

## 5. Zusammenfassung

Die intrastriale Injektion von Chinolinsäure führt bei der Ratte über eine Kaskade aus Stimulation von Glutamatrezeptoren, Einstrom von Kalziumionen und Bildung freier Radikale zu einem neuronalen Zellschaden im Striatum, der dem von Chorea-Huntington-Patienten ähnelt. Die vorliegende Arbeit untersuchte an diesem Chinolinsäuretiermodell der Chorea Huntington die neuroprotektive Wirkung verschiedener systemisch applizierter Substanzen, die mit dieser neurotoxischen Kaskade interferieren.

Ratten erhielten eine stereotaktische intrastriale Injektion von 1 µl Chinolinsäure in einer Konzentration von 240 nm/µl, die Veränderungen induziert, die mit denen von Chorea-Huntingtonpatienten sehr gut übereinstimmen (BEAL et al., 1986). Als Kontrollgruppe dienten Tiere, denen intrastriatal das Lösungsmittel der Chinolinsäure, phosphatgepufferte Kochsalzlösung (PBS) injiziert wurde. Vor der intrastriatalen Applikation von Chinolinsäure erhielten die Tiere intraperitoneale Injektionen folgender potentiell neuroprotektiver Substanzen: die NMDA-Rezeptorantagonisten MK-801, CGP 40116 und Memantine sowie Flupirtin, der Kalziumantagonist Levomepamil, die Radikalfänger Vitamin E in Kombination mit Vitamin C und GYKI 52466, einem Benzodiazepin mit antagonistischer Wirkung am nicht-NMDA-Rezeptor. Nach einer Überlebenszeit von 3 Wochen post operationem wurden die Gehirne der Ratten histologisch untersucht. Das Ausmaß der Läsion wurde anhand des striatalen Neuronenverlustes mittels der Nissl-Färbung und der astrozytären Gliereaktion mittels immunhistochemischer Färbung für saures Gliaprotein (GFAP) im Striatum sowie in den nachgeschalteten Strukturen Globus pallidus, Substantia nigra und ventromedialer Thalamuskern bestimmt.

Der neuronale Schaden und die astrozytäre Gliereaktion im Striatum wurde mittels eines Bildanalyseystems bestimmt, indem bei histologischen Präparaten die Fläche des Striatums und des neuronalen Schadens bzw. die des GFAP-exprimierenden striatalen Areals gemessen und in Relation zueinander gesetzt wurden. In den Projektionsarealen des Striatums, Globus pallidus und Substantia nigra wurde in der Bildanalyse die optische Dichte bestimmt und mit der eines definierten Cortexareals als Maß für die Hintergrundfärbung verglichen.

Die intrastriale Injektion von PBS führte zu einem Neuronenverlust im Bereich des Stichkanals, der etwa 2,5% der striatalen Fläche ausmachte. Im Gegensatz dazu führte die intrastriale Injektion von Chinolinsäure zu einem fast vollständigem Untergang der Neurone im Striatum. Die anhand der Nissl-Färbung ermittelte zerstörte striatale Fläche betrug 97%. Durch intraperitoneale Gabe der NMDA-Rezeptorantagonisten MK-801 und CGP 40116 wurde eine fast vollständige Protektion der striatalen Neurone erreicht. Es fand sich nur im Bereich des Einstichkanals der Kanüle ein Neuronenverlust, der etwa 7% der striatalen Fläche ausmachte und sich damit nicht signifikant von den Tieren mit intrastriataler PBS-Injektion unterschied. Die systemische Gabe von

Memantine, Flupirtin oder Levemopamil führte dagegen nur zu einer geringen Abnahme des durch Chinolinsäure induzierten striatalen Neuronenverlustes auf Werte von 89 bzw. 92 % zerstörte striatale Fläche. Diese Werte waren gegenüber denjenigen durch Chinolinsäure läsionierten Ratten ohne Neuroprotektion statistisch signifikant vermindert. Die Gabe von GYKI 52466 oder Vitamin E in Kombination mit Vitamin C hingegen beeinflusste den Chinolinsäure-induzierten Schaden nicht. Das Ausmaß des striatalen Neuronenverlustes betrug in beiden Fällen etwa 95% der striatalen Fläche.

Im Striatum der schcinoperierten Kontrolltiere war eine Fläche von 10,7% GFAP-positiv angefärbt, demgegenüber war dieser Gehirnbereich der Ratten, die Chinolinsäure ohne systemische Protektion injiziert bekamen, zu 98,9% fast vollständig mit Astrozyten ausgefüllt. Die Gruppen, die mit MK-801 und CGP 40116 protektioniert wurden, erzielten Werte bis zu 23,7% und waren somit gegenüber den Tieren, denen nur Chinolinsäure verabreicht wurde, hochsignifikant verbessert. Ein signifikantes Resultat im Vergleich mit dem Ergebnis der Tiere, die lediglich Chinolinsäure erhielten, wurde mittels der Protektion durch Levemopamil erreicht, die Größe der GFAP-positiven striatalen Fläche betrug dabei 94,4%. Die angefärbten Flächen der Tiere, die eine der restlichen Substanzen erhielten, betrugen 96,4% bis 98,3% und waren somit nicht signifikant gegenüber den Tieren, die nur Chinolinsäure erhielten, vermindert.

Die optische Dichte des Globus pallidus lag bei den Kontrolltieren im Vergleich zu dem definierten Cortexareals bei 3,15, während die der Ratten, die Chinolinsäure ohne systemische Protektion erhielten, 4,96 betrug. Die systemische Gabe von MK-801, CGP 40116 und Memantine bewirkte eine statistisch signifikant geringere optische Dichte von  $\leq 2,74$  im Vergleich zu den Tieren, die lediglich intrastriatal Chinolinsäure erhielten. Ratten, die eine der anderen Substanzen erhielten, erzielten Ergebnisse von  $\geq 4$  und waren im Vergleich mit den Tieren, die nur Chinolinsäure erhielten, nicht signifikant verbessert.

Kontrolltiere erzielten in der Substantia nigra eine optische Dichte von 2,68, die im Vergleich mit den Tieren, die Chinolinsäure ohne Protektion erhielten (optische Dichte 3,82) signifikant geringer war. Von den protektionierten Tiergruppen erzielten nur die mit MK-801 und CGP 40116 behandelten Ratten mit optischen Dichten von 2,48 bzw. 2,22 signifikante Resultate im Vergleich zu den Ratten, die nur Chinolinsäure erhielten. Die optische Dichten der restlichen Tiergruppen lagen bei  $\geq 4$ .

Der ventromediale Thalamuskern verfügt generell über eine schlechte GFAP-Anfarbbarkeit, in Versuchen von BLOCK und SCHWARZ (1994) zeigten Kontrolltiere keine Färbung in diesem Bezirk, so daß in der vorliegenden Arbeit nur kontrolliert wurde, ob eine Gliose vorlag oder nicht. Dabei zeigte sich lediglich bei den Kontrolltieren, die intrastriatal PBS erhielten und den mit MK-801 und CGP 40116 protektionierten Tieren eine signifikante Verbesserung im Vergleich zu den Ratten, die Chinolinsäure ohne systemische Protektion verabreicht bekamen.

Um zu prüfen, ob die in den striatalen Projektionsarealen beobachtete astrozytäre Gliaaktivierung vom Ausmaß des striatalen Schadens abhängt, wurden die Ergebnisse der Untersuchungen des Striatums sowie seiner Projektionsareale miteinander korreliert. Zwischen dem Ausmaß des striatalen neuronalen Schadens und der striatalen GFAP-Expression bestand eine lineare Korrelation ( $r=0,84$ ;  $p<0,0001$ ). Setzte man das Ausmaß des striatalen neuronalen Schadens mit der glialen Reaktion der Projektionsareale in Beziehung, ergab sich eine schwache, aber statistisch signifikante Korrelation mit einem Spearman-Korrelationskoeffizienten von 0,49 für den Globus pallidus sowie 0,48 für die Substantia nigra. Der Korrelationskoeffizient für die Korrelation des Ausmaßes der striatalen GFAP-Expression mit der optischen Dichte der Projektionsareale betrug für den Globus pallidus 0,48 und für die Substantia nigra 0,56.

## 6 Summary

### Gabriele Quadflieg

#### Neuroprotection in the rat quinolinic acid model of Huntington's disease: immunohistological researches

Intrastriatal injection of quinolinic acid (QA) leads to a cascade of biochemical events consisting of stimulation of glutamate receptors,  $Ca^{2+}$ -influx and formation of free radicals resulting in neuronal damage in the striatum which is similar to the damage seen in patients with Huntington's disease. In the present study, the quinolinic acid-model (QA-model) was used to test the potential neuroprotective effect of different substances interfering with this cascade of biochemical events after systemic application.

Rats were mounted in a small animal stereotactic frame and received intrastriatal injections of 240 nmol solved in 1  $\mu$ l phosphate-buffered-solvent (PBS), a dose that induces changes resembling those observed in Huntington's disease patients (BEAL et al, 1986). Control animals were injected with PBS only. Before the intrastriatal application of QA experimental rats received an intraperitoneal injection of one of the following potentially neuroprotective substances: the NMDA-receptor-antagonists MK-801, CGP 40116, Memantine and Flupirtine, the calcium-antagonist Levemopamil, the scavengers of free radicals vitamine E in combination with vitamine C and the benzodiazepine GYKI 52466 with AMPA-receptor-antagonistic properties. After a post-operative survival time of three weeks the rats were sacrificed and their brains were histologically analysed. In order to determine the extent of the lesion sections were taken from the striatum, the globus pallidus, the substantia nigra and the ventromedial nucleus of the thalamus and stained with either cresyl violet or immunohistochemically with an antibody against the glial fibrillary acidic protein (GFAP) to assess the neuronal loss and the astroglial reaction respectively.

The spatial extent of the neuronal damage and of the astroglial reaction in the striatum were measured with a computerized analysis system. The areas of neuronal loss as well as the territories that showed GFAP-immunoreactivity were measured and expressed as percentage of the total area of the striatum (e.g. area of neuronal damage/entire area of striatum\*100). In the projection areas of the striatum - globus pallidus and substantia nigra - the mean optical density was determined with an image analysis program and was related put in relation to the mean optical density of a defined unlesioned cortex area (expressed as ratio of optical density of projection area /optical density of cortex).

The intrastriatal injection of PBS causes a loss of neurons in the vicinity of the incision canal (approximately 2,5 % of the area of the striatum). In contrast to that the injection of QA leads to an almost complete loss of neurons in the striatum. According to Nissl stained sections the damage extended to 97 % of the entire striatal area. If the NMDA-receptor antagonists MK-

801 or CGP 40116 were injected intraperitoneally to the application of QA an almost complete protection from neuronal cell death was observed. Neuronal loss was seen around the incision canal only (7 % of the striatal area) and thus was not significantly different from animals with intrastriatal PBS injection. The injection of Memantine, Flupirtine or Levemopamil only caused a small reduction of QA-induced striatal cell death (82 % and 92 %) but were significantly different from rats without neuroprotection. The application of GYKI 52466 or vitamine E in combination with vitamine C did not affect the QA induced cell death. In both cases the neuronal loss in the striatum measured was approximately 95 % of the striatal area.

While in sham-operated animals only 10,7% of the striatal area showed GFAP-immunoreactivity, 98,9 % of the striatum were filled with GFAP-positive astrocytes in rats after treatment with QA. In animals with QA and neuroprotection with MK-801 or CGP 40116 the GFAP-positive area measured 23,7 % and was thus significantly different from those rats that were only treated with QA. Also results from rats that were neuroprotected with Levemopamil were significantly different from animals with an QA injection, although still 94,4% of the striatal area showed GFAP-immunoreactivity. Rats that received an injection of any of the other potentially neuroprotective substances had a GFAP-positive area of 96,4 - 98,3 % of the striatal area and were not significantly different from QA treated animals.

The mean optical density of GFAP-immunoreactivity in the globus pallidus of control animals after comparison to the defined cortex area was 3,15 as compared to an optical density of 4,96 in rats with an injection of QA without systemic application of neuroprotective substances. The intraperitoneal injection of MK-801, CGP 40116 or Memantine caused a statistically significant reduction of optical density to  $\leq 2,74$  in comparison to QA treated rats. In animals that received any of the other substances, a mean optical density of  $\geq 4$  was measured and therefore was not significantly different from measured densities after application of QA.

The optical density of GFAP-immunoreactivity in the substantia nigra of control animals was 2,68 which was significantly less than in rats with intrastriatal injection of QA (3,82). From groups that received potentially neuroprotective substances, only MK-801 and CGP 40116 treated rats showed a significant reduction of optical density (2,48 and 2,22). In all other groups the optical density was  $\geq 4$ .

In the ventromedial nucleus of the thalamus GFAP-immunoreactivity is generally very weak. According to experiments from BLOCK and SCHWARZ (1994) untreated control animals were GFAP-negative in this territory so that in the present study it was only analysed if gliosis was detectable or not. It could be shown that only in groups where PBS was injected into the striatum or where MK-801 or CGP 40116 was applied to the treatment with QA gliosis was significantly less than in groups with QA treatment.

In order to check whether the astroglial activation in the striatal projection areas is dependant on the extent of the lesion in the striatum, the results from the studies of the striatum were correlated with those from the projection areas. There was a linear correlation between the extent of the neuronal damage in the striatum and the expression of GFAP in the striatum.

( $r=0,84$ ;  $p<0,0001$ ). The correlations of the neuronal damage in the striatum and the glial activation in the projection areas were weak but significant with a Spearman-correlation-coefficient of 0,49 for the globus pallidus and 0,48 for the substantia nigra. The correlation coefficient of striatal GFAP-expression and optical density in the projection areas was 0,48 for the globus pallidus and 0,56 for the substantia nigra.