

Aus der Klinik für Neurologie  
des Vivantes Klinikum Spandau  
Akademisches Lehrkrankenhaus der Charité zu Berlin

**Dissertation**

**Neurophysiologische Untersuchungen  
zur Wirksamkeit der alpha-Liponsäure bei der  
experimentellen Hexacarbonneuropathie**

Zur Erlangung des akademischen Grades  
Doctor medicinae (Dr. med.)

Vorgelegt der Medizinischen Fakultät  
Charité Universitätsmedizin Berlin

von

Georg Walter

Aus Frankfurt am Main

Gutachter:

1. Prof. Dr. H. Altenkirch
2. Prof. Dr. G. Curio
3. Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. M. Schöneshöfer

Datum der Promotion: 18. September 2009

# Inhaltsverzeichnis

<b>1. VERZEICHNIS DER ABKÜRZUNGEN .....</b>	<b>5</b>
<b>2. VERZEICHNIS DER ABBILDUNGEN.....</b>	<b>8</b>
<b>3. EINLEITUNG .....</b>	<b>11</b>
3.1. INTOXIKATIONEN MIT N-HEXAN UND MNBK.....	11
3.2. DIE HEXACARBONNEUROPATHIE .....	12
3.3. STOFFWECHSEL UND TOXIZITÄT DER HEXACARBONE.....	13
3.4. THERAPIE DER HEXACARBONNEUROPATHIEN .....	17
3.5. $\alpha$ -LIPONSÄURE.....	18
3.6. DIE EXPERIMENTELLE HEXACARBONNEUROPATHIE .....	19
3.6.1. Klinische Befunde .....	20
3.6.2. Pathomorphologische Befunde .....	20
3.6.3. Hexacarbonwirkung auf Zellkulturen .....	22
3.6.4. Folgen einer topischen Applikation von Hexacarbonen auf vitale Nerven .....	22
3.6.5. Störungen der Zytoskelettstruktur und des axonalen Transportes durch Hexacarbonate.....	23
3.7. NEUROPHYSIOLOGISCHE UNTERSUCHUNGEN AM PERIPHEREN NERVENSYSTEM DER RATTE .....	24
3.8. ANATOMIE DES RATTENSCHWANZES .....	25
<b>4. FRAGESTELLUNG .....</b>	<b>26</b>
<b>5. VERSUCHSPLANUNG .....</b>	<b>27</b>
5.1. VORVERSUCH.....	27
5.2. HAUPTVERSUCH.....	28
<b>6. MATERIAL UND METHODEN .....</b>	<b>29</b>
6.1. VERSUCHSTIERE UND GRUPPENEINTEILUNG .....	29
6.2. N-HEXAN .....	29
6.3. $\alpha$ -LIPONSÄURE.....	29
6.4. APPLIKATION DER $\alpha$ -LIPONSÄURE .....	30
6.5. EXPOSITION.....	30
6.6. WARTUNG UND FÜTTERUNG DER TIERE.....	31
6.7. KLINISCH-NEUROLOGISCHE UNTERSUCHUNG DER TIERE .....	32
6.8. NEUROPHYSIOLOGISCHE UNTERSUCHUNGEN.....	32
6.8.1. Elektromyograph.....	32
6.8.2. Temperaturkontrolle.....	33
6.8.3. Vorrichtung zur Fixierung der Ratte .....	33
6.8.4. Elektrodenhalter .....	33
6.8.5. Elektroden und Kabel.....	34
6.8.6. Präparation des Rattenschwanzes.....	34
6.8.7. Durchführung der Messung.....	35
6.9. DATENERFASSUNG UND STATISTIK .....	36
<b>7. ERGEBNISSE .....</b>	<b>38</b>
7.1. VORBEMERKUNG .....	38
7.2. EINZELERGEBNISSE DES VORVERSUCHES.....	38
7.2.1. Latenz I .....	38
7.2.2. Latenz II .....	41
7.2.3. Latenzdifferenz .....	44
7.2.4. Statistische Daten des Vorversuches .....	47
7.2.4. Tabellarische Darstellung der Amplituden (Vorversuch).....	49
7.3. ERGEBNISSE DES HAUPTVERSUCHES.....	51
7.3.1. Latenz I und Latenz II .....	51
7.3.2. Latenzdifferenz .....	58
7.3.3. Statistische Daten des Hauptversuches .....	61
7.3.4. Tabellarische Darstellung der Amplituden (Hauptversuch).....	63
<b>8. DISKUSSION .....</b>	<b>65</b>

8.1. NEUROPHYSIOLOGISCHE METHODIK.....	65
8.1.1. Elektrodenposition .....	67
8.1.2. Diskrepante Ausgangswerte.....	70
8.1.3. Vergleich mit den Ergebnissen anderer Autoren.....	72
8.2. NEUROPHYSIOLOGISCHE CHARAKTERISTIKA DER HEXACARBONNEUROPATHIE .....	73
8.3. VERBESSERUNGSMÖGLICHKEITEN DER METHODE .....	76
8.4. MÖGLICHE WIRKUNGEN DER $\alpha$ -LIPONSÄURE BEI DER EXPERIMENTELLEN HEXACARBONNEUROPATHIE ....	77
8.4.1. Hypothese I: Bindung von Toxinen durch $\alpha$ -Liponsäure.....	77
8.4.2. Hypothese II: Schutz glykolytischer Enzyme durch $\alpha$ -Liponsäure.....	78
8.4.3. Hypothese III: $\alpha$ -Liponsäure verhindert die Alteration der Neurofilamente.....	81
8.4.4. Hypothese IV: $\alpha$ -Liponsäure fördert die axonale Regeneration.....	86
8.4.5. Wertung der eigenen Ergebnisse .....	87
<b>9. ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>89</b>
<b>10. LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>91</b>
<b>11. DANKSAGUNG.....</b>	<b>114</b>
<b>12. LEBENSLAUF .....</b>	<b>115</b>
<b>13. PUBLIKATIONSLISTE .....</b>	<b>116</b>
<b>14. SELBSTSTÄNDIGKEITSERKLÄRUNG .....</b>	<b>117</b>

# 1. VERZEICHNIS DER ABKÜRZUNGEN

Amp.I	Amplitude des (proximal abgeleiteten) Muskelaktionspotentials (Lat.I)
Amp.II	Amplitude des (distal abgeleiteten) Muskelaktionspotentials (Lat.II)
CS <sub>2</sub>	Schwefelkohlenstoff
DH-LS	Dihydroliponsäure
DL	Distale Latenz
DTT	Dithiotreitol
GAPDH	Glyceraldehyd-3-Phosphatdehydrogenase
GFAP-IF	Glial fibrillary acidic protein (Intermediate filament)
Gruppe H	Versuchstiergruppe (Hexan): 700 ppm Hexan ab Tag 0.
Gruppe HL	Versuchstiergruppe (Hexan + Liponsäure): 700 ppm Hexan ab Tag 0, zusätzlich Behandlung mit 10 mg Liponsäure ab Tag 0.
Gruppe HL <sub>42</sub>	Versuchstiergruppe (Hexan + Liponsäure Tag 42): 700 ppm Hexan ab Tag 0, zusätzlich Behandlung mit 10 mg Liponsäure ab Tag 42.
Gruppe K	Versuchstiergruppe (Kontrollen): Keine Hexanexposition, keine Behandlung mit Liponsäure.
Gruppe KL	Versuchstiergruppe (Kontrollen + Liponsäure): Keine Hexanexposition, Behandlung mit 10 mg Liponsäure ab Tag 0.
Gruppe KL <sub>42</sub>	Versuchstiergruppe (Kontrollen + Liponsäure Tag 42): Keine Hexanexposition, Behandlung mit 10 mg Liponsäure ab Tag 42.
IDPN	Iminodipropionitril

kDa	kilo Dalton
KG	Körpergewicht
Lat.I	Latenz I, proximal abgeleitetes Aktionspotential.
Lat.II	Latenz II, distal abgeleitetes Aktionspotential.
m/s	Meter pro Sekunde
mA	milli-Ampère
MAP	Muskelaktionspotential
MCV	Motor conduction velocity (Nervenleitgeschwindigkeit)
MEK	Methyl-Ethyl-Keton
MnBK	Methyl-n-Butyl-Keton (= 2-Hexanon)
MNCV	Mixed nerve conduction velocity
ms	Milli-Sekunden
MW	Mittelwert
NF	Neurofilament
NLG	Nervenleitgeschwindigkeit
PFK	Phosphofruktokinase
PNS	Peripheres Nervensystem
ppm	Parts per Million
SCV	Sensory conduction velocity (Leitgeschwindigkeit sensibler Nervenfasern)
SH	Sulfidgruppen
ZNS	Zentrales Nervensystem
$\alpha$ -LS	alpha-Liponsäure
1,6-HD	1,6-Hexandion
2,5-HD	2,5-Hexandion

2,5-Hdiol	2,5-Hexandiol
3,4-DMHD	3,4-Di-Methyl-Hexandion

## 2. VERZEICHNIS DER ABBILDUNGEN

<b>Abbildung</b>	<b>Beschreibung</b>	<b>Seite</b>
1	Formeln n-Hexan, MnBK und 2,5-Hexandion	11
2	Metaboliten der Hexacarbone	15
3	Formel von Methylethyleketon (MEK)	16
4	Formeln von alpha-Liponsäure und Dihydroliponsäure	18
5	Darstellung einer Expositionseinheit	31
6	Schematische Darstellung der Elektrodenpaare	34
7	Meßprotokoll	36
8	Vorversuch Latenz I, Gruppe K	39
9	Vorversuch Latenz I, Gruppe H	39
10	Vorversuch Latenz I, Gruppen KL und KL42	40
11	Vorversuch Latenz I, Gruppe HL	40
12	Vorversuch Latenz I, Gruppe HL42	41
13	Vorversuch Latenz II, Gruppe K	42
14	Vorversuch Latenz II, Gruppe H	42
15	Vorversuch Latenz II, Gruppen KL und KL42	43
16	Vorversuch Latenz II, Gruppe HL	43
17	Vorversuch Latenz II, Gruppe HL42	44
18	Vorversuch Latenzdifferenz, Gruppe K	45
19	Vorversuch Latenzdifferenz, Gruppe H	45
20	Vorversuch Latenzdifferenz, Gruppen KL und KL42	46
21	Vorversuch Latenzdifferenz, Gruppe HL	46
22	Vorversuch Latenzdifferenz, Gruppe HL42	47



<b>Abbildung</b>	<b>Beschreibung</b>	<b>Seite</b>
23	Wilcoxon test Vorversuch, Hexan / Kontrollen	47
24	Wilcoxon test Vorversuch, Hexan / Hexan + Liponsäure	48
25	Wilcoxon test Vorversuch, HL / HL42	48
26	Tabelle Amplituden Vorversuch	49-51
27	Latenz I Hauptversuch Gruppe K	52
28	Latenz I Hauptversuch Gruppe H	52
29	Latenz I Hauptversuch Gruppe H	53
30	Latenz I Hauptversuch Gruppe KL	53
31	Latenz I Hauptversuch Gruppe HL	54
32	Latenz I Hauptversuch Gruppe HL	54
33	Latenz II Hauptversuch Gruppe K	55
34	Latenz II Hauptversuch Gruppe H	55
35	Latenz II Hauptversuch Gruppe H	56
36	Latenz II Hauptversuch Gruppe KL	56
37	Latenz II Hauptversuch Gruppe HL	57
38	Latenz II Hauptversuch Gruppe HL	57
39	Latenzdifferenz Hauptversuch, Gruppe K	58
40	Latenzdifferenz Hauptversuch, Gruppe H	58
41	Latenzdifferenz Hauptversuch, Gruppe H	59
42	Latenzdifferenz Hauptversuch, Gruppe KL	59
43	Latenzdifferenz Hauptversuch, Gruppe HL	60
44	Latenzdifferenz Hauptversuch, Gruppe HL	60
45	Wilcoxon test Hauptversuch, Hexan / Kontrollen	61

<b>Abbildung</b>	<b>Beschreibung</b>	<b>Seite</b>
46	Wilcoxon test Hauptversuch HL / KL	62
47	Wilcoxon test Hauptversuch H / HL	62
48	Tabelle Amplituden Hauptversuch	63-64
49	Grafisches Verfahren: Bestimmung der terminalen Überleitungszeit	69
50	Vergleich der neurophysiologischen Methoden und Ergebnisse	72
51	Reaktion des 2,5-HD mit Neurofilamentproteinen	83

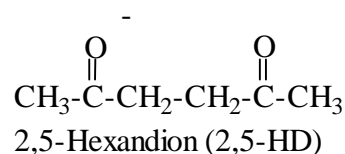
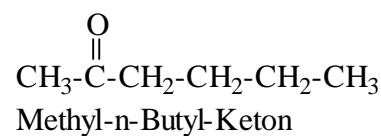
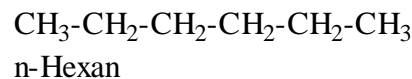
### 3. EINLEITUNG

Die folgende Einleitung gibt zunächst einen Überblick über die Wirkungen der Hexacarbonyl auf das Nervensystem, dabei werden epidemiologische, arbeitsmedizinische und tierexperimentelle Aspekte dargestellt. Daneben beschäftigt sich dieser Abschnitt auch mit den grundlegenden Daten zur  $\alpha$ -Liponsäure und den anatomischen Voraussetzungen der hier angewandten neurophysiologischen Methode.

#### 3.1. INTOXIKATIONEN MIT N-HEXAN UND MNBK

Organische Lösungsmittel werden auf Grund ihrer Eigenschaften, wie gute Fettlöslichkeit, leichte Flüchtigkeit etc. in großem Maße industriell eingesetzt. Auch im privaten Bereich kommen diese Stoffe als Bestandteile von Farben, Lacken, Klebstoffen, Verdünnern und Reinigungsmitteln zur Anwendung. Neurotoxische Wirkungen organischer Lösemittel sind seit langem bekannt [202][21][66][74].

N-Hexan und MnBK gehören zur Gruppe der sogenannten "Hexacarbonyl". Im angelsächsischen Raum hat sich diese Bezeichnung durchgesetzt für aliphatische Kohlenwasserstoffe mit sechs C-Atomen.



*Abb. 1: Formeln von n-Hexan, MnBK, 2,5-HD*

N-Hexan wird meist in Lösemittelgemischen angetroffen, die weitere Substanzen wie Aceton, MEK, MnBK, Benzol oder Toluol enthalten [202]. In Italien wurden Hunderte von

Arbeitern aus der Schuh- und Lederindustrie mit lösemittelinduzierten sensomotorischen Neuropathien gemeldet [172][171][147][36][56]. Ähnliche Berichte liegen aus Japan vor [102][237]. Auch in den USA kam es wiederholt zum Ausbruch lösemittelinduzierter, am Arbeitsplatz erworbener sensomotorischer Neuropathien [3][104][156][96][21]. In der überwiegenden Zahl der Fälle wurden n-Hexan oder (seltener) Methyl-n-Butyl-Keton für die Entwicklung der Nervenschädigung verantwortlich gemacht [195][5]. Diese Berichte betreffen die 50er bis 70er Jahre des 20. Jahrhunderts, mittlerweile sind lösemittelinduzierte Neuropathien durch arbeitshygienische Maßnahmen in den Industrieländern selten geworden.

Berichte über neurotoxische Syndrome, insbesondere sensomotorische Polyneuropathien bei Lösemittelmißbrauch, liegen aus den verschiedensten Ländern vor [67][117][42][158][230][217][9][8]. Die dabei verwendeten Substanzen enthalten fast alle n-Hexan. In jedem Fall handelte es sich hierbei um Lösemittelgemische, die neben n-Hexan weitere Substanzen enthielten (s.o.). Erfahrungen in Berlin zeigten, daß die neurotoxische Wirkung von n-Hexan durch Zugabe von MEK potenziert wird [9][11][12]. Dies wurde auch im Tierexperiment belegt [10][7].

In den Anfangsstadien einer Intoxikation mit hochkonzentriertem n-Hexan (z.B.: bei Schnüfflern) kann es zu Erregungs- und Euphoriezuständen kommen [9]. In tieferen Intoxikationsstadien werden illusionäres Verkennen, Änderung der Farbwahrnehmung oder akustischer Sinneseindrücke und schließlich Halluzinationen erlebt. Kontinuierliche Exposition gegenüber 500 ppm n-Hexan soll zunächst (10 min) keine Befindlichkeitsstörung hervorrufen. Länger anhaltende Exposition wurde mit einer leichten Euphorie und Kopfschmerzen in Verbindung gebracht [156]. Höhere Konzentrationen (1400-2000) ppm führen zu Übelkeit, Kopfschmerzen und Schleimhautirritationen [202].

### **3.2. DIE HEXACARBONNEUROPATHIE**

Unter jugendlichen Schnüfflern kam es in Berlin Mitte der siebziger Jahre zu einem plötzlichen Ausbruch einer rasch progredienten Polyneuropathie mit distal-symmetrischer Verteilung, nachdem dem verwendeten Schnüffelstoff seitens des Herstellers Methyl-Ethyl-Keton beigemischt worden war. Es handelte sich um eine vorwiegend motorische Neuropathie vom axonalen Typ. Initialsymptome waren meist Kribbelparästhesien in den Zehen und nach 1-3 Wochen eintretende schnell aufsteigende schlaffe Paresen, die bis zu der Hüftmuskulatur reichten und rasch von Muskelatrophien gefolgt waren. Daneben wurden

vergleichsweise diskrete, strumpf- bzw. handschuhförmige Sensibilitätsstörungen beobachtet. An den Fußsohlen und Handflächen fanden sich erhebliche vegetative Innervationsstörungen. Nach Sistieren des Lösemittelabusus waren diese Störungen zunächst weiter progredient (bis zu 4 Monate). Später kam es zu einer mehr oder weniger vollständigen Rückbildung des neuropathischen Syndroms. Gleichzeitig demaskierten sich Zeichen einer Störung spinaler Bahnen wie Hyperreflexie und Pyramidenbahnzeichen [9]. Langfristiger Lösemittelmißbrauch führt ferner zu toxischen Encephalopathien mit Zeichen einer hirnorganischen Wesensveränderung, cerebellären Symptomen und Augenbewegungsstörungen [6]. Morphologisches Substrat einer Encephalopathie kann eine computertomographisch nachweisbare interne und externe Hirnatrophie sein.

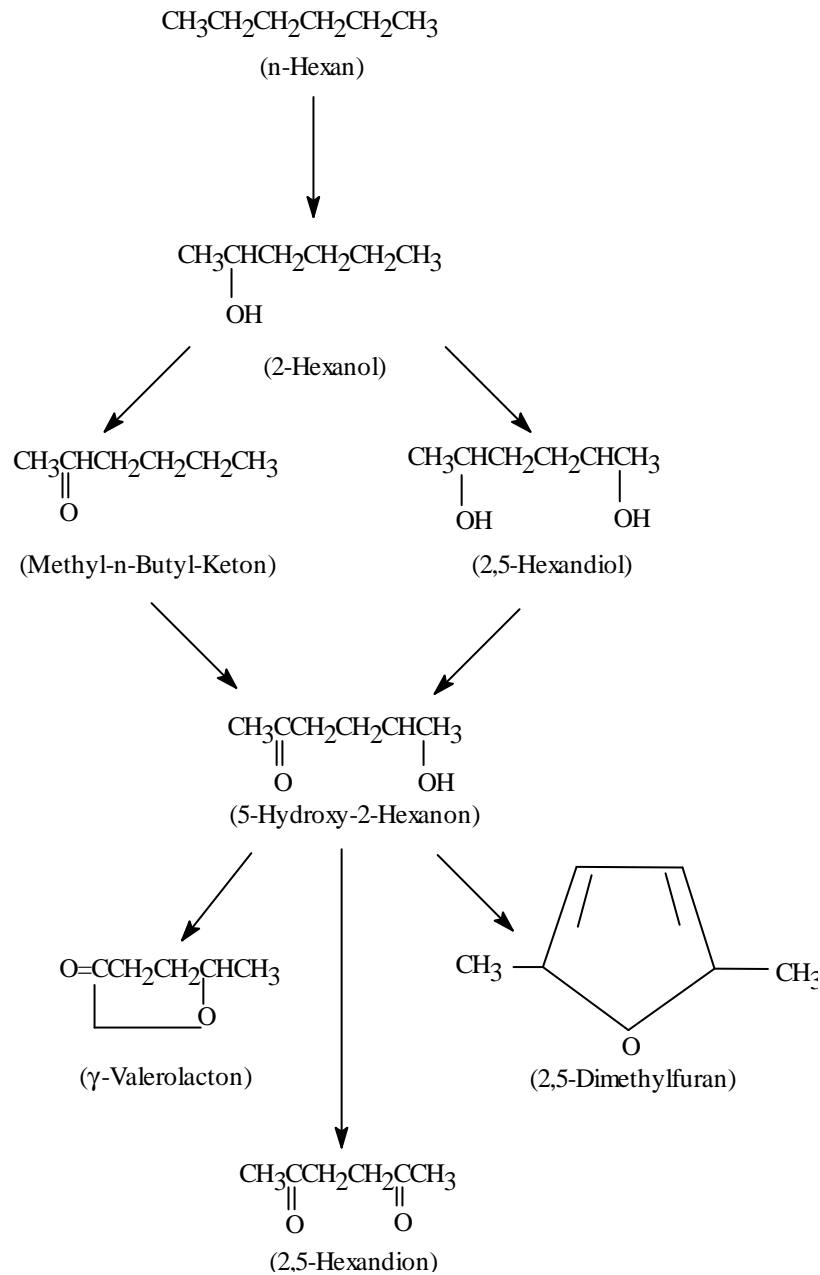
Berichte über am Arbeitsplatz erworbene Hexacarbon-Neuropathien [3][172] [171][96] lassen eine solche Dominanz motorischer Symptome nicht erkennen. Zumindest anfänglich bestehen sensible und motorische Symptome nebeneinander. Auch bei der im Rahmen einer chronischen, subklinischen Exposition erworbenen Hexacarbonneuropathie sind distal in den Extremitäten auftretende Parästhesien häufig das erste Symptom. Später treten distal symmetrische Sensibilitätsminderungen auf. Es kommt zu einer Abschwächung der Muskel-Dehnungs-Reflexe, die im weiteren Verlauf völlig erlöschen können. Schließlich finden sich wiederum distal angeordnete schlaffe Lähmungen, die nach proximal fortschreiten und in schweren Fällen von Muskelatrophien gefolgt werden. Es wurde wiederholt berichtet, daß die Erkrankung relativ plötzlich einsetzt, um dann langsam fortzuschreiten.

### **3.3. STOFFWECHSEL UND TOXIZITÄT DER HEXACARBONE**

Die Aufnahme von n-Hexan oder MnBK kann durch Inhalation, percutan, aber auch durch enterale Resorption erfolgen [58][151]. FILSER und Mitarb. untersuchten beim Menschen und bei der Ratte die pulmonale Retentionsrate des n-Hexan. Sie ist abhängig von der Konzentration des Lösemittels in der Atemluft. Unterhalb einer Konzentration von 300 ppm bei der Ratte bzw. 1 ppm beim Menschen ist die Metabolisierung von n-Hexan proportional der Konzentration des Lösemittels in der Atemluft, die Rate des unverändert abgeatmeten n-Hexans beträgt in diesem Bereich 17 % (Ratte) bzw. 20 % (Mensch). Bei einer n-Hexan Konzentration in der Atemluft von 300 ppm werden von der Ratte 47  $\mu\text{mol/h}$  x kg metabolisiert. Oberhalb von 300 ppm besteht zwischen Metabolisierung und Lösemittelkonzentration keine lineare Beziehung, die Metabolisierungsrate steigt auf maximal

285  $\mu\text{mol/h} \times \text{kg}$ , die bei 7000 ppm n-Hexan in der inspirierten Luft erreicht werden [68]. Aus diesen Daten wurde geschlossen, daß bei geringer n-Hexan Exposition die Kapazität des Lösemitteltransportes zu den metabolisierenden Enzymsystemen den limitierenden Faktor darstellen könnte. In der Tat korreliert die metabolische Clearance für n-Hexan mit dem Leberblutfluß der entsprechenden Spezies [68][31]. Die Verteilung des aufgenommenen n-Hexans erfolgt in Abhängigkeit vom Lipidgehalt der Gewebe. So reichert sich das Lösemittel insbesondere im Fett- und Nervengewebe an [29]. Im Blut ist die Lösemittelkonzentration nicht abhängig vom Fettgehalt sondern vom Gehalt an Proteinen und insbesondere Hämoglobin. Bei Ratten finden sich 93% des im Blut gebundenen n-Hexans intraerythrozytär, beim Menschen nur 65,5% [123]. Dies wurde mit einer höheren Lipophilie des Ratten-Hämoglobins erklärt.

N-Hexan wird in der Leber und (teilweise) in der Lunge von Isoenzymen des Cytochrom P450-Enzymkomplexes oxidiert [228]. COURI gelang an mit Phenobarbital vorbehandelten Ratten der Nachweis einer gesteigerten mikrosomalen Transformation von n-Hexan zu 2-Hexanol [46]. Auch die weitere Oxidation des Moleküls zur Bildung von 2,5-Hexandion wird durch eine vorhergehende Induktion des Cytochrom P450-Enzymkomplexes gesteigert. Dieselbe Arbeitsgruppe konnte zeigen, daß n-Hexan und MnBK in dem 2,5-Hexandion einen gemeinsamen Metaboliten haben. Nach den Ergebnissen von TOFTGÅRD [228] ist die Bildung von 2,5-Hexandion nur in der Leber möglich. Der bedeutendste Metabolit ist das 2-Hexanon (Synonym: MnBK). Es entsteht durch Oxidation des primären n-Hexan Metaboliten 2-Hexanol [47][202][14][53][1]. Der bereits erwähnten Arbeitsgruppe um COURI gelang der Nachweis einer Oxidation des Methyl-n-Butyl-Ketons in den Mikrosomen und anschließender Reduktion in der Leberzelle über 5-Hydroxy-2-Hexanon zu 2,5-Hexandion [45].



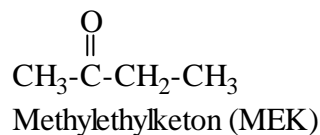
**Abb.2:** Metaboliten der Hexacarbone [53][58]

Das quantitative Verhältnis der verschiedenen Metaboliten ist nur teilweise bekannt. Nach DIVICENZO beträgt der Anteil des 2,5-HD an den Urinmetaboliten beim Menschen 36%, bei der Ratte 10-20%. Die Reaktionsschritte in Abbildung 2 scheinen reversibel, im Tierexperiment (Ratte) sind nach intraperitonealer Gabe des entsprechenden intermediären Metaboliten (z.B.: 5-Hydroxy-2-Hexanon) sowohl dessen Vorstufen als auch dessen "Folgesubstanzen" (z.B.: 2,5-HD und 2,5-HDiol) nachweisbar [47]. Eine Neurotoxizität der n-Hexan Analoge n-Pentan und n-Heptan ist nach den Studien von TAKEUCHI nicht anzu-

nehmen. Auch die in kommerziell erhältlichem n-Hexan üblicherweise enthaltenen Beimengungen anderer Lösemittel sind nicht neurotoxisch [64][198].

In experimentellen Studien gelang die Induktion der typischen Hexacarbonneuropathie nicht nur mittels einer Exposition der Tiere gegenüber n-Hexan, sondern auch durch 2,5-HD, 2,5-Hexandiol, 5-Hydroxy-Hexanon, MnBK und 2-Hexanol. Dabei nimmt die neurotoxische Potenz dieser Substanzen in der Reihenfolge der hier gewählten Aufzählung ab [118][2][206][53][69][153]. Von KRASAVAGE wurde darauf hingewiesen, daß das Ausmaß der durch diese Substanzen ausgelösten Neuropathie direkt korrelierte mit den jeweils festgestellten 2,5-HD-Blutspiegeln bzw. dem kumulativen 2,5-HD Gehalt des Blutes. Insofern wird das 2,5-HD als das eigentlich toxische Agens angesehen. Diese Annahme wird unterstützt durch die Arbeiten von SPENCER, die zur Entwicklung des Begriffes der  $\gamma$ -Diketon-Neuropathie führten [204][157]. Im Tiermodell gelang die Induktion einer Neuropathie lediglich mit  $\gamma$ -Diketonen. So war die durch 2,5-Heptandion oder 3,6-Octandion bedingte Neuropathie nicht von der durch 2,5-HD bedingten zu unterscheiden. Dagegen evozierten andere Diketone, wie beispielsweise 2,4-HD oder 1,6-HD, keine neurotoxischen Syndrome. Auch Analoge des MnBK wie 2-Heptanon führten nicht zur Ausbildung einer Neuropathie.

Wie bereits erwähnt (s.Kap.3.2.), potenziert Methyl-Ethyl-Keton (MEK) die neurotoxischen Effekte der Hexacarbone [10]. MEK alleine induziert keine Polyneuropathien [11][12]. Der Mechanismus dieser Interaktion ist bisher nicht aufgeklärt [182]. RALSTON und SHIBATA veröffentlichten Daten, die eine erniedrigte 2,5-HD-Clearance aus dem Blut bei gleichzeitiger Gabe von MEK zeigen [165].



**Abb. 3:** Formel von MEK



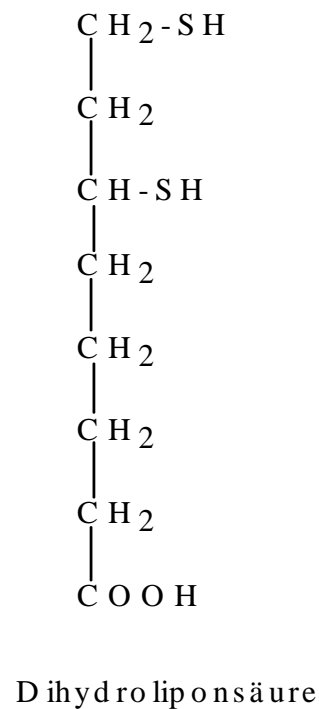
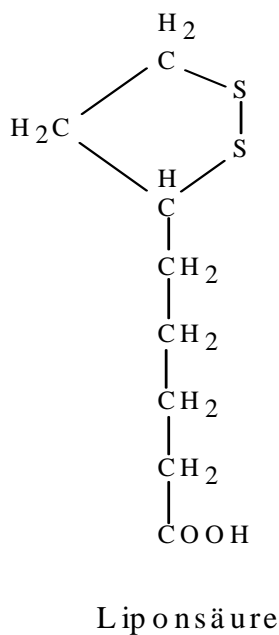
### 3.4. THERAPIE DER HEXACARBONNEUROPATHIEN

Die Therapie toxisch bedingter Neuropathien stellt in der Regel den klinisch tätigen Arzt vor erhebliche Probleme [62]. Lediglich für einige Polyneuropathien bzw. neurotoxische Syndrome existieren spezifische Detoxifikationsverfahren, die beispielsweise bei der Therapie der Blei- oder Quecksilbervergiftung zur Anwendung kommen. Bei jedem Patienten mit einer toxischen Neuropathie ist jedoch die Beendigung der Exposition (Wechsel des Arbeitsplatzes, Abstinenz bei Schnüffelsucht usw.) der initiale therapeutische Schritt [207]. Die weiteren Maßnahmen zielen im Rahmen einer symptomatischen Therapie auf eine Vermeidung von Komplikationen (z.B.: Beatmung bei Beteiligung der Intercostal- und Phrenicuskulatur), auf die Förderung der Rehabilitation (z.B.: physikalische Therapie) und ggf. auf die Behandlung der schmerzhaften Parästhesien (z.B.: trizyklische Antidepressiva, verschiedene Antiepileptika). Medikamente zur Förderung der Regeneration stehen nur in sehr begrenztem Umfang zur Verfügung. Der therapeutische Gewinn der dabei angewandten Pharmaka (z.B.: Vitamin B-Komplex oder Folsäure) ist keineswegs allgemein anerkannt [198][62].

Bei der Behandlung der Polyneuropathien spielt die  $\alpha$ -Liponsäure eine gewisse Rolle. Die Substanz wird aufgrund klinischer Beobachtungen und erster Studienergebnisse zur Behandlung von Neuropathien (insbesondere diabetischer Genese) eingesetzt [107]. Drei klinische Studien (ALADIN 1, SYDNEY 1 und SYDNEY 2) zeigten einen positiven Effekt der  $\alpha$ -Liponsäure im Sinne einer subjektiven Verbesserung [240][13][243]. Im Rahmen der ALADIN II Studie wurden auch periphere Nervenleitgeschwindigkeiten gemessen. Dabei wurde im Anschluss an eine fünftägige Infusionsbehandlung über zwei Jahre oral behandelt. In der mit Liponsäure behandelten Gruppe ergaben sich im Verlauf tendenziell höhere Nervenleitgeschwindigkeiten im Vergleich zur Placebogruppe. Im Rahmen der statistischen Analysen war jedoch keine signifikante Wirksamkeit der Thioctsäure bei der diabetischen Neuropathie feststellbar. Als möglicher Grund für dieses Ergebnis wurde unter anderem eine unerwartet hohe intraindividuelle Variabilität der Testergebnisse angegeben. Die nachfolgende Diskussion beschäftigte sich insbesondere mit der nur kurzdauernden parenteralen Applikation der Liponsäure. Es wurde argumentiert, daß eine längerdauernde oder intermittierende parenterale Gabe möglicherweise einen positiven Effekt haben könnte [169][242].

### 3.5. $\alpha$ -LIPONSÄURE

Die Liponsäure stellt für viele Mikroorganismen einen Wachstumsfaktor dar. Es ist nicht bekannt, ob die Liponsäure endogen im menschlichen Organismus hergestellt wird, ob sie von Bakterien der Darmflora produziert und anschließend enteral resorbiert wird oder ob sie auf Grund der ubiquitären Verbreitung in Lebewesen aller Art jederzeit mit der Nahrung in ausreichendem Maß zugeführt wird [94]. Versuche, bei Tieren einen Liponsäuremangel zu induzieren, sind bisher fehlgeschlagen. Gemeinhin wird die Alpha-Liponsäure zu den "Vitaminähnlichen Wirkstoffen" gerechnet [20]. Die  $\alpha$ -Liponsäure (Molekulargewicht 206,32) ist in Wasser nahezu unlöslich, bildet jedoch ein wasserlösliches Na-Salz und ist in lipophilen Lösungsmitteln gut löslich [93][186][23].



*Abb. 4: Strukturformeln von alpha-LS und DH-LS*

Sie weist einen fünfgliedrigen heterozyklischen Ring mit zwei Schwefelatomen auf. Durch Reduktion bildet sich Dihydroliponsäure. Dadurch kann sie als intramolekulares Redoxsystem fungieren. Die Balance zwischen Sulfhydryl- und Thiolkomponenten ist abhängig

von verschiedenen Faktoren wie dem pH oder der Anwesenheit oxidierender oder reduzierender Reagenzien [150] [186]. Die Liponsäure ist Teil eines Multienzymkomplexes, der oxidative Carboxylierungen (z.B.: Pyruvat-Acetyl-CoA) katalysiert. Des Weiteren vermag die Liponsäure als Coenzym die Bindung und Übertragung von Acetylgruppen und Wasserstoff zu katalysieren [93] und ist als Coenzym an der mitochondrialen Atmungskette beteiligt [28]. In Deutschland wird  $\alpha$ -Liponsäure seit 1966 als Arzneimittel eingesetzt. Indikationsgebiete sind Lebererkrankungen, Pilzvergiftungen (Knollenblätterpilze) und periphere Polyneuropathien verschiedenster Genese, insbesondere jedoch diabetischen Ursprungs. Bei diesen unterschiedlichen Krankheitsbildern wurde eine Minderung des  $\alpha$ -Liponsäurespiegels in Serum festgestellt [115], dies diente initial als Begründung für Therapievorsuche mit  $\alpha$ -Liponsäure.

Die Pharmakokinetik der  $\alpha$ -Liponsäure ist nur teilweise bekannt [224]. Die Aufnahme in Zellen soll bei Konzentrationen unter 100  $\mu\text{mol/l}$  durch ein aktives, von  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  und ATP abhängiges Transportsystem erfolgen [229]. Bei Konzentrationen über 100-120  $\mu\text{mol/l}$  spielt dagegen passive Diffusion eine Rolle [3][43]. Auf Grund ihrer lipophilen Eigenschaften passiert die  $\alpha$ -Liponsäure auch die Blut-Hirnschranke. Untersuchungen an Ratten mittels radioaktiv markierter Liponsäure ergaben, daß 81% der intraperitoneal verabreichten Aktivität über den Urin ausgeschieden wurden. Die Metabolisierung verläuft im wesentlichen über eine Beta-Oxidation der Seitenkette [194]. Weitere Daten zur  $\alpha$ -Liponsäure werden im Rahmen der Diskussion (Kap.8.4.) behandelt.

### **3.6. DIE EXPERIMENTELLE HEXACARBONNEUROPATHIE**

In den achtziger und neunziger Jahren des 20. Jahrhunderts beschäftigten sich mehrere Forschergruppen mit Untersuchungen, die den Pathomechanismus der Hexacarbon-Neuropathie aufklären sollten. Dabei spielte nicht nur die sozialmedizinische Bedeutung der Hexacarbonneuropathien eine Rolle. Zunehmend wurden Befunde erhoben, die auf dem Gebiet der Grundlagenforschung von Interesse sind. Gleichzeitig stellt die Hexacarbonneuropathie ein fundamentales Prinzip toxischer Neuropathien dar, welches sich bis auf die molekulare Ebene beschreiben läßt. Seit Beginn des 20. Jahrhunderts hat sich das Interesse an anderen Fragestellungen in der Neurotoxikologie zugewandt (z.B. sogenanntes „Gulf War Syndrome“ oder die toxikologischen Aspekte neurodegenerativer Erkrankungen), Publikationen über die molekulären Vorgänge bei der Hexacarbonneuropathie sind selten geworden, obwohl der Pathomechanismus immer noch nicht endgültig beschrieben ist.

Eine experimentell induzierte Hexacarbon-Neuropathie konnte bei verschiedenen Spezies ausgelöst werden [202][2][122][132][200], wird jedoch meist anhand von Ratten untersucht. Dieses Tiermodell gleicht in allen wesentlichen Aspekten der humanen Neuropathie [121][214]. Applikationsrouten betrafen meist die Inhalations-Exposition, aber auch dermale, subcutane, intraperitoneale, orale Applikation, intraneurale Injektion und topische Applikation auf den vitalen Nerven [202][238][91]. Das besondere Interesse galt den "giant axonal swellings", die vor den distalen Axondegenerationen auftreten. Gleichartige Axonaufreibungen werden auch beobachtet im Rahmen der Neuropathien durch Carbondisulfid (CS<sub>2</sub>), Imidodipropionitril (IDPN) und Acrylamid. Anknüpfend an diese Befunde galt das besondere Interesse den möglichen Interaktionen des Toxins mit Zellstruktur- und Zellfunktionselementen. Weiterführende Arbeiten beschäftigten sich mit den zellulären Transportmechanismen bzw. deren Veränderungen unter Hexacarbon-Einwirkung (s.Kap.8).

### 3.6.1. KLINISCHE BEFUNDE

Das klinische Bild der motorischen Ausfälle bei subchronisch gegenüber Hexacarbonen exponierten Ratten ist den Befunden, die bei Patienten mit einer Hexacarbonneuropathie erhoben werden vergleichbar (s.Kap.3.2.) [225]. Bei der Ratte treten die motorischen Paresen zunächst symmetrisch an den hinteren Extremitäten auf. Erstes Zeichen ist ein Ausbleiben der reflektorischen Spreizbewegung der hinteren Extremität, wenn die Ratte am Schwanz hochgezogen wird [9]. Die Störungen des Gangbildes zeigen sich durch eine Eversion der Hinterbeine beim Gehen, schließlich kommt es zur vollständigen Lähmung der hinteren Extremitäten [130]. Schreitet die Lähmung weiter voran, manifestieren sich auch Paresen der vorderen Extremitäten, im Extremfall bis zur Tetraplegie. Den Paresen folgen Atrophien der Muskulatur, die zunächst distal betont erscheinen [53][183][202].

### 3.6.2 PATHOMORPHOLOGISCHE BEFUNDE

Die Hexacarbonneuropathie stellt sich als primär axonale Neuropathie dar, es tritt eine retrograd von distal nach proximal fortschreitende Degeneration der Nervenfasern auf. Dieser Prozeß wird nach GREENFIELD als "dying-back"- Neuropathie bezeichnet [87]. SCHAUMBURG und SPENCER [199][184] faßten unter dem Begriff "central-peripheral distal axonopathy" jene Neuropathien vom "dying-back" Typ zusammen, bei denen sowohl im PNS, als auch im ZNS eine distale, diffus verteilte Degeneration vulnerabler Axone zu beobachten ist. Die Vulnerabilität der Nervenfasern gegenüber Hexacarbonen ist proportional der Länge und dem Durchmesser der Axone [36]. Das heißt, Nervenfasern mit gleichen

strukturellen Merkmalen degenerieren zu einem ähnlichen Zeitpunkt, unabhängig von ihrer Zugehörigkeit zu PNS oder ZNS. Im PNS der Ratte sind als erstes jene Äste des N.tibialis betroffen, welche die Wadenmuskulatur versorgen. Es handelt sich hierbei um die bei weitem dicksten Axone der hinteren Extremität der Ratte. Dagegen tritt eine Degeneration der dünnen, wenig bemerkten plantaren Fasern zur sensiblen Innervation der Zehen erst erhebliche Zeit später im Verlauf der Neuropathie ein [200]. Bei weiterem Fortschreiten der Neuropathie finden sich die morphologischen Veränderungen zunehmend weiter proximal bzw. auch in dünneren Axonen [60][203]. Lichtmikroskopische Befunde betreffen zunächst distal gelegene Axonaufreibungen ("axonal swellings"), die jeweils proximal eines Ranvierschen Schnürringes liegen. Die Axonaufreibungen werden von Myelinretraktionen begleitet, deren Genese (primär oder sekundär?) noch nicht geklärt ist [162]. Distal der "axonal-swellings" kommt es zum Untergang der Axone und zur Degeneration des Myelins. Die Degenerationen finden sich im weiteren Verlauf immer weiter proximal und erreichen im Extremfall die ventralen Spinalwurzeln bzw. die Spinalganglien. Die elektronenoptische Untersuchung der Axonaufreibungen zeigt eine Akkumulation von 10nm Neurofilamenten und Mikrotubuli, sowie Reste axonaler Mitochondrien und Myelinschrumpfungen [203][214]. Die Veränderungen sind stets von einem endoneuralen Ödem begleitet. SAIDA, MENDELL und WEISS zeigten anhand sequentieller Studien bereits vor Auftreten von "axonal swellings" und vor einer klinischen Manifestation der Hexacarbonneuropathie eine höhere Dichte von Neurofilamenten in den großen myelinisierten Nervenfasern. In Analogie zu den Veränderungen am PNS sind von der Hexacarbonneuropathie im ZNS zunächst die langen spinalen Bahnen betroffen, insbesondere rostrale Abschnitte des Fasciculus gracilis. Histopathologische Veränderungen am ZNS sind bereits nachweisbar, wenn die Degenerationen am PNS klinisch manifest werden.

Nach den Untersuchungen von LEHNING et al. korreliert das Auftreten von „axonal swellings“ mit der Höhe und der Dauer der 2,5-Hexandion Exposition. Diese Autoren beschrieben zusätzlich eine Atrophie der Axone, die langsam von distal nach proximal fortschreite. Diese Atrophie korrelierte vorwiegend mit der Dauer der Exposition [127][128]. Möglicherweise trete die distale Atrophie von Axonen auch unabhängig von Axonaufreibungen auf.

Schon im Verlauf einer Intoxikation sind häufig regenerative Prozesse zu beobachten. Diese überwiegen die degenerativen Vorgänge aber erst nach Beenden der Toxineinwirkung. Erstes Zeichen einer beginnenden Regeneration sind Remyelinisierungen um schrumpfende Axonaufreibungen. In Abhängigkeit von dem Grad der Schädigung kommt

es über Axonsprossungen zu einer mehr oder weniger vollständigen Rekonstruktion. In jedem Fall verbleibt ein Residualzustand mit reduziertem Myelinisierungsgrad und verkürzter Internodallänge [180][198].

### 3.6.3. HEXACARBONWIRKUNG AUF ZELLKULTUREN

Die beschriebenen pathomorphologischen Befunde der Hexacarbonneuropathie konnte VERONESI auch an Nervenzellkulturen reproduzieren [206][232]. Während hohe Lösemittelkonzentrationen (400-600 µg/ml) zu unspezifischen Zellnekrosen führten, trat bei einer kontinuierlichen Behandlung mit mittleren Konzentrationen (245-325µg/ml=2,8mMol) der als neurotoxisch bekannten Hexacarbone (2,5-HD, Hexan, MnBK, 2-Hexanol etc.) zunächst eine leichte Erweiterung im Bereich distaler (aber nicht terminaler) Schnürringe auf. Danach wurde eine Axonaufreibung, angefüllt mit 10 nm NF, sowie paranodale Myelinretraktionen in diesen Bereichen beobachtet. Später traten diese Axonaufreibungen auch weiter proximal auf, es kam zu Wallerschen Degenerationen der distalen Nervenfasern. Bereits während der Entstehung dieser Nervenschädigung wurden Zeichen einer Regeneration in Form von Remyelinisierungen beobachtet. Diese spezifischen neuropathologischen Befunde waren bei einer Anwendung nicht neurotoxischer Hexacarbone (z.B. 2,4-Hexandion) nicht zu beobachten.

Berichte über eine Gliatoxizität des 2,5-HD in Nervenzellkulturen [27][213] stehen im Gegensatz zu diesen Befunden und widersprechen den bei der klinischen und experimentellen Hexacarbonneuropathie erhobenen neuropathologischen Befunden.

### 3.6.4. FOLGEN EINER TOPISCHEN APPLIKATION VON HEXACARBONEN AUF VITALE NERVEN

Nach einer direkten topischen Applikation von 2,5-Hexandion und verschiedenen Kontrollsubstanzen auf den Ischiasnerven von Ratten fanden POLITIS et al. innerhalb von vier Tagen "axonal swellings", angefüllt mit 10 nm Neurofilamenten im Bereich der dem 2,5-HD ausgesetzten Nervenabschnitte [161]. Etwa parallel dazu entwickelten die Tiere eine Lähmung aller vom N. ischiadicus versorgten Muskeln. Diese Veränderungen waren besonders deutlich, wenn die topische Applikation bei Tieren durchgeführt wurde, die über acht Tage mit 0,5%-igem 2,5-HD- Zusatz im Trinkwasser vorbehandelt wurden. Die pathomorphologische Untersuchung der lokal dem Hexacarbon ausgesetzten Nervenabschnitte erbrachte Befunde, die denen bei systemischer Exposition erhobenen entsprechen. 2,4-Hexandion, 1,6-Hexandion und andere Kontrollsubstanzen (z.B. NaCl-Lösung) produ-

zierten keine spezifischen pathologischen Veränderungen. In der Peripherie des betroffenen Nervenfaszikel gelegene Axon- und Schwanzzell-Nekrosen werden für alle angewendeten Lösemittel beschrieben. Später veröffentlichten Mitglieder dieser Arbeitsgruppe Beobachtungen, die sie in der Frühphase nach intrafaszikulärer Injektion von 2,5-HD in den Ischiasnerven von Ratten machten [238]. In ultrastrukturellen Studien an Präparaten, die bereits 1 Minute nach Injektion gewonnen wurden, zeigte sich eine Ansammlung von Mikrotubuli, Mitochondrien und glattem endoplasmatischem Retikulum im Zentrum des Axoplasmas, während die Neurofilamente weitgehend in der Peripherie des Axoplasmas gesehen wurden.

Auch GRIFFIN und Mitarbeiter [91] beschrieben eine Dissoziation der Cytoskelettstrukturen unmittelbar nach topischer Einwirkung von 2,5-HD. Ähnlich wie nach lokaler Applikation von IDPN folgte bei 2,5-HD-Gabe eine Orientierung der Neurofilamente in die Peripherie des Axoplasmas bei gleichzeitiger Akkumulation anderer Zellelemente (Mitochondrien, Mikrotubuli).

### 3.6.5. STÖRUNGEN DER ZYTOSKELETTSTRUKTUR UND DES AXONALEN TRANSPORTES DURCH HEXACARBONE

Die Akkumulation von 10 nm Neurofilamenten in den paranodalen Axonschwellungen stellt das charakteristische Kennzeichen der Hexacarbon-Neuropathien dar. Es besteht jedoch Unsicherheit darüber, wie es zu dieser Schädigung kommt. Nach DECAPRIO [51] müßte eine Theorie über einen molekularen Mechanismus der Hexacarbonneuropathie folgende Aspekte erklären können:

- Es handelt sich um eine spezifische Organ-Toxizität, nur das Nervensystem und das testikuläre germinale Epithelium werden betroffen.
- Nur Verbindungen mit  $\gamma$ -Diketon-Struktur oder Verbindungen, die zu einem  $\gamma$ -Diketon metabolisiert werden, können das spezifische Schädigungsmuster hervorrufen.
- Die Verteilung der Axonschwellungen im Verlauf des Axons (proximal oder distal) ist abhängig von der Dosis und bestimmten strukturellen Charakteristika des  $\gamma$ -Diketons.
- Die Ergebnisse der Untersuchungen an Nervenzellkulturen und nach topischer Applikation der Diketone auf vitale Nerven lassen eine direkte Wirkung auf eine oder mehrere axonale Komponenten annehmen.

Von verschiedenen Arbeitsgruppen wurden Modelle zur Pathogenese der Hexacarbonneuropathie publiziert.

SPENCER und SCHAUMBURG [205] postulierten, daß eine Hemmung von glykolytischen Enzymen (insbesondere GAPDH) zu einem Energiedefizit führe, welches Ursache der Neurofilamentakkumulationen vor den Rannvier`schen Schnürringen sei. Andere Arbeitsgruppen beschäftigten sich mit den durch die Toxine möglicherweise ausgelösten Veränderungen der Neurofilamente [222]. Nach GRAHAM [86][90] führt die Inkubation von 2,5-HD mit primären Aminen zur Bildung einer fluoreszenten konjugierten Schiff`schen Base. Später veröffentlichte DECAPRIO [49] Daten, die darauf hinwiesen, daß die Reaktion von 2,5-HD mit primären Aminen zu einem 2,5-Dimethylpyrrol führt, welches durch weitere (Auto-) Oxidation zur Bildung chromophorer Polymere führt. Details zu diesen Erklärungsmodellen und weitere Hypothesen zum Pathomechanismus der Hexacarbon-Neuropathien werden Gegenstand der Diskussion (s.Kap.8) sein.

### **3.7. NEUROPHYSIOLOGISCHE UNTERSUCHUNGEN AM PERIPHEREN NERVENSYSTEM DER RATTE**

Im Rahmen neurotoxikologischer Untersuchungen an Ratten wurden verschiedenste elektrophysiologische Methoden angewandt zur Beurteilung der Auswirkungen der Toxine auf das periphere Nervensystem der Ratte. Diese Verfahren beziehen sich meist auf den N.ischiadicus oder die Nn. collectores ventralis am Rattenschwanz. Am N.ischiadicus wurden Messungen häufig mittels invasiver Verfahren durchgeführt, bei denen der Nerv operativ freigelegt wird. Allerdings sind Messungen der Nervenleitgeschwindigkeit an diesem Nerven auch möglich nach proximaler Stimulation mit Oberflächenelektroden und Ableitung des Muskelantwortpotentials (MAP) durch eine Nadelektrode aus der Plantarmuskulatur [110][234][78][140].

Neurophysiologische Untersuchungen an den ventralen Nn. collctores ventralis wurden seltener berichtet. Die meisten Verfahren verwenden Nadelelektroden oder sogenannte Average-Techniken, um den Einfluß des sehr hohen Widerstandes der verhornten Hautpartien am Rattenschwanz auszuschalten[78][140][168][120]. Eine detaillierte Übersicht über die verschiedenen Methoden wird im Rahmen der Diskussion (Kap.8.1.) gegeben.



### 3.8. ANATOMIE DES RATTENSCHWANZES

Der Rattenschwanz ist von einer derben, schuppig verhornten und spärlich mit Haaren bewachsenen Haut überzogen. Die Grundlage des Schwanzes bilden 27 Wirbel, deren jeder ca. 1 cm lang ist [210][211]. Am proximalen Ende eines jeden Schwanzwirbels inserieren drei Paar lange Sehnen von Muskeln, die am Kreuzbein ihren Ursprung haben, sowie drei Paar kurze Sehnen von Muskeln, die jeweils an dem nächst proximalen Schwanzwirbel ihren Ursprung haben. Auf jeder Seite finden sich je ein langer und ein kurzer ventraler, ein langer und ein kurzer lateraler und ein langer und ein kurzer dorsaler Muskel. Auf der ventralen und der dorsalen Seite des Schwanzes liegen die kurzen, von Wirbel zu Wirbel ziehenden Muskeln jeweils medial der langen Muskeln und sind von diesen durch eine Bindegewebsschicht getrennt. Die lateralen Muskeln liegen dicht aneinander und stellen sich als zusammenhängender Muskelstrang dar. SCHUHMACHER teilte die Schwanzmuskulatur in folgende Gruppen ein [188]:

- M. flexor caudae medialis: gebildet aus den kurzen ventralen Muskeln.
- M. flexor caudae lateralis: gebildet aus den langen ventralen Muskeln.
- Mm. intertransversarii: gebildet aus den langen und kurzen lateralen Muskeln.
- M. extensor caudae medialis: gebildet aus den kurzen dorsalen Muskeln.
- M. extensor caudae lateralis: gebildet aus den langen dorsalen Muskeln.

In einer Loge zwischen den Mm. flexores caudae medialis verlaufen zwei Nn. collectores ventrales. Analog finden sich zwischen den Mm. extensores caudae medialis die Nn. collectores dorsales [188]. Jeder dieser vier Nervenstämme wird aus den sechs caudalen (cocygealen) Spinalwurzeln gebildet. Hinzu kommt noch der größere Anteil der Fasern des letzten Sacralsegmentes. Die segmentale Innervation des Rattenschwanzes ist keineswegs regelmäßig. Ein spinales Segment versorgt die Muskeln von drei bis fünf Schwanzwirbeln. Die langen und kurzen Muskeln, die einen gemeinsamen Ansatz an demselben Schwanzwirbel haben, werden aus dem selben Spinalsegment versorgt. Von den ventralen Sammelnerven entspringen für jedes Schwanzsegment drei Nerven: ein Hautast, ein Ast zu den Mm. intertransversarii und ein Ast zu den Mm. flexores medialis et lateralis .

## 4. FRAGESTELLUNG

Angeichts der vielfältigen Daten auf dem dieser Arbeit zugrundeliegenden Wissensgebiet sollte eine möglichst klare und präzise Fragestellung, eingebettet in pragmatische klinisch-neurologische Zusammenhänge entwickelt werden. Die Fragestellung dieser Arbeit beinhaltet Implikationen auf den verschiedensten Ebenen:

1. Die Behandlung der Polyneuropathien stellt den Kliniker vor erhebliche Probleme. Nur für einige dieser Erkrankungen stehen etablierte und in klinischen Studien erprobte Therapien zur Verfügung, wie bei der Polyradikulitis, der Bleivergiftung usw. Die  $\alpha$ -Liponsäure stellt einen der wenigen experimentellen Ansätze auf diesem Gebiet dar.
2. Darüber hinaus berührt diese Arbeit auch grundlegendere Fragen. Sie betreffen die Bedeutung einer möglichen Wirksamkeit der  $\alpha$ -Liponsäure bezüglich der Vorstellungen über die Funktionen der Neurofilamente und den Pathomechanismus der Hexacarbonneuropathie. Diese zeigt in vielerlei Aspekten Ähnlichkeiten mit anderen Intoxikationen und bestimmten, bis heute ungeklärten humanen Erkrankungen.
3. Die Untersuchung stützt sich im Wesentlichen auf ein eigens modifiziertes Verfahren zur Messung der motorischen Nervenleitung am Rattenschwanz. Es sollte auch überprüft werden, ob die hier vorgestellte Methode die bei der experimentellen Hexacarbonneuropathie zu erwartenden neurophysiologischen Befunde erfasst.

Der **Vorversuch** sollte anhand eines etablierten Tiermodelles folgende Fragen beantworten:

- Protektiver Effekt: Kann die experimentelle Hexacarbonneuropathie bei der Ratte durch orale Gaben von  $\alpha$ -Liponsäure beeinflusst werden?
- Regenerationsfördernder Effekt: Kann die Rückbildung einer experimentellen Hexacarbonneuropathie durch orale Gaben von  $\alpha$ -Liponsäure gefördert werden?

Der **Hauptversuch** sollte überprüfen, ob sich die im Vorversuch festgestellten Hinweise auf einen protektiven Effekt der  $\alpha$ -Liponsäure anhand grösserer Tierkollektive bestätigen lassen

## 5. VERSUCHSPLANUNG

### 5.1. VORVERSUCH

Im Rahmen des Vorversuches sollte anhand kleinerer Tierkollektive überprüft werden, ob überhaupt ein Einfluß der  $\alpha$ -Liponsäure auf die Entwicklung oder Regeneration der bekannten Hexacarbonneuropathie festgestellt werden kann.

Dabei wurden 24 Ratten über 60 Tage gegenüber n-Hexan exponiert (24h/die, 700 ppm). Von diesen 24 erhielten 8 Tiere ab dem ersten Expositionstag täglich  $\alpha$ -Liponsäure oral. Weitere 8 Tiere wurden ab dem 42. Expositionstag mit  $\alpha$ -Liponsäure behandelt, während die restlichen 8 Tiere zu keinem Zeitpunkt mit  $\alpha$ -Liponsäure behandelt wurden. Die Kontrollkollektive wurden unter identischen Bedingungen gehalten und nicht gegenüber n-Hexan exponiert, jedoch analog mit  $\alpha$ -Liponsäure sofort behandelt (4 Tiere), nach 42 Tagen behandelt (4 Tiere) oder nicht behandelt (8 Tiere). Nach 60 Tagen n-Hexan-Exposition wurden die Tiere über weitere 84 Tage beobachtet um die Regeneration zu beurteilen. Die Behandlung mit Liponsäure von 16 zuvor exponierten Tiere und von 8 Tieren aus dem Kontrollkollektiv wurde in diesem Zeitraum fortgesetzt. Die Entnahme von Tieren am 60. Tag zur histopathologischen Untersuchung verringerte die Tierzahlen je Kollektiv.

#### Versuchsplan Vorversuch

GRUPPE	ANZAHL 1.-60.Tag	ANZAHL 61.-154.Tag	HEXAN- EXPOSITION	LIPONSÄURE- BEHANDLUNG
H	8	5	1.-60.Tag	----
HL	8	6	1.-60.Tag	1.-154.Tag
HL <sub>42</sub>	8	6	1.-60.Tag	42.-154.Tag
K	8	6	----	----
KL	4	3	----	1.-154.Tag
KL <sub>42</sub>	4	4	----	42.-154.Tag

**Neurophysiologische Untersuchungen** vor Expositionsbeginn (Tag 0), sowie jeweils nach 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80 und 140 Tagen.

## 5.2. HAUPTVERSUCH

Der Hauptversuch sollte den im Vorversuch beobachteten Hinweisen auf eine protektive Wirksamkeit der  $\alpha$ -Liponsäure nachgehen. Die n-Hexan-Exposition erfolgte bei 24 Tieren über 28 Tagen in gleicher Weise wie im Vorversuch (24h/die, 700 ppm). Von diesen Tieren erhielten 12 ab dem ersten Tag der Exposition  $\alpha$ -Liponsäure oral. Erneut gab es Kontrollkollektive (jeweils acht Tiere), die nicht lösemittlexponiert waren, jedoch unter identischen Bedingungen gehalten wurden. Dabei erhielt ein Kontrollkollektiv ab Versuchsbeginn ebenfalls  $\alpha$ -Liponsäure oral. Zwei Tage nach Expositionsende wurden aus den beiden gegenüber n-Hexan exponierten Kollektiven je drei Tiere, aus den Kontrollkollektiven insgesamt vier Tiere getötet und zur histologischen Untersuchung aufbereitet. Die übrigen Tiere wurden noch 28 Tage nach Abschluß beobachtet und dann ebenfalls getötet und zur histopathologischen Untersuchung aufbereitet.

### Versuchsplan Hauptversuch

GRUPPE	ANZAHL	ANZAHL	HEXAN-EXPOSITION	LIPONSÄURE-BEHANDLUNG
	1.-28 Tag	29.-56.Tag		
<b>H</b>	12	9	1.-28.Tag	----
<b>HL</b>	12	9	1.-28.Tag	1.-56.Tag
<b>K</b>	8	6	----	----
<b>KL</b>	6	6	----	----

**Neurophysiologische Untersuchungen** am Tag vor Beginn der Exposition (Tag 0), sowie jeweils nach 10, 20, 30, 40 und 55 Tagen.

## **6. MATERIAL UND METHODEN**

### **6.1. VERSUCHSTIERE UND GRUPPENEINTEILUNG**

Als Versuchstiere dienten männliche Wistar-Ratten (Stamm Hannover). Im Vorversuch wurden Tiere eingesetzt, die bei Versuchsbeginn 19 Wochen alt waren, sie wogen im Durchschnitt 400 g. Die im Hauptversuch eingesetzten Tiere waren bei Expositionsbeginn 15 Wochen alt und im Mittel 330 g schwer. Vor der Zuteilung der Ratten zu den einzelnen Gruppen wurden alle Tiere gewogen und in vier Gewichtsränge eingeteilt. Jeder Gruppe wurde in einem Losverfahren je eine Ratte aus den vier Gewichtsklassen zugeteilt. Die dabei entstandenen 10 Kollektive zu vier Ratten hatten somit zu Versuchsbeginn nahezu gleiche Gewichtsmittelwerte und wurden den in der Versuchsplanung festgelegten Gruppen zufällig zugeteilt. Die Zusammenstellung der Vierergruppen wurde mindestens 14 Tage vor Expositionsbeginn durchgeführt. Dadurch sollten sich die Tiere aneinander gewöhnen. (Versuchstiergenehmigung des Landesamtes für Arbeitsschutz, Gesundheitsschutz und technische Sicherheit Berlin: Reg. 0005/87)

### **6.2. N-HEXAN**

Das verwendete n-Hexan stammte von der Firma Merck Darmstadt, (99% Reinheit, Merck-Nr: 4368).

### **6.3. $\alpha$ -LIPONSÄURE**

Die  $\alpha$ -Liponsäure wurde von der Firma Asta Werke, Degussa Pharma-Gruppe in Pulverform bezogen. Appliziert wurde sie als Lösung deren Zubereitung nach Anweisung des Herstellers in kleinen Portionen erfolgte. Dazu wurden 2.06 g Liponsäurepulver in 16 ml Aqua Bidest bei 37 °C ca. 15 Minuten gerührt, bis das Pulver vollständig gelöst war. Danach erfolgte die Titration der Lösung mittels 1 N NaOH auf einen pH von 7,4. Anschließend wurde die Lösung mit Aqua Bidest ad 50 ml aufgefüllt. Die Lösung wurde portioniert eingefroren und die benötigte Menge jeweils vor der Applikation bei Zimmertemperatur aufgetaut.

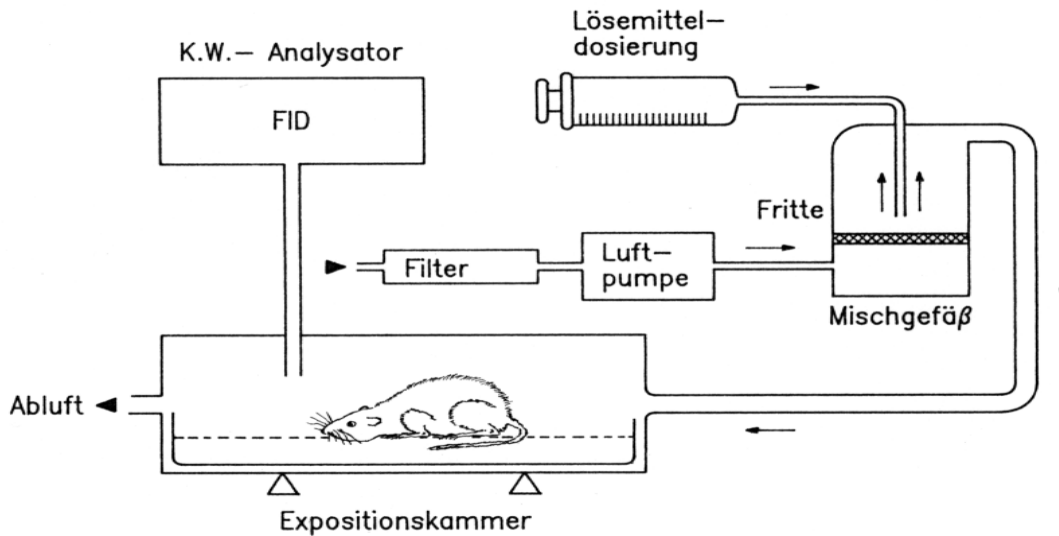
#### **6.4. APPLIKATION DER $\alpha$ -LIPONSÄURE**

Die Applikation der  $\alpha$ -Liponsäure erfolgte per os mit einer 1 ml Tuberkulinspritze ohne Nadel. Jeweils einmal pro Tag erhielt jedes Tier 0,25 ml der 4%-igen Lösung (entsprechend 10 mg bzw. etwa 50  $\mu$ mol  $\alpha$ -Liponsäure). Bei einem durchschnittlichen Gewicht der Ratten von ca. 360g entspricht dies einer Dosierung von 140 $\mu$ mol/kg. In einem speziellen Vorversuch fütterten wir 6 erwachsene Ratten über 10 Wochen mit 0,25 ml einer 3%-igen Lösung der  $\alpha$ -Liponsäure, um zu klären, inwieweit es zu Unverträglichkeitsreaktionen oder anderen Komplikationen kommen könnte. Insbesondere interessierte uns die Frage, ob die Tiere eine langdauernde Applikation von  $\alpha$ -Liponsäure tolerieren. Der Vorversuch zeigte eine rasche Gewöhnung der Tiere an die Fütterung mit der Tuberkulinspritze, so daß schon nach wenigen Tagen die in den Schlund der Tiere getropften 0,25 ml Flüssigkeit von diesen zuverlässig geschluckt wurden. Unverträglichkeitsreaktionen oder andere Anzeichen einer Belastung der Tiere durch die Fütterung mit  $\alpha$ -Liponsäure, wie beispielsweise abnorme Gewichtsentwicklung oder erhöhte Erkrankungsneigung, traten während und nach dem Vorversuch nicht auf. Bereits eine Woche vor Versuchsbeginn wurde mit der Fütterung von 0,25 ml Wasser begonnen, um die Tiere an die Fütterungsprozedur zu gewöhnen.

#### **6.5. EXPOSITION**

Die Tiere wurden in einer von ALTENKIRCH und Mitarb. [11] beschriebenen Anlage gegenüber n-Hexan exponiert. Jede Expositionseinheit (Abb.5) bestand aus einer zylindrischen, luftdichten Plexigaskammer mit einem Volumen von 14 l, sowie der zugehörigen Apparatur zur Aufbereitung des Gas-Luftgemisches (Wisa-Pumpe, Perfusor und Fritte). In einer Kammer saßen jeweils 4 Tiere auf einem Laufgitter, so daß ihre Fäkalien in die Kotauffangschalen am Boden der Kammer durchfallen konnten. Sowohl der Lufteinlaß als auch der Luftauslaß waren gegen die Kammerwände gerichtet, um Zugluft zu vermeiden und eine gleichmäßige Verteilung des Gas-Luftgemisches zu gewährleisten. Mittels eines Perfusors wurde n-Hexan in einer definierten Menge pro Zeiteinheit in eine Mischkammer geleitet und auf einer Fritte durch die von unten anströmende Luft aus der Wisa-Pumpe verdüst. Dabei war die n-Hexan Konzentration sowohl über die Perfusorgeschwindigkeit als auch über den Luftstrom aus der Wisa-Pumpe regulierbar. Ein mindestens zehnfacher Luftwechsel pro Stunde wurde in jedem Falle aufrechterhalten. Auch die Kontrolltiere be-

fanden sich während der gesamten Expositionsphase in derartigen Plexigaskammern durch die jedoch lediglich Luft (140 l/h) geleitet wurde.



*Abb. 5: Darstellung einer Expositionseinheit*

Die Lösemittelkonzentrationen in den Expositionskammern wurden durch einen Eckmann-Flammenionisationsdetektor (FID) kontinuierlich aufgezeichnet. Zusätzlich kontrollierten wir die Konzentrationen in täglichen Stichproben mit Dräger-Indikatorröhrchen (n-Hexan 100-3000 ppm, Nr.6728391, Drägerwerk AG Lübeck).

## 6.6. WARTUNG UND FÜTTERUNG DER TIERE

Zweimal täglich erfolgte die gründliche Reinigung der Kottauffangschalen, in die jeweils ein in gesättigte  $\text{NaH}_2(\text{PO}_4)$ -Lösung eingelegter und getrockneter Papierstreifen gelegt wurde. Dies sollte durch die Bildung eines sauren Milieus am Boden der Kammer die bakterielle Bildung von Ammoniak unterbinden. Den Ratten standen Futter (Altrumin-Standard Rattennahrung) und Leitungswasser ad libitum zur Verfügung. Die Reinigung der Kammern mit anschließendem Wasser- und Futterwechsel unterbrach zweimal pro Tag die Exposition für zehn Minuten. Der Wechsel von Tag und Nacht erfolgte mittels einer Zeitschaltuhr im Zwölfstunderrhythmus. Während der gesamten Versuche befanden sich die

Tiere in einem klimatisierten Raum mit 22-24° C und 68-78% Luftfeuchte. Während der Regenerationsphasen wurden die Tiere in den unveränderten Gruppen zu viert in V<sub>2A</sub> Gitterkäfigen gehalten.

## **6.7. KLINISCH-NEUROLOGISCHE UNTERSUCHUNG DER TIERE**

Die klinisch-neurologische Begutachtung der Tiere erfolgte über die gesamte Versuchsdauer einmal pro Woche. Dabei wurden die Merkmale Gewicht, Spreizreflex, Fallreflex, Klettertest und Beurteilung des Gesamtbewegungsablaufes in einem Blindverfahren bewertet. Die Beurteilung der Tiere nahm während der gesamten Versuchsdauer derselbe Untersucher vor.

Die Untersuchungsmethoden folgten den in der experimentellen Neurotoxikologie etablierten Standards und sind Teil der von der "U.S. Environmental protection agency" approbierten Methoden [12][145].

Die Ergebnisse der klinisch-neurologischen Begutachtung sind bereits an anderer Stelle veröffentlicht und werden im Rahmen der abschließenden Diskussion dieser Arbeit berücksichtigt [95].

## **6.8. NEUROPHYSIOLOGISCHE UNTERSUCHUNGEN**

Die Untersuchungsmethode zur Bestimmung der motorischen Latenzen am ventralen Rattenschwanznerven wurde in längeren Vorstudien entwickelt. Einen Überblick über die hierzu vorliegenden Berichte anderer Autoren, sowie über die in diesem Zusammenhang gemachten Erfahrungen findet sich in den Abschnitten 3.7. und 8.1..

### **6.8.1. ELEKTROMYOGRAPH**

Im Vorversuch wurde ein "Medelec Myograph MS 91" verwendet, für den Hauptversuch wurde ein "Neuropack II" der Firma Nihon Kohden eingesetzt. Beide Geräte verfügen über eine integrierte Reizeinheit und externe Vorverstärker, die es erlauben, zwischen Elektroden und Verstärkereingang eine ausgesprochen kurze Kabelverbindung zu legen. Im Hinblick auf die Notwendigkeit, Störeinflüsse möglichst klein zu halten, war dies von



besonderer Bedeutung. Die Aktionspotentiale wurden mit den zugehörigen Thermo-  
druckern dokumentiert.

#### 6.8.2. TEMPERATURKONTROLLE

Die Messungen im Vorversuch wurden bei einer Temperatur von  $34 \pm 1^\circ\text{C}$  durchgeführt, im Hauptversuch bei  $29 \pm 1^\circ\text{C}$ . Mit einem "Sekundenthermometer" der Firma Yellow Springs Instruments (Nr.14474C) kontrollierten wir die Oberflächentemperatur an der Ventralseite des Rattenschwanzes jeweils vor und nach der Ableitung motorischer Antwortpotentiale. Den Meßfühler des Thermometers (Thermistor) fixierten wir mit Hilfe einer der Rundung des Rattenschwanzes angepaßten Klemme auf der Schwanzoberfläche. Um gegebenenfalls die festgelegte Oberflächentemperatur zu erzielen, wurden Rattenschwanz und Elektrodenhalter mit einer Rotlichtlampe (40 Watt) erwärmt.

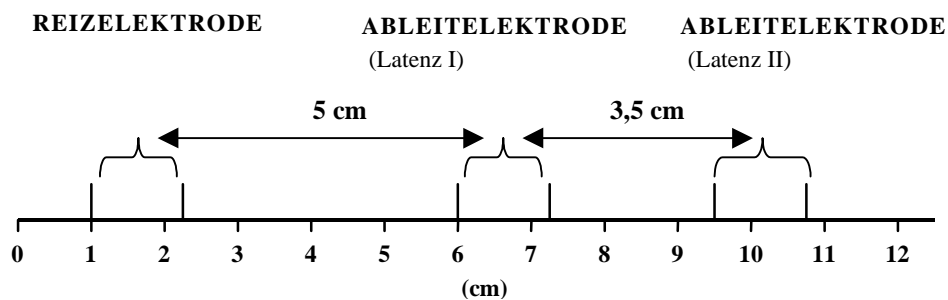
#### 6.8.3. VORRICHTUNG ZUR FIXIERUNG DER RATTE

Ein Tunnel aus Plexiglas stellte während der neurophysiologischen Messungen die Fixierung der Ratten sicher. Vorne war der Tunnel durch eine schrägstehende, ovale Platte verschlossen, deren Stellung mittels zweier Schrauben verändert werden konnte. Dies ermöglichte eine optimale Anpassung an die Kopfform und Länge der Ratte. Seitlich trug der Plexiglastunnel mehrere Luftschlitze. Hinten war der Tunnel durch eine Platte zu verschließen, in deren Mitte ein 2 cm breiter Schlitz gefräst war, durch den der Rattenschwanz nach außen geführt wurde. Diese Vorrichtung stand in vier verschiedenen Größen zur Verfügung, die je nach Größe der Ratten zum Einsatz kamen.

#### 6.8.4. ELEKTRODENHALTER

Der Elektrodenhalter wurde in Anlehnung an ähnliche Vorrichtungen von KULIG und REBERT et al. (siehe 8.1.) entwickelt. Es handelt sich dabei um zwei Plexiglasplatten (110 x 245 mm), die längsseits durch Scharniere miteinander verbunden sind. In beide Platten ist in der Mitte ein in Längsrichtung verlaufender, im Querschnitt halbkreisförmiger Kanal gefräst. Bei Aufeinanderklappen von Deck- und Grundplatte bilden die beiden Kanäle einen Tunnel von 13 mm Durchmesser, der während der Messung den Rattenschwanz aufnimmt. In dem Kanal befinden sich Bohrungen jeweils in einem Abstand von 10, 22.5, 60, 72.5, 95 und 107.5 mm von der Vorderkante. In diesen Bohrungen finden jeweils ein Stift

und eine Feder ihre Verankerung. Jeder Stift trägt an seinem oberen Ende ein Elektrodenplättchen. Kleine Spiralfedern, die zwischen Grundplatte und Elektrodenplättchen eingespannt sind, sorgen für einen gleichbleibenden Druck der Elektroden gegen den Rattenschwanz. Die exakte Führung der Stifte in den Bohrungen gewährleistet eine exakt reproduzierbare Stellung der Elektroden zum Rattenschwanz.



*Abb. 6: Schematische Darstellung der Elektrodenpaare*

#### 6.8.5. ELEKTRODEN UND KABEL

Die Elektroden wurden aus chloriertem Silber gefertigt. Die Plättchen auf dem Elektrodenhalter haben einen Durchmesser von 4 mm. Sie sind über vollabgeschirmte Kabel so verdrahtet, daß je zwei Elektrodenplättchen, im Abstand von 12,5 mm eine bipolare Elektrode bilden. Diese können wahlweise als Reiz- oder Ableitelektrode verwendet werden. Alle Kabelanschlüsse sind mit dreipoligen DIN-Steckern ausgestattet. Als Erdelektrode diente eine 5 x 8 cm große Silberplatte, die mit einem in NaCl-Lösung getauchtem Zellstoffstreifen umwickelt den Ratten für die Dauer der Messungen unter die Hinterpfoten gelegt wurde.

#### 6.8.6. PRÄPARATION DES RATTENSCHWANZES

Die Oberfläche des Rattenschwanzes bildet eine dicke, verhornte Haut, der Elektrodenübergangswiderstand beträgt etwa 20 M $\Omega$ . Eine Senkung dieses Wertes auf Werte unter 10 K $\Omega$  wurde durch folgende Prozedur erreicht:

1. Rasur der Ventralseite des Rattenschwanzes.
2. Entfernen der Hornhaut mit sehr feinem Sandpapier (Gradation 180).
3. Befeuchten der Elektrodenplättchen mit NaCl-Lösung unmittelbar vor der Messung.

In Vorversuchen wurde festgestellt, daß die Ratten diese Präparation ohne weiteres tolerieren, Reizerscheinungen der Haut oder Schorfbildung treten nur auf, wenn die Meßintervalle kürzer als 10 Tage betragen.

#### 6.8.7. DURCHFÜHRUNG DER MESSUNG

Um jedesmal über demselben Nervenabschnitt messen zu können, markierten wir dauerhaft die Lage der Elektroden am Schwanz mit einem wasserfesten Stift. Zusätzlich wurde der Abstand zwischen Elektrodenhalter und Schwanzspitze protokolliert. Ein Meßvorgang einschließlich aller Vorbereitungen lief in folgenden Schritten ab:

1. Die Ratte wird auf den Tisch gesetzt, auf dem die Meßapparatur aufgebaut ist. Der Plexiglastunnel zur Fixierung der Ratte ist mit einem Tuch soweit abgedeckt, daß nur noch die hintere Öffnung frei bleibt. Ihrem Instinkt folgend kriecht die Ratte in den abgedunkelten Tunnel, in dem sich bereits die Erdelektrode befindet. Sodann wird mit Hilfe der verschieblichen Vorder- und Rückwand der Tunnel der Größe der Ratte angepaßt und verschlossen.
2. Präparation des Rattenschwanzes (vergl. 6.8.6.)
3. Temperaturkontrolle gegebenenfalls Erwärmung des Rattenschwanzes (siehe 6.8.3.).
4. Befeuchten der Elektroden mit NaCl-Lösung, Einlegen des Rattenschwanzes in den Elektrodenhalter. Dabei genaues Justieren der Elektroden in der am ersten Meßtag festgelegten Position. Die distale Elektrode lag dabei 5,5 - 6,5 cm (Vorversuch) bzw. 1,5 - 2,5 cm (Hauptversuch) von der Schwanzspitze entfernt.
5. Abgabe des Reizimpulses (0,2 ms, supramaximal) über die Reizelektrode, Kathode distal.
6. Ableitung der motorischen Aktionspotentiale über die distalen Elektrodenpaare. Ausmessen der Latenzzeit beider Potentiale entsprechend den in auch in der Humanmedizin gebräuchlichen Regeln [192] [154].

7. Erneute Temperaturkontrolle, ggf. Wiederholung der Ableitung bei zutreffender Temperatur.

8. Dokumentation der Antwortpotentiale und Latenzen durch Ausdruck.

<b><u>PROTOKOLL:</u></b>	
<b>NR.:</b>	Nummer zur Identifikation der Ratte.
<b>Datum:</b>	Datum und Uhrzeit der Messung.
<b>Temperatur:</b>	Oberflächentemperatur des Schwanzes unmittelbar nach der Messung.
<b><u>MOTORISCHE LATENZEN:</u></b>	
<b>BS:</b>	Strecke Schwanzspitze-Elektrodenhalter [ cm ].
<b>Reiz:</b>	Reizstärke, [ V ].
<b>Lat.I:</b>	Latenzzeit des Potentials I, [ ms ].
<b>Lat.II:</b>	Latenzzeit des Potentials II, [ ms ].
<b>D-Lat.:</b>	Differenz der Latenzen (Lat.II - Lat.I), [ ms ].
<b>Amp.I:</b>	Amplitude des Potentials I, [ mV ].
<b>Amp.II:</b>	Amplitude des Potentials II, [ mV ].
<b><u>F-WELLEN:</u></b>	
<b>SF:</b>	Distanz zwischen Schwanzspitze und Stimulationselektrode [cm]
<b>Reiz:</b>	Reizstärke, [ V ]
<b>Lat. M:</b>	Latenz der direkten Muskelantwort ( M-Wave ) [ms]
<b>tF:</b>	Latenzzeit der F-Welle [ms]

*ABB. 7: Meßprotokoll*

## 6.9. DATENERFASSUNG UND STATISTIK

Die Erfassung der Daten erfolgte zunächst schriftlich auf dem Meßprotokoll, daneben wurden die Aktionspotentiale mit dem Thermodrucker dokumentiert. Später wurden die Daten am Computer in das Programm "Microsoft Excel" eingegeben und mittels einfacher (vorwiegend grafischer) Methoden eine Plausibilitätskontrolle durchgeführt, um Eingabefehler aufzudecken. Zur weiteren Bearbeitung wurden die Datensätze in "MICROSOFT ACCESS" überführt. Die Berechnung des Wilcoxon Testes erfolgte im Programm "SPSS

3.0", dabei wurde bei  $n < 6$  das Ergebnis nicht berücksichtigt, da der Test bei derart kleinen Stichproben keine zuverlässigen Ergebnisse erzielt und nach Meinung verschiedener Autoren nicht angewendet werden sollte [178]. Bei  $n < 8$  wurde entsprechend eine maximal mögliche Irrtumswahrscheinlichkeit von 5 % ( $p < 0,05$ ) angenommen.

## **7. ERGEBNISSE**

### **7.1. VORBEMERKUNG**

Auf eine Umrechnung bestimmter Werte (Latenzdifferenzen) in Nervenleitgeschwindigkeiten wurde im Rahmen der hier gewählten Darstellung verzichtet. Neben den im Abschnitt 8.1. angeführten inhaltlichen Gründen, sprach dafür auch die vereinfachte optische Darstellung. Nervenleitgeschwindigkeit und Latenz des Antwortpotentials stehen zueinander in einem reziproken Verhältnis. Dies kann das Erfassen grafischer Darstellungen erschweren, indem die Schädigung eines Nerven sich durch eine sinkende Nervenleitgeschwindigkeit, aber steigende Latenz des Antwortpotentials ausdrückt.

Die langdauernde Hexanexposition im Vorversuch führte bei einigen Tieren zu einem vollständigen Zusammenbruch der Nervenfunktion. Klinisch war dies zu erkennen an einer Plegie der hinteren Extremitäten, neurographisch war bei diesen Tieren zumindest über den distalen Abschnitten nach proximaler Reizung kein reproduzierbares Muskelantwortpotential mehr ableitbar und keine Muskelkontraktion zu beobachten. In Anlehnung an die Erfahrungen anderer Autoren [71][154] wurde die untere Nachweisgrenze eines Muskelaktionspotentials bei 0,1 mV festgelegt. In den grafischen Darstellungen sind diese Fälle gekennzeichnet mit dem Zusatz "Werte nicht meßbar" und mit zugeordneten Werten eingetragen, die kurz oberhalb der in dem Versuch für den entsprechenden Parameter gemessenen Maximalwerte liegen. Diese angenommenen Werte betragen für Latenz I und Latenzdifferenz jeweils "5 ms", für Latenz II "8 ms". Bei Rechenoperationen (Mittelwert, Median, Wilcoxon-Test etc.) wurden diese angenommenen Maximalwerte ebenfalls berücksichtigt. Die Darstellung der Amplituden erfolgt nur in tabellarische Form.

### **7.2. EINZELERGEBNISSE DES VORVERSUCHES**

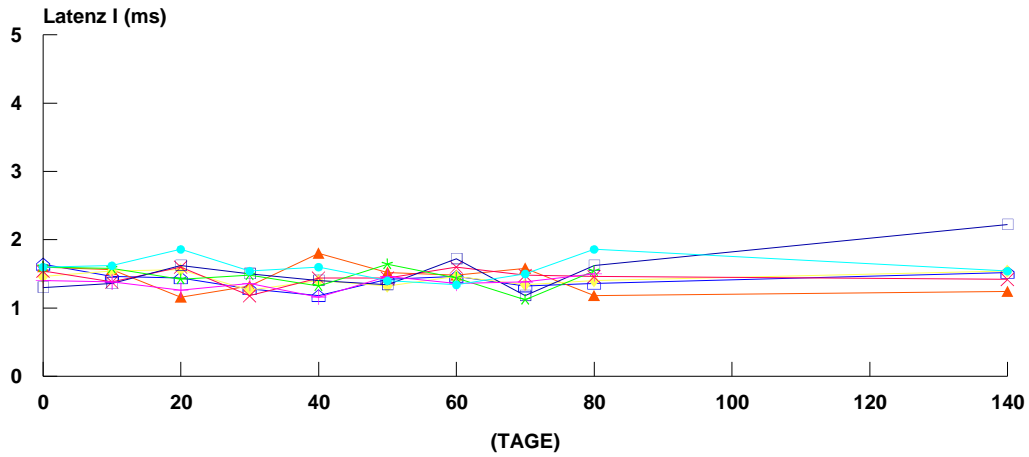
#### **7.2.1. LATENZ I**

Für die Kontrolltiere (Gruppe K) ergeben sich über den gesamten Versuchszeitraum stabile Meßwerte. Gleiches gilt für die mit Liponsäure behandelten Tiere. Weder bei den ab Versuchsbeginn behandelten Tieren (Gruppe KL) noch bei einer Applikation ab dem 42. Tag (Gruppe KL<sub>42</sub>) läßt sich eine Veränderung der Meßwerte feststellen. Die hexanexponierten Tiere (Gruppe H) lassen bereits ab Tag 10 eine höhere intra- und interindividuelle Variabilität der Meßwerte erkennen. Ab dem 40. Tag steigen die Werte langsam an und

erreichen für alle Tiere bei der letzten Messung das Maximum. Gleiches gilt für die Tiere, die erst nach 42 Tagen Hexanexposition mit Liponsäure behandelt wurden (HL<sub>42</sub>) In der Gruppe HL, den unter Liponsäurebehandlung gegenüber Hexan exponierten Tieren, kommt es ebenfalls zu einem Anstieg der Latenz I, akzentuiert zwischen Tag 40 und 60.

### KONTROLLEN (K)

#### VORVERSUCH LATENZ I



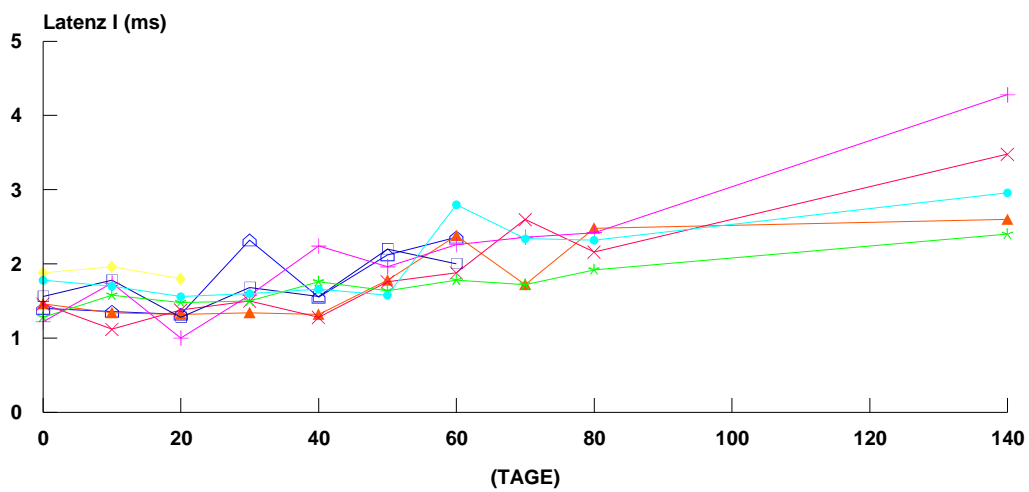
Nr.5 und Nr.6 nur bis Tag 60

● 3 + 5 \* 6 □ 15 × 16 ◆ 39 ▲ 51 □ 58

Abb.8

### HEXANEXPOSITION (H)

#### VORVERSUCH LATENZ I



Nr.18 nur bis Tag 20

Nr.12 und Nr.21 nur bis Tag 60

● 2 + 10 \* 11 □ 12 × 17 ◆ 18 ▲ 19 □ 21

Abb.9

### KONTROLLEN MIT LIPONSÄUREBEHANDLUNG (KL/KL42) VORVERSUCH LATENZ I

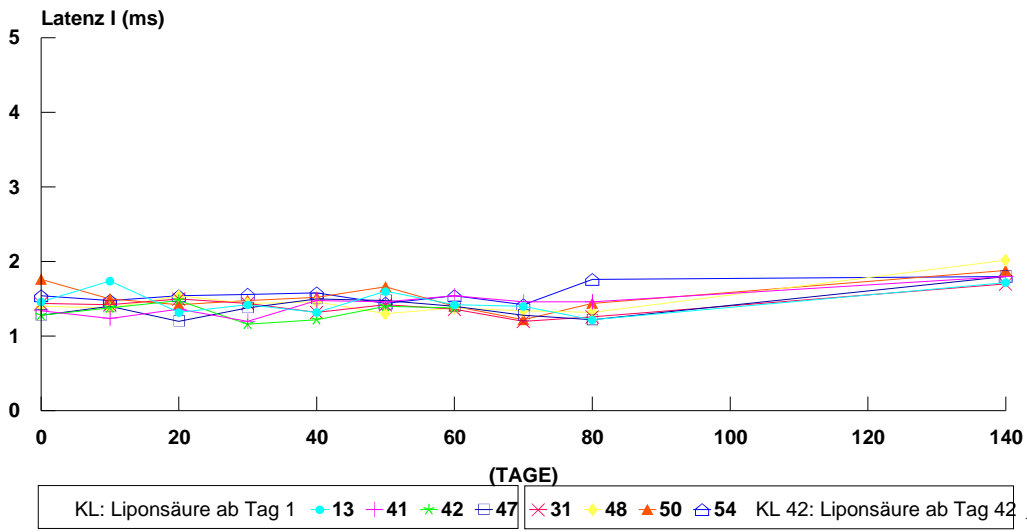
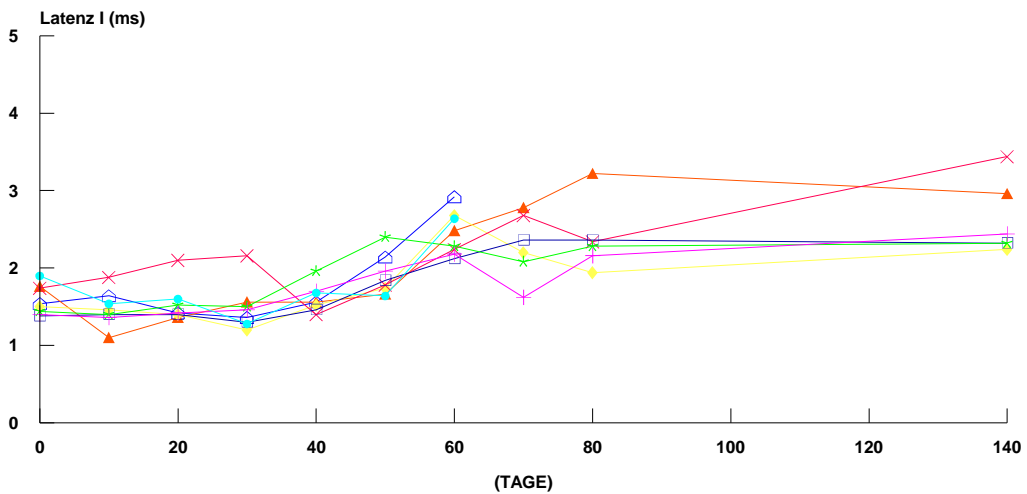


Abb.10

Nr.41 nur bis Tag 42

### HEXANEXPOSITION + LIPONSÄURE (HL) VORVERSUCH LATENZ I



Nr.8 und Nr.44 nur bis Tag 60

9 25 26 27 29 38 40 44

Abb.11



## HEXANEXPOSITION, LIPONSÄURE AB 42.TAG (HL42)

### VORVERSUCH LATENZ I

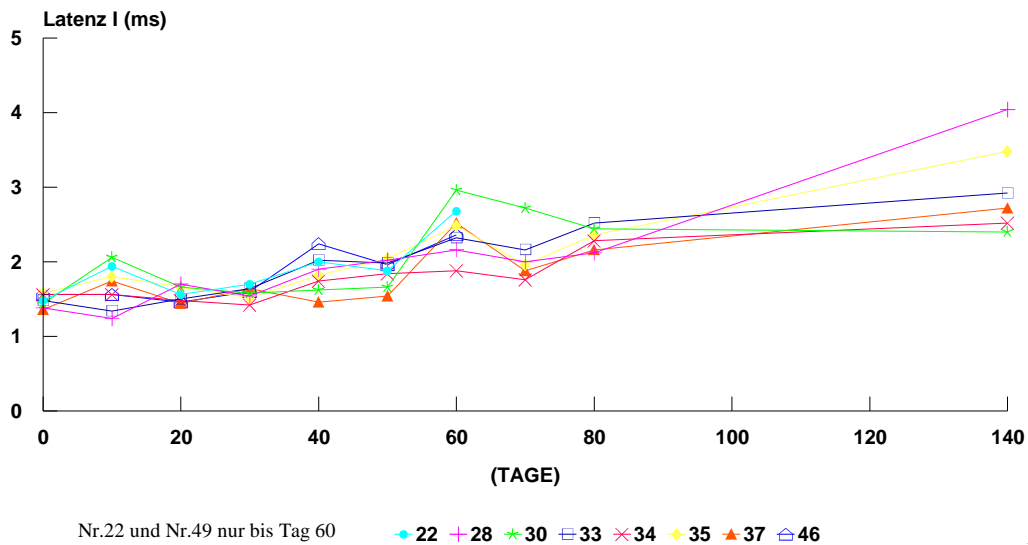


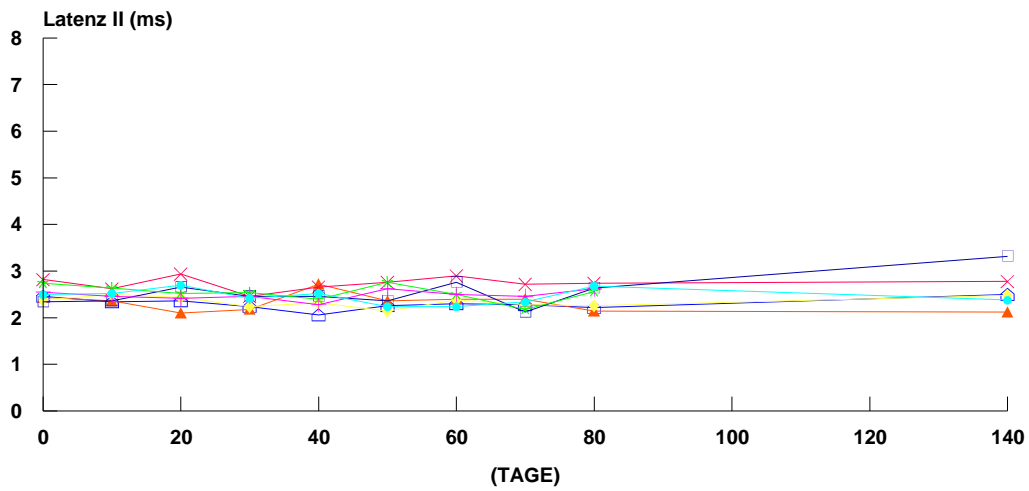
Abb.12

#### 7.2.2. LATENZ II

Hinsichtlich der Gruppen K, KL und KL<sub>42</sub> ergeben sich keine weiterführenden Aspekte. Die hexanexponierten Tiere (Gruppe H) lassen ab dem 20. Tag einen leichten Anstieg der Meßwerte erkennen. Am 70. Tag ist bei zwei, 10 Tage später bei drei Tieren die mit Latenz II bezeichnete Muskelantwort nicht mehr zu evozieren. Nach der Regenerationsphase ist in zwei dieser Fälle wieder ein Potential meßbar.

Gruppe HL zeigt bis Tag 40 nur einen geringen Anstieg der Meßwerte, danach wird die Zunahme von Latenz II für alle Tiere deutlicher. Allerdings zeigen zwei Tiere ab Tag 60 wieder einen stabileren Kurvenverlauf, während zwei Tiere an den Tagen 70 und 80 keine und nach der Regenerationsphase deutlich verzögerte Latenzen aufweisen. Dagegen ist bei einem weiteren Tier eine fast kontinuierliche Verzögerung festzustellen, bis nach 142 Tagen die Latenz II nicht mehr bestimmbar ist. Für die Gruppe HL<sub>42</sub> ergeben sich ähnliche Verläufe wie bei Gruppe H. An Tag 70 läßt sich bei einem Tier (danach zur histopathologischen Aufarbeitung getötet) kein distales Muskelantwortpotential messen, an den Tagen 70 und 80 trifft dies für zwei Tiere zu, diese lassen nach 142 Tagen wieder ein meßbares Potential erkennen. Zu diesem Zeitpunkt ist jedoch bei einem weiteren Tier die Latenz II nicht zu bestimmen.

## KONTROLLEN (K) VORVERSUCH LATENZ II

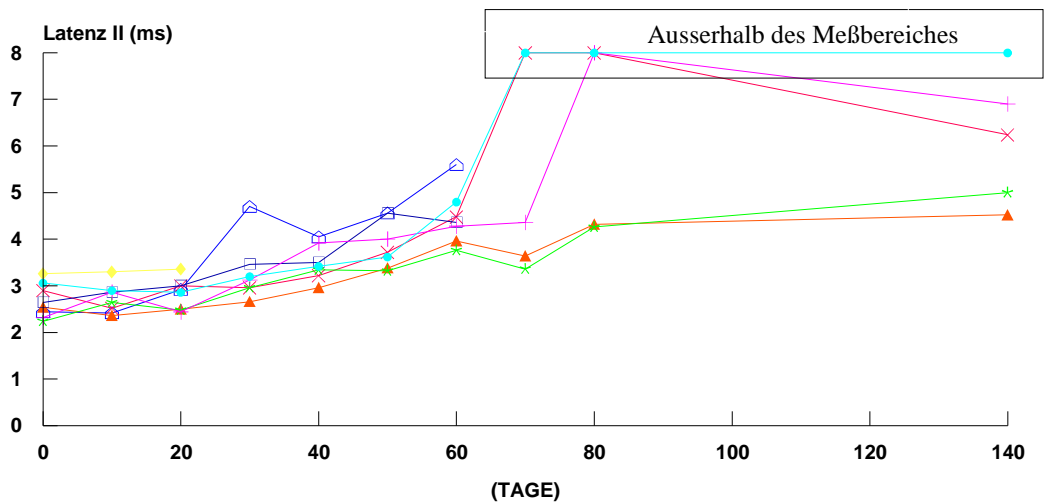


Nr.5 und Nr.6 nur bis Tag 60

● 3 + 5 \* 6 □ 15 × 16 ◆ 39 ▲ 51 □ 58

Abb.13

## HEXANEXPOSITION (H) VORVERSUCH LATENZ II



Nr.18 nur bis Tag 20

Nr.12 und Nr.21 nur bis Tag 60

● 2 + 10 \* 11 □ 12 × 17 ◆ 18 ▲ 19 □ 21

Abb.14

## KONTROLLEN MIT LIPONSÄUREBEHANDLUNG (KL/KL42) VORVERSUCH LATENZ II

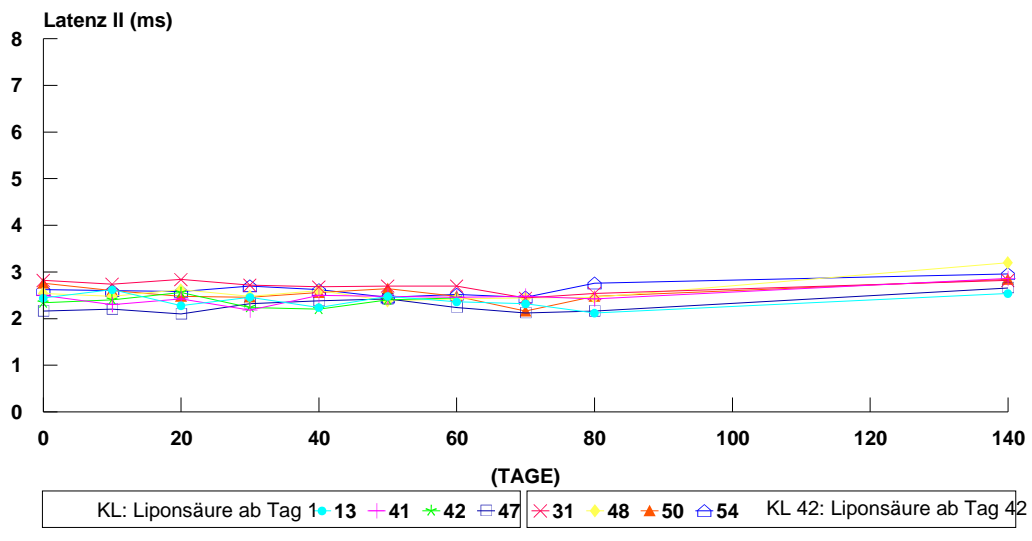
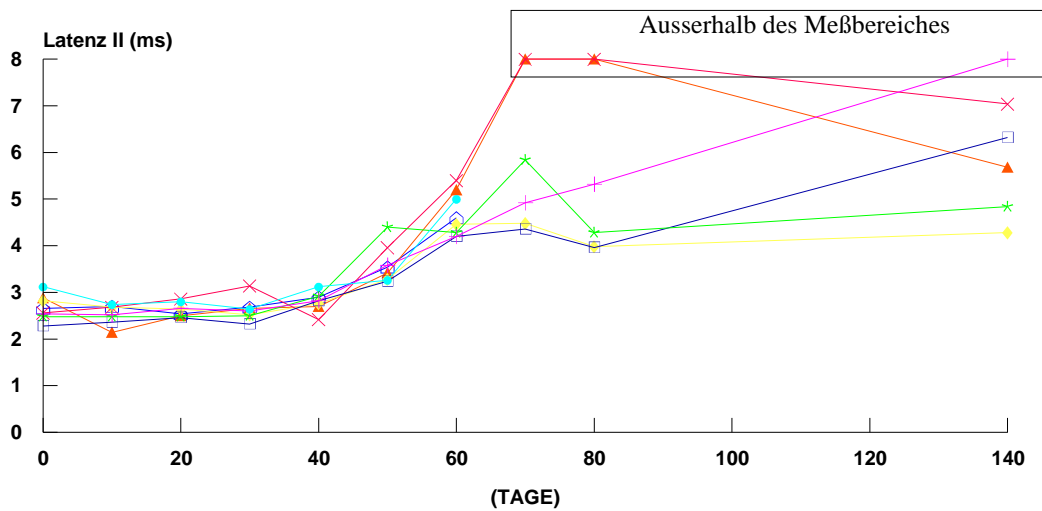


Abb.15

Nr.41 nur bis Tag 60

## HEXANEXPOSITION + LIPONSÄUREBEHANDLUNG (HL) VORVERSUCH LATENZ II



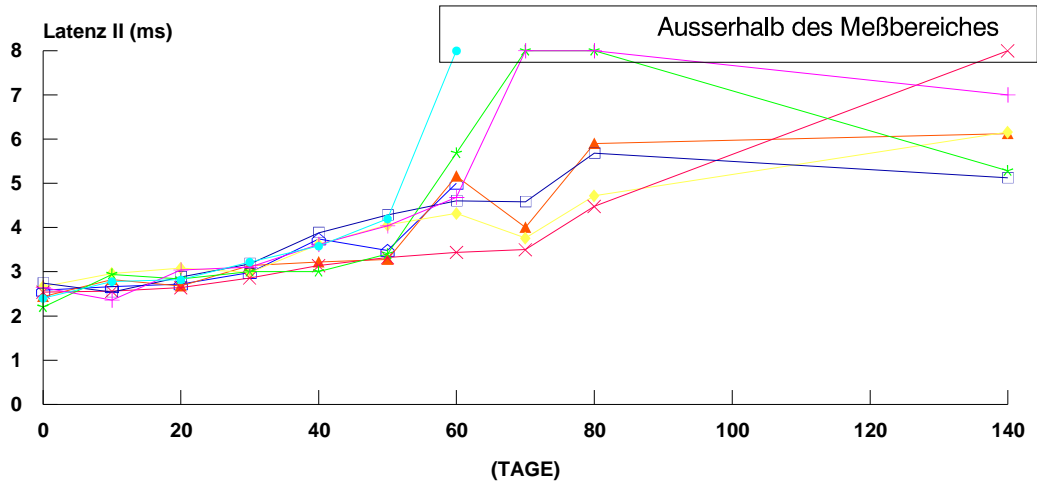
Nr.9 und Nr.44 nur bis Tag 60

• 9 + 25 \* 26 □ 27 × 29 ◆ 38 ▲ 40 □ 44

Abb.16

## HEXANEXPOSITION, LIPONSÄURE AB 42.TAG (HL42)

### VORVERSUCH LATENZ II



Nr.22 und Nr.46 nur bis Tag 60

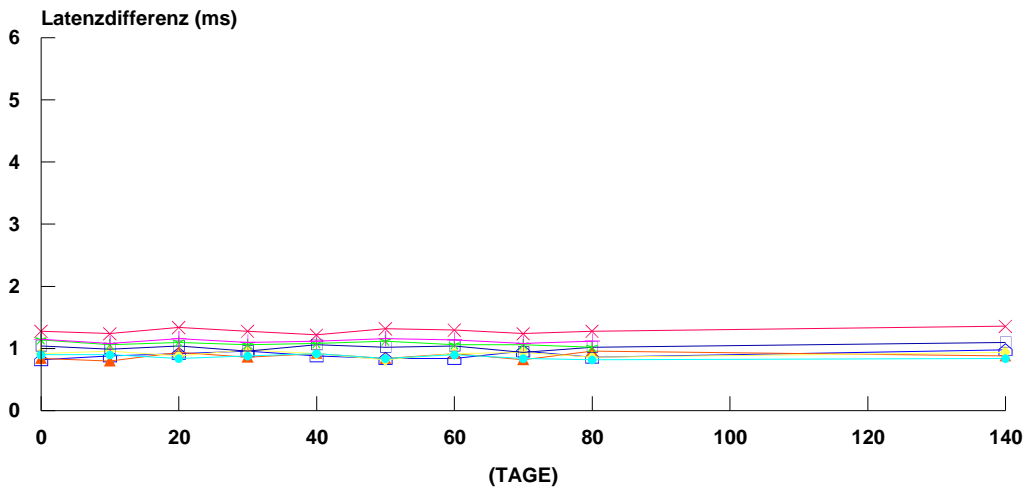
● 22 + 28 \* 30 □ 33 × 34 ◆ 35 ▲ 37 □ 46

Abb.17

### 7.2.3. LATENZDIFFERENZ

Hierbei handelt es sich um einen durch Subtraktion von Latenz I von Latenz II entstandenen Wert. Da - wie oben beschrieben - die Werte für Latenz I in allen Gruppen nahezu stabil blieben, ist der zu jedem Meßzeitpunkt errechnete Wert der Latenzdifferenz ausschließlich durch die Größe Latenz II bestimmt. Die Ergebnisse entsprechen den für Latenz II beschriebenen Beobachtungen und werden hier nicht näher erläutert. Auffällig ist die geringere intraindividuelle Variabilität der Latenzdifferenzen im Vergleich zu den Latenzen.

### KONTROLLEN (K) VORVERSUCH LATENZDIFFERENZ (LAT.II - LAT.I)

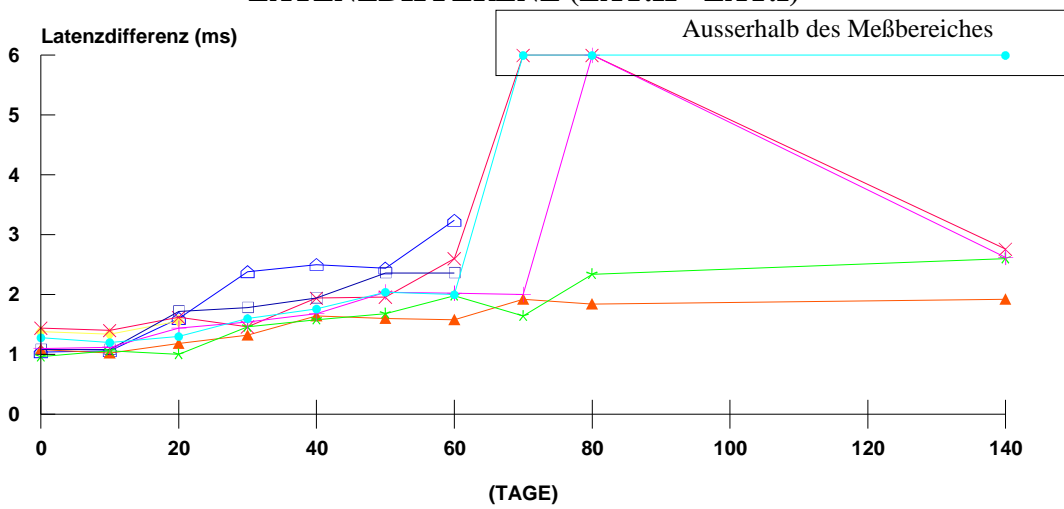


Nr.5 und Nr.6 nur bis Tag 60

● 3 + 5 \* 6 □ 15 × 16 ◆ 39 ▲ 51 □ 58

Abb.18

### HEXANEXPOSITION (H) VORVERSUCH LATENZDIFFERENZ (LAT.II - LAT.I)



Nr.18 nur bis Tag 20

Nr.12 und Nr.21 nur bis Tag 60

● 2 + 10 \* 11 □ 12 × 17 ◆ 18 ▲ 19 □ 21

Abb.19

### KONTROLLEN MIT LIPONSÄUREBEHANDLUNG (KL/KL42) VORVERSUCH LATENZDIFFERENZ (LAT.II - LAT.I)

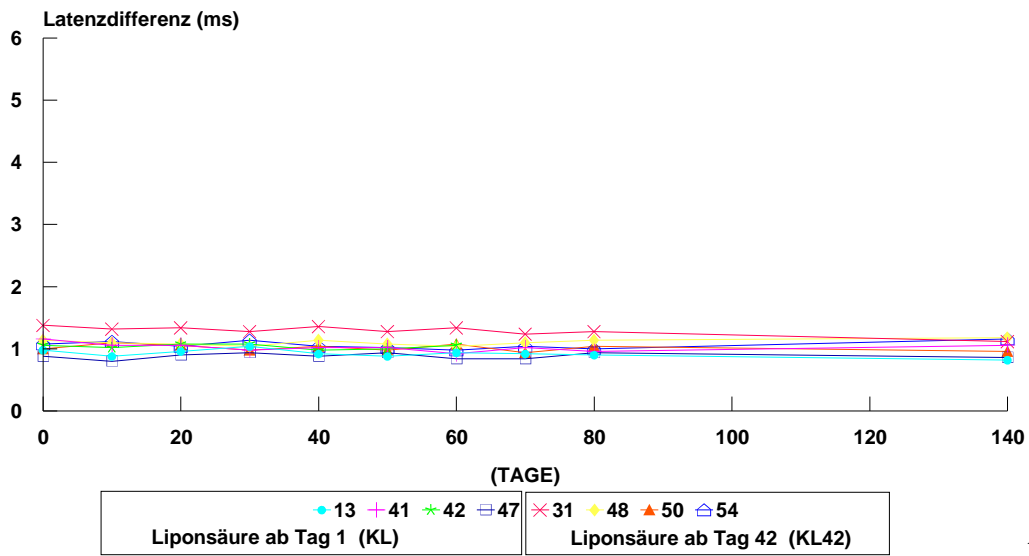


Abb.20

Nr.41 nur bis Tag 60

### HEXANEXPOSITION UND LIPONSÄUREBEHANDLUNG (HL) VORVERSUCH LATENZDIFFERENZ (LAT.II - LAT.I)

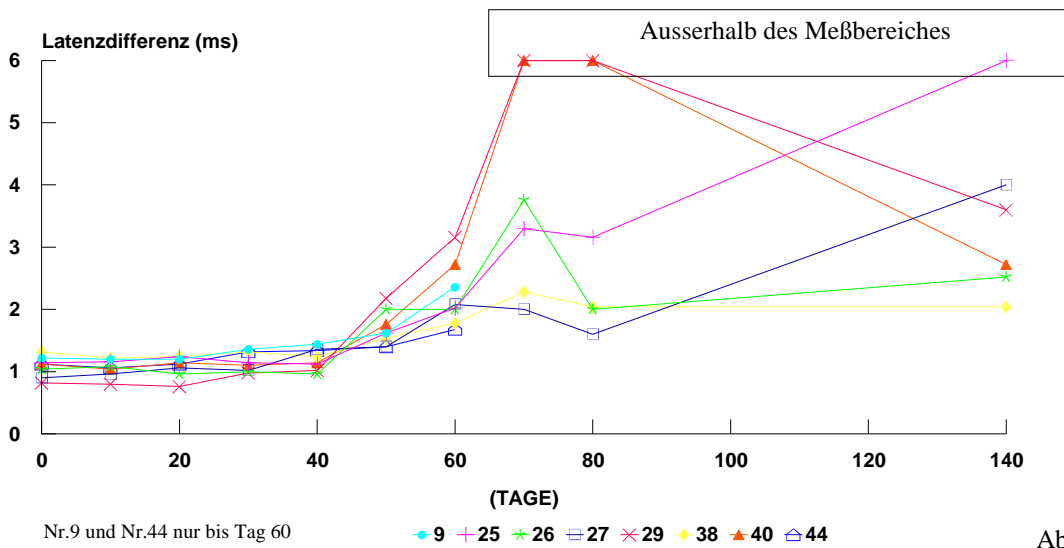
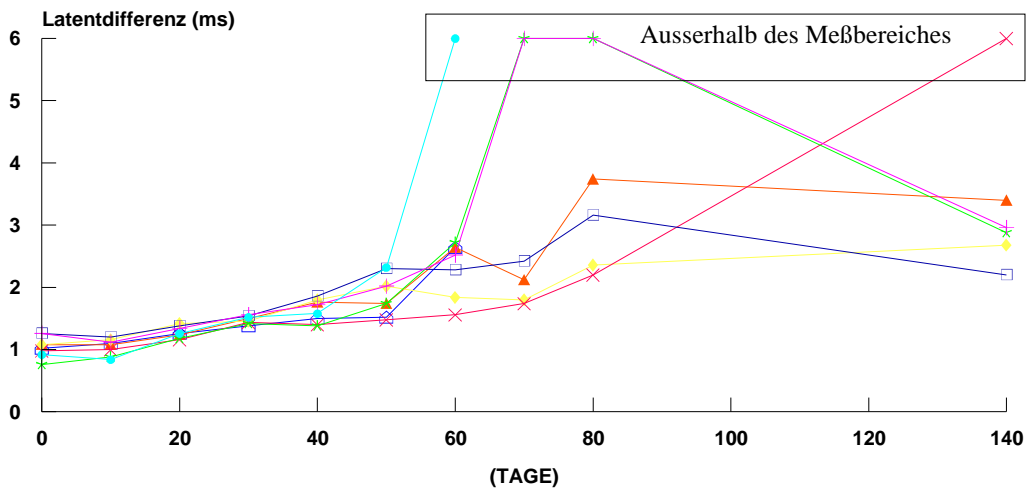


Abb.21

Nr.9 und Nr.44 nur bis Tag 60

**HEXANEXPOSITION, LIPONSÄURE AB 42.TAG (HL42)**  
**VORVERSUCH**  
**LATENZDIFFERENZ (LAT.II - LAT.I)**



Nr.22 und Nr.46 nur bis Tag 60

● 22 + 28 \* 30 □ 33 × 34 ◆ 35 ▲ 37 □ 46

Abb.22

7.2.4. STATISTISCHE DATEN DES VORVERSUCHES

Der Wilcoxon-Test kann zum Vergleich von Kollektiven mit weniger als sechs Tieren nicht sinnvoll angewendet werden (s.Kap.6.9.). Vergleiche mit den Gruppen KL oder KL<sub>42</sub> entfallen dadurch von vornherein. Die Ergebnisse sind in tabellarischer Form dargestellt. Auf eine Beschreibung wird deshalb an dieser Stelle verzichtet. Ein Vergleich zwischen den Gruppen H und HL<sub>42</sub> ergab keine Unterschiede.

**VORVERSUCH (H vs K)**  
Hexan versus Kontrollen

TAG	0	10	20	30	40	50	60	70	80	142
LATENZ I				+		++	++			
LATENZDIFF.		+	++	++	++	++	++			
LATENZ II				++	++	++	++			

**Wilcoxon Test: p < 0,05: + p < 0,01: ++**

Ab Tag 70 n = 5 (Gruppe H): Test nicht anwendbar

Abb.23

**VORVERSUCH (H vs HL)**  
Hexan versus Hexan + Liponsäurebehandlung

TAG	0	10	20	30	40	50	60	70	80	142
LATENZ I										
LATENZDIFF.										
			+	++	++					
LATENZ II										
				++	++					

**Wilcoxon Test:  $p < 0,05$ : +  $p < 0,01$ : ++**

Ab Tag 70 n = 5 (Gruppe H): Test nicht anwendbar

Abb.24

**VORVERSUCH (HL vs HL<sub>42</sub>)**  
Hexan + Liponsäure versus Hexan + Liponsäure ab Tag 42

TAG	0	10	20	30	40	50	60	70	80	142
LATENZ I										
				+	+					
LATENZDIFF.										
			+	++	++					
			+							
LATENZ II										
			+	++	++					

**Wilcoxon Test:  $p < 0,05$ : +  $p < 0,01$ : ++**

Abb.25



7.2.4. TABELLARISCHE DARSTELLUNG DER AMPLITUDEN (VORVERSUCH)

Tier- Nummer	Gruppe	Tag	Amp.II (mV)	Tier- Nummer	Gruppe	Tag	Amp.II (mV)	Tier- Nummer	Gruppe	Tag	Amp.II (mV)
2	H	0	8	10	H	0	9	11	H	0	7
2	H	10	6	10	H	10	7	11	H	10	8
2	H	20	5	10	H	20	7	11	H	20	7,5
2	H	30	6	10	H	30	7	11	H	30	8
2	H	40	7,5	10	H	40	5	11	H	40	9
2	H	50	4,5	10	H	50	7	11	H	50	9
2	H	60	6	10	H	60	2,8	11	H	60	5,2
2	H	70	<0,1	10	H	70	1,2	11	H	70	3,8
2	H	80	<0,1	10	H	80	<0,1	11	H	80	1,8
2	H	140	<0,1	10	H	140	0,72	11	H	140	2,4
12	H	0	4,8	17	H	0	6,2	18	H	0	5,2
12	H	10	4	17	H	10	6,2	18	H	10	4,4
12	H	20	3	17	H	20	6,4	18	H	20	5,2
12	H	30	3,5	17	H	30	5,4				
12	H	40	4,4	17	H	40	4,4				
12	H	50	3,5	17	H	50	6,2				
12	H	60	2,1	17	H	60	2,1				
				17	H	70	<0,1				
				17	H	80	<0,1				
				17	H	140	0,7				
19	H	0	3,8	21	H	0	6,5	9	HL	0	4
19	H	10	3,8	21	H	10	5	9	HL	10	5
19	H	20	5,6	21	H	20	6	9	HL	20	4,5
19	H	30	4,2	21	H	30	5,5	9	HL	30	4,5
19	H	40	4,6	21	H	40	3,2	9	HL	40	5
19	H	50	2,8	21	H	50	4,4	9	HL	50	6
19	H	60	2,8	21	H	60	1,9	9	HL	60	2,5
19	H	70	1,5								
19	H	80	1,7								
19	H	140	2								
25	HL	0	8	26	HL	0	4,8	27	HL	0	8
25	HL	10	6,5	26	HL	10	4,8	27	HL	10	10
25	HL	20	8	26	HL	20	5,2	27	HL	20	6
25	HL	30	7	26	HL	30	4,2	27	HL	30	7,5
25	HL	40	8	26	HL	40	5	27	HL	40	6,4
25	HL	50	5,5	26	HL	50	4,2	27	HL	50	8
25	HL	60	1,8	26	HL	60	2	27	HL	60	1,6
25	HL	70	0,22	26	HL	70	2	27	HL	70	0,9
25	HL	80	0,28	26	HL	80	0,32	27	HL	80	0,36
25	HL	140	<0,1	26	HL	140	1,3	27	HL	140	1,1
29	HL	0	10	38	HL	0	9	40	HL	0	6,5
29	HL	10	8,5	38	HL	10	4	40	HL	10	7,5
29	HL	20	10	38	HL	20	8	40	HL	20	7,5
29	HL	30	12,5	38	HL	30	4	40	HL	30	5,6
29	HL	40	6	38	HL	40	6	40	HL	40	6
29	HL	50	4,5	38	HL	50	5,6	40	HL	50	4,5
29	HL	60	0,64	38	HL	60	5,6	40	HL	60	0,66
29	HL	70	<0,1	38	HL	70	2,3	40	HL	70	<0,1
29	HL	80	<0,1	38	HL	80	2,1	40	HL	80	<0,1
29	HL	140	0,5	38	HL	140	0,56	40	HL	140	0,24
44	HL	0	10	22	HL42	0	8,5	28	HL42	0	10,5
44	HL	10	7	22	HL42	10	7,5	28	HL42	10	8
44	HL	20	6	22	HL42	20	7	28	HL42	20	7,5
44	HL	30	6,4	22	HL42	30	6,5	28	HL42	30	7,5

Abb. 26

Tier- Nummer	Gruppe	Tag	Amp.II (mV)	Tier- Nummer	Gruppe	Tag	Amp.II (mV)	Tier- Nummer	Gruppe	Tag	Amp.II (mV)
44	HL	40	8	22	HL42	40	10	28	HL42	40	6
44	HL	50	6	22	HL42	50	3,5	28	HL42	50	5,5
44	HL	60	4	22	HL42	60	<0,1	28	HL42	60	0,38
								28	HL42	70	<0,1
								28	HL42	80	<0,1
								28	HL42	140	0,36
30	HL42	0	9	33	HL42	0	5,5	34	HL42	0	3
30	HL42	10	9,5	33	HL42	10	5	34	HL42	10	3
30	HL42	20	9	33	HL42	20	5,5	34	HL42	20	1,6
30	HL42	30	9	33	HL42	30	4,8	34	HL42	30	2,5
30	HL42	40	11	33	HL42	40	4	34	HL42	40	2,5
30	HL42	50	7,5	33	HL42	50	5	34	HL42	50	1,8
30	HL42	60	2,4	33	HL42	60	2	34	HL42	60	3
30	HL42	70	<0,1	33	HL42	70	1,2	34	HL42	70	0,6
30	HL42	80	<0,1	33	HL42	80	0,36	34	HL42	80	0,24
30	HL42	140	0,12	33	HL42	140	0,9	34	HL42	140	<0,1
35	HL42	0	5,5	37	HL42	0	7,5	46	HL42	0	5,8
35	HL42	10	7	37	HL42	10	5,6	46	HL42	10	5,6
35	HL42	20	5,5	37	HL42	20	7	46	HL42	20	5,4
35	HL42	30	5,5	37	HL42	30	5	46	HL42	30	5,8
35	HL42	40	4	37	HL42	40	8	46	HL42	40	4,8
35	HL42	50	3,5	37	HL42	50	4,8	46	HL42	50	4,2
35	HL42	60	0,5	37	HL42	60	7	46	HL42	60	5,4
35	HL42	70	1,8	37	HL42	70	0,7				
35	HL42	80	1,4	37	HL42	80	0,55				
35	HL42	140	0,35	37	HL42	140	1,21				
3	K	0	6	5	K	0	7,2	6	K	0	5,6
3	K	10	7	5	K	10	5,2	6	K	10	8
3	K	20	8	5	K	20	7,6	6	K	20	5
3	K	30	9	5	K	30	6,4	6	K	30	8
3	K	40	9,5	5	K	40	6,5	6	K	40	9
3	K	50	9	5	K	50	7,5	6	K	50	7,5
3	K	60	7,5	5	K	60	6,8	6	K	60	10
3	K	70	7	5	K	70	5,8	6	K	70	6
3	K	80	8,5	5	K	80	6	6	K	80	10
3	K	140	9,5								
15	K	0	5,5	16	K	0	8	39	K	0	9,5
15	K	10	5,2	16	K	10	7	39	K	10	7,5
15	K	20	4,4	16	K	20	9	39	K	20	6
15	K	30	5,2	16	K	30	8	39	K	30	6,5
15	K	40	5,2	16	K	40	7,5	39	K	40	7
15	K	50	4,2	16	K	50	7	39	K	50	6,5
15	K	60	5,2	16	K	60	6,5	39	K	60	6
15	K	70	4	16	K	70	6	39	K	70	6
15	K	80	7	16	K	80	6	39	K	80	8
15	K	140	6,5	16	K	140	5,5	39	K	140	7
51	K	0	6,5	58	K	0	5,6	13	KL	0	6
51	K	10	5,5	58	K	10	6	13	KL	10	4,8
51	K	20	5,5	58	K	20	5,5	13	KL	20	6,4
51	K	30	6	58	K	30	6	13	KL	30	7,2
51	K	40	6,5	58	K	40	5,5	13	KL	40	7,5
51	K	50	5,5	58	K	50	5,5	13	KL	50	8,5
51	K	60	6,5	58	K	60	5,5	13	KL	60	7
51	K	70	6,5	58	K	70	5,5	13	KL	70	7,5
51	K	80	6	58	K	80	5,5	13	KL	80	8,5
51	K	140	7	58	K	140	6,5	13	KL	140	8,5

Tier- Nummer	Gruppe	Tag	Amp.II (mV)	Tier- Nummer	Gruppe	Tag	Amp.II (mV)	Tier- Nummer	Gruppe	Tag	Amp.II (mV)
41	KL	0	4,4	42	KL	0	8	47	KL	0	8
41	KL	10	5,2	42	KL	10	8,5	47	KL	10	6,8
41	KL	20	4,6	42	KL	20	9,5	47	KL	20	9
41	KL	30	3,4	42	KL	30	10	47	KL	30	7,5
41	KL	40	4,6	42	KL	40	11,5	47	KL	40	7
41	KL	50	5,6	42	KL	50	10,5	47	KL	50	6,8
41	KL	60	6	42	KL	60	7	47	KL	60	7,5
41	KL	70	5,6					47	KL	70	7
41	KL	80	3,6					47	KL	80	6,5
								47	KL	140	8
31	KL42	0	5,5	48	KL42	0	11	50	KL42	0	5
31	KL42	10	6,5	48	KL42	10	12,5	50	KL42	10	5
31	KL42	20	6	48	KL42	20	11	50	KL42	20	4
31	KL42	30	6	48	KL42	30	11,5	50	KL42	30	4
31	KL42	40	7	48	KL42	40	12	50	KL42	40	5
31	KL42	50	9	48	KL42	50	11,5	50	KL42	50	4
31	KL42	60	9,5	48	KL42	60	12,5	50	KL42	60	4,5
31	KL42	70	8	48	KL42	70	11	50	KL42	70	4,5
31	KL42	80	7	48	KL42	80	11	50	KL42	80	4
31	KL42	140	7,5	48	KL42	140	10	50	KL42	140	5
54	KL42	0	7,5	54	KL42	30	6,5	54	KL42	70	7
54	KL42	10	7	54	KL42	40	8	54	KL42	80	7
54	KL42	20	6,5	54	KL42	50	8	54	KL42	140	6
				54	KL42	60	7,5				

Fehlende Daten zu einzelnen Tieren (leere Kästchen) erklären sich durch die Entnahme von Tieren zur histopathologischen Untersuchung.

### 7.3. ERGEBNISSE DES HAUPTVERSUCHES

Auch in diesem Abschnitt gelten die in Kapiteln 7.1. gemachten Anmerkungen hinsichtlich des Verzichtes auf eine Berechnung der Nervenleitgeschwindigkeit.

#### 7.3.1. LATENZ I UND LATENZ II

Die folgenden Befunde treffen für beide Meßgrößen zu, sind aber jeweils für die Werte der Latenz II etwas deutlicher, für Latenz I nur geringfügig ausgeprägt. Für die Kontrolltiere (Gruppe K) und die mit Liponsäure behandelten Kontrollen (Gruppe KL) ergeben sich weitgehend stabile Werte, die allenfalls geringfügig im Verlauf abfallen. Die meisten der gegenüber n-Hexan exponierten Tiere (Gruppe H) zeigen einen geringen Anstieg der Latenzzeiten bis Tag 20, im Vergleich zu den Gruppen K und KL findet sich eine leicht ansteigende Tendenz der Meßwerte, des weiteren läßt sich eine etwas größere intra- und interindividuelle Variabilität der Meßwerte feststellen. Bei den mit Liponsäure behandelten und hexanexponierten Tieren (Gruppe HL) finden sich diskrete Veränderun-

gen des Kurvenbildes, wie schon bei Gruppe H scheint es bei den meisten Tieren zu einem leichten Anstieg bis Tag 20 zu kommen.

### KONTROLLEN (K) HAUPTVERSUCH LATENZ I

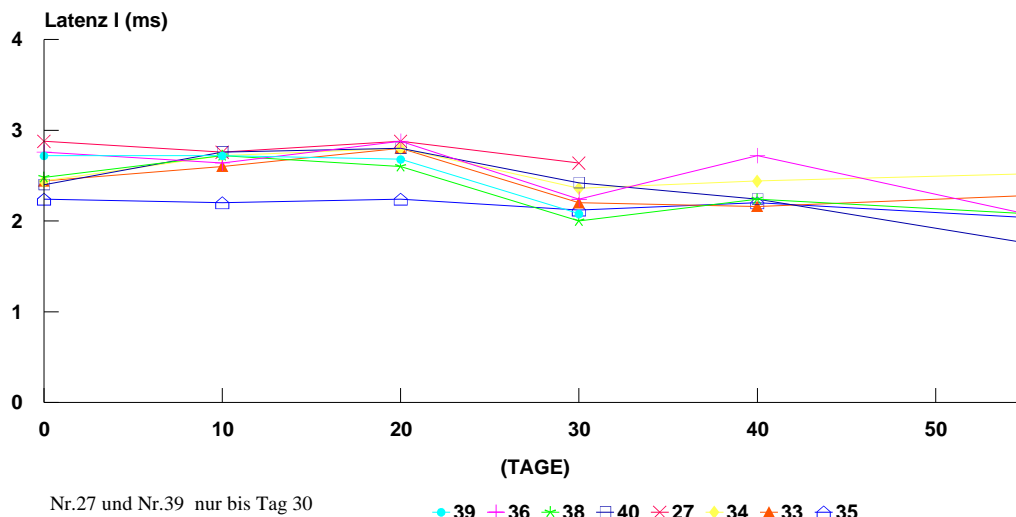


Abb.27

### HEXANEXPOSITION (H) HAUPTVERSUCH LATENZ I

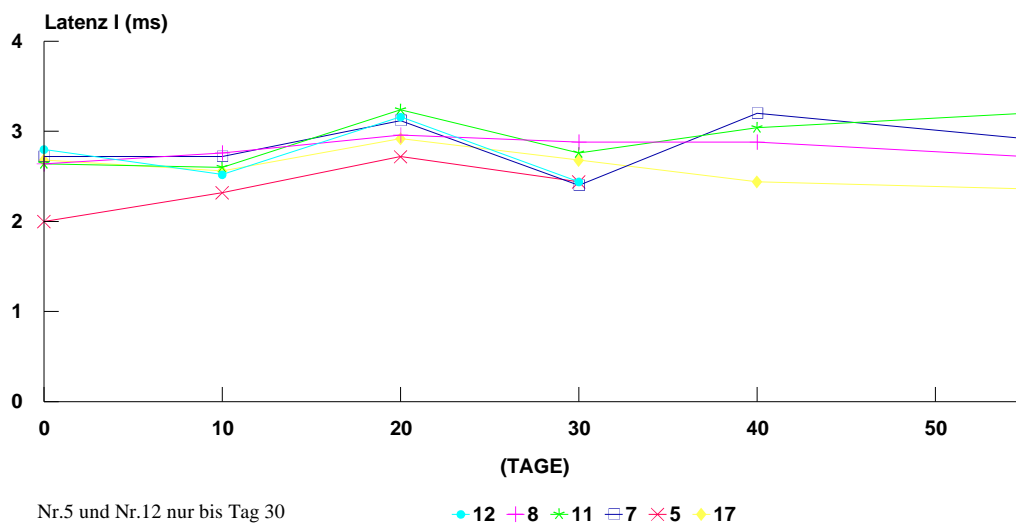


Abb.28

# HEXANEXPOSITION (H)

## HAUPTVERSUCH LATENZ I

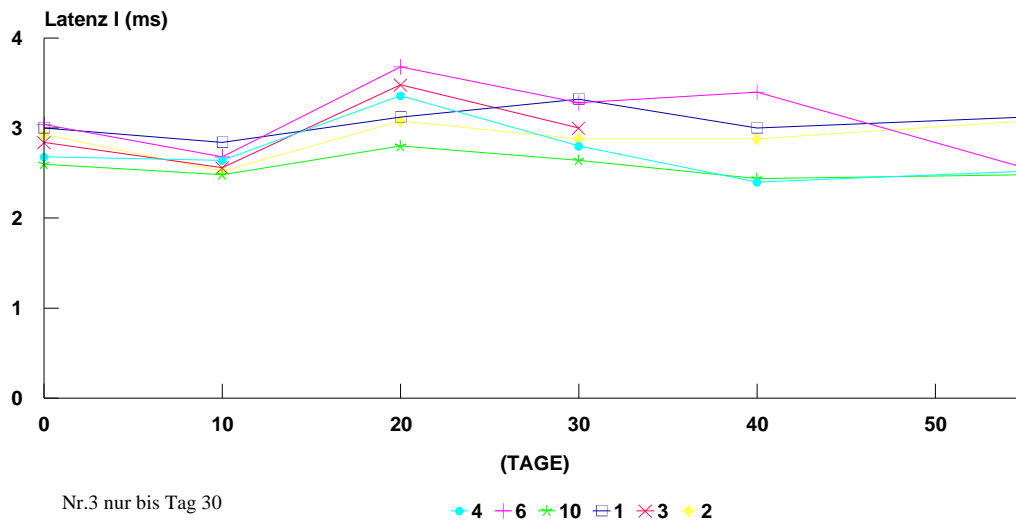


Abb.29

# KONTROLLEN + LIPONSÄUREBEHANDLUNG (KL)

## HAUPTVERSUCH LATENZ I

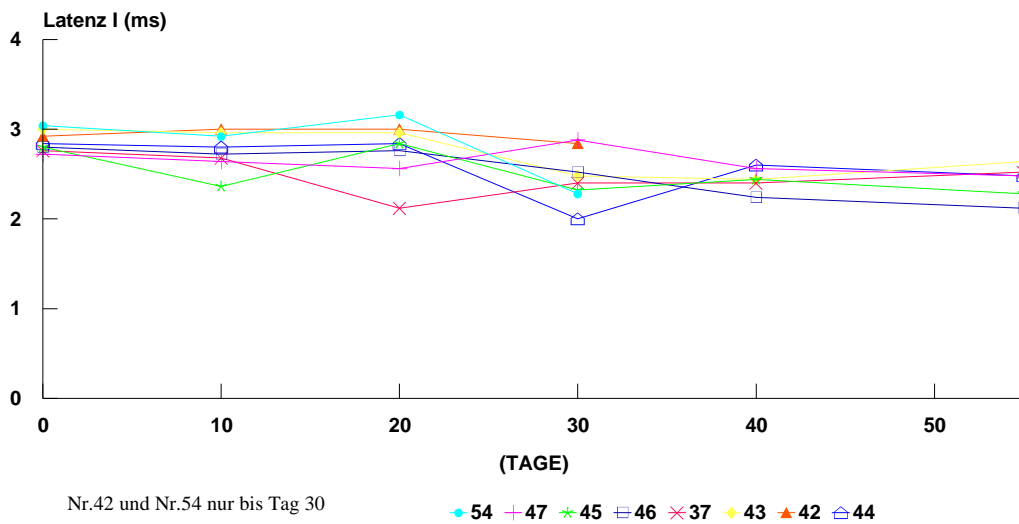


Abb.30

### HEXANEXPOSITION + LIPONSÄUREBEHANDLUNG (HL) HAUPTVERSUCH LATENZ I

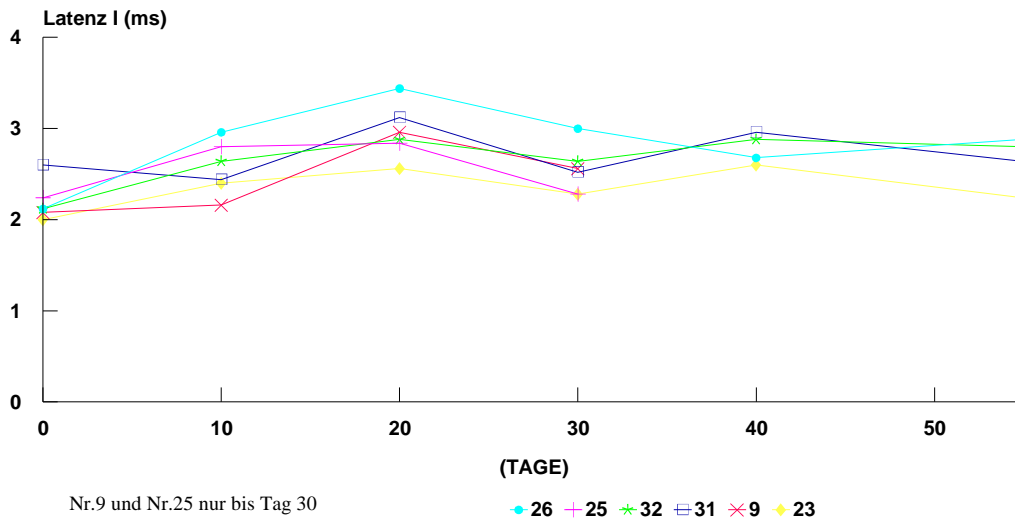


Abb.31

### HEXANEXPOSITION + LIPONSÄUREBEHANDLUNG (HL) HAUPTVERSUCH LATENZ I

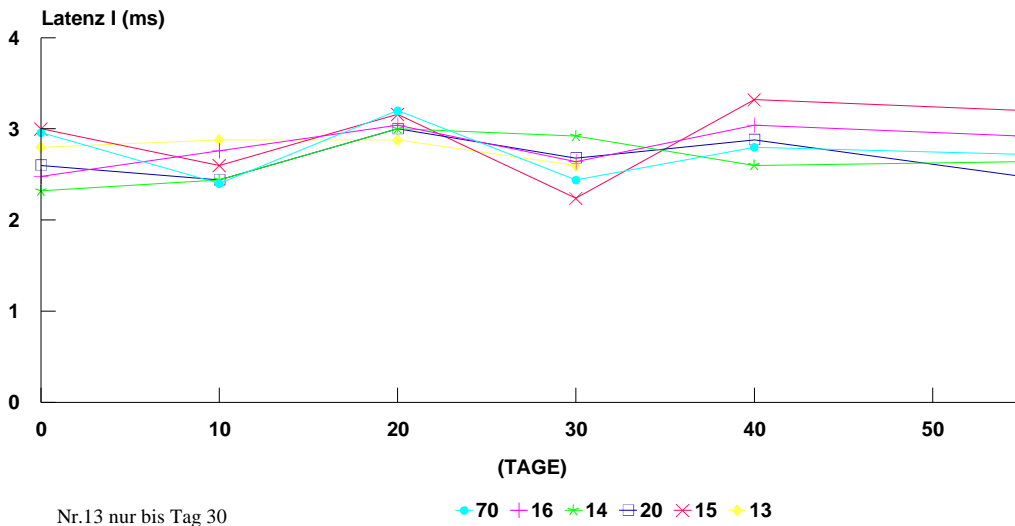
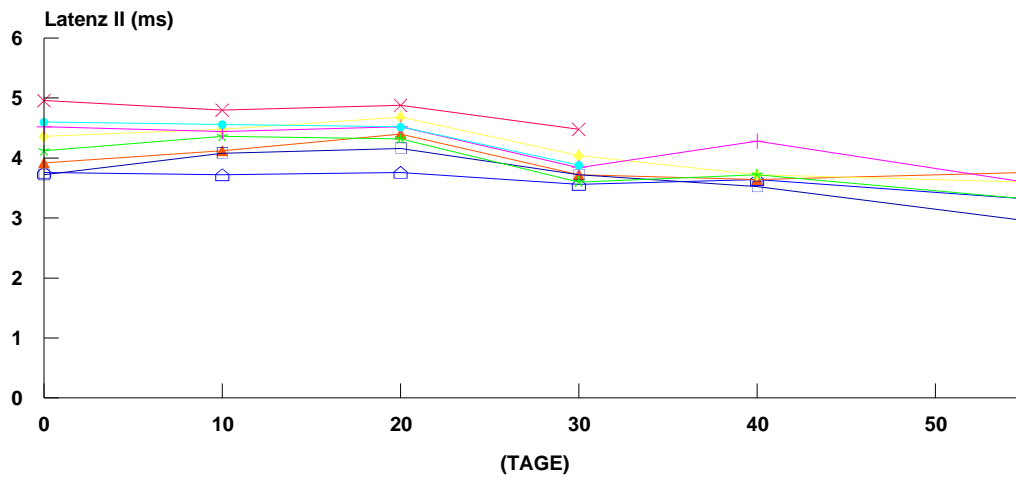


Abb.32

## KONTROLLEN (K) HAUPTVERSUCH LATENZ II

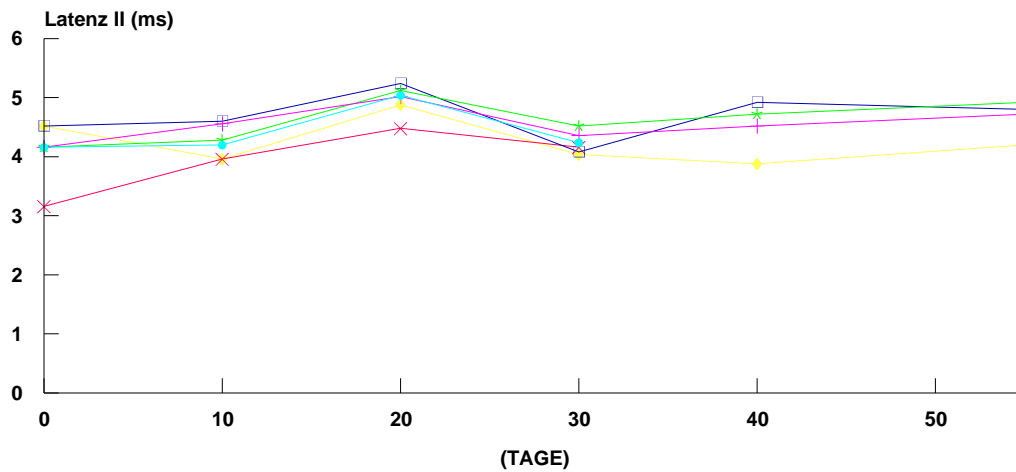


Nr.27 und Nr.39 nur bis Tag 30

● 39 + 36 \* 38 □ 40 × 27 ◆ 34 ▲ 33 ▢ 35

Abb.33

## HEXANEXPOSITION (H) HAUPTVERSUCH LATENZ II



Nr.5 und Nr.12 nur bis Tag 30

● 12 + 8 \* 11 □ 7 × 5 ◆ 17

Abb.34

## HEXANEXPOSITION (H) HAUPTVERSUCH LATENZ II

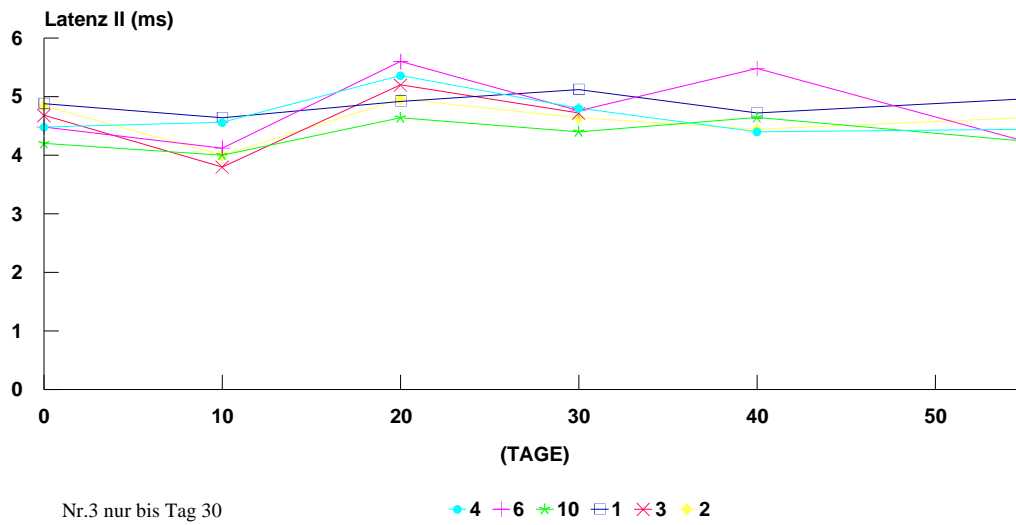


Abb.35

## KONTROLLEN + LIPONSÄUREBEHANLUNG (KL) HAUPTVERSUCH LATENZ II

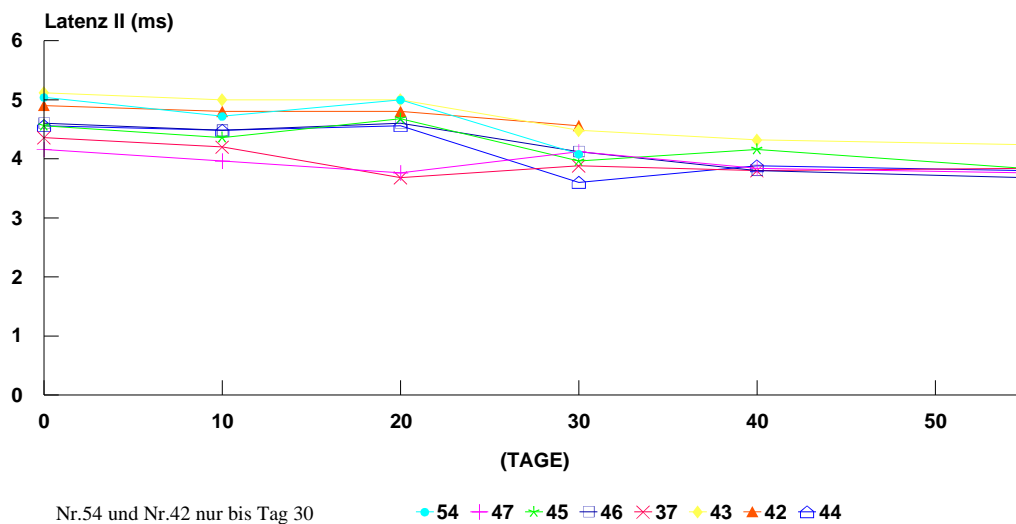


Abb.36



### HEXANEXPOSITION + LIPONSÄUREBEHANDLUNG (HL) HAUPTVERSUCH LATENZ II

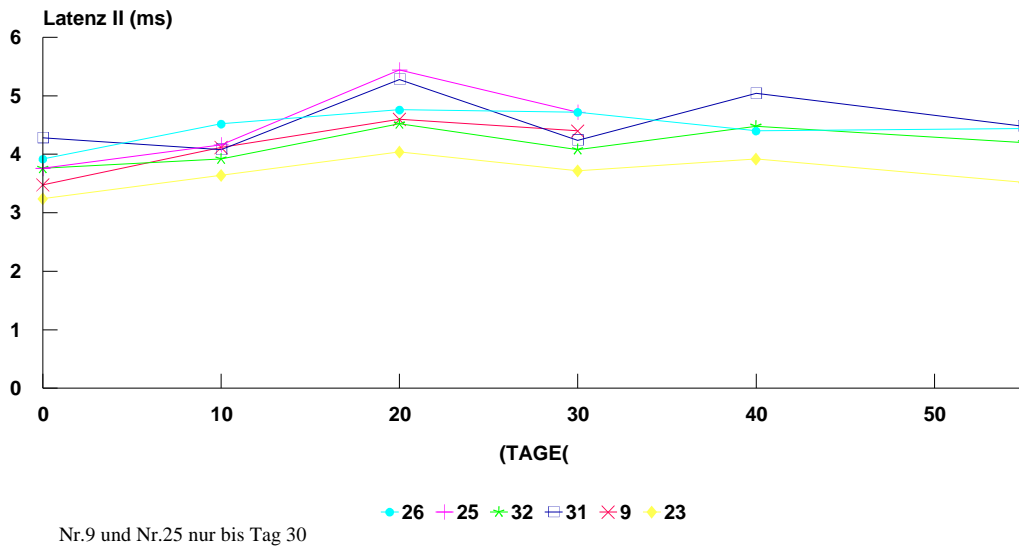


Abb.37

### HEXANEXPOSITION + LIPONSÄUREBEHANDLUNG (HL) HAUPTVERSUCH LATENZ II

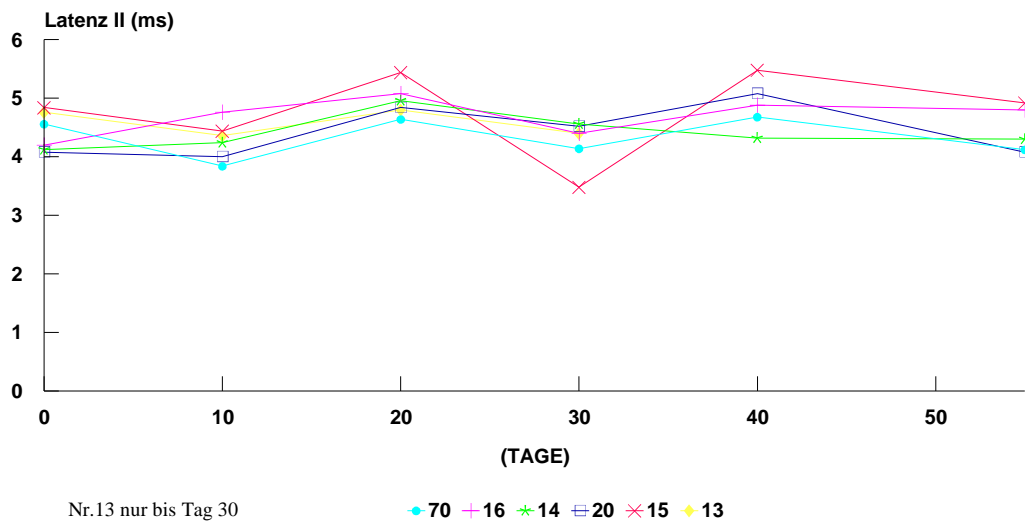
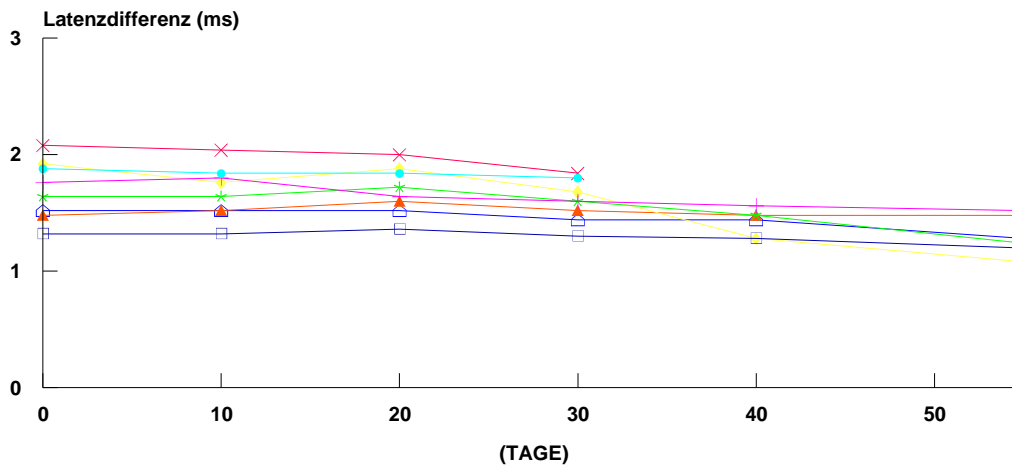


Abb.38

### 7.3.2. LATENZDIFFERENZ

Die grafischen Darstellungen für diesen Parameter ergeben keine auffälligen Veränderungen während des Untersuchungszeitraumes. In Gruppe H lassen einige Tiere einen geringfügigen Anstieg der Meßwerte bis Tag 20 erkennen, daneben fällt eine im Vergleich zu den Gruppen K und KL größere Schwankung der Meßwerte von Messung zu Messung auf. Die Werte für Gruppe HL entsprechen den Ergebnissen der Gruppe H, lediglich Tier Nr. 25 zeigt eine deutliche Zunahme der Latenzdifferenz bis Tag 20. Dieses Tier wurde an Tag 30 nach einem Losverfahren zur histopathologischen Untersuchung getötet.

## KONTROLLEN (K) HAUPTVERSUCH LATENZDIFFERENZ (Lat.II - Lat.I)

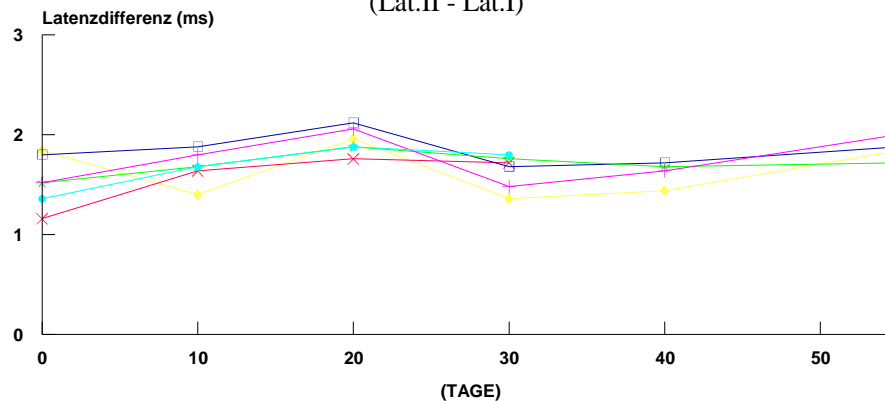


Nr.27 und Nr.39 nur bis Tag 30

● 39 + 36 \* 38 □ 40 × 27 ◆ 34 ▲ 33 □ 35

Abb.39

## HEXANEXPOSITION (H) HAUPTVERSUCH LATENZDIFFERENZ (Lat.II - Lat.I)

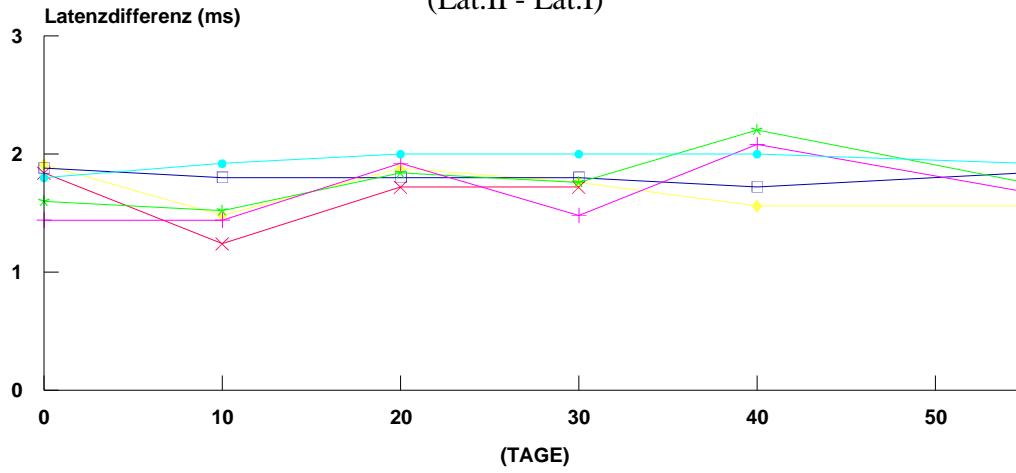


Nr.5 und Nr.12 nur bis Tag 30

● 12 + 8 \* 11 □ 7 × 5 ◆ 17

Abb.40

### HEXANEXPOSITION (H) HAUPTVERSUCH LATENZDIFFERENZ (Lat.II - Lat.I)

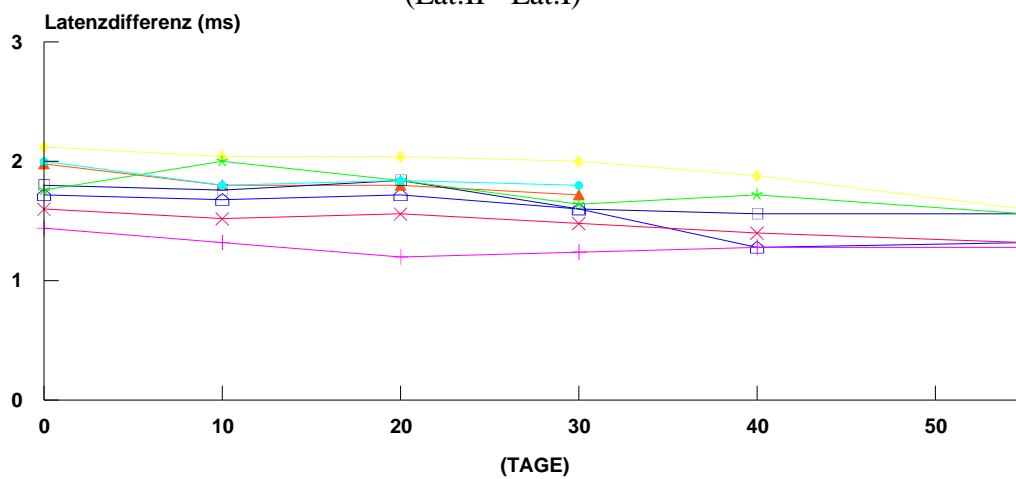


Nr.3 nur bis Tag 30

● 4 + 6 \* 10 □ 1 × 3 ◆ 2

Abb.41

### KONTROLLEN + LIPONSÄUREBEHANDLUNG (KL) HAUPTVERSUCH LATENZDIFFERENZ (Lat.II - Lat.I)



Nr.42 und Nr.54 nur bis Tag 30

● 54 + 47 \* 45 □ 46 × 37 ◆ 43 ▲ 42 ◻ 44

Abb.42

### HEXANEXPOSITION + LIPONSÄUREBEHANDLUNG (HL) HAUPTVERSUCH LATENZDIFFERENZ (Lat.II - Lat.I)

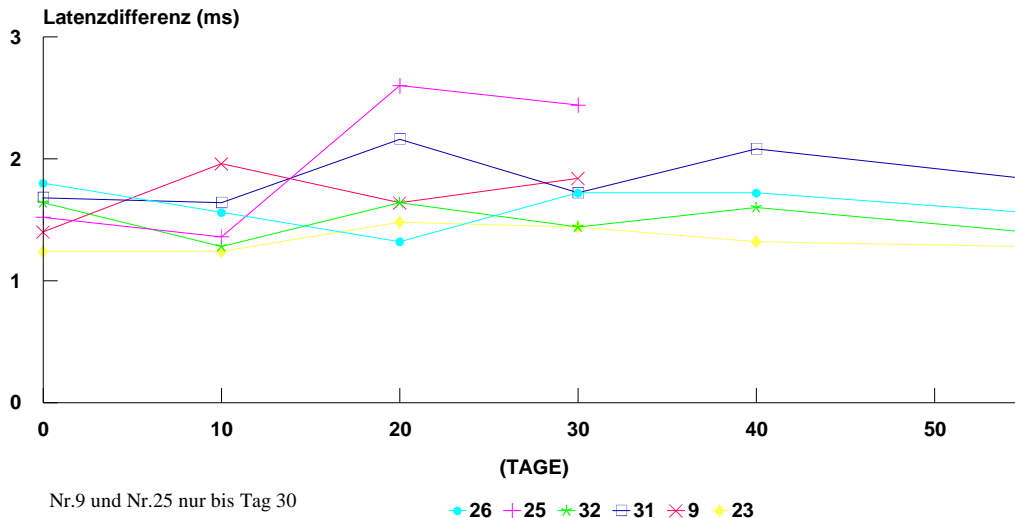


Abb.43

### HEXANEXPOSITION + LIPONSÄUREBEHANDLUNG (HL) HAUPTVERSUCH LATENZDIFFERENZ (Lat.II - Lat.I)

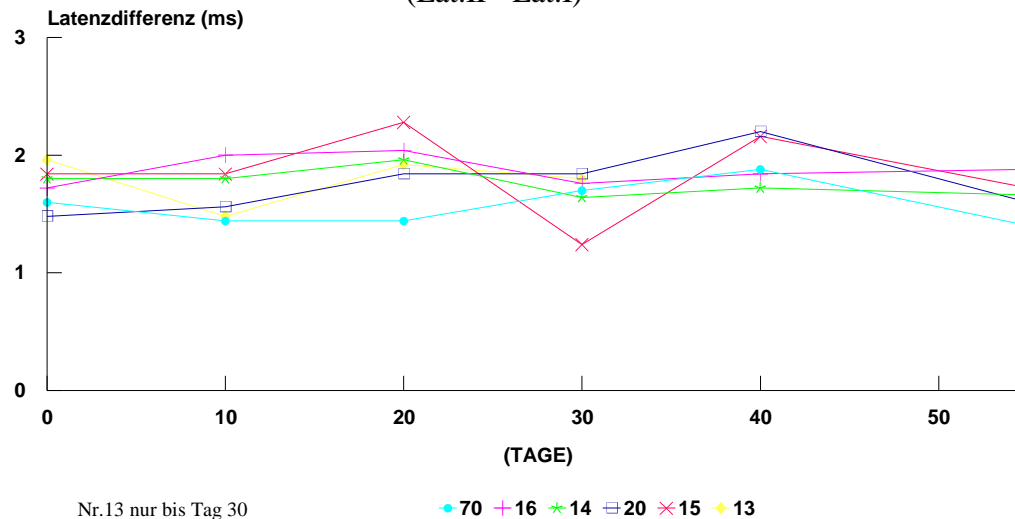


Abb.44

### 7.3.3. STATISTISCHE DATEN DES HAUPTVERSUCHES

Für jede Gruppe und bezogen auf jeden Untersuchungstag wurde der Wilcoxon-Test berechnet. Auch hier gilt, daß für Kollektive mit  $n < 8$  eine Berechnung des Wilcoxon-Testes nur bezogen auf eine Irrtumswahrscheinlichkeit von 5 % ( $p < 0,05$ ) sinnvoll ist (s.Kap.6.9.). Beim Vergleich der exponierten Tiere mit den Kontrollen (Gruppen H vs. K) läßt sich für drei Parameter ab Tag 20 ein Unterschied sichern (Latenz I und II, Latenzdiff.). Im Vergleich der Gruppen KL und HL ergeben sich erst ab Tag 30 Hinweise auf einen Unterschied der Latenz I und II, für die Latenzdifferenz erst ab Tag 40. Erst am Ende der Beobachtungsperiode (Tag 55) zeigen sich Unterschiede bei Vergleich der Gruppen H und HL.

#### HAUPTVERSUCH (H vs K) Hexan versus Kontrollen

TAG	0	10	20	30	40	55
LATENZ I			+	++	+	+
LATENZDIFF.			+	+	+	+
LATENZ II			++	++	+	+

**Wilcoxon Test:  $p < 0,05$ : +     $p < 0,01$ : ++**

Ab Tag 40  $n = 6$  (Gruppe K): Testbedingt nur  $p < 0,05$  möglich

**HAUPTVERSUCH (HL vs KL)**  
Liponsäurebehandlung: Hexan versus Kontrollen

TAG	0	10	20	30	40	55
LATENZ I				++	+	+
LATENZDIFF.					+	+
LATENZ II				++	+	

**Wilcoxon Test:  $p < 0,05$ : +     $p < 0,01$ : ++**

Ab Tag 40 n = 6 (Gruppe KL): Testbedingt nur  $p < 0,05$  möglich

Abb.46

**HAUPTVERSUCH (H vs HL)**  
Hexan versus Hexan + Liponsäurebehandlung

TAG	0	10	20	30	40	55
LATENZ I						+
LATENZDIFF.						+
LATENZ II						+

**Wilcoxon Test:  $p < 0,05$ : +     $p < 0,01$ : ++**

Abb.47

7.3.4. TABELLARISCHE DARSTELLUNG DER AMPLITUDEN (HAUPTVERSUCH)

Tier-nummer	Gruppe	Tag	Amp.II [mV]	Tier-nummer	Gruppe	Tag	Amp.II [mV]	Tier-nummer	Gruppe	Tag	Amp.II [mV]
12	H	0	5,1	8	H	0	3,3	11	H	0	3,1
12	H	10	6,1	8	H	10	5,9	11	H	10	3,3
12	H	20	6,3	8	H	20	4,9	11	H	20	3
12	H	30	7,5	8	H	30	7,6	11	H	30	3,5
				8	H	40	5,1	11	H	40	3,1
				8	H	55	4,6	11	H	55	3,1
7	H	0	5,6	5	H	0	9,3	17	H	0	3,9
7	H	10	4,4	5	H	10	6,4	17	H	10	5,9
7	H	20	6,1	5	H	20	7	17	H	20	4,9
7	H	30	6,8	5	H	30	7	17	H	30	4,4
7	H	40	6					17	H	40	3,4
7	H	55	8,6					17	H	55	4
4	H	0	4,5	6	H	0	4,1	10	H	0	5,6
4	H	10	3,5	6	H	10	4,3	10	H	10	2,8
4	H	20	4	6	H	20	4,5	10	H	20	4,3
4	H	30	3,4	6	H	30	5	10	H	30	3,8
4	H	40	4,5	6	H	40	3,5	10	H	40	4,8
4	H	55	4,5	6	H	55	3,1	10	H	55	5
1	H	0	4,5	3	H	0	6,9	2	H	0	3,8
1	H	10	2,8	3	H	10	4,9	2	H	10	4,9
1	H	20	4,6	3	H	20	8,8	2	H	20	4,5
1	H	30	1,8	3	H	30	8,5	2	H	30	3,3
1	H	40	8,5					2	H	40	5,8
1	H	55	4,3					2	H	55	4,1
26	HL	0	5,3	25	HL	0	4	31	HL	0	2,9
26	HL	10	5	25	HL	10	3,5	31	HL	10	6,6
26	HL	20	6	25	HL	20	3,6	31	HL	20	6,4
26	HL	30	6	25	HL	30	3,1	31	HL	30	5,1
26	HL	40	4,5					31	HL	40	4,3
26	HL	55	3,8					31	HL	55	5,9
9	HL	0	5	32	HL	0	9,1	70	HL	0	3,3
9	HL	10	7,1	32	HL	10	7,5	70	HL	10	2,9
9	HL	20	4	32	HL	20	8,8	70	HL	20	1,3
9	HL	30	4,3	32	HL	30	9	70	HL	30	3,3
				32	HL	40	6,4	70	HL	40	4,3
				32	HL	55	6	70	HL	55	6
16	HL	0	4,1	23	HL	0	2,4	20	HL	0	3,4
16	HL	10	3,6	23	HL	10	7,5	20	HL	10	5,6
16	HL	20	3,8	23	HL	20	7,9	20	HL	20	8,1
16	HL	30	3,4	23	HL	30	9,23	20	HL	30	5,5
16	HL	40	4,9	23	HL	40	6,6	20	HL	40	4
16	HL	55	3,3	23	HL	55	8	20	HL	55	4,6
15	HL	0	5,6	14	HL	0	5	13	HL	0	5,4
15	HL	10	5,9	14	HL	10	3,6	13	HL	10	7,6
15	HL	20	6	14	HL	20	4,5	13	HL	20	3,5
15	HL	30	2,2	14	HL	30	5,4	13	HL	30	4,1
15	HL	40	3,8	14	HL	40	4,3	13	HL	40	2,2
15	HL	55	2,4	14	HL	55	5,3				
39	K	0	6,3	36	K	0	5	38	K	0	4,8
39	K	10	5,1	36	K	10	5,5	38	K	10	5
39	K	20	3,6	36	K	20	4,9	38	K	20	5,8
39	K	30	5,2	36	K	30	4,1	38	K	30	5,5
				36	K	40	4,1	38	K	40	4,9
				36	K	55	5,9	38	K	55	5,5
40	K	0	5,1	27	K	0	4,3	34	K	0	2,3

Abb.48

Tier- nummer	Gruppe	Tag	Amp.II [mV]	Tier- nummer	Gruppe	Tag	Amp.II [mV]	Tier- nummer	Gruppe	Tag	Amp.II [mV]
40	K	10	6,6	27	K	10	3,8	34	K	10	2,3
40	K	20	5,6	27	K	20	4,4	34	K	20	4,6
40	K	30	6,4	27	K	30	4,5	34	K	30	4,2
40	K	40	7,1					34	K	40	4,1
40	K	55	5,2					34	K	55	6,6
33	K	0	5,5	35	K	0	3,9	54	KL	0	1,3
33	K	10	6,9	35	K	10	4,4	54	KL	10	3,3
33	K	20	6,1	35	K	20	3,4	54	KL	20	3,1
33	K	30	6,9	35	K	30	5,4	54	KL	30	3,1
33	K	40	6	35	K	40	9				
33	K	55	6,8	35	K	55	5				
47	KL	0	4,4	45	KL	0	4,6	46	KL	0	4,9
47	KL	10	6,6	45	KL	10	4,9	46	KL	10	3,9
47	KL	20	4,6	45	KL	20	3,8	46	KL	20	5
47	KL	30	6,3	45	KL	30	5	46	KL	30	8,3
47	KL	40	7,5	45	KL	40	4,1	46	KL	40	6,5
47	KL	55	7	45	KL	55	6,5	46	KL	55	8,3
37	KL	0	5,3	43	KL	0	3,4	42	KL	0	5,3
37	KL	10	9,4	43	KL	10	5	42	KL	10	6
37	KL	20	6,6	43	KL	20	5,3	42	KL	20	5,5
37	KL	30	9,3	43	KL	30	3	42	KL	30	3,4
37	KL	40	11,7	43	KL	40	7,8				
37	KL	55	10,3	43	KL	55	5,6				
44	KL	0	3,4	44	KL	20	4,9	44	KL	40	6,6
44	KL	10	5	44	KL	30	5,8	44	KL	55	4,5

Fehlende Daten zu einzelnen Tieren (leere Kästchen) erklären sich durch die Entnahme von Tieren zur histopathologischen Untersuchung.



## 8. DISKUSSION

### 8.1. NEUROPHYSIOLOGISCHE METHODIK

Einige Prinzipien der Messungen am peripheren Nervensystem der Ratte wurden bereits in Kap.3.7. genannt. Im Folgenden soll dargestellt werden, welche Methoden in der Literatur beschrieben sind, sowie aufgrund welcher Überlegungen und Vorversuche die in Kap.6 vorgestellte Methode entwickelt wurde.

Anlässlich unserer Fragestellung schieden von vornherein jene Verfahren aus, die mit dem isolierten, herauspräparierten N. ischiadicus in Nährlösung arbeiten [231][108], da hierbei jede Ratte nur einmal neurophysiologisch untersucht werden kann.

Andere Autoren [110][193][109][54][234] beschrieben invasive Vorgehensweisen in deren Verlauf der N. ischiadicus freigelegt wird, um am offenen Nerven die Reiz- und Ableitелеktroden zu plazieren. Wiederholte Messungen sind mit diesem Verfahren nur beschränkt möglich. Darüber hinaus ist eine mögliche Wirkung der Narkosemittel auf die Nervenleitgeschwindigkeit, sowie eine Interaktion mit den zu untersuchenden Toxinen nur schwer abzuschätzen [105][227].

Messungen mit oberflächlichen Reizelektroden im Verlauf des N. ischiadicus und einer bipolaren Nadelableitелеktrode in der Plantarmuskulatur, wie von FULLERTON [70] sowie (modifiziert) GLATZEL [79][78] und MIYAGAKI [139] beschrieben, umgehen zwar das Problem der eingeschränkten Wiederholbarkeit, werfen aber andere Schwierigkeiten auf:

- Eigene Vorversuche zeigten, daß eine zuverlässige, reproduzierbare supramaximale Reizung des N. ischiadius mit Oberflächenelektroden wegen dessen tiefen Verlaufes nur selten gelingt.
- Weder FULLERTON noch GLATZEL erwähnen eine Narkose der Tiere für die Dauer der Messung. Nach unseren Erfahrungen tolerieren Ratten einen Einstich in die Plantarmuskulatur nicht ohne weiteres.
- Eine zuverlässige Entfernungsmessung zwischen Reiz- und Ableitелеktrode erscheint im vielfach geschwungenen Verlauf des überdies tiefliegenden N. ischiadicus nicht möglich.

Neurophysiologische Untersuchungen an den ventralen Nn. collectores des Rattenschwanzes führte erstmals MIYOSHI 1962 durch [140]. Er verwendete Nadelelektroden und anästhesierte die Ratten mit Amobarbital-Natrium. Unter Temperaturkontrolle maß MIYOSHI in monopolarer Anordnung die motorische und die sensible Nervenleitgeschwindigkeit (MCV und SCV).

Die von der Gruppe um Y. TAKEUCHI beschriebene Methode [221][219][23][220] [155] unterscheidet sich nur in wenigen Punkten von der Vorgehensweise MIYOSHIS:

- Verzicht auf eine Anästhesie.
- Die Ratte wird während des Meßvorganges in ein Handtuch gewickelt und somit fixiert.
- Ein beheiztes Paraffinbad sorgt für eine gleichbleibende Temperatur des Rattenschwanzes.
- Messung der distalen Latenz (DL), der motorischen Leitgeschwindigkeit (MCV) und der Leitgeschwindigkeit gemischter Nerven (MNCV).
- Bestimmung der Meßwerte anhand der mittels repetitiver Stimulation und Einsatz eines Averagers gewonnenen Kurven.

PETAJAN et al. [160] erweiterten diese Methode um die Messung der orthodromen Nervenleitgeschwindigkeit (SCV). Sie maßen erstmals auch Dauer und Amplitude des motorischen Aktionspotentials.

REBERT und SORENSEN [168][167] entwickelten einen Elektrodenhalter, der den Rattenschwanz fixierte und einen gleichbleibenden Elektrodenabstand garantierte. Sie inserierten die Nadelelektroden 1 mm in die Schwanzoberfläche und verzichteten ebenfalls auf eine Narkose. Bei Stimulation des Nerven in der Nähe der Spitze und Ableitung im Bereich der Wurzel des Rattenschwanzes erhielten sie ein Nervenaktionspotential, welches aus antidrom geleiteten motorischen und orthodromen sensiblen Impulsen zusammengesetzt war. Mit Hilfe eines Averagers summierten sie die Antwortpotentiale aus tausend Reizen und beurteilten Peak-Latenz und Amplitude des summierten Nervenaktionspotentials.

KULIG entwickelte die Methode von REBERT und SORENSEN weiter [120][119]. Vorsichtiges Reiben mit feinem Sandpapier reduzierte den Widerstand der Haut des Ratten-

schwanzes soweit, daß mit Oberflächenelektroden abgeleitet werden konnte. Auf ein Averaging der Nervenaktionspotentiale konnte KULIG nicht verzichten. Angesichts der zu erwartenden neurographischen Befunde erschien es sinnvoll, die Methode von KULIG so abzuwandeln, daß eine Ableitung von Muskelaktionspotentialen mit Oberflächenelektroden nach proximaler Einzelreizung möglich wurde. Die Belastung der Versuchstiere sollte durch Verzicht auf eine repetitive Stimulation gesenkt werden, da aus zweierlei Gründen auf eine Anästhesie verzichtet wurde. Zum einen ist eine metabolische Interaktion von Narkotika mit Hexacarbonen nicht ausgeschlossen, im Gegenteil ist eine Wirkungsverstärkung der Hexacarbone durch Barbiturate denkbar (s.Kap.3.3.). Zum anderen ist - wie bereits erwähnt - ein Einfluß der Narkotika auf die Nervenleitgeschwindigkeiten möglich.

#### 8.1.1. ELEKTRODENPOSITION

In der Neurophysiologie wird die motorische Nervenleitgeschwindigkeit üblicherweise bestimmt, indem der entsprechende Nerv an zwei verschiedenen Stellen stimuliert wird und das dadurch hervorgerufene elektrische Muskelantwortpotential eines von diesem Nerven innervierten Muskel abgeleitet wird [98]. Die Zeitspanne von Abgabe des Stimulus bis Erscheinen des Muskelpotentials wird Latenz genannt. Diese beinhaltet nicht nur den Zeitraum der Impulsleitung im peripheren Nerven, sondern auch die Transmission des Impulses an der neuromuskulären Synapse. Die Nervenleitgeschwindigkeit für den Nervenabschnitt zwischen den beiden Reizorten ergibt sich aus der Differenz der entsprechenden Latenzen geteilt durch die Distanz zwischen den Reizorten.

Die in dieser Arbeit angewendete Methode arbeitet mit einer feststehenden Stimulations- elektrode nahe der Schwanzwurzel und zwei Ableitelektroden über den distalen Abschnitten des Rattenschwanzes, d.h. die Aktionspotentiale werden von unterschiedlichen Muskeln der Schwanzmuskulatur abgeleitet. Die Versuchsanordnungen von LADEFOGET [122] und PETAJAN [159] zeigen gleichartige Elektrodenpositionen. Die unterschiedlichen Latenzen werden dabei nicht über vollständig identische Nervenabschnitte gemessen. Daher verzichtet diese Arbeit - im Unterschied zu den erwähnten Autoren - auf die Berechnung von Nervenleitgeschwindigkeiten.

Werden jedoch nur Latenzen zur Beurteilung eines neurotoxischen Effektes herangezogen, so ergeben sich eine Reihe von Problemen. Beispielsweise müßten die Auswirkungen des fraglichen Toxins auf die neuromuskuläre Synapse bekannt sein. Unter der Annahme der Gleichheit dieser Synapsen ist dies durch den Vergleich von Latenzen über verschiedenen

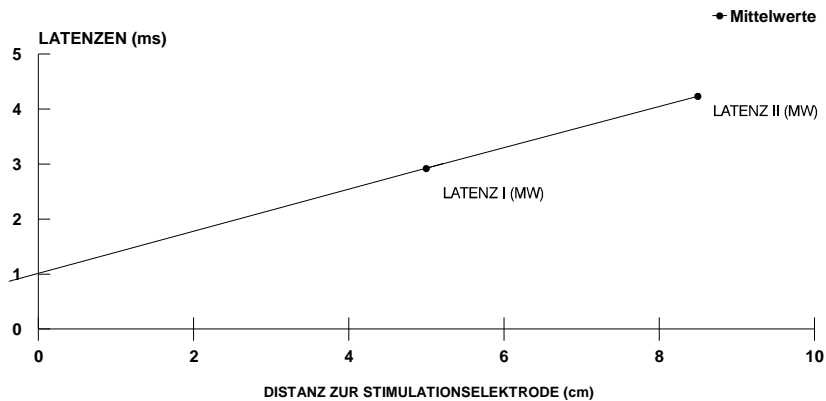
Nervenabschnitten hilfsweise zu umgehen. Es liegen keine Berichte zu Synapsenstörungen durch Hexacarbone vor.

In der klinischen Neurophysiologie stellt sich ein analoges Problem bei Messungen am N. femoralis. Dieser Nerv ist beim Menschen wegen seines tiefliegenden Verlaufes nur im Bereich des Leistenbandes durch Oberflächenelektroden zu stimulieren. Dadurch ist eine Messung der Nervenleitgeschwindigkeit dieses Nerven mit dem üblichen Verfahren nicht möglich. Umfangreiche Studien von GASSEL [72] zeigten, daß unter bestimmten Voraussetzungen aus Latenzen, die in unterschiedlicher Entfernung vom Leistenband aus dem M. quadriceps femoris abgeleitet wurden, sogar die Nervenleitgeschwindigkeit bestimmt werden konnte. Hierzu ist jedoch eine gleiche Leitgeschwindigkeit der proximalen und distalen Äste des Nerven anzunehmen. Dies kann für die Ratte nur eingeschränkt gelten, da teils erhebliche Unterschiede der MCV in distalen und proximalen Abschnitten des Rattenschwanzes berichtet werden (s.u.). Andererseits beträgt der Elektrodenabstand bei dieser Arbeit nur 3,5 cm. Dies entspricht etwa 20% der durchschnittlichen Länge eines Rattenschwanzes von 18-20 cm.

Auch die Verzögerung des Nervenaktionspotentials in den letzten Aufzweigungen des Nerven und die Synapsenzeit sollten bei dieser Methode für die proximalen und distalen Latenzen identisch sein.

Diese Annahme wird durch folgende Tatsache gestützt: Die in Abb.8 eingetragene Verlängerung der die Latenz - Mittelwerte verbindenden Geraden schneidet die Zeitachse bei einem Wert von ca. 1,0 ms . Der Wert erscheint realistisch als Maß für die Verzögerung des Nervenaktionspotentials im Bereich der terminalen Nervenfasern und der neuromuskulären Synapse [72][154][103].

## MITTELWERTE: LATENZ I UND LATENZ II HAUPTVERSUCH TAG 0



Graphisches Verfahren zur annähernden Bestimmung der terminalen Überleitungszeiten (Distanz = 0) bei simultaner Ableitung der MAP von unterschiedlichen Punkten eines Muskels nach proximaler Stimulation des entsprechenden Nerven. Nach GASSEL (247).

### ABB.: 49

Die motorischen Nervenleitgeschwindigkeiten der Nn. collectores ventralis der Ratte sind über den distalen Abschnitten langsamer als über den proximalen. MISUMI [137][138] gibt für die männliche "Donryu"- Ratte Geschwindigkeiten an zwischen  $53,6 \pm 6,5$  m/s (proximal) und  $39,9 \pm 4,7$  m/s (distal). Entsprechende Werte liegen für die hier verwendeten Tiere nicht vor und konnten - wie oben beschrieben - aus methodischen Gründen auch nicht bestimmt werden. Da eine Messung über möglichst distalen Abschnitten des Nerven wünschenswert erschien, wurde bei jeder Messung die gleiche Position der Elektroden eingehalten. Als Bezugspunkt diente dabei die Schwanzspitze. Sollte die Hexanexposition erwartungsgemäß [202] ein langsamerer Wachstum der Tiere hervorrufen, so würde dies eher zu einer distaleren und damit langsameren Ableitung bei den Kontrollen führen und ggf. den Hexaneffekt nicht scheinbar verstärken.

Wenn auch auf die Berechnung von Nervenleitgeschwindigkeiten verzichtet wurde, schien es unter den erwähnten Bedingungen gerechtfertigt, die Latenzdifferenzen zu berechnen. Dabei war auch von Bedeutung, daß zwar die (spinale) segmentale Innervation des Rattenschwanzes eine gewisse interindividuelle Variabilität aufweist, die Innervationsverhältnisse im Bereich der Schwanzsegmente aber symmetrisch und konstant beschrieben werden (s. Kap. 3.8.).

Die proximale Plazierung der Stimulationselektrode, möglichst nahe der Schwanzwurzel, sollte die Stimulationsartefakte verringern. Dies ist bei gleichartigen Untersuchungen anderer Autoren häufig als limitierendes Kriterium für das Positionieren von Elektroden

beschrieben worden [105][108]. Der Verzicht auf Nadelelektroden ließ größere Reizintensitäten erwarten. Tatsächlich zeigte sich in den Vorversuchen, daß nur bei proximaler Stimulation und Einsatz einer großflächigen Erdelektrode der Stimulationsartefakt in jedem Falle hinreichend zu unterdrücken war. Die Ableitung von F-Wellen, die Auskunft über die Leitungsverhältnisse im proximalen Nervenabschnitt geben, bedarf einer distaleren Lage der Stimulationselektrode. Diese Messungen wurden im Verlauf der Untersuchungen nur bei einem Teil der Tiere durchgeführt. Probleme bereitete dabei häufig eine Störung der Messung durch den Stimulationsartefakt.

Die klinischen und neuropathologischen Befunde der Hexacarbonneuropathie weisen auf eine primäre Beeinträchtigung der motorischen Nervenfasern bzw. der Axone mit großem Durchmesser (s.Kap.3.2. und Kap.3.7.). Die hier angewendete Methode mißt die motorischen Latenzen der schnellsten Fasern eines gemischten Nerven, d.h. die Axone mit dem größten Durchmesser [73][111][134].

Die Elektrodenanordnung erlaubte eine relativ distale Ableitung eines Muskelpotentials. Dieses entspricht einer sogenannten "distalen Latenz" und wird im Rahmen dieser Arbeit Latenz II genannt. Dementsprechend findet sich bei den hexanexponierten Tieren in beiden Versuchen zuerst eine Minderung der Latenz II.

#### 8.1.2. DISKREPANTE AUSGANGSWERTE

Die Ergebnisse des Hauptversuches zeigen für die Parameter Latenz I, Latenz II und Latenzdifferenz im Vergleich zum Vorversuch deutlich höhere Meßwerte. Dies kann exemplarisch bereits für die Ausgangswerte an Tag 0, d.h. vor Beginn der Exposition oder Liponsäurebehandlung gezeigt werden.

	VORVERSUCH	HAUPTVERSUCH	RELATIVE ÄNDERUNG
Latenz I	1,5 ms	2,63 ms	+74,7 %
Latenz II	2,58 ms	4,31 ms	+66,9 %
Latenzdifferenz	1,08 ms	1,68 ms	+56,1 %
Mittelwerte für alle Tiere (n=40) vor Behandlungsbeginn.			

Diese Unterschiede können mit verschiedenen Faktoren erklärt werden, die im folgenden erörtert werden. Im Vorversuch wurden die Messungen bei einer Temperatur von  $34 \pm$

1°C, im Hauptversuch bei einer Temperatur von  $29 \pm 1^\circ\text{C}$  vorgenommen. Dies schien geboten, da das Erwärmen einen erheblichen Zeitverlust darstellte und von den Ratten teilweise kaum toleriert wurde. Der Temperatureinfluß auf die MCV im Rattenschwanznerven wird von MIYOSHI mit 1,0 bis 1,6 m/s pro °C und von PETAJAN [159] mit 1,33 m/s pro °C angegeben. Angaben über die temperaturabhängige Veränderung distaler Latenzen am Rattenschwanz existieren nicht. Legt man in einer Modellrechnung den Elektrodenabstand von 3,6 cm zugrunde, so ergeben sich bei einer durchschnittlichen Latenzdifferenz von 1,08 ms (Vorversuch) bzw. 1,68 ms (Hauptversuch) Nervenleitgeschwindigkeiten von 32,4 bzw. 20,8 m/s. Den Angaben von PETAJAN zufolge entspricht der Temperaturminderung von 5 °C eine Reduktion der MCV um 6,65 m/s. Umgerechnet auf die Bedingungen des Vorversuches bedeutet dies eine Minderung der Latenzdifferenz um 0,28 ms (25,9 %). Die Temperaturänderung alleine reicht zur Erklärung der Unterschiede offensichtlich nicht aus. Während in der Literatur übereinstimmend eine Korrelation von Körpergewicht und MCV verneint wird, differieren die Angaben über altersabhängige Änderungen der MCV [166]. Für den N.ischiadicus der Ratte wird eine lineare Zunahme der MCV bis zum 350. Tag angegeben [24]. MIYOSHI bzw. MISUMI beobachteten eine lineare Steigerung der MCV am Rattenschwanz bis zum 180. bzw. 170. Tag. Die in diesem Versuch eingesetzten Tiere lagen mit 133 Tagen bzw. 105 Tagen zu Versuchsbeginn unter dieser Grenze. Diese Altersunterschiede könnten auch teilweise die unterschiedlichen Ausgangswerte erklären. Die Werte müßten - zumindest bei den Kontrollgruppen - im Verlauf der Untersuchung ansteigen. Dies ist im Verlaufe des Vorversuches nicht zu beobachten, während bei den jüngeren Tieren des Hauptversuches im Verlauf eine Tendenz zu kürzeren Latenzen auftritt. Diese Entwicklung wurde mit statistischen Methoden jedoch nicht bestätigt. Der Wechsel der elektromyographischen Apparatur bedingte eine Vielzahl von Änderungen. Zunächst war es mittels des "Neuropack II" (Hauptversuch) möglich, die Messungen weiter distal am Rattenschwanz vorzunehmen, da die höhere Empfindlichkeit des Gerätes eine Abbildung kleinerer Muskelaktionspotentiale erlaubte, wie sie über den distalen Schwanzabschnitten aufgrund der dort kleineren Muskelmasse auftreten. Die distale Elektrode (Latenz II) lag bei den Messungen des Hauptversuches ca. 4 cm näher an der Schwanzspitze (s.Kap 6.8.). Dies korrespondiert mit den im Hauptversuch geringeren Werten von Amplitude II. Bei Verwendung des "Neuropack II" stellten sich die Muskelaktionspotentiale mit einer deutlich größeren Steilheit der ersten negativen Auslenkung dar. Die notwendige Verstärkung lag mindestens um den Faktor 2,5 unter den im Vorversuch notwendigen Werten. Verschiedene Studien zeigen, daß ein Wechsel der

technischen Bedingungen (z.B.: Impedanz, veränderte Zeitbasis) zu deutlichen Abweichungen der Meßergebnisse führen [111][103][71][92][44]. Dies gilt in besonderem Maße für die (scheinbare) Verkürzung der Latenzen bei höherer Verstärkung und kann auch Ursache sein der zwischen Vorversuch und Hauptversuch aufgetretenen Diskrepanzen.

### 8.1.3. VERGLEICH MIT DEN ERGEBNISSEN ANDERER AUTOREN

Die motorischen Nervenleitgeschwindigkeiten (MCV) der Nn.collectores ventralis der Ratte werden in der Literatur unterschiedlich angegeben. Dabei sind eine Fülle von Variablen (z.B.: Tierstamm, Temperatur, Elektroden) zu unterscheiden. Die wesentlichen Daten finden sich in der folgenden Zusammenstellung.

Abb.50

<b>AUTOR [Quelle]</b>	<b>MCV (m/s)</b>	<b>TEMP. (°C)</b>	<b>AN- ZAHL</b>	<b>TIER- STAMM</b>	<b>BEMERKUNGEN</b>
PETAJAN + [160]	18±1	29	15	Sprague- Dawley	Nadelelektroden
PETAJAN # [159]	31±1,8	30	25	Sprague- Dawley	Nadelelektroden
ONO und TAKEUCHI [155]	49,6±7,6	37,5	8	Wistar	Summationstechnik Nadelelektroden
HUANG und TAKEUCHI [101]	23	37,5	8	Wistar	Summationstechnik Nadelelektroden
MISUMI [138]	+ 39,9±4,7 # 53,6±6,5	28 28	10 10	Donryu Donryu	Barbituratnarkose Nadelelektroden
MIYOSHI [140]	51,7±1,2	36,5	??	??	Barbituratnarkose Nadelelektroden
LADEFOGET [122]	30,3±2,5	37	11	Wistar	Nadelelektroden
KULIG [119]	28*	30	8	??	Oberflächen- elektroden

+ distal

# proximal

?? fehlende Angaben

\* Die MCV ist für diese Tabelle berechnet: KULIG nennt "Nervenleitungszeiten" von 1,28 ms bei einer Distanz von 3,6 cm.

Eine vergleichende Wertung dieser unterschiedlichen Ergebnisse ist nur eingeschränkt möglich, da von den Autoren nicht alle Parameter mitgeteilt wurden, die Einfluß auf die



Meßwerte haben. Auch sind nicht alle Parameter systematisch untersucht worden, es existieren beispielsweise keine vergleichenden Messungen an verschiedenen Tierstämmen. Allerdings weist ein Vergleich der Ergebnisse von LADEFOGET und ONO/TAKEUCHI auf weitere, speziesunabhängige Unterschiede. Faktoren wie die Elektrodenposition, die Temperatur, die Eigenschaften des Verstärkers oder das Alter der Tiere wurden bereits angeführt. Viele dieser Parameter werden in der Literatur nicht mitgeteilt und können für eine vergleichende Wertung der Ergebnisse nicht herangezogen werden. Vergleichende Messungen der Nervenleitgeschwindigkeiten beim Menschen mit Oberflächen- und Nadel-elektroden zeigten keine nennenswerten Unterschiede hinsichtlich der gemessenen Latenzen [26]. Die von MISUMI mitgeteilte - jedoch nicht quantifizierte - Verzögerung der Nervenleitung durch Barbiturate läßt sich anhand der obigen Aufstellung ebenfalls nicht nachvollziehen, da gerade einige der höchsten Werte bei anästhesierten Ratten gemessen wurden.

Die in dieser Arbeit aus methodischen Erwägungen nur modellhaft errechneten Nervenleitgeschwindigkeiten (s.Kap.8.1.) von 32,4 m/s (Vorversuch) bzw. 20,8 m/s (Hauptversuch) liegen im Bereich der Meßwerte anderer Autoren, wenn die Ableitbedingungen berücksichtigt werden. Dazu zählen insbesondere die Messung über den distalen Abschnitten und die Temperatur.

## **8.2. NEUROPHYSIOLOGISCHE CHARAKTERISTIKA DER HEXACARBONNEUROPATHIE**

Die klinischen und pathomorphologischen Befunde der experimentellen Hexacarbonneuropathie weisen auf eine distal betonte axonale Neuropathie, die vorwiegend die längsten myelinisierten Axone mit dem größten Durchmesser betrifft (s. Kap.3.6.). Die Geschwindigkeit der Nervenleitung ist dem Durchmesser der myelinisierten Faser proportional [73]. Zu den frühen neurophysiologischen Zeichen einer axonalen Schädigung zählen neben elektromyographischen Befunden auch reduzierte Amplituden der Nerven- oder Muskelaktionspotentiale [129]. Leitungsverzögerungen sind erst später im Verlauf der Erkrankung zu erwarten [154][190]. Bei der Hexacarbonneuropathie tritt jedoch frühzeitig eine paranodale Myelinretraktion auf und ist Ursache der von verschiedenen Autoren berichteten Leitungsverzögerungen bereits zu Beginn der Erkrankung [197][53][117][35][3][226]. Die Ableitung motorischer Latenzen mit der hier vorgestellten Methode mißt die schnellsten motorischen Axone, da die Zeitspanne zwischen dem Reizartefakt und dem Beginn des Muskelaktionspotentials (Beginn der ersten negativen Auslenkung) [137][154][48] be-

stimmt wird. Tatsächlich sind die ersten Latenzverzögerungen bei den hexanexponierten Tieren festzustellen und betreffen die (distal abgeleitete) Latenz II. Dies führt im Vorversuch ab Tag 30, im Hauptversuch bereits ab Tag 20 zu einem signifikanten Unterschied ( $p < 0,01$ ). Vergleichbare Befunde sind für die Latenz I (proximaler abgeleitet) erst etwa 10 Tage später festzustellen. Das frühere Auftreten der Latenzverzögerungen im Hauptversuch kann bedingt sein durch die distalere Ableitung der Potentiale, auch lassen die größeren Tierkollektive eine statistische Unterscheidung bereits bei etwas kleineren Differenzen erwarten.

Die Auswertung der Amplituden der distalen Muskelantwortpotentiale erbrachte für beide Versuche erst zu einem späten Zeitpunkt Hinweise auf eine entsprechende Schädigung bei den hexanexponierten Tieren. Eine zuverlässige Ableitung der Amplituden ist in besonderer Weise von niedrigen Elektrodenwiderständen abhängig [99]. Bei der Präparation des Rattenschwanzes gelang es, den Widerstand in jedem Fall unter  $10 \text{ k}\Omega$  zu senken, Werte unter  $5 \text{ k}\Omega$  wurden nicht regelmäßig erreicht. Die deutlichen Schwankungen der Amplituden auch bei den nicht exponierten Tieren sind Zeichen der von Messung zu Messung wechselnden Widerstände und machen eine Auswertung dieses Parameters als frühen Indikator der Neuropathie unmöglich.

Ein Vergleich der Ergebnisse dieser Arbeit mit den Befunden anderer Autoren wird erschwert durch die unterschiedlichen Expositionsbedingungen. Die Hexacarbonneuropathie entwickelt sich bei der Ratte insbesondere unter kontinuierlicher Hexanexposition [164]. Eine klinisch evidente Neuropathie ist bei einer kontinuierlichen Exposition mit 400 - 600 ppm n-Hexan nach 5 bis 7 Wochen zu erwarten [53][9]. Bei intermittierender Hexanexposition mit 500 ppm werden über 30 Wochen keine Veränderungen beobachtet, 5000 ppm n-Hexan intermittierend über 14 Wochen vermag die typischen "giant axonal swellings" hervorzurufen [202].

TAKEUCHI und ONO exponierten die Tiere täglich über 12 Stunden. Unter einer Exposition von 3000 ppm n-Hexan traten die ersten Verzögerungen der NLG und der distalen Latenz nach 4 Wochen auf, unter 500 ppm nach 12 Wochen [219][155][220]. Die klinischen Befunde sind nur für die hochdosierte Exposition mitgeteilt. Von insgesamt sieben Ratten waren nach 10 Wochen bei einem Tier und nach 12 Wochen bei 5 Tieren Lähmungen festzustellen.

Die Expositionsbedingungen bei KULIG [119] lauten: 900 ppm n-Hexan an fünf Tagen pro Woche über 24 h/Tag. Erste Veränderungen der Latenzen waren ab der 3. Woche, klinische Zeichen von Lähmungen ab der 6. Woche zu beobachten.

LADEFOGET [122] nutzte die wasserlöslichen Eigenschaften des toxischen Metaboliten der Hexacarbene, indem er dem Trinkwasser von Ratten 0,5 % 2,5-Hexandion zusetzte. Die NLG der exponierten Tiere war nach 3 Wochen signifikant verzögert, zu klinischen Befunden werden in dieser Arbeit keine Angaben gemacht.

Unter Berücksichtigung der Expositionsbedingungen korrespondieren die Ergebnisse dieser Arbeit hinsichtlich der neurophysiologischen Anzeichen der Neuropathie gut mit den Daten anderer Autoren.

Auch diese Arbeit zeigt neurophysiologische Veränderungen vor klinisch faßbaren Befunden. In beiden Versuchen waren erste (minimale) Veränderungen im Falltest und Spreiztest bei jeweils zwei Tieren der Gruppe H bereits nach zwei Wochen aufgefallen, nach 6 Wochen waren bei über 80 % der exponierten Tiere klinische Zeichen schwererer peripherer Störungen zu verzeichnen [95].

Neurographische Befunde im Verlauf der Regeneration einer experimentellen Hexacarbonneuropathie wurden bisher nicht veröffentlicht. Es existieren kasuistische Mitteilungen über neurophysiologische Verlaufsuntersuchungen der humanen Hexacarbonneuropathie. Nach Ende der Exposition kommt es dabei zunächst zu einer weiteren Verschlechterung der Befunde. Eine langsame Rückbildung der Leitungsverzögerungen setzt nach einigen Wochen ein und erstreckt sich über mehrere Monate. Bei Nachuntersuchungen nach ein bis zwei Jahren wurden noch residuale Leitungsverzögerungen, Amplitudenminderungen und elektromyographische Auffälligkeiten gefunden [53][4][117]. Dies entspricht den Ergebnissen des Vorversuches, die Neuropathie war (klinisch und neurophysiologisch) nach Expositionsende noch progredient. Der vollständige Zusammenbruch der Nervenleitung (distal) trat bei drei hexanexponierten Tieren erst 10 bzw. 20 Tage nach Expositionsende auf. Bei zwei dieser Tiere war nach 80 Tagen die distale Muskelantwort wieder ableitbar.

### 8.3. VERBESSERUNGSMÖGLICHKEITEN DER METHODE

Bei neurophysiologischen Untersuchungen am Menschen nimmt man einen Fehler bei der Bestimmung von Latenzen in der Größenordnung von 0,2 ms an. Üblicherweise wird zusätzlich für die Entfernungsmessung eine Abweichung von 0,5 cm angenommen. Auch der Einfluß der Temperatur zählt zu den erheblichen Fehlerquellen bei der Bestimmung der Nervenleitgeschwindigkeit [111]. Die beiden letztgenannten Störgrößen können hier vernachlässigt werden, da bei konstanter Temperatur gemessen wurde und der Elektrodenhalter gleichbleibende Elektrodenabstände gewährleistete. Der relative Meßfehler berechnet sich demnach auf [98]:

**A** = Fehler bei der Bestimmung der Latenzdifferenz

**B** = Fehler bei der Bestimmung der Reizstrecke

**A** = Latenz II - Latenz I + 0,2ms<sup>2</sup> + 0,2ms<sup>2</sup>

**B** = 0

**Relativer Fehler** =  $(A^2+B^2)$

Setzt man für Latenz I und II erneut die Mittelwerte über alle Tiere des Hauptversuches an Tag 0 ein, so ergibt sich ein relativer Fehler von 15,2 %. Der Einfluß dieses Wertes wäre zu senken durch größere Elektrodenabstände und damit längere Latenzzeiten. Trotz einer mittleren Länge des Rattenschwanzes von 18 bis 20 cm steht nur ein Teil dieser Distanz für Messungen zur Verfügung. Die distal kleinere Muskelmasse begrenzt die Ableitung des MAP in Abhängigkeit von den Eigenschaften des Verstärkers und den Elektrodenwiderständen. Dies zeigte sich anlässlich des Gerätewechsels zwischen Vor- und Hauptversuch. Die Präparation des Rattenschwanzes vor der Messung wurde durchgeführt, während die Ratte bereits in der Vorrichtung saß, die sie während der Messungen fixierte. Dadurch waren proximale Anteile des Schwanzes für eine Präparation nicht zugänglich. Eine bessere Erdung hätte erlaubt, den notwendigen Mindestabstand zwischen Reiz- und Ableit-elektrode zu verringern und eine konventionelle Bestimmung der NLG ermöglicht. Versuche mit Erdelektroden direkt am Rattenschwanz hatten jedoch keine zufriedenstellenden Ergebnisse erbracht. Die zur Verfügung stehende Elektrodenfläche ist in diesem Bereich sehr begrenzt, könnte aber durch Ringelektroden vergrößert werden. Geringere Elektrodenwiderstände (z.B. durch Elektrodenpaste) könnten die Amplitudenmessungen stabilisieren. Dadurch wäre es möglich, durch Auswertung der Fläche unter der Kurve des MAP

(ein Maß für die Zahl der erregten Fasern) Hinweise für das Ausmaß der axonalen Läsion [99][108][77] zu erhalten.

Angesichts der intraindividuellen Variabilität der Nervenleitung wäre die Empfindlichkeit der Methode zu erhöhen, indem nicht nur zu bestimmten Zeitpunkten Gruppenvergleiche über einzelne Parameter angestellt werden, sondern in Verlaufsanalysen die intraindividuelle Veränderungen berücksichtigt würden [235]. Dabei könnten auch die durch die geringen Tierzahlen pro Kollektiv entstehenden Probleme verringert werden. Dies würde allerdings voraussetzen, daß die Messungen bereits vor Beginn der Exposition bzw. Behandlung über mehrere Wochen durchgeführt würden [63].

Die Beschränkungen des Wilcoxon-Testes erlaubt keine vollständige Auswertung der Daten des Vorversuches. Insbesondere waren Vergleiche mit den Gruppen KL und KL<sub>42</sub> nicht möglich. Die klinischen und histopathologischen Befunde bei diesen Tieren entsprachen den Ergebnissen der Gruppe K [95]. Auch beim Vergleich der hexanexponierten Tiere war auf die Aussagekraft des Testes Rücksicht zu nehmen. Die Kollektive verkleinerten sich nach Tag 30 (Hauptversuch) auf 6 bzw. 9 Tiere. Daher ergeben die statistischen Berechnungen ab Tag 40 ein  $p < 0,05$ , obgleich die Einzelergebnisse eine unveränderte Verzögerung der Latenzen erkennen lassen.

Die Gruppengrößen waren limitiert durch die Kapazität der Expositionseinheit. Die Entnahme von einzelnen Tieren für neuropathologische Untersuchungen reduzierte die Kollektive im Verlauf der Untersuchung. Allerdings zeigten diese Stichproben bei den hexanexponierten Tieren - auch unter Liponsäurebehandlung - eine axonale Neuropathie. Diese war gekennzeichnet durch Axonaufreibungen mit Neurofilamentakkumulationen und Myelinretraktionen an den Ranvier'schen Schnürringen [95]. Eine enger gefaßte Fragestellung erlaubte es, im Hauptversuch größere Kollektive einzusetzen.

## **8.4. MÖGLICHE WIRKUNGEN DER $\alpha$ -LIPONSÄURE BEI DER EXPERIMENTELLEN HEXACARBONNEUROPATHIE**

### **8.4.1. HYPOTHESE I: BINDUNG VON TOXINEN DURCH $\alpha$ -LIPONSÄURE**

In Tierexperimenten konnten Vergiftungen mit Quecksilber, Arsen oder Cadmium durch Liponsäure dosisabhängig verhindert oder abgeschwächt werden. Dabei spielte neben dem zusätzlichen Schutz der Zellen durch Bereitstellung von Redoxäquivalenten (s. Kap.3.5.) auch die Detoxifikation durch Chelatbildung eine Rolle. Auch die kasuistisch beschriebene

Wirkung der Liponsäure bei Eisenspeicherkrankheiten und M. Wilson wurden einer Chelatbildung zugeschrieben [146][41][59][65][17].

Umfangreichere Studien beschäftigten sich mit der Wirksamkeit der Liponsäure beim Diabetes mellitus [239]. Im Rahmen der diabetischen Stoffwechsellaage ist die Aktivität der  $\alpha$ -Ketoglutaratdehydrogenase und der Pyruvatdehydrogenase reduziert [218]. Dies soll nicht nur Folge einer mangelnden insulinvermittelten Aktivierung dieser Enzyme sein, sondern auch mit einer direkten Inaktivierung durch Ketonkörper im Zusammenhang stehen. Infolge gesteigerter Lipolyse kommt es beim Diabetes zu einem relativen CoA-Defizit, dadurch steigt die Ketonkörperproduktion. NATRAJ und Mitarbeiter stellten in der Leber diabetischer Ratten verminderte Liponsäurespiegel fest. Die Gabe von  $\alpha$ -Liponsäure bzw. Dihydroliponsäure führte bei den Tieren zu einer Minderung der Hyperglykämien und der Ketonämie [149]. Bei gewissen Schritten der Fettsäuresynthese kann Dihydroliponsäure das CoA ersetzen. Nach den Befunden von WAGH [233] werden CoA aktivierte Fettsäuren hauptsächlich der  $\beta$ -Oxidation zugeführt, während Dihydroliponsäure-aktivierte Fettsäuren zur Synthese von Neutralfetten und Phospholipiden herangezogen werden. Dadurch soll es beim experimentell induzierten Diabetes mellitus der Ratte zu einer Reduktion der Ketogenese kommen [40][107][170][216].

Die Konfiguration der Dihydroliponsäure läßt bei einer Reaktion mit 2,5-HD die Bildung stabiler zyklischer Thioketale erwarten [65]. Dies könnte einen protektiven Effekt der Liponsäure bei der Hexacarbonneuropathie begründen. Diese These wäre zu untermauern in Kenntnis der spezifischen Pharmakokinetik (Verteilungsvolumen, Halbwertszeit, intraneurale Konzentration etc.) der Liponsäure. Die entsprechenden Daten sind jedoch nicht bekannt.

#### 8.4.2. HYPOTHESE II: SCHUTZ GLYKOLYTISCHER ENZYME DURCH $\alpha$ -LIPONSÄURE

Die Wirkung von 2,5-Hexandion und Methyl-n-Butyl-Keton auf bestimmte Enzyme der Glykolyse (Phosphofruktokinase (PFK) und Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrokinase (GAPDH)) wurde durch die Gruppe um SABRI und SPENCER untersucht. Sie berichteten von einer Hemmung dieser beiden Enzyme durch Bindung der Toxine an aktive Sulfhydrylgruppen der Enzyme [175]. Wurde vor der Inkubation der Enzyme mit den untersuchten Toxinen Dithiothreitol (DTT, ein Sulfhydryl-Gruppen-Donator) zugegeben, trat keine Hemmung der Enzymaktivität auf [177]. Wurde DTT erst hinzu gegeben wenn die Enzymaktivität bereits durch Hexacarbon blockiert war, dann war diese nicht mehr reversibel. Hexacarbonanaloge ohne neurotoxische Wirksamkeit (z.B.: 2,4-HD) hatten keinen hem-

menden Effekt auf diese Enzyme [201]. Ebenso wurden Enzyme ohne aktive Sulhydrylgruppen wie z.B. LDH, Transketolase und Neuronen spezifische Enolase von 2,5-HD bzw. MnBK nicht gehemmt. Bezeichnenderweise tragen nur die GAPDH und die PFK Sulhydrylgruppen als mögliche Bindungsstellen für Hexacarbene. Diese Befunde wurden an N.ischiadicus Präparaten und Gehirnhomogenisaten der Ratte bestätigt [176]. Gleichzeitig konnte gezeigt werden, daß im Gefolge der Hemmung der Glykolyse die ATP Spiegel in den untersuchten Geweben abfielen. Dies war durch die Zugabe von Pyruvat reversibel [100].

SPENCER entwickelte die Hypothese, daß eine toxininduzierte Hemmung der glykolytischen Enzyme in Nervenzellen besonders frühe und deutliche Auswirkungen haben müsse, da die Nervenzelle, insbesondere das axonale Transportsystem, in ihrer Energiegewinnung fast ausschließlich von der Glykolyse abhängt. Syntheseleistungen können nur im Zelleib erfolgen [189][174].

Die zur ATP-Gewinnung nötigen Enzyme werden im Perikaryon synthetisiert und mittels des axonalen Transportes (Scb) im Axon befördert [32][25]. Eine Minderung funktionsfähiger glykolytischer Enzyme führt zunächst zu einem Zusammenbruch der Energieversorgung im distalen Axonabschnitt mit nachfolgender Unterbrechung des axonalen Transportsystems. Dies führt zu einer Degeneration der Nervenfasern [97]. Die besondere Vulnerabilität der motorischen Axone wurde mit deren besonders großen Axonvolumina erklärt, welche besonders hohe Anforderungen an die perikariale Synthese und den Energiehaushalt stellen [37]. Der Transport des Neurofilamentstromes durch Axonabschnitte geminderter lichter Weite bedürfe - nach dieser Theorie - der Beschleunigung der transportierten Materialien. D.h. diese Passage stelle einen Ort erhöhten Energiebedarfes dar und sei somit ein Prädilektionsort für die durch ein lokales Energiedefizit induzierte Störung des axonalen Transportes mit nachfolgender Akkumulation der Neurofilamente vor den Schnürringen. Des Weiteren sei die Minderung der lichten Weite dicker Axone im Bereich der Ranvierschen Schnürringe relativ größer als bei dünneren Nervenfasern. Der zusätzliche Energiebedarf zur Beschleunigung des axonalen Transportes im Bereich der Schnürringe sei demnach bei dicken Nervenfasern (z.B.: motorische Nervenfasern) besonders groß [205].

MONACO und Mitarbeiter [143][142][141] konnten in tierexperimentellen Studien nachweisen, daß bereits im Stadium der incipienten Hexacarbonneuropathie die axonale Transportrate der Neurofilamente in den Abschnitten proximal der axonal swellings ansteigt. Im Verlauf der Neuropathie kommt es nach den Ergebnissen von GRIFFIN und GRAHAM

zunächst zu einer Reduktion des axonalen Neurofilamenttransportes distal der Axonaufreibungen [90][144]. Schließlich ist der axonale Transport vollständig blockiert [34][89]. Analoge Ergebnisse berichteten MENDELL und Mitarb. auch für die durch MnBK ausgelöste Hexacarbonneuropathie [135]. Bei transgenen Mäusen, die kein Neurofilament produzieren, kommt es nach Applikation von Acrylamid oder 2,5-Hexandion in den Augapfel zu Störungen des axonalen Transportes im N. opticus. Dies wurde als Hinweis interpretiert, dass die Pathogenese der entsprechenden toxischen Neuropathien möglicherweise nicht primär über eine Störung der Zytoskelettstrukturen vermittelt wird, sondern über Stoffwechselprozesse, z.B. Störungen im Energiestoffwechsel der Zelle [215].

Diese Befunde konnten SIDENIUS und BRAENDGARD zumindest für die inzipiente experimentelle Hexacarbonneuropathie nicht bestätigen. Sie fanden keine Veränderung des schnellen anterograden Transportes unter 2,5-HD Einwirkung. Dies betraf sowohl die Transportmenge als auch -geschwindigkeit [106]. Bei Untersuchungen des retrograden Transportes zeigte sich jedoch eine deutliche Minderung der Transportleistung zu einem Zeitpunkt (kumulative Dosis: 4 g 2,5-HD/kgKG) als noch keine klinischen Zeichen der Neuropathie erkennbar waren (klinisch manifeste Neuropathie bei einer kumulativen Dosis von 6g/kgKG) [33][191]. Diese Beobachtungen werden auch durch morphometrische Studien gestützt [131].

DECAPRIO [50][51] wies darauf hin, daß nur für den schnellen axonalen Transport eine Abhängigkeit von ATP - und damit von der Glykolyse - belegt sei. Auch könnten die bei den in vitro Versuchen angewandten 2,5-HD-Konzentrationen durch eine systemische n-Hexan-Exposition nicht erreicht werden.

Eine große Zahl verschiedenster Enzyme sind in ihrer Aktivität von freien Sulfhydrylgruppen abhängig. Die Inhibition glykolytischer Enzyme durch Jodazetat ist ein bekanntes Beispiel dieser Beziehung zwischen Enzymaktivität und freien Sulfhydrylgruppen [150]. Thiolgruppen (Sulfhydrylgruppen) sind sehr reaktive Verbindungen, die an verschiedenen Reaktionen teilnehmen können: Alkylierung, Arylierung, Oxidation etc. Diese Reaktionen können bei einer Protein- bzw. Toxinbindung eine Rolle spielen. Auch die toxische Wirkung vieler Schwermetallionen soll unter anderem auf einer Interaktion der Ionen mit Sulfhydrylgruppen und einer dadurch hervorgerufenen Inaktivierung thiolabhängiger Enzyme beruhen [146]. Die therapeutische Wirkung von  $\alpha$ -Liponsäure, Glutathion und anderen Disulfidgruppen-Donatoren bei unterschiedlichsten Intoxikationen soll nicht nur auf ihrer Fähigkeit zur Chelatbildung beruhen (s.o.). Diese Substanzen können auch thiolabhän-



gige Enzyme reaktivieren oder einer Inaktivierung vorbeugen. Sie wirken als Redoxsystem oder indirekt als Donator von Redoxäquivalenten für andere Redoxsysteme [23][241][80][185]. Die von SPENCER beschriebene spezifische Hemmung Sulfhydrylgruppen tragender Enzyme der Glykolyse durch 2,5-HD konnte mittels einer Inkubation der Enzyme mit DTT vor der Toxineinwirkung verhindert werden. Eine nachträgliche DTT-Gabe stellte die Enzymaktivität nicht wieder her. SABRI und SPENCER folgerten, dies erkläre sich durch eine direkte und rasche Bindung des 2,5-HD an die freien SH-Gruppen des DTT bzw. durch einen Schutz der Enzyme mittels der durch DTT bereitgestellten Redoxäquivalente.  $\alpha$ -Liponsäure ist ein SH-Gruppen-Donator und mit DTT vergleichbar [18][146][115][17]. Eine regelmäßige Liponsäuregabe könnte durch direkte Bindung des 2,5-HD oder durch Schutz der Enzyme der Glykolyse mittels Bereitstellung von Redoxäquivalenten die Entstehung der Hexacarbon neuropathie verhindern oder verzögern [19].

#### 8.4.3. **HYPOTHESE III: $\alpha$ -LIPONSÄURE VERHINDERT DIE ALTERATION DER NEUROFILAMENTE**

Akkumulationen von Neurofilamenten in den Axonen oder Perykaria peripherer und zentraler Nervenzellen treten bei verschiedensten Erkrankungen auf [152][136][88][126]. Neben den bereits erwähnten Intoxikationen zählen hierzu der Lathyrismus (toxisches Agens:  $\beta$ -n-oxalylamino-L-alanin), die amyotrophe Lateralsklerose, die hereditäre Motoneuron-erkrankung des Hundes, sowie die "giant-axonal"-Neuropathie des Kindes- und Jugendalters, eine bisher unvollständig erklärte progressive Erkrankung, die mit Haaranomalien einhergeht (Synonym: kinky-hair-disease) [114][16][187][82][163][81] [116][30]. In vitro konnte an Fibroblasten von Patienten mit dieser Erkrankung die Akkumulation von Intermediärfilamenten (Vimentin) durch DTT und durch Penicillamin gehemmt werden. Beiden Substanzen gemeinsam ist ihre Eigenschaft als Sulfhydrylgruppen-Donator. Ein entsprechender Therapieversuch bei einer Patientin wurde von TANDAN berichtet. Über einen Beobachtungszeitraum von 9 Monaten zeigte sich eine Besserung der klinischen Symptomatik [223].

Untersuchungen zur Alteration von Neurofilamenten durch Hexacarbone wurden nicht nur an Nervenzellen vorgenommen. Die Neurofilamente (NF) zählen zu der Gruppe der Intermediärfilamente, deren Vertreter sich durch eine nahezu identische Proteinstruktur auszeichnen [152]. Die Intermediärfilamente in Epithelzellen werden Vimentin genannt, in Astrozyten „glial fibrillary acidic protein“ (GFAP-IF) [269].

LAPADULA und Mitarbeiter [125][61] untersuchten die Intermediärfilamente spinaler Zellen, spinaler Ganglien und Fibroblasten unter Einwirkung von 2,5-HD sowohl bei Ratten als auch in Zellkulturen. Sie berichteten von einer Reduktion aller 3 Neurofilamentproteine (70 kDa, 160 kDa, 210 kDa). Dagegen traten andere, bei Kontrolltieren nicht nachweisbare Proteine mit 138 kDa und 260 kDa auf. Das 138 kDa Protein reagierte mit einem monoklonalen Antikörper gegen das 160 kDa Neurofilament. Dies wurde als möglicher Hinweis auf eine Bildung des 138 kDa Proteins durch intramolekulares cross-linking gewertet [124]. POLLY SAGER [179] beschrieb die Wirkung von 2,5-HD und Acrylamid auf Epithelzellkulturen. 2,5-HD induzierte - ebenso wie Acrylamid - eine dosisabhängige Aggregation des Vimentins, welches perinukleär präzipitierte. Bei sehr hohen 2,5-HD Dosen ( $> 17$  mMol) waren diese Effekte irreversibel. Eine Analyse der Zytoskelettbestandteile führte zur Entdeckung hochmolekularer Proteine, die sich mit vimentinspezifischen Antikörpern binden ließen. Diese Proteine fanden sich nur in gegenüber 2,5-HD exponierten Epithelzellen. Es wurde angenommen, daß diese Proteine durch kovalente Vernetzung von Vimentinfilamenten unter 2,5-HD Wirkung entstehen. Eine Beeinflussung anderer zellulärer Strukturen wie Zytokeratin, Mikrotubuli oder Mikrofilamente wurde im Rahmen dieser Untersuchungen nicht beobachtet. DURHAM [60] untersuchte die Wirkung von 2,5-HD auf Zytoskelettstrukturen in Myelongewebe- und Spinalganglienzellkulturen von Mäuseföten. Ausmaß und Zeitpunkt bis zum Auftreten von mit Neurofilamenten gefüllten Auftreibungen hing von der 2,5-HD Konzentration in dem Zellkulturmedium ab. Die Mindestkonzentration zur Auslösung von axonal swellings betrug 1 mMol. Bei dieser Konzentration kam es nach vier Wochen zur Ausbildung der typischen Axonaufreibungen, jedoch - auch bei lange fortgesetzter Exposition - zu keiner Degeneration von distal der Axonaufreibungen gelegenen Nervenfaserteilen. Dies war jedoch bereits nach dreiwöchiger Inkubation der Zellkulturen mit 2 mMol 2,5-HD der Fall. Die GFAP-IF Verteilungsstörungen traten nur bei 2,5-HD Konzentrationen größer als 1,4 mMol auf. Eine Woche nach Entwicklung der Axonaufreibungen zeigten sich in den Astrozyten zunehmend runde Anhäufungen von GFAP-IF. Auch dieser Effekt schien dosisabhängig.

Von MALOMI und Mitarbeitern wurde die Wirkung von 2,5-HD auf Epithelial- und Melanomzellen untersucht [133]. Auch in diesen Zellen stellten sich zeit- und dosisabhängig Aggregationen von Intermediärfilamenten ein. Darüber hinaus beschreiben diese Autoren ein Verkürzen und Kräuseln des Actins und eine Veränderung der Zellform. Im Rahmen von Untersuchungen zu der von SPENCER [205] berichteten reversiblen Blockade glykolytischer Enzyme durch 2,5-HD fand GRAHAM [84][85] eine irreversible Bindung von

2,5-HD an Proteinen. Diese Arbeitsgruppe ging zunächst von einer Bildung stabiler Schiff'scher Basen als Reaktionsprodukt zwischen 2,5-HD und den Aminogruppen der Neurofilamentproteine aus. Anhand späterer Untersuchungen der Arbeitsgruppe um GRAHAM und insbesondere auch von DECAPRIO und Mitarb. [52][51][50] konnte jedoch nachgewiesen werden, daß sich 2,5-HD mit primären Aminen zu 2,5-Dimethylpyrrolen verbindet und in sekundären oxidativen Reaktionen chromophore Polymere entstehen. Bemerkenswerterweise ist eine solche Pyrrolbildung nur mit  $\gamma$ -Diketonen möglich [208][E]. Andere Diketone (z.B.:  $\alpha$ -Diketon,  $\beta$ -Diketon) reagieren zwar mit Aminogruppen, bilden aber keine Pyrrole. Diese Eigenschaft der  $\gamma$ -Diketone beruht auf deren spezifischen sterischen Konfiguration, welche die Bildung einer zyklischen pentameren Struktur ermöglicht. Daraufhin wurde hypothetisch die Vernetzung und Denaturierung von Zytoskelettproteinen zurückgeführt auf die Bildung kovalenter Bindungen (sowohl intramolekular als auch intermolekular) im Rahmen der Autooxidation der Pyrrole. Sekundär käme es nach dieser Hypothese zu Neurofilamentakkumulationen durch intermolekulares "Cross-linking", Veränderungen der molekularen Tertiärstruktur und geändertes Löslichkeitsverhalten der Neurofilamente. Letztendlich würden diese Veränderungen die Degeneration der Nervenfasern bedingen. Die unterschiedliche Lokalisation der axonalen Swellings bei verschiedenen toxischen Axonopathien (IDPN, Acrylamid, Aluminium, Vinca-Alkaloide) wurde im Rahmen dieser Theorien mit einer unterschiedlichen Potenz der jeweiligen Toxine erklärt, derartige "cross-linkings" hervorzurufen.

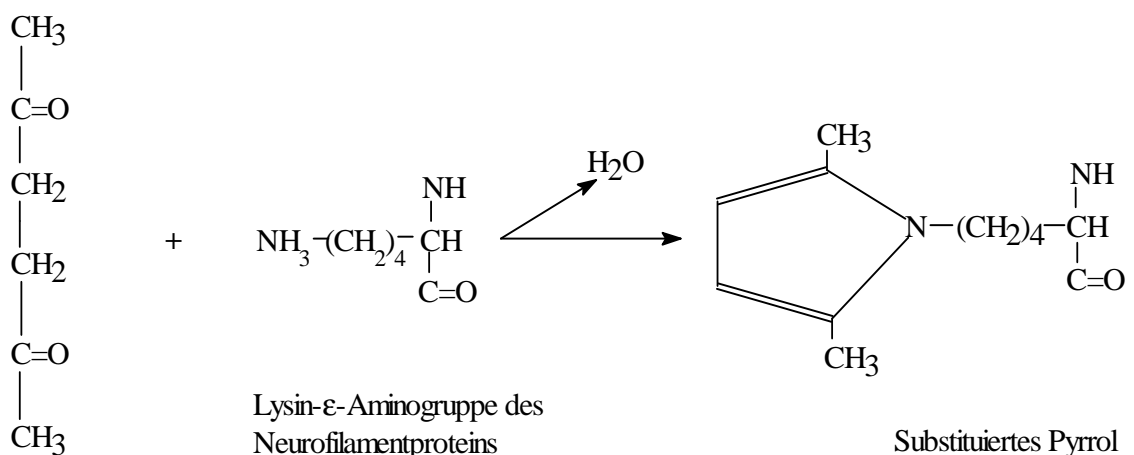


ABB. 51: Reaktion des 2,5-HD mit Neurofilamentproteinen nach DECAPRIO [52][51]

In einem weiteren experimentellen Ansatz gelang der Gruppe um DECAPRIO der Nachweis von Proteinpyrrolverbindungen im Hirnstamm und im distalen Myelon von 2,5-HD exponierten Ratten [52]. Dabei war nach einiger Zeit der Exposition (z.B.: nach zwei Wochen 0,5% 2,5-HD im Trinkwasser) eine konstante Konzentration von Protein-Pyrrolkomplexen in den jeweiligen Geweben und im Serum zu verzeichnen. Histopathologische Veränderungen stellten sich nach fünfwöchiger Exposition ein, klinische Zeichen einer Hexacarbon neuropathie wurden erst nach neun Wochen beobachtet. Nach Abschluß der Exposition kam es zu einer graduellen Besserung des klinischen Bildes, während die histopathologischen Veränderungen und die Protein-Pyrrol-Komplex-Konzentrationen in den untersuchten Axonprotein-Präparaten zunächst unverändert blieben. In einem eleganten Experiment derselben Arbeitsgruppe wurde die entscheidende Bedeutung der Pyrrolbildung bei der Entstehung von Gamma-Diketon-Neuropathien nachgewiesen [50]. Hintergrund dieser Studie war die Überlegung, daß 2,5-Hexandion, bei welchem die Wasserstoffatome durch Perdeuterioisotope ersetzt sind, sich in seinen wichtigsten chemischen Eigenschaften nicht verändert. Jedoch sollte die Reaktion mit Aminogruppen zur Bildung von Pyrrolen bei Perdeuterio-substituiertem 2,5-HD bedeutend träger und langsamer ablaufen. Tatsächlich konnte ein solches Reaktionsverhalten *in vitro* nachgewiesen werden. *In vivo* Untersuchungen zeigten im Vergleich zu mit Wasserstoff substituiertem 2,5-HD eine geringere Neurotoxizität des Perdeuterio-substituierten Moleküls. Die Protein-Pyrrol-Konzentrationen in Hirnstamm, Myelon und Serum lagen um 50-70% niedriger. Auch konnte bei beiden Gruppen eine Korrelation zwischen dem Pyrrolgehalt der Axonproteine und der Anzahl der kovalenten cross-linkings in den Axonen nachgewiesen werden. Die Arbeitsgruppe um GRAHAM untersuchte die Neurotoxizität verschiedener mit Methylgruppen substituierter Derivate des 2,5-HD. 3,4-Dimethylhexandion (3,4-DMHD) neigt aufgrund seiner chemischen Eigenschaften in erheblich größerem Maße zu einer Reaktion mit primären Aminen (und nachfolgender Pyrrolbildung) als 2,5-HD [75][15][14]. Tierexperimentelle Studien belegten eine im Vergleich zum 2,5-HD deutlich höhere Toxizität des 3,4-DMHD bei ansonsten identischen klinischen und morphologischen Befunden. Die durch diese Substanz ausgelösten Neuropathien entwickeln sich schneller und bei geringeren Konzentrationen, die "axonal swellings" lokalisieren sich proximal im Axon. Methylsubstituierte Hexacarbon-Analoga, die aufgrund ihrer chemischen Struktur keine Pyrrolbildung erlauben, entfalten keine neurotoxische Wirkung [181][236].

Ein möglicher Ansatzpunkt der Liponsäure bei der experimentellen Hexacarbonneuropathie steht in Zusammenhang mit den zytoprotektiven Eigenschaften dieser Substanz. Neben den bereits erwähnten Eigenschaften der  $\alpha$ -Liponsäure wurde berichtet über protektive Effekte bei der Vincristin-Toxizität, bei der Toxizität von Aldehydverbindungen, bei alkoholtoxischen Vorgängen an der Magenmukosa und der diabetischen Neuropathie bei Streptozotocin behandelten Ratten [22][38][209][76][212]. Über die klinisch relevante Wirksamkeit der Liponsäure bei der Knollenblätterpilzvergiftung hinaus werden auch protektive Effekte bei der experimentellen Phosphor-induzierten Hepatitis [115] beschrieben. Wie bereits erwähnt, beruht die breit gefächerte Wirksamkeit der Thiolverbindungen ( $\alpha$ -Liponsäure, DTT, Cystein, Glutathion etc.) gegenüber unterschiedlichen Noxen auf deren Eigenschaft, als Redoxsystem zu wirken [146][23][241][80][185] (s.Kap.3.5..). Dies könnte auch indirekt geschehen, indem eine Substanz als Donator von Redoxäquivalenten für andere Redoxsysteme eintritt. Hinweise auf solche Zusammenhänge beschrieben BAST und HAENEN [18], die nach Zugabe reduzierter Liponsäure eine erhöhte Wirksamkeit des Glutathion/Glutamin-Systems gegenüber freien Radikalen feststellten. Das relativ negative Redoxpotential von  $\alpha$ -Liponsäure/Dihydroliponsäure ( $E_0 = -0,29$  V in Tierzellen) könnte ausgenutzt werden zur reduktiven Regeneration weniger elektronegativer Antioxidantien wie Glutathion/Glutathiondisulfid ( $E_0 = -0,24$  V) [23]. In diesem Zusammenhang muß außer einer direkten Interferenz der Liponsäure bzw. anderer Thiole mit dem Toxin oder dessen Metaboliten auch ein möglicher Zusammenhang mit der Wirkung intrazellulärer freier Radikale diskutiert werden. Freie Radikale (wie Wasserstoffperoxid, Hydroxylgruppen, Superoxid etc.) treten in gesunden Organismen als Zwischenstufen bei einer Vielzahl normaler Metabolisierungswege auf. Die Atmungskette stellt beispielsweise eine enzymatisch kontrollierte Reaktion freier Radikale dar. Aber auch das Zytochrom P450-System oder phagozytische Prozesse gehören zu dieser Gruppe. Bei einer Reihe von pathologischen Prozessen wird zumindest eine teilweise Beteiligung freier Radikale in der Pathogenese diskutiert. Hierzu gehören neben dem Alterungsprozeß auch ischämische Prozesse, Neoplasien, Lebererkrankungen und Intoxikationen [115]. Normalerweise verfügt die Zelle über eine Vielzahl von Schutzsystemen, um freie Radikale abzufangen. Am besten untersucht ist hierbei die Rolle des Glutathions bzw. der Superoxyddismutase [20].

DECAPRIO hat darauf hingewiesen, daß die autooxidativen Prozesse bei der Bildung der Pyrrole von der Anwesenheit freier Radikale abhängt und zu intra- und intermolekularem „cross-linking“ führt [49]. Die experimentelle Hexacarbonneuropathie entwickelt sich unter intermittierender hyperbarer Sauerstoffzufuhr erheblich schneller. ANTHONY und

Mitarb. [173] werteten dies als Hinweis auf die Bedeutung oxidativer Prozesse in der Pathogenese der Hexacarbonneuropathie. Bei der intrazellulären Kontrolle von freien Radikalen spielen Thiolverbindungen eine wichtige Rolle. Sie stehen in Abhängigkeit ihres Redoxpotentials im Gleichgewicht zueinander, eine Thiolverbindung kann als Donator von Redoxäquivalenten für andere Redoxsysteme eintreten. Die Gabe von Liponsäure könnte die Kapazität der intrazellulären Redoxsysteme erhöhen und der von DECAPRIO und GRAHAM angenommenen Bildung kovalenter Bindungen zwischen den Neurofilamenten entgegenwirken.

#### 8.4.4. **HYPOTHESE IV: $\alpha$ -LIPONSÄURE FÖRDERT DIE AXONALE REGENERATION**

In Zellkulturen vermag Liponsäure ein Neuritenwachstum bei Neuroblastomzellen zu induzieren [57]. Eine nach partieller Denervation in der Interkostalmuskulatur der Ratte physiologischerweise einsetzende Entwicklung von Axonsprossungen als Zeichen einer beginnenden Reinnervation läßt sich durch Verabreichen von  $\alpha$ -Liponsäure um ca. 50% steigern [113].

Bei der Acrylamid-Neuropathie wird ein Schädigungsmechanismus angenommen, bei dem es neben distaler Akkumulation von 10nm Neurofilamenten in den Axonen von PNS und ZNS auch zu einer Alkylierung von Glutathion und Cystein vornehmlich in der Membran der terminalen Nervenendigung kommt. Dadurch soll die terminale Axonmembran starr und brüchig und die Entwicklung von terminalen Axonsprossungen gehemmt werden. KEMPLAY und Mitarbeiter [112] gelang der Nachweis einer Wirksamkeit der  $\alpha$ -Liponsäure in der Frühphase der Acrylamid-Neuropathie. Dies wurde mit einer möglicherweise stattfindenden Bindung des Acrylamids an die Dihydroliponsäure erklärt, wodurch die zelleigenen SH-Gruppen (z.B. Cystein) geschützt werden. Derselben Arbeitsgruppe gelang der Nachweis einer signifikant gesteigerten Aussprossung von Nervenfasern nach in-vitro-Inkubation von Muskelpräparaten in Liponsäure.

Diese Ergebnisse weisen auf eine spezifische neurotrope Wirkung der Liponsäure, die zu einer Beschleunigung von Regenerationsprozessen in Nervenfasern führt. Insofern wäre es denkbar, daß es durch Liponsäuregabe zu einer verbesserten Regeneration bei den hexanexponierten Tieren käme. Ein solcher Effekt würde eine spezifische Interaktion der Liponsäure mit den Hexacarbonen nicht zwangsläufig voraussetzen. Aus diesem Grund wurde im Vorversuch ein Teil der Tiere ab dem 42. Tag mit Liponsäure behandelt und die Regeneration beobachtet.

#### 8.4.5. WERTUNG DER EIGENEN ERGEBNISSE

Im Rahmen des Vorversuches waren bei den hexanexponierten Tiere ab dem 20. Tag zunehmend neurophysiologische Zeichen der Neuropathie festzustellen (Vergleich der Gruppen H mit K) [196]. Für den 30. und den 40. Tag zeigt sich im Vergleich der Gruppen H und HL ein Unterschied für die Parameter Latenz II und Latenzdifferenz (siehe auch Kap.6.2.). Die Verzögerungen der Meßwerte unter der Hexanexposition stellten sich bei den mit Liponsäure behandelten Tieren (Gruppe HL) etwa 20 Tage später ein, waren dann aber ebenso ausgeprägt wie bei Gruppe H. Ein Vergleich mit der Gruppe HL<sub>42</sub> (zu diesem Zeitpunkt noch identisch behandelt wie Gruppe H) bestätigt diese Beobachtungen. Aus diesen Ergebnissen des Vorversuches wurde geschlossen, daß die Liponsäure einen protektiven Effekt haben könnte. Dieser bestünde in einer verzögerten Ausbildung der Hexacarbonneuropathie.

Für den Hauptversuch war eine kürzer andauernde Hexanexposition gewählt worden, zumal eher geringe Effekte der  $\alpha$ -Liponsäure erwartet wurden. Die Hexankonzentration von 700 ppm und die anderen Expositionsparameter blieben unverändert. Damit sollte sichergestellt werden, daß das Ausmaß der Hexacarbonneuropathie mittels der neurophysiologischen Messungen vollständig dokumentiert werden konnte. Im Rahmen des Vorversuches hatte die (langdauernde) Hexanexposition bei einigen Tieren zu einem vollständigen Zusammenbruch der Nervenleitung geführt, es war mittels der angewendeten Methode kein Muskelaktionspotential mehr zu evozieren bzw. abzuleiten (s.Kap.7.1.). Die hexanexponierten Tiere des Hauptversuches zeigten insgesamt eine deutlich geringer ausgeprägte Neuropathie, dies war auch anhand der klinischen Untersuchungen festzustellen [95]. Allerdings setzten die entsprechenden neurophysiologischen Veränderungen zu einem vergleichbaren Zeitpunkt (20. Tag) ein. Es finden sich keine Unterschiede zwischen den Gruppen H und HL am 30. oder 40. Tag. Erst am 55. Tag (27 Tage nach der Hexanexposition) ergeben sich für sämtliche Meßwerte Hinweise auf einen Unterschied zwischen den beiden Gruppen ( $p < 0,05$ ). Tatsächlich ist bei den hexanexponierten Tieren vom 40. zum 50. Tag in der Mehrzahl ein Anstieg der Latenzzeiten zu verzeichnen, bei den gleichzeitig mit Liponsäure behandelten Tieren (HL) häufiger ein Absinken der Werte. Eine frühe protektive Wirkung der Liponsäure läßt sich anhand der Resultate des Hauptversuches nicht bestätigen. Die unterschiedliche Entwicklung der Gruppen H und HL am Ende der Beobachtungszeit könnte auch einem regenerationsfördernden Effekt entsprechen. Für ein derartiges Ergebnis sind die im Hauptversuch erhobenen Daten aber in keiner Weise hin-

reichend, notwendig wäre eine längerdauernde Beobachtung und die Anwendung von Verlaufsanalysen (s.Kap.8.3.)

Die diskrepanten Ergebnisse von Vor- und Hauptversuch können verschiedene Ursachen haben. Die anlässlich des Hauptversuches geänderten Bedingungen wie Alter der Tiere, Elektrodenposition und Wechsel des Verstärkers wurden bereits in anderem Zusammenhang diskutiert (s.Kap.8.1.). Diese Faktoren erklären die Diskrepanzen nicht, da sich das Ausmaß der Hexacarbon neuropathie in der entscheidenden Phase (10. bis 30.Tag) in den beiden Versuchen etwa gleich darstellt (Gruppen H versus K). Dagegen sind die unterschiedlichen Tierzahlen je Kollektiv zu beachten. Diese betragen für die Gruppen H und HL im Vorversuch 8 im Hauptversuch 12 Tiere. Die Anwendung des Wilcoxon-Testes ist auch zum Vergleich sehr kleiner Stichproben geeignet [178], allerdings ist bei kleinen Kollektiven die Gefahr gegeben, daß einzelne deutlich abweichende Meßwerte das Ergebnis unverhältnismäßig beeinflussen. Insofern sind die Ergebnisse des Hauptversuchs als zuverlässiger einzuschätzen.

Die Dosis der täglichen oralen Liponsäuregabe betrug 140  $\mu\text{mol/kg}$  bezogen auf das mittlere Gewicht der Tiere. KEMPLAY nennt Dosen von 250  $\mu\text{mol/kg}$ , die intraperitoneal appliziert wurden. NAGAMABU und Mitarb. verabreichten 150  $\mu\text{mol/kg}$  per os [148]. Die Pharmakokinetik der Liponsäure nach oraler oder intraperitonealer Gabe wurde bisher nicht systematisch untersucht. Aus den Daten von WAGH und NATRAJ läßt sich folgern, daß die antidiabetischen Effekte der Liponsäure bei einer Dosis von 100  $\mu\text{mol/kg}$  auftraten, unabhängig von der Applikation (oral oder intraperitoneal). Die Beschränkung auf eine tägliche Gabe von 0,25 ml ergab sich anlässlich der Vorversuche, die zeigten, daß eine rasche Gewöhnung der Tiere an die Fütterung bei höheren Volumina nicht zu gewährleisten war. Die hier untersuchte Frage einer protektiven Wirksamkeit hätte durch eine höher dosierte Anwendung eindeutiger beantwortet werden können. Auch eine Kontrolle der Liponsäurespiegel im Blut wäre in diesem Zusammenhang wünschenswert. Umgekehrt könnte eine Minderung der n-Hexanexposition ebenfalls zu eindeutigeren Ergebnissen im Sinne der Fragestellung führen. Allerdings würde dies die Zeitspanne bis zum Auftreten der Neuropathie deutlich verlängern (s.Kap.8.2.). Angesichts der nur unvollständig bekannten biochemischen Daten ist nicht zu entscheiden, ob eine langfristige Vorbehandlung mit Liponsäure eine höhere Wirksamkeit begründen könnte (s.Kap.3.5.).



## 9. ZUSAMMENFASSUNG

n-Hexan ist ein organisches Lösemittel, welches meist in Lösemittelgemischen angetroffen wird. Berichte über Neuropathien betreffen sowohl arbeitsmedizinische Bereiche (z.B.: Schuh- oder Automobilindustrie) als auch den Mißbrauch von Lösemitteln durch jugendliche Schnüffler. N-Hexan zählt zu den sogenannten Hexacarbonen, einer Gruppe von Lösemitteln, die spezifische axonale Polyneuropathien auslösen können. Die experimentelle Hexacarbon-Neuropathie stellt ein etabliertes Modell einer neurotoxischen Erkrankung dar, teilweise sind die zugrundeliegenden pathophysiologischen Zusammenhänge bis auf molekulare Ebene bekannt. Auslöser ist dabei das gemeinsame Stoffwechselprodukt der Hexacarbonate, das 2,5-Hexandion. Die Schädigung durch 2,5-HD ist organspezifisch, nur das Nervensystem und das germinale testikuläre Epithelium sind betroffen. Im Bereich des Nervensystems kommt es zu typischen Axonaufreibungen („axonal swellings“), angefüllt mit 10 nm Neurofilamenten, Mikrotubuli und Mitochondrien. In Folge dieser Schädigung bricht der axonale Transport zusammen, distal tritt eine Wallersche Degeneration der Nervenfasern auf. Gleichartige Befunde werden erhoben bei Neuropathien z.B. durch CS<sub>2</sub> und Acrylamid, aber auch bei der amyotrophen Lateralsklerose, der sogenannten „giant axonal“ Neuropathie und anderen humanen Erkrankungen.

$\alpha$ -Liponsäure zählt zu den vitaminähnlichen Substanzen. Es ist Bestandteil von mitochondrialen Dehydrogenase-Systemen. Darüber hinaus kann  $\alpha$ -Liponsäure als intramolekulares Redoxsystem fungieren, sie ist ein möglicher SH-Gruppen-Donator. Des Weiteren werden der Substanz chelatbildende Eigenschaften zuerkannt. Im klinischen Alltag wird die Liponsäure eingesetzt zur Behandlung peripherer (insbesondere diabetischer) Polyneuropathien. Hierzu fehlen bisher gesicherte experimentelle und neurophysiologische Daten. Zur Prüfung eines möglichen protektiven oder regenerationsfördernden Effektes der Liponsäure bei der experimentellen Hexacarbonneuropathie wurden in zwei Versuchsdurchgängen jeweils 24 männliche Wistar-Ratten gegenüber 700 ppm n-Hexan exponiert. Weitere 16 Tiere wurden unter identischen Bedingungen gehalten, jedoch nicht hexanexponiert (Kontrollen). Liponsäure wurde einem Teil der hexanexponierten Tiere und einem Teil der Kontrollen verabreicht. Die Exposition erfolgte 24 Std./Tag, 7 Tage/Woche über einen Zeitraum von 8<sup>1</sup>/<sub>2</sub> Wochen (Vorversuch) bzw. 28 Tagen (Hauptversuch).

Es wurden insbesondere neurophysiologische Parameter untersucht. Eine eigens entwickelte Methode ermöglichte die Bestimmung der motorischen Nervenleitung am ventralen Schwanznerven der Ratte.

Unter einer Exposition gegenüber 700 ppm n-Hexan entwickelten die Tiere innerhalb von 6-7 Wochen eine klinisch schwere motorische Neuropathie. Eine signifikante Verzögerung der motorischen Nervenleitung war bereits nach 20 Tagen festzustellen. In den Gruppen der mit  $\alpha$ -Liponsäure behandelten Tiere kam es - nach neurophysiologischen Kriterien - zu einem um 20 Tage verzögerten Auftreten der Neuropathie. Ein Einfluß der Liponsäure auf die Regeneration einer Hexacarbonneuropathie konnte mit den hier angewandten Methoden nicht gezeigt werden.

Wenn auch der Mechanismus einer möglichen protektiven Wirksamkeit der  $\alpha$ -Liponsäure nicht geklärt ist, so ergeben sich auf den verschiedensten Ebenen Ansatzpunkte, die in der vorliegenden Arbeit diskutiert werden. Dabei wird jeweils von den unterschiedlichen Konzepten ausgegangen, die zur Erklärung der Hexacarbonneuropathie vorgeschlagen wurden. Neben einer direkten Bindung und Inaktivierung des 2,5-Hexandions könnte eine Wirkung der Liponsäure bei der Hexacarbon-Neuropathie auch durch den Schutz glykolytischer Enzyme oder eine Blockade der autooxidativen Alteration von Neurofilamenten zustande kommen. Darüber hinaus beschäftigt sich diese Arbeit mit den wesentlichen Bedingungen und Grenzen der hier vorgestellten neurophysiologischen Methode.

## 10. LITERATURVERZEICHNIS

1. Abdel-Rahmann M, L.Hetland, D.Couri. Toxicity and Metabolism of Methyl-n-Butyl Ketone. Am. Ind. Hygiene Association Journal (1976), 37: 95-101.
2. Abou-Donia MB, H-AM Makkawy, DC Graham. The relative neurotoxicity of n-Hexane, Methyl n-Butyl Ketone, 2,5-Hexandiol and 2,5-Hexandione following oral or intraperitoneal administration in hens. Toxicol. Appl. Pharmacol. (1982), 62: 369-389.
3. Akerboom TPM, J Peinado, H Sies. Lipoattransport in der Leber.  
In: Borbe HO, Ulrich H (Hrsg): Thioctsäure. Neue biochemische und pharmakologische Erkenntnisse zur Thioctsäure. Perimed Verlag. Frankfurt 1989: S. 194-203.
4. Allen N, JR Mendell, DJ Billmaier, RE Fontane, J O'Neill. Toxic Polyneuropathy due to Methyl n-Butyl Ketone. Arch. Neurol. (1975), 32: 203-218.
5. Allen N. Identification of Methyl n-Butyl Ketone as the Causative Agent. In: Spencer PS, Schaumburg HH (Hrsg.): Experimental and Clinical Neurotoxicology. Williams and Wilkins, Baltimore/London 1985: S. 834-845.
6. Altenkirch H. Schnüffelstoffe: Lösemittelhaltige Produkte als Rausch- und Suchtmittel. Deutsches Ärzteblatt (1985), 29: 93-100.
7. Altenkirch H, G Stoltenburg, HM Wagner. Experimental studies on hydrocarbon neuropathies induced by Methyl-Ethyl-Ketone (MEK). J.Neurol. (1978), 219: 159-170.
8. Altenkirch H, J Mager, G Stoltenburg, J Helmbrecht. Toxic polyneuropathies after sniffing a glue thinner. J. Neurol. (1977),214: 137-152.
9. Altenkirch H. Schnüffelsucht und Schnüfflerneuropathie. Sozialdaten, Praktiken, klinische und neurologische Komplikationen sowie experimentelle Befunde des Lösungsmittelmißbrauchs. Springer Verlag. Berlin, Heidelberg, New York, 1982.
10. Altenkirch H, G Stoltenburg-Didinger, HM Wagner. Experimental data on the neurotoxicity of Methyl-Ethyl-Ketone (MEK). Seperatum Experimentia (1979), 35: 503-505.

11. Altenkirch H, HM Wagner, G Stoltenburg-Didinger. Potentiation of hexacarbon-neurotoxicity by Methyl-Ethyl-Ketone (MEK) and other substances: Clinical and experimental aspects. *Neurobehav. Toxicol. Teratol.*: (1982), 4: 623-627.
12. Altenkirch H, HM Wagner, G Stoltenburg, PS Spencer. Nervous system responses to subchronic inhalation of n-Hexane and Methyl-Ethyl-Ketone (MEK) mixtures. *J. Neurol. Sciences* (1982), 57: 209-219.
13. Ametov AS, A Barinov, PJ Dyck et al.. The sensory symptoms of diabetic polyneuropathy are improved with alpha-lipoic acid: the SYDNEY trial. *Diabetes Care* (2003), 26:770-776.
14. Anthony DC, K Boekelheide, DG Graham. The effect of 3,4-Dimethyl substitution on the neurotoxicity of 2,5-Hexandione. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* (1983),71: 362-371.
15. Anthony DC, F Giangaspero, DG Graham. The spatio-temporal pattern of the axonopathy associated with the neurotoxicity of 3,4-Dimethyl-2,5-Hexandione in rat. *J. Neuroph. Exp. Neurol.* (1983), 42: 548-566.
16. Asbury AK. Neuropathies with filamentous abnormalities. In: Aguayo AJ, G Karpati (Hrsg.): *Current topics in nerve and muscle research. Selected papers of the symposia held at the 4th international Congress on Neuromuscular Disease. Montreal 1978.* Excerpta Medica, Amsterdam-Oxford 1979: 84-91.
17. Bano M, DK Bhatt. Neuroprotective Role of a novel combination of certain antioxidants on Lindane ( $\gamma$ -HCH) induced toxicity in cerebrum of mice. *Res. J. Agricult. Biol. Sci.* (2007), 3: 664-669.
18. Bast A, GR Haenen. Interplay between Lipoic Acid and Glutathion in the protection against microsomal lipid peroxidation. *Biochim. Biophys. Acta* (1988), 963: 588-561
19. Baumgarten HG, B Zimmermann. Vorkommen und Funktion intra- und extrazellulärer Sulfhydrylgruppen bzw. Disulfidbrücken. In: Borbe HO, Ulrich H (Hrsg): *Thioctsäure. Neue biochemische und pharmakologische Erkenntnisse zur Thioctsäure.* Perimed Verlag. Frankfurt 1989: S. 27-43.
20. Berg JM, JL Tymoczko, L Stryer. *Biochemistry.* Palgrave McMillan. 6.ed. Houndsmills 2006.

21. Berger A, HH Schaumburg. Neuropathy associated with industrial agents. In: Dyck PJ, Thomas PK, Griffin JW, Low PA, Poduslo JF (Hrsg.). *Peripheral Neuropathy*. 4th edition, Saunders. Philadelphia, London, Montreal, 2004. S. 1533-1548.
22. Berger M, M Habs, D Schmaehl. Effect of Thioctic acid on the chemotherapeutic efficacy of cyclophosphamide and vincristine sulfate. *Drug Res.* (1983), 33 (9): 1286-1288.
23. Biewenga GP, GRM Haenen, A Bast. An overview of Lipoat chemistry. In: Fuchs J, L Packer, G Zimmer (Hrsg.): *Lipoic acid in health and disease*. Marcel Dekker. New York 1997: 1-32.
24. Birren JE, PE Wahl. Age changes in conduction velocity, refractory period, number of fibers, connective tissue space and blood vessels in sciatic nerve in rats. *J. Comp. Neurol.* (1956), 104: 1-16.
25. Black MM, RJ Lasek. Slow components of axonal transport: two skeletal networks. *J. Cell. Biol.* (1980), 86: 616-623.
26. Bock WJ, J Liesegang. Vergleichende Messungen der Nervenleitgeschwindigkeit mit Oberflächen- und Nadelelektroden. *Zbl. Neurochir.* (1972), 33: 45-51.
27. Boegner F, W Grüning, G Stoltenburg-Didinger, P Marx, Altenkirch H. 2,5-HD is a potent gliatoxin in in-vitro cell cultures of the nervous system. *Neurotox.* (1992), 13: 151-154.
28. Böhm M, M Ebeling, H Binswanger. Neuere Erkenntnisse über die Funktion von  $\alpha$ -Liponsäure in mitochondrialen Multienzym-Komplexen. In: Borbe HO, Ulrich H (Hrsg): *Thioctsäure. Neue biochemische und pharmakologische Erkenntnisse zur Thioctsäure*. Perimed Verlag. Frankfurt 1989: S. 44-56..
29. Böhlen P, UP Schlunegger, E Läubli. Uptake and distribution of Hexane in rat tissues. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* (1973), 25: 242-249.
30. Bomont P, M Koenig. Intermediare filament aggregation in fibroblasts of giant axon neuropathy patients is aggravated in non dividing cells and by microtubule destabilisation. *Hum. Mol. Genet.* (2002), 12:813-822.

31. Boxenbaum H. Interspecies variation in liver weight, hepatic blood flow and antipyrine intrinsic clearance: Extrapolation of data to benzodiazepines and phenytoin. *J. Pharmacokinet. Biopharm.* (1980), 8: 156-176.
32. Brady ST, RJ Lasek. Nerve-specific Enolase and Creatine Phosphokinase in axonal transport: soluble proteins and the axoplasmic matrix. *Cell* (1981), 23: 515-523.
33. Braendgaard H, P Sidenius. The retrograde fast component of axonal transport in motor and sensory nerves of rats during administration of 2,5-Hexandione. *Brain Res.* (1986), 378: 1-7.
34. Braendgaard H, P Sidenius. Anterograde components of axonal transport in motor and sensory nerves in experimental 2,5-Hexandione Neuropathy. *J. Neurochem.* (1986), 47:31-37.
35. Buiatti E, S Cecchini, O Ronchi, P Dolara, G Bulgarelli. Relationship between clinical and electromyographic findings and exposure to solvents in shoe and leather workers. *Br. J. Ind. Med.* (1978), 35: 168-182.
36. Cangiano A, L Lutzemberger, N Rizzuto, A Simionati, A Rossi, G Toshi. Neurotoxic effects of 2,5-Hexandione in rats: Early morphological and functional changes in nerve fibres and neuromuscular junctions. *Neurotox.* (1980), 2: 25-32.
37. Cavanagh JB. The problems of neurons with long axons. *Lancet* (1984), 84:1284-1287.
38. Cesolari JAM, OM Laudano, P San Miguel, OA Bedini. Drugs cytoprotective for the gastric mucosa against alcohol aggression. *Rev. Esp. Enferm. Apar. Dig.* (1988), 73(3): 229-232.
39. Cianchetti C, G Abbritti, G Perticoni, A Siracusa, F Curradi. Toxic polyneuropathy of shoe-industry workers. A study of 122 cases. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiat.* (1976), 39: 1151-1161.
40. Cicmir I, P Mayer, D Ziegler, FA Gries. Hochdosierte Thioctsäure-Infusionstherapie mit anschließender oraler Erhaltungstherapie bei diabetischer Polyneuropathie. In: Borbe HO, H Ulrich (Hrsg.): Thioctsäure. Neue biochemische, pharmakologische und klinische Erkenntnisse zur Thioctsäure. Perimed-Verlag, Frankfurt 1989 S. 311-319.

41. Clarkson TW. Molecular targets of methyl toxicity. In: Brown H, P Savory (Hrsg.): Chemical toxicology and clinical chemistry of metals. Saunders. Philadelphia, USA 1983, S. 210-226.
42. Cohen S. Glue sniffing. JAMA (1975), 231: 653-655.
43. Coore HG, RM Denton, BR Martin, PJ Randle. Regulation of adipose tissue pyruvatdehydrogenase by insulin and other hormones. Biochem. J. (1971), 125: 115-127.
44. Corbat F. Über Messungen der Leitgeschwindigkeit am peripheren Nerven und deren Verwendung in der Klinik. Dtsch. Z. Nervenheilk. (1964), 182: 106-115.
45. Couri D, JP Nachtman. Biochemical and biophysical studies of 2,5-Hexandione neuropathy. Neurotox. (1979), 1: 269-283.
46. Couri D, MS Abdel-Rahman, LB Hetland. Biotransformation of n-Hexane and Methyl-n-Butyl-Ketone in guinea pigs and mice. Am. Ind. Hyg. Assoc. J. (1978), 39: 295-300.
47. Couri D, M Milks. Toxicity and metabolism of the neurotoxic hexacarbons n-Hexane, 2-Hexanone and 2,5-Hexandione. Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol. (1982), 22: 145-166.
48. Dawson GD. The relative excitability and conduction velocity of sensory and motor nerve fibres in man. J. Physiol. (1956), 131: 436-451.
49. DeCaprio AP. Mechanisms of in vitro pyrrole adduct autoxidation in 2,5-Hexandione-treated rats. Mol. Pharmacol. (1986), 30: 452-458.
50. DeCaprio AP, RG Briggs, S Jackowski, JCS Kim. Comparative neurotoxicity and pyrrole-forming potential of 2,5-Hexandione and Perdeuterio-2,5-Hexandione in the rat. Toxicol. Appl. Pharmacol. (1988), 92: 75-85.
51. DeCaprio AP, EA O'Neill. Alterations in rat axonal cytoskeletal proteins induced by in vitro and in vivo 2,5-Hexandione exposure. Toxicol. Appl. Pharmacol. (1985), 78: 235-247.
52. DeCaprio AP, EJ Olajos, P Weber. Covalent binding of a neurotoxic n-Hexane metabolite: Conversion of primary amines to substituted pyrrole adducts by 2,5-Hexandione. Toxicol. Appl. Pharmacol. (1982), 65: 440-445.

53. DeCaprio AP. N-Hexane metabolites and derivatives. In: Spencer PS, HH Schaumburg, Ludolph AC: Experimental and Clinical Neurotoxicology. 2<sup>nd</sup> edition, Oxford University Press, New York / Oxford 2000. S. 456-475.
54. DeJesus PV, DE Pleasure. Hexachlorophene Neuropathy. Arch. Neurol. (1973), 29: 180-182.
55. DeJong RH, WN Hershey, IH Wagman. Nerve conduction velocity during hypothermia in man. Anaesthesiology (1966), 27: 805-810.
56. DiBosco MM, S Fonzi. La polineuropatia cosiddetta da collanti o dei calzaturieri. Riv. Infort. Mal. Prof. (1974), 61: 665-692.
57. Dimpfel W, W Müller, M Spüler. Morphologische und elektrophysiologische Korrelate des durch Thioctsäure induzierten Neuritenwachstums in Neuroblastomzellen. In: Borbe HO, H Ulrich (Hrsg.): Thioctsäure. Neue biochemische, pharmakologische und klinische Erkenntnisse zur Thioctsäure. Perimed-Verlag, Frankfurt 1989: S.165-178 .
58. DiVincenzo GD, ML Hamilton, CJ Kaplan, J Dedinas: Metabolic fate and disposition of <sup>14</sup>C labeled Methyl-n-Butyl-Ketone in the rat. Toxicol. Appl. Pharmacol. (1977), 41: 547-560.
59. Domanska-Janik K, JM Bourre: Effect of mercury on rabbit myelin CNP-ase in vitro. Neurotox. (1987), 8(1): 23-32.
60. Durham HD. Aggregation of intermediate filaments by 2,5-Hexandione: comparison of effects on neurofilaments, GFAP-filaments and vimentin-filaments in dissociated cultures of mouse spinal cord-dorsal root ganglia. J. Neuropath. Exp. Neurol. (1988) 47: 423-442.
61. Durham HD, I Salera, S Dahrouge. Evidence that formation of an intermediate filament-protein complex plays a primary role in aggregation of neurofilaments, glial acidic protein (GFAP)-filaments and vimentin filaments by 2,5 Hexandione. J. Neuropath. Exp. Neurol. (1989),48:197-211.
62. Dyck PJ, Thomas PK, Griffin JW, Low PA, Poduslo JF (Hrsg.). Peripheral Neuropathy. 4th edition, Saunders. Philadelphia, London, Montreal, 2004.



63. Egan GF, SC Lewis, RA Scala. Experimental design for animal toxicity testing. In: Spencer PS, Schaumburg HH (Hrsg.): Experimental and Clinical Neurotoxicology. Williams and Wilkins. Baltimore, London 1985: 708-725.
64. Egan G, PS Spencer, HH Schaumburg, KJ Murray, M Bischoff, R Scala. N-hexane-  
“free“ hexane fails to produce nervous system damage. Neurotoxicol. (1980), 1: 515-524.
65. Ehrental W, W Prellwitz. Biochemie und Pharmakologie der Liponsäure.  
In: Neundörfer B, Sailer D (Hrsg.): Interdisziplinäre Bestandsaufnahme der Polyneuropathien. Morphologie, Biochemie, Klinik und Therapie. Perimed-Verlag. Erlangen 1986: S.154-165.
66. Elofsson SA, F Gamberale, T Hindmarsh. Exposure to organic solvents: A cross-sectional epidemiologic investigation on occupationally exposed car and industrial spray painters with special reference to the nervous system. Scand. J. Environ. Health (1980), 6: 239-273.
67. Escobar A, C Aruffo. Chronic thinner intoxication: Clinico-pathologic report of a human case. J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry (1980, 43: 986-994.
68. Filser JG, H Peter, HM Bolt, N Fedtke. Pharmacokinetics of the neurotoxin n-Hexane in rat and man. Arch. Toxicol. (1987), 60: 77-88.
69. Frontali N, C Amantini, A Spagnolo, AM Guarcini, MC Saltari, F Brugnone, L Perbellini. Experimental neurotoxicity and urinary metabolites of the C<sub>5</sub>-C<sub>7</sub> aliphatic hydrocarbons used as glue solvents in shoe manufacture. Clin. Toxicol. (1981), 18: 1357-1367.
70. Fullerton PM, JM Barnes. Peripheral neuropathy in rats produced by acryamide. Brit. J Ind. Med. (1966), 23: 210-221.
71. Gassel MM. Sources of error in motor conduction studies. Neurology (1964), 14: 825-835.
72. Gassel MM. A study of femoral conduction time. Arch. Neurol. (1963), 9: 607-614.
73. Gasser HS, H Grundfest. Axon diameter in relation to the spike dimensions and the conduction velocity in mammalian A fibers. Amer. L. Physiol. (1939), 127: 393-414.

74. Gaultier M, G Rancurel, C Piva, ML Efthymiou. Polynévrites et hydrocarbures aliphatiques. *J. Europ. Toxicol.* (1973), 6: 294-296.
75. Genter MB, G Szakàl-Quin, CW Anderson, DC Anthony, DG Graham: Evidence that pyrrole formation is a pathogenetic step in  $\gamma$ -Diketone neuropathy. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* (1987), 87: 351-362.
76. Gibson TM, MA Cotter, NE Cameron. Effects of alpha-lipoic acid on impaired gastric fundus innervation in diabetic rat. *Free Radic. Biol. Med.* (2003), 35:160-168.
77. Gilliatt RW. Nerve conduction in human and experimental neuropathies. *Proc. R. Soc. Med.* (1966), 59: 989-993.
78. Glatzel W, W Ponsold, JU Grünes, K Tietze. Aktionspotentiale im M. tibialis antreior, M. gastrocnemius und M. plantaris und motorische Leitgeschwindigkeit am N. ischiadicus, N. tibialis und N. peroneus der Albino-Ratte. *Wiss. Z. Univ. Halle* (1972), XXI 72 M., 3: 99-102.
79. Glatzel W, W Ponsold, JU Grünes, K Tietze. Veränderungen der motorischen Leitungsgeschwindigkeit von peripheren Nerven der Ratte nach oralen Tetrachlorkohlenstoffgaben. *Wiss. Z. Univ. Halle* (1972), XXI 72 M. 5: 87-89.
80. Götz ME, A Dirr, W Grell, R Burger, et al. Influence of N-methyl-4-phenyl-1,2,3,6,-tetrahydropyridine, Lipoic acid and L-deprenyl on the interplay between cellular redox systems. *J. Neural. Transm.* (1994), 43(Suppl.):145-162.
81. Gold BC. The pathophysiology of proximal neurofilamentous giant axonal swellings. Implications for the pathogenesis of amyotrophic lateral sclerosis. *Toxicol.* (1987), 46: 125-139.
82. Goldman JE, SH Yen. Cytoskeletal protein abnormalities in neurodegenerative diseases. *Ann. Neurol.* (1986), 19: 209-223.
83. Goto I, M Mutsuro, N Inoue et al. Toxic polyneuropathy due to glue sniffing. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiat.* (1974), 37: 848-853.
84. Graham DG. Hexane neuropathy: a proposal for pathogenesis of a hazard of occupational exposure and inhalant abuse. *Chem. Biol. Interact.* (1980), 32: 339-345.
85. Graham DG, MB Genter, ST Clair, V Amarhath, DC Anthony. Molecular machanisms of  $\gamma$ -Diketone neuropathy. *Adv. Exp. Med. Biol.* (1991), 283: 427-431.

86. Graham DG, DC Anthony, K Boekelheide. In vitro and in vivo studies of the molecular pathogenesis of n-Hexane neuropathy. *Neurobehav. Toxicol. Teratol.* (1982), 4: 629-634.
87. Greenfield JG. *Neuropathology*. Ann Arbor, Michigan / USA, 1956.
88. Griffin JW, DF Watson. Axonal transport in neurological disease. *Ann. Neurol.* (1988), 23: 3-13.
89. Griffin JW, DL Price, PS Spencer. Fast axonal transport through giant axonal swellings in hexacarbon neuropathy. *J. Neuropath. Exp. Neurol.* (1977) 36: 603-614.
90. Griffin DG, DC Anthony, KE Fahnestock, PN Hofman, DG Graham. 3,4-Dimethyl-2,5-Hexandione impairs the axonal transport of neurofilament proteins. *J. Neurosci.* (1984) 4: 1516-1526.
91. Griffin JW, KE Fahnestock, DL Price, LC Cork. Cytoskeletal disorganisation induced by local application of  $\beta,\beta'$ -Imminodipropionitrile and 2,5-Hexandione. *Ann. Neurol.* (1983), 14: 55-61.
92. Guld C, A Rosenfalck, RG Willison. Technical factors in recording electrical activity of muscle and nerve in man. *Electroenceph. Clin. Neurophys.* (1970), 28: 399-413.
93. Gunsalus IC, WE Razzell. Preparation and assay of Lipoic Acid and derivatives. In: Colowick SP, Kaplan NO (Hrsg.): *Methods in Enzymology*, Vol. III. New York 1957: 941-946.
94. Hermann R, G Niebich. Human pharmacokinetics of  $\alpha$ -Lipoic acid. In: Fuchs J, L Packer, G Zimmer: *Lipoic acid in health and disease* (Hrsg.). Marcel Dekker. New York, 1997: 337-360.
95. Herrmann J. Neurotoxizität von Hexacarbonen: Tierexperimentelle Studien an der Ratte zu möglichen protektiven und regenerationsfördernden Effekten der  $\alpha$ -Liponsäure. Inaugural Dissertation, FU Berlin 1991, Fachbereich Veterinärmedizin.
96. Hershkowitz A, N Ishii, HH Schaumburg. N-Hexane neuropathy. *NEJM* (1971), 285: 82-85.
97. Hoffmann PN, JW Griffin, DL Price: Control of axonal caliber by Neurofilament transport. *J. Cell. Biol.* (1984), 99: 705-714.

98. Hopf HC. Untersuchungen über die Unterschiede in der Leitungsgeschwindigkeit motorischer Nervenfasern beim Menschen. Dtsch. Z. Nervenheilkd.(1962), 183: 579-588.
99. Hopf HC, R Löser, P Becker A Prill, E Volles. Elektrophysiologische Verlaufskontrollen zum Nachweis von Leitfunktionsstörungen peripherer Nerven bei Polyneuropathien mit Leitzeiten im „Normbereich“. Z. Neurol. (1972), 202: 281-294.
100. Howland RD, IL Vyas, HE Lowndes. The ethiology of toxic peripheral neuropathies: in vitro effects of Acrylamide and 2,5-Hexandione on brain Enolase and other glycolytic enzymes. Brain Res. (1980), 202: 131-142.
101. Huang J, K Koto, E Shibata, K Sugimura, H Hisanaga, Y Ono, Y Takeuchi. Effects of chronic n-Hexane exposure on nervous system specific and muscle specific proteins. Arch. Toxicol. (1989), 63: 381-385.
102. Inoue M, Y Takeuchi, S Takeuchi et al. A health survey on vinyl sandal manufacturers with high incidence of n-Hexane intoxication. Jpn. J. Ind. Health (1970), 12: 73-85.
103. International Federation of Societies for Electroencephalography and Clinical Neurophysiology Symposium: Facts and Artefacts in the measurement of conduction velocity. Copenhagen, June 21-23, 1963. Electroenceph. Clin. Neurophysiol. (1964), 17: 84-104.
104. Ishii N, A Herskowitz, HH Schaumburg. n-Hexane polyneuropathy: A clinical and experimental study. J. Neuropath. Exp. Neurol. (1972), 31: 198-206.
105. Iwata M, Y Takeuchi, N Hisanaga, Y Ono. Changes of n-Hexane neurotoxicity and its urinary metabolites by long term co-exposure with MEK or Toluene. Int. Arch. Occup. Health (1984), 54: 273-281.
106. Jakobsen J, P Sidenius, H Braendgaard. A proposal for a classification of neuropathies according to their axonal transport abnormalities. J. Neurol. Neurosurg. Psychiat. (1986), 49: 986-990.
107. Jörg J. Behandlung der diabetischen Polyneuropathie mit Thioctsäure oder einem Vitamin-B-Präparat: Eine kontrollierte klinische Studie. In: Borbe HO, H Ulrich (Hrsg.): Thioctsäure. Neue biochemische, pharmakologische und klinische Erkenntnisse zur Thioctsäure. Perimed-Verlag, Frankfurt 1989: S.317 (Abstract)

108. Johnson BL. Electrophysiological methods in neurotoxicity testing. In: Spencer PS, Schaumburg HH (Hrsg.): *Experimental and Clinical Neurotoxicology*. Williams and Wilkins. Baltimore, London 1985: S.726-742.
109. Kaeser HE, EH Lambert. Nerve function in experimental polyneuritis. *Electroenceph. Clin. Neurophys.* (1962), Suppl. 22: 29-35.
110. Kaeser HE, EH Lambert. Nerve conduction in experimental polyneuritis. In: Pinelli P (Hrsg.): *Progress in Electromyography*. Elsevier Publishing. Amsterdam 1962.
111. Karup C, F Buchthal. Conduction studies in peripheral nerves. *Neurobehav. Toxicol. Teratol.* (1985), 7: 319-323.
112. Kemplay S. Thioctic Acid and motor nerve terminal changes during and after Acrylamide poisoning. In: Borbe HO, Ulrich H (Hrsg): *Thioctsäure. Neue biochemische und pharmakologische Erkenntnisse zur Thioctsäure*. Perimed Verlag. Frankfurt 1989: S. 248-260.
113. Kemplay S, P Martin, S Wilson. The effects of Thioctic acid on motor nerve terminals in Acrylamide-poisoned rats. *Neuropath. Appl. Neurobiol.* (1988), 14: 275-288.
114. King RH, M Sarsilmaz, PK Thomas. Axonal neurofilamentous accumulation: a comparison between human and canine giant axonal neuropathy and 2,5-HD neuropathy. *Neuropath. Appl. Neurobiol.* (1993), 19:224-232.
115. Kleemann A, HO Borbe, H Ulrich: Thioctsäure -  $\alpha$ -Liponsäure. In: Borbe HO, Ulrich H (Hrsg): *Thioctsäure. Neue biochemische und pharmakologische Erkenntnisse zur Thioctsäure*. Perimed Verlag. Frankfurt 1989: S. 11-26.
116. Klymkowsky MW, DJ Plummer. Giant axonal neuropathy: A conditional mutation affecting cytoskeletal organisation. *J. Cell. Biol.* (1985) 100: 245-250
117. Korobkin R, AK Asbury, AJ Sumner, SL Nielsen. Glue sniffing neuropathy. *Arch. Neurol.* (1975), 32: 158-162.
118. Krasavage WL, JL O`Donoghue, GD DiVincenzo, CJ Terhaar. The relative neurotoxicity of Methyl-n-Butyl ketone, n-Hexane and their metabolites. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* (1980), 52: 433-441.
119. Kulig BM, OL Wolthuis. The development of neurologic and behavioral impairments in rats exposed subchronically to n-Hexane. *Arbete. Och. Hals* (1984), 29: 83-89

120. Kulig BM. The effects of chronic Trichlorethylene exposure on neurobehavioral functioning in the rat. *Neurotoxicol. Teratol.* (1987), 9: 171-178
121. Kurita H. Experimental studies on the effects of n-Hexane to albino rats. *Sangyo-igaku* (1967), 9: 24-29 (engl. Abstract).
122. Ladefoged O, U Hass, L Simonsen. Neurophysiological and behavioral effects of combined exposure to 2,5-Hexandione and Acetone or Ethanol in rats. *Pharmacol. Toxicol.* (1989), 65: 372-375.
123. Lam CW, TJ Galen, JF Boyd, DL Pierson. Mechanism of transport and distribution of organic solvents in blood. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* (1990), 104: 117-129.
124. Lapadula DM, E Suwita, MB Abou-Donia. Evidence for multiple mechanisms responsible for 2,5-Hexandione-induced neuropathy. *Brain Res.* (1988), 458: 123-131.
125. Lapadula DM, RD Irwin, E Suwita, MB Abou-Donia. Cross-Linking of neurofilament protein of rat spinal cord in vivo after administration of 2,5-Hexandione. *J. Neurochem.* (1986), 44: 1843-1850.
126. Laterrier JF, RHK Liem, ML Shelanski. Interactions between neurofilaments and microtubule-associated proteins: A possible mechanism for intraorganellar binding. *J. Cell. Biol.* (1982), 95: 982-986.
127. Lehning EJ, KS Dyer, BS Lortner et al. Axonal atrophy is a specific component of 2,5-Hexandione peripheral neuropathy. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* (1995), 48: 58-66.
128. Lehning EJ, BS Jortner, JH Fox et al.  $\gamma$ -Diketone neuropathy: II. Morphometric analysis of axonal atrophy and swellings. *Toxicologist* (1999), 48:285-293.
129. LeQuesne P. Clinical expression of neurotoxic injury and diagnostic use of electromyography. *Environ. Health Perspect.* (1978), 26: 89-95.
130. LoPachin, RM, JF Ross, ML Reid et al. Neurological evaluation of toxic axonopathies in rats: Acrylamide and 2,5-Hexandione. *Neurotoxicology* (2002), 23: 95-110.
131. LoPachin RM, BS Jortner, ML Reid et al.  $\gamma$ -diketone central neuropathy: quantitative analysis of cytoskeletal components in myelinated axons of the rat rubrospinal tract. *Neurotoxicology* (2005), 26: 1021-1030.

132. Lynch JJ, WH Merigan, TA Eskin. Subchronic dosing of Macaques with 2,5-Hexandione causes long lasting motor dysfunction but reversible visual loss. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* (1989) 98: 166-180.
133. Maloni W, F Iosi, G Formisano, G Arancia. Cytoskeletal changes induced in vitro by 2,5-Hexandione: An immuno-cytochemical study. *Exp. Mol. Pathol.* (1989), 50: 50-68.
134. McLeod JG, SH Wray. Conduction velocity and fibre diameter of the median and ulnar nerves of the baboon. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiat.* (1967), 30: 240-251.
135. Mendell JR, Z Sahenk, K Saida, HR Weiss, R Savage, D Couri. Alterations of fast axoplasmic transport in experimental Methyl-n-Butyl Ketone neuropathy. *Brain Res.* (1977), 133: 107-118.
136. Miller CC, S Ackerley, J Brownlees, AJ Grierson, NL Thornhill. Axonal transport of neurofilaments in normal and disease state. *Cell. Mol. Life Sci.* (2003)59:323-330.
137. Misumi J. Induction of action potentials and determining method of maximum conduction velocity of mixed nerve in rat's tail. *Jap. J. Ind. Health* (1975), 17: 172-181.
138. Misumi J. Electrophysiological studies in vivo on peripheral nerve function and their application to peripheral neuropathy produced by organic mercury in rats. II: Measurement of the maximum conduction velocity of compound action potentials in the tail nerve of healthy rats. *Kumamoto Med. J.* (1974), 32 (1): 1-14.
139. Miyagaki H. Electrophysiological studies on the peripheral neurotoxicity of n-Hexane. *Jap. J. Ind. Health* (1967), 9: 660-671.
140. Miyoshi T. Serial determinations of nerve conduction velocity in normal and alloxanized diabetic rats. *Fukuoka Acta Med.* (1971), 62: 588-603.
141. Monaco S, Twongmongkolrit, CM Shearson et al. Giant axonopathy characterized by intermediate location of axonal enlargements and acceleration of neurofilament transport. *Brain Res.* (1990), 519: 73-81.
142. Monaco S, L Autilio-Gambetti, D Zabel, P Gambetti. Giant axonal neuropathy: Acceleration of neurofilament transport in optic axons. *Proc. Nat. Acad. Sci.* (1985), 82: 920-924.

143. Monaco S, J Jakob, H Jenich, A Patton, L Autilio-Gambetti, P Gambetti. Axonal transport of neurofilament is accelerated in peripheral nerve during 2,5-Hexandione intoxication. *Brain. Res.* (1989), 491: 328-334.
144. Monaco S, L Autilio-Gambetti, R Lasek, M Katz, P Gambetti. Experimental increase of neurofilament transport rate: Decrease in neurofilament number and axon diameter. *J. Neuropath. Exp. Neurol.* (1989), 48: 23-32.
145. Moser VC. Screening approaches to neurotoxicity. *J. Amer. Coll. Toxicol.* (1989), 8: 85-93.
146. Müller L. Untersuchungen zur Wirkung von DL- $\alpha$ -Liponsäure in Cadmium exponierten Hepatozyten. In: Borbe HO, Ulrich H (Hrsg): Thioctsäure. Neue biochemische und pharmakologische Erkenntnisse zur Thioctsäure. Perimed Verlag. Frankfurt 1989: S. 207-222.
147. Mutti A, F Ferri, G Lommi, S Lotti, S Lucertini, I Franchini. N-Hexane-induced changes in nerve conduction velocity and somatosensory evoked potentials. *Int. Arch. Occup. Health* (1982), 51: 45-54.
148. Nagamatsu M, K Nickander, JD Schmelzer, A Raya, F Wittrock, H Tritschler, P Lo: Lipoic acid improves nerve blood flow, reduces oxidative stress and improves distal nerve conduction in experimental diabetic neuropathy. *Diabetes care* (1995), 18: 1160-1167.
149. Natraj CV, VM Gandhi, KKG Menon: Lipoic acid and diabetes: effect of dihydrolipoic acid administration in diabetic rats and rabbits. *J. Biosci.* (1984), 6: 37-46.
150. Nicotera P, S Orrenius. Role of Thiole in protection against biological reactive intermediates. *Adv. Exp. Med. Biol.* (1986), 197: 41-51.
151. Nomiya K, Nomiya H. Respiratory retention, uptake and excretion of organic solvents in man. *Int. Arch. Arbeitsmed.* (1974), 32: 75-82.
152. Ochs S, Brimijoin SW. Axonal flow. In: Dyck PJ, Thomas PK: *Peripheral Neuropathy*. 4th edition, Saunders. Philadelphia, London, Montreal, 1993: S. 331-360.



153. O'Donoghue JL, WJ Krasavage, GD DiVicenzo, DA Ziegler. Commercial-grade Methyl-Heptyl-Ketone (5-Methyl-2-Octanone) neurotoxicity: contribution of 5-Nonanone. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* (1982), 64: 307-316.
154. Oh SJ. *Clinical Electromyography. Nerve conduction studies.* 2<sup>nd</sup> ed. Lippincott Williams, Baltimore 2002.
155. Ono Y, Y Takeuchi, N Hisanaga, M Iwata, J Kitoh, Y Sugiura. Neurotoxicity of petroleum benzene compared with n-Hexane. *Int. Arch. Occup. Environ. Health* (1982), 50: 219-229.
156. Paulson GW, GW Waylonis. Polyneuropathy due to n-Hexane. *Arch. Int. Med.* (1976), 138: 880-882.
157. Perbellini L, D DeGrandis, F Semenzato, N Rizzuto, A Simonati. An experimental study on the neurotoxicity of n-Hexane metabolites: Hexanol-1 and Hexanol-2. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* (1978), 46: 421-427.
158. Perbellini L, MC Amantini, F Brugnone, N Frontali. Urinary excretion of n-Hexane metabolites. *Arch. Toxicol.* (1982), 50: 203-215.
159. Petajan JH. Changes in rat ventral caudal nerve conduction velocity during cold exposure. *Am. J. Physiol.* (1968), 214: 130-132.
160. Petajan JH, SC Packham, DB Frens, BG Dinger. Sequelae of Carbon Monoxide induced hypoxia in the rat. *Arch. Neurol.* (1976), 33: 152-157.
161. Politis MJ, RG Pellegrino, PS Spencer. Ultrastructural studies of the dying-back process. V: Axonal neurofilaments accumulate at sites of 2,5-Hexandione application: Evidence for nerve fibre dysfunction in experimental Hexacarbon neuropathy. *J. Neurocyt.* (1980), 9: 505-516.
162. Powell HC, T Koch, R Garetti, P Lampert. Schwann cell abnormalities in 2,5-Hexandione neuropathy. *J. Neurocyt.* (1987), 7: 517-526.
163. Prineas JW, RA Ouvrier, RG Wright, JC Walsh, JG McLeod. Giant axonal neuropathy - a generalized disorder of cytoplasmic microfilament formation. *J. Neuropath. Exp. Neurol.* (1976), 35: 458-471.

164. Pryor GT, LR Bingham, J Dickinson, CS Rebert, RA Howd. Importance of schedule of exposure to Hexane in causing neurotoxicity. *Neurobehav. Toxicol. Teratol.* (1982), 4: 71-78.
165. Ralston WH, RL Hildebrand, DE Uddin, ME Andersen, RW Gardier. Potentiation of 2,5-Hexandione neurotoxicity by Methyl-Ethyl-Ketone. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* (1985), 81: 319-327.
166. Rammerman WG, JC Honet, RH Jebsen. Serial determination of nerve conduction velocity in the rat. *Arch. Phys. Med.* (1968), 49: 205-209.
167. Rebert CS, PW Houghton, RA Howd, GT Pryor. Effects of Hexane on the brainstem auditory response and caudal nerve action potential. *Neurobehav. Toxicol. Teratol.* (1982), 4: 79-85.
168. Rebert CS, S Sorensen. Concentration-related effects of Hexane on evoked responses from brain and peripheral nerve of the rat. *Neurobehav. Toxicol. Teratol.* (1983), 5: 69-76.
169. Reljanovic M, G Reichel, K Rett, et al. Treatment of diabetic polyneuropathy with the antioxidant thioctic acid (alpha-lipoic-acid): a two year multicenter randomized double-blind-placebo-controlled trial (ALADIN II). *Free Radic. Res.* (1999), 31 (3): 171-179
170. Reschke B, S Zeuzem, C Rosak et al: Hochdosierte Langzeitbehandlung mit Thioctsäure bei der diabetischen Polyneuropathie. Ergebnisse einer kontrollierten Studie unter besonderer Berücksichtigung der autonomen Neuropathie. In: Borbe HO, Ulrich H (Hrsg): Thioctsäure. Neue biochemische und pharmakologische Erkenntnisse zur Thioctsäure. Perimed Verlag. Frankfurt 1989: S. 318-334.
171. Rizzuto N, D DeGrandis, G DiTrepani, E Pasinato. N-Hexane polyneuropathy. An occupational disease of shoemakers. *Eur. Neurol.* (1980), 19: 308-315.
172. Rizzuto N, H Terziani, S Galiazzo-Rizzuto. Toxic polyneuropathy in Italy due to leather cement poisoning in shoe industries. *J. Neurol. Sci.* (1977), 31: 343-354.
173. Rosenberg CK, DC Anthony, GY Szakál-Quin, MB Genter, DG Graham. Hyperbaric Oxygen accelerates the neurotoxicity of 2,5-Hexandione. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* (1987), 87: 374-379.

174. Sabri MI, S Ochs. Characterization of fast and slow transported proteins in dorsal root and sciatic nerve of cat. *J. Neurobiol.* (1972), 4: 145-165.
175. Sabri MI. In vitro effect of n-Hexane and its metabolites on selected enzymes in glycolysis, pentose phosphate pathway and citric acid cycle. *Brain Res.* (1982), 297: 145-150.
176. Sabri MI, CJ Moore, PS Spencer. Studies on the molecular basis of distal axonopathies. I: Inhibition of glycolysis by neurotoxic Hexacarbon compounds. *J Neurochem.* (1979), 32: 683-689.
177. Sabri MI, K Ederle, CE Holdsworth, PS Spencer. Studies on the biochemical basis of distal axonopathies. II: Specific inhibition of Fructose-6-Phosphate Kinase by 2,5-Hexandione and Methyl-Butyl-Ketone. *Neurotox.* (1979), 1: 285-297.
178. Sachs L. *Angewandte Statistik.* Springer Verlag. Heidelberg, New York 7. Aufl., (1992).
179. Sager PR. Cytoskeletal effects of Acrylamide and 2,5-Hexandione: selective aggregation of vimentin filaments. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* (1989), 97: 141-155.
180. Saida K, JR Mendell, HS Weiss. Peripheral nerve changes induced by Methyl-n-Butyl-Ketone and potentiation by Methyl-Ethyl-Ketone. *J. Neuropath. Exp. Neurol.* (1976), 35: 207-225.
181. Sayre LM, CM Shearson, T Wongmongkolrit, R Medori, P Gambetti. Structural basis of  $\gamma$ -Diketone neurotoxicity: Non-neurotoxicity of 3,3-Dimethyl-2,5-Hexandione, a  $\gamma$ -Diketone incapable of pyrrole formation. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* (1986), 84: 36-44.
182. Shibata E, J Huang, N Hisanaga, Y Ono, I Saito, Y Takeuchi. Effects of MEK on kinetics of n-Hexane metabolites in serum. *Arch. Toxicol.* (1990), 64: 247-250.
183. Schaumburg HH, PS Spencer. Degeneration in central and peripheral nervous system produced by pure n-Hexane: An experimental study. *Brain* (1976), 99: 183-192.
184. Schaumburg HH, HM Wisniewski, PS Spencer. Ultrastructural studies of the dying-back process I: Peripheral nerve terminal axon degeneration in systemic Acrylamide intoxication. *J. Neuropath. Exp. Neurol.* (1974), 33: 260-284.
185. Schmidt KH. Mechanismen zur Aufrechterhaltung des Redox-Gleichgewichtes in Zellen. In: Borbe HO, Ulrich H (Hrsg): Thioctsäure. Neue biochemische und

- pharmakologische Erkenntnisse zur Thioctsäure. Perimed Verlag. Frankfurt 1989: S. 118-123.
- 186.Schmidt U, P Grafen, HW Goedde. Chemie und Biochemie der Liponsäure. Angew. Chem. (1965), 77: 900-911.
- 187.Schoenthal R, JB Cavanagh. Mechanisms involved in the „Dying-Back“-Process- an hypothesis implicating coenzymes. Neuropath. Appl. Neurobiol. (1977), 3: 145-157.
- 188.Schuhmacher S. Die segmentale Innervation der Säugetierschwanzes als Beispiel für das Vorkommen einer „kollateralen Innervation“. Anat. Hefte (1909), 40: 47-94.
- 189.Selden SC, TD Pollard. Phosphorylation of microtubule-associated proteins regulates their interaction with actin filaments. J. Biol. Chem. (1983), 258: 7064-7011.
- 190.Seppäläinen AM, M Antti-Poika. Time course of electrophysiological findings for patients with solvent poisoning. Scand. J. Work Environ. Health (1983), 9: 15-24.
- 191.Sidenius P, J Jakobsen. Anterograde axonal transport in rats during intoxication with Acrylamide. J. Neurochem. (1983), 40: 697-704.
- 192.Simpson JA. Facts and fallacy in measurement of conduction velocity in motor nerves. J. Neurol. Neurosurg. Psychiat. (1964), 27: 381-386.
- 193.Somjen GG, SP Herman, R Klein. Electrophysiology of Methyl Mercury poisoning. J. Pharmacol. Exp. Ther. (1973), 186: 579-592.
- 194.Spence JT, DB McCormick. Lipoic acid metabolism in the rat. Arch. Biochem. Biophys. (1976), 174: 13-19.
- 195.Spencer PS, HH Schaumburg, RL Raleigh, CJ Terhaar. Nervous system degeneration by the industrial solvent Methyl-n-Butyl Ketone. Arch. Neurol. (1975), 32: 219-222.
- 196.Spencer PS, HH Schaumburg. Distal axonopathy: One common type of neurotoxic lesion. Environ. Health Perspec. (1978), 26: 97-105.
- 197.Spencer PS, HH Schaumburg. Organic solvent neurotoxicity: Neurophysiological and behavioral effects. Scand. Work. Environ. Health (1985), 11(Suppl. 1): 52-60.
- 198.Spencer PS, HH Schaumburg, Ludolph AC. Experimental and Clinical Neurotoxicology. 2<sup>nd</sup> edition, Oxford University Press, New York / Oxford 2000.

- 199.Spencer PS, HH Schaumburg. Classification of neurotoxic disease: A morphologic approach. In: Spencer PS, HH Schaumburg (Hrsg.): Experimental and Clinical Neurotoxicology. Williams and Wilkins. Baltimore, London 1985. S: 92-99.
- 200.Spencer PS, HH Schaumburg. Ultrastructural studies of the dying-back process. IV: Differential vulnerability of PNS and CNS fibers in experimental central-peripheral distal axonopathies. J. Neuropath. Exp. Neurol. (1977), 36: 300-320.
- 201.Spencer PS, MI Sabri, M Politis. Methyl-n-Butyl Ketone, Carbon disulfide and Acrylamide. Putative mechanism of neurotoxic damage. In: Manzo L (Hrsg.): Advances in Neurotoxicology. Pergamon Press, USA, 1980. S: 412-423
- 202.Spencer PS, HH Schaumburg, MI Sabri, B Veronesi. The enlarging view of Hexacarbene neurotoxicity. CRC Critical Reviews in Toxicology (1980): 279-360.
- 203.Spencer PS, HH Schaumburg. Ultrastructural studies of the dying-back process. III: The evolution of experimental peripheral giant axonal degeneration. J. Neuropath. Exp. Neurol. (1977), 36: 276-299.
- 204.Spencer PS, M Bischoff, HH Schaumburg. On the specific molecular configuration of neurotoxic aliphatic Hexacarbon compounds causing central-peripheral distal axonopathy. Toxicol. Appl. Pharmacol. (1978), 44: 17-28.
- 205.Spencer PS, MI Sabri, HH Schaumburg, CJ Moore. Does a defect of energy metabolism in the nerve fiber underlie axonal degeneration in polyneuropathies? Ann. Neurol. (1979), 5: 501-507.
- 206.Spencer PS, HH Schaumburg. Experimental neuropathy produced by 2,5-Hexandione - a major metabolite of the neurotoxic industrial solvent Methyl-n-Butyl Ketone. J. Neurol. Neurosurg. Psychiat. (1975), 38: 771-775.
- 207.Spencer PS, HH Schaumburg, PK Thomas. Disorders of peripheral nerves. FA Davis, Philadelphia, USA, 1983.
- 208.Spencer PS, MS Kim, MI Sabri. Aromatic as well as aliphatic hydrocarbon solvent axonopathy. Int. J. Hyg. Environ. Health (2002), 205:131-136.
- 209.Sprince H. Protective action of Sulfur compounds against Aldehyde toxicants of cigarette smoke. Eur. J. Respir. Dis. (1985), 66 (Suppl. 139): 102-112.

210. Steg G. Efferent muscle innervation and rigidity. *Acta Physiol. Scand.* (1964), 61 (Suppl.225): 1-53.
211. Steg G. A morphological description of the rat tail muscles. *Acta Physiol. Scand.* (1964), 61 (Suppl.225): 8-9.
212. Stevens MJ, I Obrosova, C Xianghui, C Van Huysen, DA Greene. Effects of DL- $\alpha$ -Lipoic Acid on peripheral nerve conduction, blood flow, energy metabolism and oxidative stress in experimental diabetic neuropathy. *Diabetes* (2000), 49: 1006-1015.
213. Stoltenburg-Didinger G, F Boegner, W Grüning. Specific neurotoxic effects of different organic solvents on dissociated cultures of nervous system. *Neurotox.* (1992), 13:161-164.
214. Stoltenburg-Didinger G, H Altenkirch. Neurotoxic effects of Hexacarbonyls, 1,4-Diketones, 2-Hexanone and n-Hexane. In: Johns TC (Hrsg.): *Monographs on pathology of laboratory animals. Nervous system.* Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York. 1988.
215. Stone JD, AP Peterson, J Eyer et al. Neurofilaments are non-essential elements of toxicant-induced reductions in fast axonal transport: pulse labeling in CNS neurons. *Neurotoxicology.* 2000 Aug;21(4):447-57.
216. Stracke H, E Dietrich, K Federlin. Änderung subjektiver Beschwerden und objektive Meßgrößen bei 19 Diabetikern unter Therapie mit Thioctsäure. In: Borbe HO, Ulrich H (Hrsg): *Thioctsäure. Neue biochemische und pharmakologische Erkenntnisse zur Thioctsäure.* Perimed Verlag. Frankfurt 1989: S. 350-360.
217. Suzuki T, S Shimbo, H Nishitami. Muscular atrophy due to glue sniffing. *Int. Arch. Arbeitsmed.* (1974), 33: 115-123.
218. Taegtmeyer H. JM Passmore. Defective energy metabolism of the heart in diabetes. *Lancet* (1985), 19: 139-141.
219. Takeuchi Y, Y Ono, N Hisanaga, J Kitoh, Y Sugiura. A comparative study on the neurotoxicity of n-Pentane, n-Hexane and n-Heptane in the rat. *Brit. J. Ind. Med.* (1980), 37: 241-247.

220. Takeuchi Y, Y Ono, N Hisanaga. An experimental study on the combined effects of n-Hexane and Toluene on the peripheral nerve of the rat. *Brit. J. Ind. Med.* (1981), 38: 14-19.
221. Takeuchi Y, Y Ono, N Hisanaga, I Kitoh, S Sugiura. A comparative study of the toxicity of n-Pentane, n-Hexane and n-Heptane to the peripheral nerve of the rat. *Clin. Toxicol.* (1981), 18(12):1395-1402.
222. Tami H, M Hayashi, K Hashimoto. Neurofilament degradation in the nervous system of rats intoxicated with Acrylamide, related compounds or 2,5-Hexandione. *Arch. Toxicol.* (1988), 62: 70-75.
223. Tandan R, WG Bradly, MJ Fillway. Giant axonal neuropathy studies with sulfhydryl donor compounds. *J. Neurol. Sci.* (1990), 95: 153-162.
224. Teichert J, J Kern, HJ Tritschler, H Ulrich, R Preiss. Investigations on the pharmacokinetics of alpha-lipoic acid in healthy volunteers. *Int. J. Clin. Pharmacol. Ther.* (1998), 36: 625-628.
225. Thomas PK. The peripheral nervous system as a target for toxic substances. In: Spencer PS, Schaumburg HH (Hrsg.): *Experimental and Clinical Neurotoxicology*. Williams and Wilkins, Baltimore/London, 1985: S. 35-47.
226. Thomas PK. Morphological basis for alterations in nerve conduction in peripheral neuropathies. *Proc. R. Soc. Med.* (1971), 64: 295-298.
227. Thornton JA, D Whelpton, BH Brown. The effect of general anaesthetic agents on nerve conduction velocities. *Brit. J. Anaesth.* (1968), 40: 583-587.
228. Toftgard R, T Haarparanta, L Eng, J Halpert. Rat lung and liver microsomal cytochrome p-450 Isoenzymes involved in the hydroxylation of n-Hexane. *Biochem. Pharmacol.* (1986), 35: 3733-3738.
229. Totskii VN. Mechanisms and regulatory pathways of the penetration of lipoic acid into biological structures. *Biokhimiya* (1978), 41: 1094-1105.
230. Towfighi J, NK Gonatas, D Pleasure, HS Cooper, L McCree. Glue sniffers neuropathy. *Neurology* (1976), 26: 238-243.

231. Truhaut R, P Laget, G Piat et al. Premiers resultats électrophysiologiques après intoxications expérimentales par l'hexane et par l'heptane techniques chez le rat blanc. Arch. Mal. Prof. Med. Trav. Soc. (1973), 34: 417-426.
232. Veronesi B, ER Peterson, MB Bornstein, PS Spencer. Ultrastructural studies of the dying back process: VI. Examination of nerve fibers undergoing giant axonal degeneration in organotypic culture. J. Neuropath. Exp. Neurol. (1983), 42: 153-165.
233. Wagh SS, CV Natraj, KKG Menon. Mode of action of lipoic acid in diabetes. J. Biosci. (1987), 11: 59-74.
234. Weis , W Dimpfel, JM Schröder. Nerve conduction changes and fine ultrastructural alterations of extra- and intrafusal muscle and nerve fibers in streptozotocin diabetic rats. Muscle & Nerve (1995), 16(2): 175-184.
235. Wolfsum CH. Zur Clusteranalyse von Verlaufskurven. Psychologische Beiträge (1980), 22: 574-580.
236. Xu G, MP Singh, D Gopal, LM Sayre. Novel 2,5-Hexanedione analogues. Substituent-induced control of the protein cross-linking potential and oxidation susceptibility of the resulting primary amine-derived pyrroles. Chem. Res. Toxicol. (2001), 14:264-274.
237. Yamamura Y. N-Hexane polyneuropathy. Folia Psych. Neurol. Jap. (1969), 23: 45-57.
238. Zagoren JC, MJ Politis, PS Spencer. Rapid reorganisation of the axonal cytoskeleton induced by a  $\gamma$ -Diketone. Brain Res. (1983), 270: 162-164.
239. Ziegler D, FA Gries. Treatment with  $\alpha$ -Lipoic acid in diabetic peripheral and cardiac autonomic neuropathy. In: Fuchs J, L Packer, G Zimmer (Hrsg.): Lipoic acid in health and disease. Marcel Dekker. New York 1997. S.: 407-422..
240. Ziegler D, M Hanefeld, KJ Ruhnau et al. Treatment of symptomatic diabetic neuropathy with the antioxidant  $\alpha$ -Lipoic Acid. Diabetologia (1995), 38: 1425-1433.
241. Ziegler D, F Conrad, H Ulrich et al. Effects of treatment with the antioxidant  $\alpha$ -Lipoic Acid on cardiac autonomic neuropathy in non-insulin-dependent patients. A four-month randomized controlled trial (DEKRAN-Study). Clin. Auton. Res. (1995), 5: 323 (Abstract).



242. Ziegler D, H Nowak, P Kemplert et al.. Treatment of symptomatic diabetic polyneuropathy with the antioxidant  $\alpha$ -lipoic acid: a meta-analysis. *Diab. Med.* (2004), 21: 114-121.
243. Ziegler D, A Ametov, A Barinov et al.. Oral treatment with  $\alpha$ -Lipoic Acis improves symptomatic diabetic Polyneuropathy. The SIDNEY 2 Trail. *Diabetes Care* (2006), 29: 2365-2370.

## 11. DANKSAGUNG

Herrn Prof. Dr. Altenkirch danke ich für mehr als 20 Jahre der Zusammenarbeit. Als klinischer Lehrer, akademischer Diskussionspartner, wacher und kritischer Geist und nicht zuletzt als freundschaftlicher Begleiter hat er meinen Weg in die Neurologie und die Neurotoxikologie zuverlässig begleitet und gefördert. Für die Überlassung des Themas der Arbeit und die Unterstützung während der Fertigstellung der Arbeit sei Herrn Prof. Altenkirch besonders gedankt.

Die Diskussionen mit Frau Prof. Dr. G. Stoltenburg-Didinger (Inst. f. Neuropathologie der Charité Berlin) und Herrn Prof. em. Dr. M. Wagner (TU Berlin und Institut für Wasser-, Boden- und Lufthygiene des Bundesgesundheitsamtes) waren jederzeit motivierend und fruchtbar. In diesen Gesprächen wurden die in dieser Arbeit aufgestellten Thesen vorbereitet.

Frau Dr. med. vet. J. Herrmann war eine jederzeit hilfsbereite Kollegin bei der Vorbereitung und Durchführung der Versuche, ihrem Organisationstalent und ihrer konstruktiven Kritik war der zügige Ablauf der Versuchsphase zu danken.

Fr. Dr. Gerling-Hopmann, Herrn D. Hopmann und Frau Dr. Thiem sei gedankt für die geduldige Hilfe bei Korrektur und Layout der Arbeit.

## **12. LEBENSLAUF**

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht

### **13. PUBLIKATIONSLISTE**

Altenkirch H, Hopmann D, Brockmeier B, Walter G. Neurological investigations in 23 cases of pyrethroid intoxication reported to the German Federal Health Office. *Neurotoxicology* (1996)17(3-4):645-651.

Altenkirch H, Stoltenburg G, Haller D, Hopmann D, Walter G. Clinical data on three cases of occupationally induced PCB-intoxication. *Neurotoxicology* (1996)17(3-4):639-643.

Altenkirch H, Stoltenburg-Didinger G, Wagner HM, Herrmann J, Walter G. Effects of lipoic acid in hexacarbon-induced neuropathy. *Neurotoxicol. Teratol.* (1990) 12(6):619-22.

## **14. SELBSTSTÄNDIGKEITSERKLÄRUNG**

Ich erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Neurophysiologische Untersuchungen zur Wirksamkeit der alpha-Liponsäure bei der experimentellen Hexacarbonneuropathie“ selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.