

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

DISSERTATION

**Untersuchung von zellulärer Plastizität in der Subventrikulären
Zone der gesunden Wistar-Ratte nach chronischer
Hochfrequenzstimulation des Nucleus Subthalamicus**

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Antonia Sophia Owsianowski

aus Mannheim

Datum der Promotion: 27.02.2015

Inhaltsverzeichnis

ABSTRAKT	5
ABSTRACT	6
1 GRUNDLAGEN UND EIGENE ZIELSETZUNG	7
1.1 NEUROPLASTIZITÄT	7
1.1.1 <i>Adulte endogene Neurogenese</i>	7
1.1.2 <i>Die Subventrikuläre Zone</i>	8
1.2 DAS IDIOPATHISCHE PARKINSONSYNDROM	9
1.2.1 <i>Epidemiologie und Pathophysiologie des idiopathischen Parkinsonsyndroms</i>	9
1.2.2 <i>Therapie des idiopathischen Parkinsonsyndroms</i>	10
1.3 HOCHFREQUENZSTIMULATION DES NUCLEUS SUBTHALAMICUS	11
1.3.1 <i>Anatomisch-funktionelles Modell des idiopathischen Parkinsonsyndroms</i>	11
1.3.2 <i>Elektrophysiologische und biochemische Grundlagen der STN-HFS</i>	12
1.4 PROLIFERATIONSMARKER	14
1.4.1 <i>Immunhistochemischer Nachweis von Neurogenese in der Subventrikulären Zone</i>	14
1.4.2 <i>5-Bromo-2-desoxyuridin (BrdU)</i>	14
1.4.3 <i>Proliferating cell nuclear antigen (PCNA)</i>	15
1.4.4 <i>Ki-67</i>	15
1.5 EIGENE ZIELSETZUNG	16
2 MATERIALIEN UND METHODIK	17
2.1 EXPERIMENTELLES DESIGN	17
2.2 VERSUCHSTIERE, GESETZLICHE BESTIMMUNGEN UND HALTUNGSBEDINGUNGEN	18
2.3 CHRONISCHE HOCHFREQUENZSTIMULATION DES NUCLEUS SUBTHALAMICUS	18
2.3.1 <i>Das Mikrostimulationssystem</i>	18
2.3.2 <i>Implantation des Mikrostimulationssystems</i>	19
2.3.3 <i>In vivo Stimulation</i>	21
2.4 5-BROMO-2-DESOXYURIDIN-INJEKTIONEN	22
2.5 TRANSKARDIALE PERFUSION, POSTFIXIERUNG UND SCHNITTPROTOKOLL	22
2.6 IMMUNHISTOCHEMISCHE DETEKTION DER PROLIFERATIONSMARKER	23
2.6.1 <i>Allgemeine Behandlung</i>	23
2.6.2 <i>BrdU-Immunhistochemie</i>	24
2.6.3 <i>Ki-67-Immunhistochemie</i>	24
2.6.4 <i>PCNA-Immunhistochemie</i>	25
2.7 MIKROSKOPISCHE QUANTIFIZIERUNG	25
2.8 HISTOLOGISCHE ÜBERPRÜFUNG DER ELEKTRODENPOSITION	26

2.9 STATISTISCHE AUSWERTUNG.....	27
3 ERGEBNISSE	29
3.1 DEFINITION DER EINSCHLUSSKRITERIEN	29
3.2 ERGEBNIS DER IMMUNHISTOCHEMISCHEN FÄRBUNGEN	29
3.2.1 Zellmorphologie und Verteilung.....	29
3.2.2 Quantitative Analyse.....	31
3.3 ZELLPROLIFERATIVER EFFEKT DER HOCHFREQUENZSTIMULATION DES NUCLEUS SUBTHALAMICUS	33
3.3.1 Subventrikuläre Zelldichte BrdU-immunreaktiver Zellen nach 10-tägiger STN-HFS.....	33
3.3.2 Subventrikuläre Zelldichte Ki-67- und PCNA-immunreaktiver Zellen nach 10-tägiger STN-HFS.....	34
4 DISKUSSION	36
4.1 STRUKTURELLE NEUROPLASTIZITÄT UND ELEKTRISCHE HIRNSTIMULATION	36
4.1.1 Das neuroplastische Potential der tiefen Hirnstimulation des STN	36
4.1.2 Spezifität der neuroplastischen Veränderungen nach tiefer Hirnstimulation des STN.....	38
4.1.3 Mechanismen von gesteigerter Zellplastizität nach tiefer Hirnstimulation des STN.....	39
4.2 ZELLPLASTISCHER EFFEKT DURCH MIKROLÄSION DES NUCLEUS SUBTHALAMICUS	41
4.2.1 Effekttäquivalenz von STN-HFS und STN-Läsion ?	41
4.2.2 Läsionsbedingte zellplastische Effekte ?.....	42
4.3 METHODISCHE ASPEKTE.....	43
4.3.1 Beurteilung der immunhistochemischen Visualisierung der Proliferationsmarker.....	43
4.3.2 Limitationen der BrdU-Immunhistochemie	44
4.3.3 Vergleich der beiden endogenen Proliferationsmarker.....	44
4.4 AUSBLICK UND KLINISCHE RELEVANZ DER ERGEBNISSE	45
5 LITERATURVERZEICHNIS	48
ANHANG:.....	55
VERWENDETE SUBSTANZEN UND LÖSUNGEN	55
EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG	58
LEBENS LAUF	59
DANKSAGUNG	60

Abkürzungsverzeichnis

aNSCs	adulte neuronale Stammzellen; adult neuronal stem cells
BDNF	Brain-derived neurotrophic factor
BO	Bulbus olfactorius
BrdU	5-Bromo-2-desoxyuridin
DA	Dopamin
DAB	3'3 Diaminobenzinhydrochlorid
DBS	Deep brain stimulation
EGFR	Epidermal growth factor receptor
GABA	γ -Aminobuttersäure
GPe	Globus pallidus externus
GPI	Globus pallidus internus
HFS	Hochfrequenzstimulation
IPS	Idiopathisches Parkinson-Syndrom
IPG	Impulsgenerator (des Mikrostimulationssystems)
LTP	Langzeitpotentierung; Long-term potentiation
NR	Nucleus ruber
PCNA	Proliferating Cell Nuclear Antigen
RMS	Rostrales Migrationssystem
SGZ	Subgranuläre Zone
SNC	Substantia nigra, pars compacta
SNr	Substantia nigra, pars reticularis
STN	Nucleus subthalamicus
SVZ	Subventrikuläre Zone
TH	Thyrosinhydroxylase
THS	Tiefe Hirnstimulation
VIM	Nucleus ventralis intermedius thalami

Abstrakt

Einleitung: In den letzten Jahren konnte tierexperimentell eine positive Beeinflussung adulter Neurogenese in der subventrikulären Zone (SVZ) und der subgranulären Zone (SGZ), den sogenannten neurogenen Nischen, durch Dopamin (DA) nachgewiesen werden. Weiter konnte gezeigt werden, dass DA in der SVZ über Kollaterale nigro-striatale Projektionen freigesetzt wird, welche synaptisch mit proliferierenden adulten neuronalen Stammzellen (aNSCs) interagieren. Im Tiermodell konnte gezeigt werden, dass eine Hochfrequenzstimulation (HFS) des Nucleus Subthalamicus (STN) die dopaminerge nigro-striatale Transmission steigern kann. Es wurde schlussfolgernd vermutet, dass sich die STN-HFS stimulierend auf Zellproliferation in der SVZ gesunder Ratten auswirkt.

Methodik: Nach Implantation eines Mikrostimulationssystems (mit Insertion einer Stimulationselektrode in den linken STN) wurde nach 7-tägiger postoperativer Erholungsphase mit der STN-HFS begonnen. Parallel zum 10-tägigen Stimulationszeitraum erfolgten tägliche intraperitoneale BrdU (5-Bromo-2-desoxyuridin)-Injektionen. Nach transkardialer Perfusion am Tag 18 folgte die immunhistochemische Detektion von BrdU, einem exogenen Proliferationsmarker, sowie von Ki-67 und PCNA (*proliferating cell nuclear antigen*), zwei endogenen Proliferationsmarkern in der SVZ von histologisch aufgearbeiteten Schnitten. Nach mikroskopischer Zellzählung innerhalb einer prädefinierten Region (10.000µm) in der SVZ, wurde die mittlere Dichte BrdU-, Ki-67- und PCNA-immunreaktiver Zellkerne der behandelten Seite im Vergleich zur unbehandelten Seite bestimmt.

Ergebnisse: Es zeigte sich eine signifikant erhöhte Ratio (behandelte/unbehandelte Seite) BrdU-immunreaktiver Zellen in der SVZ von STN-HFS behandelten Tieren im Vergleich zur Kontrollgruppe. Auch für die endogenen Proliferationsmarker Ki-67 und PCNA zeigte sich ein tendenzieller Anstieg immunreaktiver Zellen in der ipsilateralen SVZ nach STN-HFS. Ferner zeigte sich eine verminderte Dichte BrdU, Ki-67 und PCNA immunreaktiver Zellen in der ipsilateralen SVZ im Vergleich zur kontralateralen Hemisphäre nach Implantation der Placeboelektrode in den STN.

Schlussfolgerung: Diese Studie konnte erstmals einen positiven Einfluss von STN-HFS auf die Zellneubildung in der SVZ der gesunden Ratte zeigen, wobei im Rahmen des gewählten experimentellen Ansatzes nicht abschließend zwischen einer Induktion von Zellproliferation vs. einem gesteigerten Zellüberleben als Ursache der erhöhten subventrikulären Zelldichte differenziert werden konnte. Der gleichzeitige Anstieg Ki-67 und PCNA immunreaktiver Zellen (Proliferationsfraktion) unterstützt jedoch die These einer reel gesteigerten Proliferation von aNSCs durch die STN-HFS. Im Hinblick auf die aktuelle Datenlage ist ein komplexes Zusammenwirken mehrerer ursächlicher Mechanismen wahrscheinlich. Wir vermuten, dass insbesondere eine erhöhte dopaminerge nigro-striatale Transmission sowie erhöhte Level des Wachstumsfaktors BDNF (Brain-derived neurotrophic factor) im benachbarten Striatum eine wichtige Rolle spielen.

Abstract

Background: In recent years it has been demonstrated that adult neurogenesis in distinct brain areas like the Subventricular Zone (SVZ) and the Subgranular Zone (SGZ) is influenced by Dopamine (DA). In the SVZ the release of DA most likely derives from collaterals of nigro-striatal projections whose synaptic endings contact amplifying adult neuronal stem cells (aNSCs). Since high frequency stimulation (HFS) of the Subthalamic Nucleus (STN) may increase striatal DA levels as shown previously we hypothesized that STN-HFS may facilitate cell proliferation in the SVZ of naïve (healthy) rats.

Methods: Either a customized microstimulation system (STN-HFS group) or a dummy microstimulation system (STN-SHAM group) was implanted in the left STN of naïve rats. After a recovery period of 7 days chronic STN-HFS was started. During the stimulation period of 10 days animals were daily injected with BrdU (5-Bromo-2-desoxyuridin). Immunocytochemistry of BrdU (as an exogen marker of proliferation), as well as PCNA (*proliferating cell nuclear antigen*) and Ki-67 (as endogenous markers of proliferation) was performed in defined striatal sections containing the SVZ. After microscopically assisted cell counting the ratio of the mean cell density of BrdU-, Ki-67- and PCNA-positive cells within a predefined area (10.000µm) inside the SVZ between treated and untreated side was assessed and compared between the groups.

Results: As a result, the ratio (treated/untreated side) of BrdU-positive cells was significantly higher in animals of the STN-HFS group compared to controls. Although there were no significant changes in the number of Ki-67 or PCNA positive cells following STN-HFS we could document a higher cell count in the ipsilateral SVZ of animals treated with STN-HFS compared to the untreated side. Furthermore we observed a repressive effect of dummy electrode implantation on BrdU-, Ki-67- and PCNA- positive cells in the SVZ of the affected compared to the unaffected side.

Conclusions: These data provide first evidence that chronic STN-HFS may increase the absolute number of newly formed cells in the SVZ of naïve rats. The design of the present study did not allow differentiating whether this effect was due to an enhanced proliferation or a positive effect on cell survival. Nevertheless the increase of Ki-67- and PCNA-positive cells, two markers expressed by proliferating cells in the ipsilateral SVZ of animals treated with STN-HFS underlines the hypothesis of a proliferative capacity of STN-HFS in naïve rats. According to the current state of relevant studies we suppose a complexity of causal mechanisms for the cellproliferative effect of STN-HFS in the SVZ. Enhanced levels of DA and Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) in the neighboring Striatum could be the most important mechanisms.

1 Grundlagen und eigene Zielsetzung

1.1 Neuroplastizität

1.1.1 Adulte endogene Neurogenese

Der Nachweis von adulter endogener Neurogenese bei adulten Säugetieren ^{1,2}, einschließlich des Menschen ³ revolutionierte die bis dahin geltenden Annahme einer fehlenden strukturellen Neuroplastizität des erwachsenen Gehirns.

Adulte neuronale Stammzellen (adult neuronal stem cells; aNSCs) zeichnen sich durch ihre unlimitierte Selbsterneuerungskapazität sowie ihre multipotente Differenzierungsfähigkeit aus ⁴. Dabei wird der Sachverhalt, dass die aus aNSCs entstehenden Vorläuferzellen abhängig von ihrer Umgebung unterschiedliche neuroektodermale Phänotypen (neuronal, astrozytär und oligodendrozytär) ausbilden können als „neurogene Permissivität“ bezeichnet.

Der Großteil des Stammzellpools im zentralen Nervensystem des Säugers, einschließlich des Menschen, findet sich in der subventrikulären Zone (SVZ), einem jeweils paraventriculär des Seitenventrikels gelegenen Areal sowie in der subgranuläre Zone des hippocampalen Gyrus dentatus (SGZ) ⁵. Diese beiden Zonen werden aufgrund ihrer spezielle Mikroanatomie sowie ihres spezielles Mikromilieus, welche den Neurogeneseprozess fördern als „neurogene Nischen“ bezeichnet ⁶.

Tierexperimentell konnte an Nagern gezeigt werden, dass subventrikuläre neuronale Vorläuferzellen unter physiologischen Bedingungen zum Großteil im rostralen Migrationssystem (RMS) über Zell-Zell und Zell-Matrix vermittelte Kontakte zum Bulbus olfactorius (BO) migrieren, wo sie sich als GABA-erge und dopaminerge Neurone in bestehende neuronale Netzwerke integrieren können ⁷. Subgranuläre Vorläuferzellen dagegen wandern auf kürzerem Weg in die benachbarte Molekularzellschicht ein und integrieren sich dort in das Netzwerk granularer Zellen ⁸.

Die genauen Mechanismen sowie die Funktion endogener Neurogenese sind bis heute nicht abschließend geklärt. Die aktuelle Datenlage spricht jedoch dafür, dass in den neurogenen Nischen kontinuierlich neue Neurone entstehen, welche eine wichtige Rolle bei lebenslangen hippocampal vermittelten Lernprozessen, räumlichem Gedächtnis, Stimmungsregulation, sowie olfaktorischem Lernen spielen ⁹.

1.1.2 Die Subventrikuläre Zone

Anatomie der SVZ

Die Subventrikuläre Zone (SVZ) stellt sich in koronaren Hirnschnitten als schmale längliche zellreiche Struktur zwischen den Seitenventrikeln und dem Corpus striatum dar. Dorsal wird sie durch das Corpus callosum begrenzt, wo sie in das rostrale migratorische System (RMS) übergeht. Ventral erstreckt sie sich bis zum Nucleus accumbens.

In der adulten SVZ von Nagern können mindestens vier Zelltypen durch ihre typischen Expressionsmuster voneinander unterschieden werden: 1. ependymale Zellen (Typ E), welche eine Zellreihe zwischen lateralem Ventrikel und der proliferativen Zellschicht bilden; 2. astrozytenähnliche aNSCs (Typ B); 3. amplifizierende EGFR (*Epidermal Growth Factor Receptor*)-positive Zellen (Typ-C) sowie 4. neuronale Vorläuferzellen (Typ-A) ¹⁰.

Obwohl weder die oben beschriebene Architektur der SVZ noch das Existieren eines migratorischen Systems zum Bulbus olfactorius im Sinne des RMS beim Nager ^{11,12} im menschlichen Gehirn bestätigt werden konnte, fand sich doch eine analoge periventriculär gelegene proliferative Zellschicht astrozytenähnlicher aNSCs ¹³.

Regulation subventrikulärer Neurogenese – die Rolle von Dopamin

Allgemeinhin kann man sagen, dass jedes diffundierbare Molekül, das von lokalen Zellen produziert wird, sowie alle Stoffe die die Blut-Hirn-Schranke passieren können einen potentiellen Einfluss auf die subventrikuläre Neurogenese haben können ⁶. Weiterhin kommunizieren aNSCs über direkte Zell-Zell-Kontakte mit benachbarten- sowie über Transmitterfreisetzung oder direkte synaptische Kontakte mit weiter entfernten Zellen ⁶.

Dem Neurotransmitter Dopamin kommt hierbei eine besonders wichtige Rolle zu. Schon während der frühen Ontogenese sind Dopamin (DA) und seine Rezeptoren in den Keimzonen des Gehirns nachweisbar ¹⁴. Sowohl in Zellkultur als auch in-vivo konnte eine positive Beeinflussung von subventrikulären aNSCs durch dopaminerge Stimulation nachgewiesen werden. Im Umkehrschluss führte die im Tiermodell des Morbus Parkinson induzierte partielle nigrostriatale DA Depletion zu verminderter Neurogenese in den neurogenen Nischen ¹⁵.

Eine Arbeitsgruppe um Freundlieb konnte mithilfe von anterograder und retrograder Markierung von Nervenbahnen („*tracing*“) am nicht-humanen Primatengehirn erstmals Kollateralen nigrostriataler Projektionen als anatomisches Korrelat der dopaminergen Innervation in der SVZ aufzeigen ¹⁶. Dieses Ergebnis lenkte die Aufmerksamkeit vermehrt auf den Aspekt der

Neurogenese beim idiopathischen Parkinson-Syndrom des Menschen (IPS), einer Erkrankung die durch eine Neurodegeneration dopaminergener nigraler Neurone gekennzeichnet ist.

1.2 Das idiopathische Parkinsonsyndrom

1.2.1 Epidemiologie und Pathophysiologie des idiopathischen Parkinsonsyndroms

Das idiopathische Parkinson-Syndrom (IPS) oder der Morbus Parkinson, 1817 nach seinem Erstbeschreiber James Parkinson benannt, ist nach der Alzheimerschen Erkrankung die zweithäufigste neurodegenerative Erkrankung weltweit. Die Inzidenz des IPS nimmt mit einem Alter über 60 Jahre deutlich zu und beträgt bei 65-jährigen etwa 2.0, bei über 80-jährigen bereits ca. 3.0 Prozent. Somit kann das Lebensalter als wichtigster „Risikofaktor“ angesehen werden, was mit Blick auf eine zunehmende Lebenserwartung der Weltbevölkerung auch eine Zunahme dieser neurodegenerativen Erkrankungen bedeutet. Nach Schätzungen der „Deutschen Parkinson Gesellschaft e.V.“ sind allein in Deutschland etwa 250 000 bis 280 000 Personen von der Erkrankung betroffen, mit zunehmender Tendenz. Klinisch ist die Erkrankung typischerweise durch eine akinetisch-rigide Bewegungsstörung mit Ruhetremor sowie reduzierter Haltungsvermögen gekennzeichnet. Im Krankheitsverlauf kommt es darüber hinaus zu kognitiven, emotionalen und vegetativen Symptomen, welche als nicht-motorische Symptome (NMS) zusammengefasst werden. Zu den häufigsten NMS zählen Depression, dementielle Entwicklung sowie autonome und olfaktorische Dysfunktion, welche der Manifestation der motorischen Symptome oft schon Jahre vorausgehen¹⁷.

Pathophysiologisches Korrelat der Erkrankung ist zum einen ein ausgeprägter progressiver Zelltod dopaminergener Neurone in der Substantia nigra, pars compacta (SNc), welcher sich hauptsächlich in einem striatalen Dopaminmangel manifestiert. Zum anderen kommt es zur ubiquitären Akkumulation intrazytoplasmatischer Einschlüsse, die hauptsächlich aus dem Protein Alpha-Synuclein bestehen (sogenannter Lewy-Körperchen und Lewy-Neuriten), ein ubiquitäres stereotypes Ausbreitungsmuster aufweisen und deren Nachweis die Diagnose IPS post-mortem sichern kann¹⁸.

Die Ätiologie des sporadischen IPS ist weiterhin unbekannt und möglicherweise auch nicht einheitlich. Gegenwärtig wird vielmehr eine multifaktorielle Genese postuliert (sogenannte *multiple hits hypothesis*), wonach insbesondere das Zusammenwirken von toxischem Stress (u.a. durch Oxidation von Dopamin sowie mitochondriale Dysfunktion) und eine Inhibition von

neuroprotektiven Mechanismen (i.e. Beeinträchtigung von autophagotytischen Prozessen ¹⁹) als grundlegend für den selektiven neuronalen Zelltod angesehen werden ²⁰.

Die Pathomechanismen, die zu einer Propagation des nigralen Zelltodes beitragen, sind dagegen besser verstanden. Zu nennen ist hier vor allem eine vermehrte glutamaterge Exzitotoxizität in der SN durch Desinhibition des STN in Kombination mit einer mangelhaften neuroprotektiven Kapazität ^{21,22}.

1.2.2 Therapie des idiopathischen Parkinsonsyndroms

Das IPS ist bis heute nicht kurativ behandelbar. Aktuelle Therapiestandards müssen daher als symptomatisch angesehen werden. Derzeit können zwei prinzipielle Therapiestrategien voneinander unterschieden werden: die Pharmakotherapie sowie neuromodulative Verfahren.

Die pharmakologische Modulation zielt in erster Linie auf eine Re-Äquilibration des pathologischen Transmitterungleichgewichts ab, welches durch das striatale Dopamindefizit hervorgerufen wird. Zum einen kommen dopaminagonistisch wirkende Substanzen (Levodopa, Dopaminagonisten sowie Modulatoren des Dopaminstoffwechsels [MAO]-B-Hemmer, [COMT]-Hemmer), zum anderen Substanzen welche das Transmitterlevel antagonistisch wirkender Neurotransmitter reduzieren (Glutamat-Antagonisten, Anticholinergika) zum Einsatz. Goldstandard ist wegen seiner besten Wirksamkeit seit den 1960er Jahren die medikamentöse DA-Ersatztherapie mit Levodopa (L-Dopa). L-Dopa ist eine Vorstufe von Dopamin und wird nach Passage der Blut-Hirn-Schranke von den dopaminergen Neuronen aufgenommen und durch Decarboxylierung in „endogenes“ Dopamin überführt. In der Frühphase der Erkrankung kann die L-Dopa Therapie über mehrere Jahre alle Kardinalsymptome (Akinese > Rigor > Tremor) effektiv mindern. Der Therapieerfolg wird jedoch im Verlauf der Erkrankung durch Wirkungsfluktuationen und L-Dopa-induzierte Dyskinesien (unkontrollierte Überbewegungen) gemindert ²³. Diese Symptome werden unter dem Begriff des L-Dopa-Langzeitsyndroms, zu dem auch psychiatrische Symptome zählen ²⁴, zusammengefasst. Nach 5-jähriger L-Dopa-Therapie entwickeln etwa 50% der Patienten ein L-Dopa-Langzeitsyndrom, wobei die Inzidenz mit der Dosis und Dauer der Therapie ansteigt ²⁵. Das Interesse an alternativen Therapieverfahren blieb daher trotz überwiegend guter Symptomkontrolle unter der L-Dopa Behandlung groß.

Vor diesem Hintergrund erlangte die Erstbeschreibung der sogenannten tiefen Hirnstimulation (THS, im Englischen „deep brain stimulation“) als mögliche alternative Therapiestrategie Ende der 1980er Jahre große Aufmerksamkeit. Nachdem die Arbeitsgruppe um den französischen

Neurochirurgen Alim-Louis Benabid eine ähnlich gute Symptomkontrolle durch die elektrische Stimulation des Nucleus ventralis intermedius des Thalamus (VIM), im Vergleich zur Ablation dieses Kerngebiets, wie sie zur Therapie des essentiellen Tremors angewendet wurde, hatte zeigen können²⁶, wurden weitere basalganglionäre Zielstrukturen für die THS evaluiert. Ende der 90er Jahre wurde dann die Hochfrequenzstimulation des Globus pallidus internus (GPi) sowie des Nucleus subthalamicus (STN) in Europa zur Therapie des IPS zugelassen. Abbildung 1 zeigt die stereotaktische Operationssituation vor Implantation der Stimulationselektroden.



Abbildung 1 (aus www.medillsb.com):
Stereotaktischer Rahmen zur Implantation
der Stimulationselektroden

1.3 Hochfrequenzstimulation des Nucleus Subthalamicus

1.3.1 Anatomisch-funktionelles Modell des idiopathischen Parkinsonsyndroms

Ende der 1980er Jahre wurde auf dem Boden von Beobachtungen am Primatenmodell des IPS²⁷ sowie postmortalen Untersuchungen am menschlichen Gehirn ein Basalganglienmodell entworfen, welches zum Ziel hatte die Basalganglienschleife sowie deren Dysfunktionen vereinfacht darzustellen^{28,29}. Dem Modell zufolge können zwei parallele “Signalwege” zur Transmission kortikaler motorischer Information in die Ausgangsstrukturen der Basalganglien (GPi/SNr) unterschieden werden: der D1-Rezeptor vermittelte direkte Signalweg (Kortex-Striatum-GPi/SNr) und der D2-Rezeptor vermittelte indirekte Signalweg (Kortex-Striatum-GPe-STN-GPi/SNr). Die Ausgangsstrukturen wiederum hemmen, dem Modell zufolge, die erregende Thalamusaktivität auf den Kortex und regulieren so Bewegungsabläufe.

Während in der physiologischen Situation ein Gleichgewicht zwischen direktem- und indirektem Signalweg angenommen wird, führt ein striataler Dopaminmangel, wie beim IPS, zu einem Überwiegen des indirekten Signalwegs und so zu einer Hyperaktivität des STN mit der Folge

einer Hemmung thalamo-kortikaler motorischer Impulse ³⁰ (vergleiche Kapitel 1.2.1). Inhibiert man nun diesen hyperaktiven STN durch HFS käme es zu einer Wiederherstellung erregender und hemmender Impulse auf den Thalamus und so zu einer Normalisierung von Bewegungskreisläufen (vergleiche Abbildung 2).

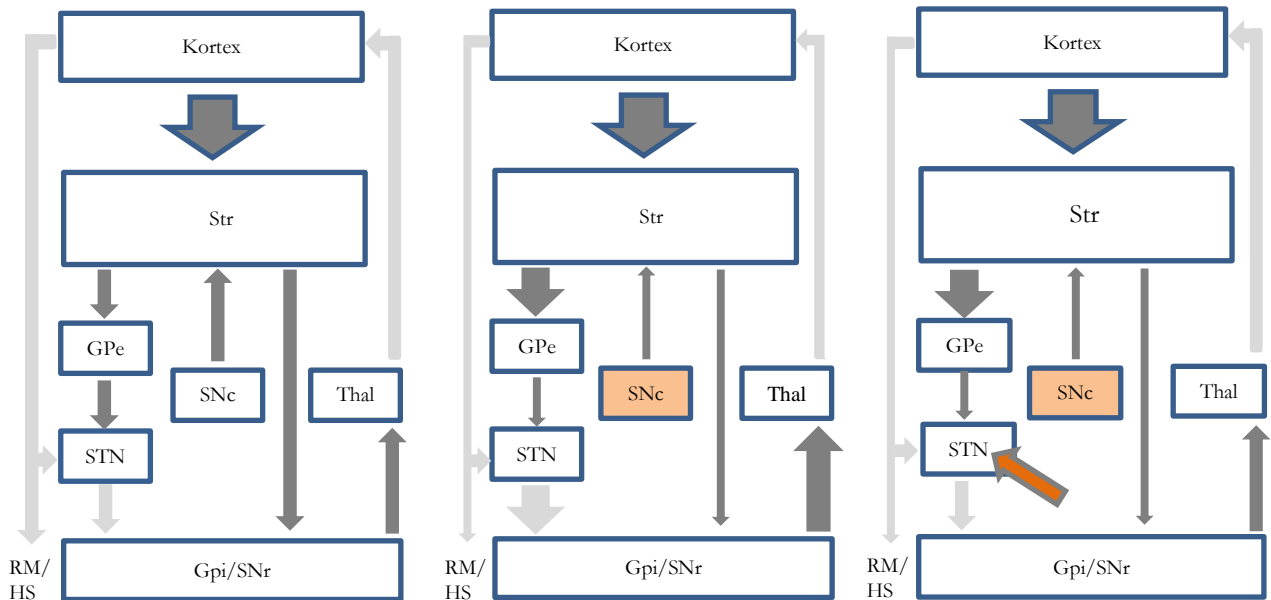


Abbildung 2 (modifiziert nach Alexander et al. 1990 ²⁹; Wichmann und DeLong 1996 ³¹): Basalganglienschleife in der gesunden Situation (links), beim IPS (mitte) und unter STN-HFS (rechts). Der orangene Pfeil repräsentiert die STN-HFS, welche zu einer Hemmung von STN-Neuronen und, dem Modell nach, in der Folge zu einer Enttötung von Bewegungsimpulsen führt. Erregende glutamaterge Verbindungen sind durch helle Pfeile, hemmende GABAerge Verbindungen durch dunkle Pfeile dargestellt. Die Breite der Pfeile repräsentiert das Ausmaß der Aktivierung bzw. Hemmung. STR: Striatum; GPe: Globus pallidus externus; Gpi: Globus pallidus internus; SNc: Substantia nigra, pars compacta; SNr: Substantia nigra, pars reticularis; Thal: Thalamus; STN: Nucleus subthalamicus; RM: Rückenmark; HS: Hirnstamm

1.3.2 Elektrophysiologische und biochemische Grundlagen der STN-HFS

Aufgrund der in der Vergangenheit schwierigen technischen Umsetzung in Tiermodellen konnte dieser Erklärungsansatz bisher nur teilweise belegt werden und die genauen Mechanismen der STN-HFS, welche zu einer Re-Äquilibration der gestörten Bewegungsabläufe führen sind, trotz der guten klinischen Erfolge, bis heute nicht im Detail verstanden. Es existieren jedoch mittlerweile zahlreiche experimentelle und klinische Arbeiten welche sich mit den prinzipiellen

Wirkmechanismen dieses vielversprechenden neuromodulativen Verfahrens auseinander gesetzt haben. Präklinische insbesondere elektrophysiologische Techniken und neurochemische Analyseverfahren sind hierbei von großer Wichtigkeit. Ausgehend von der klinischen Beobachtung, dass läsionelle Verfahren der stereotaktischen Neurochirurgie einen HFS-äquivalenten klinischen Effekt induzieren können, vertrat man lange Zeit die Vorstellung, dass die HFS des STN zu einer funktionellen Inhibition dieses Basalganglienkerne (vereinbar mit dem oben beschriebenen Basalganglienmodell) führt. Zwar konnten elektrophysiologische Untersuchungen eine neuronale Inhibition bestätigen^{32,33}, aktuellere Ansätze sind jedoch deutlich komplexer und beziehen u.a. auch die Auswirkung der STN-HFS auf anderer Kernregionen mit ein³⁴. Mittlerweile geht man von einem dualen Effekt der HFS auf die elektrische Aktivität der STN-Neurone aus, wonach die elektrische Stimulation simultan zu einer Inhibition der Nervenzellkörper und einer Exzitation der Axone führt („*Uncoupling*“) ³⁵. Ferner konnte gezeigt werden, dass es je nach Intensität der Stimulation zu divergenten Effekten, also entweder einer Suppression (niedrige Intensität) oder eine Aktivierung (hohe Intensität) von Neuronen kommen kann³⁶.

Auf Transmitterebene zeigen sich im Tiermodell der STN-HFS multiple Modifikationen. So konnten Änderungen in der Glutamat-, GABA-, und Dopaminausschüttung innerhalb der Basalganglien nachgewiesen werden³⁴. Vor dem Hintergrund der Fragestellung dieser Studie (vergleiche Kapitel 1.5) ist eine Beeinflussung des DA-Transmitterstoffwechsels durch STN-HFS von besonderem Interesse. So konnte eine vorangegangene Studie unserer Arbeitsgruppe erhöhte striatale Transmitterlevel sowohl bei der gesunden Ratte, als auch im Rattenmodell des IPS aufzeigen³⁷.

Welche Effekte die relevantesten für die motorischen Verbesserungen unter STN-HFS sind, ist jedoch weiter ungeklärt. Neuere experimentelle Studien haben folglich zum Ziel die durch STN-HFS ausgelösten Effekte unabhängig voneinander zu untersuchen und diese mit Verhaltenseffekten zu korrelieren. Interessante Ergebnisse einer Studie von *Gradinaru et al.* (2009) lassen vermuten, dass es die direkte Aktivierung von efferenten glutamatergen kortikalen Axonen im STN (*hyperdirekter Signalweg versus direkter und indirekter Signalweg des ursprünglichen Basalganglienmodells*) ist welche für die Stimulation für die motorische Symptomkontrolle ausschlaggebend sein könnte³⁸.

Ein weiterer populärer Erklärungsansatz basiert auf elektrophysiologischen Ableitungen der Basalganglienstrukturen, welche nach Beobachtung einer Re-Rhythmisierung von für das IPS charakteristischen „abnormal synchronisierten Oszillationen“ (β -Oszillationen) im STN sowie

Globus pallidus durch die applizierten elektrischen Impulse die Beeinflussung der zeitlichen Aspekte der Erregungsmusters in den Fokus rücken^{39,40}.

1.4 Proliferationsmarker

1.4.1 Immunhistochemischer Nachweis von Neurogenese in der Subventrikulären Zone

Aufgrund ihres unspezifischen Expressionsmusters gibt es bis dato keine etablierte immunzytochemische Methode aNSCs oder die aus ihnen entstandenen jungen Neurone direkt nachzuweisen (zur Übersicht siehe *Landgren and Curtis, 2010*⁵). Um das Ausmaß von Neurogenese in der SVZ zu messen, kommen daher typischerweise klassische Proliferationsmarker zur Anwendung, welche zur genaueren Phänotypisierung als Neurone mit unterschiedlichen neuronenspezifischen Phänotypisierungsmarkern kombiniert werden müssen. Proliferationsmarker werden in exogene- und endogene Marker unterteilt. Beide Typen können post-mortem im alkohol- oder formalinfixierten Material mithilfe von verschiedenen monoklonalen Antikörpern nachgewiesen werden. Als endogene Marker fungieren zelleigene mit der Zellproliferation assoziierte Proteine. Diese werden von der proliferierenden Zelle während des Zellzyklus exprimiert (vergleiche Abbildung 3). Exogene Marker dagegen werden auf unterschiedliche Art in den Organismus eingebracht und sekundär von proliferierenden Zellen aufgenommen.

1.4.2 5-Bromo-2-desoxyuridin (BrdU)

BrdU, ein DNA-Basen-Thymidinanalogon, ist der am häufigste verwendete exogene Proliferationsmarker. Initial kam er vor allem in der Tumordiagnostik zum Einsatz. Je nach Fragestellung kommen zwei Applikationsregime zur Anwendung. Soll die Proliferationsfraktion eines Gewebes untersucht werden wird eine gepulste Applikation mit mehrfachen Injektionen im Abstand von 30 Minuten bis zu 3 Stunden über einen Zeitraum von bis zu 3 Tagen (*pulse labeling*) empfohlen. Bei sich langsam teilenden Geweben sowie zur Markierung einer möglichst großen Zellpopulation neu entstandener Zellen sind wiederholte Applikationen über mehrere Tage von Vorteil (*cumulative labeling*)⁴¹.

BrdU kann intraventrikulär, intraperitoneal, intravenös oder oral appliziert werden. Befindet sich der Stoff im Kreislauf, wird er von sich in der Synthese-Phase (S-Phase) befindenden Zellen

aufgenommen und in die DNA integriert. Zum immunhistochemischen Nachweis des Markers wird die DNA durch eine Säure- oder Hitzebehandlung denaturiert, da nur einzelsträngige DNA eine Antikörperbindung erlaubt.

1.4.3 Proliferating cell nuclear antigen (PCNA)

PCNA ist ein nukleäres Hilfsprotein der DNA-Polymerase delta und wird während der DNA-Synthese und DNA-Reparatur exprimiert. Die Expression des Proteins beginnt in der G1-Phase, erreicht ein Maximum in der S-Phase und klingt in der G2- und M-Phase wieder ab (vergleiche Abbildung 3). Aufgrund einer langen Halbwertszeit von 8-20 Stunden kann PCNA jedoch zum Teil noch in der frühen G0-Phase nachweisbar sein⁴². In der Zelle kommt es in zwei Formen vor: in einer nukleoplasmatischen Form, die auch in ruhenden proliferativen Zellen vorhanden ist und in einer DNA-abhängigen Form, welche ausschließlich mit der DNA-Replikation assoziiert ist⁴³.

1.4.4 Ki-67

Die Bezeichnung Ki-67 erfolgte in Anlehnung an die Stadt Kiel bzw. die Anzahl des originalen Klons in einer 96-Well Platte. Es handelt sich um ein nicht genau identifiziertes nukleäres nicht-Histon Protein, welches von allen Säugetieren in proliferierenden Zellen exprimiert wird⁴⁴. Wie BrdU kam es initial hauptsächlich in der Tumordiagnostik zum Einsatz. Sein Expressionsmuster ähnelt dem von PCNA. Es ist jedoch aufgrund einer kurzen Halbwertszeit von einer Stunde nur sehr selten in der G0- Phase und in der frühen G1- Phase detektierbar. Im Unterschied zu PCNA hat es damit jedoch den Vorteil auch Zellen, welche wieder in den Zellzyklus eingetreten sind, nachweisen zu können⁴⁵.

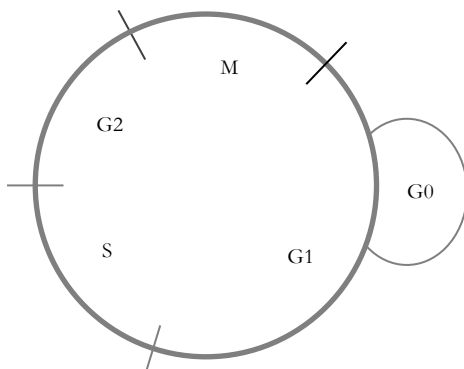


Abbildung 3: Schematische Darstellung des Zellzyklus.

G1: präsynthetische Phase; S: DNA-Synthese-Phase;

G2: prämitotische Phase; M: Mitose-Phase; G0: Ruhephase

1.5 Eigene Zielsetzung

Eine positive Beeinflussung von subventrikulärer Neurogenese durch Dopamin konnte wiederholt in der experimentellen Situation beim Nager sowie Primaten nachgewiesen werden¹⁵. Das physiologische Korrelat dieser dopaminergen Innervation der SVZ sind am wahrscheinlichsten Kollateralen nigro-striataler dopaminerger Projektionen¹⁶.

Der Nachweis von gesteigerten striatalen DA Transmitterleveln nach kontinuierlicher Hochfrequenzstimulation des Nucleus subthalamicus (STN-HFS) bei der Ratte durch unsere Arbeitsgruppe³⁷ führte daher schlussfolgernd zu der Annahme, dass STN-HFS zu einer DA-vermittelten Stimulation von Neurogenese in der SVZ führt.

Zur Überprüfung der Hypothese wurde die Auswirkung von 10-tägiger unilateraler STN-HFS auf die Zellproliferation in der SVZ bei der gesunden Ratte untersucht. Hierfür kam ein exogener Proliferationsmarker (BrdU) sowie zwei endogene Proliferationsmarker (PCNA, Ki-67) zur Anwendung.

Die Untersuchung von zellproliferativen Effekten am gesunden Tier im Gegensatz zum partiell DA-depletierten Tier in Analogie zum IPS des Menschen, hatte den Vorteil, dass der stimulationsbedingte zellproliferative Effekt unabhängig vom repressiven Effekt gemessen werden konnte, welche die nigro-striatale DA-Depletion auf Neurogenese in der SVZ hat¹⁵.

2 Materialien und Methodik

2.1 Experimentelles Design

Für diese Studie wurden insgesamt 20 Tiere (n=20) operiert, wobei 10 Tieren ein Mikrostimulationssystem (STN-HFS Gruppe) und 10 Tieren eine dem Stimulationssystem in Form und Größe entsprechende Attrappe implantiert wurde. Die operative Prozedur am Tag 1 erfolgte nach einer Woche Adaptationszeit an die neuen Haltungsbedingungen. Im Anschluss an eine postoperative Regenerationszeit von 7 Tagen unter Einzelhaltung mit Standardbedingungen, wurde am Tag 8 mit der chronischen Stimulation (STN-HFS) begonnen welche für 10 Tage kontinuierlich aufrecht erhalten wurde. Im gleichen Zeitraum erfolgten tägliche intraperitoneale Injektionen von BrdU (50mg/kgKG i.p.). Nach Tötung der Tiere an Tag 18 erfolgten die Explantation des Mikrostimulationssystems sowie die Entnahme und nachfolgende Prozessierung des Gehirns. Abbildung 4 zeigt das experimentelle Design der STN-HFS Gruppe.

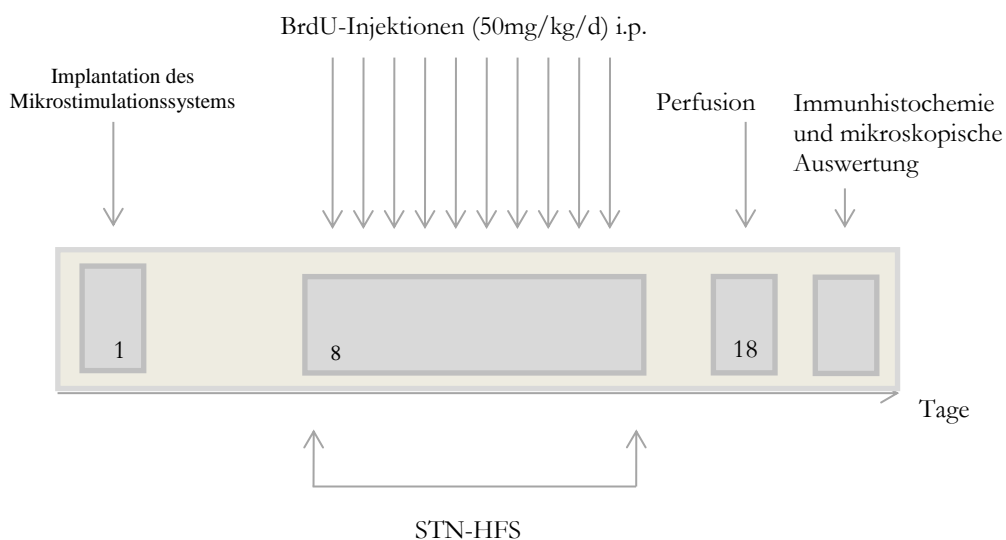


Abbildung 4: Experimentelles Design der STN-HFS Gruppe

2.2 Versuchstiere, Gesetzliche Bestimmungen und Haltungsbedingungen

Die für diese Studie durchgeführten Tierversuche wurden vom Landesamt für Gesundheit und Soziales (LAGeSo Berlin) unter der TVV-Nummer G0228/10 genehmigt. Die Umsetzung sämtlicher Versuche im Rahmen der Studie richtete sich nach den Bestimmungen des Tierschutzgesetzes §8 Absatz 1 der Bundesrepublik Deutschland.

Die Versuche erfolgten an männlichen Wistar-Ratten (Harlan-Winkelmann, Borcheln, Deutschland). Zum Zeitpunkt der stereotaktischen Operation betrug das Gewicht der Tiere zwischen 250g und 300g.

Die Haltungsbedingungen entsprachen den Vorgaben der *“European Community Council Directive of 24 November 1986 for the care of laboratory animals and local regulations”* (86/609/EEC). Vor Versuchsbeginn wurden die Tiere in Standardkäfigen (70x40x20cm) zu je vier Tieren gehalten. Nach der Operation wurden sie in standardisierte Einzelkäfige (42x26x18cm) umgesetzt um gegenseitige Manipulationen im Operationsareal zu vermeiden. Präoperativ erfolgte eine einwöchige Eingewöhnungsphase an die Temperatur- und Feuchtigkeits- kontrollierte Umgebung (18°C, 50% Luftfeuchtigkeit) sowie an einen 12-Stunden hell-dunkel Rhythmus (Tagesphase von 6.00 bis 18.00 Uhr). Futter (Altromin-1324-Standardfutter; Altromin, Lage, Deutschland) und Wasser standen nach Belieben zur Verfügung.

2.3 Chronische Hochfrequenzstimulation des Nucleus Subthalamicus

2.3.1 Das Mikrostimulationssystem

Für diese Studie wurde ein komplett implantierbares und von extern programmier- und überwachbares Mikrostimulationssystem verwendet, dessen Einzelheiten an anderer Stelle ausführlich beschrieben wurden (*Harnack et al., 2008*⁴⁶). Kurz zusammengefasst besteht das System aus *i*) einem miniaturisierten Impulsgenerator (Breite x Länge x Höhe: 1cm x 2cm x 0.5 cm, Gewicht ca. 10g), *ii*) einer monopolaren Stimulationselektrode aus aktiviertem Iridium, *iii*) einem zweiteiligen Kabelsystem (welches die Konnektierbarkeit zwischen Elektrode und Stimulator während der OP ermöglicht) und *iv*) einer Induktionsspule (welche die vom externen Programmiergerät generierten Stimulationsparameter [Frequenz, Stromstärke, Pulsweite, Stimulationsform: alternierend/kontinuierlich] amplifiziert) (vergleiche Abbildung 5). Dieses System wurde eigens für Langzeitversuche der tiefen Hirnstimulation im Tiermodell von der Charité (Medizinisch Technische Labore, MTL) entwickelt und bereits erfolgreich getestet^{46,47}.

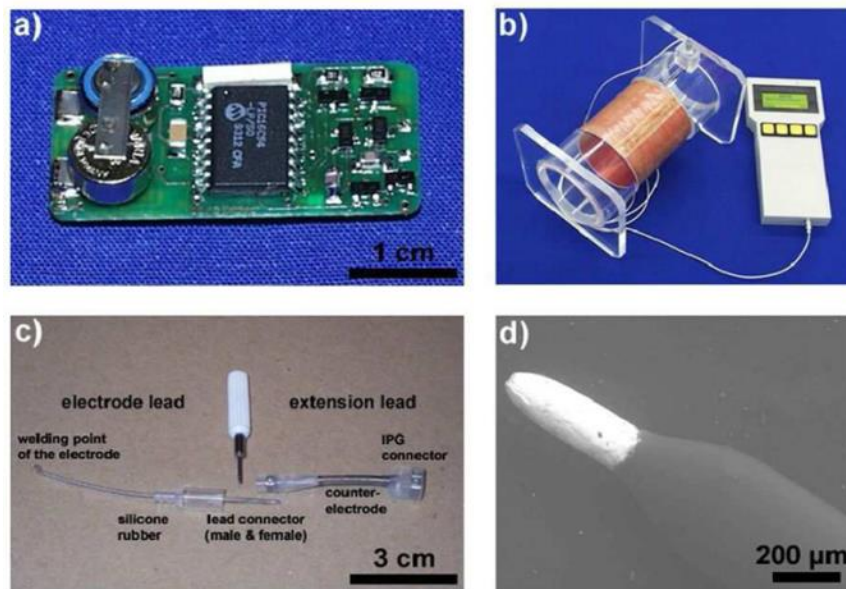


Abbildung 5 (aus Harnack *et al.*, 2008⁴⁶): a) Impulsgenerator, b) Induktionsspule und externer Programmierer, c) subkutanes Kabelsystem, d) monopolare Semi-Mikroelektrode.

2.3.2 Implantation des Mikrostimulationssystems

Vorbereitungen und perioperative Maßnahmen

Die Operation dauerte pro Tier ein bis zwei Stunden und erfolgte unter semisterilen Bedingungen. Das Mikrostimulationssystem wurde vor der Operation plasmasterilisiert, alle chirurgischen Instrumente sowie Teile des stereotaktischen Rahmens wurden autoklaviert. Nach initialer Narkose (0,9 ml Ketamin 10% [Serumwerk Bernburg AG, Bernburg, Deutschland], 0,7 ml Xylazin 2% [Bayer Health Care, Leverkusen, Deutschland] ad 2 ml NaCl 0,9%, davon 0,16 ml/100kg Körpergewicht i.p.) wurden die Operationsareale am Kopf sowie an der linken mediolateralen Thoraxwand mithilfe eines elektrischen Handrasierers rasiert. Zum Schutz vor Infektionen und zum Feuchthalten der Kornea wurde eine Gentamicin Augensalbe appliziert. Eine adäquate Körpertemperatur wurde während der Operation durch beheizbare Wärmematten und postoperativ durch eine elektrische Heizplatte gewährleistet. Zur postoperativen Analgesie erfolgte eine orale Gabe von 100µl Novaminsulfon. Ab dem 2. postoperativen Tag erfolgte eine tägliche Kontrolle von Wundheilung, Nahrungsaufnahme und Gewicht der Tiere.

Berechnung der STN-Koordinaten

Die Berechnung der STN-Koordinaten basiert auf dem stereotaktischen Atlas des Rattengehirns von Paxinos und Watson ⁴⁸. Dabei erfolgt die Lokalisation des linken STN der im stereotaktischen Rahmen eingespannten Ratte in drei Ebenen: anterior-posterior (AP), medio-lateral (ML) und ventro-dorsal (VD). Die Berechnungen orientierten sich an zwei Orientierungsstrukturen: 1. der Interaurallinie und 2. dem Schnittpunkt (Bregma) von Kranznaht (Sutura coronalis) und Pfeilnaht (Sutura sagittalis).

	Interaural	Bregma
anterior-posterior	+ 5.7	- 3.6
medio-lateral		2.5
ventro-dorsal		- 8.4

Tabelle 1: STN-Koordinaten des linken STN nach dem stereotaktischen Rattenatlas von Paxinos und Watson, 1998 ⁴⁸

Implantation der Mikrostimulationselektrode

Vor dem Einspannen des Tieres in den stereotaktischen Rahmen (David Kopf Instruments, Tujunga, USA) wurde die an einem stereotaktischen Arm befestigte Elektrode zunächst auf die interaural bezogene AP-Koordinate des STN kalibriert. Nach dem Einspannen wurde die Kopfhaut eröffnet, subkutanes Gewebe entfernt sowie verletzte Gefäße mithilfe eines Thermocouters (Bovie Aaron Mecical, St.Petersburg, USA) verödet. Im nächsten Schritt erfolgte die Kalibrierung der Elektrodenspitze auf den Bregmapunkt und die Berechnung der auf das Bregma bezogenen Koordinaten für den STN. Die interaural bezogene AP-Zielpunktcoordinate wurde mit der des Bregmas gemittelt, wohingegen die ML- und DV-Koordinaten ausschließlich auf das Bregma bezogen wurden. Die Elektrode wurde nun auf die errechneten AP und ML Koordinaten des STN kalibriert. Mithilfe eines Dentalbohrers (Durchmesser des Bohrloches <1 mm) wurde der Schädelknochen an der entsprechenden Stelle trepaniert und die darunter liegende Hirnhaut (Dura mater) mittels 27G-Kanüle penetriert. Anschließend erfolgte die Absenkung der Mikroelektrode in den STN gemäß der VD Koordinate (vergleiche Abbildung 6). Die Fixierung der Elektrode erfolgte durch Modellierung eines Sockels aus Kunstzement (Technovit® Heraeus-Kulzer, Hanau, Deutschland) unter Einbeziehung zweier an der Kalotte angebrachter Verankerungsschrauben. Anschließend erfolgte der adaptive Verschluss der Kopfhaut durch einfache Hautnaht.

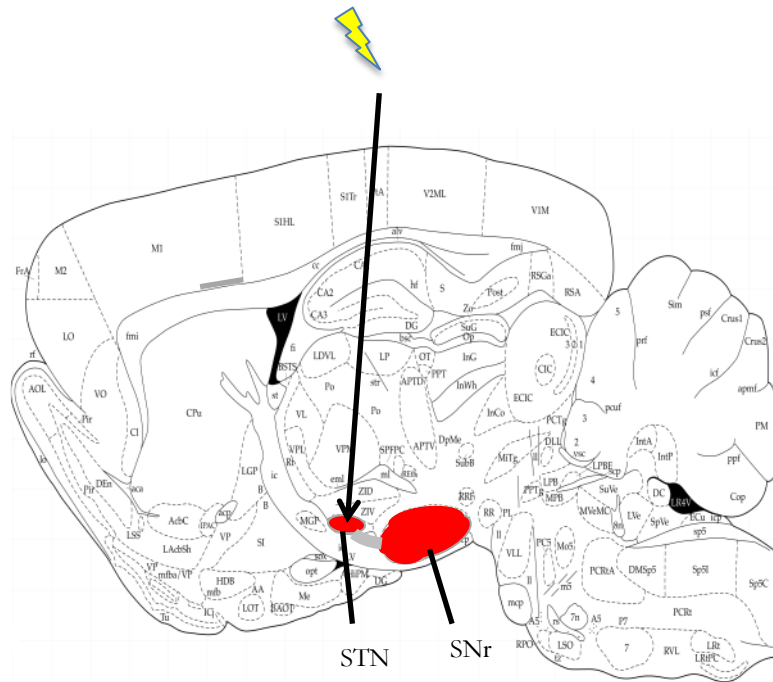


Abbildung 6 (modifiziert nach Paxinos und Watson 1998 48): Schematische Darstellung der Stimulationselektrode im linken STN sowie Übersicht über die anatomische Lage von STN und SNr (rot markiert). Dargestellt ist ein Sagittalschnitt 2.4 mm lateral von der Medialebene.

Implantation des Impulsgenerators und Konnektion mit der Elektrode

Nach mehrfacher Desinfektion (mit Povidoniod) und Abkleben der Haut (OP-Folie) über der rasierten dorsolateralen Thoraxwand erfolgt die Inzision der Oberhaut in Längsrichtung des Tieres (Länge ca. 2.0 cm). Nach Elektrokauterisation kleinerer venöser Gefäße wurde kaudal und lateral beider Schulterblätter eine Subkutantase präpariert. Im Anschluss wurde von kranial aus ein subkutaner Kanal geschaffen durch den das Elektrodenkabel gezogen und nach Einlage des Stimulators lateral der Wirbelsäule mit diesem konnektiert wurde. Die Konnektion erfolgt mithilfe einer Stellschraube sowie anschließender Abdichtung durch eine mit flüssigem Silikon gefüllte Silikonhülle. Der Stimulator wurde nun mithilfe von resorbierbarem Nahtmaterial am Subkutangewebe fixiert. Zuletzt wurde die Inzisionsstelle durch Einzelknopfnähte verschlossen.

2.3.3 In vivo Stimulation

Am 8. postoperativen Tag wurde mit der kontinuierlichen Stimulation (HFS) des STN begonnen. Das Einschalten des Stimulators erfolgte elektromagnetisch über das Programmiergerät. Die

Tiere wurden dafür kurzzeitig in die Induktionsspule gesetzt (vergleiche Abbildung 5b). Die Stimulationsparameter wurden wie folgt definiert: Frequenz $f=131$ Hz, Pulsweite $PW=52$ μ s, Stromstärke $i=100$ μ A. Während sich f und PW an der klinischen Situation orientierten (typische THS Parameter bei Parkinsonpatienten), wurde die gewählte Stimulationsamplitude hinsichtlich einer Vermeidung von Angst- und Schreckreaktionen, unwillkürlicher Bewegungen oder der Induktion gewebsschädigender Effekte an die tierexperimentelle Situation angepasst^{46,47}.

Um eine suffiziente Stimulation (HFS) im Langzeitverlauf sicherstellen zu können, erfolgte innerhalb des Beobachtungszeitraums dreimal eine in-vivo-Detektion des Stromflusses mithilfe eines speziellen Signalrecorders. Dazu wurden dem Versuchstier zur Registrierung der Stromsignale kurzzeitig (<10 s) zwei selbstklebende EMG-Oberflächenelektroden, die mit einem Recorder und einem Oszilloskop verbunden waren, palmarseitig auf den Hinterpfoten platziert.

2.4 5-Bromo-2-Desoxyuridin-Injektionen

Über die gesamte Dauer der STN-HFS wurden die Tiere täglich einer intraperitonealen BrdU-Injektion (50 mg/Kg KG; SIGMA Chemie, Deisenhofen, Deutschland) unterzogen. Vor der Applikation wurde die Substanz in 0,5 ml/100g KG steriler physiologischer Kochsalzlösung gelöst und durch einen Spritzenfilter filtriert. Dann erfolgte die intraperitoneale Injektion. Die letzte Injektion erfolgte 24 Stunden vor Beendigung des Experiments.

2.5 Transkardiale Perfusion, Postfixierung und Schnittprotokoll

Am Ende des Beobachtungszeitraums wurden die Tiere in finaler Narkose mit 500mg/kg KG Chloralhydrat (Merck, Darmstadt, Deutschland) i.p. durch transkardiale Perfusion getötet. Zunächst erfolgte die Perfusion mit 80 ml phosphatgepufferter Salzlösung (PBS 0,1%) zur Konditionierung des Hirngewebes. Nachfolgend wurde das Gewebe durch Perfusion mit 250 ml gekühlter 4-prozentiger Paraformaldehydlösung fixiert.

Im Anschluss erfolgte die Explantation des Mikrostimulationssystems, wobei für die Entfernung des Elektrodensockels eine motorgetriebene Korundscheibe verwendet wurde (siehe *Harnack et al 2008*⁴⁶). Nach Dekapitation und vorsichtiger Entnahme des Gehirns erfolgte dessen Postfixierung für weitere zwölf Stunden in selbigem Fixativ (PFA 4%).

Zur Kryoprotektion erfolgte eine osmotische Entwässerung durch Lagerung in Saccharoselösungen aufsteigender Konzentrationen (10%-20%-30%) für je 24 Stunden. Im Anschluss wurden die Gehirne in flüssigem Stickstoff bei -60 bis -80°C eingefroren. Die Gewinnung von 30µm dicken Hirnschnitten erfolgte mittels Gefriermikrotom (Cryostat 1800; Reichert-Jung, Deutschland) bei -20°C nach dem in Tabelle 2 aufgeführten Schnittprotokoll. Rostrale Hirnschnitte welche die SVZ enthielten wurden bis zur weiteren Verarbeitung frei flottierend in einer kryoprotektiven Lösung (Walter's Antifreeze) bei -20 °C gelagert. Die weiter kaudal gelegenen Hirnschnitte auf Höhe des STN auf denen die Trajektorie der Elektrode zu detektieren war, wurden direkt auf Objektträger aufgezogen.

Hirnregion	Stereotaktische Koordinaten
Vordere SVZ	2.2-1.6
SVZ/Striatum	1.6-(-1.3)
STN	-3.6-(-4.3)

Tabelle 2: Schnittprotokoll. Stereotaktische Koordinaten in mm entfernt vom Bregma nach *Paxinos und Watson, 1998* ⁴⁸

2.6 Immunhistochemische Detektion der Proliferationsmarker

2.6.1 Allgemeine Behandlung

Zuerst wurden die Schnitte aus der kryoprotektiven Lösung in phosphatgepufferte Salzlösung (PBS 0,1%) überführt. Nach immunhistochemischer Markierung der Antigene (Proliferationsmarker; siehe nächster Abschnitt) erfolgte deren Visualisierung durch enzymatische Peroxidasefärbung mit dem braunen Farbstoff 3'3 Diaminobenzinhydrochlorid (DAB), wobei für BrdU und PCNA 4-prozentiges Ammoniumnickelsulfat zur besseren Abgrenzbarkeit der Zellkerne hinzugegeben wurde. Durch Anwendung eines Avidin-Biotin-Komplexes (ABC-Elite; 9µl/ml PBS) wurde die immhistochemische Reaktion verstärkt.

Die Entwicklung erfolgte über 5-10 Minuten in einer Färbelösung bestehend aus in 0,01-prozentigem Wasserstoffperoxid und 5-prozentigem DAB.

Im Anschluss an die immunhistochemische Reaktion wurden die frei flottierenden Schnitte aus Aqua dest. auf Objektträger aufgezogen und luftgetrocknet. Es folgte eine Entwässerung durch Anwendung einer Alkoholreihe mit aufsteigenden Konzentrationen (90% Ethanol, 96% Ethanol, Propanol, Xylol für je 60 Sekunden). Anschließend wurden die Objektträger im Medium Entellan® (Merck, Darmstadt, Deutschland) eingedeckelt.

Alle für diese Studie verwendeten Substanzen und Lösungen finden sich in Tabellenform im Anhang der Arbeit. Die Konzentrationen der Sekundärantikörper sind in Tabelle 3 dargestellt.

	Primärantikörper	Sekundärantikörper
BrdU	Rat anti-BrdU monoclonal : 1:500 (Biozol-BZL20634)	Donkey anti-rat IgG biotinyliert: 1:500 (Jackson Immuno Research Laboratories- 712065150)
KI-67	Rabbit anti-Ki-67 monoclonal : 1:500 (Millipore- AB9260)	Goat anti-rabbit IgG biotinyliert: 1:1000 (Vector Laboratories-BA1000)
PCNA	Mouse anti-PCNA monoclonal: 1:500 (Dako Cytomation-M0879)	Goat anti-mouse IgG biotinyliert: 1:1000 (Vector Laboratories-BA9200)

Tabelle 3: Für die immunhistochemischen Färbungen verwendete Antikörper mit Konzentrationen und Hersteller

2.6.2 BrdU-Immunhistochemie

- 1) Blockade endogener Peroxidasen: 30-minütige Inkubation mit 0,6-prozentigem Wasserstoffperoxid
- 2) Denaturierung der DNA zum Antigenretrieval: 20-minütige Inkubation mit 2 N HCL bei 37°C, dann 10-minütige Inkubation mit 0,1 M Boratpuffer (pH 8,5) bei Raumtemperatur (RT) zur Neutralisation
- 3) Permeabilisierung der Zellmembran und Blockade unspezifischer Bindungen: 30-minütige Inkubation in *PBS-plus* bei RT
- 4) Nächtliche Inkubation mit dem Primärantikörper in *PBS-plus* bei 4°C
- 5) Vorinkubation in *PBS-plus* für 30 Minuten
- 6) Inkubation mit dem biotinylierten Sekundärantikörper in *PBS-plus* für 2 Stunden bei RT
- 7) Inkubation mit dem Avidin-Biotin-Komplex und Entwicklung wie im vorherigen Abschnitt beschrieben

2.6.3 Ki-67-Immunhistochemie

- 1) Blockade endogener Peroxidasen: 15-minütige Inkubation mit 0,6-prozentigem Wasserstoffperoxid

- 2) Permeabilisierung der Zellmembran und Blockade unspezifischer Bindungen: 30-minütige Inkubation in *PBS-plus 2* bei RT
- 3) Nächtliche Inkubation mit dem Primärantikörper bei 4°C in *PBS-plus 2*
- 4) Vorinkubation in *PBS-A* (siehe Anhang) für 30 Minuten
- 5) Inkubation mit dem biotinylierten Sekundärantikörper in *PBS-A* für 2 Stunden bei RT
- 6) Inkubation mit dem Avidin-Biotin-Komplex und Entwicklung wie im vorherigen Abschnitt beschrieben

2.6.4 PCNA-Immunhistochemie

- 1) und 2) wie bei BrdU (siehe 2.6.2)
- 3) Permeabilisierung der Zellmembran und Blockade unspezifischer Bindungen: 30-minütige Inkubation in *PBS-plus 3* bei RT
- 4) Nächtliche Inkubation mit dem Primärantikörper bei 4°C in *PBS-plus 3*
- 5) Vorinkubation in *PBS-A* für 30 Minuten
- 6) Inkubation mit dem biotinylierten Sekundärantikörper in *PBS-A* für 2 Stunden bei RT
- 7) Inkubation mit dem Avidin-Biotin-Komplex und Entwicklung wie im vorherigen Abschnitt beschrieben

2.7 Mikroskopische Quantifizierung

Die quantitative Auswertung immunhistochemisch markierter Zellen in der SVZ erfolgte lichtmikroskopisch in drei entsprechend dem stereotaktischen Atlas des Rattengehirns von Paxinos und Watson, 1998⁴⁸ definierten Schnittniveaus: +1.4 mm; +1.2mm; und +0.7 mm vom Bregma entfernt. Hinsichtlich der Schnittebene wurde ein Toleranzbereich von $AP \pm 10\%$ festgelegt.

Die Zellzählung erfolgte computergestützt mithilfe einer mikroskop- bzw. kameraspezifischen Software (AxioVision®, Carl Zeiss Jena GmbH, Jena, Deutschland). Nach fotografischer Aufnahme der Zielregion wurde zunächst ein Bildfeld (sogenannter *Frame*) mit der Rahmengröße 200µm x 50 µm definiert und 200µm ventral des lateralen Ventrikelwinkels in die SVZ projiziert (siehe Abbildung 7). Innerhalb dieses Frames und seiner Begrenzung (d. h. seiner Markierungslinien) erfolgte unter 10-facher und 20-facher Vergrößerung die Zählung aller deutlich abgefärbten Zellkerne. Bei fehlender Abgrenzbarkeit auf dem Foto erfolgte eine

mikroskopische Kontrolle der einzelnen Zelle. Im Anschluss wurde die mittlere Zelldichte pro Gruppe/ 0,01 mm² SVZ angegeben.

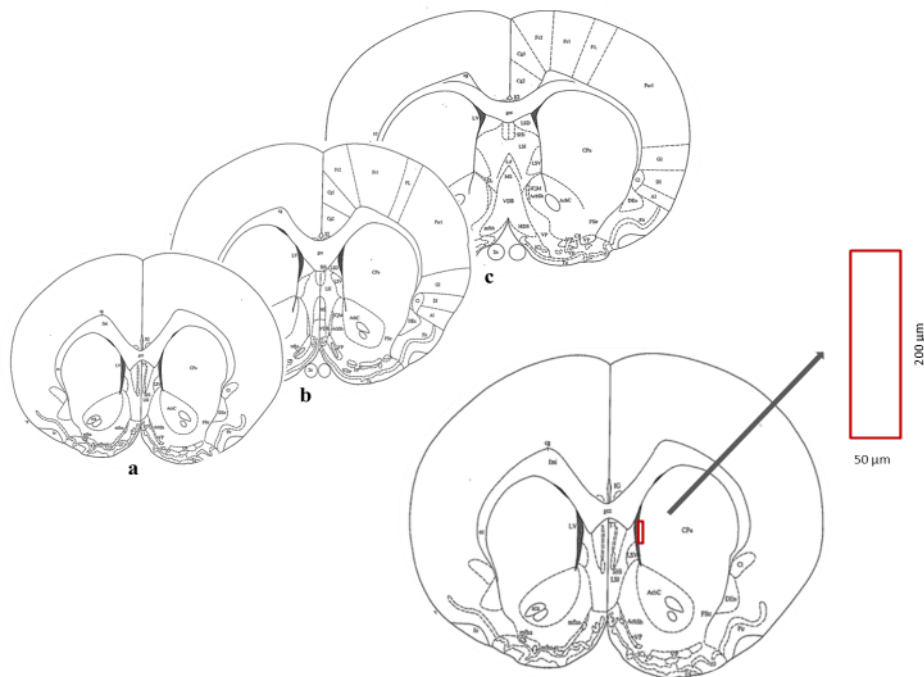


Abbildung 7 (modifiziert nach Paxinos und Watson, 1998⁴⁸): Schematische Darstellung der Schnittniveaus der für die Auswertung ausgewählten Schnitte sowie der prädefinierten Region in der SVZ (roter Rahmen) : a) +1.4 mm. b) +1.2 mm. c) +0,7 mm bezogen auf das Bregma

2.8 Histologische Überprüfung der Elektrodenposition

Zur histologischen Überprüfung der Elektrodenposition in der STN-Region wurden bei jedem Versuchstier Hirnschnittserie zwischen AP: -3,6 mm und -4,3 mm analysiert auf denen die Elektrodentrajektorie sichtbar war. Hierzu erfolgte eine Kresylviolett färbung nach Nissl von auf Objektträger aufgezogenen Hirnschnitten. Erst wurden die Schnitte einer aufsteigenden Alkoholreihe (70% Ethanol, 90% Ethanol, 96% Ethanol, Propanol, Xylol für je 5 Minuten), im Anschluss einer absteigenden Alkoholreihe (Propanol, 96% Ethanol, 90% Ethanol, 70% Ethanol, Aqua dest. für je 5 min) unterzogen. Es folgte die zweiminütige Färbung mit dem

wasserlöslichen Kresylviolett und eine Spülung mit Aqua dest. Schließlich erfolgte die Eindeckelung mit Entellan®.

Abbildung 8 zeigt repräsentativ für alle Studientiere die korrekte Elektrodenposition im linken STN nach histologischer Aufarbeitung eines Hirnschnitts durch Nissl-Färbung. Die Trajektorie von Elektrodenschafte und -spitze sind hier als Aussparung im Gewebe erkennbar (Pfeil). Ferner ist der STN als gut sichtbare Verdichtung von Zellkernen sichtbar (Pfeil).

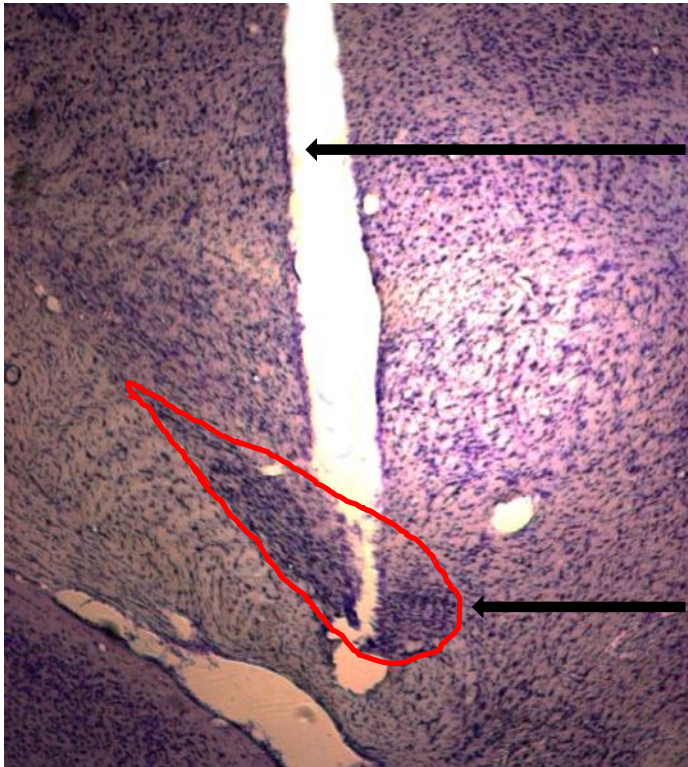


Abbildung 8: Korrekte Elektrodenposition im linken STN nach Nissl-Färbung. Die rote Linie markiert die Kontur des STN

2.9 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung wurde mithilfe der Programme Excel und Graph Pad Prism (Version 6) durchgeführt. Die untersuchten Stichproben wurden nach Durchführung des Normalitätstests nach Kolmogorov and Smirnov als Stichproben einer normalverteilten Population definiert. Ein Signifikanzniveau von $p \leq 0,05$ wurde als signifikant angenommen. Die Darstellung der Ergebnisse erfolgte als Mittelwert \pm Standardfehler des Mittelwerts (SEM).

Zur Ermittlung des Stimulationseffektes nach 10-tägiger STN-HFS wurde die Ratio aus der Dichte immunreaktiver Zellen der behandelten Seite versus der der unbehandelten Seite gebildet. Die sich ergebenden Mittelwerte innerhalb der Gruppen wurden verglichen und die Differenz statistisch in einem ungepaarten t-Test ausgewertet.

3 Ergebnisse

3.1 Definition der Einschlusskriterien

Für die endgültige Analyse wurden folgende Einschlusskriterien definiert:

1. histologisch gesicherter Nachweis einer orthotopen Lage der Elektrodenspitze im linken STN (vergleiche Kapitel 2.8)
2. Nachweis eines funktionstüchtigen Stimulationssystems bis zum Ende der 10-tägigen Stimulationsperiode (vergleiche Kapitel 2.3.3)
3. komplikationsloser postoperativer Verlauf ohne z.B. Zeichen einer Fremdkörperreaktion im Bereich der Implantathöhle
4. regelrechte Gewichtszunahme der Tiere
5. Ausschluss histologisch-artefizieller Gewebedefekte

Von 20 Tieren, die für dieses Projekt operiert wurden gingen die Ergebnisse von 12 Tieren (n=12) in die endgültige Auswertung ein. Gründe für ein Ausscheiden aus dem Experiment waren eine hohe Morbidität und Mortalität durch peri- und postoperative Komplikationen (n=5), ein im Verlauf defektes Stimulationssystem (n=1), eine fehlerhafte Elektrodenposition (n=1) sowie ein Gewebeschaden nach fehlerhafter Perfusion (n=1).

3.2 Ergebnis der immunhistochemischen Färbungen

3.2.1 Zellmorphologie und Verteilung

In den histologischen Schnitten der Zielregion SVZ zeigten sich mikroskopisch mit Blick auf die oben beschriebenen Antigene zahlreiche immunreaktive Zellkerne, welche sich saumartig an der gesamten lateralen Ventrikelwand auszumachen waren und eine dreiecksförmige Auslaufstruktur am lateralen Ventrikelwinkel bildeten (vergleiche Abbildung 9).

Bei 20-facher Vergrößerung zeigte sich ein Bild von zum Teil stark überlagerten Zellkernen von ovalrunder Form. Während BrdU- und Ki-67-immunreaktive Zellkerne vor allem lateral des Ventrikels sowie im vorderen Ventrikelwinkel detektierbar waren, fanden sich PCNA-immunreaktive Zellkerne auch am medialen Ventrikelrand. Dabei waren zwei morphologisch unterschiedlich imponierende PCNA-positive Zellkerntypen voneinander zu unterscheiden: ein ovalrunder Zellkerntyp, welcher in Form und Anordnung der von Ki-67- und BrdU-positiven

Zellkernen entsprach sowie ein zweiter Zellkerntyp mit kleineren quadratischen, pflastersteinartig angeordneten, schwächer angefärbten Zellkernen, welche mehrreihig sowohl an der medialen als auch lateralen Ventrikelwand angeordnet waren. Abbildung 9 zeigt eine Übersicht über die immunhistochemischen Ergebnisse der drei verwendeten Proliferationsmarker in 10-facher Vergrößerung. In Abbildung 10 sind in 20-facher Vergrößerung beide PCNA-immunreaktiven Zellkerntypen dargestellt.

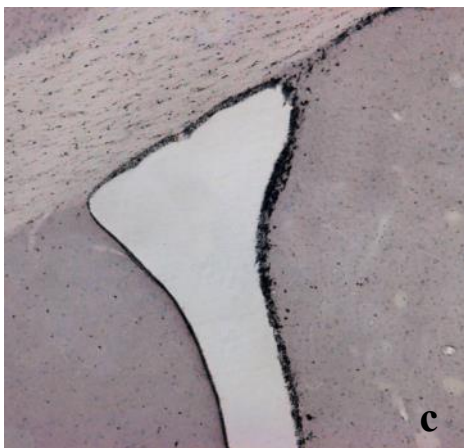
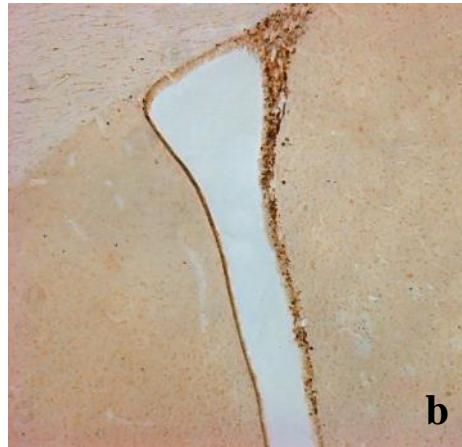
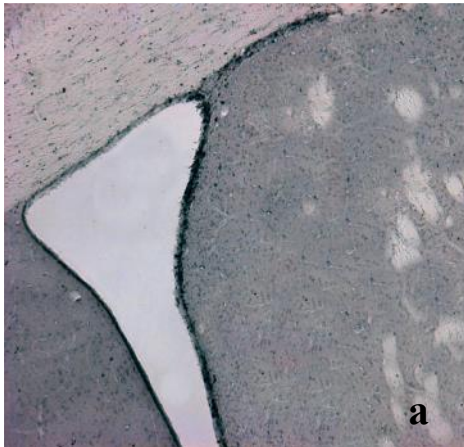


Abbildung 9: Ergebnis der immunhistochemischen Färbungen in 10-facher Vergrößerung. a) BrdU, b) Ki-67, c) PCNA

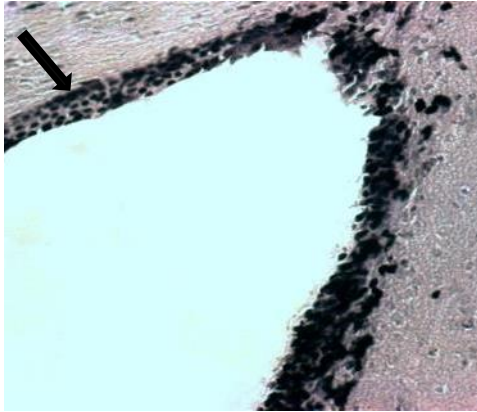


Abbildung 10: Ergebnis der immunhistochemischen Färbung PCNA-immunreaktiver Zellkerne in 20-facher Vergrößerung: Es sind zwei unterschiedliche Zellkerntypen voneinander zu unterscheiden: rundovale Zellkerne am lateralen Ventrikelrand sowie plastersteinartig angeordnete kleinere Zellkerne am medialen (Pfeil) und lateralen Ventrikelrand.

3.2.2 Quantitative Analyse

Nach 10-tägiger kontinuierlicher Hochfrequenzstimulation des STN war für alle drei Proliferationsmarker eine höhere Zelldichte immunreaktiver Zellen in der SVZ der stimulierten Hemisphäre im Vergleich zur kontralateralen Seite zu verzeichnen. In der Kontrollgruppe (STN-SHAM-Gruppe) dagegen war die subventrikuläre Zelldichte in der lädierten Hemisphäre geringer als kontralateral.

Insgesamt fanden sich in beiden Gruppen bilateral mehr BrdU-positive im Vergleich zu Ki-67- und PCNA-positiven Zellkernen. Beim Vergleich der beiden endogenen Proliferationsmarker überstieg die Zelldichte PCNA-immunreaktiver Zellkerne die von Ki-67-immunreaktiven Zellkernen. Tabelle 9 gibt eine Übersicht über die quantitativen Ergebnisse. In den folgenden Abschnitten werden die Einzelergebnisse für die drei Proliferationsmarker gesondert dargestellt.

Marker	BrdU		PCNA		Ki-67	
Gruppe / Hemisphäre	ipsilateral	kontralateral	ipsilateral	kontralateral	ipsilateral	kontralateral
	156,8±17,3	143,3±12,6	141,6±24,9	137,5±23,0	96,5±12,8	87,6±8,2
STN-HFS						
STN-SHAM	116,1±19,8	124,1±20,9	99,6±18,0	106,8± 19,5	93,3±14,1	97,8±15,9

Tabelle 9: Mittlere Dichte BrdU-, Ki-67- und PCNA immunreaktiver Zellkerne/0,01mm² SVZ/Gruppe ± SEM; die Mikroelektrode wurde in den linken STN implantiert (ipsilateral).

3.3 Zellproliferativer Effekt der Hochfrequenzstimulation des Nucleus Subthalamicus

3.3.1 Subventrikuläre Zelldichte BrdU-immunreakiver Zellen nach 10-tägiger STN-HFS

Bei Tieren der STN-HFS Gruppe, war eine signifikant erhöhte Ratio der ipsilateral versus kontralateralen Zelldichte BrdU-positiver Zellen im Vergleich zu Kontrolltieren (STN-SHAM) zu verzeichnen.

Während bei stimulierten Tieren im Durchschnitt $8.3\% \pm 4.2\%$ mehr Zellen in der ipsilateralen SVZ im Vergleich zur Gegenseite detektierbar waren, war die ipsilaterale subventrikuläre Zelldichte der Kontrollgruppe im Vergleich zur Gegenseite sogar um $6.7\% \pm 2.0\%$ vermindert.

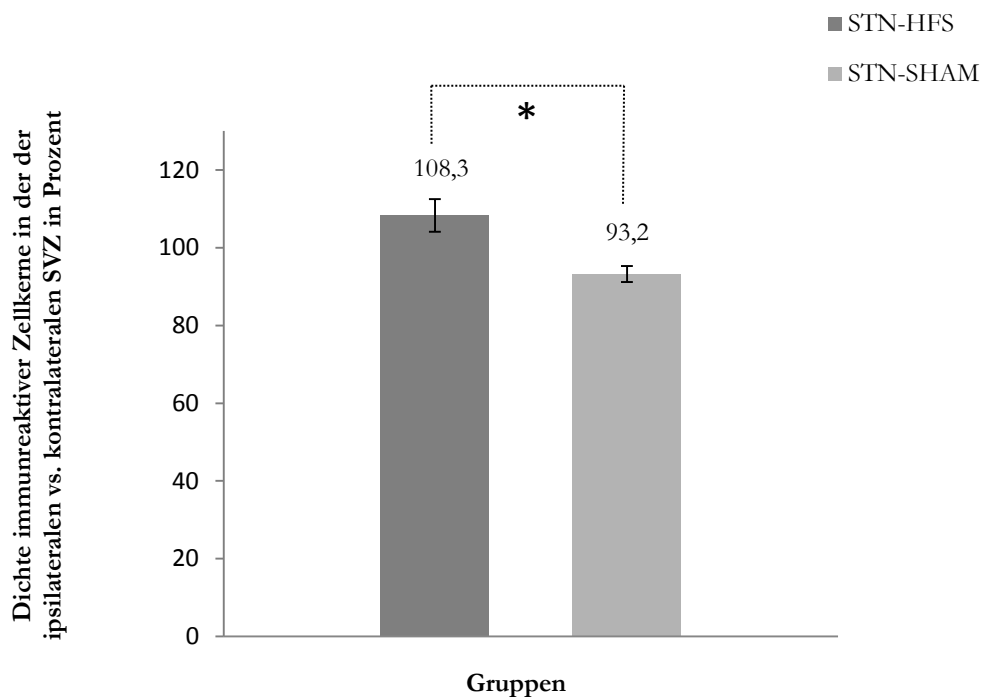


Abbildung 11: Mittelwert der subventrikulären Zelldichte \pm Standardfehler des Mittelwerts (SEM) BrdU-immunreakiver Zellkerne/ $0,01\text{mm}^2$ SVZ im Vergleich zur Gegenseite von STN-HFS vs. STN-SHAM behandelten Tieren. * $p \leq 0,05$

3.3.2 Subventrikuläre Zelldichte Ki-67- und PCNA-immunreaktiver Zellen nach 10-tägiger STN-HFS

Analog zu den Ergebnissen für BrdU zeigte sich auch für die endogenen Proliferationsmarker Ki-67 und PCNA eine im Vergleich zur Gegenseite ipsilateral erhöhte Zellkerndichte bei Tieren der STN-HFS Gruppe sowie eine ipsilateral verminderte Zellkerndichte bei Tieren der Kontrollgruppe. Obwohl der Stimulationseffekt im Graph deutlich sichtbar ist, erreichte er statistisch für beide Marker keine Signifikanz.

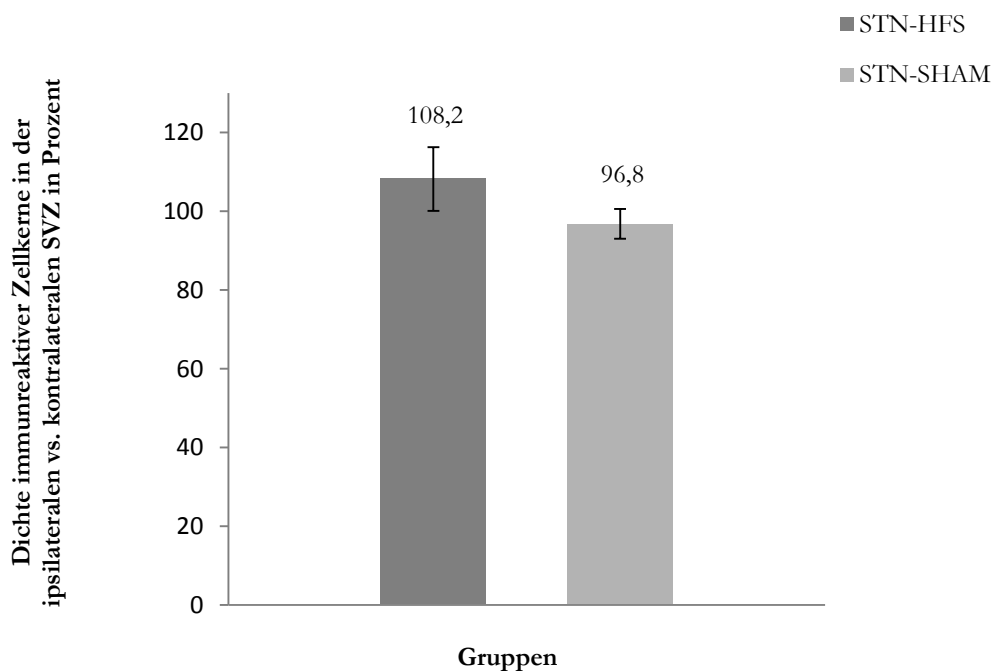


Abbildung 12: Mittelwert der subventrikulären Zelldichte \pm Standardfehler des Mittelwerts (SEM) Ki-67-immunreaktiver Zellkerne/0,01mm² SVZ im Vergleich zur Gegenseite von STN-HFS vs. STN-SHAM behandelten Tieren. $p=0,11$

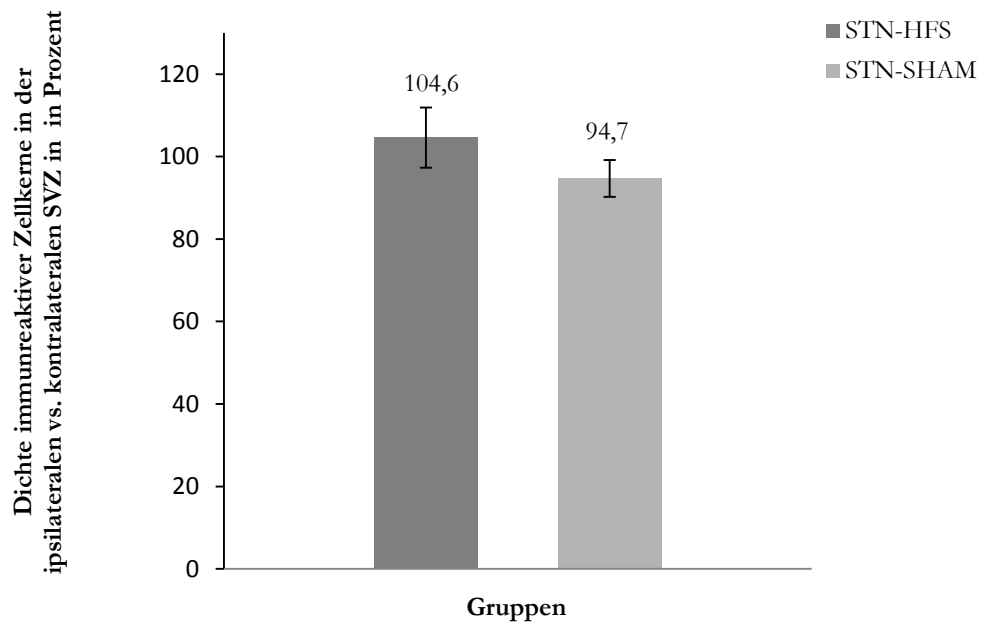


Abbildung 13: Mittelwert der subventrikulären Zelldichte \pm Standardfehler des Mittelwerts (SEM) PCNA-immunreaktiver Zellkerne/0,01mm² SVZ im Vergleich zur Gegenseite von STN-HFS vs. STN-SHAM behandelten Tieren. $p=0,13$

4 Diskussion

Die vorliegende Studie hatte das Ziel, den Effekt der kontinuierlichen tiefen Hochfrequenzstimulation des Nucleus subthalamicus auf die Zellproliferation in der subventrikulären Zone (SVZ) der gesunden Ratte zu untersuchen. Hierzu wurde nach immunhistochemischer Visualisierung von drei verschiedenen Proliferationsmarkern (unterschieden nach exogen vs. endogen) eine quantitative Analyse in definierten Serienschnitten der SVZ durchgeführt.

Im Ergebnis zeigte sich nach 10-täglicher kontinuierlicher Hochfrequenzstimulation des Nucleus subthalamicus (STN-HFS) ein signifikanter Anstieg der Ratio BrdU-immunreaktiver Zellen (ipsilaterale versus kontralaterale Zelldichte) in der SVZ von stimulierten Tieren im Vergleich zur Kontrollgruppe. Auch für die endogenen Proliferationsmarker Ki-67 und PCNA ließ sich ein tendenzieller Anstieg immunreaktiver Zellen in der ipsilateralen SVZ nach STN-HFS verzeichnen. Diese Ergebnisse sind prinzipiell mit der Hypothese eines zellplastischen Potentials der STN-HFS vereinbar.

4.1 Strukturelle Neuroplastizität und elektrische Hirnstimulation

4.1.1 Das neuroplastische Potential der tiefen Hirnstimulation des STN

Die vorliegende Studie belegt, dass sich durch kontinuierliche STN-HFS bei der gesunden bzw. unbehandelten Ratte der Pool neuentstandener Zellen in der SVZ, einer dafür prädestinierten sogenannten neurogenen Nischenregion, positiv beeinflussen lässt.

Die Ergebnisse dieser Studie lassen sich zum Teil in Übereinstimmung mit den Ergebnissen einer 2011 veröffentlichten Studie bringen, in der ein vergleichbares STN-HFS Paradigma in unihemisphäriell DA-depletierten Ratten angewendet wurde⁴⁹. Danach konnten *Khaindrava et al. (2011)* im neurotoxischen 6-Hydroxydopamin (6-OHDA)-Parkinsonmodell der Ratte nach einer 8-tägigen kontinuierlichen STN-HFS ebenfalls einen signifikanten Anstieg BrdU-immunreaktiver Zellen in der ipsilateralen SVZ demonstrieren, welche zum Teil einen neuronalen Phänotyp aufwiesen. Einschränkend muss erwähnt werden, dass der Applikationsmodus von BrdU in der vorliegenden Studie im Vergleich zur vorher beschriebenen unterschiedlich gewählt wurde. So haben *Khaindrava et al. (2011)* in ihrer Studie die 6-OHDA lädierten Ratten am ersten Tag der STN-HFS mehreren BrdU-Injektionen entsprechend eines pulsatilen Labelingprotokolls (5×75 mg/kg i.p.) unterzogen, sodass eine Population von sich in

der S-Phase befindenden Zellen in den untersuchten Hirnregionen markiert und später als Indikator für Zellüberleben (und weniger Zellproliferation) verwendet werden konnte. In der vorliegenden Studie wurde dagegen ein kumulatives Dosierungsregime von BrdU über die Gesamtdauer der STN-HFS angewendet, wobei der Marker als Proliferationsmarker interpretiert wurde.

Der hier gleichzeitig verzeichnete tendenzielle Anstieg der Expression von Ki-67 und PCNA, zwei endogenen Proliferationsmarkern, in der ipsilateralen SVZ von Tieren der STN-HFS Gruppe, unterstützt die These einer reell gesteigerten Zellproliferation in der SVZ als Folge der Stimulationsbehandlung. Dieses Ergebnis stellt einen Unterschied zu den Ergebnissen von *Khaindrava et al. (2011)* dar, bei denen die Zelldichte Ki-67-immunreaktiver Zellen in allen untersuchten Hirnregionen (u. a. der SVZ) nahezu unverändert blieb⁴⁹. Der Grund für diese unterschiedliche Befundkonstellation könnte in der Wahl des Tiermodells begründet sein, wobei der Nachweis eines zellproliferativen Effektes nach kontinuierlicher STN-HFS im Dopamin-depletierten Tier ausblieb, im gesunden Tier jedoch nachzuweisen war. Das leicht abweichende Stimulationsprotokoll dieser Studie scheint dagegen nicht für diese Unterschiede verantwortlich zu sein, da der effektive „Ladungsstrom“ (Ladungen pro Phase, Q/phase) mit 6.4 nC/phase in der Studie von *Khaindrava et al. (2011)* sogar etwas höher gewählt wurde als in dieser Studie (5.2 nC/phase), die Stimulationsfrequenz sowie totale Stimulationszeit sogar nahezu identisch waren. Als weiterer methodischer Unterschied muss das Studiendesign im Hinblick auf die statistische Auswertung der beobachteten Effekte beachtet werden. Während in der Studien von *Khaindrava et al. (2011)* im 6-OHDA Parkinsonmodell der Ratte die absolute Dichte immunreaktiver Zellen in der ipsilateralen sowie kontralateralen Hemisphäre zwischen drei Versuchsgruppen Gruppen (naiv; 6-OHDA-lädiert+STN-SHAM; 6-OHDA-lädiert+STN-HFS) miteinander verglichen wurden und so auch kontralaterale Effekte untersucht wurden, erfolgte in dieser Studie ein Vergleich der Ratio von ipsilateraler versus kontralateraler Zelldichte beider Gruppen (STN-SHAM vs. STN-HFS).

Neben einem kontralateralen positiven Stimulationseffekt, kam es in der Studie von *Khaindrava et al. (2011)* auch zu einer bilateral verminderten Zellzahl BrdU-immunreaktiver Zellen in der SVZ nach unilateraler partieller Dopamindepletion, a. e. als Ergebnis einer bilateral verminderten DA Transmission durch Neurotoxizität von 6-OHDA. Dieses Ergebnis weist auf eine interhemisphärische Kommunikation des STN aber auch des mesencephalen (bzw. nigralen) Dopaminsystems hin, was durch anatomische Arbeiten und klinische Beobachtungen teilweise untermauert wird. So konnte z.B. bei Parkinsonpatienten, bei denen aufgrund der deutlichen Asymmetrie der Kardinalsymptome nur eine unilaterale (d. h. kontralateral zur „Symptomseite“

gelegene) STN-HFS durchgeführt wurde, auch ein symptomatischer Effekt auf der ipsilateral zum Stimulationsort gelegenen Körperseite beobachtet werden^{50,51}. Ferner konnte im Rahmen intraoperativer Ableitungen im STN eine erhöhte *Multiunit Spike* Aktivität nach HFS des kontralateralen STN demonstriert werden⁵².

4.1.2 Spezifität der neuroplastischen Veränderungen nach tiefer Hirnstimulation des STN

Die Frage nach der Spezifität neuroplastischer Veränderungen infolge der STN-HFS im Sinne einer Induktion von Zellproliferation in der SVZ stellt sich mehrdimensional: erstens mit Blick auf die Zielpunktspezifität der STN-HFS und zweitens hinsichtlich der Stimulationsspezifität des Hochfrequenzstimulationsprotokolls allgemein.

Für die Beurteilung der Zielpunktspezifität spielt die Interkonnektivität der Zielstruktur mit anderen Hirnregionen eine bedeutende Rolle. Der Nachweis neuroplastischer Effekte nach tiefer Hirnstimulation wurde erstmals von *Toda et al. (2008)* beschrieben⁵³. In dieser tierexperimentellen Studie konnten die Autoren eine 2- bis 3-fache Zunahme von neuentstandenen Vorläuferzellen in der subgranulären Zone des Gyrus dentatus des Hippocampus nach bilateraler Hochfrequenzstimulation des vorderen Thalamuskerns (*Nucleus anterior thalami*) der Ratte aufzeigen, wobei die Zellen dabei zum Großteil einen neuronalen Phänotyp aufwiesen. Da der Hippocampus und der Nucleus anterior thalami direkte und zugleich reziproke Verbindungen unterhalten⁵⁴, war es naheliegend zu argumentieren, dass die Induktion von Neurogenese in der neurogenen Nischenregion Gyrus dentatus spezifisch für die tiefe Hirnstimulation des vorderen Thalamuskerns war. Eine 1:1 Übertragung dieses Ansatzes lässt sich allerdings nicht für die Ergebnisse der vorliegenden Studie ableiten, da es keine bekannte monosynaptische Verbindung zwischen dem STN und der SVZ gibt. Somit können die zellproliferativen Effekte in der SVZ nach STN-HFS nur über indirekte Bahnverbindungen bzw. die Involvierung weiterer Relaisstationen abseits des STN erklärt werden (siehe 4.1.3).

Hinsichtlich der Stimulationsspezifität der neuroplastischen Effekte stellt sich die Frage nach der Signifikanz des Paradigmas der tiefen Hirnstimulation. Anders formuliert kann man sich fragen ob die Induktion von Zellproliferation überhaupt an ein definiertes Stimulationsprotokoll (hier im Sinne der Hochfrequenzstimulation) gebunden ist.

Einige Beobachtungen könnten diese Hypothese in Frage stellen. So konnte bereits durch *Scott et al. (1998)* in sogenannten Kindling-Versuchen zur Induktion von epileptischen Anfällen an Ratten gezeigt werden, dass die hierzu durchgeführte wiederholte niederschwellige elektrische

Stimulation der Amygdala zu einer vermehrten Neurogenese im Gyrus dentatus des Hippocampus führte ⁵⁵. Obgleich auch Teile der Amygdala (insbesondere die laterobasalen Nuclei) reziproke Verbindungen mit dem Hippocampus unterhalten, werteten die Autoren die gesteigerte Neurogenese im Gyrus dentatus im Gegensatz zu *Toda et al. (2008)* weniger im Kontext einer Zielpunktspezifität der elektrischen Stimulation (hier der Amygdala), sondern vielmehr als Form einer epileptogenen Neuroplastizität. Unter Berücksichtigung dieser These können die eigenen Beobachtungen derart interpretiert werden, dass die Induktion neuroplastischer Effekte zwar an eine elektrische Hirnstimulation nicht aber an ein bestimmtes Stimulationsprotokoll wie das der STN-HFS gekoppelt sein könnte. So konnte eine gesteigerte Neurogenese in den neurogenen Nischen in der Vergangenheit auch nach elektrokonvulsiver Therapie ⁵⁶ sowie transkraniale Magnetstimulation ⁵⁷ gezeigt werden.

In einer neuere tierexperimentellen Arbeit zeigte sich auch nach elektrischer Stimulation des Motorkortex bei der Ratte mittels epidural angelegter Elektroden eine vermehrte Zellproliferation in der SVZ ⁵⁸. Interessanterweise zeichneten sich einige dieser Zellen durch einen neuronalen Phänotyp aus und schienen in Richtung auf die Quelle der elektrischen Stimulation im Sinne einer Elektrotaxis zu migrieren.

Zusammengefasst kann anhand der aktuellen Datenlage keine sichere Zuordenbarkeit der zellplastischen Effekte in der SVZ nach STN-HFS hinsichtlich ihrer Zielpunktspezifität sowie der Spezifität ihres Stimulationsregimes erfolgen. Es ist durchaus vorstellbar, dass die Effekte der unterschiedlichen Stimulationsmodi auf eine gemeinsame Endstrecke (z.B. Mediatoren) zurückgeführt werden können.

4.1.3 Mechanismen von gesteigerter Zellplastizität nach tiefer Hirnstimulation des STN

Obwohl das gewählte Studiendesign keine sichere Aussage zur Ursache der zellplastischen Veränderung in der SVZ nach Hochfrequenzstimulation des STN erlaubt, sollen doch einige Indizien und entsprechende Kausalzusammenhänge diskutiert werden.

In vorherigen Studien wurde die Rolle von Neurotransmittern, und hier insbesondere von Dopamin (DA), bei der Stimulierung von Zellproliferation und Neurogenese herausgestellt ¹⁵. Auf experimenteller Seite gibt es eine ausreichende Evidenz dafür, dass die dopaminerge striatale Transmission (dem terminalen Projektionsgebiet der nigro-striatalen DA-Neurone) durch die HFS des STN gesteigert werden kann. So konnte beispielsweise (z. T. durch die eigene Arbeitsgruppe) an gesunden Ratten sowie im 6-OHDA Parkinsonmodell der Ratte (d. h. im

Zustand der partiellen striatalen DA-Depletion) mittels verschiedener Techniken (Mikrodialyse vs. Voltammetrie) nach akuter STN-HFS sowohl eine vermehrte DA-Freisetzung^{37,59,60}, als auch ein gesteigerter DA-Metabolismus^{32,37} demonstriert werden. Schon nach einstündiger STN-HFS mit 130 Hz konnten deutlich erhöhte extrazelluläre DA-Level im ipsilateralen Striatum von nigrostriatal DA-depletierten Tieren (Steigerung um bis zu 200%) wie auch gesunden Tieren (Steigerung um bis zu 168%) nachgewiesen werden⁶⁰.

Die Tatsache, dass auch nach chronischer STN-HFS (wie sie im Rahmen der hier dargestellten Versuche durchgeführt wurde) erhöhte striatale Gewebelevel von DA aufgedeckt werden konnten^{61,62}, spricht für eine absolute oder funktionelle Induktion des nigralen dopaminergen Zellpools durch STN-HFS. Es erscheint somit prinzipiell vorstellbar, dass über diesen Mechanismus auch die Zellproliferation in der SVZ positiv beeinflusst wird.

Diese Vermutung wird gestützt durch den anatomischen Nachweis einer nigro-subventrikulären dopaminergen Innervation (a. e. als Kollateralen der nigrostriatalen Projektionsneurone), die mit einer direkten Stimulation von Vorläuferzellen in nicht-humanen Primaten assoziiert wurde¹⁶.

Die Hypothese einer DA assoziierten gesteigerten Zellproliferation in der SVZ nach STN-HFS diskutierten auch *Khaindrava et al. (2011)*. Die Arbeitsgruppe postulierte ein komplexes, teilweise DA-abhängiges Konzept⁴⁹. Diese Vermutung beruhte einerseits auf der Beobachtung, dass Zellüberleben (gemessen an der Anzahl BrdU immunreaktiv positiver Zellen nach pulsatilem Dosierungsregime für BrdU, s.o.) und Zellproliferation (gemessen an der Anzahl Ki-67 immunreaktiv positiver Zellen) unabhängig voneinander beeinflusst wurden, andererseits auf der Tatsache, dass die Anzahl Ki-67 positiver Zellen mit dem Ausmaß der nigrostriatalen DA-Depletion korrelierte, die Anzahl BrdU positiver Zellen jedoch davon unabhängig blieb.

Ein weiterer Ansatz ist die Hypothese einer selektiven Regulation der unterschiedlichen Phasen des Neurogenese-Prozesses (Proliferation, Reifung, Zellüberleben). So hatten *Soumier et al. (2009)* am Beispiel der Wirkung des Serotoninagonisten Agomelatin auf die Neurogenese in der SGZ zeigen können, dass die Reaktion proliferierender Zellen auf Agomelatin vom Zellstadium abhängig war⁶³. Mit Blick auf die Neurotransmitterhypothese als Stimulus für Zellproliferation ist es ferner bemerkenswert, dass *Jahanshahi et al. (2013)* nach epiduraler elektrischer Stimulation des Motorkortex eine Erhöhung von Serotonin in der SVZ der Ratte beschrieben und diese in ursächlichen Zusammenhang mit der gesteigerten Zellproliferation brachten⁵⁸. Dieser Mechanismus ist mit Blick auf die Zielpunktspezifität der STN-HFS in der vorliegenden Arbeit jedoch als nachrangig zu erachten, da eine gesteigerte serotoninerge Transmission im Striatum nach STN-HFS nicht endgültig belegt werden konnte^{37,61}.

Anderen experimentellen Ansätzen zufolge scheinen neben Neurotransmittern auch neurotrophe- und andere Wachstumsfaktoren die endogene Neurogenese in neurogenen Nischenregionen des adulten Gehirns anstoßen und unterhalten zu können⁶⁴⁻⁶⁶. Somit besteht auch ein berechtigter Grund zu der Annahme, dass der stimulationsvermittelte Effekt auf Zellproliferation bzw. Neurogenese durch eine Stimulation von endogenen neurotrophen Faktoren bedingt sein könnte. Für die Interpretation der Ergebnisse der vorliegenden Studie bedeutet dies, dass eine derartige Stimulation von neurotrophen Faktoren in der SVZ durch die STN-HFS hervorgerufen werden müsste. Tatsächlich konnte ein Anstieg von BDNF (*Brain Derived Neurotrophic Factor*) nach chronischer STN-HFS im an die SVZ angrenzenden Striatum gesunder Ratten nachgewiesen werden⁶⁷. Analog konnte in der Hippocampusregion in Versuchen zur Langzeitpotenzierung (*long term potentiation [LTP]*; eine der am besten charakterisierten Form synaptischer Plastizität) unter Verwendung eines Hochfrequenz-Stimulationsprotokolls ($f = 100\text{Hz}$) in der CA1-Region eine Zunahme von Zellproliferation und neuronaler Differenzierung von endogenen neuronalen Vorläuferzellen sowie ein Anstieg von BDNF demonstriert werden⁶⁸.

Zusammengefasst gibt es mehrere Erklärungsansätze für eine gesteigerte Zellproliferation durch STN-HFS bei der gesunden Ratte. Wenngleich die diskutierten Mechanismen (Neurotransmitterhypothese, Expression neurotropher Faktoren) im Rahmen des gewählten experimentellen Ansatzes dieser Studie nicht gesondert untersucht wurden, lässt sich ein spezifischer Effekt der STN-HFS auf Zellproliferation in der SVZ (Zielpunktspezifität; s. o.) anhand der aktuellen Datenlage theoretisch leicht untermauern.

4.2 Zellplastischer Effekt durch Mikroläsion des Nucleus Subthalamicus

4.2.1 Effekttäquivalenz von STN-HFS und STN-Läsion ?

Es ist aus klinischer Sicht hinreichend bekannt, dass es zwischen ablativen und neuromodulativen Strategien im Bereich der Basalganglien mit Blick auf die Symptomkontrolle beim Patienten eine Effekttäquivalenz gibt. Diese wurde auch für die STN-HFS beschrieben (zur Übersicht siehe *Hariz 2013*⁶⁹). Von experimenteller Seite ergeben sich jedoch Hinweise auf ein komplexeres Zusammenspiel basalganglionärer Netzwerkstrukturen bei modulativen Interventionen im Vergleich zu ablativen Ansätzen. So hatten *Bacci et al. (2004)* zeigen können, dass eine subchronische STN-HFS im Vergleich zu einer einfachen STN-Läsion im Parkinsonmodell der Ratte, gleichartige Effekte wie z. B. eine Reversibilität der durch die DA-

Depletion ausgelösten zellulären Effekte in den Ausgangsstrukturen der Basalganglien, auch antagonistische Effekte nach sich zieht⁷⁰.

Weiter ist beschrieben, dass derartige Änderungen auf zellulärem Niveau, als auch Verhaltensänderung in Tierversuchen unter chronischer STN-HFS, an die Dauer der Stimulationsbehandlung gebunden sind⁷⁰⁻⁷². Dies spricht für ein deutlich komplexeres Potential der STN-HFS als initial vermutet, welches sich von ablativen Methoden unterscheidet und die Beeinflussung funktioneller als auch neuroplastischer Aspekte miteinschließt.

4.2.2 Läsionsbedingte zellplastische Effekte ?

Als weiteres interessantes Ergebnis der quantitativen Auswertung zeigte sich eine bei Kontrolltieren verminderte Anzahl subventrikulärer BrdU-, Ki-67- sowie PCNA-immunreaktiver Zellen in der SVZ der lädierten- im Vergleich zur unaffektierten Hemisphäre, welche im Sinne eines negativen zellplastischen Effekts durch die Elektrodenimplantation in den STN interpretiert werden könnte. Eine solche Beobachtung machten auch *Khaindrava et al. (2011)* in der SGZ des Hippocampus, wo es bei Kontrolltieren zu einer Abnahme Ki-67-immunreaktiver Zellen durch die Implantation der Placeboelektrode in den STN kam.

Bisher gibt es keine Studie welche sich gezielt mit dem neuroplastischen Effekt der Elektrodenimplantation in den STN beschäftigt hat, es existiert jedoch eine Studie zur Auswirkung einer im Hippocampus gesetzten Mikroläsion (durch Einbringen einer Mikronadel) auf hippocampale Neurogenese. Hier kam es durch die Läsion zu einem Anstieg von Neurogenese in der SGZ⁷³. Da die in dieser Studie gesetzte Mikroläsion nicht unmittelbar in der SVZ erfolgte, der Zone in der der zellproliferative Effekt untersucht wurde, sind beide Studien nur unzureichend vergleichbar. Während in der Studie von *Song et al. 2013* eine gesteigerte Expression des Wachstumsfaktors G-CSF sowie ein Anstieg von Zytokinen als mögliche Stimuli der gesteigerten Neurogenese nachgewiesen werden konnten, ist es vorstellbar, dass der hier beobachtete gegensätzliche repressive zellproliferative Effekt kein unmittelbarer läsionsbedingter Effekt in der SVZ, sondern vielmehr die Folge einer durch die Elektrodenimplantation bedingten Schädigung der nigro-striatalen Projektionsbahnen sein könnte, welcher durch die nachfolgende Stimulationsbehandlung konterkariert wurde.

4.3 Methodische Aspekte

4.3.1 Beurteilung der immunhistochemischen Visualisierung der Proliferationsmarker

Alle in der Studie verwendeten Proliferationsmarker konnten immunhistochemisch zuverlässig mit geeigneten Enzymreaktionen visualisiert werden. In den ausgewählten Hirnschnitten waren multiple immunreaktive Zellkerne sichtbar, welche sich vor allem saumartig an der gesamten lateralen Ventrikelwand befanden und in eine dreiecksförmige Auslaufstruktur am vorderen Ventrikelwinkel mündeten. Diese Anordnung entsprach der anatomischen Lokalisation der SVZ, welche im vorderen Ventrikelwinkel in das Rostrale Migrationssystem (RMS) übergeht, in dem die jungen subventrikulären Zellen gewöhnlich in Richtung Bulbus olfactorius migrieren.

In der vorliegenden Studie wurde der exogene Proliferationsmarker BrdU verwendet, der im Sinne eines kumulativen Labelings an zehn konsekutiven Tagen identisch zu der totalen Stimulationszeit appliziert wurde. Die immunhistochemische Visualisierung und nachfolgende Quantifizierung von BrdU erlaubte seine Verwendung als Maß für die Zellproliferation. Mikroskopisch zeigte sich bei Vergleich der Proliferationsmarker in beiden Gruppen bilateral die größte Zelldichte für BrdU immunreaktiv positive Zellen. Dieses Ergebnis entsprach den Erwartungen, da BrdU kumulativ Zellen in der S-Phase markierte. Da BrdU im Rahmen der Zellteilung an die Tochterzellen weitergegeben wird, gingen auch diese bei der Quantifizierung mit ein.

Durch die immunhistochemische Detektion der endogenen Proliferationsmarker Ki-67 und PCNA sollte im Gegensatz zu BrdU eine Markierung der Proliferationsfraktion zum Zeitpunkt des Gewebetodes erfolgen. Die deutlich erhöhte Dichte PCNA immunreaktive positiver im Vergleich zu Ki-67 immunreaktiv positiven Zellen ist am wahrscheinlichsten in dem unspezifischeren Profil von PCNA begründet ⁷⁴. So war ein zweiter, kleinerer PCNA immunreaktiver Zellkerntyp nachweisbar, welcher morphologisch und mit Blick auf seine anatomische Lokalisation am ehesten dem von Ependymzellen entspricht, welche die mediale sowie laterale Ventrikelwand auskleiden.

Wenngleich die in der vorliegenden Studie verwendeten Proliferationsmarker als etabliert angesehen werden können, müssen sie in Reflexion auf die individuellen Ergebnisse hinsichtlich ihrer Charakteristika mitbeurteilt werden.

4.3.2 Limitationen der BrdU-Immunhistochemie

BrdU ist eine toxische sowie teratogene Substanz ⁴¹. So kann BrdU bei der Ratte die Apoptose triggern, die Stabilität der DNA verändern, den Zellzyklus verlängern und die Mitose fördern ⁷⁵. Um derartige toxische und andere „Nebenwirkungen“ weitgehend zu vermeiden, wird in tierexperimentellen Studien meistens eine Konzentration von maximal 50-100mg/kg KG (bei der i.p. Applikation) verwendet. Dieser Empfehlung wurde in der vorliegenden Studie entsprechend Rechnung getragen.

Streng genommen darf BrdU nicht als reiner Marker der S-Phase interpretiert werden, da es auch von Zellen aufgenommen wird, in denen DNA-Reparationen, Gen-Duplikation oder apoptotische Prozesse ablaufen ⁴¹. Hinsichtlich der Pharmakokinetik ist zu erwähnen, dass BrdU nur 30 Minuten bis 2 Stunden in bioaktiver Konzentration im Blut nachweisbar ist, und deshalb pro Injektion jeweils nur ein Teil aller sich in der S-Phase befindlichen Zellen markieren kann ⁷⁶. Weiterhin ist zu berücksichtigen, dass ein bestimmter Anteil BrdU immunreaktiv positiver Zellen der orthotopen post mortem Detektion entgehen kann, wenn diese sich bereits in Migration befanden. Ferner ist die praktische Handhabung von BrdU bei der Interpretation der Ergebnisse zu beachten. Da Stress den Neurogeneseprozess in der SVZ negativ beeinflussen kann ⁷⁷ und die intraperitoneale Injektion als stressreiche Prozedur gewertet werden muss, ist vorstellbar, dass die Injektionsbehandlungen selber einen Effekt auf die Neurogenese hatte.

Da die Untersuchungsbedingungen für alle Versuchstiere bzw. innerhalb der Versuchsgruppen (STN-HFS vs. STN-SHAM) identisch waren, sind die erhöhten Zelldichten BrdU immunreaktiv positiver Zellen in der SVZ jedoch eher dem Wirkeffekt der STN-HFS zuzuschreiben und nicht auf die o. g. Eigenschaften von BrdU zurückzuführen.

4.3.3 Vergleich der beiden endogenen Proliferationsmarker

Ki-67 und PCNA sind die am häufigsten verwendeten endogenen Proliferationsmarker. Analog zu BrdU sind diese Marker nicht ausschließlich mit Zellproliferation, sondern auch mit der DNA-Reparatur assoziiert, weshalb die Proliferationsfraktion tendenziell überschätzt wird ^{45,74}.

Die hier beschriebenen unterschiedlichen Expressionsraten von PCNA vs. Ki-67 innerhalb der Versuchsgruppen können größtenteils durch das unspezifischere Profil von PCNA im Vergleich zu Ki-67 erklärt werden. So ist das Ausmaß der PCNA Detektion im Vergleich zu Ki-67 stark von der Länge der Gewebefixation und der Art der Gewebepreparation abhängig ⁷⁸. Relevanter

für die höhere Zellzahl ist jedoch wahrscheinlich seine lange Halbwertszeit von ca. 8-20 Stunden⁴² sowie die Tatsache, dass das Protein auch in ruhenden Zellen in einer nukleoplasmatischen Form vorkommt⁴³. Da Ki-67 eine Halbwertszeit von lediglich einer Stunde hat, ist es im Gegensatz zu PCNA nicht mehr in der G0-Phase nachweisbar und markiert proliferierende Zellen spezifischer. Die kurze Halbwertszeit führt andererseits jedoch dazu, dass der Marker schon in der frühen G1-Phase nicht mehr exprimiert wird und so zu einem falsch negativen Wert führt⁷⁹.

4.4 Ausblick und klinische Relevanz der Ergebnisse

Neuroplastizität kann als ein biologischer Prozess definiert werden, welcher strukturelle, funktionelle sowie molekulare Mechanismen von Nervenzellen, die zu einer Erhaltung und Kompensation von alters- und krankheitsbedingten Veränderungen des peripheren und zentralen Nervensystems führen, umfasst. In der vorliegenden Studie konnte erstmals gezeigt werden, dass sich in gesunden bzw. unbehandelten Ratten durch kontinuierliche tiefe Hirnstimulation des STN eine vermehrte Zellproliferation in der SVZ als Ausdruck struktureller Neuroplastizität induzieren lässt. Im Rahmen des gewählten experimentellen Ansatzes ließ sich nach 10-tägiger Hochfrequenzstimulation ein signifikanter Anstieg BrdU-immunreaktiv positiver Zellen in der SVZ, einer der beiden neurogenen Nischenregionen des adulten Gehirns (neben der SGZ des Hippocampus) nachweisen. Darüber hinaus zeigte sich der Trend einer erhöhten Expressionsrate für die endogenen Proliferationsmarker Ki-67 und PCNA. Als mögliche zugrunde liegende Mechanismen dieser Effekte wurde eine gesteigerte striatale Transmission von Dopamin und BDNF diskutiert. Diese Arbeit dient als fundamentale Basis für Folgestudien zur Untersuchung neuroplastischer Mechanismen von STN-HFS. Diese sollten mögliche ursächliche Mechanismen, eine weitere phänotypische Charakterisierung der proliferierten Zellen der SVZ als auch ihr Migrationsverhalten berücksichtigen, um die funktionelle Signifikanz einer STN-HFS assoziierten Neurogenese in der SVZ aufrecht erhalten zu können.

Solange noch keine kausalen Therapien zur Behandlung neurodegenerativer Erkrankungen wie dem Idiopathischen Parkinsonsyndrom (IPS) verfügbar sind, werden neurorestaurative Therapieansätze im Fokus der Grundlagen- und klinischen Forschung bleiben. Neurorestaurative Therapieansätze beim IPS umfassten bisher fetale Stammzelltransplantationen, die im Autopsiegut eine Re-Innervation von 30 bis 50% im Putamen erreichten und von guten klinischen Effekte begleitet waren⁸⁰. Aufgrund des hohen methodischen Aufwands, ethischer

Bedenken aber auch der hohen Nebenwirkungsrate hat sich diese Strategie als Alternative in der Behandlung des IPS jedoch bisher nicht durchsetzen können.

Die Hypothese, dass durch endogene Neurogenese im adulten Gehirn degenerierte Neuronenpopulationen kompensiert werden können, hat in den letzten Jahren in Form von intensiver Forschung zur Neurogenese viel Aufmerksamkeit erhalten und wird bis heute kontrovers diskutiert. Die SVZ kann als wichtigstes Reservoir von humanen adulten neuronalen Stammzellen aufgefasst werden. Dort entstehende neuronale Vorläuferzellen können unter externen Einflüssen derart „umprogrammiert“ werden, dass sie unterschiedliche Phänotypen ausbilden⁸¹, zur Migration in bestimmte Hirnareale angeregt werden⁸² und sich dort funktional in bestehende neuronale Netzwerke integrieren⁸³. Methoden zur Stimulation der endogenen Neurogenese sind für die Entwicklung endogener Stammzelltherapien schlussfolgernd von großer Wichtigkeit.

Mit der tiefen Hirnstimulation des STN steht ein etabliertes und zugleich sehr effektives neuromodulatives Therapieverfahren in der Behandlung des IPS zur Verfügung. Nachdem präklinische Arbeiten übereinstimmend eine Präservierung des dopaminergen Phänotyps der Substantia nigra pars compacta (SNc) nach chronischer STN-HFS belegen konnten (zur Übersicht siehe Review von *Harnack und Kupsch 2010*⁸⁴) und in klinischen Langzeitstudien zur STN-HFS eine stabile Symptomkontrolle von motorischen Symptomen von bis zu fünf Jahren dokumentiert wurde^{85,86}, richtet sich nun zunehmend ein Fokus auf mögliche krankheitsmodifizierende Effekte durch STN-HFS im Sinne einer Beeinflussung von Nicht-motorischen Symptomen. Im Rahmen einer zentrumsübergreifenden klinischen Studie aus 2013 (sogenannte EARLYSTIM-Studie) wurde erstmals der Effekt einer frühzeitig im Krankheitsverlauf beginnenden STN-HFS nach 2-jähriger Behandlungsdauer dokumentiert. Ergebnis war eine signifikant verbesserte Lebensqualität durch die Stimulationsbehandlung im Vergleich zur medikamentöse Therapie⁸⁷.

Bisher sind präklinische Arbeiten zum Thema Neuroprotektion und Neurogenese bei tiefer Hirnstimulation aufgrund der technischen Umsetzung im Tiermodell rar, könnten dieser Therapieoption in Zukunft jedoch weiteren Auftrieb verleihen.

Ein möglicher Zusammenhang zwischen einer klinischen Verbesserung bestimmter nicht-motorischer Symptome und einer gesteigerten Neurogenese durch STN-HFS lassen sich jedoch bereits jetzt anhand klinischer Daten ableiten. In einer Fallserie von *Guo et al. (2008)* z.B. wurde die Auswirkung von chronischer tiefer Hirnstimulation des STN auf die olfaktorische Funktion von Parkinsonpatienten untersucht, wobei sich nach einer Beobachtungszeit von sechs Monaten eine verbesserte olfaktorische Funktion zeigte⁸⁸. Da die Abnahme des Riechvermögens auf eine

Degeneration von dopaminergen Neuronen im Bulbus olfactorius (OB) zurückgeführt wird, ist es durchaus vorstellbar, dass die verbesserte Riechfunktion nach tiefer Hirnstimulation durch eine gesteigerte Zellproliferation in der SVZ mit nachfolgender Migration im SVZ-RMS-OB System bedingt war.

Ein weiteres Beispiel bezieht sich auf die positiven Auswirkungen der tiefen Hirnstimulation auf Affekt und Kognition⁸⁹⁻⁹¹, zwei Befunde, die leicht mit einer gesteigerten hippocampalen Neurogenese in Zusammenhang gebracht werden können. Zur Klärung dieser Aspekte sind zukünftige tierexperimentelle Studien notwendig, die systematisch eine Korrelation zwischen gesteigerter Neurogenese und kognitiven bzw. affektiven Verhaltenseffekten sowie olfaktorischer Funktion untersuchen.

Es sei abschließend erwähnt, dass ein Transfer von Ergebnissen tierexperimenteller Studien auf die humanpathologische Situation nicht uneingeschränkt möglich ist. Wenngleich *Höglinger et al. (2004)* bei Parkinsonpatienten eine verminderte Neurogenese in den neurogenen Zonen nachweisen konnten⁹², ließ sich diese Beobachtung in einer neueren Studie nicht reproduzieren⁹³. So zeigten sich in der zuletzt genannten Studie von *van den Berge et al. (2011)* bei *post mortem*-Untersuchungen von 10 Parkinsonpatienten weder relevante Unterschiede in der Anzahl von adulten neuronalen Stammzellen sowie deren proliferativer Kapazität im Vergleich zu gesunden Kontrollen, noch eine Modulation von humanen neuronalen Stammzellreihen durch Dopamin *in-vitro*.

5 Literaturverzeichnis

1. Altman J, Das GD. Autoradiographic and histological evidence of postnatal hippocampal neurogenesis in rats. *J Comp Neurol.* 1965;124(3):319-335.
2. Altman J. Autoradiographic and histological studies of postnatal neurogenesis. IV. Cell proliferation and migration in the anterior forebrain, with special reference to persisting neurogenesis in the olfactory bulb. *J Comp Neurol.* 1969;137(4):433-457. doi:10.1002/cne.901370404.
3. Ming G, Song H. Adult neurogenesis in the mammalian central nervous system. *Annu Rev Neurosci.* 2005;28:223-250. doi:10.1146/annurev.neuro.28.051804.101459.
4. Seaberg RM, van der Kooy D. Stem and progenitor cells: the premature desertion of rigorous definitions. *Trends Neurosci.* 2003;26(3):125-131. doi:10.1016/S0166-2236(03)00031-6.
5. Landgren H, Curtis MA. Locating and labeling neural stem cells in the brain. *J Cell Physiol.* 2011;226(1):1-7. doi:10.1002/jcp.22319.
6. Zhao C, Deng W, Gage FH. Mechanisms and functional implications of adult neurogenesis. *Cell.* 2008;132(4):645-660. doi:10.1016/j.cell.2008.01.033.
7. Carleton A, Petreanu LT, Lansford R, Alvarez-Buylla A, Lledo P-M. Becoming a new neuron in the adult olfactory bulb. *Nat Neurosci.* 2003;6(5):507-518. doi:10.1038/nn1048.
8. Markakis EA, Gage FH. Adult-generated neurons in the dentate gyrus send axonal projections to field CA3 and are surrounded by synaptic vesicles. *J Comp Neurol.* 1999;406(4):449-460.
9. Doetsch F, Hen R. Young and excitable: the function of new neurons in the adult mammalian brain. *Curr Opin Neurobiol.* 2005;15(1):121-128. doi:10.1016/j.conb.2005.01.018.
10. García-Verdugo JM, Doetsch F, Wichterle H, Lim DA, Alvarez-Buylla A. Architecture and cell types of the adult subventricular zone: in search of the stem cells. *J Neurobiol.* 1998;36(2):234-248.
11. Bonfanti L, Peretto P, Merighi A, Fasolo A. Newly-generated cells from the rostral migratory stream in the accessory olfactory bulb of the adult rat. *Neuroscience.* 1997;81(2):489-502.
12. Lois C, García-Verdugo JM, Alvarez-Buylla A. Chain migration of neuronal precursors. *Science.* 1996;271(5251):978-981.
13. Sanai N, Tramontin AD, Quiñones-Hinojosa A, et al. Unique astrocyte ribbon in adult human brain contains neural stem cells but lacks chain migration. *Nature.* 2004;427(6976):740-744. doi:10.1038/nature02301.
14. Diaz J, Ridray S, Mignon V, Griffon N, Schwartz JC, Sokoloff P. Selective expression of dopamine D3 receptor mRNA in proliferative zones during embryonic development of the rat brain. *J Neurosci.* 1997;17(11):4282-4292.

15. Borta A, Höglinger GU. Dopamine and adult neurogenesis. *J Neurochem*. 2007;100(3):587-595. doi:10.1111/j.1471-4159.2006.04241.x.
16. Freundlieb N, François C, Tandé D, Oertel WH, Hirsch EC, Höglinger GU. Dopaminergic substantia nigra neurons project topographically organized to the subventricular zone and stimulate precursor cell proliferation in aged primates. *J Neurosci*. 2006;26(8):2321-2325. doi:10.1523/JNEUROSCI.4859-05.2006.
17. Garcia-Ruiz PJ, Chaudhuri KR, Martinez-Martin P. Non-motor symptoms of Parkinson's disease A review...from the past. *J Neurol Sci*. 2014. doi:10.1016/j.jns.2014.01.002.
18. Braak H, Del Tredici K, Rüb U, de Vos RAI, Jansen Steur ENH, Braak E. Staging of brain pathology related to sporadic Parkinson's disease. *Neurobiol Aging*. 2003;24(2):197-211.
19. Hernandez D, Torres CA, Setlik W, et al. Regulation of presynaptic neurotransmission by macroautophagy. *Neuron*. 2012;74(2):277-284. doi:10.1016/j.neuron.2012.02.020.
20. Sulzer D. Multiple hit hypotheses for dopamine neuron loss in Parkinson's disease. *Trends Neurosci*. 2007;30(5):244-250. doi:10.1016/j.tins.2007.03.009.
21. Meldrum B, Garthwaite J. Excitatory amino acid neurotoxicity and neurodegenerative disease. *Trends Pharmacol Sci*. 1990;11(9):379-387.
22. Yacoubian TA, Slone SR, Harrington AJ, et al. Differential neuroprotective effects of 14-3-3 proteins in models of Parkinson's disease. *Cell Death Dis*. 2010;1:e2. doi:10.1038/cddis.2009.4.
23. Quinn N, Marsden CD, Parkes JD. Complicated response fluctuations in Parkinson's disease: response to intravenous infusion of levodopa. *Lancet*. 1982;2(8295):412-415.
24. Voon V, Fernagut P-O, Wickens J, et al. Chronic dopaminergic stimulation in Parkinson's disease: from dyskinesias to impulse control disorders. *Lancet Neurol*. 2009;8(12):1140-1149. doi:10.1016/S1474-4422(09)70287-X.
25. Lang AE, Lozano AM. Parkinson's disease. Second of two parts. *N Engl J Med*. 1998;339(16):1130-1143. doi:10.1056/NEJM199810153391607.
26. Benabid AL, Pollak P, Louveau A, Henry S, de Rougemont J. Combined (thalamotomy and stimulation) stereotactic surgery of the VIM thalamic nucleus for bilateral Parkinson disease. *Appl Neurophysiol*. 1987;50(1-6):344-346.
27. Langston JW, Langston EB, Irwin I. MPTP-induced parkinsonism in human and non-human primates--clinical and experimental aspects. *Acta Neurol Scand, Suppl.c*. 1984;100:49-54.
28. Albin RL, Young AB, Penney JB. The functional anatomy of basal ganglia disorders. *Trends Neurosci*. 1989;12(10):366-375.
29. Alexander GE, Crutcher MD, DeLong MR. Basal ganglia-thalamocortical circuits: parallel substrates for motor, oculomotor, "prefrontal" and "limbic" functions. *Prog Brain Res*. 1990;85:119-146.

30. Obeso JA, Rodriguez-Oroz MC, Rodriguez M, et al. Pathophysiologic basis of surgery for Parkinson's disease. *Neurology*. 2000;55(12 Suppl 6):S7-12.
31. Wichmann T, DeLong MR. Functional and pathophysiological models of the basal ganglia. *Curr Opin Neurobiol*. 1996;6(6):751-758.
32. Benazzouz A, Gao D, Ni Z, Benabid AL. High frequency stimulation of the STN influences the activity of dopamine neurons in the rat. *Neuroreport*. 2000;11(7):1593-1596.
33. Beurrier C, Bioulac B, Audin J, Hammond C. High-frequency stimulation produces a transient blockade of voltage-gated currents in subthalamic neurons. *J Neurophysiol*. 2001;85(4):1351-1356.
34. Kringelbach ML, Jenkinson N, Owen SLF, Aziz TZ. Translational principles of deep brain stimulation. *Nat Rev Neurosci*. 2007;8(8):623-635. doi:10.1038/nrn2196.
35. Rosa M, Giannicola G, Marceglia S, Fumagalli M, Barbieri S, Priori A. Neurophysiology of deep brain stimulation. *Int Rev Neurobiol*. 2012;107:23-55. doi:10.1016/B978-0-12-404706-8.00004-8.
36. Maurice N, Thierry A-M, Glowinski J, Deniau J-M. Spontaneous and evoked activity of substantia nigra pars reticulata neurons during high-frequency stimulation of the subthalamic nucleus. *J Neurosci*. 2003;23(30):9929-9936.
37. Meissner W, Harnack D, Reese R, et al. High-frequency stimulation of the subthalamic nucleus enhances striatal dopamine release and metabolism in rats. *J Neurochem*. 2003;85(3):601-609.
38. Gradinaru V, Mogri M, Thompson KR, Henderson JM, Deisseroth K. Optical deconstruction of parkinsonian neural circuitry. *Science*. 2009;324(5925):354-359. doi:10.1126/science.1167093.
39. Hess CW, Vaillancourt DE, Okun MS. The temporal pattern of stimulation may be important to the mechanism of deep brain stimulation. *Exp Neurol*. 2013;247:296-302. doi:10.1016/j.expneurol.2013.02.001.
40. Hashimoto T, Elder CM, Okun MS, Patrick SK, Vitek JL. Stimulation of the subthalamic nucleus changes the firing pattern of pallidal neurons. *J Neurosci*. 2003;23(5):1916-1923.
41. Taupin P. BrdU immunohistochemistry for studying adult neurogenesis: paradigms, pitfalls, limitations, and validation. *Brain Res Rev*. 2007;53(1):198-214. doi:10.1016/j.brainresrev.2006.08.002.
42. Takasaki Y, Deng JS, Tan EM. A nuclear antigen associated with cell proliferation and blast transformation. *J Exp Med*. 1981;154(6):1899-1909.
43. Bravo R, Macdonald-Bravo H. Existence of two populations of cyclin/proliferating cell nuclear antigen during the cell cycle: association with DNA replication sites. *J Cell Biol*. 1987;105(4):1549-1554.

44. Gerdes J, Schwab U, Lemke H, Stein H. Production of a mouse monoclonal antibody reactive with a human nuclear antigen associated with cell proliferation. *Int J Cancer*. 1983;31(1):13-20.
45. Scholzen T, Gerdes J. The Ki-67 protein: from the known and the unknown. *J Cell Physiol*. 2000;182(3):311-322. doi:10.1002/(SICI)1097-4652(200003)182:3<311::AID-JCP1>3.0.CO;2-9.
46. Harnack D, Meissner W, Paulat R, et al. Continuous high-frequency stimulation in freely moving rats: development of an implantable microstimulation system. *J Neurosci Methods*. 2008;167(2):278-291. doi:10.1016/j.jneumeth.2007.08.019.
47. Harnack D, Meissner W, Jira JA, Winter C, Morgenstern R, Kupsch A. Placebo-controlled chronic high-frequency stimulation of the subthalamic nucleus preserves dopaminergic nigral neurons in a rat model of progressive Parkinsonism. *Exp Neurol*. 2008;210(1):257-260. doi:10.1016/j.expneurol.2007.10.002.
48. Paxinos and Watson. *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*. Academic Press; 1998.
49. Khaindrava V, Salin P, Melon C, Ugrumov M, Kerkerian-Le-Goff L, Daszuta A. High frequency stimulation of the subthalamic nucleus impacts adult neurogenesis in a rat model of Parkinson's disease. *Neurobiol Dis*. 2011;42(3):284-291. doi:10.1016/j.nbd.2011.01.018.
50. Chung SJ, Jeon SR, Kim SR, Sung YH, Lee MC. Bilateral effects of unilateral subthalamic nucleus deep brain stimulation in advanced Parkinson's disease. *Eur Neurol*. 2006;56(2):127-132. doi:10.1159/000095704.
51. Germano IM, Gracies J-M, Weisz DJ, Tse W, Koller WC, Olanow CW. Unilateral stimulation of the subthalamic nucleus in Parkinson disease: a double-blind 12-month evaluation study. *J Neurosurg*. 2004;101(1):36-42. doi:10.3171/jns.2004.101.1.0036.
52. Novak P, Klemp JA, Ridings LW, Lyons KE, Pahwa R, Nazzaro JM. Effect of deep brain stimulation of the subthalamic nucleus upon the contralateral subthalamic nucleus in Parkinson disease. *Neurosci Lett*. 2009;463(1):12-16. doi:10.1016/j.neulet.2009.07.040.
53. Toda H, Hamani C, Fawcett AP, Hutchison WD, Lozano AM. The regulation of adult rodent hippocampal neurogenesis by deep brain stimulation. *J Neurosurg*. 2008;108(1):132-138. doi:10.3171/JNS/2008/108/01/0132.
54. Aggleton JP, O'Mara SM, Vann SD, Wright NF, Tsanov M, Erichsen JT. Hippocampal-anterior thalamic pathways for memory: uncovering a network of direct and indirect actions. *Eur J Neurosci*. 2010;31(12):2292-2307. doi:10.1111/j.1460-9568.2010.07251.x.
55. Scott BW, Wang S, Burnham WM, De Boni U, Wojtowicz JM. Kindling-induced neurogenesis in the dentate gyrus of the rat. *Neurosci Lett*. 1998;248(2):73-76.
56. Madsen TM, Treschow A, Bengzon J, Bolwig TG, Lindvall O, Tingström A. Increased neurogenesis in a model of electroconvulsive therapy. *Biol Psychiatry*. 2000;47(12):1043-1049.
57. Arias-Carrión O, Verdugo-Díaz L, Feria-Velasco A, et al. Neurogenesis in the subventricular zone following transcranial magnetic field stimulation and nigrostriatal lesions. *J Neurosci Res*. 2004;78(1):16-28. doi:10.1002/jnr.20235.

58. Jahanshahi A, Schonfeld L, Janssen MLF, et al. Electrical stimulation of the motor cortex enhances progenitor cell migration in the adult rat brain. *Exp Brain Res*. 2013;231(2):165-177. doi:10.1007/s00221-013-3680-4.
59. Lee KH, Blaha CD, Harris BT, et al. Dopamine efflux in the rat striatum evoked by electrical stimulation of the subthalamic nucleus: potential mechanism of action in Parkinson's disease. *Eur J Neurosci*. 2006;23(4):1005-1014. doi:10.1111/j.1460-9568.2006.04638.x.
60. Bruet N, Windels F, Bertrand A, Feuerstein C, Poupard A, Savasta M. High frequency stimulation of the subthalamic nucleus increases the extracellular contents of striatal dopamine in normal and partially dopaminergic denervated rats. *J Neuropathol Exp Neurol*. 2001;60(1):15-24.
61. Abstracts of the XVII WFN World Congress on Parkinson's Disease and Related Disorders. December 9-13, 2007. Amsterdam, The Netherlands. *Parkinsonism Relat Disord*. 2007;13 Suppl 2:S29-193.
62. Zhao X, Cao Y, Liu H, Li F, You B, Zhou X. Long term high frequency stimulation of STN increases dopamine in the corpus striatum of hemiparkinsonian rhesus monkey. *Brain Res*. 2009;1286:230-238. doi:10.1016/j.brainres.2009.06.069.
63. Soumier A, Banasr M, Goff LK-L, Daszuta A. Region- and phase-dependent effects of 5-HT(1A) and 5-HT(2C) receptor activation on adult neurogenesis. *Eur Neuropsychopharmacol*. 2010;20(5):336-345. doi:10.1016/j.euroneuro.2009.11.007.
64. Craig CG, Tropepe V, Morshead CM, Reynolds BA, Weiss S, van der Kooy D. In vivo growth factor expansion of endogenous subependymal neural precursor cell populations in the adult mouse brain. *J Neurosci*. 1996;16(8):2649-2658.
65. Zigova T, Pencea V, Wiegand SJ, Luskin MB. Intraventricular administration of BDNF increases the number of newly generated neurons in the adult olfactory bulb. *Mol Cell Neurosci*. 1998;11(4):234-245. doi:10.1006/mcne.1998.0684.
66. Shingo T, Sorokan ST, Shimazaki T, Weiss S. Erythropoietin regulates the in vitro and in vivo production of neuronal progenitors by mammalian forebrain neural stem cells. *J Neurosci*. 2001;21(24):9733-9743.
67. Spieles-Engemann AL, Steece-Collier K, Behbehani MM, et al. Subthalamic nucleus stimulation increases brain derived neurotrophic factor in the nigrostriatal system and primary motor cortex. *J Parkinsons Dis*. 2011;1(1):123-136.
68. Cho T, Ryu JK, Taghibiglou C, et al. Long-term potentiation promotes proliferation/survival and neuronal differentiation of neural stem/progenitor cells. *PLoS ONE*. 2013;8(10):e76860. doi:10.1371/journal.pone.0076860.
69. Hariz MI, Hariz G-M. Therapeutic stimulation versus ablation. *Handb Clin Neurol*. 2013;116:63-71. doi:10.1016/B978-0-444-53497-2.00006-1.
70. Bacci J-J, Absi EH, Manrique C, Baunez C, Salin P, Kerkerian-Le Goff L. Differential effects of prolonged high frequency stimulation and of excitotoxic lesion of the subthalamic nucleus on dopamine denervation-induced cellular defects in the rat striatum and globus pallidus. *Eur J Neurosci*. 2004;20(12):3331-3341. doi:10.1111/j.1460-9568.2004.03792.x.

71. Gubellini P, Eusebio A, Oueslati A, Melon C, Kerkerian-Le Goff L, Salin P. Chronic high-frequency stimulation of the subthalamic nucleus and L-DOPA treatment in experimental parkinsonism: effects on motor behaviour and striatal glutamate transmission. *Eur J Neurosci*. 2006;24(6):1802-1814. doi:10.1111/j.1460-9568.2006.05047.x.
72. Lacombe E, Khaindrava V, Melon C, Oueslati A, Kerkerian-Le Goff L, Salin P. Different functional basal ganglia subcircuits associated with anti-akinetic and dyskinesigenic effects of antiparkinsonian therapies. *Neurobiol Dis*. 2009;36(1):116-125. doi:10.1016/j.nbd.2009.07.002.
73. Song S, Song S, Cao C, et al. Hippocampal neurogenesis and the brain repair response to brief stereotaxic insertion of a microneedle. *Stem Cells Int*. 2013;2013:205878. doi:10.1155/2013/205878.
74. Fairman MP. DNA polymerase delta/PCNA: actions and interactions. *J Cell Sci*. 1990;95 (Pt 1):1-4.
75. Maier P, Weibel B, Zbinden G. The mutagenic activity of 5-bromo-2'-deoxyuridine (BrdU) in vivo in rats. *Environ Mutagen*. 1983;5(5):695-703.
76. Nowakowski RS, Lewin SB, Miller MW. Bromodeoxyuridine immunohistochemical determination of the lengths of the cell cycle and the DNA-synthetic phase for an anatomically defined population. *J Neurocytol*. 1989;18(3):311-318.
77. Abdanipour A, Sagha M, Noori-Zadeh A, Pakzad I, Tiraihi T. In vitro study of the long-term cortisol treatment effects on the growth rate and proliferation of the neural stem/precursor cells. *Neurol Res*. 2014;1743132814Y0000000431. doi:10.1179/1743132814Y.0000000431.
78. Hall PA, Levison DA. Review: assessment of cell proliferation in histological material. *J Clin Pathol*. 1990;43(3):184-192.
79. Zacchetti A, van Garderen E, Teske E, Nederbragt H, Dierendonck JH, Rutteman GR. Validation of the use of proliferation markers in canine neoplastic and non-neoplastic tissues: comparison of KI-67 and proliferating cell nuclear antigen (PCNA) expression versus in vivo bromodeoxyuridine labelling by immunohistochemistry. *APMIS*. 2003;111(3):430-438.
80. Lindvall O, Björklund A. Cell therapy in Parkinson's disease. *NeuroRx*. 2004;1(4):382-393. doi:10.1602/neurorx.1.4.382.
81. Wang S, Okun MS, Suslov O, et al. Neurogenic potential of progenitor cells isolated from postmortem human Parkinsonian brains. *Brain Res*. 2012;1464:61-72. doi:10.1016/j.brainres.2012.04.039.
82. Winner B, Couillard-Despres S, Geyer M, et al. Dopaminergic lesion enhances growth factor-induced striatal neuroblast migration. *J Neuropathol Exp Neurol*. 2008;67(2):105-116. doi:10.1097/nen.0b013e3181630cff.
83. Arvidsson A, Collin T, Kirik D, Kokaia Z, Lindvall O. Neuronal replacement from endogenous precursors in the adult brain after stroke. *Nat Med*. 2002;8(9):963-970. doi:10.1038/nm747.

84. Harnack D, Kupsch A. The impact of subthalamic deep brain stimulation on nigral neuroprotection-myth or reality? *Neuromodulation*. 2010;13(3):160-167. doi:10.1111/j.1525-1403.2010.00282.x.
85. Schüpbach WMM, Chastan N, Welter ML, et al. Stimulation of the subthalamic nucleus in Parkinson's disease: a 5 year follow up. *J Neurol Neurosurg Psychiatr*. 2005;76(12):1640-1644. doi:10.1136/jnnp.2005.063206.
86. Krack P, Batir A, Van Blercom N, et al. Five-year follow-up of bilateral stimulation of the subthalamic nucleus in advanced Parkinson's disease. *N Engl J Med*. 2003;349(20):1925-1934. doi:10.1056/NEJMoa035275.
87. Schuepbach WMM, Rau J, Knudsen K, et al. Neurostimulation for Parkinson's disease with early motor complications. *N Engl J Med*. 2013;368(7):610-622. doi:10.1056/NEJMoa1205158.
88. Guo X, Gao G, Wang X, et al. Effects of bilateral deep brain stimulation of the subthalamic nucleus on olfactory function in Parkinson's disease patients. *Stereotact Funct Neurosurg*. 2008;86(4):237-244. doi:10.1159/000131662.
89. Campbell MC, Black KJ, Weaver PM, et al. Mood response to deep brain stimulation of the subthalamic nucleus in Parkinson's disease. *J Neuropsychiatry Clin Neurosci*. 2012;24(1):28-36. doi:10.1176/appi.neuropsych.11030060.
90. Wolz M, Hauschild J, Fauser M, Klingelhöfer L, Reichmann H, Storch A. Immediate effects of deep brain stimulation of the subthalamic nucleus on nonmotor symptoms in Parkinson's disease. *Parkinsonism & related disorders*. 2012. doi:10.1016/j.parkreldis.2012.05.011.
91. Witjas T, Kaphan E, Régis J, et al. Effects of chronic subthalamic stimulation on nonmotor fluctuations in Parkinson's disease. *Mov Disord*. 2007;22(12):1729-1734. doi:10.1002/mds.21602.
92. Höglinger GU, Rizk P, Muriel MP, et al. Dopamine depletion impairs precursor cell proliferation in Parkinson disease. *Nat Neurosci*. 2004;7(7):726-735. doi:10.1038/nn1265.
93. Van den Berge SA, van Strien ME, Korecka JA, et al. The proliferative capacity of the subventricular zone is maintained in the parkinsonian brain. *Brain*. 2011;134(Pt 11):3249-3263. doi:10.1093/brain/awr256.

Anhang:

Verwendete Substanzen und Lösungen

Glyzerin	Merck, Darmstadt, Deutschland
Natriumdihydrogen- und Natriumhydrogencarbonat	Merck, Darmstadt, Deutschland
Natriumhydroxid	Merck, Darmstadt, Deutschland
Paraformaldehyd	SIGMA Chemie, Deisenhofen, Deutschland

Tabelle 4: Für die transkardiale Perfusion und Kryoprotektion verwendete Substanzen

Kryoprotektive Lösung	250ml Glyzerin, 250ml Ethylenglykol, 500ml Phosphatpuffer (0,1M, pH 7,4)
Paraformaldehyd (PFA) 4%	80g Paraformaldehyd in 2l PBS 0,1M
Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS) 0,1M	18g NaCl 5,26g NaH ₂ PO ₄ • H ₂ O 58,2g Na ₂ HPO ₄ •12 H ₂ O In 2l dH ₂ O lösen und mit NaOH 1M auf 7,4 pH einstellen
Sacchrose 30 %	150 g Saccharose in 400 ml PBS 0,1 M

Tabelle 5: Für die transkardiale Perfusion, Entwässerung und Kryoprotektion verwendete Lösungen

ABC-Reagenz: Vectastain Elite	Vector Laboratories, Burlingame, USA
Albumin from Bovine Serum (BSA) A-7030	SIGMA Chemie, Deisenhofen, Deutschland
Ammoniumnickel-2-sulfat A-1827	SIGMA Chemie, Deisenhofen, Deutschland
3'3 Diaminobenzinhydrochlorid (DAB) D- 5637	SIGMA Chemie, Deisenhofen, Deutschland
Entellan®	Merck, Darmstadt, Deutschland
Esel-Normalserum S-36	Chemicon, Temecula, CA, USA
Ethanol 96% 1.00949.1000	Merck, Darmstadt, Deutschland
Ethylenglykol 1.00949.1000	Merck, Darmstadt, Deutschland
2-Propanol (100%)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Salzsäure (2N)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Triton X-100 37240	Serva, Heidelberg, Deutschland
Tris(Hydroxymethyl)aminomethan T1378 1M	Sigma, St. Louis, USA
Wasserstoffperoxid (30%)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Xylol	Merck, Darmstadt, Deutschland
Ziegen- Normalserum S1000	Vector Laboratories , Burlingame, USA

Tabelle 6: Für die Immunhistochemie verwendete Substanzen mit Hersteller

Boratpuffer 0,1 M	3,08 g Borsäure + 450 ml Aqua dest + 5N Natriumhydroxid, titrieren auf pH 8,5, auf 500 ml auffüllen
DAB Aliquots	50 mg/ml
PBS-Arbeitslösung (0,2%)	20mg BSA in 10ml PBS
PBS-plus	96 ml PBS, 1 ml Triton X 10%, 3 ml Eselserum
PBS-plus 2	92 ml PBS, 3 ml Triton X 10%, 5 ml Ziegennormalserum
PBS-plus 3	87 ml PBS, 3 % Triton X 10%, 10 ml Ziegennormalserum
Trispuffer (TBS) 10mmol/l	121 mg Tris (H ₂ NC(CH ₂ OH) ₃) in 80 ml H ₂ O lösen und mit HCl 10M auf 7,6 pH einstellen, dann auf 100 ml auffüllen

Tabelle 7: Für die Immunhistochemie verwendete Lösungen

Kresylviolett	Merck, Darmstadt, Deutschland
Kresylviolett-Färbelösung	1,5 g Kresylviolett + 98 ml Agua dest. + 1 ml 1 M CH ₃ COOH + 1 ml 1 M Natriumacetat

Tabelle 8: Für die Nissl-Färbung verwendete Substanzen und Lösungen mit Hersteller

Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Antonia Sophia Owsianowski, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: *„Untersuchung von zellulärer Plastizität in der Subventrikulären Zone der gesunden Wistar-Ratte nach chronischer Hochfrequenzstimulation des Nucleus Subthalamicus“* selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung (siehe „Uniform Requirements for Manuscripts (URM)“ des ICMJE -www.icmje.org) kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem/der Betreuer/in, angegeben sind. Sämtliche Publikationen, die aus dieser Dissertation hervorgegangen sind und bei denen ich Autor bin, entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§156,161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.

Berlin, 12.08.2014

Lebenslauf

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

Danksagung

Ich bedanke mich bei meinem Doktorvater Herrn Professor Dr. med. Andreas Kupsch für die Unterstützung meiner Dissertation in der Klinik für Neurologie, Charité- Universitätsmedizin Berlin, Campus Virchow Klinikum, sowie meinem Betreuer Herrn Dr. med. Daniel Harnack für seine Ideen, welche der Grundstein dieser Arbeit sind.

Herzlich möchte ich mich auch bei allen Mitarbeitern und ehemaligen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe sowie bei meiner Familie und meinen Freunden für Ihre Unterstützung bedanken.