

Aus der Klinik für Neurologie
(Direktor der Klinik ist **Prof. Dr. med. G. Deuschl**)
im Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel
an der Christian –Albrechts-Universität zu Kiel

**Assoziative hochfrequente Stimulation des Nervus Supraorbitalis zur
Untersuchung der zeitabhängigen Plastizität im Blinkreflex bei Patienten
mit Blepharospasmus**

Inauguraldissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
der Medizinischen Fakultät
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von
Asmaa Al-Ali
aus Bonn

Kiel 2012

1. Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr. Zeuner

2. Berichterstatter: Prof. Dr. Kuhtz-Buschbeck

Tag der mündlichen Prüfung: 12. April 2013

Zum Druck genehmigt, Kiel, den 28. Januar 2013

gez. Prof. Dr. Thilo van Eimeren

Meiner Mutter gewidmet

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	7
1.1. Blepharospasmus	7
1.1.1. Definition und Epidemiologie des Blepharospasmus	7
1.1.2. Klinisches Bild und Therapie des Blepharospasmus	7
1.1.3. Pathophysiologie des Blepharospasmus	8
1.2. Anatomie und Innervation der Augenlider	8
1.3. Blinkreflex	9
1.3.1. Einführung	9
1.3.2. Blinkreflex und Doppelpulsstimulation beim Blepharospasmus	10
1.3.3. Tiermodelle für den Blepharospasmus	11
1.4. Synaptische Plastizität	12
1.4.1. Definition der synaptischen Plastizität	12
1.4.2. Kurzzeitplastizität	12
1.4.3. Langzeitplastizität	13
1.4.4. Assoziative Plastizität	13
1.4.5. LTP und LTD des Blinkreflexes	14
1.4.6. LTP des Blinkreflexes bei Patienten mit Blepharospasmus	15
1.5. Homöostatische Mechanismen	16
1.6. Hypothesen und Fragestellungen	17
2. Material und Methoden	22
2.1. Klinische Daten der Patienten und Probanden	22
2.2. Interventionsprotokoll: HFS Konditionierung der elektrisch evozierten R2- Antwort	27
2.3. Messung der R2- Antwort	32
2.4. Experimentelle Verfahrensweise	33
2.5. Statistische Analysen	34

3. Ergebnisse	36
3.1. Klinische Ergebnisse der Patienten	36
3.2. Die R2- Antwort des Blinkreflexes nach Einzelpulsstimulation	37
3.3. Inhibition der R2- Antwort nach Doppelpulsstimulation.....	40
3.4. Messungen mit LTP –LTD an Patienten vor und nach BTX- Therapie	42
3.4.1. Klinische Ergebnisse bei Patienten vor und nach BTX- Therapie.....	42
3.4.2. LTP- LTD Messungen vor und nach BTX- Therapie	43
4. Diskussion	44
4.1. Einfluss der Stimulusintensität.....	46
4.2. Habituationseffekt des Blinkreflexes	47
4.3. Einfluss des Alters auf die assoziative Plastizität	48
4.4. Doppelpulsinhibition.....	49
4.5. Einfluss der Botulinumtoxin Therapie	51
5. Zusammenfassung	54
6. Veröffentlichungen	56
7. Literaturverzeichnis	57
8. Anhang	62
8.1. Aufklärungsprotokoll für Patienten.....	62
8.2. Aufklärungsprotokoll für Probanden	65
9. Danksagung	68
10. Lebenslauf	69

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Hypothetische Darstellung des dynamischen Bereichs bei gesunden Kontrollen und bei Patienten mit Blepharospasmus nach HFS_{LTP} und HFS_{LTD}	19
Abbildung 2: Hypothetische Darstellung der homöostatischen Antwort bei Kontrollen und bei Patienten mit Blepharospasmus	20
Abbildung 3: Hypothetische Darstellung der Effekte der BTX- Therapie auf die gestörte homöostatische Kontrolle bei Patienten mit Blepharospasmus	21
Abbildung 4: Evaluation des dynamischen Modifikationsbereichs der LTP- LTD- ähnlichen Plastizität	28
Abbildung 5: Die Untersuchung der Wirkung von BTX Injektionen an der homöostatischen Plastizität	29
Abbildung 6: Platzierung der Elektroden und Beispiele für die R2- Antwort	30
Abbildung 7: Platzierung der Elektroden zur elektrischen Stimulation des rechten Nervus Supraorbitalis bei einer Probandin	31
Abbildung 8: Normalisierte Daten für HFS_{LTP} , $HFS_{LTP-LTD}$ und $HFS_{LTP-LTP}$	37
Abbildung 9: Normalisierte Daten für HFS_{LTD} und $HFS_{\text{ohne Intervention}}$ bei Probanden	38
Abbildung 10: R2- Antwort jedes einzelnen Teilnehmers vor und direkt nach HFS_{LTP}	39
Abbildung 11: R2- Antwort der einzelnen Kontrollpersonen, vor und direkt nach HFS_{LTP} , HFS_{LTD} und $HFS_{\text{ohne Intervention}}$	40
Abbildung 12: $HFS_{LTP-LTD}$ vor und nach BTX Therapie bei Patienten mit Blepharospasmus	43

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Klinische Daten der Blepharospasmus Patienten	22
Tabelle 2: Protokolle, an denen die Blepharospasmus Patienten teil nahmen	23
Tabelle 3: Protokolle, an denen die Kontrollpersonen teil nahmen	24
Tabelle 4: Unterschiede in den Methoden zwischen den drei Studien	46

1. Einleitung

1.1. Blepharospasmus (BSP)

1.1.1. Definition und Epidemiologie des Blepharospasmus (BSP)

Die Dystonie ist ein Syndrom unwillkürlicher, anhaltender und repetitiver Muskelkontraktionen, die zu verzerrenden Bewegungsmustern oder abnormen Haltungen führt (Jankovic und Fahn 2002).

Der Blepharospasmus (BSP) gehört zur Gruppe der fokalen Dystonien. Das Manifestationsalter beträgt 40- 60 Jahre. Bisher wurden keine verantwortlichen Gene hierfür gefunden. Dennoch zeigte sich in 30 % der betroffenen Patienten eine positive Familienanamnese bezüglich fokaler Dystonien (eine oder mehrere Formen). Die Prävalenz wird auf 16 bis 133 pro Million geschätzt. Im Einzelnen betrachtet betrug die Prävalenz des BSP 12 pro Million in Japan (Nakashima et al. 1995), 17 pro Million in Rochester-Minnesota (Nutt et al. 1988), 30 pro Million in Nord England (Duffy et al. 1998), 36 pro Million in einer Dystonie Studie in Europa (ESDE 2000) und 133 Pro Million in einer Region Süd Italiens (Hallett 2002, Defazio und Livrea 2004). Frauen sind zweimal so häufig betroffen wie Männer (Hallett 2002, Defazio und Livrea 2002). Das Risiko für die Entwicklung eines Blepharospasmus kann erhöht sein, wenn anamnestisch ein zerebrales Trauma mit Bewusstlosigkeit vorliegt, es Dystonien in der Familie gibt oder aber Augenerkrankungen wie beispielsweise eine Blepharitis, Keratokonjunktivits oder trockene Augen in der Krankengeschichte gibt (Defazio und Livrea 2002).

1.1.2. Klinisches Bild und Therapie des Blepharospasmus

Der Blepharospasmus (BSP) ist durch eine übermäßige unwillkürliche Kontraktion der M. orbicularis oculi gekennzeichnet, die zu einer anhaltenden Schließung der Augenlider führen kann. Der Blepharospasmus tritt spontan auf, kann aber auch durch Exposition gegenüber hellem Licht, durch Fernsehen, Lesen, Autofahren oder Müdigkeit ausgelöst oder getriggert werden. Kontraktionen können durch sensorische Tricks, z. B. Berühren der Stirn oder Augenbrauen oder Sprechen, gemindert werden (Langlois et al. 2003, Defazio und Livrea 2004). Blepharospasmus kann allein auftreten oder von einer Dystonie der unteren Gesichtshälfte oder des Kiefers (Meige-Syndrom) begleitet sein (Hallett 2002).

Zudem zeigt BSP, eine beträchtliche sozio-ökonomische Auswirkung auf die betroffenen Patienten. In schweren Fällen kann eine tonische Augenlidschließung zu einer funktionellen

Blindheit führen und eine erhebliche negative Auswirkung auf die Lebensqualität des Patienten haben (Hallett 2002, Langlois et al. 2003).

Die Standardtherapie des BSP ist die Injektion von Botulinumtoxin (BTX) in die betroffene Muskultur, meist in den M. orbicularis oculi (Hallett 2002, Defazio und Livrea 2004). Die BTX- Therapie ist sehr wirksam und kann über viele Jahre angewandt werden (Hallett 2002, Defazio und Livrea 2004). Da das Toxin innerhalb von 8-12 Wochen abgebaut wird, ist die Besserung der klinischen Symptomatik nur vorübergehend, und die Behandlung muss alle drei Monate wiederholt werden. Die Wirkung von BTX bei Blepharospasmus ist hauptsächlich auf eine Parese der injizierten Muskulatur zurückzuführen, die in Folge der Hemmung der Acetylcholinfreisetzung an der neuromuskulären Synapse auftritt.

1.1.3. Pathophysiologie des Blepharospasmus

Die Pathophysiologie des BSB ist noch nicht ganz geklärt. Sowohl genetische als auch nicht-genetische Faktoren scheinen dabei eine Rolle zu spielen. Die meisten epidemiologischen Studien belegen, dass der BSP autosomal dominant vererbt wird, jedoch mit einer reduzierten Penetranz von ungefähr 5 % (Hallett 2002).

Zu den nicht-genetischen Faktoren zählt eine Verminderung an Dopamin-haltigen Neurone in der Substantia nigra Pars Compacta, die zu einer Reduktion der Inhibierung innerhalb des Blinkreflexes, führen könnte (Schicatano et al. 1997). Ein weiterer nicht-genetischer Faktor könnte eine Schwäche des Musculus Orbicularis Oculi sein, die zu einer erhöhten Blinzelrate und letztlich einen Lidkrampf auslösen könnte. Schließlich verursachen trockene Augen einen abnormen sensorischen Reiz, der ebenfalls zur Entwicklung eines BSP beiträgt (Schicatano et al. 1997).

Die Blinzelrate ist bei BSB Patienten im Vergleich zu Gesunden besonders in Ruhe erhöht, und nimmt während einer Unterhaltung ab. Dieses Ergebnis wird damit erklärt, dass eine Unterhaltung die Erregbarkeit des Lidschlusses reduzieren könnte (Bentivoglio et al. 2006).

1.2. Anatomie und Innervation der Augenlider

Der Musculus Orbicularis Oculi (Lidschliesser) ist ein Skelettmuskel, der das Auge ringförmig umgreift, er führt zum Schluss der Lidspalte und somit zum Lidschlussreflex (Blinkreflex). Der Muskel wird unilateral vom Nucleus Fazialis durch den Nervus facialis (VII. Hirnnerv) innerviert.

Der Musculus levator palpebrae superioris ist ein Skelettmuskel in der Augenhöhle, der das obere Augenlid nach oben und zurück zieht und somit für die Öffnung der Lidspalte zuständig

ist. Er wird bilateral vom Nucleus Oculomotorius durch den Nervus oculomotorius (III. Hirnnerv) innerviert. Im Hirnstamm erfolgt die synaptische Verschaltung dieser zwei Muskeln folgenderweise:

Sensorische Afferenzen von der Kornea und dem Augenlid erreichen den medullären Trigemuskern. Vom spinalen Trigemuskern werden exzitatorische, ipsilaterale Impulse an den Motoneurone des Musculus Orbicularis Oculi geleitet. Der Trigeminus Hauptkern sendet wiederum bilaterale exzitatorische Impulse an den Motoneurone des Musculus Orbicularis Oculi und inhibierende Impulse an den Musculus Levator Palpebrae (Hallett 2002).

Das Resultat dieser Verschaltung im Blinkreflex, ist die Kontraktion des M. orbicularis oculi verbunden mit der Inhibierung des M. levator palpebrae.

1.3. Blinkreflex (Musculus Orbicularis Oculi-Reflex)

1.3.1. Einführung

Der Blinkreflex gehört zu den Hirnstammreflexen und ist ein etabliertes Untersuchungsverfahren, das routinemäßig in der klinischen Neurophysiologie eingesetzt wird, um Schädigungen des N. facialis, des N. trigeminus oder Läsionen im Bereich des pontomedullären Überganges genauer lokalisieren zu können.

Ausgelöst wird der Blinkreflex, durch die elektrische Stimulation des Nervus Supraorbitalis, die zu einem bilateralen Augenschluss führt (Hallett 2002). Die Afferenz des Blinkreflexes erfolgt über den Nervus Supraorbitalis (Endast des Nervus Ophthalmicus, der 1. Ast des Nervus Trigeminus V) und die Efferenz erfolgt nach Verschaltung im Hirnstamm über den Nervus Fazialis. Infolge dessen entsteht eine frühe, kurze ipsilaterale Antwort mit einer Latenz von 10 ms (R1-Antwort) gefolgt von einer späten, längeren, bilateralen Antwort mit einer Latenz von 33 ms (R2- Antwort) (Hallett 2002).

Die Umschaltung der verschiedenen Komponenten des Blinkreflexes erfolgt im Hirnstamm, über unterschiedliche Kerne des Nervus Trigeminus zum Kern des Nervus Fazialis, wobei die zwei Komponenten des Blinkreflexes zwei verschiedene Reflexwege haben:

Nach elektrischer Stimulation des N. Supraorbitalis verläuft der Reflexbogen für die R1-Antwort zum Kern des Nervus Trigeminus (Nucleus principalis trigemini) und von dort oligosynaptisch über Interneurone, ipsilateral, zum motorischen Kern des Nervus Fazialis (Nucleus nervi facialis) im Bereich der Pons. Von dort erreichen die Nervenfasern des Nervus Fazialis den Musculus Orbicularis oculi und induzieren die R1- Antwort. Die R1- Antwort zeigt keine Habituation und bleibt bei mehreren hintereinander folgenden Reizen gleich (Malin 1980).

Bei der R2- Antwort, die zum Augenschluss führt, verläuft der Reflexbogen, nach elektrischer Stimulation des Nervus Supraorbitalis über den Nucleus und Tractus spinalis trigemini zur Medulla oblongata. Ein Teil der Fasern kreuzt über die Mittellinie zur kontralateralen Seite, und der Reflexbogen steigt ascendierend auf beiden Seiten wieder auf zu den motorischen Kern des Nervus Fazialis (Nucleus nervi facialis) und induzieren die R2- Antwort.

Damit ist die R2 Komponente sowohl ipsilateral als auch kontralateral ableitbar (Hopf und Deuschl 1998, Stoehr und Bluthardt 1983, Hallet 2002). Der resultierende Augenschluss durch den M. orbicularis oculi ist daher immer bilateral auslösbar (Willer et al. 1984). Die Verschaltung dieses Reflexbogens erfolgt im Gegensatz zur R1- Komponente polysynaptisch (Valls- Sole und Tolosa 1989, Klostermann und Wessel 1995).

1.3.2. Blinkreflex und Doppelpulsstimulation beim Blepharospasmus

Die Doppelpulsstimulation des N. Supraorbitalis ist eine Variante des Blinkreflexes, bei dem elektrophysiologisch ein kurz hintereinander abgegebener elektrischer Doppelreiz im Abstand von ca. 150–200 ms erfolgt. Bei Gesunden nimmt die Amplitude um mehr als 30% nach dem zweiten Reiz ab (Sommer et al. 1998). Diese Amplitudenreduktion ist von der Reizstärke abhängig und bei erhöhten Reizstärken deutlich ausgeprägter (Sommer und Ferbert 2001). Beim Blepharospasmus jedoch kann die Amplitudenreduktion fehlen, und die Erholungszeit ist verkürzt. Ursächlich dafür, wird ein Wegfall hemmender Neurone der Substantia nigra und der Formatio reticularis vermutet (Basso und Evinger 1996, Koehler et al. 2001).

Berardelli et al., 1985 untersuchte mit der Doppelpulsstimulation die Erholungszeit der R2- Antwort bei Gesunden Kontrollpersonen und Blepharospasmus Patienten. Die zwei Stimulationen (1. konditionierende und 2. Test-Stimulation) des Nervus supraorbitalis, erfolgten in einem variierenden Abstand von 100 Millisekunden – 3 Sekunden. Die Antwort der zweiten Stimulation, wurde als Prozentanteil der Antwort der ersten Stimulation, gemessen.

Bei einem Abstand von 500 ms, zeigte sich bei den Probanden eine Amplitudenreduktion um 90% und eine Amplitudenreduktion um 70% bei einem Abstand von 1000 ms. Dagegen zeigte sich bei Blepharospasmus Patienten nur eine moderate Amplitudenreduktion um 21% bei einem Abstand von 500 ms und keine Reduktion bei einem Abstand von 1000 ms.

Damit wies er erstmals nach, dass die Erholungszeit bei BSP Patienten verkürzt ist. Aufgrund der fehlenden Hemmung ist das System abnorm erregbar. Man vermutete, als Grund dafür, eine verstärkte Erregbarkeit in den Interneuronen des Gehirnstammes, die vermutlich wichtig sind, um eine Hemmung der R2-Antwort herbei zu führen (Berardelli et al. 1998).

1.3.3. Tiermodelle für den Blepharospasmus

In einem Ratten-Tiermodell stellte Schicatanò et al., 1997 fest, dass die Symptome des Blepharospasmus möglicherweise durch eine Kombination aus zwei Änderungen im trigeminalen Blinkreflex System hervorgerufen werden:

Zum einen kann ein unilateraler 30%- iger Verlust an dopaminhaltigen Neuronen in der Substantia Nigra Pars Compacta (durch Injektion von 6-Hydroxydopamin) zu einem „prädisponierenden neuronalen Umfeld“ für Blepharospasmus führen, das eine Reduktion der tonischen Inhibition im Blinkreflex-Kreislauf bewirkt, gleichzeitig jedoch die R2-Antwort verstärkt und somit eine Übererregbarkeit im Blinkreflex induziert. Zum anderen kann eine leichte Schwäche des Musculus Orbicularis oculi durch eine unilateral induzierte Läsion im Nervus Facialis, adaptiv einen erhöhten Reiz im senso-motorischen Kreislauf des Blinkreflexes erzeugen, welches Blepharospasmus durch vermehrtes Blinzeln auslöst. In einem dritten Ansatz wurden beide Faktoren kombiniert. 20 Tage nach einem induzierten Verlust an dopaminhaltigen Neuronen in der Substantia nigra pars Compacta (durch Injektion von 6-Hydroxydopamin) wurde der Musculus Orbicularis Oculi in derselben Weise wie vorher geschwächt. Daraus resultierte eine enorme Übererregbarkeit im Blinkreflex und führte reflektorisch zu einem bilateralen spontanen Krampf des Lidschließers. Einzeln bewirkte keiner dieser zwei Änderungen jegliche Verkrampfungen der Lidschließers, nach dessen Kombination zeigte sich hingegen, ein kräftiges bilaterales Blinzeln und Verkrampfungen der Lidschließers.

Der Dopamin Verlust und die Schwäche (oder leichte Parese) des Musculus Orbicularis führten zu einer Übererregbarkeit im Blinkreflex Kreislauf. Die Basalganglien modulieren die Erregbarkeit des Blinkreflex Kreislaufes. Dabei führt die Substantia nigra pars reticulata zu einer GABAergen Hemmung des Colliculus Superior. Der Colliculus Superior wiederum erregt serotonerge Neurone in den Raphe- Kernen, die die Blinkreflex Bahnen inhibieren (Basso und Evinger 1996). Der Dopamin Verlust führt zu einer verstärkten Inhibition des Colliculus Superior und letztlich zu einer reduzierten Inhibition des Blinkreflex Kreislaufes. Vermutlich führte die verstärkte Inhibition durch die Substantia nigra ebenso wie die Lidmuskelparese zu einer Änderung und Fazilitierung im senso- motorischen Kreislauf des Blinkreflexes und damit zu einem erhöhten Risiko für die Entwicklung eines Blepharospasmus.

Die Faktoren Alter, Übererregbarkeit im Blinkreflex und Funktionsstörung der Basalganglien sind durchaus zusammenhängend. Eine Reduktion des striatalen Dopamins führt zu einer

Übererregbarkeit im Blinkreflex (Basso et al. 1993, Kimura 1973). Bekannt ist weiter, dass im höheren Alter ein progressiver Verlust an dopaminhaltigen Neurone in der Substantia nigra Pars compacta auftritt (Fearnley und Lees 1991), sodass sich die Übererregbarkeit im Blinkreflex im höheren Alter verstärkt. Ferner kann eine externe Augenerkrankung z. B. trockene Augen einen verstärkten Reiz im Blinkreflex Kreislauf und somit ein vermehrtes Blinzeln zur Verbesserung der Befeuchtung der Kornea bewirken.

Ersichtlich aus diesem Tiermodell sind zwei Faktoren, die das Auftreten von Blepharospasmus beim Menschen möglicherweise erklären: 1) Eine subklinische Reduktion an dopaminhaltigen striatalen Neurone verschafft ein geeignetes Milieu für Blepharospasmus 2) Externe Augenerkrankungen z. B. trockene Augen können Blepharospasmus auslösen (Schicatano et al. 1997).

Desweiteren befürwortet dieses Tiermodell die Auffassung, dass eine schlecht angepasste Plastizität innerhalb des sensomotorischen Systems, eine große Rolle, bei der klinischen Manifestation einer fokalen Dystonie, spielen (Quartarone et al. 2006).

1.4. Synaptische Plastizität

1.4.1. Definition der Synaptischen Plastizität

Synaptische Plastizität beschreibt die aktivitätsabhängige Änderung der Stärke der synaptischen Übertragung (Citri und Malenka 2008).

Der synaptischen Plastizität wird eine zentrale Rolle bei der Umwandlung von kurzzeitigen Erfahrungen in persistierenden Erinnerungen zugeschrieben. Zusätzlich wird es als zelluläres Korrelat für das Lernen und das Gedächtnis betrachtet.

Man unterscheidet die Kurzzeitplastizität, bei der die Änderung der Übertragungsstärke Millisekunden bis höchstens einige Minuten anhält von der Langzeitplastizität, bei der die Stärke der Übertragung über viele Minuten bis Stunden bestehen bleibt (Citri und Malenka 2008).

1.4.2. Kurzzeitplastizität

Wenn zwei Stimuli innerhalb eines kurzen Zeitintervalls die Präsynapse erreichen, kann die synaptische Übertragung, in Abhängigkeit vom Interstimulus Intervall, verstärkt oder abgeschwächt werden (Katz und Miledi 1968, Zucker und Regehr 2002). Bei einem Interstimulus Intervall von 20 ms, erfolgt eine Abschwächung der synaptischen Übertragung, die vermutlich auf eine Inaktivierung der Kalzium- oder Natriumkanäle oder auf eine Reduktion der Transmittermoleküle der Präsynapse zurück zu führen ist. Eine Potenzierung

dagegen tritt bei längeren Interstimulus Intervallen (20- 500 ms) auf. Begründet wird dieses Phänomen durch das übrig gebliebene Kalzium in der Präsynapse, von dem ersten Stimulus, welches nach Eintreffen des zweiten Stimulus zu einer weiteren Kalzium Ausschüttung führt. Vermutlich sind jedoch weitere Mechanismen involviert (Citri und Malenka 2008).

1.4.3. Langzeitplastizität

Die synaptische Stärke, kann durch verschiedene Muster der Präsynaptischen Aktivität, sowohl verstärkt (Potenzierung) als auch abgeschwächt (Depression) werden.

Eine langanhaltende Potenzierung der synaptischen Effizienz (long-term potentiation, LTP), erfolgt mittels repetitiver hochfrequenter Stimulation exzitatorischer Synapsen, indem es zur einer Erhöhung erregender postsynaptischer Potentiale in den Zielzellen führt, welche über Stunden oder Tage anhält (Bliss und Lomo 1973). Zellphysiologisch wird LTP durch Aktivierung von glutamatergen N- Methyl- D- Aspartat (NMDA)- Rezeptoren vermittelt. Dies führt zu einem Einstrom von Natrium und Kalzium in die postsynaptischen Zelle. Kalzium wirkt im Zellinneren als second Messenger und aktiviert spezifische Enzyme und ist der entscheidende Trigger für LTP. In der Postsynapse kommt es zur Aktivierung einiger Proteinkinasen, welche über intrazelluläre Phosphorylierung von AMPA-Rezeptoren, die synaptische Übertragung verstärken.

Die langanhaltende Depression der synaptischen Effizienz (long-term Depression, LTD) wird durch repetitive niederfrequente Stimulation präsynaptischer Neurone erzeugt, die zur einer Abnahme der synaptische Übertragung führt (Malenka und Nicoll 1993). Analog zur LTP, hängt LTD von der Reduktion der NMDA-Rezeptor abhängigen, postsynaptischen Kalziumkonzentration, ab (Mulkey und Malenka 1992). LTD entsteht durch einen niedrigen Kalziumeinstrom in der Postsynapse, welches zur Aktivierung spezifischer Enzyme und somit zur Dephosphorylierung des AMPA-Rezeptors und zur Abnahme der AMPA- Rezeptordichte an der postsynaptischen Membran führt.

1.4.4. Assoziative Plastizität

Nach der Hebb'schen Lernregel, werden Synapsen zwischen Neuronen verstärkt, wenn die Aktivität des präsynaptischen Neuron, wiederholt mit der Aktivität des postsynaptisches Neurons, zusammen trifft d.h. wenn prä- und postsynaptische Neurone gleichzeitig aktiv sind (Hebb 1949). Hebb's Hypothese wurde, in Bezug auf der Zeitabhängigkeit, durch die „spike-timing dependent Plasticity, STDP moduliert: Synapsen werden verstärkt (LTP), wenn der präsynaptische Input vor der postsynaptischen Depolarisation eintrifft, dagegen kommt es zu

einer Abschwächung der Synapsen (LTD) wenn der präsynaptische Input, die postsynaptische Depolarisation folgt. Somit kann LTP, durch die wiederholte Induktion exzitatorischer postsynaptischer Potenziale vor einem Aktionspotenzial verursacht werden, LTD hingegen durch die Umkehrung dieser Reihenfolge (Markram et al. 1997).

Wenn die Stimulation eines schwachen afferenten Eingangs kein LTP auslöst, kann dieser schwache afferente Eingang mit einer hochfrequenten, länger anhaltenden Reizung eines anderen starken afferenten Eingangs gepaart (assoziiert) werden, um LTP auszulösen. Die Richtung dieser synaptischer Plastizität (LTP vs. LTD) hängt stark von der zeitlichen Beziehung des schwachen und starken Einganges ab: LTP des schwachen Eingangs entsteht, wenn der starke Eingang gleichzeitig oder immer kurz (bis zu 20 ms) nach dem schwachen Eingang erzeugt wird, LTD dagegen, wenn diese Reihenfolge umgekehrt wird (Siebner und Ziemann 2007, Levy und Steward 1983).

1.4.5. LTP und LTD des Blinkreflexes

Mao und Evinger untersuchten im Jahr 2001 den Blinkreflex bei gesunden Personen, indem sie Hochfrequenzstimulation (HFS) am Nervus Supraorbitalis applizierten, welche zu einer Veränderung der nachfolgenden Blinkreflexe führte. HFS wurde in drei Impulsblöcken, mit einem Interblock Intervall von fünf Minuten, durch Stimulation des Nervus Supraorbitalis, appliziert. Jeder dieser Blöcke bestand aus vier HFS-Serien, und diese wiederum bestanden aus neun Stimuli, dessen Rate 400 Hz betrug.

Für die Induktion des Blinkreflexes, wurde erstmals die minimale Stimulusintensität, die eine R2- Antwort auslöst festgesetzt. Für die Experimente wurde jedoch die doppelte Stimulusintensität (2T) gegeben, um einen sicheren Blinkreflex auszulösen.

Die 2T Stimulation und die Hochfrequenzstimulation wurden zu verschiedenen Zeiten in Relation zur R2- Antwort appliziert. Die R2-Antwort wurde umgehend vor (Baseline), umgehend (T0), 30 Minuten (T30) und 60 Minuten (T60) nach der HFS gemessen. Die Ergebnisse sahen folgendermaßen aus:

- Die Applikation der HFS am Anfang der elektrisch evozierten R2- Antwort führte zu einer ipsilateralen Potenzierung der nachfolgenden R2-Amplituden um 33%, 29% und 18% sofort, 30 und 60 Minuten nach HFS. Kontralateral wurde keine statistisch signifikante Potenzierung erzielt.
- Die Applikation der HFS vor dem Anfang der elektrisch evozierten R2- Antwort induzierte eine Reduktion der nachfolgenden R2-Amplituden kontralateral um 30%, 20% und 42% sofort, 30 und 60 Minuten nach HFS. Ipsilateral wurde nur, 30 min

nach HFS, eine statistisch signifikante Reduktion der R2-Amplitude um 27 % ermittelt.

- Wurde die HFS nach der R2 Antwort durchgeführt, änderte sich die R2 Antwort nicht.

Die physiologischen Eigenschaften der bidirektionalen Veränderungen der R2- Amplitude des Blinkreflexes sind mit der assoziativen zeitabhängigen Plastizität (spike-timing dependent Plasticity) kompatibel.

Mao und Evinger, 2001 gingen davon aus, dass die hochfrequente Stimulation des Nervus Supraorbitalis, LTP- ähnliche Effekte (HFS am Anfang der R2- Antwort) und LTD- ähnliche Effekte (HFS vor dem Anfang der R2- Antwort) innerhalb des trigeminalen Teils des Blinkreflexes erzeugte.

Möglicherweise entstand LTP, durch eine Summation der Depolarisationen durch die 2T- Stimulation und der Hochfrequenzstimulation des Nervus Supraorbitalis, die zu einem verstärkten Kalziumeinstrom führten. Dagegen entstand LTD, weil HFS vor dem Blinkreflex, die Sensitivität des Nervus Supraorbitalis für nachfolgende Stimulationen reduziert und somit zu einem verminderten Kalziumeinstrom führte (Mao und Evinger 2001).

1.4.6. LTP des Blinkreflexes bei Patienten mit Blepharospasmus

Basierend auf der Studie von Mao und Evinger 2001, führte Quartarone et al. 2006 eine zweite wichtige Studie durch, um die gestörte Plastizität der neuronalen Verschaltungen innerhalb des Blinkreflexes bei Patienten mit Blepharospasmus zu beweisen.

Quartarone et al. 2006, verwendete das von Mao und Evinger (2001) eingesetzte Protokoll bei Blepharospasmus Patienten und zeigte, nach einem Faszilitations HFS-Protokoll, eine erhöhte Potenzierung der R2-Antwort bei Patienten im Vergleich zu gesunden Probanden. Die Ergebnisse deuteten auf eine abnorm erhöhte LTP- ähnliche assoziative Plastizität innerhalb des Blinkreflexes bei den Patienten mit Blepharospasmus hin. Die anschließende Therapie mit Botulinum Toxin (BTX), injiziert in beiden Musculi Orbicularis oculi bei den Patienten, führte zur Aufhebung dieser gestörten Plastizität (Quartarone et al. 2006).

Dabei wurde entsprechend des Protokolls von Mao und Evinger, am rechten Nervus Supraorbitalis am Anfang der R2-Antwort (die ebenfalls durch einen konditionierenden 2T Stimulus ausgelöst wurde) sowohl an Blepharospasmus Patienten als auch an gesunden Probanden, hochfrequent stimuliert. Auch hier wurde die R2-Antwort umgehend vor (Baseline), umgehend (T0), 30 Minuten (T30) und 60 Minuten (T60) nach HFS gemessen. Zusätzlich wurden die Untersuchungen an den Patienten, vier Wochen nach Botulinum Toxin

(BTX) Injektionen an beiden Musculi Orbicularis Oculi wiederholt. Die Ergebnisse sahen Folgendermaßen aus:

- Sowohl bei Patienten als auch bei Probanden induzierte die HFS Konditionierung am Anfang der R2- Antwort, eine bilaterale Vergrößerung der R2-Amplitude.
- Die Vergrößerung der R2-Amplitude war jedoch bei den Patienten (Vergrößerung um 60%) viel stärker ausgeprägt als bei den Probanden (Vergrößerung um 20%). Es zeigten sich keinerlei Unterschiede zwischen den R2-Amplituden in beiden Musculi Orbicularis Oculi.
- Bei Patienten und Probanden, zeigte sich eine konsistente Vergrößerung der R2-Amplitude umgehend (T0), 30 Minuten (T30) und 60 Minuten (T60) nach HFS im Vergleich zu den Ausgangswerten.
- Vier Wochen nach BTX Injektionen zeigte sich bei den Patienten eine Abschwächung der HFS-induzierten Vergrößerung der R2-Amplitude. Dies ereignete sich zusammen mit einer klinischen Besserung der Blepharospasmus Symptomatik bei den Patienten.

Die HFS Konditionierung des Nervus Supraorbitalis erzeugte somit langanhaltende Faszilitierung des Blinkreflexes, wenn HFS mit der elektrisch induzierten R2-Antwort zeitlich zusammentraf. Dieser Effekt bestand für mindestens eine Stunde. Erstmals wurde hier gezeigt dass unbehandelte Blepharospasmus Patienten eine verstärkte Potenzierung des Blinkreflexes aufweisen im Vergleich zu gesunden Probanden. Blepharospasmus war demnach vermutlich mit einer erhöhten Modifizierbarkeit des Blinkreflexes assoziiert. Dies ist vereinbar mit der Vermutung, dass fokale Dystonien aus einer gestörten sensomotorischen Plastizität resultieren (Berardelli et al. 1998).

1.5. Homöostatische Mechanismen

Die synaptische Plastizität wird, zwecks Stabilisierung der neuronalen Erregbarkeit, durch homöostatische Mechanismen kontrolliert. Durch diese Mechanismen wird bei Verstärkung oder Verminderung der synaptischen Übertragung einzelner Neurone, eine Hypo- oder Hyperaktivierung der neuronalen Kreisläufe verhindert (Turrigiano et al. 1998, Burrone et al. 2002). Ohne stabilisierende Mechanismen, würden aktivitätsabhängige Formen der Plastizität wie LTP und LTD, die neuronale Aktivität zur unkontrollierbaren Erregung oder totale Stilllegung führen. Metaplastizität steht für eine langandauernde Plastizität der neuronalen und synaptischen Funktionen, die durch die zurückliegende Erfahrung einer Synapse verursacht wird, da Neurone bekanntermaßen, in Abhängigkeit ihrer Vergangenheit bei Stimulation, entweder LTP oder LTD bilden (Wang und Wagner 1999). Die BCM- Theorie

(Bienenstock, Cooper und Munro 1982) bidirektionaler Plastizität, ist ein möglicher Mechanismus, um die Grenzwerte für die Induktion LTP- und LTD- artiger Plastizität zu stabilisieren. Hier vermutet man eine verschiebbare Modifikationsreizschwelle (sliding modifications threshold), die in Abhängigkeit der zurückliegenden synaptischen Aktivität, entweder LTP oder LTD induziert (Bienenstock et al. 1982). Eine schwache afferente Aktivität, erzeugt LTD dagegen induziert eine starke Aktivität LTP. Die Übergangsstelle von LTD zu LTP, wird als Modifikationsschwellenwert bezeichnet. Dieser ist nicht fixiert, sondern variiert in Abhängigkeit von der zurückliegenden postsynaptischen Aktivität. Dieser gleitende Schwellenwert bietet, durch die Ermittlung der postsynaptischen Aktivität, ein Mittel um Synapsen innerhalb eines dynamischen Bereichs, zu erhalten. Kommt es beispielsweise zur einer langanhaltenden Verstärkung der postsynaptischen Aktivität durch LTP, gleitet der Modifikationsschwellenwert so, dass sich die Schwelle für LTP erhöht, damit weitere LTP erschwert werden und gleichzeitig die Schwelle für LTD sinkt, damit weitere LTD bevorzugt werden. Umgekehrt, kommt es bei einer langanhaltenden Reduktion der postsynaptischen Aktivität, zum Gleiten der Modifikationsschwellenwert zu Gunsten von LTP, dadurch bedarf es einer geringeren neuronalen Aktivität, um LTP zu erzeugen (durch Senkung des Grenzwertes für LTP und Erhöhung des Grenzwertes für LTD) (Siebner und Ziemann 2007).

Eine gestörte homöostatische Kontrolle, wurde bereits bei Patienten mit Dystonien nachgewiesen. Sie zeigten eine gestörte homöostatische Antwort auf eine akute Zunahme der kortikospinalen Exzitabilität die zu einer gestörten motorischen Plastizität führte (Quartarone et al. 2006).

Die gestörte homöostatische Kontrolle der LTP- und LTD- ähnliche Plastizität in der Pathophysiologie des Blepharospasmus, wurde bisher noch nicht untersucht und ist eine zentrale Fragestellung unserer vorliegenden Studie.

1.6. Hypothesen und Fragestellung

Unser Projekt basiert auf dem Protokoll von Mao und Evinger 2001, welches LTP- und LTD- artige Plastizität, auslöst. Das Protokoll wurde jedoch erweitert, indem wir inhibitorische und fazilitatorische Protokolle kombinierten. Während bisherige Studien nur elektrische Einzelpulse applizierten, um die Veränderung der R2-Antwort nach HFS zu untersuchen (Mao und Evinger 2001, Quartarone et al. 2006), fügten wir in unserer Studie, analog zur Studie von Berardelli et al. 1985, die Doppelpulsstimulation hinzu, um die Inhibition der R2-Antwort zu quantifizieren. Frühere Studien berichteten über eine gestörte

Doppelpulsstimulation bei Blepharospasmus Patienten, bzw. über eine fehlende Hemmung der R2-Antwort (Berardelli et al. 1985). Dies deutete auf eine verstärkte Erregbarkeit in den Interneuronen des Hirnstammes hin (Berardelli et al. 1998). Wir vermuteten, dass der Verlust der Doppelpulsinhibition bei Blepharospasmus Patienten, mit der abnormen Plastizität Antworten auf die HFS Konditionierung, korreliert (Zeuner et al. 2010).

Ziel dieser Arbeit war es, die homöostatische Kontrolle der Erregbarkeit im Blinkreflex, bei Blepharospasmus Patienten und Probanden, durch die Kombination der fazilitatorischen (HFS_{LTP}) mit dem inhibitorischen (HFS_{LTD}), zu untersuchen.

Es sollten dabei folgende Hypothesen untersucht werden:

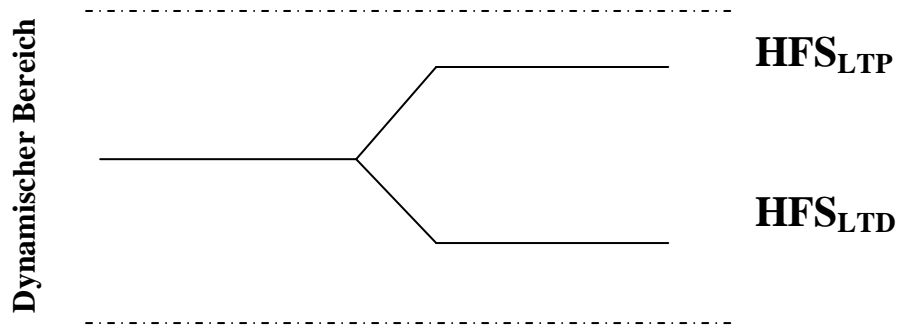
Es besteht eine gestörte Kontrolle der Plastizität bei Patienten mit Blepharospasmus, insbesondere ist die, durch die assoziative HFS induzierte Modifikationsschwelle des Blinkreflexes, gestört. Patienten zeigen dabei, bevorzugt eine LTP-ähnliche Plastizität.

Gesunde Kontrollen entwickeln nach der Präkonditionierung mit HFS_{LTP} , besonders gut LTD-ähnliche Plastizität, die jedoch bei den Patienten abgeschwächt ist (Abbildung 1).

Folgt eine inhibitorische HFS_{LTD} einer HFS_{LTP} , dann führt sie bei Gesunden zu einer Depotenzierung und damit zu einer deutlichen Reduktion der R2 Antwort. Blepharospasmus Patienten hingegen haben als Folge einer fehlerhaften homöostatischen Plastizität eine gestörte Modifikationsschwelle, sodass die Depotenzierung ausbleibt (Abbildung 2).

Botulinumtoxin Behandlung verbessert vorübergehend die gestörte Plastizität bei den Blepharospasmus Patienten (Abbildung 3).

Normaler dynamischer Bereich bei gesunden Kontrollen



Gestörter dynamischer Bereich bei Patienten mit Blepharospasmus

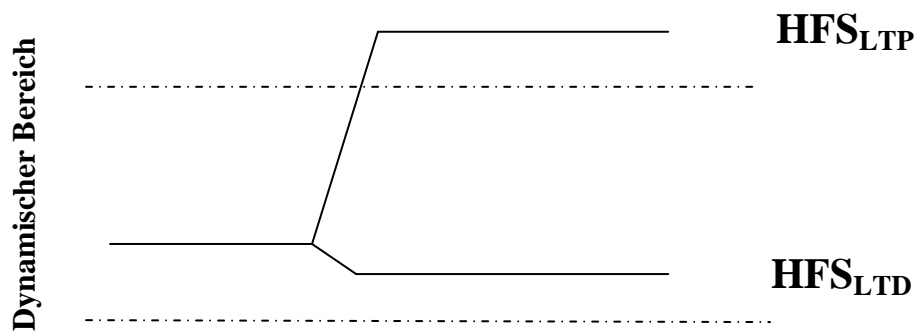
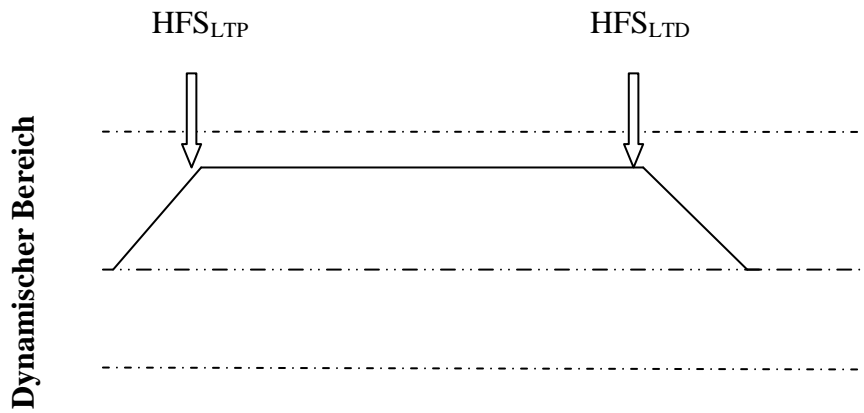


Abbildung 1. Hypothetische Darstellung des dynamischen Bereichs bei gesunden Kontrollen und bei Patienten mit Blepharospasmus nach \mathbf{HFS}_{LTP} und \mathbf{HFS}_{LTD} . Gesunde Kontrollen entwickeln nach der Präkonditionierung mit \mathbf{HFS}_{LTP} , besonders gut LTD-ähnliche Plastizität, die jedoch bei den Patienten abgeschwächt ist. Patienten tendieren nach assoziativer HFS eine übermäßige LTP-ähnliche Plastizität zu entwickeln.

$HFS_{LTP} - HFS_{LTD}$: Normale homöostatische Antwort bei gesunden Kontrollen



$HFS_{LTP} - HFS_{LTD}$: Gestörte homöostatische Antwort bei Patienten mit Blepharospasmus

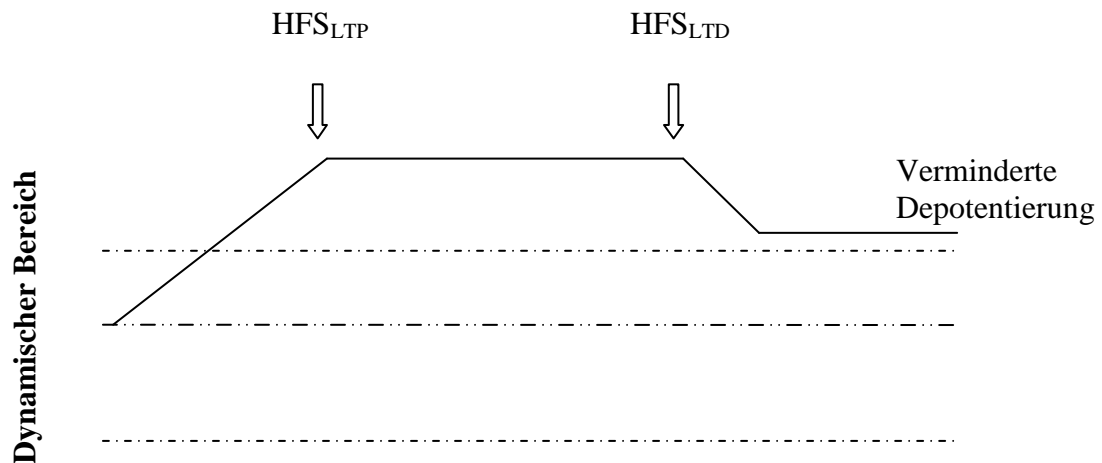
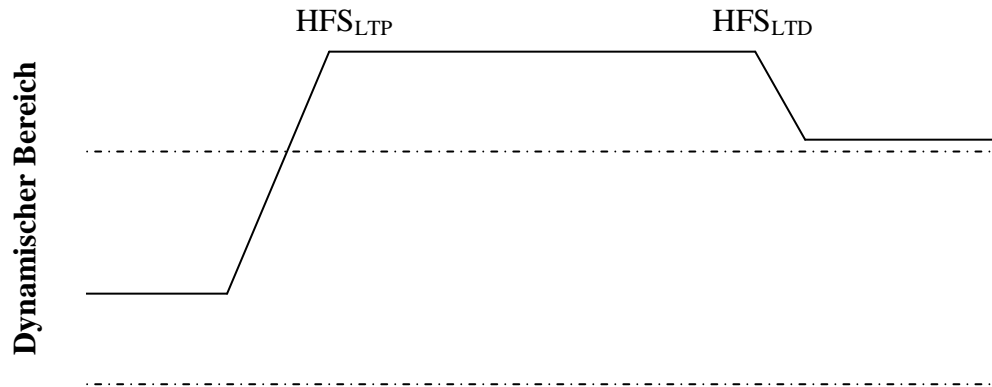


Abbildung 2. Hypothetische Darstellung der homöostatischen Antwort bei Kontrollen und bei Patienten mit Blepharospasmus. Folgt eine inhibitorische HFS_{LTD} einer HFS_{LTP} , dann führt sie bei Gesunden zu einer Depotentierung und damit zu einer deutlichen Reduktion der R2 Antwort. Blepharospasmus Patienten hingegen haben als Folge einer fehlerhaften homöostatischen Plastizität eine gestörte Modifikationsschwelle, sodass die Depotentierung ausbleibt.

Gestörte homöostatische Kontrolle bei Patienten mit Blepharospasmus vor BTX- Therapie



Verbesserung der homöostatische Kontrolle bei Patienten mit Blepharospasmus nach BTX- Therapie

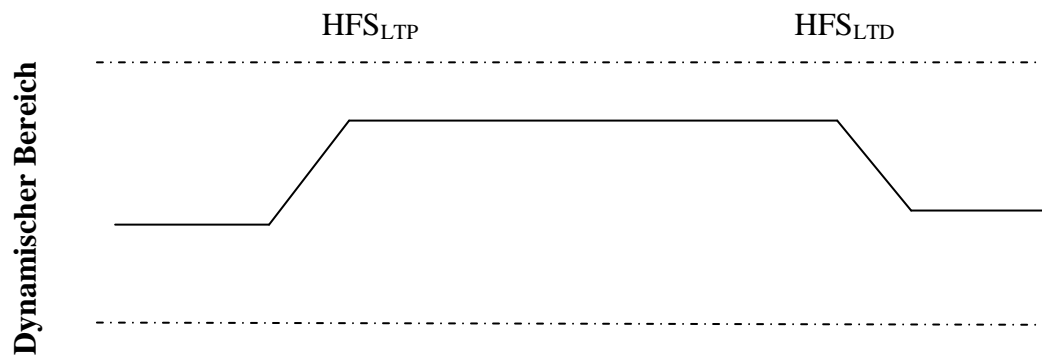


Abbildung 3. Hypothetische Darstellung der Effekte der BTX- Therapie auf die gestörte homöostatische Kontrolle bei Patienten mit Blepharospasmus. Die BTX Behandlung verbessert vorübergehend die gestörte Plastizität.

2. Material und Methoden

2.1. Klinische Daten der Patienten und Probanden

Insgesamt nahmen an unserer Studie 16 Patienten mit Blepharospasmus oder Meige Syndrom (9 weibliche, 7 männliche Patienten) mit einem durchschnittlichen Alter von 64 ± 6 Jahre, teil. Zusätzlich wurden 12 gesunde Probanden (7 weibliche, 5 männliche Probanden) rekrutiert, mit einem durchschnittlichen Alter von 50 ± 14 Jahren (Tabelle 1).

Tabelle 1 erläutert Alter der Patienten, Symptombdauer, klinische Symptome, BRS- Skala (Blepharospasm Rating Scale), BDS- Skala (Blepharospasm Disability Scale) und Anzahl des Blinzeln /min.

Patient ID	Alter (Jahre)	Symptombdauer (Jahre)	Klinische Symptome	BRS	BDS	Anzahl des Blinzeln/min
P01	67	9	Meige-Syndrom	21	65,77	
P02	69	31	Meige-Syndrom	12	79,62	13
P03	51	7	Meige-Syndrom	9	79,62	52
P04	65	5	Blepharospasmus	15	38,08	18
P05	65	13	Meige-Syndrom	17	20,77	17
P07	65	7	Blepharospasmus	16	72,69	37
P08	66	9	Blepharospasmus	7	79,62	34
P09	65	6	Blepharospasmus	13	76,15	50
P10	57	7	Meige-Syndrom	18	83,08	26
P11	72	16	Meige-Syndrom	10	83,08	25
P12	57	3	Blepharospasmus	4	90,00	4
P13	63	7	Blepharospasmus	8	90,00	39
P14	60	10	Blepharospasmus	7	76,15	29
P15	66	6	Meige-Syndrom	13	86,54	38
P16	77	7	Meige-Syndrom	19	20,77	60
P17	66	9	Blepharospasmus	9	83,08	42
Mittelwert	64,44	9,50		12,38	70,31	32,27
Standard- abweichung	5,94	6,30		4,79	22,12	15,54

Tabelle 1. Klinische Daten der Blepharospasmus Patienten. BRS = Blepharospasm Rating Scale, BDS = Blepharospasm Disability Scale

Es nahmen jedoch nicht alle Patienten und Probanden an jedem Protokoll teil (Tabelle 2 und 3). Zusätzlich zu den LTP- oder LTD- induzierenden Protokollen, applizierten wir in der Kontrollgruppe ein „nicht Interventions-Protokoll“ als Kontrollmessung. Alle Patienten und Probanden wurden mindestens 24 Stunden vor Beginn der Studie über die Vorgehensweise der Studie aufgeklärt und gaben ihr schriftliches Einverständnis, an den Untersuchungen teilzunehmen (Aufklärungsprotokoll für Patienten und Probanden siehe Anhang 8.1 und 8.2). Jeder Teilnehmer hatte das Recht, die Studie jederzeit abubrechen. Vor Beginn der Studie lag eine Genehmigung der Ethik-Kommission der Christian-Albrechts- Universität zu Kiel vor.

Patienten ID	HFS _{LTP}	HFS _{LTP-LTD}	HFS _{LTP-LTP}	BTX 0	BTX 1	BTX 2	BTX 3
P01		X		X	X	X	X
P02			X				
P03	X	X	X				
P04		X		X	X	X	X
P05	X	X	X	X	X	X	X
P06	X	X	X	X	X	X	X
P07	X	X	X				
P08	X	X	X	X	X	X	X
P09	X	X	X	X	X	X	X
P10	X	X	X	X	X	X	X
P11	X	X	X				
P12	X	X	X				
P13	X	X	X	X	X	X	X
P14		X		X	X	X	X
P15		X		X	X	X	X
P16	X	X	X				
Gesamtzahl	N= 11	N= 15	N= 12	N= 10	N= 10	N= 10	N= 10

Tabelle 2. Protokolle, an denen die Blepharospasmus Patienten teilnahmen. LTP= Langzeitpotenzierung. LTD= Langzeitdepression. LTP-LTD, LTP-LTP= Kombination aus zwei Interventionen. BTX 0= Vor BTX- Injektion, BTX 1, 2 und 3= 1, 2 und 4 Wochen nach BTX- Injektion.

Kontroll ID	Alter (Jahren)	HFS _{LTD}	HFS _{LTP}	HFS _{LTP-LTD}	HFS _{LTP-LTP}	HFS _{ohne-Intervention}
K01	23	X	X	X	X	X
K02	24	X	X	X	X	X
K03	65	X	X	X	X	X

K04	52	X	X	X	X	X
K05	50	X	X		X	
K06	60	X	X	X	X	X
K07	48	X	X	X	X	X
K08	51	X	X		X	X
K09	51	X	X	X	X	X
K10	54	X	X	X	X	
K11	63	X	X	X	X	X
K12	58	X	X	X	X	X
Gesamtzahl		N= 12	N= 12	N= 10	N= 12	N= 10
Durchschnitt	49,92					
Standardabweichung	13,45					

Tabelle 3. Protokolle, an denen die Kontrollpersonen teilnahmen. LTP= Langzeitpotenzierung. LTD= Langzeitdepression. LTP-LTD, LTP-LTP= Kombination aus zwei Interventionen.

Blepharospasmus Beurteilungsskala (BRS)

Zur Beurteilung und Quantifizierung des klinischen Bildes des Blepharospasmus wurde vor jedem Experiment, mittels der von Fahn 1989 eingeführten Blepharospasmus Beurteilungsskala (Blepharospasm Rating Scale (BRS)) folgende Faktoren bewertet:

Die Lokalisation der unwillkürlichen Bewegungen: (für jede positive Antwort ein Punkt)

- Obere Gesichtshälfte:
 1. Musculus Frontalis
 2. Musculus Orbicularis Oculi
 3. Musculus Nasalis
 4. Musculus Zygomaticus
- Untere Gesichtshälfte:
 1. Lippenspitzen
 2. Einziehen der Lippen
 3. Mundwinkel zur Seite gezogen
 4. Musculus Buccinator
 5. Wangen aufblasen
 6. Musculus Mentalis
 7. Platysma

Unwillkürliche Bewegungen, falls vorhanden:

1. In Ruhe
2. Nur bei Aktivität

Einflussfaktoren: (Verstärkung der Blepharospasmus Symptome= +1, keine Veränderung der Symptome= 0, Verbesserung der Symptome= -1)

1. Sonnenlicht
2. Fernsehen
3. Spazieren
4. Sprechen
5. Lesen
6. Schreiben
7. Nähen
8. Kartenspielen
9. Arbeiten
10. Hören
11. Singen
12. Gähnen
13. Brillen tragen
14. Sonnenbrillen tragen
15. Wut

Die Frequenz der unwillkürlichen Bewegungen: (maximal fünf Punkte)

1. Die unwillkürlichen Bewegungen bestehen konstant in Ruhe zur > 75 % der Wachzeit = 5 Punkte
2. Die unwillkürlichen Bewegungen bestehen in Ruhe zur 51- 75% der Wachzeit = 4 Punkte
3. Die unwillkürlichen Bewegungen bestehen in Ruhe zur 26- 50% der Wachzeit = 3 Punkte
4. Die unwillkürlichen Bewegungen bestehen in Ruhe zur 10- 25 % der Wachzeit = 2 Punkte
5. Die unwillkürlichen Bewegungen bestehen in Ruhe zur < 10 % der Wachzeit = 1 Punkt

Schweregrad der unwillkürlichen Bewegungen:

- Obere Gesichtshälfte (maximal vier Punkte)
 1. vermehrtes Blinzeln= 1 Punkt
 2. Schluss der Augenlider= 2 Punkte
 3. Kraftvoller Schluss der Augenlider= 3 Punkte
 4. Starker kraftvoller Schluss der Augenlider= 4 Punkte

- Mund (Maximal drei Punkte)
 1. Mild betroffen= 1 Punkt
 2. Mäßig betroffen= 2 Punkte
 3. Schwer betroffen= 3 Punkte

Für jeden dieser oben genannten Faktoren wurde eine festgesetzte Anzahl an Punkten vergeben. Ein Patient konnte maximal 41 Punkte erreichen. Je höher die erreichte Punktzahl desto schwerer und ausgeprägter waren die Symptome. Demnach hatte beispielsweise ein schwer betroffener Patient 21 Punkte und ein leicht betroffener Patient 4 Punkte (J. Fahn 1989).

Blepharospasmus Behinderungsskala (BDS)

Zusätzlich wurde die Blepharospasmus Behinderungsskala (Blepharospasm Disability scale, BDS) eingesetzt, welche die täglichen Einschränkungen, die durch Blepharospasmus verursacht werden evaluiert. Folgende Faktoren wurden bewertet:

Sonnenbrille

1. Sonnenbrillen werden im Freien gebraucht.
2. Sonnenbrillen werden normalerweise in einem Raum gebraucht.

Autofahren

1. Unbequem aber keine Einschränkung.
2. Autofahren in der Nacht nicht möglich wegen Blepharospasmus.
3. Autofahren tagsüber möglich aber eine Augenlidunterstützung ist nötig.
4. Autofahren nur für kurze Strecken möglich.
5. Autofahren nicht möglich wegen Blepharospasmus.
6. Kann nicht Autofahren.

Lesen

1. Unbequem aber keine Einschränkung.
2. Milde bis moderate Einschränkung beim Lesen.
3. Deutliche Einschränkungen beim Lesen.

Fernsehen

1. Unbequem aber keine Einschränkung beim Fernsehen.
2. Milde bis moderate Einschränkung beim Fernsehen.
3. Deutliche Einschränkungen beim Fernsehen.

Kinobesuch

1. Unbequem aber keine Einschränkung.

2. Milde bis moderate Einschränkung.
3. Deutliche Einschränkungen.

Einkaufen

1. Unbequem aber keine Einschränkung.
2. Einkaufen alleine nicht möglich.
3. Einkaufen sogar mit Begleitung nicht möglich.

Spazieren

1. Unbequem aber keine Einschränkung.
2. Schwierig in Menschenmassen.
3. Alleine nicht möglich im Freien.
4. Ohne Hilfe nicht möglich in einem Raum.

Hausarbeit

1. Unbequem aber keine Einschränkung.
2. Schwierig wegen Blepharospasmus.
3. Nicht möglich wegen Blepharospasmus.

Für jeden dieser acht Faktoren, wurde für jede Antwort, ein Punkt gegeben. Die Gesamtzahl der Punkte wurde durch die maximal mögliche Punktzahl geteilt, multipliziert mit 90 und von 90 % subtrahiert.

Berechnung: $90\% - 90 \cdot (\text{Punktzahl} / \text{maximale mögliche Punktzahl}) = \text{Endergebnis}$

Das Endergebnis stellt den Prozentanteil der normalen Aktivität dar. 100 % bedeutet keine bemerkbaren Einschränkungen, 95% bedeutet Blepharospasmus Symptome leicht bemerkbar jedoch keine Einschränkungen der Aktivität, 90% bedeutet Blepharospasmus Symptome bemerkbar und dadurch sozial eingeschränkt. Je niedriger der Prozent desto schwerer ist die Beeinträchtigung der Patienten.

Zusätzlich wurde ein 2-minütiges Video der spontanen Gesichtsbewegungen der Patienten gedreht. Ein unabhängiger Begutachter bewertete die Anzahl der Lidschläge pro Minute, vor und nach HFS Konditionierung.

2.2. Interventionsprotokoll: HFS Konditionierung der elektrisch induzierten R2-Antwort

Um die Veränderungen des dynamischen Modifikationsbereiches des Blinkreflexes bei Patienten und Probanden zu untersuchen, erfolgte die Hochfrequenzstimulation des N. Supraorbitalis, direkt am Anfang der R2-Antwort (HFS_{LTP}), um eine LTP-artige Plastizität zu induzieren.

Bei den Probanden wurde zusätzlich ein LTD Protokoll angewendet, bei dem HFS kurz vor dem Anfang der R2-Antwort appliziert (HFS_{LTD}) wurde. Als Kontrollbedingung erfolgte in derselben Gruppe ein Protokoll ohne Intervention ($HFS_{\text{ohne Intervention}}$).

Zur Messung der homöostatischen Kontrolle, wurden zwei fazilitatorische Protokolle (HFS_{LTP} gefolgt von HFS_{LTP}) und ein fazilitatorisches mit einem inhibitorischen Protokoll (HFS_{LTP} gefolgt von HFS_{LTD}) kombiniert (Abbildung 4).

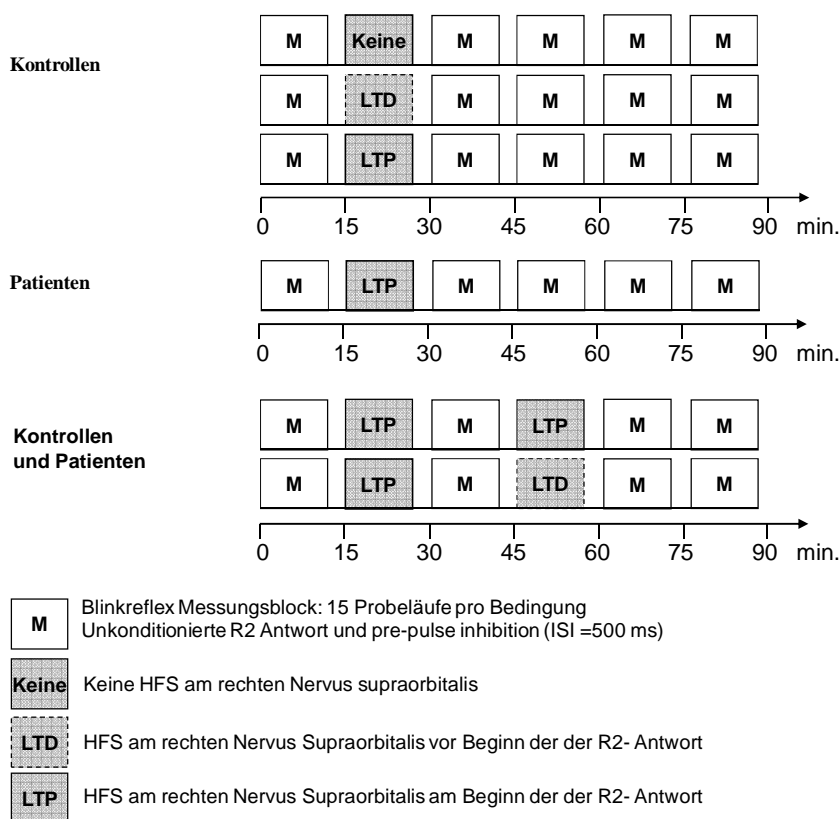


Abbildung 4. Evaluation des dynamischen Modifikationsbereichs der LTP- LTD-ähnlichen Plastizität. Dargestellt sind die verschiedenen Protokolle für Hochfrequenzstimulation. Bei Probanden und Patienten wurde HFS_{LTP} , $HFS_{LTP-LTD}$, $HFS_{LTP-LTP}$ untersucht. Die Protokolle HFS_{LTD} und keine Intervention wurden zur Kontrolle bei Probanden durchgeführt.

Die Wirkung von BTX auf die homöostatische Kontrolle, wurde bei Patienten, durch das (HFS_{LTP} gefolgt von HFS_{LTD}) Protokoll untersucht (Abbildung 5). Für Details siehe experimentelle Verfahrensweise.

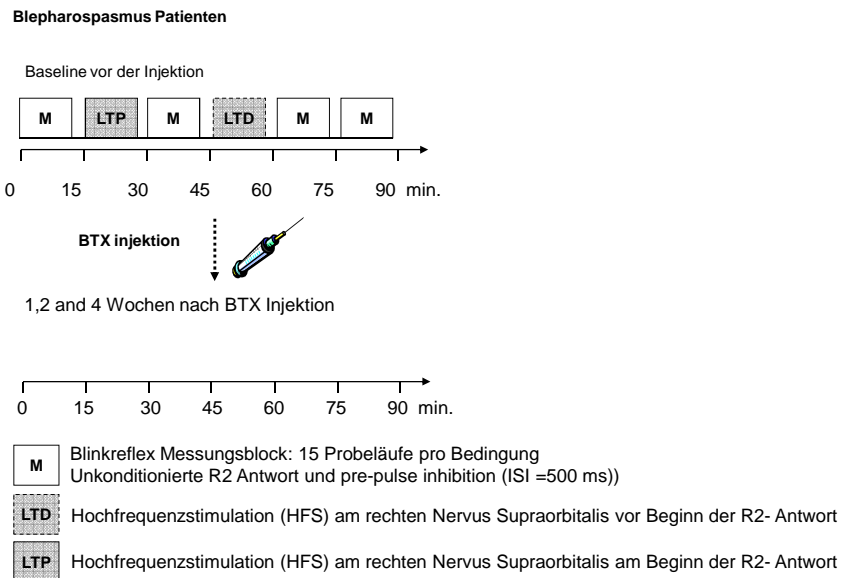


Abbildung 5. Die Untersuchung der Wirkung von BTX Injektionen an der homöostatischen Plastizität. Hochfrequenzstimulation wurde vor, eine, zwei und vier Wochen nach BTX- Injektionen bei Patienten mit Blepharospasmus untersucht.

Die elektrische Stimulation des rechten Nervus Supraorbitalis wurde, mittels eines peripheren Stimulationsblock und die Ableitung mit Silber Chlorid Oberflächen Elektroden, durchgeführt (DS7A Stimulator, Digitimer Ltd., Welwyn Garden City, Hertz, UK, Maximum Voltage 200). Die Kathode wurde über dem rechten Foramen Supraorbitalis platziert und die Anode zwei cm oberhalb des Foramen Supraorbitalis (Abbildung 6 und 7).

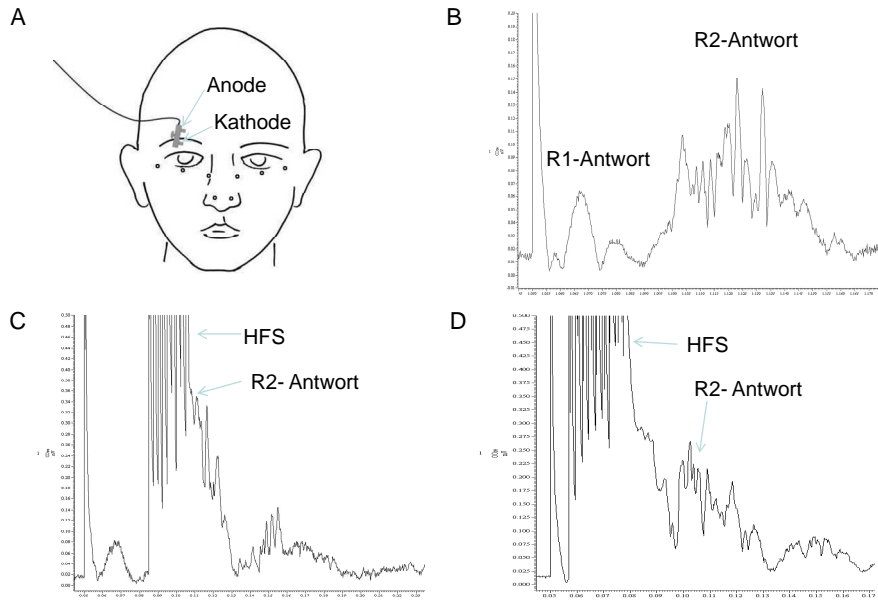


Abbildung 6. Platzierung der Elektroden und Beispiele für die R2- Antwort. A) Platzierung der Elektroden um den Musculus orbicularis oculi und den Musculus Nasalis. Der rechte Nervus Supraorbitalis wurde stimuliert. B) Beispiel für eine ipsilaterale R1- und R2- Antwort nach Einzelpulsstimulation. C) Beispiel für ein LTP induzierendes Protokoll. Die Hochfrequenzstimulation wird am Anfang der R2- Antwort appliziert um LTP- ähnliche Effekte zu induzieren. D) Beispiel für ein LTD induzierendes Protokoll. Die Hochfrequenzstimulation wird vor Beginn der R2- Antwort appliziert um LTD- ähnliche Effekte zu induzieren.



Abbildung 7. Platzierung der Elektroden zur elektrischen Stimulation des rechten Nervus Supraorbitalis bei einer Probandin.

Die elektrische Stimulation hatte eine Rechteckwellen Konfiguration mit einer Pulsweite von 200 μ s. In jedem Experiment, wurde die Intensität ermittelt, die notwendig ist um eine R2 Antwort zu erhalten (motorischer Schwellenwert). Der motorische Schwellenwert wurde am Anfang und vor der letzten Messung bestimmt. Der sensorische Schwellenwert wurde ebenfalls ermittelt, welcher als minimale Intensität um den Stimulusreiz zu spüren, festgesetzt wurde. Die Stimulation erfolgte schließlich mit der doppelten Intensität, die zuvor als motorischer Schwellenwert ermittelt worden war (2T R2). Somit wurde sichergestellt, dass eine konstante R2-Komponente ausgelöst wurde. In allen Experimenten wurden die von Mao und Evinger beschriebenen Interventions Protokolle verwendet (Mao und Evinger 2001). Die Konditionierungs HFS- Protokolle, wurden in drei Blöcken im Abstand von fünf Minuten angewendet. Jeder dieser Blöcke, bestand aus vier HFS- Reizserien, die im Abstand von Zehn Sekunden, am rechten Nervus Supraorbitalis, durchgeführt wurden (Abbildung 4 und 5). Jede HFS- Reizserie bestand aus neun Stimuli mit einer Frequenz von 400 Hertz und einer Intensität von 2T R2. Die HFS wurde am Anfang der elektrisch evozierten R2-Antwort

gegeben, um LTP- ähnliche Effekte auszulösen (Abbildung 6c), dagegen wurde HFS fünf Millisekunden vor dem Anfang der R2-Antwort gegeben, um LTD- ähnliche Effekte auszulösen (Abbildung 6d) (Mao und Evinger 2001). Für jeden Teilnehmer ermittelten wir den Mittelwert der R2- Antworten, dabei wurde der exakte Anfang der R2- Antwort individuell festgelegt, um die Zeitabfolge der HFS genau zu optimieren. Für die HFS_{LTD}, wurde die Zeitabfolge so festgelegt, dass HFS genau fünf Millisekunden vor der erwarteten R2- Antwort, endete. In unseren assoziativen Stimulationsprotokollen, wurden die kurzen HFS- Reizserien (20 ms) mit einer elektrischen Einzelpulsstimulation am Nervus Supraorbitalis kombiniert, wobei die HFS den Einzelpulsstimulationen folgten. Die genaue Zeitabfolge zwischen den Einzelpulsen und der HFS entschied darüber, ob die HFS direkt vor oder zu Beginn der R2 Antwort einsetzte und bestimmte damit die Richtung der synaptischen Plastizität, entsprechend der Regeln der STDP (spike Timing dependent Plasticity). Insgesamt dauerten alle assoziativen HFS- Protokolle (Summe aller Einzelpulsstimulationen und HFS- Reizserien) 15 Minuten, wobei eine einzelne HFS – Reizserien 20 ms dauerte.

2.3. Messung der R2-Antwort

Die Erregbarkeit des Blinkreflexes wurde immer vor und nach der HFS in Messblöcken M, aufgezeichnet (Abbildung 4 und 5). Die EMG Aktivität des Musculus Orbicularis Oculi, wurde entsprechend dargestellt. Für die Messung der R2-Antwort, wurde die Stimulationsintensität des Nervus Supraorbitalis, ähnlich der HFS Applikation, als doppelter motorischer Grenzwert ($2T_{R2}$) festgelegt. Analog zu der Studie von Berardelli et al., 1985, wurde zusätzlich zur unkonditionierten R2-Antwort nach einer Einzelpulsstimulation, die Doppelpulsstimulation untersucht. Dabei wurden zwei aufeinander folgende Stimulationen (Konditionierende und Test- Stimulation) am Nervus Supraorbitalis, mit derselben Intensität, in einem Abstand von einer halben Millisekunde, appliziert (Berardelli et al. 1985). Dies ermöglicht uns, die Erregbarkeit der inhibitorischen Interneurone, die verantwortlich für die R2-Antwort sind, zu untersuchen. In einem Messblock M, folgten Einzel- und Doppelpulsstimulationen, aufeinander, in einem Abstand von 10 ± 2 Sekunden, in einer pseudorandomisierten Anordnung. Demnach wurde im Gegensatz zur Studie von Quartarone et al. 2006, jeder Stimulus nach einem vordefinierten Zeitabstand automatisch und nicht manuell, appliziert. In jedem Messblock M, wurden 15 R2-Antworten nach Einzelpulsstimulation und 15 R2-Antworten nach Doppelpulsstimulation, gemessen. Zwischen jedem Messblock M wurde fünf Minuten pausiert. Die EMG Aktivität, wurde von den bilateralen Musculi Supraorbitales und von den Musculi Nasalis als Referenz,

aufgezeichnet. Der EMG Signal wurde um 1000 amplifiziert/ verstärkt. Der Bandpass Filter betrug zwischen 20-2000 Hertz (D 360 Verstärker, Digitimer Ltd., Welwyn Garden City, Hertz, UK) und wurde mit einer Abtastfrequenz von fünf Kilohertz auf einem Personal Computer für Off-Line Analysen (Signal Software, Cambridge Electronic Design, Cambridge, UK) gespeichert.

Die Fläche der R2-Antwort, die durch die EMG Aktivität des Musculus Supraorbitalis abgeleitet wurde, wurde mithilfe der Signal Software, gemessen. Dabei wurde der Anfang der R2- Antwort, als die zweifache Zunahme der EMG Aktivität in Bezug zur Baseline, festgelegt.

Um den inhibitorischen Effekt in jedem Protokoll zu ermitteln, wurde die R2-Antwort nach Doppelpulsstimulation, durch die R2-Antwort nach Einzelpulsstimulation dividiert und mit 100 multipliziert und das Ergebnis von 100 subtrahiert ($(R2\text{-Antwort nach Doppelpulsstimulation} / R2\text{ nach Einzelpulsstimulation} * 100) - 100$).

2.4. Experimentelle Verfahrensweise

Erster Teil:

- **HFS_{LTP}**: Bei den Patienten und Probanden wurde HFS_{LTP} am Anfang der R2-Antwort appliziert, um einen LTP- artigen Effekt auszulösen. Dabei erwarteten wir, eine Potenzierung der R2-Antwort.
- **HFS_{LTD}**: Bei den Probanden wurde drei Tage später, HFS_{LTD} vor der elektrisch ausgelösten R2- Antwort appliziert, und endetet 5 ms vor der erwarteten R2- Antwort, um eine LTD- ähnliche Plastizität zu induzieren. Nach der Festlegung des individuellen Beginns der R2- Antwort bei jedem Teilnehmer, wurde die Zeitabfolge so berechnet, dass die HFS exakt 5 ms vor Anfang der R2- Antwort endete. Wir erwarteten hierbei, eine Inhibition der R2- Antwort.
- **HFS_{ohne Intervention}**: Bei den Probanden wurde weitere drei Tage später, als Kontrollbedingung anstatt der HFS (HFS_{ohne Intervention}) zwischen den Messblöcken eine Pause eingelegt, die genauso lange dauerte wie eine HFS (Abbildung 4).

Zweiter Teil: Bei den Patienten und Probanden wurde ebenfalls in einem Abstand von drei Tagen

- **HFS_{LTP-LTP}**: HFS_{LTP} gefolgt von einem zweiten HFS_{LTP} und
- **HFS_{LTP-LTD}**: HFS_{LTP} gefolgt von einem HFS_{LTD}, appliziert.

Bei den Patienten erwarteten wir, dass die inhibitorische HFS_{LTD} eine geringere Inhibition der R2-Antwort auslöst, nach Präkonditionierung mit HFS_{LTP} (was auf eine verminderte Depotenzierung hinweisen würde). Ebenfalls vermuteten wir eine verstärkte Potenzierung nach Präkonditionierung mit HFS_{LTP} (Abbildung 4).

Alle experimentellen Teile wurden, nach einer randomisierten Anordnung im Abstand von mindestens drei Tagen durchgeführt, um Übertragungseffekte, auszuschließen.

Dritter Teil: Hier untersuchten wir die Wirkung und Einfluss der Botulinumtoxin (BTX) Therapie, an den Patienten in einem ($HFS_{LTP-LTD}$) Protokoll.

Analog zur Studie von Quartarone et al. 2006, erwarteten wir hierbei, dass die BTX Injektionen, den Verstärkungseffekt der HFS_{LTP} , normalisieren würde, während der inhibitorische Effekt der nachfolgenden HFS_{LTD} , verstärkt wird bzw. zunimmt. Zu diesem Zweck, wurden die Patienten mit Blepharospasmus oder Meige Syndrom vor den BTX Injektionen und eine Woche, zwei Wochen und vier Wochen nach der BTX Behandlung untersucht. Bei jeder Sitzung wurde zuerst HFS_{LTP} und nachfolgend HFS_{LTD} ($HFS_{LTP-LTD}$) appliziert (Abbildung 5).

2.5. Statistische Analysen

Veränderungen der R2- Antwort nach Einzel- oder Doppelpulsstimulation wurden als abhängige Variable in getrennten Analysen untersucht. Zunächst wurde ein dreifaktorieller ANOVA (Analysis of variance) für Messwiederholungen, für die Einzelpuls Bedingung angewendet mit folgenden Faktoren:

- zwei Innersubjektfaktoren: *Messzeit* (Vier Zeitpunkte; Beginn der Untersuchung, 30, 60, 75 Minuten) und *Protokolle* (HFS_{LTP} , $HFS_{LTP-LTD}$, $HFS_{LTP-LTP}$)
- und ein Intersubjektfaktor: *Gruppe* (Zwei Ebenen, Patienten vs. Probanden).

Da ausschließlich bei den Probanden zwei zusätzliche Protokolle untersucht wurden, nämlich HFS_{LTD} und $HFS_{\text{ohne Intervention}}$, erfolgte hier eine getrennte Analyse in einer zweifaktoriellen ANOVA mit den Faktoren *Zeit* (Vier Ebenen; Beginn der Untersuchung, 30, 60, 75 Minuten) und *Protokoll* (fünf Ebenen bei den Probanden; HFS_{LTP} , $HFS_{LTP-LTD}$, $HFS_{LTP-LTP}$, HFS_{LTD} , $HFS_{\text{ohne Intervention}}$).

Die klinische Ausprägung des BSP vor Beginn der Untersuchungen, zu den bei den Patienten angewendeten Protokollen, wurden mit einer separaten einfaktoriellen ANOVA für jedes Protokoll (HFS_{LTP} , $HFS_{LTP-LTD}$ und $HFS_{LTP-LTP}$) getrennt berechnet. Die hier untersuchten

klinischen Skalen, beinhalteten die Blepharospasmus Beurteilungsskala (BRS), Blepharospasmus Behinderungsskala (BDS) und die gesamt Anzahl des Blinzeln.

Ein möglicher Einfluss der BTX Therapie auf die Einzelpulsstimulation, wurde mit einer zweifaktoriellen ANOVA untersucht, die als Innersubjektfaktoren erneut die Zeitpunkte (zu Beginn, nach 30, 60 und 75 min) und die Woche der Messungen (zu Beginn vor der Behandlung, 1, 2 und 4 Wochen nach der BTX Behandlung) einschloss. Die Änderungen der klinischen Skalen als Folge der BTX Behandlung, wurden erneut getrennt in einer einfaktoriellen ANOVA mit den Faktoren *Zeit* (vor Injektion, 1, 2, 4 Wochen nach der Injektion) als Intersubjektfaktor getrennt für jede einzelne Skala (BRS, BDS, Blinzelfrequenz) berechnet. Im Falle einer signifikanten Sphärizität im Mauchy Test, wurde mit der Greenhouse- Geisser Methode korrigiert. Bei Vorliegen eines signifikanten *F* Wertes, wurden post-hoc T-Tests für gepaarte, abhängige Stichproben oder aber der T-Test für unabhängige Stichproben, zur Analyse von Zwischensubjektfaktoren angewendet, um die Stärke der Haupteffekte und um die Interaktionen zwischen den Experimenten, zu untersuchen. Das Signifikanzniveau wurde mit $p \leq 0,05$ festgelegt. Die Ergebnisse werden als Mittelwert \pm Standardabweichung dargestellt (Zeuner et al. 2010).

3. Ergebnisse

3.1. Klinische Ergebnisse bei Patienten

Die Blepharospasmus Beurteilungsskala (BRS), die Blepharospasmus Behinderungsskala (BDS) und die Anzahl des Blinzeln bei den Patienten wurden vor jedem Interventionsprotokoll gemessen. Dabei zeigten sich keine signifikanten Unterschiede (BRS $p > 0,3$; BDS $p > 0,1$; Anzahl des Blinzeln $p > 0,3$). Die Ergebnisse sahen folgendermaßen aus:

- Im HFS_{LTP} Protokoll betrug:
 - der BRS Mittelwert $11,55 \pm 4,85$ Punkte
 - der BDS Mittelwert $76,78 \pm 13,00$ %
 - die Anzahl der Lidschläge betrug in dem zweiminütigem Video:
 - vor der Intervention $31,45 \pm 13,99$ Lidschläge
 - nach der Intervention: $30,56 \pm 18,04$ Lidschläge ($p > 0,6$)
- Im HFS_{LTP-LTD} Protokoll betrug
 - der BRS Mittelwert $11,54 \pm 4,81$ Punkte
 - der BDS Mittelwert $72,43 \pm 23,00$ %
 - die Anzahl der Lidschläge:
 - Vor der Intervention $36,79 \pm 20,49$ Lidschläge
 - Nach der Intervention $27,75 \pm 15,93$ Lidschläge ($p > 0,7$)
- Im HFS_{LTP-LTP} Protokoll betrug:
 - der BRS Mittelwert $11,75 \pm 4,79$ Punkte
 - der BDS Mittelwert $75,87 \pm 17,86$ %
 - die Anzahl der Lidschläge:
 - vor der Intervention $35,42 \pm 22,42$ Lidschläge
 - nach der Intervention $34,33 \pm 22,33$ Lidschläge ($p > 0,7$)

3.2. Die R2-Antwort des Blinkreflexes nach Einzelpulsstimulation

Die Stimulationsintensität, die am rechten Nervus Supraorbitalis appliziert wurde, betrug bei den Patienten im Mittelwert $7,4 \pm 1,9$ mA und bei den Probanden $7,5 \pm 2,2$ mA.

Der dreifaktorielle ANOVA, zeigte keinen Haupteffekt für *Protokoll* ($p > 0,1$) oder *Gruppe* ($p > 0,5$) und keine Interaktion ($p > 0,1$). Allerdings konnte ein Haupteffekt für die *Zeit* ermittelt werden ($F_{1,75; 33,15} = 8,62$; $p = 0,001$) (Abbildung 8 a-c). Die R2- Antwort nahm zwischen der Grundlinie vor dem Beginn und 75 Minuten ($T_{20} = 3,71$; $p < 0,001$), zwischen 30 und 60 Minuten ($T_{20} = 2,70$; $p = 0,014$), zwischen 30 und 75 Minuten ($T_{20} = 3,60$; $p = 0,002$) und zwischen 60 und 75 Minuten ($T_{20} = 3,04$; $p = 0,006$) ab.

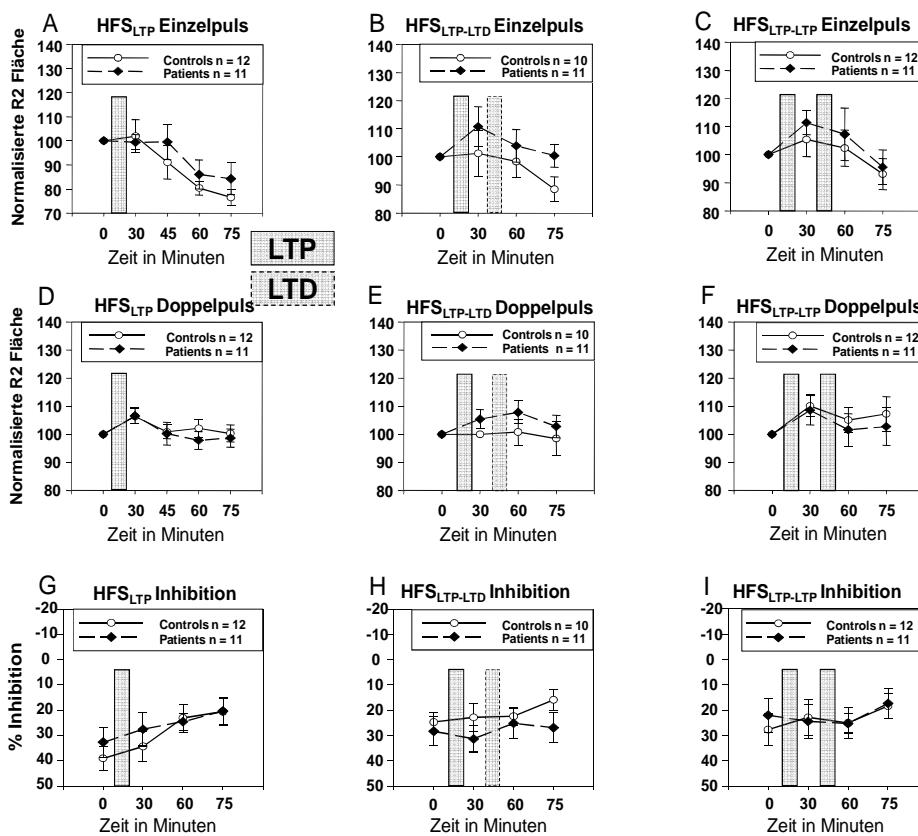


Abbildung 8. Normalisierte Daten für HFS_{LTP} , $HFS_{LTP-LTD}$ und $HFS_{LTP-LTP}$. Abbildungen A-C zeigen die normalisierte Fläche unter der Kurve (area under the curve) der ipsilateralen R2- Antwort nach Einzelpulsstimulation. HFS_{LTP} , $HFS_{LTP-LTD}$ und $HFS_{LTP-LTP}$ wurden bei Patienten und Probanden angewendet. Abbildungen D-F zeigen die Fläche unter der Kurve der ipsilateralen R2- Antwort nach Doppelpulsstimulation. Abbildungen G-I zeigen die % Inhibition, welche als Prozentuale Änderung der R2-Antwort nach Doppelpulsstimulation in Relation zur Einzelpulsstimulation festgelegt wurde. Nach Einzelpulsstimulation zeigte sich in allen Protokollen, bei Probanden und Patienten eine unspezifische Reduktion der R2- Antwort. Nach Doppelpulsstimulation wurden keine Änderungen nachgewiesen, weil die Reduktion der R2- Antwort mit einer Reduktion der % Inhibition assoziiert war (höhere Werte deuten auf stärkere Inhibition hin). Die Fläche unter Kurve der R2 Antwort wird in $\mu V/ sek$ angegeben. Mittelwert und Standardabweichung sind dargestellt. Offene Kreise stehen für Probanden und dunkle Rauten für Patienten.

In der zweifaktoriellen ANOVA der Kontrollen, wurde ebenfalls eine nicht-spezifische Reduktion der R2- Antwort über die Zeit ermittelt ($F_{1,56; 12,44} = 9,9; p = 0.004$, Abbildung 8a-c, 9a). Der Zeiteffekt trat zwischen dem Beginn und 60 Minuten ($T_8 = 3, 32; p = 0,010$), zwischen der Grundlinie und 75 Minuten ($T_8 = 3, 92; p = 0,004$), zwischen 30 und 60 Minuten ($T_8 = 3,18; p = 0,013$), zwischen 30 und 75 Minuten ($T_8 = 3,14; p = 0,014$) und zwischen 60 und 75 Minuten ($T_8 = 2,45; p = 0,040$).

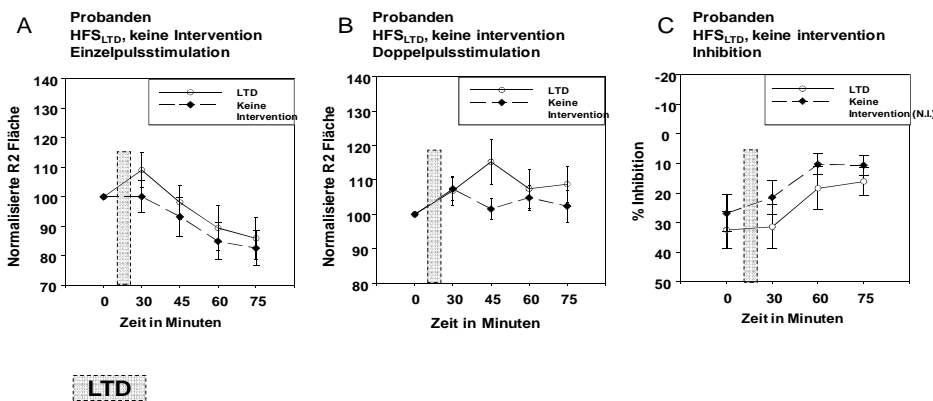


Abbildung 9. Normalisierte Daten für HFS_{LTD} und $HFS_{\text{ohne Intervention}}$ bei Probanden. Abbildung A zeigt die Ergebnisse nach Einzelpulsstimulation, Abbildung B nach Doppelpulsstimulation und Abbildung C die % Inhibition. Die Fläche unter Kurve der R2 Antwort wird in $\mu V/ \text{sek}$ angegeben. Mittelwert und Standardabweichung sind dargestellt. Offene Kreise stehen für HFS_{LTP} und dunkle Rauten für $HFS_{\text{ohne Intervention}}$.

In Abbildung 10 sind die R2- Antworten nach der HFS_{LTP} der einzelnen Versuchsteilnehmer (Probanden und Patienten) in den verschiedenen Protokollen dargestellt. Es zeigte sich, dass die R2 Antwort selbst, bei jeder einzelnen Versuchsperson nach der HFS_{LTP} in jedem Protokoll unterschiedlich war und einer erheblichen Variabilität unterlag. Die Variabilität lag bei den Kontrollpersonen innerhalb desselben Bereiches wie die R2- Antworten nach dem $HFS_{\text{ohne Intervention}}$ Protokoll (Abbildung 11).

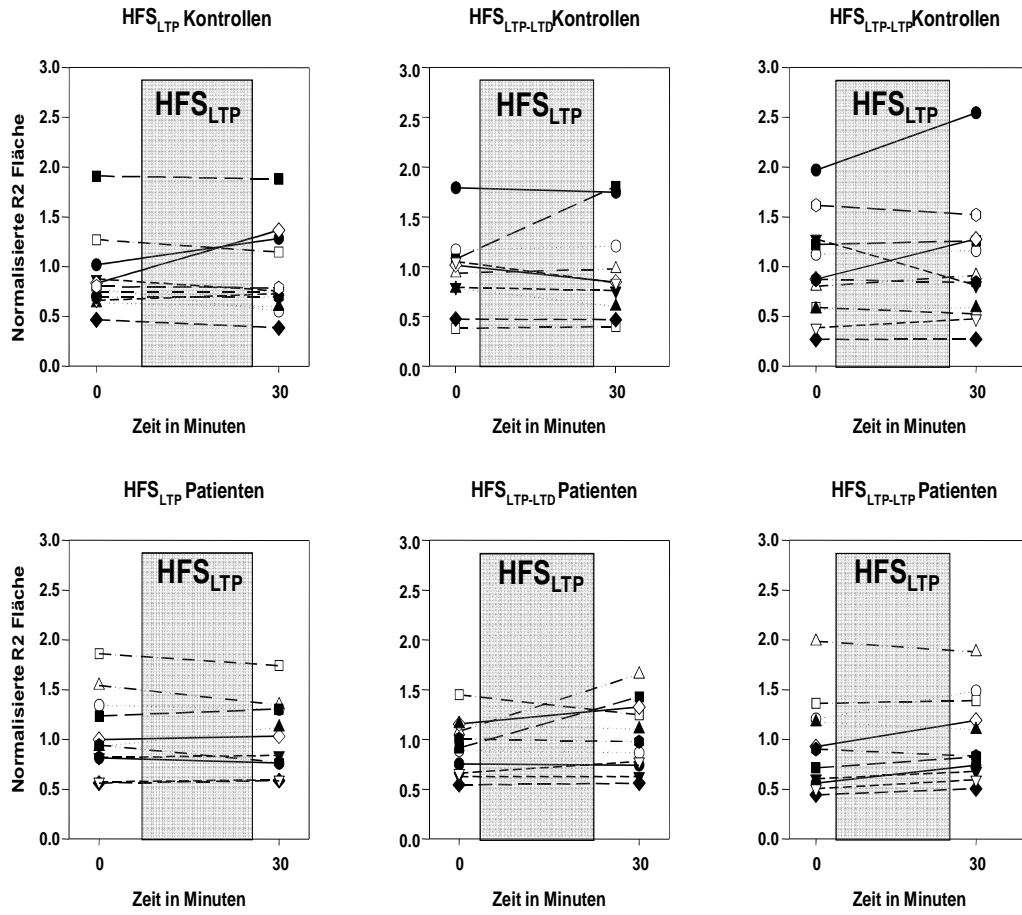


Abbildung 10. R2- Antwort jedes einzelnen Teilnehmers vor und direkt nach HFS_{LTP} . Gezeigt sind die R2- Antworten jedes einzelnen Teilnehmers (Patienten und Kontrollen) vor und direkt nach HFS_{LTP} , für jedes Protokoll (HFS_{LTP} , $HFS_{LTP-LTD}$ und $HFS_{LTP-LTP}$), das mit HFS_{LTP} anfing. Bei einigen Probanden zeigte sich eine deutliche Potenzierung der R2-Antwort, dies war jedoch nicht in allen Protokollen nachweisbar.

Um die Sensitivität zu verbessern, damit letztlich fazilitatorische Effekte als Folge des HFS_{LTP} Protokolls detektiert werden konnten, reduzierten wir die Variabilität, in dem wir die Änderung in Prozent, zwischen der R2 Antwort vor der Intervention und der gemittelten R2-Antwort der HFS_{LTP} , $HFS_{LTP-LTD}$ und $HFS_{LTP-LTP}$ Protokolle direkt nach der ersten HFS_{LTP} (30 Minuten Messung) separat errechneten. Mit dem einseitigen-t-test für eine Stichprobe konnte eine leichte Fazilitierung der R2-Antwort um 7% bei den Patienten ($T_{10} = 2,46$; $p = 0,017$), nicht jedoch bei den Probanden ($p > 0,04$) nachgewiesen werden. Der unabhängige t-test für eine Stichprobe zeigte dabei keine signifikanten Unterschiede zwischen Patienten und Probanden ($p > 0,6$).

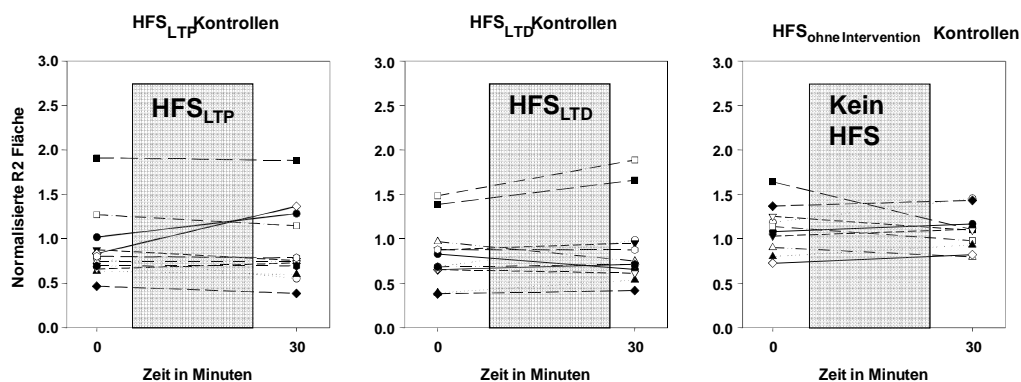


Abbildung 31. R2- Antwort der einzelnen Kontrollpersonen, vor und direkt nach HFS_{LTP} , HFS_{LTD} und $HFS_{\text{ohne Intervention}}$. In Analogie zur Abbildung 10, sind die individuellen Ergebnisse jedes Teilnehmers in der Gruppen der Probanden vor und direkt nach HFS für die Protokolle (HFS_{LTP} , HFS_{LTD} und $HFS_{\text{ohne Intervention}}$) dargestellt.

Ferner wurde der Einfluss des motorischen Schwellenwertes auf die R2-Antwort ermittelt. Wir errechneten die Veränderungen des motorischen Schwellenwertes und die Veränderungen in der R2-Antwort zwischen Baseline und nach 60 Minuten. Dabei stellte sich eine leichte, jedoch signifikante negative Korrelation zwischen beiden ($r = -0,280$; $p = 0,008$) heraus.

Damit war ein hoher Schwellenwert mit einer verminderten R2-Antwort assoziiert. Dagegen konnte ein Zusammenhang zwischen sensorischen Schwellen und Veränderung in der R2-Antwort nicht nachgewiesen werden ($r = -0,063$; $p > 0,5$).

3.3. Inhibition der R2-Antwort nach Doppelpulsstimulation

Die, durch die Doppelpulsstimulation erzeugte R2- Antwort des Test Reizes wurde als prozentuale Änderung der R2-Antwort zur Einzelpulsstimulation ($R2 \text{ Antwort nach gepaarter Stimulation} / R2 \text{ Antwort nach Einzelpulsstimulation} * 100 - 100$) festgelegt. Diese Berechnung ermöglichte es uns, die Erregbarkeit der hemmenden interneuronalen Bahnen, die die R2 Antwort beeinflussen, zu untersuchen. In allen Protokollen fand sich bei Patienten und Kontrollen zu allen Zeitpunkten eine signifikante Hemmung der R2- Antwort (einseitiger t-test für eine Stichprobe; $p < 0,014$; Abbildung 8 d-f; 9b).

Mit der dreifaktoriellen ANOVA konnte kein Haupteffekt für *Protokoll* ($p > 0,1$) und *Gruppe* ($p > 0,3$) ermittelt werden. Dagegen konnte ein signifikanter Zeiteffekt ($F_{1,75; 37,29} = 6,62$; $p = 0,003$) sowie eine *Zeit * Protokoll* Interaktion ($F_{6, 108} = 2,43$; $p = 0,03$) nachgewiesen werden. Es zeigte sich eine allgemeine Abnahme der prozentualen Hemmung zwischen dem Beginn der Stimulation und 60 Minuten ($T_{20} = 2,16$; $p = 0,043$), zwischen dem Beginn und 75 Minuten ($T_{20} = 4,64$; $p < 0,001$), zwischen 30 und 75 Minuten ($T_{20} = 2,76$; $p = 0,012$) und zwischen 60 und 75 Minuten ($T_{20} = 2,59$; $p = 0,017$).

Wegen der signifikanten Interaktion zwischen der Zeit und dem Protokoll, wurde der post hoc t-test separat für alle Protokolle über die Zeit ermittelt. Die Abnahme der prozentualen Hemmung konnte zu folgenden Zeitpunkten nachgewiesen werden:

- Für das HFS_{LTP} Protokoll: zwischen dem Beginn und 30 Minuten ($T_{20} = 2,30$; $p = 0,007$), zwischen dem Beginn und 60 Minuten ($T_{20} = 2,26$; $p = 0,035$) und zwischen dem Beginn und 75 Minuten ($T_{20} = 3,94$; $p = 0,001$)
- Für das HFS_{LTP-LTP} Protokoll: zwischen dem Beginn und 75 Minuten ($T_{20} = 2,17$; $p = 0,042$)
- Für das HFS_{LTP-LTD} Protokoll zeigte sich keine Veränderung der prozentualen Hemmung (Abbildung 8 g- i)

Dieselben Ergebnisse zeigten sich, in einer separaten zweifaktoriellen ANOVA für Kontrollen, in der ein *Zeit* Effekt ($F_{3; 21} = 16,29$; $p < 0,000$) und ein *Zeit * Protokoll* Interaktionseffekt ($F_{12; 84} = 1,92$; $p = 0,043$), errechnet wurde. Eine Kontrollperson (N=8) wurde von dieser Analyse ausgeschlossen, da die 60 Minuten Messung in dem HFS_{LTP-LTD} Protokoll, nicht abgeschlossen wurde.

Die Inhibition reduzierte sich im Mittel zwischen dem Beginn und 60 Minuten ($T_7 = 9,50$; $p < 0,001$), zwischen der Basislinie und 75 Minuten ($T_7 = 5,91$; $p = 0,001$), zwischen 30 und 60 Minuten ($T_7 = 2,98$; $p = 0,021$), und zwischen 30 und 75 Minuten ($T_7 = - 2,76$; $p = 0,028$).

Es erfolgte eine weitere post-hoc Analyse mit dem paarigen t-test für jedes Protokoll, um die Effekte der Interaktion in der Kontrollgruppe weiter zu analysieren. Dabei ergaben sich zwischen folgenden Zeitpunkten Hinweise für eine signifikante Reduktion in der prozentualen Hemmung:

- Für das HFS_{LTP} Protokoll: zwischen dem Beginn und 30 Minuten ($T_7 = 3,22$; $p = 0,015$), zwischen dem Beginn und 60 Minuten ($T_7 = 5,37$; $p = 0,001$), zwischen dem Beginn und 75 Minuten ($T_7 = 9,14$; $p < 0,001$) und zwischen 30 und 75 Minuten ($T_7 = 4,41$; $p = 0,003$) (Abbildung 8g)
- Für das HFS_{LTD} Protokoll: zwischen dem Beginn und 60 Minuten ($T_7 = 2,37$; $p = 0,049$), zwischen dem Beginn und 75 Minuten ($T_7 = 3,66$; $p = 0,008$), zwischen 30 und 60 Minuten ($T_7 = 3,15$; $p = 0,016$) und zwischen 30 und 75 Minuten ($T_7 = 3,23$; $p = 0,015$; Abbildung 9c)
- Für das HFS_{ohne Intervention} Protokoll: Zwischen dem Beginn und 75 Minuten ($T_7 = 2,66$; $p = 0,032$; Abbildung 9c)
- HFS_{LTP-LTD} und HFS_{LTP-LTP}: zeigten sich keine Veränderungen der prozentualen Hemmung (Abbildung 8h, i)

Da die Reduktion der R2- Antwort, mit einer Reduktion der prozentualen Hemmung assoziiert war, variierte die R2- Antwort der Doppelpulsstimulation nach dem Testreiz im Zeitverlauf nur geringfügig (Abbildung 8d-f, 9b). Ferner ergaben sich keine Korrelationen zwischen den motorischen oder sensorischen Schwellenwerten und der Veränderung der prozentualen Inhibition (Zeuner et al. 2010).

3.4. Messungen mit LTP-LTD an Patienten vor und nach BTX Therapie

3.4.1. Klinische Ergebnisse bei Patienten vor und nach BTX Therapie

Die BTX Therapie zeigte keinen signifikanten Effekt in der Blepharospasmus Beurteilungsskala (BRS) und der Blepharospasmus Behinderungsskala (BDS). Die BRS veränderte sich im Zeitablauf, wie folgt:

- Vor der Injektion: $13 \pm 5,2$ Punkte
- 1. Woche nach der Injektion: $13 \pm 4,0$ Punkte
- 2. Woche nach der Injektion: $12,1 \pm 4,2$ Punkte
- 4. Woche nach der Injektion: $10,7 \pm 4,6$ Punkte

Bei der BDS, kam es zu folgenden Ergebnissen:

- Vor der Injektion: $67 \pm 27,2$ %
- 1. Woche nach der Injektion: $64,6 \pm 25,2$ %

- 2. Woche nach der Injektion: $63,8 \pm 26,3$ %
- 4. Woche nach der Injektion: $71,9 \pm 15,7$ %

Die Frequenz des Lidschlages zeigte eine leichte Verringerung ($F_{3; 21} = 2.52$; $p = 0.085$):

- Vor der Injektion: $38,6 \pm 18,6$ Lidschläge
- 1. Woche nach der Injektion $37,7 \pm 19,1$ Lidschläge
- 2. Woche nach der Injektion $26,5 \pm 16,5$ Lidschläge
- 4. Wochen nach der Injektion $32,8 \pm 12,5$ Lidschläge

3.4.2. LTP-LTD Messungen vor und nach BTX Therapie

Die Doppelpulsinhibition blieb auch nach BTX- Therapie erhalten (einseitiger t-test für eine Stichprobe und wurde zu folgenden Zeitpunkten nachgewiesen: zu Beginn: $T_9 = 2,79$; $p = 0.021$; nach der 1. Woche: $T_9 = 3,67$; $p = 0.005$; nach der 2. Woche: $T_9 = 1,92$; $p = 0,087$; und nach der 4. Woche: $T_9 = 2,93$; $p = 0,017$). Die BTX Therapie verursachte jedoch keinerlei Veränderungen an der R2- Antwort oder an der prozentualen Hemmung, und hatte keinen Einfluss auf den Zeitverlauf im HFS_{LTP-LTD} Protokoll (Abbildung 12).

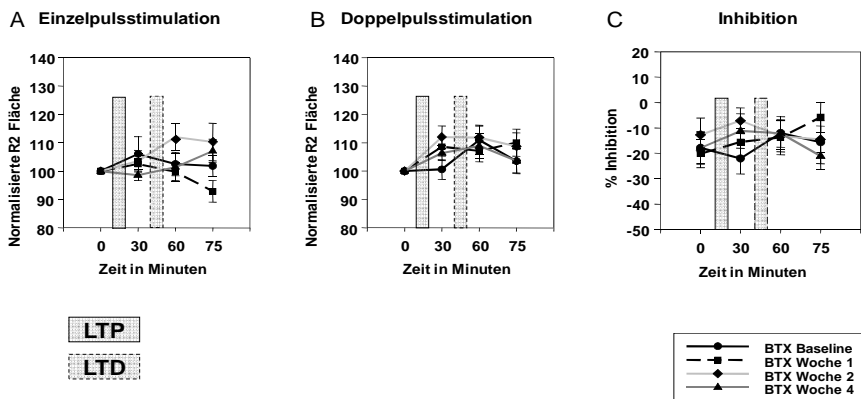


Abbildung 14. HFS_{LTP-LTD} vor und nach BTX Therapie bei Patienten mit Blepharospasmus. Ergebnisse der normalisierten Daten für HFS_{LTP-LTD} vor und nach BTX Therapie bei Patienten mit Blepharospasmus. Abbildung A: Einzelpulsstimulation; Abbildung B: Doppelpulsstimulation und Abbildung C: % Inhibition. BTX hatte keinen Effekt auf die HFS_{LTP-LTD}. Schwarze Linie mit Kreis = Baseline; gestrichelte Linie mit Quadrat = eine Woche nach BTX Injektion; helle graue Linie mit Raute = zwei Wochen nach BTX Injektion; dunkle graue Linie mit Dreieck = vier Wochen nach BTX Injektion. Die R2- Fläche unter Kurve wird in $\mu\text{V}/\text{sek}$ angegeben. Die %- Inhibition ist in Relation zur Einzelpulsstimulation festgelegt.

4. Diskussion

Ziel dieser Studie war es, mit der assoziativen Hochfrequenzstimulation (HFS) des Nervus Supraorbitalis, LTP- und LTD- ähnliche Plastizität zu induzieren, um deren homöostatische Interaktionen bei Patienten mit Blepharospasmus oder einer kranialen Dystonie, im Vergleich zu gesunden Kontrollen zu untersuchen. Dabei wurde die HFS vor (HFS_{LTD}) oder während (HFS_{LTP}) der elektrisch evozierten R2-Antwort des Blinkreflexes durchgeführt.

Entgegen unserer Hypothese ergaben sich nach der HFS keine Unterschiede zwischen Patienten und gesunden Kontrollen in der R2 Antwort. In beiden Gruppen, erzeugten die drei HFS- Protokolle (HFS_{LTP} , $HFS_{LTP-LTD}$ und $HFS_{LTP-LTP}$), im Vergleich zur prä-interventionellen Basislinie eine unspezifische Reduktion der R2-Antwort nach 60 und nach 75 Minuten.

Diese Veränderungen sind nicht durch die verschiedenen assoziativen HFS Protokolle zu erklären, da die Kontrollen eine ähnliche Reduktion der R2-Antwort auch in der Kontrollbedingung ohne assoziative HFS ($HFS_{\text{ohne Intervention}}$) zeigten. Insgesamt variierte die R2-Antwort, die durch das erste HFS_{LTP} Protokoll induziert wurde deutlich bei den einzelnen Probanden und den Protokollen, sodass wir hier von einem unspezifischen Effekt ausgehen. Unsere Ergebnisse stehen somit im Gegensatz zu den früheren Studien (Mao und Evinger 2001, Quartarone et al. 2006). Bei diesen zwei Studien, kam es stets zur LTP- ähnlichen Effekten, wenn die assoziative HFS am Anfang der R2-Antwort appliziert wurde. Ferner zeigten die Patienten mit Blepharospasmus in den früheren Studien, exzessive LTP- ähnliche Potenzierung der R2-Antwort nach HFS_{LTP} (Quartarone et al. 2006), welche in unserer Studie ebenfalls nicht ersichtlich war.

In Übereinstimmung mit den Gruppenanalysen, zeigte sich eine deutliche Intrasubjekt Variabilität in allen Protokollen (Abbildung 10 und 11). Allerdings konnten wir in unserer Studie, durch ein Zusammenlegen der Basis-Daten und der Ergebnisse der Post- HFS_{LTP} Messungen der drei Sitzungen in denen wir HFS_{LTP} (HFS_{LTP} , $HFS_{LTP-LTD}$, $HFS_{LTP-LTP}$) applizierten, eine leichte Zunahme (7 %) der R2-Antwort bei den Patienten 30 Minuten nach HFS_{LTP} , ermitteln. Dies gelang nur bei den Patienten, nicht bei den Kontrollen, was möglicherweise auf eine größere Variabilität bei den Patienten zurück zu führen ist.

Die abweichenden Ergebnisse sind nicht auf Unterschiede in den assoziativen HFS Protokollen im Vergleich zu Mao und Evinger oder Quartarone zurück zu führen, da Durchführung der Protokolle exakt denen von Mao und Evinger 2001 und von Quartarone et al. 2006 entsprachen. Die zeitliche Koordinierung zwischen der elektrisch evozierten R2-Antwort und der HFS in den HFS_{LTP} und HFS_{LTD} Protokollen war, identisch.

Jedoch gab es einige kleinere Unterschiede in der Konzeption und der Durchführung, die im Folgenden dargestellt werden (Tabelle 4):

Techniken	Mao and Evinger	Quartarone et al.	Unsere Studie
Anzahl der Teilnehmer	5 Teilnehmer pro Protokoll	16 Patienten 11 Kontrollen	16 Patienten 12 Kontrollen
Alter Jahre \pm SA	Nicht angegeben	Kontrollen 59 ± 9 Patienten 64 ± 12	Kontrollen 50 ± 14 Patienten 64 ± 10
Protokolle	HFS _{LTP} , HFS _{LTD} , Kontrollbedingung	HFS _{LTP}	HFS _{LTP} , HFS _{LTP-LTD} , HFS _{LTP-LTP} , HFS _{LTD} , HFS keine Intervention
Pulsweite	170 μ sec	200 μ sec	200 μ sec
Schwellenwert	Minimale Intensität für eine reproduzierbare R2-Antwort	Minimale Intensität für $R2 \geq 50 \mu V$	Minimale Intensität für eine reproduzierbare R2-Antwort
Relative Reizintensität	2-facher Schwellenwert um eine zuverlässige R2 zu erzeugen ($2TR_2$)	2-facher Schwellenwert um eine zuverlässige R2 zu erzeugen ($2TR_2$)	2-facher Schwellenwert um eine zuverlässige R2 zu erzeugen ($2TR_2$)
Absolute Reizintensität	Nicht angegeben	$11,5 \pm 5,3$ mA	$7,5 \pm 2,3$ mA
Interstimulus Intervalle	Stimuluspaare mit 7,5 sek Interstimulus Intervall, abwechselnd zw. rechter u. linker Seite, jede 25 ± 5 sek	Manuell ausgelöst	Automatisch abwechselnd zwischen 10 ± 2 sek
Stimulationsseite	Rechts und links	Rechts	Rechts

Abhängige Variable für statistische Analysen	Normalisierte R2 Amplitude der behandelten minus der nicht-behandelten Seite	Integrierte Fläche der rektifizierten R2- Antwort	Integrierte Fläche der rektifizierten R2- Antwort
Dauer der Experimente	60 Minuten	60 Minuten	75 Minuten
Einzel- od. Doppelpulse	Einzelpulse, Anzahl nicht angegeben	20 Einzelpulse	15 Einzel- und 15 Doppelpulse

Tabelle 4: Unterschiede in den Methoden zwischen den drei Studien

4.1. Einfluss der Stimulusintensität

Quartarone et al. 2006 verwendete eine Reizstärke von 11.5 ± 5.3 mA. Um eine Schmerzprovokation (Ellrich und Treede 1998) bei den Teilnehmern zu vermeiden, verwendeten wir für die Stimulation eine etwas niedrigere Stromstärke als Quartarone et al. 2006 von 7.5 ± 2.3 mA.

Eine zu hohe Stromstärke könnte die Induktion LTP- und LTD- ähnlicher Plastizität negativ beeinflussen (Svendsen et al. 1997). Andererseits, muss die Schwellenwertintensität möglicherweise einen bestimmt Wert überschreiten, um eine LTP- od. LTD- ähnliche Plastizität zu erzeugen. In einer Blinkreflexstudie (Sommer und Ferbert 2001) mit Doppelpulsstimulation wurden verschiedene Stimulus Intensitäten (5, 12, 19 und 26 mA) verwendet. Die physiologische Inhibition der zweiten R2- Antwort, war bei den höheren Stimulus Intensitäten reduziert. Zusätzlich führte eine Erhöhung der Stimulus Intensität zu einer Zunahme aller R1- und die R2- Amplituden. Dagegen verkürzte sich die Latenz der R1- und R2- Antworten mit höherer Reizstärke. Folglich beeinflusst die Reizstärke die Amplitude, Latenz und R2- Inhibition im Blinkreflex.

Eine Erhöhung der Stimulus Intensität aktiviert schrittweise mehr motorische Einheiten des Musculus Orbicularis oculi und beeinflusst dadurch die R2-Amplitude und Doppelpulsinhibition. Die Stimulus Intensität in den verschiedenen Blinkreflexstudien variiert stark. So verwendete Berardelli et al. 1985 für die Induktion des Blinkreflexes Stromstärken von 3- 10 mA, andere Blinkreflexstudien applizierten Stimulationen mit einer Stromstärke von 16- 26 mA (Kimura 1973). Problematisch sind Stimulus Intensitäten unterhalb von 5 mA

und oberhalb von 26 mA, da es dann schwierig wird, Unterschiede zwischen Patienten mit Blepharospasmus/ Meige Syndrom und Probanden zu ermitteln (Sommer und Ferbert 2001). In unserer Studie fanden wir keinerlei Korrelation zwischen der Reizintensität und der R2-Antwort. Demnach betrachten wir den moderaten Unterschied in der Stimulus Intensität, zwischen unserer und der Studie von Quartarone et al. 2006 als irrelevant, wobei hierzu weitere Studien hilfreich wären (Zeuner et al. 2010).

4.2. Habituation des Blinkreflexes

Um Habituationseffekte zu vermeiden, ist es wichtig ein entsprechend ausreichend langes Interstimulus Intervall anzuwenden. Dieses sollte länger als 10- 15 Sekunden sein, damit stabilere Antworten erzielt werden (Esteban 1999). Wir entschieden uns, für ein wechselndes Interstimulus Intervall von 10 ± 2 Sekunden, welches kürzer als das Interstimulus Intervall in der Studie von Mao und Evinger 2001 (25 ± 5 Sekunden) war. Andererseits wurde in einer anderen Blinkreflexstudie, um Habituationseffekte zu vermeiden, ein deutlich kürzeres Interstimulus Intervall von 10 Sekunden verwendet (Ellrich und Treede 1998), welches dem in unserer Studie verwendeten Intervall entspricht.

Da wir mehrere Protokolle kombinierten (HFS_{LTP} mit HFS_{LTP} und zwei HFS_{LTP} Protokolle), dauerten unsere Experimente insgesamt länger als die Experimente von Mao und Evinger 2001, und von Quartarone et al. 2006.

Die daraus resultierende, allmähliche Reduktion der R2-Antwort, die wir bei all unseren Experimenten beobachteten, könnte Folge eines Habituationseffektes der R2-Antwort sein, welches nach 60 und nach 75 Minuten auftrat.

Tatsächlich wurden Habituationseffekte der R2- Antwort des Blinkreflexes beschrieben (Kimura 1973). Sehr langsame, 1- HZ repetitive Stimulation kann zu einer Inhibition einer R2- Antwort führen (Berardelli et al. 1985).

Patienten mit Chorea Huntington zeigen im Vergleich zu Parkinson Patienten eine vermehrte Tendenz zur Habituation der elektrisch evozierten R2- Antwort im Blinkreflex. Möglicherweise entsteht die gestörte Habituation, bei Parkinson Patienten durch abnorm hyperaktive Interneurone (Kimura 1973). Eine Reihe von Studien belegten einen Zusammenhang zwischen der Blinzelrate und zentraler Dopaminaktivität (Karson 1983). Bei Parkinson Patienten kann die Therapie mit Levodopa und Amantadine, zur einer Zunahme der Habituation der elektrisch evozierten R2- Antwort führen.

In unserer Studie vermuten wir, dass die insgesamt mit 75 min längere Experimente zu Habituationseffekten geführt haben könnten, welche in den früheren HFS Studien mit deutlich kürzerer Dauer der Experimente nicht sichtbar wurden.

4.3. Einfluss des Alters auf die assoziative Plastizität

Die Applikation der Hochfrequenzstimulation vor der R2-Antwort, um LTD- ähnliche Plastizität zu induzieren (HFS_{LTD}), wurde bislang nur von Mao und Evinger 2001 bei fünf gesunden Probanden angewandt.

Die Prinzipien der assoziativen Plastizität können durch gepaarte assoziative Stimulation (paired associative stimulation, PAS) untersucht werden. Die PAS kombiniert die elektrische Reizung eines peripheren Nervs (z.B. Nervus Medianus) mit einem transkraniellen magnetischen Einzelreiz des Handareals des kontralateralen primären motorischen Kortex (TMS) mit einem definierten Interstimulusintervall (ISI). Es ist eine nicht invasive Methode um assoziative Plastizität, durch die Paarung von zwei Eingängen, im motorischen Kortex zu induzieren (Stefan et al. 2000).

Verschiedene TMS Studien zeigten ein Nachlassen der aufgabenspezifischen Plastizität im höheren Alter, insbesondere bei Menschen ab 50 Jahren (Floel et al. 2005). Desweiteren wurde eine Abnahme der PAS- (paired associative Stimulation) induzierten Plastizität bei älteren Menschen, beschrieben (Fathi et al. 2010, Tecchio et al. 2008, Florian et al. 2008).

In der Studie von Fathi et al. 2010 wurden drei Altersgruppen, welche in jung (21- 39 Jahre), mittelalt (40- 59 Jahre) und Alt (60-79 Jahre) unterteilt wurden, bezüglich der MEP (motorisch evozierten Potentiale)- Antwort, verglichen. Die MEP- Amplitude im Zielmuskel (M. abductor pollicis brevis) diente hierbei als Maß für den durch PAS induzierten Effekt.

Diese wurde vor und nach gepaarter assoziativer Stimulation (PAS) gemessen. Die PAS kombinierte eine Einzelpulsstimulation am rechten Nervus medianus mit anschließender transkranieller Magnetstimulation (TMS) des linken primär motorischen Kortex mit einem Interstimulus Intervall von 25 Millisekunden. Bei den jungen und mittelalten Teilnehmern kam es zu einer Zunahme der MEP- Amplitude, nicht jedoch bei den älteren Teilnehmern. Zusätzlich wurde eine negative Korrelation zwischen Veränderung der MEP-Amplitude und Alter detektiert. Demnach wurde gezeigt, dass die M1 Region eine altersabhängige Reduktion der kortikalen Plastizität aufweist (Fathi et al. 2010).

Eine mögliche Erklärung dafür könnte die verminderte Erregbarkeit in den kortikalen Neuronen im höheren Alter sein. Verschiedene Studien belegten, dass das zunehmende Alter eine Veränderung der kortikalen Erregbarkeit mit Reduktion der MEP- Amplituden verursachen könnten (Matsunaga et al. 1998, Oliviero et al. 2006). Möglicherweise besteht ein Zusammenhang mit der verminderten Anzahl an aktiven Motoneurone im höheren Alter. Ebenfalls könnte die reduzierte Empfindlichkeit der intrakortikalen Kreisläufe in der M1 Region mit der verminderten Plastizität im Alter assoziiert sein (Fathi et al. 2010). Frühere Studien belegten, dass die PAS- induzierte M1- Plastizität durch erhöhte Erregbarkeit der exzitatorischen Interneurone oder der kortikospinalen Neurone an der Postsynapse hervorgerufen wird (Wolters et al. 2003).

Bei Parkinson Patienten wurde ebenfalls in PAS Studien eine reduzierte motor-kortikale Plastizität der M1 beschrieben, die sich nach Gabe von Dopamin wieder normalisierte (Ueki et al. 2006). Die durch Dopaminmangel entstandene Störung im Basalganglien- Thalamo-kortikalen Kreislauf spielt möglicherweise eine wichtige Rolle bei der Entstehung der reduzierten Plastizität. Zudem belegten Studien, dass es im höheren Alter aufgrund von Degeneration der Dopaminneurone und Rezeptoren zu einer physiologischen allmählichen Abnahme der Dopaminfunktion kommt (Zaman et al. 2008). Demzufolge ist es möglich, dass die physiologische Dopaminabnahme im Alter mit der verminderten Plastizität der M- Region assoziiert ist. Verschiedene PET- Studien zeigten ebenso eine negative Korrelation zwischen dem Alter und der Anzahl der Dopaminrezeptoren (Rinne et al. 1993, Kumakura et al. 2005).

Bislang wurde HFS_{LTD}, nur von Mao und Evinger 2001 bei fünf gesunden Teilnehmern ohne Altersangaben durchgeführt. Somit ist es denkbar, dass es bei unseren 12 Teilnehmern, die ein Durchschnittsalter von 50 ± 14 Jahre hatten, schwieriger ist, LTD- ähnliche Plastizität nach HFS_{LTD} im Blinkreflex zu induzieren. Das höhere Alter der Teilnehmer in unserer Studie, hatte vermutlich einen hemmenden Effekt auf die, durch HFS induzierte Plastizität im Blinkreflex und könnte die Ineffektivität der assoziativen HFS in unserer Studie erklären.

4.4. Doppelpulsinhibition

Im Gegensatz zu den Studien von Mao und Evinger 2001 und Quartarone et al. 2006, welche nur die Wirkung der assoziativen HFS nach Einzelpulsstimulation untersuchten, interessierte uns der Effekt der assoziativen HFS nach Einzelpuls- und Doppelpulsstimulation im Blinkreflex. Dabei wurden Einzel- und Doppelpulsstimulation in einer pseudorandomisierten Anordnung während der Messblöcke vermischt. Dies führte zu einer zusätzlichen Erhöhung

der Anzahl der elektrischen Stimulationen am Nervus Supraorbitalis vor dem ersten HFS-Protokoll.

In einer TMS- Studie von Delvendahl et al. 2010, wurde PAS (paired associative Stimulation), welche Einzelpulsstimulation am linken Nervus Medianus mit TMS des rechten primären Motorkortex M1 kombinierte, mit einem Interstimulus Intervall von 25 Millisekunden (PAS₂₅) oder 10 Millisekunden (PAS₁₀), angewandt. Repetitive TMS (rTMS), welches aus überschwelligem 250 Reizen mit 0,1 Hz bestand, wurde vor der PAS₂₅ (zur Induktion eines LTP ähnlichen Effektes) oder der PAS₁₀ (zur Induktion eines LTD ähnlichen Effektes) durchgeführt.

Niedrigfrequente rTMS vor Durchführung der PAS führte zu einer Aufhebung des LTP ähnlichen Effektes der PAS₂₅ und des LTD ähnlichen Effektes der PAS₁₀ und damit zur einer kompletten Aufhebung der bidirektionalen Veränderung der kortikospinalen Erregbarkeit. So wurde die signifikante Zunahme der MEP-Amplitude nach PAS_{25ms} sowie die signifikante Abnahme der MEP- Amplitude nach PAS_{10ms} komplett eliminiert (Delvendahl et al. 2010).

Infolgedessen kamen Delvendahl et al. zur Schlussfolgerung, dass eine generelle Okklusion der bidirektionalen Plastizität, nach Applikation von 250 Stimulationen repetitiver TMS_{0,1Hz} auftrat.

Diese Konditionierung mit niederfrequenter Stimulation, induzierte keine direkte Plastizität sondern blockierte nachfolgende LTP- und LTD- Induktionen. Dieses Phänomen wird als „Okklusion der bidirektionalen Plastizität“ interpretiert und trägt wahrscheinlich zur Homöostase der neuronalen Netzwerke bei. Dies befürwortet die Idee, dass die vorausgehende neuronale Aktivität die nachfolgende Plastizität im humanen Motorkortex bestimmt und beeinflusst (Delvendahl et al. 2010).

Das 0.1 Hz rTMS Protokoll, induzierte wahrscheinlich eine langanhaltende Verstärkung der Erregbarkeit der inhibitorischen Interneurone des Motorkortex. Daraufhin wurde vermutet, dass 0.1 Hz rTMS die Empfindlichkeit des stimulierten Motorkortex auf darauffolgende konditionierende PAS Effekte, durch Verstärkung der inhibitorischen Interneurone reduziert. Diese Verstärkung der inhibitorischen Interneurone nach niederfrequenter rTMS, beeinflusst vermutlich die assoziative Stimulation und verhindert somit die Induktion zeitabhängiger Plastizität im Motorkortex (Delvendahl et al. 2010, Siebner 2010).

Es ist unwahrscheinlich, jedoch denkbar, dass die Applikation von 15 Einzelpuls- und 15 Doppelpulsstimulationen, mit 0.1 Hz, möglicherweise zu dem sogenannten „Okklusions“ Effekt führte, welches die Effizienz der nachfolgenden assoziativen HFS Protokolle, bei der

Induktion zeitabhängiger Plastizität, beeinträchtigte. Falls das zutrifft, müsste in den zukünftigen Studien die Anzahl der R2-Messungen reduziert werden, um solche Okklusionseffekte bei der Induktion assoziativer Plastizität, so gering wie möglich zu halten (Zeuner et al. 2010).

Im Gegensatz zu den Kombinationsprotokollen $HFS_{LTP-LTD}$ und $HFS_{LTP-LTP}$, in denen keine Fazilitierung oder Inhibition der R2- Antwort nach Doppelpulsstimulation induziert werden konnte, zeigte sich eine signifikante prozentuale Inhibition der R2 Antwort nach Doppelpulsstimulation in den HFS_{LTP} , HFS_{LTD} und auch $HFS_{\text{ohne Intervention}}$ -Protokollen. Dies könnte Resultat eines homöostatischen regulatorischen Prozesses sein, der die Erregbarkeit der inhibitorischen Neurone und somit die Doppelpulsinhibition der R2- Antwort vermittelt (Kimura 1973, Sommer und Ferbert 2001).

In Anbetracht der langen Dauer der R2-Inhibition, könnte ein Einfluss weit entfernter neuronaler Strukturen, möglich sein (Sommer und Ferbert 2001, Esteban 1999, Valls-Sole et al. 1991). In der Tat, kontrollieren mehrere Gehirnregionen, die Erregbarkeit der Motorneurone und Interneurone im Kreislauf der R2-Antwort des Blinkreflexes. Die Basalganglien beeinflussen vermutlich den Blinkreflex durch direkte subkortikale Verschaltungen (Berardelli et al. 1985).

Da es zur einer Abnahme der R2-Antwort nach Einzelpulsstimulation, jedoch zur einer Abnahme der Inhibition 60 und 75 Minuten nach Doppelpulsstimulation gekommen ist, könnte diese Abnahme der Inhibition Ausdruck einer homöostatischen Regulation sein. Diese Form der homöostatischen Regulation wird vermutlich durch deszendierende Bahnen vermittelt, um eine weitere Herunterregulation der R2-Antwort zu verhindern, und somit den Blinkreflex aufrecht zu erhalten. Dies muss jedoch in zukünftigen Studien näher untersucht werden.

4.5. Einfluss der Botulinumtoxin Therapie

Im Gegensatz zur Studie von Quartarone et al. 2006, hatte die Botulinumtoxin Therapie, bei den Blepharospasmus Patienten, keinen Effekt auf die Erholungszeit des Blinkreflexes nach Doppelpulsstimulation. Somit hatte BTX keine oder nur geringe Wirkung auf die erhöhte Erregbarkeit der Interneurone des Hirnstammes der Blepharospasmus Patienten. Ferner zeigte die BTX- Therapie in unserer Studie, keinen Effekt auf die Kombinationsprotokolle $HFS_{LTP-LTD}$ bei den Blepharospasmus Patienten.

Um zu erforschen ob Botulinumtoxin (BTX) einen Einfluss auf das zentrale Nervensystem hat, wurde in der Studie von Grandas et al. 1998, die Erholungszeit (Recovery- Kurve) des Blinkreflexes an 12 Patienten mit Blepharospasmus, vor und drei Wochen nach unilateraler BTX-Injektion untersucht. BTX erzeugt durch Blockade der Acetylcholinfreisetzung, eine chemische Denervierung und führt somit zur einer Muskelparese. Die Doppelpulsstimulation des Nervus Supraorbitalis erfolgte bilateral, dagegen beschränkte sich die Aufzeichnungen der R2- Antwort des Blinkreflexes auf die unbehandelte Seite. Dies erfolgte um Aufzeichnungen der denervierten Muskeln durch BTX- Injektion zu vermeiden.

Es wurde folgende Hypothese aufgestellt: Falls es zur einer Modifikation der Erregbarkeit der Recovery- Kurve des unbehandelten Musculus Orbicularis oculi kommt, hätte die BTX- Therapie einen „zentralen“ Effekt auf die Interneurone des Gehirnstammes, da die R2- Antwort bilateral auftritt und durch Interneurone des Gehirnstammes vermittelt wird.

Die Ergebnisse der Studie zeigten vor der BTX Injektion, eine vergrößerte R2- Antwort des Blinkreflexes bei den Blepharospasmus Patienten. Drei Wochen nach BTX- Therapie wurde eine schwere Denervation des therapierten Musculus Orbicularis coculi, beobachtet. Dies führte zur einer erschwerten Reflexantwort bei den meisten Patienten zusammen mit einer deutlichen Reduktion des Augenlidkrampfes der therapierten Seite.

Die Recovery- Kurve der R2- Antwort der unbehandelten Seite, zeigte keine Unterschiede vor und nach der BTX- Therapie, sowohl bei ipsilateraler als auch bei kontralateraler Stimulation des Nervus orbicularis oculi. Da die R2- Antwort bilateral verschaltet ist, bestätigten diese Ergebnisse somit die Annahme, dass BTX- Injektionen die Erregbarkeit der Interneurone des Gehirnstammes, welche die bilaterale R2- Antwort des Blinkreflexes vermitteln, nicht modifizieren (Grandas et al. 1998). Diese Annahme könnte den fehlenden BTX- Effekt auf die Erholungszeit des Blinkreflexes nach Doppelpulsstimulation in unserer Studie erklären.

Zusammenfassend ist festzustellen, dass sich die Ergebnisse unserer Studie von denen von Mao und Evinger 2001 und Quartarone et al. 2006 unterscheiden.

Es ist durchaus denkbar, dass durch die Dauer unserer Protokolle, ein Habituationseffekt erfasst wurde, der in den früheren Studien durch deren kürzere Dauer, nicht zu ermitteln war.

Darüber hinaus können wir nicht ausschließen, dass die wiederholte Applikation der Doppelpulsstimulation eine anhaltende Inhibition induzierte, die vermutlich die Fähigkeit der assoziativen HFS, zeitabhängige Plastizität im Blinkreflex, zu verursachen, verhindert oder abgeschwächt hat.

Unsere Studie konnte auch zeigen, dass diese Methoden nicht verlässlich sind, um homöostatischen Eigenschaften der Blinkreflex Recovery- Kurve zu untersuchen.

5. Zusammenfassung

Der Blinkreflex ist ein Hirnstammreflex. Der afferente Teil verläuft über den N. ophthalmicus des N. trigeminus. Die Weiterleitung erfolgt über den Hirnstamm zum Ncl. Facialis. Von dort wird, über den efferenten Schenkel des N. facialis, eine Kontraktion des M. orbicularis oculi ausgelöst. Zur elektrischen Auslösung wird der N. Supraorbitalis stimuliert. Abgeleitet wird eine frühe ipsilaterale R1-Antwort und eine späte bilaterale R2-Antwort, die für den Augenschluss verantwortlich ist (Hallet 2002).

Die Kombination einer elektrischen Einzelpulsstimulation zusammen mit hochfrequenter Stimulation (HFS) des Nervus Supraorbitalis, wird als assoziative Hochfrequenz Stimulation bezeichnet. Diese erzeugte, bei fünf gesunden Probanden, eine Langzeitpotenzierung (LTP, langanhaltende Potenzierung der nachfolgenden elektrisch induzierten R2- Antworten des Blinkreflexes) oder Langzeitdepression (LTD, langanhaltende Abschwächung der nachfolgenden elektrisch induzierten R2- Antworten des Blinkreflexes) in Abhängigkeit des Zeitfensters zwischen der HFS und der elektrisch induzierten R2- Antwort. Wenn die HFS am Anfang der R2- Antwort des Blinkreflexes (HFS_{LTP}) appliziert wird, kommt es zu LTP, dagegen kommt es zur LTD, wenn die HFS kurz vor der R2- Antwort des Blinkreflexes (HFS_{LTD}), gegeben wird. Dies erfolgt, gemäß den Gesetzen der zeitabhängigen Plastizität (STDP, Spike Time dependent Plasticity) (Mao und Evinger 2001).

Bei 16 Patienten mit benignen essenziellen Blepharospasmus, eine fokale Dystonie, die den Muskel Orbicularis Oculi betrifft, erzeugte HFS_{LTP} , exzessive Potenzierungen der R2-Antwort, im Vergleich zu 11 gesunden Probanden. Diese starke Potenzierung der R2-Antwort, konnte nach Botulinumtoxin (BTX) Injektion, normalisiert werden (Quartarone et al. 2006).

Angeregt durch diese zwei Studien, verwendeten wir ebenfalls HFS- Konditionierung, am Nervus Supraorbitalis, um die homöostatische Metaplastizität im Blinkreflex, bei 12 gesunden Probanden und 16 Patienten mit Blepharospasmus, zu erforschen. Wir applizierten jedoch Einzel- und Doppelpulsstimulationen, um die Doppelpulsinhibition der R2-Antwort, zu ermitteln. Zusätzlich führten wir eine Kombination der Konditionierungsprotokolle folgendermaßen durch: An getrennten Tagen, wurde die R2-Antwort und die Doppelpulsinhibition nach 1) HFS_{LTP} , 2) HFS_{LTP} gefolgt von HFS_{LTP} 3) HFS_{LTP} gefolgt HFS_{LTD} gemessen. An Probanden wurde zusätzlich nach 4) HFS_{LTD} und 5) $HFS_{Keine\ Intervention}$ gemessen. Bei den Blepharospasmus Patienten wurde die R2- Antwort und die Doppelpulsinhibition nach HFS_{LTP} gefolgt HFS_{LTD} , vor und nach BTX- Behandlung gemessen.

Alle HFS Protokolle, erzeugten eine unspezifische Inhibition der R2-Antwort und eine relative Abnahme der Doppelpulsinhibition. Diese Resultate, zeigten sich auch bei Probanden, ohne die Applikation von HFS ($HFS_{\text{ohne Intervention}}$). Zusätzlich fand sich bei den Patienten keine Auswirkung der Botulinumtoxin Therapie auf die homöostatischen Mechanismen. Unsere Daten stellen somit in Frage, ob assoziative Hochfrequenzstimulation (HFS), bidirektionale Plastizität im Blinkreflex induzieren kann. Die unspezifische Abnahme der R2-Antwort in allen Protokollen, könnte ein Habituationseffekt des Blinkreflexes, als Folge einer repetitiven elektrischen Stimulation des N. Supraorbitalis, darstellen.

Die Abnahme der Inhibition nach der Doppelpulsstimulation, ist vermutlich Ausdruck einer homöostatischen Reaktion, um eine weitere Abwärtsregulierung der R2 Antwort zu verhindern, damit der Schutzmechanismus dieses Reflexes erhalten bleibt.

6. Veröffentlichung

Teile dieser Arbeit wurden bereits veröffentlicht:

Publikation:

Associative stimulation of the supraorbital nerve fails to induce timing-specific plasticity in the human blink reflex. Zeuner, K. E., Knutzen, A., Al-Ali, A., Hallett, M., Deuschl, G., Bergmann, T., Siebner, H.

Klinik für Neurologie, Christian-Albrechts-Universität Kiel, Kiel, Deutschland.

PLoS One. 2010 Oct 26;5(10): e13602.

7. Literatueverzeichnis

- Basso, M. A., Evinger, C. (1996): An explanation for reflex blink hyperexcitability in parkinson's disease. II. Nucleus raphe magnus. *J Neurosci*, 16, 7318–7330.
- Basso, M. A., Strecker, R. E., Evinger, C. (1993): Midbrain 6-hydroxydopamine lesions modulate blink reflex excitability. *Exp Brain Res*, 94, 88–96.
- Bentivoglio, A. R., Daniele, A., Albanese, A., Tonali, P. A., Fasano, A. (2006): Analysis in blink rate in patients with blepharospasm. *Mov Disord*, 21, 1225-1229.
- Berardelli, A., Rothwell, J. C., Day, B. L., Marsden, C. D. (1985): Pathophysiology of blepharospasm and oromandibular dystonia. *Brain*, 108 (Pt 3), 593-608.
- Berardelli, A., Rothwell, J. C., Hallett, M., Thompson, P. D., Manfredi, M. (1998): The pathophysiology of primary dystonia. *Brain*, 121, 1195-1212.
- Bienenstock, E. L., Cooper, L. N., Munro, P. W. (1982): Theory for the development of cortex. *J Neurosci*, 2, 32–48.
- Bliss, T. V., Lomo, T. (1973): Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the anaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path. *J Physiol*, 232, 331-356.
- Burrone, J., O'Byrne, M., Murthy, V. N. (2002): Multiple forms of synaptic plasticity triggered by selective suppression of activity in individual neurons. *Nature*, 420, 414–418.
- Citri, A., Malenka, R. C. (2008): Synaptic plasticity: multiple forms, functions, and mechanisms. *Neuropsychopharmacology*, 33, 18-41.
- Defazio, G., Livrea, P. (2004): Primary blepharospasm: diagnosis and management. *Drugs*, 64, 237-244.
- Defazio, G., Livrea, P. (2002): Epidemiology of primary blepharospasm. *Mov Disord*, 17, 7-12.
- Delvendahl, I., Jung, N. H., Mainberger, F., Kuhnke, N. G., Cronjaeger, M. (2010): Occlusion of bidirectional plasticity by preceding low-frequency stimulation in the human motor cortex. *Clin Neurophysiol*, 121, 594–602.
- Duffey, P. O., Butler, A. G., Hawthorne, M. R., Barnes, M. P. (1998): The epidemiology of the primary dystonias in the north of england. *Adv Neurology*, 78, 121–126.
- Ellrich, J., Treede, R. D. (1998): Characterization of blink reflex interneurons by activation of diffuse noxious inhibitory controls in man. *Brain Res*, 803, 161-168.
- ESDE, Epidemiological study of dystonia in europe (2000): A prevalence study of primary dystonia in eight european countries. *J Neurol*, 247, 787-792.

- Esteban, A. (1999): A neurophysiological approach to brainstem reflexes. Blink reflex. *Neurophysiol Clin*, 29, 7-38.
- Fahn, S. (1989): Assessment of the primary dystonias. In: Munsat TL (ed). *Quantification of neurologic deficit*. Boston: Butterworths, 241- 270.
- Fathi, D., Ueki, Y., Mima, T., Koganemaru, S., Nagamine, T. (2010): Effects of aging on the human motor cortical plasticity studied by paired associative stimulation. *Clin Neurophysiol*, 121, 90-93.
- Fearnley, J. M., Lees, A. J. (1991): Aging and Parkinson's disease: substantia nigra regional selectivity. *Brain*, 114, 2283–2301.
- Floel, A., Breitenstein, C., Hummel, F., Celnik, P., Gingert, C. (2005): Dopaminergic influences on formation of a motor memory. *Ann Neurol*, 58, 121-130.
- Florian, J., Muller-Dahlhaus, M., Liu, Y., Ziemann, U. (2008): Inhibitory circuits and the nature of their interactions in the human motor cortex a pharmacological TMS study. *J Physiol*, 586, 495–514.
- Grandas, F., Traba, A., Alonso, F., Esteban, A. (1998): Blink reflex recovery cycle in patients with blepharospasm unilaterally treated with botulinum toxin. *Clin Neuropharmacol*, 21, 307-311.
- Hallet, M. (2002): Blepharospasm: Recent Advances. *Neurology*, 59, 1306-1312.
- Hebb, D. (1949). *The organization of behavior: A neuropsychological theory*. New York: John Wiley and Sons, Inc.
- Hopf, H. C., Deuschl, G. (1998): Diagnostische Aussagekraft der Hirnstammreflexe. *Akt Neurologie*, 25, 127–132.
- Jankovic, J. Fahn, S. (2002): Dystonic Disorders. In: Jankovic J, Tolosa E, editors. *Parkinson's Disease and Movement Disorders*. Baltimore, MD: Urban & Schwarzenberg, 331-357.
- Karson, C. N. (1983): Spontaneous eye-blink rates and dopaminergic systems. *Brain*, 106, 643-653.
- Katz, B., Miledi, R. (1968): The role of calcium in neuromuscular facilitation. *J Physiol*, 195, 481–492.
- Kimura, J. (1973): Disorder of interneurons in parkinsonism: the orbicularis oculi reflex to paired stimuli. *Brain*, 96, 87-96.
- Klostermann, W., Wessel, K. (1995): Crossed R1 response of the blink reflex in peripheral facial palsy. *Electromyogr. clin. Neurophysiol*, 35, 69–71.
- Koehler, J., Schwarz, M., Urban, P. P., Voth, D., Holker, C., Hopf, H. C. (2001): Masseter reflex and blink reflex abnormalities in Chiari II malformation, *Muscle Nerve*, 24, 425–427.

- Kumakura, Y., Vernaleken, I., Grunder, G., Bartenstein, P., Gjedde, A., Cumming, P. (2005): PET studies of net blood-brain clearance of FDOPA to human brain: age-dependent decline of [18F] fluorodopamine storage capacity. *J Cereb Blood Flow Metab*, 25(7), 807–819.
- Langlois, M., Richer, F., Chouinard, S. (2003): New perspectives on dystonia. *Can J Neurol Sci*, 30 (suppl 1), 34- 44.
- Levy, W. B., Steward, O. (1983): Temporal contiguity requirements for long-term associative potentiation/depression in the hippocampus. *Neuroscience*, 8(4), 791-797.
- Malenka, R. C., Nicoll, R. A. (1993): NMDA-receptor-dependent synaptic plasticity: multiple forms and mechanisms. *Trends Neurosci*, 16, 521–527.
- Malin, J. P. (1980): The orbicularis oculi reflex. Electrophysiological results and habituation. *Fortschr. Med*, 98, 1252–1256.
- Mao, J. B., Evinger, C. (2001): Long-term potentiation of the human blink reflex. *J Neurosci*, 21, RC 151.
- Markram, H., Lubke, J., Frotscher, M., Sakmann, B. (1997): Regulation of synaptic efficacy by coincidence of postsynaptic APs and EPSPs. *Science*, 275, 213-215.
- Matsunaga, K., Uozumi, T., Tsuji, S., Murai, Y. (1998): Age-dependent changes in physiological threshold asymmetries for the motor evoked potential and silent period following transcranial magnetic stimulation. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol*, 109(6), 502–507.
- Mulkey, R. M., Malenka, R. C. (1992): Mechanisms underlying induction of homosynaptic long-term depression in area CA1 of the hippocampus. *Neuron*, 9, 967–975.
- Nakashima, K., Kusumi, M., Inoue, Y., Takahashi, K. (1995): Prevalence of focal dystonias in the western area of Tottori Prefecture in Japan. *Mov Disord*, 10, 440–443.
- Nutt, J. G., Muentzer, M. D., Aronson, A., Kurland, L. T., Melton, L. J. D. (1988): Epidemiology of focal and generalized dystonia in Rochester, Minnesota. *Mov Disord*, 3, 188–194.
- Oliviero, A., Profice, P., Tonali, P. A., Pilato, F., Saturno, E., Dileone, M. (2006). Effects of aging on motor cortex excitability. *Neurosci Res*, 55(1), 74–7.
- Quartarone, A., Sant'Angelo, A., Battaglia, F., Bagnato, S., Rizzo, V. (2006): Enhanced long term potentiation-like plasticity of the trigeminal blink reflex circuit in blepharospasm. *J Neurosci*, 26, 716-721.
- Rinne, J. O., Hietala, J., Ruotsalainen, U., Sako, E., Laihin, A., Nagren, K. (1993): Decrease in human striatal dopamine D2 receptor density with age: a PET study with [11C] raclopride. *J Cereb Blood Flow Metab*, 13(2), 310–4.
- Schicatano, E. J., Basso, M. A., Evinger, C. (1997): Animal model explains the origins of the cranial dystonia benign essential blepharospasm. *J Neurophysiol*, 77, 2842–2846

- Siebner, H. R. (2010): A primer on priming the human motor cortex. *Clin Neurophysiol*, 121, 461–463.
- Siebner, H. R., Ziemann, U. (2007): *Das TMS Buch*. Springer Verlag, Heidelberg.
- Sommer, M., Wobker, G., Ferbert, A. (1998): Voluntary eyelid contraction modifies the blink reflex recovery cycle. *Acta Neurol Scand*, 98, 29–35.
- Sommer, M., Ferbert, A. (2001): The stimulus intensity modifies the blink reflex recovery cycle in healthy subjects and in blepharospasm. *Clin Neurophysiol*, 112, 2293–2299.
- Stefan, K., Kunesch, E., Cohen, L. G. (2000): Induction of plasticity in the human motor cortex by paired associative stimulation. *Brain*, 123, 572–584.
- Stoehr, M., Bluthardt, M. (1983): Reflex- und F-Wellen-Befunde in: M. Stoehr, M. Bluthardt (Eds.), *Atlas der klinischen Elektromyographie und Neurographie*, W. Kohlhammer Verlag, Stuttgart.
- Svendsen, F., Tjolsen, A., Hole, K. (1997): LTP of spinal A beta and C-fibre evoked responses after electrical sciatic nerve stimulation. *Neuroreport*, 8, 3427–3430.
- Tecchio, F., Zappasodi, F., Pasqualetti, P., De Gennaro, L., Pellicciari, M. C. (2008): Age dependence of primary motor cortex plasticity induced by paired associative stimulation. *Clin Neurophysiol*, 119, 675–682.
- Turrigiano, G. G., Leslie, K. R., Desai, N. S., Rutherford, L. C., Nelson, S. B. (1998): Activity-dependent scaling of quantal amplitude in neocortical neurons. *Nature*, 391, 892–896.
- Ueki, Y., Mima, T., Kotb, M. A., Sawada, H., Saiki, H., Ikeda, A. (2006): Altered plasticity of the human motor cortex in Parkinson's disease. *Ann Neurol*, 59(1), 60–71.
- Valls-Sole, J., Tolosa, E. S., Ribera, G. (1991): Neurophysiological observations on the effects of botulinum toxin treatment in patients with dystonic blepharospasm. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 54, 310–313.
- Valls-Sole, J., Tolosa, E. S. (1989): Blink reflex excitability cycle in hemifacial spasm, *Neurology*, 39, 1061–1066.
- Wang, H., Wagner, J. J. (1999): Priming-induced shift in synaptic plasticity in the rat hippocampus. *J Neurophysiol*, 82, 2024–2028.
- Willer, J.C., Boulu, P., Bratzlavsky, M. (1984): Electrophysiological evidence for crossed oligosynaptic trigemino-facial connections in normal man, *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry*, 47, 87–90.
- Wolters, A., Sandbrink, F., Schlottmann, A., Kunesch, E., Stefan, K., Cohen, L. G., Benecke, R., Classen, J. (2003): A temporally asymmetric Hebbian rule governing plasticity in the human motor cortex. *J Neurophysiol*, 89, 2339

Zaman, V., Boger, H. A., Granholm, A. C., Rohrer, B., Moore, A., Buhusi, M. (2008): The nigrostriatal dopamine system of aging GFRalpha-1 heterozygous mice: neurochemistry, morphology and behavior. *Eur J Neurosci*, 28 (8), 1557–68.

Zeuner, K. E., Knutzen, A., Al-Ali, A., Hallett, M., Deuschl, G., Bergmann, T., Siebner, H. (2010): Associative stimulation of the supraorbital nerve fails to induce timing-specific plasticity in the human blink reflex. *Plos One* 5(10), e13602.

Zucker, R. S., Regehr, W. G. (2002): Short-term synaptic plasticity. *Annu Rev Physiol*, 64, 355–405.

8. Anhang

8.1. Aufklärungsprotokoll für Patienten

Titel der Studie: Untersuchung zur Anpassungsfähigkeit des Blinzelreflexes bei Lidkrampf

Studienleiterin: Dr. Kirsten Zeuner

Wir laden Sie ein, an einer wissenschaftlichen Studie der Neurologischen Klinik der Universität Kiel teilzunehmen. Die Teilnahme an der Studie ist vollkommen freiwillig. Sie können sich jederzeit dazu entscheiden, nicht teilzunehmen, oder die Teilnahme an der Studie abubrechen ohne Angabe von Gründen und ohne Nachteile für Ihre medizinische Versorgung. Die Daten, die wir im Rahmen dieser Studie erheben unterliegen der Schweigepflicht und werden nur zu medizinischen Zwecken verwendet. Ergebnisse werden anonymisiert ausgewertet, das heißt in namentlich nicht kenntlicher Form, und Beispiele anonym veröffentlicht. Gemäß den Datenschutzbestimmungen benötigen wir Ihr Einverständnis zur Speicherung und Verwendung dieser Daten im Rahmen unseres Forschungsprojektes.

Sie werden keine direkten Vorteile von einer Teilnahme in dieser Studie haben. Die wissenschaftlichen Erkenntnisse, die wir aus der Studie erhalten werden, werden uns helfen, Ihre Krankheit besser zu verstehen.

Die Teilnahme an der Studie ist kostenlos. Fahrtkosten werden Ihnen erstattet.

Hintergrund und Ziel der Studie

Ziel der Studie ist es, die Ursache des dystonen Lidkrampfes (Blepharospasmus) besser zu verstehen. Beim dystonen Lidkrampf kommt es zu spontanen beidseitigen Muskelkontraktionen der Augenschließ- und Stirnmuskeln, was zu einem unwillkürlichen Lidschluss führt. Wir werden sowohl betroffene Patienten als auch gesunde Probanden als Kontrollgruppe untersuchen. Bevor Sie sich entschließen, bitten wir Sie, sich die Zeit zu nehmen, die Einverständniserklärung zu lesen und offene Fragen mit dem Untersucher zu klären. Die Studie birgt für Sie keine Risiken, bringt Ihnen aber auch keine direkten Vorteile im Sinne einer Besserung Ihrer Bewegungsstörung.

Bevor wir Sie in die Studie aufnehmen können, müssen wir prüfen, ob Sie für die Studie geeignet sind und an der Studie teilnehmen können. Dies bedeutet, dass wir Sie in unserer Ambulanz für Bewegungsstörungen untersuchen werden. Wir können nur Patienten mit Blepharospasmus einschließen, die (i) keine Medikamente einnehmen, die die Gehirnfunktion verändern können einschließlich sog. Anticholinergika, (ii) keine Neuroleptika in der Vorgeschichte eingenommen haben und (iii) keine anderen neurologischen oder psychiatrischen Erkrankungen in der Vergangenheit hatten.

Studienplan

Wir laden Sie zu zwei verschiedenen Teilen der Studie ein, nämlich den Teil A und Teil B.

Studie A	Wir werden Sie bitten, zwei Mal zu kommen. Wir planen zwei Untersuchungen, die in einem Abstand von mindestens drei Tagen durchgeführt werden. Falls Sie vorher mit Botulinum Toxin Spritzen behandelt worden sind, werden wir die Untersuchungen kurz vor der nächsten, geplanten Botulinum Toxin Spritze durchführen.
Studie B	Wir werden Sie bitten, vier Mal zu kommen. Wir planen insgesamt vier Untersuchungen, die kurz vor der geplanten Botulinum Toxin Spritze, und dann 1, 2 und 4 Wochen danach durchgeführt werden sollen.

Jede Untersuchung dauert zwischen 90 und 120 Minuten.

In jeder Untersuchung lösen wir den **Blinzelreflex** aus. Der Blinzelreflex wird durch eine sensible Stimulation des Gesichtes ausgelöst und führt zu einem reflektorischen Lidschluss. Wir provozieren diesen Blinzelreflex, indem wir einen kurzen, nicht schmerzhaften elektrischen Reiz oberhalb der echten Augenbraue verabreichen. Die reflektorische Aktivität der Lidschlussmuskeln wird mit Oberflächenelektroden gemessen.

Das Hauptziel dieser Studie ist es, das Antwortverhalten des Blinzelreflexes vorübergehend zu verändern, also entweder zu verstärken oder abzuschwächen. Dies erreichen wir, indem wir während oder kurz vor dem Augenblinzeln eine kurze Reizserie bestehend aus nicht schmerzhaften elektrischen Reizen über der rechten Augenbraue geben. Dies gibt uns die Möglichkeit, den Mechanismus zu verstehen, der die Ausprägung des Blinzelreflexes reguliert. Um die Auswirkungen der elektrischen Stimulation auf die Blinzelaktivität zu untersuchen, werden wir den Blinzelreflex vor und nach der schnellen Stimulation messen.

Durchführung der Untersuchungen:

Um den Blinzelreflex auszulösen, reizen wir elektrisch einen kleinen Nerv oberhalb der Augenbraue, der zu einem Blinzeln des Auges führt. Dabei wenden wir einzelne Reize oder auch gepaarte Reize an. Die reflektorische Aktivität wird mit Oberflächenelektroden, die unter- und oberhalb der Augen sowie auf die Nase geklebt werden, gemessen. Mit dieser Methode sind wir in der Lage, die Antwort des Blinzelreflexes auf diesen sensiblen Reiz zu messen. Um die Aktivität zuverlässig zu messen, müssen wir die Messungen in Blöcken durchführen. Jeder Block hat 45 hintereinander folgende Durchläufe und dauert etwa 10 Minuten.

Schnelle, rasche elektrische Stimulation

Wir werden die Stärke des Blinzelreflexes vorübergehend ändern, indem wir den Blinzelreflex mit einer Serienstimulation bestehend aus neun Stimuli und einer Wiederholungsrate von 400 Hz an der rechten Augenbraue kombinieren. Wir werden mit einem einzelnen elektrischen Stimulus über der rechten Augenbraue den Blinzelreflex auslösen und dann entweder vor oder während des Blinzelreflexes eine schnelle Reizserie oberhalb der rechten Augenbraue verabreichen. Insgesamt werden wir diese gepaarte Serienstimulation in drei Blöcken mit 5 fünfminütiger Pause geben. Jeder Stimulationsblock wird aus vier Durchläufen bestehen.

Klinische Untersuchung:

Um den Einfluss der Untersuchungen und einen Zusammenhang mit der Botulinum Toxin Wirkung herstellen zu können, werden wir die Ausprägung ihrer Bewegungsstörung messen. Dazu füllen wir mit Ihnen gemeinsam einen Fragebogen mit 8 Fragen aus, mit dem wir erfassen können, wie sehr Sie durch Ihre Erkrankung im täglichen Leben beeinträchtigt sind. Dies dauert ca. 5 Minuten. Um den Einfluss der Untersuchungen messen zu können, erstellen wir ein Video der spontanen Muskelaktivität des Gesichts vor und 10 Minuten nach den Messungen.

Risiken

Besondere Risiken erwarten wir nicht. Die elektrische Reizung kann wie oben beschreiben unangenehm sein, verursacht aber in der Regel keine Schmerzen und ist geringer als in klinischen Routineanwendung. Es handelt sich bei den geplanten Untersuchungen um nicht-eingreifende Verfahren, die in der klinischen Routine bestens bekannt sind und keine langfristigen Nebenwirkungen oder Auswirkungen auf Ihre normalen, täglichen Aktivitäten haben.

Positive Auswirkungen

Dies ist eine wissenschaftliche Studie, die Ihnen keine persönlichen Vorteile bringen wird. Es besthet lediglich ein indirekter Nutzen, da die Untersuchung uns helfen wird, mehr über die Mechanismen zu erfahren, die zum Entstehen des dystonen Lidkrampfes beitragen.

Unterschrift des Patienten

Datum

Unterschrift des Arztes

Datum

8.2. Aufklärungsprotokoll für Probanden

Titel der Studie: Untersuchung zur Anpassungsfähigkeit des Blinzelreflexes bei Lidkrampf

Studienleiterin: Dr. Kirsten Zeuner

Wir laden Sie ein, an einer wissenschaftlichen Studie der Neurologischen Klinik der Universität Kiel teilzunehmen. Die Teilnahme an der Studie ist vollkommen freiwillig. Sie können sich jederzeit dazu entscheiden, nicht teilzunehmen, oder die Teilnahme an der Studie abubrechen ohne Angabe von Gründen. Die Daten, die wir im Rahmen dieser Studie erheben unterliegen der Schweigepflicht und werden nur zu medizinischen Zwecken verwendet. Ergebnisse werden anonymisiert ausgewertet, das heißt in namentlich nicht kenntlicher Form, und Beispiele anonym veröffentlicht. Gemäß den Datenschutzbestimmungen benötigen wir Ihr Einverständnis zur Speicherung und Verwendung dieser Daten im Rahmen unseres Forschungsprojektes.

Sie werden keine direkten Vorteile von einer Teilnahme in dieser Studie haben. Die wissenschaftlichen Erkenntnisse, die wir aus der Studie erhalten werden, werden uns helfen, die Erkrankung (Blepharospasmus) besser zu verstehen.

Die Teilnahme an der Studie ist kostenlos. Als Aufwandsentschädigung werden Sie acht Euro pro Stunde erhalten.

Hintergrund und Ziel der Studie:

Ziel der Studie ist es, die Ursache des dystonen Lidkrampfes (Blepharospasmus) besser zu verstehen. Beim dystonen Lidkrampf kommt es zu spontanen beidseitigen Muskelkontraktionen der Augenschließ- und Stirnmuskeln, was zu einem unwillkürlichen Lidschluss führt. Wir werden sowohl betroffene Patienten als auch gesunde Probanden als Kontrollgruppe untersuchen. Die Untersuchung gesunder Probanden ist erforderlich, um eine Vergleichsgruppe zu haben. Bevor Sie sich entschließen bitten wir, Sie, sich die Zeit zu nehmen, die Einverständniserklärung zu lesen und Fragen mit dem Untersucher zu klären.

Bevor wir Sie in die Studie aufnehmen können, müssen wir prüfen, ob Sie für die Studie geeignet sind und an der Studie teilnehmen können. Dies bedeutet, dass wir Sie in unserer Ambulanz für Bewegungsstörungen untersuchen werden. Wir können nur gesunde Probanden einschließen, die (i) keine Medikamente einnehmen, die die Gehirnfunktion verändern können einschließlich sog. Anticholinergika, (ii) keine Neuroleptika in der Vorgeschichte eingenommen haben und (iii) keine anderen neurologischen oder psychiatrischen Erkrankungen in der Vergangenheit hatten.

Studienplan:

Wir werden Sie bitten, zwei Mal in die Neurologische Klinik des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein, Campus Kiel, zu kommen. Wir planen zwei Untersuchungen, die in einem Abstand von mindestens drei Tagen durchgeführt werden. Jede Untersuchung dauert zwischen 90 und 120 Minuten.

In jeder Untersuchung lösen wir den **Blinzelreflex** aus. Der Blinzelreflex wird durch eine sensible Stimulation des Gesichtes ausgelöst und führt zu einem reflektorischen Lidschluss. Wir provozieren diesen Blinzelreflex, indem wir einen kurzen, nicht schmerzhaften elektrischen Reiz oberhalb der echten Augenbraue verabreichen. Die reflektorische Aktivität der Lidschlussmuskeln wird mit Oberflächenelektroden gemessen.

Das Hauptziel dieser Studie ist es, das Antwortverhalten des Blinzelreflexes vorübergehend zu verändern, also entweder zu verstärken oder abzuschwächen. Dies erreichen wir, indem wir während oder kurz vor dem Augenblinzeln eine kurze Reizserie bestehend aus nicht schmerzhaften elektrischen Reizen über der rechten Augenbraue geben. Dies gibt uns die Möglichkeit, den Mechanismus zu verstehen, der die Ausprägung des Blinzelreflexes reguliert. Um die Auswirkungen der elektrischen Stimulation auf die Blinzelaktivität zu untersuchen, werden wir den Blinzelreflex vor und nach der schnellen Stimulation messen.

Durchführung der Untersuchungen:

Messung der Blinzelreflexes

Um den Blinzelreflex auszulösen, reizen wir elektrisch einen kleinen Nerv oberhalb der Augenbraue, der zu einem Blinzeln des Auges führt. Dabei wenden wir einzelne Reize oder auch gepaarte Reize an. Die reflektorische Aktivität wird mit Oberflächenelektroden, die unter- und oberhalb der Augen sowie auf die Nase geklebt werden, gemessen. Mit dieser Methode sind wir in der Lage, die Antwort des Blinzelreflexes auf diesen sensiblen Reiz zu messen. Um die Aktivität zuverlässig zu messen, müssen wir die Messungen in Blöcken durchführen. Jeder Block hat 45 hintereinander folgende Durchläufe und dauert etwa 10 Minuten.

Schnelle, rasche elektrische Stimulation

Wir werden die Stärke des Blinzelreflexes vorübergehend ändern, indem wir den Blinzelreflex mit einer Serienstimulation bestehend aus neun Stimuli und einer Wiederholungsrate von 400 Hz an der rechten Augenbraue kombinieren. Wir werden mit einem einzelnen elektrischen Stimulus über der rechten Augenbraue den Blinzelreflex auslösen und dann entweder vor oder während des Blinzelreflexes eine schnelle Reizserie

oberhalb der rechten Augenbraue verabreichen. Insgesamt werden wir diese gepaarte Serienstimulation in drei Blöcken mit 5 fünfminütiger Pause geben. Jeder Stimulationsblock wird aus vier Durchläufen bestehen.

Klinische Untersuchung:

Um den Einfluss der Untersuchungen messen zu können, erstellen wir ein Video der spontanen Muskelaktivität des Gesichts vor und 10 Minuten nach den Messungen.

Risiken:

Besondere Risiken erwarten wir nicht. Die elektrische Reizung kann wie oben beschreiben unangenehm sein, verursacht aber in der Regel keine Schmerzen und ist geringer als in klinischen Routineanwendung. Es handelt sich bei dieser Untersuchung um eine nicht-eingreifende Methode, die in der klinischen Routine bestens bekannt ist und keine langfristigen Nebenwirkungen oder Auswirkungen auf Ihre normalen, täglichen Aktivitäten hat.

Positive Auswirkungen:

Dies ist eine wissenschaftliche Studie, die Ihnen keine persönlichen Vorteile bringen wird, sondern deren Ziel es ist, mehr über die Mechanismen zu erfahren, die zum Entstehen des dystonen Lidkrampfes beitragen. Sie erhalten eine Entschädigung von 8 Euro pro Stunde.

Unterschrift des Probanden

Datum

Unterschrift des Arztes

Datum

9. Danksagung

Mein herzlicher Dank gilt meiner Doktormutter und Betreuerin meiner Dissertation Frau PD Dr. med. Kirsten Zeuner für die exzellente Betreuung, ihr stets persönliches und freundliches Engagement, ihre Anregungen und gewissenhafte Unterstützung zur Planung und Durchführung der Versuche und Erstellung und Korrektur meiner Dissertation.

Ebenfalls bedanke ich mich bei Herrn Prof. Dr. med. Deuschl, Direktor der Klinik für Neurologie des Universitätsklinikums Schleswig-Holsteins, Campus Kiel, für die Möglichkeit der uneingeschränkten Durchführung dieser Arbeit in seiner Klinik.

Desweiteren bedanke ich mich bei allen, die mir bei der Durchführung dieser Arbeit behilflich waren, insbesondere:

Herrn Prof. Dr. med. H. Siebner für die Überlassung des Themas und die Möglichkeit, diese Arbeit an der Klinik für Neurologie durchführen zu können.

Herrn Arne Knutzen und Frau Anke Hoff für die freundliche und kompetente Unterstützung in allen Belangen dieser Arbeit, und insbesondere für das angenehme Arbeitsklima.

Ein ganz besonderer Dank gilt allen Probanden und Patienten, die an unserer Studie teilgenommen haben.

Und nicht zuletzt danke ich meiner Familie insbesondere meinen Eltern, die in jeglicher Hinsicht die Grundsteine für meinen Weg gelegt haben.

10. Lebenslauf

Persönliche Angaben

Name Asmaa Al-Ali
 Geburtsdatum/-ort 13.01.1983 in Bonn
 Staatsangehörigkeit deutsch

Hochschulstudium

Studium der Humanmedizin an der
 Christian-Albrechts-Universität zu Kiel 2002 – 2009
 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung 03/ 2005
 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung 06/ 2009

Beruflicher Werdegang

03/2010- 07/2011: Assistenzärztin der Gynäkologie und Geburtshilfe am Kreiskrankenhaus
 Gummersbach
 Seit 11/2011: Assistenzärztin der Gynäkologie und Geburtshilfe am Gemeinschaftsklinikum
 St. Elisabeth Krankenhaus Mayen

Publikation

Associative stimulation of the supraorbital nerve fails to induce timing-specific plasticity in
 the human blink reflex.

Zeuner, K. E., Knutzen, A., Al-Ali, A., Hallett, M., Deuschl, G., Bergmann, T., Siebner, H.
 Klinik für Neurologie, Christian-Albrechts-Universität Kiel, Kiel, Deutschland.

PLoS One. 2010 Oct 26;5(10): e13602.