

### **3. MATERIAL UND METHODEN**

#### **3.1. Material**

##### **3.1.1. Versuchstiere**

Für die Versuche wurden männliche Mäuse des Inzuchtstammes C57Bl/6 im Alter von 2,5-12 Monaten mit einem altersabhängigen Körpergewicht (KGW) von 20-45 g verwendet. Zum Aufbau einer institutseigenen Zucht wurden männliche und weibliche C57Bl/6 von Charles River (Sulzfeld, BRD) bezogen. Für Versuche dienten sowohl Tiere der eigenen Nachzucht als auch bei Charles River bezogene C57Bl/6 und Mäuse dieses Stammes aus der Forschungseinrichtung für experimentelle Medizin (FEM) der Charité, Campus Benjamin Franklin (Berlin, BRD). Tiere aus externen Beständen wurden erst nach einer Eingewöhnungsphase in das institutsinterne Haltungssystem von mindestens zwei Wochen in die Versuche aufgenommen.

##### **3.1.2. Haltung und Fütterung**

Zucht und Haltung erfolgten im institutseigenen Tierstall unter Standardbedingungen (Raumtemperatur  $23 \pm 1$  °C, relative Luftfeuchtigkeit  $60 \pm 5\%$ , zwölfstündiger Hell-Dunkel-Rhythmus mit einer Lichtphase von 6-18 Uhr). Die Versuchstiere wurden in Gruppen zu 2-6 Mäusen auf Standardeinstreu (Altromin®, Altrogge, Lage, BRD) in Kunststoffkäfigen mit Metallabdeckungen (Makrolon®, Normtyp III und IV) gehalten. Zum Schutz der implantierten Führungskanülen (s. 3.2.2.2.) wurden operierte Tiere in erhöhten Einzelkäfigen (Makrolon®, Normtyp III-180) untergebracht; zur Eingewöhnung erfolgte die Umsetzung eine Woche vor Versuchsbeginn. Alle Tiere erhielten Trinkwasser und Standardfutter (Altromin® Nr. 1324, Altrogge, Lage, BRD) ad libitum. Die durchgeführten Tierversuche waren von der zuständigen Behörde genehmigt (Landesamt für Arbeitsschutz, Gesundheitsschutz und technische Sicherheit, Berlin, Genehmigungsnummer G0059/04).

##### **3.1.3. Verwendete Substanzen**

Rotenon, 6-Hydroxydopamin (6-OHDA) und Dehydroepiandrosteron (DHEA) wurden von der Fa. Sigma-Aldrich (Saint Louis, USA) bezogen. L (+) Ascorbinsäure (Ascorbat) stammte von der Fa. Roth (Karlsruhe, BRD). Miglyol® 812 (mittelkettige Triglyceride) wurde zur Verwendung als Lösungsmittel von der Fa. Caesar & Loretz (Hilden, BRD), 0,9%ige Kochsalz

(NaCl)- Lösung von der Fa. Braun (Melsungen, BRD) bezogen. Die verwendeten Substanzen sind mit ihren für die Versuche ausschlaggebenden Eigenschaften, sowie Applikationen, Dosierungen, Injektionsvolumina und dem jeweiligen Lösungsmittel in Tab. 4 aufgeführt.

Rotenon wurde zur Verringerung der Exposition des Untersuchers mit der Festsubstanz im 3-Tagesrhythmus im Vehikel (Miglyol) gelöst. Alle weiteren Substanzen wurden frisch vor der Applikation angesetzt. Die benötigten Wirkstoffmengen wurden auf einer Feinwaage (Sartorius, Goettingen, BRD) abgewogen und anschließend auf einem Magnetrührer im Vehikel gelöst. Im Umgang mit den potentiellen Neurotoxinen Rotenon und 6-OHDA wurden Arbeitsschutzmaßnahmen getroffen, so wurden Vinylhandschuhe und Atemschutzmasken getragen und unter einem Abzug gearbeitet. Um einen frühzeitigen Zerfall von 6-OHDA durch seine hohe Lichtempfindlichkeit zu vermeiden, wurde die Lösung (mit und ohne Ascorbat-Zusatz) bis zur Injektion durch eine Aluminiumfolie vor Lichteinfall geschützt und auf Eis gelagert.

Die verwendeten Dosierungen wurden in Anlehnung an Literaturangaben bei Nagern (s. 2.7.2.1.) gewählt. In Untersuchungen zur Dosisfindung wurde zudem die akute Toxizität von Rotenon (2,5 -5 mg/kg s.c.) bei Mäusen (n=4) sowie die Dosierungen von 6-OHDA und DHEA (insgesamt 12 Mäuse) bestimmt (4.1.1. und 4.2.1.).

Substanz	Eigenschaften	Applikation (Anzahl)	Dosierungen (Injektionsvolumen)	Lösungsmittel
<b>Rotenon</b> (Pestizid, Zytotoxin)	Komplex I- Hemmung	s.c. (30; 45)	2,5; 4,0/5,0 mg/kg KGW (5 ml/kg KGW)	Miglyol
<b>6-OHDA</b> (Neurotoxin)	Radikalbildung	bilateral intrastriatal (1; 5; 7)	8 µg/Hemisphäre (2 µl/Hemisphäre)	0,9% NaCl- Lösung
<b>6-OHDA</b> (Neurotoxin) + <b>Ascorbat</b> (Antioxidans)	Radikalbildung (6-OHDA) + Stabilisation der Lösung (Ascorbat)	bilateral intrastriatal (1)	8 µg/Hemisphäre (6-OHDA) 0,4 µg/Hemisphäre (Ascorbat) (2 µl/Hemisphäre)	0,9% NaCl- Lösung
<b>DHEA</b> (Neurosteroid)	Modulation am GABA <sub>A</sub> - und NMDA- Rezeptor	i.p. (5; 7)	10 mg/kg KGW (10 ml/kg KGW)	Miglyol

**Tab. 4: Verwendete Substanzen** mit ausschlaggebenden Eigenschaften und Applikationen. Es wurden zwei potentielle Neurotoxine (Rotenon, 6-OHDA), ein Antioxidans (Ascorbat) und ein Neuromodulator (DHEA) eingesetzt. Rotenon wurde im 3-Tagesrhythmus, alle übrigen Substanzen am Versuchstag in 0,9%iger NaCl-Lösung bzw. in Miglyol gelöst. Die Dosierungen und Injektionsvolumina beziehen sich auf kg KGW bzw. auf eine Gehirnhälfte (Hemisphäre).

## 3.2. Methoden

Inhalt dieser Arbeit ist die Entwicklung und Validierung von Tiermodellen für PD. Hierzu wurden zwei Toxinmodelle in der Maus untersucht:

1. **Rotenon:** chronische s.c. Injektion,
2. **6-OHDA:** akute vergleichend zu subchronischen, bilateralen striatalen Injektion; Untersuchung der Effekte von DHEA im subchronischen Modell.

In diesen Tiermodellen wurden folgende Untersuchungen durchgeführt:

- Beurteilung der Vitalität und des motorischen Verhaltens,
- Histologische und immunhistochemische Untersuchungen auf pathomorphologische Veränderungen im ZNS, insbesondere des dopaminergen Systems,
- Histologische Beurteilung der systemischen Toxizität im Rotenon-Modell (Leber, Niere, Hoden, Milz).

Im Folgenden wird jeweils die Methodik zur Entwicklung der beiden Tiermodelle beschrieben. Im Anschluss werden die Methoden zur Untersuchung der Modelle ausgeführt und die statistische Auswertung angegeben.

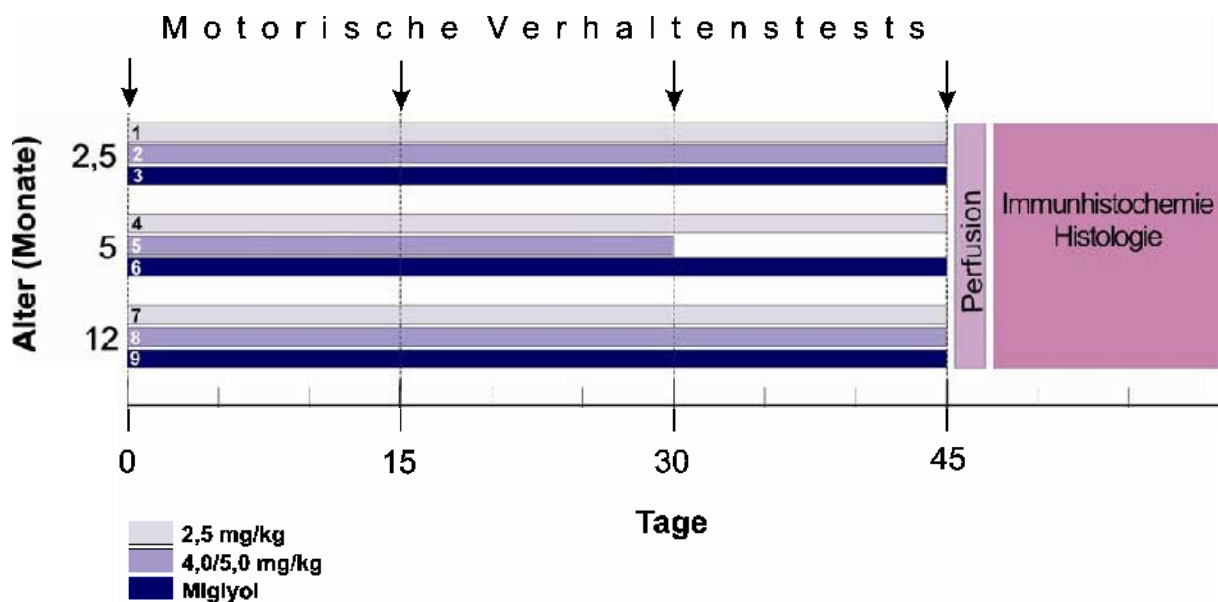
### 3.2.1. Entwicklung eines chronischen Rotenon-induzierten Mausmodells

Bei der Maus wurde Rotenon bislang nur akut bis subchronisch appliziert. In dieser Untersuchung wurde nach akuter Applikation von 10 mg/kg Rotenon ein Anstieg der Dopaminmetaboliten und des Laktatspiegels im Striatum beobachtet, der 7 Tage nach der Injektion nicht mehr vorhanden war (s. auch 2.7.2.1., Thiffault et al., 2000). Zur Entwicklung eines chronischen Rotenon-induzierten Mausmodells wurde das Rotenon-Modell der Ratte zugrunde gelegt (Alam und Schmidt, 2002; Betarbet et al., 2000; Sherer et al., 2003). Rotenon wurde drei Altersgruppen (2,5, 5 und 12 Monate) von Mäusen täglich über 45 Tage s.c. injiziert. Wie Untersuchungen zur Dosisfindung zeigten, konnten 18 Monate alte Mäuse nicht einbezogen werden, da nach 7 Injektionen über einen Zeitraum von 2 Wochen eine hohe Letalität und sehr schlechtes Allgemeinbefinden auftraten und der Versuch abgebrochen werden musste. Deutliche Leberdegenerationen waren in den getöteten Tieren bereits makroskopisch zu erkennen. Wie im Folgenden näher beschrieben, wurden über den Behandlungszeitraum zu vier Zeitpunkten Verhaltenstests durchgeführt. Die Verhaltenstests erstreckten sich über 2 Tage, wobei erst nach den Versuchen injiziert wurde, um einen Einfluss akuter Effekte des Toxins zu verhindern, bzw. an Tag 2 auf eine Injektion von

Rotenon verzichtet wurde, um den durch die Versuche geschwächten Tieren eine Erholungsphase zu ermöglichen. Tab. 5 und Abb. 11 zeigen eine Übersicht der verwendeten Versuchsgruppen und der zugehörigen Injektionsregime sowie den zeitlichen Ablauf der Versuche.

Nr. der Tiergruppe	Alter	Anzahl der Tiere	s.c. Injektion
1	2,5 Monate	8 (7)	45 Tage Rotenon 2,5 mg/kg
2		8 (6)	45 Tage Rotenon 4,0 mg/kg
3		6	45 Tage Vehikel 5,0 ml/kg (Kontrollgruppe)
4	5 Monate	10 (9)	45 Tage Rotenon 2,5 mg/kg
5		10 (6)	30 Tage Rotenon 5,0 mg/kg
6		5	45 Tage Vehikel 5,0 ml/kg (Kontrollgruppe)
7	12 Monate	14 (11)	45 Tage Rotenon 2,5 mg/kg
8		14 (12)	45 Tage Rotenon 4,0 mg/kg
9		10	45 Tage Vehikel 5,0 ml/kg (Kontrollgruppe)

**Tab. 5: Versuchsgruppen zur Entwicklung eines chronischen Rotenon-Modells** in der Maus. Es wurden drei Altersgruppen mit je drei Versuchsgruppen aus 5-14 Tieren (insgesamt 85 Mäuse) verwendet. Als Vehikel wurde Miglyol gewählt. Die in Klammern genannte Zahl entspricht der Gruppengröße zum Versuchsende nach Tierverlusten. Das Injektionsvolumen betrug 5 ml/kg KGW.



**Abb. 11: Versuchsablauf zur Entwicklung und Validierung eines chronischen Rotenon-Modells** bei 2,5, 5 und 12 Monate alten Mäusen. An Tag 0, 15, 30 und 45 des Behandlungszeitraumes wurden motorische Verhaltenstests durchgeführt. An diesen Tagen wurden die Tiere nicht injiziert. Die Injektion der 5 Monate alten Tiere mit 5,0 mg/kg KGW Rotenon (Gruppe 5) musste aufgrund der hohen Letalität am 30. Tag abgebrochen werden. Nach Abschluss des Behandlungszeitraumes wurden die Tiere narkotisiert, transkardial perfundiert und die Gehirne, sowie Leber, Milz, Nieren und Hoden zur weiteren Auswertung entnommen. Die Angabe der Dosierungen ist bezogen auf das KGW.

Die Injektion der 5 Monate alten Tiere mit 5,0 mg/kg KGW Rotenon (Gruppe 5) musste aufgrund der hohen Letalität am 30. Tag abgebrochen werden. Gruppe 2 und 8 erhielten aufgrund dessen eine herabgesenkte Dosis von 4,0 mg/kg KGW. Als Vehikel wurde in Anlehnung an Alam und Schmidt (2004) Miglyol® 812 (mittelkettige Triglyceride) verwendet. Da das ölige Vehikel in der Unterhaut nicht sofort resorbiert wird und eine Kontamination des Felles der Tiere durch die toxische Lösung vermieden werden sollte, wurde das Injektionsvolumen von 10 ml/kg KGW (Standardvolumen für die Maus) auf 5 ml/kg KGW gesenkt. Um akute Verhaltenseffekte zu protokollieren, wurden alle Versuchstiere nach der Injektion über 5 h stündlich jeweils für 5-10 min einer adspektorischen Untersuchung in ihren Heimkäfigen unterzogen. Nach Abschluss des Behandlungszeitraumes wurden die Tiere narkotisiert, transkardial perfundiert und die Gehirne, sowie Leber, Milz, Nieren und Hoden zur weiteren Auswertung entnommen.

### **3.2.2. Entwicklung eines subchronischen 6-OHDA-induzierten Mausmodells**

#### **3.2.2.1. Einteilung der verwendeten Versuchsgruppen**

Stellt sich das Rotenon-Mausmodell als nicht geeignet heraus, sollte in einer zweiten Versuchsreihe der Einfluss subchronischer Injektionen von 6-OHDA bilateral intrastriatal in der Maus getestet werden, wie in Kap. 2.7.2. begründet wurde. Es sollte eine Dosierung und ein Applikationsregime gewählt werden, wodurch initial (nach eintägiger Applikation) eine partielle Läsion des nigrostriatalen Systems hervorgerufen wird (s. Tab. 6). Dies würde eher einem frühen Stadium des Parkinson-Syndroms entsprechen und sich daher eher zur Testung neuroprotektiver Strategien eignen (Deumens et al., 2002; Gerlach und Riederer, 1996).

In dieser Arbeit wurde erstmals 6-OHDA nach subchronischem *Applikationsregime* über 5 und 7 Tage appliziert und die Effekte mit akuten Läsionen derselben Dosierung verglichen (vgl. Tab. 7). Es muss beachtet werden, dass 6-OHDA durch autooxidative Prozesse in Lösung zerfällt und daher häufig mit einem Zusatz von Ascorbat stabilisiert wird (zu 6-OHDA-Dosierungen und Ascorbatkonzentrationen mit den zugehörigen Literaturstellen s. Tab. 3, 2.7.2.). Um neuroprotektive Effekte von Ascorbat zu umgehen, wurde im Rahmen dieser Arbeit untersucht, ob auf diesen Zusatz bei entsprechenden Schutzmaßnahmen gegen eine frühzeitige Oxidation von 6-OHDA auch verzichtet werden könnte (Ehrhart und Zeevalk, 2003).

Basierend auf den Literaturangaben (s. 2.7.2.) wurde in Versuchen an einzelnen Tieren eine Dosis von 8 µg pro Hemisphäre, ein Injektionsvolumen von 2 µl und ein Zeitraum bis zur Tötung der Tiere nach der ersten Injektion von 12 Tagen als geeignet festgelegt (s. auch 4.2.1.). Da im chronischen Rotenon-Mausmodell keine neurodegenerativen Effekte nachweisbar waren (s. Ergebnisse 4.1.2.7.), sollten erste Versuche mit dem Neurosteroid Dehydroepiandrosteron (DHEA) hinsichtlich seiner neuroprotektiven Eigenschaften im 6-OHDA-Modell ergänzt werden.

Innerhalb dieses Modells wurden daher ein akutes und ein subchronisches Injektionsregime verwendet. Um eine möglichst hohe Vergleichbarkeit zu gewährleisten, wurden in beiden Modellen chronisch stereotaktisch Führungskanülen implantiert (s. 3.2.2.2.).

Im *akuten Modell* erfolgte eine einmalige Injektion von 8 µg 6-OHDA in 2 µl Vehikel pro Hemisphäre (Tab. 6: Gruppen Nr. 1-4). Als Vehikel wurde in Gruppe 1 und 2 0,9% NaCl-Lösung verwendet („schein-läsionierte“ Tiere). Aus oben genannten Gründen wurde zum Vergleich in Gruppe 3 und 4 die Lösung durch das Antioxidans Ascorbinsäure (0,02%ige Lösung) stabilisiert.

Im *subchronischen Modell* wurde über 5 bzw. 7 Tage täglich 8 µg 6-OHDA in 2 µl 0,9% NaCl-Lösung (Vehikel) pro Hemisphäre (Tab. 7: Gruppen Nr. 6-8; 10-12) intrastriatal appliziert. Auf einen Zusatz von Ascorbinsäure wurde verzichtet, da es im akuten Modell keine Effekte zeigte (s. Ergebnisse, 4.2.3.). Zwei Versuchsgruppen (Gruppen Nr. 5 und 9) dienten als unbehandelte („naive“) Kontrolltiere und wurden nicht operiert, um den Einfluss der stereotaktischen Operation beurteilen zu können.

Jeweils 3 h vor dem Zeitpunkt der Mikroinjektion wurde in Gruppe 5-8 das Vehikel Miglyol, und in Gruppe 9-12 das *Neurosteroid DHEA* i.p. verabreicht. In Versuchen an einzelnen Tieren wurde die Injektionsdosis von DHEA basierend auf Literaturangaben festgelegt (Ben-Nathan et al., 1991; D'Astous et al., 2003; Maurice et al., 2000; Negrette et al., 2001).

Vor der Operation und nach der Mikroinjektion wurden Verhaltenstests zur Untersuchung der Motorik durchgeführt. Zwölf Tage nach der ersten Injektion wurden die Tiere narkotisiert, transkardial perfundiert (s. 3.2.4.) und die Gehirne zur weiteren Auswertung entnommen (s. Abb. 12).

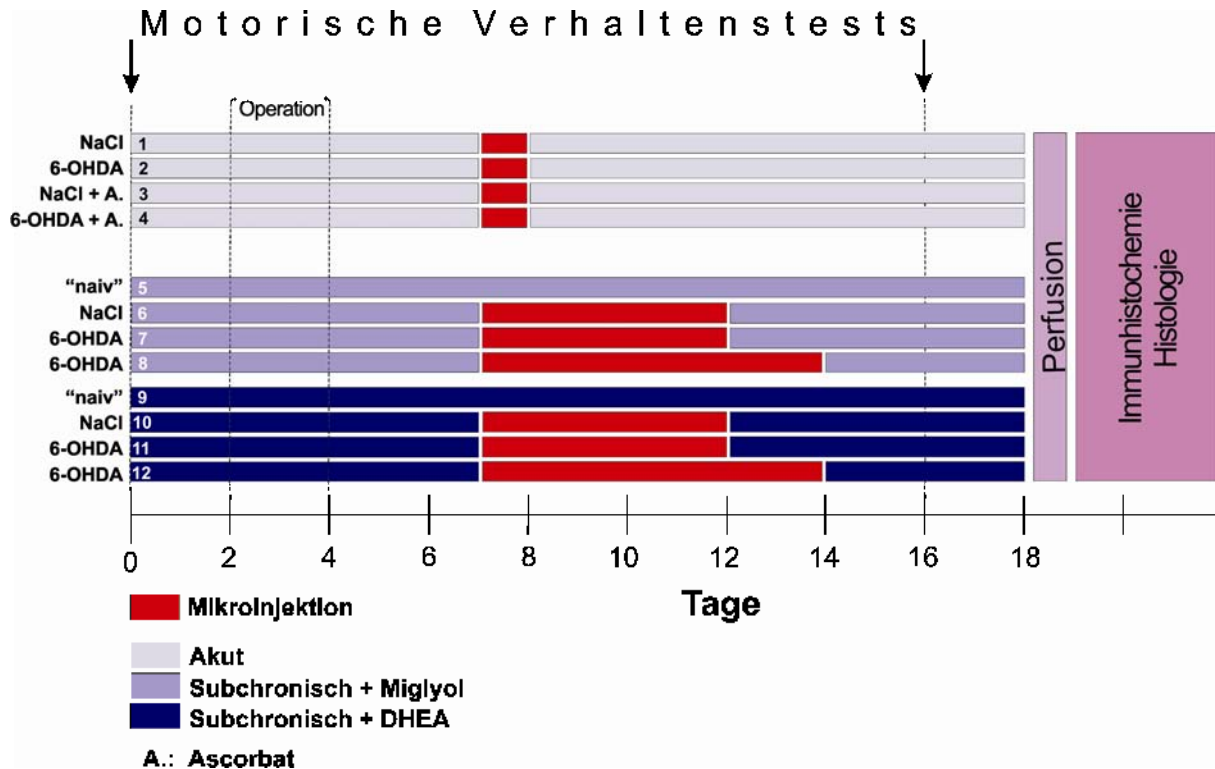
**Tab. 6: Versuchsgruppen: akutes 6-OHDA-Modell**

Nr. der Tiergruppe	Anzahl der Tiere	Applikationsdauer (d)	Mikroinjektion / Hemisphäre
1	5	1	2 µl NaCl intrastriatal (Vehikelkontrolle zu Gruppe 2)
2	6	1	8 µg 6-OHDA/ 2 µl NaCl intrastriatal
3	5	1	0,4 µg Ascorbat/ 2 µl NaCl intrastriatal (Vehikel mit Ascorbat, Kontrolle zu Gruppe 4)
4	5	1	8 µg 6-OHDA + 0,4 µg Ascorbat/ 2 µl NaCl intrastriatal

**Tab. 7: Versuchsgruppen: subchronisches 6-OHDA-Modell**

Nr. der Tiergruppe	Anzahl der Tiere	Applikationsdauer (d)	Mikroinjektion / Hemisphäre	i.p. Injektion
5	6	5	keine Mikroinjektion	Vehikel 10 ml/kg
6	5	5	2 µl NaCl intrastriatal	
7	6	5	8 µg 6-OHDA/ 2 µl NaCl intrastriatal	
8	5	7	8 µg 6-OHDA/ 2 µl NaCl intrastriatal	
9	6	5	keine Operation / Mikroinjektion	DHEA 10 mg/kg
10	5	5	2 µl NaCl intrastriatal	
11	6	5	8 µg 6-OHDA/ 2µl NaCl intrastriatal	
12	6	7	8 µg 6-OHDA/ 2µl NaCl intrastriatal	

**Tab. 6 und 7:** Übersicht über die Versuchsgruppen zur Entwicklung eines 6-OHDA-Läsions-Modells in der Maus. Es wurden 12 Versuchsgruppen zu je 5-6 Tieren verwendet. 4 Gruppen wurde akut (Tab. 6), 8 Gruppen subchronisch (Tab. 7), d.h. 5 bzw. 7 Tage (d), die angegebenen Vehikel bzw. Substanzen bilateral striatal injiziert. Das Injektionsvolumen betrug bei allen Tieren 2 µl/ Hemisphäre. Die i.p. Injektion von DHEA (Vehikel: Miglyol) im subchronischen Modell wurde 3 h vor der Mikroinjektion durchgeführt. Das Injektionsvolumen betrug 10 ml/kg KGW. Die Methoden zur Implantation der Führungskanülen und zur Mikroinjektion werden im Folgenden erläutert. Insgesamt wurden 66 Tiere zur Entwicklung und Validierung dieses Modells verwendet.



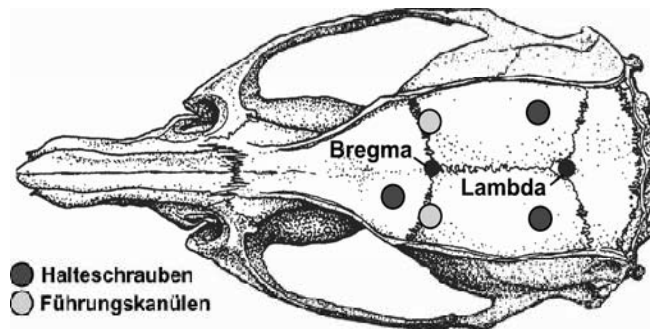
**Abb. 12:** Versuchsablauf zur Entwicklung und Validierung eines akuten vs. subchronischen 6-OHDA-Modells in der Maus. Vor der Operation und nach der Mikroinjektion wurden Verhaltenstests (s. Pfeile) zur Untersuchung der Motorik durchgeführt. Im akuten Modell wurde in zwei Gruppen Ascorbat (A.) als Antioxidans der Injektionslösung hinzugefügt. Im subchronischen Modell wurde je 3 h vor dem Zeitpunkt der Mikroinjektion das Neurosteroid DHEA bzw. als Vehikel Miglyol i.p. verabreicht. 12 Tage nach der ersten Injektion wurden die Tiere narkotisiert, transkardial perfundiert und die Gehirne zur weiteren Auswertung entnommen. Die Zahlen in den Balken geben die Nr. der Tiergruppe an (vgl. Tab. 6 und 7).

### 3.2.2.2. Stereotaktische Implantation der Führungskanülen für intrastriatale 6-OHDA-Applikationen

Im Alter von 3 Monaten wurden die Versuchstiere einer Operation zur chronischen Implantation der Führungskanülen für die bilaterale striatale Mikroinjektion unterzogen. Die Methodik war in den Details der Durchführung zuvor in Versuchen an einzelnen Tieren erprobt worden (s. 4.2.1.). Zur Narkotisierung wurde 60 mg/kg KGW Pentobarbital (Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA) mit einem Injektionsvolumen von 10 ml/kg KGW i.p. verabreicht. Die Operation basiert auf der Methode von Paxinos und Watson (1986) und wurde mit Hilfe einer stereotaktischen Apparatur (TSE Systems GmbH, Bad Homburg, BRD) durchgeführt. Nach der Rasur des Operationsfeldes erfolgte das Einspannen der Mäuse im Stereotakt durch Fixierung mittels Stäben in den Gehörgängen. Im Anschluss an die Desinfektion mit 70%igem Ethanol wurde die Kopfhaut und die Unterhaut median mit einem Skalpell über eine Länge von 15 mm eröffnet. Das Periost der freigelegten Schädeldecke wurde mittels



Skalpellschneide vom Knochen gelöst und dieser mit 30%igem Wasserstoffperoxid (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) desinfiziert und gebleicht. Hierdurch traten die Kreuzungspunkte der Knochennähte, die Sutura lambdoidea (Lambda) und Bregma (s. Abb. 13), sichtbar hervor und konnten auf einer Höhe ausgerichtet werden.



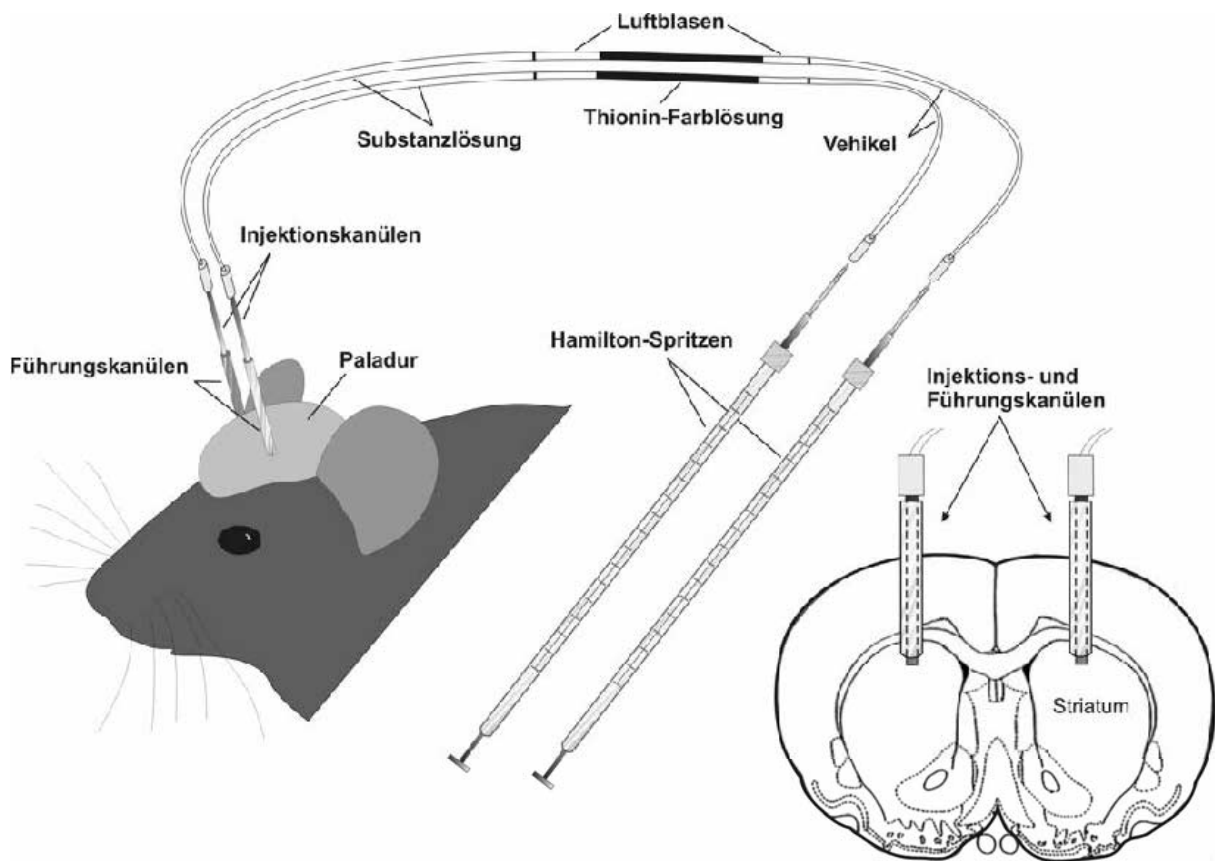
**Abb. 13: Schädel einer Ratte** mit den eingezeichneten Knochenplatten (nach Paxinos und Watson, 1986). Die markierten Kreuzungspunkte Bregma und Sutura Lambdoidea (Lambda) dienen bei der stereotaktischen Operation der Ausrichtung des Schädels und zur Positionierung der Führungskanülen und Halteschrauben (exemplarisch am Rattenschädel markiert).

Es erfolgte nun die Markierung der Trepanationsstellen für die Implantation der Führungskanülen. Zur Orientierung diente ein stereotaktischer Atlas für die Maus (Paxinos und Franklin, 2001), womit folgende Koordinaten festgelegt wurden: 0,8 mm anterior und 1,9 mm lateral zu Bregma. Nach Markierung drei weiterer Trepanationsstellen für die Halteschrauben, wurden alle markierten Punkte ausgebohrt (Bohrmaschine: Dremel, Breda, Niederlande). Nach Eindrehen der Halteschrauben wurden beide Führungskanülen (Länge: 12,2 mm, äußerer Durchmesser: 0,70 mm, innerer Durchmesser: 0,45 mm) auf 2,6 mm ventral von Bregma abgesenkt und mit einem Kunststoff-Kaltpolymerisat (Paladur®, Heraeus, Hanau, BRD) zusammen mit den Halteschrauben an der Schädeldecke fixiert. Abschließend wurde die Kopfhaut rostral und kaudal des Paladur®-Aufbaus durch Einzelhefte adaptiert. Um eine innere Verlegung der Führungskanülen mit Einstreu oder Sekreten zu verhindern, erfolgte das Einsetzen von Mandrins. Während der Operation und bis zum Erwachen aus der Narkose wurden die Mäuse auf Wärmematten gelegt und unter postoperative Beobachtung gestellt.

### 3.2.2.3. Mikroinjektion

Nach postoperativer Rekonvaleszenz von mindestens zwei Tagen wurde den Versuchstieren via Mikroinjektion 6-OHDA bzw. Vehikel in das dorsale Striatum injiziert. Die hier beschriebene Mikroinjektionstechnik basiert auf einer am Institut etablierten Methode (Hamann und Richter, 2002; Sander und Richter, 2006). Wie in Abb. 14 dargestellt, wurden zwei Hamilton-Spritzen (Hamilton Bonaduz AG, Bonaduz, Schweiz) mit einem Fassungs-

vermögen von 2  $\mu\text{l}$  über einen durchsichtigen Mikrotubus aus flexiblem Plastik (CMA, Solna, Schweden) mit zwei Injektionskanülen (äußerer Durchmesser: 0,40 mm, innerer Durchmesser: 0,20 mm, Länge: 13,2 mm) verbunden. In die Plastikschräuche wurden Vehikel bzw. Substanzlösung getrennt durch zwei Luftblasen von einer dazwischen liegenden Thionin-Farbstofflösung aufgezogen. Anhand der Bewegung des Thionin-Balkens im Schlauch konnte die applizierte Menge während der Injektion kontrolliert werden. Jetzt wurden die Mandrins aus den Führungskanülen entfernt und die Injektionskanülen eingeführt, welche die Führungskanülen im Striatum um einen mm überragten (s. Abb. 14).



**Abb. 14: Aufbau des Systems für die Mikroinjektionen.** Über Plastikschräuche sind zwei Hamilton-Spritzen (Fassungsvolumen = Injektionsvolumen = 2  $\mu\text{l}$ ) mit den Injektionskanülen verbunden. Es wurden Vehikel und Substanzlösung getrennt durch zwei Luftblasen mit einer dazwischen liegenden Thionin-Farbstofflösung aufgezogen. Nach Einsetzen der 1 mm längeren Injektionsnadeln in die Führungskanülen wurde über einen Zeitraum von 10 min (0,2  $\mu\text{l}/\text{min}$ ) appliziert. Der Transversalschnitt des Mäusegehirns in der Ebene 0,8 mm anterior zu Bregma zeigt die Lokalisation der Führungskanülen mit eingesetzten Injektionskanülen.

Anschließend erfolgte das Umsetzen der Tiere zur Injektion in einen leeren Makrolonkäfig. Nach 1 min Adaptationszeit wurde mit der Injektion begonnen und das Injektionsvolumen von 2 µl über 10 min (0,2 µl/min/Hemisphäre) bilateral appliziert. Die Injektionskanülen verblieben weitere 5 min in den Führungskanülen, um eine vollständige Diffusion der Injektionslösung in das umgebende Gewebe zu gewährleisten. Im Anschluss wurden die Injektionskanülen wieder durch Mandrins ersetzt. Während der Injektion wurden auftretende Verhaltensauffälligkeiten protokolliert. Zur Kontrolle der Lokalisation der Führungskanülen wurden die Mäuse nach Beendigung der Versuche perfundiert und eine Serie von Gehirnschnitten mittels einer histologischen Färbung beurteilt (s. 3.2.6.). In die Auswertung wurden nur Tiere einbezogen, deren Führungskanülen korrekt im dorsalen Anteil des Striatums lokalisiert waren.

**Folgende Methoden werden gemeinsam für beide Tiermodelle abgehandelt:**

- Untersuchungen der Vitalität und des motorischen Verhaltens,
- Perfusion und Anfertigung von Organschnitten,
- immunhistochemische Markierung,
- histologische Färbungen.

**3.2.3. Untersuchung der Vitalität und der Motorik**

Die Vitalität der Tiere wurde über den Behandlungszeitraum anhand des KGW und des Allgemeinzustandes beurteilt und protokolliert. In allen zuvor beschriebenen Tiergruppen wurden an festgelegten Versuchstagen (s. Abb. 11 und 12) die Effekte der Behandlung auf die Motorik untersucht. Die Durchführung der Verhaltensversuche fanden mit Rücksicht auf den zirkadianen Rhythmus der Tiere stets im Zeitraum von 8.30 bis 14 Uhr in einem vom Tageslicht abgeschirmten Raum (Lichtintensität: 320-480 Lux) und unter konstanten Temperaturverhältnissen ( $24 \pm 2$  °C) statt. Den Tieren wurde vorab 1 h Eingewöhnungszeit an die Umgebung im Versuchsraum gewährt. Die Reinigung der Apparaturen erfolgte jeweils vor Beginn des Versuches für jedes Tier, um Einflüsse durch die Wahrnehmung von Artgenossen auf das Verhalten auszuschließen. Die Versuchsreihenfolge wurde festgelegt und für jedes Tier zu jedem Versuchszeitpunkt beibehalten. Bei der Bezeichnung der Verhaltenstests werden in dieser Arbeit die englischen Begriffe verwendet. Ein geeignetes PD-Modell sollte eine verminderte motorische Aktivität, Koordination und Initiation der Bewegung sowie hyperkinetische Effekte (Tremor) entwickeln. Da motorische Defizite zentral neurologisch und nicht durch die Abnahme der Muskelkraft oder durch Störungen der

Reflexe bedingt sein müssen, wurden diese ebenfalls bestimmt. Folgende Parameter wurden untersucht: neurologische Reflexe (Lidschlag-, Stellungs-, Haltungs-, und Orientierungsreflex sowie Hautsensibilität), lokomotorische Aktivität (Open field, Activity cage), Koordination (Rotarod), Muskelkraft (Wire-hang Test, Grip-strength Test), Katalepsie (Block-Test, Paw-retraction Test) und Ganganalysen (Foot-print-pattern). Da für das Open field eine höhere Sensitivität hinsichtlich vorangegangener Testdurchläufe beschrieben ist, wurden die Verhaltensuntersuchungen auf 2 Tage aufgeteilt (Paylor et al., 2006). An Tag 1 wurde die Bewegungsaktivität im Open field gemessen. Mäuse der Rotenon-Versuchsgruppe wurden erst im Anschluss an die Untersuchung injiziert, um Einflüsse akuter Effekte der Substanz zu vermeiden. An Tag 2 wurden die übrigen Tests durchgeführt, aufgereiht nach Sensitivität hinsichtlich vorangegangener Testdurchläufe, beginnend mit dem Activity cage. Nach dem Rotarod-Test und den Versuchen zur Muskelkraft wurden jeweils 5 min Erholungszeit eingehalten. An diesem Tag wurden die Tiere nicht mit Rotenon injiziert. Die Durchführung der Versuche fand in Anlehnung an frühere Studien bei Mäusen im hiesigen Institut statt (Hamann et. al, 2003; weitere Literaturangaben s. 2.7.2.2.).

#### 3.2.3.1. Neurologische Reflexe

Im Rahmen der Verhaltenstests wurden zur weiteren Protokollierung des allgemeinen Gesundheitsstatus der Tiere die neurologischen Reflexe überprüft. Ein Reflex wurde als ungestört bezeichnet, wenn zwischen dem Stimulus und der Reflexantwort maximal 1 s lag. Mit einem sauberen Wattestäbchen wurde durch vorsichtiges Tippen auf die Augen der *Lidschlagreflex* überprüft. Durch Berühren der Ohren mit dem Stäbchen war bei ausreichender *Hautsensibilität* ein Zurückziehen der Ohrmuschel auslösbar. Weiterhin wurde durch leichtes Berühren der Tasthaare am frei sitzenden Tier mit einem Wattestäbchen der *Orientierungsreflex* überprüft. Gesunde Tiere reagieren durch sofortiges Innehalten und drehen sich zu der Körperseite, wo sie berührt wurden. Zur Kontrolle der *Haltungsreflexe* wurden die Mäuse in leere Makrolonkäfige gesetzt und vorsichtig hin und her geschwenkt, wobei das kontrollierte Gegenstützen der Gliedmaßen bewertet wurde. Um die *Stellungsreflexe* zu überprüfen, wurden die Mäuse auf den Rücken gedreht und protokolliert, ob sie sich nach dem Freilassen sofort wieder in Bauchlage drehen.

### 3.2.3.2. Lokomotorische Aktivität

#### *Open field*

Es wurde eine mit weißer Folie ausgekleidete Box (50 x 50 x 30 cm) aus Holz verwendet. Diese befand sich in einer für Verhaltenstests installierten abschließbaren Kammer unter gleich bleibenden Versuchsbedingungen. Durch eine oberhalb der Box angebrachte Kamera (TSE Systems, Bad Homburg, BRD) war die Beobachtung der Tiere über einen Monitor außerhalb der Kammer möglich. Auf dem Bildschirm wurde das Beobachtungsfeld durch vier Linien gleichmäßig in neun Quadrate unterteilt. Die Tiere wurden zentral in das Offenfeld gesetzt und jeweils für 5 min beobachtet. Es wurde die Anzahl der vollständig überquerten Linien (**horizontale Bewegungsaktivität, Transitions**), das Aufrichten des Oberkörpers unter Abheben beider Vorderbeine (**vertikale Bewegungsaktivität, Rearing**) und die **Putzaktivität (Grooming)** protokolliert. Der Versuch wurde auf Videokassette aufgezeichnet.

#### *Activity cage*

Die Apparatur zur Aktivitätsmessung (Model 7420, UGO BASILE, Comerio, VA, Italien) besteht aus einer Box (41 x 41 x 33 cm) mit durchsichtigen Seitenwänden aus Acrylglas. Über Infrarot-Sensoren wird die horizontale (Transitions) und die vertikale (Rearing) Bewegungsaktivität bestimmt. Die Ergebnisse wurden über ein elektronisches Kontrollsystem ausgedruckt. Nach Absetzen der Tiere im zentralen Bereich der Box wurde für 5 min die Bewegungsaktivität aufgezeichnet. Im akuten 6-OHDA-Mausmodell wird auf die Darstellung der Ergebnisse des Activity cage verzichtet, da die Testapparatur zu diesem Zeitpunkt eine Fehlfunktion aufwies.

### 3.2.3.3. Koordination

#### *Akzelerierendes Rotarod (Drehstab)*

Es wurde ein „Accelerating-Rota-Rod“ für Mäuse (Model 7650, Robert & Jones, UGO BASILE, Comerio, VA, Italien) verwendet. Ein Drehstab aus profiliertem Hartgummi wird über einen Elektromotor angetrieben und ist durch Plastikscheiben in 5 Bereiche abgeteilt. 15 cm unterhalb des Stabes befindet sich für jeden Bereich eine Kontaktplatte, die mit einem digitalen Sekundenzählwerk verbunden ist. Nach Aufsetzen der Maus auf den Drehstab erfolgt die Zählung der Laufzeit bis die Kontaktplatte beim Herabfallen berührt wird. Im Accelerating-Modus wird die Umdrehungsgeschwindigkeit über 300 Sekunden (s) von 4

Rotationen pro min (rpm) kontinuierlich auf 40 rpm gesteigert (Laufgeschwindigkeit: 38-380 cm/min). Die Tiere wurden einzeln auf die Walze gesetzt und 60 s bei 4 rpm trainiert. Anschließend erfolgte die Umstellung auf den Accelerating-Modus. Die Zeit bis zum Herabfallen vom Drehstab („Latency to fall“) wurde protokolliert. Wenn der Maximalwert von 300 s (40 rpm) erreicht war, wurde der Test beendet.

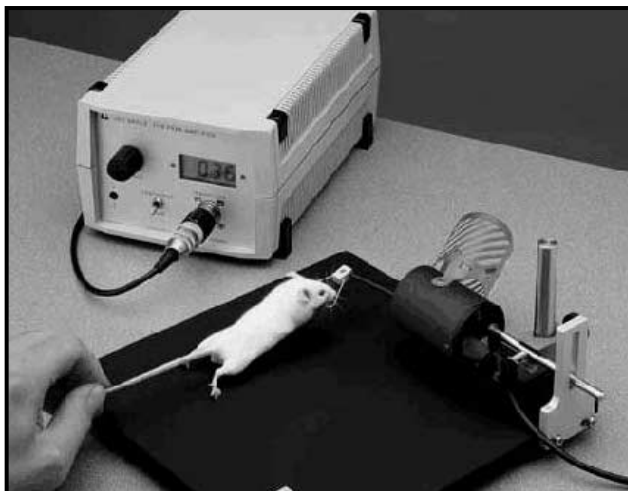
#### 3.2.3.4. Muskelkraft

##### „Wire-hang Test“

Es wird ermittelt, wie lange sich die Maus an einem Käfigdeckel hängend festhalten kann. Somit kann auf die Griffstärke von Vorder- und Hintergliedmaßen geschlossen werden. Ein Käfigdeckel aus Edelstahl (Normtyp III) wurde an den Rändern mit festem Klebeband abgedeckt, so dass eine innere Fläche von 20 x 15 cm verblieb. Die Maus wurde für 60 s auf diese Fläche gesetzt. Anschließend wurde der Käfigdeckel unter vorsichtigem Schütteln um 90° und nach 60 s um weitere 90° gedreht und dabei ca. 15 cm über der Tischfläche gehalten. Die Zeit bis zum Herabfallen vom Käfigdeckel („Latency to fall“) wurde protokolliert (Maximalwert je Position: 60 s).

##### Griffstärke-Messung (Grip-strength Test)

Hierzu wurde ein „Grip Strength Meter“ für Mäuse (Model 47106, UGO BASILE, Comerio, VA, Italien) verwendet (s. Abb. 15). Mit dieser Apparatur wurde die Griffstärke an den Vordergliedmaßen ermittelt. Jede Maus wurde aufeinander folgend 5 Versuchen unterzogen, deren Ergebnisse (Griffstärke in Gramm) gemittelt wurden.



**Abb. 15:** „Grip Strength Meter“ für Mäuse (Abb. des Herstellers). Die Maus greift beim vorsichtigen Zurückziehen reflexartig mit den Vordergliedmaßen nach einem schmalen Metallbügel. Übersteigt die nach hinten ziehende Kraft des Untersuchers diejenige der Maus, lässt sie den Bügel los. Auf der Digitalanzeige wird die erreichte Griffstärke in g kontinuierlich angezeigt und kann protokolliert werden.

### 3.2.3.5. Katalepsie

Um eine Katalepsie (Bewegungsstarre) erfassen zu können, werden Tiere passiv in eine unphysiologische Körperhaltung gebracht, und die Zeit gemessen, in der sie in dieser Position verharren („Latency to move“). Als Maximalwert wurden 30 s zugrunde gelegt.

#### *Block-Test*

Hierbei wurden die Tiere mit den Vordergliedmaßen auf einen lackierten Holzblock mit einer Grundfläche von 6 x 6 cm und einer Höhe von 4 cm gesetzt. Gemessen wurde die Zeit, in der die Maus mit beiden Vorderbeinen ohne äußere Manipulation auf dem Block verharrte.

#### *„Paw-retraction Test“*

Eine auf 6 cm erhöhte Plattform (13 x 7 x 0,5 cm) aus Hartplastik wurde mit 2 x 2 Bohrlöchern versehen (Durchmesser 2 x 1 cm; 2 x 1,5 cm). Die Maus wurde so auf die Plattform gesetzt, dass Vorder- und Hintergliedmaßen jeweils in ein Loch passten. Gemessen wurde die Zeit bis das Tier eine Gliedmaße zurückzog („paw-retraction“) und aufsetzte. Vor der Verwendung der hergestellten Plattform zur Beschreibung der Tiermodelle wurde ihre Eignung zur Feststellung eines kataleptischen Zustandes an einzelnen Mäusen, welche mit verschiedenen Dosierungen von Haloperidol (0,1-1,0 mg/kg KGW i.p.) behandelt wurden, bestätigt. Das Neuroleptikum Haloperidol, ein D<sub>2</sub>-Rezeptorantagonist, löst im Ratten- und Mausmodell dosisabhängig Katalepsie aus (Sanberg, 1980).

### 3.2.3.6. Ganganalysen

#### *Foot-print-pattern („Footprints“)*

Mittels ungiftiger Farbe (Plaka®, Pelikan, Hannover, BRD) wurden die Vorder- und Hintergliedmaßen verschiedenfarbig markiert. Dann wurde die Maus in den Eingang eines blickdichten Tunnels (85 x 5 x 5 cm) gesetzt, auf dessen Boden sich liniertes Papier befand.

Der Abstand zwischen zwei Linien betrug 6 mm. Beim Durchqueren des Tunnels entstanden so „Fuß“-Abdrücke, welche Rückschlüsse auf den Gang zuließen (s. Abb. 16). Bewertet wurde der Abstand zwischen dem Abdruck der Vordergliedmaße zur Hintergliedmaße einer Seite, wobei im Normalfall bei Mäusen beide Abdrücke eng beieinander liegen. Außerdem sollten sich Regelmäßigkeit der Schrittlänge und der Schrittfolge zeigen.



**Abb. 16:** „Footprints“ einer Maus mit physiologischem Schrittmuster. Die regelmäßigen Abdrücke der Hintergliedmaßen (rot) liegen dicht neben den Abdrücken der Vordergliedmaßen (schwarz).

#### 3.2.4. Perfusion und Anfertigung von Organschnitten

Die Anfertigung von Organschnitten zur immunhistochemischen und histologischen Untersuchung erforderte die Perfusion der Tiere nach Versuchsende mit einer Fixanslösung. Hierzu wurden die Mäuse mit Pentobarbital (100 mg/kg KGW i.p.) in tiefe Narkose gelegt. Bei bereits ausgesetzter Atmung und fehlender Tiefensensibilität erfolgte die Eröffnung der Bauch- und Brusthöhle am in Rückenlage fixierten Tier. Die linke Herzkammer wurde an der Herzspitze punktiert, eine Knopfkanüle eingeführt und diese mit einer Klemme fixiert. Die Kanüle war durch ein Schlauchsystem über einen Drei-Wege-Hahn mit zwei Behältern verbunden, wobei der eine 0,01 M phosphatgepufferte NaCl-Lösung und der andere die Fixanslösung (4%iges gepuffertes Paraformaldehyd) enthielt. Nach Eröffnung der rechten Vorkammer wurde das Blutkreislaufsystem zuerst mit ca. 50 ml der PBS-Lösung durchspült, um das Tier zu entbluten und die Bildung von Blutkoagula zu vermeiden. Anschließend erfolgte die Perfusion mit 100 ml Fixanslösung. Allen perfundierten Tieren wurde daraufhin das Gehirn entnommen und über Nacht in der Fixanslösung belassen, da Erfahrungen aus früheren Studien an einem Tiermodell eine homogenere Markierung der Neurone in der Immunhistochemie bei gleichmäßiger Fixierung zeigten (Nobrega et al., 1999). Anschließend erfolgte die Aufbewahrung der Gehirne zur Kryoprotektion bei der Anfertigung von Gefrierschnitten in einer 30%igen phosphatgepufferten Zuckerlösung bei 4 °C über einen Zeitraum von mindestens 2 Tagen. Weiterhin wurden den mit Rotenon applizierten Mäusen sowie den entsprechenden Kontrolltieren jeweils die Milz, die Leber, die Nieren und die Hoden entnommen und in 4%iger Formaldehydlösung bei 4 °C bis zur weiteren Behandlung nachfixiert. Die Herstellung der verwendeten Lösungen ist im Anhang in Tab. A1 aufgeführt. Tab. 8 zeigt eine Übersicht der anschließend angefertigten Organschnitte mit den jeweils verwendeten histologischen bzw. immunhistochemischen Methoden.



ROTENON-Modell		6-OHDA-Modell
<b>Gehirn</b> => Gefrierschnitte (40 µm)	<b>Milz, Leber, Nieren, Hoden</b> => Paraffinschnitte (5 µm)	<b>Gehirn</b> => Gefrierschnitte (40 µm)
<ul style="list-style-type: none"> <li>• TH-Immunhistochemie</li> <li>• Thionin-Färbung</li> <li>• Silberimprägnierung*</li> <li>• HE-Färbung*</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• HE-Färbung</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• TH-Immunhistochemie</li> <li>• Thionin-Färbung</li> </ul>

**Tab. 8: Übersicht der angefertigten Organschnitte und Färbungen** bzw. Markierungen für beide Versuchsgruppen (\* exemplarisch an 20/ 40 µm dicken Schnitten).

40 µm dicke *Transversalschnitte der Gehirne* wurden mit dem Gefriermikrotom (MICROM, Walldorf, BRD) nach Markierung der rechten Gehirnhälfte in zwei Serien angefertigt. Eine Serie wurde für die TH-Immunhistochemie verwendet (s. 3.2.5.), die zweite für histologische Färbungen. Exemplarisch wurden weiterhin von Gehirnen der Rotenon-Versuchsgruppe (2,5 Monate alt) in der zweiten Serie 20 µm dicke Schnitte angefertigt, welche mit der HE-Färbung bzw. der Silberimprägnierung weiterbehandelt wurden. Die Gehirnschnitte verblieben bis zum weiteren Verfahren in 0,1 M Phosphatpuffer.

Die *Herstellung von Paraffinschnitten* erfolgte am Institut für Tierpathologie des Fachbereiches Veterinärmedizin an der Freien Universität Berlin. Von Milz, Leber, Nieren und Hoden der Rotenon-Versuchsgruppe wurden ca. 10 x 10 x 3 mm große Geweblöcke angefertigt und maximal 24 h in 4%igem Formaldehyd fixiert und mit einem Automaten (VIP E300; Sakura Finetek, Heppenheim, BRD) entwässert. Anschließend erfolgte die Einbettung in Paraffin (Paraffin-Ausgieß-Station Shandon, Thermo Electron, Dreieich, BRD). Von den entstandenen Paraffinblöcken wurden mit einem Mikrotom (Typ SM2000 R; Leica Microsystems, Bensheim, BRD) 5 µm dicke Schnitte angefertigt. Diese wurden in einem Wasserbad (40 °C) aufgefangen und direkt auf mit Aminopropyltriethoxysilan beschichtete Objektträger übertragen. Über Nacht erfolgte die Trocknung im Brutschrank bei 37 °C. Anschließend wurden die Schnitte entparaffiniert und rehydriert.

### 3.2.5. Immunhistochemische Markierung

Die erste Serie der 40 µm dicken Gefrierschnitte der Gehirne aller in dieser Arbeit verwendeten Versuchstiere (insgesamt 151 Gehirne) wurde einer immunhistochemischen Markierung der TH zur Bestimmung der Dichte dopaminerger Neurone in der Substantia nigra (SN) und ihrer Nervenfaserdichte im Striatum unterzogen, da in einem geeigneten PD-Modell hier neuropathologische Effekte auftreten müssen.

### 3.2.5.1. Tyrosinhydroxylase (TH)-Immunhistochemie

Die Methode dient zur Markierung und Sichtbarmachung dopaminerger Neurone, in dem Antikörper (Ak) gegen das Enzym TH, ein Schlüsselenzym im Dopaminstoffwechsel (s. 2.2.1.), spezifisch an dieses sich im Gewebe befindenden Protein gebunden wird. Nach der oben beschriebenen Anfertigung der Gehirnschnitte wurden diese zunächst in 0,1 M Phosphatpuffer (pH 7,4) aufgefangen und dreimalig in TRIS (*tris*-(Hydroxymethyl)aminomethan) gepufferter isotoner NaCl-Lösung (TBS = *tris*-buffered saline; pH 7,6) für 10 min gewaschen. Diese Reinigung von überschüssigen Reaktionsrückständen erfolgte auch zwischen den Vorgängen und wird im Folgenden nicht explizit erwähnt.

Die immunhistochemische Markierung der in den jeweiligen Lösungen frei flotierenden Gehirnschnitte erfolgte zur Übersicht in folgenden Schritten:

- 30 min: Inkubation der Schnitte mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>
- 60 min: Inkubation mit der „Blocking“-Lösung zur Reduktion unspezifischer Bindungen
- 20 h: Inkubation mit dem primären Ak (bindet direkt an die TH)
- 60 min: Inkubation mit dem sekundären Ak (bindet an den primären Ak)
- 60 min: Inkubation mit dem Enzym Streptavidin-Meerrettich-Peroxidase (Umsetzung der Farbreaktion)
- 15 min: Vorinkubation mit DAB (3,3'-Diaminobenzidin, Farbreagenz)
- 15 min: Zugabe von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Substrat für die Meerrettich-Peroxidase: DAB wird umgesetzt und sichtbar)

Im ersten Schritt fand eine Vorinkubation in 5 ml TBS unter Zusatz von 75 µl H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> statt, wodurch eventuell vorhandene Blutrückstände beseitigt wurden. Anschließend reduzierte die Inkubation mit der „Blocking“-Lösung (s. Anhang Tab. A1) unspezifische Bindungen des primären Ak. Für die Inkubation mit den Ak wurde eine so genannte „Carrier“-Lösung (s. Anhang Tab. A1) verwendet. Es folgte die Inkubation mit dem primären Ak (monoklonales Anti-TH IgG aus dem Kaninchen; Dianova, Hamburg, BRD; Konzentration 1:2000). Anschließend wurden die Gehirnschnitte mit dem sekundären Ak (Schwein-Anti-Kaninchen IgG, biotinyliert; Dako, Hamburg, BRD; Konzentration 1:500) inkubiert. Die geeigneten Ak-Konzentrationen waren zuvor ermittelt worden. Nach Bindung des sekundären Ak wurde mit dem Enzym Streptavidin-Meerrettich-Peroxidase (= horse radish peroxidase; 1:375 in TBS) inkubiert. Anschließend an eine Vorinkubation der Schnitte mit einer Nickel-DAB-Lösung wurde die Farbreaktion mit 1 µl H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> pro 4 ml DAB-Lösung in Gang gesetzt. Abschließend wurden die Schnitte noch dreimalig mit TBS gewaschen.

Entfettete Objektträger wurden mit einer Glycerin-Eiweiß-Lösung beschichtet und die Gehirnschnitte sortiert nach anterior-posterior Ebene aufgezogen. Nach Lufttrocknung und Entwässerung der Schnitte in Toluol konnten sie mit einem Einbettungsmedium (Entellan®) eingedeckt werden.

Die Herstellung der verwendeten Lösungen ist im Anhang in Tab. A1 aufgeführt.

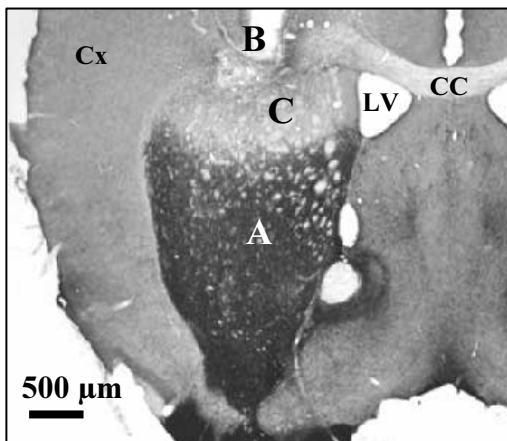
### 3.2.5.2. Auswertung der immunhistochemisch markierten Gehirnschnitte

Vor Beginn der Auswertung wurden die Objektträger verschlüsselt, so dass der Untersucher keine Kenntnis darüber hatte, ob die Schnitte von behandelten bzw. Kontrolltieren stammten. Nach der Ermittlung aller Werte erfolgten die Entschlüsselung und die Zuordnung zur jeweiligen Versuchsgruppe. Die Auswertung wurde mittels eines Bildanalyse-Systems (Visitron Systems GmbH, Puchheim, BRD) durchgeführt. Über eine Kamera (RT Slider, Spot Diagnostic Instruments, Michigan, USA) wurden die durch ein Mikroskop (Zeiss, Jena, BRD) vergrößerten Bilder der Gehirnschnitte auf den Monitor eines Computers projiziert.

#### *Striatum*

Im *Rotenon-Modell* wurde die Dichte TH-positiver Fasern im Striatum beider Hemisphären mit Hilfe einer Grauwertmessung (erstellt durch das Bildanalyse-System) verglichen. Es wurde je ein Gehirnschnitt aus dem Bereich des anterioren, mittleren und posterioren (1,34; 0,74; und 0,14 anterior zu Bregma) Striatum ausgewertet (Rozas et al., 1998). Hierzu wurde jeweils ein Bildausschnitt (4,736 mm x 3,552 mm) des Striatums einer Gehirnhälfte in 25facher Vergrößerung bei konstanter Belichtungszeit und unter gleich bleibenden Licht- und Kontrasteinstellungen erstellt. Das Striatum wurde als zu messende Fläche umfahren und ein zuvor anhand der durchschnittlichen Grauwerte der jeweils immunhistochemisch markierten Gehirne definierter minimaler Grauwert („Threshold for dark objects“) mit den Grauwerten innerhalb dieser Fläche verglichen. Alle Bildpunkte, deren Grauwert über dem festgelegten Grenzwert lag, wurden vom System zu einer Fläche addiert und der prozentuale Anteil an der Gesamtfläche angegeben. Je größer dieser Flächenanteil ausfiel, desto stärker war die immunhistochemische Markierung und somit die striatale Faserdichte. Da die immunhistochemische Färbung eine unterschiedliche Farbtintensität in Abhängigkeit von dem Fixierungsgrad der Schnitte und den verwendeten Lösungen zeigen konnte, wurden zu vergleichende Schnitte gemeinsam behandelt und ausgewertet.

Im *6-OHDA-Modell* wurde zu Beginn der Auswertung die Lokalisation der Führungskanülen anhand des Einstichkanals in das Striatum für jedes Gehirn kontrolliert. Am tiefsten Punkt sollten sich die Kanülen im dorsalen Striatum im Bereich von 0,8 mm anterior zu Bregma befinden. Es war aufgrund der intrastriatalen Applikation des Toxins in einem umschriebenen Bereich unterhalb der Kanülen eine Läsionierung zu erwarten, sichtbar durch eine deutliche Aufhellung der immunhistochemischen Färbung (s. Abb. 17). War eine Aufhellungszone erkennbar, wurde diese in jedem vorhandenen Schnitt bei 25facher Vergrößerung (Okular: 10fach, Objektiv: 2,5fach) mittels eines Bildausschnittes (4,736 mm x 3,552 mm erstellt durch das Bildanalyse-System) ausgemessen (Angabe in mm<sup>2</sup>). Um den prozentualen Anteil der Läsion am gesamten Striatum zu errechnen, wurde weiterhin für das entsprechende Gehirn die Gesamtfläche des Striatums aller Schnitte vermessen.

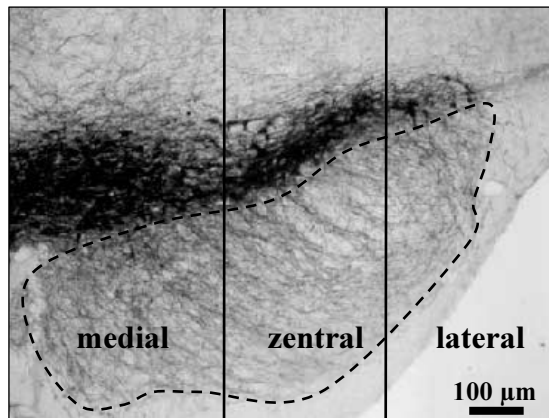


**Abb. 17: Histologische Abb. mit läsiertem Striatum** der Maus nach Markierung TH-positiver Nervenfasern (25fache Vergrößerung eines Transversalschnittes). Der deutlich schwarz gefärbte Bereich (A) stellt das markierte Striatum dar. Zu erkennen ist der Einstichkanal der Führungskanüle (B) und die sich darunter befindende scharf abgrenzbare Aufhellungszone der Läsion (C). Umgeben ist das Striatum vom Corpus Callosum (CC), das wiederum vom Kortex (Cx) umgeben ist. Zur Medianen wird das Striatum vom lateralen Ventrikel (LV) begrenzt. Der Kalibrierungsbalken entspricht 500 µm im histologischen Schnitt.

#### *Nigrale Neurone (SN)*

Die SN wurde anhand des stereotaktischen Atlas für das Mäusegehirn (Paxinos und Franklin, 2001) lokalisiert: 2,80-3,80 mm posterior zu Bregma. In dieser Arbeit wurde zur Auswertung des *Rotenon-Mausmodells* die SN der jeweiligen Gehirnhälfte innerhalb dieser Koordinaten von medial nach lateral in 3 Subregionen unterteilt (s. Abb. 18). Die „pars compacta“ der Substantia nigra (SNc) wird durch die mediale und die zentrale Subregion erfasst. Die laterale Subregion entspricht der topographisch anatomisch von der SNc getrennt betrachteten „pars lateralis“ (Gonzalez-Hernandez und Rodriguez, 2000). Die mediale Subregion grenzt direkt an das ebenfalls TH-positive Neurone enthaltende ventrale Tegmentale Areal (VTA), welches von der Auszählung ausgeschlossen wurde. Die Schnitte der Versuchsgruppe zur Entwicklung des Rotenon-Modells wurden in allen 3 Subregionen getrennt ausgezählt und ausgewertet, um etwaige subregionale Unterschiede in der Degeneration, wie sie im PD-

Patienten beobachtet wurden (Damier et al., 1999; Fearnley und Lees, 1991; Gibb und Lees, 1991), zu erfassen.



**Abb. 18: Histologische Abb. der SN** einer Maus nach Markierung TH-positiver Neurone einer Gehirnhälfte (100fache Vergrößerung eines Transversalschnittes). Der deutlich schwarz gefärbte Bereich enthält die Nervenzellkörper und bildet die „pars compacta“ und die „pars lateralis“. Weiterhin ist die „pars reticulata“ anhand der faserigen Nervenzellfortsätze zu erkennen (gestrichelte Linie). Die SN wurde zur Auszählung in 3 Subregionen unterteilt: medial, zentral und lateral. Der Kalibrierungsbalken entspricht 100 µm im histologischen Schnitt.

Im *6-OHDA-Mausmodell* ist auch aufgrund von Erkenntnissen der funktionalen Anatomie bei einer Applikation des Toxins im zentralen Striatum (anterioposterior betrachtet, hier 0,8 mm anterior zu Bregma) eine Degeneration in der zentralen Subregion der SNc (Hedreen und DeLong, 1991; Przedborski et al., 1995) zu erwarten, daher wurde diese ausgezählt.

Zur Quantifizierung der TH-positiven Neurone wurde bei allen Tiergruppen aus beiden Gehirnhälften jeden Schnittes ein Bildausschnitt (0,296 mm x 0,222 mm) pro Subregion bei 400facher Vergrößerung (Okular: 10fach, Objektiv: 40fach) ausgezählt. Die Neurone wurden hierzu in den unterschiedlichen Bildebenen fokussiert. Die ermittelte Anzahl der Neurone wurde mit einem Korrekturfaktor (0,615) multipliziert, um den Fehler zu minimieren, welcher durch das Zählen von lediglich angeschnittenen Neuronen entsteht (Abercrombie, 1946). Der Korrekturfaktor wurde folgendermaßen ermittelt:

$$\begin{aligned}\text{Korrekturfaktor} &= \text{Schnittdicke } [\mu\text{m}] / (\text{Schnittdicke } [\mu\text{m}] + \text{Zelldurchmesser}) \\ &= 40 \mu\text{m} / (40 \mu\text{m} + 25 \mu\text{m}) \\ &= \mathbf{0,615}\end{aligned}$$

Anschließend folgte anhand der Schnittdicke (40 µm) und der Maße des Bildausschnittes eine Umrechnung der ausgezählten TH-positiven Neurone auf ihre Dichte in der SN.

$$\begin{aligned}\text{Dichte} &= \text{Anzahl gezählter Neurone} / \text{mm}^3 \\ &= \text{Anzahl gezählter Neurone} / \text{Schnittdicke } [\text{mm}] \times \text{Bildbreite } [\text{mm}] \times \text{Bildhöhe } [\text{mm}] \\ &= \text{Anzahl gezählter Neurone} / 0,04 \text{ mm} \times 0,296 \text{ mm} \times 0,222 \text{ mm} \\ &= \text{Anzahl gezählter Neurone} / 0,00263 \text{ mm}^3 \\ &= \mathbf{(\text{Anzahl gezählter Neurone} \times 380,23) / \text{mm}^3}\end{aligned}$$

Die Anzahl der Neurone wird nicht nur durch die Dichte, sondern auch durch die Gesamtausdehnung der Struktur bestimmt. Daher wurde die Fläche (in  $\mu\text{m}^2$ ) der SNc/l in Bildausschnitten (1,184 mm x 0,888 mm) bei 100facher Vergrößerung (Okular: 10fach, Objektiv: 10fach) in je einem anterioren, zentralen und posterioren Anschnitt der Struktur (2,80; 3,30; und 3,80 posterior zu Bregma) bestimmt, um sowohl Unterschiede in der anterioposterioren als auch in der mediolateralen Ausdehnung erkennen und somit Rückschlüsse auf das Gesamtvolumen ziehen zu können. Da im 6-OHDA-Mausmodell die ausgezählte zentrale Subregion von einem Bildausschnitt in der Gesamtheit erfasst wurde, konnte hier von einer absoluten Anzahl der Neurone ausgegangen und auf die Ermittlung des Gesamtvolumens verzichtet werden.

### **3.2.6. Histologische Färbungen**

Zur Bewertung der Lokalisation der Führungskanülen im 6-OHDA-Modell und spezifischer oder auch unspezifischer neuropathologischer Effekte der Toxine wurden histologische Färbungen von Gehirnschnitten angefertigt. Im Rotenon-Mausmodell wurden zudem periphere Organe histologisch dargestellt, um organotoxische Effekte von Rotenon ausschließen zu können. Die Anfertigung der Färbungen erfolgte in Anlehnung an etablierte histologische Techniken (Romeis, 1989). Eine Übersicht ist in Tab. 8 dargestellt.

#### **3.2.6.1. Thionin-Färbung**

Von den Gefrierschnitten der Gehirne aller Tiere wurde eine Thionin-Färbung angefertigt. Hierbei wird das endoplasmatische Retikulum („Nissl Schollen“ nach Franz Nissl) der Zelle mit einem blauen Farbstoff angefärbt, und somit der Zellkörper dargestellt.

Diese Färbung diente zur Kontrolle der Lokalisation der Führungskanülen (6-OHDA-Modell) und zur allgemeinen Beurteilung des Zellbildes in allen Schnitten. Die Gefrierschnitte wurden aus dem 0,1 M Phosphatpuffer (pH 7,4) mittels einer Gelatinelösung (Herstellung s. Anhang, Tab. A1) auf entfettete Objektträger aufgezogen. Nach Trocknung im Wärmeschrank bei 37 °C für einige Stunden wurden die Schnitte mit Thionin gefärbt (Herstellung und Färbeprotokoll s. Anhang Tab. A2) und mit Entellan® (Merck, Darmstadt, BRD) eingedeckt.

#### **3.2.6.2. Bielschowsky Silbernitrat-Färbung**

Diese Silberimprägnierung basiert in Abwandlung auf der Golgi-Färbung, bei welcher die gesamte Nervenzelle mit Fortsätzen durch Silbernitrat geschwärzt wird. Neurofibrillen,

Dendriten und Axone stellen sich schwarz dar, das umgebende Gewebe gelb bis braun. Aus noch ungeklärten Gründen werden jedoch nur 1-2 % aller Nervenzellen angefärbt (Romeis, 1989). Im Gegensatz zur Nissl-Färbung ist hier die Darstellung verschiedener Nervenzellen im Gewebeverband einer Region möglich.

Diese Färbung wurde exemplarisch an Gehirnschnitten (20-40 µm) der Rotenon-Versuchsgruppe durchgeführt, um einzelne Zellen hinsichtlich ihrer Degenerationsanzeichen beurteilen zu können. Die Schnitte wurden hierzu auf SuperfrostPlus®-Objektträger (Roth, Karlsruhe, BRD) aufgezogen, welche durch eine elektrostatische Anziehungskraft einen Verzicht auf Haftmittel und die damit einhergehenden unerwünschten Hintergrundfärbungen ermöglichen. Nach Trocknung im Wärmeschrank bei 37 °C für einige Stunden wurden die Schnitte imprägniert (Herstellung und Färbeprotokoll s. Anhang Tab. A2) und mit Entellan® (Merck, Darmstadt, BRD) eingedeckt.

### 3.2.6.3. Hämatoxylin-Eosin-(HE)-Färbung

Hämatoxylin wird durch die Zugabe von Alaun (Kaliumaluminiumsulfat) zum Färbemittel für Zellkernfärbungen, dem Hämalaun. Während der Färbung lagern sich die positiv geladenen Komplexverbindungen des Hämalauns an die negativ geladenen Phosphatgruppen der Nukleinsäuren und erzeugen eine Blaufärbung der Kerne. Eosin ist negativ geladen und bindet an die positiv geladenen Gruppen von Proteinen mittels Ionenbindung (Romeis, 1989). Das Zellplasma und die Interzellulärsubstanz werden somit rötlich gefärbt.

Mit der HE-Färbung ist eine Darstellung von Einschlusskörperchen auf Proteinbasis möglich (Schneider et al., 2002), wofür diese Färbung hier exemplarisch an 20 und 40 µm dicken Schnitten der Gehirne der Rotenon-Versuchsgruppe durchgeführt wurde. Die Schnitte wurden dazu aus 0,1 M Phosphatpuffer (pH 7,4) mittels einer Gelatinelösung (Herstellung s. Anhang, Tab. A1) auf entfettete Objektträger aufgezogen. Nach Trocknung im Wärmeschrank bei 37 °C für einige Stunden wurden die Schnitte mit HE gefärbt (s. Anhang Tab. A2).

Des Weiteren wurden die 5 µm dicken Paraffinschnitte von Leber, Niere, Milz und Hoden der Rotenon-Versuchsgruppe mit HE gefärbt, um anschließend auf Degenerationskriterien beurteilt zu werden. Herstellung und Färbeprotokoll sind im Anhang Tab. A2 zusammengefasst. Im Anschluss an die Färbung wurden alle Schnitte mit Entellan® (Merck, Darmstadt, BRD) eingedeckt.

#### 3.2.6.4. Auswertung der histologischen Färbungen

Vor Beginn der Auswertung wurden die Objektträger verschlüsselt, so dass der Untersucher keine Kenntnis darüber hatte, ob es sich um Schnitte von behandelten bzw. Kontrolltieren handelte. Nach der Ermittlung aller Werte erfolgten die Entschlüsselung und die Zuordnung zur jeweiligen Versuchsgruppe. Die Auswertung wurde mit einem Mikroskop (Zeiss, Jena, BRD) durchgeführt.

Unter Verwendung des stereotaktischen Atlas für die Maus (Paxinos und Franklin, 2001) wurde in der Thionin-Färbung die Lokalisation der Führungskanülen im 6-OHDA-Modell kontrolliert, wobei außerdem auf Anzeichen von Blutungen und entzündlichen Prozessen geachtet wurde, welche die Ergebnisse der Untersuchungen beeinflussen könnten.

Im Rotenon-Mausmodell wurden folgende Gehirnregionen in allen drei histologischen Färbungen auf degenerative Veränderungen durchgemustert: SN, GPe, subthalamischer Nucleus und entopedunkularer Nucleus (GPi), um neben erwünschten spezifischen Effekten von Rotenon auf nigrale Neurone auch unspezifische Läsionen in nichtdopaminergen Systemen zu erfassen. Die genannten Regionen wurden gewählt, weil im Rotenon-Rattenmodell Veränderungen in diesen Kerngebieten beschrieben worden sind (Höglinger et al., 2003). Hierbei wurden folgende Kriterien für Degeneration beurteilt: Chromatinkondensation, Kernfragmentierung (Pyknose), Zellschrumpfung, Zellfragmente, Zellvergrößerung, Zellmembranintegrität, Vakuolenbildung und inflammatorische Prozesse. In der HE-Färbung der Gehirnschnitte wurde insbesondere auf eosinophile Einschlusskörperchen in Neuronen der SN geachtet.

Unter Beachtung der genannten Kriterien für Degeneration wurden auch die mit HE gefärbten Paraffinschnitte von Leber, Milz, Nieren und Hoden der Rotenon-Versuchsgruppe beurteilt, um periphere organotoxische Effekte von Rotenon bewerten zu können.

### **3.3. Statistische Versuchsauswertung**

Die Irrtumswahrscheinlichkeit  $\alpha$  („Signifikanzniveau“), bei deren Unterschreitung die Nullhypothese als widerlegt angenommen wird, wurde in dieser Arbeit wie folgt festgelegt:  $\alpha = 0,05$ . Mit Hilfe des Programms SigmaStat® (Version 3.0) wurde der p-Wert (Überschreitungswahrscheinlichkeit) berechnet. War  $p < \alpha$ , wurde die Wahrscheinlichkeit, dass die Abweichung von der Nullhypothese nicht nur zufallsbedingt war, als signifikant bezeichnet. Je weiter der p-Wert unterhalb der Irrtumswahrscheinlichkeit lag, desto höher wird die Informationsqualität angesehen. Die Unterschiede in der Qualität wurden wie folgt



markiert:  $p < 0,05$  \*,  $p < 0,01$  \*\* und  $p < 0,001$  \*\*\*. War  $0,05 \leq p < 0,1$  wurde von einer „Tendenz“ zur Widerlegung der Nullhypothese gesprochen.

### 3.3.1. Untersuchungen der Vitalität und des motorischen Verhaltens

Die ermittelten Einzeltierwerte für das KGW und die Verhaltenstests wurden zu den jeweiligen Tiergruppen und Testzeitpunkten zusammengefasst. Anschließend wurden jeweils das arithmetische Mittel ( $\bar{x}$ ), die Standardabweichung (S.D.) und der Standardfehler (S.E.) berechnet. Mit dem Programm SigmaStat® (Version 3.0) folgte die Varianzanalyse. Zur Auswertung der Daten wurde eine Normalverteilung der Werte innerhalb der Population vorausgesetzt, was bei der Interpretation der Ergebnisse berücksichtigt werden muss. Die Versuchsgruppen wurden je nach Anzahl der involvierten Faktoren mit einer One-, Two- oder Three-Way Anova (analysis of variance; Ein-, Zwei- oder Drei-Wege Varianzanalyse) untereinander verglichen. Ein Faktor ist eine Eigenschaft mit mehreren Ausprägungen, die als Grade bezeichnet werden und zur Einteilung der Versuchsgruppen geführt haben. So ist beispielsweise ein Wirkstoff (z. B. Rotenon) ein Faktor und die jeweiligen Dosierungen (z. B. 0/2,5/4,0-5,0 mg/kg) sind die zugehörigen Grade, durch welche sich die Versuchsgruppen voneinander unterscheiden. In einer Übersichtsanalyse wird zuerst getestet, ob die nach einem bestimmten Faktor (z. B. Wirkstoff) aufgeteilten Versuchsgruppen sich generell in einem Merkmal (z. B. KGW) unterscheiden, ohne dabei die einzelnen Gruppen untereinander zu vergleichen. Zeigt sich keine Signifikanz, ist das Merkmal (z. B. KGW) unabhängig vom Grad des Faktors (Dosierung des Wirkstoffes) gleich bleibend. Ergaben sich hier signifikante p-Werte ( $p < 0,05$ ) wurde der Bonferroni t-Test für multiple Vergleiche durchgeführt, um Unterschiede zwischen einzelnen Gruppen herauszustellen. Wurden Gruppen verglichen, welche sich in mehr als einem Faktor unterschieden (Two- bzw. Three-Way Anova, z. B. verschiedene Wirkstoffdosierung und unterschiedlicher Versuchstag und/oder Vorbehandlung), wurde die Wahrscheinlichkeit einer Interaktion zwischen diesen berechnet. Eine Interaktion bedeutet, dass signifikante Unterschiede innerhalb eines Faktors abhängig sind von einem oder mehreren anderen Faktoren. So kann beispielsweise ein Merkmalsunterschied (z. B. KGW) zwischen zwei Wirkstoffdosierungen (z. B. Vehikel zu hoch-dosiert) abhängig davon sein, an welchem Versuchstag (z. B. Tag 0 oder Tag 45) der Vergleich durchgeführt wird. Wenn eine Interaktion der beteiligten Faktoren vorhanden war, konnte für jede einzelne Versuchsgruppe, d.h. für jeden einzelnen Grad ein p-Wert angegeben werden. War keine Interaktion vorhanden, jedoch eine Signifikanz innerhalb von einem oder

auch mehreren Faktoren, wurde dieses gruppenübergreifend mit einer geschweiften Klammer dargestellt. Dies ist z. B. der Fall, wenn sich zwischen zwei Versuchstagen das Merkmal „lokomotorische Aktivität“ signifikant unterscheidet, dies jedoch unabhängig von der applizierten Menge an Wirkstoff auftritt. Bei repetitiven Versuchen innerhalb einer Versuchsgruppe wurde dies bei der Auswahl der Varianzanalysen berücksichtigt (Repeated Measures Anova).

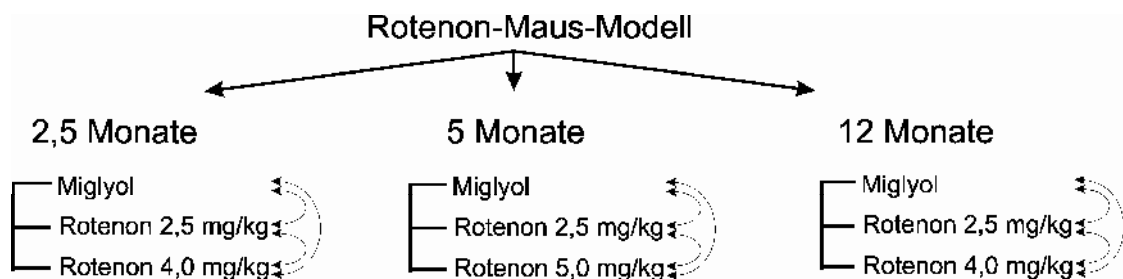
### **3.3.2. Immunhistochemische und histologische Untersuchungen**

Die ermittelten Werte für die Dichte der dopaminergen Neurone (Neurone/mm<sup>3</sup>) in den jeweiligen Subregionen der SN aller Bildausschnitte der rechten bzw. linken Gehirnhälfte wurden für jedes Tier gemittelt. Ebenso wurde für jedes Tier von den ausgemessenen striatalen Läsionen und dem zugehörigen Gesamtstriatum (mm<sup>2</sup>) der 6-OHDA-Versuchsgruppe bzw. von den in jeweils drei Bildausschnitten ermittelten prozentualen Grauwerten der striatalen Faserdichte in der Rotenon-Versuchsgruppe ( $\bar{x}$ ) berechnet. Die Ausdehnung der SNc/l (µm<sup>2</sup>) wurden für die drei ausgewählten Bildausschnitte pro Tier getrennt ausgewertet, um etwaige Unterschiede zwischen anterior, zentral und posterior zu erkennen. Nun erfolgte die Zuordnung der Einzeltierwerte zu den Versuchsgruppen. Innerhalb dieser Gruppen wurde das arithmetische Mittel ( $\bar{x}$ ), die Standardabweichung (S.D.) und der Standardfehler (S.E.) berechnet. Mit dem gepaarten t-Test (für verbundene Stichproben) wurden innerhalb der Gruppen die Werte der linken mit denen der rechten Gehirnhälfte verglichen. Da keine signifikanten Abweichungen auftraten, wurden die Mittelwerte aus beiden Gehirnhälften für die weitere Auswertung zusammengefasst. Die Versuchsgruppen wurden mit einer One way-Anova verglichen, und bei Signifikanz des p-Wertes ( $p < 0,05$ ) der Bonferroni t-Test für multiple Vergleiche durchgeführt. Weiterhin wurde der Anteil der striatalen Läsionen am Gesamtstriatum der einzelnen Versuchsgruppen berechnet. Alle Berechnungen wurden mit dem Programm SigmaStat® (Version 3.0) durchgeführt.

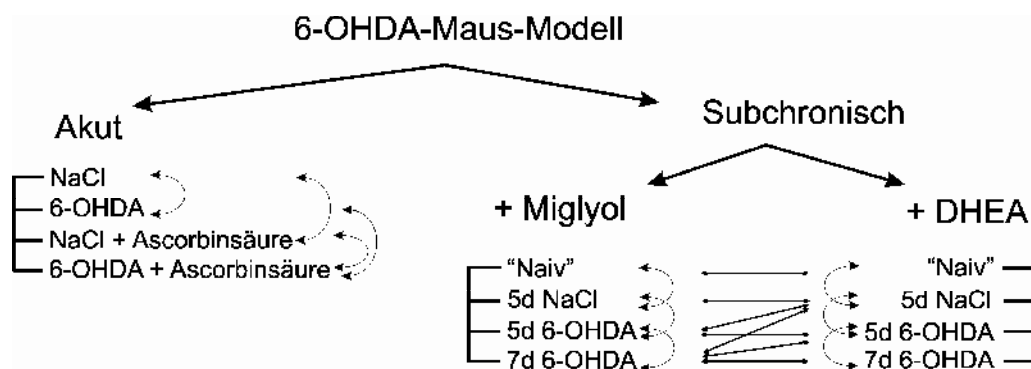
### **3.3.3. Übersicht der Varianzanalysen**

Abb. 19 und 20 zeigen eine Übersicht der durchgeführten Gruppenvergleiche im jeweiligen Mausmodell. Im *Rotenon-Mausmodell* wurden jeweils innerhalb der Altersgruppen statistische Vergleiche durchgeführt. Jede Altersgruppe wurde als abgeschlossener Versuch ausgewertet, da die zugehörigen Versuchsgruppen parallel im gleichen Zeitraum den gleichen Bedingungen ausgesetzt waren. Trotz hochgradiger Standardisierung der Versuche sind

zwischen den Altersgruppen Unterschiede im Verhalten bedingt durch jahreszeitliche oder äußere Einflüsse (Wager-Smith und Kay, 2000) oder eine unterschiedlich starke Markierung dopaminerger Neurone oder Nervenfasern durch wechselnde Qualitäten der Antikörper und Lösungen nicht auszuschließen. Daher wird ein Vergleich zwischen den Altersgruppen nur beschreibend vorgenommen. Im *6-OHDA-Mausmodell* wurden statistische Vergleiche innerhalb des akuten und innerhalb des subchronischen Modells vorgenommen, da diese in sich abgeschlossene Versuche darstellen, in welchen die Versuchsgruppen zeitlich parallel behandelt wurden. Der Vergleich zwischen dem akuten und dem subchronischen Modell wurde wiederum nur beschreibend anhand der jeweils ermittelten Effekte durchgeführt, da Einflüsse der Jahreszeiten und der Qualität der Immunhistochemie nicht auszuschließen sind.



**Abb. 19: Übersicht der Varianzanalysen im chronischen Rotenon-Mausmodell.** Die Pfeile innerhalb der drei Altersgruppen kennzeichnen jeweils einen durchgeführten statistischen Vergleich. Folgende Faktoren waren für die Auswertung (One- oder Two-Way Anova/ Bonferroni t-Test) relevant: Rotenon (0/2,5/4,0-5,0 mg/kg KGW) und Versuchstag (unbehandelt (Versuchstag 0)/ behandelt (Versuchstag 15/30/45)). Eine Übersicht der Gruppen ist in Tab. 5 und Abb. 11 dargestellt.



**Abb. 20: Übersicht der Varianzanalysen im akuten und subchronischen 6-OHDA-Mausmodell.** Die Pfeile innerhalb der beiden Modelle kennzeichnen jeweils einen durchgeführten statistischen Vergleich. Folgende Faktoren waren für die Auswertung relevant: Operation (ja/nein), Mikroinjektion von 6-OHDA (ja/nein), Zusatz von Ascorbinsäure (ja/nein), Injektionszeitraum (5d/7d) und Versuchstag (unbehandelt (Versuchstag 0)/ behandelt (Versuchstag 16)) (zur Übersicht der Gruppen s. auch Tab. 6 und 7 und Abb. 12). Je nach Anzahl der beteiligten Faktoren wurde eine One-, Two- oder Three-Way Anova durchgeführt, zum multiplen Vergleich wurde der Bonferroni t-Test verwendet.