

Aus dem Institut für Rechtsmedizin der Medizinischen Fakultät der
Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
Direktor: Prof. Dr. med. Rüdiger Lessig

Die Rolle von Metallothionein-I/II im menschlichen Hippocampus bei Opiatabusus

Dissertation
zur Erlangung des akademischen Grades
Doktor der Medizin (Dr. med.)

vorgelegt
der Medizinischen Fakultät
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von Andreas Peter Erler
geboren am 07.08.1978 in Erfurt

Betreuer: Prof. Dr. med. Rüdiger Lessig

GutachterIn:
PD Dr. med. Heike Franke (Leipzig)
Prof. Dr. med. Jan G. Hengstler (Dortmund)

Datum der Verteidigung: 11.09.2013

Ich danke meinen Eltern für die Unterstützung und Motivation.

Mein besonderer Dank gilt Melanie
für die moralische Erbauung und konstruktive Kritik.

Für Laura, Pia & Siri

Referat

Neben ihrer Funktion als Schwermetalltransportproteine erfüllen Metallothioneine eine antioxidative Funktion und wirken protektiv gegen den Einfluss verschiedener Noxen, welche oxidativen Stress als gemeinsame Endstrecke der Schädigung haben. Die Gültigkeit der bisher im Tierexperiment gewonnenen Erkenntnisse zur Rolle der Metallothioneine bei Opiatabusus beim Menschen wurde bisher nicht systematisch untersucht. Gegenstand der vorliegenden Arbeit ist zu untersuchen, inwieweit die beobachtete Hochregulation der Metallothioneinexpression im Hippocampus auf den Menschen, speziell auf Heroinabhängige, übertragbar ist. Hierzu wurden retrospektiv bereits asservierte, konsekutive Gewebeproben aus den Hippocampi einer Gruppe an Opiatintoxikationen Verstorbener und einer Kontrollgruppe untersucht. Zur Beurteilung der Metallothioneinexpression als Surrogatparameter der hypoxischen Schädigung und resultierenden Gliose erfolgte der immunhistochemische Nachweis von Metallothionein I/II und die Bestimmung der Anzahl der immunoreaktiven Zellen, der Gliazellen und Neuronen. In Übereinstimmung mit der Literatur waren Metallothionein I und II nur in Astrozyten nachweisbar. In CA1 war eine gliotische Reaktion nach Opiatabusus nachzuweisen. Darüber hinaus zeigten sich mögliche Hinweise auf einen Verlust der Fähigkeit zur adulten Neuroneogenese bei den Probanden. Im Gegensatz zur Literatur ist in CA3 ein Verlust an Gliazellen und eine verminderte MT-I/II-Expression im Vergleich zu den Kontrollpersonen zu beobachten. Im Hilus gyri dentati war ein altersabhängiger Verlust der metallothioneinpositiven Astrozyten im Probandenkollektiv sowie ein Trend zu einem altersabhängig zunehmenden Neuronenverlust nachzuweisen.

Erler, Andreas Peter:

Die Rolle von Metallothionein-I/II im menschlichen Hippocampus bei Opiatabusus

Halle, Univ., Med. Fak., Diss., 80 Seiten, 2013

Inhaltsverzeichnis

I. Abkürzungsverzeichnis	V
1. Einleitung	1
1.1. Heroinabusus - ein medizinisches und soziales Problem	1
1.2. Struktur und Funktion der Metallothioneine	3
1.2.1. Metallothioneinstruktur, Isoformen und Polymorphismen unter besonderer Berücksichtigung des Zentralnervensystems	3
1.2.2. Funktion der Metallothioneine im Zentralnervensystem . .	4
1.3. Anatomie und Funktion des Hippocampus	6
1.3.1. Makroskopischer und mikroskopischer Bau des Hippocampus	6
1.3.2. Feingeweblicher Bau des Gyrus dentatus	8
1.3.3. Funktionelle Rolle des Hippocampus im Zentralnervensystem	9
2. Zielstellung	11
3. Untersuchungsgut und Methodik	12
3.1. Untersuchungsgut	12
3.1.1. Probanden	12
3.1.2. Kontrollgruppe	15
3.2. Gewebeaufbereitung	17
3.3. Immunhistochemie	17
3.3.1. Allgemeine Prinzipien der Immunhistochemie	18
3.3.2. Verwendete Antikörper-Detektionssystemkombination . . .	19
3.3.3. Durchführung der Immunhistochemischen Färbung	19
3.3.4. Spezifitätsnachweis und Positivkontrolle	23
3.4. Immunfluoreszenz und konfokale Lasermikroskopie	24
3.5. Auswertung	26
3.5.1. Mikroskopie und Digitale Fotografie	26
3.5.2. Rechnergestützte Datenerhebung	27

Inhaltsverzeichnis

3.5.3. Kategorisierung und Statistische Analyse	31
4. Ergebnisse	33
4.1. Routinetauglichkeit der Metallothionein-I/II-Immunhistochemie .	33
4.2. Arbeitserleichterung durch rechnergestützte Datenerhebung	33
4.3. Metallothioneinexpression im Hippocampus	34
4.4. Statistische Analyse	36
4.4.1. Eigenschaften der erhobenen Daten und Auswahl der sta- tistischen Testverfahren	36
4.4.2. Ergebnisse der statistischen Auswertung	38
5. Diskussion	47
5.1. Einordnung der Ergebnisse	47
5.1.1. Lebensalter und Geschlecht als Störgrößen	48
5.1.2. Kritische Punkte im Studiendesign	49
5.2. Interpretation der erhobenen Befunde	51
5.2.1. Differenziertes Schädigungsbild nach Opiatabusus im Hip- pocampus	51
5.3. Abschließende Betrachtung	56
6. Zusammenfassung	58
7. Thesen	68
A. Lebenslauf	70
B. Selbstständigkeitserklärung	72
C. Erklärung über frühere Promotionsversuche	73

I. Abkürzungsverzeichnis

CA	Cornu ammonis
Cd	Cadmium
Cy2	Cyanin
Cy5	Indodicarbocyanin
DAB	3,3'-Diaminobenzidin
Dekap	Dekapitation
etc.	et cetera
FCS	fetales Kälberserum
GFAP	saures Gliafaserprotein
GNU	GNU's not Unix
GPL	GNU General Public License
HRP	Horseradish-Peroxidase
HS	hämorrhagischer Schock
Hypox	Hypoxie
IgG	Immunglobulin G
Intox	Intoxikation
KD	Kilodalton
LAB	Labeled Avidin-Biotin
LSAB	Labeled Streptavidin-Biotin
m	männlich
MAM	Monoacetylmorphin
mRNA	Ribonukleinsäure vom Messengertyp
MT	Metallothionein
MT-E9	Primärantikörper gegen Metallothionein I/II
PBS	Phosphate buffered saline
pH	pH-Wert

Abkürzungsverzeichnis

Pixel	Picture element
PSA-NCAM	polysialiniertes neurales Zelladhäsionsmolekül
PT	Polytrauma
ROI	Region of interest
SHT	Schädel-Hirn-Trauma
Tris	Tris-hydroxymethyl-aminomethan
Triton X-100	Polyethylenglycol-[4-(1,1,3,3-tetramethylbutyl)phenyl]-ether
w	weiblich
ZNS	Zentralnervensystem

1. Einleitung

1.1. Heroinabusus - ein medizinisches und soziales Problem

Unter den missbräuchlich eingesetzten legalen und illegalen psychotropen Substanzen nehmen Diacetylmorphin (Heroin) und andere Opiate eine besondere Stellung ein: Durch rasche psychische und physische Abhängigkeit resultiert eine hohe Rate an dauerhaft Abhängigen [1]. Bedingt durch die meist intravenöse Anwendung und den illegalen Handel von Heroin resultiert neben den substanzspezifischen Nebenwirkungen eine ausgeprägte Komorbidität mit entsprechender Belastung des öffentlichen Gesundheitssystems [2]. Auch der durch Beschaffungskriminalität bedingte volkswirtschaftliche Schaden ist als beträchtlich einzuschätzen [1].

Neben der klassischen Entzugstherapie mit hohen Raten an Therapieversagern haben sich neuere Ansätze wie die heroinassistierte Therapie etabliert [2]. Trotz ermutigender Erfolge insbesondere der neuen therapeutischen Ansätze bezüglich Kriminalitätsrückgang und gebessertem gesundheitlichen Zustand der Betroffenen handelt es sich nicht um kausale, sondern symptomatische Behandlungskonzepte. Folglich ist trotz jüngst rückläufiger Zahlen eine beträchtliche Zahl von Konsumenten zu verzeichnen [1], [3].

Ein besseres Verständnis der Physiologie und Pathophysiologie der Opiatwirkung und der Gewöhnung beziehungsweise Abhängigkeitsentwicklung auf neuroanatomischer und neuromolekularer Ebene ist nach Meinung des Autors Voraussetzung zur Entwicklung kausaler Therapie- und Präventionskonzepte. Ziel der Arbeit ist die Untersuchung möglicher struktureller Veränderungen des Hippocampus, speziell der Metallothioneinverteilung, bei Heroinabhängigen im Vergleich zu einer Normalpopulation. In zahlreichen Arbeiten konnte gezeigt werden, dass unter den Genprodukten mit veränderter cerebraler Genexpression nach Trauma und oxidativem Stress [4] Metallothioneine eine ausgeprägte Änderung ihrer Genexpression erfahren [5]. Das und die neuroprotektive Funktion der Metallothioneine [6], [7], [8]

1. Einleitung

machen sie zu einem möglichen Surrogatmarker und funktionell bedeutenden Genprodukt in der Pathophysiologie der Opiatabhängigkeit.

Der Hippocampus erscheint uns als die für die Untersuchung geeignete Struktur, da er gegenüber anderen Hirnregionen einige Besonderheiten aufweist. Diese sollen nachfolgend erläutert werden. Im Vergleich zu anderen Hirnregionen besteht eine erhöhte Empfindlichkeit gegenüber einer Hypoxie [9], [10]. Aufgrund der für Opiate typischen Atemdepression und möglichen resultierenden Asphyxie [10] ist es folgerichtig im Hippocampus, als besonders sensibler Hirnregion, nach einem möglichen morphologischen Korrelat dieser Opiatnebenwirkung zu suchen. Die Asphyxie und resultierende Hypoxie führt zu einem Untergang von Neuronen. Noch häufiger als der neuronale Untergang ist eine Gliaproliferation nachweisbar [9]. Im Tierversuch konnte eine Assoziation zwischen Gewebeschädigung durch exogene Noxen und steigenden Metallothioneinspiegeln belegt werden [11]. Auch für eine Exposition mit Opiaten wurde ein solcher Zusammenhang tierexperimentell gesichert [12]. Der Hippocampus hat maßgeblichen Anteil an der Gedächtnisbildung [13] und erhält über die mesolimbische Bahn Efferenzen aus dem dopaminergen Belohnungssystem [14]. Die Beteiligung des Hippocampus als funktioneller Baustein eines Suchtgedächtnisses ist naheliegend. Der genaue Ablauf, die Voraussetzungen oder neuroanatomisch-funktionellen Mechanismen der Ausbildung einer Substanzabhängigkeit sind hingegen nicht hinreichend geklärt. Die bessere Kenntnis der Pathophysiologie auf neuroanatomischer und neuromolekularer Ebene wäre ein wertvoller Beitrag zum besseren Verständnis der aus einem fortgesetzten Substanzmissbrauch resultierenden kognitiven Defizite. Trotz großer Anstrengungen und auch Fortschritte in der Erforschung von Suchtmechanismen besteht hier noch großer Forschungsbedarf [15].

Heroin unterliegt, sowohl im Lebenden als auch postmortal, einem ausgeprägten Stoffwechsel [16]. Daher ist Heroin selbst nur kurzzeitig und in der Regel nur nach intravenöser Applikation im Serum nachweisbar [17]. Der serologische Nachweis der Heroinmetaboliten, insbesondere 6'-Monoacetylmorphin, ist eine lang etablierte Methode. Jedoch unterliegen auch die Metaboliten einem intravitalen und postmortalen Stoffwechsel, der sich bei unsachgemäßer Probengewinnung und Weiterverarbeitung auch im Probengefäß fortsetzen kann [18]. Analog ist der Nachweis von Opiatmetaboliten im Urin eine etablierte, aber nicht immer verlässliche Methode, mitunter wird der qualitative Nachweis eines oder mehrerer Metaboliten als ausreichend für die Diagnose eines opiatassoziierten Todes angesehen [19].

Vor dem geschilderten Hintergrund erscheint es wünschenswert über ein kosteneffektives, leicht zu handhabendes und reproduzierbare Ergebnisse lieferndes Werkzeug zum Nachweis insbesondere des fortgesetzten Opiatabusus auf histopathologischer Ebene zu verfügen.

1.2. Struktur und Funktion der Metallothioneine

1.2.1. Metallothioneinstruktur, Isoformen und Polymorphismen unter besonderer Berücksichtigung des Zentralnervensystems

Metallothioneine sind eine Familie cysteinreicher Proteine mit einem niedrigem Molekulargewicht von vier bis vierzehn Kilodalton (KD), die ubiquitär in allen Säugergeweben vorkommen. Es wurden zunächst drei Isoformen identifiziert: Metallothionein I, II und III [20], [6]. Eine vierte Isoform MT IV wird im menschlichen Hirngewebe nicht exprimiert [21].

Im menschlichen Zentralnervensystem kommen die Isoformen I - III vor. Die Metallothionein I- und II- Subpopulation wird fast ausschließlich in Astrozyten vorgefunden. In rezenten Arbeiten wird der Nachweis von Spuren von Metallothionein I/II in Neuronen berichtet [22]. Die Isoform Metallothionein III ist hirnspezifisch und wird vorwiegend in zinkhaltigen Neuronen des Hippocampus exprimiert [23], [24]. Sie wurde von uns aufgrund der nur fakultativ im Rahmen eines Heroinabusus auftretenden Neuronenuntergänge (im Gegensatz zur regelhaft nachweisbaren Gliose) [9] zunächst nicht untersucht.

Die im Zentralnervensystem vorkommenden Isoformen Metallothionein I und II weisen einen Genpolymorphismus auf. Es sind mindestens zehn humane Iso-Metallothioneingene bekannt, welche als Metallothionein Ia, Ib etc. bezeichnet werden. Die Metallothionein I und II -Isoformen bestehen aus 61 bis 62 Aminosäuren. Ein Drittel, also ca. 20 Aminosäuren, sind Cystein und dienen der Bildung von Chelatverbindungen mit Schwermetallionen. Der größere Anteil der nicht-Cystein Aminosäuren bildet ein flexibles Gerüst, in diesem formen sich die Metallbindungsepitope der Tertiärstruktur [23], [6].

Die hirnspezifische Isoform Metallothionein III besteht im Gegensatz dazu aus 68 Aminosäuren, wobei 38 davon in Position und Aminosäuretyp mit dem Metallo-

thionein I und II übereinstimmen. Ebenso stimmt die Anordnung der 20 Cysteinmoleküle, welche die Funktion bestimmen in der Tertiärstruktur aller Isoformen überein [6].

1.2.2. Funktion der Metallothioneine im Zentralnervensystem

Physiologie und Pathophysiologie der Metallothioneine

Metallothioneine erfüllen eine Reihe von Funktionen im Zentralnervensystem, die sich nicht allein auf die Homöostase von Zink und anderen Schwermetallionen beschränken. Diese ist jedoch die vorrangige physiologische Funktion der Metallothioneine. Sie sind in der Lage große Mengen von Schwermetallionen wie Zink, Kupfer oder Cadmium zu binden und somit deren Konzentration im Zytoplasma und, über die Plexus choroidales, die Ependymzellen und Astrozyten, im Liquor cerebrospinalis relativ konstant zu halten. Die gebundenen Ionen werden kontrolliert wieder freigesetzt, zum Beispiel für die Biosynthese schwermetallhaltiger Proteine [6].

Die Synthese von Metallothioneinen ist durch verschiedene Stimuli induzierbar, zu denen Metalle (z.B. Zink, Kupfer oder Cadmium), Cytokine und ionisierende Strahlung zählen [11].

Darüber hinaus wird ihnen eine antioxidative und neuroprotektive Funktion zugeschrieben. Dies gilt sowohl für ionisierende Strahlung [25], als auch mechanische Traumata [26] und oxidativen Stress, wie beispielsweise bei durch Grand-mal-Epilepsie induzierter cerebraler Ischämie [27].

Andererseits konnte unlängst gezeigt werden, dass Metallothionein III eine der Zinkquellen ist, die nach akuten Hirnverletzungen, Krampfanfällen oder cerebraler Ischämie zur Akkumulation toxischer Zinkkonzentrationen in Neuronen des Thalamus und Hippocampus, sowie deren konsekutivem Zelltod führen [28].

Eine veränderte Metallothioneinexpression, namentlich der Isoformen I und II, wurde für verschiedene neurodegenerative Erkrankungen wie Morbus Alzheimer [21], die subkortikale arteriosklerotische Enzephalopathie (Morbus Binswanger) [29] und die Frontotemporale Demenz [30] nachgewiesen. Ob es sich hierbei um eine unspezifische, uniforme Reaktion auf heterogene Noxen handelt oder die gesteigerte Expression eine gemeinsame funktionelle Endstrecke darstellt, ist nicht geklärt. Die genaue Rolle der Metallothioneine in diesem Kontext und ihre im

1. Einleitung

Gewebe- und Tiermodell nachgewiesene neuroprotektive Funktion bedarf weiterer Forschung. Möglicherweise bietet sich hier ein Ansatz für zukünftige Therapien bei Strahlenkrankheit, Intoxikationen mit Schwermetallen, mechanischem Trauma oder sekundärer Asphyxie mit konsekutiver cerebraler Hypoxie.

Mögliche Rolle bei Heroinabusus

Die erwähnte antioxidative und neuroprotektive Potenz der Metallothioneine I und II, sowie die Wirksamkeit dieser Mechanismen bei cerebraler Ischämie machen eine Einbeziehung der Metallothioneine als Antioxidanz in die durch Heroinabusus ausgelösten pathophysiologischen Prozesse wahrscheinlich. Hypoxisch-ischämische Alterationen des Zentralnervensystems, ausgelöst durch die von Heroin herbeigeführte Atemdepression, werden regelmäßig vorgefunden [10].

Als antioxidativ wirksame Moleküle sind Metallothioneine potentiell in der Lage die Auswirkungen der opiatinduzierten Hypoxie zumindest partiell zu kompensieren. Eine erhöhte Expression von Metallothionein als Adaptationsmechanismus beim Überleben mehrerer kurzer opiatinduzierter hypoxischer Episoden würde diese Vermutung untermauern. Da die protektiven Funktionen in der aktuellen Literatur vorwiegend den Isoformen Metallothionein I und II zugeschrieben werden [27], erscheinen diese als ein möglicher Surrogatmarker für chronischen Heroinabusus.

Diese Annahme wird durch die Beobachtung untermauert, dass Ratten denen fünf Tage lang intraperitoneal Morphin nach einem festen Zeitplan appliziert wurde einen fünfzehnfachen Anstieg der Metallothioneinkonzentration im Zentralnervensystem aufwiesen [12]. Es erfolgte der Nachweis der Gesamtkonzentration im Homogenisat ohne Berücksichtigung der Lokalisation auf zellulärer Ebene. Diese Beobachtung stützt die Hypothese der Adaptation an hypoxische Episoden durch Hochregulation der Metallothioneinexpression. Mithilfe der Immunhistochemie soll überprüft werden, ob ein solcher Anstieg der Metallothioneinexpression im Hippocampus von chronischen Heroinkonsumenten, welche an den Folgen einer Opiatintoxikation verstarben, nachvollziehbar ist.

1.3. Anatomie und Funktion des Hippocampus

1.3.1. Makroskopischer und mikroskopischer Bau des Hippocampus

Die paarige Hippocampusformation ist Teil des limbischen Systems. Sie wölbt sich als Wandanteil in das Temporalhorn der Seitenventrikel vor. Die Formation beschreibt einen Bogen um das Mittelhirn und wird in drei Segmente eingeteilt: Das Caput mit charakteristischen Erhebungen, den *Digitationes hippocampi*, das schmalere Corpus und die Cauda, welche spitz ausläuft. Die zwei Schichten der Hippocampusformation, das Cornu ammonis (Hippocampus proper) und die Fascia dentata (Gyrus dentatus) bilden zwei U-förmig ineinander greifende Schichten, welche durch den Sulcus hippocampi getrennt werden. Beide gehören feinanatomisch zum einfacher aufgebauten Allocortex (oder Archacortex) im Gegensatz zum komplexeren und entwicklungsgeschichtlich jüngeren Isocortex. [31] Diese im Querschnitt makroskopisch identifizierbaren U-förmigen Laminae vereinfachen die sichere Identifizierung und Entnahme einer standardisierten Gewebeprobe aus koronaren Serienschnitten des Telencephalon. Die Entnahme eines koronaren Anschnitts einer Hippocampusformation erfolgt routinemäßig im Rahmen der gerichtlich angeordneten Sektion. Die entnommenen Proben werden in Formalin asserviert und paraffineingebettet.

Feingeweblicher Bau des Cornu ammonis

Das Cornu Ammonis (oder Hippocampus Proper) zeigt als Teil des Allocortex einen sechsschichtigen Aufbau. Folgende Schichten werden, ausgehend vom Ventrikel betrachtet, unterschieden: Alveus hippocampi, Stratum oriens, Stratum pyramidale, Stratum radiatum, Stratum lacunosum sowie Stratum moleculare. Der Alveus hippocampi führt efferente Axone aus Hippocampus und Subiculum zu den Fimbria hippocampi. Weiterhin erhält der Alveus hippocampi afferente Fasern, hauptsächlich vom Septum praecommissurale. Das Stratum oriens zeigt insbesondere im menschlichen Zentralnervensystem eine Überlappung mit dem Stratum pyramidale, und ist dadurch bedingt schlecht von diesem abgrenzbar. Das Stratum oriens enthält vereinzelte Neurone (Korbzellen) und wird von zum Alveus ziehenden Pyramidenzellaxonen durchquert. Das Stratum pyramidale des Cornu ammonis enthält die Somata der Pyramidenzellen. Diese sind typischerweise dreieckig,

1. Einleitung

wobei die Basis alveusseitig liegt. Von der Basis zieht das Axon durch das Stratum oriens zum Alveus. Die Mehrzahl der Axone erreicht die Kerne des Septum prae-commisurale. Ein kleinerer Anteil erreicht als Assoziationsfasern andere Pyramidenzellen, möglicherweise auch im kontralateralen Hippocampus. Darüber hinaus bestehen Schaffer-Kollaterale zu anderen Pyramidenneuronen. An der Spitze der dreieckigen Somata entspringt je ein apikaler Dendrit, welcher bis zum Stratum moleculare zieht. Daneben existieren basale Dendriten, welche teilweise Verzweigungen im Stratum oriens bilden. Die Somata sind umgeben von den axonalen Fortsätzen der Korbzellen aus dem Stratum oriens, die ein dichtes Geflecht bilden. Schließlich finden sich im Stratum pyramidale die Somata zahlreicher Interneurone. Das Stratum radiatum besteht im wesentlichen aus den parallel angeordneten apikalen Dendriten der Pyramidenzellen, die ihm in Versilberungen die namensgebende Streifung verleihen. Die Dendriten treten mit Schaffer-Kollateralen, Fasern von den Septumkernen und vom Corpus callosum in Kontakt. Im Stratum lacunosum verlaufen axonale Faserbündel von Perforansfasern und Schaffer-Kollateralen parallel zur Oberfläche. Das Stratum moleculare bildet die abschließende Schicht. Da der Sulcus hippocampi, dem das Stratum moleculare anliegt, während der Ontogenese aufgebraucht wird, verschmelzen die Strata molecularia von Cornu ammonis und Gyrus dentatus. Die Schicht enthält verstreute Interneurone. Die Verzweigungen der apikalen Dendriten der Pyramidenzellen treten hier in Kontakt mit Kollateralen der Perforansfasern. Somit erreichen die Pyramidenzellen bzw. ihre Verzweigungen alle Schichten des Cornu ammonis. Vom normalen dreischichtigen Aufbau des Allocortex ausgehend erfolgt die Einteilung des Cornu ammonis in Stratum oriens, Stratum pyramidale und die Molekularzone, unter der die Strata radiatum, lacunosum und moleculare subsumieren [31].

Hauptsächlich aufgrund der variablen Erscheinung der Pyramidenzellneurone werden am Cornu ammonis vier Felder unterschieden, welche mit CA1 bis CA4 (Cornu ammonis 1 bis 4) bezeichnet werden. Ausgehend vom Subiculum erstreckt sich CA1 mit dreieckigen, kleinen Pyramidenzellsomata, die verstreut liegen. Das Stratum pyramidale in CA1 ist in zwei Schichten unterteilbar: das Stratum profundum mit wenigen Neuronen grenzt an das Stratum oriens, während das Stratum superficiale im Vergleich zahlreiche Pyramidenzellen enthält. In CA2 finden sich große, ovaläre Pyramidenzellsomata, welche dicht zusammengelagert sind. Es resultiert eine schmale Pyramidenzellschicht. Die Lage von CA3 entspricht der Krümmung

1. Einleitung

des Cornu ammonis. Das Erscheinungsbild der Pyramidenzellen gleicht dem der Somata in CA2 bei etwas geringerer Zelldichte. Die Unterscheidung der Regionen beruht auf den vom Gyrus dentatus in die CA3 ziehenden Moosfasern. Es handelt sich um dünne unmyelinisierte Fasern, die die Pyramidenzellsomata in CA3 umgeben. Sie ziehen zwischen den Strata radiatum und pyramidale durch CA3 und können dort als Stratum lucidum abgegrenzt werden. Eingeschlossen vom Gyrus dentatus liegt CA4 mit wenigen großen ovalären Pyramidenzellsomata in lockerer Verteilung zwischen Moosfasern und myelinisierten Fasern.

Unter Berücksichtigung der regional variierenden Empfindlichkeit gegenüber einer Hypoxämie lassen sich die Regionen des Cornu ammonis in Sektoren unterschiedlich hoher Vulnerabilität einordnen. Dies sind nach zunehmender Vulnerabilität geordnet: der Spielmeyer-Sektor oder widerstandsfähiger Sektor (CA3 entsprechend), der Bratz-Sektor von intermediärer Empfindlichkeit (CA4) sowie schließlich der Sommer-Sektor oder vulnerabler Sektor. Letzterer weist die geringste Hypoxietoleranz auf und entspricht der CA1-Region [31].

1.3.2. Feingeweblicher Bau des Gyrus dentatus

Der Gyrus dentatus, auch als Fascia dentata oder Gyrus involutus bezeichnet, bildet die zweite U-förmige Schicht. Er umschließt in seiner Konkavität die Region CA4 des Cornu ammonis. Der Gyrus dentatus zeigt den, verglichen mit dem Cornu ammonis, primitiveren dreischichtigen Aufbau des Allocortex mit den Strata moleculare, granulosum und multiforme. Die breite Molekularschicht wird durch den Sulcus hippocampi von der Molekularschicht des Cornu ammonis getrennt. Die äußeren zwei Drittel des Gyrus dentatus enthalten Perforansfasern, das innere Drittel wird von afferenten Fasern aus der Kommissur und von den Septumkernen formiert. Das Stratum granulosum enthält die zahlreichen, eng einander anliegenden Somata der kleinen rundlichen Neurone. Das Stratum multiforme (oder plexiforme) verbindet den Gyrus dentatus mit der CA4-Region und wird von den Axonen des Stratum granulosum durchzogen. Die von CA4 und Fascia dentata gebildete Formation wird auch als Area dentata bezeichnet, während für CA4 allein die Bezeichnung Hilus gyri dentati oder einfach Hilus geläufig ist [31].

1.3.3. Funktionelle Rolle des Hippocampus im Zentralnervensystem

Die Funktion des Hippocampus im menschlichen Zentralnervensystem ist bis zum heutigen Tag nicht erschöpfend geklärt und somit weiterhin Gegenstand der Forschung. Ergebnisse aus Tierexperimenten legen eine zentrale Rolle der Hippocampusformation (Hippocampus proper, Gyrus dentatus, Subiculum und Entorhinaler Cortex) bei der Gedächtnisbildung nahe. In den an Primaten durchgeführten Untersuchungen wurde gezeigt, dass durch reversible Ischämie induzierte Läsionen mit bilateralem Zellverlust in CA1 und CA2 zu einem deutlichen und anhaltenden Leistungsabfall in Gedächtnistests führte. Bei Versuchstieren, denen nahezu die komplette Hippocampusformation umfassende chirurgische Läsionen beigebracht worden waren, konnten weitaus stärkere Ausfälle nachgewiesen werden [13].

Unterstrichen werden diese Erkenntnisse durch Fallstudien an Menschen die traumatische oder ischämische Läsionen der Hippocampusformation verschiedener Ausdehnung erlitten. Durch neuropsychologische und postmortale histopathologische Untersuchungen konnte das Ausmaß der Störung der Gedächtnisfunktion mit den neuropathologischen Befunden verglichen werden. Es konnte gezeigt werden, dass umschriebene Läsionen zum Beispiel der vulnerablen CA1-Region zu fast ausschließlich anterograden Amnesien führen. Die Gedächtnisstörungen traten isoliert, ohne andere nachweisbare kognitive Störungen auf [32]. Mit zunehmender Ausdehnung der geschädigten Areale sind auch ausgeprägtere Gedächtnisstörungen mit retrograder Amnesie bis zu 25 Jahren zu verzeichnen [13].

Die aufgeführten Untersuchungen legen eine zentrale Rolle des Hippocampus in der Bildung des deklarativen Langzeitgedächtnisses nahe. Darüber hinaus zeigen jüngere Untersuchungen, dass die im Hippocampus, speziell der CA1-Region, ablaufende Langzeitpotenzierung bei chronischer Opiatexposition einer durch erneute Opiatgabe reversiblen Reduktion unterliegt [33]. Der fehlende Belohnungseffekt der Opiatgabe reduziert also die synaptische Plastizität und somit die Leistungsfähigkeit der Gedächtnisbildung. Die erneute Gabe von Opiaten antagonisiert diesen Effekt. Die strenge Trennung von Limbischem System als Belohnungssystem und Hippocampus als Zentrum der Gedächtnisbildung scheint somit nicht länger gerechtfertigt. Vielmehr deuten die Ergebnisse auf eine stärkere Vernetzung beider funktioneller Systeme insbesondere im Zusammenhang mit Substanzabhängigkeit und Gewöhnung [34]. Der positive Effekt von Belohnungen auf die Gedächtnisleis-

1. Einleitung

tung scheint hier ein funktionell-anatomisches Korrelat zu haben.

2. Zielstellung

Die Auswirkungen eines fortgesetzten Heroinabusus auf die Expression von Metallothionein, speziell der Isoformen I und II, im menschlichen Hippocampus ist bisher nicht systematisch untersucht worden. Ziel der Arbeit ist zu untersuchen, inwieweit der im Tierexperiment nachweisbare Anstieg der Metallothioneinexpression im Hippocampus nach chronischer Opiatexposition beim Menschen, speziell bei Heroinabhängigen, nachvollziehbar ist.

Ausgehend von der Annahme, dass eine ausreichende Ähnlichkeit zwischen Tiermodell und tatsächlichem Heroinabusus besteht, erwarten wir ausgehend von der existierenden Literatur eine Gliose der Hippocampusregion mit vermehrter Expression von Metallothionein I/II in den Gliazellen und einen fakultativen neuronalen Zelluntergang. Neben dem besseren Verständnis der Pathophysiologie der Substanzabhängigkeit ist der Einsatz der Methode als diagnostisches Werkzeug zum Nachweis oder zur Untermauerung des Verdachts auf einen Opiatabusus vorstellbar.

3. Untersuchungsgut und Methodik

3.1. Untersuchungsgut

Sowohl die Probanden- als auch die Kontrollgruppe rekrutieren sich aus Verstorbenen, die auf staatsanwaltliche Anordnung im Institut für Rechtsmedizin der Universität Leipzig einer gerichtlichen Sektion unterzogen wurden. Ein entsprechendes positives Gutachten der Ethikkommission an der medizinischen Fakultät der Universität Leipzig liegt vor (Nummer 100-2005). Wie bereits erwähnt erfolgt standardmäßig die Entnahme und Asservierung von definierten Gewebeproben einschließlich der Hippocampusregion. Diese wurden formalinfixiert und paraffin eingebettet und stehen zur späteren Aufarbeitung nach der initialen histopathologischen Untersuchung zur Verfügung. Die Kriterien für die Aufnahme in eine der Gruppen wurden anhand der vorliegenden Sektionsgutachten überprüft. Diese enthalten Angaben zur Vorgeschichte und Auffindesituation, Sektionsbefunden, histologischen Befunden und toxikologischen Untersuchungsergebnissen. Die toxikologischen Untersuchungen wurden von der Abteilung für Toxikologie des Instituts für Rechtsmedizin im Rahmen der Routine durchgeführt [35].

3.1.1. Probanden

Einschlusskriterium für die Probandengruppe war eine im Sektionsgutachten festgestellte todesursächliche Heroinintoxikation. Von ursprünglich 21 konsekutiven Probanden aus den Jahren 2000 bis 2005 konnten 4 aufgrund fehlenden Materials oder fortgeschrittener Autolyse der Gewebeproben nicht einbezogen werden. Von den 17 verbleibenden Probanden enthielt die vorliegende Probe in allen Fällen Anteile des Gyrus dentatus, in 2 Fällen war die Region CA1 und in 3 Fällen die Region CA3 nicht enthalten. Folglich wurden 17 Datensätze für den Gyrus den-

3. Untersuchungsgut und Methodik

tatus, 15 Datensätze für CA1 und 14 Datensätze für CA3 erhoben.

Anhand der Zusammenschau der Sektionsbefunde, histopathologischer Untersuchungsergebnisse und der toxikologischen Befunde wurde in 16 Fällen von zwei Gutachtern übereinstimmend unter Ausschluss einer konkurrierenden Todesursache eine letale Heroinintoxikation als Todesursache ermittelt. Für Proband 13 (Todesursache im Sektionsgutachten Hirnödem durch Hypoxie, siehe Tabelle) legten die toxikologischen Analysen von Hirn und Leber, die polizeilichen Akten und einschlägige Vorstrafen einen fortgesetzten Heroinabusus nahe. Die Diagnose des heroinassoziierten Todes ohne Festlegung eines cut-off-Wertes ist bei fehlender konkurrierender Todesursache ein etabliertes Procedere [19]. Dieses Vorgehen liegt in den bereits erwähnten Schwierigkeiten beim Nachweis von Opiatintoxikationen in der serologischen Untersuchung begründet [16]. Die definitive Probandengruppe setzte sich aus 17 Individuen zusammen, von denen 9 männlichen und 8 weiblichen Geschlechts waren. Das Lebensalter betrug zwischen 17 und 36 Jahren, im arithmetischen Mittel $23,6 \pm 4,6$ Jahre, der Median lag bei 23 Jahren. Die Liegezeit post mortem betrug zwischen 1 und 10 Tagen, im arithmetischen Mittel $3,4 \pm 2,2$ Tage, im Median 3,5 Tage. In den durchgeführten toxikologischen Gutachten wurden Serumkonzentrationen zwischen 17,0 und 1630,0 ng/ml für Morphin und zwischen 0,0 und 304,0 ng/ml für Codein ermittelt. Das arithmetische Mittel der Morphinkonzentration lag bei $539 \pm 517,5$ ng/ml mit einem Median von 441 ng/ml. Die Codeinkonzentration betrug gemittelt $72,1 \pm 80,3$ ng/ml, der Median lag bei 39 ng/ml. Eine ausführliche Aufstellung der Merkmale aller Probanden zeigt nachstehende Tabelle.

3. Untersuchungsgut und Methodik

Tabelle 3.1.: Merkmale der Probandengruppe

Proband Nr.	Todes- ursache	Alter	Geschlecht	Liegezeit in Tagen	Morphin- konzent- ration im Se- rum (ng/ml)	Codein- konzent- ration im Se- rum (ng/ml)
1	Intox	29	m	2	783,0	98,8
2	Intox	20	w	2	17,0	0,0
3	Intox	20	m	10	601,0	102,0
4	Intox	19	w	1	333,0	37,8
5	Intox	29	m	4	119,0	11,2
6	Intox	36	m	2	441,0	54,0
7	Intox	17	m	4	142,0	23,0
8	Intox	26	w	1	25,1	3,0
9	Intox	20	w	4	1630,0	304,0
10	Intox	23	m	3	1096,0	109,0
11	Intox	26	m	4	1330,0	162,0
12	Intox	21	w	3	874,0	108,0
13	Hypox	24	m	4	58,0	13,0
14	Intox	24	w	4	1086,0	39,0
15	Intox	21	w	2	579,0	150,0
16	Intox	22	m	1	22,5	11,3
17	Intox	25	w	6	27,2	0,0

Todesursachen: Intox = Heroin- oder Mischintoxikation, Hypox = Hypoxie mit Hirnödemen (siehe Erläuterungen auf Seite 13)

3.1.2. Kontrollgruppe

Der Kontrollgruppe wurden Individuen mit fehlendem Nachweis von Morphin und anderen häufig missbräuchlich angewendeten Substanzen im toxikologischen Gutachten zugeordnet. Hauptsächlich handelte es sich um Opfer von Verkehrsunfällen mit resultierendem Polytrauma. In den Fällen, in denen bekannt war, dass die Betroffenen ein Schädel-Hirn-Trauma erlitten hatten, erfolgte der Einschluss nur bei Überlebenszeiten von maximal 6 Stunden um einen traumatisch bedingten Anstieg der Metallothioneinexpression auszuschließen. Dieser beginnt 3 bis 6 Stunden nach Einwirkung einer geeigneten Noxe mit einem Anstieg der mRNA-Spiegel für Metallothionein, der Anstieg der Metallothioneinkonzentration tritt typischerweise nach 12 Stunden ein [11]. Schließlich sollte auch eine Alteration der Metallothioneinexpression durch ärztlich applizierte Medikamente, in erster Linie Opiate, ausgeschlossen werden. Hier wurde analog eine maximale Überlebenszeit von 6 Stunden toleriert.

Analog zur Probandengruppe mussten von zunächst 21 konsekutiven Patienten 2 aufgrund fehlender oder unbrauchbarer Gewebeproben ausgeschlossen werden. Der definitiven Kontrollgruppe gehörten insgesamt 19 Individuen an, 12 männlichen und 7 weiblichen Geschlechts. Das Lebensalter lag zwischen 17 und 36 Jahren mit $22,4 \pm 4,7$ Jahren im Mittel und einem Median von 20 Jahren. Die Leichenliegezeit variierte von 1 bis 4 Tagen. Bei einer Person konnte die Liegezeit nicht aus den Akten ermittelt werden. Da keine fortgeschrittene Fäulnis festgestellt wurde, kann von einer Liegezeit im Rahmen der bei den übrigen Probanden und Kontrollpersonen ermittelten Zeiten ausgegangen werden. Im Mittel betrug die Liegezeit $2,2 \pm 0,9$ Tage, im Median 2 Tage. Die genannten Liegezeiten sind nicht immer direkt mit denen der Probandengruppe vergleichbar, da nach Ableben der Kontrollpersonen eine gekühlte Lagerung erfolgte, während die Probanden bis zum Auffinden durch Dritte bei Raumtemperatur beziehungsweise Außentemperatur (mit entsprechenden jahreszeitlichen Schwankungen) lagerten. Dementsprechend ist bei den Kontrollpersonen generell von einem geringeren Verwesungsgrad auszugehen. Die einzelnen Kontrollpersonen sind in folgender Tabelle ausführlich charakterisiert.

3. Untersuchungsgut und Methodik

Tabelle 3.2.: Merkmale der Kontrollgruppe

Kontroll- person Nr.	Todes- ursache	Alter	Geschlecht	Liegezeit in Tagen	Morphin- konzent- ration im Se- rum (ng/ml)	Codein- konzent- ration im Se- rum (ng/ml)
1	HS/PT	23	m	3	0,0	0,0
2	HS/PT	20	w	2	0,0	0,0
3	SHT	19	m	2	0,0	0,0
4	SHT	20	m	2	0,0	0,0
5	HS/PT	19	w	2	0,0	0,0
6	Dekap	29	m	2	0,0	0,0
7	HS/PT	22	w	4	0,0	0,0
8	HS/PT	36	m	2	0,0	0,0
9	HS/PT	17	m	2	0,0	0,0
10	HS/PT	26	m	4	0,0	0,0
11	HS/PT	20	m	1	0,0	0,0
12	HS/PT	23	m	2	0,0	0,0
13	HS/PT	26	m	2	0,0	0,0
14	HS/PT	19	m	1	0,0	0,0
15	SHT	18	w	2	0,0	0,0
16	HS/PT	20	w	1	0,0	0,0
17	HS/PT	19	m	4	0,0	0,0
18	HS/PT	26	w	2	0,0	0,0
19	HS/PT	24	w	nicht be- kannt	0,0	0,0

Todesursachen: HS/PT = hämorrhagischer Schock / Polytrauma, SHT =
Schädel-Hirn-Trauma mit perakutem zentralem Regulationsversagen, Dekap =
Dekapitation

3.2. Gewebeaufbereitung

Während der Sektion wurden, nach Abpräparation des Circulus willisi und Entfernung von Medulla oblongata, Diencephalon und Cerebellum, koronare Serienschnitte des Telencephalon angefertigt. Hierin wurde die Hippocampusformation aufgesucht, unter Vermeidung von unnötigen Manipulationen entnommen und für mindestens 24 Stunden in gepufferter Formalinlösung (4 %) fixiert.

Anschliessend wurden die Gewebeproben in Paraffin eingebettet. Hiervon wurden nun 5 μm dicke Schnitte in koronarer Schnittführung mit Hilfe eines Mikrotoms (Leica, Wetzlar, Deutschland) angefertigt und in ein auf 37°C temperiertes Wasserbad verbracht. Diese wurden auf mit einer permanenten positiven Oberflächenladung versehene Objektträger (SuperFrost[®] Plus, Menzel-Gläser, Braunschweig, Deutschland) aufgezogen.

Hierauf wurden die Präparate mittels Warmluft auf 56°C erwärmt, in Xylol entparaffiniert und in einer absteigenden Alkoholreihe rehydriert.

Um ein Austrocknen vor der Weiterbehandlung zu vermeiden, wurden die Präparate mit phosphatgepufferter Salzlösung (PBS, Phosphate buffered saline PBS, pH 7,4, DakoCytomation, Hamburg, Deutschland) bedeckt.

Trotz aller Sorgfalt wurden einige Proben im Rahmen der Entnahme mechanisch beschädigt. Somit standen nicht mehr alle Regionen des Hippocampus zur Untersuchung zur Verfügung. Für die betroffenen Regionen CA1 und CA3 weichen daher die Zahlen der begutachteten Präparate von den Zahlen der zur Probanden- respektive Kontrollgruppe zugeordneten Individuen ab. Konkret ergab sich für CA1 ein Verhältnis von 15 Probanden zu 17 Kontrollpersonen sowie 14 Probanden zu 14 Kontrollpersonen in CA3.

3.3. Immunhistochemie

Zur Detektion der vermuteten Änderung der Expression von Metallothionein I und II in den untersuchten Hippocampi nutzten wir ein immunhistochemisches Verfahren. Die Vorteile dieser Detektionsmethode liegen, auch mit Blick auf eine mögliche spätere Anwendung in der täglichen Routine, in der leichten Erlernbarkeit, guten Reproduzierbarkeit und dem moderaten finanziellen und apparativen

Aufwand. Nachteilig sind hingegen der hohe zeitliche Aufwand aufgrund der langen Inkubationszeit des Primärantikörpers. Weiterhin sind allenfalls qualitative oder semiquantitative Informationen zu erheben, eine echte quantitative Analyse wie beispielsweise bei Blottingverfahren ist nicht möglich.

3.3.1. Allgemeine Prinzipien der Immunhistochemie

Die verschiedenen heute gebräuchlichen immunhistochemischen Nachweismethoden beruhen auf dem selben Grundprinzip. Sie unterscheiden sich im wesentlichen durch die Verwendung unterschiedlicher Detektionssysteme. Nach der Aufbereitung der zu untersuchenden Gewebe und einer gegebenenfalls notwendigen Antigenmaskierung wird eine Primärantikörperlösung appliziert. Diese Lösung kann entweder einen monoklonalen, gegen ein einziges Epitop gerichteten Antikörper enthalten, welcher von einem einzigen B-Zellklon stammt, oder es handelt sich um einen polyklonalen Antikörper, der nach Antigenapplikation und natürlicher Immunreaktion aus dem Serum von Labortieren gewonnen wurde.

Nachfolgend unterscheidet sich die Verfahrensweise in Abhängigkeit von der Detektionsmethode. Die älteste und einfachste Methode ist die direkte Detektion, bei der der Primärantikörper mit einem Enzym gekoppelt ist, welches ein aufgetragenes Substrat unter Bildung eines farbigen Präzipitats umsetzt. Es ist einleuchtend, dass diese Vorgehensweise das Vorhandensein größerer Antigenmengen voraussetzt, um die aufgrund spezifischer Antikörperbindung entstandenen Farbniederschläge von einer unspezifischen Hintergrundfärbung unterscheiden zu können.

Um einen Verstärkungseffekt und damit eine einfachere Differenzierung zwischen spezifischer und unspezifischer Färbung zu erzielen, wurden indirekte Nachweismethoden entwickelt. Hier kommen Sekundär- und, je nach gewünschter Verstärkung, Tertiärantikörper zum Einsatz, die gegen den Primär- bzw. Sekundärantikörper gerichtet und an das substratumsetzende Enzym gekoppelt sind. Der Verstärkungseffekt beruht auf der Bindung mehrerer Sekundär- bzw. Tertiärantikörper an jeweils einen Primär- bzw. Sekundärantikörper.

Eine weitere und heute sehr verbreitete Variante (Labeled Avidin-Biotin oder LAB Methode) beruht auf der hohen Affinität von Avidin bzw. Streptavidin zu Biotin. Der eingesetzte Sekundärantikörper ist mit Biotin konjugiert, an welches ein hinzugefügter und enzymmarkierter Avidin- oder Streptavidinkomplex bindet und letztlich den Substratumsatz katalysiert [36].

3.3.2. Verwendete Antikörper-Detektionssystemkombination

Der verwendete Primärantikörper ist ein von Mäusen stammender monoklonaler Immunglobulin G₁ (IgG₁) Antikörper, der gegen von Pferden stammendes Metallothionein I und II gerichtet ist [37] und neben anderen Spezies Kreuzreaktivität mit menschlichem Metallothionein I und II aufweist [38]. Bezugsquelle für den Antikörper ist die Firma DakoCytomation[®] (Hamburg, Deutschland), welche ihn als Dako-MT E9 anbietet. Der monoklonale Antikörper ist gegen die 5 bis 7 N-terminalen Aminosäuren der B-Domäne der Metallothioneinisoformen I und II gerichtet [39].

IgG₁ ist eine von vier bekannten Subklassen des monomeren Immunglobulin G, welches aus je zwei schweren und zwei leichten Ketten besteht und somit zwei Antigenbindungsstellen besitzt [40].

Zur Detektion wurde ein ebenfalls von DakoCytomation[®] (Hamburg, Deutschland) bereitgestelltes Reagenzienpaket verwendet, welches als LSAB + System-HRP erhältlich ist. Es enthält folgende gebrauchsfertigen Komponenten sind in der Reihenfolge der Anwendung: eine gebrauchsfertige 3 prozentige Wasserstoffperoxidlösung (Dako Peroxidase-Blocking-Agent) zur Suppression der endogenen Peroxidaseaktivität. Das zweite Reagenz ist ein Gemisch aus von Ziegen stammenden Sekundärantikörpern, diese sind gegen von Mäusen, Kaninchen und Ziegen stammendes Immunglobulin G gerichtet. Die Sekundärantikörper sind mit Biotin konjugiert (Dako Biotinylated Link). Das System wird durch Meerrettichperoxidase, welche mit Streptavidin konjugiert ist (Streptavidin-HRP), komplettiert. Zur Visualisierung enthält das Set eine 3,3'-Diaminobenzidin-Lösung (DAB+ Chromogen). Das enthaltene sehr gut wasserlösliche DAB wird durch die Meerrettichperoxidase zu einem wasserunlöslichen braunen Präzipitat oxidiert [41].

3.3.3. Durchführung der Immunhistochemischen Färbung

Die nach dem Entparaffinieren in PBS gelagerten Objektträger mit den Hippocampusschnitten wurden zunächst für 15 Minuten mit der 3 prozentigen Wasserstoffperoxidlösung (Dako Peroxidase-Blocking-Agent) inkubiert, um die endogene Peroxidaseaktivität zu supprimieren. Nach 20 minütigem Spülen in PBS wurde 10 prozentiges Ziegenserum (Normal Goat Serum, DakoCytomation[®], Hamburg, Deutschland) appliziert und für 30 Minuten belassen. Das heterogene Proteingemisch soll Bindungen mit in der Gewebeprobe vorhandenen Immunglobulinen

3. Untersuchungsgut und Methodik

eingehen und diese für den Sekundärantikörper blockieren. Sowohl die Anwendung von Wasserstoffperoxid, als auch die des Ziegenserums, dienen der Reduktion der unspezifischen Hintergrundfärbung [40]. Nach zweimaligem kurzen Tauchen der Objektträger in PBS wurde der Primärantikörper aufgebracht. In mit Verdünnungen von 1:50 bis 1:1600 durchgeführten Versuchsreihen hatte sich eine Verdünnung von 1:1200 als optimal im Sinne eines günstigen Verhältnisses von spezifischer zellgebundener Farbreaktion zu unspezifischer Hintergrundfärbung erwiesen. Die Gewebeproben wurden bei 4°C für 20 Stunden mit der Primärantikörperlösung inkubiert. Nachfolgend wurden die Präparate dreimal für 5 Minuten in PBS gespült. Der nun aufgetragene Sekundärantikörper wurde nach 30 minütiger Inkubation durch dreimalige Spülung in PBS für je 5 Minuten entfernt. Im Anschluss wurde für 30 Minuten die Streptavidin-konjugierte Meerrettichperoxidase aufgetragen. Nach nochmaligem 20 minütigem Spülen in PBS wurde schließlich die DAB-Lösung aufgetragen und nach 5 Minuten durch Tauchen in destilliertes Wasser die Farbreaktion gestoppt [42]. Abschließend wurde eine Kerngegenfärbung mit Hämalaun nach Mayer [40] durchgeführt und die Präparate mit wässrigem Eindeckmittel (Aquatex[®], Merck, Darmstadt, Deutschland) eingedeckt. Das folgende Diagramm zeigt eine Übersicht der Einzelschritte.

3. Untersuchungsgut und Methodik

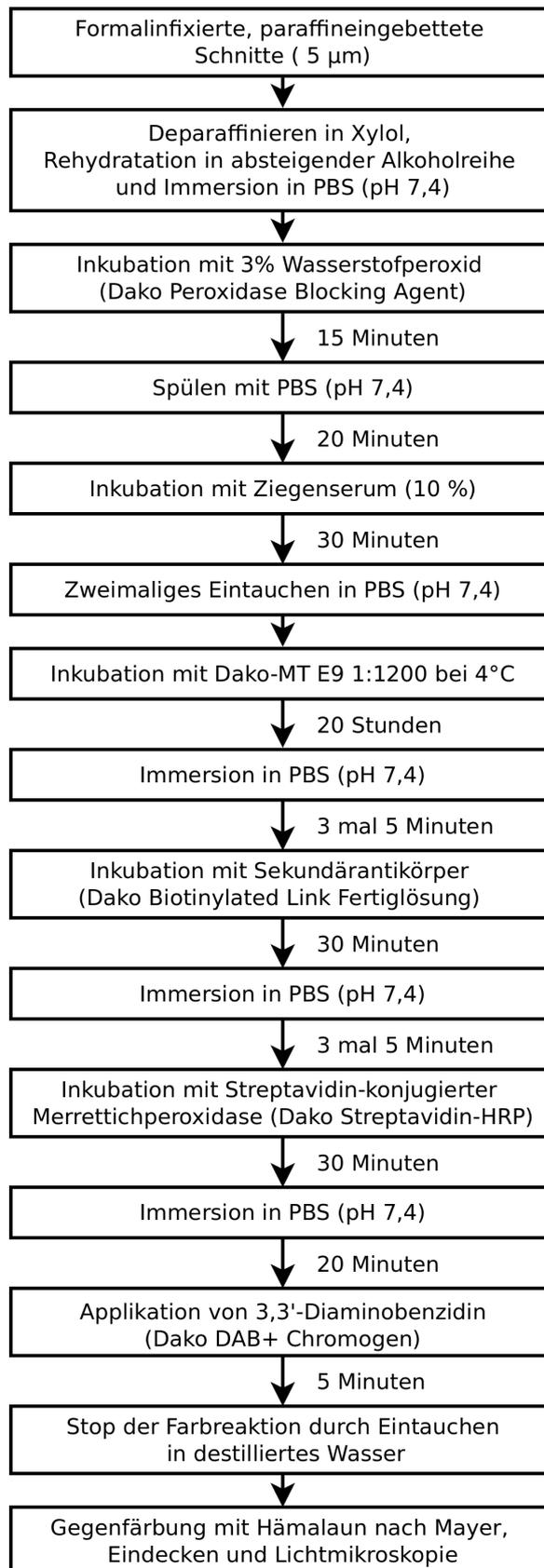


Abbildung 3.1.: Ablauf der immunhistochemischen Färbung

3. Untersuchungsgut und Methodik

Das Resultat dieser Färbeprozedur war eine zytoplasmatisch lokalisierte Braunfärbung wie in Abbildung 3.2 demonstriert. Das gesamte Soma der astrozytär imponierenden Zellen demonstriert eine feingranuläre Braunfärbung. Diese entspricht den DAB-Präzipitaten. Wie an den Astrozyten in Abbildung 3.3 gut zu erkennen ist, ist der Zellkern von der Reaktion ausgespart. Die zytoplasmatischen Fortsätze der Astrozyten weisen ebenfalls eine Farbreaktion auf und verursachen zumindest einen Teil der Hintergrundfärbung. Der Kontrast zwischen zytoplasmatisch gebundener Farbreaktion und unspezifischer Hintergrundfärbung ist ausreichend hoch, um beide sicher zu differenzieren.



Abbildung 3.2.: Typisches immunhistochemisches Färbeverhalten (Übersicht)

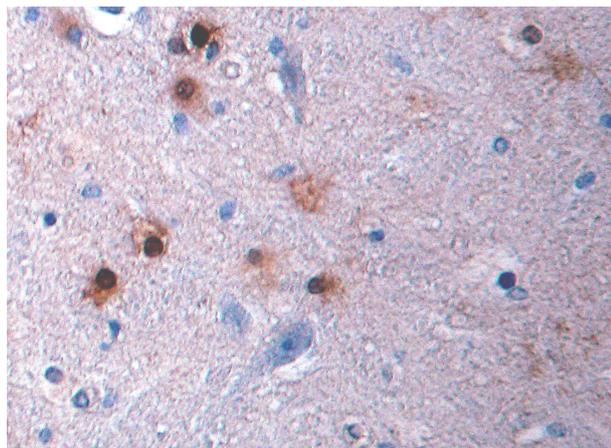


Abbildung 3.3.: Zytoplasmatisch lokalisierte Farbreaktion der Astrozyten unter Aussparung des Zellkerns

3.3.4. Spezifitätsnachweis und Positivkontrolle

Um den Nachweis zu erbringen, dass es sich bei der resultierenden Färbung um eine spezifische, gegen zytoplasmatisches Metallothionein I und II gerichtete Reaktion des Antikörpers handelt, wurde ein Metallothionein I/II -Gemisch (Sigma-Aldrich, München, Deutschland) verwendet. Vor der Abarbeitung des eigentlichen Färbeprotokolls wurde die Primärantikörperlösung bei 4°C für 20 Stunden mit Metallothionein I/II (Sigma-Aldrich, München, Deutschland) in einer Konzentration von 1mg/ml präinkubiert. Simultan wurde Antikörperlösung einer Pseudopräinkubation mit PBS unterzogen. Nachfolgend wurden je 2 vom selben Individuum stammende Präparate jeweils mit präinkubierter und pseudopräinkubierter Antikörperlösung dem Standardimmunhistochemieprotokoll unterzogen. Die Versuche zeigten reproduzierbar die nahezu vollständige Suppression der immunhistochemischen Reaktion in den mit präinkubierter Antikörperlösung angefertigten Präparaten bei unverändert positivem Nachweis von Metallothionein in den mitgeführten mit pseudopräinkubiertem Primärantikörper behandelten Referenzpräparaten. Typische Resultate werden in folgender Abbildung dargestellt. Links die mitgeführte Kontrolle, rechts das Ergebnis der Präinkubation mit praktisch vollständigem Fehlen einer Farbreaktion.

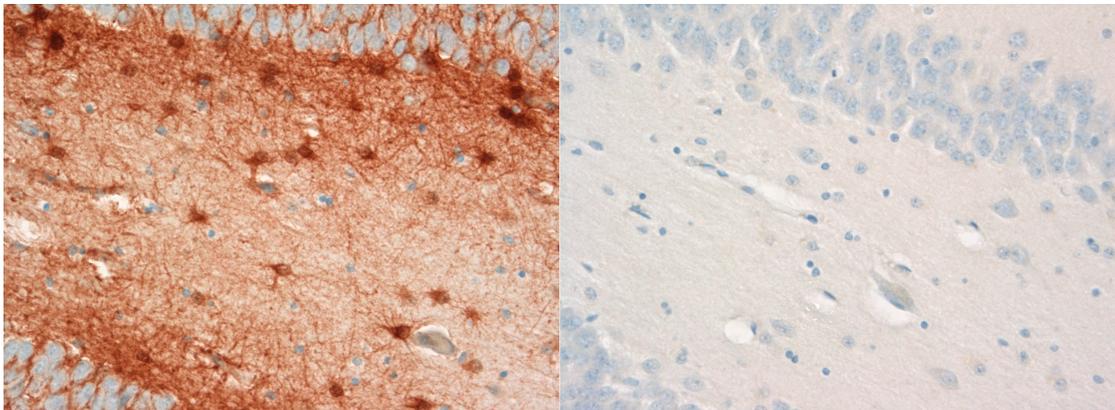


Abbildung 3.4.: Unterdrückte immunhistochemische Färbung (rechts) nach Präinkubation mit Metallothionein I/II

Um eine unspezifische Bindung des Sekundärantikörpers auszuschließen, wurde ein Teil der Präparate unter Mitführung einer Positivkontrolle mit PBS anstelle des Primärantikörpers pseudoinkubiert. Die weitere Färbeprozedur folgte dem

Standardprotokoll. Erwartungsgemäß führte diese Vorgehensweise zu vollständig aufgehobener Immunreaktivität bei den pseudoinkubierten Präparaten.

Als Positivkontrolle für die Bindungsfähigkeit des Antikörpers wurde Nierengewebe von Hunden zusammen mit dem untersuchten Gewebe dem immunhistochemischen Standardprotokoll unterzogen [43] mit reproduzierbarer zytoplasmatischer Braunfärbung.

3.4. Immunfluoreszenz und konfokale Lasermikroskopie

Wie bereits ausgeführt, wurde Metallothionein I/II ausschließlich im Zytoplasma von Astrozyten nachgewiesen [44]. Um zu verifizieren, dass es sich bei den angefärbten Zellen in unseren Proben um Astrozyten handelt, wurde die Verteilung des Metallothionein I/II mit der des sauren Gliafaserproteins (Glial fibrillary acidic protein, GFAP) als Markerprotein für Astrozyten [45] verglichen. Zunächst wurden die Präparate entparaffiniert und in einer absteigenden Alkoholreihe hydriert. Im Anschluss wurden die entparaffinierten und hydrierten Präparate zunächst mit Tris-Puffer (Tris-hydroxymethyl-aminomethan, pH 7,6) gespült und mit 5 prozentigem fetalem Kälberserum (FCS) in Tris-Puffer unter Zusatz von 0,3 % Triton X-100 für 30 Minuten präinkubiert. Zum Nachweis von Metallothionein I/II erfolgte die Inkubation mit Maus-anti-MT I/II (Dako anti-MT E9, 1:1200) als Primärantikörper [43]. Zur Detektion von GFAP wurde ein von Kaninchen stammendes anti-GFAP-Immunglobulin (rabbit anti-cow GFAP, DakoCytomation[®], Hamburg, Deutschland, 1:500) eingesetzt.

Unter Zugabe von 0.1 % Triton X-100 und 5 % FCS in Tris-Puffer wurde das Antikörpergemisch bei 4°C für 24 Stunden zur Inkubation belassen. Die Detektion erfolgte mit fluoreszenzfarbstoffmarkierten Sekundärantikörpern, namentlich Cy2 (Cyanin)-konjugiertem anti-Maus-IgG (Cy2-conjugated goat anti-mouse IgG, 1:400) und Cy5 (Indodicarbocyanin)-konjugiertem anti-Kaninchen-IgG (Cy5-conjugated goat anti-rabbit, 1:200), beide wurden von Jackson Immuno Research, Baltimore, PE, USA bezogen. Kontrollpräparate ohne Inkubation mit Primärantikörperlösung wurden mitgeführt, es erfolgte eine Pseudoinkubation mit Tris-Puffer. Nach einer abschließenden Spülung und Dehydrierung wurden die Präparate mit Entellan (Merck, Darmstadt, Deutschland) eingedeckt. Folgende Abbildung illustriert den Ablauf.

3. Untersuchungsgut und Methodik

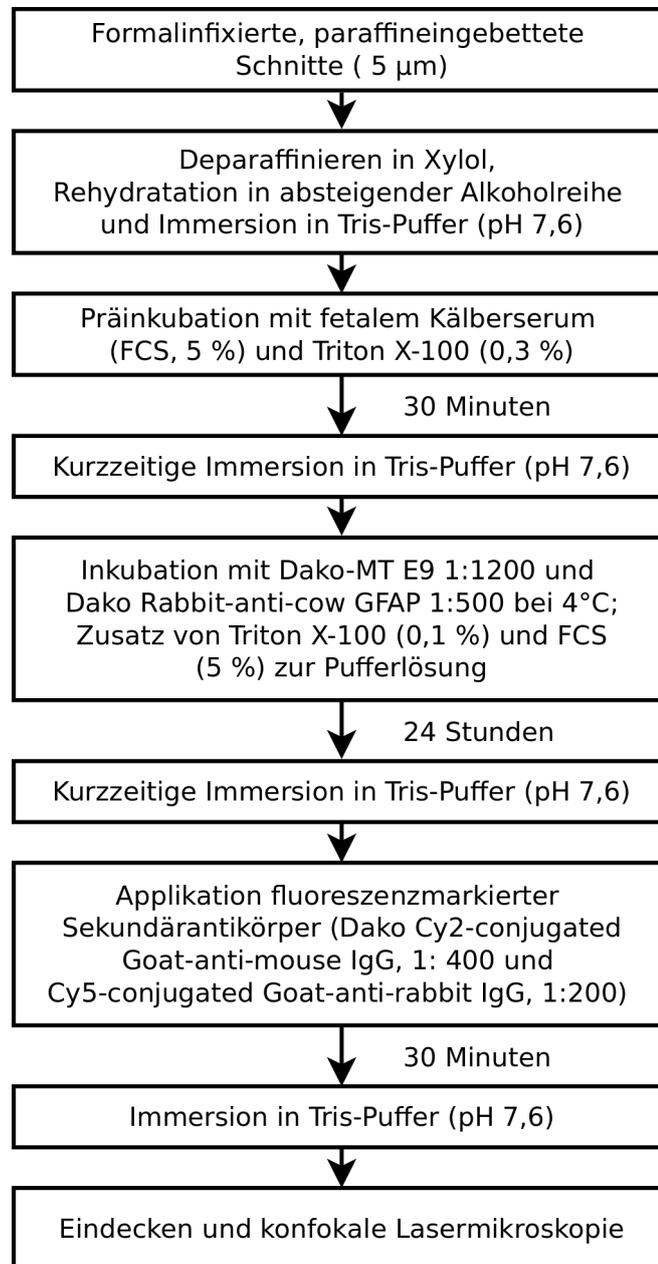


Abbildung 3.5.: Ablauf der Immunfluoreszenzfärbung

3. Untersuchungsgut und Methodik

Die Immunfluoreszenz wurde mit konfokaler Lasermikroskopie (LSM 510 Meta, Zeiss, Oberkochen, Deutschland) evaluiert. Die verwendeten Anregungswellenlängen betragen 633nm (Helium/Neon2) für den Cy5-Fluoreszenzfarbstoff (rote Farbe) bzw. 488 nm (Argon) für den Cy2-Fluoreszenzfarbstoff (grüne Farbe). Ein repräsentatives Färbeergebnis illustriert nachfolgende Abbildung. Im linken Bild, im unteren rechten Quadranten eine GFAP-positive Zelle, morphologisch ein Astrozyt. Dieselbe Zelle zeigt eine deutliche Reaktivität für Metallothionein (mittleres Bild). Im rechten Bild wird die Kolokalisation von GFAP und MT I/II demonstriert. Mein Dank gilt Frau PD Dr. Heike Franke, Rudolf-Boehm-Institut für Pharmakologie Leipzig für die freundliche Überlassung der Aufnahmen.

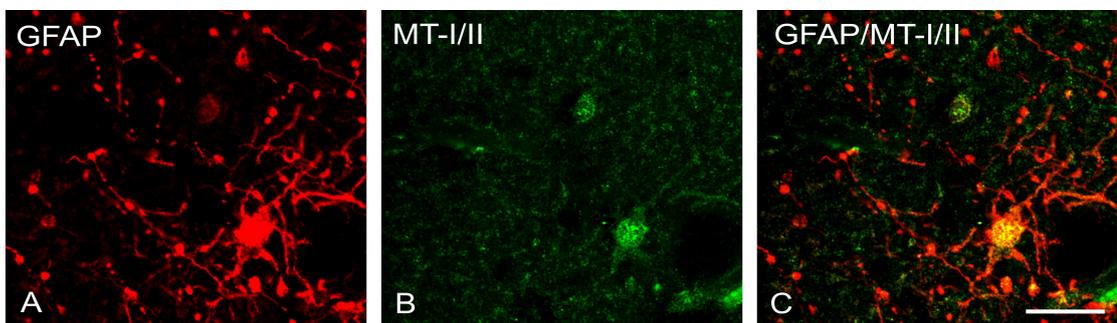


Abbildung 3.6.: Kolokalisation von MT I/II und GFAP, konfokale Lasermikroskopie, Aufnahmen freundlich überlassen von Frau PD Dr. H.Franke, Leipzig

3.5. Auswertung

3.5.1. Mikroskopie und Digitale Fotografie

Alle Präparate der Probanden- und Kontrollgruppe wurden lichtmikroskopisch untersucht und, so vorhanden, die Regionen CA1 und CA3 sowie der Hilus gyri dentati identifiziert. Hauptkriterien waren die Lokalisation in Relation zur gesamten Hippocampusformation und die Morphologie der ortsständigen Neurone. Eine schematische Darstellung der Hippocampusformation mit hervorgehobenen Charakteristika der neuronalen Somata in den einzelnen Regionen zeigt Abbildung 3.7. Die großen rund-ovalen Somata der Neurone im Hilus gyri dentati werden von den dicht gepackten runden, kleinen Neuronen des Gyrus dentatus umschlossen.

3. Untersuchungsgut und Methodik

Die Somata der Region CA3 sind deutlich kleiner und liegen dichter nebeneinander. Getrennt durch die Übergangsregion CA2 sind diese wiederum gut von den eher dreieckigen neuronalen Somata in CA1 zu differenzieren.

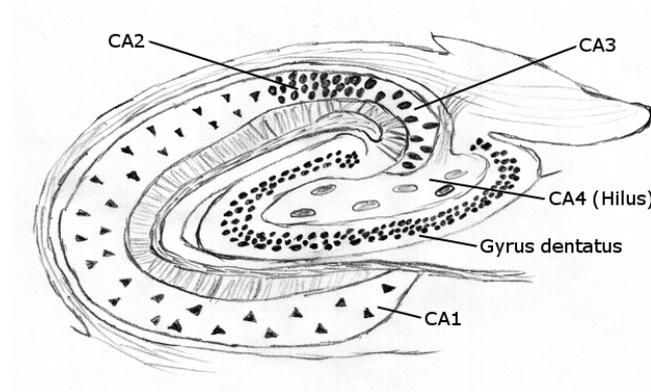


Abbildung 3.7.: Hippocampus, schematischer Querschnitt (modifiziert nach Duvernoy [31])

Die entsprechenden Bildausschnitte, drei in jeder Region, wurden bei einer Vergrößerung von 1:200 mit einer am Mikroskop angebrachten Digitalkamera (Olympus Corporation, Tokyo, Japan) fotografiert. In jeder Region wurden zufällig je drei Areale, je eines pro Bildausschnitt, von $200\ \mu\text{m} \times 200\ \mu\text{m}$ gewählt, in denen die Auszählung erfolgte.

3.5.2. Rechnergestützte Datenerhebung

Die Aufnahmen wurden mit Hilfe einer eigens von uns entwickelten und programmierten Software untersucht und ausgewertet. Im wesentlichen wurden verschiedene Kategorien von Zellen gebildet, standardisierte relevante Bildbereiche (Regions of interest) festgelegt und die enthaltenen Zellen morphologisch den verschiedenen Zellkategorien zugeordnet sowie in den Regions of interest ausgezählt.

Die Entscheidung ein eigenes Programm zu entwickeln fiel aus folgenden Gründen: Aufgrund der relativ großen Datenmenge und im Interesse der Reproduzierbarkeit kam ein Zählen "von Hand" nicht in Frage.

Aus finanziellen Gründen und aufgrund der meist bestehenden Bindung an ein gegebenes Mikroskop-Kamera-System kam der Erwerb einer kommerziellen Lösung nicht in Frage.

3. Untersuchungsgut und Methodik

Die meisten verfügbaren Programmpakete, neben einigen kommerziellen Produkten zum Beispiel auch das an den National Institutes of Health der Vereinigten Staaten von Amerika entwickelte gemeinfreie ImageJ (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>), bieten eine hohe Flexibilität im Einsatz. Diese wird jedoch damit erkauft, dass der Aufruf einer bestimmten Funktion langwieriges Navigieren durch verschachtelte Menüs erfordert. Ein dediziertes Programm trägt also zur Erhöhung der Arbeitsgeschwindigkeit bei.

Leistungsmerkmale des Programms

Die heute vorliegende Lösung ermöglicht das Öffnen von Bilddateien aller gängigen Formate. Liegen diese in einem gemeinsamen Verzeichnis vor, kann eine beliebige Anzahl Bilder stapelweise verarbeitet werden.

Die Möglichkeit zur Festlegung beliebig vieler rechteckiger Regions of interest mit frei wählbaren Kantenlängen innerhalb der geöffneten Bilder ist gegeben. Die Software unterstützt frei wählbare Bildschirmmaßeinheiten, um die Größe der Regions of interest in sinnvollen Einheiten (zum Beispiel μm) anzuzeigen.

Der entsprechende Umrechnungsfaktor, also wie vielen Maßeinheiten entspricht ein Bildpunkt (Pixel) im gegebenen Mikroskop-Kamera-System, kann den Herstellerangaben entnommen werden, wobei selbstverständlich das verwendete Objektiv berücksichtigt werden muss. Der entsprechende Umrechnungsfaktor muss für das gegebene System aus Mikroskop, Objektiv und Kamera einmal ermittelt und eingegeben werden. Zu beachten ist, dass sich der Faktor ebenfalls ändert, sollten die digitalen Fotografien skaliert, also in ihrer Auflösung angepasst werden, zum Beispiel zum Versand als elektronische Post. Liegen keine Angaben vor, kann der benötigte Umrechnungsfaktor mit Hilfe des Programms leicht bestimmt werden: Zunächst wird ein Eichkörper bekannter Größe (zum Beispiel Zählkammer) mit dem verwendeten Mikroskop-Kamera-System abfotografiert. Im Programm wird der Umrechnungsfaktor 1 gewählt, angezeigte Strecken haben somit die Einheit "Pixel". Anschließend wird Anzahl der Bildpunkte bestimmt, die das Objekt im Bild einnimmt, indem es mit einer Seitenlänge einer Region of interest zur Deckung gebracht wird. Die bekannte Länge des Objektes und die ermittelte Zahl an Bildpunkten können nun ins Verhältnis gesetzt werden:

$$\frac{L}{N} = \frac{f}{1}$$

3. Untersuchungsgut und Methodik

Wobei L die bekannte Objektlänge in der gewählten Maßeinheit (zum Beispiel $200\mu\text{m}$), N die Anzahl Bildpunkte (Pixel) ist, die das Objekt im Bild repräsentieren (zum Beispiel 920 Pixel), f der gesuchte Umrechnungsfaktor, der einem Bildpunkt (1 Pixel) entspricht. Somit errechnet sich der Umrechnungsfaktor zu:

$$f = \frac{L \times 1}{N}$$

Im gewählten Beispiel also:

$$f = \frac{200\mu\text{m} \times 1}{920} \approx 0,21739\mu\text{m}$$

Da der Bildpunkt dimensionslos ist, hat der Umrechnungsfaktor die Einheit der gewählten Maßeinheit, im Beispiel also μm .

Durch einfaches Markieren (“Anklicken”) können die im angezeigten Bild vorhandenen Elemente (zum Beispiel Zellen) bis zu sechs frei wählbaren Kategorien zugeordnet werden. In Echtzeit erfolgt die Auswertung, wie viele Elemente welcher Kategorie markiert wurden. Hierbei wird nach Regions of interest aufgeschlüsselt, sowie die Elementzahl im gesamten Bild angegeben.

Bei Abschluss der Studie wird das Ergebnis in einer eindeutig dem Bild zuordenbaren Textdatei abgelegt. Wahlweise kann zusätzlich ein Screenshot (Bildschirmfoto) mit den gesetzten Markierungen gespeichert werden. Wurden mehrere Bilder zur Bearbeitung ausgewählt, werden alle Felder zurückgesetzt und das nächste Bild zur Bearbeitung geladen.

Nur der Vollständigkeit halber soll erwähnt werden, dass das Programm ferner Möglichkeiten zur Messung der Farbwerte, sowie von Umfang und Fläche beliebiger polygonaler Bildareale bietet. Von diesen Möglichkeiten wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit jedoch noch kein Gebrauch gemacht. Die Funktionalität steht für spätere quantitative Analysen zur Verfügung. In Abbildung 3.8 ist ein Screenshot des Programms mit geöffneter Bilddatei, angewählter Region of interest (roter Rahmen) und bereits markierten metallothioneinpositiven Zellen (gelbe Quadrate) beispielhaft dargestellt.

Verfügbarkeit

Aufgrund der zahlreichen vorkonfektionierten Funktionen und der resultierenden Möglichkeit relativ komplexe Algorithmen in kurzer Zeit abzubilden, wurde als

3. Untersuchungsgut und Methodik

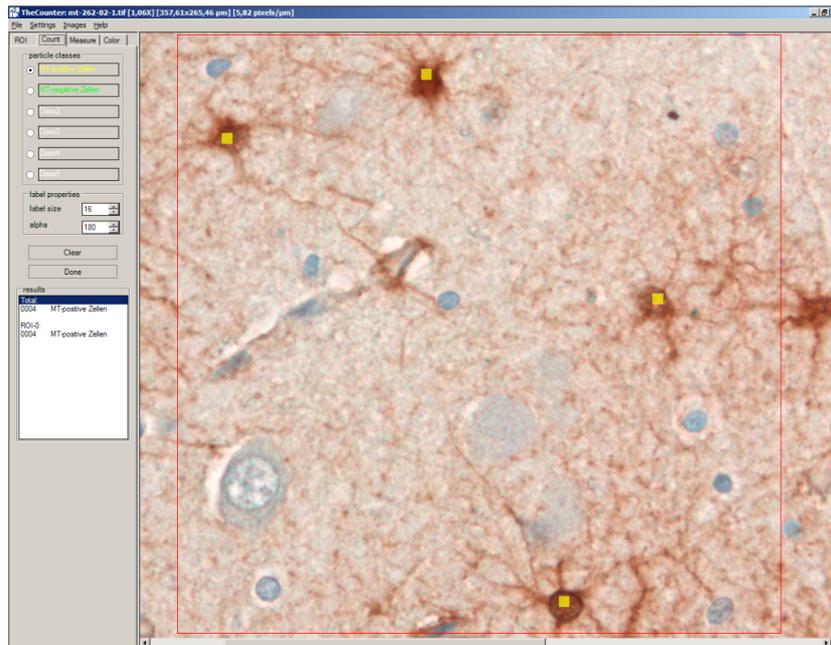


Abbildung 3.8.: Rechnergestützte Datenerhebung

Programmiersprache C# aus dem .NETTM Framework der Firma Microsoft[®], Redmond, USA gewählt. Somit ist das Programm grundsätzlich nur auf Betriebssystemen einsetzbar, für die eine kompatible Laufzeitumgebung existiert.

Microsoft[®] bietet diese nur für Windows[®] und BSD Betriebssysteme an. Eine Implementierung für andere Systeme, zum Beispiel Apple[®] OS XTM, Cupertino, USA oder Linux stellt das Mono Projekt (<http://www.mono-project.com>), Novell, Waltham, USA dar, welches gemeinfreie Software ist. Die Versionen ab 2.4 sind ausreichend kompatibel, um unter Linux den grundlegenden Funktionsumfang zu nutzen. Um das Programm einem möglichst breiten Nutzerkreis zugänglich zu machen, wurde es unter der GNU General Public License Version 2 (GPL 2) als gemeinfreie Software veröffentlicht. Jeder darf somit uneingeschränkt das Programm nutzen, den Quelltext studieren und nach Bedarf modifizieren. Die Internetpräsenz mit Bezugsmöglichkeit findet sich unter <http://www.thecounter.sf.net>.

Der genaue Wortlaut der GPL 2 findet sich unter <http://www.fsf.org/licenses/licenses/gpl.html>, sowie im herunterladbaren Programmpaket.

3.5.3. Kategorisierung und Statistische Analyse

In jeder der Regionen CA1, CA3 und Hilus gyri dentati wurden drei Regions of interest definiert und ausgewertet. In jedem der neun $200\ \mu\text{m} \times 200\ \mu\text{m}$ messenden Zählfelder (Regions of interest) pro Präparat wurden die sichtbaren Zellen aufgrund ihrer Morphologie bzw. ihres Färbeverhaltens den Kategorien Neuron, Glia sowie MT-I/II-positive Zelle zugeordnet.

Die Abgrenzung zwischen Glia und Neuronen erfolgte anhand des größeren Zellkerns der Neuronen und des größeren neuronalen Somas mit entsprechender Kern-Plasma-Relation. Ein weiteres Kriterium war der bei Neuronen deutlich erkennbare Axonhügel sowie die feingranuläre Nissl-Substanz. Die im Verhältnis deutlich kleineren Gliazellen wurden nochmals subkategorisiert. Hierbei wurden Zellen mit größerem Kern und größerem Zytoplasmasaum (oder Soma) sowie entsprechenden zytoplasmatischen Fortsätzen als Astrozyten identifiziert.

Schließlich erfolgte zunächst unabhängig von der Histomorphologie die Einteilung in immunoreaktive und nichtreaktive Zellen. Zellen wurden als MT-I/II-positiv (immunoreaktiv) eingestuft, wenn sie eine zytoplasmatische Braunfärbung aufwiesen wie in Abbildung 3.9 demonstriert, wobei das gesamte Soma in die Farb-reaktion einbezogen sein musste. Nicht zellgebundene Farbpräzipitate wurden ignoriert. Die immunoreaktiven Zellen wurden nochmals auf ihre Zugehörigkeit zu den Kategorien Neuron und Glia sowie den Subkategorien Astrozyt und andere Gliazelle untersucht. Die Mikroskopie und Auswertung erfolgte im Konsens durch den Autor der Arbeit und einen erfahrenen Rechtsmediziner. Zum Ausschluss einer Verfälschung der Ergebnisse durch eine neurodegenerative Erkrankung oder vorbestehende Gliose wurden die Präparate zusätzlich einem Neuropathologen zur Begutachtung vorgelegt. Keines der Präparate aus der Probanden- oder Kontrollgruppe musste aufgrund einer Vorschädigung ausgeschlossen werden.

Angefärbte Zellen, die durch mechanische Schädigung aus dem Präparat gelöst waren oder keinen Kern enthielten, wurden nicht berücksichtigt. Vernachlässigt wurden auch Zellen, die zu weniger als 50% innerhalb der Region of interest lagen.

Die aufgrund der Zellmorphologie aufgestellte Hypothese, dass es sich bei den immunopositiven Zellen um Astrozyten handele, wurde anhand des vorbeschriebenen Nachweises der Kolo-kalisation von MT I/II und GFAP im Zytoplasma der fraglichen Zellen bestätigt.

Die ermittelten Zellzahlen der einzelnen Regions of interest innerhalb einer der

3. Untersuchungsgut und Methodik

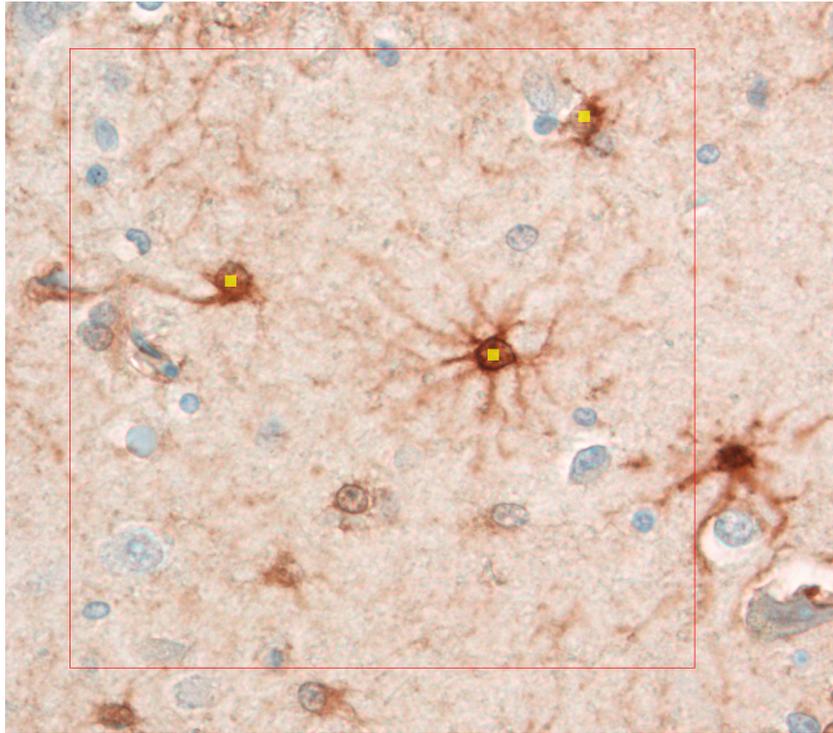


Abbildung 3.9.: Innerhalb der Region of interest (rot) sind drei typische metallothioneinpositive Zellen markiert (gelb). Die immunopositive Zelle am rechten Bildrand liegt zu weniger als 50% in der Region of interest und der Zellkern liegt nicht im Niveau des Schnittes, sie wird daher nicht gewertet.

Zielstrukturen CA1, CA3 und Hilus gyri dentati wurden addiert

Für die Statistische Analyse der Daten wurde das Programmpaket GNU R (<http://www.r-project.org/>) in der Version 2.12.1 und die grafische Oberfläche Rkward (<http://rkward.sourceforge.net/>) in der Version 0.5.4 verwendet. Beide Programme sind gemeinfreie Software und können über oben genannte Webseiten bezogen werden. Es wurden deskriptive und komparative statistische Analysen durchgeführt und als Grenze für statistische Signifikanz ein $p \leq 0,05$ akzeptiert. Für Details sei auf den Abschnitt Ergebnisse verwiesen.

4. Ergebnisse

4.1. Routinetauglichkeit der Metallothionein-I/II-Immunhistochemie

An den in der Untersuchung verwendeten formalinfixierten und in Paraffin eingebetteten Gewebeproben hat sich der immunhistochemische Nachweis von Metallothionein I/II als einfach durchführbare und zuverlässig reproduzierbare Methode erwiesen. Der apparative Aufwand ist minimal und die Grundausstattung eines histologischen Labors völlig ausreichend, um die Methode zu etablieren. Benötigt werden paraffineingebettete Gewebeproben, ein Mikrotom, eine Anlage zur Deparaffinierung und Rehydratation, histologische Färbeausstattung und ein Laborkühlschrank.

Eine aufwändige Antigendemaskierung ist nicht notwendig. Der verwendete Antikörper kann bei 4°C gelagert werden und zeigte im Verlauf der Versuchsreihen über 1,5 Jahre keine nachweisbare Änderung des Färbeverhaltens.

An den bis zu drei Jahre als Paraffinquader bei Raumtemperatur gelagerten Gewebeproben wurde ferner keine Änderung des Färbeergebnisses in Abhängigkeit von der Aufbewahrungszeit beobachtet.

Insgesamt hat sich die Metallothionein-I/II-Immunhistochemie als robuste und einfach zu handhabende Methode bewährt.

4.2. Arbeitserleichterung durch rechnergestützte Datenerhebung

Mit dem selbst entwickelten Computerprogramm konnte die große Anzahl an auszuwertenden Bildausschnitten (insgesamt 864 Regions of interest) in verhältnismäßig kurzer Zeit analysiert werden. Der Selbstversuch ergab nach entsprechender Einarbeitung und unter Beachtung der gebotenen Sorgfalt weniger als 1 Minute

Zeitbedarf pro verwendeter $200 \mu\text{m} \times 200 \mu\text{m}$ messender Region of interest. Das Zählergebnis muss nicht notiert oder anderweitig festgehalten werden, es wird für jede Bilddatei eine eindeutig zuordenbare Textdatei mit dem nach Regions of interest und voreingestellter Zellkategorie aufgeschlüsselten Ergebnis erzeugt. Da auf einem modernen Computersystem die Ladezeiten für die Bilddateien vernachlässigbar klein sind und die einmal definierten Regions of interest nur noch neu zufällig positioniert werden müssen, ist im Stapelverarbeitungsmodus ein theoretischer Durchsatz von 50 - 60 analysierten Bildausschnitten pro Stunde erreichbar.

4.3. Metallothioneinexpression im Hippocampus

Wie bereits erwähnt war das Ergebnis der immunhistochemischen Färbung mit dem anti-MT-I/II-Antikörper eine reproduzierbare und durch Präinkubation mit Metallothionein I/II vollständig supprimierbare zytoplasmatische Braunfärbung. Die immunoreaktiven Zellen wiesen in Morphologie und Lokalisation die Merkmale von Astrozyten auf. Die Zuordnung zur astrozytären Subpopulation der Glia konnte durch die Kolokalisationsfärbung mit GFAP und den Nachweis von GFAP und MT I/II in derselben Zellpopulation bestätigt werden. Im untersuchten Kollektiv wurde sowohl in der Probanden- als auch in der Kontrollgruppe eine Expression von Metallothionein I/II ausschließlich in astrozytären Zellen nachgewiesen. Repräsentative Beispiele des immunhistochemischen Färbeverhaltens in CA1, CA3 und im Hilus gyri dentati sowie der Kolokalisationsfärbung sind am Ende des Abschnitts exemplarisch abgebildet. Die Immunoreaktivität trat sowohl an den Somata der Astrozyten als auch an den radiären Fortsätzen auf. In den Abbildungen 4.1 - 4.3, auf Seite 35, werden die astrozytäre Morphologie der reaktiven Zellen sowie die braun gefärbten, immunopositiven Zellfortsätze exemplarisch gezeigt. Ebenfalls deutlich sichtbar sind andere, nicht immunopositive Gliazellen. Darüber hinaus sind keine MT-I/II-reaktiven Neurone nachweisbar. In Abbildung 3.5 auf Seite 25 wurde bereits die Kolokalisation von GFAP (rot) und MT I/II (grün) im Zytoplasma einer astrozytären Gliazelle demonstriert. In allen untersuchten Regionen des Hippocampus waren MT-I/II-positive Astrozyten nachweisbar. Alle anderen Gliazellen und alle Neurone wiesen keinerlei Immunoreaktivität auf.

4. Ergebnisse

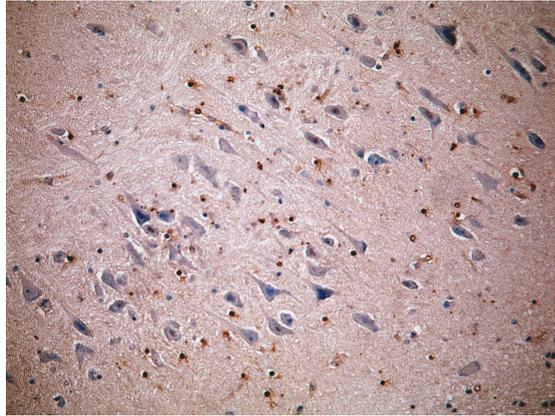


Abbildung 4.1.: Typisches immunhistochemisches Färbeverhalten (CA1 mit typischen pyramidal konfigurierten, einzeln liegenden neuronalen Somata)

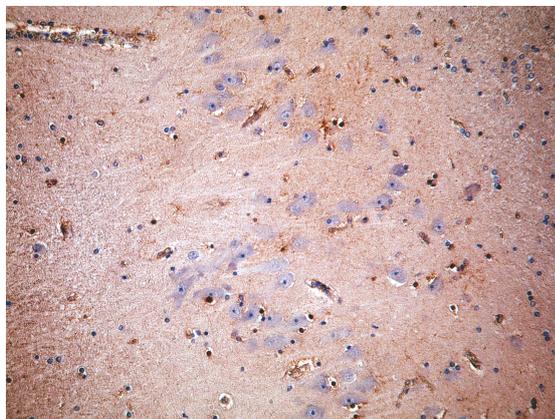


Abbildung 4.2.: Typisches immunhistochemisches Färbeverhalten am Beispiel von CA3

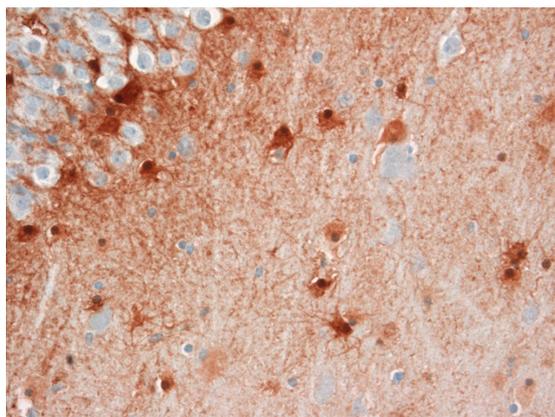


Abbildung 4.3.: Immunhistochemisches Färbeverhalten (Hilus gyri dentati)

4.4. Statistische Analyse

4.4.1. Eigenschaften der erhobenen Daten und Auswahl der statistischen Testverfahren

Für die deskriptiv-statistischen Eigenschaften des Probanden- und Kontrollkollektivs sei auf den Abschnitt zum Untersuchungsgut auf Seite 12 verwiesen. Um eine optimale Auswahl der statistischen Testverfahren zu gewährleisten wurde zunächst die Verteilung der Ausprägung der beobachteten Merkmale im Probanden- und Kontrollkollektiv sowie deren Skalierungstyp analysiert. Sowohl die Parameter Alter und Liegezeit als auch die erhobenen Zellzahlen sind intervallskaliert. Im Fall der Probandengruppe kommen noch die ermittelten Serumkonzentrationen von Morphin und Codein als intervallskalierte Größen hinzu.

Prüfung auf das Vorliegen einer Normalverteilung

Die beobachteten Merkmalsausprägungen wurden anschließend auf ihren Verteilungstyp hin überprüft. Aufgrund der Stichprobengröße mit weniger als 30 Stichproben pro Kollektiv ist nach dem zentralen Grenzwertsatz nicht automatisch von einer Normalverteilung der beobachteten Merkmalsausprägungen auszugehen. Der Shapiro-Wilk-Test stellt eine Möglichkeit dar, auch Stichproben mit $n < 30$ auf Normalverteiltetheit zu überprüfen. Die hierzu errechnete Testgröße w wird mit einem von der Stichprobengröße und dem gewählten Signifikanzniveau abhängigen Tabellenwert w_{krit} verglichen. Ist $w < w_{krit}$ kann die Nullhypothese zum gegebenen Signifikanzniveau bestätigt und von einer Normalverteilung ausgegangen werden [46]. Exemplarisch seien hier Ergebnisse des Shapiro-Wilk-Tests für die postmortale Liegezeit und die immunoreaktiven Astrozyten im Hilus gyri dentati des Probandenkollektivs angeführt ($p = 0,01$): Für die Liegezeit ergibt sich bei $n = 17$ ein Testwert von $w = 0,817$, für die Stichprobengröße weist die Tabelle $w_{krit} = 0,851$ aus. Mit $w < w_{krit}$ ist also die Nullhypothese der Normalverteiltetheit abzulehnen. Der errechnete Testwert für die immunoreaktiven Astrozyten ist $w = 0,948$, bei $n = 17$ und $w_{krit} = 0,851$ wird mit $w < w_{krit}$ die Nullhypothese angenommen, es liegt eine Normalverteilung vor. Analog führten wir Tests an Alter, nichtreaktiver Glia, Gesamtglia, Neuronen sowie, im Fall des Probandenkollektivs, Serummorphin- und Serumcodeinkonzentration durch. Getestet wurde im Probanden- und Kontrollkollektiv jeweils im Hilus gyri dentati, CA1 und CA3.

Für die Mehrheit der erhobenen Merkmalsausprägungen konnte Normalverteilung demonstriert werden.

Identifizierung und Behandlung von Ausreißerwerten

Zur graphischen Identifizierung von Ausreißerwerten wurden bei nicht normalverteilten Beobachtungen zunächst Box-and-Whiskers-Plots erstellt. Zur rechnerischen Ermittlung der Ausreißerwerte wurde der Dixon-Q-Test verwendet. Für die geordnete Reihe der beobachteten Merkmalsausprägungen wird ein Testwert q ermittelt. Die Formel zur Errechnung des Wertes ist abhängig von der Größe der Stichprobe. Analog dem Shapiro-Wilk-Test erfolgt der Vergleich mit einem kritischen Wert q_{krit} . Dieser ist ebenfalls von der Stichprobengröße abhängig. Ist $q > q_{krit}$ wird die Nullhypothese verworfen, es liegt ein Ausreißerwert vor [47]. Für Merkmalsausprägungen, die im t-Test einen signifikanten Unterschied zwischen Probanden- und Kontrollkollektiv oder zu anderen Merkmalsausprägungen einen Pearson-Korrelationskoeffizienten $r \geq 0,5$ aufwiesen, wurden mittels Dixon-Q-Test Ausreißerwerte eliminiert und die Berechnung ohne Ausreißer wiederholt. Zur Illustration zeigt Abbildung 4.4 auf Seite 38 die Box-and-Whiskers-Plots der Gesamtglia in CA1.

Ergebnisse der Verteilungsanalyse und Auswahl der Testverfahren

In beiden Kollektiven zeigte die postmortale Liegezeit keine Normalverteilung, nähert sich jedoch mit $w_{Probanden} = 0,812(w_{krit} = 0,851)$ und $w_{Kontrollen} = 0,769(w_{krit} = 0,863)$ an eine solche an. Das Alter der Probanden wies eine Normalverteilung auf, im Kontrollkollektiv stellte die älteste Person einen Ausreißer dar. Diese Stichprobe enthielt ebenfalls Ausreißerwerte für nicht reaktive Glia und Gesamtglia in CA1 sowie negative Glia in CA3 und wurde aus dem Datensatz eliminiert. Im Probandenkollektiv wies der Serumcodeinspiegel eine minimale Abweichung von der Normalverteilung auf: $w_{hilus} = 0,823(w_{krit} = 0,851)$ und $w_{ca1} = 0,835(w_{krit} = 0,844)$. Diese wurde bei normalverteiltem Serummorphinspiegel hingenommen, um den Datensatz nicht unnötig zu verkleinern. Die in den Regionen CA1, CA3 und Hilus gyri dentati erhobenen Zellzahlen für reaktive, nicht reaktive und gesamte Glia sowie Neurone zeigten mit Ausnahme der oben beschriebenen Kontrollperson Normalverteilung. Schlussfolgernd führten wir zum Überprüfen der Gleichheit der Mittelwerte der beobachteten Merkmalsausprägungen in Kontroll- und Probandenkollektiv den t-Test für unabhängige Stichproben [48]

4. Ergebnisse

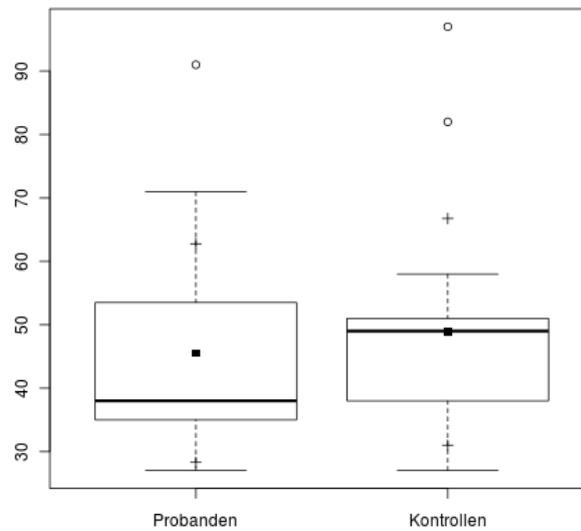


Abbildung 4.4.: Box-and-Whiskers-Plot, deutlich zu erkennen sind die außerhalb der “Whisker” liegenden potentiellen Ausreißerwerte

durch. Ziel war, zu überprüfen, ob beide Stichproben der selben Grundgesamtheit entstammen oder ob ein signifikanter Unterschied zwischen Probanden- und Kontrollkollektiv besteht. Die erhobenen Daten erfüllten die Testbedingungen der Normalverteilung und Intervallskalierung der beobachteten Merkmale. Darüber hinaus liegen keine verbundenen Stichproben vor. Somit wird grundsätzlich keine der, für den t-Test nötigen, Annahmen verletzt. Aufgrund der erwähnten Stichprobeneigenschaften eignet sich zur Überprüfung möglicher Korrelationen zwischen Alter, Geschlecht, Serummorphin bzw. -Codein und der Häufigkeit des Auftretens der verschiedenen Zellpopulationen nach Elimination der Ausreißer der Korrelationskoeffizient nach Pearson [49]. Das Vorliegen einer Korrelation wurde ab $r \geq 0,5$ angenommen, Werte im Intervall $0,4 \leq r \leq 0,5$ wurden als starker, Werte im Intervall $0,2 \leq r \leq 0,4$ als schwacher Trend gewertet.

4.4.2. Ergebnisse der statistischen Auswertung

Vergleich der Zellpopulationen im Probanden- und Kontrollkollektiv

Der t-Test für zwei unabhängige Stichproben ergab aufgeschlüsselt nach untersuchter Hippocampusregion folgende Besonderheiten:

4. Ergebnisse

Im Hilus gyri dentati zeigte sich eine signifikante Abweichung der Stichprobenmittelwerte für die immunoreaktiven Astrozyten zwischen beiden Kollektiven ($p = 0,043$). Im einseitigen t-Test (Hypothese: im Probandenkollektiv sind im Mittel weniger immunoreaktive Astrozyten nachweisbar) ergibt sich ein hochsignifikanter Unterschied ($p = 0,021$). Der Befund ist in Abbildung 4.5 durch einen Box-and-Whiskers-Plot verdeutlicht:

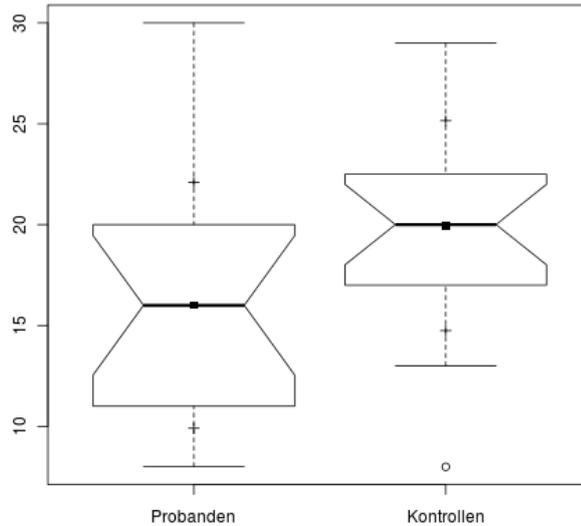


Abbildung 4.5.: Box-and-Whiskers-Plot der immunoreaktiven Astrozyten im Hilus gyri dentati im Vergleich zwischen Probanden- und Kontrollkollektiv; zur besseren Anschaulichkeit sind die Boxen gekröpft dargestellt

Für die Region CA1 besteht kein signifikanter Unterschied zwischen beiden Kollektiven. Auch in CA3 besteht der oben beschriebene Unterschied in der Häufigkeit der immunoreaktiven Astrozyten nicht. Dagegen ergibt sich ein deutlicher Trend zum Vorkommen von weniger nichtreaktiven Gliazellen in der Region CA3 des Probandenkollektivs ($p = 0,066$). Mit einseitiger Testhypothese ergibt sich $p = 0,033$. Ein schwacher gleichsinniger Trend resultiert für die Gesamtglia mit $p = 0,085$ für die einseitige Testhypothese. Die entsprechenden Box-and-Whiskers-Plots sind in den Abbildungen 4.6 und 4.7 auf Seite 40 bzw. 40 dargestellt.

4. Ergebnisse

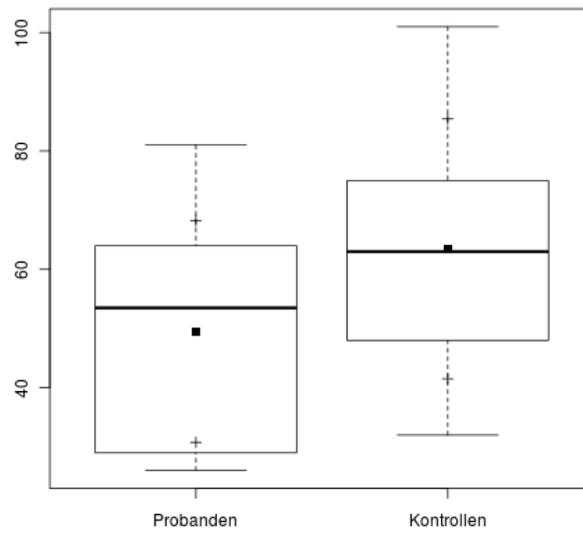


Abbildung 4.6.: Box-and-Whiskers-Plot der nicht immunoreaktiven Glia in CA3 im Vergleich zwischen Probanden- und Kontrollkollektiv

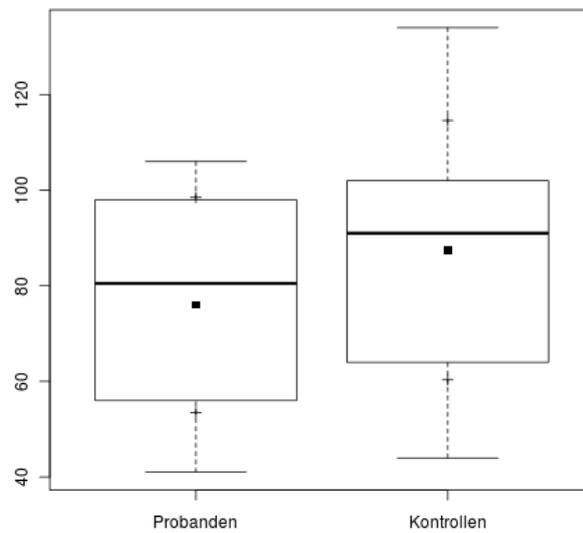


Abbildung 4.7.: Box-and-Whiskers-Plot der Gesamtglia in CA3

Korrelationen innerhalb der Kollektive

In beiden Kollektiven zeigte sich erwartungsgemäß eine starke Korrelation zwischen der Häufigkeit der Gesamtglia und der nichtreaktiven Glia einerseits als auch der Gesamtglia und der immunreaktiven Glia. Diese Beziehung wurde in allen untersuchten Regionen beobachtet. Beispielhaft sei hier der Pearson-Korrelationskoeffizient r für die immunreaktiven Astrozyten und die Gesamtglia in der Region CA3 angeführt: $r_{\text{reaktiv-gesamt}} = 0,584(\text{Probanden})$ und $r_{\text{reaktiv-gesamt}} = 0,765(\text{Kontrollen})$. Für nichtreaktive Glia und Gesamtglia ergibt sich: $r_{\text{nichtreaktiv-gesamt}} = 0,923(\text{Probanden})$ und $r_{\text{nichtreaktiv-gesamt}} = 0,967(\text{Kontrollen})$. Die Befunde sind in Abbildung 4.8 und 4.9 auf Seite 41 und 42 als Scatterplot illustriert.

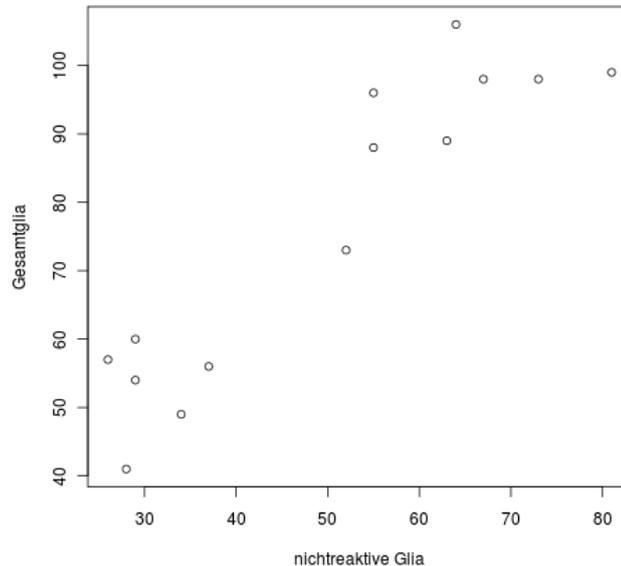


Abbildung 4.8.: Scatterplot der nichtreaktiven Glia, aufgetragen gegen die Gesamtglia in CA3 im Probandenkollektiv

Darüber hinaus korrelierten die Serumspiegel von Morphin und Codein im Probandenkollektiv: $r_{\text{Morphin-Codein}} = 0,864$. Ferner zeigten sich im Probandenkollektiv folgende auffällige Befunde: Die Zahl der immunreaktiven Astrozyten im Hilus gyri dentati weist eine negative Korrelation mit dem Alter auf ($r_{\text{reaktiv-Alter}} = -0,527(\text{Probanden})$), dargestellt in Abbildung 4.10 auf Seite 42. Der Befund ist zum 95%-Konfidenzintervall signifikant ($p = 0,0296$). Ältere Probanden weisen in dieser Hirnregion also weniger immunreaktive Astrozyten auf, im Kontrollkollektiv

4. Ergebnisse

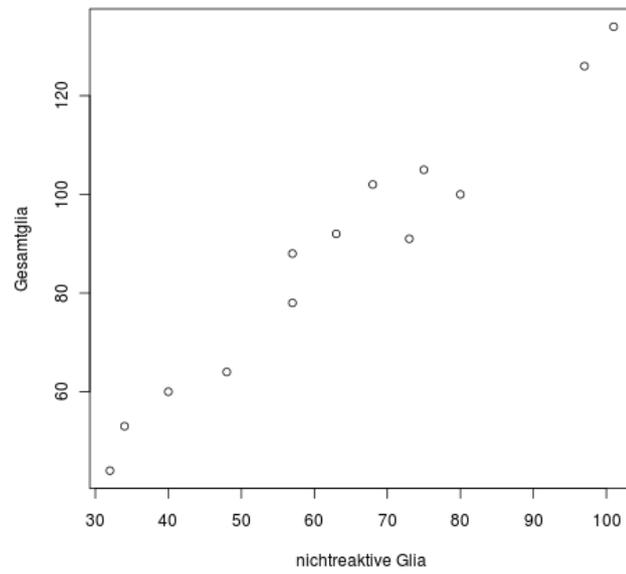


Abbildung 4.9.: Scatterplot der nichtreaktiven Glia, aufgetragen gegen die Gesamtglia in CA3 im Kontrollkollektiv

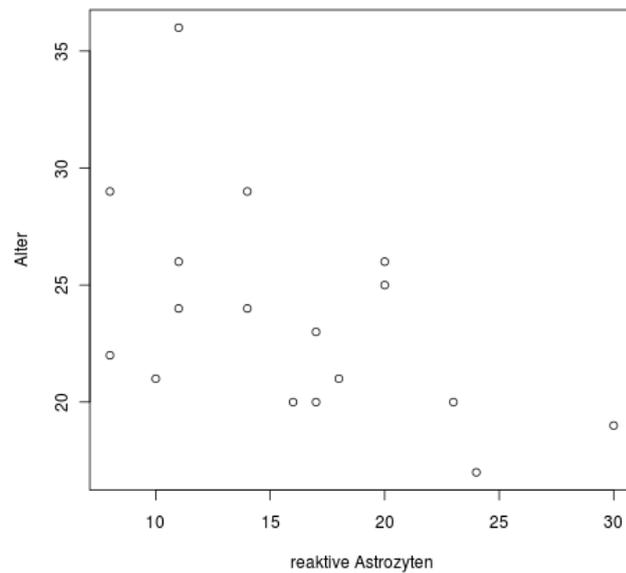


Abbildung 4.10.: Scatterplot der reaktiven Astrozyten, aufgetragen gegen das Lebensalter im Probandenkollektiv

4. Ergebnisse

tiv fehlt dieser Befund, er ist konsistent mit der Abweichung der Stichprobenmittelwerte des Probandenkollektivs in Richtung auf eine niedrigere Zahl immunoreaktiver Astrozyten im t-Test. In der Region CA1 besteht keine Alterskorrelation für die reaktiven Astrozyten, ein Trend zu einer Erhöhung der Zahl der Gesamtglia und der nichtreaktiven Zellen mit zunehmendem Alter ist im Kontrollkollektiv nach Elimination der Ausreißer nicht mehr nachweisbar. Es besteht jedoch eine Korrelation der Neuronenzahl mit dem Lebensalter im Kontrollkollektiv mit $r_{Neurone-Alter} = 0,545$, $p = 0,024$ (Abbildung 4.11, Seite 43). Auffällig ist in CA1

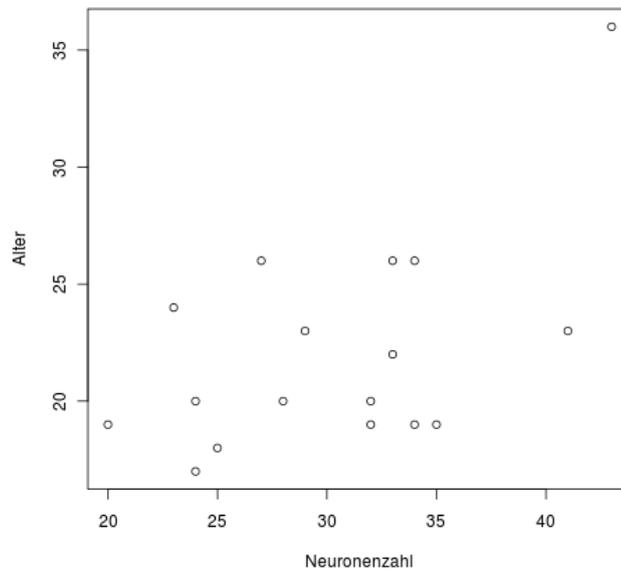


Abbildung 4.11.: Scatterplot der Neuronenzahl, aufgetragen gegen das Lebensalter in CA1 im Kontrollkollektiv

des Kontrollkollektivs eine Korrelation bzw. ein Trend der Glia subpopulationen zu steigendem Vorkommen mit dem Geschlecht, wobei männliches Geschlecht mit dem Vorhandensein von mehr Glia verbunden scheint: $r_{gesamt-Geschlecht} = 0,587$, $p = 0,021$; $r_{nichtreaktiv-Geschlecht} = 0,486$, $p = 0,066$ und $r_{reaktiv-Geschlecht} = 0,536$, $p = 0,027$. Im Probandenkollektiv der Region CA1 korrelieren die Zahl der gesamten Gliazellen und der nichtreaktiven Glia mit dem Serummorphinspiegel, es ergibt sich im Detail: $r_{gesamt-Morphin} = 0,568$, $p = 0,034$ und $r_{nichtreaktiv-Morphin} = 0,516$, $p = 0,059$. Bei hohen Serummorphinspiegeln ist in CA1 also insgesamt mehr Glia nachweisbar, allerdings gehört diese nicht der Subpopulation der immunoreaktiven Astrozyten an (Abbildungen 4.12 und 4.13 auf Seite 44 bzw. 45).

4. Ergebnisse

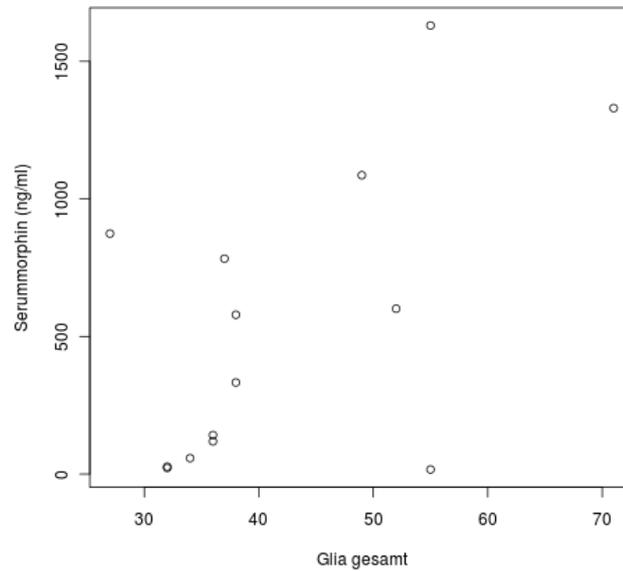


Abbildung 4.12.: Scatterplot der Gesamtglia, aufgetragen gegen die Serummorphinspiegel in CA1 im Probandenkollektiv

In der Region CA3 des Kontrollkollektivs prädestiniert ein höheres Alter zum Vorhandensein von mehr reaktiven Astrozyten ($r_{\text{reaktiv-Alter}} = 0,639$, $p = 0,014$). Der Befund beeinflusst offenbar auch die Gesamtglia mit $r_{\text{gesamt-Alter}} = 0,499$, $p = 0,069$, wenn auch ohne deutliche Signifikanz (Abbildungen 4.14 und 4.15 auf Seite 45 bzw. 46).

Eine geschlechtsabhängige Vermehrung der Glia ist im Kontrollkollektiv für die reaktiven Astrozyten nachweisbar ($r_{\text{reaktiv-Geschlecht}} = 0,539$, $p = 0,046$). Die Neuronenzahl im Probandenkollektiv ist mit dem Serumcodeinspiegel positiv korreliert ($r_{\text{Neurone-Codein}} = 0,578$, $p = 0,030$), der Befund ist ohne deutliche Signifikanz als Trend auch für den Serummorphinspiegel erkennbar ($r_{\text{Neurone-Morphin}} = 0,469$, $p = 0,090$).

4. Ergebnisse

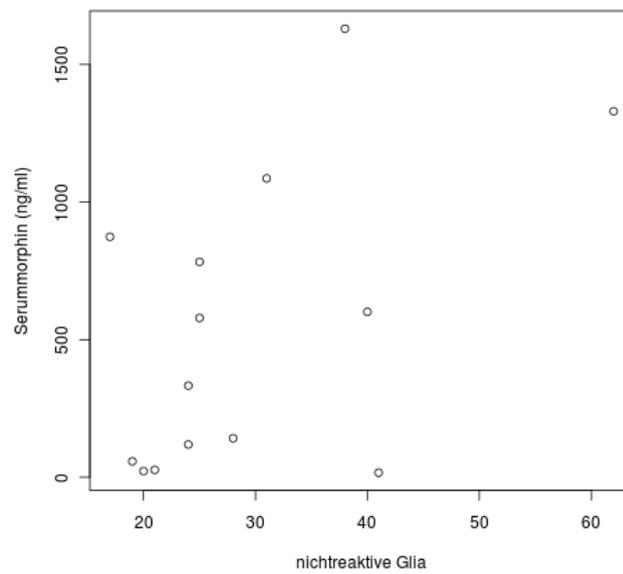


Abbildung 4.13.: Scatterplot der nichtreaktiven Astrozyten, aufgetragen gegen die Serummorphinspiegel in CA1 im Probandenkollektiv

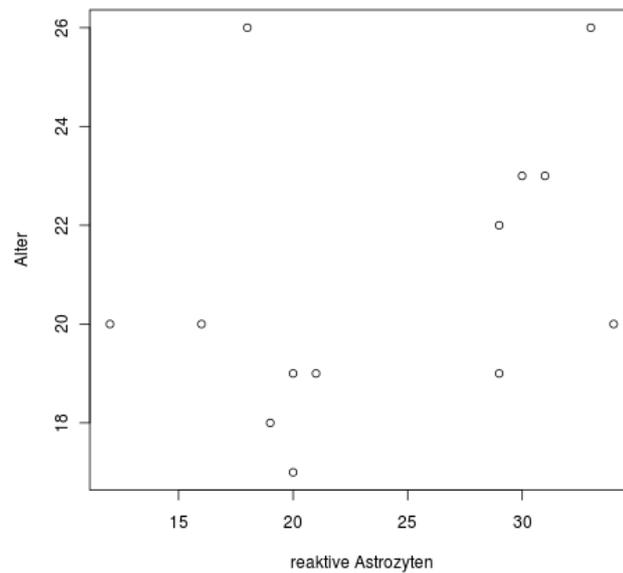


Abbildung 4.14.: Scatterplot der reaktiven Astrozyten, aufgetragen gegen das Lebensalter in CA3 im Kontrollkollektiv

4. Ergebnisse

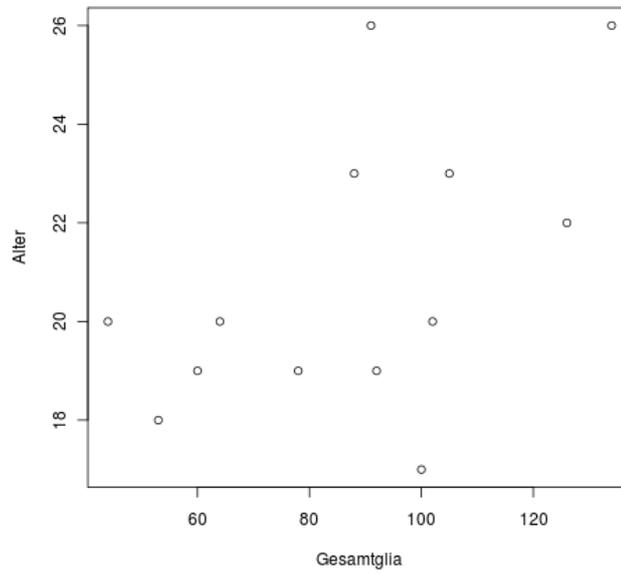


Abbildung 4.15.: Scatterplot der Gesamtglia, aufgetragen gegen das Lebensalter in CA3 im Kontrollkollektiv

5. Diskussion

5.1. Einordnung der Ergebnisse

Nachdem in früheren Arbeiten eine vermehrte Expression des neuronalen Plastizitätsmarkers Polysialic acid neural cell adhesion molecule (PSA-NCAM) in den Hippocampi von Opiatabhängigen nachgewiesen wurde [35] und die neuroprotektive Rolle der Metallothioneine im Rahmen neuronaler Verletzungen [26], der Einwirkung chemischer Noxen [27] sowie von neurodegenerativen Erkrankungen [50] als gesichert gelten kann, stellte sich die Frage, ob chronischer Opiatabusus geeignet ist, die Expression von Metallothionein zu beeinflussen. Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine immunhistochemische Methode zum spezifischen Metallothioneinnachweis etabliert, die bei relativ geringem apparativem Aufwand reproduzierbare Resultate im Sinne einer sicheren Detektion des zytoplasmatisch gebundenen Metallothionein I/II liefert. In der untersuchten Population von 17 Probanden und 19 Kontrollpersonen zeigte sich eine Immunreaktivität ausschließlich in morphologisch astrozytären Zellen. Diese Beobachtung konnte durch Nachweis der Kolo-kalisation von MT I/II und dem etablierten astrozytären Marker GFAP [45] verifiziert werden und ist konkordant mit den Beobachtungen anderer Forschungsgruppen: [26]; [29]; [30]. Erkenntnisse tierexperimenteller Arbeiten ließen eine gegenüber der Normalpopulation erhöhte Metallothioneinexpression im Probandenkollektiv [12] erwarten. Ein solcher klarer Zusammenhang mit, aus neuropathophysiologischer und forensischer Sicht wünschenswerter, in allen Regionen nachweisbarer erhöhter Metallothioneinexpression bestätigt sich in unseren Befunden nicht. Vielmehr zeigt sich eine komplexe Befundkonstellation, welche in den untersuchten hippocampalen Regionen erheblich differiert. Die komplexe anatomische Struktur Hippocampus reagiert offenbar auf die Opiateinwirkung differenzierter als bisher vermutet. Bevor mögliche Erklärungen der erhobenen Befunde dargelegt werden, soll auf mögliche Störgrößen (Confounder) und andere kritische Punkte im Studiendesign eingegangen werden.

5.1.1. Lebensalter und Geschlecht als Störgrößen

In der Literatur wird eine Abnahme der Metallothioneinexpression mit zunehmendem Alter beschrieben [50]. Unsere Untersuchungen zeigen eine vermehrte Expression in der Region CA3 des Kontrollkollektivs. In CA1 ist jedoch weder im Probanden- noch im Kontrollkollektiv eine altersabhängige Änderung der MT I/II-Expression nachweisbar. Hierzu ist folgendes zu bedenken:

Die betrachteten Kollektive im erwähnten Review wiesen eine wesentlich weitere Altersspanne und vor allem ein höheres maximales Lebensalter auf, weshalb der Vergleich mit den in dieser Untersuchung betrachteten Kollektiven mit einem maximalen Lebensalter von 36 Jahren und einem Durchschnittsalter von $23,6 \pm 4,6$ Jahren für die Probanden- und $22,4 \pm 4,7$ Jahren für die Kontrollgruppe, nur sehr bedingt möglich ist. Die im Hilus gyri dentati des Probandenkollektivs beobachtbare altersabhängige Abnahme der MT I/II-Expression mit dem Surrogatparameter immunoreaktive Zellen ist möglicherweise eine durch den Abusus begünstigte vorzeitige Reaktion im Sinne von [50]. Vor dem Hintergrund des erwiesenen neuroprotektiven Effekts der Metallothioneine zeigt sich in der altersabhängigen Zunahme der MT I/II-Expression im Kontrollkollektiv in CA3 möglicherweise ein Protektionsmechanismus. Zusammenfassend ist anzunehmen, dass die erhobenen altersabhängigen Befunde echte Effekte des Opiatabusus bzw. der Abstinenz sind, da beide Kollektive laut deskriptiver Statistik und Verteilungsanalyse in ihrer Altersstruktur vergleichbar und normalverteilt sind, nachdem die entsprechenden Ausreißerwerte eliminiert wurden.

Die im Kontrollkollektiv beobachtete Geschlechtsabhängigkeit der MT I/II-Expression in CA3 und ihr Fehlen bei den Probanden ist nach unserer Kenntnis in der Literatur nicht vorbeschrieben.

Mögliche Erklärungen umfassen, neben Verzerrungen bei nicht ausreichender Stichprobengröße auch geschlechtsspezifisch vermehrte Exposition gegenüber MT I/II-induzierenden anderen Noxen, z.B. oxidativer Stress durch Alkohol oder repetitive mechanische Traumata. Für das Kontrollkollektiv liegen uns jedoch keine entsprechenden Anhaltspunkte vor (z.B. Anamnese oder Narben von vorausgegangenen Operationen).

5.1.2. Kritische Punkte im Studiendesign

Untersuchte Kollektive

Die untersuchten Kollektive wurden, wie bereits erwähnt retrospektiv untersucht. Ein prospektives oder gar verblindetes Studiendesign ist jedoch aus offensichtlichen ethischen Gründen abzulehnen. Dem Problem der Verfälschung der Stichprobe durch Selektion der eingeschlossenen Fälle wurde durch die Festlegung von Ein- und Ausschlusskriterien und die konsequente Anwendung derselben auf konsekutive Stichproben Rechnung getragen.

Eine etwaige Verfälschung durch nicht bekannte Leberfunktionsstörungen im Probandenkollektiv ist unwahrscheinlich, da der Metabolismus von Diacetylmorphin durch eingeschränkte Leberfunktion kaum beeinflusst wird. Eine Erhöhung der Serumspiegel bei erheblich oder perakut eingeschränkter Nierenfunktion ist hingegen möglich [18]. Allerdings wurde bei keinem Probanden im Sektionsgutachten ein makroskopisch oder mikroskopisch auffälliger Nierenbefund erhoben. Die Aservierung und histologische Aufarbeitung von Nierengewebe erfolgt routinemäßig.

Methodische Unterschiede zu vorliegenden Studien

Der Befund einer opiatinduzierten Induktion der Metallothioneinexpression [12] wurde im Tierversuch erhoben. Die Versuchstiere erhielten eine standardisierte Morphindosis über fünf Tage. Das entspricht nicht dem Konsummuster bei Heroinabusus. Hier ist von einer unregelmäßigen Einnahme wechselnder Dosen über einen deutlich längeren Zeitraum auszugehen. Im Tierexperiment wurde ein bekanntermaßen suchtinduzierendes Dosisschema verwendet. Im Probandenkollektiv ist außerdem mit einem Mischkonsum mit anderen Substanzen, insbesondere Benzodiazepinen, zu rechnen. Eine Reproduzierbarkeit der Befunde aus dem Tierversuch ist somit nicht zwingend gegeben. Letztlich bietet die im Tierexperiment verwendete Detektionsmethode mittels Cadmium-Affinitätsassay einerseits den Vorteil der Quantifizierbarkeit, weist jedoch die totale Metallothioneinaktivität nach [11], ist also nicht geeignet zwischen den drei im ZNS vorkommenden Isoformen zu differenzieren. Insgesamt ist die Detektionsmethode anfällig für Verfälschung durch andere schwermetallbindende Proteine, nicht zuletzt Metallothionein III. Auch wurde die Datenerhebung nicht wie in unserer Untersuchung nach Hirnregionen aufgeschlüsselt durchgeführt, sondern das gesamte Hirn der Versuchstiere untersucht. Die von uns etablierte Immunhistochemie bietet dagegen

5. Diskussion

einerseits nur eine semiquantitative Ermittlung der MT I/II-Aktivität, ist jedoch spezifisch für die untersuchte Metallothioneinspezies. Zusammenfassend ist es also durchaus denkbar, dass die tierexperimentell beobachtete Erhöhung der Metallothioneinaktivität nach regelmäßiger Morphingabe einen Mischbefund der einzelnen Metallothioneinspezies und der unterschiedlichen Hirnregionen darstellt und auf histopathologischer Ebene erheblich komplexere Schädigungsprozesse ablaufen. Die Annahme, dass sich eine gesteigerte Metallothionein I/II-Expression in einem größeren Anteil MT I/II-positiver Astrozyten ausdrückt, stellt nur eine denkbare Befundkonstellation dar. Eine mögliche vermehrte Metallothioneinexpression, die nicht in einer wachsenden Anzahl oder einem größeren Anteil MT I/II-positiver Zellen zum Ausdruck kommt, sondern in einem vermehrten Metallothioneingehalt oder Metallothioneinturnover in einer zahlenmäßig konstanten Population immunopositiver Zellen wäre jedoch mittels Immunhistochemie als qualitative bzw. semiquantitative Methode nicht ausreichend sensitiv detektierbar.

Von der Problematik der Übertragbarkeit von Untersuchungsergebnissen zwischen verschiedenen Spezies abgesehen birgt die retrospektive Untersuchung menschlicher Individuen im Vergleich mit dem Tierversuch eine Reihe zusätzlicher Unwägbarkeiten. An erster Stelle zu nennen wäre die im Vergleich zu Labortieren mit gleichem Stammbaum hohe genetische Heterogenität der untersuchten Individuen. Die mögliche Schwankungsbreite der basalen Metallothioneinexpression, sowohl in der Probanden- als auch in der Kontrollgruppe fließt ebenso wie die mögliche Änderung der Expression durch Opiatabusus in der Probandengruppe in die Ergebnisse mit ein und maskiert möglicherweise den opiatinduzierten Effekt.

Es muss ferner berücksichtigt werden, dass die Labortiere eine identische Diät erhielten, im Gegensatz zu den untersuchten Probanden und Kontrollpersonen. Dies wiegt umso schwerer, vor dem Hintergrund, dass die Möglichkeit einer Induktion der Metallothioneinexpression durch Zink und Cadmium belegt ist [11]. Ein weiterer die Metallothioneinexpression beeinflussender Faktor könnte Alkoholkonsum in beiden betrachteten Kollektiven sein. Regelmäßiger Alkoholkonsum ist, wenn auch in geringerem Ausmaß als Opiatmissbrauch, geeignet eine vermehrte Expression von Metallothionein zu induzieren [12].

Letztlich kann die Chronizität der Opiataufnahme im Probandenkollektiv zwar anhand der Anamnese vermutet, aber nicht bewiesen werden. Die Frage ist also,

ob auch ein unregelmäßiger oder kurzzeitiger Konsum eine Metallothioneininduktion bewirken kann. In Untersuchungen an humanen Astrozytenkulturen führte die Applikation von 30 Gray γ -Strahlung nach 3-6 Stunden zum Anstieg der MT-II-mRNA-Spiegel, welche nach 12-24 Stunden ein Maximum erreichten [11].

Folglich wäre, um sicher von einem erhöhten Metallothioneinspiegel nach Exposition mit Opiaten ausgehen zu können eine, womöglich wiederholte, Applikation 1-5 Tage vor Todeseintritt zu fordern. Für die überwiegende Anzahl der Probanden kann dieses Kriterium als erfüllt betrachtet werden. Einzig im Falle eines sogenannten "Goldenen Schusses", also einer letalen akzidentellen oder beabsichtigten Überdosierung, zum Beispiel nach längerer Abstinenz mit Verlust der Opiattoleranz, wäre wohl kein Anstieg der Metallothioneinexpression zu beobachten. Eine Objektivierung des chronischen Konsums mittels z.B. Haaranalyse könnte hier Abhilfe schaffen, jedoch standen nur für einige der untersuchten Probanden entsprechende Asservate bzw. Analyseergebnisse zur Verfügung. Nach Ausschluss der nicht objektivierbaren Fälle von chronischem Abusus hätte eine statistisch nicht sinnvoll untersuchbare Probandengruppe resultiert.

5.2. Interpretation der erhobenen Befunde

5.2.1. Differenziertes Schädigungsbild nach Opiatabusus im Hippocampus

Der Hippocampus ist wie bereits erwähnt aufgrund seiner Histologie und Lage eine Modellstruktur für Untersuchungen zu neuronalen Schäden durch Hypoxämie wobei der Weg, auf dem diese induziert wird, für die resultierende neuronale Schädigung irrelevant ist. Die genauen Auswirkungen der Hypoxämie sind regionsspezifisch und werden als selektive Vulnerabilität bezeichnet

Selektive Vulnerabilität auf neuronaler Ebene

Die deutlich höhere Vulnerabilität der Region CA1 (Sommer-Sektor) gegenüber der als resistent bezeichneten Region CA3 (Bratz-Sektor) und dem Hilus gyri dentati für neuronale hypoxämische Schäden ist ein lange bekannter Befund [31]. Eine Ursache der selektiven Vulnerabilität stellt die Gefäßversorgung dar. Der Hippocampus wird maßgeblich aus parahippocampalen Arterien versorgt. Der Ursprung dieser arkadenbildenden Arterien ist variabel. Am häufigsten liegt eine Mischver-

5. Diskussion

sorgung vor, welche maßgeblich aus der Arteria choroidea anterior und Ästen der Arteria cerebri posterior erfolgt [51]. Die parahippocampalen Arterien teilen sich in kurze und lange Äste, welche nach Ushimura benannt werden. Der Hilus gyri dentati und CA3 werden aus anastomosierenden Gefäßen beider Äste versorgt, während CA1 Blut aus funktionellen Endarterien des langen Ushimura-Astes erhält [52], [51]. Das prinzipielle Schema der hippocampalen Blutversorgung zeigt Abbildung 5.1. Gut zu erkennen ist die Versorgung von CA3 und des Hilus gyri dentati durch anastomosierende Arterien im Gegensatz zur Eingefäßversorgung von CA1.

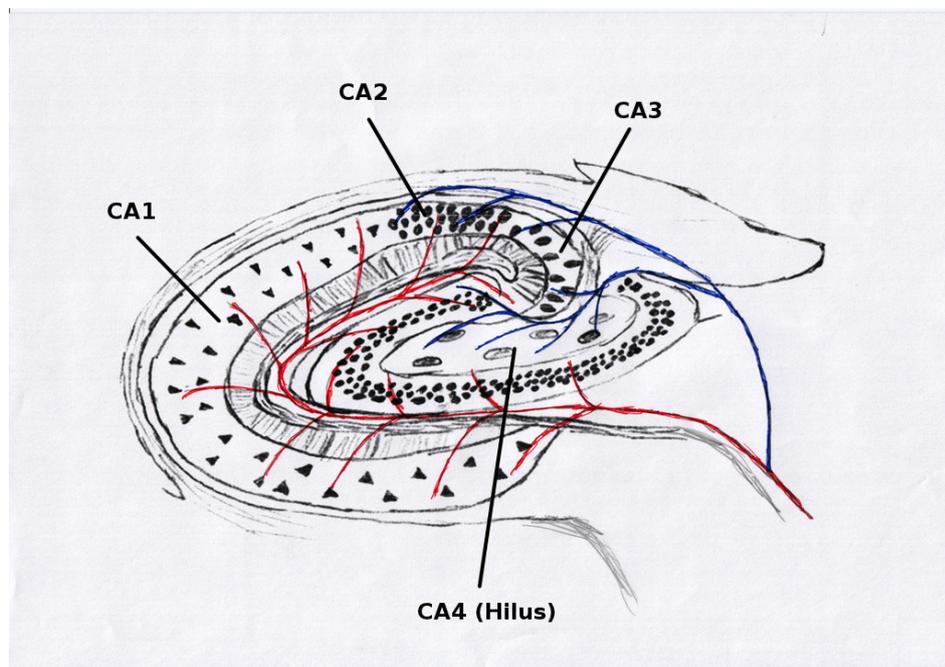


Abbildung 5.1.: Hippocampus, schematische Darstellung der Blutversorgung im Querschnitt (modifiziert nach Duvernoy [31]); rot dargestellt der lange, blau der kurze Ast der Ushimura-Arterie

Bei Hypoxämie und insbesondere konsekutiver Kreislaufdepression resultiert bevorzugt ein neuronaler Schaden in der schlechter kollateralisierten Region CA1. In jüngerer Zeit mehren sich die Hinweise, dass neben der Vaskularisation auch metabolische Besonderheiten der einzelnen hippocampalen Region zur selektiven Vulnerabilität beitragen [53]. Das Modell der selektiven Vulnerabilität ist bislang nur für die betroffenen Neurone belegt [54]. Im Tierversuch führte ein bilateraler fünfminütiger Verschluss der Arteria carotis communis zu einem nach 2 bis 3 Tagen zu beobachtenden Neuronenuntergang in CA1, nicht jedoch in CA3 oder

im Hilus gyri dentati. Erst bei Verschlusszeiten von 30 Minuten waren auch andere Hirnregionen betroffen [54]. Da im untersuchten Probandenkollektiv von einer milderen Hypoxämie auszugehen ist, sind keine Neuronenuntergänge zu erwarten. Diese waren in Übereinstimmung mit der Literatur auch nicht nachzuweisen.

Differenziertes Reaktionsmuster der Glia

Im Gegensatz zur Literatur, die neben einem ischämiebedingten Nervenzellverlust eine stereotype Reaktion der Glia im Sinne einer Mikroglia proliferation bei Opiatabusus beschreibt [9], beobachteten wir ein differenzierteres Reaktionsmuster in Abhängigkeit von der Hippocampusregion. Dieser Befund kann analog der neuronalen Hypoxieempfindlichkeit als selektive Vulnerabilität der Glia interpretiert werden. Erneut gehen wir davon aus, dass die in der Literatur beschriebenen Mikroglia proliferationen die Summe der Veränderungen im zentralen Nervensystem ohne Berücksichtigung der topographischen Region widerspiegeln und bei Probanden mit anderem Missbrauchsverhalten erhoben wurden. Die These einer geringeren Opiatexposition unseres Probandenkollektivs wird gestützt durch den fehlenden Nachweis perivasaler Einblutungen im Gegensatz zu [9], wo dieser Befund bei den akut Intoxikierten auftrat. Für eine chronische, aber unter dem für einen neuronalen Schaden und eine sekundäre Gliose nötigen Niveau liegende hypoxämische Schädigung in unserem Probandenkollektiv spricht auch die gegenüber dem Kontrollkollektiv unveränderte Neuronenzahl in CA1 und die ebenfalls vergleichbare Anzahl an Gesamtglia. Als klassische vulnerable Region wären hier zuerst Zelluntergänge zu erwarten. Wie bereits erwähnt ist keine Änderung der Anzahl immunoreaktiver Astrozyten als Zeichen einer vermehrten Metallothioneinexpression nachweisbar. Die Metallothioneinaktivität in den einzelnen Astrozyten ist mit immunohistochemischen Methoden aus unserer Sicht nicht zuverlässig quantifizierbar, prinzipiell ist eine Erhöhung des zytoplasmatischen Metallothioneingehalts in der immunoreaktiven Astrozytensubpopulation jedoch denkbar. Ein sehr interessanter Befund ist in diesem Zusammenhang die in der Region CA1 des Probandenkollektivs beobachtete Korrelation der Anzahl der gesamten Gliazellen mit der Serummorphinkonzentration. In geringerem Ausmaß besteht der Bezug auch für nichtreaktive Glia ($r_{gesamt-Morphin} = 0,568$, $p = 0,034$ und $r_{nichtreaktiv-Morphin} = 0,516$, $p = 0,059$). Unterstellt man für die Probanden mit hohem Serummorphinspiegel eine wiederholte Applikation höherer, potentiell hypoxämieinduzierender Dosen, so ist hier der Minimalbefund einer beginnenden

5. Diskussion

Gliose in Übereinstimmung mit [9] nachweisbar. Der fehlende Nachweis eines vermehrten Vorkommens immunoreaktiver Astrozyten im Probandenkollektiv bedeutet nicht notwendigerweise einen fehlenden Anstieg der Metallothioneinexpression. Vielmehr ist die stärkere Korrelation der Gesamtglia zum Serummorphinspiegel im Vergleich zur nichtreaktiven Glia ein Indiz für eine latente Vermehrung der immunreaktiven Astrozyten, welche nicht direkt detektierbar, weil nicht statistisch signifikant ist. Diese Interpretation ist vereinbar mit den Beobachtungen von [12]. Ein insbesondere interessanter Befund ist die im Kontrollkollektiv beobachtbare starke Korrelation von Lebensalter und Neuronenzahl mit $r_{Neurone-Alter} = 0,545$, $p = 0,024$. Diese Beobachtung legt nahe, dass es sich um einen Effekt einer adulten Neogenese von Neuronen im zentralen Nervensystem handelt [55]. Ob das Fehlen des Befundes im Probandenkollektiv einen opiatinduzierten Verlust der Fähigkeit zur neuronalen Plastizität, wie er im Tierexperiment bereits für die Region CA3 belegt ist [56], darstellt, ist anhand der von uns erhobenen Daten nicht zu klären. Ebenfalls denkbar ist ein durch körperlichen Verfall und sozialen Rückzug der Probanden bedingter Sekundäreffekt im Sinne eines fehlenden differenzierten Reizangebots ([57] und [58]) bzw. ein umgekehrter protektiver Effekt bei den Kontrollpersonen. Jedoch sind derartige Schlussfolgerungen aufgrund der erheblichen Komplexität der involvierten regulatorischen Mechanismen [59] nur mit der gebotenen Vorsicht zu ziehen und grundsätzlich kritisch zu hinterfragen. Eine Korrelation besteht zwischen dem Lebensalter und den immunreaktiven Astrozyten in der Region CA3 des Kontrollkollektivs: $r_{reaktiv-Alter} = 0,0639$, $p = 0,014$. Gleichzeitig resultiert also offenbar eine Reduktion der Fähigkeit zur kompensatorischen Hochregulation der Metallothioneinexpression. Ein teilweiser und vorzeitiger Verlust des Vermögens zur Bildung von Metallothionein im Probandenkollektiv könnte konsekutiv eine suboptimale Reparatur nach Schädigung durch exogene Noxen mit überschießender und prolongierter inflammatorischer Reaktion [26] und somit vermehrtem neuronalem Schaden bedeuten. Schwierig zu interpretieren ist die positive Korrelation von Neuronenzahl und Serumcodeinspiegel in der Region CA3 der Probanden. Ein deutlich schwächerer Zusammenhang im Sinne eines Trends ist hier zwischen Serummorphinspiegel und Neuronen zu beobachten ($r_{Neurone-Codein} = 0,578$, $p = 0,030$ und $r_{Neurone-Morphin} = 0,469$, $p = 0,090$). Codein ist kein Metabolit des Morphins bzw. Diacetylmorphins, sondern ein häufiger Begleitstoff in illegalem Straßenheroin [60]. Der scheinbare protektive Effekt des Codeins ist möglicherweise durch den dann geringeren Anteil an Diacetylmor-

5. Diskussion

phin am Gesamtgewicht des Heroingemischs zu erklären. Dem steht andererseits der gleichsinnige schwache Trend für den Serummorphinspiegel widersprüchlich gegenüber. Letztlich ist die beschriebene Korrelation nicht abschließend und befriedigend zu erklären. Bei nur annähernd normalverteilten Serumcodeinspiegeln handelt es sich möglicherweise um einen Verzerrungseffekt.

Der auffälligste von uns erhobene Befund betrifft den Hilus gyri dentati: hier ist eine signifikant geringere Zahl an immunoreaktiven Astrozyten im Kontroll- gegenüber dem Probandenkollektiv nachzuweisen mit $p = 0,043$ im zweiseitigen t-Test, im einseitigen t-Test ergibt sich $p = 0,021$. Gleichzeitig korreliert höheres Lebensalter im Probandenkollektiv zum Verlust von immunoreaktiven Astrozyten ($r_{\text{reaktiv-Alter}} = -0,527$ (Probanden), $p = 0,0296$). Gegenüber dem Kontrollkollektiv führt also offenbar die chronische Opiatexposition der Probanden mit zunehmendem Alter zu einem Verlust an metallothionein I/II-positiven Astrozyten und damit der Fähigkeit zur Kompensation von oxidativem Stress. Bemerkenswert ist, dass dieser Effekt in einer auf neuronaler Ebene gegenüber oxidativem Stress eigentlich resistenten Hippocampusregion auftritt. Erwartungsgemäß müsste im Hilus gyri dentati eine Sensibilisierung gegenüber oxidativem Stress und eine erhöhte neuronale Vulnerabilität resultieren [26]. Allerdings zeigt unsere Analyse hier keinen signifikanten Unterschied zwischen Probanden- und Kontrollkollektiv. Auffällig ist jedoch ein schwacher Trend zur negativen Korrelation von Alter und Neuronenzahl mit $r_{\text{Alter-Neurone}} = -0,187$ bei den Probanden. Ohne die Elimination des als Ausreißer identifizierten Maximalwertes 23 bei der Anzahl der Neurone würde sich sogar eine höhere Korrelation $r_{\text{Alter-Neurone}} = -0,268$ ergeben. Die Klassifikation als Ausreißer beruht wie beschrieben auf dem Dixon-Test für Ausreißer der einen q-Wert von $q = 0,5$ bei $q_{\text{krit}} = 0,49$ ergab. Die Interpretation als Ausreißerwert ist also durchaus kritisch zu hinterfragen. Wir schlussfolgern aus den erhobenen Daten und dem Vergleich der Literatur, dass chronischer Opiatabusus zu einer altersabhängigen Reduktion der metallothionein I/II-produzierenden Astrozyten im Hilus gyri dentati und resultierend zu einer erhöhten Vulnerabilität auf neuronaler Ebene gegenüber der Normalpopulation führt. Diese Befunde stehen im Einklang mit den Untersuchungen von [9]. Eine synoptische Übersicht über die von uns beobachteten Auswirkungen des Opiatabusus gibt die Abbildung 5.2 auf Seite 56.

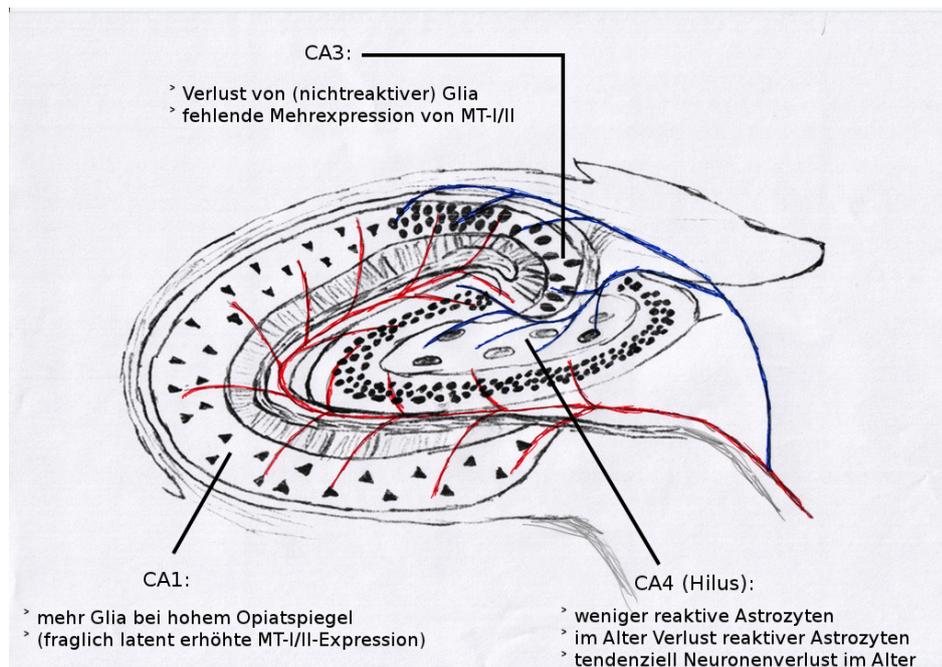


Abbildung 5.2.: Hippocampus, synoptische Übersicht der Veränderungen im Probandenkollektiv (modifiziert nach Duvernoy [31]); rot dargestellt der lange, blau der kurze Ast der Ushimura-Arterie

5.3. Abschließende Betrachtung

Die Metallothioneinisoform MT I/II agiert als Transportmolekül für Schwermetallionen mit hohem antioxidativem und neuroprotektivem Potential. Die Regulation ihrer Expression erfolgt in Abhängigkeit von einwirkenden exogenen Noxen. Neben direkter mechanischer, chemischer und thermischer Schädigung [26]; [25] sowie Schädigung durch ionisierende Strahlung ist im Tierexperiment die Induzierbarkeit von Metallothionein allgemein durch systemische Gabe von Opiaten belegt [12]. In unserer Arbeit konnten wir zeigen, dass der immunhistochemische Nachweis von Metallothionein I/II ein reproduzierbares und routinetaugliches Verfahren ist. Zur Vereinfachung der Auswertung und Datenerhebung hat sich die von uns entwickelte Software "TheCounter" (<http://www.thecounter.sf.net>) bewährt.

Der tierexperimentelle Befund einer Induzierbarkeit der Metallothioneinsynthese durch Opiate bestätigt sich in unseren Untersuchungen nicht vollständig. Mögliche Gründe liegen zum einen in den verschiedenen Versuchsbedingungen und Nachweismethoden. Eine weitere mögliche Erklärung für die vermeintliche Diskrepanz liegt im von uns durchgeführten selektiven Nachweis der Subspezies Metallothion-

5. Diskussion

ein I/II. Diese kommt, wie unsere Untersuchungen in Übereinstimmung mit der Literatur zeigen, nahezu ausschließlich in Astrozyten vor [6]; [22]. Die Rolle der neuronal gebundenen Isoform MT III als möglicher Marker für Abusus bedarf in Zukunft einer eingehenden Untersuchung. Darüber hinaus ist mittels immunhistochemischer Methoden die Änderung der Expression von MT I/II möglicherweise nicht ausreichend quantifizierbar, hier muss gegebenenfalls auf sensitivere Methoden wie Western- oder Northern-Blotting zurückgegriffen werden.

Im Gegensatz zur existierenden Literatur, in der ein relativ uniformes Reaktionsmuster auf chronische Exposition mit subletalen Opiatdosen berichtet wird [9], konnten wir zeigen, dass in unserem Probandenkollektiv insbesondere auf der Ebene der Glia differenzierte und subtile Reaktionen der einzelnen Hippocampusregionen nachweisbar sind. In Anlehnung an die klassische neuroanatomische und neuropathologische Nomenklatur können diese als selektive Vulnerabilität der Glia interpretiert werden. Wesentliche Befunde sind der mögliche Verlust der Fähigkeit zur kompensatorischen Metallothioneinsynthese in der Region CA3 der Probanden und der Verlust metallothioneinpositiver Astrozyten im Hilus gyri dentati. Diese können als Ausdruck einer erhöhten Vulnerabilität der Probanden und Vorstufe zur manifesten Schädigung im Sinne eines Neuronenuntergangs und einer Gliose gewertet werden. Tatsächlich ist im Probandenkollektiv im Hilus gyri dentati ein Trend zum Neuronenverlust mit zunehmendem Alter nachzuweisen. Damit werden die Beobachtungen von [9] gestützt. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass als Folge des fortgesetzten Abusus eine im Vergleich zur Normalbevölkerung höhere Vulnerabilität der eigentlich resistenten Region CA3 und des Hilus gyri dentati gegenüber oxidativem Stress resultiert mit Trend zum Neuronenverlust im Hilus gyri dentati.

Obwohl uns zur retrospektiven Analyse eine relativ kleine Stichprobe zur Verfügung stand, belegen die statistischen Verteilungsanalysen und die Übereinstimmungen mit der existierenden Literatur die Validität der von uns erhobenen Daten. Wir konnten zeigen, dass die Reaktionen auf den aus dem Opiatabusus resultierenden oxidativen Stress komplexer als bisher vermutet sind. Darüber hinaus liegt ein regionsspezifisches Reaktionsmuster vor. Wie bereits erwähnt sollte mittels quantitativer Methoden die Änderung der MT I/II-Expression weiter untersucht, sowie die Rolle von Metallothionein III näher beleuchtet werden, um ein noch besseres Verständnis der neuropathologischen und neuropathophysiologischen Mechanismen des Opiatabusus zu erreichen.

6. Zusammenfassung

Ausgangslage

Metallothioneine sind eine Klasse ubiquitärer cysteinreicher Transportproteine, die wichtige regulatorische Funktionen in der Homöostase von Schwermetallionen wahrnehmen. Darüber hinaus besitzen Metallothioneine ein hohes antioxidatives Potential. Zum heutigen Zeitpunkt sind vier Isoformen bekannt. Die Induzierbarkeit der Metallothioneinexpression durch verschiedene mechanische, thermische und chemische Noxen wurde ebenso nachgewiesen wie die antioxidative und neuroprotektive Potenz dieser Proteine. Tierexperimentell wurde ein Anstieg der Expression von Metallothionein in den Hippocampi von Wistarratten nach regelmäßiger Gabe von Morphin beobachtet. Der Hippocampusformation werden grundlegende Funktionen bei der Bildung des deklarativen Gedächtnisses zugeschrieben, ferner suggerieren neuere Forschungsergebnisse eine Interaktion mit dem limbischen System und somit eine mögliche Rolle bei Suchtkrankheiten. Die Rolle der Metallothioneine im menschlichen Hippocampus bei Opiatabusus wurde hingegen noch nicht systematisch untersucht.

Untersuchungsgut und Methodik

Gewebeproben aus den Hippocampi von 17 verstorbenen Probanden mit bekanntem Opiatabusus und 19 Kontrollpersonen wurden von uns dem immunhistochemischen Nachweis von Metallothionein-I/II unterzogen. Die Präparate wurden digital fotografiert und mit Hilfe eines selbst erstellten Computerprogrammes wurde die Anzahl der immunoreaktiven Zellen sowie der Neurone und Gliazellen in den Regionen CA1, CA3 und Hilus gyri dentati (CA4) ermittelt. Die Anzahl der MT-I/II-positiven Zellen, der Gesamtglia und der Neuronen wurde bestimmt. In der statistischen Analyse erfolgte ein Vergleich der Stichprobenmittelwerte von Probanden- und Kontrollkollektiv. Darüber hinaus untersuchten wir die Korrelation der er-

mittelten Häufigkeiten der einzelnen Zellpopulationen zu den Serumspiegeln von Morphin und Codein sowie zu Lebensalter, Geschlecht und Leichenliegezeit.

Ergebnisse

Das immunhistochemische Nachweisverfahren erwies sich als einfach und zuverlässig. Das verwendete Computerprogramm beschleunigte die Auswertung der großen Datenmenge erheblich. Die Metallothionein-I/II-Expression in den untersuchten Hippocampusregionen war, in Übereinstimmung mit der Literatur an Astrozyten gebunden wie wir durch den gleichzeitigen Nachweis des Glial fibrillary acidic protein (GFAP) mittels Immunfluoreszenz und konfokaler Lasermikroskopie zeigten. In Übereinstimmung mit der Literatur war in CA1 eine gliotische Reaktion nach Opiatabusus nachzuweisen. Darüber hinaus zeigten sich Hinweise auf eine adulte Neuroneogenese bei den Kontrollpersonen. Im Gegensatz zur Literatur ist in CA3 ein Verlust an Gliazellen und eine verminderte MT-I/II-Expression im Vergleich zu den Kontrollpersonen zu beobachten. Im Hilus gyri dentati war ein altersabhängig progredienter Verlust der metallothioneinpositiven Astrozyten im Probandenkollektiv sowie ein Trend zu einem altersabhängig zunehmenden Neuronenverlust nachzuweisen.

Schlussfolgerung

In dieser Arbeit untersuchten wir, ob Opiatabusus im menschlichen Hippocampus ebenfalls zum Anstieg der Metallothioneinkonzentration führt. Wir etablierten eine immunhistochemische Methode zum Nachweis von Metallothionein der Isoformen I und II in formalinfixiertem, paraffineingebettetem Gewebe. Im Gegensatz zu bisherigen Untersuchungen konnten wir ein differenziertes Reaktionsmuster der Hippocampusregionen CA1, CA3 und CA4 auf den Opiatabusus und den resultierenden oxidativen Stress belegen. Als Resultat des fortgesetzten Abusus beobachteten wir eine höhere Vulnerabilität der eigentlich resistenten Region CA3 und des Hilus gyri dentati gegenüber oxidativem Stress mit Trend zum Neuronenverlust im Hilus gyri dentati. Da der Nachweis des in der Literatur beschriebenen Anstiegs der Expression von Metallothionein-I/II mit immunhistochemischen Methoden nicht gelang, ist zunächst eine Quantifizierung von Metallothionein-I/II bei Opiatabusus nötig. Inwieweit die neuronenspezifische Isoform Metallothionein-III

6. Zusammenfassung

zu der tierexperimentell nachgewiesenen Mehrexpression beiträgt, sollte ebenfalls Gegenstand zukünftiger Untersuchungen sein.

Literaturverzeichnis

- [1] LOBMANN, R. ; VERTHEIM, U.: Explaining the effectiveness of heroin-assisted treatment on crime reductions. In: *Law and Human Behavior* 33 (2009), S. 83–95
- [2] VERTHEIM, U. ; BONORDEN-KLEIJ, K. ; DEGKWITZ, P. ; DILG, C. ; KÖHLER, W. ; PASSIE, T. ; SOYKA, M. ; TANGER, S. ; VOGEL, M. ; HAASEN, C.: Long-term effects of heroin-assisted treatment in Germany. In: *Addiction* 103 (2008), S. 960–967
- [3] PFEIFFER-GERSCHEL, T. ; KIPKE, I. ; FLÖTER, S. ; LIEB, C. ; RAISER, P. ; CASATI, A. ; KARACHALIOU, K.: *Bericht 2009 des nationalen REITOX-Knotenpunkts an die EBDD*. 2009
- [4] ACHANTA, P. ; THOMPSON, K. ; FUSS, M. ; MARTINEZ, J.: Gene expression changes in the rodent hippocampus following whole brain irradiation. In: *Neuroscience Letters* 418 (2007), S. 143–148
- [5] AMMON, S. ; MAYER, P. ; RIECHERT, U. ; TISCHMEYER, H. ; HOLLT, V.: Microarray analysis of genes expressed in the frontal cortex of rats chronically treated with morphine and after naloxone precipitated withdrawal. In: *Brain Res Mol Brain Res* 112 (2003), April, Nr. 1-2, S. 113–125
- [6] ASCHNER, M.: The functional significance of brain metallothioneins. In: *FASEB J* 10 (1996), August, Nr. 10, S. 1129–1136
- [7] STANKOVIC, R. ; CHUNG, R. ; PENKOWA, M.: Metallothioneins I and II: neuroprotective significance during CNS pathology. In: *Int J Biochem Cell Biol* 39 (2007), Nr. 3, S. 484–489
- [8] WEST, A. ; CHUAH, M. ; VICKERS, J. ; CHUNG, R.: Protective role of metallothioneins in the injured mammalian brain. In: *Rev. Neurosci.* 15 (2004), Nr. 3, S. 157–166

- [9] OEHMICHEN, M. ; MEIBNER, C. ; REITER, A. ; BIRKHOLZ, A.: Neuropathology in non-human immunodeficiency virus-infected drug addicts: hypoxic brain damage after chronic intravenous drug abuse. In: *Acta Neuropathol.(Berl)* 91 (1996), S. 642–646
- [10] BUTTNER, A. ; MALL, G. ; PENNING, R. ; WEIS, S.: The neuropathology of heroin abuse. In: *Forensic Sci.Int.* 113 (2000), September, Nr. 1-3, S. 435–442
- [11] CAI, L. ; CHERIAN, M.G. ; ISKANDER, S. ; LEBLANC, M. ; HAMMOND, R.R.: Metallothionein induction in human CNS in vitro: neuroprotection from ionizing radiation. In: *Int.J Radiat.Biol.* 76 (2000), Juli, Nr. 7, S. 1009–1017
- [12] FLORIANCZYK, B. ; STRYJECKA-ZIMMER, M.: Induction of metallothioneins by ethanol and morphine. In: *Ann.Univ Mariae.Curie Sklodowska [Med.]* 56:183-7. (2001), S. 183–187
- [13] SQUIRE, L. R. ; ZOLA, S. M.: Structure and function of declarative and nondeclarative memory systems. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 93 (1996), Nov, Nr. 24, S. 13515–13522
- [14] TISCH, S. ; SILBERSTEIN, P. ; LIMOUSIN-DOWSEY, P. ; JAHANSHAH, M.: The basal ganglia: anatomy, physiology, and pharmacology. In: *Psychiatr Clin North Am* 27 (2004), Dec, Nr. 4, S. 757–799
- [15] ZASTROW, M. von: A cell biologist's perspective on physiological adaptation to opiate drugs. In: *Neuropharmacology* 47 Suppl 1:286-92. (2004), S. 286–292
- [16] DRUMMER, O.H.: Postmortem toxicology of drugs of abuse. In: *Forensic Sci.Int.* 142 (2004), Juni, Nr. 2-3, S. 101–113
- [17] GYR, E. ; BRENNEISEN, R. ; BOURQUIN, D. ; LEHMANN, T. ; VONLANTHEN, D. ; HUG, I.: Pharmacodynamics and pharmacokinetics of intravenously, orally and rectally administered diacetylmorphine in opioid dependents, a two-patient pilot study within a heroin-assisted treatment program. In: *Int J Clin Pharmacol Ther* 38 (2000), S. 486–491
- [18] ROOK, E.J. ; HUITEMA, A.D. ; BRINK, W. van d. ; REE, J.M. van ; BEIJINEN, J.H.: Pharmacokinetics and pharmacokinetic variability of heroin and its

- metabolites: review of the literature. In: *Curr Clin Pharmacol* 1 (2006), S. 109–118
- [19] GEROSTAMOULOS, J. ; STAIKOS, V. ; DRUMMER, O.: Heroin-related deaths in Victoria: a review of cases for 1997 and 1998. In: *Drug Alcohol Depend.* 61 (2001), S. 123–127
- [20] HENGSTLER, J.G. ; PILCH, H. ; SCHMIDT, M. ; DAHLENBURG, H. ; SAGEMULLER, J. ; SCHIFFER, I. ; OESCH, F. ; KNAPSTEIN, P.G. ; KAINA, B. ; TANNER, B.: Metallothionein expression in ovarian cancer in relation to histopathological parameters and molecular markers of prognosis. In: *Int.J Cancer.* 20;95 (2001), März, Nr. 2, S. 121–127
- [21] ASCHNER, M. ; WEST, A.K.: The role of MT in neurological disorders. In: *J Alzheimers.Dis.* 8 (2005), November, Nr. 2, S. 139–145
- [22] CHUNG, R. S. ; HIDALGO, J. ; WEST, A. K.: New insight into the molecular pathways of metallothionein-mediated neuroprotection and regeneration. In: *J Neurochem* 104 (2008), Jan, Nr. 1, S. 14–20
- [23] MOCHEGANI, E. ; GIACCONI, R. ; FATTORETTI, P. ; CASOLI, T. ; CIPRIANO, C. ; MUTI, E. ; MALAVOLTA, M. ; DISTEFANO, G. ; BERTONI-FREDDARI, C.: Metallothionein isoforms (I+II and III) and interleukin-6 in the hippocampus of old rats: may their concomitant increments lead to neurodegeneration? In: *Brain Res.Bull.* 63 (2004), März, Nr. 2, S. 133–142
- [24] MASTERS, B.A. ; QUAIFFE, C.J. ; ERICKSON, J.C. ; KELLY, E.J. ; FROELICK, G.J. ; ZAMBROWICZ, B.P. ; BRINSTER, R.L. ; PALMITER, R.D.: Metallothionein III is expressed in neurons that sequester zinc in synaptic vesicles. In: *J Neurosci.* 14 (1994), S. 5844–5857
- [25] CAI, L. ; ISKANDER, S. ; CHERIAN, M.G. ; HAMMOND, R.R.: Zinc- or cadmium-pre-induced metallothionein protects human central nervous system cells and astrocytes from radiation-induced apoptosis. In: *Toxicol.Lett.* 146 (2004), Februar, Nr. 3, S. 217–226
- [26] CHUNG, R.S. ; ADLARD, P.A. ; DITTMANN, J. ; VICKERS, J.C. ; WEST, A.K. ; CHUAH, M.I.: Neuron-glia communication: metallothionein expression

- is specifically up-regulated by astrocytes in response to neuronal injury. In: *J Neurochem* 88 (2004), Jan, Nr. 2, S. 454–461
- [27] PENKOWA, M. ; FLORIT, S. ; GIRALT, M. ; QUINTANA, A. ; MOLINERO, A. ; CARRASCO, J. ; HIDALGO, J.: Metallothionein reduces central nervous system inflammation, neurodegeneration, and cell death following kainic acid-induced epileptic seizures. In: *J Neurosci.Res.* 79 (2005), Februar, Nr. 4, S. 522–534
- [28] LEE, J.Y. ; KIM, J.H. ; PALMITER, R.D. ; KOH, J.Y.: Zinc released from metallothionein-iii may contribute to hippocampal CA1 and thalamic neuronal death following acute brain injury. In: *Exp.Neurol.* 184 (2003), November, Nr. 1, S. 337–347
- [29] ZAMBENEDETTI, P. ; SCHMITT, H.P. ; ZATTA, P.: Metallothionein I-II immunocytochemical reactivity in Binswanger’s encephalopathy. In: *J Alzheimers.Dis.* 4 (2002), Dezember, Nr. 6, S. 459–466
- [30] ZATTA, P. ; ZAMBENEDETTI, P. ; MUSICCO, M. ; ADORNI, F.: Metallothionein-I-II and GFAP positivity in the brains from frontotemporal dementia patients. In: *J Alzheimers.Dis.* 8 (2005), November, Nr. 2, S. 109–116
- [31] DUVERNOY, H.M.: *The human hippocampus: an atlas of applied anatomy.* J.F. Bergmann, 1988. – 25–154 S. – ISBN 9783807003757
- [32] ZOLA-MORGAN, S. ; SQUIRE, L.R. ; AMARAL, D.G.: Human amnesia and the medial temporal region: enduring memory impairment following a bilateral lesion limited to field CA1 of the hippocampus. In: *J.Neurosci.* 6 (1986), Oktober, Nr. 10, S. 2950–2967
- [33] PU, L. ; BAO, G.B. ; XU, N.J. ; MA, L. ; PEI, G.: Hippocampal long-term potentiation is reduced by chronic opiate treatment and can be restored by re-exposure to opiates. In: *J Neurosci* 22 (2002), Mar, Nr. 5, S. 1914–1921
- [34] NESTLER, E. J.: Neurobiology. Total recall-the memory of addiction. In: *Science* 292 (2001), Jun, Nr. 5525, S. 2266–2267

- [35] WEBER, M. ; MODEMANN, S. ; SCHIPPER, P. ; TRAUER, H. ; FRANKE, H. ; ILLES, P. ; GEIGER, K.D. ; HENGSTLER, J.G. ; KLEEMANN, W.J.: Increased polysialic acid neural cell adhesion molecule expression in human hippocampus of heroin addicts. In: *Neuroscience* 138 (2006), Januar, Nr. 4, S. 1215–1223
- [36] GUESDON, J. L. ; TERNYNCK, T. ; AVRAMEAS, S.: The use of avidin-biotin interaction in immunoenzymatic techniques. In: *J Histochem Cytochem* 27 (1979), Aug, Nr. 8, S. 1131–1139
- [37] JASANI, B. ; ELMES, M. E.: Immunohistochemical detection of metallothionein. In: *Methods Enzymol* 205 (1991), S. 95–107
- [38] SKROCH, P. ; BUCHMAN, C. ; KARIN, M.: Regulation of human and yeast metallothionein gene transcription by heavy metal ions. In: *Prog Clin Biol Res* 380 (1993), S. 113–128
- [39] LAZO, J.S. ; BASU, A.: Metallothionein expression and transient resistance to electrophilic antineoplastic drugs. In: *Semin.Cancer Biol.* 2 (1991), August, Nr. 4, S. 267–271
- [40] JUNQUEIRA, L.C. ; CARNEIRO, J.: *Basic Histology. Text and Atlas (Basic Histology)*. McGraw-Hill, 2003
- [41] CHERIAN, M. G. ; BANERJEE, D.: Immunohistochemical localization of metallothionein. In: *Methods Enzymol* 205 (1991), S. 88–95
- [42] WARNKE, R. ; LEVY, R.: Detection of T and B cell antigens hybridoma monoclonal antibodies: a biotin-avidin-horseradish peroxidase method. In: *J Histochem Cytochem* 28 (1980), Aug, Nr. 8, S. 771–776
- [43] SHIMADA, A. ; UEMURA, T. ; YAMAMURA, Y. ; KOJIMA, S. ; MORITA, T. ; UMEMURA, T.: Localization of metallothionein-I and -II in hypertrophic astrocytes in brain lesions of dogs. In: *J. Vet.Med.Sci.* 60 (1998), März, Nr. 3, S. 351–358
- [44] ASCHNER, M.: Metallothionein (MT) isoforms in the central nervous system (CNS): regional and cell-specific distribution and potential functions as an antioxidant. In: *Neurotoxicology* 19 (1998), August, Nr. 4-5, S. 653–660

- [45] FRANKE, H. ; KRUGEL, U. ; GROSCHE, J. ; HEINE, C. ; HARTIG, W. ; ALLGAIER, C. ; ILLES, P.: P2Y receptor expression on astrocytes in the nucleus accumbens of rats. In: *Neuroscience* 127 (2004), Nr. 2, S. 431–441
- [46] SHAPIRO, S.S. ; WILK, M.B.: An Analysis of Variance Test for Normality (Complete Samples). In: *Biometrika* 52 (1965), S. 591–611
- [47] DEAN, R.B. ; DIXON, W.J.: Simplified Statistics for Small Numbers of Observations. In: *Analytical Chemistry* 23 (1951), S. 636–638
- [48] FAY, M.P. ; PROSCHAN, M.A.: Wilcoxon-Mann-Whitney or t-test? On assumptions for hypothesis tests and multiple interpretations of decision rules. In: *Statistics Surveys* 4 (2010), S. 1–39
- [49] ROGERS, J.L. ; NICEWANDER, W.J.: Thirteen Ways to look at the Correlation Coefficient. In: *The American Statistician* 42 (1988), S. 59–66
- [50] DITTMANN, J. ; FUNG, S.J. ; VICKERS, J.C. ; CHUAH, M.I. ; CHUNG, R.S. ; WEST, A.K.: Metallothionein biology in the ageing and neurodegenerative brain. In: *Neurotox.Res.* 7 (2005), Nr. 1-2, S. 87–93
- [51] ATILA, E. ; YASARGIL, G. ; ROTH, P.: Microsurgical anatomy of the hippocampal arteries. In: *Journal of Neurosurgery* 79 (1993), S. 256–265
- [52] CRUZ-SANCHEZ, F.F. ; GIRONES, X. ; ORTEGA, A. ; ALAMEDA, F. ; LA-FUENTE, J.V.: Oxidative stress in Alzheimer's disease hippocampus: A topographical study. In: *Journal of the Neurological Sciences* 299 (2010), S. 163–167
- [53] PEARSON, T. ; NURITOVA, F. ; CALDWELL, D. ; DALE, N. ; FRENGUELLI, B. G.: A depletable pool of adenosine in area CA1 of the rat hippocampus. In: *J Neurosci* 21 (2001), Apr, Nr. 7, S. 2298–2307
- [54] VALLET, P.G. ; CHARPIOT, A.: Cerebral hippocampic ischemia, metabolic disturbances and neuronal death. In: *L'Encéphale* 20 (1994), S. 131–137
- [55] GE, S. ; GOH, E.L. ; SAILOR, K.A. ; KITABATAKE, Y. ; MING, G.L. ; SONG, H.: GABA regulates synaptic integration of newly generated neurons in the adult brain. In: *Nature* 439 (2005), Dezember, S. 589–593

- [56] KAHN, L. ; ALONSO, G. ; NORMAND, E. ; MANZONI, O.J.: Repeated morphine treatment alters polysialylated neural cell adhesion molecule, glutamate decarboxylase-67 expression and cell proliferation in the adult rat hippocampus. In: *Eur.J Neurosci.* 21 (2005), Januar, Nr. 2, S. 493–500
- [57] KEMPERMANN, G. ; FABEL, K. ; EHNINGER, D. ; BABU, H. ; LEAL-GALICIA, P. ; GARTHE, A. ; WOLF, S.A.: Why and how physical activity promotes experience-induced brain plasticity. In: *Front Neurosci* 4 (2010), S. 189
- [58] KEMPERMANN, G. ; KUHN, H.G. ; GAGE, F. H.: More hippocampal neurons in adult mice living in an enriched environment. In: *Nature* 386 (1997), S. 493–495
- [59] KEMPERMANN, G.: Seven principles in the regulation of adult neurogenesis. In: *European Journal of Neuroscience* 33 (2011), S. 1018–1024
- [60] MUSSHOF, F. ; TRAFKOWSKI, J. ; MADEA, B.: Validated assay for the determination of markers of illicit heroin in urine samples for the control of patients in a heroin prescription program. In: *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 811 (2004), Nov, Nr. 1, S. 47–52

7. Thesen

1. Heroinmissbrauch stellt durch die Folgeerkrankungen und die Beschaffungskriminalität ein erhebliches soziales, gesundheitspolitisches und volkswirtschaftliches Problem dar.
2. Neben vielversprechenden symptomatischen Ansätzen wie der heroïnassistierten Therapie muss das kausale Verständnis der Abhängigkeitsausbildung vordergründiges Ziel aller Bemühungen zur Bekämpfung des Heroinmissbrauchs sein.
3. Zu den regelhaft geschädigten Zielstrukturen bei chronischem Abusus gehört die Hippocampusformation als funktionelle Schnittstelle von Gedächtnisbildung und Belohnungssystem.
4. Die Proteinklasse der Metallothioneine hat sich als ein wichtiger protektiver Faktor bei oxidativem Stress wie zum Beispiel bei opiatinduzierter Asphyxie erwiesen.
5. Da im Tiermodell eine Induktion der Metallothioneine im zentralen Nervensystem durch Opiate nachgewiesen wurde, ist eine zentrale Rolle dieser Proteinklasse in den Pathomechanismen bei Opiatabusus zu vermuten.
6. Die pathophysiologische Funktion der Metallothioneine bei Opiatabusus im Menschen wurde bisher nicht systematisch untersucht.
7. Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine robuste Methode zum Nachweis von Metallothionein I/II im zentralen Nervensystem etabliert.
8. Mit Hilfe des erarbeiteten immunhistochemischen Protokolls gelingt zuverlässig der Nachweis dieser Metallothioneinisoform im formalinfixierten, paraffineingebetteten Gewebe.

9. Für die computergestützte Erfassung der Häufigkeit der verschiedenen Zellpopulationen in den immunhistochemischen Präparaten und histologischen Präparaten allgemein eignet sich das von uns entwickelte Computerprogramm insbesondere bei hohem Datenaufkommen.
10. Unsere Untersuchung zeigt, dass Metallothionein I/II, wie in der Literatur belegt, im ZNS praktisch ausschließlich in Astrozyten vorkommt.
11. Der mit der Literatur übereinstimmende Nachweis einer Gliose und eines Trends zur erhöhten Metallothioneinexpression in der vulnerablen CA1-Region des Hippocampus untermauern die Validität der von uns erhobenen Daten.
12. In den Regionen CA3 und CA4 zeigte sich ein komplexeres Bild mit fehlendem Nachweis einer Metallothioneininduktion und sogar einem Rückgang der Expression in CA4.
13. Die eigentlich nur intermediär hypoxieempfindliche Region CA4 reagiert erstaunlicherweise zusätzlich mit einem Trend zum Neuronenverlust.
14. Unsere Arbeit zeigt erstmals die regionale Verteilung der bisher nur überlagert für den gesamten Hippocampus erfassten Reaktionsmuster Gliose, Neuronenuntergang und Änderung der Metallothioneinexpression.
15. In Analogie zur selektiven Vulnerabilität der Neurone in den einzelnen Hippocampusregionen existiert ein regional spezifisches Reaktionsmuster der Glia.
16. Da eine Quantifizierung des zellulären Metallothioneingehalts mittels Immunhistochemie nicht suffizient möglich ist, sollte diese mittels Blottingverfahren erfolgen.
17. Zur weiteren Verbesserung des pathophysiologischen Verständnisses des Heroinabusus sollte die Rolle der neuronal gebundenen Isoform Metallothionein III ebenfalls untersucht werden.

A. Lebenslauf

Persönliche Daten

Andreas Peter Erler

geb. am 07.08.1978 in Erfurt

römisch-katholisch

in eheähnlicher Gemeinschaft lebend, drei Kinder

Schulbildung

1985-1991 Polytechnische Oberschule "Fritz Gäbler" Erfurt

1991-1997 Gymnasium "Heinrich Hertz" Erfurt

1997 Abitur

Zivildienst

1998-1999 DRK Blutspendedienst Thüringen, Institut für Transfusionsmedizin Erfurt

Hochschulstudium

1999-2006 Studium der Humanmedizin, Universität Leipzig

2001 Ärztliche Vorprüfung

2002 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

2004 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

2005-2006 Praktisches Jahr

Städtisches Klinikum "St. Georg" Leipzig, I. Klinik f. Innere Medizin

Städtisches Klinikum "St. Georg" Leipzig, II. Klinik f. Innere Medizin

Städtisches Klinikum "St. Georg" Leipzig, Klinik f. Viszeralchirurgie

Städtisches Klinikum "St. Georg" Leipzig, Klinik f. Thorax- u. Gefäßchirurgie

Universität Leipzig, Institut für Rechtsmedizin

2006 Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

Approbation als Arzt

Ärztliche Tätigkeit

- 2006 Antritt einer Assistenzarztstelle im Fach Diagnostische Radiologie
am Institut für Diagnostische und Interventionelle Radiologie
der Caritasklinik St. Theresia in Saarbrücken
Vorwiegende Tätigkeit in der sonographischen Diagnostik
- 2007 Klinisches Fortbildungsjahr im Fach Strahlentherapie
in der Klinik für Strahlentherapie und Radioonkologie
am Klinikum St. Georg in Leipzig
Tätigkeit als Stationsarzt und in der ambulanten Sprechstunde
Planung und Durchführung von konventionellen Bestrahlungen
- 2008 Fortsetzung der Weiterbildung in der Diagnostischen Radiologie
in der Klinik für Bildgebende Diagnostik und Interventionsradiologie
an den Berufsgenossenschaftlichen Kliniken Bergmannstrost Halle
Schwerpunkte muskuloskelettale und neuroradiologische Diagnostik
mittels Schnittbildverfahren und Sonographie
- 2012 Abschluss der Weiterbildung und Qualifikation zum Facharzt für Radiologie

Leipzig, 20.01.2013

Andreas Peter Erler

B. Selbstständigkeitserklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne unzulässige Hilfe Dritter angefertigt habe. Ich erkläre weiter, keine anderen als die in der Arbeit angegebenen und verwendeten Hilfsmittel verwendet zu haben.

Leipzig, 20.01.2013

Andreas Peter Erler

C. Erklärung über frühere Promotionsversuche

Ich habe bisher an keiner in- oder ausländischen Universität um die Zulassung zum Promotionsverfahren nachgesucht, noch wurde diese oder eine andere Arbeit als Dissertation vorgelegt.

Leipzig, 20.01.2013

Andreas Peter Eler