

Aus dem
Medizinischen Zentrum für Nervenheilkunde
der Philipps-Universität Marburg
Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. J. C. Krieg
Klinik für Neurologie, Direktor: Prof. Dr. W. H. Oertel

Untersuchung
neuroprotektiver Effekte von Radikalfängern in Tiermodellen
des Morbus Parkinson

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der gesamten Medizin
(Dr. med.)

dem Fachbereich Humanmedizin
der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von
Brita Fritsch
aus Salzgitter

Marburg 2004

Angenommen vom Fachbereich Humanmedizin der
Philipps-Universität Marburg

am
04.03.04

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs

Dekan: Prof. Dr. Maisch
Referent: Prof. Dr. Oertel
Coreferent: PD Dr. Westermann

INHALTSVERZEICHNIS

1 ZUSAMMENFASSUNG	1
2 EINLEITUNG	4
2.1 DAS IDIOPATHISCHE PARKINSON-SYNDROM	6
2.1.1 Neuropathologie und Neuropathochemie	7
2.1.2 Pathophysiologie	9
2.1.3 Ätiopathogenese	11
2.1.3.1 Oxidativer Stress in der Pathogenese des IPS	11
2.2 TIERMODELLE DES IDIOPATHISCHEN PARKINSON-SYNDROMS	15
2.2.1 Das 6-OHDA (6-Hydroxydopamin) Modell	15
2.2.1.1 Das subakute intrastriatale [Fluorogold (FG)]/6-OHDA-Modell	17
2.2.1.2 Der Wirkmechanismus von 6-OHDA	18
2.2.2 Das MPTP (1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine) Modell	20
2.2.2.1 Der Wirkmechanismus von MPTP	21
2.2.3 Andere Modelle des IPS	24
2.3 AKTUELLE THERAPIE	25
2.4 NEUROPROTEKTIVE/-REGENERATIVE THERAPIEANSÄTZE	25
2.4.1 Radikalfänger als neuroprotektiver Therapieansatz des IPS	26
2.4.1.1 Salicylsäure = 2-Hydroxybenzoesäure (SS)	26
2.4.1.2 Alpha-Phenyl-N-Tert-Butyl Nitron (PBN)	29
2.4.1.3 Trolox [®] -Methyl Ether = (S)-6-Methoxy-2,5,7,8-tetramethylchroman -2 carboxylic Acid (Trolox)	30
2.5 HYPOTHESEN UND ZIELE DER ARBEIT	32
3 MATERIAL UND METHODEN	33
3.1 VERSUCHSTIERE UND TIERHALTUNG	33
3.2 BEHANDLUNG	34
3.2.1 Herstellung und Applikation der Arzneistofflösungen	34
3.3 MESSUNG DER LOKOMOTORISCHEN AKTIVITÄT	35

3.4 LÄSIONEN UND OPERATIONEN	35
3.4.1 Operationsverlauf der retrograden FG-Markierung nigraler DA-Neurone	36
3.4.2 Operationsverlauf der unilateralen intrastriatalen 6-OHDA-Läsion und bilateralen FG Markierung nigrostriataler DA- Neurone	37
3.4.3 MPTP-Läsion der Maus	38
3.5 DISSEKTION DER GEHIRNE	38
3.6 ELEKTROCHEMISCHE AUSWERTUNG DURCH HPLC	39
3.6.1 Aufbereitung der Proben	39
3.6.2 Herstellung der Eichlösung	39
3.6.3 Elektrochemische Messung und Auswertung	40
3.6.4 Bestimmung der Dopaminumsatzrate	41
3.7 HISTOLOGIE	42
3.7.1 Anfertigung der Gefrierschnitte	42
3.7.2 Auswertung FG-positiver (FG-p) Neurone der SNpc	42
3.7.3 Tyrosinhydroxylase-Immunperoxidase Färbung	44
3.7.4 Auswertung TH-ir Neurone der SNpc	46
3.8 STATISTISCHE AUSWERTUNG	47
3.9 GERÄTE UND SUBSTANZEN	49
4 ERGEBNISSE	52
<hr/>	
4.1 NEUROCHEMISCHE UNTERSUCHUNG	52
4.1.1 Effekte der Läsionen und verwendeten Testsubstanzen auf den striatalen Dopamingehalt	52
4.1.2 Effekte der Läsionen und verwendeten Testsubstanzen auf die striatale Dopaminumsatzrate (DOPAC/Dopamin)	57
4.2 HISTOLOGIE	61
4.2.1 Effekte der Läsion und verwendeten Testsubstanzen auf die Anzahl der FG-p Neurone in der SNpc	61
4.2.2 Effekte der Läsionen und verwendeten Testsubstanzen auf die Anzahl der TH-ir Neurone in der SNpc	66
4.3 LOKOMOTORISCHE AKTIVITÄT	74

5 DISKUSSION **76**

5.1 DISKUSSION DER VALIDITÄT DER ERZIELTEN LÄSIONEFFEKTE UND DER ZUR DARSTELLUNG GEWÄHLTEN PARAMETER **77**

5.1.1 Neurochemische Untersuchung 77

5.1.2 Histologische Untersuchung 80

5.1.3 Lokomotorische Aktivität 83

5.2 DISKUSSION DER EFFEKTE DER VERWENDETEN RADIKALFÄNGER IM PARKINSON-TIERMODELL **84**

5.2.1 SS im FG/6-OHDA-Modell der Ratte 84

5.2.2 PBN im FG/6-OHDA-Modell der Ratte 88

5.2.3 Trolox im MPTP-Modell der Maus 91

6 SUMMARY **94**

7 LITERATURÜBERSICHT **96**

8 ANHANG **112**

8.1 ABKÜRZUNGEN **112**

8.2 ABBILDUNGSVERZEICHNIS **113**

8.3 TABELLENVERZEICHNIS **115**

8.4 LEBENS LAUF **116**

8.5 VERZEICHNIS AKADEMISCHER LEHRER **117**

8.6 DANKSAGUNG **118**

8.7 PUBLIKATIONS LISTE **119**

8.8 EHRENWÖRTLICHE ERKLÄRUNG **120**

1 ZUSAMMENFASSUNG

Im Fluorogold/6-OHDA-Ratten-Modell (FG/6-OHDA) und dem MPTP-Maus-Modell des idiopathischen Parkinsonsyndroms (IPS) sollten in der vorgelegten Studie die Radikalfänger Salicylsäure (SS), alpha-Phenyl-N-Tert-Butyl Nitron (PBN) und Trolox[®] Methyl Ether (Trolox) auf ihre neuroprotektive Wirkung untersucht werden.

Ziel der Arbeit war es die potenziell protektiven Effekte der Substanzen auf den striatalen Dopamingehalt, die Dopaminumsatzrate, die Anzahl nigraler Tyrosinhydroxylase-immunreaktiver (TH-ir) Neurone und im FG/6-OHDA-Modell auf die Anzahl nigraler Fluorogold-positiver (FG-p) Neurone sowie im MPTP-Modell auf die lokomotorische Aktivität der Mäuse zu erfassen.

FG/6-OHDA-Modell der Ratte

Anhand der genannten Parameter konnte nach unilateral durchgeführter intrastriataler Injektion von 6-OHDA eine signifikante ipsilaterale Läsion nigraler dopaminerger Neurone mit konsekutiv signifikant veränderten neurochemischen Parametern erhoben werden.

SS zeigte bis auf einen tendenziell positiven Effekt auf die Verminderung FG-p Neurone und den striatalen Dopamingehalt keinen schützenden Einfluss auf die durch 6-OHDA hervorgerufenen Veränderungen. Bei mit 10mg/kg KG niedrig dosierter Langzeitbehandlung (2 Wochen *pre* und 4 Wochen *post laesionem*; i.p.) im Vergleich zu Studien im MPTP-Modell der Maus mit 5 – 10-facher Dosis der SS, welche einen signifikant protektiven Effekt beschrieben (Aubin *et al.* 1998), wurde auch für das 6-OHDA-Modell eine neuroprotektive Wirkung in diesem Dosierungsbereich postuliert, zumal die Läsionseffekte so ausgeprägt waren, dass es möglich erscheint, dass sich die gesehenen tendenziellen Effekte bei unter diesen Voraussetzungen zu geringer Fallzahl nicht signifikant abzeichneten. Dies bleibt durch weitere Studien zu beweisen. Hingewiesen wurde auf die zu erwartenden gastrointestinalen Nebenwirkungen bei chronischer Therapie mit Salicylsäure im Hochdosisbereich.

PBN wurde im FG/6-OHDA-Modell niedrig- (75 mg/kg KG; i.p.) und hochdosiert (150 mg/kg KG; i.p.) 2 Wochen vor und 4 Wochen nach Läsion verabreicht. Auf sämtliche bestimmte Parameter konnte mit beiden Dosierungen kein signifikant neuroprotektiver

Effekt erhoben werden. Eine durch 150 mg PBN signifikant verminderte Anzahl nigraler TH-ir Neurone, welche sich tendenziell in der Anzahl FG-p Neurone, allerdings nicht auf neurochemischer Ebene widerspiegelte, ließ sogar einen dosisabhängigen neurotoxischen Effekt in höherer Dosierung vermuten. Entscheidend scheint die lange Behandlungsdauer im Vergleich zu anderen tierexperimentellen Studien im selben Dosierungsbereich, da hier bisher kein toxischer Effekt auf behavioraler Ebene beschrieben wurde. Morphologische Parameter wurden in diesen Arbeiten nicht erhoben. Dies spricht gegen eine neuroprotektive Therapie beim Menschen, da diese am ehesten in Form einer Langzeitbehandlung durchgeführt würde. Eine Stimulation der Dopaminsynthese durch PBN in den residualen nigrostriatalen Neuronen wurde bei fehlender gleichzeitiger Verminderung des striatalen Dopamingehaltes diskutiert.

MPTP-Modell der Maus

Die einmalige subcutane Applikation von 30 mg/kg KG MPTP führte ebenfalls zu einem signifikanten Rückgang nigraler dopaminerger TH-ir Neurone, welcher sich wiederum signifikant auf die bestimmten neurochemischen und behavioralen Parameter auswirkte.

Das fettlösliche Vitamin E Derivat Trolox[®] wurde in hoher (300 mg/kg KG) und niedriger (100 mg/kg KG) Dosierung im MPTP-Maus-Modell mittels einmaliger Gabe s.c. unmittelbar vor Applikation des Toxins getestet.

Bis auf eine signifikante Senkung der postläsionell erhöhten Umsatzrate des Dopamins unter Behandlung mit 300 mg/kg KG Trolox[®] zeigte sich kein signifikant positiver Effekt auf sämtliche Parameter. Bemerkenswerterweise kamen allerdings die Daten für sämtliche Parameter der geschädigten Tiere in der Reihenfolge Trolox 300 > Trolox 100 > NaCl zu liegen, was eine dosisabhängige Wirkung vermuten und die Durchführung weiterer Studien mit höher dosiertem Trolox erfolgversprechend erscheinen lässt, zumal unter den angewandten Dosierungen keine unerwünschten Wirkungen bei den Tieren zu beobachten waren. Darüber hinaus stellten sich auch in diesem Versuch die Läsionseffekte so ausgeprägt dar, dass sich die gesehenen tendenziellen Effekte bei größerer Fallzahl möglicherweise signifikant abzeichnen würden.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass ein neuroprotektiver Effekt von Trolox und Salicylsäure in höherer als in der hier verwendeten Dosierung oder bei größerer Fallzahl möglich erscheint.

Des weiteren erscheint die Kombination eines wasserlöslichen mit einem fettlöslichen Antioxidanz mit differierendem Wirkort und möglicher Addition/Potenzierung der neuroprotektiven Effekte erfolgversprechend.

PBN erwies sich im 6-OHDA-Modell der Ratte als nicht neuroprotektiv. Es zeigte in höherer Dosierung sogar neurotoxische Effekte, was insbesondere für Langzeitbehandlungen, wie sie beim Menschen im Falle einer chronisch neurodegenerativen Erkrankung Anwendung finden würde, Relevanz hat und in Folge-Studien näher spezifiziert werden sollte.

2 EINLEITUNG

Das idiopathische Parkinson Syndrom (IPS; Morbus Parkinson) stellt eine chronisch progrediente, degenerative Erkrankung des zentralen Nervensystems des mittleren bis höheren Lebensalters dar. In der Altersgruppe ab 65 Jahre sind ca. 1% der Bevölkerung betroffen.

Gekennzeichnet ist die Erkrankung durch eine motorische und vegetative Symptomatik. Die Betroffenen sind durch einen erhöhten generalisierten Muskeltonus (Rigor) und eine Minderbeweglichkeit (Hypo-/Akinese) beeinträchtigt. Einerseits ist die Lebensqualität durch schwer bis nicht durchführbare feinmotorische Bewegungen eingeschränkt, wie z.B. das Zuknöpfen eines Hemdes, was den Patienten von der Hilfe Dritter abhängig macht. Andererseits entstehen Probleme im sozialen Umfeld, da die Patienten durch eine eingeschränkte Mimik und monotone Sprache häufig als in einem demenziellen Prozess begriffen, verkannt werden. Stigmatisierend und somit für den Patienten zusätzlich belastend, kann ein ausgeprägtes Ruhe-Zittern (Tremor) wirken.

Mit den derzeit in Anwendung befindlichen Therapiemaßnahmen kann ein Großteil der Patienten nach einer Therapiedauer von 10-15 Jahren nicht mehr befriedigend medikamentös eingestellt werden. Weitere therapeutische Maßnahmen in diesem Stadium sind invasiver Natur (z.B. Tiefenhirnstimulation) und mit den üblichen perioperativen Risiken behaftet. Derzeit belaufen sich die jährlichen Kosten für Medikation, Pflege und stationäre Aufenthalte pro Patient durchschnittlich auf 7.000 Euro/Jahr (Dodel et al 1997).

Die beschriebene für das IPS typische Symptomkonstellation ist bereits in ayurvedischen Schriften (1000-1500 v. Chr.) zu finden (Manyam 1990). Als Krankheitsentität erkannt und charakterisiert wurden sie erstmals 1817 von dem Londoner Arzt James Parkinson in seiner Monographie „An Essay on the Shaking Palsy“. Knapp 50 Jahre später wurde der Morbus Parkinson durch Jean Martin Charcot nach seinem Erstbeschreiber benannt.

Heute ist die für die Symptomatik verantwortliche Degeneration bestimmter Kerngebiete, hauptsächlich der *substantia nigra pars compacta* mit ihren dopaminergen Neuronen, mit konsekutivem striatalem Dopaminmangel bekannt. Die Ätiologie und Pathogenese sind allerdings auch derzeit nicht komplett entschlüsselt.

Festzuhalten ist, dass das idiopathische Parkinson Syndrom einzig beim Menschen vorzukommen scheint. Daher werden zur Erforschung der Erkrankung im Tier Toxine verwendet, welche eine relativ selektive Schädigung in der *substantia nigra pars compacta* hervorrufen und dem M. Parkinson ähnliche Syndrome induzieren.

Geläufige und in der vorgelegten Arbeit verwendete Tiermodelle sind das progressive Fluorogold/6-OHDA-Modell der Ratte und das MPTP-Modell der Maus.

Mittels dieser Modelle konnten einige pathogenetische Mechanismen und Veränderungen, welche größtenteils dem humanen M. Parkinson eigen sind, aufgedeckt werden. Hier war insbesondere das MPTP-Modell von Nutzen, da man weiss, dass dieses Toxin beim Menschen ebenfalls die typische Parkinson-Symptomatik induziert.

Zu den postulierten pathogenetischen Faktoren des idiopathischen Parkinsonsyndroms gehört unter anderem das Aufkommen zytotoxischer Sauerstoffradikale, auch oxidativer Stress genannt.

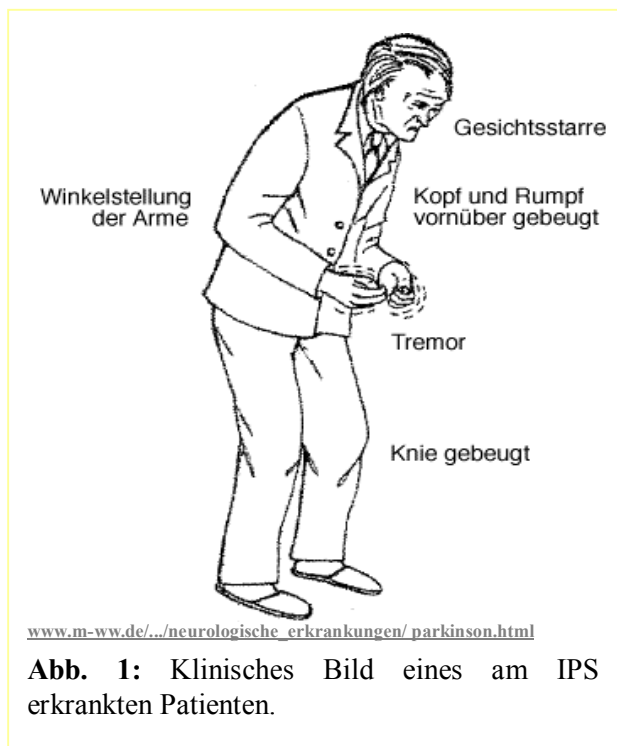
Die Forschung der letzten Jahre lässt eine bedeutende Rolle des oxidativen Stresses in der Pathogenese der Parkinson-Erkrankung wahrscheinlich erscheinen. Vor diesem Hintergrund wurden in der vorgelegten Arbeit die Wirksamkeit und potenziellen neuroprotektiven Effekte von erwiesenen Radikalfängern in den obengenannten Tiermodellen auf histologische, neurochemische und behaviorale Parameter untersucht.

2.1 Das idiopathische Parkinson-Syndrom

Das idiopathische Parkinson-Syndrom (IPS), auch Parkinson-Krankheit, Morbus Parkinson oder primäres Parkinson-Syndrom (alt: Paralysis agitans) genannt, ist eine neurodegenerative Erkrankung bislang unbekannter Ursache und macht mit ca. 70% den größten Teil der Parkinson-Syndrome aus (Uitti und Calne 1993).

Hiervon abzugrenzen sind die symptomatischen oder auch sekundären Parkinson-Syndrome mit bekannter Ursache. Hierbei kann eine metabolische (z.B. Morbus Wilson), eine vaskuläre, eine toxische (z.B. Mangan, Kohlenmonoxid oder Methanol), eine infektiöse (z.B. nach Encephalitis lethargica) oder eine medikamentöse (z.B. Neuroleptika, Reserpin) Ursache zugrunde liegen. Weiterhin sind die mit einer Parkinson-Symptomatik einhergehenden neurodegenerativen Erkrankungen (z.B. Multisystematrophien: olivopontocerebellare Atrophie, striatonigrale Degeneration; progressive supranukleäre Blickparese) zu nennen (Poewe 1993).

Allen gemeinsam ist die Triade aus Ruhe-Tremor, Rigor und Akinese (Abb. 1), wobei diese mit syndromspezifischer Ausprägung und zusätzlicher vegetativer und psychischer Symptomatik sowie Haltungsinstabilität einhergehen können.



Die vorgelegte Arbeit bezieht sich auf das IPS. Die klinische Manifestation findet statt, wenn schon ein erheblicher Zellverlust der dopaminergen Neurone der Substantia nigra pars compacta (SNpc) von mindestens 68% vorliegt, so dass von einer präsymptomatischen Phase von ca. 5 Jahren ausgegangen werden muss (Fearnley und Lees 1991). Seine Inzidenz wird auf 20/100.000 Einwohner geschätzt. Mit einer Prävalenz von 100-200/100.000 in

der Gesamtbevölkerung in Europa und Nordamerika ist sie hier die häufigste neurodegenerative Erkrankung (Tanner 1992). Ein vermehrtes Auftreten ist in agrarwirtschaftlich genutzten Gebieten zu beobachten, in denen das Trinkwasser aus

eigenen Quellen bezogen wird, welches einer erhöhten Insektizidbelastung ausgesetzt ist (Barbeau *et al.* 1987).

Beide Geschlechter sind nahezu mit gleicher Häufigkeit betroffen, mit geringer Dominanz des männlichen Geschlechts. Mit einem Manifestationsgipfel nach dem 65. Lebensjahr ist das IPS eine Erkrankung des Seniums, mit einer Prävalenz von 1-3% in der betreffenden Population (Oertel und Kupsch 1993; Moghal *et al.* 1994). Nur 5-10 % der Erkrankungen manifestieren sich schon vor dem 40. Lebensjahr. Der chronisch-progressive Verlauf der derzeit nicht kurativ behandelbaren Erkrankung bedeutet durch Kosten, welche durch medikamentöse Behandlung, Pflege, Rehabilitation und stationäre Aufenthalte entstehen, einen großen finanziellen Aufwand für das öffentliche Gesundheitssystem. Die durchschnittlichen jährlichen Kosten pro Patient belaufen sich im deutschen Raum auf etwa 7.000 Euro/Jahr, wobei eine deutliche Abhängigkeit vom Schweregrad der Erkrankung zu erkennen ist (Dodel *et al.* 1997).

2.1.1 Neuropathologie und Neuropathochemie

Der Verlust der Pigmentierung des Mittelhirns und das Vorkommen von Lewy-Körperchen in Nervenzellen der SNpc sind die neuropathologischen Kriterien des IPS

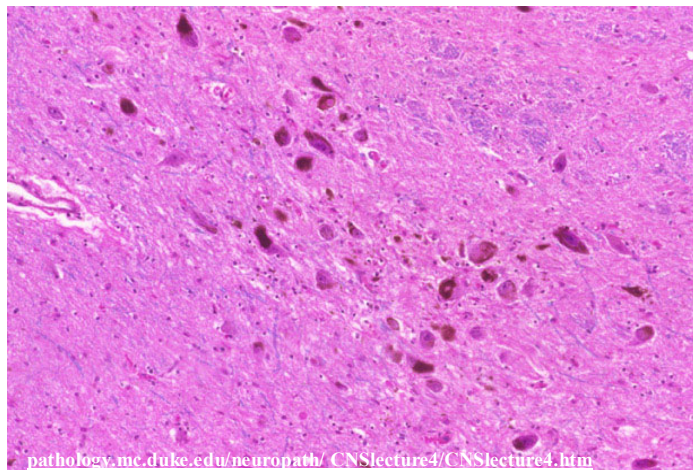


Abb. 2: Histologischer Schnitt auf Höhe der Substantia nigra, intrazellulär Eiweissablagerung im Sinne von Lewykörperchen.

(Abb. 2). Auch bei Verstorbenen, die zu Lebzeiten kein klinisch auffälliges Parkinson-Syndrom aufwiesen, wurden Lewy-Körperchen in der SN nachgewiesen. Diese Fälle werden von einigen Autoren als präsymptomatisches IPS eingestuft (Gibb und Lees 1988). Der verminderten Pigmentierung des Mesenzephalons liegt als

morphologisches Korrelat der Verlust dopaminerger, nigrostriataler, neuromelaninhaltiger Neurone zugrunde. Dies führt zu einem konsekutivem Mangel an Dopamin (DA) mit gleichzeitiger Konzentrationsabnahme seiner Metaboliten sowie der Aktivität der Tyrosinhydroxylase (TH) bei erhöhtem Dopaminumsatz im Striatum (Riederer *et al.* 1978; Hornykiewicz 1982). Mit dem *Locus coeruleus* und dem dorsalen

Vaguskern sind weitere pigmentierte Kerngebiete, allerdings in geringerem Ausmaß, vom Zellverlust betroffen (Jellinger 1991).

Das Ausmaß des nigralen Dopaminverlustes muss ca. 2/3 der ursprünglichen Dopaminkonzentration erreichen, bevor sich das IPS klinisch manifestiert (Bernheimer *et al.* 1973). Die im Vergleich zur Neuropathologie späten Funktionseinbußen werden damit erklärt, dass einerseits der striatale Dopaminumsatz als Zeichen eines präsynaptischen Kompensationsmechanismus zunimmt und andererseits die postsynaptische Dopaminrezeptordichte und –sensitivität ansteigt (Hefti *et al.* 1985; Rinne *et al.* 1990; Rinne *et al.* 1993).

Die beim IPS stattfindende Hochregulation striataler D2-Rezeptoren konnte durch bildgebende Verfahren bestätigt werden und wird z.B. in SPECT-Untersuchungen mit dem selektivem D2-Rezeptoragonisten IBZM zur differenzialdiagnostischen Einordnung von Parkinsonsyndromen genutzt (Hierholzer *et al.* 1993).

2.1.2 Pathophysiologie

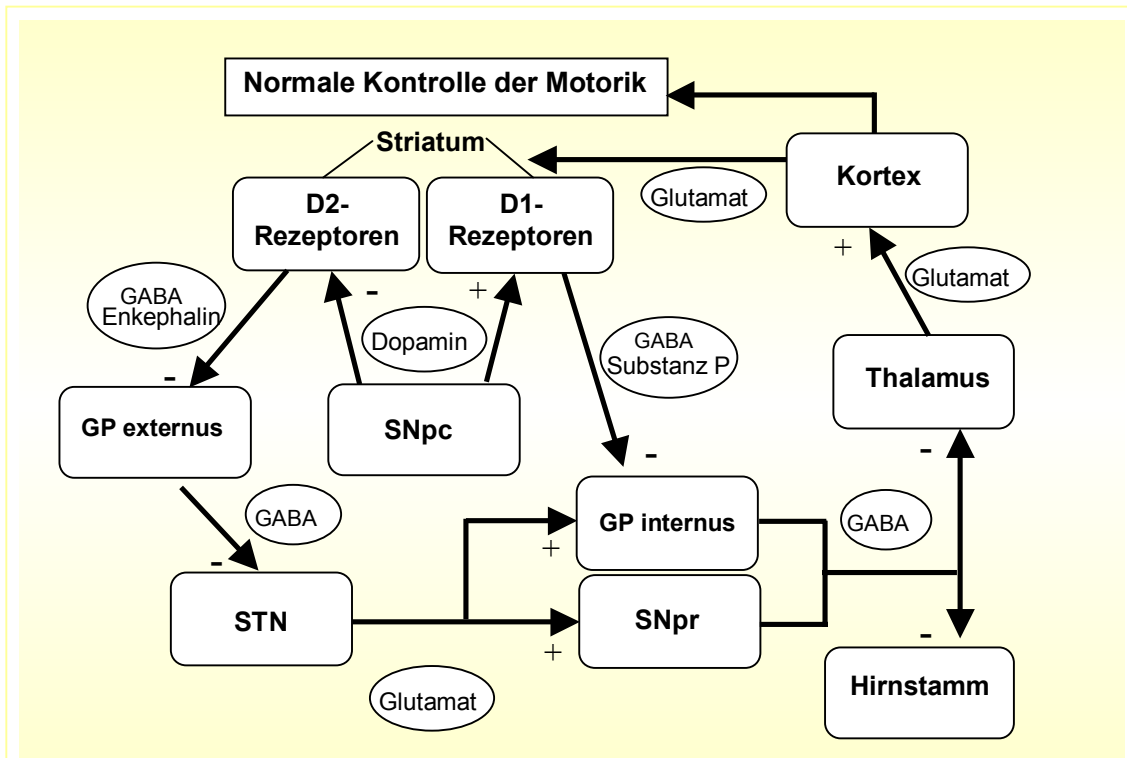


Abb. 3: Funktionelles Modell der Basalganglien einer Person mit normaler motorischer Funktion, vereinfachte Darstellung (nach Lang und Lozano 1998); (STN → Ncl. Subthalamicus, SNpc → Substantia nigra pars compacta, SNpr → Substantia nigra pars reticulata, GP → Globus pallidus).

In Abb. 3 ist die normale funktionelle Anatomie der Basalganglien mit dem direkten und indirekten striatalen Projektionsweg dargestellt. Die Basalganglien werden von einer Gruppe subkortikaler Neuronenverbände gebildet und stellen das extrapyramidalmotorische System dar. Dieses ist für Haltere reflexe, Muskeltonus und unwillkürliche Koordinationsbewegungen verantwortlich.

Eine Störung in diesem System äußert sich durch lokalisations typische motorische Syndrome. Bei den IPS-typischen Veränderungen in den nigrostriatalen Projektionswegen (Abb.4) kommt es bedingt durch die Degeneration der Neurone der SNpc über eine reduzierte Ausschüttung von Dopamin zu einer verminderten Stimulation der D1 Rezeptoren des Striatums und somit auch des direkten striatalen Systems. Daraus resultiert eine reduzierte Unterdrückung der inhibitorischen Neurone der Substantia nigra pars reticulata (SNpr) und des internen Segmentes des Globus pallidus (GPI), was in diesen Kerngebieten eine vermehrte Freisetzung des Neurotransmitters γ -Aminobuttersäure (GABA) bewirkt.

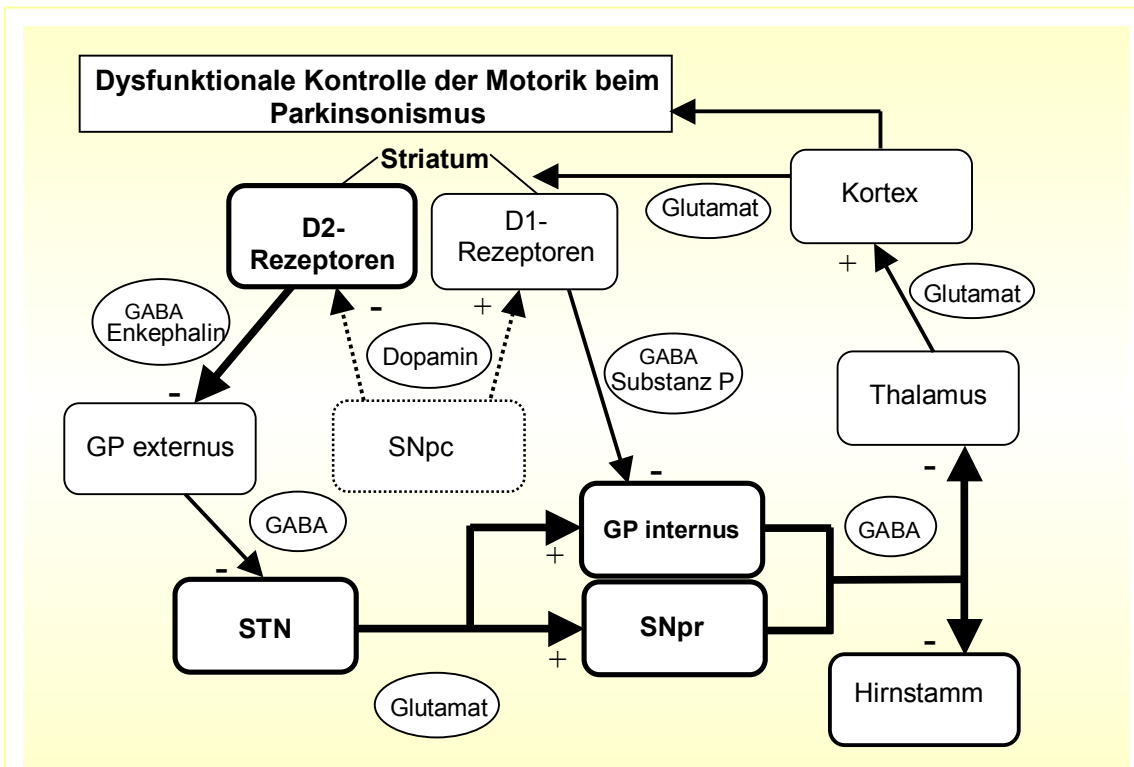


Abb. 4: Funktionelles Modell der Basalganglien einer Person mit IPS, vereinfachte Darstellung (nach Lang und Lozano 1998). Die Abschnitte des Schaltkreises mit vermehrter Aktivität sind fett und die mit verminderter dünn dargestellt.

Andererseits ist die inhibitorische Wirkung von Dopamin an den striatalen D2-Rezeptoren durch die SNpc verringert. Hierdurch wird eine Aktivierung des indirekten striatalen Systems bedingt. Dies besteht aus zwei inhibitorischen neuronalen Verschaltungen, welche sich zwischen dem Striatum und dem externen Segment des Globus pallidus (GPe) und zwischen GPe und dem Ncl. subthalamicus (STN) befinden. Letztgenanntes Kerngebiet wirkt wiederum exzitatorisch auf den GPi und die SNpr via Freisetzung von Glutamat. Zusammenfassend führt die beim IPS auftretende Verminderung des Dopamins im Striatum zu einer vermehrten Aktivität des GPi und der SNpr.

Die dadurch enthemmten inhibitorischen GABA-ergen Verbindungen dieser beiden Kerngebiete zum Thalamus führen zu einer Suppression der Aktivität der Neurone des motorischen Kortex, wodurch die IPS-Symptomatik mit Akinesie, Rigor und Tremor erklärt wird. Die enthemmte Inhibition von lokomotorischen Arealen des Hirnstammes könnte wiederum für die typische Haltungs- und Gangunsicherheit der IPS-Patienten verantwortlich sein (Lang und Lozano 1998).

2.1.3 Ätiopathogenese

Trotz einer Vielzahl von Studien zur Klärung der Ursache(n) der für das IPS typischen Neurodegeneration konnte(n) diese bis heute nicht vollständig aufgezeigt werden. Aus diesen Studien resultieren allerdings vielfältige Erklärungsansätze und partielle Einblicke in die Ätiopathogenese der Erkrankung. Da keine der bestehenden Hypothesen die Ätiologie des IPS bisher vollständig erklären würde, erscheint eine multifaktorielle Genese wahrscheinlich.

Die Entstehung reaktiver Sauerstoffverbindungen und -radikale scheint in diesem Zusammenhang eine wesentliche Rolle zu spielen. Ob dies beim IPS ursächlich ist oder den chronisch-degenerativen Prozess lediglich unterhält, ist nicht geklärt. Unter den diskutierten pathogenetischen Mechanismen des IPS, die mit oxidativem Stress im Zusammenhang stehen, finden sich einerseits eine grundsätzlich erhöhte Suszeptibilität der dopaminergen Neurone der SNpc gegenüber reaktiven Sauerstoff Spezies (ROS), die mitochondriale Dysfunktion, die Wirkung von Exzitotoxinen, immunologische und inflammatorische Faktoren und die exogenen Toxine.

Des Weiteren wird bei etwa gedoppeltem Erkrankungsrisiko Familienangehöriger von IPS Patienten eine genetische Prädisposition vermutet. Eine polygenetische Determination des IPS mit z.B. der Exposition eines Neurotoxin als anstoßendes Ereignis ist vorstellbar (Vierregge *et al.* 1999).

Ein monogener Erbgang wird bei 5 bis maximal 10% der Parkinson Erkrankungen angenommen. Derzeit sind 8 Gendefekte mit monogenem Erbgang bekannt, wie z.B. bei Angehörigen einer Familie, bei denen die Erkrankten eine Punktmutation des PARK1 Gens aufweisen, welches für α -Synuclein kodiert (Kitada *et al.* 1998; Gasser 1998).

2.1.3.1 Oxidativer Stress in der Pathogenese des IPS

Schon der physiologische Dopaminmetabolismus im gesunden Gehirn führt zur Freisetzung oxidativ wirkender Moleküle (Ben Shachar *et al.* 1995). Für diese neurotoxischen Stoffwechselprodukte gibt es vielfältige körpereigene Abfangmechanismen wie z.B. Glutathion, Superoxiddismutase und Vitamin E + C, so dass ihre schädliche Wirkung im gesunden Gehirn nicht zum Tragen kommt (Abb. 5). Oxidativer Stress stellt ein Ungleichgewicht zwischen oxidativen Substanzen und ihren Abfangmechanismen zugunsten ersterer dar.

Die Gruppe der im Gehirn entstehenden reaktiven Sauerstoffverbindungen besteht aus Wasserstoffperoxiden (H_2O_2) und den vom Sauerstoff ableitbaren freien Radikalen.

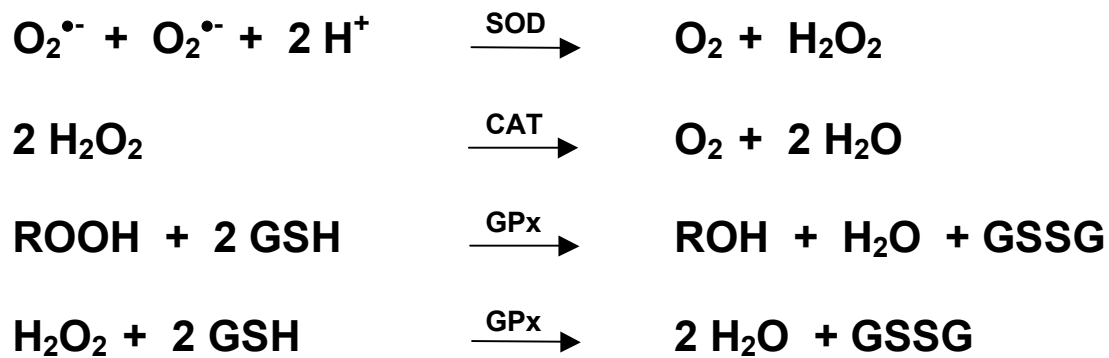


Abb. 5: Es sind mehrere Beispiele der Abfangmechanismen oxidativen Stresses dargestellt. SOD = Superoxiddismutase, CAT = Catalase, GPx = Glutathionperoxidase, GSH = Glutathion.

Unter freien Radikalen versteht man Verbindungen, die ein oder mehrere ungepaarte Elektronen aufweisen. Dieses Merkmal der Radikale ist der Grund für ihre große Reaktionsfreudigkeit. Zu den in biologischen Systemen relevantesten zählen die Radikale des Sauerstoffs wie z.B. Superoxidradikale ($\bullet O_2^-$), Hydroxylradikale ($\bullet OH$) und Stickstoffoxide (NO). Die erwähnte Reaktionsfreudigkeit dieser Moleküle bedingt Interaktionen mit Nukleinsäuren, Proteinen, Lipiden und anderen Molekülen. Dadurch verändern sie die Struktur dieser für die Integrität von Neuronen lebenswichtigen Moleküle und führen so deren Untergang herbei.

Oxidativer Stress und die Neurone der SNpc

Grundsätzlich ist oxidativer Stress ein allgemein zellschädigender Faktor, die SNpc birgt allerdings Merkmale, die sie dem schädigenden Einfluss durch ROS besonders aussetzen:

Der hohe Anteil dopaminerger Neurone in der SNpc bedeutet einen hohen Dopaminumsatz in diesem Kerngebiet. Hierbei entsteht physiologischerweise H_2O_2 durch enzymatische Umsetzung mittels MAO-B sowie neben anderen neurotoxischen Produkten $\bullet O_2^-$ durch nichtenzymatische Dopamin-Autooxidation (siehe auch Abb. 6).

Das für die Färbung der SNpc verantwortliche intrazelluläre Neuromelanin ist in der Lage, unter anderem Eisen, Neuroleptika und neurotoxische Kationen (z.B. MPP^+) zu binden. Es konnte gezeigt werden, dass das gebundene Eisen unter bestimmten Bedingungen wieder freigesetzt wird (Hirsch *et al.* 1988; Double *et al.* 1999). Die vergleichsweise hohen Eisenkonzentrationen begünstigen wiederum das Abfließen der Fenton-Reaktion (Abb. 6) mit der Bildung reaktionsfreudiger $\bullet OH$ (Youdim *et al.* 1989).



Abb. 6: Die Fenton-Reaktion.

Mitochondriale Dysfunktion

Da annähernd 95% des Sauerstoffs in den Mitochondrien umgesetzt wird und der Anteil der daraus entstehenden Sauerstoffradikale bei ca. 2% liegt (Boveris und Chance 1973), sind diese Zellorganellen besonders dem Risiko der Schädigung durch freie Sauerstoffradikale ausgesetzt. Fehlfunktionen in den Mitochondrien führen wiederum zu einer gesteigerten Freisetzung reaktiver Substanzen. In *post mortem* Untersuchungen an 9 Gehirnen von Parkinson-Patienten konnten Schapira *et al.* (1990) und Mann *et al.* (1992) Fehlfunktionen oder einen Mangel an Enzymen der mitochondrialen Elektronen-Transport-Kette der Neurone der SNpc, insbesondere des Komplex I, nachweisen. Hattori *et al.* (1991) konnten diesen Aktivitätsverlust quantifizieren und fanden eine Reduktion um 30-40%, die für das IPS spezifisch zu sein scheint.

Exogene Toxine

Die Theorie, dass exogene Toxine für die Entstehung der Parkinson-Krankheit verantwortlich sein könnten, basiert unter anderem darauf, dass in landwirtschaftlich genutzten Gebieten, in denen Brunnenwasser zur täglichen Versorgung dient, ein gehäuftes Auftreten von Parkinson-Erkrankungen beobachtet wurde (Barbeau *et al.* 1987; Svenson 1991). Ungeklärt ist, ob mögliche Verunreinigungen des Wassers mit Herbiziden, Pestiziden oder Schwermetallen, ein unbekanntes Umwelttoxin, Tierkontakte oder eine Dysfunktion bei der Entgiftung exo- und endogener Toxine der Entstehung der Erkrankung zugrunde liegen (Oertel und Kupsch 1993).

Weiterhin wurde der Verdacht, dass die Erkrankung durch ein exogenes Toxin verursacht sein könnte, dadurch unterstützt, dass sich bei einer Gruppe Heroinabhängiger, die sich versehentlich mit 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridin (MPTP) verunreinigtes Heroin intravenös appliziert hatten, ein IPS ähnliches Krankheitsbild ausbildete (Davis *et al.* 1979). In späteren Studien konnte für diese Patientengruppe ein Verlust von dopaminergen Neuronen in der Substantia nigra nachgewiesen werden (Burns *et al.* 1983). Zur Untersuchung der Pathophysiologie und möglicher Therapieansätze wurden mit MPTP Tiermodelle des IPS etabliert. Die durch MPTP verursachten pathophysiologischen Veränderungen zeigen eine Beteiligung freier Radikale unter anderem durch eine exzessive Freisetzung von Dopamin mit

darauf folgender Metabolisierung durch MAO-B und Autooxidation. Weitere exogene Neurotoxine die bei systemischer Gabe ein Parkinson-Syndrom induzieren können, sind unter anderem Paraquat, Dieldrin, Mangan und Salsolinol.

Exzitotoxine und gestörte Kalziumhomeostase

Als Quelle für Exzitotoxizität kommt beim IPS der hyperaktive, glutamaterge Nucleus subthalamicus (Abb.4) in Frage. Die von ihm ausgehende erhöhte Ausschüttung des exzitatorischen Neurotransmitters aktiviert unter anderem glutamaterge N-methyl-D-aspartat (NMDA) Rezeptoren. Dies führt zu einer Erhöhung des intrazellulären Gehalts an Kalziumionen mit folgender Aktivierung von Proteasen, Endonukleasen, Phospholipasen und NO-Synthetase mit sich anschließender Bildung von Stickstoffoxid, Peroxynitrit und Sauerstoff-Radikalen (Lancelot *et al.* 1998) und darauffolgendem Untergang dopaminerger Neurone der SNpc (Lafon-Cazal *et al.* 1993). Zu berücksichtigen ist allerdings, dass der Nucleus subthalamicus überwiegend in den retikulären Teil der Substantia nigra projiziert. Andererseits könnten weitere glutamaterge Afferenzen der SNpc exzitotoxisch wirken. Die Beobachtung, dass die Expression von Calbindin, einem calziumbindenden Protein, dopaminerger Neurone bei Parkinson-Patienten vor dem Untergang zu schützen scheint (Mouatt-Prigent *et al.* 1994), unterstützt die Theorie, dass durch Glutamat bedingtes, intrazellulär erhöhtes Kalzium mit konsekutiver Ausbildung oxidativen Stresses pathogenetisch beteiligt sein könnte.

Immunologische und inflammatorische Faktoren

Die Tatsache, dass in der SNpc von Parkinson-Patienten HLA-DR-positive Mikroglia nachgewiesen (McGeer *et al.* 1988) und in post mortem Untersuchungen an 3 mit MPTP intoxikierten Patienten Gliose und ein gehäuftes Vorkommen aktivierter Mikroglia um Nervenzellen der SNpc gezeigt werden konnte (Langston *et al.* 1999), deutet auf eine Beteiligung immunologischer und inflammatorischer Faktoren beim IPS hin. Unterstützt wird diese Theorie durch den Nachweis von Alterationen der Zytokin-Level im 6-OHDA-Modell der Ratte und im MPTP-Modell der Maus (Nagatsu *et al.* 2000). NFkB ist ein Transkriptionsfaktor, der als zentraler Mediator oder gar Regulator der Immunantwort bezeichnet wird (Pahl 1999). Er kann durch oxidativen Stress induziert werden und diesen wiederum bedingen. Der Nachweis von erhöhter NFkB-Immunreaktivität in Gehirnen von IPS-Patienten und in Tiermodellen des IPS spricht ebenfalls für die Beteiligung inflammatorischer Prozesse, welche mit oxidativem Stress assoziiert sein können (Hunot *et al.* 1997; Blum *et al.* 2001b).

Ubiquitin und Proteasomen

In Nervenzellen finden Proteinumbau, axonaler und vesikulärer Transport statt, welche bei fehlstrukturierten Proteinen Störungen erleiden. Wird diese Störung nicht beseitigt, werden die fehlerhaften Proteine ubiquitiniert (markiert) und durch Proteasomen abgebaut (Thrower *et al.* 2000). Da in Lewy-Körperchen immunhistochemisch Ubiquitin nachgewiesen werden konnte, wird über einen ursächlich gestörten Proteinabbau beim IPS, der dann zu diesen Ablagerungen führen würde, spekuliert (Yaron *et al.* 1997). Es ist möglich, dass die Zellfunktionen neben dem Funktionsverlust der Proteine auch durch die Lewy-Körperchen selbst gestört werden und die Zelle degeneriert (Rockwell *et al.* 2000). Tatsache ist, dass Lewy-Körperchen kein ausschließliches Charakteristikum des IPS sind, da sie in 25 % aller sich im frühen Lebensalter manifestierenden, sporadischen IPS-Fälle nicht auftreten. Ebenso gibt es vergleichbare Ablagerungen bei anderen neurodegenerativen Erkrankungen, z.B. der Plaque-Bildung bei der Demenz vom Alzheimer-Typ.

2.2 Tiermodelle des idiopathischen Parkinson-Syndroms

Das spontane Auftreten eines IPS konnte bei Tieren bisher nicht beobachtet werden, so dass zur Entwicklung und Testung neuer Therapiestrategien chemische, physikalische und, demnächst wahrscheinlich vermehrt, genetische Modelle herangezogen werden. Ein optimales Krankheitsmodell sollte den neurochemischen, morphologischen und, soweit diese im Tier zu erheben sind, klinischen Aspekten sowie dem Zeitverlauf der imitierten Erkrankung gerecht werden. Charcot war im Jahr 1862 der erste, der versuchte ein Tiermodell des IPS zu entwickeln. Er konnte durch isolierte Entfernung der Medulla oblongata einen Nikotin-abhängigen Tremor in Fröschen induzieren, was ihn dazu bewegte, den Ursprung des Parkinsonismus im unteren Hirnstamm zu vermuten (Duvoisin 1976).

Mit zunehmenden Einblicken in das Krankheitsgeschehen wandelten sich die Tiermodelle des IPS. Die wesentlichen, insbesondere die in der vorliegenden Arbeit verwandten, werden im Folgenden behandelt.

2.2.1 Das 6-OHDA (6-Hydroxydopamin) Modell

1959 ist das physiologische Vorkommen von 6-OHDA, einem hydroxylierten Analogon des Neurotransmitters Dopamin, im Rattenhirn und 15 Jahre später im menschlichen

Hirngewebe beschrieben worden (Senoh *et al.* 1959; Curtius *et al.* 1974). Aus dem Urin von Parkinsonpatienten konnte 6-OHDA isoliert werden, so dass seine Beteiligung an der Pathogenese des IPS vermutet wird (Jellinger *et al.* 1995). Sein biologischer Effekt ist nach systemischer Gabe auf das periphere sympathische Nervensystem beschränkt, da der Substanz die Überwindung der Blut-Hirn-Schranke nicht möglich ist. Die biochemischen Veränderungen sind durch eine mehrere Monate anhaltende Noradrenalin-Verarmung peripherer Organe gekennzeichnet, welche 1963 erstmalig von Porter *et al.* anhand eines Noradrenalinverlustes im autonomen Nervensystem des Herzens dokumentiert wurde (Porter *et al.* 2002). Darüber hinaus ist eine selektive Destruktion adrenerger Nervenendigungen mit reduzierter TH-Aktivität, resultierend in der beschriebenen Noradrenalin-Verarmung, zu beobachten (Thoenen und Tranzer 1968; Mueller *et al.* 1969).

Da 6-OHDA nicht Bluthirnschranken-gängig ist, muss es für die Entfaltung seiner Wirkung im ZNS intraventrikulär, intrazisternal oder intrazerebral appliziert werden, wodurch im ZNS ebenfalls eine selektive Degeneration katecholaminerger Neurone hervorgerufen wird (Ungerstedt 1968; Bloom *et al.* 1969). Das morphologische und neurochemische Korrelat der Zerstörung der katecholaminergen Neurone bilden deren histologisch nachgewiesene Degeneration, selektiv verringerte Dopamin-, Noradrenalin- und Adrenalin Spiegel mit Reduktion der Katecholaminmetabolite in den zugehörigen Projektionsarealen, Verminderung der Katecholamin-Wiederaufnahmestellen und der TH-Aktivität (Übersicht bei: Zigmond und Stricker, 1989).

Die für das IPS typische Destruktion nigrostriataler dopaminergener Neurone ist durch stereotaktische intranigrale, intrastriatale sowie Injektionen in das mediale Vorderhirnbündel (MFB), welche bilateral oder unilateral durchgeführt werden können, erreichbar. Bilaterale Injektion von 6-OHDA in die SNpc oder das MFB der Ratte führt akut zu einem hypokinetisch, kataleptischen Syndrom mit Aphagie und Adipsie (Ungerstedt 1971) sowie zu einem akuten Untergang nigraler dopaminergener Neurone mit kompletter Ausbildung der Läsion innerhalb von 24 Stunden (Sotelo *et al.* 1973; Ervin *et al.* 1977). Der akute dem IPS unähnliche Verlauf der Läsion und die aufwendige Pflege der Tiere lassen die bilaterale 6-OHDA Injektion in die SNpc oder das MFB als wenig geeignetes Modell für experimentelle Studien erscheinen.

Durch unilaterale Injektionen in beiden Lokalisationen lässt sich der pflegerische Aufwand deutlich verringern (Breese und Traylor 1970). Diese einseitig nigral

läsionierten Tiere entwickeln akut eine kontralaterale motorische Symptomatik mit Hypokinesie und Rigor, bei der es zu einer Torsion der Ratte zur nicht lädierten Seite kommt, welche nach Stunden rückläufig ist. Das Rotationsverhalten kann allerdings durch Dopaminagonisten oder Dopamin-freisetzende Substanzen auch später noch hervorgerufen und zur Beurteilung der Läsionsstärke oder als Parameter für klinische Effekte in Studien herangezogen werden. Das Drehverhalten ist für mind. 2 Jahre stabil reproduzierbar (Ungerstedt und Arbuthnott 1970; Hefti *et al.* 1980) und wird mit der skoliotischen Fehlhaltung bei Parkinson-Patienten mit ausgeprägter Seitendominanz der Symptomatik verglichen (Duvoisin 1976), so dass dieses Modell für Studien, welche auf behaviorale Parameter ausgerichtet sind, geeignet scheint. Der akute Verlauf der neuronalen Degeneration lässt dieses Modell insbesondere für Studien mit neuroprotektivem Ansatz ungeeignet erscheinen.

Durch die intrastriatale Gabe des 6-OHDA, welche eine progrediente Degeneration der nigrostriatalen Neurone über Monate bewirkt, kann eine nähere Anlehnung am Spontanverlauf des humanen Erkrankungsbildes erreicht werden.

2.2.1.1 Das subakute intrastriatale [Fluorogold (FG)]/6-OHDA-Modell

Die intrastriatale Injektion von 6-OHDA bewirkt zunächst die Degeneration axonaler Nervenendigungen nigrostriataler dopaminergener Neurone, welche sich retrograd ausbreitet und zum Untergang der gesamten Neurone führt. Einen indirekten Beweis hierfür erbrachten Berger *et al.* (1991) mit dem Nachweis verminderter Dopamin-Wiederaufnahmestellen nicht nur im ipsilateralen Striatum, dem Ort der Injektion, sondern auch in der ipsilateralen SNpc, Ncl. accumbens und der ventralen tegmental Area (VTA). Bei der intrastriatalen unilateralen Injektion kommt es zur Mitbeteiligung der kontralateralen Seite über Kommissurenfasern, was anhand geringer neurochemischer Alterationen in der kontralateralen SNpc und VTA belegt wurde. Das kontralaterale Striatum zeigt allerdings keine Minderung der Dopamin-Wiederaufnahmestellen (Berger *et al.* 1991).

Sauer und Oertel haben 1994 eine weitere Modifikation dieses Tiermodells publiziert. In diesem Modell, welches für die vorliegende Arbeit ausgewählt wurde, wird eine Woche vor unilateraler, intrastriataler 6-OHDA Injektion bilateral FG in das Striatum von Albino-Wistar-Ratten injiziert. FG ist ein fluoreszierender Neuronenmarker, welcher sich durch einen retrograden axonalen Transport auszeichnet. Bei der gewählten Dosierung (0,2 µl einer 4% FG-Lösung) zeigte sich bei bekanntem neurotoxischem Potential von FG eine lokale, geringe bis mäßige Nekrose im Bereich

der Injektionsstelle (Schmued *et al.* 1993). Das FG/6-OHDA-Modell erlaubt die histologische Beurteilung exakt der Neuronengruppe in der SNpc, welche ihr Projektionsareal im Bereich der Injektionsstelle des 6-OHDA im Striatum hat.

Sauer und Oertel konnten im Vergleich zur Kontrollseite einen 30%igen Verlust dopaminerger FG-positiver Neurone innerhalb von 2 Wochen beobachten, welcher nach 4 Wochen auf 60% und nach 8 Wochen auf 70% ansteigt. Später ist keine weitere Progredienz der Dopaminzelldegeneration in der SNpc festzustellen. Dies ermöglicht es eine Testsubstanz in ihrer Potenz zu beurteilen, diesen über 2 Monate progredienten Untergang dopaminerger Neurone, den progredienten Verlauf des IPS imitierend, zu hemmen oder zu verstärken.

2.2.1.2 Der Wirkmechanismus von 6-OHDA

Für die selektive Schädigung katecholaminerger Neurone durch 6-OHDA ist vermutlich seine strukturelle Ähnlichkeit zu Dopamin verantwortlich (Abb. 7). Dies ermöglicht der Substanz die Aufnahme in Neurone durch selektive Transportmechanismen für Katecholamine.

Bei der Neurotoxizität von 6-OHDA scheint oxidativer Stress ausschlaggebend zu sein. Es konnten *in vitro* (Decker *et al.* 1993; Lotharius *et al.* 1999), sowie *in vivo* direkt und indirekt, anhand von Lipidperoxidationsprodukten, erhöhtem intrazellulärem Kalziumgehalt und erniedrigter Glutathion-Peroxidase, das Aufkommen oxidativen

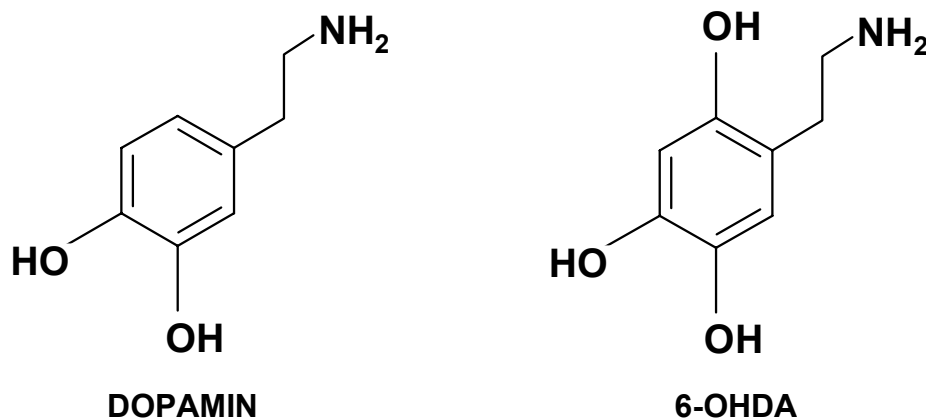


Abb. 7: Strukturformeln von Dopamin und 6-OHDA

Stresses aufgezeigt werden (Perumal *et al.* 1989; Kumar *et al.* 1995).

Vor diesem Hintergrund erscheint die protektive Wirkung von substituierten enzymatischen Antioxidanzien (z.B. SOD, Catalase) (Davison *et al.* 1986; Yamada *et*

al. 1997; Blum *et al.* 2000) und die verminderte Empfindlichkeit von transgenen Mäusen mit einer gesteigerten Expression von Superoxiddismutase und Glutathionperoxidase, beide sind für die Detoxifikation von ROS zuständig, im 6-OHDA-Modell schlüssig (Bensadoun *et al.* 1998; Asanuma *et al.* 1998).

Als Reaktionswege, über die nach 6-OHDA-Gabe oxidativer Stress entsteht, werden die Desaminierung durch MAO mit dem Nebenprodukt Wasserstoffperoxid und die nicht-enzymatische Autooxidation von 6-OHDA resultierend in ROS und anderen toxischen Verbindungen angenommen. *In vitro* konnte unter physiologischen Bedingungen eine rasch ablaufende Autooxidation des 6-OHDA, einhergehend mit der Bildung von Wasserstoffperoxid, Hydroxyl Radikalen und toxischen Substanzen, wie z.B. Chinonen, nachgewiesen werden. Die Potenz der Zytotoxizität von Katecholaminen, im speziellen von 6-OHDA, scheint mit ihrer Autooxidationsrate zu korrelieren (Saner und Thoenen 1971; Heikkila und Cohen 1972; Soto-Otero *et al.* 2000). Eine entscheidende Rolle bei der Initiierung und Unterhaltung der Produktion von ROS scheint dem Vorliegen freien Eisens zuzukommen, welches die Fenton Reaktion katalysiert und bei der Wasserstoffperoxid zu Hydroxylradikalen umgesetzt wird (s. Abb.6). In einigen Arbeiten konnte ein Eisenanstieg in der SNpc und dem Striatum nach 6-OHDA-Gabe festgestellt werden (He *et al.* 1996). Dementsprechend kann durch Eisenchelatoren *in vivo* die 6-OHDA-Wirkung vermindert werden (Ben Shachar *et al.* 1991).

Als Konsequenz des vermehrt aufgetretenen oxidativen Stresses kommt es zur Überlastung der intrazellulären antioxidativen Systeme und durch den daraus entstehenden Überschuss an ROS zu Lipidperoxidation, DNA-Strangbrüchen, Mutationen und strukturellen Veränderungen des Zytoskelettes, was *in vivo* an den Umbauprodukten der einzelnen Zellbestandteile nachgewiesen werden konnte (Blum *et al.* 2001a).

Nachdem Glinka und Youdim in mehreren Studien an isolierten neuronalen Mitochondrien eine Inhibition des Komplexes I der Atmungskette durch 6-OHDA aufzeigten, welche nicht durch Antioxidanzien oder Eisenchelatoren zu beeinflussen ist und daher am ehesten einen von ROS unabhängigen Prozess darstellt, wurde zunächst die Beeinträchtigung der mitochondrialen Funktion als weiterer Schädigungsweg des 6-OHDA angesehen (Glinka und Youdim 1995; Glinka *et al.* 1996). Der Effekt auf die mitochondriale Atmungskette war in diesen Untersuchungen allerdings vollkommen reversibel und an Nervenzellkulturen konnten diese Ergebnisse nicht nachvollzogen werden (Storch *et al.* 2000). Eine Interaktion mit Mitochondrien erscheint trotzdem

nicht unwahrscheinlich, da Lotharius *et al.* (1999) festgestellt haben, dass 6-OHDA in einer Kultur dopaminerger Neurone ein früh kollabiertes mitochondriales Membranpotential, wie es in einigen Paradigmen für Apoptose zu finden ist, bewirkt. Die exakte Interaktion des Toxins mit Mitochondrien und deren Stellenwert im neurotoxischen Mechanismus von 6-OHDA bleibt weiterhin unklar.

2.2.2 Das MPTP (1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine) Modell

Anfang der 80er Jahre entwickelten Drogenabhängige in Kalifornien nach Injektion eines neuen, synthetischen Heroins neben dem gewünschten, euphorisierenden Effekt ein irreversibles Parkinson-Syndrom. Seither ist MPTP, ein Meperidinderivat, welches mit einem Anteil von 2,9% in der Droge nachgewiesen wurde, als parkinsonoidogene Substanz bekannt (Langston *et al.* 1983).

Die induzierte Symptomatik zeigte eine Dominanz der Symptome Akinese und Rigor und konnte durch Gabe von L-DOPA positiv beeinflusst werden (Tetrud *et al.* 1989).

Eine 1979 durchgeführte neuropathologische Untersuchung an einem suizidalen, nach MPTP-Intoxikation an einem Parkinson-Syndrom erkrankten, Heroinabhängigen, erbrachte den Nachweis einer selektiven Zerstörung dopaminerger Neurone der SNpc (Davis *et al.* 1979).

Die für das IPS typische Verminderung des striatalen Dopamingehaltes ist nach initialer Entleerung der Dopaminspeicher ebenfalls kennzeichnend für die neurochemischen Veränderungen nach MPTP-Gabe (Heikkila *et al.* 1984).

Lewy-Körperchen, ein für das IPS charakteristischer neuropathologischer Marker, konnten im Menschen und im Tiermodell nicht sicher nachgewiesen werden. Forno *et al.* (1995) beschrieben zwar eosinophile, neuronale Einschlusskörperchen bei alten mit MPTP behandelten Affen, fanden allerdings keine morphologische und immunhistochemische Übereinstimmung mit Lewy-Körperchen.

Die phenotypische und neuropathologische Ähnlichkeit zum IPS legte die Vermutung nahe, dass der Parkinson-Krankheit ätiologisch zumindest als initiales Ereignis die Exposition eines exo- oder endogenen Neurotoxins mit ähnlichem Wirkmechanismus zugrunde liegen könnte und führte im Weiteren zur Etablierung eines neuen Tiermodells des IPS, welches tiefere Einblicke in die Pathogenese gewähren sollte.

Die zur Parkinson-Symptomatik führende neurotoxische Wirkung von MPTP konnte in nicht menschlichen Primaten, einigen Mausstämmen (z.B. C57Black/6), Hunden, Katzen, Schafen und sogar Goldfischen, allerdings mit unterschiedlicher Suszeptibilität,

zwischen und innerhalb der einzelnen Tierarten, nachvollzogen werden (Zigmond und Stricker 1989; Gerlach *et al.* 1991).

Da MPTP nicht das eigentliche Toxin ist, vermutet man in der artenspezifischen Metabolisierung eine Ursache für die unterschiedliche Empfindlichkeit gegenüber MPTP. Bei den wenig empfindlichen Ratten z.B. findet man im Endothel der Blut-Hirnschranke vergleichsweise hohe MAO-B-Konzentrationen, so dass 1-methyl-4-phenyl-pyridinium-Kation (MPP⁺), das Haupttoxin, diese gar nicht erst überwinden und seine Wirkung cerebral nicht entfalten kann. Hierfür spricht, dass nach direkter intrastriatarer Injektion von MPP⁺ bei Ratten der vollständig ausgeprägte toxische Effekt beobachtet werden kann (Wagner *et al.* 1986).

Das MPTP-C57 Black/6-Maus-Modell scheint für neuroanatomische und neurochemische Untersuchungen praktikabel. Zur Beurteilung behavioraler Aspekte wird allerdings das wesentlich aufwendigere Affen-Modell bevorzugt, da bei Mäusen lediglich eine kurzzeitige akut-toxische Verhaltensänderung (Hypersalivation, Piloerektion, Hypokinesie und epileptische Anfälle) und Beeinträchtigung der lokomotorischen Aktivität, welche sich nach ca. einer Woche rückläufig zeigt (Schmidt und Ferger 2001), zu beobachten ist. Die morphologischen und neurochemischen Veränderungen zeigen etwa ab dem 4. Tag nach MPTP-Exposition keine weitere Progredienz. Es ist sogar eine gewisse Erholung des striatalen Dopamingehaltes und der Anzahl TH-immunreaktiver Neurone festzustellen. Man geht von einem kompensatorischen „Sprouting“ TH-ir Neurone sowie der funktionellen Erholung zuvor inaktiverter „ghost-cells“ aus (Mitsumoto *et al.* 1998).

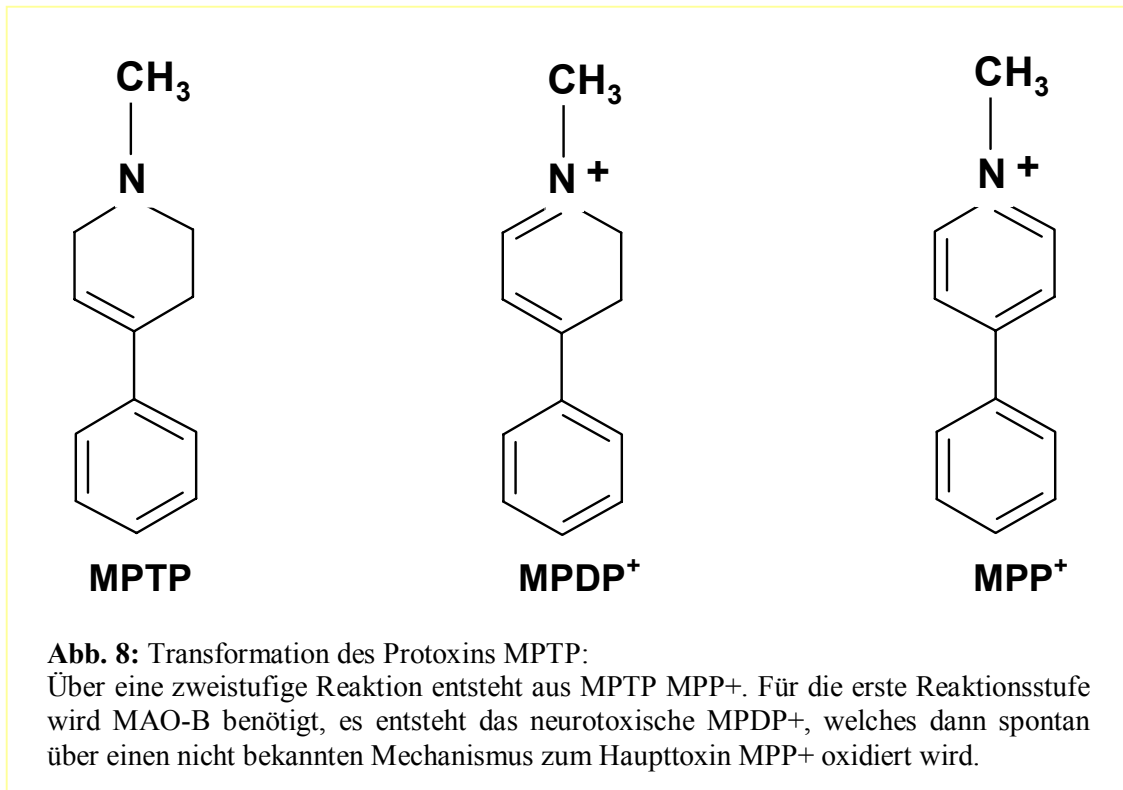
Um dem Verlauf des IPS näher zu kommen, wurden unterschiedlichste Applikationsschemata untersucht. Schmidt und Ferger (2001) haben in ihrem Übersichtsartikel von 2001 diese aus den einzelnen Arbeiten zusammengestellt und den einzelnen Stadien des IPS zugeordnet.

2.2.2.1 Der Wirkmechanismus von MPTP

Ein Großteil der Aktivierungsstufen und des Wirkmechanismus des MPTP ist bekannt. Die Lipophilie der Substanz erlaubt nach systemischer Gabe die rasche Überwindung der Blut-Hirnschranke. Nach Aufnahme in Astrozyten wird es durch MAO-B über das ebenfalls toxische MPDP⁺, welches während seiner Autooxidation die Bildung von Superoxid-Radikalen induziert (Abb. 8) (Zang und Misra 1992), in seinen toxischen Hauptmetaboliten MPP⁺ überführt. Dementsprechend wird nach Gabe selektiver MAO-

B-Hemmer, wie z.B. Selegelin oder Rasagelin, eine Minderung des MPTP-Effektes erreicht (Kupsch *et al.* 2001).

Das geladene Molekül ist nicht in der Lage Zellmembranen spontan zu durchqueren und gelangt daher über extraneuronale Monoamin-Transporter in den Extrazellulärraum



(Russ *et al.* 1991). Es besteht selektive Affinität zu membranständigen Dopamin-, Norepinephrin- und Serotonintransportern, durch welche insbesondere dopaminerge Neurone dem Toxin zugänglich sind. Im Neuron angelangt wird das MPP⁺ nach Aufnahme durch vesikuläre Monoamin-Transporter in synaptosomalen Vesikeln sequestriert. Dort verdrängt es Dopamin, was einen akuten bis zu 60-fachen Anstieg der Dopaminfreisetzung im *Ncl. caudatus* bewirkt und mit Dopamin-induzierter Bildung von Hydroxyl-Radikalen einhergeht. Dies wurde nachgewiesen durch Messung von 2,3-dihydroxybenzoat mittels reverser Mikrodialyse nach systemischer Salicylat-Gabe (Chiueh *et al.* 1992).

Die vesikuläre Lagerung verhindert die toxische Aktivität des MPP⁺, so dass Knock-out-Mäuse für den vesikulären Monoamin-Transporter-2, bei denen das Toxin aus dem Zytosol nicht in die Vesikel der axonalen Terminale aufgenommen werden kann, eine verstärkte Empfindlichkeit gegenüber MPTP Exposition zeigen (Chan *et al.* 1991; Takahashi *et al.* 1997).

Nicht-sequestriertes MPP^+ akkumuliert mitochondrial und entfaltet dort seine neurotoxische Wirkung durch Inhibition des Komplex I der mitochondrialen Atmungskette mit folgender Blockade des Elektronentransportes und somit des Energiehaushaltes. Dies resultiert in einem ATP-Mangel (Nicklas *et al.* 1985; Ramsay *et al.* 1991), welcher zum Verlust des neuronalen und mitochondrialen Membranpotentials, Störung der Kalzium-Homeostase und Bildung reaktiver Sauerstoff-Verbindungen führt (Chan *et al.* 1991; Cosi und Marien 1998).

Obwohl die alleinige Störung der mitochondrialen Funktion die Toxizität des MPP^+ erklären würde, legen einige Untersuchungen eine komplexere und nicht nur Mitochondrien-abhängige toxische Aktivität nahe. So wurde in Rho0-Zellen, welche keine funktionale Elektronentransport-Kette besitzen, ebenfalls Sensitivität gegenüber MPP^+ nachgewiesen (Przedborski und Jackson-Lewis 1998).

Die Reihe der Indizien, die für eine wesentliche Rolle von oxidativem Stress im MPTP-Modell sprechen, ist lang (Ferraro *et al.* 1986; Oishi *et al.* 1993). Unter anderem konnte mittels Salicylat-Hydroxylation-Assay in Kombination mit reverser Mikrodialyse (Schmidt und Feger 2001) und 2',7'-dichlorodihydrofluorescein-diacetat (DCDHF-DA) ROS-abhängiger Fluoreszenz-Sonde (Rossetti *et al.* 1988) der indirekte Nachweis eines vermehrten Aufkommens hochreaktiver Hydroxyl-Radikale nach MPTP-Behandlung erbracht werden.

Nach MPTP Exposition wurde ebenfalls ein Anstieg des freien Eisens in dopaminergen Zellen der SNpc nachgewiesen. Dies triggert wie erwähnt die Fenton Reaktion, bei der Wasserstoffperoxid in Hydroxyl-Radikale umgesetzt wird (Mochizuki *et al.* 1994).

Zusätzlich führt eine MPTP-assoziierte vermehrte Ausschüttung von Glutamat zu einem vermehrten Kalzium-Einstrom und den konsekutiven fatalen Auswirkungen in betroffenen Neuronen unter Beteiligung des resultierenden oxidativen Stresses (s. Kapitel 2.1.3) (Carboni *et al.* 1990).

Eine Anhäufung von NO bewirkt über die Bildung von Peroxynitrit nach Reaktion mit Superoxiden oxidativen Stress. Dies wiederum bedingt die Oxidation und Nitration von Biomolekülen (Beckman und Koppenol 1996; Du *et al.* 2001). Durch weitere Interaktion mit Enzymen der mitochondrialen Atmungskette wird der schon vorhandene Energieverlust noch verstärkt (Radi *et al.* 1991).

Kürzlich durchgeführte Untersuchungen an 3 verstorbenen Patienten und im MPTP-Modell der Maus mit Nachweis perineuronaler Mikroglia lassen auf eine immunologische Beteiligung schließen (Langston *et al.* 1999). Ist die Mikroglia

aktiviert, sezerniert und induziert sie die Bildung zytotoxischer Verbindungen wie z.B. Hydroxyl-Radikale, NO, Glutamat, Zytokine und Tumornekrosefaktor- α (Grunblatt *et al.* 2000).

Zusammenfassend bewirken die beschriebenen neurochemischen Alterationen nach MPTP-Exposition DNS-Schäden, Membranschäden (Lipidperoxidation) und Proteinveränderungen, was dosisabhängig zum Untergang dopaminerger Neurone führt.

2.2.3 Andere Modelle des IPS

Greenamyre *et al.* (1999) beschrieben ein neues Modell des IPS. Sie berichteten über einen chronisch progredienten Untergang dopaminerger Neurone in der SNpc unter intravenöser Applikation von Rotenon mittels Mikropumpe. Rotenon ist ein Pestizid und wirkt über die selektive Hemmung des Komplexes I der mitochondrialen Atmungskette. Die gute Imitation des IPS wurde von den Autoren durch den Nachweis von Lewy-Körperchen-Äquivalenten unterstrichen. Bisher konnte dieses Modell in anderen Labors auf diese Weise nicht erfolgreich repliziert werden, sondern ähnelte dem nicht so selektiv nigralen Läsionsmuster, wie es bei atypischen Parkinson-Syndromen (ähnlich der progressiven supranukleären Blickparese) des Menschen zu finden ist (Höglinger *et al.* 2003).

Des weiteren können Parkinson-Symptome durch Medikamente wie Neuroleptika oder Reserpin induziert werden. Neuroleptika entfalten ihre parkinsonoidogene Wirkung über eine postsynaptische Blockade von Dopaminrezeptoren, vorwiegend in höherer Dosierung (Maickel *et al.* 1974). Reserpin führt zur unselektiven Freisetzung aller monoaminergen Neurotransmitter und interagiert peripher wie zentral mit deren präsynaptischer Wiederaufnahme und vesikulären Speicherung. Dies führt zu einer kurzzeitigen Verminderung dieser Neurotransmitter im synaptischen Spalt, resultierend in Hypokinese, Rigidität und Tremor für eine Dauer von max. 48 h in Ratte und Maus (Colpaert 1987). Die fehlende Degeneration dopaminerger Neurone und die Reversibilität unterscheiden diese Modelle vom humanen IPS.

Neue molekularbiologische Modelle wie z.B. transgene Mäuse, die IPS-assoziiertes [A30P] alpha-Synuclein exprimieren und histopathologisch Lewy-Körperchen-ähnliche Aggregationen zeigen, sind in Entwicklung und gewinnen vermehrt an Relevanz (Kahle *et al.* 2001).

2.3 Aktuelle Therapie

Bedingt durch den Umstand, dass die Ursache(n) der beim IPS auftretenden Degeneration der dopaminergen Neurone noch nicht aufgedeckt werden konnte(n), steht bis heute noch keine kausale Therapie zur Verfügung. Als therapeutische Möglichkeiten steht derzeit eine medikamentös oder operativ symptomatische Therapie zur Wahl (Tab. 1).

Tab.1: Übersicht der Therapiestrategien beim IPS (nach Möller *et al.*, 1999)

Medikamentös:

- a. externe Dopaminbereitstellung: Levodopa
- b. Inhibition des Dopaminabbaus/-metabolismus: COMT-, MAO-B-Inhibitoren
- c. Dopamin Rezeptor Agonisten: Bromocriptin, Pergolid, Lisurid, Apomorphin, Cabergolid, Pramipexol, Ropinirol

Manipulation nicht-dopaminergen Neurotransmitter (z.T. experimentell):

- a. Acetylcholinrezeptor Antagonisten (mit abnehmendem Bedarf im klinischen Alltag)
- b. Glutamaterezeptor Inhibitoren: Amantadin
- c. atypische Antiparkinsonmittel: Budipin

Operativ:

- a. Thermokoagulation
- b. Hochfrequente Tiefenhirnstimulation
- c. Transplantation

2.4 Neuroprotektive/-regenerative Therapieansätze

Die oben genannten heute eingesetzten Therapien vermögen zwar die Symptomatik des IPS zu mildern, die Lebensqualität der Patienten zu verbessern und die Lebenserwartung zu verlängern, dem Verlust der dopaminergen nigralen Neurone und somit dem Fortschreiten der Erkrankung gebieten sie allerdings keinen Einhalt. Die bisher postulierten Pathomechanismen des IPS bieten potentielle Angriffspunkte für eine neuroprotektive/-regenerative Therapie:

- Oxidativer Stress
- Exitotoxizität
- Mitochondriale Dysfunktionen

- Immunologische Faktoren
- Mangel an neurotrophen Faktoren
- Ubiquitin/Proteasomen Funktionsstörung

Trotz der herrschenden Unklarheit darüber, ob diese Prozesse primär oder lediglich sekundär mit dem Krankheitsgeschehen in Zusammenhang stehen, werden sie aktuell rege beforscht. Aufgrund der dem oxidativen Stress anscheinend zukommenden hohen Relevanz in der Pathogenese des IPS wurden Radikalfänger zur Erprobung ihrer potenziell neuroprotektiven Effekte in tierexperimentellen Parkinson-Modellen ausgewählt.

2.4.1 Radikalfänger als neuroprotektiver Therapieansatz des IPS

Wie zuvor aufgeführt spielt laut der aktuellen Forschungsmeinung die Imbalance zwischen aggressiven, prooxidativen Molekülen (z.B. reaktive Sauerstoff Radikale) und protektiven Antioxidanzien (z.B. Superoxiddismutasen, Glutathion) mit konsekutiv vermehrt aufkommendem oxidativem Stress eine Rolle beim progredienten Absterben dopaminerger Neurone im Verlauf des IPS.

Daher bietet sich ein Eingreifen in dieses Gleich- bzw. Ungleichgewicht z.B. mittels Stärkung des protektiven Anteils durch Gabe von Antioxidanzien als neuroprotektivem Therapieansatz an.

Für die vorliegende Arbeit wurden unter Berücksichtigung bereits vorliegender Studien mit Salicylsäure (SS), Trolox[®]-Methyl Ether (Trolox) und Alpha-Phenyl-N-Tert-Butyl Nitron (PBN) drei Substanzen, welche ihre Verträglichkeit, ihr antioxidatives und teilweise auch neuroprotektives Potenzial in anderen Tiermodellen unter oxidativem Stress gezeigt haben, ausgewählt.

2.4.1.1 Salicylsäure = 2-Hydroxybenzoesäure (SS)

2-Hydroxybenzoesäure (Abb. 9) ist in der Weidenrinde (= Cortex Salicis) in Form verschiedener Derivate enthalten und daraus isolierbar. Dem deutschen Chemiker Kolbe gelang 1859 die Synthese der SS. 1897 gelang es dem deutschen Apotheker und Chemiker Hoffmann in seinem Labor aus Salicyl- und Essigsäure die Acetylsalicylsäure (ASS) in reiner und stabiler Form herzustellen (Übersicht bei: Flower, 1974).

Molekulare Formel: C₇ H₆ O₃

Strukturformel:

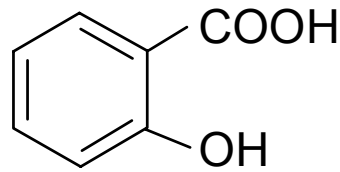


Abb. 9: Salicylsäure = 2-Hydroxybenzoesäure

SS ist die pharmazeutische Stammsubstanz der „Salicylsäuregruppe“ („Salicylate“, z.B. Acetylsalicylsäure, Salicylamid), deren Mitglieder als Analgetika, Antipyretika, Antiphlogistika und (äußerlich) dermatologische Antiseptika und Keratolytika Anwendung finden. Unerwünschte Eigenschaft ist die Schädigung der Magen- und Darmschleimhaut (evtl. Geschwüre, Blutungsneigung).

Für die Wirkung der Salicylate wurde lange nur die nicht selektive Hemmung der Cyclooxygenasen (COX) verantwortlich gemacht. Hier sind zwei Isoformen bekannt, die konstitutive COX1 (Induktion durch physiologische Stimuli) und die induzierbare COX2 (Induktion durch Entzündungsreize), wobei der Hemmung der COX2 mit Unterbrechung der Umsetzung der Arachidonsäure zu Entzündungsmediatoren (Proteasen, Prostaglandine etc.) die schmerzstillende und fiebersenkende Wirkung zugeschrieben wird. Mit der Inhibition von COX1 kommt es ebenso zu einer Unterbrechung der Prostaglandin- I₂ (Prostazyklin), -E₂ und Thromboxan A₂-Synthese. Prostazyklin ist ein Schutzfaktor der Magenschleimhaut, Prostaglandin E₂ führt zur Steigerung der Nierendurchblutung und Thromboxan A₂ ist ein Bestandteil der Blutplättchen und an deren Aggregation beteiligt.

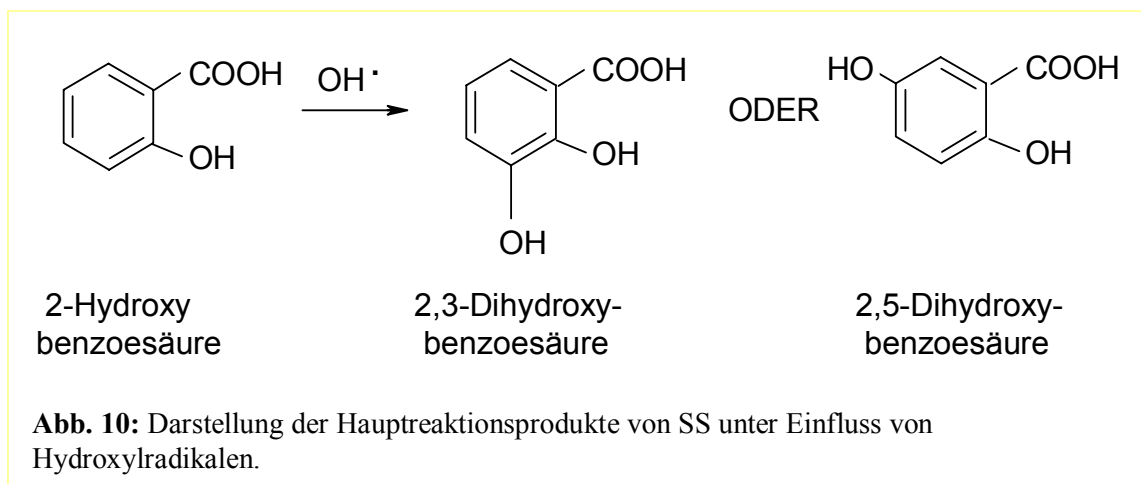
Die unerwünschten Wirkungen mit Schädigungen der Magen- und Darmschleimhaut, mögliche Nierenpapillennekrosen und die therapeutisch genutzte Hemmung der Thrombozytenaggregation sind demnach auf die COX1-Hemmung zurückzuführen (Mitchell *et al.* 1993).

In den letzten Jahren stellte sich heraus, dass die antiinflammatorische Wirkung der Salicylate und auch anderer nichtsteroidaler, antiinflammatorischer Substanzen nicht allein über die Aktivitätshemmung der Cyclooxygenasen erklärt werden kann. So zeigt SS trotz der im Vergleich zu seiner acetylierten Form, dem ASS, zu vernachlässigenden Hemmung der beiden COX-Isoformen, eine vergleichbare antiinflammatorische Potenz.

Davon ausgehend, dass ASS über die Acetylierung der Enzyme seine inhibitorische Wirkung entfaltet, ist der in Studien nicht nachweisbare direkte Effekt von SS auf die Cyclooxygenasen bei fehlender Acetyl-Gruppe nicht unerwartet (Preston *et al.* 1989; Wu 1998).

Auf der Basis unterschiedlicher Studien werden hemmende Effekte der SS auf Transkriptionsfaktoren wie der $\text{rel/NF}\kappa\text{B}$ -Familie, welche die Aktivierung für immunologische Prozesse wichtiger Enzyme modulieren, diskutiert (Kopp und Ghosh 1994).

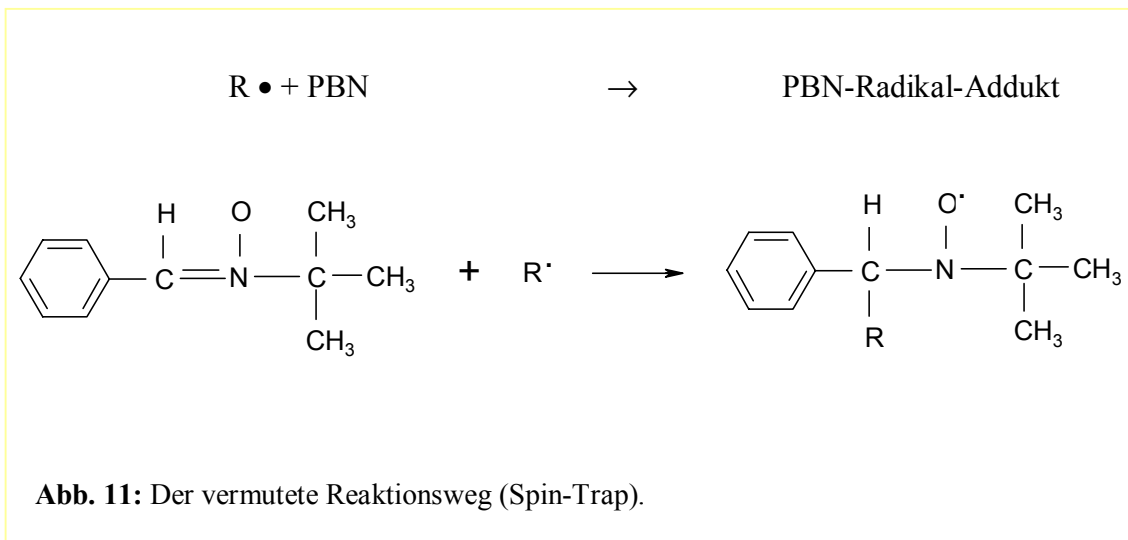
Eine weitere Eigenschaft der SS besteht in der Fähigkeit freie Radikale zu fangen (Abb. 10). Dies ist experimentell sehr gut belegt, und die radikalfangende Aktivität der SS wird sogar zum indirekten Nachweis von Hydroxylradikalen *in vivo* und *in vitro* verwendet. Dabei werden die Reaktionsprodukte 2,3- und 2,5-Dihydroxybenzoesäure (-DHBA), zumeist per HPLC quantifiziert (Grootveld und Halliwell 1986; Floyd *et al.* 1984).



Daten, die *in vivo* im MPTP-Maus-Modell des IPS erhoben werden konnten, und für neuroprotektive Effekte sprechen, werden von den Autoren überwiegend auf diese der SS eigenen Fähigkeit zurückgeführt, oxidativen Stress zu mindern (Aubin *et al.* 1998; Mohanakumar *et al.* 2000). Daher wurde SS für die vorliegende Arbeit als im FG/6-OHDA-Modell der Ratte auf seine neuroprotektive Potenz zu testende Substanz ausgewählt.

2.4.1.2 Alpha-Phenyl-N-Tert-Butyl Nitron (PBN)

PBN ist ein Nitron: Nitrone haben die Eigenschaft, Radikale zu fangen. Bevor PBN aufgrund dieser in tierexperimentellen Studien nachgewiesenen Eigenschaft als Radikalfänger zu Therapiezwecken zum Einsatz kam, wurde es zur quantitativen Bestimmung von freien Radikalen, z.B. mittels Elektronen Spin-Resonanz-Spektroskopie, in der Funktion als „spin-trap“ eingesetzt. Hierbei macht PBN durch Bildung eines stabileren PBN-Radikal-Adduktes den Nachweis besonders kurzlebiger Radikalspezies möglich (Abb. 11).



Wegweisend für weitere Studien war der erfolgreiche erste tierexperimentelle therapeutische Einsatz von PBN in einem cerebralen Ischämie Modell, in vivo an Wüstenrennmäusen. Die untersuchten hippocampalen CA1 Pyramidenzellen, welche auf ischämische Zustände besonders empfindlich reagieren, zeigten nach Vorbehandlung (30 min; PBN 100mg/kg KG) eine deutlich verringerte Schädigung durch die 5-minütige beidseitige Karotisokklusion (Phillis und Clough-Helfman 1990). Die Fähigkeit, mit schnell reagierenden, schädlichen Radikalen stabilere Addukte zu bilden, wird für den zumindest partiellen Schutz in diesem und anderen Modellen der cerebralen Ischämie (transiente globale Ischämie, transiente fokale Ischämie, permanente fokale Ischämie), sowie in einem Modell der Exzitotoxizität an striatalen Neuronen, für welche eine Beteiligung von oxidativem Stress gezeigt werden konnte, verantwortlich gemacht (Oliver *et al.* 1990; Cao und Phillis 1994; Folbergrova *et al.* 1995; Nakao *et al.* 1996).

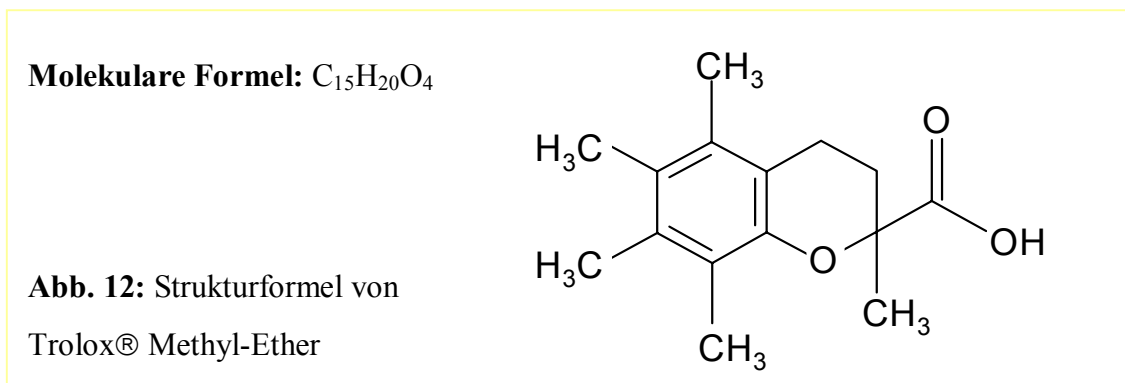
Die Pharmakokinetik von PBN ist gut untersucht. So kommt es nach intraperitonealer Applikation der Substanz zu einem Konzentrationsmaximum im Plasma nach 15

Minuten und nach 30 Minuten im Gehirn. PBN ist Bluthirnschranken-gängig. Bei Gabe von 150mg/kg KG ist die Konzentration im Gehirn sogar signifikant höher als die im Plasma (Chen *et al.* 1990; Cheng *et al.* 1993; Janzen *et al.* 1995).

2.4.1.3 Trolox[®]-Methyl Ether = (S)-6-Methoxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic Acid (Trolox)

Trolox ist eine lipophile Verbindung, welche ein Tocopherol (Vitamin E) Analogon darstellt. Es besteht wie das Tocopherol aus einem Chromanring, besitzt allerdings anstelle einer isoprenoiden Seitenkette eine -COOH-Gruppe.

Das wirksamste unter den Tocopherolen ist das α -Tocopherol. Es ist wie das Trolox durch eine dreifache Methylierung am Chromanring gekennzeichnet (Abb. 12).



Vitamin-E-defiziente Mäuse zeigen auf nigraler Ebene eine erhöhte Suszeptibilität gegenüber MPTP und die kombinierte Vor- und Nachbehandlung mit Vitamin E ergab bei einmaliger Applikation von 40 bzw. 30 mg/kg/KG MPTP in C57 black Mäusen einen positiven Effekt auf den striatalen Dopamingehalt und die verbliebene Anzahl TH-ir Neurone der SNpc (Perry *et al.* 1985; Odunze *et al.* 1990; Lan und Jiang 1997). In einigen Studien wurden Trolox und Vitamin E hinsichtlich ihrer antioxidativen Wirkung vergleichend eingesetzt. Hier zeigte sich eine Überlegenheit des Trolox. Trolox selber fand bisher nur in seiner wasserlöslichen Form in Modellen cerebraler Erkrankungen oder cerebralen oxidativen Stresses Anwendung. In experimentellen Modellen, in denen der dopaminerge Zellschaden in der SNpc in etwa dem Schädigungsmuster des IPS entspricht, wurde Trolox bisher lediglich in Zellkulturen eingesetzt, welche durch MPP⁺-Behandlung geschädigt wurden. Es wurden divergente Ergebnisse gefunden, die von 42% mehr überlebenden mesenzephalen dopaminergen Neuronen im Vergleich zur unbehandelten geschädigten NaCl-Gruppe, über eine Wirksamkeit nur in Kombination mit einem Pancaspaseinhibitor bis hin zu einem

fehlenden Effekt auf den Verlust von TH-ir Neuronen einer humanen Neuroblastomzelllinie reichen (Lee *et al.* 2000; Chun *et al.* 2001; Stull *et al.* 2002). Der in vivo Einsatz von Trolox in einem Parkinsonmodell zur Testung der neuroprotektiven Potenz hat bisher nicht stattgefunden.

2.5 Hypothesen und Ziele der Arbeit

Ziele

Anhand des aktuellen Standes der Forschung zur Pathogenese des IPS wird von einer wesentlichen Beteiligung oxidativen Stresses am Krankheitsgeschehen des IPS ausgegangen. Der langsam progrediente Verlauf der Erkrankung gestattet eine neuroprotektive Therapie, so dass es Ziel der vorgelegten Arbeit ist neuroprotektive Effekte von Radikalfängern in Tiermodellen des IPS nachzuweisen.

Hypothesen

Nullhypothese:

Die für jeden Versuch zu verwerfende Nullhypothese ist der fehlende Effekt eines jeden Radikalfängers auf die auf neurochemischer, histologischer und behavioraler (nur bei MPTP) Ebene durch die Toxingabe erzeugten pathologischen Veränderungen.

FG/6-OHDA

Gerichtete Hypothese:

Die Behandlung mit SS bzw. PBN vermindert den mittels intrastriärer Injektion von 6-OHDA hervorgerufenen Verlust nigraler TH-ir und FG-p Neuronen, und die damit verbundene Reduktion striatalen Dopamins und die folgende Steigerung der striatalen Dopaminumsatzrate.

MPTP

Gerichtete Hypothese

Die Troloxbehandlung führt im MPTP-Maus-Modell zu einer Verminderung der Reduktion des striatalen Dopamingehaltes, des Anstieges des Dopaminumsatzes, des Verlustes von TH-ir Neuronen und zur Normalisierung der lokomotorischen Aktivität.

3 MATERIAL UND METHODEN

Zur Feststellung möglicher neuroprotektiver Effekte von Radikalfängern im IPS wurden zwei anerkannte Tiermodelle verwandt, das chronische FG/6-OHDA-Parkinson-Modell der Ratte und das MPTP-Parkinson-Modell der Maus. Als Radikalfänger fanden SS, PBN sowie Trolox, als einzige fettlösliche Substanz, ihren Einsatz. Eine Quantifizierung der Effekte fand über die Bestimmung relevanter Neurotransmitter im Striatum mittels HPLC (High Performance Liquid Chromatographie), die Erfassung der Anzahl dopaminerger Neurone in der SNpc mittels retrograder FG-Färbung und Tyrosinhydroxylase-Immunperoxidase-Färbung sowie der lokomotorischen Aktivität der Tiere im Versuchsverlauf statt.

3.1 Versuchstiere und Tierhaltung

Für alle Experimente im intrastriatalen FG/6-OHDA Modell der Ratte wurden männliche Wistar-Ratten der Firma Harlan/Winkelmann, Borcheln verwendet. Zu Beginn der Versuche waren die Tiere zwischen 3 und 4 Monate alt und hatten im SS-Versuch ein durchschnittliches Körpergewicht von 280g und im PBN-Versuch von 340g. Die Unterbringung der Ratten fand in einem klimatisierten Tierstall (23°C / 55 ± 5% rel. Feuchte) mit einem 12-stündigen Hell-Dunkel-Rhythmus (07.30 bis 19.30 Uhr: Kunstlicht) statt. Zur Eingewöhnung wurden die Ratten in Gruppen zu jeweils drei Tieren in Plexiglas-Käfigen (Maße: 32x54x13cm) mit Metallgitterabdeckung für 5 Tage untergebracht. Nach der Eingewöhnungsphase wurden die Tiere durch Randomisierung auf die NaCl- und Behandlungsgruppen verteilt. In ihren Käfigen hatten die Versuchstiere freien Zugang zu Standardfutter (Altromin[®]) und Wasser aus der Saugflasche.

Für die Experimente des MPTP-Modells der Maus wurden männliche C57BL/6 Mäuse verwendet. Sie hatten zu Beginn der Versuche ein Körpergewicht von 20-25g und ein Alter von ca. 2 Monaten.

Die Unterbringung und Versorgung und Aufteilung in die unterschiedlichen Versuchsgruppen wurde wie bei den Versuchen im Rattenmodell gehandhabt, fand allerdings räumlich getrennt von diesen und zu je 5 Tieren pro Käfig statt.

3.2 Behandlung

3.2.1 Herstellung und Applikation der Arzneistofflösungen

Alle Arzneistoffe wurden intraperitoneal mittels Einwegspritzen und Einwegkanülen (Firma: Sterican[®]) der Größe 0,45 x 12 mm injiziert.

SS (Tab. 2 A) wurde für die Applikation in 0,9%iger NaCl-Lösung im Verhältnis von 0,01:1 gelöst. Die Injektion erfolgte 2 Wochen vor der 6-OHDA-Läsion und 4 Wochen *post laesionem* einmal täglich vormittags. Lediglich direkt nach der Läsion wurden die Tiere mehrmals täglich mit den oben genannten Dosierungen behandelt. Am Tag der Läsion erhielten die Tiere in der 2., 4. und 8. Stunde nach der Operation eine Injektion. Danach wurde ihnen die Arzneistofflösung noch für 4 weitere Tage 2x täglich verabreicht.

PBN (Tab. 2 A) wurde in 0,9%iger NaCl-Lösung gelöst, in einem Verhältnis von 0,15:1 für die erste und 0,075:1 für die zweite Behandlungsgruppe. Bei diesem Experiment wurde ebenfalls zwei Wochen *pre* und 4 Wochen *post laesionem* einmal täglich behandelt. Aufgrund seiner schlechten Verträglichkeit wurde PBN am Tag der intrastriatalen 6-OHDA-Läsion nicht häufiger als 2x täglich mit den oben genannten Dosierungen verabreicht. Nach dem fünften postoperativen Tag wurde wieder 1x täglich injiziert.

Trolox (Tab. 2 B) wurde für die Applikation aufgrund seiner lipophilen Eigenschaften in Sesamöl im Verhältnis von 150 mg zu 1 ml Öl für die mit täglich 300 mg Trolox behandelte Gruppe und von 100 mg zu 1 ml Öl für die mit täglich 100 mg Trolox behandelte Gruppe gelöst. Die Mäuse wurden zwischen 30 und 35 Minuten, je nach Behandlungsgruppe, vor der Läsion mit MPTP behandelt.

Tab. 2: Dosierungsschema im FG/6-OHDA- (A) und MPTP-Modell (B); (Ø=ohne)

A

Arzneistoff/ Läsion	Behandlungsgruppe 1	Behandlungsgruppe 2	NaCl-Gruppe
SS + 6-OHDA	10 mg	--	NaCl-Lsg. 0,9%
PBN + 6-OHDA	150 mg	75 mg	NaCl-Lsg. 0,9%

B

Arzneistoff/ Läsion	Behandlungsgruppe 1	Behandlungsgruppe 2	NaCl-Gruppe
Trolox + MPTP	300 mg	100 mg	NaCl-Lsg. 0,9%
Trolox Ø MPTP			

3.3 Messung der lokomotorischen Aktivität

Primäres Ziel der Messung war es, die Veränderung der lokomotorischen Aktivität der Tiere in den unterschiedlichen Behandlungs- und NaCl-Gruppen im Zeitverlauf des Versuches festzuhalten um Läsions- und Medikamenteneffekte festzustellen und vergleichen zu können. Zu diesem Zweck wurden die Tiere isoliert einmalig *pre* und *post laesionem* für eine Stunde in eine 47x47x42 cm große PVC-Box zur Messung der lokomotorischen Aktivität gegeben. Um die Aktivität quantifizieren zu können, war jede Box mit 8 horizontalen Lichtschranken ausgestattet (LxB: 4x4 Lichtschranken). Zur Erfassung der Lichtschrankendurchbrechungen diente ein für Nager modifiziertes Marmorsetprogramm (IBM). Das Programm arbeitete mit einer Tastfrequenz von 51 Hz und unterschied zwischen 2 Arten von Lichtschrankendurchbrechungen, zwischen einer schnellen (<5sec) die als count/time registriert wurde und einer langsamen (>5sec) welche als count/place gezählt wurde. Ausgewertet wurden die wöchentlichen count/time Stundenwerte, wobei die Messung vor MPTP-Injektion auf 100% gesetzt wurde und die später erhobenen Daten prozentual zu diesem Wert berechnet wurden.

3.4 Läsionen und Operationen

Im chronischen FG/6-OHDA-Modell der Ratte werden die neuronalen Verbindung zwischen SNpc und Striatum genutzt. Durch das mittels stereotaktischer Operation in das Striatum eingebrachte FG/6-OHDA kommt es über die nigrostriatalen Axone zu einer retrograden Anfärbung/Läsion der nigralen dopaminergen Neurone. Die Läsion zeigt einen progredienten Verlauf über einige Monate.

Die intrastriale FG-Markierung und 6-OHDA-Injektion wurden mit identischen Koordinaten mit einwöchigem Abstand durchgeführt. Zur intraindividuellen Kontrolle fand die Läsion im Gegensatz zur Färbung nur einseitig statt.

MPTP kann aufgrund seiner Eigenschaft, die Bluthirnschranke passieren zu können, systemisch gegeben werden. Die Injektion wurde subcutan in die Nackenfalte der Mäuse appliziert. In diesem Modell erreicht die Läsion ihr Maximum nach einigen Tagen.

3.4.1 Operationsverlauf der retrograden FG-Markierung nigraler DA-Neurone

Die Narkose der Tiere wurde mit 400 mg/kg KG Chloralhydrat, 4%ig in 0,9%iger NaCl-Lösung gelöst, mittels intraperitonealer Injektion durchgeführt. Nachdem durch einen Schmerz- und Druckreiz an einer Hinterpfote eine ausreichende Narkosetiefe festgestellt wurde, konnte das jeweilige Tier am Kopf rasiert und intraural in den stereotaktischen Rahmen eingespannt werden. Der Zahnbalken des Rahmens wurde in der interauralen Linie (TB: +/- 0) fixiert.

Nach Desinfektion des rasierten Kopfes wurde die Schädeldecke freipräpariert und mit einem Schaber von der Knochenhaut befreit, so daß der Referenzpunkt für die stereotaktischen Koordinaten, das Bregma, aufgesucht werden konnte. Das Bregma ist eine charakteristische Suturenkreuzung der Rattenkalotte, wie sie Abb. 13 zeigt.

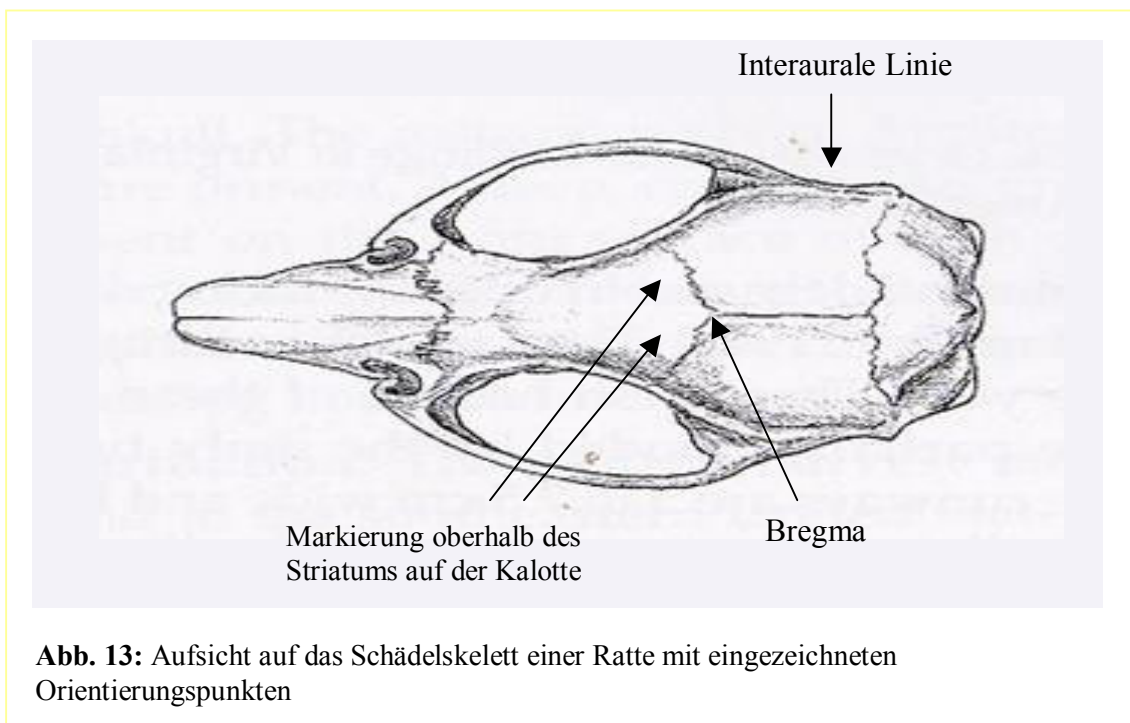
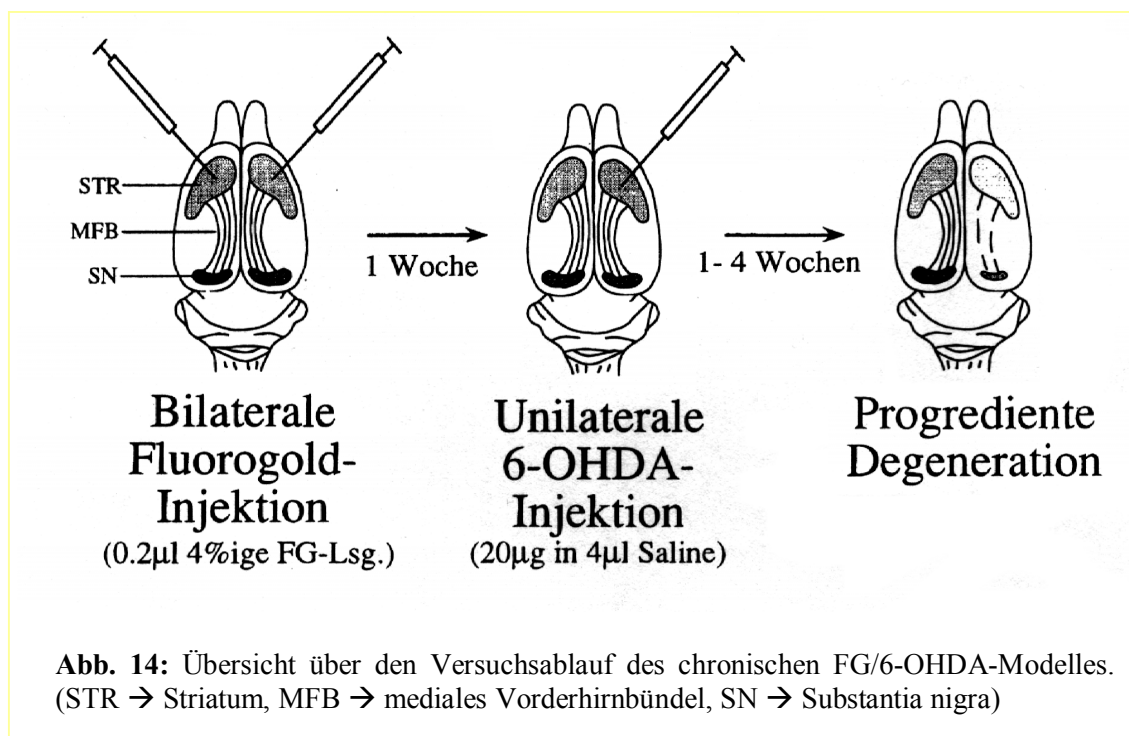


Abb. 13: Aufsicht auf das Schädelskelett einer Ratte mit eingezeichneten Orientierungspunkten

Als Koordinaten für die bilaterale intrastriatale Injektion wurden von Bregma ausgehend anterior/posterior (a/p):+1mm, medial/lateral (m/l): +/-3mm und dorsal/ventral (d/v): -4,5mm, nach dem Stereotaxieatlas der Ratte von Paxinos und Watson (1986), gewählt (vergl. Sauer und Oertel, 1994). An den ermittelten Schnittpunkten auf der Kalotte wurde diese mit einem elektrischen Bohrer punktuell bis zur Dura mater eröffnet. Die Dura diente als Ausgangspunkt für die d/v-Koordinate. An den ermittelten Lokalisationen konnten dann mit einer 1- μ l Hamilton Mikroliterspritze (26-gauge Stahlkanüle) 0,2 μ l des 4%ig in 0,9%igen NaCl-Lösung gelösten FGs (Sauer und Oertel 1994) injiziert werden. Die Injektionsrate betrug 0,05 μ l/30 sec.. Um eine gute Diffusion des FGs zu gewährleisten verweilte die Kanüle insgesamt 10 min intracerebral und wurde dann langsam zurückgezogen. Nachdem der Eingriff beendet war, wurde die Wunde gesäubert und mit Klammern verschlossen.

3.4.2 Operationsverlauf der unilateralen intrastriatalen 6-OHDA-Läsion und bilateralen FG Markierung nigrostriataler DA- Neurone

Eine Woche nach der FG-Markierung erfolgte die intrastriatale 6-OHDA-Läsion der Ratten. Von der Narkose bis zum Ermitteln der Injektionsstelle war das Vorgehen identisch mit dem bei der FG-Markierung. 6-OHDA wurde allerdings nur unilateral ins Striatum injiziert (Abb. 14).



Es wurde das bereits von der FG-Markierung vorhandene Loch in der Kalotte auf der rechten Seite verwendet. Jedes Tier erhielt mittels einer 10- μ l Hamilton Mikroliterspritze (26-gauge Stahlkanüle) 20 μ g 6-OHDA, das in 4 μ l einer 0,9%igen Kochsalzlösung mit 0,2 mg/ml L-Ascorbinsäure gelöst wurde. Die L-Ascorbinsäure diente als Oxidationsschutz. Zwischen den Injektionen wurde die Lösung vor Licht geschützt auf Eis gelagert. Hier betrug die Injektionsrate 0,5 μ l/30 sec. Die Nadel wurde nach 5 min vorsichtig aus dem Gewebe entfernt. Wieder wurde die Wunde gesäubert und mit Klammern verschlossen.

3.4.3 MPTP-Läsion der Maus

Für die Erfassung möglicher neuroprotektiver Effekte von Trolox wurde das MPTP-Modell der Maus gewählt. Dazu wurde MPTP in 0,9%iger NaCl-Lösung gelöst und einmalig mit einer Dosierung von 30 mg pro kg KG subcutan in die Nackenfalte injiziert.

3.5 Dissektion der Gehirne

Alle Ratten erhielten eine tiefe Chloralhydrat-Narkose mit 400 mg pro kg KG. Nachdem die ausreichende Narkosetiefe durch einen Schmerz-Druck-Reiz festgestellt wurde, konnten die Ratten nach cervicaler Dislokation decapitiert werden. Die Kalotte wurde mit einer Knochenzange eröffnet, das Gehirn freipräpariert und in 0,9%iger NaCl-Lösung (auf Eis) gespült. Die weitere Verarbeitung verlief zügig auf einer gekühlten Metallplatte.

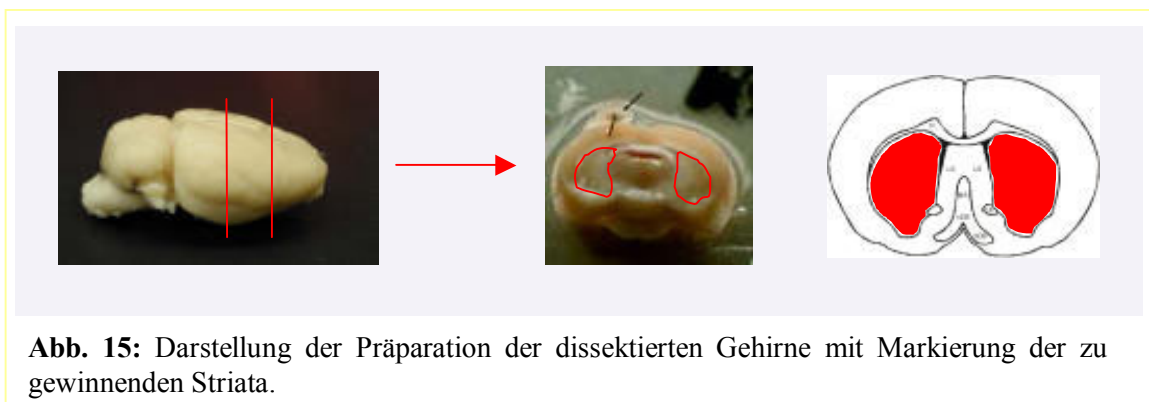


Abb. 15: Darstellung der Präparation der dissektierten Gehirne mit Markierung der zu gewinnenden Striata.

Ca. 2 mm vor und hinter den sichtbaren Einstichen der FG-Markierung und 6-OHDA-Läsion wurde jeweils ein koronarer Schnitt geführt (Abb. 15) und aus der gewonnenen Scheibe das Striatum herauspräpariert.

Das freipräparierte Striatum wurde sofort in flüssigen Stickstoff gegeben und bis zur Auswertung durch HPLC bei -80°C gelagert. Das Restgehirn, ohne Kleinhirn, wurde zur Fixierung für 24 Stunden in eine 4%ige Paraformaldehyd/(0,1M) PB-Lösung gegeben und anschließend in 25%iger Saccharoselösung (in 0,1M PB) dehydriert.

Alle Mäuse wurden cervikal disloziert und dann decapitiert. Auch hier wurde das freipräparierte Gehirn in eisgekühlter 0,9%iger NaCl-Lösung gespült und danach auf einer gekühlten Metallplatte das Striatum präpariert. Da bei den Mäusen nicht die Möglichkeit bestand, sich an Injektionsstellen zu orientieren, wurden die Gehirne mittig mit koronarer Schnittführung zerteilt. Der frontale Teil diente wiederum zur Gewinnung der Striata. Der dorsale Teil der Gehirne wurde wie bei den Ratten für die histologische Auswertung fixiert und dehydriert.

3.6 Elektrochemische Auswertung durch HPLC

Zur Mengenbestimmung der relevanten Katecholamine, Dopamin und DOPAC, in den präparierten Striata diente die elektrochemische Detektion per High Performance Liquid Chromatography (HPLC).

3.6.1 Aufbereitung der Proben

Die freipräparierten und gefrorenen Striata wurden gewogen und in 500 μl 0,4 N Perchlorsäure bei 20000 Umdrehungen/Minute mit einem IKA, Ultra Turrax für eine Minute homogenisiert. Das Homogenisat wurde dann für 15 min bei 5000 Umdrehungen/Minute und einer Temperatur von 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde auf Einwegspritzen aufgezogen und durch einen Filter (Spartan Filter30/B, 0,45 μm , Schleicher und Schuell) in die Vials für den automatischen Probengeber des HPLC-Gerätes gespritzt.

3.6.2 Herstellung der Eichlösung

Zur Ermittlung der benötigten Eichgerade wurde eine Eichlösung mit definierter Zusammensetzung hergestellt. Ein Gemisch aus den zu messenden Katecholaminen wurde durch Verdünnung mit 0,1 N Perchlorsäure auf eine Konzentrationsstufe von 10^{-7}

für jeden Stoff gebracht. Die Eichlösung wurde einmal direkt vor den striatalen Proben und einmal im Anschluß an den Probendurchlauf in den Chromatographen gegeben. Nach der elektrochemischen Detektion fand eine Einpunkt-Eichung statt.

3.6.3 Elektrochemische Messung und Auswertung

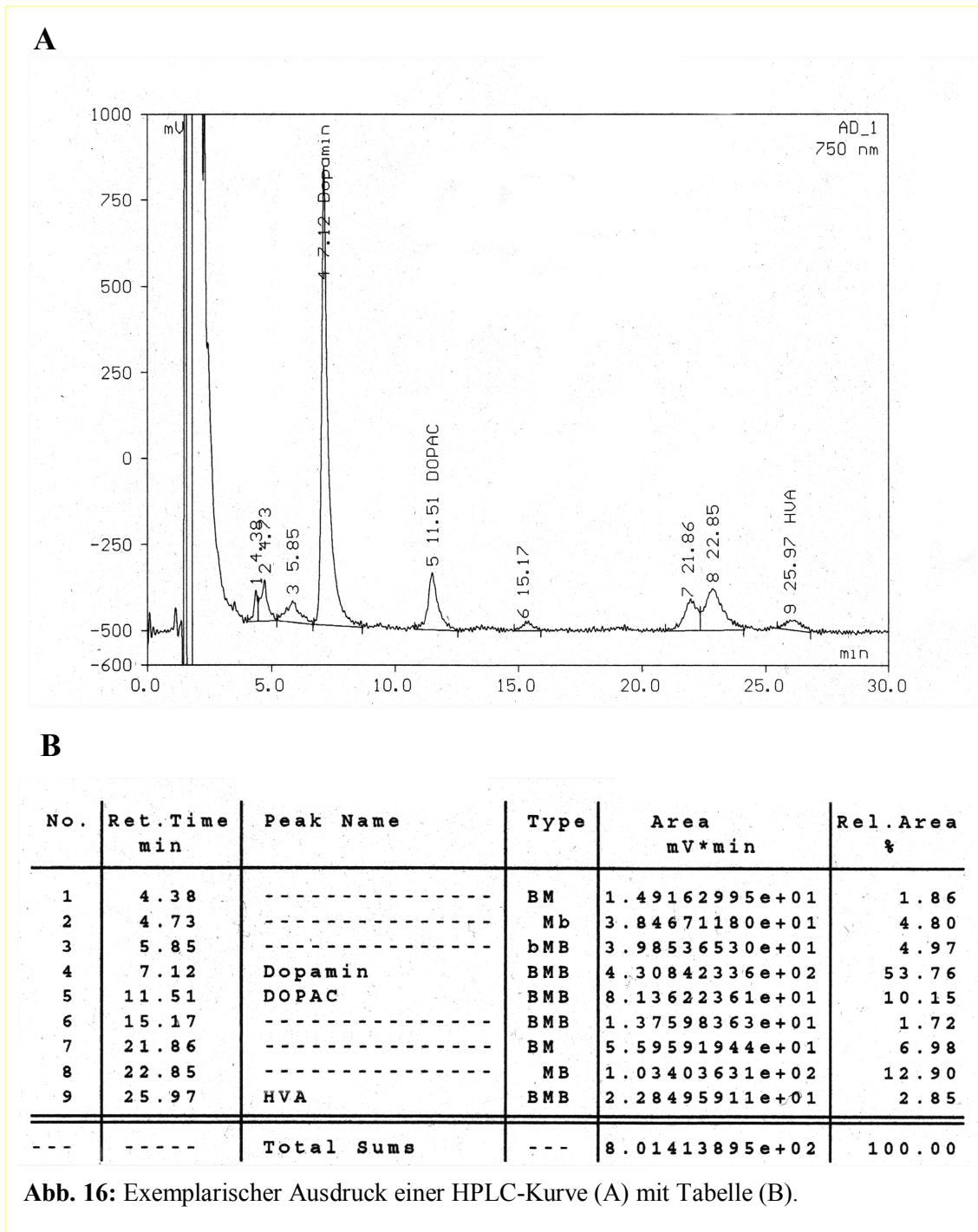


Abb. 16: Exemplarischer Ausdruck einer HPLC-Kurve (A) mit Tabelle (B).

Der Autosampler injizierte jeweils ein Probenvolumen von 10 µl der auf 2°C gekühlten aufbereiteten Striata in die Meßapparatur. Über eine pulsationsfrei arbeitende Doppelkolbenpumpe gelangten die Proben dann mit einer Durchflussrate von 0,5

ml/min in die konstant auf 22° C gehaltene Vor- und Trennsäule. Auf die Auftrennung folgte die elektrochemische Detektion. Hierzu flossen die aufgetrennten Substanzen in der mobilen Phase über die „glassy-carbon“ Elektrode, welche eine konstante Polarisationsspannung von + 750 mV aufwies. Bei Potentialdifferenzen zwischen der Elektrode und dem Potenzial, das zur Elektrolyse der zu analysierenden Proben nötig ist, kommt es dann zu einem Elektronenfluss zum Ort des geringeren Potentials. Dieser Elektronenfluss kann mit Hilfe der Ag/AgCl-Referenzelektrode über Bestimmung des Oxidationspotentials quantifiziert werden. Die Messung fand mit einer Empfindlichkeit von 5 nA/V statt. Hierbei besteht eine direkte Proportionalität zwischen Stromfluss und der Substanzkonzentration in den Proben.

Die Auswertung der registrierten Signale wurde mit einem speziellen IBM-kompatiblen HPLC-Analyseprogramm, Gynkosoft[®], durchgeführt. Hierzu wurden die Referenzwerte aus der Eichung mit den Standardproben benötigt.

Für jedes Katecholamin wurde eine typische Retentionszeit ermittelt, welche es ermöglichte, die Zugehörigkeit der Signalkurven zu den einzelnen Katecholaminen festzustellen (siehe Abb. 16). Die Berechnung erfolgte dann über das Flächenintegral der identifizierten Signalkurven in Bezug zu den aus der Eichung erhaltenen Referenzkurven. Der bestimmte Katecholamingehalt der Proben konnte dann mit dem bei der Aufbereitung gemessenen Gewicht der Striata verrechnet werden. Die ermittelte Konzentration wurde dann in ng/mg Nassgewicht des einzelnen Striatums angegeben.

3.6.4 Bestimmung der Dopaminumsatzrate

Läsionen des dopaminergen nigrostriatalen Systems, die mehr als 2/3 der SNpc betreffen, führen zu einer erhöhten Synthese, Ausschüttung und Metabolisierung von Dopamin in den von der Schädigung nicht erfassten Neuronen. Ein Maß hierfür sind die erhöhten „Level“ von Dopaminmetaboliten im Vergleich zum Dopamingehalt des Striatums (Hefti *et al.*, 1980 und 1985).

Auf dieser Beobachtung basierend wurde zur Beurteilung des Ausmaßes der durch 6-OHDA verursachten Läsion und des Einflusses der Medikation auf diese der Dopaminumsatz im Striatum durch Berechnung des Verhältnisses von DOPAC, dem Hauptmetaboliten des Dopamin, zu Dopamin im Striatum bestimmt:

$$\text{Dopaminumsatzrate} = \text{DOPAC}(\text{ng}/\mu\text{g})/\text{Dopamin}(\text{ng}/\mu\text{g})$$

3.7 Histologie

Zur Überprüfung möglicher neuroprotektiver Effekte von SS und PBN in der SNpc der Ratte wurde auf histologischer Ebene die retrograde Markierung einer Subpopulation DA-Neurone des nigrostriatalen Systems mit FG gewählt, welche es ermöglicht, genau die dopaminerge Neuronengruppe zu erfassen, die durch die retrograde Läsion betroffen ist. Erreicht wurde dies durch die Übereinstimmung der Injektionsstelle von FG und 6-OHDA im Striatum.

Tyrosinhydroxylase (TH) ist ein bekannter Marker für dopaminerge Zellen und das limitierende Enzym der Dopaminsynthese mit spezifischem Vorkommen in dopaminergen Zellen. Diese Färbung erreicht im Gegensatz zur FG-Markierung, welche nur einen Teil der nigralen dopaminergen Neurone markiert, alle vorkommenden dopaminergen Zellen der gefärbten Schnitte, so dass sich diese beiden Färbungen im FG/6-OHDA-Modell der Ratte ergänzen. Es wurde eine Immunperoxidase Färbung zur Darstellung TH-ir Neurone gewählt. Ausschließlich diese Färbung wurde zur histologischen Auswertung der Gehirnschnitte der Mäuse aus dem MPTP-Modell verwendet.

3.7.1 Anfertigung der Gefrierschnitte

Der fixierte und dehydrierte dorsale Teil der dissektierten Gehirne wurde für die Anfertigung der Gefrierschnitte zunächst auf Trockeneis „schockgefroren“, um sie dann mit einem Kryostat in koronarer Ebene mit einer Dicke von 30 µm aufzuschneiden. Die Schnitte der Rattengehirne wurden abwechselnd auf 4 Serien, die der Mäusegehirne auf 3 Serien, aufgeteilt. Die erste Serie der Rattengehirne war für die Zählung der FG-markierten Zellen gedacht und wurde nach dem Schneiden sofort auf Objektträger aufgezogen und nach eintägiger Trockenphase (38°C) mit DePeX eingedeckelt. Bis zur Auswertung wurden die aufgezogenen und gedeckelten Schnitte bei -20°C dunkel gelagert. Die restlichen 3 Serien wurden in Antifreeze bei -20°C bis zu ihrer Weiterverarbeitung gelagert.

3.7.2 Auswertung FG-positiver (FG-p) Neurone der SNpc

Die Zählung der FG-markierten Zellen wurde im Dunkelfeld bei 200-facher Vergrößerung mit einem Fluoreszenzmikroskop mit Epi-illumineszenz bei 330 nm durchgeführt. Pro Gehirn wurden jeweils 3 Schnitte in die Auswertung einbezogen. Das

Kriterium für deren Auswahl war die deutliche Trennung des medialen vom lateralen Anteil der SNpc durch den medialen terminalen Nucleus des akzessorischen optischen Traktes (Abb. 17). Gezählt wurden Zellen, die weiß-bläulich leuchtend fluoreszierten, mindestens einen langen Neuriten oder eine polygonale Gestalt aufwiesen und eine Zellgröße von $90\text{-}100\ \mu\text{m}^2$ nicht unterschritten (vergl. Sauer und Oertel 1994).

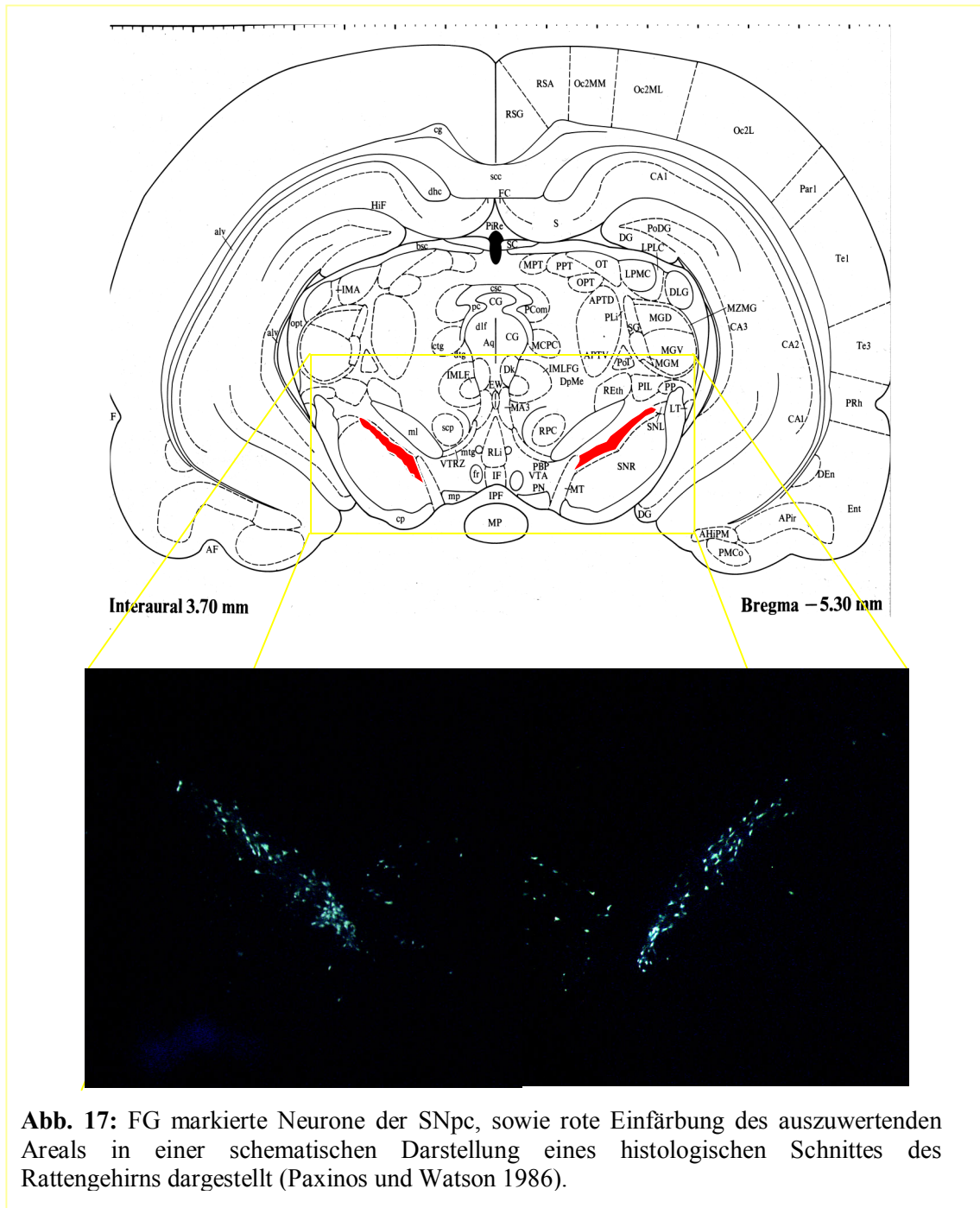


Abb. 17: FG markierte Neurone der SNpc, sowie rote Einfärbung des auszuwertenden Areal in einer schematischen Darstellung eines histologischen Schnittes des Rattengehirns dargestellt (Paxinos und Watson 1986).

Für die Auswertung wurden die Zellzahlen der drei Schnitte eines jeden Gehirns gemittelt. Die erhaltenen Werte wurden wiederum innerhalb der Behandlungs- bzw. NaCl-Gruppen und für die ipsi- bzw. kontralaterale SNpc getrennt gemittelt. Die erhaltenen Zellzahlen der nicht lädierten kontralateralen Seite wurden als 100% gewertet. Die Zellzahlen der lädierten ipsilateralen Seite wurden dazu prozentual ins Verhältnis gesetzt.

3.7.3 Tyrosinhydroxylase-Immunperoxidase Färbung

Grundlage der verwendeten Avidin-Biotin-Färbemethode ist die Fähigkeit des Eiweißglykoproteins Avidin, 4 Moleküle des Vitamins Biotin physikalisch zu binden. Für die Färbung wurden 3 Reagenzien benötigt. Das erste war ein Primärantikörper, welcher spezifisch gegen TH gerichtet ist. Darauf folgte der an den Primärantikörper bindende Sekundärantikörper, welcher mit einem Molekül Biotin konjugiert ist. Als drittes Reagenz wurde ein Peroxidase-konjugierter Avidin-Biotin-Komplex (Abb. 18) benötigt, in welchem drei der vier Bindungsstellen des Avidins von Peroxidase-konjugiertem Biotin besetzt werden. Die vierte Bindungsstelle dockt an das Biotin des Sekundärantikörpers an.

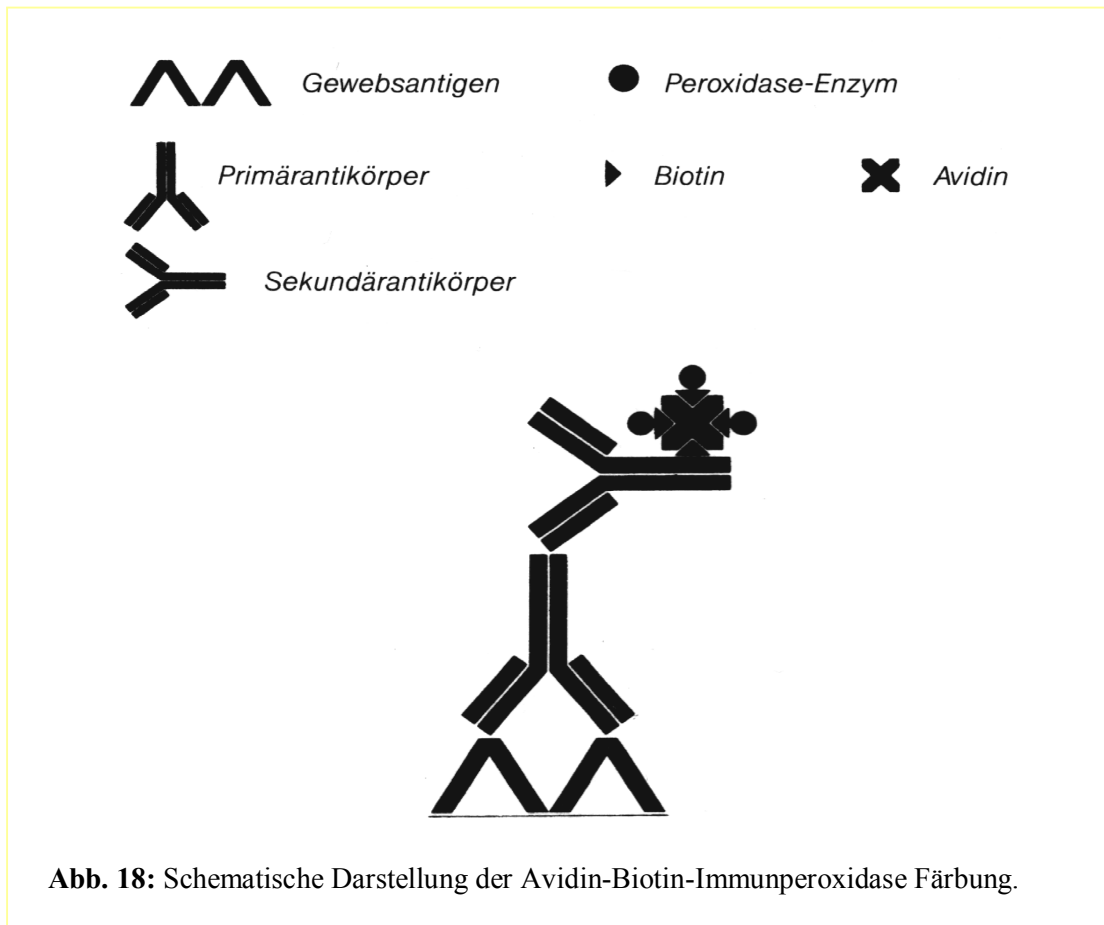


Abb. 18: Schematische Darstellung der Avidin-Biotin-Immunperoxidase Färbung.

Die über die Antikörper an die TH gebundene Peroxidase wurde durch das Chromogen DAB und H_2O_2 angefärbt. H_2O_2 ist das Substrat, mit dem die Peroxidase reagiert. Deshalb wurde vor Beginn der Färbung die endogene Peroxidase, welche vorrangig in Erythro- und Leukozyten vorkommt, mit einem Überschuß (dieser verhindert die für die Färbung nötige Komplexbildung) von H_2O_2 blockiert, um deren Anfärbung zu vermeiden.

Eine unspezifische Hintergrundfärbung könnte durch eine Bindung des

Tab.3: Färbeprotokoll der TH-Immunperoxidase-Färbung.

Arbeitsschritte	Durchführung
Waschen	3x für 10 min in 0.1M PB
Blockierung endogener Peroxidase	10% Methanol+ 3% H_2O_2 in 0.1M PB für 15 min
Waschen	3x für 10 min in 0.1M PB
Präinkubation	5% unspezifisches Pferdeserum in 0.3% Triton/0.1PB für 1h
Primärantikörper	TH-Antikörper 1:4000 in 0.3% Triton/0.1PB für 15-20 h im Kühlschrank
Waschen	3x für 10 min in 0.1M PB
Sekundärantikörper	biotinyliertes Anti-Maus IgG 1:200 in 0.3% Triton/0.1PB für 1 h
Waschen	3x für 10min in 0.1M Phosphatpuffer (PB)
Peroxidase-konjugierter Avidin-Biotin-Komplex	Streptavidin 1:200 in 0.1M PB für 1 h
Waschen	3x für 10 min in 0.1M PB
Färbung	0.05% DAB mit 0.01% H_2O_2 in 0.1M PB für 1-2 min
Waschen	3x für 10 min in 0.1M PB

Primärantikörpers an stark geladene Kollagen- oder Bindegewebelemente zustande kommen. Dies wiederum wurde durch die Behandlung der Schnitte mit Normalserum vom Pferd verhindert, welches Proteine enthält, die an stark geladene Kollagen- oder Bindegewebelemente binden, (Bourne 1997). Die genauen Mengenangaben und Einwirkzeiten sind aus dem Färbeprotokoll (Tab. 3) zu ersehen. Nach dem Aufziehen der Schnitte wurden diese in der Alkoholreihe entwässert und mit DePeX eingedeckelt.

3.7.4 Auswertung TH-ir Neurone der SNpc

Die Anzahl der nigralen TH-ir Neurone wurde mikroskopisch im Hellfeld bei 200-facher Vergrößerung bestimmt. Wie auch bei der FG-Markierung wurden pro Gehirn 3 Schnitte ausgewertet. Die Kriterien zur Auswahl dieser 3 Schnitte stimmten mit denen der FG-Schnitte überein (Abb.19). Auch hier gingen die Zellen in die Wertung ein, die mindestens einen langen Neuriten oder eine polygonale Gestalt aufwiesen und eine Zellgröße von $90-100 \mu\text{m}^2$ nicht unterschritten (vergl. Sauer und Oertel 1994). Die Auswertung der Zellzahlen der TH-ir Neurone wurde wie bei den Zellzahlen der FG-markierten Schnitte gehandhabt.

3.8 Statistische Auswertung

Zur statistischen Auswertung wurde die kommerziell erhältliche Software SPSS 11.0 (SPSS GmbH Software, München) verwandt. Alle Ergebnisse wurden als Mittelwert \pm Standardfehler angegeben.

FG/6-OHDA-Modell der Ratte

Nach der Durchführung einer zweifaktoriellen univariaten Varianzanalyse (ANOVA) für die absoluten Werte mit dem zweistufigen Messwiederholungsfaktor Läsion und dem dreistufigen (PBN) bzw. zweistufigen (SS) Gruppenfaktor Behandlung sowie einer einfaktoriellen, univariaten ANOVA für die relativen Werte (prozentualer Anteil des lädierten zum intakten Striatum) wurden die Residuen mittels Q-Q-Plot-Histogramm auf Normalverteilung geprüft (Heinecke *et al.* 1992).

Bei Vorliegen einer Normalverteilung der Residuen und signifikanter Interaktionseffekte für die Faktoren Läsion und Behandlung wurde als parametrisches post-hoc Verfahren ein ungepaarter, zweiseitiger t-Test durchgeführt, um signifikante Effekte genau zu determinieren. Dies wurde für den Haupteffekt Läsion nicht durchgeführt, da es sich hierbei lediglich um eine Erfolgskontrolle des Tiermodells handelt. Bei Mehrfachvergleichen wurde eine α -Adjustierung nach Bonferroni-Holm durchgeführt (Holm 1979).

MPTP-Modell der Maus

Nach der Durchführung einer zweifaktoriellen univariaten Varianzanalyse (ANOVA) wurden die Residuen ebenfalls mittels Q-Q-Plot-Histogramm auf Normalverteilung geprüft (Heinecke *et al.* 1992). Bei vorliegender Normalverteilung wurde bei signifikantem Interaktionseffekt für die Faktoren Läsion und Behandlung als post-hoc Verfahren im lädierten Arm ein ungepaarter, zweiseitiger t-Test angeschlossen. Dies wurde für den Haupteffekt Läsion nicht durchgeführt, da es sich hierbei lediglich um eine Erfolgskontrolle des Tiermodells handelt. Bei Mehrfachvergleichen wurde eine manuelle α -Adjustierung nach Bonferroni-Holm durchgeführt (Holm 1979).

3.9 Geräte und Substanzen

Arzneistoffe

- FG/6-OHDA-Modell der Ratte:
 - Salicylsäure (Firma: Sigma)
 - N-tert-butyl- α -phenylnitron (PBN) (Firma: Sigma)
- MPTP-Modell der Maus:
 - (S)-TroloxTMmethylether (Firma: Fluka)

Läsionen und Operationen

- FG/6-OHDA-Modell:
 - Chloralhydrat (Firma: J.T. Baker)
 - Fluorogold (FG) (Firma: Fluorochrome)
 - 6-Hydroxydopamin-hydrobromid (6-OHDA) (Firma: Sigma)
 - L-Ascorbinsäure (Firma: Merck)
 - Stereotaxierahmen für Nager (FIRMA: Kopf)
 - Operationsbesteck (Firma: Aesculap)
 - Mikroliterspritze (Firma: Hamilton)
 - Einwegspritzen und -kanülen (Firma: Sterican)
- MPTP-Modell:
 - 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) (Firma: RBI)
 - Einwegspritzen und -kanülen (Firma: Sterican)

Dissektion und Aufbereitung der Gehirne

- FG/6-OHDA und MPTP-Modell:
 - Phosphatpuffer 0,1 M, pH = 7,4:
 - Aqua dest.
 - Na₂HPO₄ (Firma: Merck)
 - NaH₂PO₄ (Firma: Merck)
 - 4%ige Paraformaldehydlösung 1l:
 - Phosphatpuffer 0,1 M
 - Paraformaldehyd: 80 g (Firma: Merck)
 - NaOH: 4 Tropfen
 - 25%ige Saccharose 1l:
 - Phosphatpuffer 0,1 M
 - Saccharose 250 g (Firma: Sigma)

Aufbereitung der Proben für die HPLC und Durchführung

- FG/6-OHDA- und MPTP-Modell:
 - 0,4 N + 0,1 N Perchlorsäure (HClO₄) (Firma: Fluka)
 - Eichlösungen:
 - Dopamin (3,4-Dihydroxyphenethylamin HCl) (Firma: Sigma)
 - DOPAC (3,4- Dihydroxyphenylethylsäure) (Firma: Sigma)
 - Mobile Phase: auf einen Liter
 - 400 mg 2,3 mM 1-Octansulfonsäure(Firma: Sigma)
 - 100 mg 0,1 mM Dinatrium-EDTA (Firma: Riedel-de Haen)
 - 35 ml Acetonitril (Firma: Merck)
 - 6 ml Triethylamin (Firma: Riedel-de Haen)
 - Millipore-Wasser (Firma: Millipore)
 - pH-Wert Einstellung (2,9) mit konz. Phosphorsäure (Firma: Merck)
 - Doppelkolbenpumpe M 300 (Firma: Gynkotec)
 - Degasser A260 (Firma: Carnegie Medicine)
 - automatischer Probengeber Gina 160 mit Kühlung Minichiller (Firma: Gynkotec)
 - STH 585 Säulenofen (Firma: Gynkotec,)
 - Vorsäule: Nucleosil 120-3 C18 5x3mm (Firma: Knauer)
 - Trennsäule: Nucleosil 120-3 C18, Reversed-Phase Vertex Säule mit Nucleosidfüllung 125x3mm (Firma: Knauer)
 - Detector: Amperometric Detector LC-4B, elektrochemischer 2 Kanal Detektor (Firma: BAS)
 - Arbeitselektrode: Glassy Carbon MF 1000 (Firma: BAS)
 - Referenzelektrode: Ag/AgCl RE-4 MF 2021 (Firma: BAS)
 - HPLC-Analyseprogramm Gynkosoft (Firma: Gynkotec)

Histologie

- Substanzen:
 - Phosphatpuffer 0,1 M
 - Antifreeze:
 - Aqua dest.
 - NaH₂PO₄ (Firma: Merck)
 - Na₂HPO₄ (Firma: Merck)

Ethylenglycol (Firma: Merck)

Glyzerin (Firma: Merck)

DePeX (Firma: Serva)

- Normalserum (Firma: DAKO)
- Primärantikörper (Firma: DAKO)
- Sekundärantikörper (Firma: DAKO)
- Avidin-Biotin-Komplex (Firma: DAKO)
- 3,3'-Diaminobenzidin-Tetrahydrochlorid (DAB) (Firma: Sigma)

➤ Geräte:

- Kryostat Frigocut 2800E (Firma: Leica)
- Photomikroskop DMRD (Firma: Leica)

4 ERGEBNISSE

4.1 Neurochemische Untersuchung

Nach Aufbereitung der striatalen Proben (s. Kapitel 3.6.1) wurde die elektrochemische Detektion von DA und DOPAC mittels HPLC durchgeführt, um den Einfluss der getesteten Substanzen auf den striatalen Dopaminverlust und die Dopaminsatzrate nach FG/6-OHDA - und MPTP-Läsion zu quantifizieren.

Rechtes (Seite der Läsion) und linkes (intakte Seite) Striatum wurden für das 6-OHDA-Modell getrennt und für das MPTP-Maus-Modell gemeinsam aufbereitet und ausgewertet. Darüber hinaus wurde als Maß für den Dopaminmetabolismus die Umsatzrate von Dopamin zu DOPAC, welches den Hauptmetaboliten von Dopamin darstellt, errechnet.

4.1.1 Effekte der Läsionen und verwendeten Testsubstanzen auf den striatalen Dopamingehalt

SS im FG/6-OHDA-Modell der Ratte

Zur Beurteilung einer suffizienten einseitigen 6-OHDA-Läsion wurde der absolute striatale DA-Gehalt der lädierten und intakten Striata innerhalb einer Behandlungsgruppe bzw. NaCl-Gruppe miteinander verglichen. Im SS-Versuch konnten hier signifikante Unterschiede festgestellt werden (Tab. 4).

Zur Beurteilung eines Behandlungseffektes wurden einerseits der absolute DA-Gehalt der lädierten Seite und andererseits der relative striatale DA-Gehalt (prozentualer Anteil der lädierten Seite zur Kontrollseite) unter den Gruppen miteinander verglichen.

Im SS-Versuch wurde bei absoluten DA-Werten der lädierten Seite in der mit 10 mg behandelten Gruppe von $5,96 \mu\text{g}/\text{mg} \pm 0,80$ und der NaCl-Gruppe von $3,57 \mu\text{g}/\text{mg}$ in der ANOVA mit einem p-Wert von 0,057 die Signifikanz für Interaktionseffekte knapp verfehlt (Angaben in μg Dopamin/ mg Nassgewicht).

Zum Vergleich des relativen DA-Gehaltes wurden die DA-Werte der intakten Striata auf 100% gesetzt und die Werte der lädierten Seite innerhalb einer Gruppe als prozentualer Anteil zu diesen angegeben. Es lag der relative DA-Gehalt der lädierten zur Kontrollseite im SS-Versuch für die Behandlungsgruppe bei $51,3\% \pm 5,85$ und die NaCl-Gruppe bei $31,5\% \pm 7,81$ (Abb. 20). Die Unterschiede zwischen den beiden Gruppen waren nicht signifikant, wobei in der Varianzanalyse bei einem p-Wert von

0,053 die Signifikanz nur knapp verfehlt wurde und somit zumindest von einem tendenziellen Effekt auszugehen ist.

Tab. 4: DA-Gehalt der Striata im SS-Versuch

	n	intakt ($\mu\text{g}/\text{mg}$)	lädiert ($\mu\text{g}/\text{mg}$)
SS	8	$11,36 \pm 0,48$	$5,96 \pm 0,80$
NaCl	7	$11,06 \pm 0,39$	$3,57 \pm 0,89$

Effekte der einseitigen 6-OHDA-Läsion in Bezug auf den striatalen DA-Gehalt im Seitenvergleich innerhalb der einzelnen Behandlungsgruppen. Angaben in $\mu\text{g}/\text{mg}$ Nassgewicht. Es ergibt sich über sämtliche Gruppen hinweg in der ANOVA für den Haupteffekt Läsion ein hochsignifikanter Effekt ($p = 0,0001$).

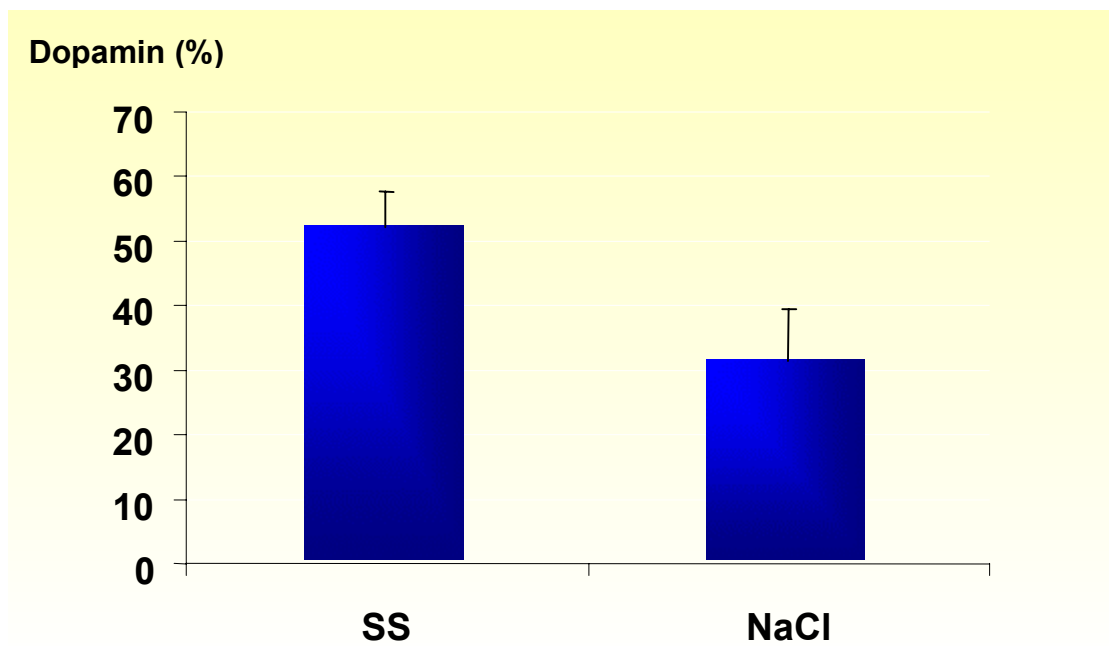


Abb. 20: Einfluss der Behandlung mit SS auf den durch 6-OHDA induzierten striatalen DA-Verlust im Vergleich der Behandlungsgruppen untereinander. Es wurde die Signifikanz mit einem p-Wert von 0,053 knapp verfehlt. Angabe des prozentualen Anteils der lädierten Seite zur intakten (= 100%). ANOVA für den Interaktionseffekt Läsion x Behandlung: kein signifikanter Effekt.

PBN im FG/6-OHDA-Modell der Ratte

Eine suffiziente einseitige 6-OHDA-Läsion wurde anhand signifikanter Unterschiede des absoluten striatalen DA-Gehaltes im Vergleich der lädierten und intakten Striata innerhalb der NaCl-Gruppe gezeigt (Tab. 5).

Im PBN-Versuch lagen die absoluten DA-Werte der lädierten Striata der mit 150 mg PBN behandelten Ratten bei $1,15 \mu\text{g}/\text{mg} \pm 0,41$ und der mit 75 mg behandelten Ratten bei $1,41 \mu\text{g}/\text{mg} \pm 0,37$ im Vergleich zur NaCl-Gruppe mit $0,62 \mu\text{g}/\text{mg} \pm 0,12$. In der durchgeführten Varianzanalyse ergab sich hier mit $p=0,031$ ein signifikanter Interaktionseffekt. Die Einzelgruppenvergleich waren allerdings nach Bonferroni-Adjustierung im post-hoc t-Test nicht signifikant.

Der relative DA-Gehalt der lädierten im Vergleich zur auf 100% gesetzten Kontrollseite lag für die PBN-150-mg-Gruppe im Mittel bei $17,8\% \pm 6,0$, in der PBN-75-mg-Gruppe bei $20,5\% \pm 4,17$ und in der NaCl-Gruppe bei $17,3\% \pm 3,81$ (Abb. 21). Die Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen erwiesen sich in der statistischen Analyse nicht als signifikant.

Tab. 5: DA-Gehalt der Striata im PBN-Versuch

	n	intakt ($\mu\text{g}/\text{mg}$)	lädiert ($\mu\text{g}/\text{mg}$)
PBN 150	8	$6,38 \pm 0,67$	$1,15 \pm 0,41$
PBN 75	8	$6,46 \pm 0,56$	$1,41 \pm 0,37$
NaCl	6	$3,88 \pm 0,43$	$0,62 \pm 0,12$

Effekte der einseitigen 6-OHDA-Läsion in Bezug auf den striatalen DA-Gehalt im Seitenvergleich innerhalb der einzelnen Behandlungsgruppen. Angaben in $\mu\text{g}/\text{mg}$ Nassgewicht. Es ergibt sich über sämtliche Gruppen hinweg in der ANOVA für den Haupteffekt Läsion ein hochsignifikanter Effekt ($p = 0,0001$).

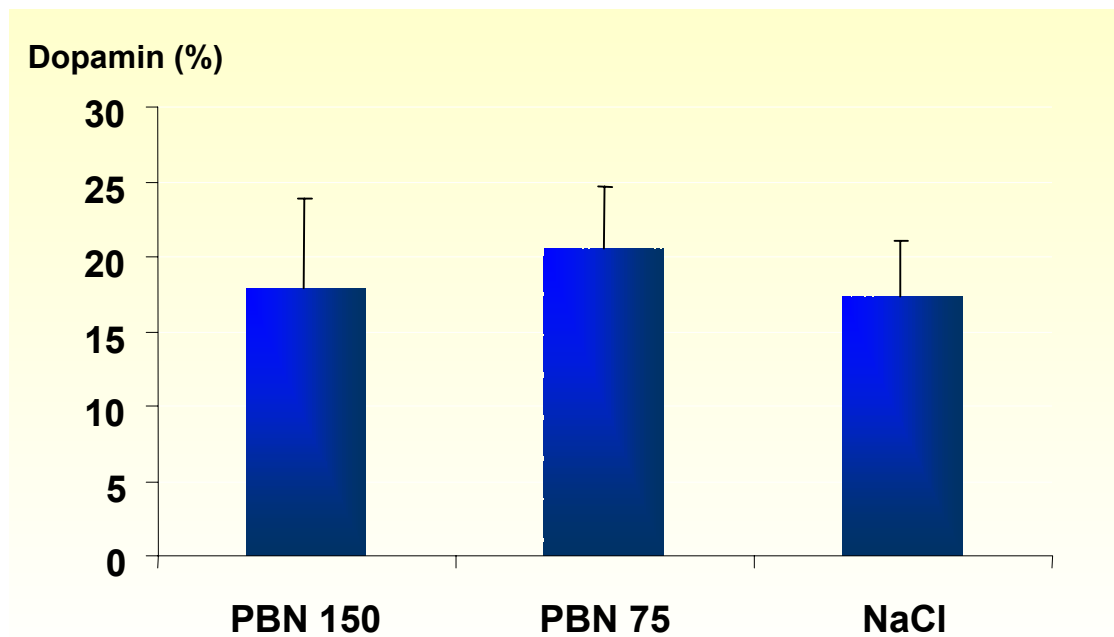


Abb. 21: Einfluss der Behandlung mit PBN auf den durch 6-OHDA induzierten striatalen DA-Verlust im Vergleich der Behandlungsgruppen untereinander. Angabe des prozentualen Anteils der lädierten Seite zur intakten (= 100%). ANOVA für den Interaktionseffekt Läsion x Behandlung kein signifikanter Effekt.

Trolox im MPTP-Modell der Maus

Zur Beurteilung der MPTP-Läsion im Troloxversuch wurden die lädierten und intakten Tiere einer Behandlungsgruppe jeweils in Hinsicht auf den absoluten striatalen Dopamingehalt miteinander verglichen. Hier war ein signifikanter intrastriataler DA-Verlust für alle lädierten Mäuse vs. Kontrollmäuse festzustellen (Tab. 6). Im Vergleich der Behandlungsgruppen und der NaCl-Gruppe der lädierten Mäuse für die absoluten striatalen DA-Werte zur Beurteilung möglicher therapeutischer Effekte in Bezug auf den Verlust des striatalen DA-Gehaltes bildeten sich die Werte in der Reihenfolge Trolox 300 mg > Trolox 100 mg > NaCl ab. Es konnten in der zweifaktorielle ANOVA hinsichtlich des Interaktionseffektes zwischen Läsion und Behandlung allerdings keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden (Abb. 22).

Tab. 6: DA-Gehalt der Striata im Troloxversuch

	n	Dopamin
T 300 - MPTP	10	5,42 ± 0,52
T 300 - NaCl	10	14,39 ± 0,48
T 100 - MPTP	10	4,37 ± 0,75
T 100 - NaCl	10	14,85 ± 0,67
NaCl - MPTP	10	3,84 ± 0,76
NaCl - NaCl	10	14,46 ± 0,47

Effekte der MPTP-Läsion auf den absoluten striatalen DA-Gehalt im Troloxversuch im Vergleich der lädierten zu den intakten Mäusen innerhalb einer Behandlungsgruppe. Angaben in $\mu\text{g}/\text{mg}$ Nassgewicht. Es ergibt sich über sämtliche Gruppen hinweg in der ANOVA für den Haupteffekt Läsion ein hochsignifikanter Effekt ($p < 0,0001$).

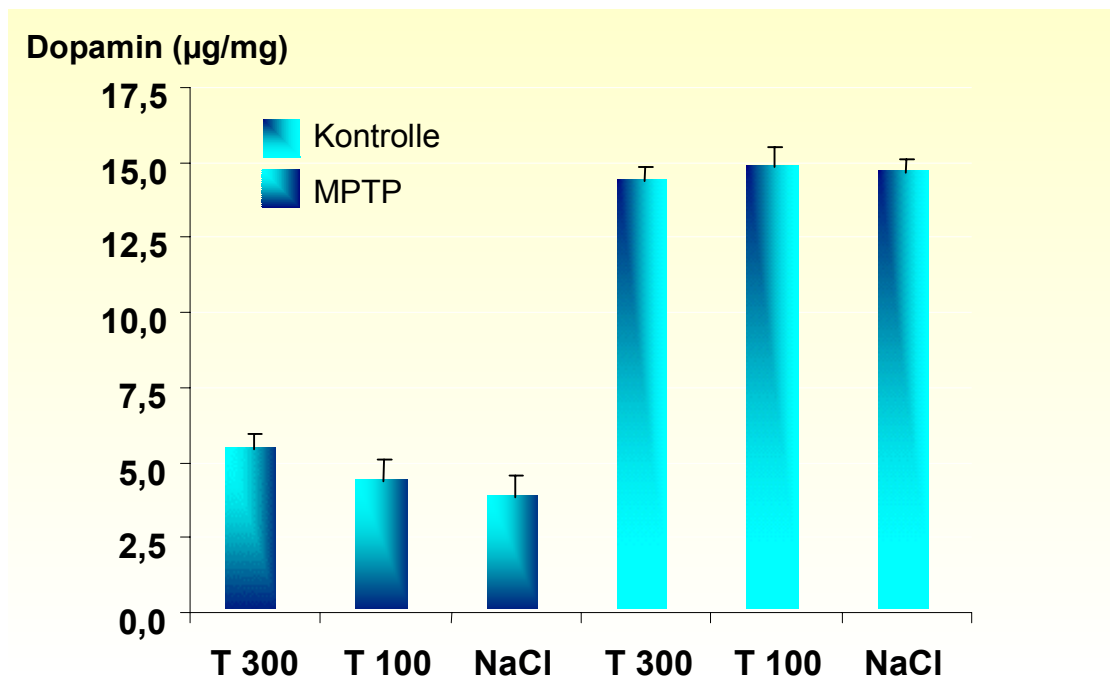


Abb. 22: Einfluss von Trolox auf den durch die MPTP-Läsion induzierten Verlust an striatalem Dopamin im Vergleich der Behandlungsgruppen untereinander. Angaben in $\mu\text{g}/\text{mg}$ Nassgewicht; ANOVA für den Interaktionseffekt Läsion x Behandlung nicht signifikant.

4.1.2 Effekte der Läsionen und verwendeten Testsubstanzen auf die striatale Dopaminumsatzrate (DOPAC/Dopamin)

SS im FG/6-OHDA-Modell der Ratte

Als Maß für die Dopaminumsatzsteigerung nach partieller Läsion des nigrostriatalen Systems wurde das Verhältnis des Metaboliten DOPAC, zur Dopaminkonzentration bestimmt (s. Kapitel 3.6.4). Es wurden die absoluten Werte innerhalb der Gruppen zur Beurteilung der Läsion verglichen. Es ergab sich im SS- in der ANOVA mit $p < 0,001$ für den Haupteffekt Läsion ein hoch signifikanter Effekt (Tab. 7).

Die Effekte der Medikation auf den Dopaminumsatz wurden durch den Vergleich der relativen Umsatzrate unter den Gruppen beurteilt. Hierfür wurden wiederum die Werte der intakten Striata auf 100% gesetzt und die Werte der lädierten Seite innerhalb einer Gruppe als prozentualer Anteil zu diesen angegeben. So lag der relative Dopaminumsatz in der mit SS behandelten Gruppe mit $128\% \pm 15$ zwar unter dem der NaCl-Gruppe mit $166\% \pm 14$, dieser Unterschied war allerdings nicht signifikant (Abb. 23).

Tab. 7: Dopaminumsatz im SS-Versuch

	n	intakt	lädiert
SS	8	$0,10 \pm 0,01$	$0,13 \pm 0,01$
NaCl	7	$0,10 \pm 0,01$	$0,16 \pm 0,01$

Effekte der einseitigen 6-OHDA-Läsion auf den striatalen Dopaminumsatz im Seitenvergleich innerhalb der einzelnen Behandlungsgruppen. Angaben in $\mu\text{g}/\text{mg}$ Nassgewicht; Es ergab sich über sämtliche Gruppen hinweg in der ANOVA für den Haupteffekt Läsion ein hochsignifikanter Effekt ($p = /< 0.001$).

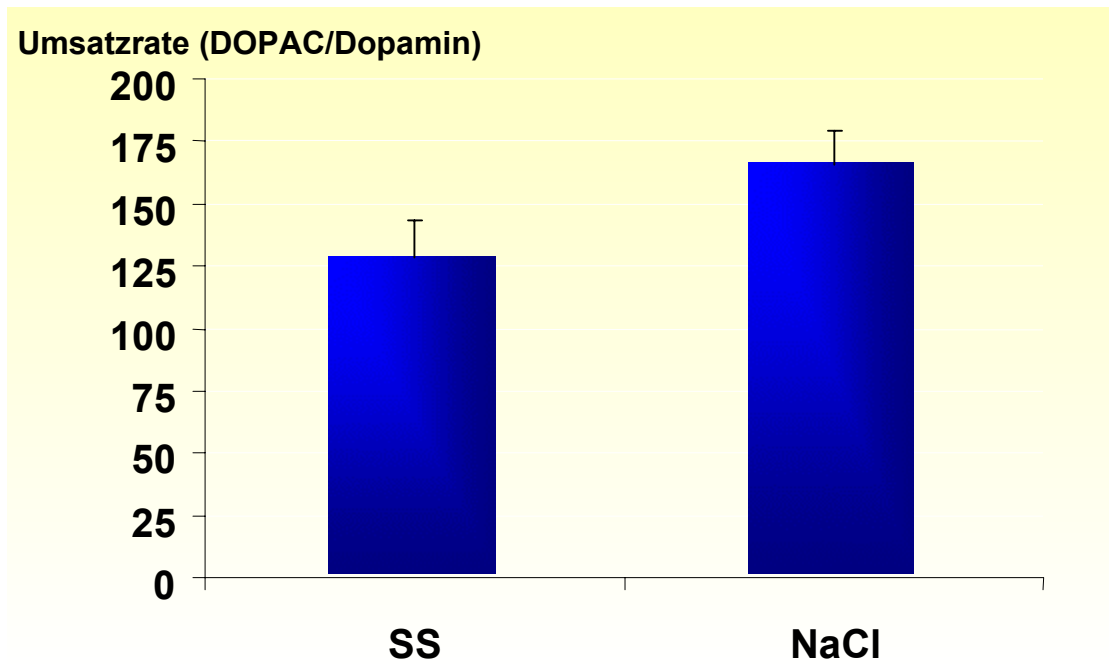


Abb. 23: Einfluss der Behandlung mit SS auf die durch 6-OHDA induzierte striatale Zunahme des Dopaminmetabolismus im Vergleich der Behandlungsgruppen untereinander. Angabe der lädierten Seite prozentual zur intakten (= 100%). ANOVA für den Interaktionseffekt Läsion x Behandlung: nicht signifikant.

PBN im FG/6-OHDA-Modell der Ratte

Auch im PBN-Versuch zeigte sich für die Dopaminumsatzrate in der ANOVA mit $p < 0,001$ für den Haupteffekt Läsion ein hoch signifikanter Effekt (Tab. 8).

Hinsichtlich der Effekte der Medikation auf den Dopaminumsatz zeigten sich im PBN-Versuch mit einer relativen Dopaminumsatzrate von $309 \% \pm 52$ für die PBN-150 Gruppe, $229 \% \pm 38$ für die PBN-75 Gruppe und $327 \% \pm 42$ für die NaCl-Gruppe ebenfalls keine signifikanten Unterschiede (Abb. 24).

Tab. 8: Dopaminumsatz im PBN-Versuch

	n	intakt	lädiert
PBN 150	8	0,14 ± 0,01	0,43 ± 0,07
PBN 75	8	0,13 ± 0,01	0,29 ± 0,04
NaCl	6	0,16 ± 0,011	0,51 ± 0,07

Effekte der einseitigen 6-OHDA-Läsion auf den striatalen Dopaminumsatz im Seitenvergleich innerhalb der einzelnen Behandlungsgruppen. Angaben in $\mu\text{g}/\text{mg}$ Nassgewicht; Es ergab sich über sämtliche Gruppen hinweg in der ANOVA für den Haupteffekt Läsion ein hochsignifikanter Effekt ($p = /< 0.001$).

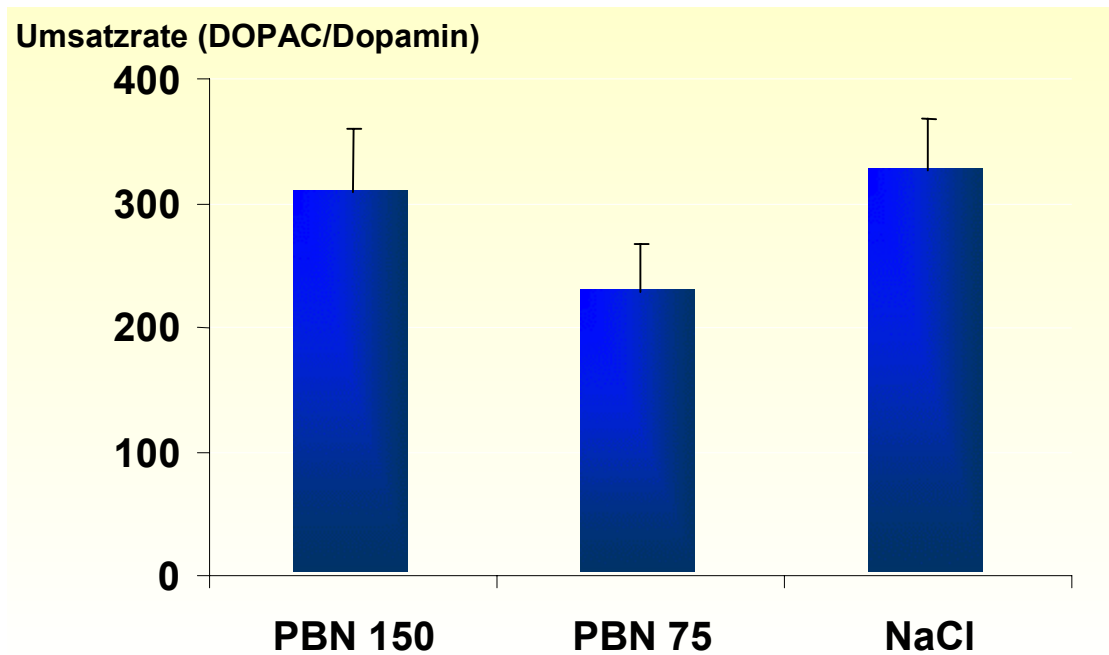


Abb. 24: Einfluss der Behandlung mit PBN auf die durch 6-OHDA induzierte striatale Zunahme des Dopaminmetabolismus im Vergleich der Behandlungsgruppen untereinander. Angabe der lädierten Seite prozentual zur intakten (= 100%). ANOVA für den Interaktionseffekt Läsion x Behandlung nicht signifikant.

Trolox im MPTP-Modell der Maus

Zur Beurteilung der MPTP Läsion und der Effekte der Behandlung auf den Dopaminmetabolismus wurde auch im Maus-Modell der DOPAC/Dopamin-Quotient der einzelnen Gruppen bestimmt und verglichen.

Als Ausdruck der Läsion fand sich bei den mit MPTP geschädigten Mäusen ein hoch-signifikanter Anstieg des Dopaminumsatzes mit $p < 0,001$ in der ANOVA (Tab. 9).

Der zur Veranschaulichung eines möglichen therapeutischen Effektes durchgeführte Vergleich der lädierten Mäuse in den unterschiedlichen Behandlungsgruppen mittels ANOVA erbrachte für den Interaktionseffekt Behandlung x Läsion keine signifikanten Unterschiede (Abb. 25).

Tab. 9: Dopaminumsatz im Troloxversuch

	n	Dopaminumsatz (DOPAC/Dopamin)
T 300 - MPTP	10	0,13 ± 0,01
T 300 - NaCl	10	0,07 ± 0,005
T 100 - MPTP	10	0,12 ± 0,01
T 100 - NaCl	10	0,08 ± 0,005
NaCl - MPTP	10	0,12 ± 0,01
NaCl - NaCl	10	0,08 ± 0,005

Effekte der MPTP-Läsion auf den absoluten Dopaminumsatz im Troloxversuch, im Vergleich der lädierten zu den intakten Mäusen einer Behandlungsgruppe. Hier ergab sich über sämtliche Behandlungsgruppen hinweg in der ANOVA für den Haupteffekt Läsion ein hoch signifikanter Effekt ($p < 0.0001$).

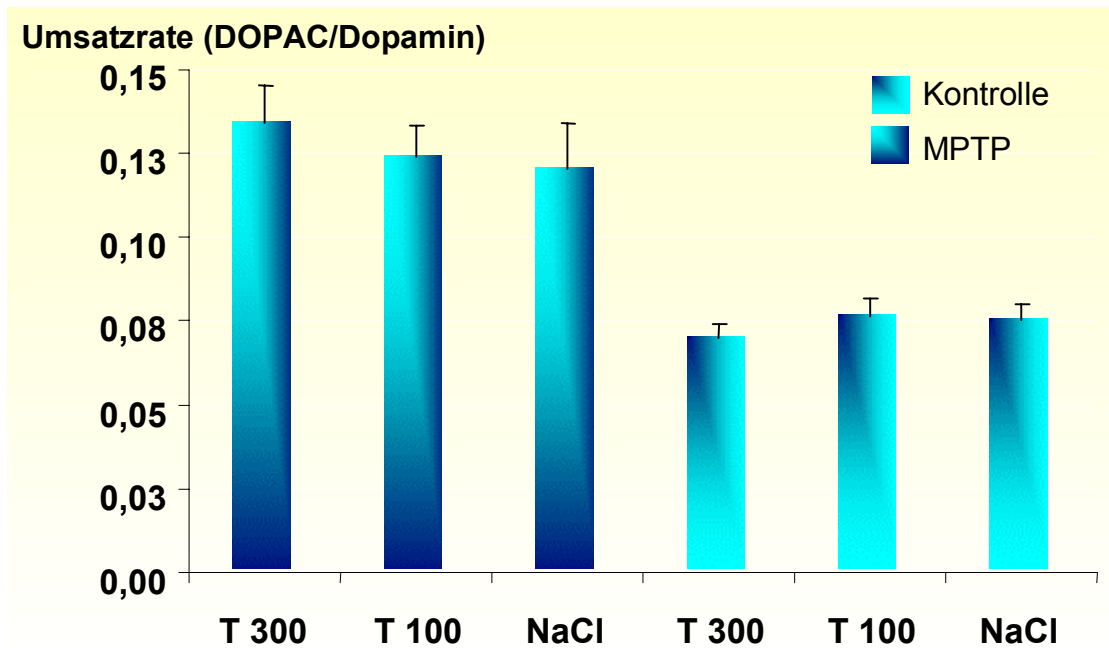


Abb. 25: Einfluss von Trolox auf den durch die MPTP-Läsion induzierten Anstieg des Dopaminumsatzes im Vergleich der Behandlungsgruppen untereinander. Unter den lädierten Mausgruppen war kein signifikanter Effekt auszumachen. ANOVA für den Interaktionseffekt Läsion x Behandlung nicht signifikant.

4.2 Histologie

Die histologische *post mortem* Auswertung der Ratten- und Mäusegehirne fand einerseits durch Erfassung der FG-p und andererseits der TH-ir Zellen in der SNpc statt (zur Anfertigung und Auswertung der Schnitte siehe Kapitel 3.7). Wie auch in der Auswertung des DA-Gehaltes wurde bei den Rattengehirnen rechtes und linkes Striatum getrennt und bei den Mäusen die Striata beider Seiten gemeinsam ausgewertet.

4.2.1 Effekte der Läsion und verwendeten Testsubstanzen auf die Anzahl der FG-p Neurone in der SNpc

SS im FG/6-OHDA-Modell der Ratte

Durch die Auswertung der FG-p Neurone in der SNpc wurde die Population dopaminerg, nigraler Neurone, welche durch die 6-OHDA Läsion erreicht wurde sowie die intakte Vergleichspopulation der kontralateralen Seite, erfasst.

In allen ausgezählten Schnitten war die Anzahl FG-p Neurone der SNpc der lädierten Seite im Vergleich zur intakten Seite niedriger. In der statistischen Auswertung war dieser Zellverlust auf der lädierten Seite in allen Behandlungs- und NaCl-Gruppe hoch signifikant (Tab. 10).

Zum Vergleich der einzelnen Gruppen untereinander wurden für jeden Versuch die FG-p Neurone der intakten Striata auf 100% gesetzt und die Werte der lädierten Seite innerhalb einer Gruppe als prozentualer Anteil hierzu angegeben. Bei relativen Zellzahlen von $19,6\% \pm 2,6$ für die mit 10 mg SS behandelte Gruppe und $10,6\% \pm 3,4$ für NaCl-Gruppe wurde die Signifikanz mit $p = 0,052$ knapp verfehlt (Abb. 26).

Tab. 10: Anzahl FG-p Neurone der SNpc im SS Versuch

	n	intakt	lädiert
SS	8	$65,00 \pm 5,72$	$12,79 \pm 2,09$
NaCl	7	$64,48 \pm 5,80$	$5,86 \pm 1,32$

Effekte der einseitigen 6-OHDA-Läsion in Bezug auf die Anzahl FG-p Neurone im Seitenvergleich innerhalb der einzelnen Behandlungsgruppen. Es zeigte sich in der ANOVA über alle Gruppen hinweg für den Haupteffekt Läsion ein hochsignifikanter Unterschied. ANOVA für den Haupteffekt Läsion ($p < 0.0001$).

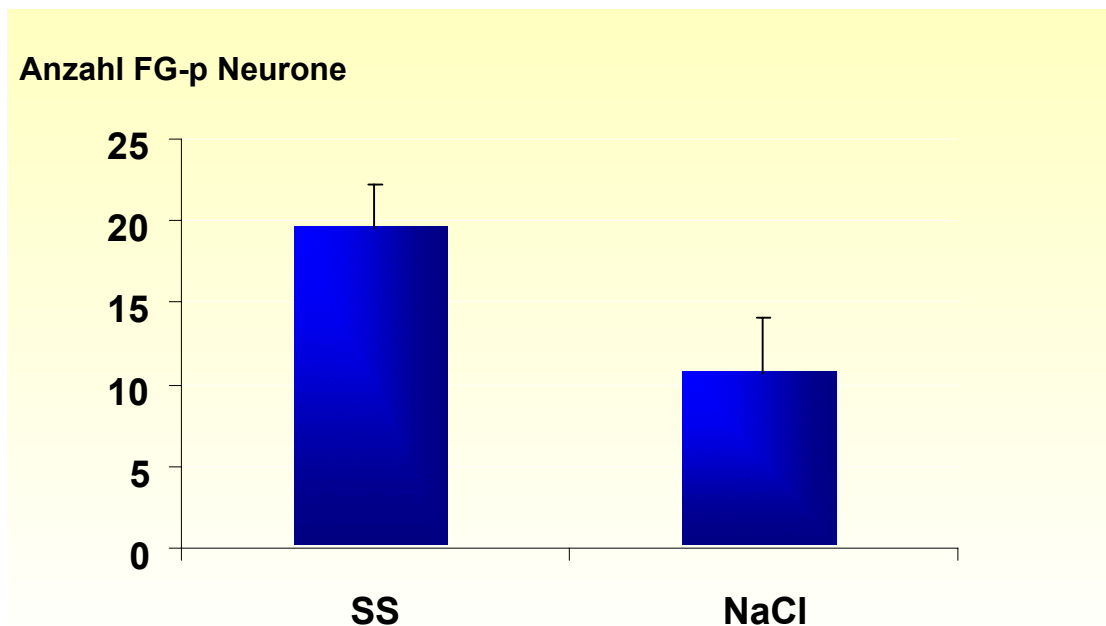


Abb. 26: Einfluss der Behandlung mit SS auf den durch 6-OHDA induzierten nigralen Verlust an FG-p Neurone. Unter der Behandlung mit SS wurde mit $p=0,052$ ein signifikanter Interaktionseffekt Läsion x Behandlung knapp verfehlt. Angabe der lädierten Seite prozentual zur intakten (= 100%). ANOVA für den Interaktionseffekt Läsion x Behandlung: nicht signifikant.

PBN im FG/6-OHDA-Modell der Ratte

In allen ausgezählten Schnitten war die Anzahl FG-p Neurone der SNpc der lädierten Seite im Vergleich zur intakten Seite niedriger. In der statistischen Auswertung war dieser Zellverlust auf der lädierten Seite in allen Behandlungs- und NaCl-Gruppe in der ANOVA hoch signifikant (Tab. 11).

Beim Vergleich der relativen FG-p Zellzahlen war mit PBN 150: $11,68\% \pm 1,77$; PBN 75: $15,65\% \pm 3,12$; NaCl: $12,67\% \pm 1,71$ kein signifikanter oder tendenzieller Unterschied auszumachen (Abb. 27).

Tab. 11: Anzahl FG-p Neurone der SNpc im PBN-Versuch

	n	intakt	lädiert
PBN 150	8	$53,83 \pm 2,89$	$6,21 \pm 0,87$
PBN 75	8	$49,25 \pm 3,56$	$7,21 \pm 1,25$
NaCl	6	$54,8 \pm 3,14$	$6,83 \pm 0,74$

Effekte der einseitigen 6-OHDA-Läsion in Bezug auf die Anzahl FG-p Neurone im Seitenvergleich innerhalb der einzelnen Behandlungsgruppen. Es zeigte sich in der ANOVA über alle Gruppen hinweg für den Haupteffekt Läsion ein hochsignifikanter Unterschied. ANOVA für den Haupteffekt Läsion ($p < 0.0001$).

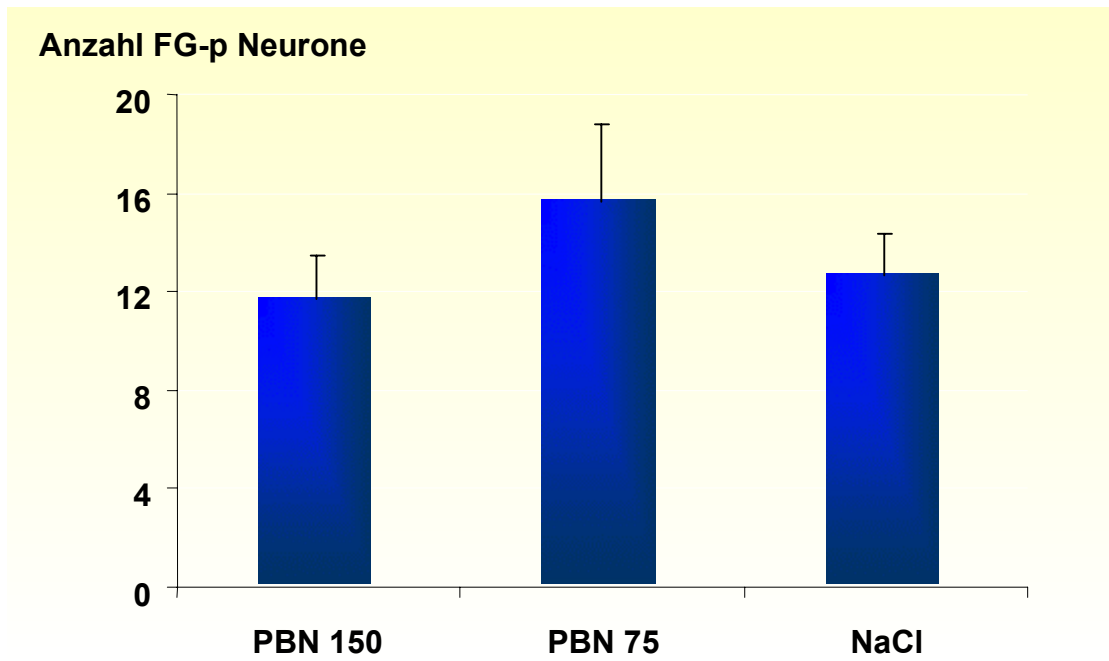
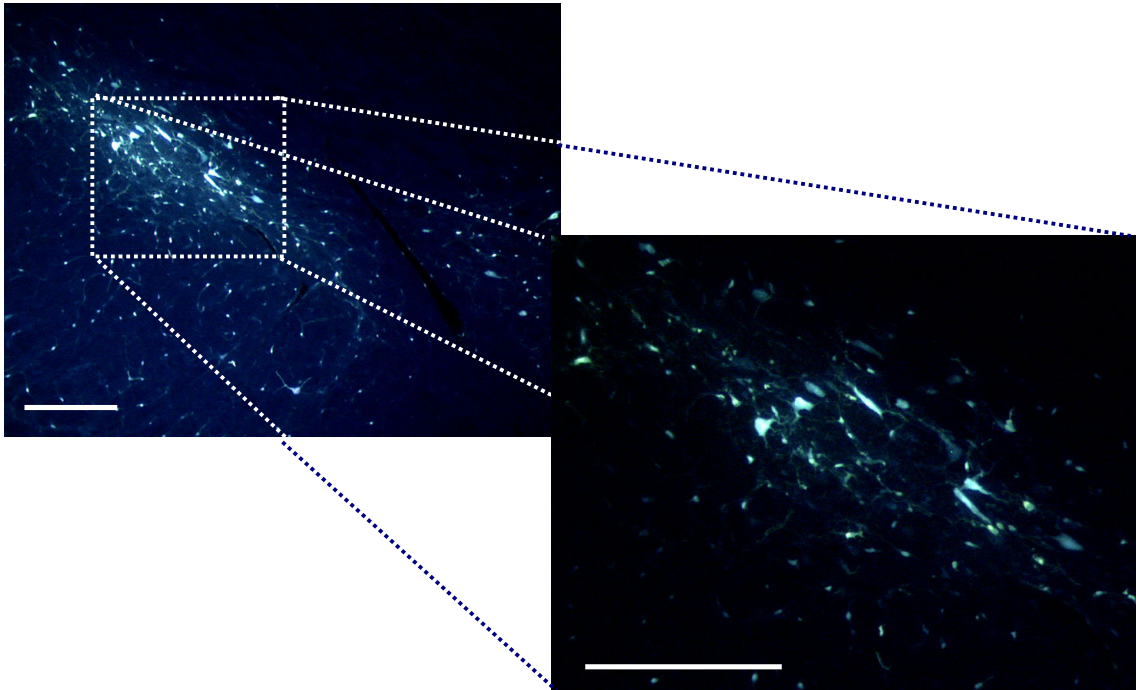


Abb. 27: Einfluss der Behandlung mit PBN auf den durch 6-OHDA induzierten nigralen Verlust an FG-p Neurone. Angabe der lädierten Seite prozentual zur intakten (= 100%). ANOVA für den Interaktionseffekt Läsion x Behandlung: nicht signifikant.

A



B

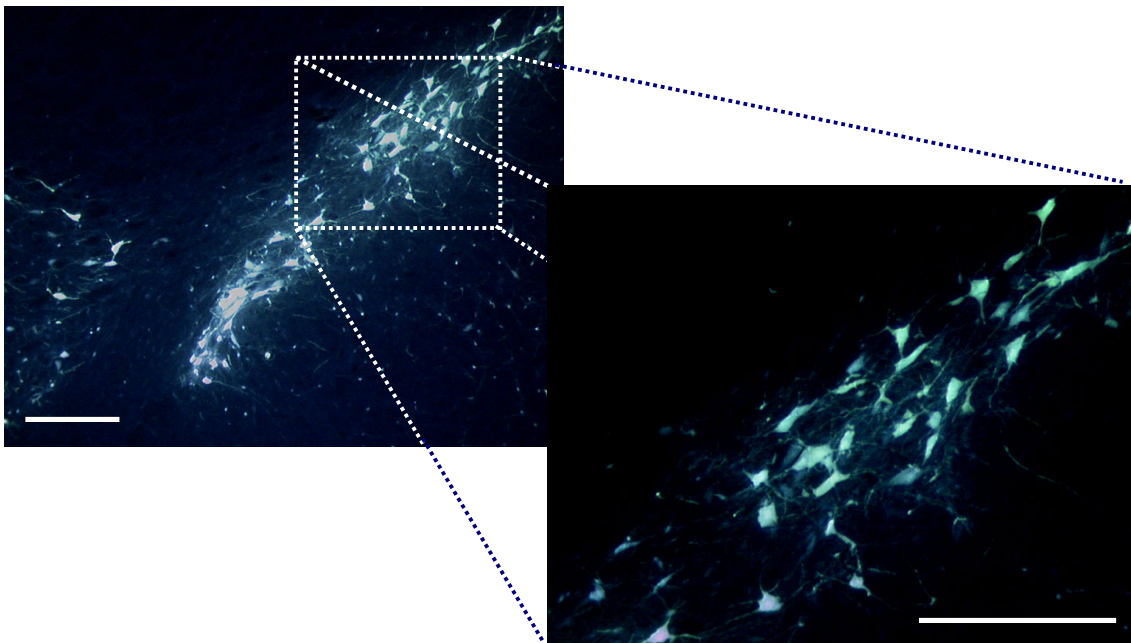


Abb. 28: Mikrofotografie eines FG gefärbten Schnittes mit Vergrößerung im Bereich der SNpc. Ein Zellverlust auf der Läsionsseite A im Vergleich zur Kontrollseite B ist festzustellen (Balkenlänge 200 μ m; Schnittdicke 30 μ m).

4.2.2 Effekte der Läsionen und verwendeten Testsubstanzen auf die Anzahl der TH-ir Neurone in der SNpc

Die Tyrosinhydroxylase ist das limitierende Enzym der Dopaminsynthese. Ihr Nachweis in Neuronen spricht für die Dopaminsyntheseaktivität der angefärbten Zellen.

SS im FG/6-OHDA-Modell der Ratte

In allen ausgezählten Schnitten war die Anzahl der TH-ir Neurone der SNpc der lädierten Seite im Vergleich zur intakten Seite niedriger. In der statistischen Auswertung war dieser Zellverlust auf der lädierten Seite in beiden Gruppen mit $p < 0,001$ hoch signifikant (Tab. 12).

Des weiteren fand ein Vergleich der relativen Anzahl der beschriebenen Neurone in den unterschiedlichen Gruppen statt. Hierzu wurde die Anzahl der TH-ir Neurone der intakten Striata auf 100% gesetzt und die Werte der lädierten Seite innerhalb einer Gruppe als prozentualer Anteil dazu angegeben. Im SS-Versuch konnten hier wie auch im Vergleich der absoluten Werte keine signifikanten Unterschiede ausgemacht werden. Die relativen Zellzahlen betragen für die SS-Gruppe: $57,67\% \pm 8,18$ und für die NaCl-Gruppe: $43,96\% \pm 10,41$ (Abb. 29).

Tab. 12: Anzahl TH-ir Neurone der SNpc im SS-Versuch

	n	intakt	lädiert
SS	8	$98,50 \pm 12,00$	$58,33 \pm 10,00$
NaCl	7	$85,24 \pm 6,33$	$38,38 \pm 9,40$

Effekte der einseitigen 6-OHDA-Läsion in Bezug auf die Anzahl TH-ir Neurone im Seitenvergleich innerhalb der einzelnen Behandlungsgruppen. ANOVA für den Haupteffekt Läsion für alle Gruppen hochsignifikant ($p < 0.0001$).

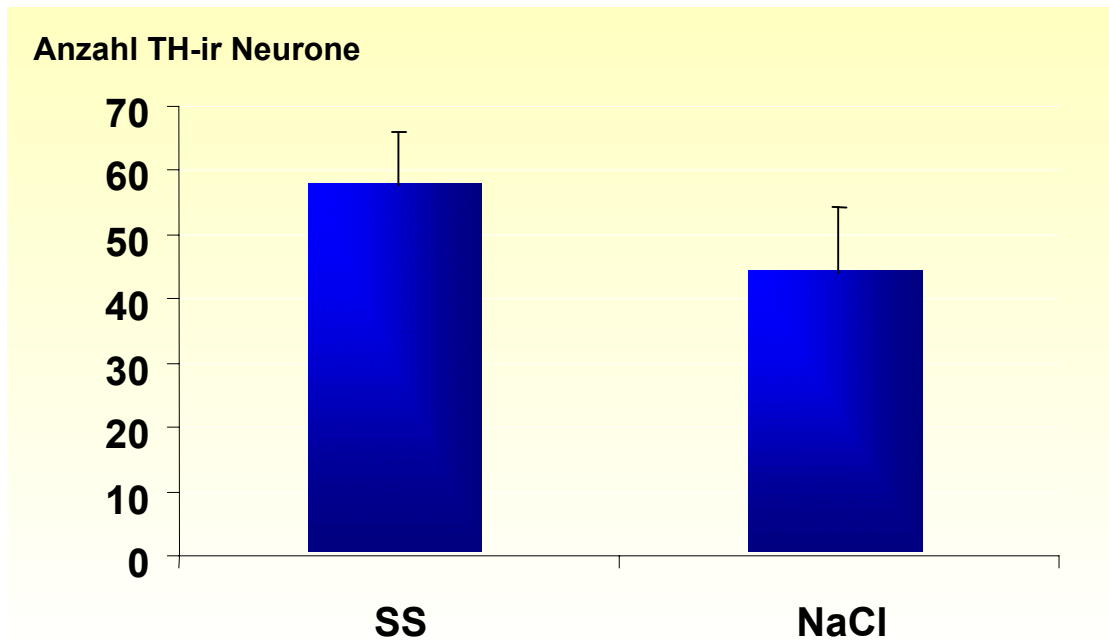


Abb. 29: Einfluss der Behandlung mit SS auf den durch 6-OHDA induzierten nigralen Verlust an TH-ir Neuronen im Vergleich der Behandlungsgruppen untereinander. ANOVA für den Interaktionseffekt Läsion x Behandlung: nicht signifikant.

PBN im FG/6-OHDA-Modell der Ratte

In allen ausgezählten Schnitten war die Anzahl der TH-ir Neurone der SNpc der lädierten Seite im Vergleich zur intakten Seite niedriger. In der statistischen Auswertung war dieser Zellverlust auf der lädierten Seite in allen Gruppen mit $p < 0,001$ hoch signifikant (Tab. 13).

Im PBN-Versuch war bei Auswertung der relativen Anzahl FG-p Neurone auf der lädierten Seite ein signifikant niedrigerer Wert in der 150 mg PBN-Behandlungsgruppe mit $40,82\% \pm 7,60$ im Vergleich zur NaCl-Gruppe mit $73,54\% \pm 5,69$ bei $p < 0,016$ zu sehen. Der prozentuale Anteil der lädierten zur intakten Seite betrug für die 75 mg PBN-Behandlungsgruppe $49,90\% \pm 8,07$ und hob sich von den anderen beiden Gruppen hiermit nicht signifikant ab (Abb. 30).

Tab. 13: Anzahl TH-ir Neurone der SNpc im PBN-Versuch

	n	intakt	lädiert
PBN 150	8	101,81 ± 7,75	41,27 ± 8,40
PBN 75	8	116 ± 12,12	62,75 ± 11,68
NaCl	6	119,86 ± 7,48	87,53 ± 7,95

Effekte der einseitigen 6-OHDA-Läsion in Bezug auf die Anzahl TH-ir Neurone im Seitenvergleich innerhalb der einzelnen Behandlungsgruppen. ANOVA für den Haupteffekt Läsion mit für alle Gruppen hochsignifikant ($p < 0.0001$).

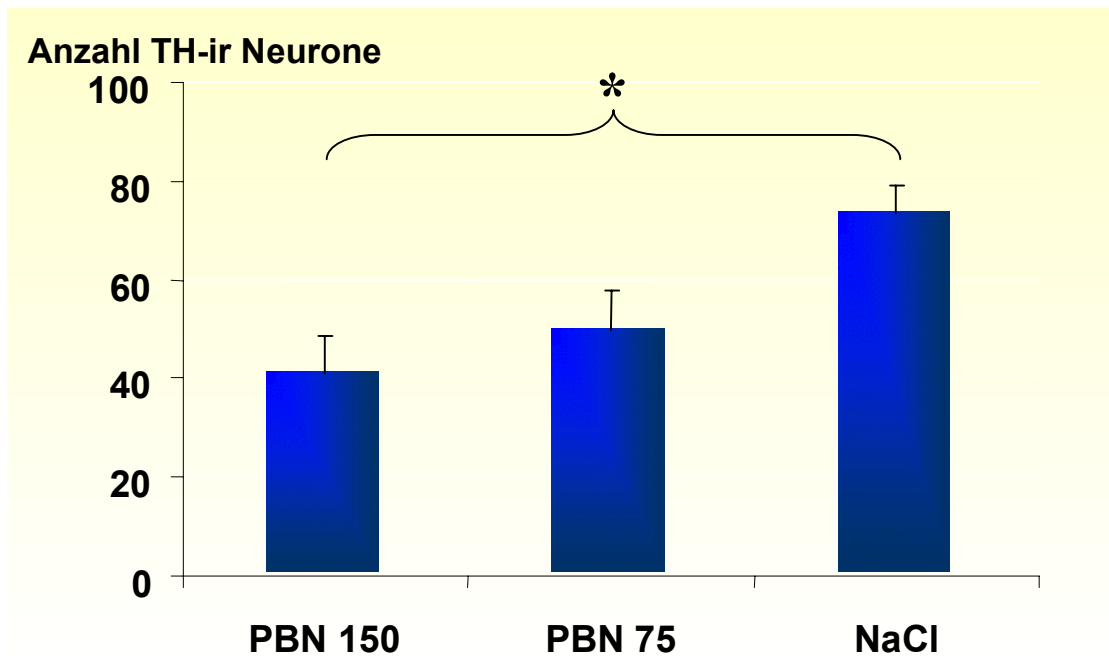
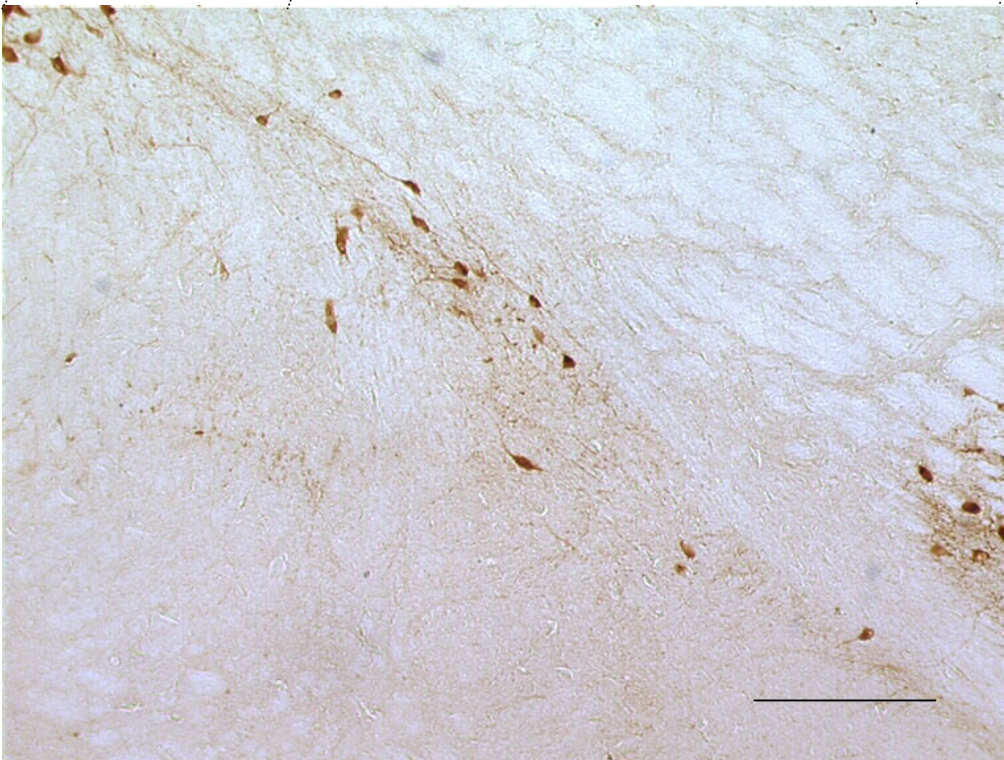
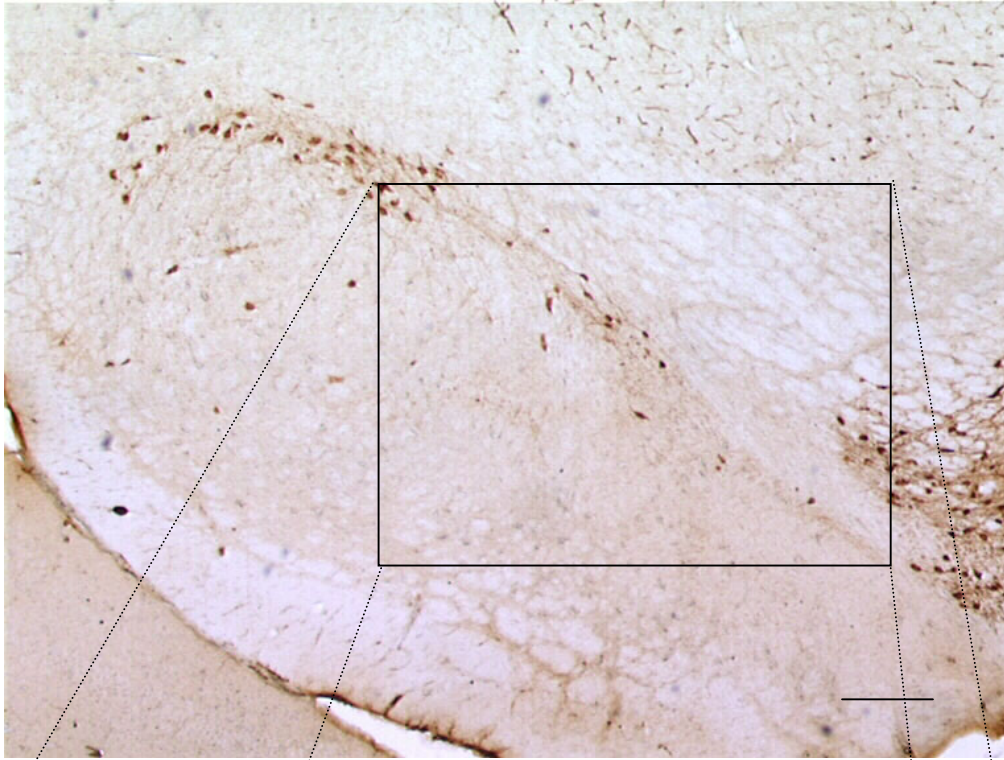


Abb. 30: Einfluss der Behandlung mit PBN auf den durch 6-OHDA induzierten nigralen Verlust an TH-ir Neuronen im Vergleich der Behandlungsgruppen untereinander. Hierbei zeigten sich signifikant niedrigere relative Werte für TH-ir Neurone in der 150 mg Behandlungs- im Vergleich zur NaCl-Gruppe im PBN-Versuch. T-Test: * = $p < 0.016$, PBN 150 mg vs. NaCl.

A



B

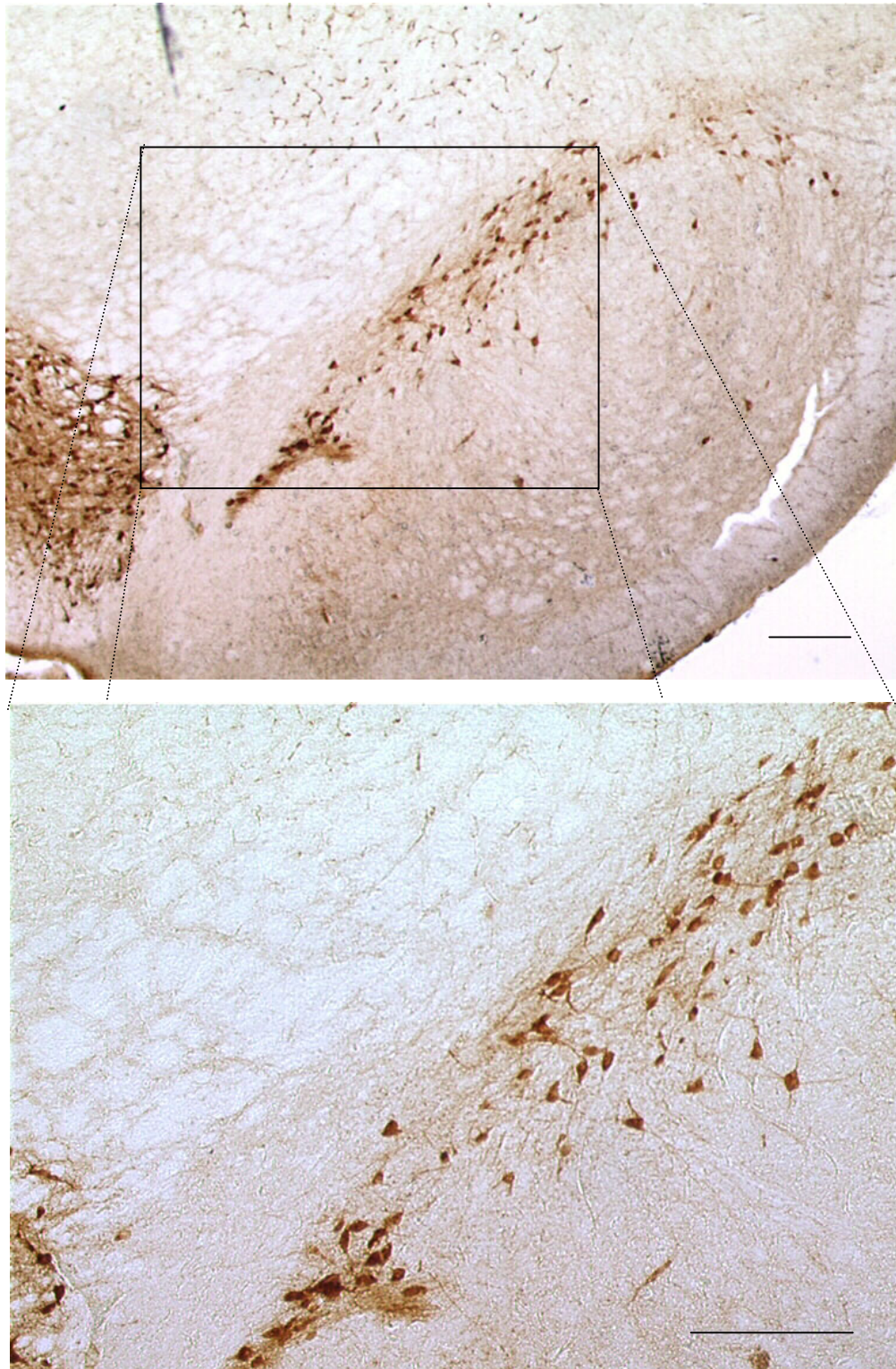


Abb. 31: Mikrofotografie eines TH-immunperoxidase gefärbten Schnittes mit Vergrößerung im Bereich der SNpc. Ein Zellverlust auf der Läsionsseite A im Vergleich zur Kontrollseite B ist festzustellen (Balkenlänge 200 μ m; Schnittdicke 30 μ m).

MPTP-Modell der Maus

Im MPTP-Modell der Maus wurden für jedes Tier die TH-ir Zellen der linken und rechten SNpc addiert und für jede Versuchsgruppe der Mittelwert angegeben.

Als Ausdruck der Läsion fand sich in den mit MPTP geschädigten Mäusen eine Verminderung der TH-ir Neurone, diese war in der ANOVA hochsignifikant mit $p < 0,001$.

Im Troloxversuch zeigten sich im zur Beurteilung der Behandlungseffekte auf die Läsion durchgeführten Vergleich der Behandlungsgruppen gegenüber NaCl-behandelter Tiere keine signifikanten Unterschiede (Tab. 14 und Abb. 32).

Tab. 14: Anzahl TH-ir Neurone der SNpc im Troloxversuch

	n	TH-ir Neurone
T 300 - MPTP	10	92,53 ± 9,56
T 300 - NaCl	10	94,80 ± 13,97
T 100 - MPTP	9	79,37 ± 10,69
T 100 - NaCl	10	115,07 ± 11,65
NaCl - MPTP	9	72,37 ± 9,55
NaCl - NaCl	10	108,98 ± 9,30

Effekte der MPTP-Läsion in Bezug auf die absolute Anzahl TH-ir Neurone im Vergleich der lädierten zu den intakten Mäusen einer Behandlungsgruppe. Es ergibt sich über sämtliche Behandlungsgruppen hinweg in der ANOVA für den Haupteffekt Läsion ein signifikanter Effekt ($p < 0.01$).

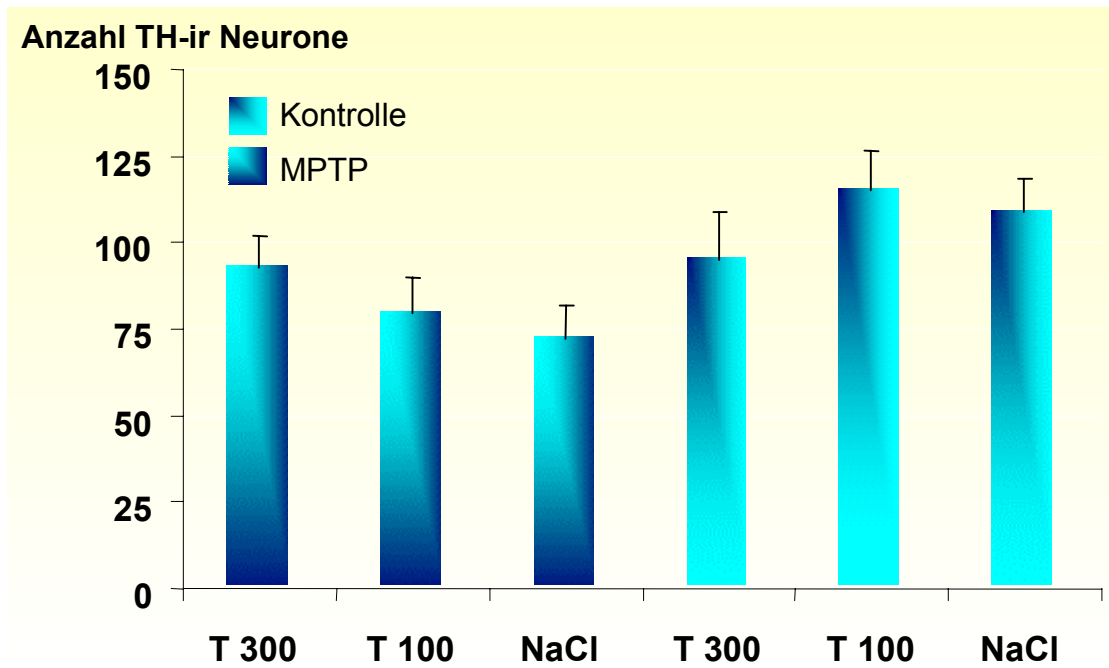
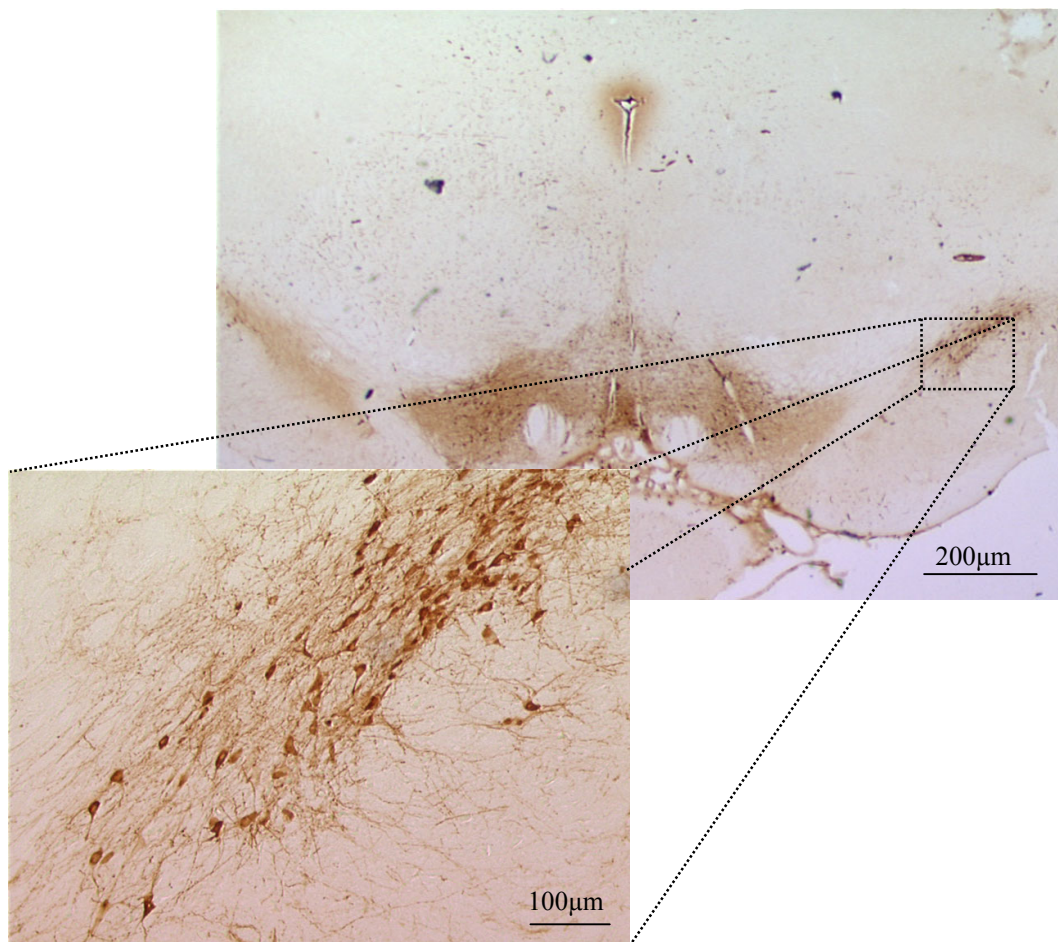


Abb. 32: Einfluss von Trolox auf den durch die MPTP-Läsion induzierten Verlust nigraler TH-ir Neurone im Vergleich der Behandlungsgruppen untereinander. Die mit MPTP geschädigte ANOVA für den Interaktionseffekt Läsion x Behandlung nicht signifikant.

A



B

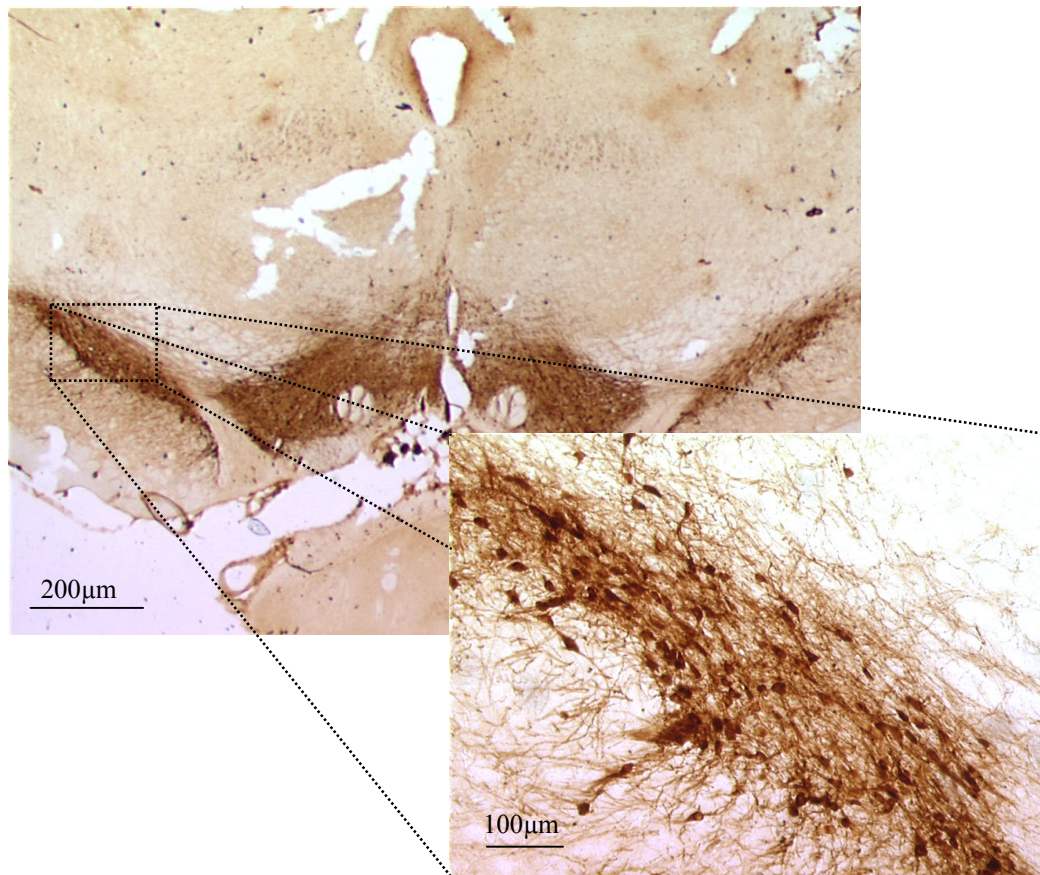


Abb. 33: Mikrofotografie von zwei TH-immunperoxidase gefärbten Schnitten der Maus mit Vergrößerung im Bereich der SNpc. Ein nigraler Zellverlust nach MPTP-Behandlung A ist im Vergleich zur NaCl-Gruppe B festzustellen (Schnittdicke 30 µm).

4.3 Lokomotorische Aktivität

Die im MPTP-Maus-Modell durchgeführte Bestimmung der prä- und postläsionellen lokomotorischen Aktivitäten der Tiere wurde wie in Kapitel 3.3 beschrieben durchgeführt.

Zur Bestimmung des Effektes von MPTP auf die lokomotorische Aktivität wurden die prä- und postläsionellen Werte verglichen. Im Trolox-Versuch fand sich in den mit MPTP geschädigten Gruppen ein signifikanter Abfall der Aktivitäten im Vergleich zur präläsionellen Messung (Tab. 15).

Zur Erfassung möglicher Medikamenteneffekte auf die durch die MPTP-Läsion verursachte Einschränkung der lokomotorischen Aktivität wurden die postläsionellen Werte prozentual zu den jeweiligen präläsionellen Werten, welche für jede Gruppe auf 100% gesetzt wurden, angegeben und die erhaltenen relativen Aktivitätswerte miteinander verglichen. In beiden Versuchen ergaben sich im Vergleich der lädierten Behandlungs- und NaCl-Gruppen keine signifikanten Effekte (Abb. 34).

Tab. 15: Lokomotorische Aktivität der Tiere im Troloxversuch

	n	Aktivitäten prä	Aktivitäten post
T 300 - MPTP	10	418,20 ± 49,26	301,70 ± 47,98
T 300 - NaCl	10	426,30 ± 42,54	425,90 ± 22,96
T 100 - MPTP	10	405,50 ± 93,02	259,40 ± 28,31
T 100 - NaCl	10	421,10 ± 24,32	391,80 ± 36,21
NaCl - MPTP	10	376,30 ± 32,68	216,30 ± 33,40
NaCl - NaCl	10	392,20 ± 34,92	393,70 ± 39,91

Effekte der MPTP-Läsion in Bezug auf die prä- und postläsionellen lokomotorischen Aktivitäten im Vergleich der lädierten zu den intakten Mäusen einer Behandlungsgruppe. Die ANOVA ergibt für die Läsion einen signifikanten Haupteffekt ($p < 0,01$).

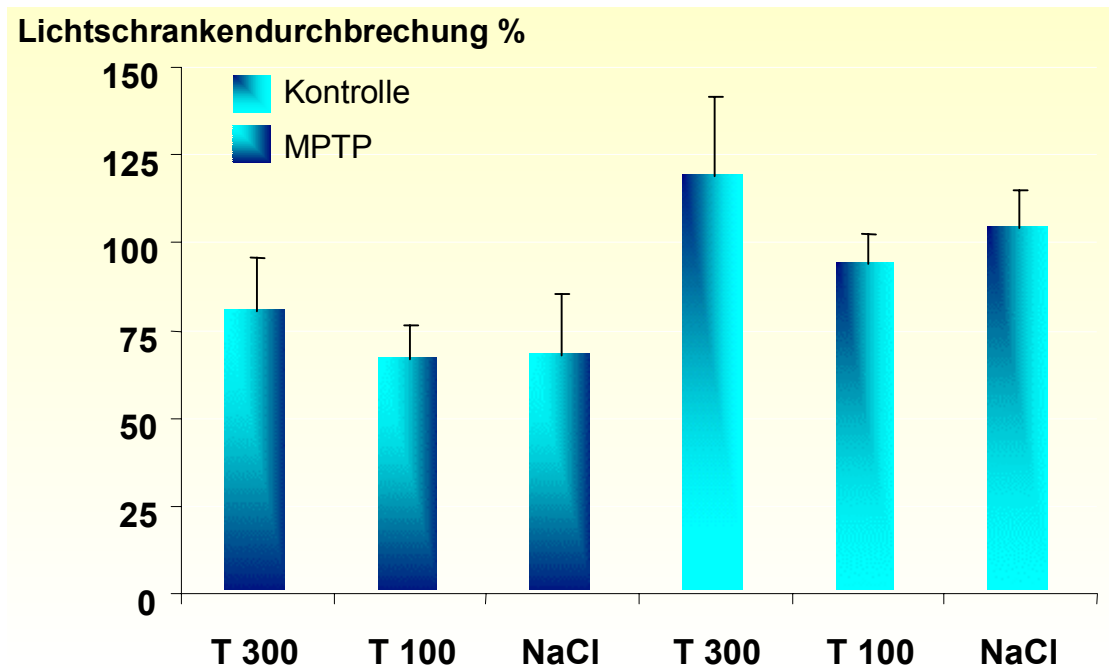


Abb. 34: Einfluss von Trolox auf die durch die MPTP-Läsion induzierte verminderte lokomotorische Aktivität der lädierten Mäuse. Es sind die postläsionellen Aktivitätswerte relativ zu den präläsionellen angegeben. Unter den lädierten Mäusen erbrachte die ANOVA für den Interaktionseffekt Läsion x Behandlung keine Signifikanz.

5 DISKUSSION

Die vorliegende Arbeit sollte die Fragestellung beantworten, ob die Radikalfänger SS, PBN und Trolox in Tiermodellen des IPS neuroprotektiv wirken.

Aus methodischer Sicht ist zunächst die Darstellung der erfolgreichen Imitation des humanen IPS durch das jeweilige Tiermodell, also einer suffizienten nigrostriatalen Läsion, relevant.

- Durch die intrastriatale Injektion von 6-OHDA und die systemische Gabe von MPTP konnte auf histologischer Ebene jeweils eine signifikante nigrale Läsion, gemessen am Verlust TH-ir und FG-p (6-OHDA) Neurone erzielt werden.
- Dieser spiegelte sich auf neurochemischer Ebene durch eine signifikante Verminderung des striatalen Dopamingehaltes sowie den konsekutiv gesteigerten Dopaminumsatz wider.
- Auf behavioraler Ebene wurde eine dementsprechende postläsionell signifikante Reduktion der lokomotorischen Aktivität nach MPTP Applikation erhoben.
- Keiner der getesteten Radikalfänger konnte einen signifikanten neuroprotektiven Effekt auf sämtliche Parameter erbringen.
- Es zeichneten sich allerdings tendenziell neuroprotektive Effekte durch SS für die Parameter striataler Dopamingehalt und nigrale Anzahl FG-p Neurone ab.
- Darüber hinaus fiel auf, dass der Einfluss von Trolox zwar nicht signifikant neuroprotektiv war, aber auf sämtliche Läsionsparameter einen dosisabhängigen Effekt in der Reihenfolge T300>T100>NaCl hatte.
- Das in zwei Dosierungen eingesetzte PBN beeinflusste in der höheren Dosierung (150 mg/kg KG) im Vergleich zur NaCl-Gruppe sämtliche Parameter negativ, was sich für die relative Anzahl nigraler TH-ir Neurone signifikant darstellte. Dieser Einfluss war in der Gruppe mit niedriger Dosierung des PBN (75 mg/kg KG) nicht zu erkennen, so dass dosisabhängige neurotoxische Eigenschaften des PBN im FG/6-OHDA-Modell der Ratte vorzuliegen scheinen.

Im Folgenden werden zunächst die durch 6-OHDA und MPTP induzierte Läsion und die zur Darstellung gewählten Parameter hinsichtlich ihrer Validität diskutiert. Im Anschluss folgt die Diskussion der Ergebnisse der Behandlung mit den einzelnen Radikalfängern.

5.1 Diskussion der Validität der erzielten Läsionseffekte und der zur Darstellung gewählten Parameter

5.1.1 Neurochemische Untersuchung

FG/6-OHDA-Modell der Ratte

In methodischen Grundlagenstudien zur Beurteilung des striatalen Dopamingehaltes, als einem Index für die Dichte residualer striataler dopaminerger Terminale nach unilateraler 6-OHDA-Läsion der anteromedialen SNpc, wurde der striatale Dopaminverlust der lädierten im Verhältnis zur intakten Seite mit dem Verhältnis der korrespondierenden striatalen (3H)Dopaminwiederaufnahme verglichen und zwar am 3. und 18. bzw. 21. Tag nach Läsion. Aus den erhaltenen nahezu identischen linearen Funktionen für jede Gruppe schlossen Altar *et al.* (1987), dass keine Veränderung der Beziehung zwischen Dopaminwiederaufnahmestellen und Dopamingehalt zwischen dem 3. und 18. bzw. 21. Tag *post laesionem* aufzutreten scheint und dass somit der striatale Dopamingehalt, ebenso wie die Anzahl an striatalen Dopaminwiederaufnahmestellen, als ein direktes Maß für den Grad der dopaminergen Denervation nach 6-OHDA-Läsion in der Ratte angesehen werden kann (Zigmond *et al.* 1984). Hierzu passend stellten Hefti *et al.* (1980) eine ähnliche Proportionalität nach einseitiger nigraler Läsion für die Parameter Dopaminkonzentration im Striatum und TH-Aktivität bei unterschiedlichen Toxindosierungen fest.

In Arbeiten, die den zeitlichen Verlauf der striatalen Dopaminkonzentrations- bzw. Dopaminwiederaufnahmestellenminderung nach unilateraler striataler Läsion untersuchten, zeigte sich, dass die maximale Reduktion jeweils nach einer Woche stattgefunden hatte und bis zur 8. Woche (Dopaminkonzentration) bzw. 12. Woche (Dopaminwiederaufnahmestellen) *post laesionem* zu keinem weiteren statistisch signifikanten Abfall führte (Raaf 1993; Przedborski *et al.* 1995). Daher ist davon auszugehen, dass in der vorgelegten Arbeit mit dem gewählten Überlebens- und Behandlungszeitraum der Ratten von 4 Wochen einerseits in den progredienten Verlauf potentiell eingegriffen werden konnte und andererseits ein Großteil der Läsion stattgefunden hatte.

Für den Haupteffekt Läsion zeigten sich in beiden Versuchen des FG/6-OHDA-Modells 4 Wochen nach Läsion deutlich erniedrigte striatale Dopaminkonzentrationen auf der lädierten Seite im Vergleich zur intakten Seite. Dieser Effekt war hoch signifikant, was das Modell bestätigt.

Die erhaltenen absoluten Dopaminkonzentrationen für die intakten und lädierten Striata zeigten zwischen dem SS-Versuch und dem PBN-Versuch Unterschiede. Hierzu ist anzumerken, dass die Proben nicht am selben Tag aufbereitet wurden, sich die Lagerungszeit um einige Tage unterschied und die HPLC-Untersuchung ebenfalls nicht am selben Tage stattfand. Laut einer Arbeit von Kontur *et al.* (1994), in der unter anderem der Einfluss von verzögertem Einfrieren, der Dauer der Lagerung, des Auftauens und Wiedereinfrierens auf neurochemische Parameter, z.B. Monoamin- und Metabolitengehalt, im Rattengehirn untersucht wurde, reichen diese „geringfügigen“ methodischen Unterschiede aus, um differente Monoaminkonzentrationen zu erhalten.

Für eine in der Aufbereitung der Proben zu suchende Ursache des Dopaminkonzentrationsunterschiedes zwischen den Teilversuchen spricht zusätzlich, dass sich für die Kontrollgruppen die Dopaminkonzentrationen wie auch die Dopaminumsatzraten der intakten Seite in Versuch A und B ebenfalls und zwar konkordant dem Konzentrationsunterschied der Läsionsseiten, voneinander unterschieden. Dessen ungeachtet zeigte sich mit einem relativen Dopaminverlust von 83% (NaCl-Gruppe) im PBN-Versuch, im Vergleich zu 69% (NaCl-Gruppe) im SS-Versuch, in ersterem ein stärker ausgeprägter Toxineffekt. In einer weiteren Studie, welche wie diese Arbeit auf der von Sauer und Oertel (1994) etablierten Methodik des unilateralen striatalen FG/6-OHDA-Modelles basierend durchgeführt wurde und diese um die Analyse striataler Dopamin- und Metabolitenkonzentrationen erweiterte, findet sich eine Reduktion des Dopamingehaltes der lädierten Seite, prozentual zur intakten, auf 47% nach 4 Wochen (Sautter *et al.* 1997). Die in der vorliegenden Arbeit erhobenen Werte liegen mit 31,5% und 17,3% unter den von Sautter erhaltenen und sind eher mit denen von Cadet *et al.* (1989), 3 Wochen nach intrastriataler Injektion erhobenen, vergleichbar (39% residualer Dopamingehalt, lädiert vs. intaktes Striatum). Die in der vorgelegten Arbeit erreichte sehr stark ausgeprägte Läsion erschwert den Nachweis neuroprotektiver Effekte.

Diese Unterschiede sind möglicherweise mit der Reinheit der Substanz, gering abweichenden Injektionsstellen und unterschiedlicher Suszeptibilität der verwendeten, unterschiedlichen Rattenstämme gegenüber dem Toxin erklärbar.

Der Dopaminmetabolit DOPAC entsteht extra- und intraneuronal durch die enzymatische oxidative Desaminierung von Dopamin durch MAO. Daher kann DOPAC intraneuronal nach Wiederaufnahme oder erhöhter Durchlässigkeit von präsynaptischen Lagerungsvesikeln und extraneuronal nach Dopaminfreisetzung in den synaptischen

Spalt synthetisiert werden. Aus diesem Grund reflektiert DOPAC eher die Biotransformation von Dopamin als seine Freisetzung (Schoepp und Azzaro 1982).

Die zuvor berichtete ausgeprägtere Verminderung des Dopaminlevels im Vergleich zum DOPAC-Gehalt des Striatum bei unilateral 6-OHDA lädierten Ratten spiegelt sich dementsprechend in einem gesteigerten Verhältnis von striataler DOPAC- zu Dopaminkonzentration wider, welches wiederum ein Maß für die Dopaminumsatzrate ist (Schwartz *et al.* 1991; Moser *et al.* 1996). Für die wiederholt beschriebene Steigerung der Dopaminumsatzrate nach ausgeprägter, aber inkompletter Schädigung dopaminerger nigrostriataler Verbindungen im Tiermodell und im Menschen (Bernheimer *et al.* 1973) werden eine erhöhte Syntheserate in den residualen Neuronen, verbunden mit einer erhöhten Entladungsrate, bzw. Transmitterfreisetzung, eine verminderte Wiederaufnahme durch selektive Dopaminwiederaufnahmestellen und ein reduzierter Abbau des Transmitters verantwortlich gemacht (Robinson und Whishaw 1988; Schwartz *et al.* 1991). Diese Mechanismen scheinen der Kompensation des postläsionellen Abfalls von Dopamin zu dienen und sind in stark lädierten Tieren, aufgrund eines Mangels an zur Kompensation fähiger Neurone, oder bei zu geringer Läsion, bei welcher die noch vorhandene Dopaminausschüttung zur negativen Rückkopplung ausreicht, anhand des Metaboliten-/Transmitter-Quotienten nicht nachweisbar (Altar *et al.* 1987). So konnte Raaf 1993 zeigen, dass Läsionen mit einem Dopaminverlust von < 50% bei gleichem Versuchsaufbau, abgesehen von der FG-Markierung, lediglich zu einem kurzzeitigen Anstieg des Dopaminumsatzes, einen Tag nach der Läsion führen.

Die in der aktuellen Studie durchgeführten Messungen lagen in dem Fenster zwischen nahezu kompletter und 50%iger Läsion der dopaminergen Terminale, so dass nach 4 Wochen eine signifikante Erhöhung des Dopaminumsatzes festzustellen war, was die ausgeprägte aber inkomplette Läsion der dopaminergen Terminale auf funktioneller Ebene bestätigte. Für die Dopaminumsatzrate zeigten sich ähnliche Versuchsgruppenunterschiede wie für den striatalen Dopamingehalt, welche am ehesten auf die dort (S. 78) diskutierten methodischen Unterschiede zurückzuführen sind.

Zusammenfassend scheint es sich in Bezug auf die neurochemische Untersuchung in beiden Versuchen um eine subakute Läsion der Dopaminterminale im lädierten Striatum zu handeln, welche im weiteren Verlauf stabil ist. Es ist von einer ausgeprägten partiellen Läsion der nigrostriatalen dopaminergen Nervenendigungen auszugehen, welche ausreichte, um Mechanismen zur Kompensation des erreichten

Dopaminmangels in Gang zu setzen. Das Ausmaß der Läsion striataler dopaminerger Terminale bestimmte wiederum in ihrem Ausmaß den Endpunkt des läsionellen Prozesses, nämlich die retrograde Degeneration der zugehörigen, ins Striatum projizierenden, nigralen Neurone.

MPTP-Modell der Maus

Der Dopamingehalt der Striata ist im MPTP Modell als ebenso entscheidender Parameter anzusehen wie im 6-OHDA Modell. Bei Registrierung des Gehaltes im Zeitverlauf der Läsion bildet sich allerdings eine andere Kurve ab, da MPTP, bzw. MPP+, initial eine massive Freisetzung von Dopamin durch Verdrängung aus den präsynaptischen Vesikeln bewirkt. Dieser Anstieg erreicht das sechzigfache des Normalgehaltes, wenn dieser mittels Microdialysetechnik im wachen Tier bestimmt wird (Kuschinsky und Ferger 1996).

In der vorgelegten Arbeit wurde der Dopamin- und –metabolitengehalt sieben Tage nach Läsion bestimmt. Der Konzentrationsabfall war mit einer absoluten Dopaminkonzentration im Striatum von 3,84 ng/mg Nassgewicht bei den unbehandelten lädierten Tieren im Vergleich zu 14,46 ng/mg bei den unbehandelten Kontrolltieren im Troloxversuch deutlich ausgeprägt. Diese Effekte waren signifikant und entsprachen einem ca. 73%igen Verlust an striatalem Dopamin.

Die Ausprägung der MPTP-Effekte auf neurochemischer Ebene mit dem stärker ausgeprägten Verlust von Dopamin, im Vergleich zu seinen Metaboliten und somit erhöhter Dopaminumsatzrate, korreliert mit den in der Literatur zu findenden Daten in Arbeiten mit ähnlicher Dosierung und ähnlichem Applikationsschema (Schmidt und Ferger 2001).

Zu erwähnen ist, dass bei längerem Überleben der Versuchstiere eine Erholung des Neurotransmitterabfalls nach 4-5 Wochen, allerdings nicht bis auf das Ausgangsniveau, beobachtet werden kann. Dies wird unter anderem auf die Erholung von Neuronen zurückgeführt, welche durch das Toxin nur eine funktionelle Einschränkung erfahren haben (Mihatsch *et al.* 1988; Schmidt und Ferger 2001).

5.1.2 Histologische Untersuchung

Zur Beurteilung des morphologischen Korrelats der durch die beiden gewählten Neurotoxine hervorgerufenen Läsionen in der SNpc wurden in allen Gruppen die immunhistochemisch für TH positiven Neurone und in den FG/6-OHDA-Versuchen zusätzlich die retrograd mit FG markierten Neurone erfasst.

FG/6-OHDA-Modell der Ratte

Die TH ist das „rate-limiting“-Enzym der Katecholaminsynthese. Die Anfärbung dopaminerger Neurone der SNpc mittels Immunhistochemie spricht somit nicht nur für die Vitalität, sondern auch für die grundsätzliche enzymatische Fähigkeit der Zelle zur Dopaminsynthese.

Ichitani *et al.* (1991) beschrieben erstmalig den Verlust TH-ir Neurone in der ipsilateralen SNpc nach unilateraler 6-OHDA Applikation in das Striatum (geringe Abweichung der Injektionsstelle im Vergleich zur vorgelegten Arbeit) im Vergleich zur intakten Seite. Sie führten eine Zellzählung der nigralen TH-ir Neurone an 4 Ratten durch. Hierbei fiel, wie auch in der hier diskutierten Arbeit (11-89 %), eine ausgeprägte Varianz der prozentualen Anteile der nigralen TH-ir Neurone im Vergleich zur Kontrollseite auf, wobei diese mit der Reduktion striataler TH-ir Terminale korrelierte (41%, 57%, 63% und 71%).

Die ausgeprägte Variabilität der Anzahl nigraler TH-ir Neurone nach unilateraler striataler 6-OHDA Applikation fand sich auch in der den Zeitverlauf der Läsion darstellenden Arbeit von Sauer und Oertel (1994). In dieser Arbeit war der maximale Verlust TH-ir im Vergleich zur intakten Hemisphäre 2 Wochen *post laesionem* erreicht und blieb dann bis zur 16. Woche stabil. Im Kontrast hierzu zeigte sich in der ebenfalls durchgeführten retrograden FG-Markierung von in das Striatum projizierenden Neuronen der SNpc ein signifikanter progressiver Rückgang zwischen den Messzeitpunkten bis zur 4. Woche; der weitere Verlust der Neurone war zwar nicht signifikant, führte jedoch bis zu einer 10%igen Restpopulation. Die Variabilität der Werte zwischen den einzelnen Tieren war für FG-p Neurone (21-41 ipsilateral zu 61-102 kontralateral) deutlich geringer ausgeprägt als für die TH-ir Neurone (22-14 ipsilateral zu 140-251 kontralateral). In der vorgelegten Studie wurde in den NaCl-Gruppen 4 Wochen nach Läsion ein 89 bzw. 87%iger Verlust an FG-p Neuronen erreicht und die Streuung dieser Neurone (3-13 ipsilateral zu 47-89 kontralateral) war ebenfalls wesentlich geringer ausgeprägt als für die TH-ir (7-121 ipsilateral zu 58-133 kontralateral).

Geht man von der von Sauer und Oertel gezeigten besseren Eignung der FG-Markierung zur Beurteilung des durch das Toxin verursachten Zellverlustes in diesem lokal toxischen Modell aus, so kann ein ausgeprägter toxischer Effekt angenommen werden, welcher nach Sauer und Oertel bis zum Versuchsende progredient verläuft. Die Reduktion der TH-ir Neurone spiegelt sowohl den durch 6-OHDA induzierten

Zellverlust als auch die teilweise reversible Funktionsstörung der dopaminergen Neurone der gesamten SNpc wider. Der Verlust zeigte sich in der vorliegenden Arbeit im Versuch A mit 66% auf der läsierten Seite und mit 26% im Versuch B signifikant vermindert, wie erwartet deutlich geringer, als der Verlust FG-p Neurone. Eine partielle Reversibilität konnte von Sauer und Oertel durch Zunahme FG-p und gleichzeitig TH-ir Neurone nach initialem Abfall schon zwischen der 2. und 4. Woche nach 6-OHDA-Gabe untermauert werden. Dies kann zur Erklärung der schon erwähnten, in diversen Studien auffallenden Variabilität dieses Parameters beitragen.

MPTP-Modell der Maus

Durch die systemische Applikation von MPTP konnte eine signifikante Reduktion TH-ir Neurone der SNpc mit 72,4 Neuronen bei den lädierten Tieren im Vergleich zu den Kontrolltieren mit 109 Neuronen im Mittel erzielt werden, so dass von einem moderaten Zellverlust auf nigraler Ebene auszugehen ist, am ehesten vergleichbar mit einem präsymptomatischen IPS beim Menschen (Schmidt und Ferger 2001).

Es ist zu berücksichtigen, dass die Reduktion der TH-ir Neurone nur bedingt die Interpretation des Zelltodes zulässt, da MPTP eine fehlende Anfärbung dopaminergener Neurone ohne assoziierten Zelltod bedingen kann. Den Zeitverlauf der Auswirkungen des MPTP auf TH-ir Zellen, die absolute Anzahl von Neuronen durch Nissl-Färbung und die Degeneration von Neuronen mittels Silberfärbung haben Jackson-Lewis *et al.* (1995) an C57/black-Mäusen charakterisiert (Messzeitpunkte: 0,5, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 14 und 28 Tage nach Läsion). Sie fanden eine progressive Reduktion TH-ir von dem ersten Messzeitpunkt an, 12 Stunden nach Injektion, bis zum 2. Tag und Nissl gefärbter Neurone vom ersten Messzeitpunkt bis zum 4. Tag; danach erreichte die Anzahl der Zellen in beiden Färbemethoden bis zum 28. Tag ein Plateau. Die Anzahl silberimprägnierter Zellen verhielt sich reziprok dazu. Auffallend war eine stärkere Erniedrigung der TH-ir Neurone im Vergleich zu Nissl gefärbten Zellen an den ersten beiden Tagen, welche sich bis zum 4. Tag durch eine leichte Remission des TH-ir Zellunterganges verlor (Jackson-Lewis *et al.* 1995). Dies lässt die Interpretation zu, dass MPTP eine akute Degeneration dopaminergener Neurone der SNpc in Gang setzt, die nach 4 Tagen beendet ist. Des Weiteren kann anhand dieser Daten davon ausgegangen werden, dass 4 Tage nach Injektion sogenannte „ghost-cells“ (Nissl-positiv aber nicht TH-ir) funktionell wieder soweit intakt sind, dass die Gesamtheit der dopaminergen Neurone der SNpc mittels immunhistochemischen Darstellung der TH nachgewiesen werden kann.

In der vorgelegten Arbeit wurde die Anzahl TH-ir Neurone 7 Tage nach Injektion bestimmt, so dass sich das volle Ausmaß der Läsion und die Regeneration von „ghost-cells“ zu diesem Zeitpunkt vollzogen haben müsste.

5.1.3 Lokomotorische Aktivität

MPTP-Modell

Von einigen Forschergruppen wurden über transiente Symptome hinausgehende Effekte auf das Verhalten von Mäusen, wie z.B. abnorme Haltung, Tremor und Bradykinese, berichtet, wobei eine starke Divergenz hinsichtlich der Applikationsschemata für MPTP und der verwendeten Mäusestämme zu bestehen scheint. Für einen moderaten Dopaminverlust, wie er bei der in der vorgelegten Arbeit verwendeten MPTP-Dosierung zu erwarten ist, wurde von Schmidt und Ferger (2001) der Zeitverlauf der behavioralen Effekte nach s.c. Applikation von 40 mg/kg KG, gemessen an der lokomotorischen Aktivität, täglich für eine Woche bestimmt. Nach 3-7 Tagen fand sich ein nahezu kompletter Rückgang der am ersten und zweiten Tag nach Läsion deutlichen Bradykinese.

Die am *prae* und *post laesionellen* Tag durchgeführten lokomotorischen Aktivitätsmessungen zeigten dementsprechend einen Tag nach MPTP Applikation eine signifikant geringere Anzahl an Lichtschrankendurchbrechungen/h.

5.2 Diskussion der Effekte der verwendeten Radikalfänger im Parkinson-Tiermodell

5.2.1 SS im FG/6-OHDA-Modell der Ratte

Ergebnisse tierexperimenteller Studien unterschiedlicher Modelle neurodegenerativer Erkrankungen liefern Evidenz für neuroprotektive Effekte der SS, welche möglicherweise nicht allein auf ihrer Eigenschaft als Radikalfänger beruhen. Die Applikation von SS konnte im Ischämie/Reperfusion-Modell der Wüstenpringmaus den Verlust von CA1 Neuronen im Hippocampus schon in einer Dosierung von 20mg/kg KG verhindern (Kanazawa und Kondo 1996). In diesem Versuchsdesign war die Bestimmung des Aufkommens an freien Radikalen inbegriffen und konnte mit signifikantem Unterschied zur NaCl-Gruppe dargestellt werden.

ASS schützte ebenfalls vor der Entstehung einer Katarakt bei Ratten, bei denen mit Streptozotocin ein Diabetes mellitus induziert wurde (Blakytyn und Harding 1992). Die Beteiligung von freien Radikalen in diesem Modell ist wahrscheinlich, da sich ubiquitär nach Applikation von Streptozotocin erhöhte Level von 2,3 DHBA nach SS Applikation nachweisen ließen (Ohkuwa *et al.* 1995).

Die Entstehung oxidativen Stresses spielt für den neurotoxischen Einfluss von 6-OHDA, wie auch von MPTP eine zentrale Rolle, so dass unter Berücksichtigung der zitierten Studien der Detoxifizierung von Hydroxylradikalen eine entscheidende Rolle bei neuroprotektiven Effekten der SS zuzukommen scheint.

Dementsprechend könnte der von Grilli *et al.* (1996) berichtete Schutz neuronaler Primärkulturen und striataler Schnitte durch SS vor dem durch Glutamat hervorgerufenen, exzitotoxisch bedingten Neuronenverlust interpretiert werden. Hinweise für eine Beteiligung von oxidativem Stress bei Glutamatexzitotoxizität wurden schon Anfang der 90er Jahre in *in vitro* und *in vivo* Untersuchungen gefunden (siehe Kapitel 2.1.3) (Dykens 1994; Schulz *et al.* 1995). Eine Bestimmung von Parametern des oxidativen Stresses wurde nicht durchgeführt. Diese Arbeitsgruppe konzentrierte sich isoliert auf den Einfluss der SS auf die Induktion des Transkriptionsfaktors NFκB (nukleärer Faktor κ B) unter glutamatexzitatorischen Bedingungen.

NFκB gehört zu einer Familie von bisher 5 im Menschen determinierten Heterodimeren (NFκB/rel-Familie), zeigt ein ubiquitäres Vorkommen und ist im Zytosol in einem inaktiven Komplex an IκB gebunden. Durch über 150 unterschiedliche Mediatoren, wie

z.B. Zytokine, Chemokine, Viren, Glutamat aber auch oxidativen Stress, kommt es wahrscheinlich über eine Kinase (I κ B-K) vermittelte Phosphorylierung zur Dissoziation von NF κ B aus dem Komplex mit I κ B. Dies ist der eigentliche Aktivierungsschritt, da NF κ B nun ungehindert in den Nucleus translozieren kann, um dort an κ B-Bindungsstellen anzudocken. Zumeist wird durch NF κ B eine vermehrte Translation der mit den Bindungsstellen assoziierten Gene bewirkt. Die Funktion der kodierten Proteine, an der Zahl auch 150, unter anderem Zytokine, iNOS und COX2, ist überwiegend in der Regulation und Induktion von inflammatorischen oder immunologischen Prozessen angesiedelt, so dass NF κ B auch als zentraler Mediator der Immunantwort bezeichnet wurde (Übersicht bei: Pahl, 1999). Da NF κ B neuroprotektive wie auch neurodestruktive Aktivität aufweist, wurde von Pahl *et al.* (1999) der globalere Begriff des zentralen Regulators der Stressantwort geprägt.

Von einer Inhibition des Transkriptionsfaktors durch SS und ASS wurde erstmalig 1994 berichtet (Kopp und Ghosh 1994).

Auch die Arbeitsgruppe um Grilli konnte eine Reduktion des durch Glutamat bedingten Anstieges von NF κ B nach SS-Gabe aufzeigen, welcher mit der neuroprotektiven Wirkung in dieser Studie vergesellschaftet schien.

SS wurde in der vorliegenden Arbeit auf ihren neuroprotektiven Einfluss auf den induziert durch intrastriatale Gabe von 6-OHDA striatalen Dopamingehalt und Dopaminumsatzanstieg, Verlust an TH-ir Neuronen und FG-p Neuronen getestet.

Hauptauswahlkriterium der Substanz stellte ihre Eigenschaft als Radikalfänger zu agieren dar, welche unter anderem durch den extensiven Einsatz als Fängermolekül zum indirekten Nachweis von Hydroxylradikalen belegt ist. Bei dem Schädigungsmechanismus des 6-OHDA scheint das Entstehen oxidativen Stresses, wie auch beim IPS postuliert, eine zentrale Rolle einzunehmen (siehe Kapitel 2.2.1).

Der erwartete signifikant neuroprotektive Effekt auf die gewählten Parameter konnte im Versuch nicht festgestellt werden. Tendenzen einer neuroprotektiven Wirkung zeigten sich allerdings auf der Ebene der toxininduzierten Verminderung des absoluten Dopamingehaltes, im Vergleich der relativen Werte für diesen Parameter und des relativen Verlustes FG-p Neurone.

Vier kürzlich veröffentlichte Untersuchungen der SS- und ASS-Wirkung in MPTP läsionierten Mäusen erbrachten einen sicheren und signifikant neuroprotektiven Effekt

ab einer Dosierung von 50 - 100 mg/kg KG. Dosierungen unter 50 mg/kg KG zeigten maximal tendenzielle Effekte. Die direkte Interaktion der SS mit MPTP, MAO B, dem für die Umsetzung zu MPP+ verantwortlichen Enzym, oder aber dem aktiven MPTP-Metaboliten MPP+ selbst, wurde durch Konzentrationsbestimmung dieser Substanzen mittels HPLC ausgeschlossen (Aubin *et al.* 1998; Mohanakumar *et al.* 2000).

Die zur Beurteilung gewählten Parameter stimmten in diesen Studien bis auf die modellbedingt fehlende FG-Zellzahlerhebung mit der vorliegenden Arbeit überein, so dass die Vermutung nahe liegt, dass die gesehenen tendenziellen Effekte durch Dosissteigerung auch im 6-OHDA-Modell deutlicher hervortreten würden. Dies muss allerdings in weiteren Versuchen mit höheren Dosierungen gezeigt werden.

Die relativ niedrige Dosierung wurde unter Berücksichtigung der bei Anwendung im Menschen zu erwartenden Nebenwirkungen im Falle einer möglichen Langzeittherapie gewählt. Man orientierte sich an den für ASS üblichen Dosen in der chronischen Anwendung als Thrombozytenaggregationshemmer.

Die Dosierungen, die in zuvor erwähnten *in vivo* MPTP-Maus Modell Studien einen eindeutigen neuroprotektiven Effekt zeigten, würden beim Menschen in einem Bereich liegen, wie er zur analgetischen Akutbehandlung üblich ist und in einer chronischen Anwendung nicht verträglich wäre.

In Gehirnen von IPS-Patienten konnte *post mortem* eine 70-fach erhöhte Anzahl an Neuronen mit NFκB-Immunreaktivität in einer Untersuchung an 5 Patienten erhoben werden (Hunot *et al.* 1997). Auch im Rattenmodell des IPS mit intrastriatler 6-OHDA-Injektion zeigte sich die Transkriptionsfaktoraktivität erhöht (Youdim *et al.* 1999). Bemerkenswerterweise zeigte die isolierte Reduktion des Anstieges von NFκB durch den selektiven Inhibitor Parthenolid in einer PC12-Zellkultur eine Verstärkung des 6-OHDA-induzierten Zellunterganges (Youdim *et al.* 1999; Blum *et al.* 2001b). Darüber hinaus erbrachte das Glukokortikoid Dexamethason, ein wesentlich potenterer NFκB-Inhibitor als SS (Auphan *et al.* 1995), im MPTP-Maus-Modell weder einen neuroprotektiven, noch einen -destruktiven Effekt (Aubin *et al.* 1998).

Dies könnte dadurch erklärt werden, dass ein Anstieg der NFκB-Aktivität im Rahmen der MPTP-Toxizität mittels elektrophoretischer Mobilitätsshiftassays nicht nachgewiesen werden konnte. Knock-out-Mäuse für die NFκB p50-Untereinheit waren nicht weniger empfindlich gegenüber MPTP als Wildtyp-Mäuse und somit scheint eine Beteiligung des Transkriptionsfaktors in diesem Modell nicht wahrscheinlich

(Teismann *et al.* 2001). Die neuroprotektive Wirkung von SS in unterschiedlichsten cerebralen Läsionsmodellen ist am ehesten nicht isoliert auf eine Hemmung des NF κ B zurückzuführen.

Weitere Angriffspunkte der SS, deren Relevanz für die neuroprotektive Wirkung diskutiert wird, sind die induzierbare NO-Synthetase und die induzierbare COX 2. Für beide Enzyme, wie auch für NF κ B, fand sich in *post mortem* Untersuchungen an Gehirnen von IPS Patienten eine Aktivitätssteigerung, im speziellen in amöboider Microglia (Knott *et al.* 2000). Knock-out oder Inhibition des jeweiligen Enzyms bot in diesem Fall Mäusen Schutz vor MPTP-Toxizität (Liberatore *et al.* 1999; Teismann und Feger 2001).

Die COX 2-Aktivitätshemmung kann durch SS nicht direkt stattfinden, da ihr im Vergleich zur ASS die zur Inaktivierung benötigte Acetyl-Gruppe fehlt. Die Aktivierung der COX 2 wie auch der iNOS funktioniert allerdings über Kaskaden, bei denen Interaktionen der SS bekannt sind. Zu nennen wären hier wiederum NF κ B, aber auch die TNF- α vermittelte Aktivierung des JNK(cJun-Kinase)-Signalweges (Westwick *et al.* 1994; Adams *et al.* 1996; Baeuerle und Baichwal 1997). Die Tatsache, dass SS zur Inhibition dieser Enzyme über diese Wege in wesentlich höherer Dosierung eingesetzt werden muss als zum Erlangen seines neuroprotektiven Effektes, schließt auch hier einen Hauptmechanismus der Wirkung eher aus.

Bei der neuroprotektiven Wirkung der SS scheint der Bewältigung oxidativen Stresses eine zentrale Rolle zuzukommen. Die detaillierten und in ihrer Komplexität und Interaktion noch zu entschlüsselnden Wirkmechanismen in den IPS-Tiermodellen und insbesondere ihre quantitativen Anteile an der neuroprotektiven Wirkung könnten zur Entwicklung neuer Design-Pharmaka beitragen, welche gezielter und in für den Menschen verträglicher Dosierung eingesetzt werden könnten.

Zusammenfassend scheint SS vielfältig in pathologische Veränderungen einzugreifen, wie sie sich beim IPS aber auch anderen neurodegenerativen Erkrankungen und ihren Tiermodellen finden. Die gesehene tendenzielle neuroprotektive Wirkung, welche vermutlich aufgrund der im Vergleich zu anderen Studien stark ausgeprägten Läsion nicht das Signifikanzniveau erreichte, und eine daher vermuteter dosisabhängiger neuroprotektiver Effekt im 6-OHDA-Modell würde die sich bisher darstellende multimodale Wirksamkeit bei pathogenetischen Unterschieden zum MPTP-Modell unterstreichen und sollte Gegenstand weiterer Forschung sein.

5.2.2 PBN im FG/6-OHDA-Modell der Ratte

PBN, die geläufigste Nitron-Verbindung unter den Substanzen, die als radikalfangende Spin-Traps eingesetzt werden, zeigte im durchgeführten Versuch chronisch verabreicht (2 Wochen *pre* und 4 Wochen *post laesionem*) auf den striatalen Dopaminverlust, die Zunahme der Umsatzrate von Dopamin und die retrograde Degeneration FG-positiver nigraler Neurone bedingt durch 6-OHDA in beiden Dosierungen (75 und 150 mg/kg KG) keinen signifikant protektiven Effekt. Die relativ zur Kontrollseite ausgewerteten TH-ir Zellen der SNpc wiesen bei Behandlung mit 150 mg PBN sogar einen signifikant höheren Verlust nach Läsion im Vergleich zur NaCl-Gruppe auf. Dieser spiegelt sich nicht in der Konzentration des striatalen Dopamins und allenfalls tendenziell in der Auswertung der FG-p Neurone wider.

Für PBN und seine Analoga konnte *in vivo* und *in vitro* gezeigt werden, dass es in der Lage ist freie Radikale zu binden und in ein stabileres Addukt einzubinden (Janzen *et al.* 1990; Carney und Floyd 1991; Lancelot *et al.* 1998).

In einer Studie zur Evaluierung eines Huntington-Tiermodelles wurde mittels Quinolinic-Säure, einem NMDA-Agonist (→ Exzitotoxizität), eine striatale Läsion gesetzt. Es konnte gezeigt werden, dass PBN, gemessen an Dopamin-immunreaktiven Neuronen und Verhaltenstestung, signifikant protektiv wirken kann (Nakao und Brundin 1997). In dieser Studie wurde der Effekt, allerdings ohne die Bestimmung freier Radikale oder ihrer Reaktionsprodukte, auf die antioxidativen Eigenschaften des PBN zurückgeführt.

Das von Nakao und Brundin vermutete Aufkommen oxidativen Stresses und seine Eliminierung durch PBN bei der durch Glutamat induzierten Exzitotoxizität konnten Lancelot *et al.* in einer *in vivo* Untersuchung in Microdialysetechnik mit Hydroxylradikalbestimmung über 2,3-DHBA nach SS-Gabe untermauern (Lancelot *et al.* 1997).

Hierzu kontrastierend scheint die Eigenschaft Hydroxylradikale in ein Addukt zu binden für die neuroprotektiven Effekte des PBN nicht in allen Tiermodellen mit postuliertem Radikalaufkommen zum Tragen zu kommen. Ferger *et al.* (2000a) konnten an MPTP lädierten Mäusen das Aufkommen von Hydroxylradikalen nachweisen. Das eingesetzte PBN hatte zwar in einer Dosierung von 100 mg/kg KG für 15 Tage (Läsion an Tag 8) einen signifikant positiven Effekt auf die verminderte lokomotorische Aktivität, Gewichtsreduktion und den striatalen Dopaminverlust, ein signifikanter Effekt auf die Hydroxylenstehung, bestimmt durch den SS-Metabolit 2,3-DHBA, ergab

sich jedoch nicht. Die Anzahl TH-ir Neurone oder andere morphologische Parameter wurden in dieser Studie nicht bestimmt.

Die gleiche Arbeitsgruppe konnte diese Ergebnisse in einem anderem Parkinson-Modell, dem intrastriatalen 6-OHDA-Modell der Ratte in Microdialysetechnik, reproduzieren. Hier zeigte PBN keine signifikante Verringerung der 2,3-DHBA Entstehung und konnte somit deutlich weniger Hydroxylradikale als das ebenfalls getestete und wirksame Pramipexol eliminieren (Ferber *et al.* 2000b).

Die von Ferber *et al.* beobachteten neuroprotektiven Effekte auf die behavioralen Parameter und das striatale Transmitterniveau im MPTP-Maus-Modell hatten 3 Jahre zuvor schon Fredriksson *et al.* (1997), ebenfalls ohne histologische Aufarbeitung, berichtet. Eine Quantifizierung des oxidativen Stresses wurde hier allerdings nicht durchgeführt.

Auch bei Läsionen des (nigro-)striatalen Systems mit anderen Neurotoxinen zeigte PBN positive Effekte auf unterschiedlichste Parameter. *In vitro* Untersuchungen an striatalen Schnitten wurden unter anderem mit H₂O₂ als oxidativem Stressor durchgeführt. PBN hatte einen signifikant normalisierenden Effekt auf die durch Kalium-Ionen induzierte Dopaminausschüttung (Joseph *et al.* 1996).

Festzuhalten ist, dass PBN den in den Neuronen enthaltenen Biomolekülen, welche vor dem Angriff freier Radikale geschützt werden sollen, kompetitiv gegenübersteht. Die vorhandene Affinität speziell zu Hydroxylradikalen scheint unter gewissen Umständen so gering ausgeprägt zu sein, dass für die gesehenen neuroprotektiven Effekte in Tiermodellen mit nachgewiesenem oxidativem Stress auch andere Eigenschaften des PBN vorliegen müssen.

Es gibt deutliche Hinweise darauf, dass PBN einige Charakteristika von typischen NSAIDs teilt und somit sein bisher vermutetes Wirkspektrum um antiinflammatorische Qualitäten erweitert. Richtungweisend für diese Annahme sind die nachgewiesenen Interaktionen mit NFκB und die damit verbundene Modulation von immunologischen und inflammatorischen Signalwegen. So konnte der Anstieg der DNS-Bindungsaktivität des Transkriptionsfaktors sogar in geringerer Konzentration im Vergleich zu denen von SS gehemmt werden.

Die Verminderung der mRNA von iNOS und COX2 und die daraus resultierende reduzierte Aktivität beider Enzyme wurde ebenfalls aufgezeigt. Die Autoren wiesen auf die Möglichkeit hin, dass dies auch eine Auswirkung der antioxidativen Wirkung von PBN sein könnte, da die Induktion von NFκB durch oxidativen Stress getriggert werden

kann und andere Antioxidativa ähnliche Effekte zeigten (vergleiche auch Kapitel 5.2.1) (Schreck *et al.* 1992; Kotake *et al.* 1998). Dies scheint allerdings vor der gering ausgeprägten Affinität zu Hydroxylradikalen in einigen Tiermodellen eher unwahrscheinlich (s.o.).

Eine antioxidative Wirkung von PBN könnte auch „downstream“ des primären Hydroxylradikalaufkommens zum Tragen kommen. So konnte durch eine andere Arbeitsgruppe die Reduktion von Lipidperoxidationsprodukten in einem neonatalen Meningitis Modell gezeigt werden (Leib *et al.* 1996), was auch über die postulierte antiinflammatorische Wirkung des Spin-Traps erklärt werden könnte.

Weder in der vorgelegten Arbeit noch in zwei weiteren Studien mit anderem Dosierungsschema konnte ein wesentlicher neuroprotektiver Effekt von PBN auf biochemischer und morphologischer Ebene nach striataler 6-OHDA-Läsion gezeigt werden (Karlsson *et al.* 1998; Ferger *et al.* 2000b). Das von uns gewählte Behandlungsschema einer Langzeitbehandlung in ähnlicher (75 mg/kg KG) und höherer Dosierung (150 mg/kg KG) als bei Ferger und Karlsson und Ferger erbrachte gegenüber diesen Studien keine weiteren Vorteile. In der Gruppe mit der höheren PBN-Dosis war sogar eher ein neurotoxischer Effekt mit signifikant stärkerem Verlust TH-ir nigraler Neurone bei relativer Betrachtung der Läsions- zur Kontrollseite zu erheben. Dies spiegelte sich tendenziell in der Anzahl der FG-p Neurone wider, allerdings nicht auf neurochemischer Ebene.

Dieser Befund korrespondiert mit einem signifikant verminderten Überleben embryonaler dopaminergere Rattenneurone in Kultur nach sieben Tagen in serumfreiem Medium mit 10 mM PBN im Vergleich zur unbehandelten NaCl-Gruppe, wie es in der bereits oben genannten Arbeit von Karlsson zusätzlich zu den *in vivo* Daten erhoben wurde. Bei der Anwendung niedriger Konzentrationen (3 mM und 0,3 mM PBN) zeigten sich dort keine signifikanten Unterschiede zur NaCl-Gruppe (Karlsson *et al.* 1998), so dass, wie bei den vorgelegten Daten, eine dosisabhängige Neurotoxizität zu vermuten ist.

Die beeindruckende Effektivität, auch oder gerade in geringerer Dosierung im MPTP-Modell auf behavioraler und neurochemischer Ebene, ist in sämtlichen zuvor zitierten und der Autorin durch Suchmaschinen zugänglichen Studien nicht auf morphologischer Ebene untersucht worden. Somit müsste hier durch ein entsprechendes Studiendesign geklärt werden, ob die durch PBN erzielte Verbesserung mit einem vermehrten Neuronenüberleben korreliert.

PBN könnte in den MPTP-Studien evtl., bei leichter Schädigung dopaminerger Neurone, durch Anstieg der Dopaminsyntheserate normalisierend auf das Transmitter- und Verhaltensniveaus gewirkt haben, da sich in der vorgelegten Arbeit mit signifikanter Verminderung TH-ir nigraler Neurone und fehlender signifikanter Differenz auf neurochemischer Ebene Hinweise für eine vermehrte Stimulation der Dopaminfreisetzung finden. Möglicherweise unterstreichen die erhobenen Daten bei unterschiedlichen Effekten im MPTP-Maus-Modell und im 6-OHDA-Ratten-Modell die Diversität der Schädigungsmechanismen der beiden Toxine.

5.2.3 Trolox im MPTP-Modell der Maus

Mit Trolox wurde ein fettlösliches Analogon von Alpha-Tocopherol zur antioxidativen Behandlung im MPTP-Maus-Modell des IPS gewählt.

Für Vitamin E und seine Derivate existieren multiple Studien zu ihrer protektiven Potenz in *in vitro* und *in vivo* Krankheitsmodellen, bei denen Zellschädigungen durch freie Radikale des ZNS und anderer Organe als tragender Pathomechanismus diskutiert werden.

Ihre Eigenschaft als Radikalfänger zu agieren steht außer Frage, scheint allerdings bei außerordentlich divergenten Studienergebnissen in biologischen Systemen nicht einheitlich zum Tragen zu kommen.

Für die Behandlung der mit MPTP lädierten Mäuse mit 100 oder 300 mg/kg KG Trolox konnte in der vorgelegten Arbeit bis auf eine ausgestanzte Verminderung des reaktiven Dopaminumsatzanstieges durch MPTP-Gabe kein signifikanter neuroprotektiver Effekt aufgezeigt werden.

Der toxische Effekt von MPTP auf den striatalen Neurotransmittergehalt, die Anzahl TH-ir Zellen und die lokomotorische Aktivität konnten allenfalls tendenziell positiv beeinflusst werden. Sämtliche Parameter stellten sich, den neuroprotektiven Effekt betreffend, in der Reihenfolge T 300>T100>NaCl dar.

Eine chronische Vitamin E-Mangelernährung führte in der Maus zu einer erhöhten Suszeptibilität gegenüber der Toxizität von MPTP (Odunze *et al.* 1990) sowie zu einem signifikanten Verlust dopaminerger Neurone in der SNpc der Ratte (Dexter *et al.* 1994b). Des weiteren zeigte sich bei Patienten mit Vitamin E Mangel eine verminderte striatale 18F-DOPA-Aufnahme in der Positronen Emissions Tomographie (PET), wie sie sich auch bei IPS-Patienten darstellt (Dexter *et al.* 1994a). Diese Beobachtungen, wie auch die um zwei bis drei Jahre verzögerte Notwendigkeit einer L-DOPA-Therapie

bei IPS-Patienten im frühen Krankheitsstadium, welche hochdosiert Vitamin E in Kombination mit Vitamin C eingenommen hatten (Fahn 1991), legen den frühen Einsatz von Tocopherolen als Neuroprotektivum beim IPS nahe.

Allerdings ist die Evidenz gegen eine Wirksamkeit des Vitamin E und seiner Analoga nicht weniger zahlreich, so konnte in der multizentrischen DATATOP Studie (Deprenyl and Tocopherol Antioxidative Therapy of Parkinsonism) mit insgesamt 800 eingeschlossenen Patienten kein therapeutischer Benefit durch alpha-Tocopherol alleine oder synergistisch mit L-Deprenyl demonstriert werden (The Parkinson Study Group 1993).

Drei kürzlich an Zellkulturen durchgeführte Therapiestudien mit dem wasserlöslichen Vitamin E Analogon C-Troxol zeigen ebenfalls unterschiedliche Effekte auf die Toxizität des MPTP-Hauptmetaboliten MPP⁺. Lediglich bei einer primären Zelllinie mesenzephaler, dopaminergischer Neurone konnte ein signifikanter Schutz der Neurone durch Behandlung 24 h nach Läsion bewirkt werden (Stull *et al.* 2002). Die beiden anderen Studien wurden mit einer Vorbehandlung mit C-Troxol bei humanen Neuroblastomzellen und bei einer Zelllinie nigraler dopaminergischer Neurone durchgeführt, ohne dass auf das MPTP-induzierte Neuronensterben Einfluss genommen werden konnte (Lee *et al.* 2000; Chun *et al.* 2001). Eine Kombination mit dem pan-Caspase Inhibitor Boc-(Asp)-fmk, welcher bei alleiniger Gabe ebenfalls nicht wirksam war, erwies sich allerdings als signifikant neuroprotektiv (Chun *et al.* 2001).

Die Diskrepanz der Daten lässt sich zumindest teilweise durch die biologisch gegebenen Barrieren zwischen Neuron und Therapeutikum, wie der Blut-Hirn-Schranke, welche bei *in vitro* Versuchen außer Acht zu lassen ist, der unterschiedlichen Empfindlichkeit der einzelnen Zelllinien gegenüber dem Neurotoxin MPP⁺, bei dem unterschiedliche Läsionswege postuliert werden, und differente Dosierung des jeweiligen Tocopherol-Derivats sowie deren differente Lösungseigenschaften, erklären.

Ein dosisabhängiger Wirkungsunterschied ist zumindest bei den beiden bereits erwähnten klinischen Studien von Fahn (1991) mit hochdosierter Vitamin E Gabe (3200 IE/d), und der Parkinson Study Group (1993) (2000 IE/d) anzunehmen. Die Kombination eines fettlöslichen mit einem wasserlöslichen Antioxidanz (Ascorbinsäure 3 g/d) könnte bei der Studie von Fahn *et al.* ebenfalls entscheidend gewesen sein.

Deskriptiv betrachtet kamen in unserem Versuch die Werte der lädierten Tiere für sämtliche Parameter in der Reihenfolge T300>T100>NaCl zu liegen, so dass bei weiterer Dosissteigerung des bis zu der angewendeten Dosierung gut verträglichen

Trolox, ein protektiver Effekt möglicherweise ohne Unverträglichkeiten erzielt werden könnte.

Wir postulieren anhand der erhobenen Daten einen zu vernachlässigenden Effekt des alpha-Tocopherolanalogons in der angewandten Dosierung bei der in der vorliegenden Studie im MPTP-Modell der Maus erreichten sehr stark ausgeprägten Läsion. Ein signifikant neuroprotektiver Effekt bei geringer ausgeprägter Läsion, bei Verabreichung einer höheren Dosierung des Trolox oder in Kombination mit Substanzen, die an weiteren Angriffspunkten die Schädigung durch MPTP beeinflussen oder mit wasserlöslichen Radikalfängern, wird für möglich gehalten (vergl. Chun 2001).

6 SUMMARY

In the FG/6-OHDA rat model and the MPTP mouse model, which are both animal models of the idiopathic Parkinson syndrome, the radical scavengers salicylic acid (SS), alpha-phenyl-N-tert-butyl nitron (PBN) and Trolox[®] methyl ether (Trolox) should be examined with regard to their neuroprotective effects.

The aim of this work was to record the potential protective effects of these substances concerning their striatal dopamine content, dopamine turnover, the number of nigral tyrosinhydroxylase immunreactive (TH-ir) neurons. And additionally in the FG/6-OHDA-model the number of nigral fluorogold positive (FG-p) neurons as well as in the MPTP-model the mice's locomotor activity was registered.

FG/6-OHDA rat model

With the help of those parameter a significant lesion of nigral dopaminergic neurons with consecutive significant changed neurochemical parameter could be ascertained after an unilateral intrastriatal injection of 6-OHDA.

Apart from a partial positive effect on the reduction of FG-p neurons and the striatal dopamine content, the SS did not show any protective influence on the changes caused by 6-OHDA.

In this with 10mg/kg BW low dosage long-term treatment (2 weeks pre and 4 weeks post lesion; i.p.) in comparison to studies in the MPTP mouse model with a 5-10 times higher dose of SS, which describe a significant protective effect (Aubin *et al.* 1998), a neuroprotective effect in this dosage area might also be possible in FG/6-OHDA model. This has to be proven by further studies. It was hinted at the gastrointestinal side effects to be expected because of the chronic therapy with SS in high dosage.

In the FG/6-OHDA-model PBN was given low measured (75mg/kg BW; i.p.) and high measured (150 mg/kg BW; i.p.) 2 weeks before and 4 weeks after lesion. Within both dosages no significant neuroprotective effect could be ascertained on all determined parameters. A significantly reduced number of nigral TH-ir neurons caused by 150 mg, which was partly reflected by the reduced number of FG-p neurons, but not on the neurochemical level, could even make us presume a dose-dependent neurotoxic effect in higher dosages. A decisive factor seems to be the comparatively long duration of treatment in contrast to other experimental animal studies within the same dosage area,

since those did not describe a toxic effect on behavioral parameters. Morphologic correlates were not scanned. This would be against a neuroprotective application on humans/human beings, for this would rather be used in the form of a long-term treatment.

A stimulation of the dopamine synthesis with PBN in intact nigrostriatal neurons could be discussed in consideration of missing simultaneous reduction of the striatal dopamine content.

MPTP mouse model

The single subcutaneous application of 30 mg/kg BW MPTP also led to a significant reduction of nigral dopaminergic TH-ir neurons, which also had significant effects on the determined neurochemical and behavioural parameter. In its degree this lesion corresponds most likely to the earlier stages of the human IPS (Schmidt and Ferger 2001).

In the MPTP model the lipophilic vitamin E derivative Trolox was tested in high (300 mg/kg BW) and low (100 mg/kg BW) dosage by means of a single administration directly before the application of toxin.

Apart from a significant reduction of the postlesional increased turnover of dopamine within the 300 mg/kg KG Trolox treatment group there was no positive effect on all further determined parameters. But remarkably all data were registered in the order Trolox 300 > Trolox 100 > NaCl for the affected animals, which might let you think about a dose-dependent effect suggesting that further studies with a higher dosage of Trolox could be successful, particularly as there were no intolerable side effects.

In summary, because of the ascertained data and the studies that have been worked on, a neuroprotective effect of Trolox and SS in a higher dosage than the one applied in this case of the FG/6-OHDA model is probable, but the combination of a water-soluble with a fat-soluble antioxidant might even be more promising.

Over and above that PBN in the FG/6-OHDA model of rats did not prove neuroprotection, it even showed neurotoxic effects in higher dosages, which especially should be urgently specified in further long-term studies, how it would be applied in human beings in the case of a chronic degenerative disease.

7 LITERATURÜBERSICHT

1. Adams, J., Collaco-Moraes, Y., und de Bellerocche, J. Cyclooxygenase-2 induction in cerebral cortex: an intracellular response to synaptic excitation. *Journal of Neurochemistry* 66: 6-13, 1996.
2. Altar, C. A., Marien, M. R., und Marshall, J. F. Time course of adaptations in dopamine biosynthesis, metabolism, und release following nigrostriatal lesions: implications for behavioral recovery from brain injury. *Journal of Neurochemistry* 48: 390-399, 1987.
3. Asanuma, M., Hirata, H., und Cadet, J. L. Attenuation of 6-hydroxydopamine-induced dopaminergic nigrostriatal lesions in superoxide dismutase transgenic mice. *Neuroscience* 85: 907-917, 1998.
4. Aubin, N., Curet, O., Deffois, A., und Carter, C. Aspirin and salicylate protect against MPTP-induced dopamine depletion in mice. *Journal of Neurochemistry* 71: 1635-1642, 1998.
5. Auphan, N., DiDonato, J. A., Rosette, C., Helmberg, A., und Karin, M. Immunosuppression by glucocorticoids: inhibition of NF-kappa B activity through induction of I kappa B synthesis. *Science* 270: 286-290, 1995.
6. Baeuerle, P. A. und Baichwal, V. R. NF-kappa B as a frequent target for immunosuppressive and anti-inflammatory molecules. *Advances in Immunology* 65: 111-137, 1997.
7. Barbeau, A., Roy, M., Bernier, G., Campanella, G., und Paris, S. Ecogenetics of Parkinson's disease: prevalence and environmental aspects in rural areas. *The Canadian Journal of neurological Sciences*. 14: 36-41, 1987.
8. Beckman, J. S. und Koppenol, W. H. Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and ugly. *American Journal of Physiology* 271: C1424-C1437, 1996.
9. Ben Shachar, D., Eshel, G., Finberg, J. P., und Youdim, M. B. The iron chelator desferrioxamine (Desferal) retards 6-hydroxydopamine-induced degeneration of nigrostriatal dopamine neurons. *Journal of Neurochemistry* 56: 1441-1444, 1991.
10. Ben Shachar, D., Zuk, R., und Glinka, Y. Dopamine neurotoxicity: inhibition of mitochondrial respiration. *Journal of Neurochemistry* 64: 718-723, 1995.
11. Bensadoun, J. C., Mirochnitchenko, O., Inouye, M., Aebischer, P., und Zurn, A. D. Attenuation of 6-OHDA-induced neurotoxicity in glutathione peroxidase transgenic mice. *European Journal of Neuroscience* 10: 3231-3236, 1998.
12. Berger, K., Przedborski, S., und Cadet, J. L. Retrograde degeneration of nigrostriatal neurons induced by intrastriatal 6-hydroxydopamine injection in rats. *Brain Research Bulletin* 26: 301-307, 1991.

13. Bernheimer, H., Birkmayer, W., Hornykiewicz, O., Jellinger, K., und Seitelberger, F. Brain dopamine and the syndromes of Parkinson and Huntington. Clinical, morphological and neurochemical correlations. *Journal of the Neurological Sciences* 20: 415-455, 1973.
14. Blakytyn, R. und Harding, J. J. Prevention of cataract in diabetic rats by aspirin, paracetamol (acetaminophen) and ibuprofen. *Experimental Eye Research* 54: 509-518, 1992.
15. Bloom, F. E., Algeri, S., Groppetti, A., Revuelta, A., und Costa, E. Lesions of central norepinephrine terminals with 6-OH-dopamine: biochemistry and fine structure. *Science* 166: 1284-1286, 1969.
16. Blum, D., Torch, S., Lambeng, N., Nissou, M., Benabid, A. L., Sadoul, R., und Verna, J. M. Molecular pathways involved in the neurotoxicity of 6-OHDA, dopamine and MPTP: contribution to the apoptotic theory in Parkinson's disease. *Progress in Neurobiology* 65: 135-172, 2001a.
17. Blum, D., Torch, S., Nissou, M. F., Benabid, A. L., und Verna, J. M. Extracellular toxicity of 6-hydroxydopamine on PC12 cells. *Neuroscience Letters* 283: 193-196, 2000.
18. Blum, D., Torch, S., Nissou, M. F., und Verna, J. M. 6-hydroxydopamine-induced nuclear factor-kappa B activation in PC12 cells. *Biochemical Pharmacology* 62: 473-481, 2001b.
19. Boveris, A. und Chance, B. The mitochondrial generation of hydrogen peroxide. General properties and effect of hyperbaric oxygen. *The Biochemical Journal* 134: 707-716, 1973.
20. Breese, G. R. und Traylor, T. D. Effect of 6-hydroxydopamine on brain norepinephrine and dopamine evidence for selective degeneration of catecholamine neurons. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 174: 413-420, 1970.
21. Burns, R. S., Chiueh, C. C., Markey, S. P., Ebert, M. H., Jacobowitz, D. M., und Kopin, I. J. A primate model of parkinsonism: selective destruction of dopaminergic neurons in the pars compacta of the substantia nigra by N-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 80: 4546-4550, 1983.
22. Cadet, J. L., Katz, M., Jackson-Lewis, V., und Fahn, S. Vitamin E attenuates the toxic effects of intrastriatal injection of 6-hydroxydopamine (6-OHDA) in rats: behavioral and biochemical evidence. *Brain Research* 476: 10-15, 1989.
23. Cao, X. und Phillis, J. W. alpha-Phenyl-tert-butyl-nitrone reduces cortical infarct and edema in rats subjected to focal ischemia. *Brain Research* 644: 267-272, 1994.

24. Carboni, S., Melis, F., Pani, L., Hadjiconstantinou, M., und Rossetti, Z. L. The non-competitive NMDA-receptor antagonist MK-801 prevents the massive release of glutamate and aspartate from rat striatum induced by 1-methyl-4-phenylpyridinium (MPP+). *Neuroscience Letters* 117: 129-133, 1990.
25. Carney, J. M. und Floyd, R. A. Protection against oxidative damage to CNS by alpha-phenyl-tert-butyl nitron (PBN) and other spin-trapping agents: a novel series of nonlipid free radical scavengers. *Journal of Molecular Neuroscience* 3: 47-57, 1991.
26. Chan, P., DeLanney, L. E., Irwin, I., Langston, J. W., und Di Monte, D. Rapid ATP loss caused by 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine in mouse brain. *Journal of Neurochemistry* 57: 348-351, 1991.
27. Chen, G., Griffin, M., Poyer, J. L., und McCay, P. B. HPLC procedure for the pharmacokinetic study of the spin-trapping agent, alpha-phenyl-N-tert-butyl nitron (PBN). *Free Radical Biology & Medicine* 9: 93-98, 1990.
28. Cheng, H. Y., Liu, T., Feuerstein, G., und Barone, F. C. Distribution of spin-trapping compounds in rat blood and brain: in vivo microdialysis determination. *Free Radical Biology & Medicine* 14: 243-250, 1993.
29. Chiueh, C. C., Krishna, G., Tulsi, P., Obata, T., Lang, K., Huang, S. J., und Murphy, D. L. Intracranial microdialysis of salicylic acid to detect hydroxyl radical generation through dopamine autooxidation in the caudate nucleus: effects of MPP+. *Free Radical Biology & Medicine* 13: 581-583, 1992.
30. Chun, H. S., Gibson, G. E., DeGiorgio, L. A., Zhang, H., Kidd, V. J., und Son, J. H. Dopaminergic cell death induced by MPP(+), oxidant and specific neurotoxicants shares the common molecular mechanism. *Journal of Neurochemistry* 76: 1010-1021, 2001.
31. Colpaert, F. C. Pharmacological characteristics of tremor, rigidity and hypokinesia induced by reserpine in rat. *Neuropharmacology* 26: 1431-1440, 1987.
32. Cusi, C. und Marien, M. Decreases in mouse brain NAD⁺ and ATP induced by 1-methyl-4-phenyl-1, 2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP): prevention by the poly(ADP-ribose) polymerase inhibitor, benzamide. *Brain Research* 809: 58-67, 1998.
33. Curtius, H. C., Wolfensberger, M., Steinmann, B., Redweik, U., und Siegfried, J. Mass fragmentography of dopamine and 6-hydroxydopamine. Application to the determination of dopamine in human brain biopsies from the caudate nucleus. *Journal of Chromatography* 99: 529-540, 1974.
34. Davis, G. C., Williams, A. C., Markey, S. P., Ebert, M. H., Caine, E. D., Reichert, C. M., und Kopin, I. J. Chronic Parkinsonism secondary to intravenous injection of meperidine analogues. *Psychiatry Research* 1: 249-254, 1979.

35. Davison, A. J., Legault, N. A., und Steele, D. W. Effect of 6-hydroxydopamine on polymerization of tubulin. Protection by superoxide dismutase, catalase, or anaerobic conditions. *Biochemical Pharmacology* 35: 1411-1417, 1986.
36. Decker, D. E., Althaus, J. S., Buxser, S. E., VonVoigtlander, P. F., und Ruppel, P. L. Competitive irreversible inhibition of dopamine uptake by 6- hydroxydopamine. *Research Communications in Chemical Pathology and Pharmacology* 79: 195-208, 1993.
37. Dexter, D. T., Brooks, D. J., Harding, A. E., Burn, D. J., Muller, D. P., Goss-Sampson, M. A., Jenner, P. G., und Marsden, C. D. Nigrostriatal function in vitamin E deficiency: clinical, experimental, and positron emission tomographic studies. *Annals of Neurology* 35: 298-303, 1994a.
38. Dexter, D. T., Nanayakkara, I., Goss-Sampson, M. A., Muller, D. P., Harding, A. E., Marsden, C. D., und Jenner, P. Nigral dopaminergic cell loss in vitamin E deficient rats. *Neuroreport* 5: 1773-1776, 1994b.
39. Dodel, R. C., Singer, M., Kohne-Volland, R., Selzer, R., Scholz, W., Rathay, B., und Oertel, W. H. [Cost of illness in Parkinson disease. A retrospective 3-month analysis of direct costs]. *Der Nervenarzt* 68: 978-984, 1997.
40. Double, K. L., Riederer, P. F., und Gerlach, M. Role of iron in 6-hydroxydopamine neurotoxicity. *Advances in Neurology* 80: 287-296, 1999.
41. Du, Y., Ma, Z., Lin, S., Dodel, R. C. , Gao, F., Bales, K. R., Triarhou, L. C., Chernet, E., Perry, K. W., Nelson, D. L., Luecke, S., Phebus, L. A., Bymaster, F. P., und Paul, S. M. Minocycline prevents nigrostriatal dopaminergic neurodegeneration in the MPTP model of Parkinson's disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98: 14669-14674, 2001.
42. Duvoisin, R. C. Parkinsonism: animal analogues of the human disorder. *Research Publications - Association for Research in Nervous and Mental Disease* 55: 293-303, 1976.
43. Dykens, J. A. Isolated cerebral and cerebellar mitochondria produce free radicals when exposed to elevated Ca^{2+} and Na^{+} : implications for neurodegeneration. *Journal of Neurochemistry* 63: 584-591, 1994.
44. Ervin, G. N., Fink, J. S., Young, R. C., und Smith, G. P. Different behavioral responses to L-DOPA after anterolateral or posterolateral hypothalamic injections of 6-hydroxydopamine. *Brain Research* 132: 507-520, 1977.
45. Fahn, S. An open trial of high-dosage antioxidants in early Parkinson's disease. *The American Journal of Clinical Nutrition* 53: 380S-382S, 1991.
46. Fearnley, J. M. und Lees, A. J. Ageing and Parkinson's disease: substantia nigra regional selectivity. *Brain* 114 (Pt 5): 2283-2301, 1991.

47. Ferger, B., Teismann, P., Earl, C. D., Kuschinsky, K., und Oertel, W. H. The protective effects of PBN against MPTP toxicity are independent of hydroxyl radical trapping. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior* 65: 425-431, 2000a.
48. Ferger, B., Teismann, P., und Mierau, J. The dopamine agonist pramipexole scavenges hydroxyl free radicals induced by striatal application of 6-hydroxydopamine in rats: an in vivo microdialysis study. *Brain Research* 883: 216-223, 2000b.
49. Ferraro, T. N., Golden, G. T., DeMattei, M., Hare, T. A., und Fariello, R. G. Effect of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) on levels of glutathione in the extrapyramidal system of the mouse. *Neuropharmacology* 25: 1071-1074, 1986.
50. Flower, R. J. Drugs which inhibit prostaglandin biosynthesis. *Pharmacological Reviews* 26: 33-67, 1974.
51. Floyd, R. A., Watson, J. J., und Wong, P. K. Sensitive assay of hydroxyl free radical formation utilizing high pressure liquid chromatography with electrochemical detection of phenol and salicylate hydroxylation products. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* 10: 221-235, 1984.
52. Folbergrova, J., Zhao, Q., Katsura, K., und Siesjo, B. K. N-tert-butyl-alpha-phenylnitron improves recovery of brain energy state in rats following transient focal ischemia. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92: 5057-5061, 1995.
53. Forno, L. S., DeLanney, L. E., Irwin, I., und Langston, J. W. Ultrastructure of eosinophilic inclusion bodies in the amygdala- parahippocampal region of aged squirrel monkeys treated with 1-methyl-4- phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine, a dopaminergic neurotoxin. *Neuroscience Letters* 184: 44-47, 1995.
54. Fredriksson, A., Eriksson, P., und Archer, T. MPTP-induced deficits in motor activity: neuroprotective effects of the spintrapping agent, alpha-phenyl-tert-butyl-nitron (PBN). *Journal of Neural Transmission* 104: 579-592, 1997.
55. Gasser, T. Genetics of Parkinson's disease. *Clinical Genetics* 54: 259-265, 1998.
56. Gerlach, M., Riederer, P., Przuntek, H., und Youdim, M. B. MPTP mechanisms of neurotoxicity and their implications for Parkinson's disease. *European Journal of Pharmacology* 208: 273-286, 1991.
57. Gibb, W. R. und Lees, A. J. The relevance of the Lewy body to the pathogenesis of idiopathic Parkinson's disease. *Journal of Neurology, Neurosurgery and Psychiatry* 51: 745-752, 1988.
58. Glinka, Y., Tipton, K. F., und Youdim, M. B. Nature of inhibition of mitochondrial respiratory complex I by 6- Hydroxydopamine. *Journal of Neurochemistry* 66: 2004-2010, 1996.

59. Glinka, Y. Y. und Youdim, M. B. Inhibition of mitochondrial complexes I and IV by 6-hydroxydopamine. *European Journal of Pharmacology* 292: 329-332, 1995.
60. Greenamyre, J. T., MacKenzie, G., Peng, T. I., und Stephans, S. E. Mitochondrial dysfunction in Parkinson's disease. *Biochemical Society Symposium* 66: 85-97, 1999.
61. Grilli, M., Pizzi, M., Memo, M., und Spano, P. Neuroprotection by aspirin and sodium salicylate through blockade of NF- kappaB activation. *Science* 274: 1383-1385, 1996.
62. Grootveld, M. und Halliwell, B. Aromatic hydroxylation as a potential measure of hydroxyl-radical formation in vivo. Identification of hydroxylated derivatives of salicylate in human body fluids. *The Biochemical Journal* 237: 499-504, 1986.
63. Grunblatt, E., Mandel, S., und Youdim, M. B. MPTP and 6-hydroxydopamine-induced neurodegeneration as models for Parkinson's disease: neuroprotective strategies. *Journal of Neurology* 247 Suppl 2: II95-102, 2000.
64. Hattori, N., Tanaka, M., Ozawa, T., und Mizuno, Y. Immunohistochemical studies on complexes I, II, III, and IV of mitochondria in Parkinson's disease. *Annals of Neurology* 30: 563-571, 1991.
65. He, Y., Thong, P. S., Lee, T., Leong, S. K., Shi, C. Y., Wong, P. T., Yuan, S. Y., und Watt, F. Increased iron in the substantia nigra of 6-OHDA induced parkinsonian rats: a nuclear microscopy study. *Brain Research* 735: 149-153, 1996.
66. Hefti, F., Enz, A., und Melamed, E. Partial lesions of the nigrostriatal pathway in the rat. Acceleration of transmitter synthesis and release of surviving dopaminergic neurones by drugs. *Neuropharmacology* 24: 19-23, 1985.
67. Hefti, F., Melamed, E., und Wurtman, R. J. Partial lesions of the dopaminergic nigrostriatal system in rat brain: biochemical characterization. *Brain Research* 195: 123-137, 1980.
68. Heikkila, R. E. und Cohen, G. In vivo generation of hydrogen peroxide from 6-hydroxydopamine. *Experientia* 28: 1197-1198, 1972.
69. Heikkila, R. E., Hess, A., und Duvoisin, R. C. Dopaminergic neurotoxicity of 1-methyl-4-phenyl-1,2,5,6- tetrahydropyridine in mice. *Science* 224: 1451-1453, 1984.
70. Heinecke, A., Hultsch, E., und Repges, R. *Medizinische Biometrie: Biomathematik und Statistik*. Springer 1992.
71. Hierholzer, J., Cordes, M., Schelosky, L., Sander, B., Bock, J. C., David, I., Horowski, R., und Poewe, W. [The differential diagnosis of Parkinson diseases--123I-IBZM-SPECT vs. the apomorphine test]. *Fortschritte auf dem Gebiet der Röntgenstrahlen und neuen bildgebenden Verfahren* 159: 86-90, 1993.
72. Hirsch, E., Graybiel, A. M., und Agid, Y. A. Melanized dopaminergic neurons are differentially susceptible to degeneration in Parkinson's disease. *Nature* 334: 345-348, 1988.

73. Höglinger, G. U., Feger, J., Prigent, A., Michel, P. P., Parain, K., Champy, P., Ruberg, M., Oertel, W. H., und Hirsch, E. C. Chronic systemic complex I inhibition induces a hypokinetic multisystem degeneration in rats. *Journal of Neurochemistry* 84: 491-502, 2003.
74. Holm, S. A Simple Sequentially Rejective Multiple Test Procedure. *Scandinavian Journal of Statistics* 6: 65-70, 1979.
75. Hornykiewicz, O. Imbalance of brain monoamines and clinical disorders. *Prog. Brain Research* 55: 419-429, 1982.
76. Hunot, S., Brugg, B., Ricard, D., Michel, P. P., Muriel, M. P., Ruberg, M., Faucheux, B. A., Agid, Y. , und Hirsch, E. C. Nuclear translocation of NF-kappaB is increased in dopaminergic neurons of patients with parkinson disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94: 7531-7536, 1997.
77. Jackson-Lewis, V., Jakowec, M., Burke, R. E., und Przedborski, S. Time course and morphology of dopaminergic neuronal death caused by the neurotoxin 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine. *Neurodegeneration*. 4: 257-269, 1995.
78. Janzen, E. G., Poyer, J. L., Schaefer, C. F., Downs, P. E., und DuBose, C. M. Biological spin trapping. II. Toxicity of nitron spin traps: dose- ranging in the rat. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* 30: 239-247, 1995.
79. Janzen, E. G., Towner, R. A., Krygsman, P. H., Haire, D. L., und Poyer, J. L. Structure identification of free radicals by ESR and GC/MS of PBN spin adducts from the in vitro and in vivo rat liver metabolism of halothane. *Free Radical Research Community* 9: 343-351, 1990.
80. Jellinger, K., Linert, L., Kienzl, E., Herlinger, E., und Youdim, M. B. Chemical evidence for 6-hydroxydopamine to be an endogenous toxic factor in the pathogenesis of Parkinson's disease. *Journal of Neural Transmission Suppl* 46: 297-314, 1995.
81. Jellinger, K. A. Pathology of Parkinson's disease. Changes other than the nigrostriatal pathway. *Molecular and Chemical Neuropathology* 14: 153-197, 1991.
82. Joseph, J. A., Villalobos-Molina, R., Denisova, N., Erat, S., Cutler, R., und Strain, J. Age differences in sensitivity to. *Free Radical Biology & Medicine* 20: 821-830, 1996.
83. Kahle, P. J., Neumann, M., Ozmen, L., Muller, V., Odoy, S., Okamoto, N. , Jacobsen, H., Iwatsubo, T., Trojanowski, J. Q., Takahashi, H., Wakabayashi, K., Bogdanovic, N. , Riederer, P., Kretschmar, H. A., und Haass, C. Selective insolubility of alpha-synuclein in human Lewy body diseases is recapitulated in a transgenic mouse model. *American Journal of Pathology* 159: 2215-2225, 2001.
84. Kanazawa, A. und Kondo, T. [Hydroxyl radical generation and post-ischemic reperfusion brain damage implications for neuroprotection]. *No To Shinkei* 48: 567-572, 1996.

85. Karlsson, J., Emgard, M., Rosenblad, C., und Brundin, P. Treatment with the spin-trap agent alpha-phenyl-N-tert-butyl nitron does not enhance the survival of embryonic or adult dopamine neurons. *Brain Research* 805: 155-168, 1998.
86. Kitada, T., Asakawa, S., Hattori, N., Matsumine, H., Yamamura, Y., Minoshima, S., Yokochi, M., Mizuno, Y., und Shimizu, N. Mutations in the parkin gene cause autosomal recessive juvenile parkinsonism. *Nature* 392: 605-608, 1998.
87. Knott, C., Stern, G., und Wilkin, G. P. Inflammatory regulators in Parkinson's disease: iNOS, lipocortin-1, and cyclooxygenases-1 and -2. *Molecular and Cellular Neuroscience* 16: 724-739, 2000.
88. Kontur, P. J., al Tikriti, M., Innis, R. B., und Roth, R. H. Postmortem stability of monoamines, their metabolites, and receptor binding in rat brain regions. *Journal of Neurochemistry* 62: 282-290, 1994.
89. Kopp, E. und Ghosh, S. Inhibition of NF-kappa B by sodium salicylate and aspirin. *Science* 265: 956-959, 1994.
90. Kotake, Y., Sang, H., Miyajima, T., und Wallis, G. L. Inhibition of NF-kappaB, iNOS mRNA, COX2 mRNA, and COX catalytic activity by phenyl-N-tert-butyl nitron (PBN). *Biochimica et Biophysica Acta* 1448: 77-84, 1998.
91. Kumar, R., Agarwal, A. K., und Seth, P. K. Free radical-generated neurotoxicity of 6-hydroxydopamine. *Journal of Neurochemistry* 64: 1703-1707, 1995.
92. Kupsch, A., Sautter, J., Gotz, M. E., Breithaupt, W., Schwarz, J., Youdim, M. B., Riederer, P., Gerlach, M., und Oertel, W. H. Monoamine oxidase-inhibition and MPTP-induced neurotoxicity in the non-human primate: comparison of rasagiline (TVP 1012) with selegiline. *Journal of Neural Transmission* 108: 985-1009, 2001.
93. Kuschinsky, K. und Ferger, B. A sensitive HPLC method for measuring highly reactive hydroxyl radicals in vitro and in vivo. *Naunyn Schmiedebergs Archives of Experimental and Pathological Pharmacology* 353 : 1996.
94. Lafon-Cazal, M., Pietri, S., Culcasi, M., und Bockaert, J. NMDA-dependent superoxide production and neurotoxicity. *Nature* 364: 535-537, 1993.
95. Lan, J. und Jiang, D. H. Desferrioxamine and vitamin E protect against iron and MPTP-induced neurodegeneration in mice. *Journal of Neural Transmission* 104: 469-481, 1997.
96. Lancelot, E., Revaud, M. L., Boulu, R. G., Plotkine, M., und Callebort, J. alpha-Phenyl-N-tert-butyl nitron attenuates excitotoxicity in rat striatum by preventing hydroxyl radical accumulation. *Free Radical Biology & Medicine* 23: 1031-1034, 1997.
97. Lancelot, E., Revaud, M. L., Boulu, R. G., Plotkine, M., und Callebort, J. A microdialysis study investigating the mechanisms of hydroxyl radical formation in rat striatum exposed to glutamate. *Brain Research* 809: 294-296, 1998.

98. Lang, A. E. und Lozano, A. M. Parkinson's disease. Second of two parts. *New England Journal of Medicine* 339: 1130-1143, 1998.
99. Langston, J. W., Ballard, P., Tetrud, J. W., und Irwin, I. Chronic Parkinsonism in humans due to a product of meperidine-analog synthesis. *Science* 219: 979-980, 1983.
100. Langston, J. W., Forno, L. S., Tetrud, J., Reeves, A. G., Kaplan, J. A., und Karluk, D. Evidence of active nerve cell degeneration in the substantia nigra of humans years after 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine exposure. *Annals of Neurology* 46: 598-605, 1999.
101. Lee, H. S., Park, C. W., und Kim, Y. S. MPP(+) increases the vulnerability to oxidative stress rather than directly mediating oxidative damage in human neuroblastoma cells. *Experimental Neurology* 165: 164-171, 2000.
102. Leib, S. L., Kim, Y. S., Chow, L. L., Sheldon, R. A., und Tauber, M. G. Reactive oxygen intermediates contribute to necrotic and apoptotic neuronal injury in an infant rat model of bacterial meningitis due to group B streptococci. *Journal of Clinical Investigation* 98: 2632-2639, 1996.
103. Liberatore, G. T., Jackson-Lewis, V., Vukosavic, S., Mandir, A. S., Vila, M., McAuliffe, W. G., Dawson, V. L., Dawson, T. M., und Przedborski, S. Inducible nitric oxide synthase stimulates dopaminergic neurodegeneration in the MPTP model of Parkinson disease. *Nature Medicine* 5: 1403-1409, 1999.
104. Lotharius, J., Dugan, L. L., und O'Malley, K. L. Distinct mechanisms underlie neurotoxin-mediated cell death in cultured dopaminergic neurons. *Journal of Neuroscience* 19: 1284-1293, 1999.
105. Maickel, R. P., Braunstein, M. C., McGlynn, M., Snodgrass, W. R., und Webb, R. W. Behavioral, biochemical, and pharmacological effects of chronic dosage of phenothiazine tranquilizers in rats. *Advances in Biochemistry and Psychopharmacology* 9: 593-602, 1974.
106. Mann, V. M., Cooper, J. M., Krige, D., Daniel, S. E., Schapira, A. H., und Marsden, C. D. Brain, skeletal muscle and platelet homogenate mitochondrial function in Parkinson's disease. *Brain* 115 (Pt 2): 333-342, 1992.
107. Manyam, B. V. Paralysis agitans and levodopa in "Ayurveda": ancient Indian medical treatise. *Movement Disorders* 5: 47-48, 1990.
108. McGeer, P. L., Itagaki, S., Boyes, B. E., und McGeer, E. G. Reactive microglia are positive for HLA-DR in the substantia nigra of Parkinson's and Alzheimer's disease brains. *Neurology* 38: 1285-1291, 1988.
109. Mihatsch, W., Russ, H., und Przuntek, H. Intracerebroventricular administration of 1-methyl-4-phenylpyridinium ion in mice: effects of simultaneously administered

- nomifensine, deprenyl, and 1-t-butyl-4,4-diphenylpiperidine. *Journal of Neural Transmission* 71: 177-188, 1988.
110. Mitchell, J. A., Akarasereenont, P., Thiemeermann, C., Flower, R. J., and Vane, J. R. Selectivity of nonsteroidal antiinflammatory drugs as inhibitors of constitutive and inducible cyclooxygenase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America U.S.A* 90: 11693-11697, 1993.
 111. Mitsumoto, Y., Watanabe, A., Mori, A., and Koga, N. Spontaneous regeneration of nigrostriatal dopaminergic neurons in MPTP- treated C57BL/6 mice. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 248: 660-663, 1998.
 112. Mochizuki, H., Imai, H., Endo, K., Yokomizo, K., Murata, Y., Hattori, N., and Mizuno, Y. Iron accumulation in the substantia nigra of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP)-induced hemiparkinsonian monkeys. *Neuroscience Letters* 168: 251-253, 1994.
 113. Moghal, S., Rajput, A. H., D'Arcy, C., and Rajput, R. Prevalence of movement disorders in elderly community residents. *Neuroepidemiology* 13: 175-178, 1994.
 114. Mohanakumar, K. P., Muralikrishnan, D., and Thomas, B. Neuroprotection by sodium salicylate against 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-induced neurotoxicity. *Brain Research* 864: 281-290, 2000.
 115. Moller, J. C., Bandmann, O., and Oertel, W. H. [The therapy of the parkinsonian syndrome]. *Deutsche Medizinische Wochenschrift* 124: 219-222, 1999.
 116. Moser, A., Siebecker, F., Nobbe, F., and Bohme, V. Rotational behaviour and neurochemical changes in unilateral N-methyl- norsalsolinol and 6-hydroxydopamine lesioned rats. *Experimental Brain Research* 112: 89-95, 1996.
 117. Mouatt-Prigent, A., Agid, Y., and Hirsch, E. C. Does the calcium binding protein calretinin protect dopaminergic neurons against degeneration in Parkinson's disease? *Brain Research* 668: 62-70, 1994.
 118. Mueller, R. A., Thoenen, H., and Axelrod, J. Adrenal tyrosine hydroxylase: compensatory increase in activity after chemical sympathectomy. *Science* 163: 468-469, 1969.
 119. Nagatsu, T., Mogi, M., Ichinose, H., and Togari, A. Cytokines in Parkinson's disease. *Journal of Neural Transmission Suppl* 143-151, 2000.
 120. Nakao, N. und Brundin, P. Effects of alpha-phenyl-tert-butyl nitron on neuronal survival and motor function following intrastriatal injections of quinolinate or 3-nitropropionic acid. *Neuroscience* 76: 749-761, 1997.
 121. Nakao, N., Grasbon-Frodol, E. M., Widner, H., and Brundin, P. Antioxidant treatment protects striatal neurons against excitotoxic insults. *Neuroscience* 73: 185-200, 1996.

122. Nicklas, W. J., Vyas, I., und Heikkila, R. E. Inhibition of NADH-linked oxidation in brain mitochondria by 1-methyl-4-phenyl-pyridine, a metabolite of the neurotoxin, 1-methyl-4-phenyl-1,2,5,6-tetrahydropyridine. *Life Science* 36: 2503-2508, 1985.
123. Odunze, I. N., Klaidman, L. K., und Adams, J. D., Jr. MPTP toxicity in the mouse brain and vitamin E. *Neuroscience Letters* 108: 346-349, 1990.
124. Oertel, W. H. und Kupsch, A. Pathogenesis and animal studies of Parkinson's disease. *Current Opinion in Neurology and Neurosurgery* 6: 323-332, 1993.
125. Ohkuwa, T., Sato, Y., und Naoi, M. Hydroxyl radical formation in diabetic rats induced by streptozotocin. *Life Science* 56: 1789-1798, 1995.
126. Oishi, T., Hasegawa, E., und Murai, Y. Sulfhydryl drugs reduce neurotoxicity of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) in the mouse. *Journal of Neural Transmission. Parkinson's Disease and Dementia Section.* 6: 45-52, 1993.
127. Oliver, C. N., Starke-Reed, P. E., Stadtman, E. R., Liu, G. J., Carney, J. M., und Floyd, R. A. Oxidative damage to brain proteins, loss of glutamine synthetase activity, and production of free radicals during ischemia/reperfusion-induced injury to gerbil brain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 87: 5144-5147, 1990.
128. Pahl, H. L. Activators and target genes of Rel/NF-kappaB transcription factors. *Oncogene* 18: 6853-6866, 1999.
129. Perry, T. L., Yong, V. W., Clavier, R. M., Jones, K., Wright, J. M., Foulks, J. G., und Wall, R. A. Partial protection from the dopaminergic neurotoxin N-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine by four different antioxidants in the mouse. *Neuroscience Letters* 60: 109-114, 1985.
130. Perumal, A. S., Tordzro, W. K., Katz, M., Jackson-Lewis, V., Cooper, T. B., Fahn, S., und Cadet, J. L. Regional effects of 6-hydroxydopamine (6-OHDA) on free radical scavengers in rat brain. *Brain Research* 504: 139-141, 1989.
131. Phillis, J. W. und Clough-Helfman, C. Protection from cerebral ischemic injury in gerbils with the spin trap agent N-tert-butyl-alpha-phenylnitron (PBN). *Neuroscience Letters* 116: 315-319, 1990.
132. Poewe, W. Clinical features, diagnosis, and imaging of parkinsonian syndromes. *Current Opinion in Neurology and Neurosurgery* 6: 333-338, 1993.
133. Porter, C. C., Totaro, J. A., und Stone, C. A. Effect of 6-hydroxydopamine and some other components on the concentration of norepinephrine in the hearts of mice. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 140: 308-316, 2002.
134. Preston, S. J., Arnold, M. H., Beller, E. M., Brooks, P. M., und Buchanan, W. W. Comparative analgesic and anti-inflammatory properties of sodium salicylate and

- acetylsalicylic acid (aspirin) in rheumatoid arthritis. *British Journal of Clinical Pharmacology* 27: 607-611, 1989.
135. Przedborski, S. und Jackson-Lewis, V. Mechanisms of MPTP toxicity. *Movement Disorders* 13 Suppl 1: 35-38, 1998.
 136. Przedborski, S., Levivier, M., Jiang, H., Ferreira, M., Jackson-Lewis, V., Donaldson, D., und Togasaki, D. M. Dose-dependent lesions of the dopaminergic nigrostriatal pathway induced by intrastriatal injection of 6-hydroxydopamine. *Neuroscience* 67: 631-647, 1995.
 137. Raaf, S. Die intrastriatale 6-OHDA-Läsion der Ratte: Verhaltensphysiologische, histologische und biochemische Charakterisierung eines neuen Parkinson-Modells. Medizinische Dissertation, München 1993.
 138. Radi, R., Turrens, J. F., und Freeman, B. A. Cytochrome c-catalyzed membrane lipid peroxidation by hydrogen peroxide. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 288: 118-125, 1991.
 139. Ramsay, R. R., Krueger, M. J., Youngster, S. K., und Singer, T. P. Evidence that the inhibition sites of the neurotoxic amine 1-methyl-4-phenylpyridinium (MPP+) and of the respiratory chain inhibitor piericidin A are the same. *The Biochemical Journal* 273(Pt 2): 481-484, 1991.
 140. Riederer, P., Rausch, W. D., Birkmayer, W., Jellinger, K., und Seemann, D. CNS Modulation of adrenal tyrosine hydroxylase in Parkinson's disease and metabolic encephalopathies. *Journal of Neural Transmission Suppl* 121-131, 1978.
 141. Rinne, J. O., Laihininen, A., Rinne, U. K., Nagren, K., Bergman, J., und Ruotsalainen, U. PET study on striatal dopamine D2 receptor changes during the progression of early Parkinson's disease. *Movement Disorders* 8: 134-138, 1993.
 142. Rinne, U. K., Laihininen, A., Rinne, J. O., Nagren, K., Bergman, J., und Ruotsalainen, U. Positron emission tomography demonstrates dopamine D2 receptor supersensitivity in the striatum of patients with early Parkinson's disease. *Movement Disorders* 5: 55-59, 1990.
 143. Robinson, T. E. und Whishaw, I. Q. Normalization of extracellular dopamine in striatum following recovery from a partial unilateral 6-OHDA lesion of the substantia nigra: a microdialysis study in freely moving rats. *Brain Research* 450: 209-224, 1988.
 144. Rockwell P, Yuan H, Magnusson R, und Figueiredo-Pereira ME. Proteasome inhibition in neuronal cells induces a proinflammatory response manifested by upregulation of cyclooxygenase-2, its accumulation as ubiquitin conjugates, and production of the prostaglandin PGE(2). *Archives of Biochemistry and Biophysics* 374:325-33, 2000.

145. Rossetti, Z. L., Sotgiu, A., Sharp, D. E., Hadjiconstantinou, M., und Neff, N. H. 1-Methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) and free radicals in vitro. *Biochemical Pharmacology* 37 : 4573-4574, 1988.
146. Russ, H., Mihatsch, W., Gerlach, M., Riederer, P., und Przuntek, H. Neurochemical and behavioural features induced by chronic low dose treatment with 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) in the common marmoset: implications for Parkinson's disease? *Neuroscience Letters* 123: 115-118, 1991.
147. Saner, A. und Thoenen, H. Model experiments on the molecular mechanism of action of 6-hydroxydopamine. *Molecular Pharmacology* 7: 147-154, 1971.
148. Sauer, H. und Oertel, W. H. Progressive degeneration of nigrostriatal dopamine neurons following intrastriatal terminal lesions with 6-hydroxydopamine: a combined retrograde tracing and immunocytochemical study in the rat. *Neuroscience* 59: 401-415, 1994.
149. Sautter, J., Kupsch, A., Earl, C. D., und Oertel, W. H. Degeneration of pre-labelled nigral neurons induced by intrastriatal 6-hydroxydopamine in the rat: behavioural and biochemical changes and pretreatment with the calcium-entry blocker nimodipine. *Experimental Brain Research* 117: 111-119, 1997.
150. Schapira, A. H., Cooper, J. M., Dexter, D., Clark, J. B., Jenner, P., und Marsden, C. D. Mitochondrial complex I deficiency in Parkinson's disease. *Journal of Neurochemistry* 54: 823-827, 1990.
151. Schmidt, N. und Ferger, B. Neurochemical findings in the MPTP model of Parkinson's disease. *Journal of Neural Transmission* 108: 1263-1282, 2001.
152. Schmued, L. C., Beltramino, C., und Slikker, W., Jr. Intracranial injection of Fluoro-Gold results in the degeneration of local but not retrogradely labeled neurons. *Brain Research* 626: 71-77, 1993.
153. Schoepp, D. D. und Azzaro, A. J. Role of type A and type B monoamine oxidase in the metabolism of released [³H]dopamine from rat striatal slices. *Biochemical Pharmacology* 31 : 2961-2968, 1982.
154. Schreck, R., Grassmann, R., Fleckenstein, B., und Baeuerle, P. A. Antioxidants selectively suppress activation of NF-kappa B by human T-cell leukemia virus type I Tax protein. *Journal of Virology* 66: 6288-6293, 1992.
155. Schulz, J. B., Henshaw, D. R., Siwek, D., Jenkins, B. G., Ferrante, R. J., Cipolloni, P. B., Kowall, N. W., Rosen, B. R., und Beal, M. F. Involvement of free radicals in excitotoxicity in vivo. *Journal of Neurochemistry* 64: 2239-2247, 1995.
156. Schwarting, R. K., Bonatz, A. E., Carey, R. J., und Huston, J. P. Relationships between indices of behavioral asymmetries and neurochemical changes following mesencephalic 6-hydroxydopamine injections. *Brain Research* 554: 46-55, 1991.

157. Senoh, S., Witkop, B., Udenfriend, S., und Creveling, C. R. Chemical, enzymatic and metabolic studies on the oxidation of dopamine. *Journal of the American Chemical Society* 81: 6236-6240, 1959.
158. Sotelo, C., Javoy, F., Agid, Y., und Glowinski, J. Injection of 6-hydroxydopamine in the substantia nigra of the rat. I. Morphological study. *Brain Research* 58: 269-290, 1973.
159. Soto-Otero, R., Mendez-Alvarez, E., Hermida-Ameijeiras, A., Munoz-Patino, A. M., und Labandeira-Garcia, J. L. Autoxidation and neurotoxicity of 6-hydroxydopamine in the presence of some antioxidants: potential implication in relation to the pathogenesis of Parkinson's disease. *Journal of Neurochemistry* 74: 1605-1612, 2000.
160. Storch, A., Kaftan, A., Burkhardt, K., und Schwarz, J. 6-Hydroxydopamine toxicity towards human SH-SY5Y dopaminergic neuroblastoma cells: independent of mitochondrial energy metabolism. *Journal of Neural Transmission* 107: 281-293, 2000.
161. Stull, N. D., Polan, D. P., und Iacovitti, L. Antioxidant compounds protect dopamine neurons from death due to oxidative stress in vitro. *Brain Research* 931: 181-185, 2002.
162. Svenson, L. W. Regional disparities in the annual prevalence rates of Parkinson's disease in Canada. *Neuroepidemiology* 10: 205-210, 1991.
163. Takahashi, N., Miner, L. L., Sora, I., Ujike, H., Revay, R. S., Kostic, V., Jackson-Lewis, V., Przedborski, S., und Uhl, G. R. VMAT2 knockout mice: heterozygotes display reduced amphetamine- conditioned reward, enhanced amphetamine locomotion, and enhanced MPTP toxicity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94: 9938-9943, 1997.
164. Tanner, C. M. Epidemiology of Parkinson's disease. *Neurologic Clinics* 10: 317-329, 1992.
165. Teismann, P. und Ferger, B. Inhibition of the cyclooxygenase isoenzymes COX-1 and COX-2 provide neuroprotection in the MPTP-mouse model of Parkinson's disease. *Synapse* 39: 167-174, 2001.
166. Teismann, P., Schwaninger, M., Weih, F., und Ferger, B. Nuclear factor-kappaB activation is not involved in a MPTP model of Parkinson's disease. *Neuroreport* 12: 1049-1053, 2001.
167. Tetrud, J. W., Langston, J. W., Garbe, P. L., und Ruitenberg, A. J. Mild parkinsonism in persons exposed to 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6- tetrahydropyridine (MPTP). *Neurology* 39: 1483-1487, 1989.
168. The Parkinson Study Group Effects of tocopherol and deprenyl on the progression of disability in early Parkinson's disease. *New England Journal of Medicine* 328: 176-183, 1993.

169. Thoenen, H. und Tranzer, J. P. Chemical sympathectomy by selective destruction of adrenergic nerve endings with 6-Hydroxydopamine. *Naunyn Schmiedebergs Archives of Experimental and Pathological Pharmacology* 261: 271-288, 1968.
170. Thrower JS, Hoffman L, Rechsteiner M, Pickart CM. Recognition of the polyubiquitin proteolytic signal. *The EMBO Journal* 19(1):94-102, 2000.
171. Uitti, R. J. und Calne, D. B. Pathogenesis of idiopathic parkinsonism. *European Neurology* 33 Suppl 1: 6-23, 1993.
172. Ungerstedt, U. 6-Hydroxy-dopamine induced degeneration of central monoamine neurons. *European Journal of Pharmacology* 5: 107-110, 1968.
173. Ungerstedt, U. Adipsia and aphagia after 6-hydroxydopamine induced degeneration of the nigro-striatal dopamine system. *Acta Physiologica Scandinavica Suppl* 367: 95-122, 1971.
174. Ungerstedt, U. und Arbuthnott, G. W. Quantitative recording of rotational behavior in rats after 6-hydroxy- dopamine lesions of the nigrostriatal dopamine system. *Brain Research* 24: 485-493, 1970.
175. Vieregge, P., Hagenah, J., Heberlein, I., Klein, C., und Ludin, H. P. Parkinson's disease in twins: a follow-up study. *Neurology* 53: 566-572, 1999.
176. Wagner, G. C., Carelli, R. M., und Jarvis, M. F. Ascorbic acid reduces the dopamine depletion induced by methamphetamine and the 1-methyl-4-phenyl pyridinium ion. *Neuropharmacology* 25: 559-561, 1986.
177. Westwick, J. K., Weitzel, C., Minden, A., Karin, M., und Brenner, D. A. Tumor necrosis factor alpha stimulates AP-1 activity through prolonged activation of the c-Jun kinase. *Journal of Biology and Chemistry* 269: 26396-26401, 1994.
178. Wu, K. K. Biochemical pharmacology of nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Biochemical Pharmacology* 55: 543-547, 1998.
179. Yamada, K., Umegaki, H., Maezawa, I., Iguchi, A., Kameyama, T., und Nabeshima, T. Possible involvement of catalase in the protective effect of interleukin-6 against 6-hydroxydopamine toxicity in PC12 cells. *Brain Research Bulletin* 43: 573-577, 1997.
180. Yaron A, Gonen H, Alkalay I, Hatzubai A, Jung S, Beyth S, Mercurio F, Manning AM, Ciechanover A, Ben-Neriah Y. Inhibition of NF-kappa-B cellular function via specific targeting of the I-kappa-B-ubiquitin ligase. *The EMBO Journal* 16(21):6486-94, 1997.
181. Youdim, M. B., Ben Shachar, D., und Riederer, P. Is Parkinson's disease a progressive siderosis of substantia nigra resulting in iron and melanin induced neurodegeneration? *Acta Neurologica Scandinavica Suppl* 126: 47-54, 1989.
182. Youdim, M. B., Grunblatt, E., und Mandel, S. The pivotal role of iron in NF-kappa B activation and nigrostriatal dopaminergic neurodegeneration. Prospects for

- neuroprotection in Parkinson's disease with iron chelators. *Annals of the New York Academy of Sciences* 890: 7-25, 1999.
183. Zang, L. Y. und Misra, H. P. EPR kinetic studies of superoxide radicals generated during the autoxidation of 1-methyl-4-phenyl-2,3-dihydropyridinium, a bioactivated intermediate of parkinsonian-inducing neurotoxin 1-methyl-4-phenyl- 1,2,3,6-tetrahydropyridine. *Journal of Biology and Chemistry* 267: 23601-23608, 1992.
184. Zigmond, M. J., Acheson, A. L., Stachowiak, M. K., und Stricker, E. M. Neurochemical compensation after nigrostriatal bundle injury in an animal model of preclinical parkinsonism. *Archives of Neurology* 41: 856-861, 1984.
185. Zigmond, M. J. und Stricker, E. M. Animal models of parkinsonism using selective neurotoxins: clinical and basic implications. *International Review of Neurobiology* 31: 1-79, 1989.

8 ANHANG

8.1 Abkürzungen

2,3 DHBA	2,3 Dihydroxybenzoesäure
6-OHDA	6-Hydroxydopamin-hydrobromid
ASS	Acetylsalicylsäure
BW	Body Weight
D1	Dopamin 1 Rezeptoren
D2	Dopamin 2 Rezeptoren
DOPAC	Dihydroxyphenylelessigsäure
FG	Fluorogold
FG-p	Fluorogold-positiv
GABA	Gamma-amino-buttersäure
GPe	Globus pallidus externus
GPi	Globus pallidus internus
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
i.p.	intraperitoneal
IPS	idiopathisches Parkinson Syndrom
KG	Körpergewicht
L-Dopa	Levodopa
MPTP	1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine
PBN	N-tert-butyl- α -phenylnitron
s.c.	subcutan
SNpc	Substantia nigra pars compacta
SNpr	Substantia nigra pars reticulata
SS	Salicylsäure
STN	Nucleus subthalamicus
TH	Tyrosinhydroxylase
TH-ir	Tyrosinhydroxylase-immunreaktiv
Trolox	Trolox [®] Methyl-Ether

8.2 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Klinisches Bild eines am IPS erkrankten Patienten.	6
Abb. 2: Histologischer Schnitt auf Höhe der Substantia nigra, intrazellulär Eiweissablagerung im Sinne von Lewykörperchen	7
Abb. 3: Funktionelles Modell der Basalganglien einer Person mit normaler motorischer Funktion	9
Abb. 4: Funktionelles Modell der Basalganglien einer Person mit IPS	10
Abb. 5: Es sind mehrere Beispiele der Abfangmechanismen oxidativen Stresses gezeigt	12
Abb. 6: Die Fenton-Reaktion.	13
Abb. 7: Strukturformeln von Dopamin und 6-OHDA	18
Abb. 8: Transformation des Protoxins MPTP	22
Abb. 9 : Salicylsäure = 2-Hydroxybenzoesäure	27
Abb. 10: Darstellung der Hauptreaktionsprodukte von SS unter Einfluss von Hydroxylradikalen	28
Abb. 11: Der vermutete Reaktionsweg	29
Abb. 12: Strukturformel von Trolox [®] Methyl-Ether	30
Abb. 13: Aufsicht auf das Schädelskelett einer Ratte mit eingezeichneten Orientierungspunkten	36
Abb. 14: Übersicht über den Versuchsablauf des chronischen FG/6-OHDA-Modelles	37
Abb. 15: Darstellung der Präparation der dissezierten Gehirne mit Markierung der zu gewinnenden Striata	38
Abb. 16: Exemplarischer Ausdruck einer HPLC-Kurve mit –Tabelle	40
Abb. 17: FG markierte Neurone der SNpc	43
Abb. 18: Schematische Darstellung der Avidin-Biotin-Immunperoxidase Färbung	44
Abb. 19: Koronarer Kryoschnitt auf Höhe der SNpc in TH-Immunperoxidase- Färbetechnik	47
Abb. 20: Einfluss der Behandlung mit SS auf den durch 6-OHDA induzierten striatalen DA-Verlust	53
Abb. 21: Einfluss der Behandlung mit SS auf den durch 6-OHDA induzierten striatalen DA-Verlust	55

Abb. 22: Einfluss von Trolox auf den durch die MPTP-Läsion induzierten Verlust an striatalem Dopamin	56
Abb. 23: Einfluss der Behandlung mit SS auf die durch 6-OHDA induzierte striatale Zunahme des Dopaminmetabolismus	58
Abb. 24: Einfluss der Behandlung mit SS auf die durch 6-OHDA induzierte striatale Zunahme des Dopaminmetabolismus	59
Abb. : Einfluss von Trolox auf den durch die MPTP-Läsion induzierten Anstieg des Dopaminumsatzes	61
Abb. 26: Einfluss der Behandlung mit SS auf den durch 6-OHDA induzierten nigralen Verlust an FG-p Neurone	62
Abb. 27: Einfluss der Behandlung mit PBN auf den durch 6-OHDA induzierten nigralen Verlust an FG-p Neurone	64
Abb. 28: Mikrofotografie eines FG gefärbten Schnittes mit Vergrößerung im Bereich der SNpc	65
Abb. 29: Einfluss der Behandlung mit SS auf den durch 6-OHDA induzierten nigralen Verlust an TH-ir Neuronen	67
Abb. 30: Einfluss der Behandlung mit PBN auf den durch 6-OHDA induzierten nigralen Verlust an TH-ir Neuronen	68
Abb. 31: Mikrofotografie eines TH-immunperoxidase gefärbten Schnittes mit Vergrößerung im Bereich der SNpc	69/70
Abb. 32: Einfluss von Trolox auf den durch die MPTP-Läsion induzierten Verlust nigraler TH-ir Neurone	72
Abb. 33: Mikrofotografie von zwei TH-immunperoxidase gefärbten Schnitten der Maus mit Vergrößerung im Bereich der SNpc	72/73
Abb. 34: Einfluss von Trolox auf die durch die MPTP-Läsion induzierte verminderte lokomotorische Aktivität	75

8.3 Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Übersicht der Therapiestrategien beim IPS	25
Tab. 2: Dosierungsschema im FG/6-OHDA und MPTP-Modell	34/35
Tab. 3: Färbeprotokoll der TH-Immunperoxidase-Färbung	45
Tab. 4: DA-Gehalt der Striata im SS-Versuch	53
Tab. 5: DA-Gehalt der Striata im SS-Versuch	54
Tab. 6: DA-Gehalt der Striata im Troloxversuch	56
Tab. 7: Dopaminumsatz im SS-Versuch	57
Tab. 8: Dopaminumsatz im PBN-Versuch	59
Tab. 9: Dopaminumsatz im Troloxversuch	60
Tab. 10: Anzahl FG-p Neurone der SNpc im SS-Versuch	62
Tab. 11: Anzahl FG-p Neurone der SNpc im PBN-Versuch	64
Tab. 12: Anzahl TH-ir Neurone der SNpc im SS-Versuch	66
Tab. 13: Anzahl TH-ir Neurone der SNpc im PBN-Versuch	68
Tab. 14: Anzahl TH-ir Neurone der SNpc im und Troloxversuch	71
Tab. 15: Effekte der MPTP-Läsion in Bezug auf die prä- und postläsionellen lokomotorischen Aktivitäten	74

8.4 Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name, Vorname: Fritsch, Brita
Geburtsdatum: 06.12.1973
Geburtsort: Salzgitter (Niedersachsen)
Anschrift: Am Berg 12, 35041 Marburg

Schulbildung:

1980–1984 Grundschule, Dieburg
1984–1990 Gesamtschule, Dieburg (Gymnasialer Zweig)
1990–1993 Gymnasiale Oberstufe, Dieburg (Abitur)

Akademische Ausbildung:

Seit 1993 Studium der Humanmedizin an der Philipps–Universität Marburg
14.09.1995 Physicum
29.08.1996 1. Staatsexamen
Seit 1997 Beginn der Dissertation (Titel: “Untersuchung neuroprotektiver Effekte von Radikalfängern in Tiermodellen des Morbus Parkinson”) an der Klinik für Neurologie der Philipps-Universität Marburg (Prof. Dr. W.H. Oertel)
08.09.1999 2. Staatsexamen
Okt. 1999 bis Okt.2000 Praktisches Jahr
17.11.2000 3. Staatsexamen
01.02.2001 bis 31.07.2002 Ärztin im Praktikum am MZ für Neurologie der Philipps-Universität Marburg, wissenschaftlich tätig in der AG Epileptologie unter Prof. Dr. F. Rosenow, Schwerpunkt: Tiermodelle der Epilepsie (tiefe Hirnstimulation)
01.08.2002 Wissenschaftliche Assistentin am MZ für Neurologie der Philipps-Universität Marburg, Fortführung der wissenschaftlichen Tätigkeit in der AG Epileptologie unter Prof. Dr. F. Rosenow, Schwerpunkt: Tiermodelle der Epilepsie (tiefe Hirnstimulation, Neuroprotektion, funktionelle Bildgebung)

8.5 Verzeichnis akademischer Lehrer

Meine akademischen Lehrer waren die Damen und Herren

in Marburg:

Amon, Arnold, Aumüller, Aziz, Barth, Basler, Bauer, Baum,
Beato, Becker, Berendes, Berndt, Bertalanffy, Besedovsky, Beyer, Bien, Daut,
Diedrich, Dittrich, Dodel, Eilers, Engel, Engenhardt-Cabillic, Eschenbach, Feuser,
Friederich, Fruhstorfer, Fuhrmann, Gemsa, Geus, Göke, Görg, Gotzen, Graul, Gressner,
Grimm, Griss, Habermehl, Hamer, Happle, Hasilik, Havemann, Hebebrand, Heeg,
Heidenreich, Hellinger, Hemmer, Hesse, Hering, Herzum, Heß, Heufelder, Hildebrandt,
Hofmann, Hoffmann, Huffmann, Jacob, Joseph, Kälble, Kaffarnik, Karlson,
Katschinski, Kern, Kleine, Klenk, Klötzer, Klose, Knauff, Knoll, Köhler, Koolman,
Krause, Kretschmer, Krieg, Kroll, Kuhn, Lang, Lange, Lauer, Lehmann, Legrum,
Lemberg, Lennartz, Lill, Lippert, Lorenz, Lotzmann, Ludwig, Lütcke, Maisch, Mann,
Mennel, Moll, Moosdorf, Mueller, Müller, Mutters, Neubauer, Neurath, Niemeyer,
Niessing, Oertel, Peter, Petermann, Pfeiffer, Pohlen, Portig, Radsak, Remschmidt, Renz,
Richter, Riegel, Rosenow, Rothmund, Schachtschabel, Schäfer, Schäfer, Schepelmann,
Schiff, Schleyer, Schmid, Schmidt, Schmitz-Moormann, Schnabel, Schneider,
Schumacher, Schüffel, Schulz, Schwarz, Seifart, Seitz, Seyberth, Slenczka, Sommer,
Steiniger, Stiletto, Stempel, Thomas, Vogelmeier, Voigt, Weber, Weihe, Werner,
Wesemann, von Wichert, Wiegandt, Wolf.

8.6 Danksagung

Bedanken möchte ich mich bei Herrn Professor Wolfgang H. Oertel für die vertrauensvolle Annahme als Doktorandin und für die Möglichkeit, die Arbeit unter sehr motivierenden Bedingungen und in großer Freiheit durchführen zu können.

Herrn Christopher Earl, PhD, danke ich für die Einführung in die Technik und Durchführung der experimentellen Tiermodelle, die hilfreiche Durchsicht der Ergebnisse und Manuskripte, für seine konstruktiven Kritiken sowie die motivierte Introduction in Techniken des wissenschaftlichen Arbeitens.

Zu besonderem Dank verpflichtet bin ich auch Frau Astrid Dempfle für zahlreiche wertvolle Ratschläge im Rahmen der Einweisung in den adäquaten Einsatz statistischer Verfahren, wie auch Frau Anja Haag für ihre statistische Beratung.

Für die Durchsicht des Manuskriptes danke ich wiederum Herrn Prof. Wolfgang H. Oertel, Herrn Prof. Felix Rosenow, Janine Reis, Anja Haag und Wilhelm Wegener.

Meiner Studienkollegin im praktischen Teil der vorgelegten Arbeit, Astrid Metzel, möchte ich für die gegenseitige helfende Hand, fachliche und freundschaftliche Diskussionen sowie ein dadurch bedingtes angenehmes Arbeitsklima danken.

Meiner Familie und insbesondere meinem Lebensgefährten Ulrich Wegener danke ich für die liebevolle und geduldige Unterstützung, der ich viel Kraft und Selbstvertrauen in die eigenen Möglichkeiten zu verdanken habe.

Diese Arbeit wurde durch die Gemeinnützige Hertiestiftung und den SFB 279 unterstützt.

8.7 Publikationsliste

Abstracts:

- Fritsch, B., Ferger, B., Oertel, W.H., Kuschinsky, K. & Earl, C.D.. Salicylic acid increases the number of surviving dopaminergic cells in the rat substantia nigra following the intrastriatal application of 6-hydroxydopamine. *European Journal of Neuroscience* 10 [Suppl. 10]: 200, 1998.

- Ferger, B., Fritsch, B., Oertel, W.H. & Earl, C.D. The radical scavenger PBN reduces the depletion of striatal dopamine in the progressive 6-OHDA rat model of PD. *European Journal of Neuroscience* 10 [Suppl. 10]: 199, 1998.

- Fritsch, B., Ferger, B., Kuschinsky, K., Oertel, W.H. & Earl, C.D. Indomethacine, an inhibitor of COX, does not show neuroprotective properties in the MPTP-mouse model of Parkinson's disease. *Journal of Neural Transmission* 106: IX, 1999.

8.8 Ehrenwörtliche Erklärung

Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die dem Fachbereich Humanmedizin Marburg zur Promotionsprüfung eingereichte Arbeit mit dem Titel

“Untersuchung
neuroprotektiver Effekte von Radikalfängern in Tiermodellen
des Morbus Parkinson”

in der Abteilung für Neurologie im Medizinischen Zentrum für Nervenheilkunde der Philipps-Universität Marburg unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. Wolfgang H. Oertel mit Unterstützung durch Herrn PhD Christopher Earl ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als die in der Dissertation angeführten Hilfsmittel benutzt habe.

Ich habe bisher an keinem in- und ausländischen Medizinischen Fachbereich ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht noch die vorliegende oder eine andere Arbeit als Dissertation vorgelegt.

(Ort, Datum)

(Unterschrift)