

Aus der Neurologischen Klinik und Poliklinik
der Universität Würzburg

Direktor: Professor Dr. med. Jens Volkmann

Stereologische Untersuchung der Gesamtanzahl dopaminergener Neurone in der
Substantia Nigra von C57BL/6 Mäusen unter Benutzung des „*optical
fractionator*“ und einer Standard-Mikroskopieausrüstung

Inaugural – Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde der

Medizinischen Fakultät

der

Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von

David Cheong

aus Dortmund

Würzburg, Oktober 2017

Referent: Priv.-Doz. Dr. Chi Wang Ip

Korreferent: Univ.-Prof. Dr. Rudolf Martini

Dekan: Prof. Dr. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 11.06.2018

Der Promovend ist Zahnarzt

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1 Was ist Stereologie?	1
1.2 Stereologische Definitionen	2
1.2.1 Parameter	2
1.2.2 Anzahl und Bezugspunkt	2
1.2.3 Zählrahmen	3
1.2.4 Grenz-Zone	5
1.2.5 Randeffekt	5
1.2.6 Systematisch zufällige Probenauswahl	6
1.3 Untersuchungsverfahren	6
1.3.1 Modell-basiertes Verfahren	6
1.3.2 Design-basiertes Verfahren	7
1.4 Disektor	8
1.4.1 Allgemeine Informationen	8
1.4.2 Der physikalische Disektor	10
1.4.3 Der optische Disektor	11
1.4.4 Numerische Dichte ‚Nv‘ und Cavalieri’s Prinzip	14
1.5 Fraktionator	14
1.5.1 Allgemeine Informationen	14
1.5.2 Der physikalische Fraktionator	15
1.5.3 Der optische Fraktionator	15
1.6 Der Fehlerkoeffizient (CE)	18
1.7 Morbus Parkinson	20
1.8 Die Rolle der dopaminergen Neurone: die Substantia Nigra	20
1.9 Ziel der Arbeit	22

2. Material und Methoden	24
2.1 Verwendete Tiere	24
2.2 Materialien und Chemikalien	24
2.3 Spezielle Ausrüstungen	26
2.4 Intrakardiale Perfusion und Entnahme des Hirngewebes	27
2.5 Schneiden der Blöcke am Kryostat	27
2.6 Immunhistologische Färbung mittels Tyrosin-Hydroxylase (Prinzip „flee-floating“)	29
2.7 Erwartungstreue stereologische Auswertung	33
2.7.1 Auswertung mit dem Axiophot-2	34
2.7.2 Auswertung mit dem Stereo Investigator	57
3. Ergebnisse	62
3.1 Schätzung mit dem Axiophot-2, Visiview und ImageJ	62
3.2 Schätzung mit dem Stereo Investigator	62
3.3 Vergleich der beiden stereologischen Methoden	62
4. Diskussion	65
4.1 Diskussion der Methodik	66
4.2 Diskussion der Ergebnisse	73
4.3 Schlussfolgerung	76
5. Zusammenfassung	77
6. Literaturverzeichnis	78

1. Einleitung

1.1 Was ist Stereologie?

Stereologie stammt aus den griechischen Wörtern ‚*stereos*‘ für „fest/körperlich“ und ‚*logos*‘ für „Lehre“ (Altunkaynak et al., 2012). Sie befasst sich also mit der räumlichen Interpretation von festen Körpern wie Partikel beziehungsweise Zellen, die unter dem Mikroskop innerhalb von histologischen und zweidimensionalen Schnittpräparaten erscheinen (Altunkaynak et al., 2012). Aus diesen zweidimensionalen Schnitten sollen dreidimensionale, biologische Strukturen – wie zum Beispiel das menschliche Gehirn - beurteilt werden können (Gundersen et al., 1988a; Gundersen et al., 1988b; Evans et al., 2004).

Stereologische Untersuchungsverfahren verwenden spezielle Methoden, um durch erwartungstreue Schätzungen (eng. „unbiased“) einen großen Umfang an Informationen über die Partikelanzahl (West et al., 1991), die Partikelgröße (Gundersen, 1986), das Partikelvolumen (Altunkaynak und Altunkaynak, 2007) und die Partikeldichte (Altunkaynak et al., 2012) einer Gewebestruktur zu erhalten. Von allen Schätzungsmethoden wird diejenige ausgewählt, bei deren Anwendung das Vorkommen systematischer Fehler (eng. „bias“) möglichst geringgehalten und dafür ein präziseres Untersuchungsergebnis erzielt wird (Mouton, 2002; Schmitz und Hof, 2005). Bei der Bestimmung der Partikelanzahl werden die zu untersuchenden Partikel eines relevanten Bereiches innerhalb einer biologischen Struktur, das sogenannte Referenzvolumen (eng. „reference volume“), mithilfe eines virtuellen Programmes wie dem Zählrahmen (eng. „counting frame“) gezählt, woraufhin das Gesamtergebnis anschließend in einfache mathematische Formeln eingesetzt wird. Dadurch erreicht man eine erwartungstreue Schätzung über die Partikelanzahl repräsentativ für die gesamte Struktur (Howard und Reed, 2005; West et al., 2012). Die Stereologie spielt demnach eine wichtige Rolle bei der Überprüfung von experimentellen Ergebnissen in der biologischen Forschung, speziell bei der Forschung von Gehirnzellen. Sie liefert eine effektive und statistische Annäherung des erhobenen beziehungsweise geschätzten Ergebnisses zum anzustrebenden realen Wert und trifft anhand quantitativer Informationen wie der pathologisch

veränderten Partikelanzahl Aussagen über die Entstehung, den Verlauf und die Konsequenzen einer Krankheit.

1.2 Stereologische Definitionen

1.2.1 Parameter

Parameter beschreiben beispielsweise die Anzahl, Länge, Oberfläche oder das Volumen von Partikeln oder Gewebestrukturen in einem menschlichen oder tierischen Organismus. Unterschieden wird zwischen zwei Ordnungen.

Die Stereologie der 1. Ordnung schätzt Parameter innerhalb einer bestimmten Region innerhalb einer biologischen Struktur. Beispiele hierfür sind das Volumen von zerebralen Strukturen (Elfaki et al., 2011) oder die Anzahl von Neuronen innerhalb eines Hirngebietes (Baquet et al., 2009), das Volumen der Leber (Altunkaynak und Altunkaynak, 2007), die Länge und das Volumen der Kapillaren von Nierenglomeruli (Miller und Meyer, 1990) und von Blutgefäßen (Turgut et al., 2009), die volumetrische Beurteilung der Lungenexpansion (Basoglu et al., 2007) oder das Volumen eines Hirntumors (Somnez et al., 2010).

Die Stereologie der 2. Ordnung beschäftigt sich hingegen mit den Beziehungen zwischen den Partikeln untereinander, beispielsweise mit dem Verhältnis einer quantitativen Menge zu einem Einheitsvolumen, auch Dichte genannt. Beispielhaft hierfür sind die Volumendichte (Aguila et al., 1998; Kiki et al., 2007), die Längendichte (Larsen et al., 1998) und die numerische Dichte (Gundersen, 1977).

1.2.2 Anzahl und Bezugspunkt

Die Funktionsfähigkeit eines Organs ist immer durch die Interaktion und das Verhältnis von seinem Strukturgewebe zu den Partikeln bedingt. Beispielsweise wird der Einfluss von psychologischem Stress auf den Hippocampus durch die Schätzung der Anzahl von hippocampalen Nervenzellen erforscht (Keuker et al., 2001; Rosanne et al., 2007). Weitere Beispiele beinhalten die Zählungen der Anzahl von Nervenzellen in der Substantia Nigra (Baquet et al., 2009), von

Synapsen in einer Hirnregion (Geinisman et al., 1996) und von renalen Strukturen (Altunkaynak et al., 2008). Um diese Zusammenhänge zu begreifen, ist es notwendig, die Anzahl von bestimmten Partikeln in diesen Strukturen so genau wie nur möglich zu bestimmen. Die Gesamtanzahl von Partikeln in einem gegebenen Referenzvolumen kann entweder durch den Fraktionator oder durch die Cavalieri-Disektor-Kombination, bei dem die numerische Dichte ‚Nv‘ aus der Disektor-Methode mit dem Referenzvolumen ‚Vref‘ aus dem Cavalieris’s Prinzip multipliziert wird, geschätzt werden (Gundersen et al., 1988a; Gundersen et al., 1988b). Nähere Beschreibungen dazu werden in den nachfolgenden Kapiteln aufgeführt.

Bei allen Methoden müssen die Merkmale der zu zählenden Partikeln deutlich zu identifizieren sein, so dass ein genauer Bezugspunkt (eng. „unique point“) festzulegen ist. Dies kann die Spitze der Zelle (sprich der erste Oberflächenanteil, der beim Fokussieren von oben scharf zu sehen ist), die Spitze des Nukleus oder der Nukleolus der Zelle sein (Sterio, 1984; Gundersen et al., 1988b; West et al., 1991; Howard und Reed, 2005). Nur so kann möglichst verhindert werden, dass Zellen aus Versehen doppelt gezählt werden (Kaplan et al., 2012).

Die Partikelanzahl kann unabhängig von der Dimension des Untersuchungsobjektes geschätzt werden, da der Bezugspunkt eines jeden Partikels aus jeder Perspektive gleich aussieht (Altunkaynak et al., 2012, Kaplan et al., 2012). Daher können die Gewebeschnitte bei bestimmten Methoden in beliebiger Richtung, sprich in beliebigem Querschnitt der zu untersuchenden Partikel entnommen werden (Gundersen, 1986; West et al., 1991; Howard und Reed, 2005).

1.2.3 Zählrahmen

Der von Gundersen 1977 entwickelte Zählrahmen ist unter dem Namen „the unbiased counting frame“ bekannt und ist in der sterologischen Wissenschaft zur systematischen Zählung von Partikeln innerhalb eines Referenzvolumens weit verbreitet (Gundersen, 1977; West et al., 1991; Howard und Reed, 2005). Der Zählrahmen ist typischerweise als Quadrat angegeben, der den für die Zählung

relevanten Bereich innerhalb eines mikroskopischen Sichtfeldes eingrenzt (Keuker et al., 2001). Er besteht üblicherweise aus roten und grünen Linien, **siehe Abbildung 1**. Die roten Linien begrenzen als Ausschlusslinien (eng. „exclusion lines“) die ausgeschlossene Region, während die grünen Linien den akzeptierten Bereich umfassen und die Einschlusslinien (eng. „inclusion lines“) darstellen (Kaplan et al., 2012). Teilweise verlaufen die Ausschlusslinien oberhalb und unterhalb des Rahmens weiter und dienen als verlängerte Begrenzung der ausgeschlossenen Region, **siehe Abbildung 1**. Die Zählregeln mit diesem Rahmen sind folgendermaßen zusammengefasst (Sterio, 1984; Pakkenberg und Gundersen, 1988; Gundersen et al., 1988b, West et al., 1991):

1. Partikel, die komplett innerhalb des Rahmens liegen und keine seiner Linien und Ecken berühren, werden gezählt
2. Partikel, die eine Ausschlusslinie (rot) oder ihre Verlängerung berühren oder schneiden, werden nicht gezählt
3. Partikel, die eine Einschlusslinie (grün) berühren oder schneiden, werden gezählt
4. Partikel, die eine Einschlusslinie (grün) und auch eine Ausschlusslinie (rot) beziehungsweise ihre Verlängerung berühren oder schneiden, werden nicht gezählt

Die Partikel werden außerdem nur nach ihrem Bezugspunkt, das heißt zum Beispiel nach der obersten Spitze der Zellen, gezählt (Kaplan et al., 2012).

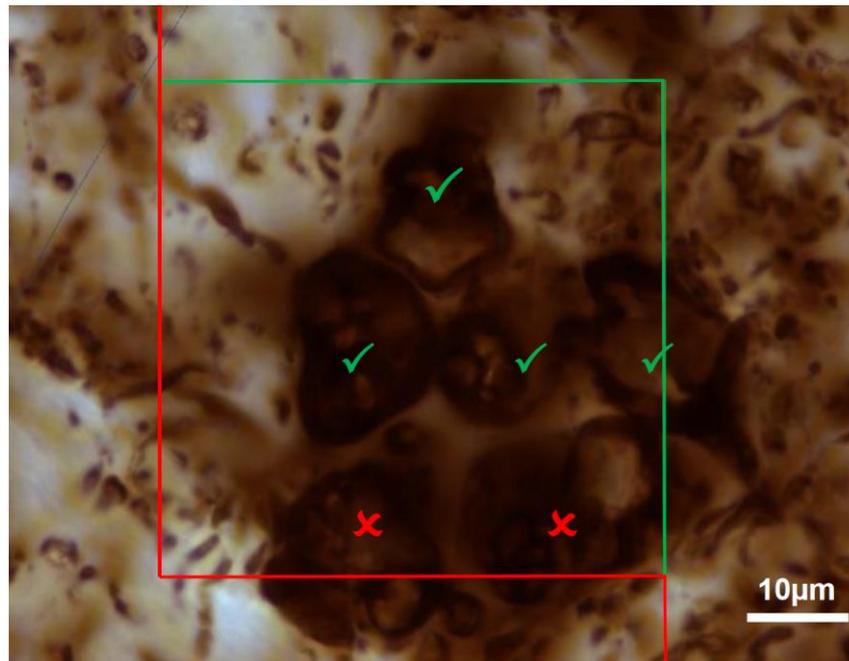


Abbildung 1: Der Zählrahmen nach Gundersen (1977). Auch mithilfe des Zählrahmens werden nur die Partikel gezählt, die die Voraussetzungen der Zählregeln erfüllen.

1.2.4 Grenz-Zone

Die Grenz-Zone (eng. „guard zone“) beschreibt einen kleinen Geweberaum an den Oberflächen eines histologischen Schnittes nach abgeschlossener histologischer Färbung, in dem keinerlei stereologische Untersuchungen und somit keine Zählvorgänge stattfinden (Mouton, 2002). Hierdurch werden Artefakte (eng. „lost caps“), die vor allem während des Gewebeschnittens entstehen, bei der Zählung ausgeschlossen, wodurch es nicht zu einer falschen Über- oder Unterschätzung der Partikelanzahl an der Oberfläche kommt (Mouton, 2002; Baryshnikova et al., 2006).

1.2.5 Randeffekt

Das mikroskopische Sichtfeld ist je nach Vergrößerung lediglich auf eine bestimmte Fläche beschränkt. Zu zählende Partikel liegen unter anderem nur teilweise im sichtbaren Bereich, während ein anderer Teil gar nicht zu sehen ist. Dieses Phänomen wird als Randeffekt (eng. „edge effect“) bezeichnet und kann die Eindeutigkeit einer Zählung erschweren (Gundersen, 1977).

1.2.6 Systematisch zufällige Probenauswahl

Stereologische Untersuchungen sind aus arbeits- und zeittechnischer Sicht sehr aufwändig, und es ist praktisch nicht möglich, alle Schnitte einer gesamten Struktur einzeln zu untersuchen und alle Partikel darin zu zählen (Kaplan et al., 2012). Es müssen für die quantitative Untersuchung daher bestimmte Abschnitte stichprobenartig ausgesucht werden, welche eine repräsentative Aussage über die Gesamtstruktur treffen können (Kaplan et al., 2012; Altunkaynak et al., 2012). Dabei muss gleichzeitig gewährleistet werden, dass jeder Bereich innerhalb der Struktur mit einer jeweils gleich hohen Wahrscheinlichkeit untersucht werden kann (Gundersen und Jensen, 1987; Mouton, 2002). Eine vernünftige Untersuchung erfordert daher eine systematische und dennoch zufällige Probenauswahl, auch ‚SRS‘ (eng. „Systematic Random Sampling“) genannt (Gundersen et al., 1999; Glaser et al., 2007; Canan et al., 2008; McArt et al., 2009). Dabei beginnt die Zählung mit einem zufälligen Startpunkt innerhalb des ersten vorbestimmten Untersuchungsintervalls und wird von dort aus im selben konstanten Intervall systematisch bis zum Ende beibehalten (Howard und Reed, 2005; Glaser et al., 2007; Canan et al., 2008). Auf diese Weise erübrigt sich eine Untersuchung der kompletten Struktur. Vielmehr weist jede ihrer Regionen nun die gleiche Wahrscheinlichkeit auf, einbezogen zu werden. Es werden daher alle Schnitte benötigt, wobei nur ein Teil von ihnen tatsächlich untersucht wird. Der randomisierte Startpunkt kann durch eine einfache Zufallszahlentabelle oder ein Computerprogramm bestimmt werden (Altunkaynak et al., 2012). Die Festlegung des für die Untersuchung angemessenen Untersuchungsintervalls erfolgt zumeist nach Durchführung einer erfolgreichen Pilotuntersuchung, bei der mehrere vorbestimmte Untersuchungsintervalle im Vorfeld ausgetestet werden und anschließend auf ein geeignetes festgelegt wird (Kaplan et al., 2012).

1.3 Untersuchungsverfahren

1.3.1 Modell-basiertes Verfahren

Im modell-basierten Verfahren (eng. „model-based stereology“) werden die aus stereologischen Untersuchungen erhobenen Ergebnisse nachträglich durch

mathematische Formeln angepasst, welche geometrische Informationen über die zu untersuchenden Zellen beinhalten, um mögliche Untersuchungsfehler nach der abgeschlossenen Zählung zu korrigieren. Ein Beispiel für die Anwendung ist die Abercrombie-Methode (Abercrombie, 1946; German und Manaye, 1993; Baquet et al., 2009). Alle sichtbaren Zellen innerhalb von dünnen Schnitten werden zunächst zusammengezählt. Mit mathematischen Formeln berechnet man dann die Gesamtanzahl der Zellen (Abercrombie, 1946). Bestimmte Informationen müssen vorab bekannt sein, beispielsweise die Partikelgröße in der Z-Ausrichtung (German und Manaye, 1993). Eine präzise Gesamtanzahl ist trotzdem schwierig zu ermitteln, denn sie hängt stark davon ab, wie gut die Formeln die tatsächlichen Eigenschaften der zu untersuchenden Partikel wiedergeben, was wiederum davon abhängt, wie viele stereologische Untersuchungsfehler vorhanden waren (West et al., 1991; West, 1999; Mouton, 2002). Das modell-basierte Verfahren liefert somit nur eine eingeschränkte Annäherung der erhobenen Daten zu den tatsächlichen geometrischen Werten. Im ungünstigen Fall kann das Ergebnis stark vom tatsächlichen Wert abweichen, so dass die gefundenen Werte in der Praxis so gut wie bedeutungslos wären (Altunkaynak et al., 2012), **siehe Abbildung 2**. Daher wird das modell-basierte Verfahren meist durch das folgende erwartungstreue design-basierte Verfahren abgelöst (Schmitz und Hof, 2005).

1.3.2 Design-basiertes Verfahren

Beim design-basierten Verfahren (eng. „design-based stereology“) ist eine Analyse von Zellen meistens unabhängig von ihrer Größe, Form, räumlichen Ausrichtung und räumlichen Verteilung möglich. Ihre stereologischen Methoden sind somit ‚*a priori*‘ so gestaltet, dass sie, im Gegensatz zum modell-basierten Verfahren, keine geometrischen Informationen über die zu untersuchenden Zellen im Vorfeld benötigen (Dorph-Petersen et al., 2001; Keuker et al., 2001; West, 2002; Schmitz und Hof, 2005). Die erhobenen Werte nähern sich durch eine ständige Wiederholung von Untersuchungsschritten gemäß der systematisch zufälligen Probenauswahl allmählich dem wirklichen Wert an (West et al., 1991; Altunkaynak et al., 2012), **siehe Abbildung 2**. Durch diese

Methoden werden potentielle und systematische Fehlerquellen zwar nicht komplett, doch zumindest auf ein Minimum reduziert, so dass sich die geschätzten und berechneten Werte aus den Ergebnissen nicht mehr so groß vom wahren, anzustrebenden Wert unterscheiden (West et al., 1991; Howard und Reed, 2005; Mühlfeld et al., 2010). Für die Analyse des Zentralen Nervensystems sowie von anderen Organen und Gewebestrukturen haben design-basierte Verfahren wesentlich zum Verständnis der funktionellen und pathologischen Morphologie des Körpers beigetragen (Pakkenberg et al., 1991; Koprach et al., 2011, West et al., 1991).

Die nachfolgend aufgeführten Methoden – der Disektor und der Fraktionator – basieren alle auf dem design-basierten Verfahren.

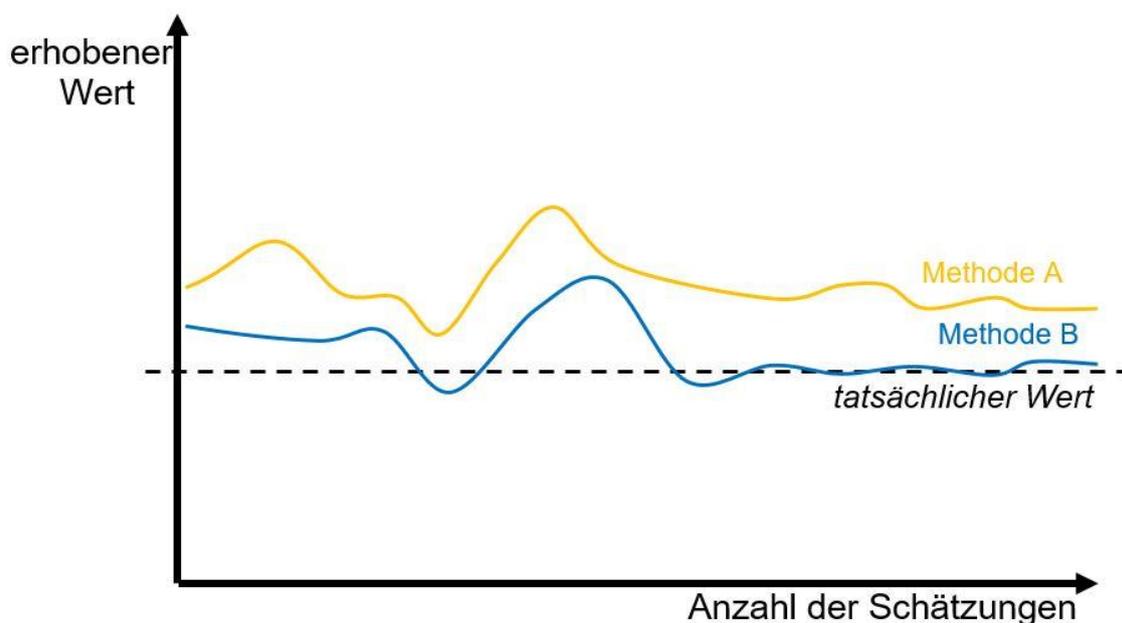


Abbildung 2: Methode A stellt ein modell-basiertes Verfahren dar und zeigt eine systematische Abweichung vom wirklichen Wert mit zunehmender Zählprozedur. Methode B ist dagegen ein design-basiertes Verfahren und nähert sich bei wiederholter Prozedur dem wirklichen Wert an und liefert somit ein erwartungstreues Endergebnis (modifiziert nach und genehmigt durch Altunkaynak et al., 2012).

1.4 Disektor

1.4.1 Allgemeine Informationen

Mithilfe des Disektors (eng „disector“) lassen sich Partikel in einem dreidimensionalen Volumen innerhalb von Geweben auf eine einfache Art und

Weise unter dem Mikroskop zählen. Jenes Volumen wird von zwei aufeinanderfolgenden Schnitten begrenzt, die nah aufeinanderliegen und ihre Schnittoberflächen in der Z-Achse um eine bestimmte Distanz voneinander getrennt sind (Sterio, 1984). Der englische Begriff „disector“ leitet sich deshalb aus der Kombination der Wörter „di“ für zwei und „section“ für Schnitt oder Ausschnitt ab (Kaplan et al., 2012). Mit der geschätzten Partikelanzahl in einem gesamten Disektor-Volumen lässt sich die numerische Dichte ‚Nv‘ bestimmen, welche dann anschließend für die Berechnung der Partikelanzahl in der gesamten Struktur verwendet wird. Dieses Vorgehen wird auch als Cavalieri-Disektor-Kombination bezeichnet (Gundersen, 1986; Howard und Reed, 2005).

Die bereits 1932 von William R. Thompson beschriebenen Grundlagen dieser Methode wurden von Cruz Orive (1980) wiederaufgegriffen, als man nach einer Möglichkeit suchte, in einem definierten Volumen eines Gewebes die Anzahl von Zellen möglichst genau und ohne großen Zeit- und Arbeitsaufwand zu bestimmen (Cruz Orive, 1980). Später entwickelte Sterio (1984) eine dreidimensionale Zählmethode für eine erwartungstreue Schätzung der Anzahl und Größe von beliebigen Partikeln in einem definierten Volumen und gilt somit als revolutionärer Begründer der ersten modernen Disektor-Methode (Sterio, 1984; Geuna, 2005). Seine Methode zielt genau auf die Zählung von Partikeln teilweise oder gänzlich innerhalb des Zählrahmens ab, welche auch nur in einem der beiden histologischen Schnitte auftreten (Geuna, 2005; Kaplan et al., 2012).

Es sind zwei Variationen der Disektor-Methode zu unterscheiden: der physikalische Disektor (eng. „physical disector“) und der optische Disektor (eng. „optical disector“). Durch beide Variationen ist eine effiziente und erwartungstreue Schätzung über eine begrenzte quantitative Menge ohne den Einfluss von verschiedenen Faktoren wie der Partikelgröße, -verteilung und -orientierung möglich (Gundersen et al., 1988b; Hatton und von Bartheld, 1999; Dorph-Petersen et al., 2001; Gardella et al., 2003; Kaplan et al., 2010). Für die Zählung einer erheblich großen Menge an Zellen eignet sich zunehmend auch die Fraktionator-Methode, bei dem es sich um eine erweiterte Modifikation der Disektor-Methode handelt (Gundersen und Jensen, 1987).

1.4.2 Der physikalische Disektor

Die Untersuchung erfolgt an zwei benachbarten, histologischen Schnitten, die in der Regel nur jeweils 2-5µm dünn sind (Sterio, 1984). Die beiden Schnitte werden als Referenzschnitt (eng. „reference“ section) und Vergleichsschnitt (eng. „look-up section“) bezeichnet, wobei ersteres in der oberen Ebene liegt (Kaplan et al., 2012), siehe **Abbildung 3**. Beide zusammen ergeben ein Disektor-Paar (Sterio, 1984; Gundersen et al., 1988a). Die Zählung der enthaltenen Partikel erfolgt durch den Zählrahmen. Wenn die Bedingungen des Zählrahmens erfüllt sind und ein Partikel im Vergleichsschnitt, jedoch nicht in dem darüberliegenden Referenzschnitt scharf erscheint, wird es markiert beziehungsweise gezählt und als Disektor-Partikel ‚Q‘ bezeichnet (Coggeshall, 1992; Howard und Reed, 2005, Kaplan et al., 2012). Eine Zelle, die in beiden Schnitten scharf zu sehen ist, wird nicht gezählt. So wird sichergestellt, dass jede Zelle nur maximal einmal gezählt werden kann (Sterio, 1984, Aslan et al., 2006). Für die gesamte Untersuchung werden nur vereinzelte Schnittpaare eines gesamten Strukturgewebes gebraucht (Dorph-Petersen et al., 2001). Die Schnitte müssen stets parallel zueinander geschnitten werden (Kaplan et al., 2012), und jeder Schnitt muss sich seinem Nachbarschnitt chronologisch und eindeutig zuordnen lassen (Howard und Reed, 2005). Der Abstand zwischen zwei Schnitten sollte weniger als 1/3 oder 1/4 der durchschnittlichen Partikelhöhe betragen (Kaplan et al., 2012). Andernfalls könnten einige ungeschnittene Partikel im Gewebe übersehen werden mit der Folge, dass diese während des Zählvorganges nicht berücksichtigt werden (Gundersen, 1986; Kaplan et al., 2012). Größere Partikel sowie ovale Partikel, die mit ihrem größten Durchmesser senkrecht zu der Schnittebene liegen, haben eine größere Chance angeschnitten zu werden und können daher unterschiedlich oft in den einzelnen Schnitten vorkommen, wodurch es auch zu einer späteren Überschätzung der Zellanzahl kommen kann (Weibel, 1981; Gundersen und Jensen, 1987; Altunkaynak et al., 2012). In solch einem Fall spricht man vom „Wicksell’s Korpuskel-Problem“ (Mouton, 2002; Kaplan et al., 2012). Wie zuvor erwähnt ist daher die Festlegung eines eindeutigen Bezugspunktes, wie der oberste Punkt einer Zelle, entscheidend für die Erzielung eines korrekten und erwartungstreuen Ergebnisses einer stereologischen

Untersuchung (Sterio 1984; Howard und Reed, 2005; Kozan et al., 2007). Weitere Zählregeln dazu sind bereits im Kapitel 1.2.3 „Zählrahmen“ beschrieben worden.

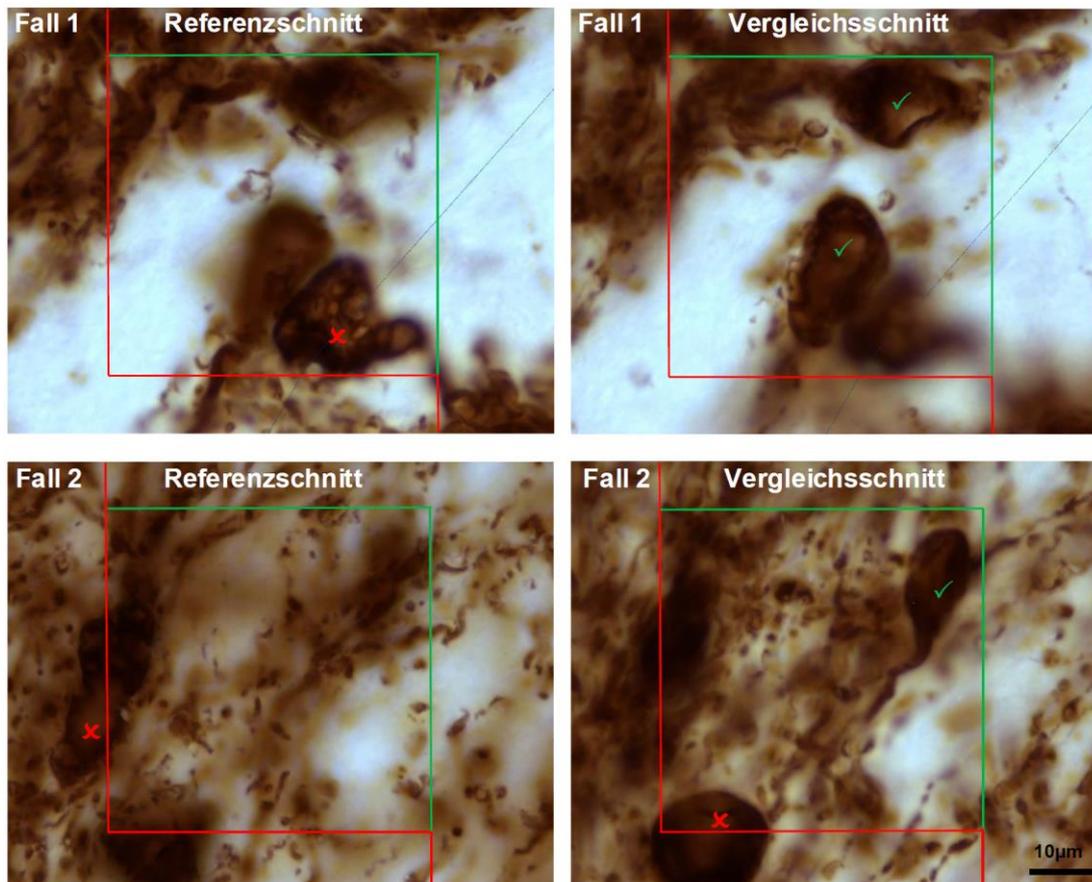


Abbildung 3: Zwei Beispiele der Disektor-Technik: sowohl in Fall 1 als auch in Fall 2 sind die Zellen jeweils nur in einem der beiden aufeinanderfolgenden Schnitte gut fokussiert zu sehen, während ihre Erscheinungen im anderen Schnitt unscharf dargestellt sind. Der oberste Punkt (Spitze) einer Zelle darf somit nur in einem der beiden Schnitte scharf zu sehen sein, um einmal gezählt zu werden. Andererseits dürfen die Zellen nicht die roten Linien des Zählrahmens berühren, sonst werden sie nicht mitgezählt.

1.4.3 Der optische Disektor

Der optische Disektor stellt eine Erweiterung der physikalischen Disektor-Methode dar und wird an dicken Schnitten (in der Regel 25-40µm) angewendet (Keuker et al., 2001). Der einzige Unterschied ist die Disektorhöhe, h' durch das zusätzliche Hinzufügen von dünnen, optischen Fokusebenen (1µm) in der Z-Achse (Gundersen et al., 1988b). Somit arbeitet der optische Disektor mit einem dreidimensionalen Kubus, worin die Linien des Zählrahmens nun zu

Flächen umgewandelt werden, **siehe Abbildung 4**. Kaplan et al. (2012) beschrieben die Durchführung folgendermaßen: die oberste Ebenenschicht des optischen Disektors wird als der erste Referenzschnitt und der Boden als der letzte Vergleichsschnitt bezeichnet. In das eingeschlossene Disektor-Volumen entstehen mehrere optische Fokusebenen mit zunehmender Tiefenschärfe am Mikroskop, wodurch ein schrittweises Durchfokussieren durch die komplette Schnittdicke ermöglicht wird. Dabei stellt eine Fokusebene den Vergleichsschnitt dar, während der Referenzschnitt unmittelbar darüberliegt (Kaplan et al., 2012). Es gelten die gleichen Regeln wie beim physikalischen Disektor: ein Partikel, das nur in der fokussierten Ebene und nicht in der darüberliegenden Ebene zu sehen ist, wird gezählt, sofern es auch die anderen Voraussetzungen des Zählrahmens bezüglich der Einschlusslinien (grün) und der Ausschlusslinien (rot) erfüllt, **siehe Abbildung 4** (für genauere Informationen siehe Kapitel 1.2.3. „Zählrahmen“). Die Höhe des optischen Disektors muss ausreichend hoch definiert werden und es ist zu berücksichtigen, dass sie von der Größe der zu untersuchenden Partikel und der Festlegung der Grenz-Zone (Mouton, 2002) sowie von Gewebedeformationen wie Schrumpfung in der Z-Achse nach den histologischen Aufbereitungsschritten beeinflusst wird (Dorph-Petersen et al., 2001).

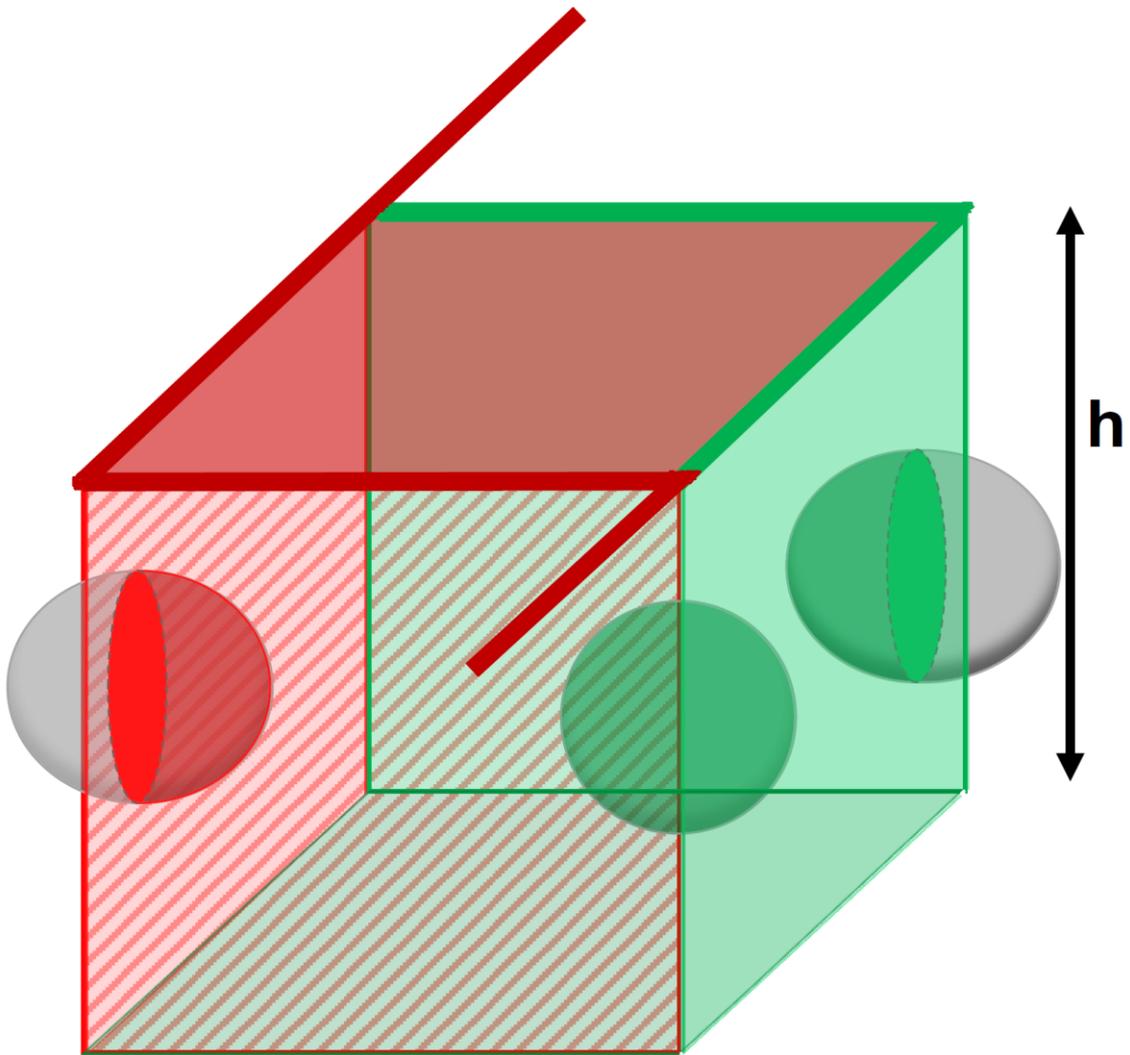


Abbildung 4: Die Abbildung zeigt den Aufbau eines dreidimensionalen Kubus, dem optischen Disektor mit einer definierten Disektorhöhe ‚h‘ in der Z-Achse. Die Zählregeln gelten auch nach wie vor, da die Begrenzungen des Rahmens in der X/Y-Achse nach vertikal in Richtung der Z-Achse abhängig von ‚h‘ erweitert werden.

1.4.4 Numerische Dichte ,Nv‘ und Cavalieri’s Prinzip

Der Quotient, der sich aus der Division der Summe der gezählten Partikelanzahl durch den Wert des Disektor-Volumens gemäß der Disektor-Methode ergibt, ist als numerische Dichte ,Nv‘ bekannt (Gundersen, 1986; Howard und Reed, 2005; Mouton, 2002).

$$N_v = \frac{\sum Q^-}{\sum \text{Vol}_{\text{Disektor}}}$$

Das Disektor-Volumen erhält man durch das Produkt aus der Anzahl und dem Flächenvolumen des verwendeten Zählrahmens (Mouton, 2002).

$$\sum \text{Vol}_{\text{dis}} = \text{Anzahl}_{\text{Disektor}} \times \text{Vol}_{\text{Zählrahmen}}$$

Um die Gesamtanzahl der Partikel für den kompletten Referenzraum in der Struktur berechnen zu können, muss dieses Referenzvolumen ,Vref‘ in einer ganzen Struktur bestimmt werden. Hierfür kommt auch heute noch eine von dem italienischen Mathematiker Bonaventura Cavalieri beschriebene Methode, als „Cavalieri’s Prinzip“ bezeichnet, zur Anwendung (Altunkaynak und Altunkaynak et al., 2007; Keskin et al., 2008; Sahin et al., 2008; Elfaki et al., 2011; Altunkaynak et al., 2012).

Das Produkt von ,Nv‘ und ,Vref‘ liefert nun eine erwartungstreue Schätzung der Gesamtpartikelanzahl ,E(N)‘ im kompletten Referenzvolumen in einer Struktur (Gundersen und Jensen, 1987; Mouton, 2002). Da ,Nv‘ durch die Disektor-Methode und ,Vref‘ durch das Cavalieri’s Prinzip bestimmt wird, wird dieses Vorgehen auch als „Cavalieri-Disektor-Kombination“ bezeichnet (Gundersen, 1986; Howard und Reed, 2005; Mouton, 2002).

$$E(N) = N_v \times V_{\text{ref}}$$

1.5 Fraktionator

1.5.1 Allgemeine Informationen

Der Fraktionator (eng. „fractionator“) wird zur Schätzung der Partikelanzahl in jeglichem dreidimensionalen Volumen verwendet und ist komplett unabhängig

von jeglichen Vorabinformationen wie der Partikelform, ihrer Größe und räumlichen Ausrichtung sowie der Berechnung eines Referenzvolumens wie bei der Disektor-Methode (Dorph-Petersen et al., 2001; West, 2002; Schmitz und Hof, 2005). Beim Fraktionator wird eine Teilmenge an Schnitten untersucht, die durch das SRS-Prinzip herausgesucht wird, um darin die Gesamtanzahl von Partikeln innerhalb ihres Referenzvolumens zu bestimmen (Keuker et al., 2001). Aus diesem Wert wird durch eine andere Formel als bei der Disektor-Methode die Gesamtanzahl von Partikeln repräsentativ innerhalb einer kompletten Struktur errechnet (Sterio, 1984, Gundersen, 1986; Gundersen et al., 1988a und 1988b, Mouton, 2002). Das Gewebe muss dabei vollständig bis zum Ende geschnitten werden, damit jeder Bereich statistisch gesehen die gleiche Wahrscheinlichkeit aufweist, untersucht zu werden (Mouton, 2002).

1.5.2 Der physikalische Fraktionator

Beim physikalischen Fraktionator (eng. „physical fractionator“) wird ein bestimmter Anteil an dünnen Schnitten durch das SRS-Prinzip herausgesucht, und die Zählung erfolgt dann analog des physikalischen Disektors mit den gleichen Regeln (Dorph-Petersen et al., 2001). Beim physikalischen Fraktionator wird die Gesamtpartikelanzahl durch das Produkt der gezählten Partikelanzahl mit den Einstellungswerten für die Probenauswahl berechnet, die für die gesamte Struktur bestimmt werden, wodurch die Bestimmung der numerischen Dichte wie bei der Disektor-Methode entfällt (Dorph-Petersen et al., 2001). Die allgemeine Fraktionator-Formel lautet (modifiziert nach Gundersen, 1986):

$$N = \sum Q^- \times \frac{1}{ssf} \times \frac{1}{asf}$$

Wobei Q^- = Anzahl der gezählten Partikel, ssf = section sampling fraction, asf = area sampling fraction. Nähere Erläuterungen dazu erfolgen im nächsten Kapitel.

1.5.3 Der optische Fraktionator

Der optische Fraktionator (eng. „optical fractionator“) ist eine Kombination des optischen Disektors und des SRS-Prinzips, bei der die Partikelanzahl durch das

Produkt aus der Anzahl der gezählten Partikel in einem Einheitsvolumen mit den Einstellungswerten für die Probenauswahl (eine Kombination aus drei verschiedenen Brüchen) geschätzt werden kann (West et al., 1991; Keuker et al., 2001; Altunkaynak et al., 2012). Diese Methode ist dem physikalischen Fraktionator sehr ähnlich, außer, dass ein optischer Disektor eingesetzt wird und es somit eine zusätzliche, definierte Disektorhöhe in der Z-Achse gibt, siehe **Abbildung 4**. Die Methode eignet sich deshalb für dicke Schnitte von 25-40µm (Gundersen, 1977; Gundersen, 1986; West et al., 1991). Die Zählung erfolgt analog dem optischen Disektor. Der optische Fraktionator wird allgemein als die Methode der Wahl bei der Untersuchung von besonders komplexen Strukturen wie dem Nervengewebe verwendet (Kaplan et al., 2001; Sonmez et al., 2010a; Gökce et al., 2011). Die Formel des optischen Fraktionators lautet (modifiziert nach Gundersen und Jensen, 1987; West et al., 1991):

$$N = \sum Q^- \times \frac{1}{ssf} \times \frac{1}{asf} \times \frac{1}{hsf}$$

Wobei Q^- = Anzahl der gezählten Partikel, ssf = section sampling fraction, asf = area sampling fraction, hsf = height sampling fraction.

1.5.3.1 Bestimmung des ‚ssf‘

Der erste Schritt beim optischen Fraktionator ist die Auswahl von Schnitten aus einem ganzen Vorrat, die für die Untersuchung herangezogen werden. Wie viele Schnitte wirklich verwendet werden, hängt entscheidend von der Gesamtmenge an verfügbaren histologischen Schnitten vom zu untersuchenden Gewebe und der Schnittdicke sowie von der Größe der zu untersuchenden Partikel ab (Dorph-Petersen et al., 2001). Im Durchschnitt werden 10-20 Schnitte für jede Seite pro Struktur ausgewählt (Gundersen und Jensen, 1987; Keuker et al., 2001). Die Auswahl erfolgt dabei nach einem gleichmäßigen Intervall und beginnt rein zufällig innerhalb des Intervalls analog dem SRS-Prinzip, siehe auch Kapitel 1.2.6. „Systematisch zufällige Probenauswahl“. Das Untersuchungsintervall wird auch als „section sampling fraction“ bezeichnet und wird somit allgemein als das Verhältnis von ausgewählten Schnitten zu der Gesamtanzahl aller vorhandenen

Schnitte einer Struktur verstanden (Kaplan et al., 2001; Keuker et al., 2001; Witgen et al., 2006; Altunkaynak et al., 2012).

1.5.3.2 Bestimmung des ‚asf‘

Der „area sampling fraction“ beschreibt die Relation zwischen der Fläche des Zählrahmens und der Fläche eines Untersuchungsrahmens, innerhalb dessen jeweils eine Zählung erfolgt, auch Rasterfläche genannt (Mouton, 2002):

$$\text{asf} = \frac{\text{Fläche}_{\text{Zählrahmen}}}{\text{Fläche}_{\text{Raster}}}$$

Die Flächen berechnen sich jeweils durch das Produkt aus Breite und Höhe in der X/Y-Achse. Der Zählrahmen muss derartig groß genug gewählt werden, so dass im Durchschnitt 1-2 Zellen pro Rahmen gezählt werden können (Gundersen und Jensen, 1987; Keuker et al., 2001; Glaser et al., 2007). Die Größe des Zählrahmens darf zudem nicht erheblich durch Randeffekte (Gundersen, 1977) beeinflusst werden, siehe Kapitel 1.2.5. „Randeffekt“. Die Auswahl der passenden Größe des Zählrahmens erfolgt in der Regel bei starker optischer Vergrößerung und bei einer geringen Tiefenschärfe am Mikroskop.

Die Größe des Rasters hängt entscheidend davon ab, wie die Zählrahmen bezüglich ihrer Anzahl und Fläche insgesamt gestaltet werden sollen. Möchte man insgesamt 100-200 Zellen für jede Seite einer Struktur gezählt haben und werden pro Zählrahmen 1-2 Zellen gezählt, müssen im Durchschnitt 10-20 Raster in jede Seite eines Schnittes gelegt werden (Gundersen und Jensen, 1987; Keuker et al., 2001).

1.5.3.3 Bestimmung des ‚hsf‘

Der „height sampling fraction“ beschreibt das Verhältnis der Disektorhöhe ‚h‘ zu der durchschnittlich gemessenen Schnittdicke ‚t‘ in der Z-Achse und lässt sich folgendermaßen berechnen (Mouton, 2002):

$$\text{hsf} = \frac{h}{t}$$

Die Schnittdicke wird am Mikroskop gemessen. Da der Schnitt während der histologischen Aufbereitung einer mehr oder weniger ausgeprägten Deformation unterliegt (Dorph-Petersen et al., 2001, Keuker et al., 2001), ist seine geschnittene Oberfläche nie glatt, sondern ähnlich einer hügeligen Landschaft stark wellenförmig gewölbt. Die Schnittdicke wird bestimmt, indem man die Distanz von dem jeweils höchsten Punkt der gegenüberliegenden Oberflächen durch das Scharfstellen am Mikroskop (Fokussieren) wie bei der Bestimmung des Bezugspunktes misst. Nach Abzug der Grenz-Zone jeweils oberhalb und unterhalb der Schnittoberfläche von der gemessenen Schnittdicke erhält man anschließend die Höhe des Disektors (Dorph-Petersen et al., 2001).

1.6 Der Fehlerkoeffizient (CE)

Für die qualitative Glaubwürdigkeit einer stereologischen Untersuchung ist es notwendig, die Menge an systematischen Fehlern und ihren nicht unerheblichen Einfluss auf die Genauigkeit eines stereologischen Verfahrens in einem Studiendesign zu berücksichtigen (Schmitz et al., 1999; Schmitz und Hof, 2005). Eine unvermeidbare Fehlerquelle sind Gewebedeformationen wie Schrumpfungen nach der histologischen Aufbereitung (Dorph-Petersen et al., 2001). Die Gesamtanzahl aller systematischen Fehler in einer stereologischen Untersuchung kann durch den Fehlerkoeffizienten (eng. „Coefficient of Error“/CE) ausgedrückt werden (Gundersen, 1987). In der praktischen Anwendung sind systematische Abweichungen in jeder Untersuchung stets vorhanden, jedoch ihr Ausmaß zwischen dem erhobenen und dem tatsächlichen Wert nicht konkret bekannt (Gundersen, 1987; Schmitz, 1998; Glaser und Wilson, 1999;). Zwar machen Altunkaynak et al. (2012) deutlich, dass sich das Gesamtergebnis durch eine erwartungstreue Methode mit zunehmender Untersuchungshäufigkeit dem tatsächlichen Wert irgendwann annähern wird, jedoch ist unklar, wann dieser Zeitpunkt letztendlich erreicht ist, **siehe Abbildung 2**. Mehrere mathematische Formeln zur Berechnung des CE's wurden bisher unter Berücksichtigung verschiedener Faktoren wie der Form und der räumlichen Verteilung der Partikel angewendet (Cruz-Orive und Weibel, 1990; Schmitz und Hof, 2005). Eine der

bekanntesten und populärsten Formeln ist die CE-Formel nach Gundersen, welche für die Präzisionsbestimmung nach der repräsentativen Zählung einer Zellgruppe verwendet wird (Gundersen, 1986; Gundersen und Jensen, 1987, West et al., 1991). Als Faustregel wird hierbei ein individueller $CE < 0,1$ angestrebt; unterhalb dieser Grenze wird die Menge an systematischen Fehlern und somit die Glaubwürdigkeit einer ordentlich durchgeführten Untersuchung als akzeptabel angesehen (Gundersen und Jensen, 1987; Gundersen et al., 1999; Keuker et al., 2001; Mouton, 2002). Die endgültige Formel zur Berechnung des CE's lautet (West et al., 1991; Keuker et al., 2001):

$$CE = \frac{\sqrt{\{3 \times (\sum Q^-)^2 - \sum Q^-\} + \sum [Q^- \times Q^-_{\text{nächster Schnitt}}] - 4 \times \sum [Q^- \times Q^-_{\text{übernächster Schnitt}}]}}{240 + \sum Q^-}$$

Abbildung 5: Formel zur Berechnung des CE's nach Gundersen (modifiziert nach Keuker et al., 2001), wobei $\sum Q^-$ für die Gesamtanzahl der gezählten Zellen steht.

1.7 Morbus Parkinson

Morbus Parkinson ist eine progressiv degenerative, neurologische Erkrankung, die vor allem bei Menschen ab dem 60. Lebensjahr gehäuft auftritt und durch einen kontinuierlichen Verlust von dopaminergen Neuronen (DA-Neurone) in der Substantia nigra (SN) gekennzeichnet ist (Sgado et al., 2006; Baquet et al., 2009). Die klinischen Kardinalsymptome sind Zittern (Tremor), Muskelsteifigkeit (Rigor), Haltungsschwierigkeiten (posturale Instabilität) und Bewegungsarmut (Hypokinese/Akinese) beziehungsweise -verlangsamung (Sgado et al., 2006). Erst ab einem Verlust von ungefähr 70% der DA-Neurone in der SN zeigen sich diese auffälligen Symptome (Baquet et al., 2009), daher stellt die Zählung dieser Zellen einen notwendigen und wichtigen diagnostischen Aspekt in zahlreichen Untersuchungen über Morbus Parkinson dar (German et al., 1989; Tomac et al., 1995; Mentis and Delalot, 2005; Richard, 2005). Histopathologisch treten zudem die sogenannten Lewy-Körperchen auf (Spillantini et al., 1997; Olanow und Tatton, 1999; Saito et al., 2004; Shults, 2006; Koprach et al., 2011). Dabei handelt es sich um proteinreiche Einschlusskörper, die zum großen Teil aus Alpha-Synuclein bestehen (Saito et al., 2004; Shults, 2006; Koprach et al., 2011), dessen physiologische Funktionen in der Freisetzung von bestimmten Neurotransmittern für den Mechanismus der synaptischen Vesikel-Übertragung und des axonalen Transportes (Jo et al., 2000; Perez et al., 2002; Madine et al., 2008; Ben Gedalya et al., 2009; Chung et al., 2009; Scott et al., 2010) sowie im Mechanismus der Autophagie (Crews et al., 2010; Winslow et al., 2010) vermutet werden. Die endgültige Funktion von Alpha-Synuclein ist noch unklar, jedoch ist seine Anwesenheit ein klares Indiz für die Diagnosestellung der Parkinson-Krankheit (Spillantini et al., 1997).

1.8 Die Rolle der dopaminergen Neurone: die Substantia nigra

Mesenzephalische DA-Neurone stellen die Hauptquelle von Dopamin im Zentralen Nervensystem der Säugetiere dar und sind in den drei ausgeprägten Nuklei-Kernen, der SN pars compacta (SNpc), der ventralen tegmental Area (VTA) und dem retrorubralen Feld (RRF) lokalisiert (Dahlström und Fuxe, 1964;

German und Manaye, 1993; Sgado et al., 2006). Ihre Innervationsziele sind die Basalganglien, wo sie eine wichtige Rolle bei den Mechanismen von Emotionen und des motorischen Verhaltens spielen (Schultz, 2002; Girault und Greengard, 2004). Ihr Untergang führt zu zahlreichen neurologischen und psychiatrischen Erkrankungen wie Schizophrenie (Stevens, 1973; Snyder et al., 1974), Sucht (Wise und Bozarth, 1982; DiChara und Imperato, 1988), Bewegungsstörungen (Iversen und Koob, 1977) und vor allem zu Morbus Parkinson (German et al., 1989; Eells, 2003). Ein besonderes Augenmerk gilt daher der SNpc, deren Region primär von der Parkinson-Erkrankung befallen ist (Pakkenberg et al., 1991; Baquet et al., 2009). Die SNpc beinhaltet bei einem gesunden 80-jährigen Menschen laut Pakkenberg et al. (1991) ungefähr 550.000 pigmentierte und 250.000 nicht-pigmentierte Neurone mit einer Abweichung von 20% (Pakkenberg et al., 1991), wobei die pigmentierten Neurone durch das Neuromelanin in den Zellen erkannt werden können (German und Manaye, 1993). Bei Morbus Parkinson ist diese Gesamtanzahl drastisch reduziert; je nach Literatur und Untersuchungsmethodik war sie im Vergleich zum gesunden Menschen um 66% (Pakkenberg et al., 1991), um 70% (McGeer et al., 1977) oder um bis zu 80% (Langston, 1985) verringert.

Zur genauen stereologischen Untersuchung der Gesamtneuronenanzahl wurden von Baquet et al. (2009) die Region der SN an Versuchsmäusen (C57BL/6J) dargestellt und erforscht. Andere Modelle verwendeten Ratten als Versuchstiere (German und Manaye, 1993). Die Ausdehnung der SN von posterior nach anterior sowie seine Begrenzungen in allen Richtungen wurden mithilfe eines Standardmaus-Atlas' nach Paxinos und Franklin (Paxinos und Franklin, 2001) und durch die Zunahme von typischen Erkennungsmerkmalen wie Blutgefäßen, Ventrikeln, Ausläufern und anderen Strukturen nach Nelson definiert (Nelson et al., 1996).

Baquet et al. (2009) beschrieben die Begrenzungen folgendermaßen: „die Region der SNpc fängt auf beiden Seiten jeweils rostral nahe dem Ende des Nucleus subthalamicus (STN) an und liegt lateral des medialen Vorderhin-Bündels. Sie endet kaudal am Beginn des retrorubralen Feldes. In zunehmender kaudaler Richtung wird die Region zusätzlich medial durch den ventralen

tegmentalen Area (VTA) und den medialen Lemniscus (ML) sowie nach ventrolateral durch die SN pars reticulata (SNr), einer Region mit dendritischen Ausläufern der SNpc-Neurone und wenigen nigralen Zellen, begrenzt“ (Baquet et al., 2009). Die Zellen der SNpc sind um einiges größer als die Neurone der VTA (Nelson et al., 1996; Baquet et al., 2009).

1.9 Ziel der Arbeit

Für die Diagnose einer neurologischen Krankheit, wie Morbus Parkinson, stellt die festgestellte Anzahl der neuronalen Zellen im menschlichen Gehirn ein wichtiges Indiz für das Vorliegen dieser Krankheit dar. Die Zellanzahl liefert Informationen über Entstehung, Verlauf und Folgen der Erkrankung. Zu diesem Zwecke muss stets die Zellanzahl eines gesunden Probanden mit jener eines erkrankten Menschen verglichen werden.

Es existieren dafür bereits zahlreiche Versuchsmodelle und die dargestellten Ergebnisse in der Literatur unterscheiden sich je nach angewandter Untersuchungsmethodik. Die erwartungstreue Untersuchungsmethode mit dem optischen Fraktionator ist heutzutage der Goldstandard und stellt eine der effizientesten Methoden in der stereologischen Forschung dar. Sie ist jedoch sehr komplex aufgebaut und ohne spezielle Ausrüstungen und Programme schwierig umzusetzen. Im Laufe der Zeit wurden viele kommerziell erhältliche Komplettsysteme einzig und allein für stereologische Untersuchungszwecke entwickelt, welche jedoch für viele Forscher aus finanziellen Gründen nicht tragbar waren. Dadurch wurden lebenswichtige Untersuchungen erschwert oder nur eingeschränkt durchgeführt.

In dieser Arbeit wird daher die Methode des „Axiophot-2“ vorgestellt, die für die Schätzung der Gesamtneuronenzahl in der SN an Wildtyp-Mäusen eine einfache, standardisierte Laborausrüstung verwendet, bestehend aus einem konventionellen Lichtmikroskop mit einer Kamera, einem fahrbaren Tisch und einem Computer mit einem Standard-Bildbearbeitungsprogramm. Diese Ausrüstung wird anschließend mit der stereologischen Untersuchungsmethode durch das kommerziell erhältliche, stereologische Komplettsystem „Stereo

Investigator“ verglichen. Beide Methoden beruhen auf das Prinzip des optischen Fraktionators und verwenden dieselben immunhistologisch aufbereiteten Schnitte.

Ein Vergleich der Ergebnisse und Effizienz beider Methoden zueinander und mit denen in der Literatur liefert Diskussion über die Effektivität und Kompatibilität der vorgestellten Methoden. Ziel dieser Arbeit ist mithin die Präsentation einer genauso effizienten, jedoch günstigeren Alternative zur einer bereits bestehenden stereologischen Untersuchungsmethode.

2. Material und Methoden

2.1 Verwendete Tiere

Für die Untersuchung wurden 6 männliche Wildtyp-Mäuse (WT) des Stammes C57BL/6 aus dem Charles-River-Laboratorium im Durchschnittsalter von 3 Monaten und einem Körpergewicht von 24-30g herangezogen.

Die Tiere wurden bei einer Standardraumtemperatur von 21°C und einem Tages-Nacht-Rhythmus von 12 Stunden in einer nahezu pathogen-freien Umgebung in Makrolonkäfigen gehalten.

Alle Durchführungen erfolgten im Einklang mit den auf die Untersuchung bezogenen internationalen, nationalen und/oder institutionellen Richtlinien bezüglich der Haltung und Nutzung der Tiere und wurden von der Regierung von Unterfranken in Würzburg (Deutschland) genehmigt.

2.2 Materialien und Chemikalien

- Phosphate buffered saline/PBS
 - Für einen Liter 1M (1mol) PBS:
 - 80g NaCl (Sigma- Aldrich, St. Louis, USA)
 - 13,2g Na₂HPO₄·2H₂O (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland)
 - 2g KCl (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland)
 - 4g KH₂PO₄ (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland)
 - Rest bis auf einen Liter mit destilliertem Wasser auffüllen
 - Für 0,1M (0,1mol) PBS: 100ml 1M PBS auf einen Liter mit destilliertem Wasser verdünnen
- Paraformaldehyd/PFA (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland)
 - Für 4% PFA: 4g PFA in 80ml 0,1M PBS gelöst, erhitzt auf 60-70°C, auf Raumtemperatur abgekühlt und mittels NaOH auf einen pH-Wert von 7,4 eingestellt, Rest bis 100ml mit 0,1M PBS aufgefüllt

- Standard Ultra-Sensitive ABC Staining Kit (Thermo Scientific, Rockford, USA)
 - Ultra Reagent A (Avidin, Specially Purified)
 - Ultra Reagent B (Biotinylated Horseradish Peroxidase)
- Primärantikörper: Tyrosine Hydroxylase rb anti rat ab 112 (Adcam, Cambridge, UK) 1:1.000
- Sekundärantikörper: Biotinylated anti-rabbit IgG H+L (Vector Laboratories Inc., Burlingame, USA) 1:100
- Azur-II-Methylenblau (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland)
- Normal Goat Serum/NGS (Dako Denmark AS, Glostrup, Dänemark)
- Bovine Serum Albumin/BSA (Sigma Aldrich, USA)
 - Für 10% BSA: 10g BSA in 100ml 0,1M PBS auflösen
- Triton X-100 (Carl Roth GmbH und Co. KG, Karlsruhe, Deutschland)
- Glycerol (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland)
- Saccharose (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland)
- Ethanol 70% (Otto Fischer GmbH, Saarbrücken, Deutschland)
- Tissue Tek® O.C.T.™ Compound (Sakura Finetek, Niederlande)
- 2-Methylbutan (Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland)
- 3,3-Diaminobenzidin-tetrahydrochlorid/DAB (Kem-En-Tec Diagnostics A/S, Taarstrup, Dänemark)
- Wasserstoffperoxid 30% (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland)
- Aquatex® (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland)

- Aufziehspritzen mit Filtropur S 0,45µm (Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland)
- Deckglas (R. Langenbrinck, Emmendingen, Deutschland)
- Objektträger: Superfrost Plus (R. Langenbrinck, Emmendingen, Deutschland)
- Falcon® Cellstar Röhrchen 50ml (Greiner Bio One, Tokyo, Japan)
- Cryomolds® (Polysciences Inc., Warrington, PA)
- Brain Matrix Slicer

2.3 Spezielle Ausrüstungen

- Kryostat Leica 3050 (Leica Biosystems, Wetzlar, Deutschland)
- Standard-Lichtmikroskop (Kern Optics, Balingen, Deutschland)
- BX53-Lichtmikroskop (Olympus, Hamburg, Deutschland) mit Kamera (mbf Bio Science, Williston, USA)
- Stereo Investigator Software Version 11.07 (MicroBrightfield Biosciences, Williston, VT)
- Axiophot-2-Mikroskop (Zeiss, Göttingen, Deutschland) mit Kamera (Visitron Systems, Puchheim, Deutschland)
- Wippschüttler
- Visiview Imaging Software 3.0 (Visitron Systems GmbH, München, Deutschland)
- NIH ImageJ Software 4.7
- Grid-Overlay-Plugin (Rasband, 2010)
- Cell-Counter-Plugin (De Vos, 2010)
- Optical-Disector-Macro (Ward, 2013)
- Optical-Disector-Position (Ip et al., 2017)
- Calculation-Of-Cell-Count (Ip et al., 2017)

2.4 Intrakardiale Perfusion und Entnahme des Hirngewebes

Vor der Gewebeentnahme wurden die Tiere in einer mit CO₂ gefüllten Kammer betäubt und eingeschläfert. Anschließend erfolgte die Thoraxeröffnung und die intrakardiale Perfusion mit 10ml 0,1M PBS sowie mit 70ml 4% PFA in 0,1M PBS. Die Gehirne wurden aus der Schädelkalotte vollständig *in toto* entnommen und an einem Brain-Matrix-Slicer in der koronaren Ebene bei Bregma +0,74mm (Figure 25 des Paxinos/Franklin-Maushirn-Atlas, 2001) geschnitten. Die dorsalen Anteile mit der SN wurden zunächst für 24 Stunden bei 4°C in 4% PFA in 0,1M PBS fixiert und anschließend für weitere 48 Stunden bei 4°C über Nacht in 30% Saccharose in 0,1M PBS überführt. Mit der Schneidfläche in Richtung Boden zeigend wurden die Gehirnhälften in elastischen Behältern (Cryomolds®) mit Tissue Tek® vollständig und blasenfrei eingedeckt, bevor sie dann in mit flüssigem Stickstoff gekühltem 2-Methylbutan gleichmäßig in Gewebeblöcke eingefroren wurden. Die Blöcke wurden bei minus 22°C in Gefrierschränken für die weiteren Aufbereitungsschritte gelagert.

2.5 Schneiden der Blöcke am Kryostat

Das Schneiden der gefrorenen Blöcke erfolgte am Kryostat (Leica) bei einer Kammertemperatur von minus 20-23°C und einer Objekttemperatur von minus 17-18°C. In jedem Block wurde zuvor bis kurz vor Beginn der SN in 10µm-Schritten vorgeschnitten und jeder 3.-4. Kontrollschnitt auf Objektträgern mittels Azur-II-Methylenblau angefärbt. Damit wurde die derzeitige topographische Lage unter dem Lichtmikroskop und mit der Hilfe des Paxinos/Franklin-Maushirn-Atlas (2001) sowie anhand von Nachbarstrukturen wie dem Hippocampus überprüft bis man den Beginn der SN erreicht hatte. Für die stereologische Untersuchung wurden dann ab diesem Bereich 30µm dicke Kryostatschnitte in der koronaren Ebene seriell geschnitten und jeder Schnitt wurde abwechselnd in einem von vier Falcon®-Röhrchen mit einer Antigefrier-Flüssigkeit (30% Glycerol, 30% Ethanol, 40% PBS) bei minus 22°C gelagert. Für die Entnahme und Überführung der fragilen Gewebeschnitte eigneten sich dünne Spezialpinzetten und feine Haarpinsel. Zur Seitenunterscheidung wurde auf der rechten Hemisphäre an

jedem Schnitt unmittelbar nach dem Schneiden zart eine minimale Kerbe gestanzt, **siehe Abbildung 6**. Diese Kerbe lag deutlich außerhalb der zu untersuchenden Region und sollte nicht im Hippocampus oder Kortex liegen, da diese Anteile während der darauffolgenden Färbungsprozeduren teilweise verloren gingen. Beim Stanzen wurde ein kaltes, spitzes Präparier-Instrument punktuell und mit nur wenig Druck am Gewebe angesetzt und in der Position leicht rotiert, um mögliche Schädigungen wie Zerreißen und Quetschungen des Gewebes zu vermeiden.

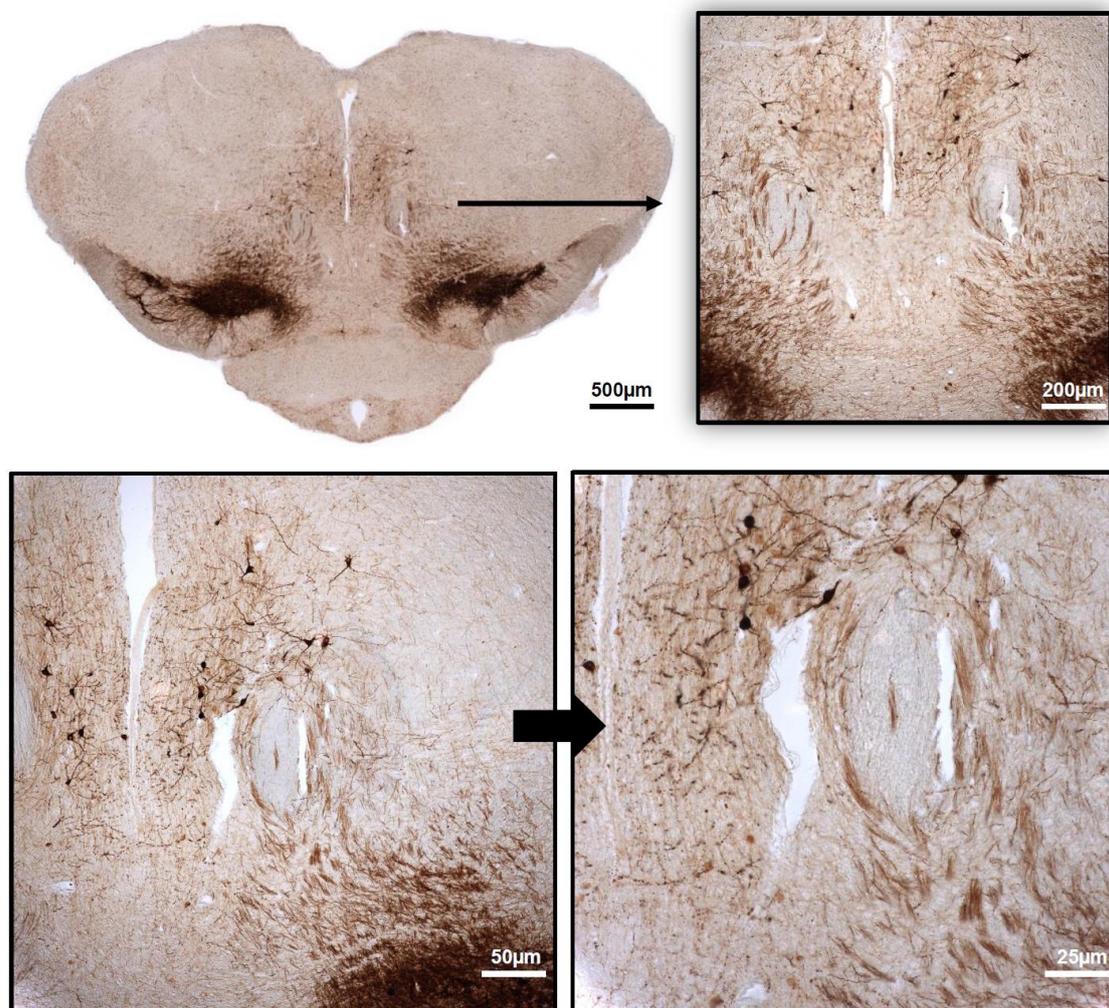


Abbildung 6: Bei mittlerer Vergrößerung wird in der rechten Hemisphäre eine Markierung gestanzt. Selbst bei schwacher Vergrößerung ist die Markierung in ihrem zackigen Grenzverlauf deutlich von Artefakten zu unterscheiden. Bestätigung sollte dennoch stets bei stärkerer, mikroskopischer Vergrößerung eingeholt werden!

Da die SN frühestens ab Bregma -2,46mm (Figure 51 des Paxinos/Franklin-Maushirn-Atlas, 2001) beginnt und sich bis Bregma -4,04 (Figure 64 des Paxinos/Franklin-Maushirn-Atlas, 2001) erstreckt, beträgt sein Gesamtbereich in rostro-kaudaler Richtung 1,58mm. Folglich mussten bei 4 Serien und 30µm dicken Schnitten in jedem Röhrchen 12-14 Schnitte vorliegen, um den kompletten Bereich der SN zu erfassen. Jedes Röhrchen enthielt somit Schnitte einer Serie der SN von rostral bis kaudal mit je 120 µm Abstand, siehe Abbildung.

2.6 Immunhistologische Färbung mittels Tyrosin-Hydroxylase (Prinzip „flee-floating“)

Für die Untersuchung wurden pro Versuchstier nur Schnitte eines Röhrchens gefärbt, wobei die Auswahl des Röhrchens rein zufällig erfolgte. Die zu färbenden Schnitte wurden aus der Antiegefrier-Flüssigkeit in einen Glasbehälter mit 0,1M PBS überführt und dreimal für je 5 Minuten mit 0,1M PBS gewaschen. Die Färbung erfolgte in 12-Well-Zellkulturplatten. Der Waschvorgang pro Zyklus verlief durch das Überführen der einzelnen Schnitte von einem „Well“ in das nächste mithilfe eines feinen Pinsels. Im nächsten Schritt erfolgte die Inkubation der Schnitte in einer Lösung aus 10% NGS/ 2% BSA/ 0,5% Triton X-100 in 0,1M PBS für 1 Stunde. Die anschließende Inkubation mit dem Primärantikörper (TH Kaninchen-anti-Ratte) in der Verdünnung 1:1.000 in einer Lösung aus 2% NGS/ 2% BSA/ 0,5% Triton X-100 in 0,1M PBS vollzog sich für 24 Stunden über Nacht bei 4°C.

Nach der Einwirkzeit wurden die Schnitte wiederum dreimal für je 5 Minuten in 0,1M PBS gewaschen, bevor im nächsten Arbeitsschritt mit dem Sekundärantikörper (Ziege-anti-Kaninchen biotinylierte IgG H+L) in der Verdünnung 1:100 mit der gleichen PBS-Lösung wie beim Primärantikörper inkubiert wurde. Die Inkubationszeit betrug hierbei 2 Stunden bei Raumtemperatur. Anschließend wurden die Schnitte erneut dreimal im 5-Minuten-Takt in 0,1M PBS gewaschen. Es folgte die Inkubation mit dem Avidin-Biotin-Komplex (Standard Ultra-sensitive ABC Staining Kit) für 2 Stunden. Die Lösung wurde mit der Konzentration von 1,8µl Avidin und 1,8µl Biotin auf 100µl

Lösung aus 2% NGS/ 2% BSA/ 0,5% Triton X-100 in 0,1M PBS hergestellt, jedoch erfolgte das Ansetzen bereits 30 Minuten vor dem Gebrauch. Danach wurden die Schnitte erneut dreimal für 5 Minuten in 0,1M PBS gewaschen. Als nächstes schloss sich daran die Färbung mit 3,3-Diaminobenzidin-tetrahydrochlorid (DAB) an. Dabei wurde zunächst eine DAB-Tablette (10mg, pH-Wert 7) in 10ml destilliertem Wasser komplett aufgelöst und kurz vor der Anwendung mit 10µl H₂O₂ (30%) aktiviert, Die komplette Flüssigkeit wurde daraufhin mit einer 10ml-Spritze und einem Filteraufsatz S 0,45µm aufgesogen und gleichmäßig auf die Schnitte verteilt. Die zunehmende Färbung wurde unter einem Lichtmikroskop beobachtet und nach maximal 10 Minuten durch zweimaliges Waschen für je 5 Minuten in destilliertem Wasser angehalten, sobald die Intensität der gefärbten Neurone als genügend beurteilt wurde, **siehe Abbildung 7**. Die Schnitte wurden zuletzt einzeln pro Objektträger aufgenommen und mit Aquatex® und einem Deckglas eingedeckt. Alle Objektträger wurden bei Raumtemperatur für 1 Stunde getrocknet und anschließend mit einem wasserfesten Stift beschriftet.

Es ist anzumerken, dass die Färbung mit dem stark kanzerogenen DAB unter strengen Sicherheitsvorkehrungen durchgeführt und speziell für diesen Schritt nur Einmalartikel verwendet wurden. Die Entsorgung der Flüssigkeit sowie aller kontaminierten Materialien, inklusive der Handschuhe, erfolgte in speziell dafür vorgesehenen Containern und unter einer Abzugshaube.

Mindestens ein Negativ-Kontrollschnitt wurde parallel zu jedem Färbezyklus in einem separaten Behälter mitgefärbt. Die Schritte waren wie oben beschrieben identisch mit der Ausnahme, dass keine Inkubation mit dem Primärantikörper erfolgte. Folglich war die Negativ-Kontrolle am Ende als einziger Schnitt ungefärbt.

Die Inkubationen erfolgten alle am Wippschüttler. Durch die Überführung der Schnitte von einem Behälter zum anderen während des Waschens und der Inkubationszeiten trennte sich der Hippocampus/Kortex-Anteil im weiteren Verlauf meist ab und ging verloren. Der Hirnstamm mit der SN war jedoch unbeschadet, **siehe Abbildungen 8 und 9**.

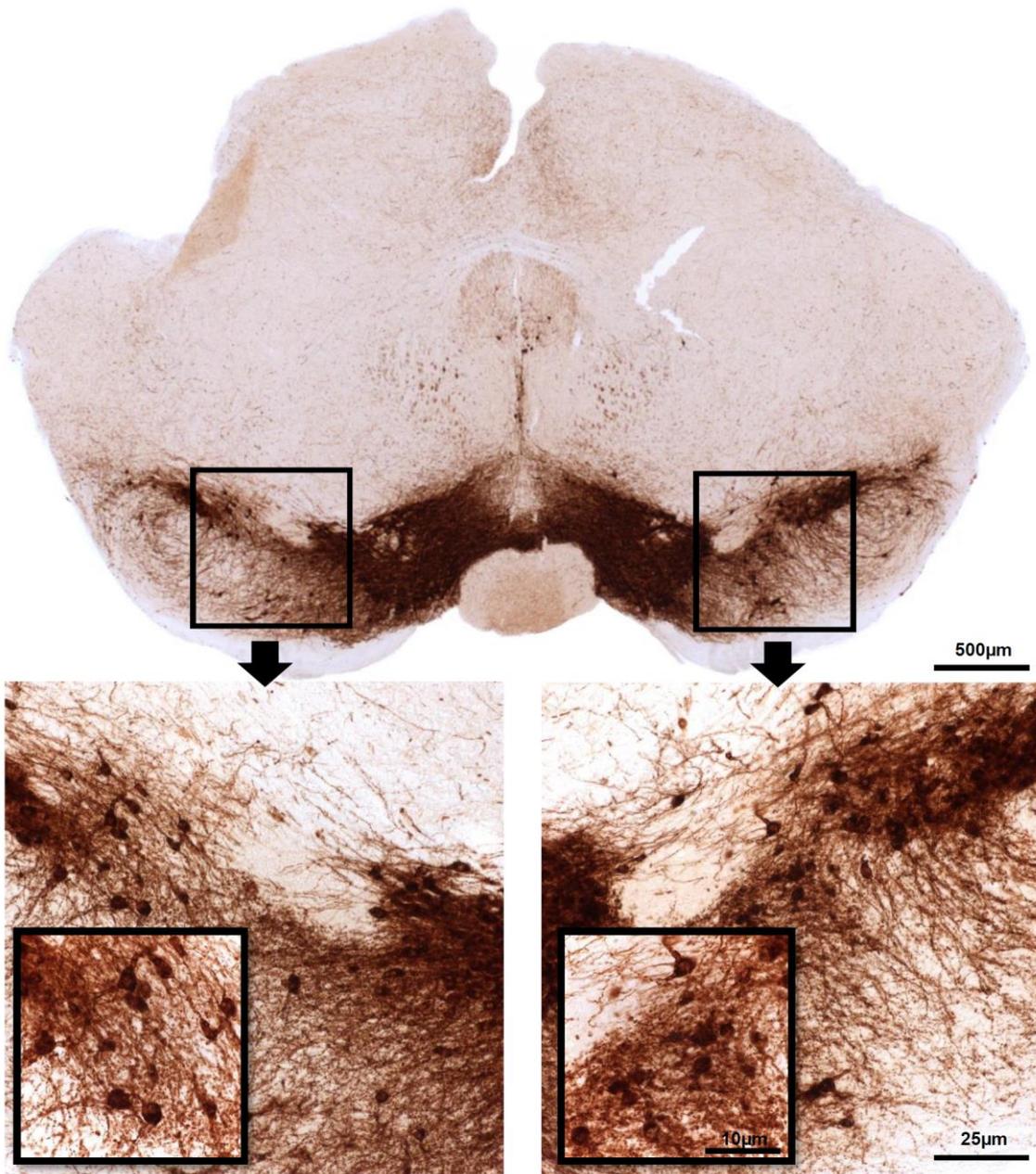


Abbildung 7: Ein vollständig gefärbter Schnitt durch Tyrosin-Hydroxylase. Bei der Betrachtung unter dem Mikroskop bei zunehmender Vergrößerung sind die nigralen Zellen sehr deutlich zu erkennen. Oben auf der rechten Schnitthälfte ist bei kleiner Vergrößerung die Kerbe zu sehen.

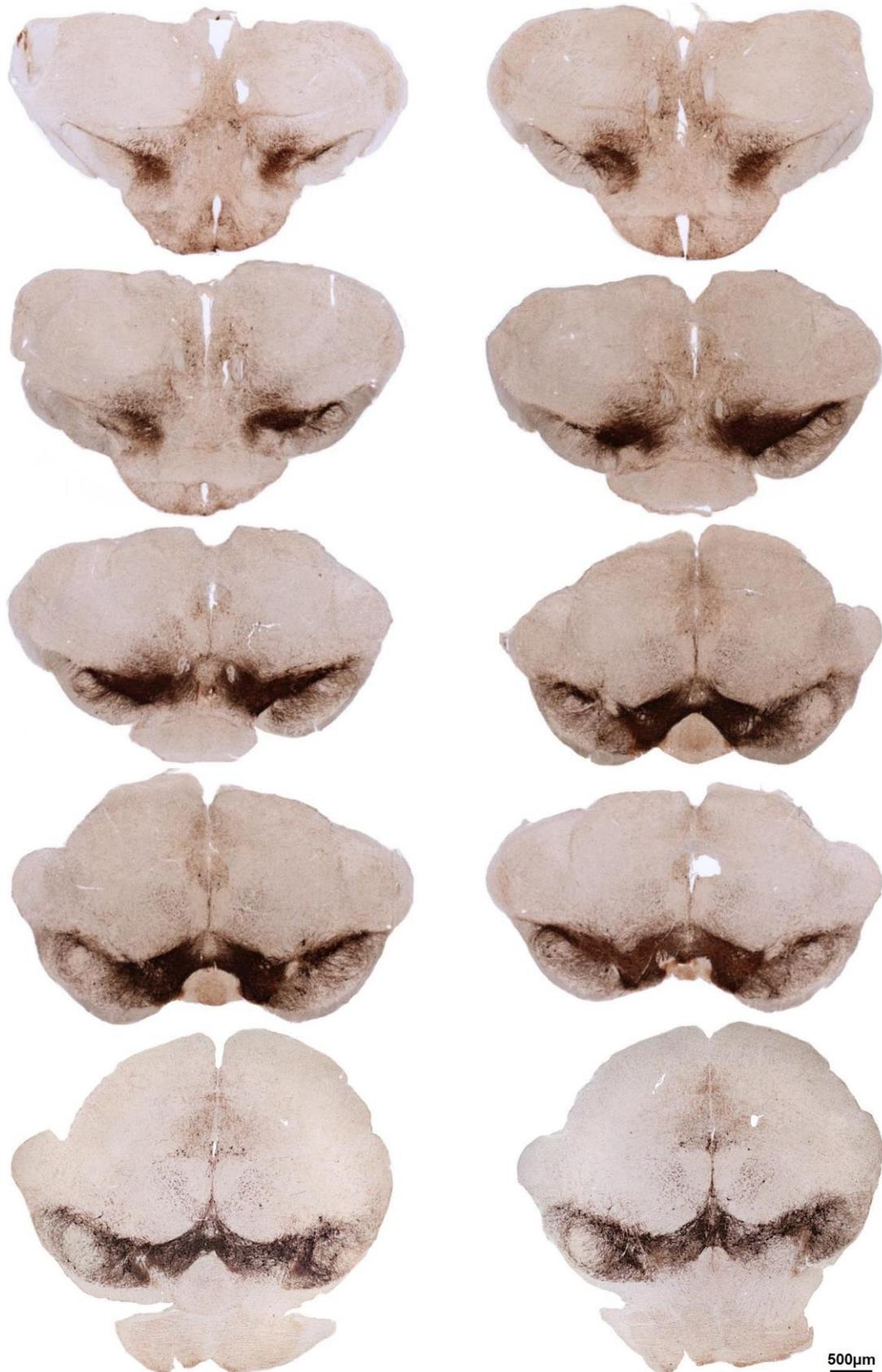


Abbildung 8: Schnitte nach der histologischen Aufbereitung mit gleichmäßiger und vollständiger Färbung der Regionen mit der SN. Das Fehlen anderer angrenzender Nachbarstrukturen außerhalb der zu untersuchenden Region stellt in der Regel kein Problem bei der nachfolgenden Auswertung dar.

2.7 Erwartungstreue stereologische Auswertung

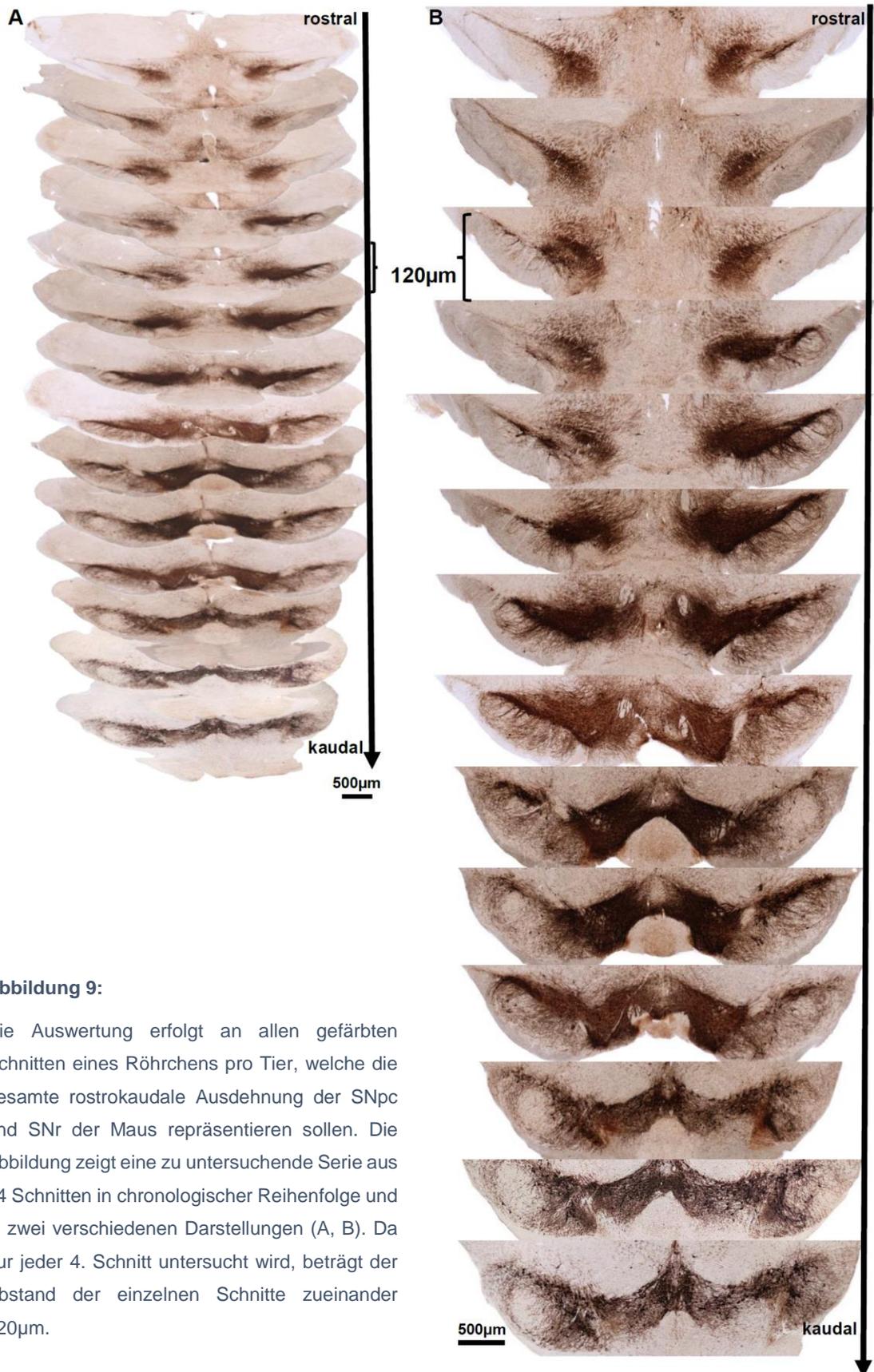


Abbildung 9:

Die Auswertung erfolgt an allen gefärbten Schnitten eines Röhrchens pro Tier, welche die gesamte rostrokaudale Ausdehnung der SNpc und SNr der Maus repräsentieren sollen. Die Abbildung zeigt eine zu untersuchende Serie aus 14 Schnitten in chronologischer Reihenfolge und in zwei verschiedenen Darstellungen (A, B). Da nur jeder 4. Schnitt untersucht wird, beträgt der Abstand der einzelnen Schnitte zueinander 120µm.

2.7.1 Auswertung mit dem Axiophot-2

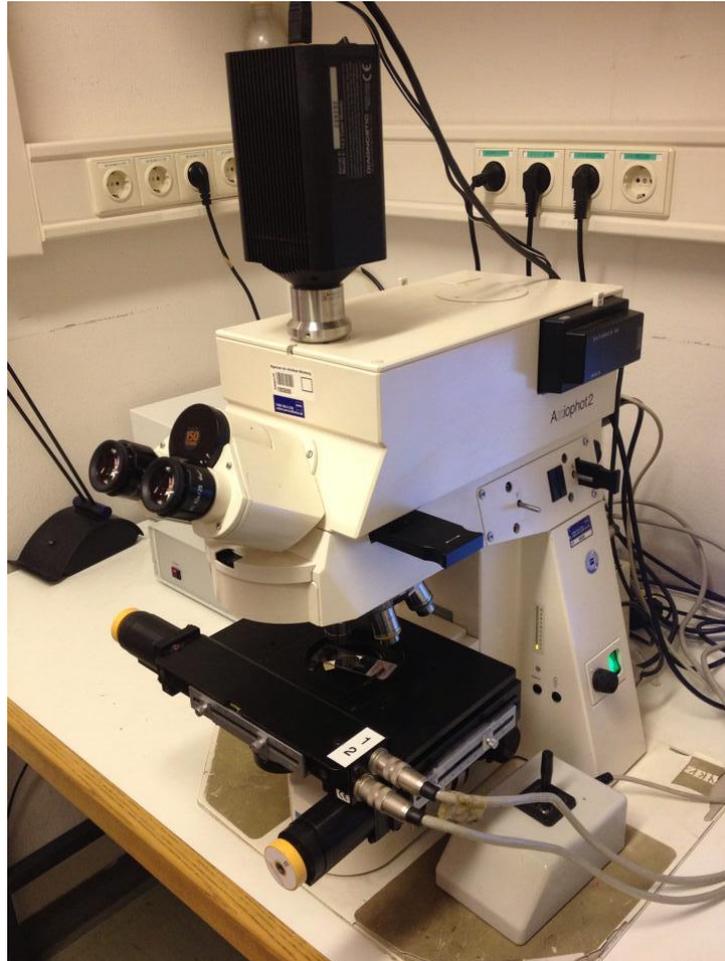


Abbildung 10: Das Axiophot-2-Mikroskop von Zeiss mit einer Aufnahmekamera von Visitron Systems, welche oben angeschlossen ist. Unter dem Mikroskop ist der motorisierte Tisch angeschlossen. Daneben befindet sich die dazugehörige Konsole

Die Aufnahme der einzelnen immunhistologisch gefärbten Schnitte erfolgte mit dem Axiophot-2-Mikroskop von Zeiss und einer daran angeschlossenen Aufnahmekamera unter Zuhilfenahme des Programmes „Visiview Imaging Software Version 3.0“ von Visitron Systems, **siehe Abbildung 10**. Die Software ermöglichte sowohl eine digital scharfe Bild-Aufnahme in hoher Auflösung von 312 pixel/cm in der horizontalen X/Y-Ebene als auch eine schrittweise optische Aufnahme von 1µm in tieferen Ebenen in der Z-Achse. Ein fahrbarer Objektträgertisch in allen Richtungen war hieran angeschlossen. Die Bilder wurden als TIFF-Format abgespeichert. Die Schnitte wurden, unter anderem auch zur erleichterten Handhabung für die Analyse, um 90° gekippt. Es wurde in vorangegangenen Pilotuntersuchungen überprüft, dass diese Maßnahmen keinen bedeutenden Einfluss auf die Qualität der späteren Analyse hatten. Das

Auswerten erfolgte anhand des Programmes „NIH ImageJ Software Version 4.7“ und die Eintragung sowie das Berechnen der Ergebnisse durch selbsterstellte Tabellen in „Excel 2016“.

Bildaufnahme mit Visiview

Der zu untersuchende Objektträger wurde mit einem Tropfen Immersionsöl am Deckglas des Schnittes am beweglichen Tisch unter dem Mikroskop angebracht. Unter der Option „Aquire“ wurde das Bearbeitungsfenster geöffnet (**siehe Abbildung 11a**). Um das Speichervolumen auf ein Minimum zu beschränken, wurden die Aufnahmen in schwarz-weißer statt in farbiger Darstellung durchgeführt; dafür wurde der Binning-Wert auf „2“ festgesetzt (**siehe Abbildung 11a**). Durch die Option „Show Live“ konnte nun die aktuelle Bildaufnahme abgerufen werden (**siehe Abbildung 11a**).

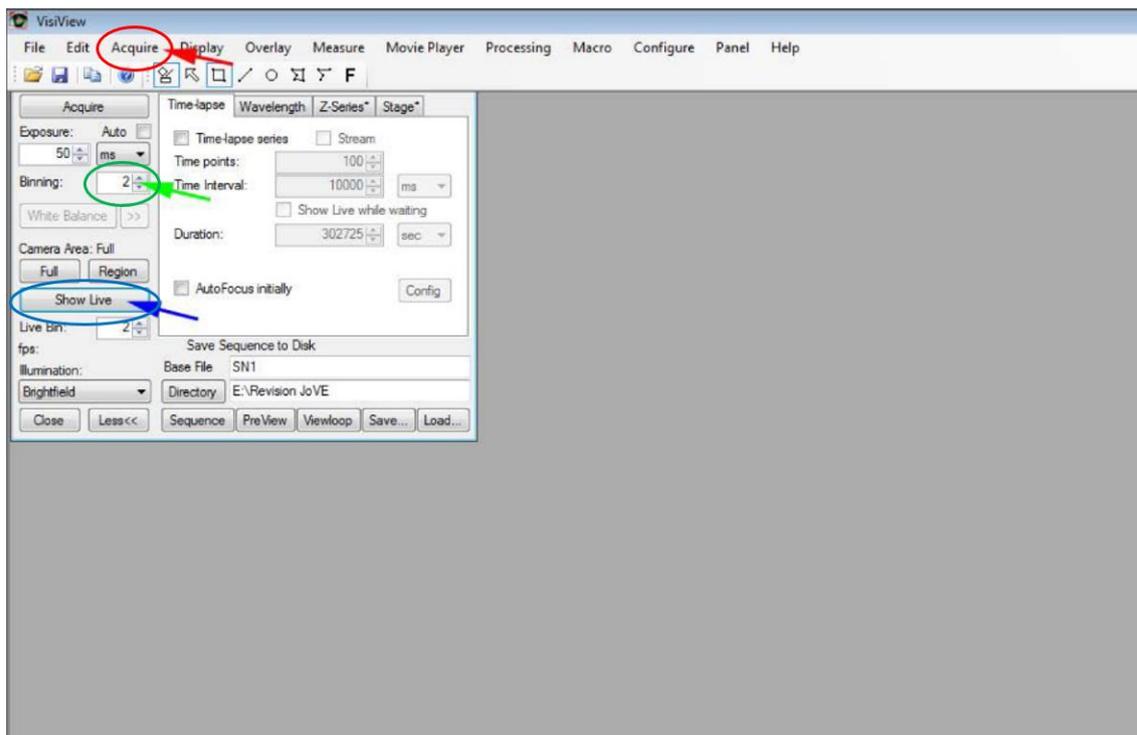


Abbildung 11a: Öffnen des Bearbeitungsfensters unter „Aquire“ (rotes Feld), Einstellung des Binning-Wertes auf „2“ (grünes Feld), Aufrufen der Bildaufnahme durch „Show Live“ (blaues Feld).

Es wurde eine Übersichtsaufnahme des zu untersuchenden Schnittes geöffnet. Dadurch konnten mit dem kleinsten Objektiv von 2,5x zunächst die richtigen Bildpositionen eingestellt und die Seiten identifiziert werden (**siehe Abbildung 11b**).

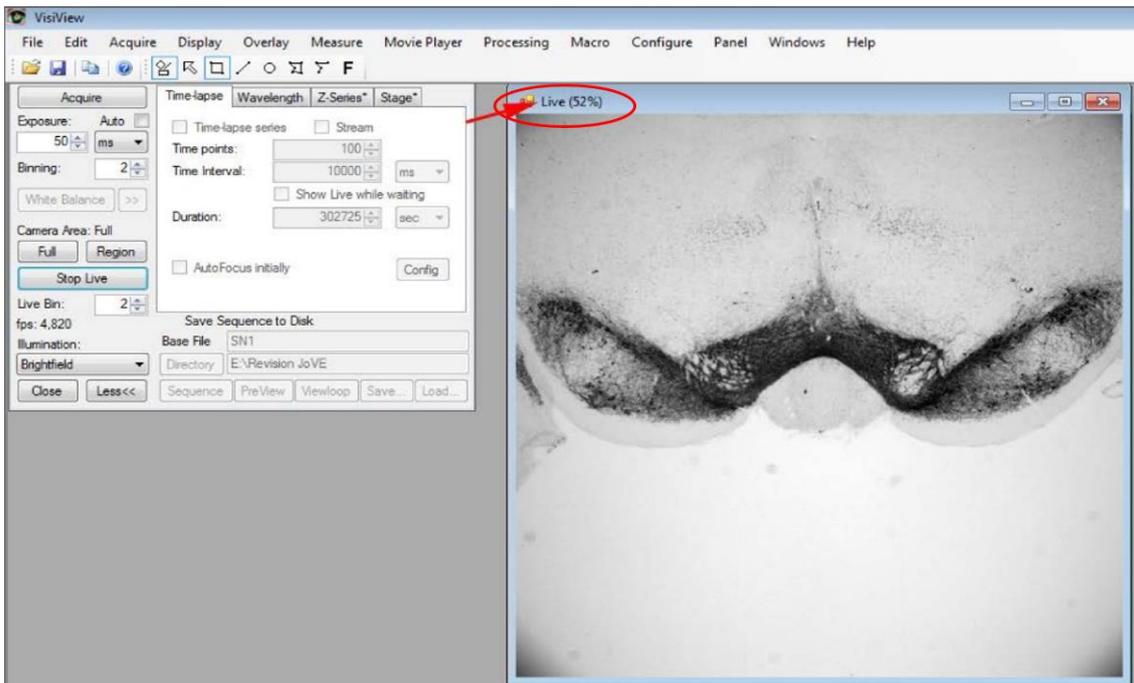


Abbildung 11b: aktuelle Bildaufnahme vom gesamten Schnitt in einem separaten Fenster (rotes Feld). Unter der Option „Stage“ wurde zunächst das Feld „Scan Slide“ aktiviert; bei 20x Objektiv wurden durch die Felder „TopLeft“ und „LowRight“ die X/Y-Koordinaten für die oberste linke Ecke und die unterste rechte Ecke des aufzunehmenden Bereiches bestimmt und jeweils unter „Set“ abgespeichert (siehe **Abbildungen 11c und 11d**).

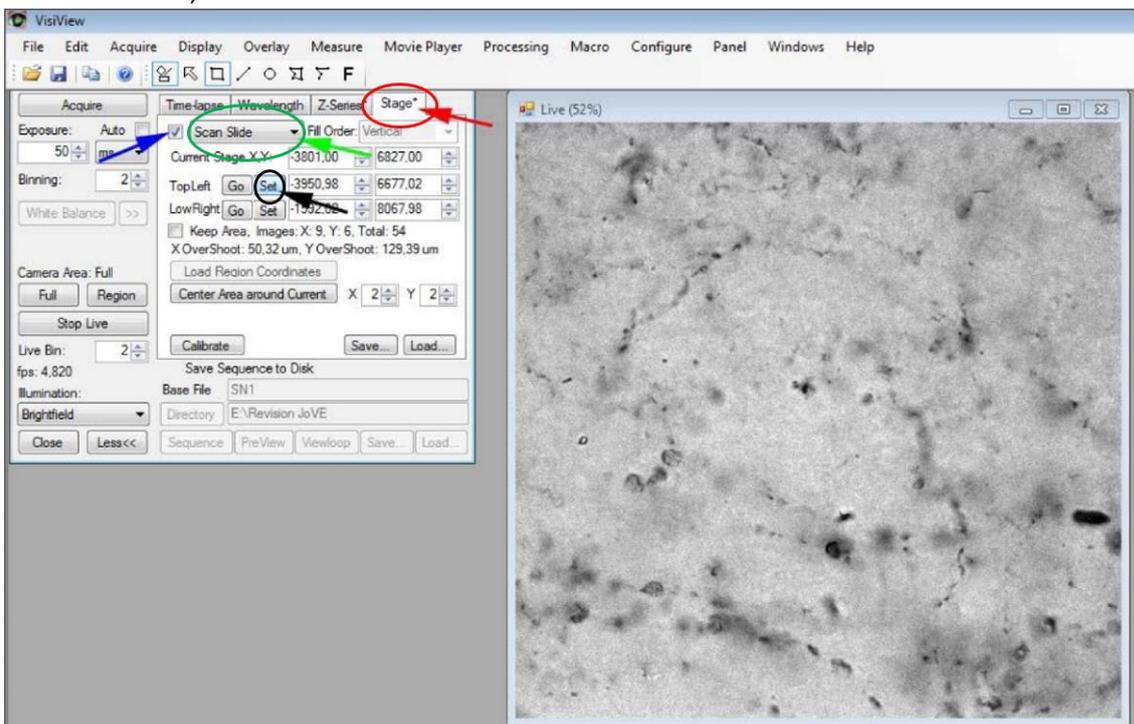


Abbildung 11c: Aufrufen von „Stage“ (rotes Feld), Aktivierung von „Scan Slide“ (grünes Feld), Abspeichern der oberen Koordinatenpositionen durch „Set“ (schwarzes Feld).

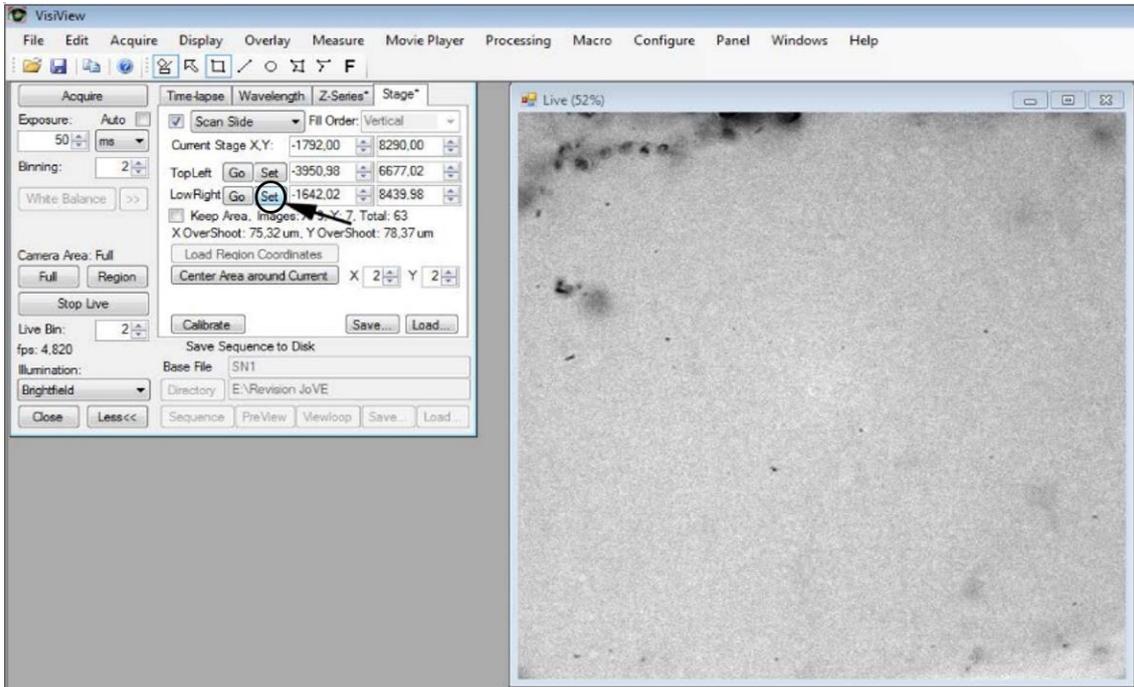


Abbildung 11d: Abspeichern der unteren Koordinationspositionen durch „Set“ (schwarzes Feld). Anschließend wurde unter der Option „Z-Series“ das Feld „Z-Plane series“ aktiviert; bei 63x Objektiv wurden an drei zufällig ausgewählten Bildpositionen innerhalb des Schnittes die Z-Koordinaten bestimmt, welche die tatsächliche Schnittdicke bestimmen sollten. Dabei wurde mit „View Top Offset“ von oberhalb des Schnittes soweit herangezoomt, bis ein Bereich scharf zu sehen war (siehe Abbildung 11e).

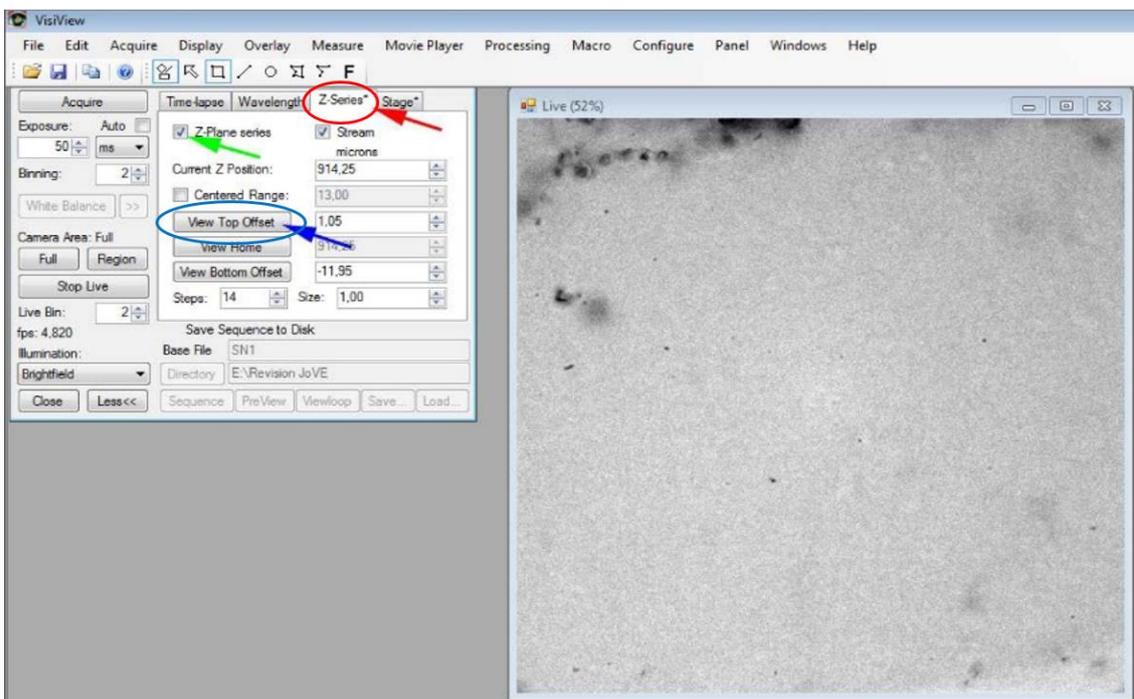


Abbildung 11e: Aufrufen von „Z-Series“ (rotes Feld), Aktivierung von „View Top Offset“ (blaues Feld).

Mittels „Stop View Top“ wurde die Position gespeichert (siehe **Abbildung 11f**). Genauso wurde auch für den Bereich unterhalb des Schnittes mit „View Bottom Offset“ (siehe **Abbildung 11f**) und „Stop View Bottom“ (siehe **Abbildung 11g**) verfahren.

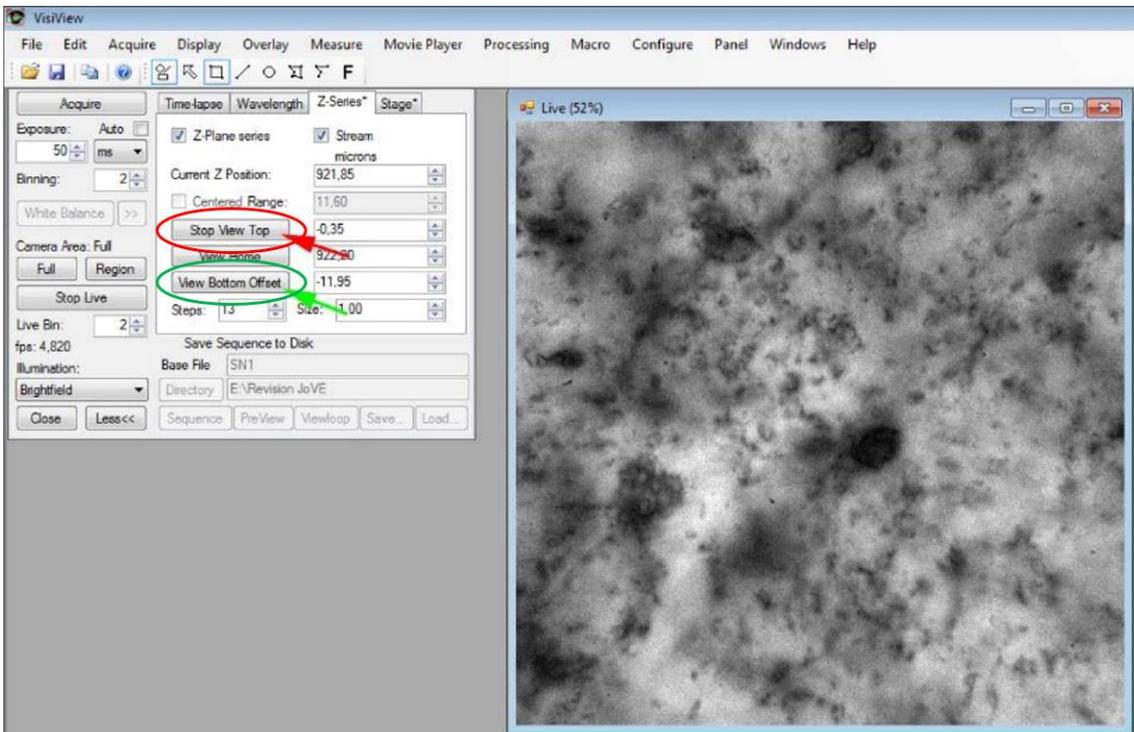


Abbildung 11f: Speichern der oberen Bildposition durch „Stop View Top“ (rotes Feld), Aktivierung von „View Bottom Offset“ (grünes Feld).

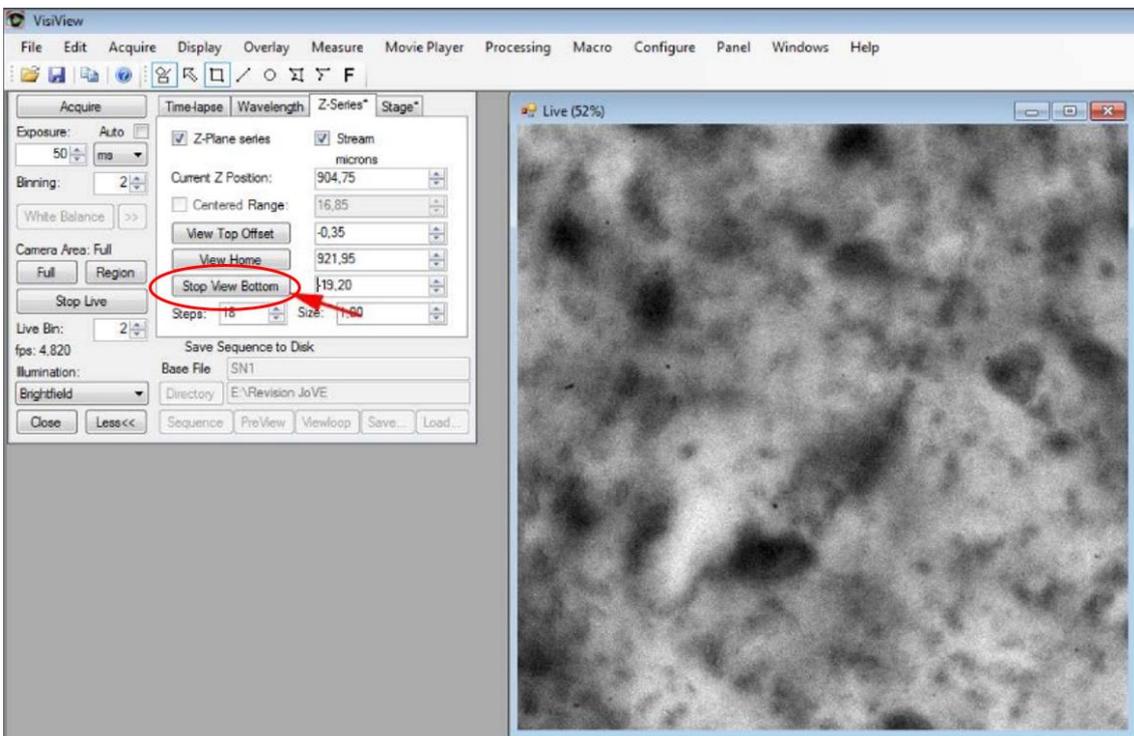


Abbildung 11g: Speichern der unteren Bildposition durch „Stop View Bottom“ (rotes Feld).

Von diesen Koordinatenwerten musste noch die jeweilige Grenz-Zone einkalkuliert werden. Vom „Top“-Wert wurden $3\mu\text{m}$ abgezogen und das Ergebnis als neuer „Top-Offset“-Wert eingegeben (**siehe Abbildung 11h**).

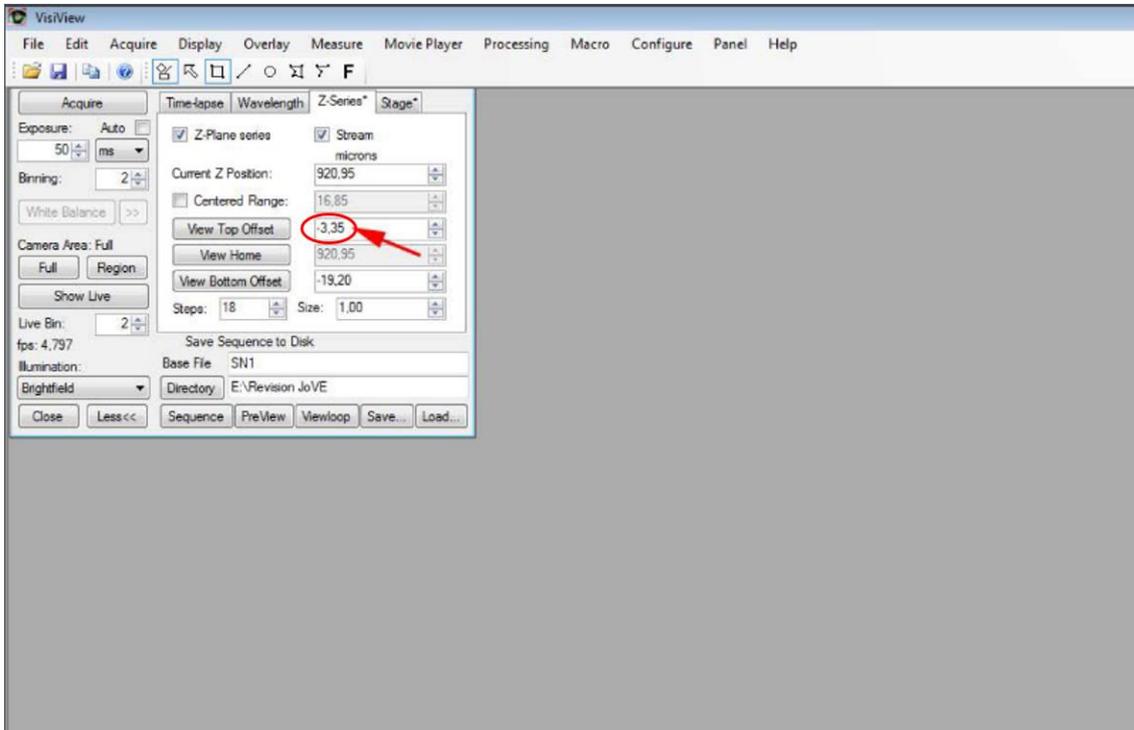


Abbildung 11h: Eingabe des neuen „Top-Offset“-Wertes (rotes Feld).

Anschließend wurden von diesem neuen „Top-Offset“-Wert $13\mu\text{m}$ subtrahiert, was der Höhe des optischen Disektors entspricht, und als neuer „Bottom-Offset“-Wert in das entsprechende Feld eingegeben (**siehe Abbildung 11i**). Danach wurden noch folgende Parameter festgelegt: „Steps: 14“ und „Size: 1.00“ (**siehe Abbildung 11i**). Damit konnten die Aufnahmen in $1\mu\text{m}$ -Schritten durch die gesamte Schnittdicke von $13\mu\text{m}$ in der Z-Achse erfolgen.

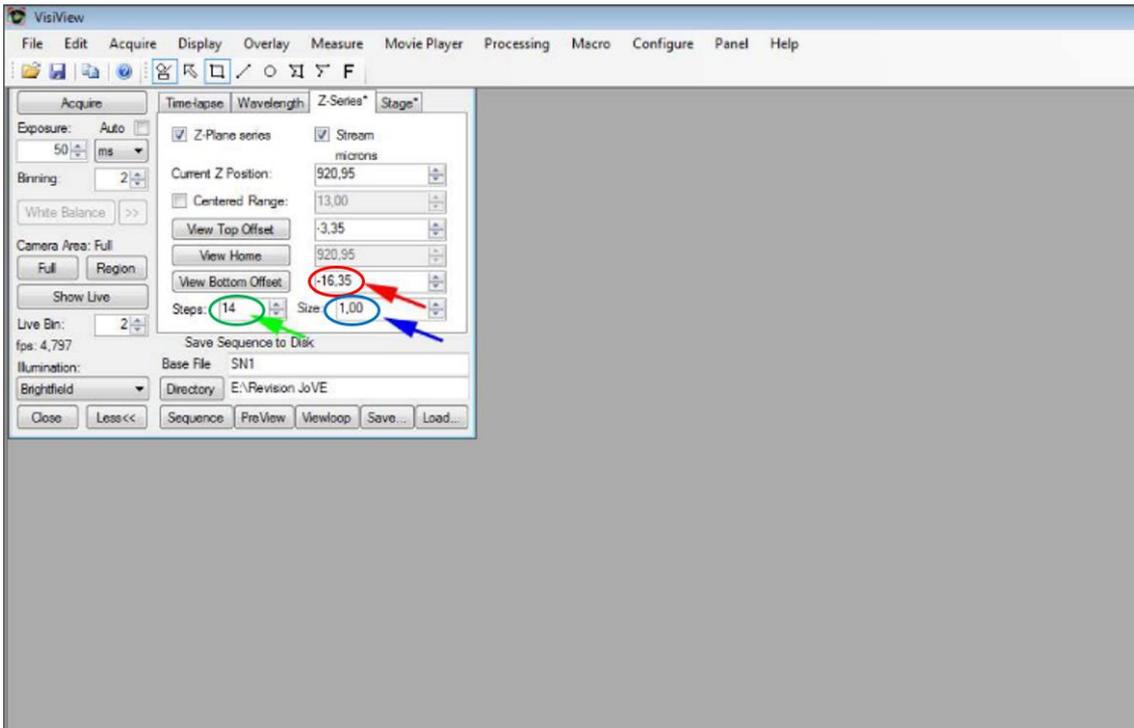


Abbildung 11i: Eingabe des „Bottom-Offset“-Wertes (rotes Feld), Festlegung des Wertes für „Steps“ auf „14“ (grünes Feld) und für „Sizes“ auf „1,00“ (blaues Feld).

Sobald alle Eingaben erfolgten, konnte man durch das Feld „Directory“ den Speicherort auswählen und anschließend durch die Option „Sequence“ mit der Bildaufnahme beginnen (siehe **Abbildung 11j**).

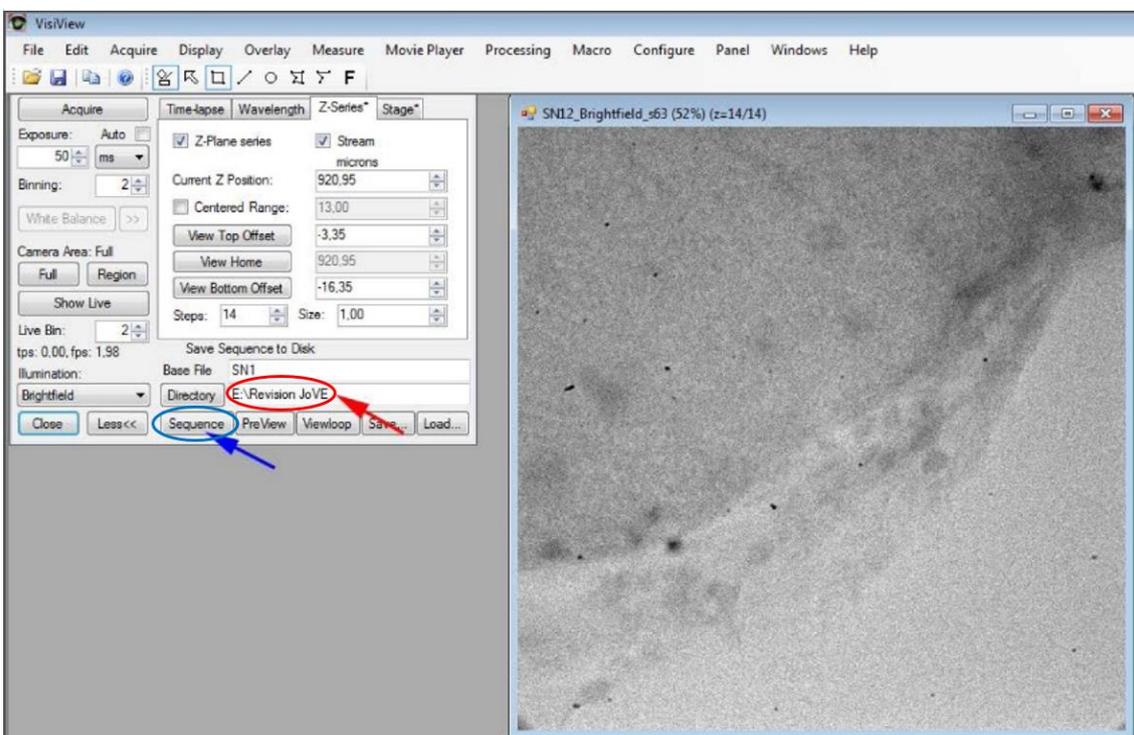


Abbildung 11j: Auswahl des Speicherortes der Bilddatei unter „Directory“ (rotes Feld), Starten der Bildaufnahme mit „Sequence“ (blaues Feld).

Nach der Aufnahme wurden unter der Option „Processing“ folgende Schritte durchgeführt: Aktivierung von „All Planes“ und „Sequence“ sowie unter „Montage“ → Stitching → Overlap of Images 10% → fast“ (siehe **Abbildung 11k**) mit anschließendem digitalem Zusammenfügen der einzelnen Bilder durch „Start“ (**Abbildung 11k**; neben dem „Processing“-Fenster).

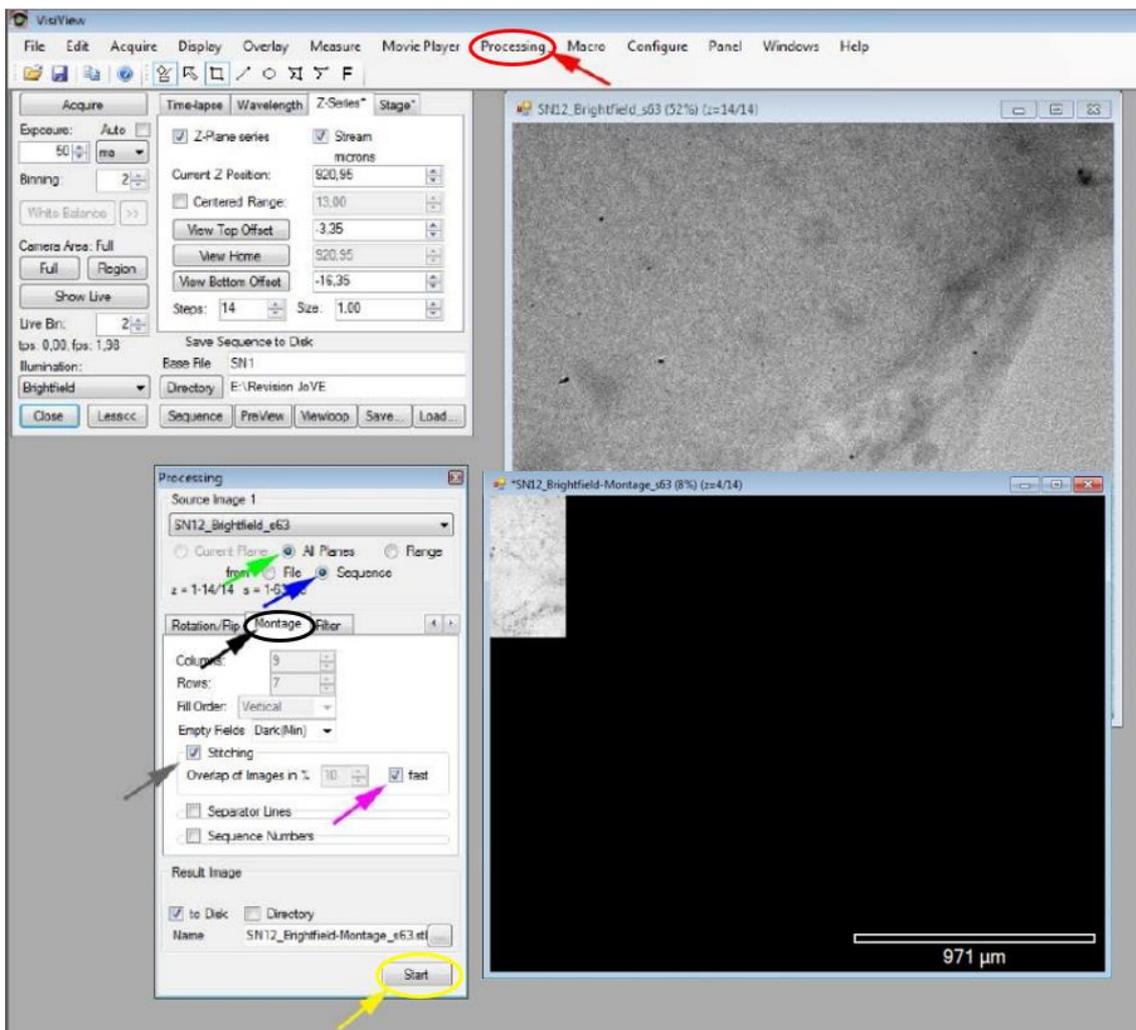


Abbildung 11k: Aufrufen von „Processing“ (rotes Feld), Aktivierung von „All Planes“ (grüner Pfeil) „Sequence“ (blauer Pfeil), Aufrufen von „Montage“ (schwarzes Feld), Aktivierung von „Stitching“ (grauer Pfeil) und „Overlap of Images 10%“ auf „fast“ (rosaner Pfeil), Starten der Bearbeitung durch „Start“ (gelbes Feld).

Auswertung mit ImageJ

Zunächst wurde durch das Programm „NIH ImageJ Software Version 4.7“ unter der Option „File → Open“ das Bild geöffnet (siehe **Abbildung 12a**).

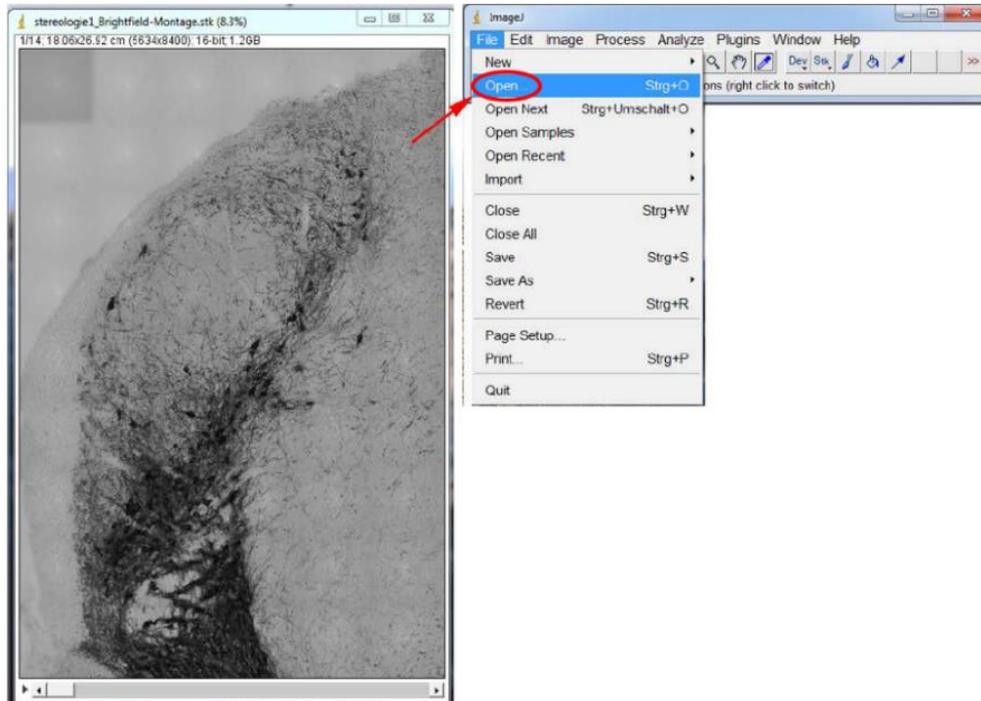


Abbildung 12a: Aufrufen der Bilddatei unter „File“ durch „Open“ (rotes Feld).

Unter der Option „Analyze → Set Scale“ wurde die Größeneinheit von ‚pixel‘ auf ‚ μm ‘ geändert, wobei $425\text{pix} = 100\mu\text{m}$ betragen sollte (siehe **Abbildung 12b**).

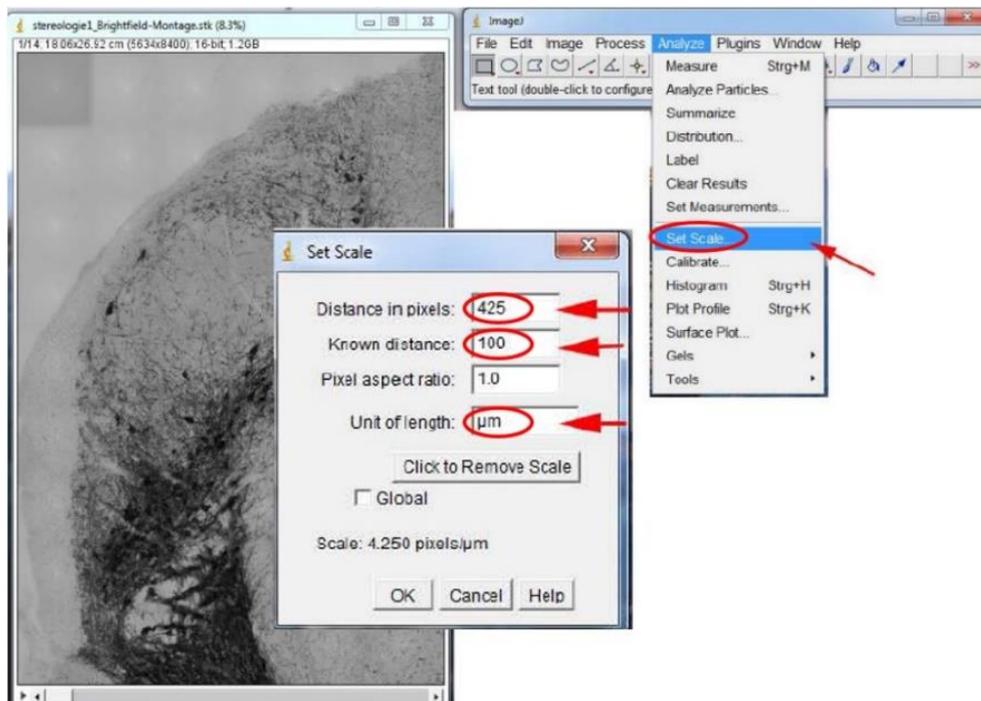


Abbildung 12b: Aufrufen von „Set Scale“ unter „Analyze“ und Umwandlung der Größeneinheit von ‚pixel‘ auf ‚ μm ‘ (rote Felder).

Über „Plugins → Grid → Grid Lines“ wurden Linien als Rastertyp festgelegt und die Rasterfläche auf $16.900\mu\text{m}^2$ ($130\mu\text{m} \times 130\mu\text{m}$) eingestellt, da eine Seite des Rasters $130\mu\text{m}$ betrug (**siehe Abbildung 12c**). Durch die Funktion „Random Offset“ (**siehe Abbildung 12c**) wurde nun das System aus Rasterquadratflächen zufällig innerhalb des gesamten Bildes positioniert (**siehe Abbildung 12d**).

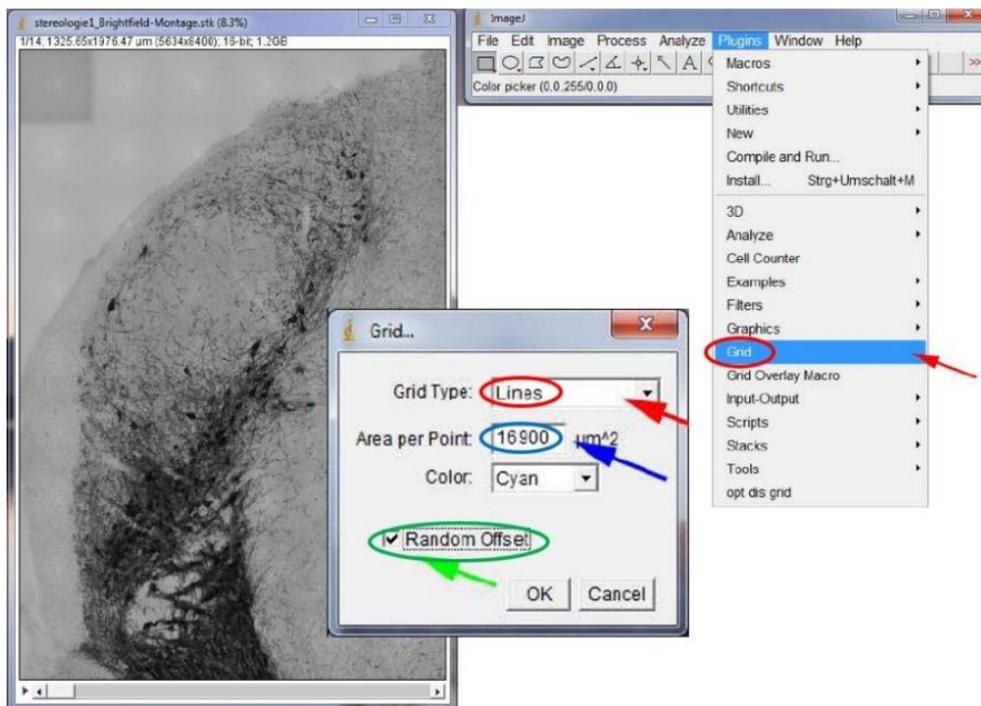


Abbildung 12c: Aufrufen von „Grid“ unter „Plugins“ und Eintragung von „Lines“ als Rastertyp (rotes Feld) sowie des Wertes „16900 μm^2 “ als Rasterfläche (blaues Feld). Einmaliges Betätigen von „Random Offset“ (grünes Feld).

Unter der Option „Image → Type“ erfolgte die Umwandlung von 16-bit auf RGB Color (**siehe Abbildung 12d**), wobei als Pinselgröße mindestens der Wert „11“ eingegeben wurde (**siehe Abbildung 12d**).

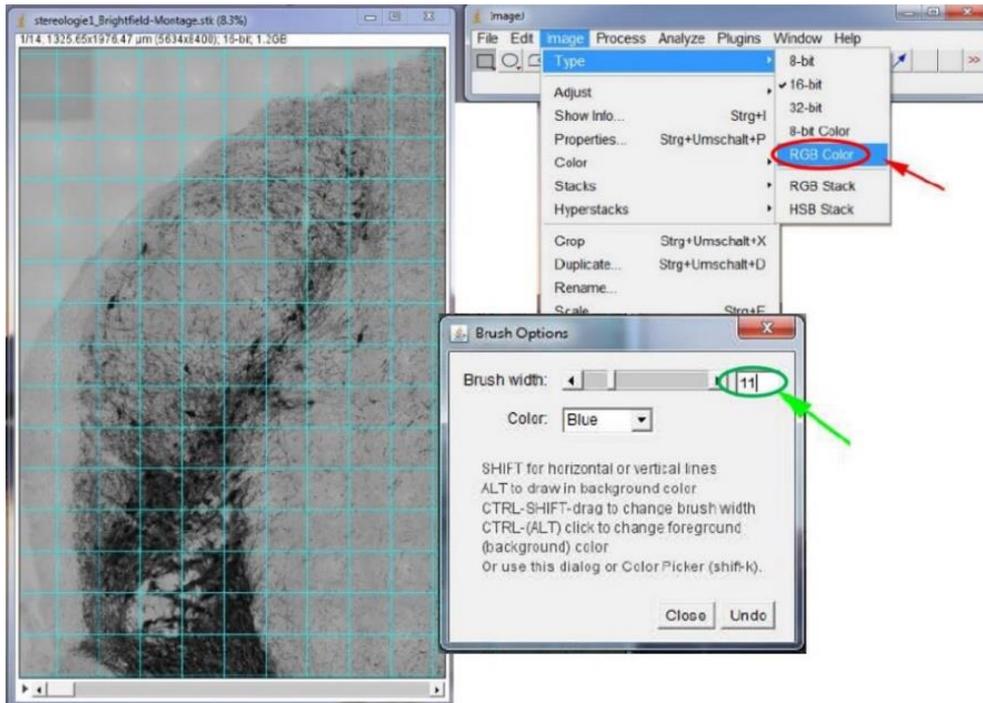


Abbildung 12d: Aufrufen von „Type“ unter „Images“ und Aktivierung von „RGB-Color“ (rotes Feld), Festlegung der Pinselgröße auf mindestens „11“ (grünes Feld).

Manuell wurde auf dem Bild der Bereich der SNpc mit Hilfe des Paxinos/Franklin-Maushirn-Atlas (2001) und des Artikels „Comparison of Model-Based (2D) and Design-Based (3D) Stereological Methods for Estimating Cell Number in the Substantia Nigra pars compacta of the C57BL/6J Mouse“ (Baquet et al., 2009) identifiziert und eingekreist (**siehe Abbildung 12e**).

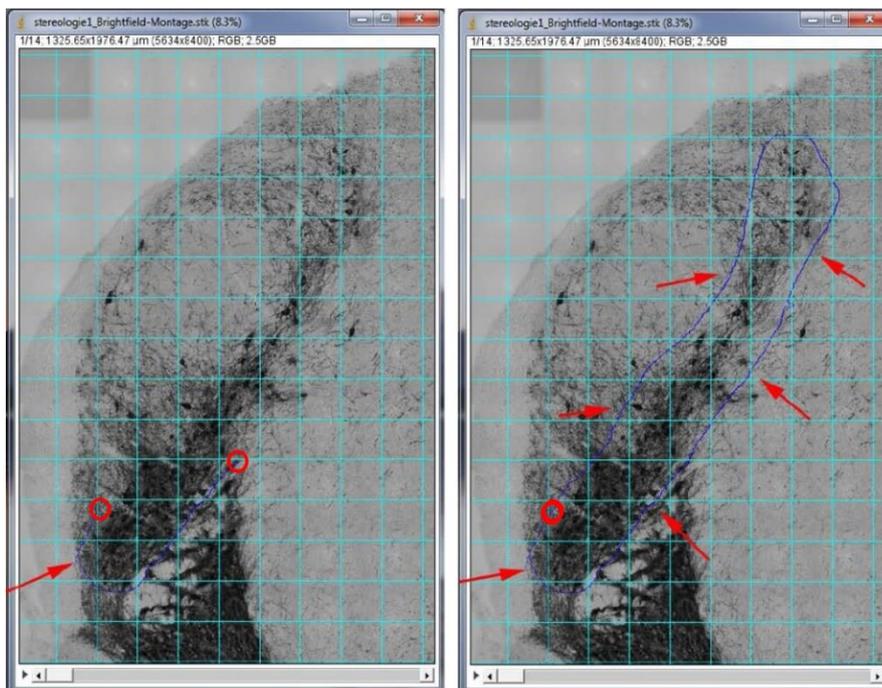


Abbildung 12e: Markierung der SNpc (blaues Feld).

Über „Analyze → Set Scale → Click to Remove Scale“ konnte die Umwandlung und die nachfolgende Berechnung wieder von ‘ μm ’ auf ‘pixel’ erfolgen (siehe **Abbildung 12f**).

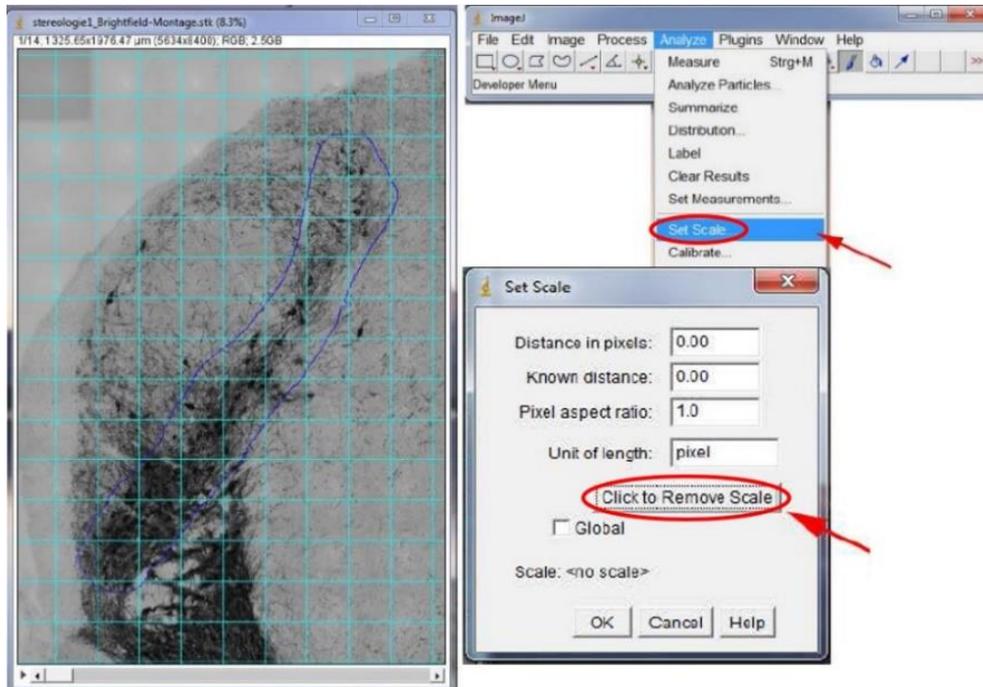


Abbildung 12f: Umwandlung der Größeneinheit von ‘ μm ’ auf ‘pixel’ durch „Click to Remove Scale“ unter „Set Scale“ (rote Felder).

Nach Erstellung eines Screenshots (durch Betätigung der „Drucken“ Taste) wurde der Screenshot in eine einfache Bearbeitungssoftware wie „Paint“ eingefügt (siehe **Abbildung 12g**).

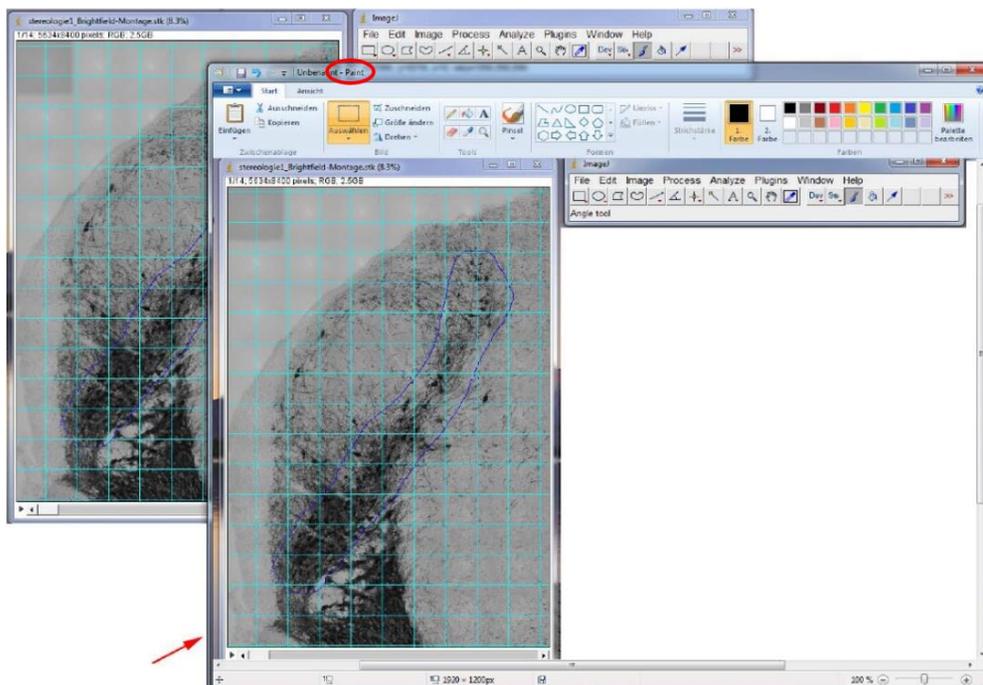


Abbildung 12g: Einfügen und Speichern eines Screenshots durch „Paint“ (rotes Feld).

Der Screenshot wurde gespeichert und unter ImageJ wieder geöffnet (siehe **Abbildung 12h**).

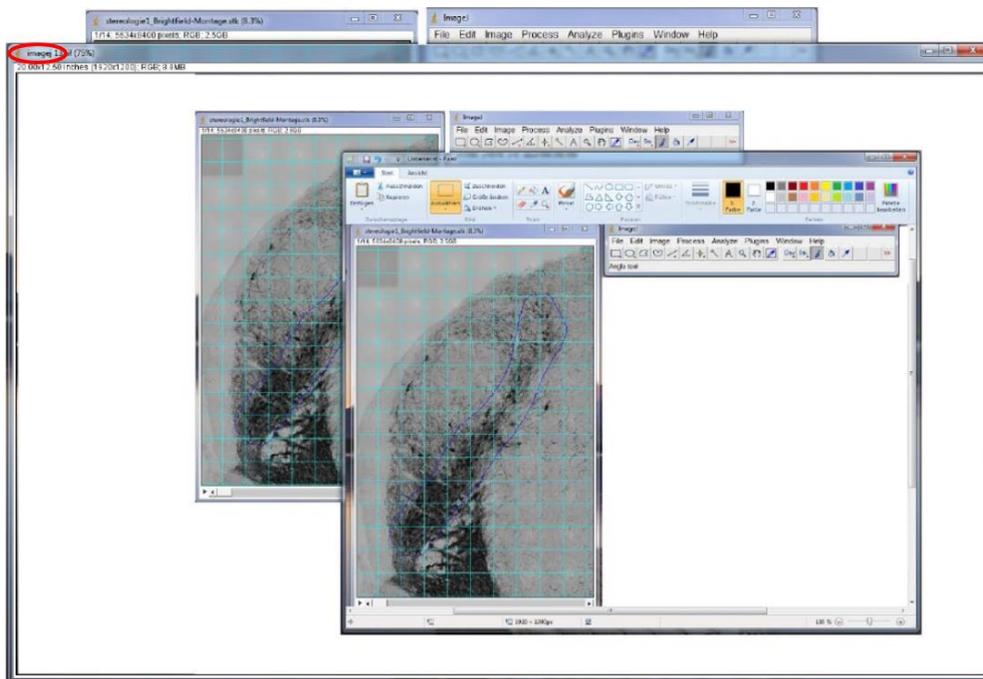


Abbildung 12h: Öffnen des Screenshots unter „ImageJ“ (rotes Feld).

Unter der Option „Point“ wurde die Pinselgröße nun auf den Wert „25“ verändert (siehe **Abbildung 12i**).

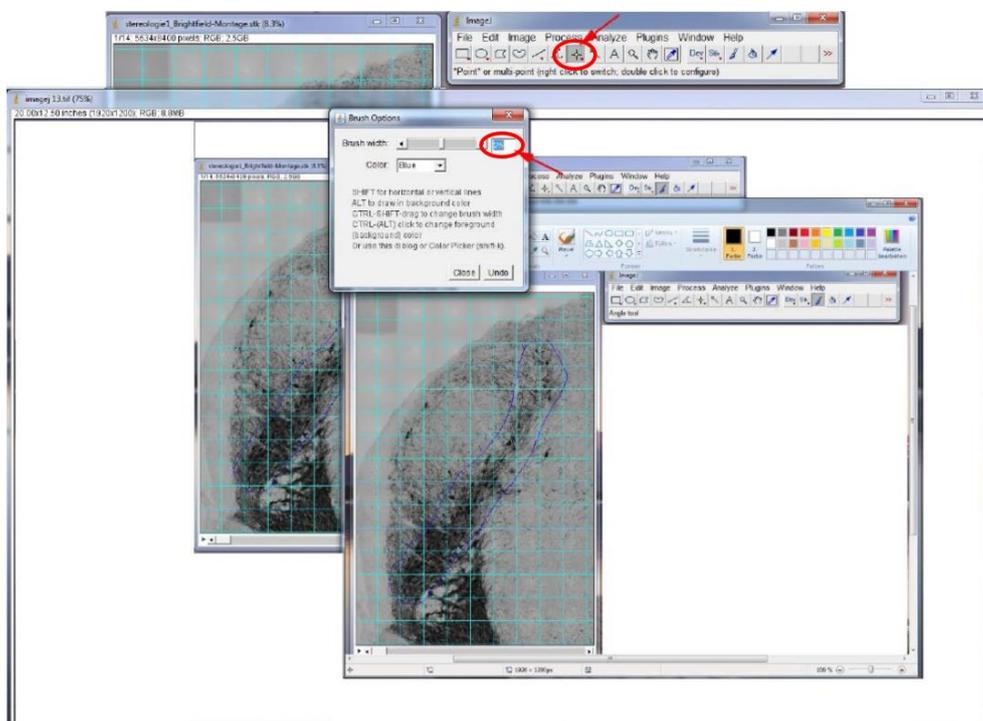


Abbildung 12i: Änderung der Pinselgröße auf „25“ unter „Point“ (rote Felder).

Alle Rasterkästchen, die mit dem eingekreisten Bereich der SNpc in Berührung kamen, wurden auf dem Screenshot markiert (siehe **Abbildung 12j**).

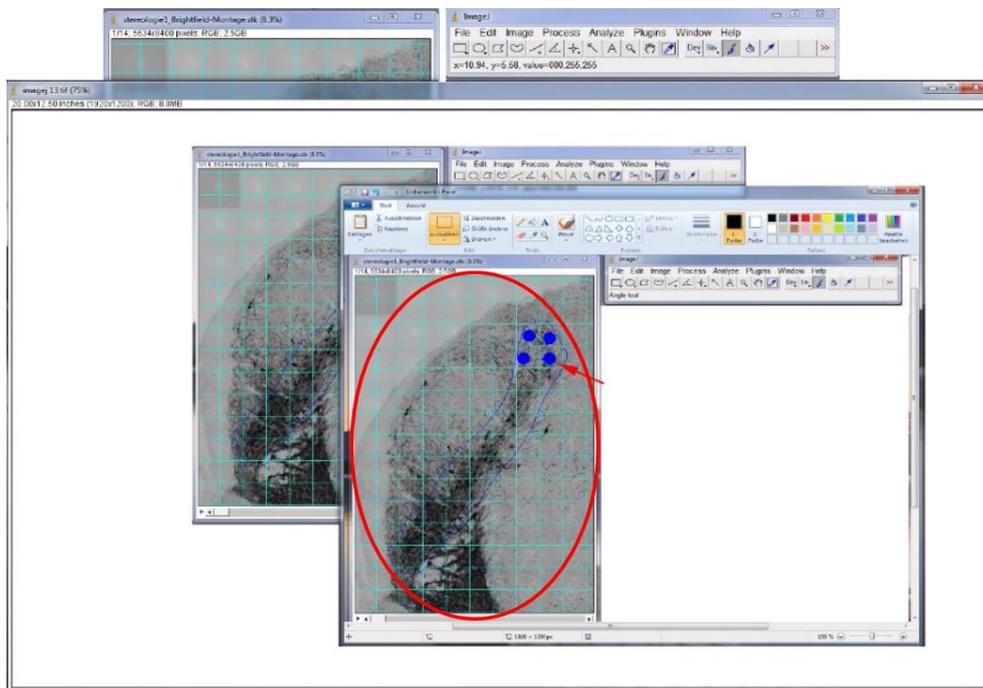


Abbildung 12j: Markierung der Rasterkästchen, welche mit dem eingekreisten Bereich in Berührung kommen (hier in blau).

Das oberste linke Raster, das den markierten Bereich berührte, wurde besonders als Startpunkt gekennzeichnet (siehe **Abbildung 12k**) und seine Koordinaten ImageX' und ImageY' in seiner obersten linken Ecke bestimmt, die sich in der Anzeigeleiste von ImageJ ablesen ließen (siehe **Abbildung 12k**; blauer Kreis).

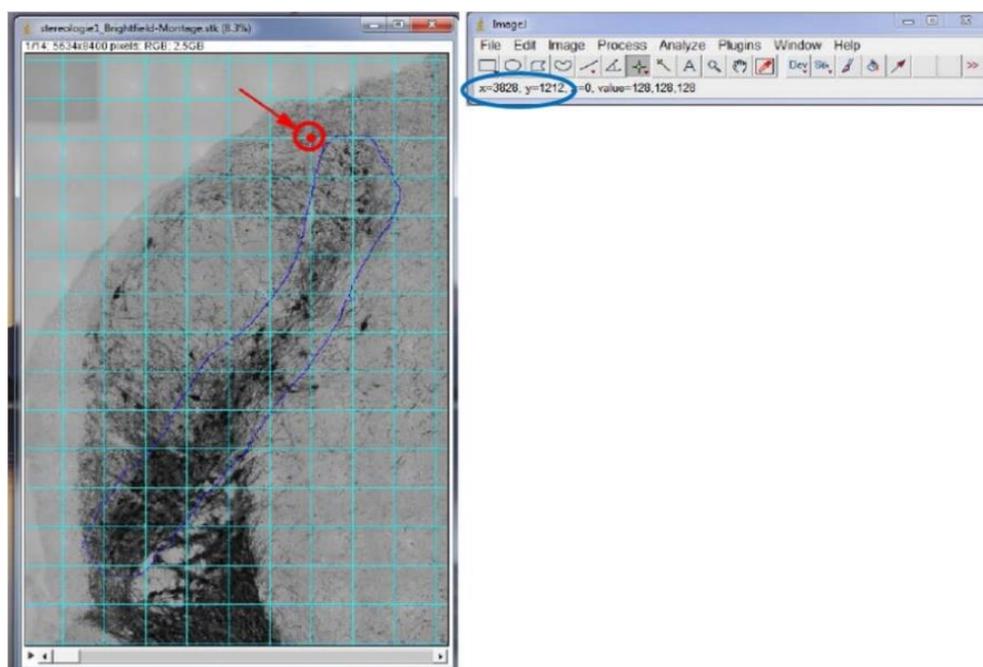


Abbildung 12k: Bestimmung des obersten linken Rasters (rotes Feld) und Ablesen der Koordinaten ImageX' und ImageY' (blaues Feld).

Jene Koordinaten wurden nun in ein entsprechendes Feld der selbsterstellten Excel-Tabelle eingetragen, um daraus die endgültigen Koordinaten des optischen Disektors zu berechnen (**siehe Abbildung 12i**; grünes Feld).

Die Berechnung hat folgenden Grund: da ImageX' und ImageY' nicht die zentrale Position des optischen Disektors in einem Rasterkästchen darstellen würden, musste dieser um je 276pix weiter nach rechts und nach unten verschoben werden ($130\mu\text{m} = 552,5\text{pix}$ liefert 276pix für die halbe Strecke). Die richtigen Koordinaten des optischen Disektors waren dementsprechend für ImageX = ImageX' + 276pix und ImageY = ImageY' + 276pix (**siehe Abbildung 12i**; blaues Feld). Der Abstand der einzelnen Disektoren zueinander betrug 552,5pix.

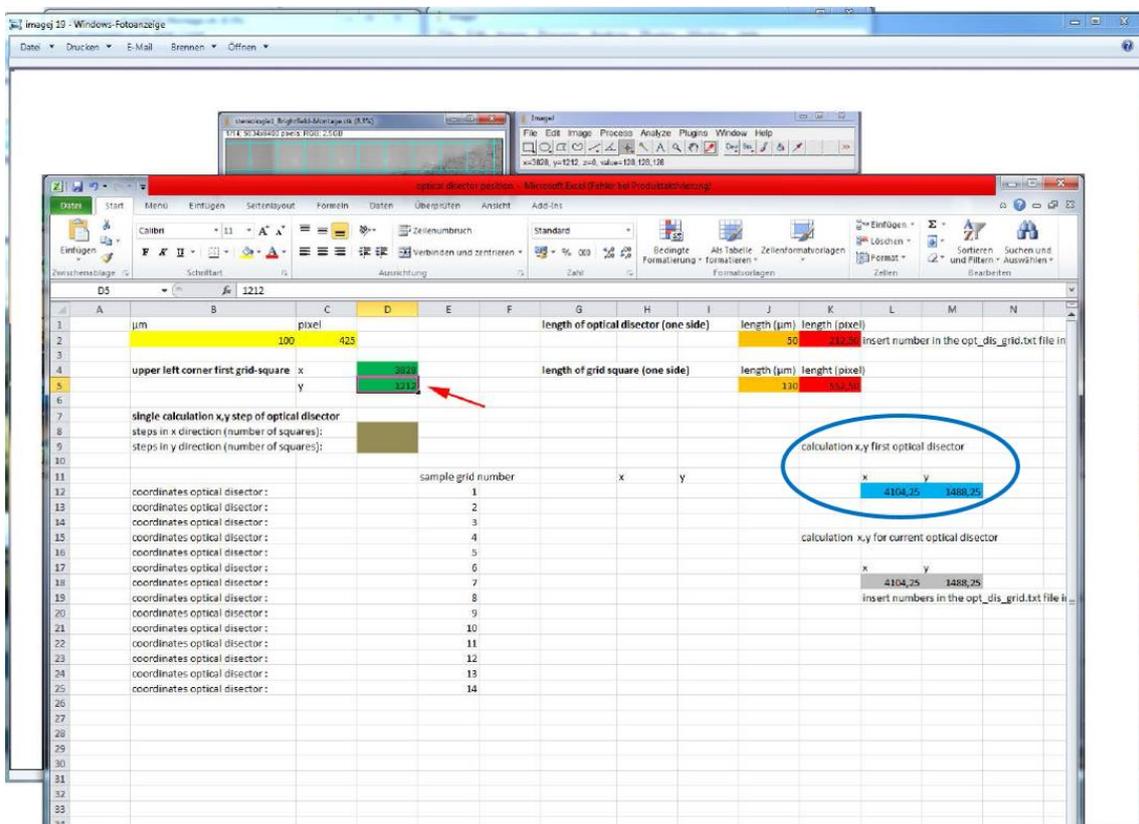


Abbildung 12i: Eintragung von ImageX' und ImageY' in das grüne Feld (roter Pfeil), Erhalt der berechneten Koordinaten ImageX und Image Y (blaues Feld).

Als nächstes wurde der optische Disektor als Datei „opt_dis_grid_txt“ von Christopher S. Ward (2013) über „Plugins → Macros → Edit“ geöffnet (**siehe Abbildung 12m**). Dadurch öffnete sich ein separates Fenster, in der die Einstellungswerte für den optischen Disektors eingegeben werden konnte (**siehe Abbildung 12n**).

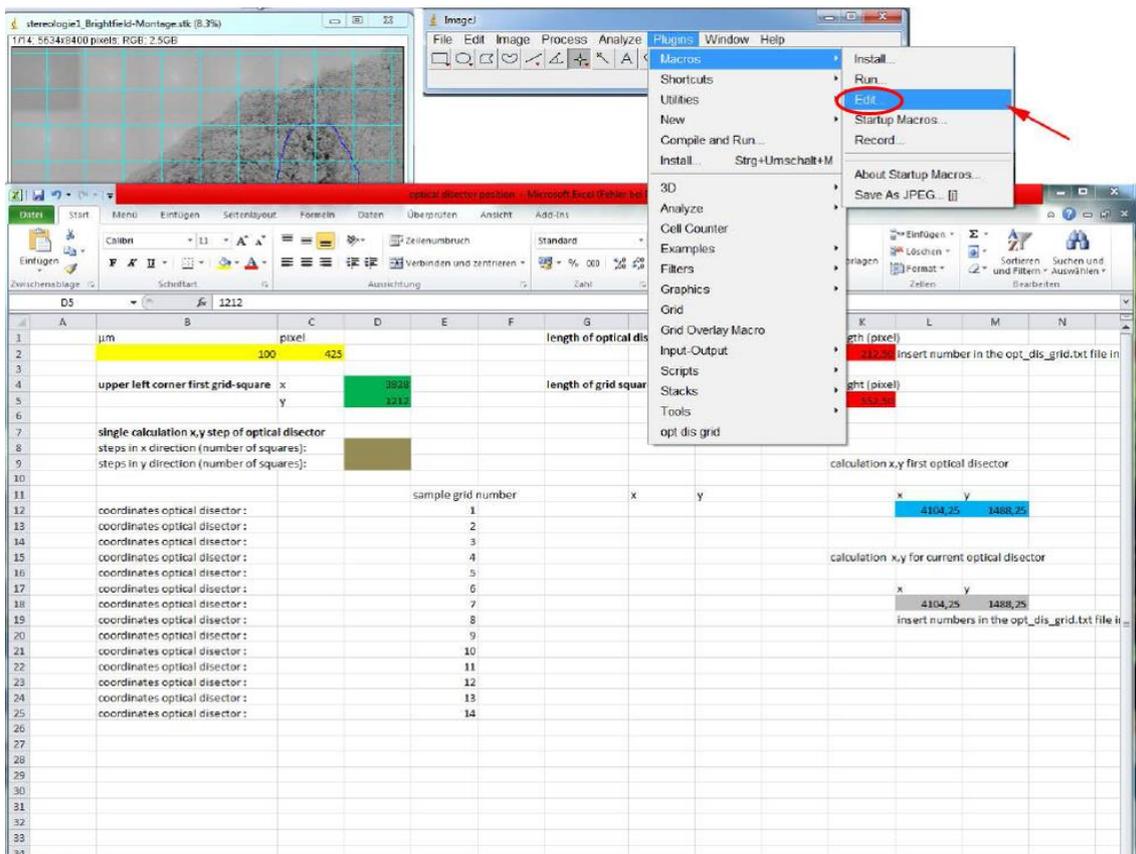


Abbildung 12m: Aufrufen des optischen Disektors durch „Edit“ (rotes Feld) unter „Plugins“ und „Macros“. Unter dem Punkt „usergrid“ wurde die Länge einer Seite des Zählrahmens in „pixel“ eingegeben: der Rahmen sollte eine Größe von 50µm x 50µm einnehmen, folglich betrug eine Seite des Rahmens 212,5pix (50µm x 4,25pix), was nun in die entsprechende Zeile eingegeben wurde (siehe Abbildung 12n; roter Kreis). Die richtigen Positionskordinaten des optischen Disektors, ImageX und ImageY, wurden ebenfalls eingegeben (siehe Abbildung 12n; grüner Kreis).

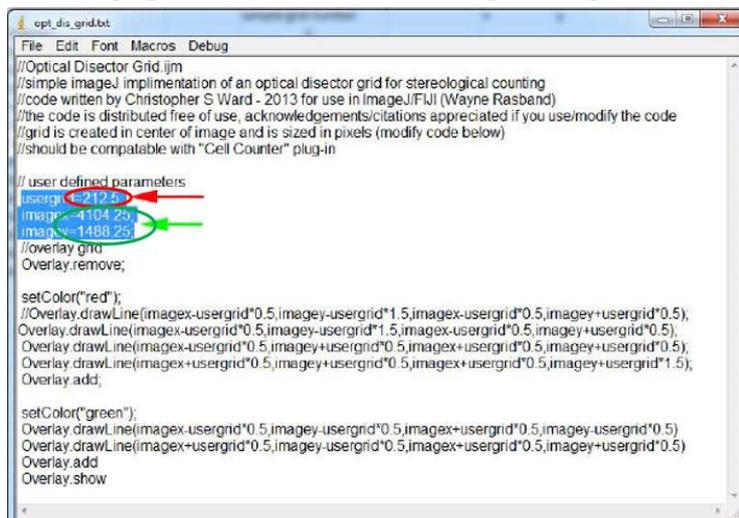


Abbildung 12n: Eintragung von „212,5“ für den „usergrid“ (rotes Feld) und der Koordinaten (grünes Feld).

Über „Macros → Run Macros“ (siehe **Abbildung 12o**) wurde der optische Disektor beziehungsweise der Zählrahmen mit seinen roten und grünen Begrenzungen nun entsprechend der Größe und der richtigen Positionskordinaten in das Bild eingefügt (siehe **Abbildung 12p**).

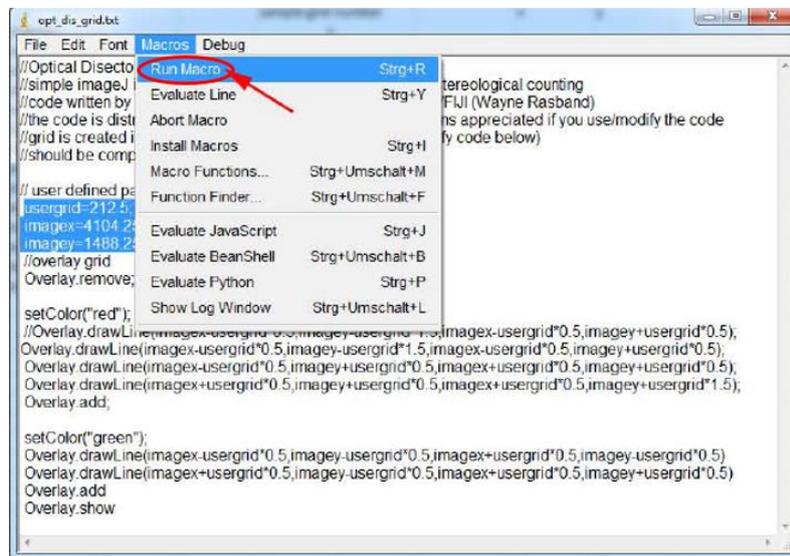


Abbildung 12o: Einfügen des optischen Disektors durch „Run Macros“ unter „Macros“ (rotes Feld).

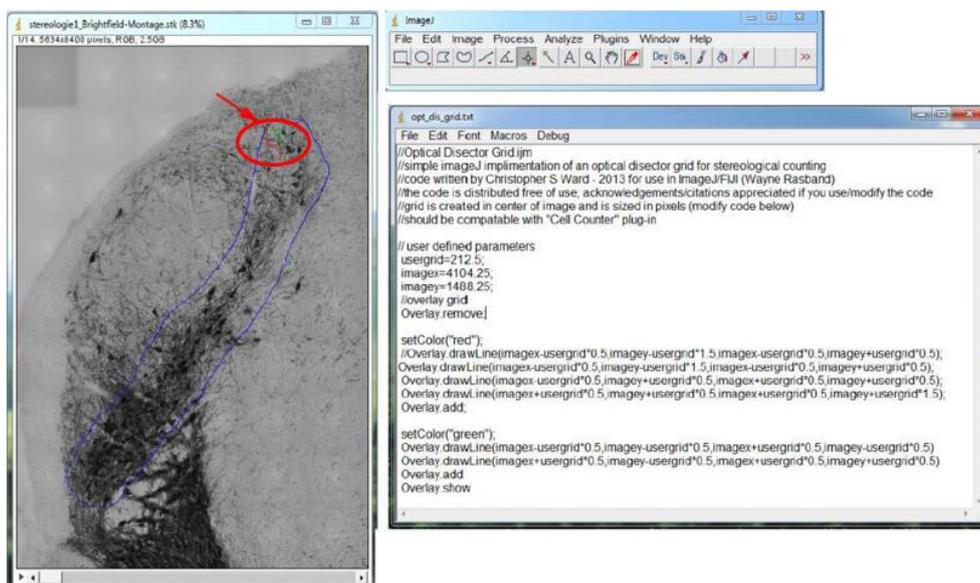


Abbildung 12p: Erscheinen des optischen Disektors in der Aufnahme (rotes Feld).

Durch „Plugins → Cell Counter“ (siehe **Abbildung 12q**) und nach Auswahl eines Markers in „Initialize“ (siehe **Abbildung 12r**) konnten die Zellen eindeutig markiert und die Zählung der TH-positiven Zellen anhand der stereologischen Regeln mit dem optischen Disektor durchgeführt werden.

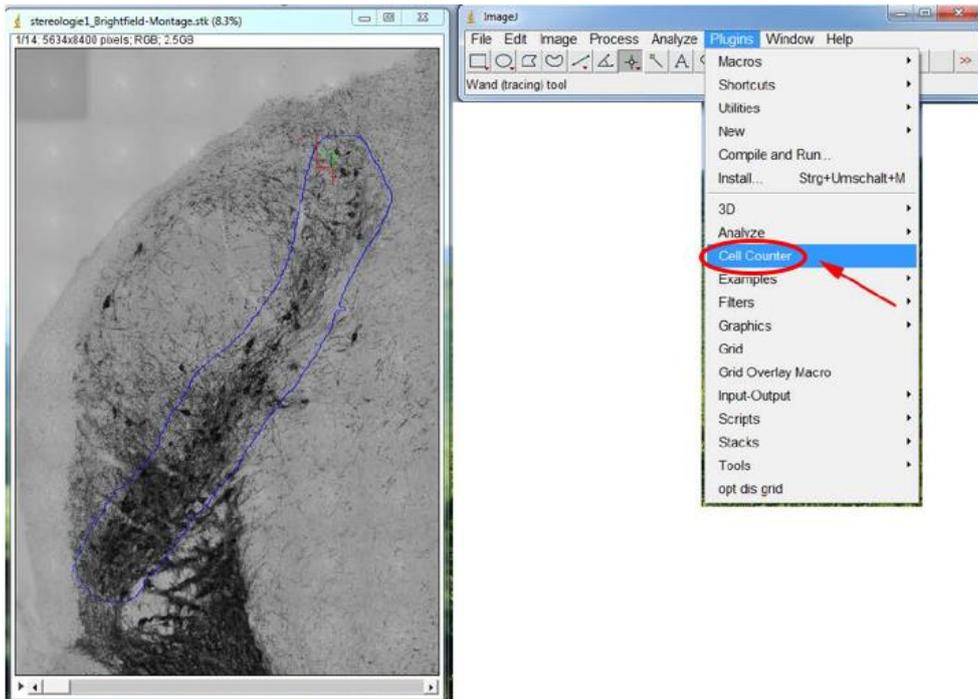


Abbildung 12q: Aufrufen des „Cell Counters“ unter „Plugins“ (rotes Feld).

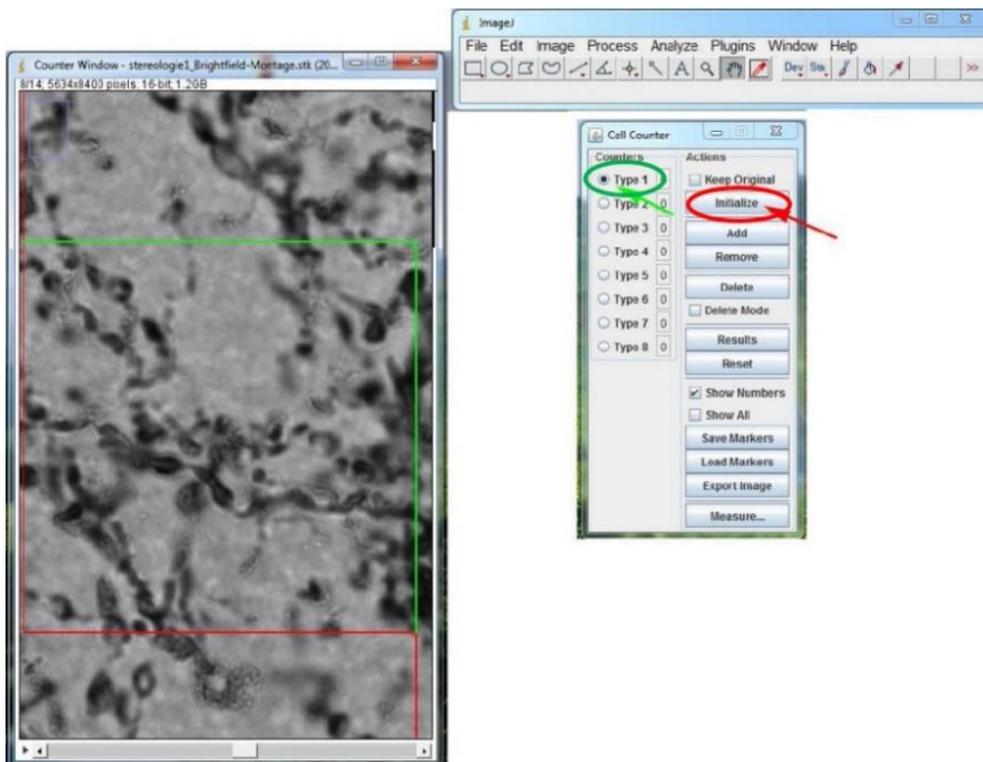


Abbildung 12r: Auswahl eines Markertyps (grünes Feld) und Bestätigung durch „Initialize“ (rotes Feld).

Das Vergrößern des Bildabschnittes erfolgte mit der Taste „+“ und das Fokussieren in tiefere Ebenen Richtung Z-Achse mit dem Mausrad (**siehe Abbildung 13**). Ein Problem war das Verschwinden des Rastersystems

unmittelbar nach dem Einfügen des optischen Disektors. Sowohl die Positionskordinaten des Disektors als auch das Ergebnis der Zählung wurden daher unmittelbar in manuell erstellte Tabellen festgehalten (**siehe Abbildungen 14 und 15**). Für die nächste Position des optischen Disektors wurden wiederum neue Koordinaten für ImageX und ImageY berechnet, **siehe Abbildung 14**. Unter Berücksichtigung der Zählregeln führte man nun auf dieselbe und oben beschriebene Weise die Zählung für alle markierten Bereiche der SNpc in der Abbildung und für alle Schnitte auf beiden Seiten durch.

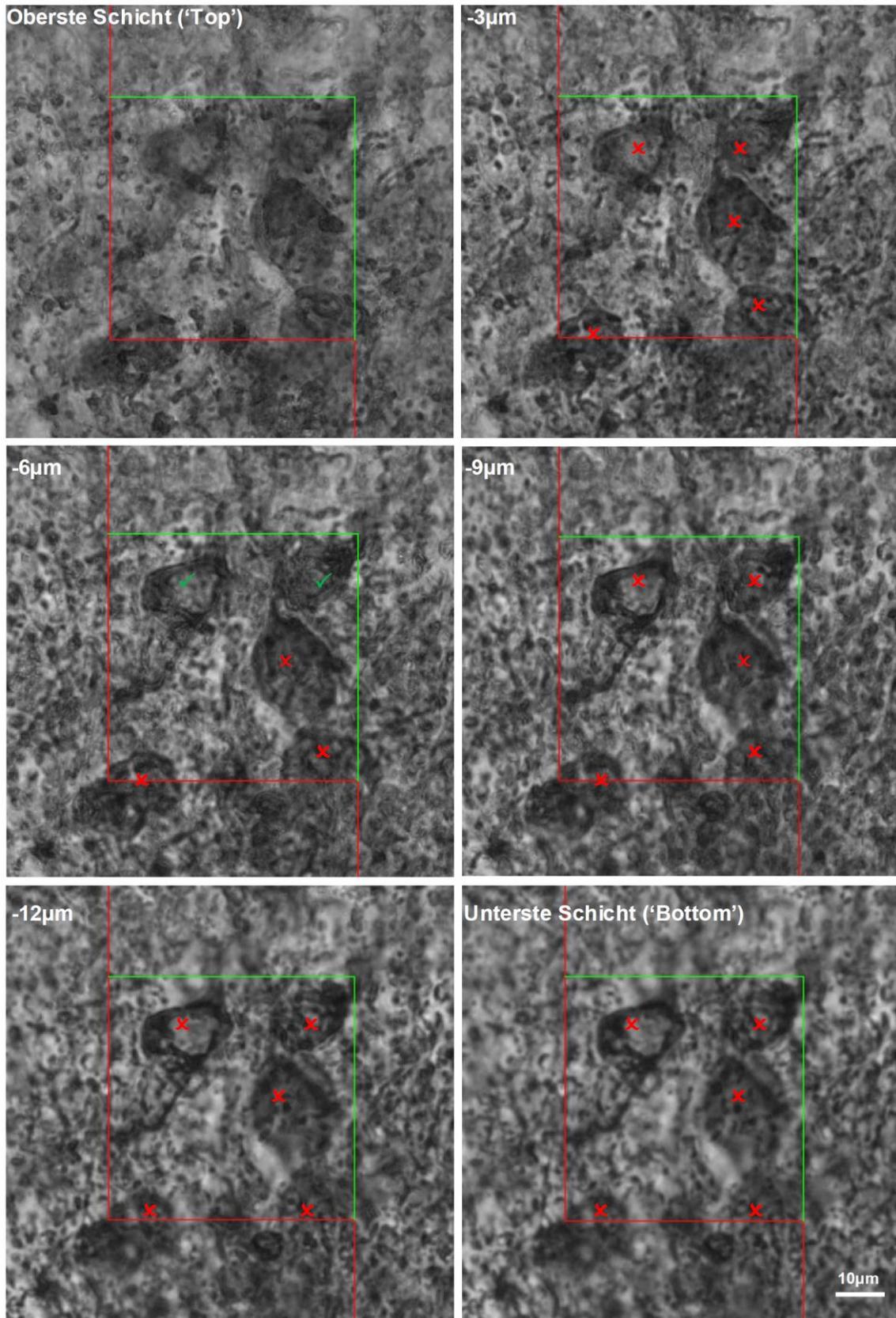


Abbildung 13: Die Abbildung zeigt das Vorgehen der stereologischen Zählung an einer definierten Stelle auf 6 absteigenden Ebenen, wobei der ‚Top‘ und der ‚Bottom‘ jeweils um ca. $1\mu\text{m}$ und die dazwischenliegenden Ebenen um je $3\mu\text{m}$ in der vertikalen Achse zueinander getrennt sind (Disektorhöhe insgesamt $13\mu\text{m}$). Die Zellen sind auf jeder Ebene unterschiedlich scharf dargestellt.

Eintragung und Berechnungen aus den Ergebnissen

Für die Eintragungen der berechneten Koordinaten der einzelnen Positionen des optischen Disektors wurde eine durch Excel selbsterstellte Gesamttabelle verwendet, welche wiederum aus mehreren kleineren Tabellen besteht, **siehe Abbildung 14**. Eine Tabelle repräsentiert die untersuchte Seite eines Schnittes. Bestimmte Felder darin beinhalten eine zuvor festgelegte Formel, die sich aus den Berechnungen aus anderen Feldern zusammensetzt, **siehe Abbildung 14**. Sie beinhaltet zunächst die passende Umwandlung der Messeinheit von ‚ μm ‘ auf ‚pixel‘, wobei hier $100\mu\text{m} = 425\text{pix}$ betragen (gelbe Felder). Dadurch können die festgelegten μm -Längen des Zählrahmens und des Rasters (orange Felder) in Pixel-Längen berechnet werden (rote Felder): für eine Seite des Zählrahmens gelten $50\mu\text{m} = 212,5\text{pix}$ und für die Seite eines Raster $130\mu\text{m} = 552,5\text{pix}$. Die X/Y-Koordinaten von ImageX' und ImageY' (pix) werden in die grünen Felder eingegeben, aus denen nun weitere Koordinatenpaare berechnet werden können. Zu Beginn werden davon ausgehend zunächst die X/Y-Koordinaten des ersten optischen Disektors im Zentrum des Startpunktes berechnet (blaue Felder). Von dieser Position aus ist das Berechnen der Koordinaten eines jeden anderen optischen Disektors im Bereich möglich, indem man die relative Distanz (angegeben durch die Anzahl der Raster, graue Felder) zum Startpunkt angibt. Das aktuelle Raster wird dabei mit zunehmenden Schritten in der X-Achse nach rechts (analog mit abnehmenden Schritten nach links) und mit zunehmenden Schritten in der Y-Achse nach unten (analog mit abnehmenden Schritten nach oben) verschoben. Dessen Koordinaten werden in den braunen Feldern berechnet und tabellarisch daneben aufgeführt.

Eine zweite Excel-Tabelle wurde für die Eintragung der Ergebnisse aus der Zählung und für die Berechnung der Gesamtanzahl der Zellen für das Tier sowie des CE-Wertes erstellt, **siehe Abbildung 15**. In der Tabelle stehen in der ersten Spalte die jeweilig gezählten Schnitte von einer Seite eines Tiers und in der jeweils dazugehörigen Zeile die Ergebnisse aus der Zählung der einzelnen Bereiche. In den gelben Feldern werden die festgelegten Untersuchungsparameter eingegeben: dabei betrug das Untersuchungsintervall 4, die Höhe des optischen Disektors 13, die Fläche des Zählrahmens $2500\mu\text{m}^2$ ($50\mu\text{m} \times 50\mu\text{m}$),

die Fläche des Rasters $16.900\mu\text{m}^2$ ($130\mu\text{m} \times 130\mu\text{m}$) und die durchschnittlich gemessene Schrittdicke $19\mu\text{m}$. Die geschätzte Gesamtanzahl der TH-positiven Zellen in der SNpc einer Seite (erstes blaues Feld) wurde durch die Formel nach West et al. (1991) berechnet (für Erläuterungen siehe Kapitel 1.5.3. „Der optische Fraktionator“):

$$N = \sum Q^- \times \frac{1}{\text{ssf}} \times \frac{1}{\text{asf}} \times \frac{1}{\text{hsf}}$$

Der CE-Wert (zweites blaues Feld) wurde anhand der modifizierten Formel nach Keuker et al. (2001) bestimmt (für Erläuterungen siehe Kapitel 1.6. „Der Fehlerkoeffizient (CE)“), wobei ein Wert von $<0,1$ anzustreben war:

$$CE = \sqrt{\frac{\{3 \times [(\sum Q^-)^2 - \sum Q^-] + \sum [Q^- \times Q^-_{\text{nächster Schnitt}}] - 4 \times \sum [Q^- \times Q^-_{\text{übernächster Schnitt}}]\} / 240 + \sum Q^-}{\sum Q^-}}$$

2.7.2 Auswertung mit dem Stereo Investigator



Abbildung 16: Das BX53-Lichtmikroskop von Olympus mit der dazugehörigen Aufnahmekamera von mbf Bio Science. Zusammen mit der Software „Stereo Investigator Version 11.07“ bildet die Einheit ein Komplettsystem.

Die Zählung der TH-positiven Neurone in der SN mit dem optischen Fraktionator eines speziellen stereologischen Programmes erfolgte durch das kommerziell erhältliche Software-Komplettsystem Stereo Investigator Version 11.07 (MicroBrightfield Biosciences), **siehe Abbildung 16**. Die Bedienung und das Vorgehen waren im Vergleich zu der Untersuchung mit dem Axiophot-2 relativ einfach und wurden nach den Anweisungen des Herstellers durchgeführt. Da es sich hierbei um eine etablierte Untersuchungsmethode handelt, erfolgt keine detaillierte bildliche Darstellung der einzelnen Bedienungspunkte, sondern lediglich eine kurze schriftliche Zusammenfassung: unter der Option „Probes → Optical Fractionator Workflow“ wurde das Programm gestartet. Unter der Option „Start a new subject“ wurden die Informationen wie die Anzahl der zu untersuchenden Schnitte, die Schnittdicke sowie das Zählintervall, was in dem Fall 4 betrug, eingegeben. Durch das Feld „2x Mag Lens“ wurde das jeweilige Bild unter kleiner Vergrößerung bei 2x Objektiv so eingestellt, dass es

möglichst scharf unter dem Mikroskop zu sehen war. Danach wurden unter der Option „Trace your Region(s) of Interest“ an allen 14 Schnitten pro Tier jeweils links- und rechtsseitig die Bereiche der SNpc bei dieser kleinen Vergrößerung manuell eingegrenzt und markiert (**siehe Abbildungen 17A und 17B**). Die genaue Orientierung und Eingrenzung der SNpc erfolgte auch hier unter Zuhilfenahme des Paxinos/Franklin-Maushirn-Atlas (2001) und anhand des Artikels „Comparison of Model-Based (2D) and Design-Based (3D) Stereological Methods for Estimating Cell Number in the Substantia Nigra pars compacta of the C57BL/6J Mouse“ (Baquet et al., 2009). Als nächstes wurden die Einstellungswerte eingegeben. Da in diesem Fall nur jeder 4. Schnitt eines Tieres untersucht wurde, betrug der Abstand zwischen den Schnitten einer Serie zueinander 120µm; das Untersuchungsintervall betrug 4 und die Schnittdicke beim Kryo-Schneiden 30µm. Die Einstellungswerte wurden weiterführend auf 50µm x 50µm für die Größe des Zählrahmens unter „Define Counting Frame Size“ und auf 130µm x 130µm für die Rastergröße unter „Define SRS Grid Layout“ festgelegt. Für die weiteren Arbeitsschritte wurde ein 100x Objektiv verwendet und das Feld „100x Mag Lens“ ausgewählt. Die tatsächliche Schnittdicke wurde im Vorfeld durch den Mittelwert aus der Messung der Schnittdicke an drei beliebigen Positionen an zufällig ausgewählten Schnitten bestimmt. Sie betrug im Durchschnitt 19-20µm. Die Grenz-Zone wurde auf jeweils 3µm festgelegt und wurde durch das Programm automatisch von der Schnittdicke abgezogen. Somit erhielt man eine Disektorhöhe von etwa 13µm. Die zuletzt genannten Werte waren bei „Define Disector Options“ einzugeben. Die Zählung erfolgte wiederum bei 100x Objektiv und einer 1,25 numerischen Objektivauflösung mit Immersionsöl an einem BX53-Lichtmikroskop (Olympus).

Nach Speichern aller festgelegten Parameter unter „Save Sampling Parameters“ wurde vom Programm automatisch ein angepasstes Rastersystem mit dem optischen Disektor in dem zuvor markierten Bereich eingefügt (**siehe Abbildung 17C**) und die Zählung konnte durch die Funktion „Counting“ begonnen werden (**siehe Abbildung 18**). Das Programm führte den Disektor automatisch nach jeder Zählung zum nächsten Raster innerhalb des zuvor markierten Bereiches. Jede gezählte Zelle wurde zuvor durch einen

farbigen Punkt am Bildschirm markiert und abgespeichert (**siehe Abbildung 17D**). Chronologisch erfolgte der Zählvorgang nicht vollständig von Schnitt zu Schnitt, sondern zunächst für die linke Seite aller Schnitte zusammen und danach für die rechte Seite. Der Wechsel der Zählvorgänge erfolgte unter der Option „Begin Next Section“. Nach Bearbeiten des letzten Schnittes wurde die Zählung mit „I've Finished Counting“ beendet. Das Programm berechnete anschließend unter „View Sampling Results“ für jede Seite die Gesamtanzahl aller gezählten Neuronen sowie den CE-Wert nach Gundersen ($m=1$), der weniger als 0,1 betragen sollte.

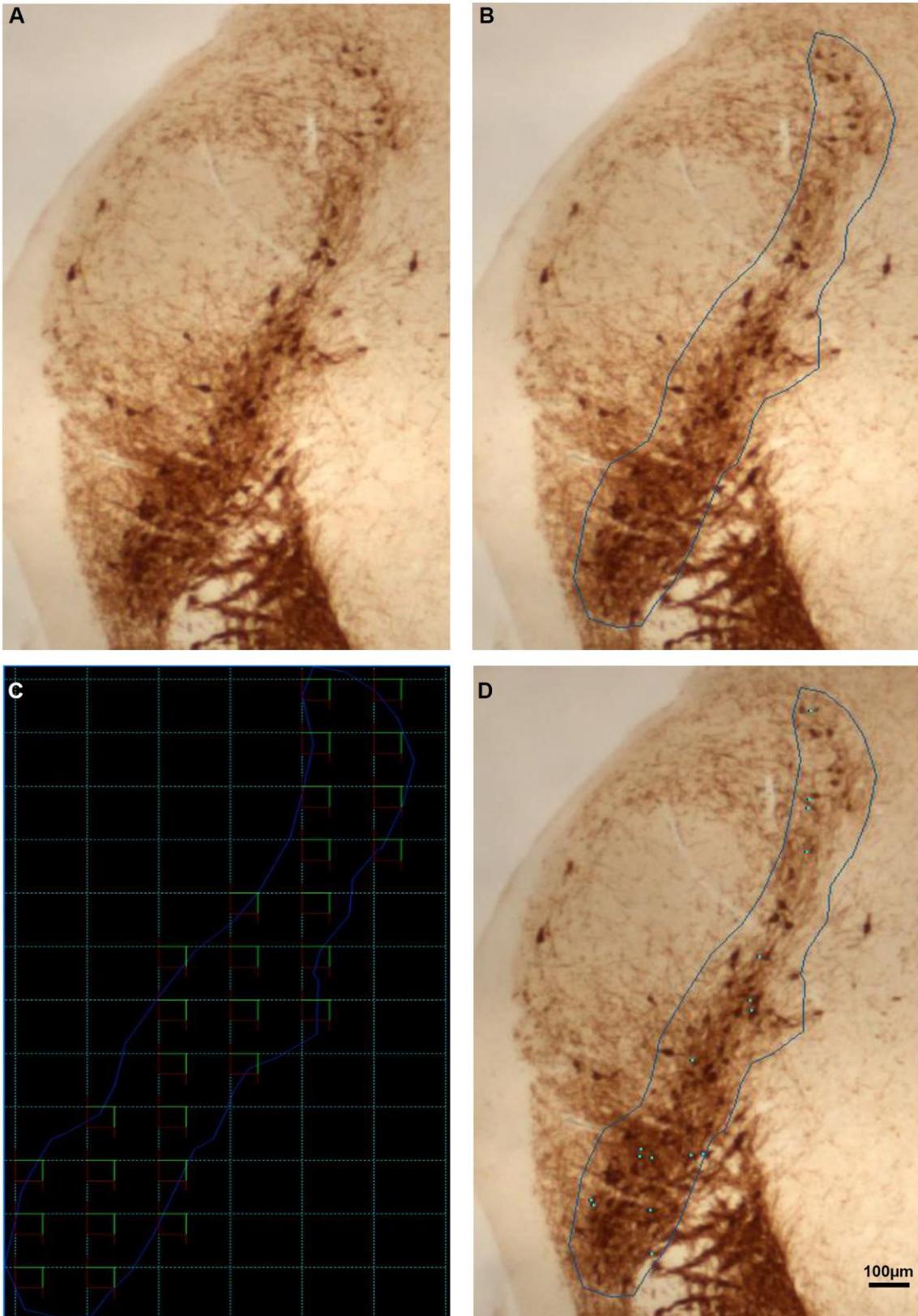


Abbildung 17: Der Bereich der SN (A) wird manuell mit einem virtuellen Stift umrandet (B). Nach dem Eintragen der Einstellungswerte fügte das Programm ein Raster system mit dem optischen Disektor hinzu, welche automatisch in alle nur mit der Eingrenzung in Berührung kommende Raster eingefügt wurden (C). Jede gezählte Zelle wurde mit einer farbigen Markierung registriert (D).

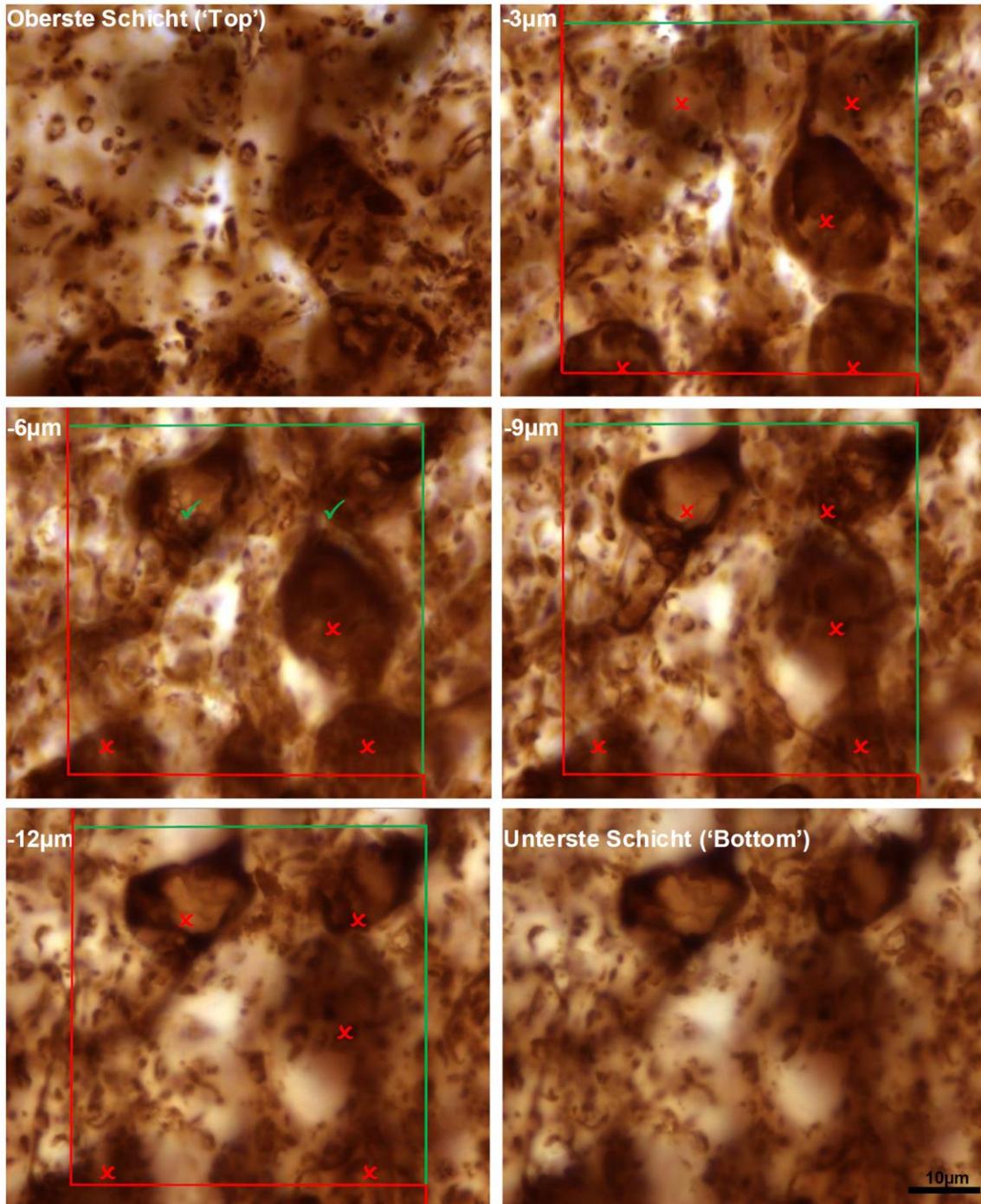


Abbildung 18: Die stereologische Zählung erfolgt analog der zuvor beschriebenen Methode. Die Einstellungen wurden ebenfalls mit den gleichen Werten vorgenommen. Bei dieser Untersuchung war zudem eine farbige Darstellung der Zellen unter dem Mikroskop möglich.

3. Ergebnisse

3.1 Schätzung mit dem Axiophot-2, Visiview und ImageJ

Die stereologische Untersuchung mit dem Axiophot-2, Visiview und ImageJ lieferte für alle 6 untersuchten Wildtypen zusammen eine geschätzte Anzahl an TH-positiven Neuronen in der SNpc von 7363-7987 Zellen auf der rechten Seite und von 7446-7904 Zellen auf der linken Seite. Die durchschnittliche Gesamtanzahl von DA-Neuronen (\pm Standardfehler des Mittelwertes SEM) betrug für die rechte Seite der SNpc 7647 ± 83 Zellen und für die linke Seite der SNpc 7675 ± 66 Zellen, **siehe Abbildung 19**. Der berechnete CE-Wert betrug für jedes untersuchte Tier und jede Seite weniger als 0,08 und reichte zwischen 0,073-0,079, **siehe Abbildung 20**.

3.2 Schätzung mit dem Stereo Investigator

Unter Verwendung des Stereo Investigators betrug die geschätzte Population an TH-positiven Neuronen in der SNpc für alle 6 untersuchten Wildtypen 7068-8105 Zellen für die rechte Seite und 7164-8016 Zellen für die linke Seite. Die durchschnittliche Gesamtanzahl (\pm SEM) belief sich auf 7535 ± 155 Zellen und 7699 ± 128 Zellen für jeweils die rechte und linke Seite der SNpc, **siehe Abbildung 19**. Der CE-Wert nach Gundersen ($m=1$) betrug für jedes Tier und jede untersuchte Seite $\leq 0,08$, **siehe Abbildung 20**.

3.3 Vergleich der beiden stereologischen Methoden

Statistische Analysen mittels des gepaarten, zweiseitigen „student's t-test“ ergaben keine signifikanten Unterschiede bezüglich der gezählten Neurone sowohl zwischen den beiden angewandten Methoden als auch zwischen den jeweiligen Seiten rechts und links der SNpc (Mittelwert \pm SEM; rechts: $t(5)=0,9524$ // $P>0,05$; links: $t(5)=0,2928$ // $P>0,05$), **siehe Abbildung 21**. Ein Vergleich der erhobenen Daten aus beiden Methoden liefern die **Abbildungen 22 und 23**.

Geschätzte Population aus den Methoden	<i>Axiophot-2</i>		<i>Stereo Investigator</i>	
	links	rechts	links	rechts
Wildtyp 1	7613	7571	7849	7253
Wildtyp 2	7738	7696	7867	8105
Wildtyp 3	7904	7779	7924	7657
Wildtyp 4	7821	7987	8016	7908
Wildtyp 5	7446	7363	7164	7224
Wildtyp 6	7530	7488	7379	7068
Mittelwert	7675	7647	7699	7535
Standardabweichung	66	83	128	155

Abbildung 19: Die geschätzte Population der Zellen für die Untersuchung der verwendeten Tiere und für beide Methoden im Vergleich

Berechneter CE-Wert aus den Methoden	<i>Axiophot-2</i>		<i>Stereo Investigator</i>	
	links	rechts	links	rechts
Wildtyp 1	0,075	0,075	0,07	0,08
Wildtyp 2	0,075	0,075	0,07	0,07
Wildtyp 3	0,075	0,075	0,07	0,08
Wildtyp 4	0,073	0,074	0,07	0,07
Wildtyp 5	0,079	0,079	0,08	0,08
Wildtyp 6	0,077	0,076	0,08	0,08
Mittelwert	0,076	0,076	0,07	0,08

Abbildung 20: Die berechneten CE-Werte für die Untersuchung der verwendeten Tiere und für beide Methoden im Vergleich

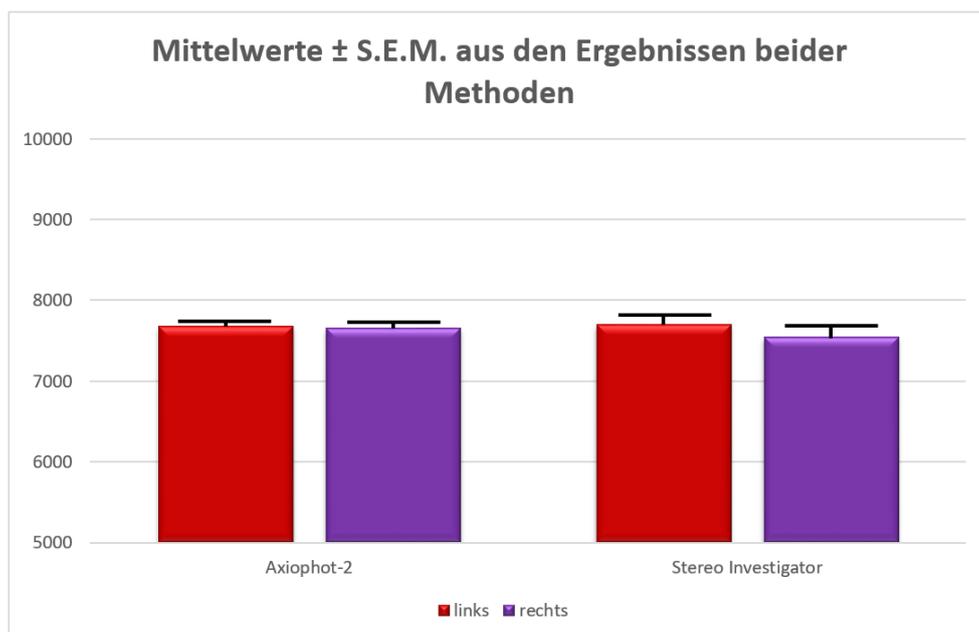


Abbildung 21: Darstellung der Mittelwerte ± S.E.M. der Populationsschätzung aus den Ergebnissen der beiden Methoden im Vergleich.

	tatsächlich gezählte Zellen		gezählte Schnitte		gezählte Raster	
	<i>Axiophot-2</i>	<i>Stereo Inv.</i>	<i>Axiophot-2</i>	<i>Stereo Inv.</i>	<i>Axiophot-2</i>	<i>Stereo Inv.</i>
	links	links	links	links	links	links
Wildtyp 1	183	194	14	14	374	388
Wildtyp 2	186	191	14	14	343	360
Wildtyp 3	190	197	13	13	401	387
Wildtyp 4	188	201	13	13	386	409
Wildtyp 5	179	176	14	14	287	301
Wildtyp 6	181	181	13	13	396	382

Abbildung 22: Erhobene Daten nach Durchführung der beiden Methoden im Vergleich für die linke Seite: die tatsächliche Anzahl der gezählten Zellen, die Anzahl der gezählten Schnitte und die Anzahl der gezählten Raster.

	tatsächlich gezählte Zellen		gezählte Schnitte		gezählte Raster	
	<i>Axiophot-2</i>	<i>Stereo Inv.</i>	<i>Axiophot-2</i>	<i>Stereo Inv.</i>	<i>Axiophot-2</i>	<i>Stereo Inv.</i>
	rechts	rechts	rechts	rechts	rechts	rechts
Wildtyp 1	182	177	14	14	354	332
Wildtyp 2	185	197	14	14	363	355
Wildtyp 3	187	190	13	13	335	351
Wildtyp 4	192	197	13	13	403	422
Wildtyp 5	177	178	12	12	312	323
Wildtyp 6	180	172	13	13	367	382

Abbildung 23: Erhobene Daten nach Durchführung der beiden Methoden im Vergleich für die rechte Seite: die tatsächliche Anzahl der gezählten Zellen, die Anzahl der gezählten Schnitte und die Anzahl der gezählten Raster.

4. Diskussion

Erwartungstreue stereologische Untersuchungsmethoden, wie der optische Fraktionator, sind sehr bedeutsam für die Quantifizierung von Zellen eines definierten Bereiches in einem biologischen System. Seit der Beschreibung der Disektor-Methode durch Sterio (1984) werden design-basierte stereologische Methoden für die Quantifizierung von Neuronen im Hirnstamm und Hippocampus immer häufiger verwendet (West und Gundersen, 1990; Korbo et al., 1990; Sarsilmaz et al., 2007). Dies liegt vor allem am deutlich geringeren Arbeits- und Zeitaufwand (Braendgaard und Gundersen, 1986) im Gegensatz zu modell-basierten Verfahren (Abercrombie, 1946). Mit stereologischen Methoden können auch andere Zelltypen wie Astrozyten (Barreto et al., 2011) und Mikrogliazellen (Robinson et al., 2017) untersucht werden. Sie umfassen damit ein weites Spektrum an Untersuchungsobjekten. Design-basierte Verfahren gelten als Goldstandard bei der Zählung von Neuronen (West, 1991; Schmitz und Hof, 2005; Tieu, 2011).

Bestimmt man die Anzahl von Nervenzellen, lassen sich neurobiologische Aussagen wie die Glukokortikoid-Kaskade-Hypothese (Sapolsky et al., 1986) viel besser nachvollziehen. Vollmann-Honsdorf et al. (1997) und Keuker et al. (2001) untersuchten jeweils in ihrer Arbeit die neuronale Anzahl in den hippocampalen Regionen CA1 und CA3, um den Einfluss von chronisch psychologischem Stress an männlichen Baumspitzmäusen (*Tupaia belangeri*, Körpergewicht ca. 200g) zu untersuchen. In bestimmten Zeitabständen ließ man die Tiere miteinander konkurrieren und eine Stresssituation erleben, bevor ihre Gehirne mittels stereologischer Untersuchungstechniken mit dem optischen Fraktionator untersucht wurden. Die Ergebnisse wurden anschließend mit denen von stressfreien Kontrolltieren verglichen. Die Forscher stellten fest, dass sich ein stressbedingt hoher Glukokortikoidspiegel nicht schädigend auf die pyramidalen Neuronen im Hippocampus bei den Mäusen auswirkte (Vollmann-Honsdorf et al., 1997; Keuker et al., 2001). Zu ähnlichen Erkenntnissen kamen auch andere Forscher anhand der gleichen Untersuchung von Glukokortikoiden am Hippocampus in Ratten (Sousa et al., 1998a; Sousa et al., 1998b) und in nichtmenschlichen Primaten (Leverenz et al., 1999).

Andere Forscher wiederum untersuchten den Einfluss des Alterns auf die pyramidalen Nervenzellen von Ratten (Rapp und Gallagher, 1996; Rasmussen et al., 1996) und Menschen (West, 1993b; West, 1994). Koprach et al. (2011) verwendeten in ihrer Untersuchung zur Bestimmung der TH-positiven Neuronen in der SN von Ratten auch den optischen Fraktionator (Stereo Investigator Version 7.0). Ermittelt werden sollte unter anderem der Einfluss von pathologischem Alpha-Synuklein auf den Untergang von DA-Neuronen in der SN bei Morbus Parkinson. Das pathologische Alpha-Synuklein bewirkte den Untergang von neuronalen Zellen in der SN, auf eine ähnliche Weise wie sie bei M. Parkinson zu beobachten war (Koprach et al., 2011). Die Zählung von Neuronen hilft also, pathologische Mechanismen und körpereigenen Reaktionen im Organismus eines Parkinson-Patienten zu verstehen. Gleichzeitig besteht das Bedürfnis, die Untersuchungsmethoden in ihren Durchführungen stets zu verbessern, dem neuen Stand der Wissenschaft anzupassen und effizienter zu gestalten. Die vorliegende Arbeit soll dazu einen Beitrag leisten, indem eine neu entwickelte Methode präsentiert und nach ihrer Wirksamkeit und Effizienz diskutiert und bewertet wird.

4.1 Diskussion der Methodik

Untersuchungen der Zellanzahl in einer bestimmten Region innerhalb einer Struktur oder eines Organs werden dadurch erschwert, dass es praktisch nicht möglich ist, jede einzelne Zelle physikalisch zu isolieren und zu zählen. Zur möglichst genauen Schätzung der Zellzahl wurden verschiedene stereologische Methoden entwickelt. Jede dieser Methoden ist einzigartig und muss gut vorbereitet werden, um individuelle Fehler während der ganzen Durchführung möglichst gering zu halten (Gundersen und Osterby, 1981; Dorph-Petersen et al., 2000). Allen Methoden ist gemein, dass im Voraus eine Pilotuntersuchung durchgeführt wird, mit der erprobt wird, welche Einstellungen und festgelegten Untersuchungswerte das angestrebte Ziel einer Forschung erreichen können (West, 1993a; Howard und Reed, 2005). Formeln zur Berechnung des Fehlerkoeffizienten (CE-Formeln) sind einfache mathematische Formeln, welche

schon zum Teil in manchen stereologischen Computerprogrammen wie dem Stereo Investigator eingebaut sind (Altunkaynak et al., 2012). Mit diesen Formeln kann man überprüfen, ob die geschätzten Ergebnisse von den mathematisch berechneten Ergebnissen abweichen (Gundersen, 1987; Schmitz, 1998; Schmitz et al., 1999; Hof und Schmitz, 2000). Große Abweichungen bereits während der Pilotuntersuchung lassen sich vorzeitig durch veränderte Einstellungswerte beheben (West, 1999; Slomianka und West, 2005). Es ist empfehlenswert, bis zum erfolgreichen Abschluss der Pilotuntersuchung alle anderen Schnitte für weitere Pilotuntersuchungen aufzubewahren, um die Einstellungswerte nachträglich verändern zu können (Keuker et al., 2001).

Folgende Einstellungswerte sollten am Ende bei jeder Methode feststehen:

- Untersuchungsintervall
- Größe und Anzahl der Zählrahmen und der Raster
- Schnittdicke
- Werte zur Disektorhöhe und Grenz-Zone

Bei der Zählung muss die Gesamtpartikelanzahl konsequent mit denselben Einstellungswerten geschätzt werden (Dorph-Petersen et al., 2001). Das Ziel ist eine umfangreiche Untersuchung von möglichst vielen Schnitten gemäß dem „do more less well“-Prinzip (Gundersen und Osterby, 1981). Das bedeutet, dass präzisere Untersuchungsergebnisse eher durch eine quantitative Untersuchung von möglichst vielen Bereichen erzielt werden und nicht durch eine intensive Beschäftigung mit nur einem Schnitt (Gundersen, 1981; Gundersen und Osterby, 1981). Beim optischen Fraktionator kann dies auf zwei Weisen erfolgen: zum einen durch das Heranziehen mehrerer Schnitte oder durch eine Verkürzung des Untersuchungsintervalls am ‚ssf‘ (Slomianka und West, 2005; Schmitz und Hof, 2005). Zum anderen durch die Verringerung des Disektorabstandes und der Vergrößerung des Zählrahmens durch den ‚asf‘ (West, 1999; Keuker et al., 2001; Kaplan et al., 2012). Eine nachträgliche Erhöhung der Disektorhöhe und somit Beeinflussung des ‚hsf‘ ist aber nur eingeschränkt möglich, da die Höhe wesentlich von der endgültigen Schnittdicke und der Schrumpfung bestimmt wird, die wiederum von der gesamten histologischen Verarbeitung des Gewebes

abhängt (Dorph-Petersen et al., 2001). Die Messung der endgültigen Schnittdicke, das heißt der vertikalen Distanz in der Z-Achse, erfolgt in der Regel durch das Durchfokussieren von der obersten bis zur untersten Schicht eines Schnittes. Zerklüftete Schnittoberflächen könnten allerdings nach Haug (1956) und Dorph-Petersen et al. (2001) dazu führen, dass die Forscher unterschiedlich hohe Referenzpunkte wählen. Dadurch kann es zu unterschiedlichen Tiefenwahrnehmungen kommen, mithin zu abweichenden Messungen der Schnittdicke. Durch die Festlegung einer Grenz-Zone lässt sich dies jedoch beheben. Als Eindeckflüssigkeit (Fixierflüssigkeit zwischen dem gefärbten Schnitt und dem Deckglas) sollten Immersionsflüssigkeiten mit einem passenden Lichtbrechungsindex verwendet werden (West et al., 1991; Dorph-Petersen et al., 2001). Glaser (1982) stellte in seiner Arbeit eine ausgeprägte optische Verkürzung von ungefähr 35% in der vertikalen Achse fest, wenn überhaupt keine Flüssigkeit verwendet wird. Luftblasen sollten unmittelbar nach dem Eindecken und vor dem Austrocknen der Objektträger rausgedrückt werden. Die Fixierflüssigkeit wird nur dünn aufgetragen, um ein scharfes Fokussieren innerhalb der Schnitte zu garantieren. In der vorliegenden Arbeit wurden die Schnitte mit Aquatex eingedeckt. Den hierzu passenden Lichtbrechungsindex lieferte das Immersionsöl, weshalb dieses auch zum Einsatz kam.

Zu beachten ist, dass die Schnitte aufgrund der immunhistologischen Aufbereitung meist deformiert sind (Ladekarl, 1994; Dorph-Petersen et al., 2001) und das Mikroskop das zu betrachtende Gewebe deshalb nicht in ihrer wirklichen Dimension wie in einem lebenden Gewebe wiedergibt. Dorph-Petersen et al. (2001) beobachteten verschiedene Arten von Deformationen. Sie unterschieden in ihrer Arbeit unter anderem zwischen gleichmäßig, homogenen und differenzierten, nicht homogenen Deformationen, die nur in bestimmten Gewebeabschnitten erscheinen. Daneben berichteten sie von uniformen, globalen und nicht uniformen, lokalen Gewebeformveränderungen (Dorph-Petersen et al., 2001). Ausgeprägte, dimensionale Gewebeveränderungen während der immunhistologischen Aufbereitung entstehen aber eher aus einer Kombination von allen Deformationsarten. Solche Deformationen beeinflussen zwar die Schnittdicke in der Z-Achse, letztendlich sollten sie jedoch nicht die

Anzahl der gezählten Partikel insgesamt beeinflussen, da die Partikel bei der Zählung in einem dreidimensionalen Volumen nicht verloren gehen können (West, 1993a; Keuker et al., 2001; Mouton, 2002). Das zu analysierende Gewebe kann daher in beliebiger Richtung geschnitten werden, ohne dass die Zählung von der Größe und Form, der räumlichen Verteilung und Ausrichtung der zu untersuchenden Zellen beeinflusst wird (Gundersen et al., 1988a und 1988b).

Von diesem Umstand wurde auch in der vorliegenden Arbeit profitiert, da sich dadurch die Untersuchung deutlich unempfindlicher gegenüber Aufbereitungsfehlern an den Schnitten gestaltete. Schon beim Schneiden selbst können sich nämlich die zu untersuchenden Partikel durch das Mikrotom dimensional verformen (Baryshnikova et al., 2006). Die Gewebeabschnitte können teilweise oder ganz schrumpfen und aufquellen oder sich drehen und verwinden. Die letztgenannten mechanischen Deformierungen wurden auch in der vorliegenden Untersuchung rechtzeitig erkannt und konnten durch einen vorsichtigen Umgang mit dem Gewebe nahezu vermieden werden. Der Schneidevorgang sollte langsam, gleichmäßig und mit wenig Druck erfolgen, um Frakturen, Brüche und schwerwiegende Risse in den Schnitten zu vermeiden. Im schlimmsten Fall können sonst einzelne Schnitte verloren gehen, wodurch das ganze Gewebe für die stereologische Untersuchung unbrauchbar werden würde. Im Vergleich zu Vibratomschnitten sind Kryostatschnitte aufgrund ihrer Sprödigkeit aufwändiger zu schneiden und schwieriger in der Handhabung (Dorph-Petersen et al., 2001). Dagegen weisen Vibratomschnitte den Nachteil auf, dass keine dünnen Schnitte möglich sind (mindestens 30µm Dicke) und die Schnitte zudem eine Gewebekollabierung von bis zu 70% aufweisen, welche als ausgeprägte Deformation sichtbar wird (Andersen und Gundersen, 1999; Dorph-Petersen, 1999). Die jeweilige Grenz-Zone sollte aufgrund der durch die Schrumpfung bedingten, zerklüfteten Oberfläche >4µm betragen (Keuker et al., 2001).

In der vorliegenden Arbeit wurden das Gewebe in das Medium Tissue Tek® aus wasserlöslichen Glykolen und Harzen eingebettet. Im Gegensatz zu Paraffin weisen die in Glykolen und Harzen eingebetteten Schnitte einen viel geringeren Grad an Deformationen auf (Hanstede und Gerrits, 1983; Miller und Meyer, 1990).

Die Oberflächen sind zudem glatter und gleichmäßiger (Helander, 1983). Es sind bei beiden Einbettungsmethoden sowohl dünne Schnitte (<2mm) als auch dicke Schnitte (>100µm) möglich. Allerdings wurde bei der Einbettung von besonders dicken Schnitten in Glykolen eine erschwerte Antikörperinkubation angegeben (Dorph-Petersen et al., 2001), während bei der klassischen Einbettung in Paraffin mit erheblichen Gewebeschrumpfungen von bis zu 50% zu rechnen seien (Haug et al., 1984; Iwadare et al., 1984; Miller und Meyer, 1990). Pakkenberg et al. (1991) verwendeten in Paraffin eingebettete Schnitte mit einer Dicke von 11µm gemäß dem früheren Protokoll von Pakkenberg und Gundersen (1988). Sie untersuchten damit die Anzahl der pigmentierten und nichtpigmentierten Neurone in der SNpc bei 7 Patienten mit Morbus Parkinson und verglichen sie mit 7 Kontrollpatienten. Die Zählung erfolgte mit dem physikalischen Disektor und die Gesamtanzahl wurde durch die NvVref-Methode bestimmt. Ihre Erkenntnisse aus der Untersuchung waren unter anderem:

- eine enge Korrelation der pigmentierten und nichtpigmentierten Neuronen zwischen den Parkinsonpatienten und den Kontrollgruppen
- keine Korrelation der Neuronenanzahl zum Alter
- eine erhöhte Reduktion von pigmentierten Neuronen um 66% sowie bei nichtpigmentierten Neuronen um 25% bei fortlaufender Krankheitsdauer.

Sind die Antikörper nicht ausreichend bis ins Gewebezentrum polymerisiert, führt dies zu einer verminderten Zellverteilung, die sich mikroskopisch als Unschärfe im betroffenen Bereich zeigt (Hatton und von Bartheld, 1999; Dorph-Peterson et al., 2001). Für die hier durchgeführte Untersuchung war dies aber weniger problematisch, da die immunhistologische Färbung nach dem „free-floating“-Prinzip erfolgte und alle Oberflächen der Schnitte gleichmäßig mit der Färbelösung in Berührung kamen. Bei den 30µm dicken Schnitten wurde eine vollständige Inkubation bis in das Gewebezentrum durch eine verlängerte Inkubationszeit der Antikörper und die Zugabe von Triton X-100 gewährleistet. Auch weißliche Artefakte an der Oberfläche unzureichend gefärbter Gewebeabschnitte (Keuker et al., 2001) wurden in der vorliegenden Arbeit nicht beobachtet. Die einzelnen Schnitte waren durch minimale eingestanzte Kerben

außerhalb der zu untersuchenden Region eindeutig zu unterscheiden (Ip et al., 2017). Das Problem des Randeffektes war in dieser Arbeit nicht anzutreffen, zumal dieses Phänomen in der Neurologie eher weniger bis gar nicht bekannt ist, da die zu untersuchenden rundlichen Neurone generell sehr klein sind (Gundersen, 1977; Kaplan et al., 2012). Um die SN einer gefärbten Struktur anatomisch zu begrenzen, orientierte man sich an bestimmte Merkmale wie Blutgefäße oder Nerven unter Zuhilfenahme des Protokolls von Baquet et al. (2009) und eines Maushirnatlas‘ (Paxinos und Franklin, 2001). Detaillierte Kenntnisse über die genaue Topographie der einzelnen Regionen ist für das stereologische Arbeiten essentiell und keineswegs allein durch eine gut durchgeführte histologische Färbung zu erreichen (Baquet et al., 2009; Fu et al., 2012).

In der vorliegenden Arbeit wurde erfolgreich gezeigt, dass die von uns entwickelte Methode unter Zuhilfenahme von Axiophot-2, Visiview und ImageJ genauso präzise Ergebnisse aus der Zählung von nigralen Zellen liefern wie beim Einsatz des kommerziell erhältlichen Stereologie-Systems Stereo Investigator. Beide Methoden heben sich von anderen Quantifizierungsmethoden dadurch ab, dass sie in einem dreidimensionalen Volumen zählen und daher keine exakt parallel entnommenen Schnitte erfordern. Im Folgenden sollen die jeweiligen Vor- und Nachteile beider Methoden, unter Berücksichtigung von Aufwendungen im Vorbereitungsstadium bis hin zu Kosten-, Zeit- und Arbeitsfaktoren während der gesamten Durchführung herauszuarbeiten und gegenüberzustellen.

Ein Vorteil des Stereo Investigators besteht darin, dass die Untersuchung komplett computergestützt abläuft und dadurch zu schnelleren, effizienteren Ergebnissen führt. Durch die automatische Berechnung sind menschlich bedingte Tipp- oder Rechenfehler so gut wie ausgeschlossen. Allerdings muss man beachten, dass das Einlegen der Schnittpräparate unter dem Mikroskop, die Eingabe der Einstellungswerte, die Umrandung der zu untersuchenden Region sowie die Zählung der Zellen auch beim Stereo Investigator immer noch per Hand erfolgt. In dieser Hinsicht ist die Stereo-Investigator-Methode nicht unbedingt weniger aufwändig oder fehleranfällig ist als bei der Axiophot-2-Methode. Vielmehr erweist sich bei der Axiophot-2-Methode gerade die manuelle Eingabe

und tabellarische Darstellung der Koordinaten als vorteilhaft: jeder einzelne Schritt ist leicht nachzuvollziehen und überprüfbar, so dass mögliche Fehler nachträglich korrigiert werden können. Bei der Methode des Stereo Investigators ist dies nur eingeschränkt möglich, da die erhobenen Werte ausschließlich durch das Programm bearbeitet werden und die einzelnen Rechenschritte nicht von außen einsehbar sind. Die kleinschrittigere Vorgehensweise der Axiophot-2-Methode erscheint daher nur auf den ersten Blick umständlicher. Dafür passt sie sich sehr an die individuellen Arbeitstechniken der Forscher an: die einzelnen Untersuchungsschritte sind nach Belieben modifizierbar. Forscher können die Vorlage mit dem Rastersystem beispielsweise mit jedem bevorzugten Bildprogramm bearbeiten. Die manuelle Eingabe der Ergebnisse kann auf verschiedene Art und Weise erfolgen, wobei die selbsterstellten Excel-Tabellen sehr zu empfehlen sind. Die Darstellung der Fluoreszenzbilder in schwarz-weiß sollte ursprünglich das Datenspeichervolumen begrenzen. Die abgebildeten Strukturen könnten dadurch aber unscharf erscheinen, beziehungsweise die genaue Unterscheidung von verschiedenen Zelltypen erschweren (Ip et al., 2017). Eine farbige Bildumwandlung ist aber durch das Programm „ImageJ“ möglich. Somit gewährt die Axiophot-2-Methode auch eine Untersuchung an farbigen Darstellungen, sofern der Computer genügend Datenvolumen aufweist. Der Analyseumfang bleibt mit anderen Worten lediglich auf die maximale Speicherkapazität der entsprechenden Arbeitscomputer und Software limitiert.

Zudem kann die Analyse nicht wie beim Stereo Investigator nur an Originalschnitten, sondern anhand der gespeicherten Bildaufnahmen durchgeführt werden. Forscher können also gleichzeitig an demselben Gewebe Untersuchungen durchführen und die Ergebnisse miteinander vergleichen. Die kooperative Arbeit spart zum einen Zeit, zum anderen wird das Ergebnis in ihrer Richtigkeit durch die Untersuchungen mehrerer Forscher abgesichert.

Als Nachteil der Axiophot-2-Methode wird der immer noch höhere Zeitaufwand um 50% im Vergleich zum Stereo Investigator angegeben (Ip et al., 2017). Das liegt vor allem an der sehr umfangreichen Bildaufnahme und der Berechnung der Ergebnisse, welche beide noch überwiegend manuell erfolgen (Ip et al., 2017).

Der befürchtete höhere Zeit- und Arbeitsaufwand lässt sich jedoch durch automatisch berechnende Hilfsprogramme (eng „plugins“) vermeiden, womit auch das Risiko von systematischen Fehlern reduziert wird.

Die Methode des Stereo Investigators mag immer noch weniger umständlich erscheinen als die Axiophot-2-Methode. Dieser Vorteil wird aber erkaufte durch deutlich höher anfallenden finanziellen Kosten. Für die Verwendung des Stereo Investigators muss zwangsläufig ein teures mikroskopisches Komplettsystem gekauft werden. Befürworter dieser Methode müssen außerdem damit rechnen, den Aufwand, den sie sich während der Untersuchung und bei den Berechnungen sparen, in das Vorbereitungsstadium zu investieren. Zur Durchführung dieser Methode kann die Anschaffung eines zusätzlichen Arbeitsraumes oder ein Umbau des Labors vonnöten sein. Dagegen gestaltet sich die Organisation und Vorbereitung für die Axiophot-2-Methode erheblich einfacher und günstiger. Diese erfordert nämlich zur Durchführung lediglich eine einfache Standardausrüstung, wie sie in jedem gewöhnlichen Labor vorhanden ist. Nennenswerte zusätzliche Anschaffungen sind nicht erforderlich. Effektive stereologische Untersuchungen von Zellen werden dadurch auch schon mit geringen finanziellen Mitteln und Ausstattungen ermöglicht. Damit erreicht die Axiophot-2-Methode einen viel größeren Adressatenkreis an Forschern und ist mithin zugänglicher und flexibler zu handhaben als der Stereo Investigator. Letzterer würde sich für eine Untersuchung im kleinen Rahmen auch nicht lohnen, während die Axiophot-2-Methode jederzeit auch für kleinere Forschungsprojekte einsetzbar ist.

4.2 Diskussion der Ergebnisse

Für die Erforschung von neurologischen Erkrankungen an Tiermodellen ist die Etablierung einer effizienten Technik zur Zählung von Neuronen geboten. Für den Menschen ist dies insoweit interessant, als dass anhand dieser Zählergebnisse die Wirksamkeit von Behandlungsmethoden auf den menschlichen Organismus getestet werden können (Tomac et al., 1995; Hatton und von Bartheld, 1999; von Bartheld, 2001; Tieu, 2011; Ip et al., 2015). Für die

Untersuchungen werden unter anderem in der SN von Tieren künstlich hervorgebrachte, neurologische Störungen erzeugt, wie sie bei einem an Morbus Parkinson Erkrankten vorliegen (Fleming et al., 2005; Koprach et al., 2011). Die berechneten DA-Neuronen werden dann mit der Anzahl der DA-Neuronen verglichen, wie sie bei einem durchschnittlichen gesunden Probanden vorliegen.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Population an TH-positiven Neuronen in der SNpc an 6 Wildtyp-Mäusen mit der Axiophot-2-Methode geschätzt und mit den Ergebnissen durch die Schätzung mit Stereo Investigator verglichen. Die Axiophot-2-Methode lieferte eine durchschnittliche Gesamtanzahl von 7647 ± 83 Zellen für die rechte Gehirnhälfte und 7675 ± 66 Zellen für die linke Gehirnhälfte. Mit dem Stereo Investigator wurden 7535 ± 155 Zellen für die rechte Gehirnhälfte und 7699 ± 128 Zellen für die linke Gehirnhälfte geschätzt. Die CE-Werte in beiden Methoden betragen jeweils $\leq 0,08$. Demzufolge unterscheiden sich die Ergebnisse beider Methoden statistisch gesehen kaum voneinander. Dies belegt, dass die Axiophot-2-Methode die gleichen Forschungsergebnisse erzielt wie beim Stereo Investigator.

In anderen wissenschaftlichen Arbeiten wurde die allgemeine Anzahl der TH-positiven Neurone in der SNpc der C57BL/6J-Mäuse zwischen 5.200 (Coban und Filipov, 2007) und 23.670 Zellen (Jakowec et al., 2004) geschätzt. Die meisten Schätzungen ergaben jedoch auch Werte zwischen 8.000-12.000 Nervenzellen (Zou et al., 2000; Baquet et al., 2005; McCormack et al., 2005), womit sich die Ergebnisse weitestgehend mit den denen aus der vorliegenden Arbeit decken. Baquet et al. (2009) schätzten die Gesamtanzahl der DA-Neurone in der SNpc bei C57BL/6J-Mäusen im Alter von 3-4 Monaten durch eine sogenannte „serial reconstruction“-Methode und verglichen die Ergebnisse dann mit den Werten aus den eigenen modell-basierten (2D-) und design-basierten (3D-) Verfahren. Der Schneidevorgang und die Färbung mit Tyrosin-Hydroxylase für die Aufbereitung der Versuchstiere waren mit der Versuchsdurchführung der vorliegenden Arbeit nahezu identisch: für das design-basierte Verfahren wurden von Baquet et al. (2009) der Stereo Investigator (Version 7.0; Microbrightfield, Colchester, VT) mit dem optischen Fraktionator-Design (West et al., 1991) an $40 \mu\text{m}$ dicken Schnitten verwendet. Die Größe des Zählrahmens wurde auf $50 \times 50 \mu\text{m}$ ($2500 \mu\text{m}^2$) und die

des Rasters auf $200 \times 200 \mu\text{m}$ ($40.000 \mu\text{m}^2$) festgelegt. Die endgültige Schnittdicke betrug $22 \mu\text{m}$ und das Untersuchungsintervall 6. Die Zählung erfolgte, wie auch hier, gemäß den Zählregeln nach West et al. (1991). Ein CE von $<0,1$ (Gundersen $m=1$) wurde von Baquet et al. (2009) erreicht. Die „serial reconstruction“ lieferte als Ergebnis 8305 ± 91 Zellen ($\pm\text{SEM}$), während das modell-basierte Verfahren mittels Abercrombie-Formel 8002 ± 91 Zellen ($\pm\text{SEM}$) und das design-basierte Verfahren als Ergebnis 8716 ± 338 Zellen ($\pm\text{SEM}$) lieferten. Hierdurch zeigten Baquet et al. (2009), dass es statistisch gesehen keine signifikanten Unterschiede zwischen den Ergebnissen aus den modell- und design-basierten Verfahren gibt. Damit bestätigten sie die Ergebnisse in anderer Literatur (Nelson et al., 1996; Hamre et al., 1999).

German und Manaye (1993) untersuchten die Anzahl von DA-Neuronen im Mittelhirn in den 3 Zellnuklei von Albinoratten und stellten ihre dreidimensionalen Verteilungen sowie ihre räumlichen Beziehungen zueinander dar: Nukleus A8 im RRF, A9 in der SN, A10 VTA. Als Ergebnis wurden pro Gehirnhälfte ca. 1.300 A8-Zellen, 10.500 A9-Zellen und 10.200 A10-Zellen angegeben. Sie verwendeten $30 \mu\text{m}$ dicke Kryostatschnitte, und als Vorlage diente ihnen das Rattenhirn-Atlas von König und Kippel (1974). Die einzelnen Schritte zur Färbung mittels TH wurden bereits von German et al. (1988) beschrieben. Mithilfe eines Computer-Bilddarstellungs-Programmes wurden die Zelldichten der 3 Nuklei-Gruppen nachkonstruiert. Die zelluläre Zählung erfolgte mit der Formel nach Abercrombie (1946), weshalb es sich um ein modell-basiertes Verfahren handelte. Hierdurch lässt sich die erstaunlich hohe Gesamtanzahl von 10.500 Zellen bei der Zählung in der SN-Region erklären. Wie zuverlässig dieses Zählergebnis aber ist, lässt sich nur schwer beurteilen. Denn für die Abercrombie-Methode waren Informationen über Form, Größe und Ausrichtung der zu zählenden Partikel erforderlich (Weibel und Gomez, 1962; Rose und Rohrlich, 1987), die jedoch in Wirklichkeit nicht bekannt waren.

4.3 Schlussfolgerung

Dass die Ergebnisse innerhalb ein und desselben design-basierten Verfahrens erheblich voneinander abweichen können, zeigt sich am folgenden Beispiel: Smeyne et al. (2016) schätzten in ihrer Untersuchung die Gesamtanzahl der DA-Neurone an neun 16 Wochen alten C57BL/6J-Mäusen auf zwischen 6302 ± 262 und 6861 ± 338 Zellen. Damit erreichte Smeyne mit seinem Forschungsteam trotz der Verwendung eines mit Baquet et al. (2009) identischen design-basierten Verfahrens ein niedrigeres Zählergebnis als in seiner Untersuchung mit Baquet et al. (2009) zusammen. Das legt den Schluss nahe, dass die Forschungsergebnisse immer noch zu sehr vom jeweiligen Erfahrungsgrad der Forscher sowie individuellen Geschick und Sorgfältigkeiten abhängen (Ip et al., 2017).

Es besteht mit anderen Worten ein gesteigertes Bedürfnis nach der Entwicklung einer Untersuchungsmethode, die widerspruchsfreie Ergebnisse liefert, unabhängig von der individuellen Kompetenz der Forscher. Das bietet die Axiophot-2-Methode. Sie ist in ihrer Bedienung und Durchführung so klar und einfach, dass sie sogar für Einsteiger Schritt für Schritt nachvollziehbar ist. In einer Gesamtbetrachtung unterliegt die Axiophot-2-Methode gegenüber den klassischen Methoden in keinem wesentlichen Aspekt. Sie erzielt dafür ebenso aussagekräftige Forschungsergebnisse und stellt damit eine optimale Alternative dar.

5. Zusammenfassung

Schwerpunktmäßig befasst sich diese Arbeit mit den praktischen Vorgängen zur Zählung von Neuronen mit dem optischen Fraktionator unter dem Mikroskop, wobei zur Veranschaulichung die Neuronen in der Substantia Nigra an C57BL/6-Mäusen gezählt wurden. Es wurde erläutert, wie die Einstellungen der jeweiligen Methode vorzunehmen sind und auf die angestrebten Ziele angepasst werden können, um ein effizientes Zählen von Neuronen unter Berücksichtigung grundlegender Zählregeln zu gewährleisten. Gleichzeitig wurde gezeigt, wie die Methoden des optischen Fraktionators die gewünschten präzisen Ergebnisse anhand des CE-Wertes liefern können.

Die in dieser Arbeit präsentierte Axiophot-2-Methode ist in der Lage, selbst mit einem einfachen, kommerziell erhältlichen Lichtmikroskop und einem Standbildaufnahmeprogramm die Gesamtanzahl von Zellen einer gegebenen Struktur unter Beachtung aller stereologischen Regeln zu zählen – und zwar genauso effizient und mit vergleichbaren Ergebnissen wie mit einem speziell für stereologische Untersuchungen vorgefertigtes Komplettsystem. Vergleiche beider Methoden zueinander ergeben folgende Schlussfolgerungen: bei dem Stereo Investigator, ist die Untersuchung zwar wesentlich schneller, da die Bildaufnahme und Auswertung mittels voreingestellten Programmes automatisch durchgeführt werden. Allerdings ist solch ein Komplettsystem sehr kostspielig (ca. 60.000 Euro Anschaffungskosten) und nicht flexibel auf andere Untersuchungsbereiche einsetzbar.

Die Axiophot-2-Methode weist zwar einige Nachteile aufgrund der manuellen Vorarbeiten auf, ist aber dafür wesentlich günstiger und zugänglicher, da sie nur ein konventionelles Mikroskop mit einem Standardprogramm erfordert.

6. Literaturverzeichnis

- Abercrombie M. „Estimation of nuclear population from microtome sections.“ *Anat Rec*, 1946: 94: 239-247.
- Aguila MB, Mandarim-de-Lacerda CA, Apfel MI. „Stereology of the myocardium in young and aged rats.“ *Arq Bras Cardiol*, 1998: 70: 105-109.
- Altunkaynak BZ, Altunkaynak ME. „Relationship of body weight and volume of liver: a morphometrical and stereological study.“ *Saudi Med J*, 2007: 28: 891-895.
- Altunkaynak BZ, Önger ME, Altunkaynak ME, Ayranci E, Canan S. „A Brief Introduction to Stereology and Sampling Strategies: Basic Concepts of Stereology.“ *NeuroQuantology*, 2012: 10:31-43.
- Altunkaynak BZ, Ozbek E. „Overweight and structural alterations of the liver in female rats fed a high-fat diet: a stereological and histological study.“ *Turk J Gastroenterol*, 2009: 20: 93-103.
- Andersen BB, Gundersen HJG. „Pronounced loss of cell nuclei and anisotropic deformation of thick sections.“ *J Microsc*, 1999: 196: 69-73.
- Aslan H, Altunkaynak BZ, Altunkaynak ME, Vuraler O, Kaplan S, Unal B. „Effect of a high fat diet on quantitative features of adipocytes in the omentum: an experimental, stereological and ultrastructural study.“ *Obes Surg*, 2006: 16: 1526-1534.
- Baquet ZC, Bickford PC, Jones KR. „Brain-derived neurotropic factor is required for the establishment of the proper number of dopaminergic neurons in the substantia nigra pars compacta.“ *J Neurosci*, 2005: 25: 6251-6259.
- Baquet ZC, Williams D, Brody J, Smeyne RJ. „A Comparison of Model-Based (2D) and Design-Based (3D) Stereological Methods for Estimating Cell Number in the Substantia Nigra pars compacta of the C57BL/6J Mouse.“ *Neuroscience*, 2009: 161: 1082-1090.

- Barreto GE, Sun X, Xu L, Giffard RG. „Astrocyte Proliferation Following Stroke in the Mouse Depends on Distance from the Infarct.“ *PLoS*, 2011: 6: e27881.
- Baryshnikova LM, Von Bohlen und Halbach O, Kaplan S, Von Bartheld CS. „Two distinct events, section compression and loss of particles ("lost caps"), contribute to z-axis distortion and bias in optical disector counting.“ *Microsc Res Tech*, 2006: 69: 738-756.
- Basoglu A, Buyukkarabacak Y, Sahin B, Kaplan S. „Volumetric evaluation of the lung expansion following resection: a stereological study.“ *Eur J Cardiothorac Surg*, 2007: 31: 512-517.
- Ben Gedalya T, Loeb V, Israeli E, Altschuler Y, Selkoe DJ, Sharon R. „Alpha-synuclein and polyunsaturated fatty acids promote clathrin-mediated endocytosis and synaptic vesicle recycling.“ *Traffic*, 2009: 10: 218-234.
- Beyer PL, Palarino MY, Michalek D, Busenbark K, Koller WC. „Weight change and body composition in patients with Parkinson's disease.“ *J Am Diet Assoc*, 1995: 95: 979-983.
- Braendgaard H, Gundersen HJG. „The impact of recent stereological advances on quantitative studies of the nervous system.“ *J Neurosci Methods*, 1986: 18: 39-78.
- Canan S, Bozkurt HH, Acar M, Vlamings R, Aktas A, Sahin B, Temel Y, Kaplan S. „An efficient stereological sampling approach for quantitative assessment of nerve regeneration.“ *Neuropathol Appl Neurobiol*, 2008: 34: 638-649.
- Chen H, Zhang SM, Hernan MA, Willett WC, Ascherio A. „Weight loss in Parkinson's disease.“ *Ann Neurol*, 2003: 53: 676-679.
- Chung CY, Koprach JB, Siddiqi H, Isacson O. „Dynamic changes in presynaptic and axonal transport proteins combined with striatal neuroinflammation precede dopaminergic neuronal loss in a rat model of AAV alpha-synucleinopathy.“ *J Neurosci*, 2009: 29: 3365-3373.

- Coban A, Filipov NM. „Dopaminergic toxicity associated with oral exposure to the herbicide atrazine in juvenile male C57BL/6 mice.“ *J Neurochem*, 2007: 100: 1177-1187.
- Coggeshall RE. „A consideration of neural counting methods.“ *Trends Neurosci*, 1992: 15: 9-13.
- Crews L, Spencer B, Desplats P, Patrick C, Paulino A, Rockenstein E, Hansen L, Adame A, Galasko D, Masliah E. „Selective Molecular Alterations in the Autophagy Pathway in Patients with Lewy Body Disease and in Models of α -Synucleinopathy.“ *PloS One*, 2010: 5: e9313.
- Cruz Orive LM. „On the estimation of particle number.“ *J Microsc*, 1980: 120: 15-27.
- Cruz-Orive LM, Weibel ER. „Recent stereological methods for cell biology: a brief survey.“ *Am J Physiol*, 1990: 258: L148-L156.
- De Vos K. „cell_counter.jar.“ <https://imagej.nih.gov/ij/plugins/cell-counter.html> , 2010.
- DiChara G, Imperato A. „Drugs abused by humans preferentially increase synaptic dopamine concentrations in the mesolimbic system of freely moving rats.“ *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1988: 85: 5274-5278.
- Dorph-Petersen KA. „Stereological estimation using vertical sections in a complex tissue.“ *J Microsc*, 1999: 195: 79-86.
- Dorph-Petersen KA, Gundersen HJG, Jensen EBV. „Non-uniform systematic sampling in stereology.“ *J Microsc*, 2000: 200: 148-157.
- Dorph-Petersen KA, Nyengaard JR, Gundersen HJG. „Tissue shrinkage and unbiased stereological estimation of particle number and size.“ *J Microsc*, 2001: 204: 232-246.
- Eells JB. „The Control of Dopamine Neuron Development, Function and Survival: Insights From Transgenic Mice and The Relevance to Human Disease.“ *Curr Med Chem*, 2003: 10: 857-870.

- Elfaki A, Osman T, Elsheikh A, Hamdoun A, Sahin B. „Evaluation of the Intra-rater Variation for the Estimation of Volume of Cerebral Structures Using the Cavalieri Principle on Magnetic Resonance Images.“ *J Exp Clin Med*, 2011: 28: 22-25.
- Evans SM, Janson AM, Nyengaard JR. „Quantitative Methods in Neuroscience: A Neuroanatomical Approach Oxford.“ *Oxford University Press, 1st Edition*, 2004.
- Fleming SM, Fernagut PO, Chesselet MF. „Genetic Mouse Models of Parkinsonism: Strengths and Limitations.“ *NeuroRx*, 2005: 2: 495-503.
- Fu Y, Yuan Y, Halliday G, Rusznak Z, Watson C, Paxinos G. „A cytoarchitectonic and chemoarchitectonic analysis of the dopamine cell groups in the substantia nigra, ventral tegmental area, and retrorubral field in the mouse.“ *Brain Struct Funct*, 2012: 217: 591-612.
- Gardella D, Hatton WJ, Rind HB, Rosen GD, von Bartheld CS. „Differential tissue shrinkage and compression in the z-axis: implications for optical disector counting in vibratome-, plastic-, and cryosections.“ *J Neurosci Methods*, 2003: 124: 45-59.
- Geinisman Y, Gundersen HJG, van der Zee E, West MJ. „Unbiased stereological estimation of the total number of synapses in a brain region.“ *J Neurocytol*, 1996: 25: 805-819.
- German DC, Dubach M, Askari S, Speciale SG, Bowden DM. „1-Methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-induced Parkinsonian syndrome in *Macaca fascicularis*: Which midbrain dopaminergic neurons are lost?“ *Neuroscience*, 1988: 24: 161-174.
- German DC, Manaye K, Smith WK, Woodward DJ, Saper CB. „Midbrain dopaminergic cell loss in parkinson's disease: Computer visualization.“ *Ann Neurol*, 1989: 26: 507-514.

- German DC, Manaye KF. „Midbrain Dopaminergic Neurons (Nuclei A8, A9 and A10): Three-Dimensional Reconstruction in the Rat.“ *J Comp Neurol*, 1993: 331: 297-309.
- Geuna S. „The Revolution of Counting "Tops": Two Decades of the Disector Principle in Morphological Research.“ *Microsc Res Tech*, 2005: 66: 270-274.
- Girault JA, Greengard P. „The Neurobiology of Dopamine Signaling.“ *Arch Neurol*, 2004: 61: 641-644.
- Glaser EM. „Snell's law: the bane of computer microscopists.“ *J Neurosci Methods*, 1982: 5: 201-202.
- Glaser EM, Wilson PD. „A comparison of three estimators of the coefficient of error of optical fractionator cell count estimates.“ *Acta Stereol*, 1999: 18: 15-25.
- Glaser JR, Greene G, Hendricks SJ. „Stereology for Biological Research with a Focus on Neuroscience.“ *Williston, VT: MBF Press; 2nd edition*, 2007: 104 p.
- Gökce MF, Kaplan S, Türkkani A, Kozan R, Ayyildiz M, Emirzeoglu M, Aslan H, Marangoz C. „Nitric oxide synthase inhibitors protect cerebellar Purkinje cells from zinc-induced cell loss in adult rat.“ *J Chem Neuroanat*, 2011: 41: 25-31.
- Gundersen HJ, Bendtsen TF, Korbo L, Marcussen N, Moller A, Nielsen K, Nyengaard JR, Pakkenberg B, Sorensen FB, Vesterby A, West MJ. „Some new, simple and efficient stereological methods and their use in pathological research and diagnosis.“ *APMIS*, 1988a: 96:379-394.
- Gundersen HJG. „Notes on the estimation of the numerical density of arbitrary particles: the edge effect.“ *J Microsc*, 1977: 111: 219-223.
- Gundersen HJG. „Stereology of arbitrary particles. A review of unbiased number and size estimators and the presentation of some new ones in memory of William R Thomson.“ *J Microsc*, 1986: 143: 3-45.

- Gundersen HJG. „The nucleator.“ *J Microsc*, 1988: 151: 3-21.
- Gundersen HJG, Bagger P, Bendtsen TF, Evans SM, Korbo L, Marcussen N, Moller A, Nielsen K, Nyengaard JR, Pakkenberg B, Sorensen FB, Vesterby A, West MJ. „The new stereological tools: Disector, fractionator, nucleator, and point sampled intercepts and their use in pathological research and diagnosis.“ *APMIS*, 1988b: 96: 857-881.
- Gundersen HJG, Jensen EB. „The efficiency of systematic sampling in stereology and its prediction.“ *J Microsc*, 1987: 147: 229-263.
- Gundersen HJG, Jensen EBV, Kieu K, Nielsen J. „The efficiency of systematic sampling in stereology - reconsidered.“ *J Microsc*, 1999: 193: 199-211.
- Gundersen HJG, Osterby R. „Optimizing sampling efficiency of stereological studies in biology: or ‘Do more less well!’.“ *J Microsc*, 1981: 121: 65-73.
- Hamre K, Tharp R, Poon K, Xiong X, Smeyne RJ. „Differential strain susceptibility following 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) administration acts in an autosomal dominant fashion: quantitative analysis in seven strains of *Mus musculus*.“ *Brain Res*, 1999: 828: 91-103.
- Hanstede JG, Gerrits PO. „The effects of embedding in water-soluble plastics on the final dimensions of liver sections.“ *J Microsc*, 1983: 131: 79-86.
- Hatton WJ, von Bartheld CS. „Analysis of cell death in the trochlear nucleus of chick embryos: Calibration of the optical disector counting technique reveals systematic bias.“ *J Comp Neurol*, 1999: 409: 169-186.
- Haug H. „Remarks on the determination and significance of the gray cell coefficient.“ *J Comp Neurol*, 1956: 104: 473-492.
- Haug H, Kühl S, Mecke E, Sass NL, Wasner K. „The significance of morphometric procedures in the investigation of age changes in cytoarchitectonic structures of human brain.“ *J Hirnforsch*, 1984: 25: 353-374.

- Helander KG. „Thickness variations within individual paraffin and glycol methacrylate sections.“ *J Microsc*, 1983: 132: 223-227.
- Hof PR, Schmitz C. „Current trends in neurostereology - Introduction to the special tissue "Recent Advances in Neurostereology".“ *J Chem Neuroanat*, 2000: 20: 3-5.
- Howard CV, Reed MG. „Unbiased Stereology: Three Dimensional Measurement in Microscopy (Advanced Methods).“ *Taylor & Francis, 2nd Edition*, 2005.
- Ip CW, Beck SK, Volkman J. „Lymphocytes reduce nigrostriatal deficits in the 6-hydroxydopamine mouse model of Parkinson's disease.“ *J Neural Transm*, 2015: 122:1633-1643.
- Ip CW, Cheong D, Volkman J. „Calculation of cell count.xlsx.“ [ecsource.jove.com/files/ftp_upload/56103/calculation_of_cell_count.xlsx](https://www.ecsource.com/files/ftp_upload/56103/calculation_of_cell_count.xlsx), 2017.
- Ip CW, Cheong D, Volkman J. „Optical disector position.xlsx.“ [ecsource.jove.com/files/ftp_upload/56103/optical_disector_position.xlsx](https://www.ecsource.com/files/ftp_upload/56103/optical_disector_position.xlsx), 2017.
- Ip CW, Cheong D, Volkman J. „Stereological Estimation of Dopaminergic Neuron Number in the Mouse Substantia Nigra Using the Optical Fractionator and Standard Microscopy Equipment.“ *J. Vis. Exp.*, 2017: 127:e56103.
- Ip CW, Klaus LC, Karikari AA, Visanji NP, Brotchie JM, Lang AE, Volkman J, Koprach JB. „AAV1/2-induced overexpression of A53T- α -synuclein in the substantia nigra results in degeneration of the nigrostriatal system with Lewy-like pathology and motor impairment: a new mouse model for Parkinson's disease.“ *Acta Neuropathol Commun*, 2017: 5:11.
- Iversen SD, Koob GF. „Behavioral Implications of Dopaminergic Neurons in the Mesolimbic System.“ *Adv Biochem Psychopharmacol*, 1977: 16: 209-214.

- Iwadare T, Mori H, Ishiguro K, Takeishi M. „Dimensional changes of tissue in the course of processing.“ *J Microsc*, 1984: 136: 323-327.
- Jakowec MW, Nixon K, Hogg E, McNeill T, Petzinger GM. „Tyrosine hydroxylase and dopamine transporter expression following 1-methyl-1-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-induced neurodegeneration of the mouse nigrostriatal pathway.“ *J Neurosci Res*, 2004: 76: 539-550.
- Jo E, McLaurin J, Yip CM, St. George-Hyslop P, Fraser PE. „ α -Synuclein Membrane Interactions and Lipid Specificity.“ *J Biol Chem*, 2000: 275: 34328-34334.
- Kaplan S, Canan S, Aslan H, Unal B, Sahin B. „A simple technique to measure the movements of the microscope stage along the x and y axes for stereological methods.“ *J Microsc*, 2001: 203: 321-325.
- Kaplan S, Geuna S, Ronchi G, Ulkay MB, von Bartheld CS. „Calibration of the stereological estimation of the number of myelinated axons in the rat sciatic nerve: A multicenter study.“ *J Neurosci Methods*, 2010: 187: 90-99.
- Kaplan S, Odaci E, Canan S, Önger ME, Aslan H, Ünal B. „The Disector Counting Technique.“ *NeuroQuantology*, 2012: 10: 44-53.
- Keskin M, Kelly CP, Moreira-Gonzalez A, Loboeki C, Yarim M, Kaplan S, Jackson IT. „Repairing Critical-Sized Rat Calvarial Defects with a Periosteal Cell-Seeded Small Intestinal Submucosal Layer.“ *Plast Reconstr Surg*, 2008: 122: 400-409.
- Keuker JIH, Vollmann-Honsdorf GK, Fuchs E. „How to use the optical fractionator: an example based on the estimation of neurons in the hippocampal CA1 and CA3 regions of tree shrews.“ *Brain Res Brain Res Protoc*, 2001: 7: 211-221.
- Kiki I, Altunkaynak BZ, Altunkaynak ME, Vuraler O, Unal D, Kaplan S. „Effect of High Fat Diet on the Volume of Liver and Quantitative Feature of Kupffer

- Cells in the Female Rat: A Stereological and Ultrastructural Study." *Obes Surg*, 2007: 17: 1381-1388.
- Koprach JB, Johnston TH, Huot P, Reyes MG, Espinosa M, Brotchie JM.
„Progressive Neurodegeneration or Endogenous Compensation in an Animal Model of Parkinson's Disease Produced by Decreasing Doses of Alpha-Synuclein." *PloS One*, 2011: 6: e17698.
- Korbo L, Pakkenberg B, Ladefoged O, Gundersen HJG, Arlien-Soborg P, Pakkenberg H. „An efficient method for estimating the total number of neurons in rat brain cortex." *J Neurosci Methods*, 1990: 31: 93-100.
- Kozan R, Ayyildiz M, Bas O, Kaplan S, Agar E. „Short term ethanol administration does not change the total pyramidal neuron number of the rat hippocampus: a stereological study." *Adv Ther*, 2007: 24: 231-238.
- Ladepohl M. „The influence of tissue processing on quantitative histopathology in breast cancer." *J Microsc*, 1994: 174: 93-100.
- Langston JW. „MPTP and Parkinson's disease." *Trends in Neurosci*, 1985: 80: 79-83.
- Leverenz JB, Wilkinson CW, Wamble M, Corbin S, Grabber JE, Raskind MA, Peskind ER. „Effect of chronic high-dose exogenous cortisol on hippocampal neuronal number in aged nonhuman primates." *J Neurosci*, 1999: 19: 2356-2361.
- Madine J, Hughes E, Doig AJ, Middleton DA. „The effects of a-synuclein on phospholipid vesicle integrity: a study using ³¹P NMR and electron microscopy." *Mol Membr Biol*, 2008: 25: 518-527.
- McArt DG, Wasson GR, McKerr G, Saetzler K, Reed M, Howard CV.
„Systematic random sampling of the comet assay." *Mutagenesis*, 2009: 24: 373-378.
- McCormack AL, Atienza JG, Johnston LC, Andersen JK, Vu S, Di Monte DA.
„Role of oxidative stress in paraquat-induced dopaminergic cell degeneration." *J Neurochem*, 2005: 93: 1030-1037.

- McGeer PL, McGeer EG, Suzuki JS. „Aging and Extrapyrarnidal Function.“ *Arch Neurol*, 1977: 34: 33-35.
- Mentis MJ, Delalot D. „Depression in Parkinson's disease.“ *Adv Neurol*, 2005: 96: 26-41.
- Miller PL, Meyer TW. „Effects of tissue preparation on glomerular volume and capillary structure in the rat.“ *Lab Invest*, 1990: 63: 862-866.
- Mouton PR. „Principles and Practices of unbiased Stereology - An introduction for Bioscientists.“ *The John Hopkins University Press*, 2002.
- Mühlfeld C, Nyengaard JR, Mayhew TM. „A review of state-of-the-art stereology for better quantitative 3D morphology in cardiac research.“ *Cardiovasc Pathol*, 2010: 19: 65-82.
- Nelson EL, Liang CL, Sinton CM, German DC. „Midbrain dopaminergic neurons in the mouse: Computer-assisted mapping.“ *J Comp Neurol*, 1996: 369: 361-371.
- Olanow CW, Tatton WG. „Etiology and pathogenesis of Parkinson's disease.“ *Annu Rev Neurosci*, 1999: 22: 123-44.
- Pakkenberg B, Gundersen HJG. „Total number of neurons and glia cells in human brain nuclei estimated by the disector and the fractionator.“ *J Microsc*, 1988: 150: 1-20.
- Pakkenberg B, Moller A, Gundersen HJG, Dam AM, Pakkenberg H. „The absolute number of nerve cells in substantia nigra in normal subjects and in patients with Parkinson's disease estimated with an unbiased stereological method.“ *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 1991: 54: 30-33.
- Paxinos G, Franklin K. „The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates.“ *Academic Press, 2nd Edition*, 2001.
- Perez RG, Waymire JC, Lin E, Liu JJ, Guo F, Zigmund MJ. „A Role for a-Synuclein in the Regulation of Dopamine Biosynthesis.“ *J Neurosci*, 2002: 22: 3090-3099.

- Rapp PR, Gallagher M. „Preserved neuron number in the hippocampus of aged rats with spatial learning deficits.“ *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1996: 93: 9926-9930.
- Rasband W. „Grid_Overlay.java.“ <https://imagej.nih.gov/ij/plugins/graphic-overlay.html>, 2010.
- Rasmussen T, Schliemann T, Sorensen JC, Zimmer J, West MJ. „Memory impaired aged rats: No loss of principal hippocampal and subicular neurons.“ *Neurobiol Aging*, 1996: 17: 143-147.
- Richard IH. „Anxiety disorders in Parkinson's disease.“ *Adv Neurol*, 2005: 96: 42-55.
- Robinson S, Berglass JB, Denson JL, Berkner J, Anstine CV, Winer JL, Maxwell JR, Qiu J, Yang Y, Sillerud LO, Meehan WP III, Mannix R, Jantzie LL. „Microstructural and microglial changes after repetitive mild traumatic brain injury in mice.“ *J Neurosci Res*, 2017: 95: 1025-1035.
- Rosanne MT, Hotsenpiller G, Peterson DA. „Acute Psychosocial Stress Reduces Cell Survival in Adult Hippocampal Neurogenesis without Altering Proliferation.“ *J Neurosci*, 2007: 27: 2734-2743.
- Rose RD, Rohrllich D. „Counting Sectioned Cells via Mathematical Reconstruction.“ *J Comp Neurol*, 1987: 263: 365-386.
- Sahin B, Mazonakis M, Akan H, Kaplan S, Bek Y. „Dependence of computed tomography volume measurements upon section thickness: an application to human dry skulls.“ *Clin Anat*, 2008: 21: 479-485.
- Saito Y, Ruberu NN, Sawabe M, Arai T, Kazama H, Hosoi T, Yamanouchi H, Murayama S. „Lewy body-related alpha-synucleinopathy in aging.“ *J Neuropathol Exp Neurol*, 2004: 63: 742-749.
- Sapolsky R, Krey LC, McEwen BS. „The Neuroendocrinology of Stress and Aging: The Glucocorticoid Cascade Hypothesis.“ *Endocr Rev*, 1986: 7: 284-301.

- Sarsilmaz M, Kaplan S, Songur A, Colakoglu S, Aslan H, Tunc AT, Ozen OA, Turgut M, Bas O. „Effects of postnatal formaldehyde exposure on pyramidal cell number, volume of cell layer in hippocampus and hemisphere in the rat: A stereological study.“ *Brain Res*, 2007: 1145: 157-167.
- Schmitz C. „Towards the use of state-of-the-art stereology in experimental gerontology.“ *Exp Gerontol*, 2000: 35: 429-431.
- Schmitz C. „Variation of fractionator estimates and its prediction.“ *Anat Embryol (Berl)*, 1998: 198: 371-397.
- Schmitz C, Hof PR. „Design-based stereology in neuroscience.“ *Neuroscience*, 2005: 130: 813-831.
- Schmitz C, Korr H, Heinsen H. „Design-based counting techniques: the real problems.“ *Trends Neurosci*, 1999: 22: 345-346.
- Schultz W. „Getting Formal with Dopamine and Reward.“ *Neuron*, 2002: 36: 241-263.
- Scott DA, Tabarean I, Tang Y, Cartier A, Masliah E, Roy S. „A Pathologic Cascade Leading to Synaptic Dysfunction in α -Synuclein-Induced Neurodegeneration.“ *J Neurosci*, 2010: 30: 8083-8095.
- Sgado P, Alberi L, Gherbassi D, Galasso SL, Ramakers GM, Alavian KN, Smidt MP, Dyck RH, Simon HH. „Slow progressive degeneration of nigral dopaminergic neurons in postnatal *Engrailed* mutant mice.“ *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2006: 103: 15242-15247.
- Shults CW. „Lewy bodies.“ *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2006: 103:1661-1668.
- Slomianka L, West MJ. „Estimators of the precision of stereological estimates: an example based on the CA1 pyramidal cell layer of rats.“ *Neuroscience*, 2005: 136: 757-767.
- Smeyne RJ, Breckenridge CB, Beck M, Jiao Y, Butt MT, Wolf JC, Zadory D, Minnema DJ, Sturgess NC, Travis KZ, Cook AR, Smith LL, Botham PA.

- „Assessment of the Effects of MPTP and Paraquat on Dopaminergic Neurons and Microglia in the Substantia Nigra Compacta of C57BL/6 Mice.“ *PLoS One*, 2016: 11: e0164094.
- Snyder SH, Banerjee SP, Yamamura HI, Greenberg D. „Drugs, Neurotransmitters and Schizophrenia.“ *Science*, 1974: 184: 1243-1253.
- Somnez OF, Odaci E, Bas O, Colakoglu S, Sahin B, Bilgic S, Kaplan S. „A stereological study of MRI and the Cavalieri principle combined for diagnosis monitoring of brain tumor volume.“ *J Clin Neurosci*, 2010: 17: 1499-1502.
- Sousa N, Almeida OFX, Holsboer F, Paula-Barbosa MM, Madeira MD. „Maintenance of Hippocampal Cell Numbers in Young and Aged Rats Submitted to Chronic Unpredictable Stress. Comparison with the Effects of Corticosterone Treatment.“ *Stress*, 1998a: 2:237-249.
- Sousa N, Madeira MD, Paula-Barbosa MM. „Effects of corticosterone treatment and rehabilitation on the hippocampal formation of neonatal and adult rats. An unbiased stereological study.“ *Brain Res*, 1998b: 794: 199-210.
- Spillantini MG, Schmidt ML, Lee VMY, Trojanowski JQ, Jakes R, Goedert M. „ α -Synuclein in Lewy bodies.“ *Nature*, 1997: 388: 839-840.
- Sterio DC. „The unbiased estimation of number and size of arbitrary particles using the disector.“ *J Microsc*, 1984: 134: 127-136.
- Stevens JR. „An Anatomy of Schizophrenia?“ *Arch Gen Psychiatry*, 1973: 29: 177-189.
- Tieu K. „A guide to neurotoxic animal models of Parkinson's disease.“ *Cold Spring Harb Perspect Med*, 2011: 1:a009316.
- Tomac A, Lindqvist E, Lin LF, Ogren SO, Young D, Hoffer BJ, Olson L. „Protection and repair of the nigrostriatal dopaminergic system by GDNF in vivo.“ *Nature*, 1995: 373: 335-339.

- Turgut M, Kaplan S, Ünal ZB, Altunkaynak Z, Ünal D, Sahin B, Bozkurt M, Yurtseven ME. „Effects of pinealectomy on morphological features of blood vessel in chicken: an electron microscopic and stereological study.“ *J Exp Clin Med*, 2009: 26: 112-118.
- Vollmann-Honsdorf GK, Flügge G, Fuchs E. „Chronic psychosocial stress does not affect the number of pyramidal neurons in tree shrews hippocampus.“ *Neurosci Lett*, 1997: 233: 121-124.
- von Bartheld CS. „Comparison of 2-D and 3-D counting: the need for calibration and common sense.“ *Trends Neurosci*, 2001: 24: 504-506.
- von Bartheld CS. „Systematic bias in an “unbiased” neuronal counting technique.“ *Anat Rec*, 1999: 257: 119-120.
- Ward C.
„opt_dis_grid.txt.“ http://ecsource.jove.com/files/ftp_upload/56103/opt_dis_grid.txt, 2013.
- Weibel ER. „Stereological Methods in Cell Biology: Where Are We - Where Are We Going?“ *J Histochem Cytochem*, 1981: 29: 1043-52.
- Weibel ER, Gomez DM. „A principle for counting tissue structures on random sections.“ *J Appl Physiol*, 1962: 17: 343-348.
- West MJ. „Design-based stereological methods for counting neurons.“ *Prog Brain Res*, 2002: 135: 43-51.
- West MJ. „New stereological methods for counting neurons.“ *Neurobiol Aging*, 1993a: 14: 275-285.
- West MJ. „Regionally specific loss of neurons in the aging human hippocampus.“ *Neurobiol Aging*, 1993b: 14: 287-293.
- West MJ. „Stereological methods for estimating the total number of neurons and synapses: issue of precision and bias.“ *Trends Neurosci*, 1999: 22: 51-61.

- West MJ, Gundersen HJG. „Unbiased stereological estimation of the number of neurons in the human hippocampus.“ *J Comp Neurol*, 1990: 296: 1-22.
- West MJ, Slomianka L, Gundersen HJG. „Unbiased stereological estimation of the total number of neurons in the subdivisions of the rat hippocampus using the optical fractionator.“ *Anat Rec*, 1991: 231: 482-497.
- Winslow AR, Chen CW, Corrochano S, Acevedo-Arozena A, Gordon DE, Peden AA, Lichtenberg M, Menzies FM, Ravikumar B, Imarisio S, Brown S, O'Kane CJ, Rubinsztein DC. „ α -Synuclein impairs macroautophagy: implications for Parkinson's disease.“ *J Cell Biol*, 2010: 190: 1023-1037.
- Wise RA, Bozarth MA. „Action of drugs of abuse on brain reward system: an update with specific attention to opiates.“ *Pharmacol Biochem Behav*, 1982: 17: 239-243.
- Witgen BM, Grady MS, Nyengaard JR, Gundersen HJG. „A new fractionator principle with varying sampling fractions: exemplified by estimation of synapse number using electron microscopy.“ *J Microsc*, 2006: 222: 251-255.
- Zou L, Xu J, Jankovic J, He Y, Appel SH, Le W. „Pramipexole inhibits lipid peroxidation and reduces injury in the substantia nigra induced by the dopaminergic neurotoxin 1-methyl-1-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine in C57BL/6 mice.“ *Neurosci Lett*, 2000: 281: 167-170.