

NEUROPROTEKTIVE EFFEKTE VON
ROLIPRAM UND ZOLPIDEM AUF
SEKUNDÄRLÄSIONEN DER
SUBSTANTIA NIGRA NACH
CHINOLINSÄUREINDUZIERTER
LÄSION DES STRIATUMS

Von der Medizinischen Fakultät
der Rheinisch-Westfälischen Technischen Hochschule Aachen
zur Erlangung des akademischen Grades eines Doktors der Medizin
genehmigte Dissertation

vorgelegt von

Claas Frohn

aus

Aachen

Berichter: Herr Professor
Dr. med. Frank Block

Herr Universitätsprofessor
Dr. rer.nat. Dr. med. Hubert Korr

Tag der mündlichen Prüfung: 15. Juni 2005

Diese Dissertation ist auf den Internetseiten der Hochschulbibliothek online
verfügbar.

INHALTSVERZEICHNIS

1. EINLEITUNG	1
1.1. Klinische Erscheinung	1
1.2. Pathologische Veränderungen	4
1.3. Biochemische Defekte	5
1.4. Tiermodell	13
1.4.1. Transgene Mäuse	13
1.4.2. Neurotoxininduzierte Modelle	15
1.5. Funktionelle Anatomie der Basalganglien	16
1.6. Fragestellung	17
2. MATERIAL UND METHODEN	19
2.1. Versuchstiere	19
2.2. Stereotaktische Injektion von Chinolinsäure (QA)	20
2.3. Postoperative Behandlung der Tiere	20
2.4. Probenentnahme und Gewebeaufarbeitung	21
2.5. Weiterverarbeitung und Färbemethoden	21
2.5.1. Immunhistochemie zur lichtmikroskopischen Darstellung von TNF- α , GFAP und OX-42	21
2.5.2. Nissl-Färbung	23
2.6. Auswertung und statistische Methoden	24
2.6.1. Läsionsausdehnung im Striatum und Flächenverringerung der Substantia nigra	24
2.6.2. Quantitative Auswertung der Anzahl der Nervenzellen in der Substantia nigra	25
2.6.3. Qualitative Auswertung der immunhistochemisch gefärbten Schnitte	25
3. ERGEBNISSE	27
3.1. Läsionsanteile im Striatum	27
3.2. Flächenverhältnisse in der Substantia nigra pars reticulata	29
3.3. Verringerung der Zellzahl in der Substantia nigra pars reticulata	32
3.4. Immunhistochemische Färbung auf GFAP und OX-42	34
3.5. Zeitverlauf der Expression von TNF- α bei der QA-Gruppe ohne Protektion	35
4. DISKUSSION	37
4.1. Validierung	37
4.1.1. Morphologische Veränderungen im Bereich des Striatums	37
4.1.2. Morphologische Veränderungen im Bereich der Substantia nigra	38

4.2.	Zeitverlauf der glialen Reaktion in der SNr	39
4.3.	Expression von TNF- α in der SNr	40
4.4.	Beeinflussung des Zelluntergangs in der SNr durch Rolipram	41
4.5.	Beeinflussung neurodegenerativer Schäden durch GABA-Agonisten	42
4.6.	Klinische Wertung	44
4.6.1.	Alternativen: Antiphlogistika bei anderen neurodegenerativen Erkrankungen	45
5.	ANHANG	47
6.	ZUSAMMENFASSUNG	56
7.	BIBLIOGRAFIE	57
8.	LEBENS LAUF	63

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

<i>Nummer</i>	<i>Seite</i>
1	8
2	16
3	27
4	28
5	29
6	30
7	31
8	32
9	33
10	33
11	34
12	34
13	36

TABELLENVERZEICHNIS

<i>Nummer</i>	<i>Seite</i>
1	22
2	33
3	47
4	48
5	49
6	50
7	51
8	52
9	53
10	54
11	55

DANKSAGUNGEN

Ich bedanke mich bei Evangelia Boutsiouki für die viele Geduld,

bei meinen Eltern für ihre Unterstützung,

bei Thomas Geerkens für die Korrektur,

bei meinem Bruder Marc für den Fotodruck.

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

3-NP	3-Nitropropionsäure
AIF	Apoptosis inducing Factor
CH	Chorea Huntington
COX-2-Inhibitoren	Hemmstoffe der Cyclooxygenase 2
CS	Colliculus superior
IL-1 β	Interleukin 1 β
IL-1Ra	Interleukin 1 Rezeptorantagonist
iNOS	inducible nitric oxide synthase
LGP	lateraler Globus pallidus
mGluR	metabotroper Glutamatrezeptor
MGP	medialer Globus pallidus
Ncl.	Nucleus
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat-Rezeptor
NSAR	Nicht steroidale Antirheumatika
PBS	Phosphatgepufferte Kochsalzlösung
PET	Positronen-Emissions-Tomographie
PTBBS	Peripheral type benzodiazepine binding sites
SEM	Standard Error of Means
SNc	Substantia Nigra pars compacta
SNr	Substantia Nigra pars reticulata
STN	Nucleus subthalamicus
TNF- α	Tumornekrosefaktor α

1. Einleitung

In dieser Arbeit sollen die mikroskopisch sichtbaren Effekte neurodegenerativer Erkrankungen am Beispiel der transsynaptischen Degeneration der Substantia nigra nach chinolinsäure-induzierter Läsion des Striatums erläutert und einige therapeutische Ansätze erörtert werden. Ähnliche pathologische Veränderungen finden sich beim Menschen bei der Chorea Huntington, einer Erkrankung, die zu den neurodegenerativen CAG-Triplet-Erkrankungen gehört. Aus diesem Grund wurde das hier benutzte Tiermodell lange Zeit als Modell für den Morbus Huntington benutzt.

Die Chorea Huntington wird gekennzeichnet durch die Trias: dominanter Erbgang, Choreoathetose und Demenz. Erstbeschreiber war George Huntington, ein praktischer Arzt aus Pomeroy, Ohio, der 1872 vor der "Meigs and Mason Academy of Medicine" seine Schlüsse umriss, basierend auf Beobachtungen seines Vaters und Großvaters, ebenfalls praktische Ärzte [31].

1.1. Klinische Erscheinung

In Universitätskliniken ist die Chorea Huntington mit einer Häufigkeit von 5 bis 10 Erkrankungen auf 100 000 Einwohner eine der wichtigsten hereditären Nervenerkrankungen, das Vererbungsmuster ist autosomal dominant [32]. Im allgemeinen scheinen Männer ungefähr gleich häufig betroffen zu sein wie Frauen. Durchschnittliches Erkrankungsalter ist das 3. bis 5. Lebensjahrzehnt, wobei es auch Formen mit Beginn im Kindesalter gibt, die dann durch einen schwereren Verlauf gekennzeichnet sind.

Ursache ist eine verlängerte CAG-Sequenz, d.h. Wiederholungen von Cytosin-Adenin-Guanin-Triplets am kurzen Arm des Chromosom 4 (s.u.). Das CAG-Triplet kodiert für die Aminosäure Glutamin.

Bei den betroffenen Patienten können bereits vor Störung der kognitiven Funktionen verschiedene subtile Veränderungen auftreten. Ungefähr die Hälfte der Patienten weisen leichte Abweichungen ihrer Charakterzüge auf. Sie fallen durch unangemessene Verdächtigungen, Irritabilität, impulsive und exzentrische Verhaltensweisen sowie übertriebene Religiosität und ein unangemessenes Überlegenheitsgefühl auf. Häufig führt dies schon zu Spannungen in den sozialen Beziehungen. Geringe Selbstkontrolle kann sich widerspiegeln in Wutausbrüchen, Episoden von Mutlosigkeit, Alkoholismus und sexueller Promiskuität. Die emotionalen Störungen können mitunter das Ausmaß einer Psychose annehmen. Zu den Frühsymptomen zählt ebenfalls eine veränderte Stimmungslage, besonders Depressionen [59].

Im weiteren Verlauf kommt es zum Verlust des Intellekts. Kennzeichen sind verminderte Leistungsfähigkeit im Arbeitsumfeld, Unfähigkeit, den Haushalt zu organisieren u.Ä. Diese Veränderungen führen häufig zu ärztlichen Konsultationen. Erinnerungsvermögen und Aufmerksamkeit sind die kognitiven Qualitäten, die als Erstes vom Schwund der Leistungsfähigkeit betroffen sind. Die allmähliche Zerstörung des Intellekts entspricht in weiten Zügen den anderen Demenzformen, jedoch sind Aphasie, Agnosie und Apraxie nur recht selten zu beobachten. Häufig bleiben Reste der kognitiven Kapazitäten noch sehr lange erhalten; die Krankheit schreitet schleichend fort [3,14].

Zunächst leicht sind ebenfalls die Bewegungsstörungen; betroffen sind anfangs die Hände und das Gesicht. Die Patienten werden häufig als nervös und ruhelos eingestuft. Mit der Zeit jedoch kommt es zu einer zunehmenden Verstärkung der motorischen Symptomatik. Dies nimmt solche Ausmaße an, dass der Patient im fortgeschrittenen Stadium nur selten auch nur für Sekunden ruhig sein kann. Die Bewegungen sind insgesamt langsamer als die brusken Zuckungen der Sydenham Chorea, und sie betreffen weit mehr Muskeln. Auffallend ist die Stereotypie, die allerdings weniger ausgeprägt ist als bei den Tics. Bei fortgeschritteneren Fällen nehmen sie eine athetoide oder dystone Qualität an. Typischerweise ist der Muskeltonus variabel, die Patienten führen unwillkürliche, arrhythmische und schnelle Bewegungen aus. Dabei versuchen sie oft, diese durch willkürliche Bewegungen zu kaschieren. Die Ruhelosigkeit ist dadurch gekennzeichnet, dass Finger, Zunge etc. nicht für lange Zeit in einer fixen Position behalten werden können. Die entsprechende Haltung wird plötzlich unterbrochen durch ziemlich langsame, gewundene und sinnlose Bewegungsmuster, die ineinander übergehen. Die Willkürmotorik ist verlangsamt [3,59].

Bei der juvenilen Form, die mit einer Häufigkeit von 10% auftritt und vor dem 20. Lebensjahr in Erscheinung tritt, stehen Bradykinesie, Rigidität und Dystonie sowie epileptische Anfälle im Vordergrund. Diese Verlaufsform wird auch als Westphal-Variante bezeichnet [35].

Bemerkenswert ist die Abhängigkeit der klinischen Symptomatik von der Länge der abnormen CAG-Sequenz. Eine vollständige Penetranz von CH zeigt sich bei CAG-Größen von größer oder gleich 42. Nur ein gewisser Anteil der Patienten mit CAG-Wiederholungen von 36 bis 41 zeigt hingegen Symptome der CH [13]. Außerdem bedingt eine höhere CAG-Wiederholungsrate eine schnellere klinische

Verschlechterung und eine größere Wahrscheinlichkeit, bereits in frühen Jahren zu erkranken [14,33]. Die Wiederholungsrate in den Gameten ist bemerkenswerterweise instabil, die Vererbung auf die nachfolgenden Generationen ist variabel. Häufig kommt es bei Vererbung vom Vater zu einer Verlängerung der CAG-Sequenz, und es ist somit mit einem früheren Krankheitsbeginn als beim Vater zu rechnen [34].

1.2. Pathologische Veränderungen

Das charakteristische makroskopische Korrelat der Chorea Huntington ist eine ausgeprägte bilaterale Atrophie des Kopfes des Nucleus caudatus und des Putamen, normalerweise begleitet von einer leichtgradigen Atrophie der temporalen und frontalen Gyri. Auch Hypothalamus und Thalamus sind von der Degeneration betroffen. Durch die Caudatus-Atrophie kommt es zu einer starken Aufweitung der Seitenventrikel [36].

Es wird angenommen, dass die frühen klinischen Manifestationen eher auf biochemischen Alterationen ohne sichtbare strukturelle Veränderungen beruhen, da in einigen frühen Fällen keine striatalen Läsionen gefunden wurden [36]. Dies wird gestützt durch Untersuchungen mit Positronen-Emissions-Tomografie an CH-Patienten, wobei eine charakteristische Verminderung der Glukose-Utilisation gefunden wurde. Diese erscheint bereits frühzeitig und geht dem Gewebsuntergang voraus [1]. Zudem zeigt die zerebrale Blutfluss-PET eine veränderte Aktivität im Bereich des Striatum und der frontalen motorischen Projektionsareale. Erhöhte parietale Aktivitätsmuster könnten auf eine kompensatorische Rekrutierung akzessorischer motorischer Bahnen hindeuten [16].

Die striatale Degeneration beginnt in dem medialen Teil des Nucleus caudatus und breitet sich aus, indem der Nucleus accumbens in der Regel ausgespart bleibt. Die

anterioren Anteile des Putamen und des Caudatum sind mehr betroffen als die posterioren [36].

Vorwiegend gehen die GABAergen Projektionsneurone unter, die vom Striatum in die nachgeschalteten Basalganglienstrukturen projizieren. Die sogenannten Interneurone werden weitgehend ausgespart. Charakteristisch ist neben dem Neuronenverlust auch die striatale Astrogliose, also die reaktive Vermehrung von Astrozyten [58].

1.3. Biochemische Defekte

Die pathologischen Erscheinungen des Morbus Huntington beruhen auf einer Degeneration der striatonigralen Hemmung. Es findet sich ein Untergang der GABA, Substanz P und Azetylcholin sezernierenden Neurone [2].

Der Verlust von inhibitorischen striatalen Neuronen, die in den lateralen Globus pallidus projizieren, führt zu einer Hemmung des Nucleus subthalamicus. Dies hat eine Inhibition der hemmenden Kerne der Basalganglien, nämlich Substantia nigra pars reticulata und medialer Globus pallidus zur Folge und resultiert in einer verstärkten erregenden thalamocorticalen Projektion. Dies steht mit den typischen Bewegungsmustern der CH im Einklang. Die verminderte Inhibition durch die SNR kann auch die Dysregulation des Colliculus superior mit der typischen frühen Verlangsamung der willkürlichen Blicksakkaden erklären.

Im späteren Verlauf kommt es zusätzlich zur Degeneration direkter striataler Projektionsneurone zur SNr [37].

Grundlage der klinischen und pathologischen Erscheinungen des Morbus Huntington ist offenbar eine abnorm expandierte Wiederholung (>36) der CAG-Sequenz im IT15-

Gen auf dem kurzen Arm von Chromosom 4 (4p16.3), welches für ein Protein von bisher unbekannter Funktion kodiert, das sog. Huntingtin [4,5]. Vermutlich handelt es sich dabei um ein Transportprotein, welches daran beteiligt ist, intrazelluläre Vesikel an das Zytoskelett zu binden [51]. Sowohl in Huntington-Patienten als auch bei den transgenen Mausmodellen finden sich neuronale Einschlüsse, die Immunoreaktivität für Huntingtin und Ubiquitin aufweisen. Diese Eigenschaft des mutierten Huntingtins Aggregate zu bilden beruht auf den Polyglutaminsträngen, die sich in gegensätzlicher Orientierung aneinander reihen, wobei die Stärke der Bindung größer ist, je länger die Polyglutaminkette ist [39].

Die oben erwähnten Huntingtin-Aggregate können sowohl nukleär als auch neuritisch lokalisiert sein. Des Weiteren finden sich perinukleäre Huntingtin-Ansammlungen und multivesikuläre Körperchen. Die genaue Lokalisation der Protein-Aggregation ist polyglutaminabhängig [6]. Die genaue Bedeutung des Huntingtins an der Pathogenese ist noch weitgehend ungeklärt. Es wird jedoch angenommen, dass das Protein durch den Gendefekt keinen Funktionsausfall erfährt, sondern vielmehr zusätzliche Funktionen erhält ("gain") [40]. Wahrscheinlich modifiziert es die Funktion zellulärer Proteine, die in den neuronalen Metabolismus eingreifen. Darauf aufbauend gibt es verschiedene weitergehende Erklärungsmodelle, wobei Exzitotoxizität, oxidativer Stress, gestörter Energie-Metabolismus und Apoptose eine Rolle zu spielen scheinen [4].

Das Auffinden einer signifikanten Verminderung der Aktivitäten von Acotinase und mitochondrialem Komplex IV und vermehrte Anfärbbarkeit in der Immunhistochemie auf inducible nitric oxide synthase (iNOS) und Nitrotyrosin weisen auf Defekte in der mitochondrialen Atmungskette und im Energiestoffwechsel hin [5].

Browne et al. fanden erhöhte Konzentrationen von Produkten oxidativen Stresses, wie z.B. Malondialdehyd, 8-Hydroxydeoxyguanosin, 3-Nitrotyrosin und Häm-Oxygenase in degenerativ veränderten Gebieten in Huntington-Hirnen. In Tiermodellen zeigt sich eine erhöhte Produktion freier Radikale. Diese Befunde untermauern die Bedeutung des oxidativen Stresses in der Pathogenese [8].

Von Hackam et al. werden zwei Phasen der Pathogenese postuliert: eine anfängliche Toxizität des Huntingtins im Zytoplasma, gefolgt durch die proteolytische Spaltung, nukleäre Verlagerung mit erhöhter nukleärer Konzentration von N-terminalen Fragmenten, Bildung von Aggregaten und daraus resultierendem Zelltod [7]. Die nukleären Einschlusskörperchen bedingen wahrscheinlich eine Störung der Transkription und Minderexpression wichtiger Proteine, darunter bestimmter Neurotransmitterrezeptoren (metabotrope Glutamatrezeptoren). Diese Rezeptoren sind überwiegend präsynaptisch lokalisiert, und ein Fehlen der Rezeptoren bedingt eine vermehrte Freisetzung von Glutamat in den synaptischen Spalt, was letztendlich zur Überstimulation führt (Exzitotoxizität, s.u.) [41]. Ebenfalls in dieses Konzept passt das Auffinden einer verminderten Expression von Glutamat-Transportern (GLT1) in Gliazellen [52]. Die Hypothese der glutamatvermittelten Exzitotoxizität wird zudem gestützt durch Befunde des Teams um Taylor-Robinson: Bei CH-Patienten wurde mittels Proton-Magnet-Resonanz-Spektroskopie ein erhöhter Glutamat/Kreatin-Quotient gefunden, lokalisiert im Striatum. Daraus kann auf einen abnormalen Glutamat-Metabolismus im Striatum geschlossen werden [20]. Des Weiteren kann eine verminderte Läsionsgröße und Laktatproduktion im Striatum bei neurotoxininduzierten Rattenmodellen nach unilateralen Dekortektomien (Blockade des glutamatergen Inputs) bzw. nach Gabe von Glutamat-Antagonisten (MK-801) beobachtet werden. Beeinflussung des Energiestoffwechsels durch Ubichinon- und

Nicotinamid-Gabe führte zu ähnlichen Ergebnissen, was den Schluss zulässt, dass die intrazelluläre Störung des Energie-Metabolismus mit der Exzitotoxizität zusammenhängt [21].

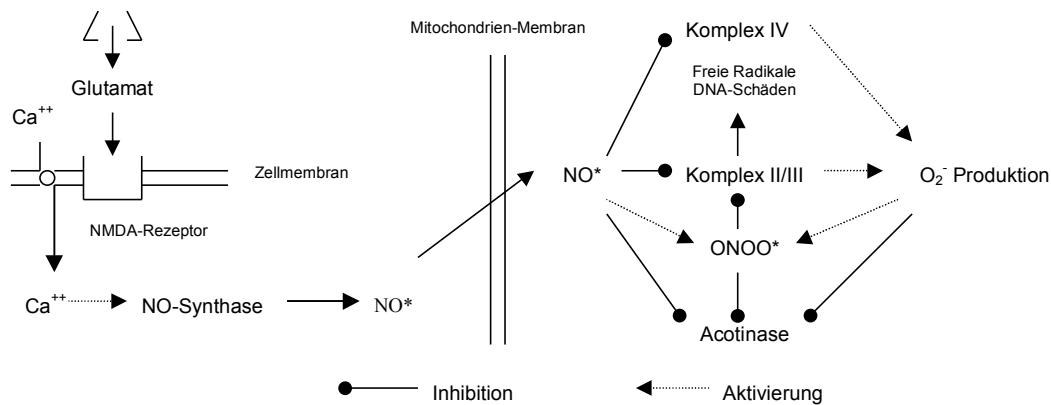


Abbildung 1: Mechanismus der Exzitotoxizität (s. Text) nach [25]

Im Rahmen der gestörten Atemkettenfunktion kommt es zu einem Absinken der intrazellulären ATP-Konzentration, welche in teilweiser Depolarisation der Zellmembran und Aufhebung des Mg^{++} -vermittelten Blocks der NMDA-Rezeptoren und persistierender Aktivierung durch Glutamat aus der unmittelbaren Umgebung resultiert [25,26]. Auch die erhöhte Glutamat-Konzentration im synaptischen Spalt, bedingt durch die verminderte Anzahl an mGluR, spielt dabei eine Rolle (s.o.). Unter anderem führt dies zu erhöhtem intrazellulärem Ca^{++} -Einstrom und Stickstoffmonoxid (NO^*)-Produktion durch die Ca^{++} -abhängige NO^* -Synthase. Atemkettenkomplexe zeichnen sich durch Eisen-Schwefel-Gruppen aus, die ein Ziel für NO^* bzw. ONOO^- darstellen [27,28].

Moderate NO^* -Erhöhung führt nun zunächst zur Komplex-IV-Inhibition. Daraus resultiert eine weitere Erhöhung der NO^* -Konzentration mit konsekutiver Inaktivierung der Aconitase. Höhere Konzentrationen an NO^* , entsprechend

ausgedehnter Exzitotoxizität, führen dagegen zur Inaktivierung von Komplex II/III. Dadurch kommt es bei weiter ansteigender Sauerstoffradikalbildung zu Schäden an der DNA und den sie umgebenden Proteinen [25].

Diese Veränderungen sind - abhängig von der Lokalisation - unterschiedlich ausgeprägt. So finden sich die stärksten Veränderungen im Striatum mit Inhibition sowohl der Aconitase als auch des Komplexes II/III. Moderate Veränderungen finden sich im Cortex (lediglich Inhibition der Aconitase). Im Cerebellum und in Fibroblasten dagegen wurden entsprechende Veränderungen nicht gefunden trotz Expression des mutanten Proteins in diesen Lokalisationen.

Die zelluläre ATP-Produktion wird folglich auf mehreren Ebenen beeinträchtigt, nämlich durch Inhibition der Aconitase (Tricarbonsäure-Zyklus) und des Komplexes II/III (oxidative Phosphorylierung). Störung des Energiestoffwechsels in Kombination mit oxidativem Stress bildet folglich einen sich selbst verstärkenden Zelltodmechanismus, initiiert durch Exzitotoxizität und NO^{*}-Produktion [25].

Beim Nervenzelluntergang im Rahmen der CH spielen sowohl Apoptose als auch Nekrose eine Rolle. Apoptotische Zellen sind charakterisiert durch perinukleäre Chromatin-Kondensation, Organellenschwellung und endonukleasevermittelter DNA-Fragmentation. Diese DNA-Bruchstücke zeigen ein nicht zufälliges Muster (Leiterform in der Elektrophorese). Im Gegensatz dazu finden sich beim nekrotischen Zelltod vakuolisierte Zellen mit geschwollenen und lysierten Organellen, kondensiertes Chromatin in kleinen Aggregaten in der Peripherie des Kerns und degradierte DNA in zufälligem Muster. Voraussetzung für die Apoptose ist eine relativ intakte Funktion der Mitochondrien. Stärkere Funktionseinbußen der Mitochondrien führen eher zu Nekrosen.

Wie bereits oben beschrieben, kommt es durch Aktivierung der NMDA-Kanäle zu einem erhöhten Ca^{++} -Einstrom in die Zelle. Im weiteren Verlauf akkumulieren die überschüssigen Ca^{++} -Ionen in den Mitochondrien. Die Folge ist vorübergehende Depolarisation der inneren Membran und vermehrte mitochondriale Permeabilität [47, 49]. Dies schließt eine Fusion der inneren und äußeren mitochondrialen Membranproteine mit Bildung von Porenkomplexen mit ein. Die Bildung solcher Poren wird ebenfalls durch Anwesenheit von reaktiven Sauerstoffverbindungen angeregt [50]. Es wird nun angenommen, dass angesichts des depolarisierten inneren Membranpotenzials Cytochrom C und ein Protein namens "Apoptose induzierender Faktor" (AIF) durch die Poren freigesetzt werden [47, 48].

Nur unzulänglich bekannt ist bisher die Bedeutung von Entzündungsreaktionen an der Pathogenese des Morbus Huntington. Bekannt ist, dass der Neuronenverlust im Striatum einhergeht mit einer fibrillären Astrozytose und relativer Gliose. Das Verhältnis der Anzahl von Neuronen zu Gliazellen sinkt von normalerweise 1:3,5 auf 1:10 bei der CH [53]. Bei Huntington-Patienten kann post mortem eine erhöhte Anzahl von peripheren Benzodiazepinbindungsstellen (PTBBS) gefunden werden. Diese Rezeptoren sind vornehmlich an Gliazellen lokalisiert und vermehrt als Antwort auf $\text{IL-1}\beta$, $\text{TNF}\alpha$ oder Lipopolysaccharide nachweisbar. Sie können somit als Marker für entzündliche Gliose angesehen werden. Besonders betroffen von diesen Veränderungen ist das Putamen. Eine mittelgradige Erhöhung der PTBBS-Dichte findet sich im frontalen Cortex. Auch in den chinolinsäureinduzierten Modellen (s.u.) können entsprechende Befunde nachgewiesen werden. Vermutlich lassen sich die o.a. Veränderungen auf Mechanismen wie Aktivierung von Makrophagen, Mikroglia und Astrozyten zurückführen [53].

Die Gruppe um S.K. Singhrao fand in ihrer Arbeit weitere Hinweise auf eine Beteiligung von entzündlichen Prozessen an der Pathogenese der CH [54]. Es konnten Komponenten der klassischen und der terminalen Komplementkaskade, der Komplementregulatoren und der Anaphylatoxin-Rezeptoren im Caudatum nachgewiesen werden. C3- und C9- mRNA fand sich in Mikrogliazellen, während Komplement-Aktivierungsprodukte und MAC (Membrane Attack Complex) auf Neuronen und reaktiven Astrozyten präsent waren als Zeichen einer Attacke durch das Komplement-System. In den gesunden Kontrollen konnten diese Befunde nicht erhoben werden. Außerdem konnte eine ausgeprägte Aktivierung von Astrozyten und Mikroglia im Neostriatum bei fortgeschrittenen Fällen nachgewiesen werden. Die Autoren erwägen, dass bei der CH - in Analogie zu den Funden bei der Alzheimer Demenz - mutantes Huntingtin zur Aktivierung der Komplementkaskade beitragen könnte. Lange repetitive Polypeptidketten können nachgewiesenermaßen in vitro das Komplementsystem mobilisieren. Die Komplementaktivierung könnte sekundär zum neuronalen Zelltod durch oxidativen Stress oder metabolische Defekte initiiert werden [54].

Bei der Untersuchung des Beitrages von entzündlichem Geschehen zur Neurodegeneration muss zudem zwischen akuten und chronischen Ereignissen unterschieden werden. Bei der akuten Neurodegeneration (z.B. nach Injektion von Glutamat-Agonisten, s.u.) finden sich nur geringe Zeichen einer typischen inflammatorischen Antwort. Es zeigen sich keine vaskulären Mechanismen oder Rekrutierung von Neutrophilen. Allerdings werden residente Makrophagen, d.h. die Mikroglia, schnell nach Injektion von Glutamat-Agonisten aktiviert. Daraufhin kommt es offensichtlich zur Freisetzung verschiedener Entzündungsmediatoren. Eine wichtige Rolle scheint die Freisetzung von tPA (tissue plasminogen Activator) zu

spielen, welches zur Unterbrechung der lamininreichen extrazellulären Matrix der Neurone führt. Auch Metalloproteasen der Mikrogliazellen scheinen an der proteolytischen Kaskade teilzuhaben [55].

Bei chronischen neurodegenerativen Erkrankungen (zu denen neben der CH u.a. der Morbus Parkinson und die Alzheimersche Demenz gehören) finden sich die oben erwähnten Veränderungen der Aktivierung von Mikroglia, Astrozyten und der Komplementkaskade. Bei der Alzheimer Demenz und dem Morbus Parkinson führen Proteinablagerungen zur Mikrogliaaktivierung und konsekutiv zur Produktion von freien Radikalen und möglicherweise anderen neurotoxischen Molekülen. Wahrscheinlich sind in die Pathogenese der Chorea Huntington ähnliche Mechanismen verwickelt [55]. Aktivierte Mikrogliazellen produzieren IL-1 β , IL-6 und TNF α , welche wieder andere Zellpopulationen aktivieren, darunter Mikroglia und Astrozyten, die wiederum Mediatoren abgeben, um weitere Mikroglia zu aktivieren [56].

Eine wichtige Hypothese im Rahmen der Neurodegeneration ist, dass einmal in Gang gesetzte entzündliche Prozesse im Hirn zur Ausweitung tendieren. Im Gegensatz zu peripheren Entzündungen wird der Antagonist zu IL-1 β , IL-1Ra, erst verspätet und nur geringfügig gebildet. Als Folge der mediatorvermittelten Zellenaktivationskaskade werden vermehrte Produktion von reaktiven Sauerstoff- und Stickstoffverbindungen und verstärktes Zellwachstum (Gliose, dystrophische Neuriten) beobachtet [56].

Eine wichtige Rolle bei der Bildung reaktiver Stickstoffverbindungen unter pathologischen Bedingungen spielt das Enzym iNOS (inducible nitric oxide synthase). Im Gegensatz zu akuten Ereignissen wie dem ischämischen Insult finden

sich bei chronischen neurodegenerativen Erkrankungen geringere Konzentrationen an iNOS, aber auch Hitzeschockproteine und Cyclooxygenase II, die mit oxidativen Schäden im Rahmen der neuroinflammatorischen Prozesse in Verbindung stehen [56]. Es wird angenommen, dass auf die Aktivierung von Mikroglia durch proinflammatorische Mediatoren eine vermehrte Expression von iNOS folgt. Diese kann über längere Zeit höhere Konzentrationen an NO produzieren, die neurotoxisch sind. NO reagiert mit Superoxid (O_2^-) zu Peroxynitrit ($ONOO^*$). Dieses wird weiter umgesetzt zu Nitrotyrosin [56]. Die Produktion von NO^* führt zu Hemmung der mitochondrialen Atmungskette durch Bindung an die Cytochrom-Oxidase. Diese Inhibition des Energie-Metabolismus trägt möglicherweise zur Zytotoxizität oder Zytostase bei [57].

Ein wichtiges Kennzeichen ist ebenfalls die transsynaptische Degeneration im Bereich der Substantia nigra nach Untergang der GABAergen striatonigralen Projektionsneurone. Diese nigrale Degeneration tritt mit einer Verzögerung von ca. 1 Woche ein. Als Erklärung für dieses Phänomen wurde die Disinhibition durch Entzug von inhibitorischen Transmittern diskutiert [63, 61, 77]. Allerdings variieren die Angaben über den Zeitverlauf deutlich; in einer anderen Studie wird als Maximum der nigralen Degeneration der 3. Tag post laesionem angegeben [64].

1.4. Tiermodell

1.4.1. Transgene Mäuse

In den letzten Jahren konnten erfolgreich transgene Mäusemodelle für Morbus Huntington hergestellt werden. Dabei können sog. Yeast-Artificial-Chromosomes (YAC) in Mäusezellen eingeschleust werden und so die Expression von mutantern Huntingtin verursachen. YAC46 und YAC72-Mäuse zeigen bereits frühzeitig

elektrophysiologische Veränderungen. Nach 12 Monaten findet sich eine selektive Degeneration der mittelgroßen Neurone des Striatums. N-terminale Huntingtin-Fragmente sind bereits in den Zellkern transloziert. Es zeigt sich hier die oben erwähnte Sequenz: zytoplasmatische Toxizität, Spaltung des Huntingtins, nukleäre Translokation des N-terminalen Fragments, selektive Neurodegeneration [22].

Eine andere Gruppe schleuste über einen heterologen Cytomegalievirus-Promoter ein jeweils 16, 48 oder 89 CAG-Triplets enthaltendes Transgen für Huntingtin in das Mäuse-Genom ein. Das entsprechende Produkt wurde im zerebralen Cortex, Striatum, Hippocampus und Cerebellum exprimiert vorgefunden. Nur Mäuse mit 48 bzw. 89 CAG-Wiederholungen wiesen charakteristische Verhaltens- und motorische Dysfunktionen auf, die dem hyperkinetischen Symptomkreis zuzuschreiben sind. Zwischendurch kam es jedoch auch zur Ausbildung hypokinetischer Phasen. Die klassischen Lokalisationen waren Striatum, Cortex, Thalamus und Hippocampus. Die typischen Proteinaggregate wurden ebenfalls beschrieben. Wildtyp und Mäuse mit 16 CAG-Wiederholungen konnten nicht voneinander unterschieden werden [23].

Das Team um Gill Bates übertrug sogar nur einen Teil des Huntingtin-Gens, nämlich das Exon1, welches die CAG-Triplets enthält, auf eine Maus, mit dem Effekt, dass sich bereits früh entsprechende Symptome ausbildeten. Offenbar reicht die Expression der Polyglutaminkette schon allein, um eine progrediente, letal verlaufende neurologische Erkrankung zu verursachen [42].

Sogenannte "Knockout" Mäuse, bei denen das Huntingtin-Gen zerstört wurde, sind nicht lebensfähig. Dies unterstreicht die Bedeutung des normalen Huntingtins für die Zelle und die Theorie der "gain of function" in Bezug auf das mutierte Huntingtin [43].

1.4.2. Neurotoxininduzierte Modelle

Grundsätzlich besteht die Möglichkeit, striatale Läsionen durch intrastriatale Injektion von Chinolinsäure (QA) oder 3-Nitropropionsäure (3-NP) zu erzeugen. In beiden Methoden zeigten sich Lernstörungen und verschiedene motorische Störungen [24]. Lediglich die QA-Ratten wiesen eine Hyperaktivität auf. Sowohl QA- als auch 3-NP-Modelle zeichneten sich durch Striatum-Atrophie, Ventrikel-Dilatation und Neuronenverlust in der Nissl-Färbung aus. In den QA-Ratten ist wohl eher ein Modell für die frühen Phasen der CH mit noch milden Verhaltens- und neuroanatomischen Effekten zu sehen, während die 3-NP Ratten eher die späteren Phasen repräsentieren [24].

1.4.2.1. Chinolinsäureinduzierte Modelle

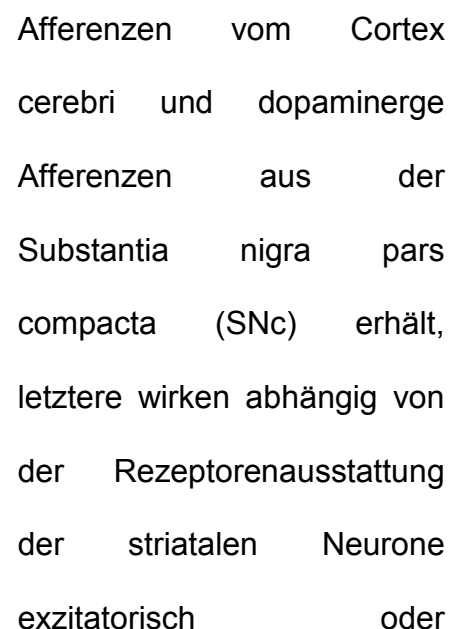
Chinolinsäure (QA) ist ein Exzitotoxin, welches als Glutamatagonist an NMDA-Rezeptoren wirkt, entsprechend der oben vorgestellten Hypothese einer Exzitotoxizität an NMDA-Rezeptoren im Striatum. Das Striatum erhält dichte glutamaterge Afferenzen aus dem gesamten Cortex cerebri, und striatale Neurone exprimieren in großer Dichte Glutamaterezeptoren.

Nach intrastriataler Injektion von QA in Ratten findet sich bei den betroffenen Tieren eine Herabsetzung der räumlich-visuellen Fähigkeiten, des Lerntransfers, des Schutzverhaltens und der Gedächtnisleistungen. Dies konnte von der Gruppe Block et al. [60] festgestellt werden. Diese Leistungseinschränkungen im Modell entsprechen denjenigen, die bei HD-Patienten gefunden werden [29].

Im Striatum findet sich innerhalb 24h nach intrastriataler QA-Injektion eine Verminderung von Calbindin- und Somatostatin / Neuropeptid -Y-immunoreaktiven Zellen entsprechend den GABAergen striatalen Projektionsneuronen. Nach 7 Tagen

1.5. Funktionelle Anatomie der Basalganglien

Im Einzelnen ist festzustellen, dass das Striatum exzitatorische glutamaterge



16

inhibitorisch. (s. Abb. 2) Die Projektionen des Striatums zu den sog. Ausgabekernen Substantia nigra pars reticulata (SNr) und medialer Globus pallidus (MGP) können in einen direkten und in einen indirekten Schaltkreis eingeteilt werden. Im direkten Schaltkreis besteht ein inhibitorischer Einfluss des Striatums auf SNr. Der indirekte Schaltkreis beginnt mit inhibitorischen Projektionen des Striatums zum lateralen Globus pallidus (LGP). Diese werden umgeschaltet auf inhibitorische Efferenzen zum Nucleus subthalamicus (STN), welcher über exzitatorische Bahnen SNr und MGP beeinflusst. SNr besitzt eine inhibitorische Bahn zum Colliculus superior (CS), während SNr und MGP zusammen inhibitorische Projektionen zum lateralen Thalamus aufweisen. Von dort finden sich exzitatorische Verbindungen zum Cortex cerebri.

Bei der CH ist zunächst der indirekte Weg betroffen. Verminderte Hemmung des LGP führt durch verminderte Exzitation von SNr und MGP über den Nucleus subthalamicus zu reduzierter Inhibition des ventrolateralen Thalamus. Als Ergebnis findet sich eine Disinhibition der exzitatorischen thalamo-kortikalen Projektion [37].

1.6. Fragestellung

Im Rahmen der obigen Ausführungen wurde besonderer Wert auf die Rolle von Exzitotoxizität und chronischen inflammatorischen Prozessen bei der Pathogenese neurodegenerativer Erkrankungen gelegt.

1. Die Rolle von $\text{TNF-}\alpha$ bei der chronischen Inflammation wurde bereits erwähnt.

Durch die vorliegende Dissertation soll überprüft werden, ob im Bereich der

Substantia nigra nach QA-induzierter Läsion des Striatums ipsilateral eine Expression von TNF- α erfolgt.

2. Ein besonderes Augenmerk soll auf die Frage gerichtet werden, ob diese Expression von TNF- α eine pathologische Relevanz besitzt und infolgedessen Substanzen, die die Produktion von TNF- α vermindern, wie zum Beispiel Rolipram als Phosphodiesteraseinhibitor, eine Verminderung der exzitotoxischen Sekundärläsion in der Substantia nigra pars reticulata zur Folge haben.
3. Zudem soll in dieser Arbeit die Frage beantwortet werden, inwieweit eine Beeinflussung der exzitotoxischen Läsionen im Bereich der Substantia nigra pars reticulata durch Agonisten des GABAergen Systems (hier durch Zolpidem) erfolgversprechend ist.

2. Material und Methoden

2.1. Versuchstiere

Die Experimente wurden mit Genehmigung der zuständigen Tierversuchskommission (Regierungspräsidium Köln) und unter der Aufsicht des zuständigen Veterinäramtes von Aachen durchgeführt. Für die Versuche wurden insgesamt 22 männliche Wistar Ratten (Hsd:WIST) mit einem Gewicht von 250-300 g verwendet. Die Tiere wurden im Institut für Versuchstierkunde der RWTH Aachen gehalten (konventioneller Keimstatus; Makrolon-Käfige Typ 3; Einstreu: entstaubte Weichholzfaser; Futter: Alleindiät RM 204 der Fa. Eggersmann, Rinteln; Tränke: durch 2x Ozonierung und Ansäuerung (pH 4-5) keimfreies Wasser in Makrolon-Tränkefläschchen; Futter und Wasser ad lib.; Temperatur in den Tierräumen: 20 +/-2°C; rel. Luftfeuchte: 60 +/-10%; hell/dunkel Rhythmus: 12:12 h).

Versuchsgruppen:

- I. 4 Tiere mit chinolinsäureinduzierter Läsion des Striatums ohne Protektion mit einer Überlebenszeit von 14 d.
- II. Tiere mit chinolinsäureinduzierter Läsion des Striatums und nachfolgender Protektion über 14 Tage, Überlebenszeit 14 d.
 - a. 6 Tiere mit Zolpidem als Neuroprotektivum
 - b. 6 Tiere mit Rolipram als Neuroprotektivum
- III. Je 1 Tier mit chinolinsäureinduzierter Läsion des Striatums ohne Protektion mit einer Überlebenszeit von 12 h, 1 d, 3 d, 5 d, 14 d und 30 d post laesionem

2.2. Stereotaktische Injektion von Chinolinsäure (QA)

Die Operation wurde in tiefer Chloralhydrat-Narkose der Tiere durchgeführt (4% Chloralhydrat in 0,9% NaCl, 1 ml/100 g Körpergewicht intraperitoneal). Der Kopf wurde in einem stereotaktischen Fixationsrahmen befestigt. Nach einem etwa 2 cm langen Hautschnitt in der Sagittalebene wurde über der rechten Schädelkalotte das Fell entfernt und das Periost abgesetzt. Anschließend wurde bei 1 mm anterior Bregma und 2,6 mm lateral rechts von Bregma mit einem Bohrer ein Loch von 2 mm Durchmesser in der Schädeldecke angelegt und mit Hilfe einer Hamilton-Mikroliterspritze 240 nmol Chinolinsäure in 1 µl 0,1 M Phosphat-gepufferter Kochsalzlösung (PBS, pH 7,4), jeweils 0,1 µl/Minute bei AP= 1mm anterior Bregma und L= 2,6 mm lateral Bregma[♦], V = 4,8 mm intrastriatal verabreicht. Die Spritze wurde für 5 Minuten in dieser Position belassen, bevor sie entfernt und die Operationswunde vernäht wurde.

2.3. Postoperative Behandlung der Tiere

Den Tieren der Gruppe II.a. (6 Tiere) wurde ab 24 h postoperativ einmal täglich über 14 Tage 15 mg/kg Körpergewicht^{*} des Wirkstoffes Zolpidem (Bikalm, Fa. Byk Gulden) intraperitoneal verabreicht.

Die mit Rolipram (Fa. Tocris, 0905) protektionierten Tieren (Gruppe II.b.) wurden wie folgt behandelt: Allen 6 Tieren wurde ab 24 h postoperativ einmal täglich über 14 Tage Rolipram in einer Dosierung von 0,3 mg/kg Körpergewicht intraperitoneal appliziert.

[♦] entsprechend dem Hirnatlas der Ratte von Paxinos und Watson [90]

^{*} Für 20 ml Lösung wurden 4 Tabl. á 8 mg Zolpidem in 2 ml 100%igem Ethanol und 18 ml PBS gelöst

Bei den Kontrolltieren (Gruppe I) wurde postoperativ keine weitere Behandlung durchgeführt.

2.4. Probenentnahme und Gewebeaufarbeitung

Nach 14tägiger Überlebenszeit wurden die Tiere erneut mit Chloralhydrat wie bereits beschrieben anästhetisiert und transkardial perfundiert. Dazu wurde das Herz freipräpariert und jeweils ein Katheter in den linken Ventrikel und das rechte Atrium platziert. Es wurde mit 100 ml einer 0,9%igen Kochsalzlösung vorgespült und mit 500 ml 4%iger Paraformaldehyd-Lösung in 0,1 M phosphatgepufferter Kochsalzlösung (PBS, pH 7,4) fixiert. Anschließend wurden die Gehirne entnommen.

2.5. Weiterverarbeitung und Färbemethoden

Nach der Entnahme wurden die Gehirne in 4%iger Paraformaldehyd-Lösung (in 0,1 M PBS, pH 7,4) 2 h lang bei 4°C postfixiert. Die Gehirne wurden daraufhin für 3 Tage mit 30%iger Saccharose (Merck, 107687-1000) in 0,1 M PBS (pH 7,4) bei 4°C kryoprotektioniert und im Anschluss in Isopentan bei –70°C tiefgefroren und gelagert.

Sowohl für die Immunhistochemie als auch für die Nissl-Färbungen wurden 20 µm dicke Frontalschnitte mit einem Kryostaten (Leica CM 3050) bei 1,2 bis –0,7 mm (Striatum) und bei –4,8 bis –6,00 mm post-Bregma (Substantia nigra) in lückenloser Serie angefertigt und zur Weiterverarbeitung in 0,1 M PBS (pH 7,4) aufgefangen.

2.5.1. Immunhistochemie zur lichtmikroskopischen Darstellung von TNF- α , GFAP und OX-42

Die Immunhistochemie wurde nach der Avidin-Biotin-Methode mit Avidin-Biotin-Enzymkomplex (ABC) durchgeführt. Die Schnitte wurden nach dem Free-Floating-

Verfahren verarbeitet, d.h. frei flottierend in der jeweiligen Lösung auf einer Gewebekulturplatte.

Durch 10-minütige Inkubation der Schnitte in einer Lösung aus 3% H₂O₂ (aus 30%igem H₂O₂, Aldrich 216763), 50% Methanol und 50% PBS (0,1 M, pH 7,4) wurde die endogene Peroxidase geblockt. Nach dreimaligem Waschen in 0,1 M PBS für je 3 Minuten erfolgte eine 10-minütige Inkubation in einer Lösung aus 0,5%igem Triton X-100 (Sigma) in PBS und 10% Normalserum. Es handelte sich um normales Pferdeserum (HNS von Vector, S-2000). Anschließend wurde über Nacht bei 4°C in einer Lösung aus 0,5%igem Triton in PBS, 1% Normalserum und dem jeweiligen Erstantikörper inkubiert:

Antikörper	TNF- α	GFAP	OX-42
Verwendetes Normalserum	HNS (Pferdenormalserum)	HNS	HNS
Antikörper-Verdünnung	7,5:1000	1:100	1:1000
Spezifikation	Polyklonales Ziegenimmunglobulin gegen Ratten-TNF α , Fa. R&D, AF-510-NA	Monoklonales Mäuseimmunglobulin gegen Ratten-GFAP, Fa. Boehringer Mannheim, 814 369	Monoklonales Mäuseimmunglobulin gegen Ratten-OX-42, Fa. Serotec, MCA275G

Tab. 1: Übersicht über die verwendeten Zweitantikörper mit Angabe des zugrunde liegenden Normalserums, der Antikörperverdünnung und der Spezifikation.

Nach dreimaligem Waschen in 0,1 M PBS für jeweils 3 Minuten folgte eine 1-stündige Inkubation in der Zweitantikörperlösung bei Raumtemperatur:

TNF- α : Pferd-Anti-Ziegen-IgG (Horse-anti-Goat) in der Verdünnung 1:1000 mit 2% normalem Rattenserum (RNS, Sigma, R-9759) und 1% normalem Pferdeserum (s.o.) in 0,1 M PBS.

GFAP, OX-42: Pferd-Anti-Maus-IgG (Horse-Anti-Mouse) in der Verdünnung 1:500 mit 2% RNS (s.o.) und 1% HNS (s.o.) in 0,1 M PBS.

Anschließend wurden die Schnitte dreimalig mit PBS gewaschen und 1 Stunde lang in Avidin-Biotin-Peroxidase-Komplex (Elite Standard, VecaStain PK6100) bei Raumtemperatur inkubiert. Nach erneutem dreimaligem Waschen in 0,1 M PBS erfolgte die Entwicklung in 5 mg Diaminobenzidin (Sigma, D-5637) und 20 μ l 3%igem H_2O_2 in 10 ml DAB-Diluent[#] unter Mikroskopkontrolle.

Nach einer letzten Waschung in 0,1 M PBS wurden die Schnitte auf Gelatinebeschichtete Objektträger aufgezogen, in einer aufsteigenden Alkoholreihe entwässert, luftgetrocknet und in DPX (Fluka, 44581) eingebettet.

2.5.2. Nissl-Färbung

Die zur Nissl-Färbung vorgesehenen Schnitte wurden zunächst auf gelatinebeschichteten Objektträgern aufgezogen und luftgetrocknet. Anschließend erfolgte eine 4-minütige Spülung in Natrium-Acetat-Puffer (0,1 M, pH 4,6). In einer 0,04%igen Thioninlösung (Sigma T3387) in Natrium-Acetat-Puffer (pH 4,6) wurden die Schnitte 10 Minuten lang gefärbt und nun in oben erwähntem Natrium-Acetat-Puffer (pH 4,6) gespült. Es schloss sich eine aufsteigende Alkoholreihe aus 50%igem, 70%igem und 96%igem Ethylalkohol zur Differenzierung an, in der die Schnitte jeweils 5 Minuten verblieben. Eine weitere Entfärbung wurde in 5%iger Cajput-Öl-Lösung (Sigma,

[#] DAB-Diluent: NaH_2PO_4 80 g + Imidazole 13,5 g (pH 6,5)

7517) in 96%igem Ethanol erreicht. Die Verweildauer wurde dem optischen Farbeindruck angepasst. Anschließend wurde zweimalig in 100%igem Ethylalkohol jeweils 2½ Minuten entwässert und das Material an der Luft getrocknet. Schließlich erfolgte die Einbettung in DePeX (neutrale Lösung von Polystyrol und Weichmachern in Xylol, Fluka, 44581).

2.6. Auswertung und statistische Methoden

2.6.1. Läsionsausdehnung im Striatum und Flächenverringern der Substantia nigra

Nach einer Nissl-Färbung war die Ausdehnung der Läsion im Striatum, ebenso wie die Fläche der Substantia nigra pars compacta und pars reticulata, gut erkennbar. Über eine an das Mikroskop (Zeiss Axioplan) angeschlossene Kamera wurden die Bilder bei 25- bzw. 50-facher Vergrößerung in ein computerunterstütztes Bildverarbeitungssystem (Ipplus 2.0) eingeladen und ausgemessen. Dabei wurde im Bereich des Striatums in den Ebenen 1,2 mm, 0,7 mm sowie -0,26 mm post Bregma gemessen. Pro Gehirn konnte mindestens 1 Schnitt der jeweiligen Ebene akquiriert werden. Aus den Messwerten der Läsionsfläche und der Gesamtfläche des Striatums wurde der prozentuale Anteil der Läsionsfläche an der Gesamtfläche berechnet. Für jede Ebene eines Protektionsverfahrens wurde für die untersuchten Ratten ein Mittelwert und sein Standardfehler (SEM= standard error of means) bestimmt.

Im Bereich der Substantia nigra wurden die Flächen der pars reticulata und der pars compacta in den Ebenen -4,80 mm, -5,20 mm und -5,80 mm post Bregma bestimmt. Aus den kontinuierlichen Schnitten konnte jeweils mindestens 1 Schnitt pro Gehirn den oben erwähnten Ebenen zugeordnet werden. Wiederum wurden die Mittelwerte und Standardabweichungen für jede Ebene bezogen auf alle Tiere einer

Versuchseinheit errechnet. Die jeweiligen Werte der Läsionsseite wurden durch diejenigen der Kontrollseite dividiert und somit die prozentuale Flächenreduktion errechnet.

Als Signifikanztest wurde in allen Fällen der Mann-Whitney-U-Test durchgeführt. Dabei wurden jeweils die Werte aus der behandelten Gruppe (also Rolipram oder Zolpidem) denen der entsprechenden unbehandelten Gruppe gegenübergestellt und der p-Wert bestimmt. Das Signifikanzniveau wurde mit $p < 0,05$ festgelegt.

2.6.2. Quantitative Auswertung der Anzahl der Nervenzellen in der Substantia nigra

In den oben erwähnten Ebenen wurden für die pars reticulata und die pars compacta auf der Läsionsseite und auf der Kontrollseite die Anzahl intakter großer Nervenzellen bestimmt. Diese wurden lichtmikroskopisch über das Vorhandensein eines prominenten Nukleolus und einer intakten Zellmembran identifiziert und über einen angeschlossenen Monitor gezählt. Es wurde mit einem Zeiss Axioskop bei 400-facher Vergrößerung gearbeitet. Aus dem Quotienten der Werte von Läsionsseite und Kontrollseite wurde die prozentuale Zellverringering bestimmt. Die statistische Signifikanz wurde wiederum mit dem Mann-Whitney-U-Test ermittelt, auch hier wurde das Signifikanzniveau mit $p < 0,05$ festgelegt.

2.6.3. Qualitative Auswertung der immunhistochemisch gefärbten Schnitte

Die immunhistochemisch gefärbten Schnitte wurden qualitativ ausgewertet. Es wurden mikroskopische Fotos angefertigt und die korrespondierenden Ebenen der einzelnen Versuchsgruppen im Hinblick auf unterschiedliche Anfärbbarkeit miteinander verglichen.

Hierbei wurden zum einen OX-42-Antikörper verwandt. Diese markieren spezifisch den CR3bi-Komplement-Rezeptor von aktivierten Mikrogliazellen. Zum anderen wurden GFAP (Glial fibrillary acidic protein) –Antikörper eingesetzt. GFAP ist ein wichtiger Strukturbaustein von Astrozyten. Auf beide Antigene wurden Schnitte aus dem Bereich des Striatums und der Substantia nigra untersucht.

Zusätzlich zu den o.g. Versuchsgruppen erfolgte eine qualitative Untersuchung hinsichtlich der Expression von $\text{TNF}\alpha$ im Zeitverlauf. Es wurden Tiere der folgenden Überlebenszeiten ohne Neuroprotektiva in die Studie mit aufgenommen: 12 h, 1 d, 3 d, 5 d, 14 d und 30 d. Die Verarbeitungsprotokolle entsprechen jedoch ansonsten den oben erwähnten.

3. Ergebnisse

3.1. Läsionsanteile im Striatum

Um gleichbleibende Untersuchungsbedingungen bezüglich der Substantia nigra pars reticulata zu erreichen, war es notwendig, in allen 3 Versuchsgruppen eine möglichst weitgehende Zerstörung des Striatums innerhalb des Untersuchungszeitraumes zu gewährleisten. Zum Nachweis dessen wurden in allen drei Gruppen Schnitte in Nissl-Färbung bei 1,2 mm, 0,7 mm und -0,26 mm post Bregma angefertigt und durch Flächenmessung der Anteil des zerstörten Areals an der Gesamtfläche des Striatums bestimmt. Es ergab sich ein Läsionsanteil von zumindest 79,3% im Falle der Zolpidem-Gruppe.(s. Abb.3)

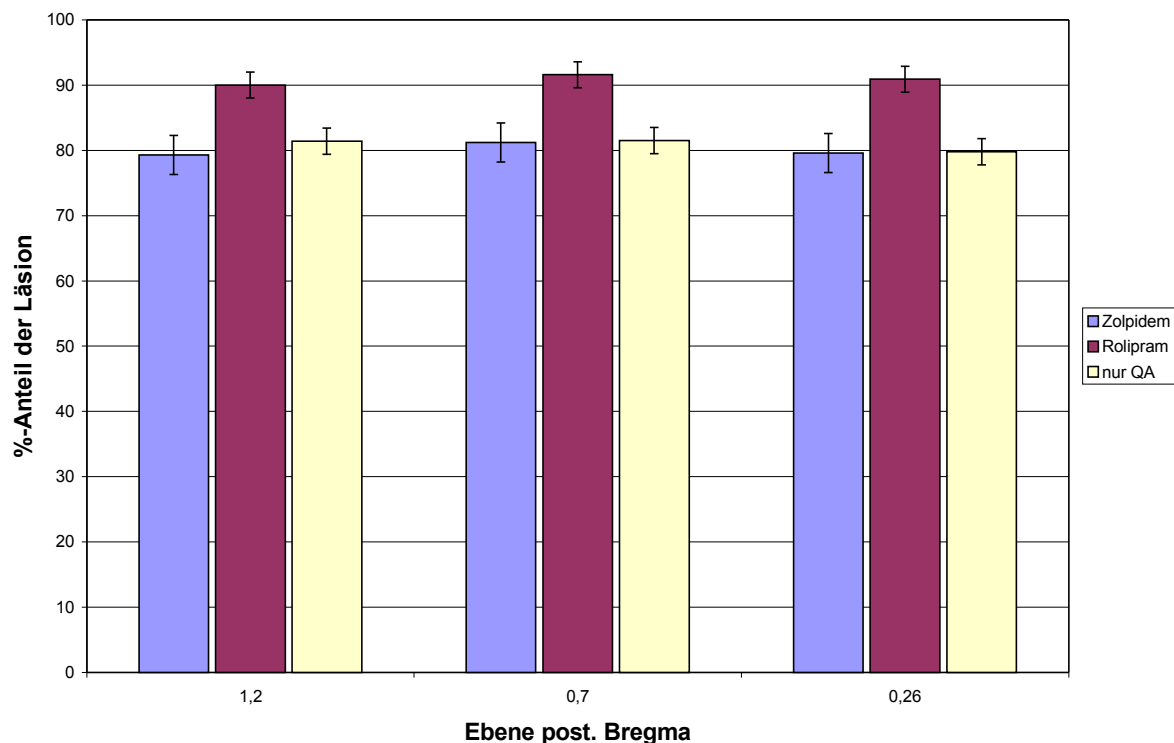


Abbildung 3: Vergleichende Darstellung der Läsionsanteile im Striatum nach 14 d bei Ratten nach Injektion von QA ohne Protektion bzw. QA plus Rolipram bzw. QA plus Zolpidem. Werte sind Mittelwerte mit Darstellung der SEM.

Hierbei wiesen die unbehandelte (nur QA) und die Zolpidem-Gruppe praktisch

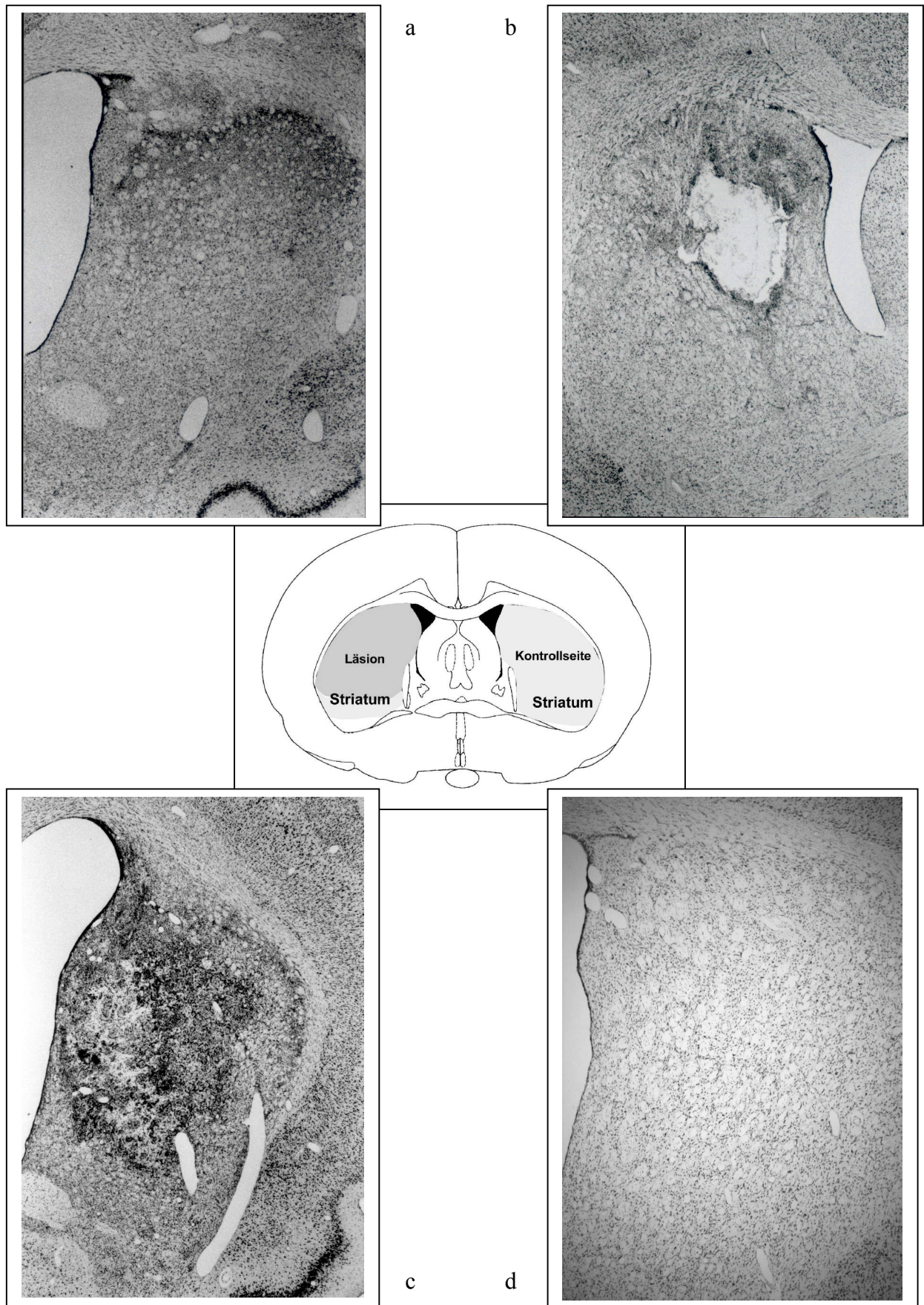


Abb. 4.a-d: Aufnahmen des Striatum in 25facher Vergrößerung 14 d nach intrastriataler Injektion von QA. (a) ohne Protektion, (b) nach Rolipram-, (c) nach Zolpidem-Gabe, (d) Kontrolle ohne Läsion.

identische Läsionswerte auf. Im Falle von Rolipram konnten größere Läsionsflächen aufgezeigt werden, nämlich zwischen 90 und 91,6%. Diese unterschieden sich bei p-Werten zwischen 0,02 und 0,03 signifikant von den übrigen beiden Gruppen.

In Abb. 4 erkennt man den Grad der Zerstörung im Striatum. Auf Bild 4.a) ist das läsionierte Striatum der Versuchsreihe ohne Protektion zu sehen, auf Bild 4.b) das der Rolipram-Versuchsreihe und auf Bild 4.c) dasjenige der Zolpidem-Reihe. Auf Bild 4.d) ist ein intaktes Striatum gegenübergestellt. In dieser Gegenüberstellung werden die jeweils betroffenen Flächen im Striatum nach QA-Injektion deutlich.

Auf den folgenden Fotos (Abb. 5.a,b) sieht man Vergrößerungen der oben dargestellten Areale. Man erkennt das Ausmaß der Zerstörung auf zellulärer Ebene (Abb. 5.a), bzw. die intakten Verhältnisse im Falle der Kontrolle (Abb. 5.b).

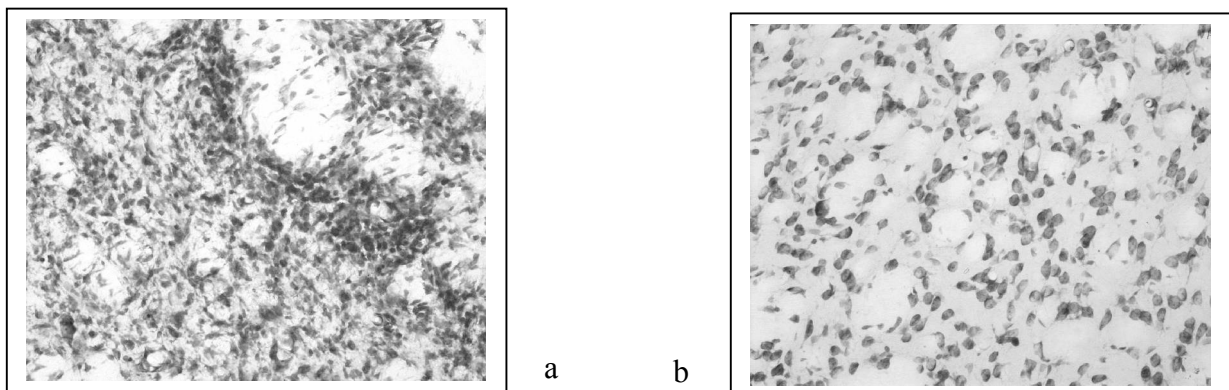


Abb. 5: 200fache Vergrößerung aus dem Bereich des Striatums, 14d nach intrastriataler Injektion von Chinolinsäure. (a) Läsionsseite, (b) Kontrollseite.

3.2. Flächenverhältnisse in der Substantia nigra pars reticulata

Es zeigte sich in allen drei untersuchten Ebenen (-4,8 mm, -5,3 mm und -5,8 mm post Bregma), dass die Flächenreduktion nach QA-Injektion anteilmäßig bei den nicht protektionierten Tieren am geringsten ist. Nach Auswertung des Mann-Whitney-U-Tests unterschieden sich die Werte für Zolpidem und QA in Ebene -4,8mm post.

Bregma signifikant ($p=0,017$), das gilt auch für Rolipram und QA in den übrigen beiden Ebenen ($p<0,044$).

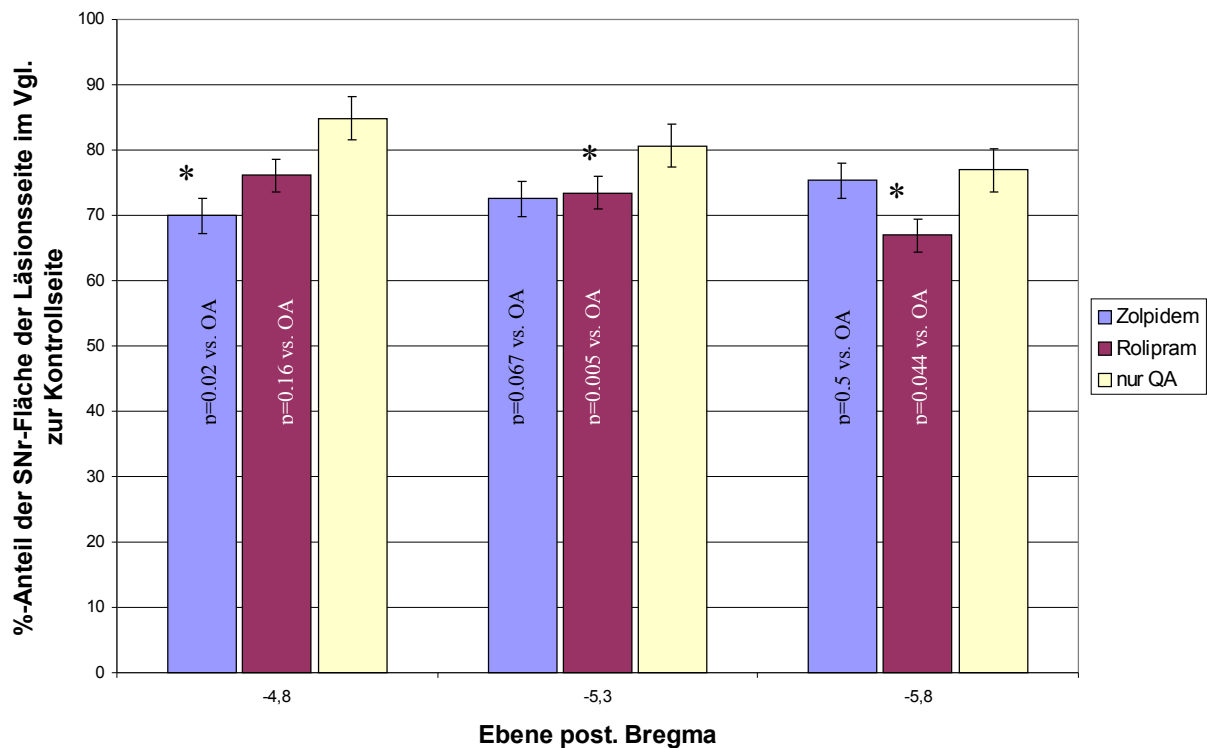


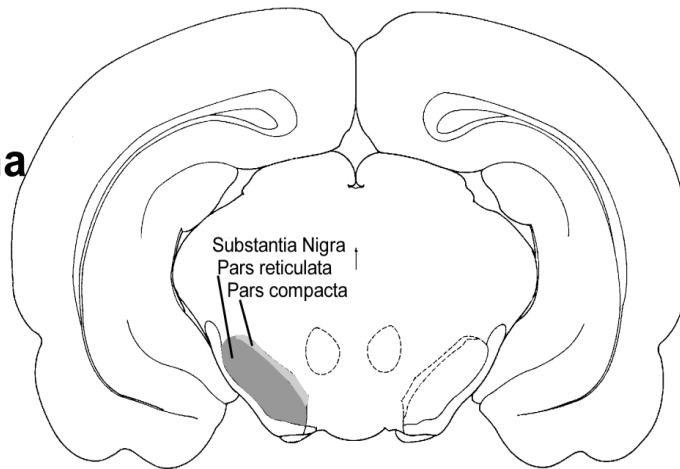
Abbildung 6: Vergleichende Darstellung der Läsionsanteile der SNr anhand der Flächenmessung bei QA-Ratten ohne Protektion, QA-Ratten mit Injektion von Rolipram und QA-Ratten mit Injektion von Zolpidem. Werte sind Mittelwerte mit Darstellung der SEM.

* signifikant im Vergleich zu QA-Ratten ohne Protektion

Interessanterweise ergaben sich auch Unterschiede in der räumlichen Verteilung der Läsionsanteile. Sowohl im Falle der unbehandelten als auch der Rolipram-Tiere zeigte sich in den hinteren Abschnitten (Ebene $-5,3$ mm und $-5,8$ mm) eine stärkere Flächenreduktion als in den vorderen Abschnitten. Bei den mit Zolpidem behandelten Tieren kann eine solche Aussage jedoch nicht getroffen werden. (s. Abb. 6 und 7)

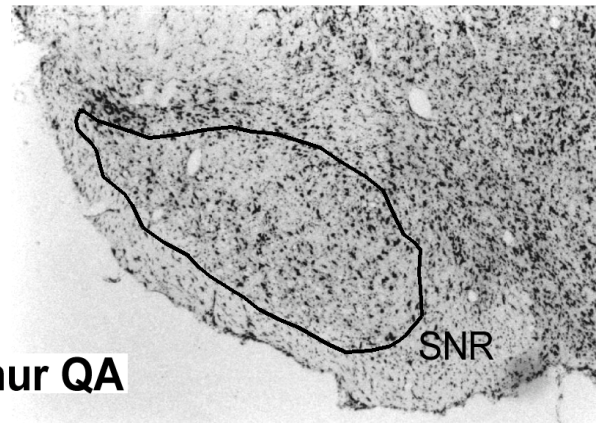
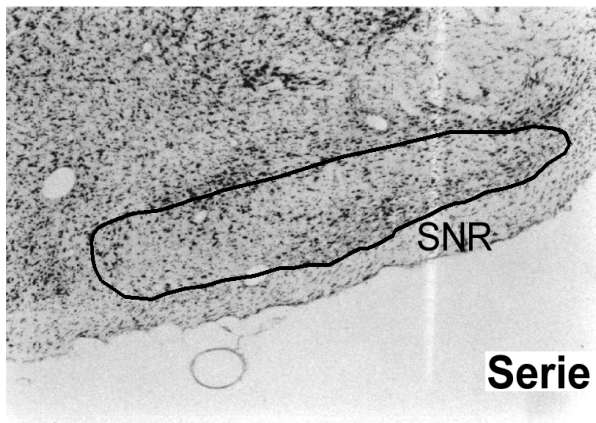
**Ebene
-5,8 mm
post. Bregma**

Färbung: Nissl

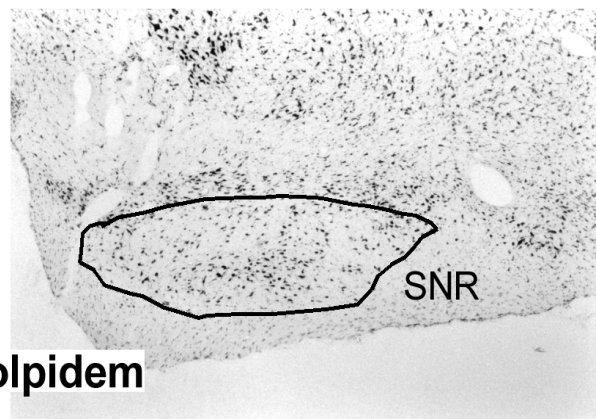
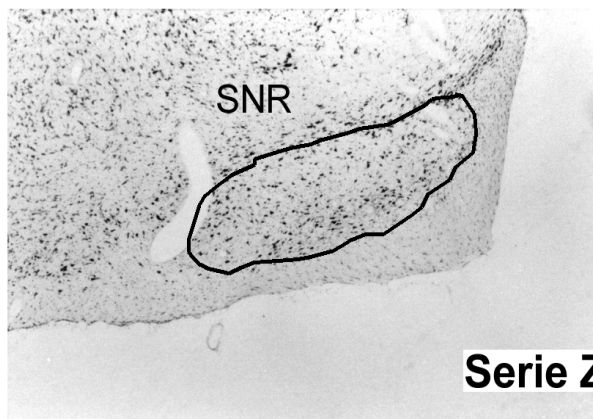


Läsionsseite

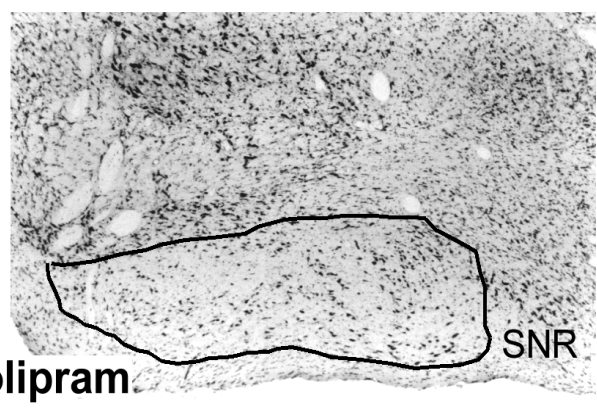
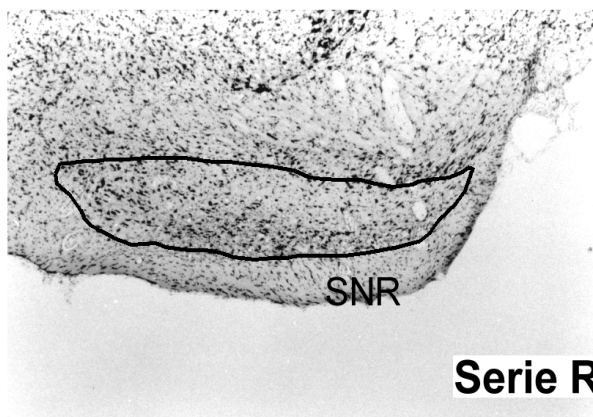
Kontrollseite



Serie nur QA



Serie Zolpidem



Serie Rolipram

Abbildung 7: Darstellung der Substantiae nigrae jeweils auf der Kontrollseite und der Läsionsseite.

3.3. Verringerung der Zellzahl in der Substantia nigra pars reticulata

Im Vergleich der untersuchten Tiergruppen (Abb. 8) zeigte sich für die nicht

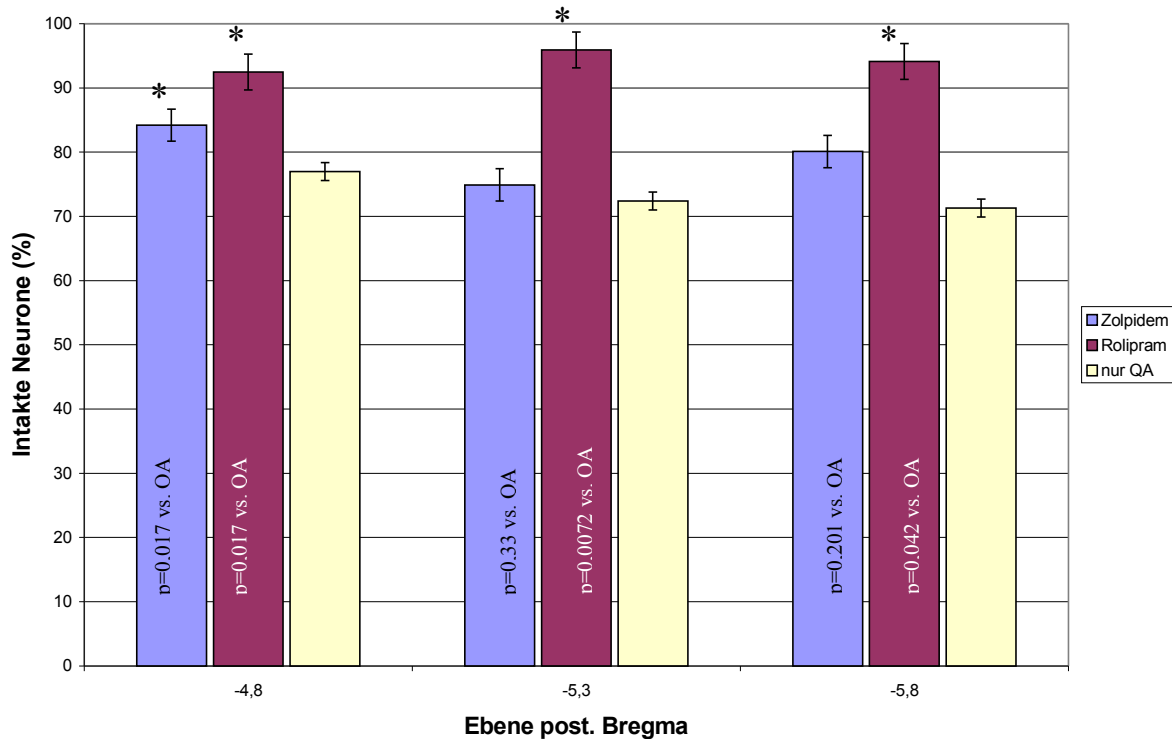


Abbildung 8: Vergleichende Darstellung des Anteils der intakten Neuronen in der SNr nach 14 d bei QA-Ratten ohne Protektion, QA-Ratten mit Injektion von Rolipram und QA-Ratten mit Injektion von Zolpidem. Werte sind Mittelwerte mit Darstellung der SEM.
 * signifikant im Vgl. zu QA-Ratten ohne Protektion

protektionierten Tiere eine deutlich erhöhte Zellzahlreduktion. Auf der Läsionsseite ließ sich im Mittel eine auf 77% der Kontrollseite verringerte Zellzahl auszählen. Im Gegensatz dazu konnten in der Rolipram-Gruppe 92,5% bis 95,5% der Zellen nachgewiesen werden. Im Falle der Zolpidem-Gruppe waren post laesionem zwischen 74,9% und 84,2% der Zellen auf der Läsionsseite erhalten. Im Falle der mit Rolipram behandelten Tieren ergaben sich in allen drei untersuchten Ebenen signifikante Unterschiede zu den unbehandelten Tieren ($p < 0,05$). Durch den Einsatz von Rolipram konnte die Zellzahlreduktion je nach Ebene um 20 bis 32,4% abgeschwächt werden. (s. Tab.2)

Wie die Fotos in Abb. 9 und 10 belegen, lassen sich im Falle des nicht protektionierten Tieres (Abb. 9.a) größtenteils nur noch Zelltrümmer auffinden.

Bei Zolpidem fand sich eine Verringerung der Zellreduktion um 3 bis 12%, jedoch waren diese Veränderungen nur in Ebene $-4,8$ mm signifikant ($p=0,017$). In den übrigen Ebenen kann bei p-Werten von 0,2008 bzw. 0,33 im Mann-Whitney-U-Test nicht von signifikanten Unterschieden ausgegangen werden.

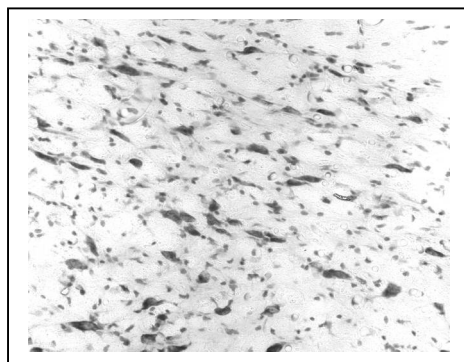


Abb. 9: 200x Vergrößerung der SNr. (a) Läsionsseite bei einer Ratte ohne Protektion, (b) Kontrolle ohne Läsion.

a

b

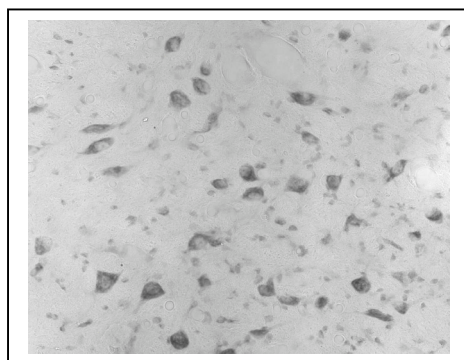
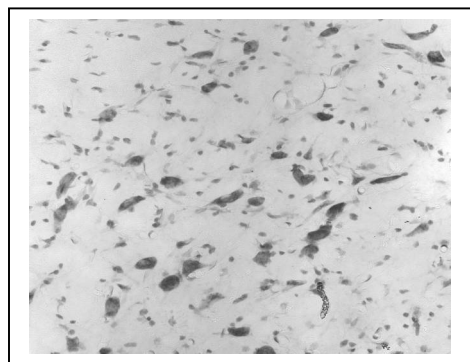


Abb. 10: 200x Vergrößerung der SNr. (a) Läsionsseite bei QA-Ratte mit Injektion von Rolipram, (b) Kontrolle ohne Läsion.

a

b

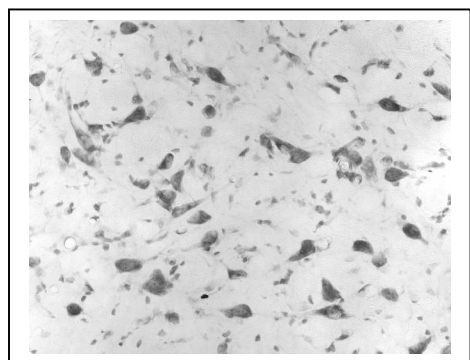


Tabelle 2: Vergleich der Verringerung der Zellzahlreduktion bei QA-Ratten mit Injektion von Rolipram bzw. Zolpidem in Relation zu den unbehandelten Tieren.

Ebene mm Bregma	Rolipram	Zolpidem
-4,8	20%	9%
-5,3	32%	3%
-5,8	32%	12%

3.4. Immunhistochemische Färbung auf GFAP und OX-42

Bei den immunhistochemischen Färbungen wurden sowohl Schnitte aus dem Bereich des Striatum als auch aus dem Bereich der Substantia nigra untersucht.

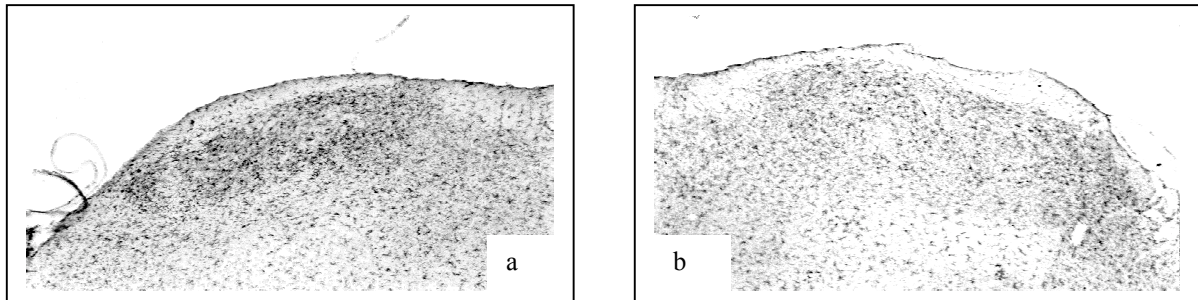


Abb. 11: Anfärbereaktion auf Ox42. (a) Läsionsseite, (b) Kontrollseite. Jeweils SNr, jeweils Reihe Rolipram.

Aufgrund der Färbereaktionen im Striatum konnten bei allen 3 Tiergruppen eine deutliche Aktivierung sowohl der Mikroglia als auch der Astroglia, jeweils auf der Läsionsseite, nachgewiesen werden. Auch im Bereich der überlebenden Neurone (dieser Bereich wurde über die Nissl-Färbung (s.o.) zur Bestimmung der Flächenrelationen dargestellt) zeigte sich eine deutliche Aktivierung beider Zellarten.

Auf der Kontrollseite hingegen blieben Färbereaktionen aus. Hier fand augenscheinlich keine Glia-Aktivierung statt.

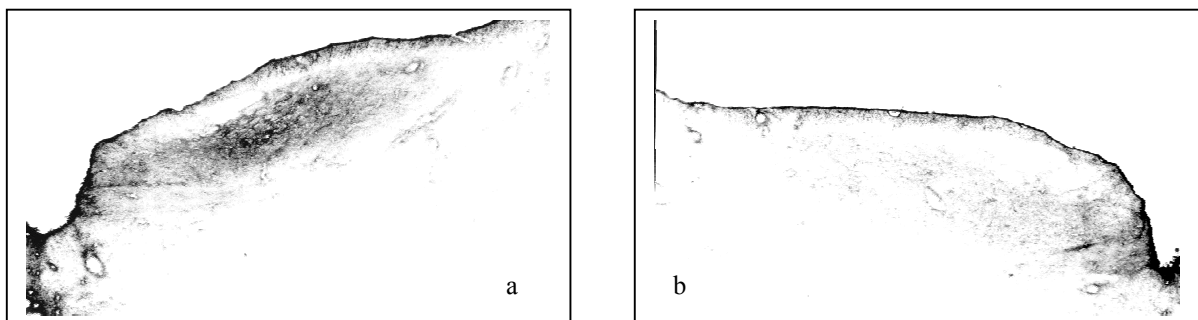


Abb. 12: Anfärbung auf GFAP. (a) Läsionsseite, (b) Kontrollseite, jeweils in der Zolpidem-Reihe, SNr.

Ähnliches ließ sich in der Substantia nigra nachweisen. Wieder zeigte sich eine deutliche Farbreaktion sowohl für GFAP als auch für OX-42 auf der Läsionsseite bei

allen drei Tierpopulationen. Auf der Kontrollseite hingegen fanden sich keine immunpositiven Zellen. Dies ist in den Abb. 11.a/b und 12.a/b verdeutlicht.

3.5. Zeitverlauf der Expression von TNF- α bei der QA-Gruppe ohne Protektion

Bezogen auf die Substantia nigra wurden folgende Ergebnisse erhalten (s.a. Abb.13):

Zu keiner Zeit wurde TNF- α auf der Kontrollseite – weder im Bereich des Striatums noch im Bereich der Substantia nigra – exprimiert. Die Expression auf der Läsionsseite zeigte jedoch im Zeitverlauf gewisse Unterschiede. Zum Zeitpunkt 12 h post laesionem fanden sich nur einige vereinzelte TNF- α positiv gefärbte Zellen. Nur zwölf Stunden später, also 1 d post laesionem, nahm die Zahl positiv gefärbter Zellen rapide zu. Sie erreichte im gesamten Zeitverlauf in der qualitativen Betrachtung ein eindeutiges Maximum.

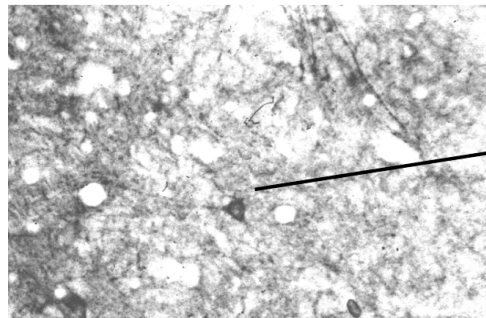
Drei Tage nach Setzen der Läsion waren noch viele Zellen TNF- α positiv färbbar, allerdings tendenziell in abnehmender Zahl.

Am Tage 5 post laesionem bot sich prinzipiell ein ähnliches Bild wie zu dem zuvor beschriebenen Zeitpunkt.

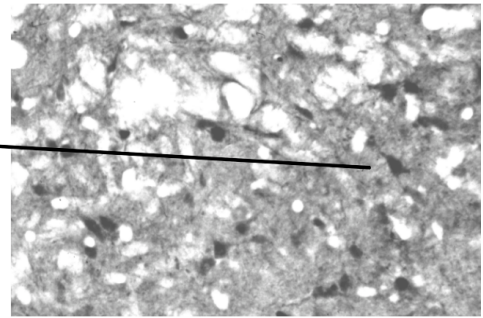
14 Tage nach Chinolinsäure-Injektion war die Anzahl der auf TNF- α positiv reagierenden Zellen deutlich vermindert.

Bis zum 30. Tag setzte sich der Trend einer Abnahme an TNF- α positiven Zellen fort. Lediglich vereinzelt konnten entsprechende Zellen ausgemacht werden.

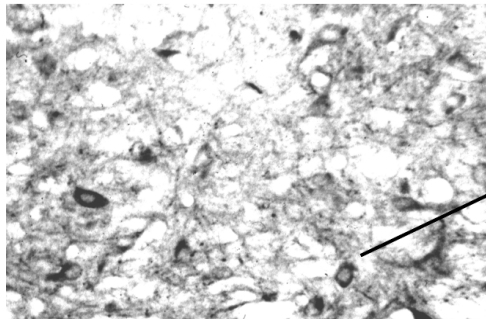
Zeitverlauf der Expression von TNF-alpha in der Substantia nigra pars reticulata nach intrastriateller Injektion von Chinolinsäure



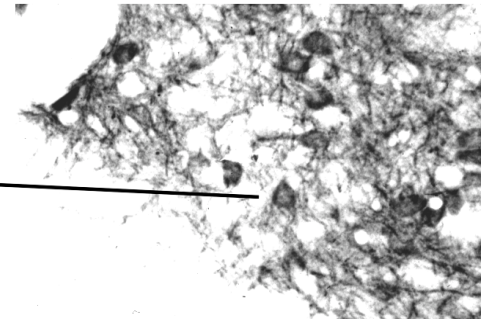
SNr (-5,8 mm post. Bregma) 12 h Läsion



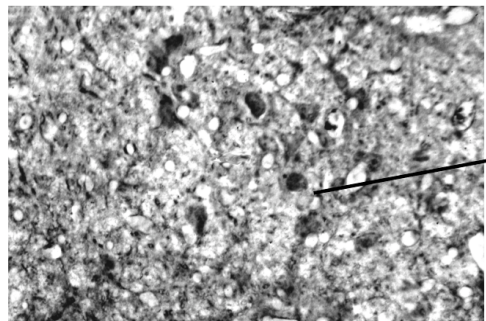
SNr (-5,8 mm post. Bregma) 1 d nach Läsion



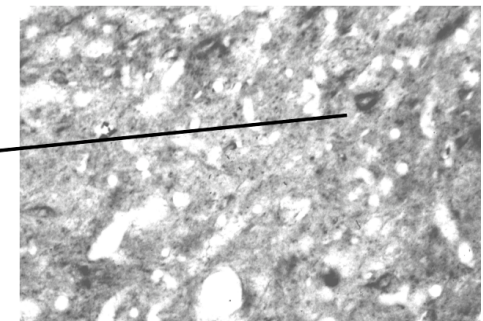
SNr (-5,8 mm post. Bregma) 3 d nach Läsion



SNr (-5,3 mm post. Bregma) 5 d nach Läsion



SNr (-4,8 mm post. Bregma) 14 d nach Läsion



SNr (-5,8 mm post. Bregma) 30 d nach Läsion

Abb. 13: Beispiele zum Zeitverlauf der Expression von $\text{TNF}\alpha$ bei QA-Ratten ohne Protektion.

4. Diskussion

4.1. Validierung

4.1.1. Morphologische Veränderungen im Bereich des Striatums

In der hier vorliegenden Arbeit wurde durch intrastriatale Injektion von Chinolinsäure eine zumindest 80%ige Zerstörung der striatalen Neurone innerhalb des Untersuchungszeitraumes von 14 Tagen erreicht. In einer Studie von Saji und Reis wurde durch Injektion von Ibotenat in drei Areale des Striatums eine 95%ige Zerstörung der striatalen Neurone erreicht [63]. In einer weiteren Studie wurde nach intrastriataler Applikation von 100 nmol Chinolinsäure die Dichte der GAD-positiven Zellen in drei Ebenen des Striatums gemessen. GAD gilt als Marker der GABAergen Neurone. Hierbei ergab sich abhängig von der jeweiligen Ebene eine 44- bis 57%ige Reduktion der GAD-positiven Neurone 7 Tage post laesionem [85]. Ähnliche Ergebnisse wurden auch von Pasinetti et al. nach 3-facher Injektion von 4 µg Ibotenat erzielt. Dabei konnte eine 40 – 50%ige Reduktion der GAD-positiven Neurone festgestellt werden [65].

Vergleicht man die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit mit den zitierten Studien, zeigt sich, dass die hier erzielte striatale Degeneration im Mittelfeld liegt. Dies könnte an mehreren methodischen Unterschieden liegen. Alexi et al. [85] verwandten nur gut die Hälfte der in dieser Arbeit benutzten Chinolinsäure-Konzentration. Andererseits applizierten Saji und Reis [63] gleich drei Injektionen mit Ibotenat an unterschiedliche Lokalisationen, so dass eine bessere räumliche Verteilung erzielt werden konnte.

4.1.2. Morphologische Veränderungen im Bereich der Substantia nigra

In der Vergangenheit sind bereits von mehreren Forschergruppen Untersuchungen zu Auswirkungen von exzitotoxischen Läsionen im Striatum auf die Zellzahl in der Substantia nigra pars reticulata durchgeführt worden. Dabei fällt die breite Streuung im Ausmaß des Zelluntergangs innerhalb der einzelnen Arbeiten auf. Andererseits zeigen sich deutliche Unterschiede in der jeweils angewandten Methodik, wodurch ein direkter Vergleich der Ergebnisse und Schlüsse erschwert wird.

Bereits 1980 führte Krammer eine Untersuchung zu transsynaptischer Degeneration nach Striatums-Läsion mit 9,38 nmol Kainat durch. Nach 7 Wochen wurde eine nahezu vollständige Zerstörung sämtlicher SNr- Neurone festgestellt [61]. Intrastriatale Injektion von Ibotenat (10 mg/ml) führte nach drei Wochen in einer von Saji et al. vorgestellten Studie zu einem Untergang von 52,2% der SNr-Neuronen gegenüber den unbehandelten Kontrolltieren [62]. In einer früheren Untersuchung desselben Autors mit Ibotenat gleicher Konzentration wurde dagegen ein Verlust von 20% der SNr-Neuronen nach 20 Tagen festgestellt. Das Maximum des Neuronenverlustes wird in dieser Arbeit mit der dritten Woche beziffert. Als Zone mit der höchsten Untergangsrate wird die zentrale Zone der SNr angegeben [63]. Es zeigt sich beim Vergleich zweier Arbeiten desselben Autors unter ansonsten gleichen Rahmenbedingungen bereits eine starke Streubreite. In der zuletzt zitierten Arbeit wird auch einer der Gründe deutlich. Der Umfang des Zelluntergangs variiert in der SNr je nach Zone zwischen 53% im zentralen Abschnitt und 16% im medialen Abschnitt. Demnach wäre – um eine optimale Vergleichbarkeit herzustellen – eine einheitliche Einteilung der Zählzonen nötig.

Eine Arbeit von Pasinetti et al. beschreibt einen 40-50%igen Untergang von Neuronen, die GAD-mRNA enthalten (entsprechend GABAergen Neuronen), im

ventromedialen ipsilateralen Anteil der SNr nach Ibotenat-induzierter Läsion des Striatums [65]. Bei Stefanis und Burke führte eine intrastriatale Injektion von Ibotenat nach 28 Tagen zu einer 22%igen Reduktion der nigralen Zellzahl (SNR) auf der ipsilateralen Seite. Die Färbung erfolgte mit der Methode nach Nissl [64].

In der hier vorgestellten Arbeit kommt es in Abhängigkeit von der betrachteten Ebene zu einer Reduktion der Neuronen der Substantia nigra pars reticulata von 23 bis 28,7%. Damit entsprechen die hier erhaltenen Daten denen von Stefanis und Burke [64], die ebenfalls die Bestimmung der überlebenden Neurone mit Hilfe der Nissl-Färbung durchführten. Einige der übrigen oben erwähnten Arbeiten bedienten sich spezifischerer Methoden zur Bestimmung des Untergangs von Subgruppen der nigralen Neuronen, wie dem Nachweis von GAD-mRNA. Eine Verwendung der Nissl-Färbung impliziert eine gewisse Ungenauigkeit, da Neurone unterschiedlicher Subgruppen dargestellt werden.

Eine weiteres Problem beruht in der nicht 100%igen Zerstörung des Striatums, so dass nicht alle Projektionsneurone erfasst wurden. In der hier vorliegenden Arbeit wurde bei den unbehandelten Tieren ein Läsionsanteil von ca. 80% im Striatum erreicht. Hinsichtlich dieser Problematik erlangt auch die Frage der Dosierung des Exzitotoxins Bedeutung. In dieser Arbeit wurden 240 nmol Chinolinsäure appliziert, andere Autoren bedienten sich niedrigerer Dosierungen (s.o.)

4.2. Zeitverlauf der glialen Reaktion in der SNr

In der vorliegenden Arbeit konnte ein Untergang nigraler Neurone nach exzitotoxischer Läsion des ipsilateralen Striatums wahrscheinlich gemacht werden. Zudem fiel anhand der OX-42 Färbung eine vermehrte Mikroglia-Aktivierung auf. Imamura et al. wiesen nach intrastriataler Hämorrhagie ED-1 positive Mikroglia ab

dem 3. Tag post laesionem nach [86]. Auch Dihné et al. zeigten einen mit dem 3. Tag post laesionem beginnenden Anstieg der Mikroglia-Zellzahl in der SNr nach QA induzierter Läsion des Striatums [87].

Ein Zeitverlauf des Zelluntergangs in der Substantia nigra nach striataler Läsion zeigte den Beginn des Neuronenuntergangs am 4. Tag post laesionem [89]. Durch den oben zitierten zeitlichen Ablauf der Mikroglia-Aktivierung am 3. Tag p.l. und des beginnenden Neuronenuntergangs am 4. Tag p.l. scheint eine entsprechende Implikation der Mikroglia wahrscheinlich. Zudem konnte die Produktion von zytotoxischen Zytokinen durch aktivierte Mikroglia nachgewiesen werden [88].

4.3. Expression von TNF- α in der SNr

Dies ist eine der ersten Arbeiten, die die Expression von TNF- α in der Substantia nigra pars reticulata untersucht. Es hat sich gezeigt, dass TNF- α eine wichtige Rolle beim Zelluntergang im Rahmen neurodegenerativer Erkrankungen wie beim Morbus Huntington spielt. Kainat-induzierte Neurodegeneration führt zur Aktivierung von Mikrogliazellen, die in Phagozyten transformieren und sterbende Neuronen entfernen. Im Rahmen der Aktivierung produzieren Mikrogliazellen u.a. reaktive Sauerstoffverbindungen und zytotoxische Zytokine wie TNF α [71].

In der vorliegenden Untersuchung konnte gezeigt werden, dass im Rahmen der transsynaptischen Degeneration vermehrt Mikroglia aktiviert wurde (positive OX-42 Färbung) und auch vermehrt TNF- α -positive Zellen nachzuweisen waren. Das Maximum der TNF- α -Expression lag zwischen dem 1. und dem 3. Tag post laesionem. Auch 30 Tage nach QA-Injektion waren noch vereinzelte TNF- α positive Zellen nachweisbar.

Es ist bekannt, dass sowohl IL1- β als auch TNF- α als proinflammatorische Zytokine die Abbaumechanismen der Astrozyten bei der enzymatischen Spaltung von Exzitotoxinen, zum Beispiel bei einem Glutamat-Exzess, antagonisieren [72]. In verschiedenen Studien hat sich herauskristallisiert, dass die vermehrte Bildung von TNF- α nach einem exzitotoxischen Ereignis (z.B. nach Gabe von NMDA) zu einer Verstärkung des neurotoxischen Effektes führt [73,74]. TNF- α induziert direkt über den sogenannten TNF-TNFR1-Komplex den neuronalen Zelltod, und zwar über die Aktivierung von Kaspasen. Diese Kaskade wird durch IL1- β ins Rollen gebracht [75].

In der Zusammenschau der Ergebnisse dieser Arbeit und der oben erwähnten Studien bleibt die wichtige Rolle von TNF- α am inflammatorischen Geschehen in der Substantia nigra pars reticulata nach QA-induzierter exzitotoxischer Läsion des Striatums als Folge der transsynaptischen Neurodegeneration festzuhalten. Im Zusammenhang mit einer ausgeprägten Aktivierung von Gliazellen in der ipsilateralen SNr kommt es zwischen dem ersten und dritten Tag post laesionem zu einer maximalen Vermehrung von TNF- α positiven Zellen. 14 Tage nach Setzen der striatalen Läsion findet sich eine Reduktion der intakten Zellzahl von 23% bis 29% in der betroffenen SNr. Die Zusammenschau der erwähnten Arbeiten [73,74,75] legt eine Beteiligung von TNF- α an den degenerativen Prozessen nahe. Auch der Zeitverlauf der Mikroglia-Aktivierung (s.o.) spricht dafür.

4.4. Beeinflussung des Zelluntergangs in der SNr durch Rolipram

Dies legt nahe, dass ein therapeutischer Ansatz in der Verminderung der Bildung von TNF- α bestehen kann. Rolipram gehört zu den Phosphodiesterase-Hemmern, die über erhöhte intrazelluläre cAMP-Konzentrationen u.a. die Produktion von TNF- α und IL-1 β hemmen [76]. Es hat sich gezeigt, dass Rolipram die inflammatorische

Reaktion und den morphologischen Schaden bei autoimmunen Enzephalomyelitiden [84], aber auch bei zerebralen Ischämien reduziert [76]. Außerdem führte die Behandlung von Gliazellen mit Phosphodiesteraseinhibitoren zu einer signifikanten Reduktion verschiedener Wachstumsfaktoren (FGF-1 und CNTF) [82]. Es scheint somit neben $\text{TNF}\alpha$ noch weitere durch Rolipram beeinflussbare Faktoren zu geben.

In den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen konnte durch die Gabe von Rolipram nach chinolinsäureinduzierter exzitotoxischer Läsion des Striatums in den abhängigen Arealen der Substantia nigra pars reticulata eine signifikante Reduktion des Neuronenuntergangs anhand von Zellzählungen nachgewiesen werden. Der genaue Wirkmechanismus lässt sich im Rahmen dieser Arbeit jedoch nicht klären. $\text{TNF-}\alpha$ spielt für die Neurodegeneration eine wichtige Rolle; die Sekretion von $\text{TNF-}\alpha$ wird durch Rolipram nachgewiesenermaßen reduziert [76], jedoch sind auch andere durch Rolipram beeinflusste Variablen bekannt.

4.5. Beeinflussung neurodegenerativer Schäden durch GABA-Agonisten

Im Rahmen des Untergangs der GABAergen striatalen Neuronen kommt es in der Substantia nigra zu entgegengesetzten Veränderungen der Rezeptor-Dichte. So konnte eine Vermehrung der GABA_A /Benzodiazepin-Rezeptoren der postsynaptischen Neuronen in der Substantia nigra um 40-66% als Folge der Unterbrechung der striatonigralen Neurone nachgewiesen werden. Da diese Denervation letztendlich zum Untergang der nigralen Neuronen führt, wäre eine positive Beeinflussung durch GABA-Agonisten zumindest eine denkbare Strategie [77]. Es ließ sich jedoch in dieser Arbeit eine signifikante Beeinflussung der neurodegenerativen Veränderungen nicht nachweisen. Es konnte keine Verringerung

der Flächenreduktion in der Substantia nigra pars reticulata erreicht werden, auch der Zelluntergang konnte nicht signifikant verhindert werden.

Ähnlich der Verwendung von Zolpidem als GABA-Agonist in der vorliegenden Arbeit wurde bereits Muscimol von anderen Gruppen eingesetzt, um die transsynaptische Neurodegeneration nach Läsion der GABAergen Neurone des Striatums zu verringern. Während in dieser Arbeit kein eindeutiger positiver Effekt nachweisbar war, konnte von Schallert und Lindner ebendies erreicht werden, allerdings durch direkte intraventrikuläre Applikation [68]. Andererseits wurde keine Wiederherstellung der funktionellen Integrität beobachtet. In einer früheren Arbeit beobachteten Saji und Reis ebenfalls eine Reduktion des neuronalen Zelltodes nach intraventrikulärer Infusion von Muscimol [69].

Diese Literaturbefunde legen nahe, dass zumindest vom theoretischen Ansatz her auch von einer Applikation von Zolpidem eine ähnliche Wirkung zu erwarten gewesen wäre. Mögliche Gründe für das in dieser Studie beobachtete Versagen könnten Unterschiede in der Applikationsform oder Dosierung und der dadurch bedingten wirksamen Gewebespiegel gewesen sein.

Zudem wurde in der Arbeit von Saji und Reis [69] die intraventrikuläre Infusion von Muscimol bereits 1 bis 2 Stunden nach Setzen der Ibotenat-Läsion appliziert. In den hier vorliegenden Untersuchungen wurde jedoch erst nach 24 Stunden mit der Gabe von Zolpidem begonnen. Wie anhand des Zeitverlauf der TNF- α -Expression aufzuzeigen ist, hat zu diesem Zeitpunkt schon ein ausgeprägtes inflammatorisches Geschehen eingesetzt.

Auf der anderen Seite führte die Gabe von Zolpidem bei der „Progressive Supranuclear Palsy“, einer Erkrankung mit ebenfalls reduzierter GABA-

Neurotransmission im Striatum, zu einer Besserung der Symptomatik bereits nach einmaliger oraler Dosis [70].

4.6. Klinische Wertung

Die klinische Bewertung der Wirksamkeit neuer Substanzen ist durch alleinige Tierversuchsreihen nicht möglich. Es sind noch weitere Punkte zu beachten, und letzten Endes kann eine endgültige Bewertung erst durch klinische Studien erfolgen. Oft zeigen sich dann relevante Unterschiede in den Ergebnissen, die auf ein unterschiedliches Design zurückzuführen sind. Es ist zum Beispiel der Zeitpunkt der Medikamentengabe entscheidend. In den hier vorgestellten Experimenten war dies 24 h, nachdem ein massiver Schaden gesetzt wurde. In der klinischen Realität gestalten sich die zeitlichen Abläufe in der Regel anders. Der Schaden entsteht im Rahmen eines chronischen Prozesses, und die Applikation eines möglichen Medikamentes wird erst verzögert erfolgen. Zum Zweiten ist die Dosierung zu beachten, die beim realen Patienten der Nebenwirkungsrate angepasst sein wird. Allerdings lag in dieser Arbeit die Dosierung im Falle des Roliprams deutlich unter der toxischen Dosis von 30 mg/kg/d. Die Applikation von Zolpidem erfolgte dagegen in einer um das 130fach höheren Dosierung als sonst üblich. Zudem war der Zeitraum der Beobachtung in dieser Arbeit mit 14 d relativ eingeschränkt. Schließlich muss erwähnt werden, dass ein beobachteter morphologischer Schaden nicht unbedingt mit einem relevanten funktionellen Defizit einhergeht. Umgekehrt muss eine Verringerung eines morphologischen Schadens keine Verbesserung der klinischen Symptomatik bedingen [80].

Entsprechend kann eine endgültige Aussage der Relevanz, vor allem im Falle von Rolipram, erst nach der Durchführung einer klinischen Studie getroffen werden.

4.6.1. Alternativen: Antiphlogistika bei anderen neurodegenerativen Erkrankungen

Neben den hier beschriebenen Therapieansätzen ist ein positiver Effekt durch Antiphlogistika in Anlehnung an entsprechende Erfolge in der Therapie anderer neurodegenerativer Erkrankungen denkbar. Wie bereits in der Einleitung erwähnt, scheinen auch bei der Chorea Huntington entzündliche Phänomene eine Rolle zu spielen, die entsprechend durch antiphlogistische Medikation reduziert werden könnten.

Im Falle eines Tiermodells für den Morbus Alzheimer konnte die im Rahmen von Quisqualin-Säure induzierter Neurodegeneration (eine exzitotoxische cholinerge Degeneration) beobachtete mikrogliale Reaktion durch Gabe von Nimesulid, einem COX2-Hemmer, abgeschwächt werden [78].

Die Gruppe um A. Klegeris und P.L. McGeer fand heraus, dass nach Gabe von Diclofenac die Aktivierung von Mikroglia durch $IF\gamma$ und Lipopolysaccharide mit resultierender Sekretion von Neurotoxinen vermindert war, was als bedeutende Therapiestrategie in der Behandlung des M. Alzheimer gesehen wurde [83]. Zusätzlich postulierten die Autoren die Kombination von unterschiedlichen Therapieansätzen aufgrund der Tatsache, dass bei der Pathogenese mehrere intrazelluläre Systeme eine Rolle spielen. Auch die Bildung von NO-Radikalen konnte durch NSAR (hier: ASS, Indomethacin, Ketoprofen) gemindert werden. Es wurden durch diese Medikamente apoptotische Zellveränderungen verhindert. Bei steroidalen Antiphlogistika hingegen konnten keine oder nur geringe Effekte nachgewiesen werden [79].

Als Fazit zeigt sich, dass es noch viele überprüfenswerte Ansätze für die Therapie neurodegenerativer Erkrankungen gibt. Bei vielen untersuchten Ansätzen stehen allerdings klinische Tests noch aus.

5. Anhang

Tab. 3: Übersicht über die Flächenverhältnisse im Striatum der Ratten nach Injektion von Rolipram: Kennzeichen der untersuchten Gehirnschnitte sind die gemessene Gesamt- und Läsionsfläche.

Versuchs- gruppe	Ebene (post. Bregma)	Gesamt- fläche (mm ²) (Mittelwert)	Gesamt- fläche (Standard- abweichung)	Läsions- fläche (mm ²) (Mittelwert)	Läsions- fläche (Standard- abweichung)	Anzahl Schnitte/ Ebene (n)
Rolipram 1	1,200	6,492	1,032	5,496	0,984	3
	0,700	8,250	0,402	6,900	0,522	3
	-0,260	8,952	0,750	7,458	0,324	2
Rolipram 2	1,20	9,612	0,126	8,568	0,144	2
	0,70	10,518	0,774	9,540	0,732	2
	-0,26	10,104	0,354	9,114	0,372	2
Rolipram 3	1,20	9,756	1,866	9,198	1,758	2
	0,70	10,134	0,612	9,420	0,582	3
	-0,26	9,918	0,240	8,460	0,192	3
Rolipram 4	1,20	7,080	1,284	6,444	1,782	3
	0,70	6,864	0,468	6,864	0,468	3
	-0,26	7,332	0,273	7,329	0,276	2
Rolipram 5	1,20	9,054	0,154	8,244	0,384	3
	0,70	8,976	0,444	8,208	0,468	3
	-0,26	8,442	0,318	7,920	0,408	3
Rolipram 6	1,20	7,206	0,246	6,624	0,338	3
	0,70	7,680	0,096	6,994	0,113	3
	-0,26	7,962	0,210	7,356	0,078	3

Tab. 4: Übersicht über die Flächenverhältnisse im Striatum der Ratten nach Injektion von Zolpidem: Kennzeichen der untersuchten Gehirnschnitte sind die gemessene Gesamt- und Läsionsfläche

Versuchs- gruppe	Ebene (post. Bregma)	Gesamt- fläche (mm ²) (Mittelwert)	Gesamt- fläche (Standard- abweichung)	Läsions- fläche (mm ²) (Mittelwert)	Läsions- fläche (Standard- abweichung)	Anzahl Schnitte/ Ebene (n)
Zolpidem 1	0,70	9,287	0,812	7,754	0,557	5
	-0,26	10,336	0,368	9,057	0,701	4
Zolpidem 2	1,20	7,001	0	6,295	0	1
	0,70	8,440	0,563	7,751	0,515	3
	-0,26	11,240	0,679	10,601	0,421	4
Zolpidem 3	1,20	6,504	0,767	4,615	0,745	3
	0,70	8,581	5,997	1,243	0,747	4
	-0,26	10,514	0	6,269	0	1
Zolpidem 4	1,20	7,165	0,568	6,119	0,382	3
	0,70	9,188	0,470	7,476	0,370	5
Zolpidem 5	1,20	7,844	0,335	5,980	0,454	3
	0,70	9,355	0,317	6,837	0,101	4
	-0,26	9,418	0	7,007	0	1
Zolpidem 6	1,20	6,819	0,619	5,094	0,735	3
	0,70	7,902	0,431	6,814	0,767	5

Tab. 5: Übersicht über die Flächenverhältnisse im Striatum der Ratten ohne Protektion: Kennzeichen der untersuchten Gehirnschnitte sind die gemessene Gesamt- und Läsionsfläche

Versuchs- gruppe	Ebene (post. Bregma)	Gesamt- fläche (mm ²) (Mittelwert)	Gesamt- fläche (Standard- abweichung)	Läsions- fläche (mm ²) (Mittelwert)	Läsions- fläche (Standard- abweichung)	Anzahl Schnitte/ Ebene (n)
QA 1						
	1,20	8,360	0,536	7,211	0,575	4
	0,70	10,688	0,489	9,220	0,457	4
	-0,26	10,030	0,569	8,734	0,494	4
QA 2						
	1,20	9,723	0,438	7,386	0,638	4
	0,70	12,048	0,784	9,350	0,776	4
	-0,26	12,203	0,264	8,351	0,463	4
QA 3						
	1,20	9,783	0,620	7,798	0,367	3
	0,70	11,147	0,531	8,510	0,536	2
	-0,26	9,738	0	7,946	0	1
QA 4						
	1,20	8,914	0,431	7,440	0,203	2
	0,70	11,197	0,479	9,600	0,426	2
	-0,26	9,647	0	7,936	0	1

Tab. 6: Übersicht über die Flächenverhältnisse der Substantia nigra pars reticulata (SNr) der Ratten nach Injektion von Rolipram: Kennzeichen der untersuchten Schnitte ist die Gesamtfläche der SNr auf der Läsions- und der Kontrollseite.

Versuchs- gruppe	Ebene (post. Bregma)	Läsionsseite Fläche SNr (mm ²) (Mittelwert)	Fläche SNr (mm ²) (Standard- abweichung)	Kontrollseite Fläche SNr (mm ²) (Mittelwert)	Fläche SNr (mm ²) (Standard- abweichung)	Anzahl Schnitte/ Ebene (n)
Rolipram 1						
	-4,8	0,733	0,011	0,965	0,060	3
	-5,3	0,958	0,220	1,261	0,103	3
	-5,8	0,706	0,100	1,019	0,096	3
Rolipram 2						
	-4,8	0,801	0,031	0,958	0,080	3
	-5,3	0,785	0,012	1,082	0,034	3
	-5,8	0,639	0,005	1,084	0,128	3
Rolipram 3						
	-5,3	0,904	0,027	1,216	0,016	2
	-5,8	0,828	0,024	1,166	0,135	3
Rolipram 4						
	-4,8	0,780	0,000	0,956	0,000	1
	-5,3	0,923	0,060	1,237	0,069	2
	-5,8	0,879	0,026	1,393	0,152	2
Rolipram 5						
	-4,8	0,914	0,000	1,126	0,000	1
	-5,3	0,857	0,013	1,151	0,050	2
	-5,8	0,751	0,070	0,969	0,152	3
Rolipram 6						
	-4,8	0,765	0,067	1,240	0,078	3
	-5,3	0,803	0,128	1,178	0,062	2
	-5,8	0,437	0,020	0,697	0,004	2

Tab. 7: Übersicht über die Flächenverhältnisse der Substantia nigra pars reticulata (SNr) der Ratten nach Injektion von Zolpidem: Kennzeichen der untersuchten Schnitte ist die Gesamtfläche der SNr auf der Läsions- und der Kontrollseite.

Versuchs- gruppe	Ebene (post. Bregma)	Läsionsseite Fläche SNr (mm ²) (Mittelwert)	Fläche SNr (mm ²) (Standard- abweichung)	Kontrollseite Fläche SNr (mm ²) (Mittelwert)	Fläche SNr (mm ²) (Standard- abweichung)	Anzahl Schnitte/ Ebene (n)
Zolpidem 1	-5,3	0,956	0,000	1,211	0,000	1
	-5,8	0,867	0,107	1,239	0,090	3
Zolpidem 2	-5,3	0,801	0,000	0,976	0,000	1
	-5,8	0,890	0,161	1,263	0,282	4
Zolpidem 3	-4,8	0,696	0,000	1,062	0,000	1
	-5,3	0,741	0,117	1,124	0,056	2
	-5,8	0,901	0,078	1,051	0,071	3
Zolpidem 4	-4,8	0,937	0,012	1,230	0,028	2
	-5,3	0,808	0,000	1,175	0,000	1
	-5,8	0,887	0,057	1,134	0,119	3
Zolpidem 5	-4,8	0,686	0,041	1,026	0,004	2
	-5,3	0,721	0,036	1,155	0,047	2
	-5,8	0,796	0,062	0,961	0,084	4
Zolpidem 6	-5,3	0,997	0,170	1,288	0,011	2
	-5,8	0,865	0,091	1,264	0,052	2

Tab. 8: Übersicht über die Flächenverhältnisse der Substantia nigra pars reticulata (SNr) der Ratten ohne Protektion: Kennzeichen der untersuchten Schnitte ist die Gesamtfläche der SNr auf der Läsions- und der Kontrollseite.

Versuchs- gruppe	Ebene (post. Bregma)	Läsionsseite Fläche SNr (mm ²) (Mittelwert)	Fläche SNr (mm ²) (Standard- abweichung)	Kontrollseite Fläche SNr (mm ²) (Mittelwert)	Fläche SNr (mm ²) (Standard- abweichung)	Anzahl Schnitte/ Ebene (n)
QA 1	-4,8	0,711	0,052	0,924	0,120	4
	-5,3	0,949	0,056	1,239	0,026	4
	-5,8	0,754	0,111	1,109	0,076	4
QA 2	-4,8	1,017	0,000	1,090	0,000	1
	-5,3	1,154	0,000	1,379	0,000	1
	-5,8	0,950	0,000	1,288	0,000	1
QA 3	-4,8	0,848	0,070	1,065	0,073	4
	-5,3	1,004	0,087	1,256	0,027	2
	-5,8	0,869	0,000	1,026	0,000	1
QA 4	-4,8	1,090	0,000	1,239	0,000	1
	-5,3	1,076	0,012	1,313	0,033	2
	-5,8	1,018	0,000	1,241	0,000	1

Tab. 9: Übersicht der ermittelten Zellzahlen in der Substantia nigra pars reticulata (SNr) der Ratten nach Injektion von Rolipram.

Versuchs- gruppe	Ebene (post. Bregma)	Läsionsseite P. reticulata Zellzahl (Mittelwert)	Zellzahl (Standard- abweichung)	Kontrollseite P. reticulata Zellzahl (Mittelwert)	Zellzahl (Standard- Abweichung)	Anzahl Schnitte/ Ebene (n)
Rolipram 1	-5,3	159	0	185	0	1
	-5,8	111	0	144	0	1
Rolipram 2	-4,8	156	0	162	0	1
	-5,3	145	0	152	0	1
	-5,8	146	0	179	0	1
Rolipram 3	-4,8	187	11	205	11	2
	-5,3	237	0	225	0	1
Rolipram 4	-5,3	215	0	214	0	1
	-5,8	181	36,5	168	36,5	2
Rolipram 5	-5,8	175	0	160	0	1
Rolipram 6	-4,8	104	0	116	0	1
	-5,3	195	21	208	17	2

Tab. 10: Übersicht der ermittelten Zellzahlen in der Substantia nigra pars reticulata (SNr) der Ratten nach Injektion von Zolpidem.

Versuchs- gruppe	Ebene (post. Bregma)	Läsionsseite P. reticulata Zellzahl (Mittelwert)	Zellzahl (Standard- abweichung)	Kontrollseite P. reticulata Zellzahl (Mittelwert)	Zellzahl (Standard- abweichung)	Anzahl Schnitte/ Ebene (n)
Zolpidem 1	-5,3	148	12,5	171	17	2
	-5,8	219	18,5	256	18	2
Zolpidem 2	-4,8	152	14	185	5,5	2
	-5,3	135	27	174	34,5	2
	-5,8	173	27	213	18,5	2
Zolpidem 3	-4,8	89	4	110,5	0,5	2
	-5,3	123	0	157	0	1
	-5,8	125	10,7	179	9,1	3
Zolpidem 4	-4,8	115	0	128	0	1
	-5,3	101	12	140	4,5	2
	-5,8	125	5,5	155	12	2
Zolpidem 5	-5,3	77	0	116	0	1
	-5,8	103	12,1	126	13	4
Zolpidem 6	-5,3	69	0	101	0	1
	-5,8	87	12,1	109	21,8	3

Tab. 11: Übersicht der ermittelten Zellzahlen in der Substantia nigra pars reticulata (SNr) der Ratten ohne Protektion.

Versuchs- gruppe	Ebene (post. Bregma)	Läsionsseite P. reticulata Zellzahl (Mittelwert)	Zellzahl (Standard- abweichung)	Kontrollseite P. reticulata Zellzahl (Mittelwert)	Zellzahl (Standard- Abweichung)	Anzahl Schnitte/ Ebene (n)
QA 1	-4,8	92	8,8	112	11,1	3
	-5,3	88	22,4	125	35,8	4
	-5,8	78	5,0	123	7,1	3
QA 2	-4,8	82	6	105	11,5	2
	-5,3	65	0	87	0,0	1
	-5,8	92	7,3	130	20,3	3
QA 3	-4,8	84	6,4	116	10,8	4
	-5,3	91	29,5	120	30,5	2
	-5,8	78	0,0	122	0,0	1
QA 4	-4,8	108	0	136	0	1
	-5,3	113	9,5	162	6	2
	-5,8	117	0	141	0	1

6. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wird die Beeinflussbarkeit durch die Pharmaka Rolipram (Phosphodiester-Inhibitor) und Zolpidem (GABA-Agonist) auf neuronalen Zelltod und Expression bestimmter entzündungsassoziierter Mediatoren bzw. Proteine in der Substantia nigra pars reticulata nach exzitotoxischer Läsion des ipsilateralen Striatums untersucht.

Es wurden insgesamt 22 Ratten in einer stereotaktischen Operation 240 nmol Chinolinsäure intrastriatal verabreicht mit dem Ziel einer exzitotoxischen Läsion des Striatums. Anschließend wurden die Tiere entsprechend der jeweiligen Versuchsgruppe weiterbehandelt: **Gruppe I** (4 Ratten) wurde ohne weitere Behandlung über 14 d beobachtet, **Gruppe II.a** (6 Ratten) mit 15 mg/kg Körpergewicht Zolpidem und **Gruppe II.b** (6 Ratten) mit 0,3 mg/kg Körpergewicht Rolipram 14 Tage durch intraperitoneale Injektion behandelt. Nach Ablauf der 14 Tage wurden sowohl immunhistochemische Färbungen auf Ox-42 und GFAP als auch Nissl-Färbungen von Striatum und Substantia nigra durchgeführt. Anhand der Nissl-Färbung konnten Zellzählungen und Flächenmessungen der Substantia nigra pars reticulata durchgeführt werden. Durch die GFAP- und Ox42-Färbung wurde die gliale Reaktion visualisiert.

Basierend auf den Auswertungen nach Nissl-Färbung wurde eine hochgradige Zerstörung des Striatums nach Chinolinsäure-Injektion festgestellt.

Anhand von Zellzählung ließ sich aufzeigen, dass die Zellzahlreduktion in der Substantia nigra pars reticulata 14 d nach chinolinsäureinduzierter striataler Läsion durch Rolipram in signifikantem Umfang verringert wird im Vergleich zur unbehandelten Tiergruppe. Die Behandlung mit Zolpidem führte zu keiner signifikanten Beeinflussung der Zellzahlreduktion. Auch das Ausmaß der Gewebeerstörung war bei den unbehandelten Tieren signifikant höher.

Bei einer **dritten Gruppe** wurde der Zeitverlauf der TNF- α Expression in der Substantia nigra pars reticulata auf der Läsions- und der Kontrollseite untersucht. Zu diesem Zweck wurde bei jeweils einem Tier mit chinolinsäureinduzierter Läsion des Striatums ohne Protektion nach einer Überlebenszeit von 12 h, 1 d, 3 d, 5 d, 14 d und 30 d eine immunhistochemische Färbung der Substantia nigra auf TNF- α angefertigt. Es zeigte sich hierbei, dass 24 h nach Setzen der striatalen Läsion eine maximale Expression von TNF- α in der Substantia nigra auf der betroffenen Seite nachzuweisen war. Das spricht für eine Beteiligung der Mikroglia am beobachteten neuronalen Zelltod.

7. Bibliografie

1. Hayden M R, Martin W R W, Stoessl A J, Clark C, Hollenberg S, Adam MJ, Ammann W, Harrop R, Rogers J, Ruth T: **Positron emission tomography in the early diagnosis of Huntington's disease.** Neurology 1986; 36(7): 888-94
2. Snell R S: **Clinical Neuroanatomy.** Philadelphia (Lippincott Williams & Wilkins) 1997; 4th Ed: 310ff
3. Adams R D, Victor M: **Principles of Neurology.** New York (McGraw-Hill) 1989; 4th Edition: 932ff
4. Petersen A, Mani K, Brundin P: **Recent advances on the pathogenesis of Huntington's disease.** Exp Neurol 1999; 157:1-18
5. Tabrizi S J, Workman J, Hart P E, Mangiari L, Mahal A, Bates G, Cooper J M, Schapira A H: **Mitochondrial dysfunction and free radical damage in the Huntington R6/2 transgenic mouse.** Ann Neurol 2000; 47: 80-6
6. Aronin N, Kim M, Laforet G, DiFiglia M: **Are there multiple pathways in the pathogenesis of Huntington's disease?** Phil Trans Royal Soc London 1999; 354: 995-1003
7. Hackam A S, Hodgson J G, Singaraja R, Zhang T, Gan L, Gutekunst C A, Hersch S M, Hayden M R: **Evidence for both the nucleus and cytoplasm as subcellular sites of pathogenesis in Huntington's disease in cell culture and in transgenic mice expressing mutant huntingtin.** Phil Trans Royal Soc London 1999; 354: 1047-1055
8. Browne S E, Ferrante R J, Beal M F: **Oxidative stress in Huntington's disease.** Brain Pathol 1999; 9:147-163
9. Cha J H, Frey A S, Alsdorf S A, Kerner J A, Kosinski C M, Mangiarini L, Penney J B, Davies S W, Bates G P, Young A B: **Altered neurotransmitter receptor expression in transgenic mouse models of Huntington's disease.** Phil Trans Royal Soc London 1999; 354: 981-989
10. Upton J D, Avery S, Parkin P, George P M: **Huntington's disease: diagnosis by amplification of the CAG repeat.** N Z Med J 1995; 108: 78-80
11. Bemelmans A P, Horellou P, Pradier L, Brunet I, Colin P, Mallet J: **Brain-derived neurotrophic factor-mediated protection of striatal neurons in an excitotoxic rat model of Huntington's disease, as demonstrated by adenoviral gene transfer.** Hum Gene Ther 1999; 10: 2987-2997
12. Rosas H D, Koroshetz W J, Jenkins B G, Chen Y I, Hayden D L, Beal M F, Cudkowicz M E: **Riluzole therapy in Huntington's disease.** Movement dis 1999; 14:326-330
13. Brinkman RR, Mezei MM, Theilmann J, Almquist E, Hayden MR: **The likelihood of being affected with Huntington disease by a particular age, for a specific CAG size.** Am J Hum Gen 1997; 60: 1202-1210
14. Jason GW, Suchowersky O, Pajurkova EM, Graham L, Klimek ML, Garber AT, Poirier-Heine D: **Cognitive manifestations of Huntington disease in relation to genetic structure and clinical onset.** Arch Neurol 1997; 54:1081-1088
15. Leigh RJ, Newman SA, Folstein SE, Lasker AG, Jensen BA: **Abnormal ocular motor control in Huntington's disease.** Neurology 1983; 33: 1268-1275
16. Bartenstein P, Weindl A, Spiegel S, Boecker H, Wenzel R, Ceballos-Baumann AO, Minoshima S, Conrad B: **Central motor processing in Huntington's disease. A PET study.** Brain 1997; 120: 1553-1567

17. Kiebertz K, Feigin A, McDermott M, Como P, Abwender D, Zimmermann C, Hickey C, Orme C, Claude K, Sotack J, Greenamyre JT, Dunn C, Shoulson I: **A controlled trial of remacemide hydrochloride in Huntington's disease.** Movement Dis 1996; 11: 273-277
18. Mateo D, Gimenez-Roldan S: **Efecto del piracetam sobre los movimientos involuntarios de la enfermedad de Huntington. Un estudio a doble ciego controlado con placebo.** Neurología 1996; 11: 16-19
19. Emerich DF, Winn SR, Hantraye PM, Peschanski M, Chen EY, Chu Y, McDermott P Baetge EE, Kordower JH: **Protective effect of encapsulated cells producing neurotrophic factor CNTF in a monkey model of Huntington's disease.** Nature 1997; 386:395-399
20. Taylor-Robinson SD, Weeks RA, Bryant DJ, Sargentoni J, Marcus CD, Harding AE, Brooks DJ: **Proton magnetic resonance spectroscopy in Huntington's disease: evidence in favour of the glutamate excitotoxic theory.** Movement Dis 1996; 11: 167-173
21. Jenkins BG, Brouillet E, Chen YC, Storey E, Schulz JB, Kirschner P, Beal MF, Rosen BR: **Non-invasive neurochemical analysis of focal excitotoxic lesions in models of neurodegenerative illness using spectroscopic imaging.** J Cereb Blood Flow Metab 1996; 16: 450-461
22. Hodgson JG, Agopyan N, Gutekunst CA, Leavitt BR, LePiane F, Singaraja R, Smith DJ, Bissada N, McCutcheon K, Nasir J, Jamot L, Li XJ, Stevens ME, Rosemond E, Roder JC, Phillips AG, Rubin EM, Hersch SM, Hayden MR: **A YAC mouse model for Huntington's disease with full-length mutant huntingtin, cytoplasmatic toxicity, and selective striatal neurodegeneration.** Neuron 1999; 23: 181-192
23. Reddy PH, Charles V, Williams M, Miller G, Whetsell WO, Tagle DA: **Transgenic mice expressing mutated full-length HD cDNA: a paradigm for locomotor changes and selective neuronal loss in Huntington's disease.** Phil Trans Royal Soc London 1999; 354: 1035-1045
24. Shear DA, Dong J, Gundy CD, Haik-Creguer KL, Dunbar GL: **Comparison of quinolinic acid and 3-nitropropionic acid for use in animal models of Huntington's disease.** Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry 1998; 22: 1217-1240
25. Tabrizi SJ, Cleeter MWJ, Xuereb J, Taanman J-W, Cooper JM, Schapira AHV. **Biochemical abnormalities and excitotoxicity in Huntington's disease brain.** Ann Neurol 1999; 45:25-32
26. Novelli A, Reilly JA, Lysko PG, Henneberry RC. **Glutamate becomes neurotoxic via the n-methyl-d-aspartate receptor when intracellular energy levels are reduced.** Brain Res 1988; 451: 205-212
27. Meyer J: **Comparison of carbon monoxide, nitric oxide and nitrate as inhibitors of the nitrogenase from Clostridium pasteurium.** Arch Biochem Biophys 1981; 210: 246-256
28. Reddy D, Lancaster JR Jr, Cornforth DP: **Nitrate inhibition of Clostridium botulinum - electron spin resonance detection of iron in nitric oxide complexes.** Science 1983; 221: 769-770
29. Furtado JC, Mazurek MF: **Behavioral characterization of quinolinate-induced lesions of the medial striatum: relevance for Huntington's disease.** Exp Neurol 1996; 138: 158-168
30. Brickell KL, Nicholson LF, Waldvogel HJ, Faull RL: **Chemical and anatomical changes in the striatum and substantia nigra following quinolinic acid**

- lesions in the striatum of the rat: a detailed time course of the cellular and GABA(A) receptor changes.** J Chem Neuroanat 1999; 17(2):75-97
31. Huntington G: **On Chorea.** Med Surg Rep 1872; 26: 317-321
 32. Meierkord H, Pfeiffer L, Ludolph A: **Neue Erkenntnisse zu Ätiologie und Pathogenese der Chorea Huntington.** Nervenarzt 1994; 65: 519-526
 33. Duyao M, Ambrose C, Myers R: **Trinucleotide repeat length instability and age of onset in Huntington's disease.** Nature Genet 1993; 4: 387-392
 34. Ranen N, Stine O, Abbot M, Sherr M, Codori A, Franz M, Chao N, Chung A, Pleasant N, Callahan C, Kasch L, Ghaffari M, Chase G, Kazazian H, Brandt J, Folstein S, Ross C: **Anticipation and instability of IT-15 (CAG)n repeats in parent-offspring pairs with Huntington disease.** Am J Hum Genet 1995; 57: 593-602
 35. Westphal C: **Über eine dem Bilde der cerebros spinalen grauen Degeneration ähnlichen Erkrankung des centralen Nervensystems ohne anatomischen Befund, nebst einigen Bemerkungen über paradoxe Contraktionen.** Arch Psychiatr Nervenkr 1883;14:187-194
 36. Vonsattel JP, Myers RH, Stevens TJ, Ferrante RJ, Bird ED, Richardson E Jr: **Neuropathological classification of Huntington's disease.** J Neuropathol Exp Neurol 1985; 44: 559-577
 37. Albin RL, Young AB, Penney JB: **The functional anatomy of basal ganglia disorders.** Trends Neurosci 1989; 12: 366-375
 38. Kosinski CM, Cha JH, Young AB, Schwarz M: **Chorea Huntington - Tiermodelle eröffnen neue Hypothesen zu Pathophysiologie und Therapie.** Nervenarzt 1999; 70: 878-888
 39. Perutz M: **Glutamine repeats and inherited neurodegenerative diseases: molecular aspects.** Curr Opin Struct Biol 1996; 6: 848-858
 40. Sharp AH, Ross CA: **Neurobiology of Huntington's disease.** Neurobiol Dis 1996; 3: 3-15
 41. Cha JH, Kosinski CM, Kerner JA, Alsdorf SA, Mangiarini L, Davies SW, Penney JB, Bates GP, Young AB: **Altered brain neurotransmitter receptors in transgenic mice expressing a portion of an abnormal human huntington disease gene.** Proc Natl Acad Sci USA 1998; 95(11): 6480-6485
 42. Mangiarini L, Sathasivam K, Seller M, Cozens B, Harper A, Hetherington C, Lawton M, Trottier Y, Lehrach H, Davies S, Bates G: **Exon 1 of the HD gene with an expanded CAG repeat is sufficient to cause a progressive neurological phenotype in transgenic mice.** Cell 1996; 87: 493-506
 43. Nasir J, Floresco SB, O'Kusky JR, Diewert VM, Richman JM, Zeisler J, Borowski A, Marth JD, Phillips AG, Hayden MR: **Targeted cell disruption of the Huntington's disease gene results in embryonic lethality and behavioral and morphological changes in heterozygotes.** Cell 1995; 81: 811-823
 44. Ludolph A, He F, Spencer P, Hammerstad J, Sabri M: **3-Nitropropionic acid-exogenous animal neurotoxin and possible human striatal toxin.** Can J Neurol Sci 1991; 18: 492-498
 45. Beal MF, Brouillet E, Jenkins BG, Ferrante RJ, Kowall NW, Miller JM, Storey E, Srivastava R, Rosen BR, Hyman BT: **Neurochemical and histological characterization of striatal excitotoxic lesions produced by the mitochondrial toxin 3-nitropropionic acid.** J Neurosci 1993; 13: 4181-4192
 46. Albin R, Greenamyre J: **Alternative excitotoxic hypotheses.** Neurology 1992; 42: 733-738
 47. Petersén A, Mani K, Brundin P: **Recent advances on the pathogenesis of Huntington's disease.** Exp Neurol 1999; 157: 1-18

48. Leist M, Nicotera P: **Apoptosis, excitotoxicity and neuropathology**. Exp Cell Res 1998; 239: 183-201
49. Zamzami N, Hirsch T, Dallaporta P, Petit X, Kroemer G: **Mitochondrial implication in accidental and programmed cell death: Apoptosis and necrosis**. J Bioenerg Biomembr 1997; 29: 185-193
50. Skulachev VP: **Why are mitochondria involved in apoptosis? Permeability transition pores and apoptosis as selective mechanisms to eliminate superoxide-producing mitochondria and cell**. FEBS Lett 1996; 397: 7-10
51. DiFiglia M, Sapp E, Chase K, Schwarz C, Meloni A, Young C, Martin E, Vonsattel JP, Carraway R, Reeves SA, Aronin N: **Huntingtin is a cytoplasmatic protein associated with vesicles in human and rat brain neurons**. Neuron 1995; 14: 1075-1081
52. Arzberger TK, Krampel K, Leimguber S, Weindl A: **Changes of NMDA receptor subunit (NR1, NR2B) and glutamate transporter (GLT1) mRNA expression in Huntington's disease-An in situ hybridization study**. J Neuropathol Exp Neurol 1997; 56: 440-454
53. Meßmer K, Reynolds GP: **Increased peripheral benzodiazepine binding sites in the brain of patients with Huntington's disease**. Neurosci Lett 1998; 241: 53-56
54. Singhrao SK, Neal JW, Morgan BP, Gasque P: **Increased complement biosynthesis by microglia and complement activation on neurons in Huntington's disease**. Exp Neurol 1999; 159: 362-376
55. Perry VH, Bolton SJ, Antony DC, Betmouni S: **The contribution of inflammation to acute and chronic neurodegeneration**. Res Immunol 1998; 149: 721-725
56. Floyd RA: **Neuroinflammatory processes are important in neurodegenerative diseases: An hypothesis to explain the increased formation of reactive oxygen and nitrogen species as major factors involved in neurodegenerative disease development**. Free Rad Biol Med 1999; 26 (9/10): 1346-1355
57. Brown GC: **Nitric oxide inhibition of cytochrome oxidase and mitochondrial respiration: implications for inflammatory, neurodegenerative and ischaemic pathologies**. Mol Cell Biochem 1997; 174 (1-2): 189-192
58. MacMillan J, Quarrell O: **The neurobiology of Huntington's disease**. Huntington's Disease 317-358, 1996, Saunders, Cambridge.
59. Haddad MS, Cummings JL: **Huntington's disease**. Psychiatr Clin North Am 1997; 20 (4): 791-807
60. Block F, Kunkel M, Schwarz M: **Quinolinic acid lesion of the striatum induces impairment in spatial learning and motor performance in rats**. Neurosci Lett 1993; 149(2):126-8
61. Krammer EB: **Anterograde and transsynaptic degeneration 'en cascade' in basal ganglia induced by intrastriatal injection of kainic acid: an animal analogue of Huntington's disease**. Brain Res 1980;196(1): 209-21
62. Saji M, Blau AD, Volpe BT: **Prevention of transneuronal degeneration of neurons in the substantia nigra reticulata by ablation of the subthalamic nucleus**. Exp Neurol, 1996; 141, 120-129
63. Saji M, Reis DJ: **Delayed transneuronal death of substantia nigra neurons prevented by gamma-aminobutyric acid agonist**. Science 1987; 235(4784), 66-69
64. Stefanis L, Burke RE: **Transneuronal degeneration in substantia nigra pars reticulata following striatal excitotoxic injury in adult rat: time course, distribution and morphology of cell death**. Neuroscience 1996, 74, 997-1008

65. Pasinetti GM, Morgan DG, Finch CE: **Disappearance of GAD-mRNA and tyrosine hydroxylase in substantia nigra following striatal ibotenic acid lesions: evidence for transneuronal regression.** Exp Neurol 1991; 112(2):131-9
66. Pearson RC, Neal JW, Powell TP: **Bilateral morphological changes in the substantia nigra of the rat following unilateral damage of the striatum.** Brain Res 1987; 400(1): 127-32
67. Pérez-Navarro E, Arenas E, Marco S, Alberch: **Intrastriatal grafting of a GDNF-producing cell line protects striatonigral neurons from quinolinic acid excitotoxicity in vivo.** Europ J Neurosc 1999; 11: 241-249
68. Schallert T, Lindner MD: **Rescuing neurons from trans-synaptic degeneration after brain damage: helpful, harmful, or neutral in recovery of function?** Can J Psychol 1990, Jun;44(2):27692
69. Saji M, Reis DJ: **Delayed transneuronal death of substantia nigra neurons prevented by gamma-aminobutyric acid agonist.** Science 1987; 235(4784):669
70. Daniele A, Moro E, Bentivoglio AR: **Zolpidem in Progressive Supranuclear Palsy.** N Engl J Med 1999; 341(7):543-544
71. Stoll G, Jander S: **The role of microglia and macrophages in the pathophysiology of the CNS.** Progr Neurobiol 1999; 58:233-47
72. Huang TL, O'Banion MK: **Interleukin-1 beta and tumor necrosis factor-alpha suppress dexamethasone induction of glutamine synthetase in primary mouse astrocytes.** J Neurochem 1998; 71(4):1436-42
73. Wilde GJ, Pringle AK, Sundstrom LE, Mann DA, Ianotti F: **Attenuation and augmentation of ischemia related neuronal death by tumor necrosis factor-alpha in vitro.** Eur J Neurosci 2000; 12(11):3863-70
74. Stoll G, Jander S, Schroeter M: **Cytokines in CNS disorders: neurotoxicity versus neuroprotection.** J Neural Transm Suppl 2000;59:81-9
75. Downen M, Maral TD, Hua LL, Zhao ML, Lee SC: **Neuronal death in cytokine-activated primary human brain cell culture: Role of tumor necrosis factor- α .** Glia 1999; 28:114-127
76. Block F, Tondar A, Schmidt W, Schwarz M: **Delayed treatment with rolipram protects against neuronal damage following global ischemia in rats.** Neuroreport 1997; 8(17): 3829-3832
77. Brickell KL, Nicholson LFB, Waldvogel HJ, Faull RLM: **Chemical and anatomical changes in the striatum and substantia nigra following quinolinic acid lesions in the striatum of the rat: a detailed time course of the cellular and GABA-A receptor changes.** J Chem Neuroanat 1999; 17:75-97
78. Scali C, Prosperi C, Vanucchi MG, Pepeu G, Casamenti F: **Brain inflammatory reaction in an animal model of neuronal degeneration and its modulation by anti-inflammatory drug: implication in Alzheimer's disease.** Eur J Neurosci 2000; 12(6): 190-212
79. Asanuma M, Nishibayashi-Asanuma S, Miyazaki I, Kohno M, Ogawa N: **Neuroprotective effects of non-steroidal anti-inflammatory drugs by direct scavenging of nitric oxide radicals.** J Neurochem 2001; 76(6): 1895-904
80. Block F, Schwarz M: **Neuroprotektion beim Schlaganfall.** Nervenarzt 1999; 70: 101-110
81. Nakagawa S, Kim, JE, Lee R, Malberg JE, Chen J, Steffen C, Zhang YJ, Nestler EJ, Duman RS: **Regulation of neurogenesis in adult mouse hippocampus by cAMP and the cAMP response element-binding protein.** J Neurosci 2002; 22(9): 3673-3682

82. Riva MA, Molteni R, Lovati E, Fumagalli F, Rusna M, Racagni G: **Cyclic AMP-dependent regulation of fibroblast growth factor-2 messenger RNA levels in rat cortical astrocytes: comparison with fibroblast growth factor-1 and ciliary neurotrophic factor.** Mol Pharmacol 1996; 49(4): 699-706
83. Klegeris A, MxGeer PL: **Interaction of various intracellular signaling mechanisms involved in mononuclear phagocyte toxicity toward neuronal cells.** J Leukoc Biol 2000; 67(1): 127-33
84. Sommer N, Loschmann PA, Northoff GH, Weller M, Steinbrecher A, Steinbach JP, Lichtenfels R, Meyermann R, Riethmuller A, Fontana A: **The antidepressant Rolipram suppresses cytokine production and prevents autoimmune encephalomyelitis.** Nat Med 1995; 1(3): 244-8
85. Alexi T, Hughes PE, van Roon-Mom WMC, Faull RLM, Williams CE, Clark RG, Gluckman PD: **The IGF-I amino-terminal tripeptide glycine-proline-glutamate (GPE) is neuroprotective to striatum in the quinolinic acid lesion animal model of Huntington's disease.** Exp Neurol 1999; 159: 84-97
86. Imamura N, Hida H, Aihara N, Ishida K, Kanda Y, Nishino H, Yamada K: **Neurodegeneration of substantia nigra accompanied with macrophage/microglia infiltration after intrastriatal hemorrhage.** Neurosci Res 2003; 46: 289-298
87. Dihné M, Block F, Korr H, Töpper R: **Time course of glial proliferation and glial apoptosis following excitotoxic CNS injury.** Brain Res 2001; 902: 178-189
88. Banati RB, Gehrmann J, Schubert P, Kreutzberg GW: **Cytotoxicity of microglia.** Glia 1993; 7: 111-118
89. DeGiorgio LA, Dibinis C, Milner TA, Saji M, Volpe BT: **Histological and temporal characteristics of nigral transneuronal degeneration.** Brain Res 1998; 795: 1-9
90. Paxinos G, Watson CR, Emson PC: **Ache-stained horizontal sections of the rat brain in stereotaxis coordinates.** J Neurosci Methods. 1980; 2: 129-149

8. Lebenslauf

Persönliche Angaben:

Name: **Claas Frohn**
Geburtsdatum: 10. Dezember 1972
Geburtsort: Aachen
Familienstand: ledig
Staatsangehörigkeit: deutsch

Schulausbildung

1979-1983 Gemeinschaftsgrundschule Kempen-St. Hubert
1983-1992 Luise-von-Duesberg-Gymnasium, Kempen

Studium

1993-2000 Medizinische Fakultät der RWTH, Aachen

Ärztliche Vorprüfung: am 8.9.1995

1. Teil der Ärztlichen Prüfung: am 23.9.1996

1996-1997 **Auslandsstudium** mit dem ERASMUS-Programm:

Facultad de Medicina, Universidad de Oviedo
Oviedo, Spanien

2. Teil der Ärztlichen Prüfung: am 6.9.1999

Praktisches Jahr:

Luisenhospital, Aachen, Abteilung für Innere Medizin

General Hospital, NHS Trust, Hartlepool, Großbritannien, Abteilung für
Allgemeinchirurgie

Luisenhospital, Aachen, Abteilung für Anästhesie

3. Teil der Ärztlichen Prüfung: am 7.11.2000