

4. ERGEBNISSE

4.1. Wirkungen chronischer Rotenon-Applikationen

4.1.1. Dosisfindung

In Anlehnung an Literaturangaben in der Ratte und der Maus (s. 2.7.2.) wurden Dosierungen von 2,5 mg/kg bis 5,0 mg/kg auf akute Toxizität in 6-12 Monate alten Mäusen (n = 4) getestet. Die Substanz löste sich je nach Konzentration in ca. 15-30 min vollständig im Vehikel Miglyol. Die einmalige s.c. Injektion der Substanzlösung innerhalb dieser Dosierungen führte nicht zu Beeinträchtigungen des Allgemeinbefindens. Das Injektionsvolumen wurde von 10 ml/kg KGW (Standardvolumen für die Maus) auf 5 ml/kg gesenkt, da das ölige Vehikel in der Unterhaut nicht sofort resorbiert wurde, und eine Kontamination des Felles der Tiere durch die toxische Lösung vermieden werden sollte.

Rotenon wurde somit drei Altersgruppen (2,5 sowie 5 und 12 Monate) von Mäusen täglich über 45 Tage (d) s.c. injiziert. Zunächst wurden 2,5 mg/kg s.c. appliziert. Fehlende Effekte auf das nigrostriatale System veranlassten zu einer Dosiserhöhung auf 5 mg/kg s.c.. Die Injektion der 5 Monate alten Tiere mit 5,0 mg/kg KGW Rotenon (Gruppe 5) musste aber aufgrund der hohen Letalität am 30. d abgebrochen werden. Daher erhielten Gruppe 2 und 8 eine herabgesenkte Dosis von 4,0 mg/kg KGW. Daraus ergaben sich die in Tab. 5 zusammengefassten Tiergruppen.

4.1.2. Vitalität und Verhalten

4.1.2.1. Beobachtete Verhaltenseffekte unmittelbar nach Rotenon-Applikation

Um akute Verhaltenseffekte zu protokollieren, wurden alle Versuchstiere ab der ersten Injektion (d 1) über 5 h stündlich jeweils für 5-10 min einer allgemeinen Untersuchung in ihren Käfigen unterzogen. Auffällig war ein vermehrtes Putzen v.a. im Bereich der Injektionsstelle bei den Mäusen in allen Versuchsgruppen innerhalb der ersten 3 h nach der Injektion, was durch Kontamination des Fells mit der öligen Lösung (Miglyol) zu erklären war. Rotenon-behandelte Tiere zeigten zusätzlich ab d 14 in den ersten 3 h eine gekrümmte Körperhaltung, mittelgradige Hypolokomotion und weniger Sozialkontakt als die Vehikel-behandelten Kontrolltiere. Bei 25% der Rotenon-behandelten Tiere war in motorisch inaktiven Phasen ein deutliches Zittern (Ruhetremor) zu beobachten, das um den 30.

Behandlungstag begann, jedoch nicht in allen Fällen bis zum Ende des Versuchszeitraumes (d 45) vorhanden war. Es war in erster Linie ein Zittern des Kopfes (schnelle Nickbewegungen) und sich schauerartig ausbreitende Kontraktionen der Haut im Bereich des Rückens auffällig. An den Tagen der verschiedenen Verhaltenstests wurde insbesondere im Open field, im Activity cage und im Block-Test ein ausgeprägtes Zittern beobachtet. Wie sich später zeigte waren die Gehirne der Tremor-betroffenen Tiere nicht auffällig verändert, ebenso nicht die peripheren Organe. Diese Tiere zeigten zumeist keine weiteren Auffälligkeiten (s. Tab. 9).

| Alter | Dosisgruppe betroffene Tiere | Zeitpunkt (Beginn) | Auffälligkeiten |
|------------|------------------------------|--------------------|--|
| 2,5 Monate | 4,0 mg/kg (n=2) | d 30 | eine Maus starb an d 35 |
| | | d 45 | |
| 5 Monate | 2,5 mg/kg (n=5) | d 30 | Tremor v.a. im Kopfbereich, Tremor war an d 45 nicht mehr vorhanden |
| | 5,0 mg/kg (n=1) | d 15 | vorübergehend: fehlende Bewegungsaktivität, Gewichtsverlust, stabilisierte sich wieder in den nächsten Tagen, zeigte 3 d später keinen Tremor mehr |
| 12 Monate | 2,5 mg/kg (n=3) | d 30 | bei 2 Tieren leichte Gewichtsabnahme (stabilisierten sich wieder); alle Mäuse der Gruppe zeigten an d 45 keinen Tremor mehr |
| | 4,0 mg/kg (n=5) | | |

Tab. 9: Übersicht der Tiere mit Ruhetremor im Rotenon-Mausmodell (25% der Rotenon-behandelten Tiere) und teils weitere Auffälligkeiten innerhalb einer 5stündigen Beobachtungsphase nach Rotenon-Applikation.

4.1.2.2. Vitalität und neurologische Reflexe

Über den Versuchszeitraum wurden das KGW und das Allgemeinbefinden der Tiere bewertet und die neurologischen Reflexe (s. 3.2.3.1.) getestet. Bei allen Altersgruppen blieb das KGW sowohl nach Vehikel-, als auch nach Rotenongabe über den Versuchszeitraum weitgehend konstant, auch wenn 2,5 und 12 Monate alte Kontrolltiere generell ein höheres Körpergewicht zeigten. Signifikante Zunahmen des KGW über den Versuchszeitraum zeigten sich lediglich in der Kontrollgruppe der 2,5 Monate alten Tiere und in den Rotenon-Substanzgruppen (2,5 und 5 mg/kg) der Tiere im Alter von 5 Monaten (s. Abb. 21). Im Alter von 12 Monaten lag das KGW im Durchschnitt deutlich über dem der jüngeren Tiere. Insgesamt betrachtet hatte Rotenon **keine Gewichtsverluste** zur Folge.

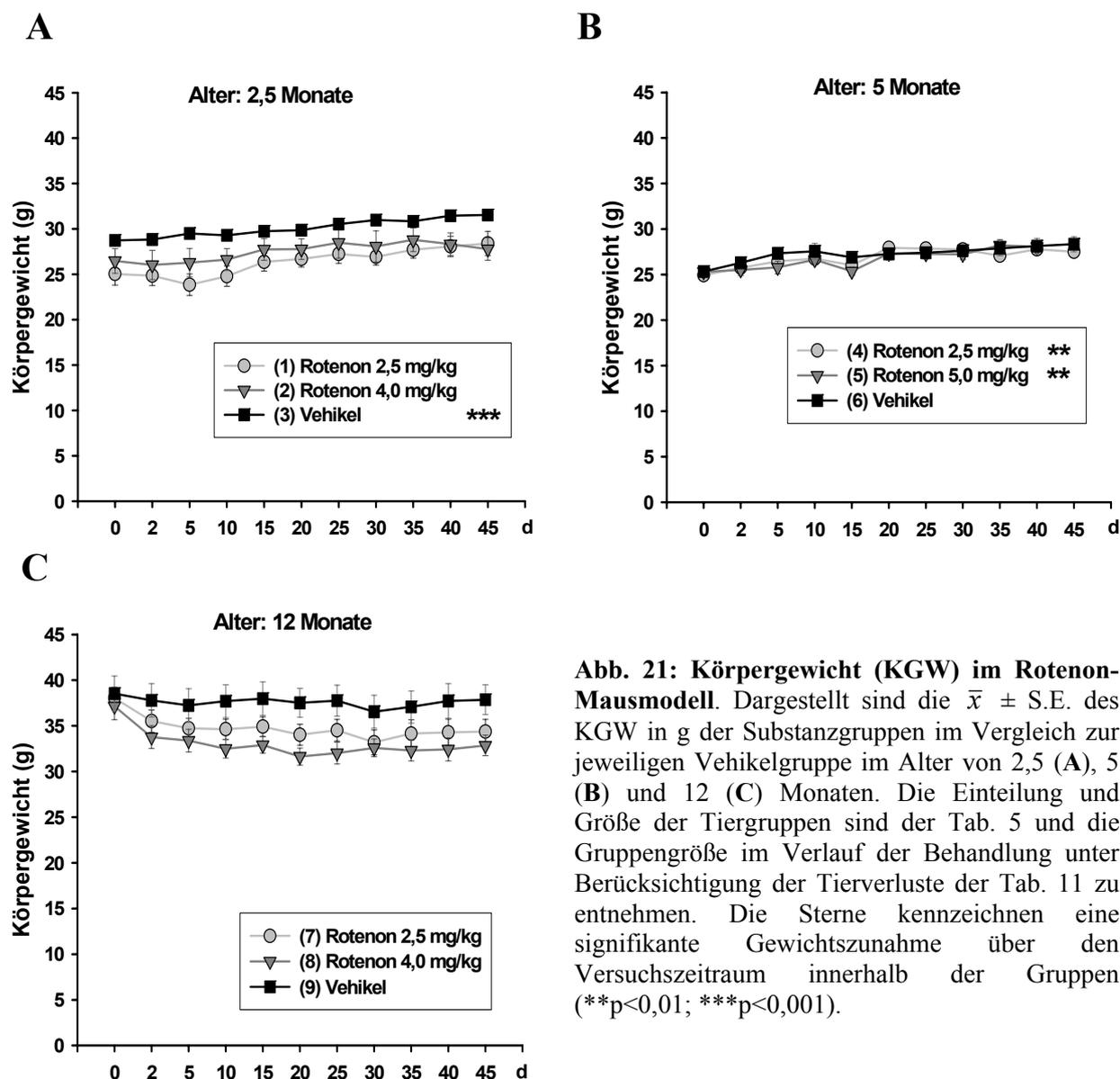


Abb. 21: Körpergewicht (KGW) im Rotenon-Mausmodell. Dargestellt sind die $\bar{x} \pm \text{S.E.}$ des KGW in g der Substanzgruppen im Vergleich zur jeweiligen Vehikelgruppe im Alter von 2,5 (A), 5 (B) und 12 (C) Monaten. Die Einteilung und Größe der Tiergruppen sind der Tab. 5 und die Gruppengröße im Verlauf der Behandlung unter Berücksichtigung der Tierverluste der Tab. 11 zu entnehmen. Die Sterne kennzeichnen eine signifikante Gewichtszunahme über den Versuchszeitraum innerhalb der Gruppen (** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

Die kontrollierten **neurologischen Reflexe** waren über den Versuchszeitraum in allen Gruppen **ungestört**, d.h. die Latenzzeit zwischen Stimulus und Reflexantwort betrug maximal 1 s (ohne Abb.). Das **Allgemeinbefinden** war v.a. im ersten Drittel des Injektionszeitraumes (Versuchstag 0-15) nach Rotenon-Injektion leicht bis stark **beeinträchtigt**, die Sterberate (Letalität) war jedoch im zweiten Drittel am höchsten. Der Tod trat in fast allen Fällen 5-12 h nach Rotenon-Injektion ein, und war nicht begleitet von einem vorhergehenden Gewichtsverlust oder einem vergleichbar stark beeinträchtigten Allgemeinbefinden. Eine prozentuale Angabe der vor Ablauf des Versuches verstorbenen Tiere zeigt Tab. 10. Eine Einzelaufstellung dieser Tiere mit Auffälligkeiten und durchgeführten Auswertungen ist in Tab. 11 dargestellt.

| Alter [Monate] | Substanzgruppe | | |
|-------------------|----------------------|-------------------------------|--------------------|
| | Rotenon 2,5 mg/kg | Rotenon 4,0 bzw. 5,0*mg/kg | Vehikel 5 ml/kg |
| 2,5 | 13 % | 25 % | 0 % |
| 5 | 10 % | 40 % | 0 % |
| 12 | 21 % | 14 % | 0 % |

Tab. 10: Übersicht der Letalität bei s.c. Applikation von Rotenon in drei Altersgruppen. *Bei Applikation von 5,0 mg/kg in 5 Monate alten Tieren führte die hohe Sterberate zum Abbruch der Injektion am 30. d.

| Alter | Dosisgruppe Rotenon / Tier | Zeitpunkt des Todes | Todesursache / Auffälligkeiten | Auswertung |
|---------------|-------------------------------|------------------------|-----------------------------------|---|
| 2,5 Monate | 2,5 mg/kg | 1 | d 35 | unbekannt / keine Organe autolytisch |
| | 4,0 mg/kg | 1 | d 30 | |
| | | 2 | d 35 | |
| 5 Monate | 2,5 mg/kg | 1 | d 22 | unbekannt / keine Organe autolytisch |
| | 5,0 mg/kg | 1 | d 6 | in Agonie getötet, Darmobstruktion durch Haarbälle TH-Immunhistochemie |
| | | 2 | d 15 | unbekannt / keine Organe autolytisch |
| | | 3 | d 24 | |
| | | 4 | d 28 | |
| 12 Monate | 2,5 mg/kg | 1 | d 18 | gestorben bei der Injektion; zuvor keine Auffälligkeiten; Leberverfettung TH-Immunhistochemie, Histologie der übrigen Organe |
| | | 2 | d 18 | |
| | | 3 | d 29 | |
| | 4,0 mg/kg | 1 | d 11 | unbekannt / keine Organe autolytisch |
| | | 2 | d 30 | |

Tab. 11: Einzelauflistung der vor dem Versuchsende verstorbenen Tiere. Häufig waren die Organe bereits autolytisch und nicht mehr auswertbar. Die angefertigten Präparate gaben keine Hinweise auf Auffälligkeiten im nigrostriatalen System oder andere pathomorphologisch abweichende Befunde, verglichen mit den übrigen Tieren der Versuchsgruppen.

4.1.2.3. Lokomotorische Aktivität

Eine Übersicht der *horizontalen Bewegungsaktivität* („Transitions“) im Open field zeigt über den Behandlungszeitraum in allen Altersgruppen eine **Aktivitätsabnahme**, welche in den Kontrollgruppen (Vehikel: Miglyol) weniger stark ausgeprägt war (s. Abb. 22A). Bei Betrachtung der Versuchstage ergab der Vergleich von d 0 zu d 15, d 30 und d 45 eine signifikante ($p < 0,001$) **Abnahme der horizontalen Aktivität** in allen Versuchsgruppen. In 2,5 Monate alten Mäusen zeigte die hoch-dosierte Substanzgruppe (4 mg) ab d 15, die gering-dosierte Substanzgruppe (2,5 mg) ab d 30 eine signifikant geringere horizontale

Bewegungsaktivität als die Kontrollgruppe. 5 Monate alte Mäuse wiesen eine tendentiell ($p < 0,085$), 12 Monate alte Mäuse eine signifikant geringere horizontale Bewegungsaktivität als die Kontrollgruppe auf, allerdings unabhängig vom Behandlungstag nach Rotenon-Behandlung in beiden Dosisgruppen. Vergleichbare Ergebnisse ergaben sich auch im Activity cage, wobei hier in den Kontrollgruppen nur die Tiere der 2,5 Monate alten Versuchsgruppe eine Reduktion über den Behandlungszeitraum aufwiesen (s. Abb. 22B). Auffällig war, dass einige der Rotenon-behandelten Tiere v.a. in der ersten min der Messperiode (5 min) völlig bewegungslos in der Mitte der Apparaturen sitzen blieben.

Abb. 23 zeigt eine Übersicht der *vertikalen Bewegungsaktivität* („Rearing“) im Open field (alle Altersgruppen) und Activity cage (für 2,5 und 5 Monate alte Tiere). Vergleichbar zur horizontalen Bewegungsaktivität ist auch hier eine Aktivitätsabnahme über den Versuchszeitraum im Open field in allen Altersgruppen zu erkennen, wobei die Kontrollgruppen wiederum höhere Werte aufwiesen. Der Vergleich von d 0 zu d 15, d 30 und d 45 ergab in 2,5 und 5 Monate alten Mäusen eine signifikante **Abnahme der vertikalen Aktivität** in allen Versuchsgruppen, wogegen im Alter von 12 Monaten nur die Rotenon-behandelten Mäuse davon betroffen waren. In 2,5 Monate alten Mäusen zeigte die hoch-dosierte Substanzgruppe ab d 15, die gering-dosierte Substanzgruppe ab d 45 eine signifikant geringere vertikale Bewegungsaktivität als die Kontrollgruppe. 5 Monate alte Mäuse wiesen eine tendentiell ($p < 0,088$) geringere vertikale Bewegungsaktivität als die Kontrollgruppe auf, allerdings unabhängig vom Behandlungstag nach Rotenon-Behandlung in beiden Dosisgruppen. In 12 Monate alten Mäusen war die Bewegungsaktivität ab d 15 in der gering-dosierten, ab d 30 in der hoch-dosierten Substanzgruppe signifikant vermindert. Vergleichbare Ergebnisse ergaben sich auch im Activity cage.

Die Abnahme der Bewegungsaktivität in den Rotenon-behandelten Tieren und in den Kontrollgruppen war nicht bedingt durch eine vermehrte *Putzaktivität* im Open field (s. Abb. 24), denn diese zeigte über den Behandlungszeitraum lediglich einen signifikanten Anstieg in Gruppe 1 (2,5 Monate, 2,5 mg/kg Rotenon). Einige Rotenon-behandelten Mäuse zeigten neben der geringeren horizontalen und vertikalen Aktivität auch eine **geringere Putzaktivität** als Mäuse der jeweiligen Kontrollgruppen.

In Ruhephasen war ein **Ruhetremor** bei einigen Mäusen der Rotenon-Substanzgruppen zu beobachten, welcher in Phasen der Bewegung wieder verschwand (s. 4.1.2.1., Tab. 9).

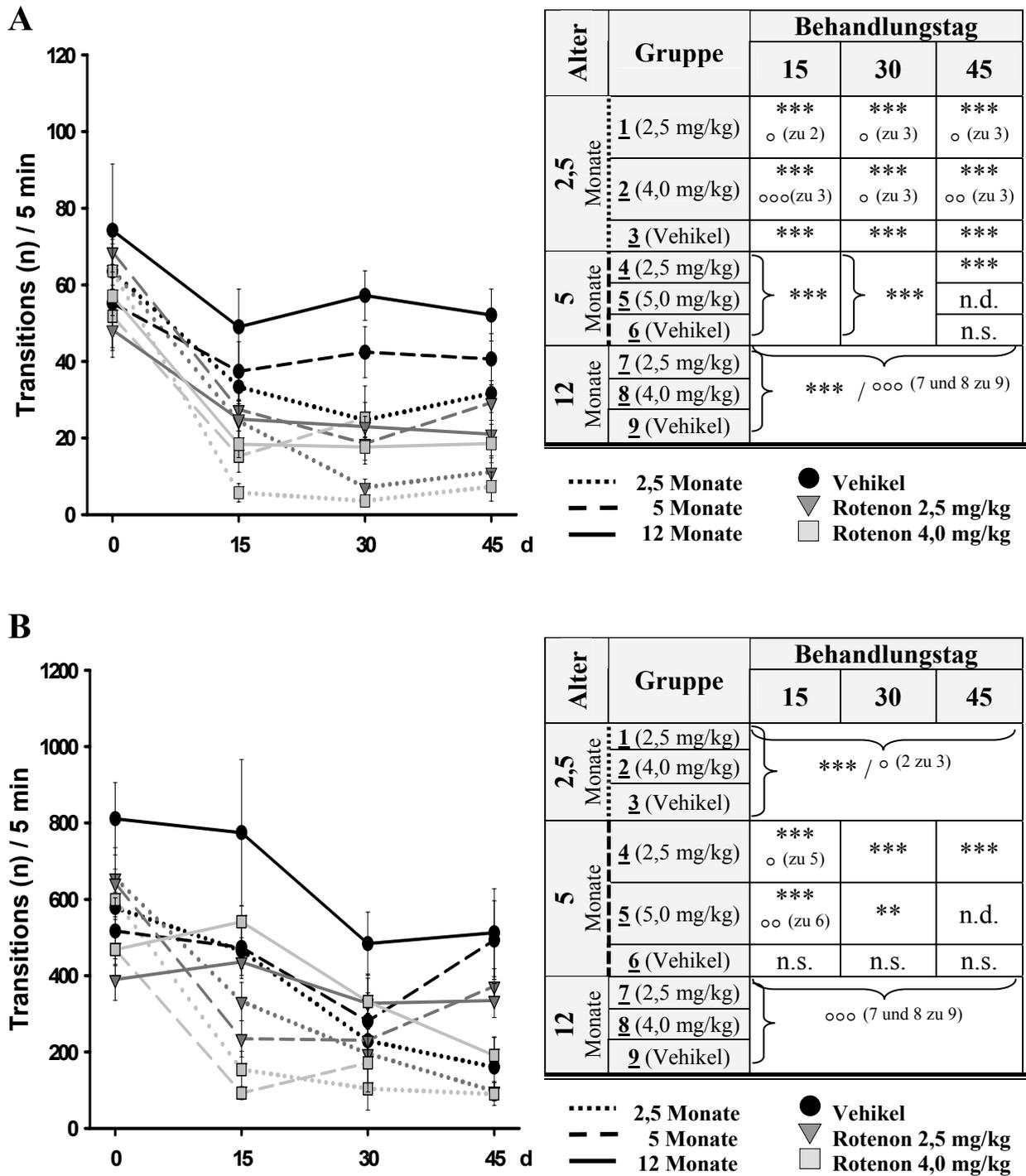


Abb. 22: Horizontale Bewegungsaktivität im Open field (A) und im Activity cage (B) in drei Altersgruppen aufgeteilt jeweils in zwei Substanzgruppen (Rotenon) und eine zugehörige Kontrollgruppe (Vehikel: Miglyol). Dargestellt sind die $\bar{x} \pm S.E.$ der überquerten Linien (A) bzw. der aktivierten Infrarotsensoren (B) („Transitions“) innerhalb von 5 min an d 0 (vor Behandlung mit Vehikel bzw. Rotenon) verglichen mit d 15, d 30 und d 45. Signifikante Unterschiede ($\bar{x} \pm S.E.$ s. Anhang Tab. A4 und A5) sind in der Tab. zusammengefasst ($\bar{x} \pm S.E.$; ** $p < 0,01$; * $p < 0,001$ im Vergleich zu d 0; ° $p < 0,05$; °° $p < 0,01$; °°° $p < 0,001$ im Vergleich zwischen den Versuchsgruppen). Die geschweiften Klammern kennzeichnen gruppenübergreifend Signifikanz, wenn keine Interaktion zwischen Versuchsgruppe und Behandlungstag vorhanden war (s. auch Kap. 3.3.1.). Die Einteilung und Größe der Tiergruppen sind der Tab. 5 und die Gruppengröße im Verlauf der Behandlung unter Berücksichtigung der Tierverluste der Tab. 11 zu entnehmen.**

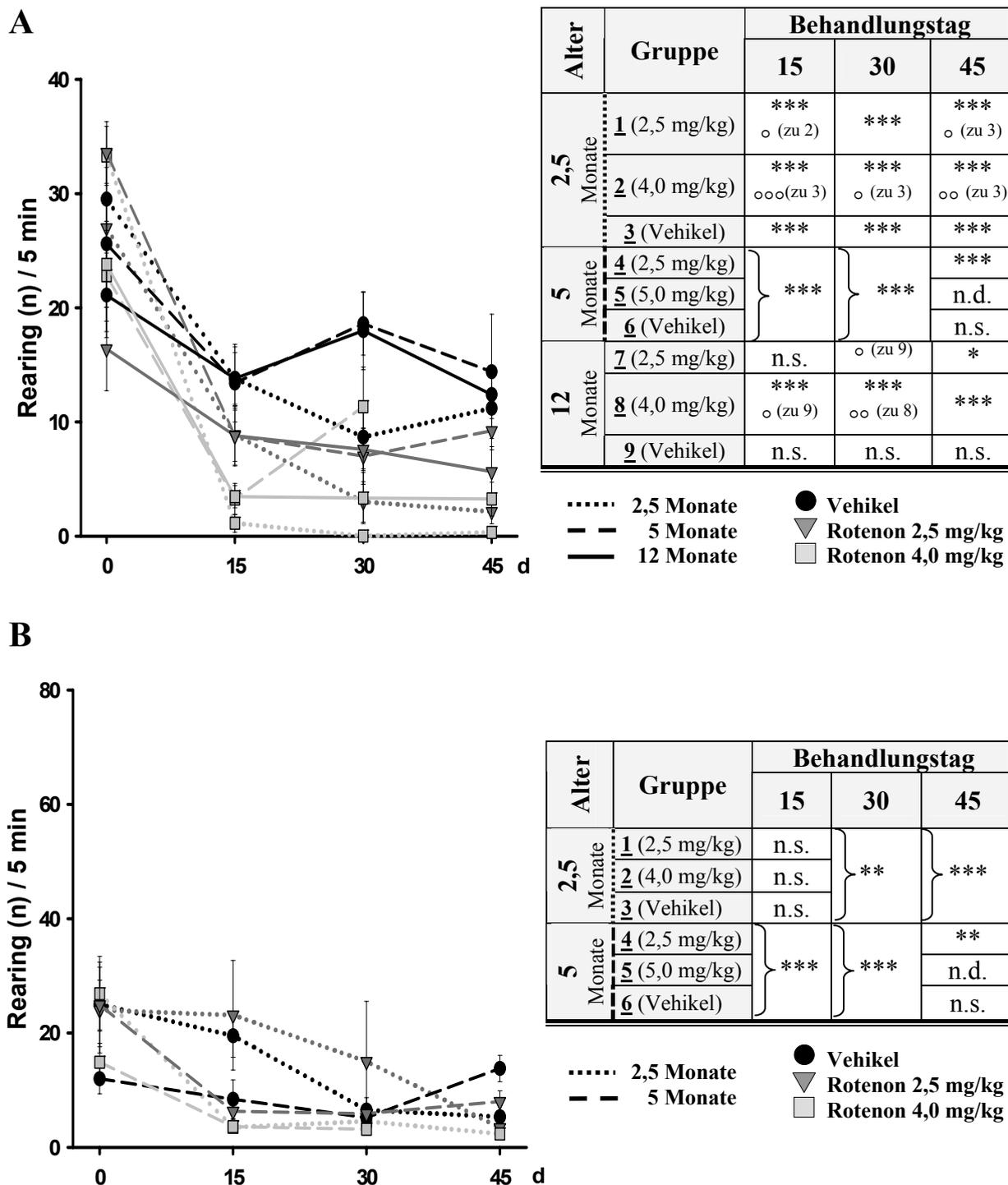


Abb. 23: Vertikale Bewegungsaktivität im Open field (A) und im Activity cage (B) in drei Altersgruppen aufgeteilt jeweils in zwei Substanzgruppen (Rotenon) und eine zugehörige Kontrollgruppe (Vehikel: Miglyol). Dargestellt sind die $\bar{x} \pm S.E.$ des Aufrichtens (A) bzw. der dadurch aktivierten Infrarotsensoren (B) („Rearing“) innerhalb von 5 min an d 0 (vor Behandlung mit Vehikel bzw. Rotenon) verglichen mit d 15, d 30 und d 45. Signifikante Unterschiede ($\bar{x} \pm S.E.$ s. Anhang Tab. A4 und A5) sind in der Tab. zusammengefasst ($\bar{x} \pm S.E.$; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; * $p < 0,001$ im Vergleich zu d 0; ° $p < 0,05$; °° $p < 0,01$; °°° $p < 0,001$ im Vergleich zwischen den Versuchsgruppen). Weitere Erklärungen: s. Legende zu Abb. 22.**

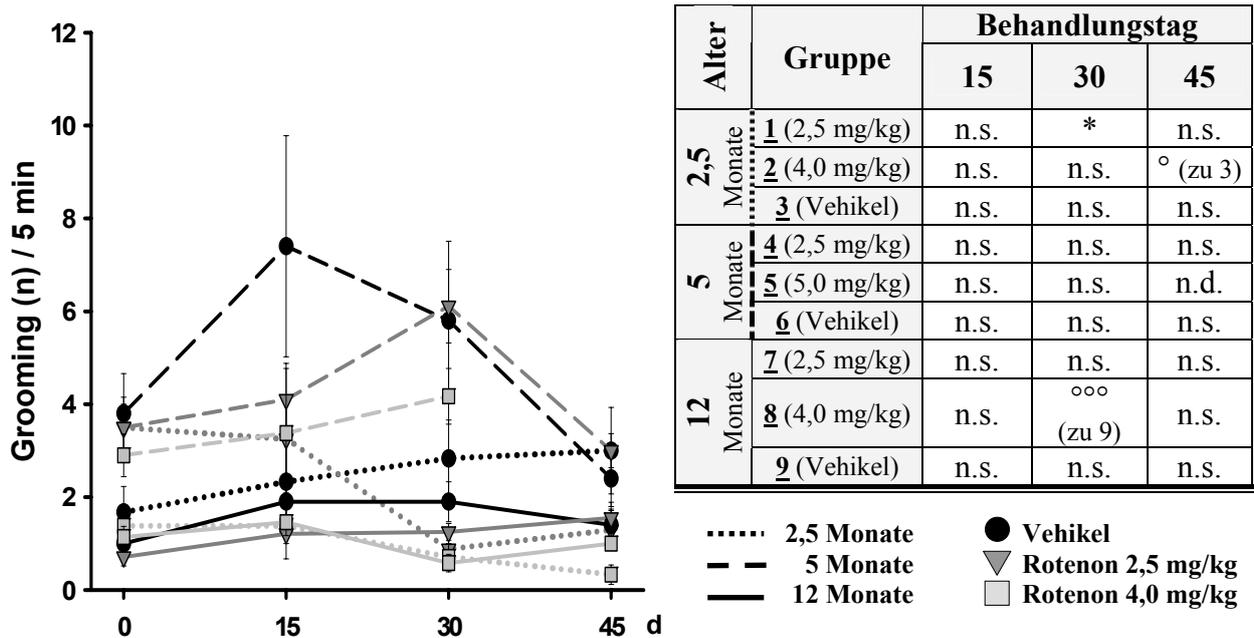


Abb. 24: Putzaktivität (Grooming) im Open field in drei Altersgruppen aufgeteilt jeweils in zwei Substanzgruppen (Rotenon) und eine zugehörige Kontrollgruppe (Vehikel: Miglyol). Dargestellt sind die $\bar{x} \pm$ S.E. des Putzens („Grooming“) innerhalb von 5 min an d 0 (vor Behandlung mit Vehikel bzw. Rotenon) verglichen mit d 15, d 30 und d 45. Signifikante Unterschiede sind in der Tab. ($\bar{x} \pm$ S.E s. Anhang Tab. A4) zusammengefasst (* $p < 0,05$ im Vergleich zu d 0; ° $p < 0,05$; °° $p < 0,01$; °°° $p < 0,001$ im Vergleich zwischen den Versuchsgruppen). Weitere Erklärungen: s. Legende zu Abb. 22.

4.1.2.4. Koordination und Muskelkraft

Der Vergleich von d 0 zu d 15, d 30 und d 45 jeweils innerhalb einer Versuchsgruppe ergab keine signifikanten Effekte der Behandlungen auf die Koordination in allen Gruppen (s. Abb. 25). **In höheren Dosen** (4,0-5,0 mg/kg KGW) bewirkte Rotenon bei 2,5 und 5 Monate alten Tiere eine **geringere Koordination** auf dem Rotarod über den Versuchszeitraum im Vergleich zur jeweiligen Kontrollgruppe bzw. gering-dosierten Substanzgruppe, was in 12 Monate alten Mäusen nicht auftrat. Diese Tiergruppe höheren Alters zeigte jedoch bereits an d 0 ($p < 0,001$) nur etwa 50 % der Leistung verglichen mit 2,5 oder 5 Monate alten Tieren.

Die **Muskelkraft** zeigte gemessen an der Griffstärke der Vordergliedmaßen im **Grip-strength Test** (s. Abb. 26 A) über den Behandlungszeitraum eine **Abnahme** in Rotenon-behandelten Mäusen und in Kontrollgruppen aller Altersgruppen beginnend an d 15 (2,5 und 5 Monate) oder d 30 (12 Monate), wobei die mit 2,5 mg behandelte Substanzgruppe der 2,5 Monate alten Tiere (Gruppe 1) nicht betroffen war.

Die Ergebnisse des **Wire-hang Test** (s. Abb. 26 B) bestätigten die Abnahme der **Muskelkraft** nicht, es zeigten sich innerhalb der Tiergruppen über den Versuchszeitraum **gleich bleibende Werte**. Auffällig war (wie bereits für die Koordination) beschrieben die bereits an d 0 signifikant ($p < 0,001$) geringere Muskelkraft der 12 Monate alten Tiere im Vergleich zu den jüngeren Tiergruppen.

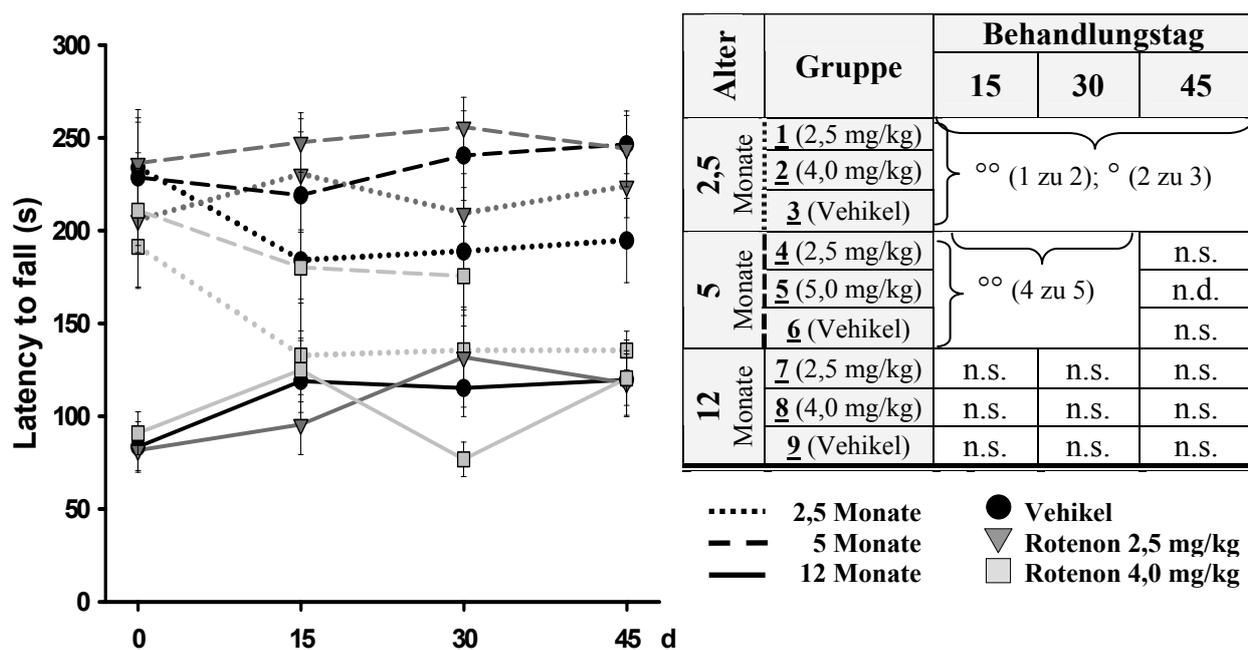


Abb. 25: Koordination auf dem Rotarod in drei Altersgruppen aufgeteilt jeweils in zwei Substanzgruppen (Rotenon) und eine zugehörige Kontrollgruppe (Vehikel: Miglyol). Dargestellt sind die $\bar{x} \pm \text{S.E.}$ der Latenzzeit bis zum Herabfallen („Latency to fall“) in s bei 4-40 rpm (rotations per minutes) an d 0 (vor Behandlung mit Vehikel bzw. Rotenon) verglichen mit d 15, d 30 und d 45. Signifikante Unterschiede sind jeweils in den Tab. ($\bar{x} \pm \text{S.E.}$ s. Anhang Tab. A6) zusammengefasst ($^{\circ}p < 0,05$; $^{\circ\circ}p < 0,01$ im Vergleich zwischen den Versuchsgruppen). Weitere Erklärungen: s. Legende zu Abb. 22.

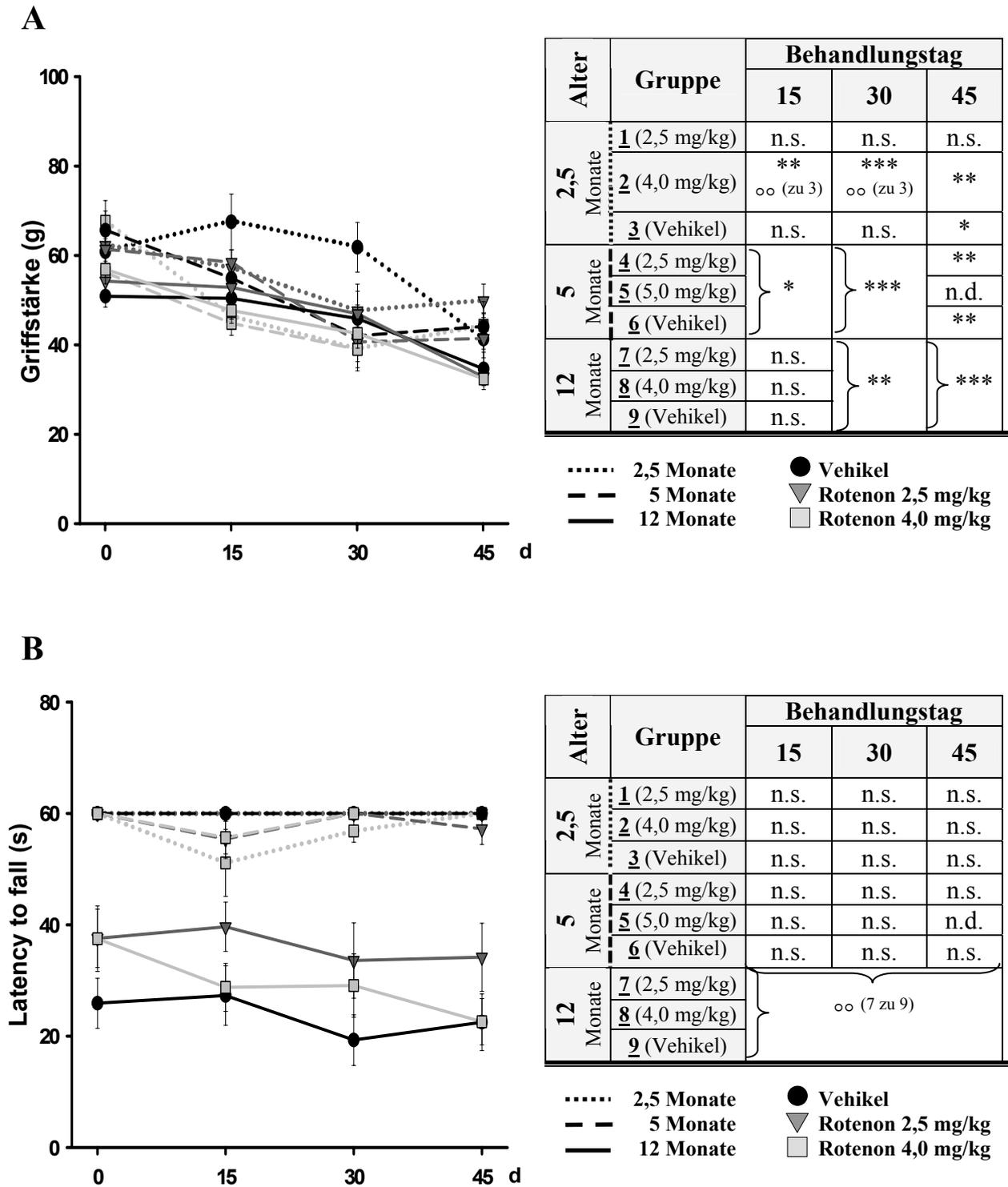


Abb. 26: Muskelkraft im Grip-strength Test (A) und im Wire-hang Test (B) in drei Altersgruppen aufgeteilt jeweils in zwei Substanzgruppen (Rotenon) und eine zugehörige Kontrollgruppe (Vehikel: Miglyol). Dargestellt sind die $\bar{x} \pm S.E.$ der Griffstärke der Vordergliedmaßen in Gramm (A) und die $\bar{x} \pm S.E.$ der Latenzzeit bis zum Herabfallen („Latency to fall“) in s von einem um 180° gedrehten Käfigdeckel (B) an d 0 (vor Behandlung mit Vehikel bzw. Rotenon) verglichen mit d 15, d 30 und d 45. Signifikante Unterschiede sind in der Tab. ($\bar{x} \pm S.E.$ s. Anhang Tab. A7 und A8) zusammengefasst (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; * $p < 0,001$ im Vergleich zu d 0; ° $p < 0,05$; °° $p < 0,01$ im Vergleich zwischen den Versuchsgruppen). Weitere Erklärungen: s. Legende zu Abb. 22.**

4.1.2.5. Katalepsie

Rotenon-behandelte Substanzgruppen der 2,5 und 12 Monate alten Mäuse zeigten ab d 30 eine signifikant höhere „Latency to move“ im **Block-Test** (s. Abb. 27). In 5 Monate alten Mäusen war eine **signifikante Zunahme** erst ab dem 45. Versuchstag (gering-dosierte Substanzgruppe) messbar, welche in geringerer Ausprägung auch in Kontrolltieren auftrat. Alle Altersgruppen betrachtend, verharren Kontrolltiere 0-5 s, gering-dosierte Substanzgruppen 7-24 s und hoch-dosierte Substanzgruppen 9-30 s. Die im Block-Test verharrenden Tiere waren zumeist bereits bei der Aktivitätsmessung im Open field oder Activity cage z. T. bis zu 1 min bewegungslos im Zentrum der Apparatur sitzen geblieben. Auffällig war eine Verstärkung des Ruhetremors, der bei einzelnen Tieren der Rotenon-Substanzgruppen während des Verharrens auf dem Block zu beobachten war.

Im **Paw-retraction Test** zogen alle Mäuse der Versuchsgruppen die Extremitäten in weniger als 1 s zurück, d.h. hier zeigte sich **keine Katalepsie** (ohne Abb.).

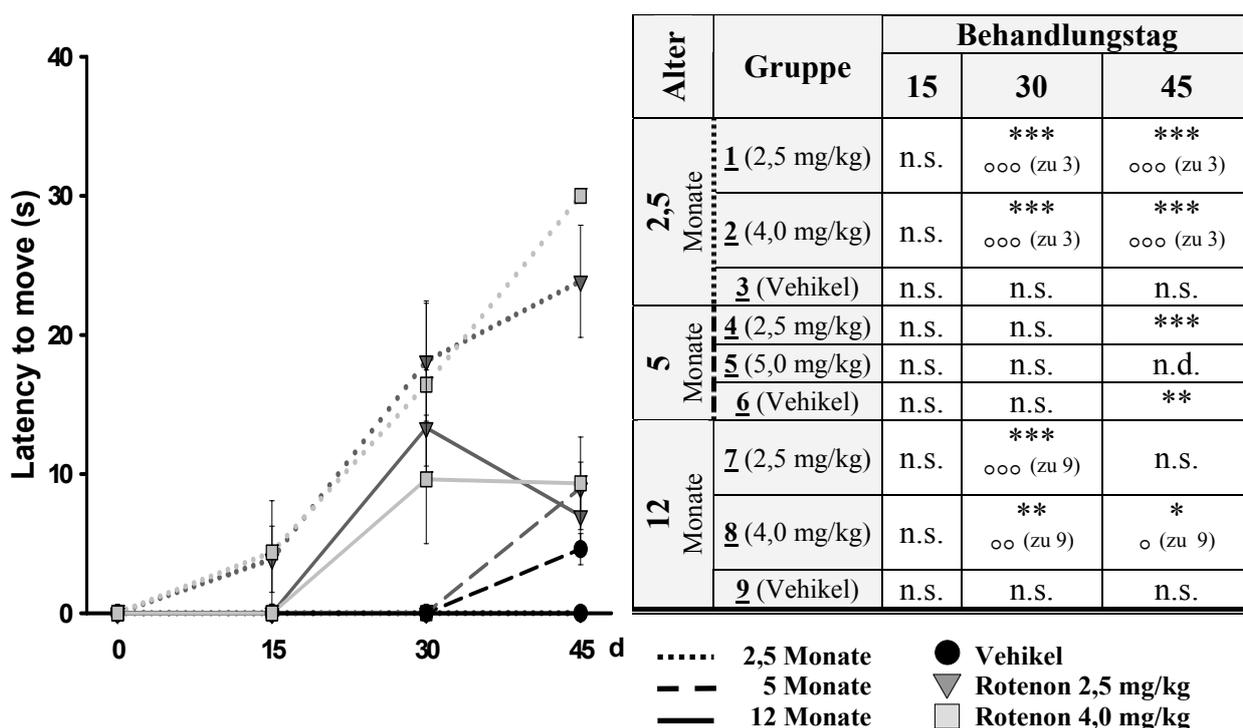


Abb. 27: Katalepsie im Blocktest in drei Altersgruppen aufgeteilt jeweils in zwei Substanzgruppen (Rotenon) und eine zugehörige Kontrollgruppe (Vehikel: Miglyol). Dargestellt sind die $\bar{x} \pm S.E.$ der Latenzzeit bis zur Positionsveränderung („Latency to move“) in s nach Aufsetzen der Vorderbeine auf einen Holzblock an d 0 (vor Behandlung mit Vehikel (Miglyol) bzw. Rotenon) verglichen mit d 15, d 30 und d 45. Signifikante Unterschiede sind in der Tab. ($\bar{x} \pm S.E.$ s. Anhang Tab. A9) zusammengefasst (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ im Vergleich zu Injektionstag 0; ° $p < 0,05$; °° $p < 0,01$; °°° $p < 0,001$ im Vergleich zwischen den Substanzgruppen). Weitere Erklärungen: s. Legende zu Abb. 22.

4.1.2.6. Ganganalysen

Schrittlänge und -folge zeigten in allen Altersgruppen **Abweichungen** über den Behandlungszeitraum (s. Abb. 28; 2,5 und 12 Monate alte Tiere). Tiere der 12 Monate alten Versuchsgruppe zeigten im Vergleich zu jüngeren Tieren bereits unbehandelt ein breiteres Auffußen, das v.a. in den Hintergliedmaßen ausgeprägt war. Tiere mit kataleptischen Anzeichen im Block-Test **verharrten häufig** und durchquerten den Tunnel nicht ohne zusätzliche Stimulation.

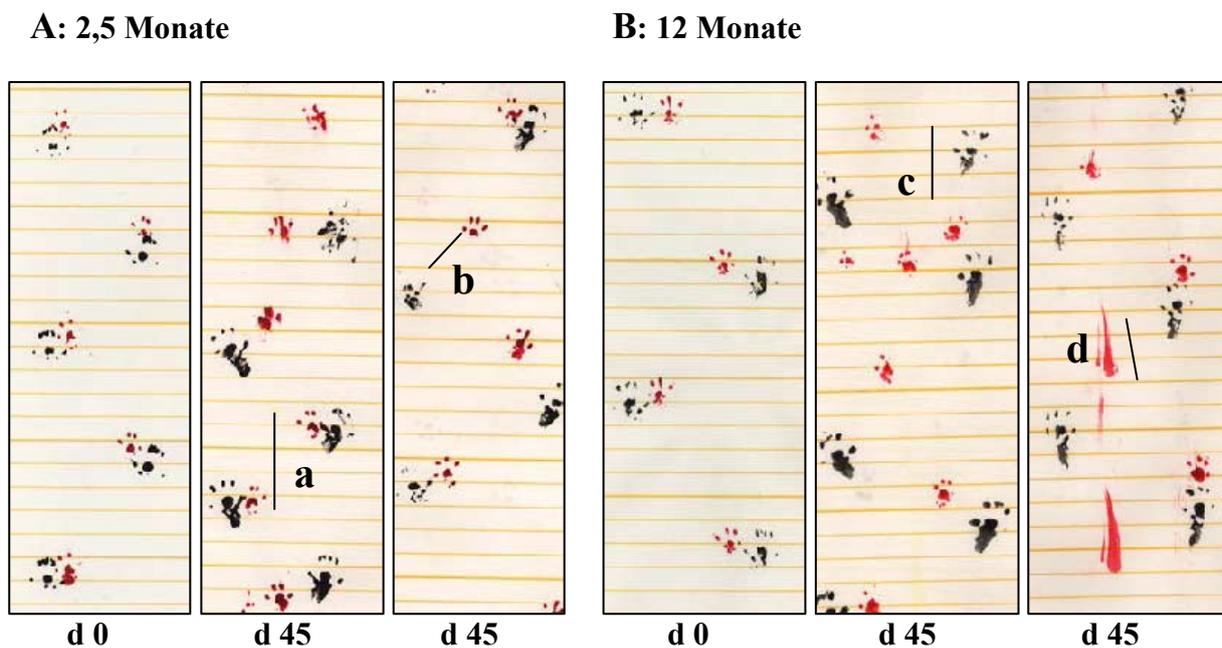


Abb. 28: „Footprints“ nach 45 d Injektion von 4 mg/kg Rotenon in (A) 2,5 und (B) 12 Monate alten Mäusen im Vergleich zu einem physiologischen Schrittmuster an d 0. Zu erkennen sind die Fußabdrücke unbehauelter (d 0) und behauelter (d 45) Mäuse, welche nach farblicher Markierung über das linierte Papier liefen (Linienabstand: 6 mm). Es sind Abweichungen nach Rotenon-Behandlung zwischen den Abdrücken der Vorder- (rot gekennzeichnet) und der Hintergliedmaßen (schwarz gekennzeichnet) dargestellt: eine verkürzte Schrittlänge (a), Unregelmäßigkeit im Abstand der Gliedmaßen zueinander (b), Verharren im Lauf (unregelmäßige Schrittfolge) (c) und das Nachziehen einer Vordergliedmaße (d).

4.1.3. Neuropathologische Effekte von Rotenon auf das dopaminerge System

Mittels TH-Immunhistochemie wurden dopaminerge Neurone in der SN und die zugehörigen Nervenfasern im Striatum markiert und einer mikroskopischen Auswertung mit einem Bildanalysesystem unterzogen (Methodik s. 3.2.5.).

Die Messung der Dichte dopaminerger Fasern im **Striatum** mittels Grauwertbestimmung zeigte in Rotenon-Substanzgruppen **keine Läsionierung**, stattdessen aber in 2,5 und 12 Monate alten Tieren eine teilweise signifikant höhere TH-Immunreaktivität als in den entsprechenden Kontrolltieren, welche v.a. in der geringen Dosierung (2,5 mg/kg) auftrat (s. Abb. 29). Es waren keine Anzeichen von lokalen oder zentralen Aufhellungen im markierten Striatum sichtbar (Abb. 31A), was durch einen weiteren unabhängigen Untersucher bestätigt wurde. Die TH-Immunreaktivität war signifikant höher in 5 Monate ($p < 0,01$) und 12 Monate alten Kontrolltieren ($p < 0,001$) im Vergleich zu 2,5 Monate alten Kontrolltieren.

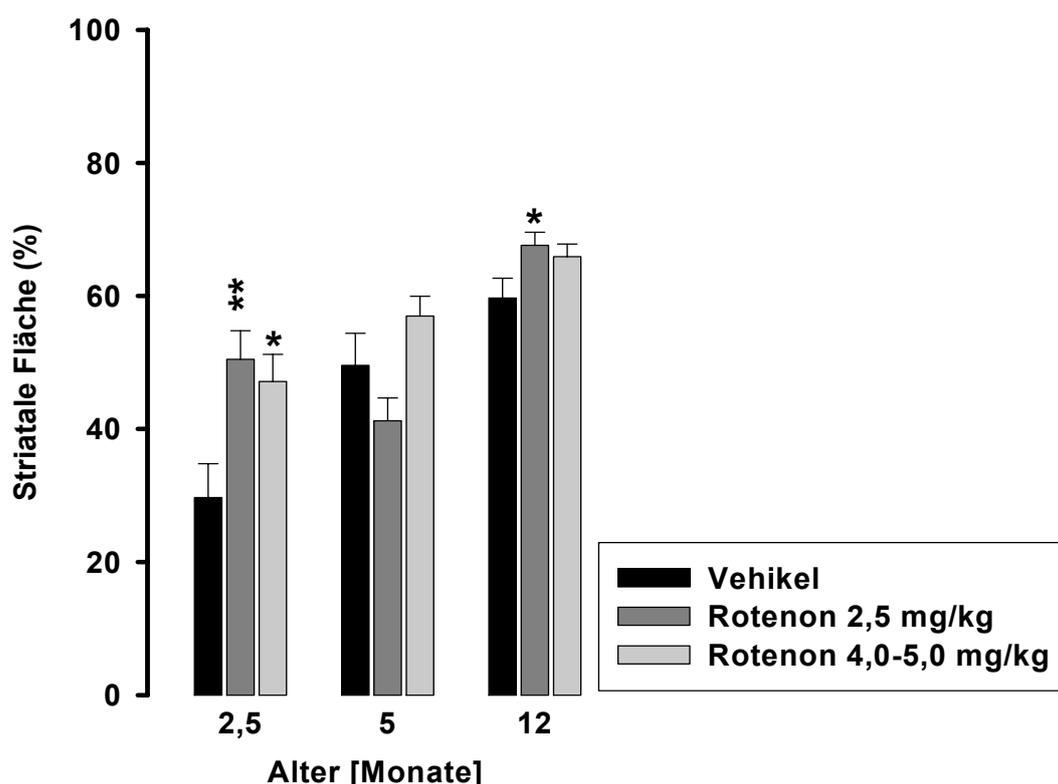


Abb. 29: Dichte TH-positiver Fasern im Striatum nach chronischer Verabreichung von Rotenon bzw. des Vehikels (Miglyol) in drei Altersgruppen (2,5, 5 und 12 Monate). Dargestellt sind die \bar{x} + S.E. der striatalen Fläche in %, deren Grauwerte oberhalb eines zuvor festgelegten Grenzwertes (Threshold) lagen, nach Markierung TH-positiver dopaminerger Nervenfasern. Signifikante Unterschiede der Rotenon-Substanzgruppen zur jeweiligen Kontrollgruppe sind durch Sterne markiert (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$).

Zur Ermittlung einer nigralen Läsionierung des dopaminergen Systems durch Rotenon wurden TH-positive Neurone in der SN ausgezählt. Hierzu wurde diese in drei Subregionen unterteilt (s. Abb. 30), welche getrennt ausgezählt und ausgewertet wurden (s. 3.2.5.2.).

Es waren **keine signifikanten Effekte von Rotenon auf die Dichte dopaminergener Neurone** erkennbar (s. Abb. 30 und 31). Lediglich eine Tendenz zur Reduktion ergab sich in 12 Monate alten Tieren der hoch dosierten Rotenon-Substanzgruppe (4,0 mg/kg KGW) in der zentralen Subregion ($p = 0,065$). Die Ausdehnung der SNc/l zeigten keine signifikanten Abweichungen zwischen Substanz- und Kontrolltieren (ohne Abb., Werte s. Anhang Tab. A12).

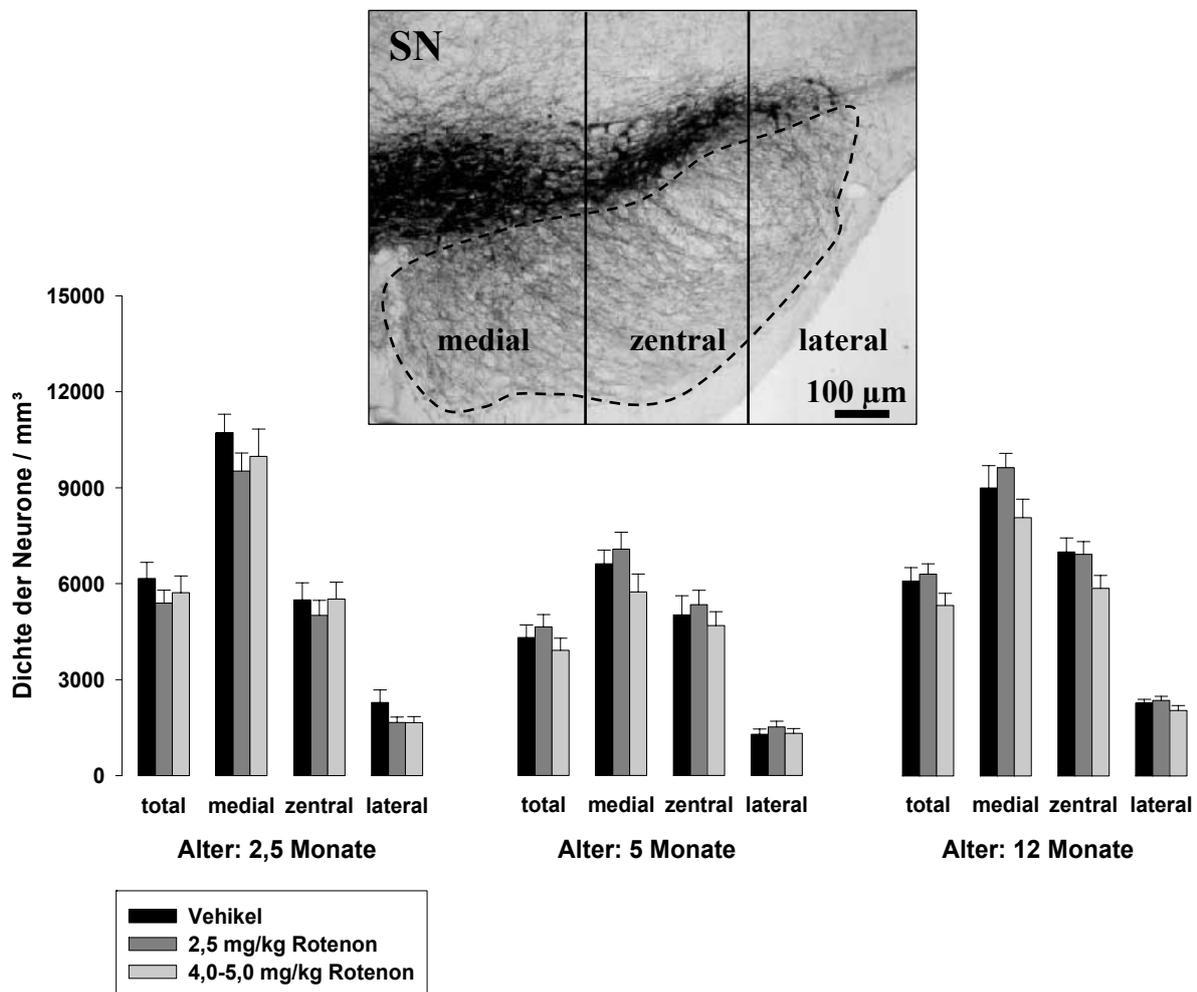


Abb. 30: Dichte TH-positiver dopaminergener Neurone in der SN im chronischen Rotenon-Modell (45 d Rotenon s.c.) in drei Altersgruppen aufgeteilt jeweils in zwei Substanzgruppen (Rotenon) und eine zugehörige Kontrollgruppe (Vehikel: Miglyol). Dargestellt sind die \bar{x} + S.E. der Neuronendichte in der medialen und zentralen Subregion (entspricht der „pars compacta“ der SN) und der lateralen Subregion (entspricht der „pars lateralis“ der SN) sowie jeweils die Mittelwerte („total“) der regionalen Werte für die SN (Beschriftung der Abb. vgl. 3.2.5.2.).

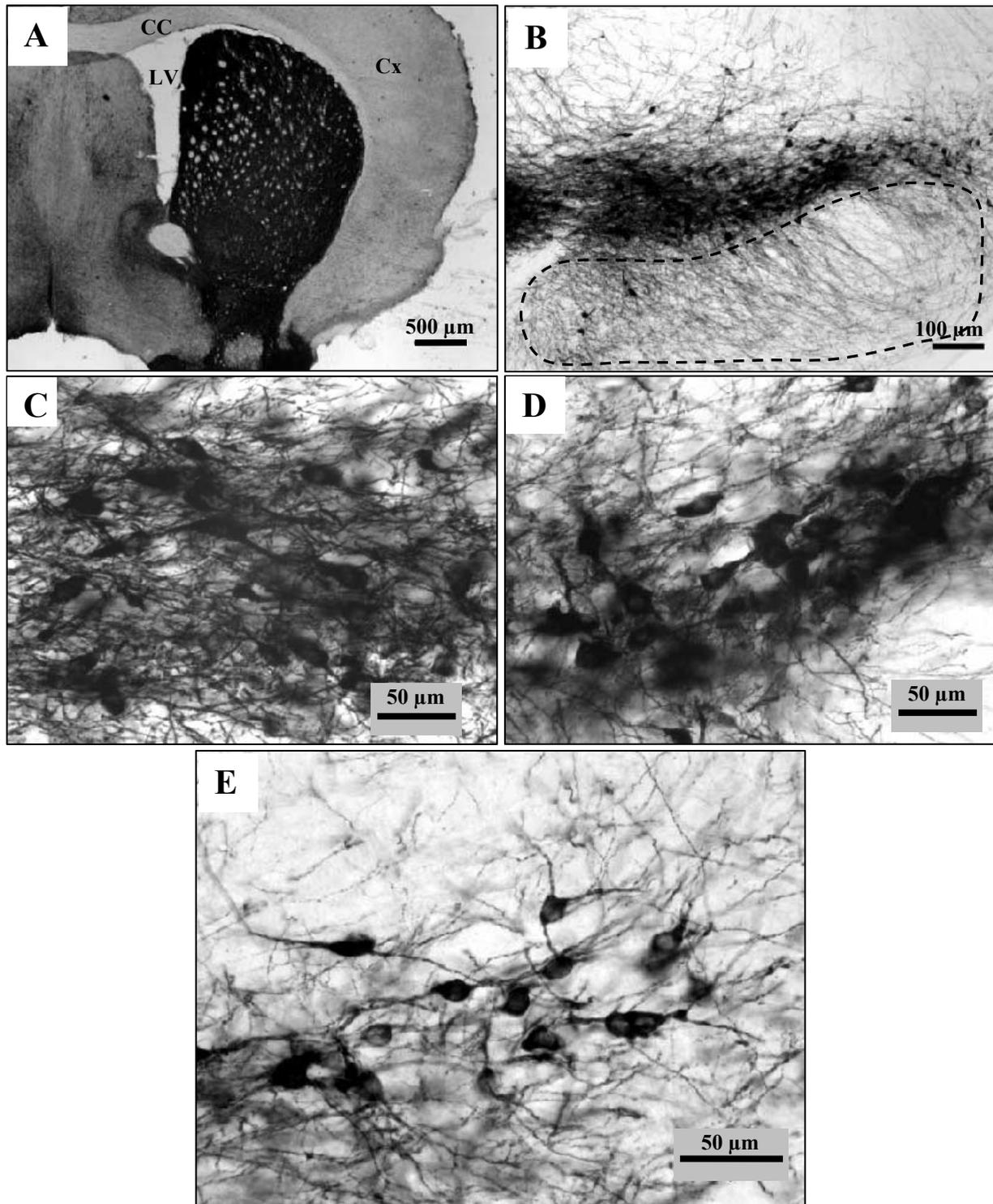
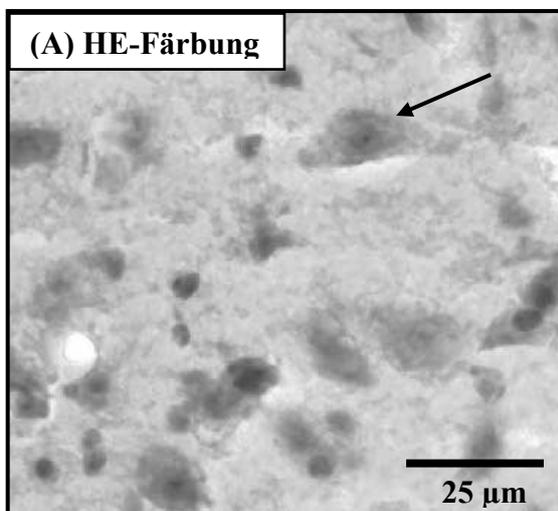


Abb. 31: Histologischen Abb. des Striatums (A) und der SN (B-E) eines 12 Monate alten Tieres nach Behandlung mit 2,5 mg/kg Rotenon über 45 d. Bildausschnitt A zeigt das Striatum, deutlich schwarz markiert durch TH-positive dopaminerge Nervenfasern. Bildausschnitt (B) enthält die SN 3,16 mm posterior zu Bregma. Sie wurde zur Auszählung in drei Subregionen unterteilt: eine (C) mediale und (D) zentrale Subregion (entspricht der „pars compacta“ der SN) und eine (E) laterale Subregion (entspricht der „pars lateralis“ der SN) (s. auch 3.2.5.2.). Ventral der deutlich schwarz gefärbten großen (25 µm) spindelförmigen nigralen Neurone befindet sich die „pars reticulata“ der SN (gestrichelte Linie), gebildet aus dopaminergen Nervenfasern. Die Referenzbalken (A: 500 µm, B: 100 µm, C-E: 50 µm) geben die Größenverhältnisse im histologischen Schnitt an. Weitere Zeichenerklärungen: s. Abb. 17.

4.1.4. Neuropathologische Effekte von Rotenon in Basalganglienstrukturen

Eine Serie von 40 µm dicken Transversalschnitten der Gehirne und exemplarisch 20 µm dicke Schnitte der 2,5 Monate alten Tiergruppe wurden weiteren histologischen Färbungen unterzogen. Die Ergebnisse der Untersuchungen sind in der folgenden Abb. am Beispiel nigraler Neurone dargestellt (Abb. 32). Das Durchmusterung der Präparate ergab **keine Anzeichen degenerativer Veränderungen** in SN, GPe, subthalamischer Nucleus und entopedunkularer Nucleus (GPi). In der HE-Färbung der Gehirnschnitte waren **keine eosinophilen Einschlusskörperchen** in Neuronen der SN erkennbar.



Die Pfeile markieren Neurone, welche anhand der Morphologie als dopaminerg identifiziert wurden. Sie besitzen große (25 µm) spindelförmige Zellkörper mit deutlich erkennbaren Nervenzellfortsätzen. Die kleineren Zellen in der Umgebung sind überwiegend Gliazellen.

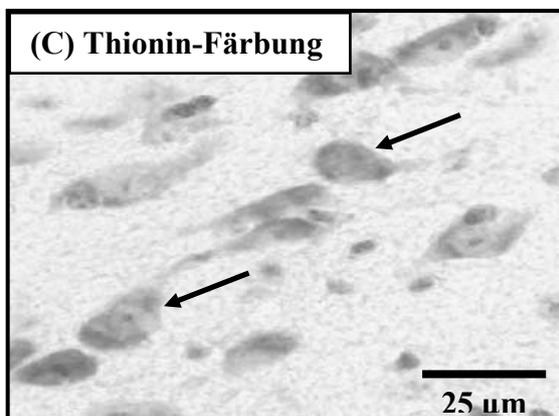
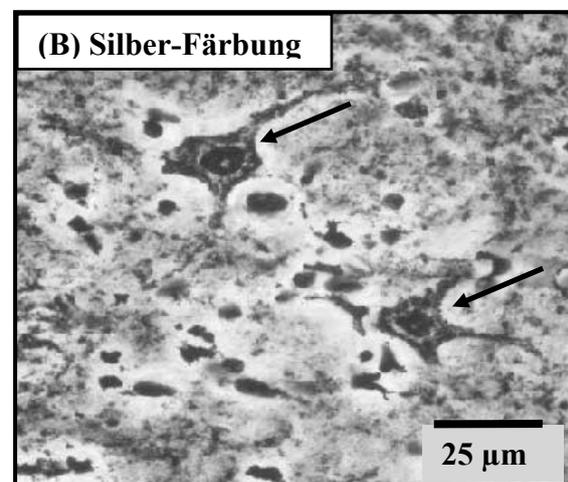


Abb. 32: Histologische Abb. der SN einer Gehirnhälfte einer 2,5 Monate alten Maus nach Behandlung mit 2,5 mg/kg Rotenon über 45 d in der HE-Färbung (A), der Bielschowsky Silbernitrat Färbung (B) und der Thionin-Färbung (C) (exemplarisch angefertigte 20 µm Transversalschnitte bei 400facher Vergrößerung).



In der HE-Färbung wurde auf bis zu 25 µm große, eosinophile Einschlusskörperchen geachtet, welche nicht vorhanden waren. Silbernitrat- und Thionin-Färbung zeigten in keinem Schnitt erkennbare Anzeichen von degenerativen Veränderungen der untersuchten Gehirnregionen. Die Länge der Referenzbalken entspricht 25 µm im histologischen Schnitt.

4.1.5. Periphere organotoxische Effekte von Rotenon

Die histologische Untersuchung von Leber, Nieren, Milz und Hoden sollte die Auswirkungen einer chronischen systemischen Behandlung mit dem zytotoxischen Pestizid Rotenon auf die peripheren Organe zeigen.

In HE-gefärbten Schnitten von Nieren und Hoden (s. Abb. 33) sowie Milz (nicht abgebildet) waren keine sichtbaren Schädigungen zu erkennen.

Dagegen waren Anzeichen von **degenerativen Veränderungen der Leber** vorhanden, die in den hohen Dosierungen (4,0/ 5,0 mg/kg Rotenon) besonders deutlich werden. Das Zellbild war aufgrund von Zellmembranschädigungen und feinschaumiger Vakuolisierung undifferenziert. Weiterhin ist eine Leberverfettung in degenerativ veränderten Organen sichtbar, welche v.a. in 12 Monate alten Tiere auffällig war (s. Abb. 34-36).

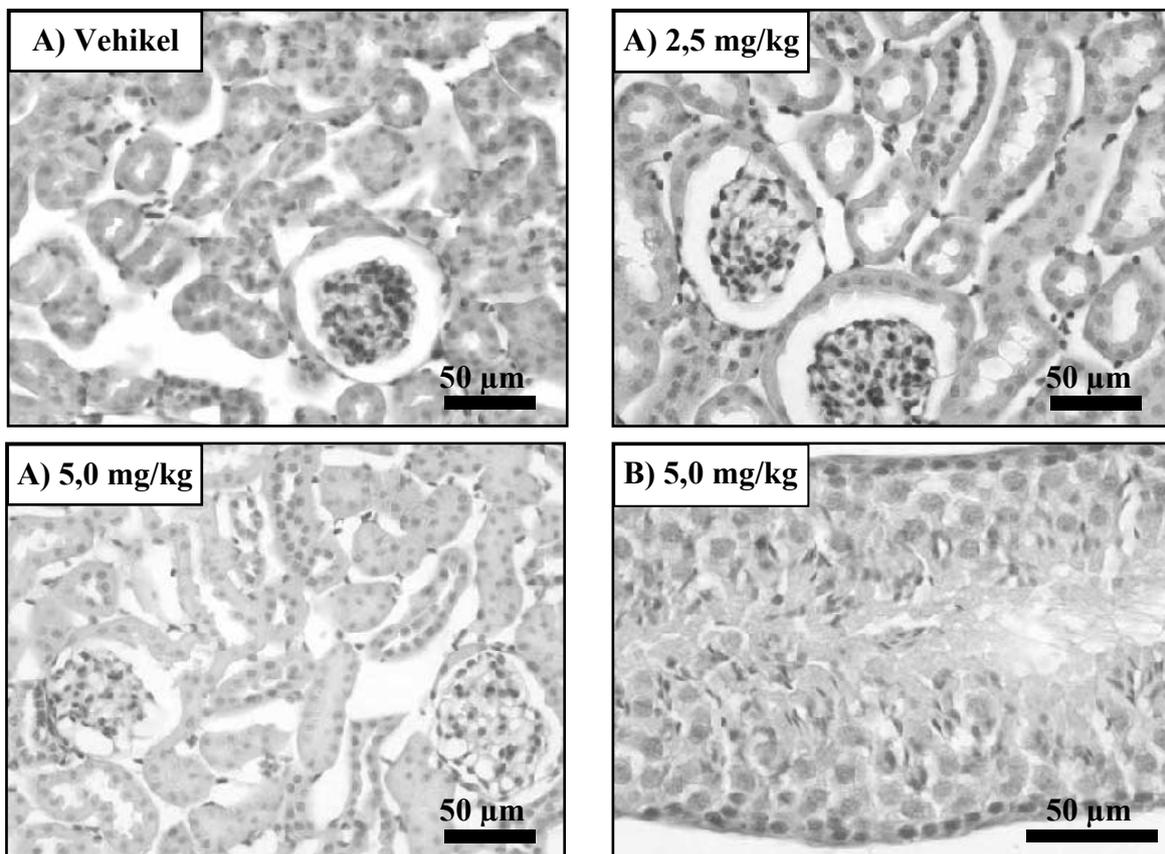


Abb. 33: Niere (A) und Hoden (B) von 5 Monate alten Mäusen nach Behandlung mit Vehikel bzw. Rotenon (2,5 und 5,0 mg/kg) über 30-45 d. In dieser und in den weiteren Altersgruppen waren keine pathologischen Veränderungen erkennbar (5 µm Paraffinschnitte, HE-Färbung, 400fache Vergrößerung, Referenzbalken entsprechen 50 µm im histologischen Schnitt).

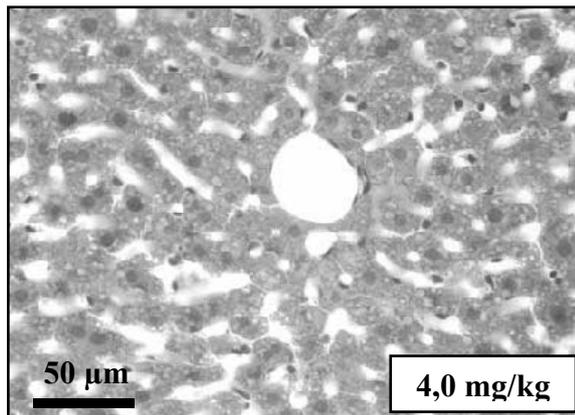
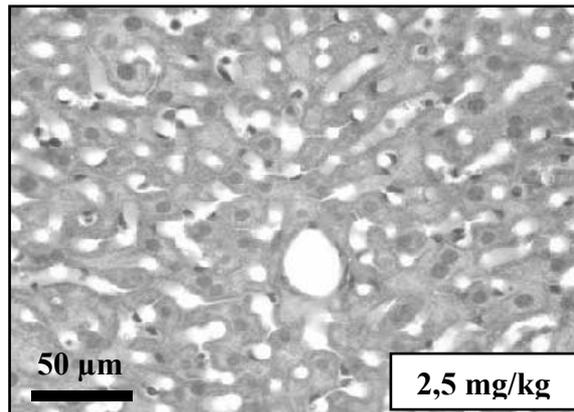
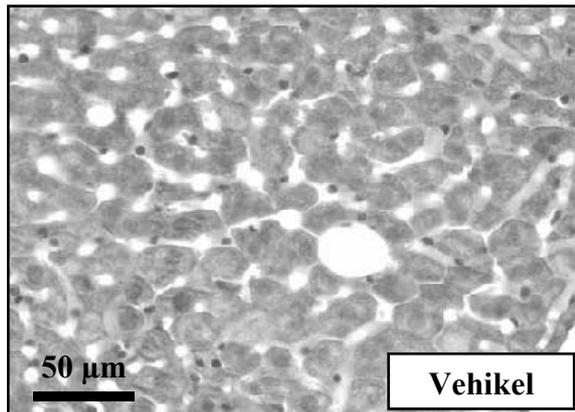


Abb. 34: Leberschnitte von 2,5 Monate alten Mäusen im chronischen Rotenon-Modell. Die Leberzellen besitzen gut erkennbare blauviolette Kerne und sind umgeben von kleinen runden Fettzellen. In den Rotenon-Dosisgruppen sind die Plasmamembranen zum Teil schwer abgrenzbar, ein Anzeichen von degenerativen Veränderungen (5 μm Paraffinschnitte, HE-Färbung, 400fache Vergrößerung, Referenzbalken entsprechen 50 μm im histologischen Schnitt).

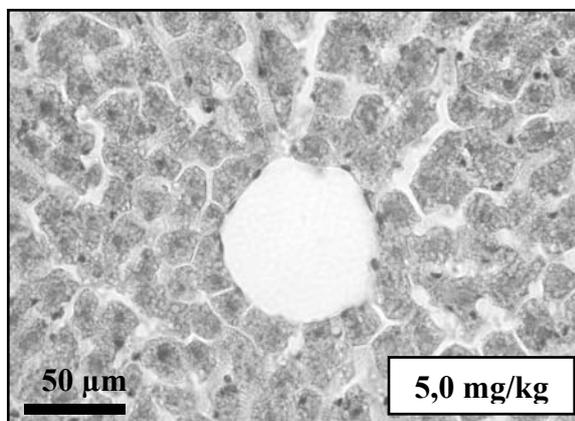
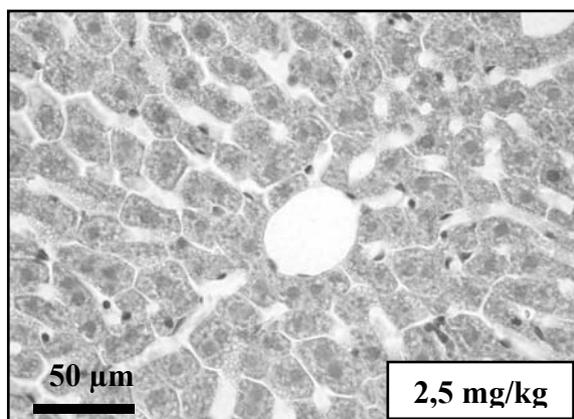
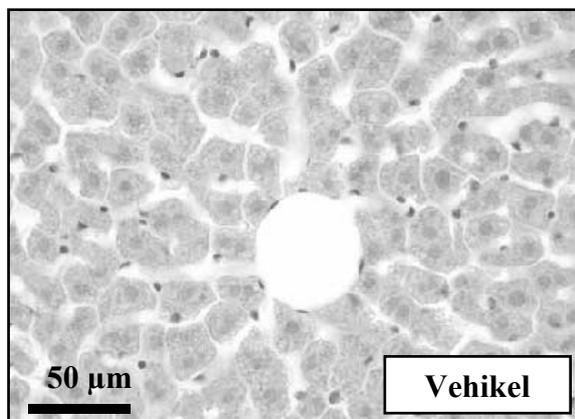


Abb. 35: Leberschnitte von 5 Monate alten Mäusen. Im Vergleich auffällig ist das undifferenzierte Zellbild nach Applikation von 5,0 mg/kg Rotenon über 30 d. Der schlechte Allgemeinzustand der Tiere korreliert mit degenerativen Veränderungen der Leberzellen, mit verschwommenen Zellgrenzen und kaum erkennbaren Zellkernen (5 μm Paraffinschnitte, HE-Färbung, 400fache Vergrößerung, Referenzbalken entsprechen 50 μm im histologischen Schnitt).

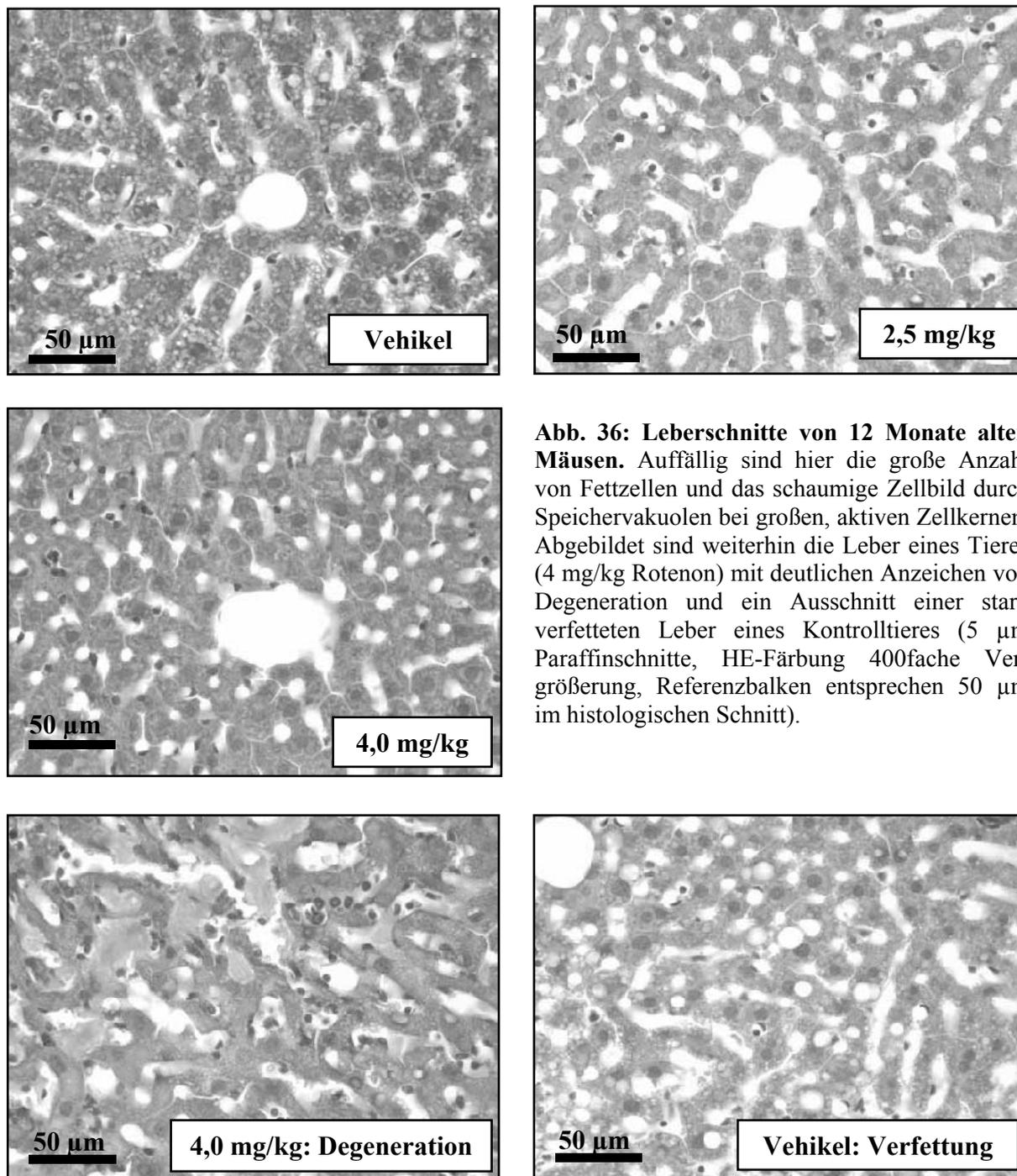


Abb. 36: Leberschnitte von 12 Monate alten Mäusen. Auffällig sind hier die große Anzahl von Fettzellen und das schaumige Zellbild durch Speichervakuolen bei großen, aktiven Zellkernen. Abgebildet sind weiterhin die Leber eines Tieres (4 mg/kg Rotenon) mit deutlichen Anzeichen von Degeneration und ein Ausschnitt einer stark verfetteten Leber eines Kontrolltieres (5 µm Paraffinschnitte, HE-Färbung 400fache Vergrößerung, Referenzbalken entsprechen 50 µm im histologischen Schnitt).

4.1.6. Zusammenfassung: Effekte im chronischen Rotenon-Mausmodell

Ein geeignetes Tiermodell für PD sollte Defizite des motorischen Verhaltens aufweisen, welche auf spezifische neuropathologische Veränderungen im dopaminergen System zurückgeführt werden können. Der Gesundheitszustand der Tiere sollte dabei nicht soweit beeinflusst sein, dass Verhaltenseffekte maskiert oder verstärkt werden.

Das **KGW** zeigte in Rotenon-behandelten und in Kontrolltieren **keine Abnahme** über den Behandlungszeitraum, auch wenn Kontrolltiere generell ein höheres KGW aufwiesen. In einigen Tiergruppen war sogar eine Gewichtszunahme zu verzeichnen. Das **Allgemeinbefinden** war jedoch v.a. im ersten Drittel der Behandlungsdauer **gestört**. In Rotenon-behandelten Mäusen war eine **Letalität von 10-40 %** zu verzeichnen. Hinweise auf eine Beeinträchtigung der Vitalität geben weiterhin die peripheren organotoxischen Effekte von Rotenon, welche in histologischen Untersuchungen der Leberpräparate gefunden wurden. Hierbei waren z. T. deutliche und dosisabhängige Anzeichen von **Leberdegeneration** vorhanden.

Die Untersuchung des motorischen Verhaltens ergab dosisabhängig eine signifikante Abnahme der lokomotorischen Aktivität im Open field und im Activity cage in allen Altersgruppen. Dosis- und altersabhängig war weiterhin eine verminderte Koordination auf dem Rotarod zu verzeichnen. Im Verlauf des Behandlungszeitraumes traten dosisabhängig Anzeichen für Katalepsie im Block-Test und in einzelnen Tieren ein Zittern auf, welches dem Ruhetremor des Menschen ähnelte. Gangstudien ergaben eine Verkürzung der Schrittlänge, unregelmäßigere Schrittfolgen und ein häufiges Verharren in Rotenon-behandelten Tieren aller Altersgruppen. Insgesamt wiesen Rotenon-behandelte Mäuse **verschiedene Charakteristika der Symptomatik von PD** des Menschen auf: Bradykinese, Akinese und Rigor (verkürzte Schrittlänge, Katalepsie, verminderte motorische Aktivität), posturale Instabilität (gestörte Koordination, verändertes Gangbild) und Tremor. Andererseits war auch eine Abnahme der Muskelkraft im Grip-strength Test auffällig, die jedoch im Wire-hang Test nicht bestätigt wurde.

Im Gegensatz zum Rotenon-Rattenmodell (Alam und Schmidt, 2002; Betarbet et al., 2000) waren jedoch **pathomorphologisch keine signifikanten Läsionierungen im striatalen und nigralen dopaminergen System** nachweisbar. Vielmehr war eine signifikant höhere Dichte dopaminergere Fasern im Striatum von Rotenon-behandelten Versuchsgruppen ermittelt worden. Lediglich in der mit 4,0 mg/kg behandelten Rotenon-Substanzgruppe der 12 Monate alten Tiere war eine Tendenz zur Reduktion der Dichte dopaminergere Neurone in der zentralen Subregion der SN vorhanden. Es waren keine Lewy-Körperchen ähnlichen zytoplasmären Einschlüsse in nigralen Neuronen erkennbar. Auch in anderen Strukturen der Basalganglien konnten keine neuropathologischen Veränderungen gefunden werden.

4.2. Wirkungen subchronischer 6-OHDA-Applikationen

Da sich das Rotenon-Modell bei Mäusen v.a. aufgrund eines Mangels an nigrostriatalen Läsionen als nicht geeignet zur Testung neuroprotektiver Substanzen herausstellte, wurde in einer zweiten Versuchsreihe der Einfluss subchronischer intrastriataler Injektionen von 6-OHDA im Vergleich zu akuten, d.h. einmaligen striatalen Applikationen von 6-OHDA bei Mäusen getestet. 6-OHDA zerfällt durch autooxidative Prozesse in Lösung und wird daher häufig mit einem Zusatz von Ascorbat stabilisiert (zu 6-OHDA-Dosierungen und Ascorbatkonzentrationen mit den zugehörigen Literaturstellen s. Tab. 3, 2.7.2.). Um neuroprotektive Effekte von Ascorbat umgehen zu können, wurde bei akuter Applikation des Toxins untersucht, ob auf diesen Zusatz bei entsprechenden Schutzmaßnahmen gegen eine frühzeitige Oxidation von 6-OHDA auch verzichtet werden könnte (Ehrhart und Zeevalk, 2003). Da der Zusatz von Ascorbinsäure im akuten Modell wie unter 4.2.3.6. näher beschrieben keine Verstärkung der pathomorphologischen Effekte erbrachte, wurde im subchronischen Modell (5- und 7-tägige Applikation) darauf verzichtet.

Da im subchronischen 6-OHDA-Mausmodell neurodegenerative Effekte nachweisbar waren, wurden erste Versuche mit dem Neurosteroid DHEA hinsichtlich seiner neuroprotektiven Eigenschaften ergänzt.

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.). Es mussten keine Tiere aufgrund einer Fehllokalisation ausgeschlossen werden. Insgesamt wurden 66 C57Bl/6-Mäuse zur Entwicklung dieses Modells verwendet, wobei 54 dieser Tiere stereotaktisch operiert wurden (vgl. Tab. 6 und 7). Die hier aufgeführten Ergebnisse wurden einer statistischen Varianzanalyse nach dem Schema in Abb. 20 unterzogen. Wie unter 4.2.1. beschrieben, gingen den Untersuchungen Versuche zur Dosisfindung und Methodenentwicklung voran.

4.2.1. Dosisfindung und Methodenentwicklung

Mit Hilfe des stereotaktischen Atlas für die Maus (Paxinos und Franklin, 2001) erfolgte die Festlegung der Koordinaten zur Implantation der Führungskanülen auf 0,8 mm anterior, 1,9 mm lateral und 2,6 mm ventral zu Bregma. Die Festlegung der ventralen Koordinaten führte zu einer Lokalisation der Kanülenöffnung im dorsalen Striatum, denn es sollte möglichst wenig striatales Nervengewebe von der chronischen Implantation der relativ breiten Führungskanülen zerstört werden. In Versuchen zur Methodikentwicklung zeigte sich

nach Implantation der Kanülen bilateral in das Striatum eine gute Vitalität der Tiere und Rekonvaleszenz nach der Operation innerhalb von 2 d. Der Paladur®-Aufbau zur Fixation der Kanülen war über 14 d bei allen Tieren stabil, dann traten Abnutzungserscheinungen auf, die eine Stabilität nicht mehr sicher gewährleisteten, so dass dieser Zeitraum als maximal für die chronische Implantation angesehen wurde. Daher wurden die Tiere 12 d nach der ersten Injektion transkardial perfundiert und die Gehirne zur weiteren Auswertung entnommen.

Es wurden basierend auf Angaben für akute Mikroinjektionen bei der Maus (s. 2.7.2.) verschiedene Injektionsvolumina und Dosierungen von 6-OHDA appliziert. Anhand der Ausmaße der striatalen Läsionen nach einmaliger Injektion und unter Beurteilung der Vitalität der Tiere erfolgte eine Festlegung der Dosierung auf 8 µg 6-OHDA/ Hemisphäre. Injektionsvolumina von 0,5-2,0 µl zeigten kaum Unterschiede in der Ausweitung der Läsion. Da in einem Kanülensystem mit Volumenverlusten aufgrund von Toträumen innerhalb der Kanülen gerechnet werden muss, wurde verschiedenen Literaturangaben bei akuten Mikroinjektionen in der Maus entsprechend das Injektionsvolumen auf 2 µl festgelegt.

Zur Dosisfindung für die i.p. Applikation von DHEA wurden in der Literatur für den Nager angegebene Dosierungen (Ben-Nathan et al., 1991; D'Astous et al., 2003; Maurice et al., 2000; Negrette et al., 2001) bei einem Injektionsvolumen von 10 ml/kg KGW injiziert. Die Substanz löste sich bis zu einer Konzentration von 120 mg/10 ml in 5 bis 20 min vollständig in Miglyol. Beginnend ab einer Dosis von 10 mg/kg KGW wurde in den ersten 30 min nach der Injektion eine herabgesetzte Lokomotion beobachtet, eine weitere Erhöhung der Dosierung (bis 120 mg/kg) verstärkte diesen Effekt bis zur Sedation der Tiere. Nach 3 h waren keine Verhaltenseffekte mehr zu beobachten. Daher wurden 10 mg/kg KGW DHEA jeweils 3 h vor der Mikroinjektion appliziert.

Insgesamt wurden für die unter 4.2.1. genannten Versuche 12 Mäuse verwendet.

4.2.2. Vitalität und Verhalten nach akuten und subchronischen intrastriatalen 6-OHDA-Injektionen

Wie in Abb. 12, (Kap. 3.2.2.1.) dargestellt, wurden die Tiere vor der Operation (d 0) und nach abgeschlossenen Mikroinjektionen (d 16) Verhaltenstests zur Untersuchung der Motorik unterzogen (s. Methodik 3.2.3.). Außerdem wurden bereits während der Mikroinjektion auftretende Verhaltensauffälligkeiten protokolliert. Mit 6-OHDA injizierte Tiere wurden im Verlauf der Applikation unruhiger, es wurde Schwanzschlagen, Piloerektion,

Muskelzuckungen und ein Verharren für maximal 30 min nach Beginn der Behandlung beobachtet.

4.2.2.1. Vitalität und neurologische Reflexe

Im *akuten* 6-OHDA-Modell (bilateral striatal 8 µg 6-OHDA/ 2 µl NaCl/ Hemisphäre mit und ohne Zusatz von Ascorbinsäure) ergab die Varianzanalyse des KGW innerhalb der Versuchsgruppen keine signifikanten Unterschiede über den Versuchszeitraum (s. Abb. 37 A). Zwischen den Versuchsgruppen traten an den einzelnen Versuchstagen keine signifikanten Unterschiede auf.

Im *subchronischen* 6-OHDA-Modell (5 bzw. 7 d bilateral striatal 8 µg 6-OHDA/ 2 µl NaCl/ Hemisphäre) ergab eine Varianzanalyse innerhalb der Versuchsgruppen signifikante Schwankungen des KGW über den Versuchszeitraum, welche während des Injektionszeitraumes am stärksten ausgeprägt waren. Wie aus Abb. 37 B ersichtlich, stabilisierten sich die Werte bis zum Verhaltenstest an d 16 wieder. Zum statistischen Vergleich der Versuchsgruppen untereinander an den einzelnen Versuchstagen s. Tab. 12.

Das Allgemeinbefinden war in einzelnen stereotaktisch operierten Mäusen unabhängig vom Applikationsschema (akut/subchronisch, Substanz/Vehikel) auch nach der Rekonvaleszenz von 2 d im Anschluss an die Operation leicht gestört; die Tiere zeigten ein leicht stumpfes Fell und eine etwas verringerte Futteraufnahme. Über den Injektionszeitraum stabilisierte sich der Zustand der Tiere wieder und sie zeigten zum 2. Verhaltenstest an d 16 ein gutes Allgemeinbefinden. In Gruppe 8 (7 d 6-OHDA) verstarb eines der Tiere an Versuchstag 16 aufgrund von schlechtem Allgemeinbefinden bedingt durch einen infektiösen Prozess im Bereich der Operationswunde und konnte daher nicht mit in die Auswertungen einbezogen werden. Alle weiteren Tiere überlebten den gesamten Versuchszeitraum.

Wie im akuten waren auch im subchronischen Mausmodell die kontrollierten neurologischen Reflexe über den Versuchszeitraum ungestört.

Im Vergleich zu Rotenon-behandelten Mäusen waren die Vitalität und der Allgemeinzustand in den akut oder subchronisch mit 6-OHDA behandelten Tieren insgesamt wesentlich besser.

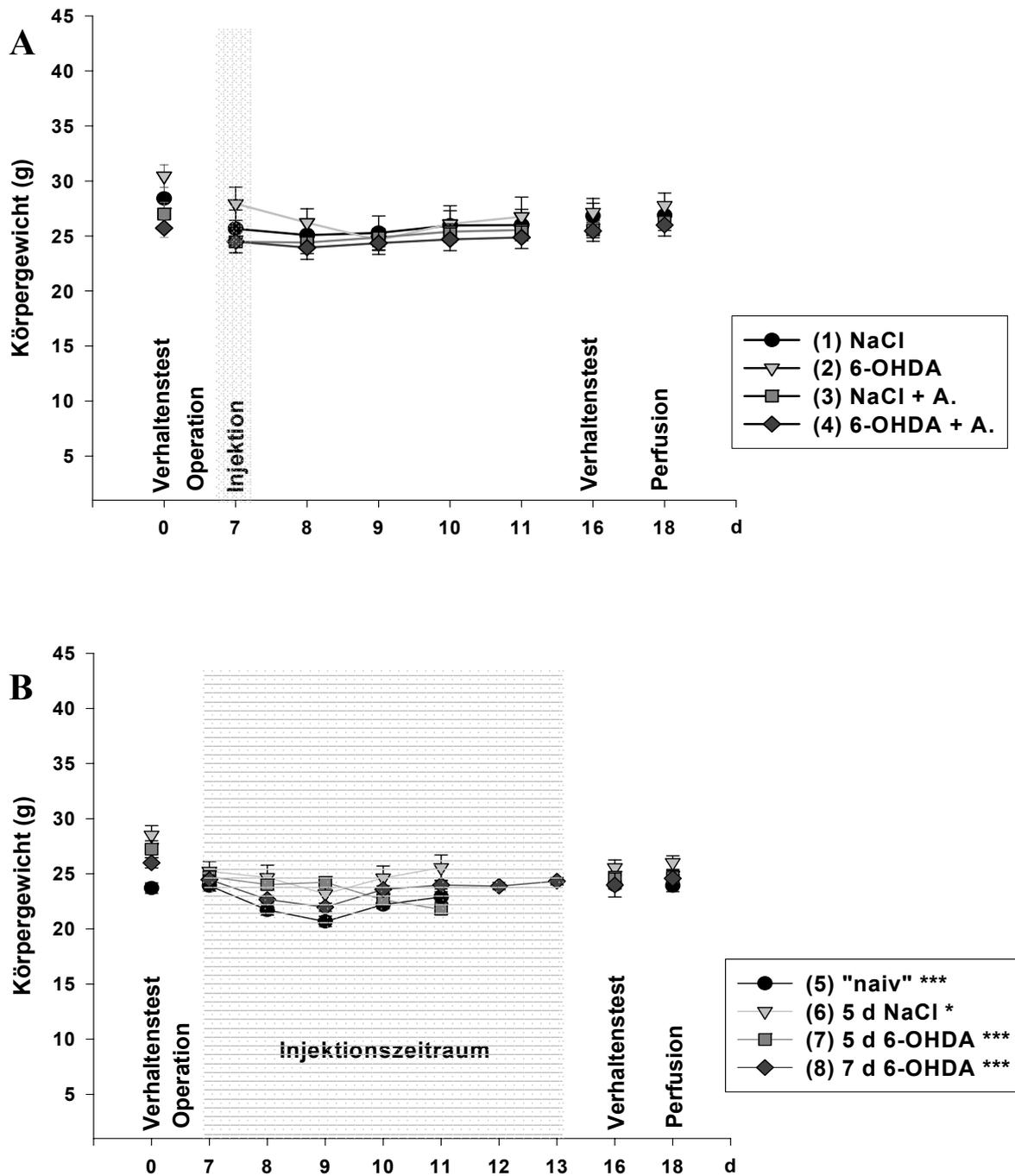


Abb. 37: Körpergewicht im akuten (A) 6-OHDA-Modell (bilateral striatal 8 µg 6-OHDA/ 2 µl NaCl/ Hemisphäre) mit und ohne Zusatz von Ascorbinsäure (A.) und im subchronischen (B) 6-OHDA-Modell (5 bzw. 7 d bilateral striatal 8 µg 6-OHDA/ 2 µl NaCl/ Hemisphäre). Dargestellt sind die Mittelwerte $\bar{x} \pm S.E.$ des KGW in g der 6-OHDA-behandelten Gruppen (A: 2 und 4; B: 7 und 8) im Vergleich zu Kontrollgruppen (A: 1 und 3; B: 5 und 6). Die Sterne kennzeichnen signifikante p-Werte einer Varianzanalyse über den Versuchszeitraum innerhalb der Gruppen (* $p < 0,05$; * $p < 0,001$). Die Einteilung und Größe der Tiergruppen sind den Tab. 6 und 7 zu entnehmen.**

| Versuchsgruppen | Versuchstag | | | | | | | |
|-----------------------------------|-------------|------|------|------|------|----|------|------|
| | 0 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 16 | 18 |
| 5 („naiv“) vs. 6 (5 d NaCl) | *** | * | * | * | * | * | n.s. | * |
| 7 (5 d 6-OHDA) vs. 6 (5 d NaCl) | n.s. | n.s. | n.s. | n.s. | n.s. | ** | n.s. | n.s. |
| 7 (5 d 6-OHDA) vs. 8 (7 d 6-OHDA) | n.s. | n.s. | * | ** | n.s. | ** | n.s. | n.s. |

Tab. 12: Signifikante Unterschiede im KGW. Signifikanztab. zu Abb. 37B. Signifikante Unterschiede zwischen den genannten Versuchsgruppen an den einzelnen Versuchstagen sind durch Sterne gekennzeichnet: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$). Die unbehandelte („naiv“) Kontrollgruppe zeigte bereits zu Versuchsbeginn ein geringeres KGW im Vergleich zur Vehikelgruppe. Das KGW in Gruppe 7 (5 d 6-OHDA) sank zum Ende des Injektionszeitraumes (d 11) ab, stabilisierte sich jedoch bis zum Verhaltenstest an d 16 wieder. Dies zeigt sich auch im Vergleich zu Gruppe 8 (7 d 6-OHDA), da Gruppe 7 an d 8 und d 9 noch ein höheres KGW aufwies, an d 11 dagegen ein signifikant geringeres (n.s.: nicht signifikant).

4.2.2.2. Lokomotorische Aktivität

Innerhalb der akuten und subchronischen Versuchsgruppen zeigte sich nach intrastriatalen Applikationen von Vehikel bzw. 6-OHDA **keine Abnahme der lokomotorischen Aktivität** (Abb. 38). Lediglich unbehandelte („naive“) Tiere (Gruppe 5) zeigten eine verringerte horizontale Bewegungsaktivität im Activity cage (Abb. 38 B).

Dagegen war in einigen stereotaktisch operierten Tiergruppen ein Anstieg der lokomotorischen Aktivität zum Versuchsende zu verzeichnen. Dies zeigte sich im Open field nicht nur für 6-OHDA-behandelte Tiere der Gruppe 7 sondern auch für Kontrolltiere (Abb. 38 A). Schein-läsionierte Kontrolltiere (Gruppe 6; 5 d NaCl) wiesen nach der Behandlung eine signifikant höhere horizontale Bewegungsaktivität als unbehandelte („naive“) Tiere (Gruppe 5) auf (s. Abb. 38). Nach einmaliger Applikation zeigten schein-läsionierte Kontrolltiere (Gruppe 3; 1 d NaCl + Ascorbat) auch in der vertikalen Bewegungsaktivität im Open field einen signifikanten Anstieg, so dass diese an d 16 höher war als in der entsprechenden 6-OHDA-läsionierten Substanzgruppe (Gruppe 4; 1 d 6-OHDA + Ascorbat) (s. Abb. 39). Bereits vor der Operation und Behandlung (d 0) war eine hohe Variabilität der vertikalen Bewegungsaktivität im Activity cage zwischen den Versuchsgruppen zu beobachten.

Die Putzaktivität zeigte bis auf einen signifikanten Anstieg nach 7-tägiger nicht jedoch nach 5-tägiger 6-OHDA-Applikation (Gruppe 8) (s. Abb. 40), keine signifikanten Abweichungen zwischen Gruppen und Versuchstagen.

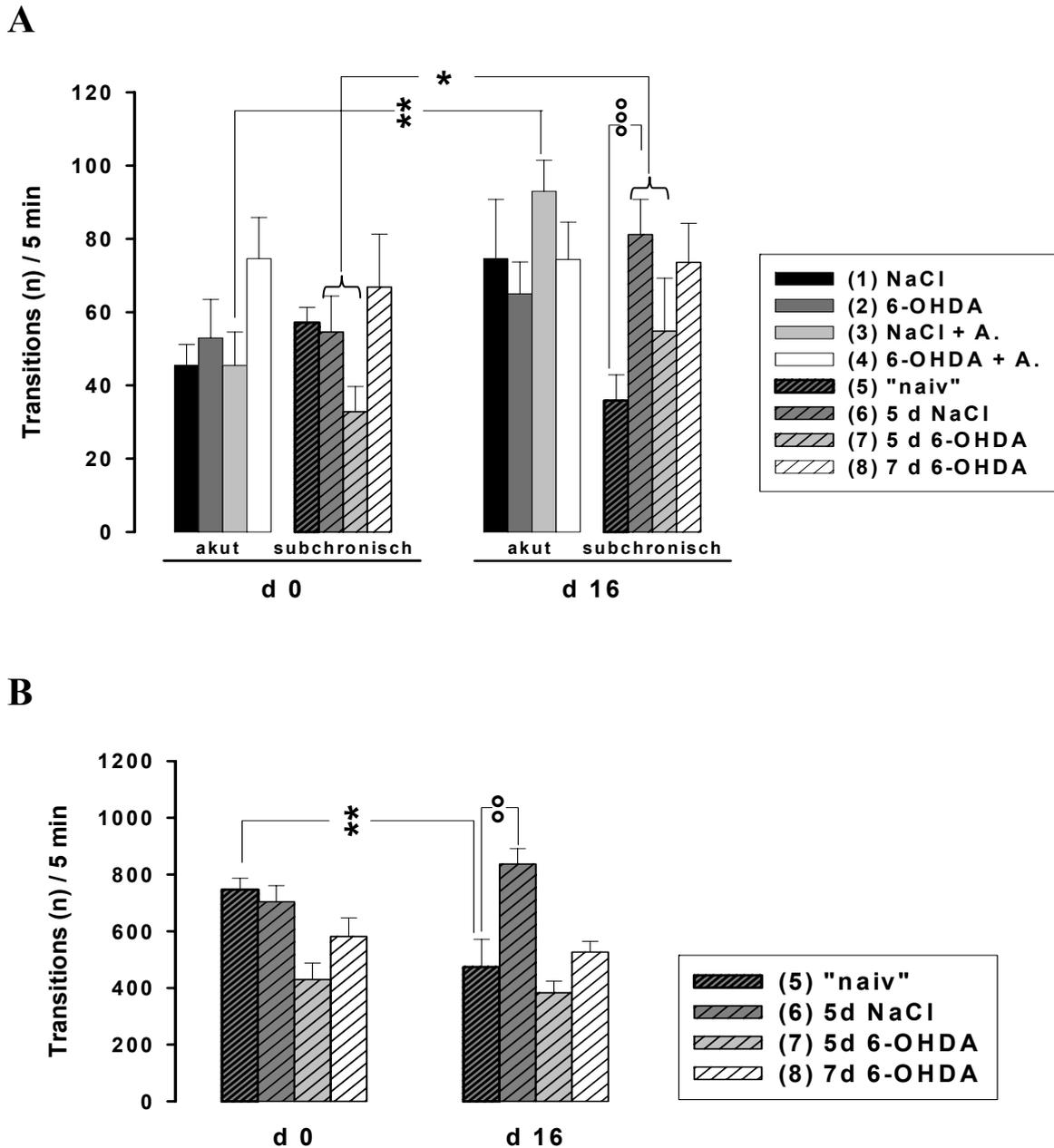


Abb. 38: Horizontale Bewegungsaktivität im Open field (A) und Activity cage (B) im akuten (Gruppen 1-4; A.: Ascorbinsäure) und subchronischen (Gruppen 5-8; jeweils + Vehikel i.p.) 6-OHDA-Modell (bilateral striatal 8 μ g 6-OHDA/ 2 μ l NaCl/ Hemisphäre). Dargestellt sind die \bar{x} + S.E. der überquerten Linien im Open field bzw. der aktivierten Infrarotsensoren im Activity cage („Transitions“) innerhalb von 5 min an Versuchstag 0 (d 0) verglichen mit Versuchstag 16 (d 16). Signifikante Unterschiede sind zwischen den Versuchstagen innerhalb der Gruppen durch Sterne (* p <0,05; ** p <0,01; Two-Way Anova mit jeweils zwei Gruppen) sowie zwischen zwei verschiedenen Versuchsgruppen innerhalb eines Versuchstages durch Kreise (° p <0,01; °° p <0,001) gekennzeichnet. Die Untersuchungen im Activity cage erfolgten nur für die Gruppen 5-8. Die Einteilung und Größe der Tiergruppen sind den Tab. 6 und 7 zu entnehmen.

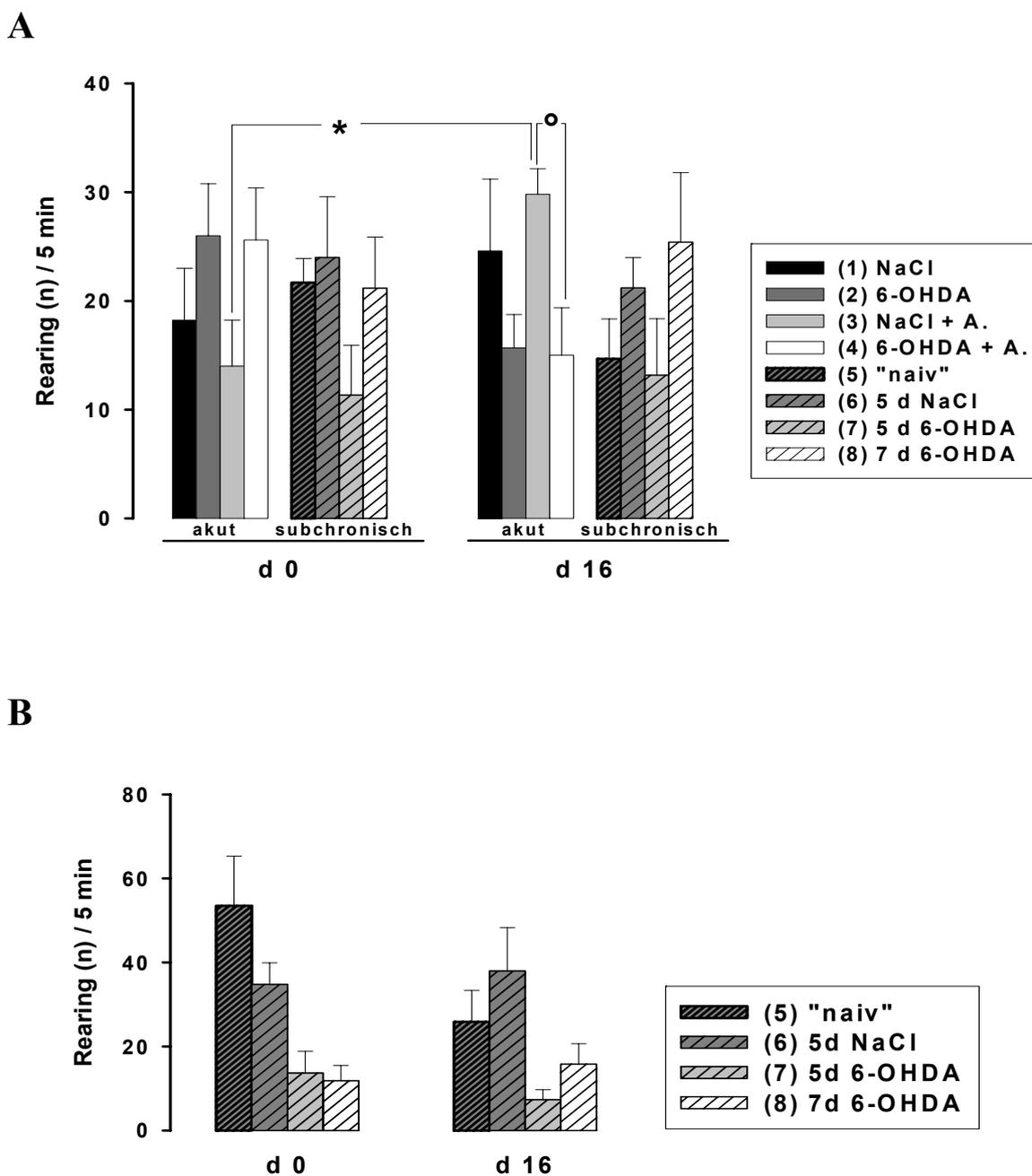


Abb. 39: Vertikale Bewegungsaktivität im Open field (A) und Activity cage (B) im akuten (Gruppen 1-4; A.: Ascorbinsäure) und subchronischen (Gruppen 5-8) 6-OHDA-Modell. Dargestellt sind die \bar{x} + S.E. des Aufrichtens („Rearing“) innerhalb von 5 min an Versuchstag 0 (d 0) verglichen mit Versuchstag 16 (d 16). Signifikante Unterschiede sind zwischen den Versuchstagen innerhalb der Gruppen durch Sterne (* $p < 0,05$) sowie zwischen zwei verschiedenen Versuchsgruppen innerhalb eines Versuchstages durch Kreise (° $p < 0,05$) gekennzeichnet. Weitere Erläuterungen s. Legende Abb. 38.

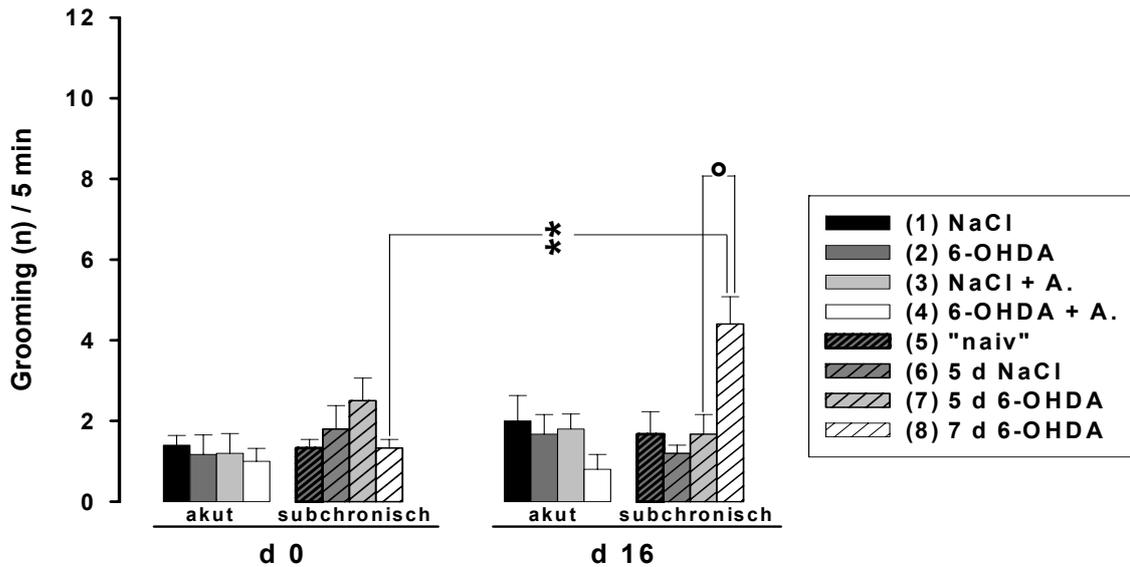


Abb. 40: Putzaktivität (Grooming) im Open field im akuten (Gruppen 1-4; A.: Ascorbinsäure) und subchronischen (Gruppen 5-8) 6-OHDA-Modell. Dargestellt sind die \bar{x} + S.E. des Putzens („Grooming“) innerhalb von 5 min an Versuchstag 0 (d 0) verglichen mit Versuchstag 16 (d 16). Signifikante Unterschiede sind zwischen den Versuchstagen innerhalb der Gruppen durch Sterne (** $p < 0,01$) sowie zwischen zwei verschiedenen Versuchsgruppen innerhalb eines Versuchstages durch Kreise (° $p < 0,01$) gekennzeichnet. Weitere Erläuterungen s. Legende Abb. 38.

4.2.2.3. Muskelkraft und Koordination

Die **Muskelkraft** blieb hingegen im akuten und im subchronischen Modell in mehreren Versuchsgruppen durch die Behandlung nicht unbeeinträchtigt. Im subchronischen 6-OHDA-Modell war eine **signifikante Abnahme** der Griffstärke der Vordergliedmaßen in stereotaktisch operierten Versuchsgruppen unabhängig vom Applikationsschema zu verzeichnen (s. Abb. 41A). Diese Abnahme der Muskelkraft war auch im Wire-hang Test nachweisbar, wobei hier stereotaktisch operierte Tiere im akuten Modell der Gruppen ohne Ascorbinsäurezusatz (Gruppe 1 und 2) und im subchronischen 6-OHDA-Modell nach 5-tägiger Applikation (Gruppe 6 mit NaCl bzw. Gruppe 7 mit 6-OHDA) betroffen waren (s. Abb. 41B).

Die **Koordination** im Rotarod-Test wurde durch die Behandlung **nicht signifikant beeinflusst** (s. Abb. 42). Bereits vor der Behandlung an Versuchstag 0 traten hohe Variabilitäten zwischen den Tiergruppen auf.

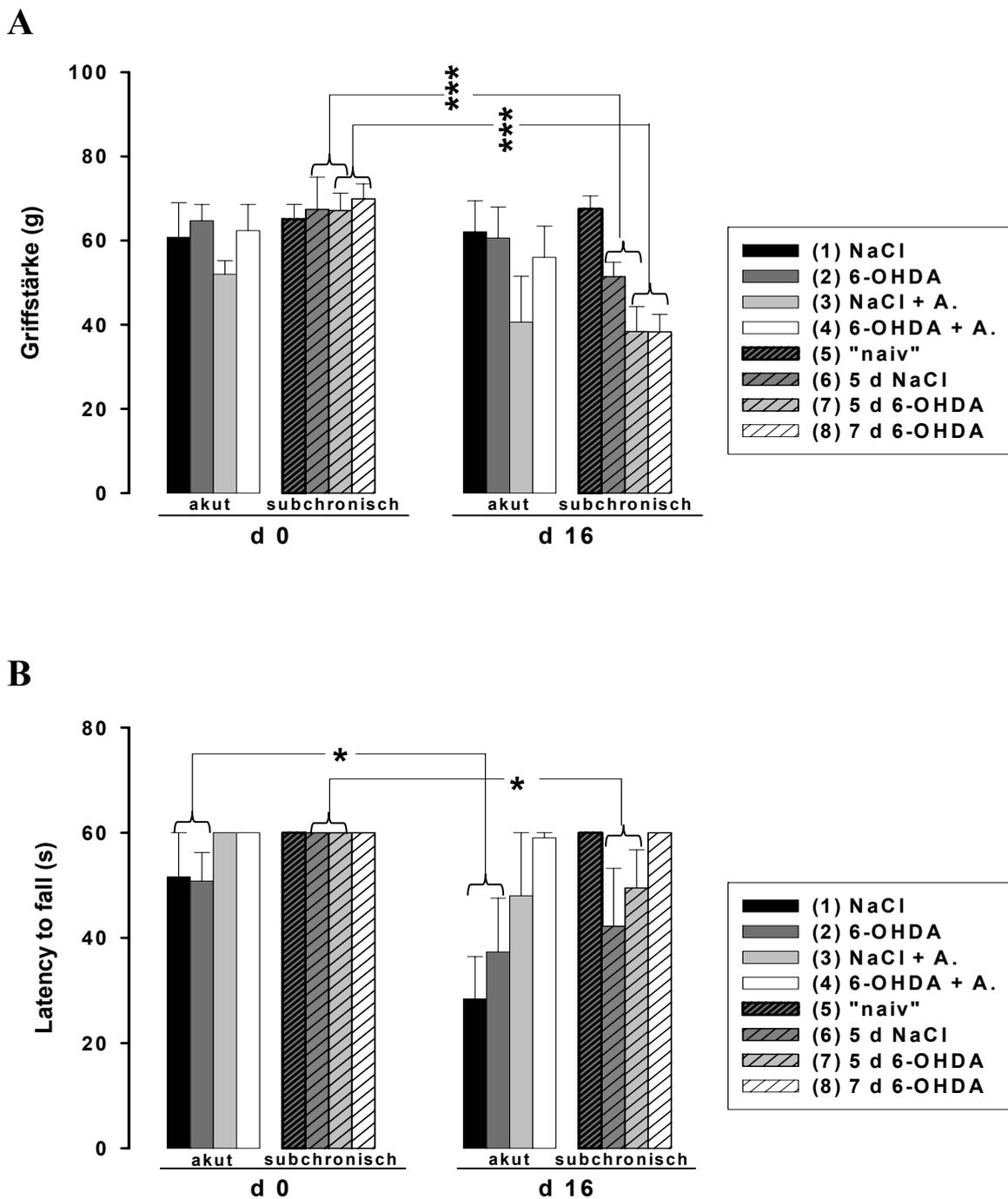


Abb. 41: Muskelkraft im Grip-strength Test (A) und im Wire-hang Test (B) im akuten (Gruppen 1-4; A.: Ascorbinsäure) und subchronischen (Gruppen 5-8) 6-OHDA-Modell. Dargestellt sind die \bar{x} + S.E. der Griffstärke der Vordergliedmaßen in Gramm (A) und der Latenzzeit bis zum Herabfallen („Latency to fall“) in s von einem um 180° gedrehten Käfigdeckel (B) an Versuchstag 0 (d 0) verglichen mit Versuchstag 16 (d 16). Die Sterne kennzeichnen signifikante Unterschiede zwischen den Versuchstagen innerhalb der Gruppen (* $p < 0,05$; * $p < 0,001$; Two-Way Anova mit jeweils zwei Gruppen). Weitere Erläuterungen s. Legende Abb. 38.**

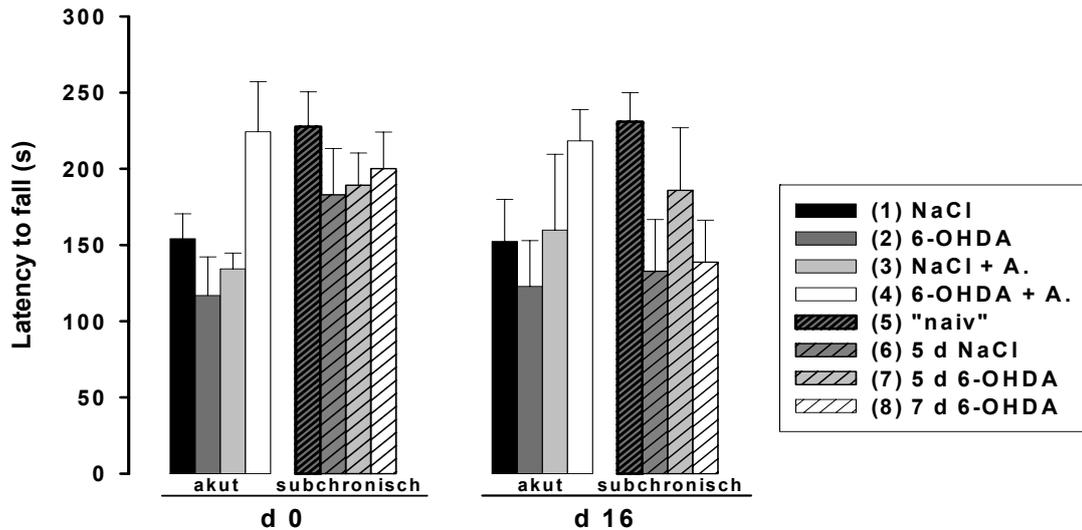


Abb. 42: Koordination auf dem akzelerierenden Rotarod akuten (Gruppen 1-4; A.: Ascorbinsäure) und subchronischen (Gruppen 5-8) 6-OHDA-Modell. Dargestellt sind die \bar{x} + S.E. der Latenzzeit bis zum Herabfallen („Latency to fall“) vom Rotarod in s bei 4-40 rpm an Versuchstag 0 (d 0) verglichen mit Versuchstag 16 (d 16). Weitere Erläuterungen s. Legende Abb. 38.

4.2.2.4. Katalepsie

Nach **7-tägiger 6-OHDA-Applikation** im subchronischen Modell zeigten die Mäuse durch eine signifikant verlängerte „Latency to move“ von 0 (d 0) auf 6 s (d 16) im Block-Test **Anzeichen von Katalepsie** (ohne Abb.; Werte s. Anhang Tab. A19). Im Paw-retraction Test bestätigten sich diese Ergebnisse nicht: die „Latency to move“ lag bei allen untersuchten Tieren immer unterhalb 1 s.

4.2.2.5. Ganganalyse

Im akuten Modell waren keine Abweichungen der „Footprints“ zwischen den Versuchstagen zu verzeichnen. Dagegen zeigten Mäuse, denen **über 7 d 6-OHDA** injiziert wurde und die bereits im Katalepsie-Test auffällig waren, **unregelmäßigere Schrittlängen** und **häufiges Verharren** beim Durchqueren des Tunnels (s. Abb. 43).

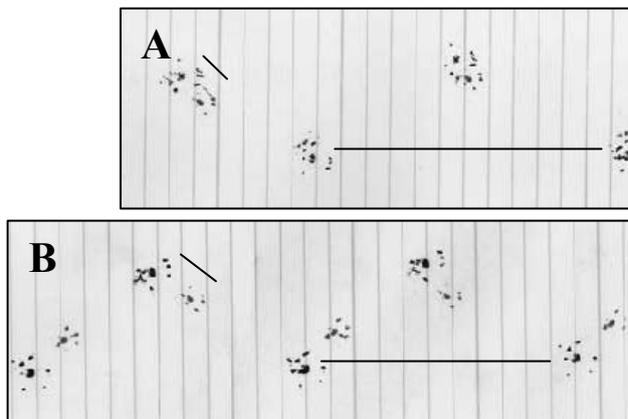


Abb. 43: „Footprints“ einer Maus im subchronischen 6-OHDA Modell vor der Operation (d 0) **(A)** im Vergleich zum Gangmuster nach 7-tägiger Injektion von 6-OHDA **(B)**. Die Schrittlänge ist leicht verkürzt und der Abstand zwischen Vordergliedmaße (rot) und Hintergliedmaße (schwarz) jedes Schrittes ist deutlich größer als im unbehandelten Tier (Linienabstand 6 mm).

4.2.3. Neuropathologische Effekte von 6-OHDA auf das dopaminerge System

Mittels TH-Immunhistochemie wurden dopaminerge Neurone in der SNc und die zugehörigen Nervenfasern im Striatum markiert und einer mikroskopischen Auswertung mit einem Bildanalysesystem unterzogen (Methodik s. 3.2.5.).

Striatale Läsionen

Weder einmalige noch 5-tägige **NaCl-Injektionen** (Gruppen 1, 3 und 6) in das Striatum führten im Vergleich zu den Mäusen ohne Führungskanülen (Gruppe 5) zu Veränderungen.

Wie aus Abb. 44 und 45 ersichtlich waren 12 d nach der einmaligen Mikroinjektion von **6-OHDA unabhängig davon, ob Ascorbinsäure der Injektionslösung zugesetzt war, 26 % des Striatums läsioniert.**

Eine 5- bzw. 7-tägige 6-OHDA-Injektion im *subchronischen Modell* führte **nicht zu einer signifikanten Ausweitung der Läsionsfläche** (Abb. 44 und 45).

Durchschnittlich lag der Mittelwert der im Gehirnschnitt annähernd halbkreisförmig unterhalb der Injektionsstelle ausgedehnten Läsionsfläche bei etwa $0,5 \text{ mm}^2$, was einem Effektradius (Diffusionsstrecke) des Toxins ausgehend von der Injektionsstelle von 0,56 mm entspricht.

Nigrale Läsionen

Im *akuten 6-OHDA-Modell* waren in der **Dichte der nigralen dopaminergen Neurone keine signifikanten Unterschiede** der 6-OHDA-injizierten Substanzgruppen im Vergleich zur jeweiligen Kontrollgruppe zu verzeichnen (Abb. 46 A und 47).

Im Gegensatz dazu zeigte sich im *subchronischen 6-OHDA-Modell nach 5-tägiger Applikation eine signifikant geringere Neuronendichte* in der zentralen SN als bei den über 5 d mit NaCl behandelten Kontrolltieren. Die Verminderung der Neuronendichte war entsprechend den Erkenntnissen der funktionalen Anatomie bei einer Applikation des Toxins im zentralen Striatum (anterioposterior betrachtet) v.a. in der zentralen Subregion der SNc ausgeprägt (vgl. Abb. 46 B). Dieser Befund war Anlass für eine Ergänzung von Versuchsgruppen mit 7-tägiger 6-OHDA-Injektion. Diese nigrale Läsionierung konnte jedoch durch eine Verlängerung der **Applikationszeit auf 7 d weder in dieser Ausprägung erreicht noch weiter verstärkt** werden. Es zeigte sich hingegen sogar eine signifikant höhere Dichte dopaminergen Neurone in der SNc im Vergleich zu den Tieren, denen über 5 d 6-OHDA appliziert wurde (s. Abb. 46 B,C und 47).

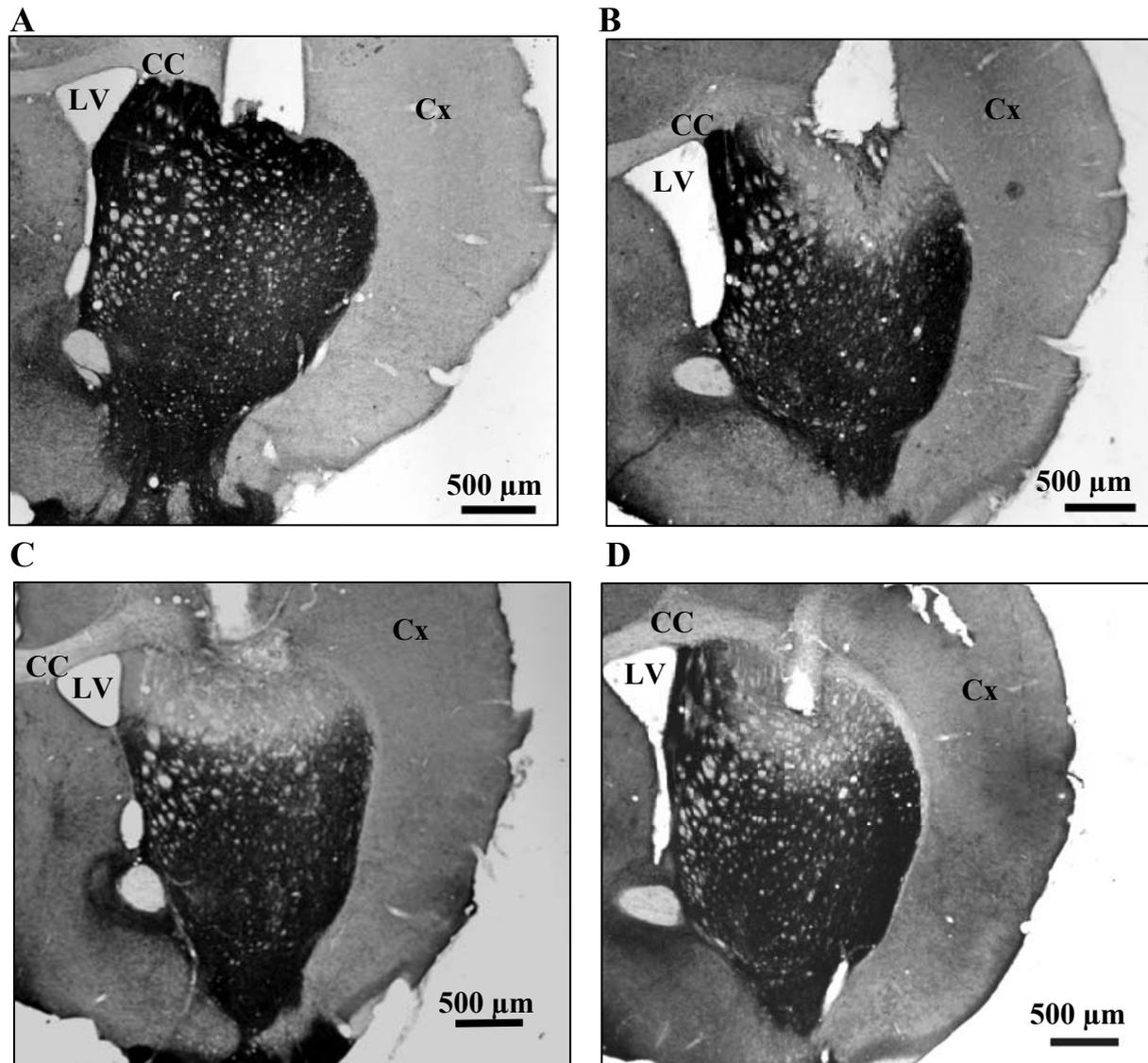


Abb. 44: Striatale Läsionen nach 6-OHDA-Injektion im akuten und subchronischen 6-OHDA-Modell (bilateral striatal 8 µg 6-OHDA/ 2 µl NaCl/ Hemisphäre) 12 d nach der ersten Mikroinjektion. Dargestellt sind das Striatum nach Markierung TH-positiver dopaminerge Nervenfasern (dunkel) mit (A) 5-tägiger NaCl-Injektion ohne Läsionierung, (B) einmaliger 6-OHDA-Injektion, (C) 5-tägiger 6-OHDA-Injektion und (D) 7-tägiger 6-OHDA-Injektion. Zu erkennen ist der Einstichkanal der Führungskanüle und die darunter befindliche Läsionierung dopaminerge Nervenfasern als Aufhellungszone (s. auch Abb. 17). Umrahmt ist das Striatum vom Corpus Callosum (CC), das wiederum vom Kortex (Cx) umgeben ist. Zur Medianen wird das Striatum vom lateralen Ventrikel (LV) begrenzt. Die Länge der Referenzbalken entspricht 500 µm im histologischen Schnitt. Die Einteilung und Größe der Tiergruppen sind den Tab. 6 und 7 zu entnehmen.

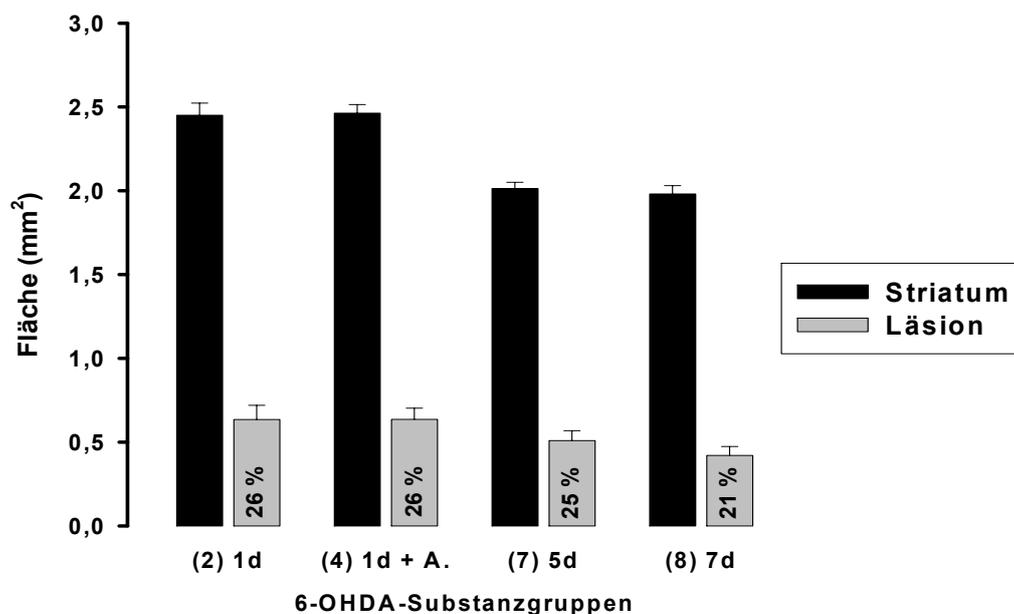


Abb. 45: Striatale Läsionen nach einmaliger Injektion (1 d) von 6-OHDA ohne und mit Ascorbatzusatz (A.) (Gruppe 2 und 4) und nach 5- bzw. 7-tägiger Applikation (5 d, 7 d) (Gruppe 7 und 8) (bilateral striatal 8 μ g 6-OHDA/ 2 μ l NaCl/ Hemisphäre). Dargestellt sind die \bar{x} + S.E. der ausgemessenen Flächen in mm² von Gesamtstriatum und zugehöriger Läsion (Anteil in % der gesamten striatalen Fläche) nach Markierung TH-positiver dopaminerger Nervenfasern. Die Einteilung und Größe der Tiergruppen sind den Tab. 6 und 7 zu entnehmen.

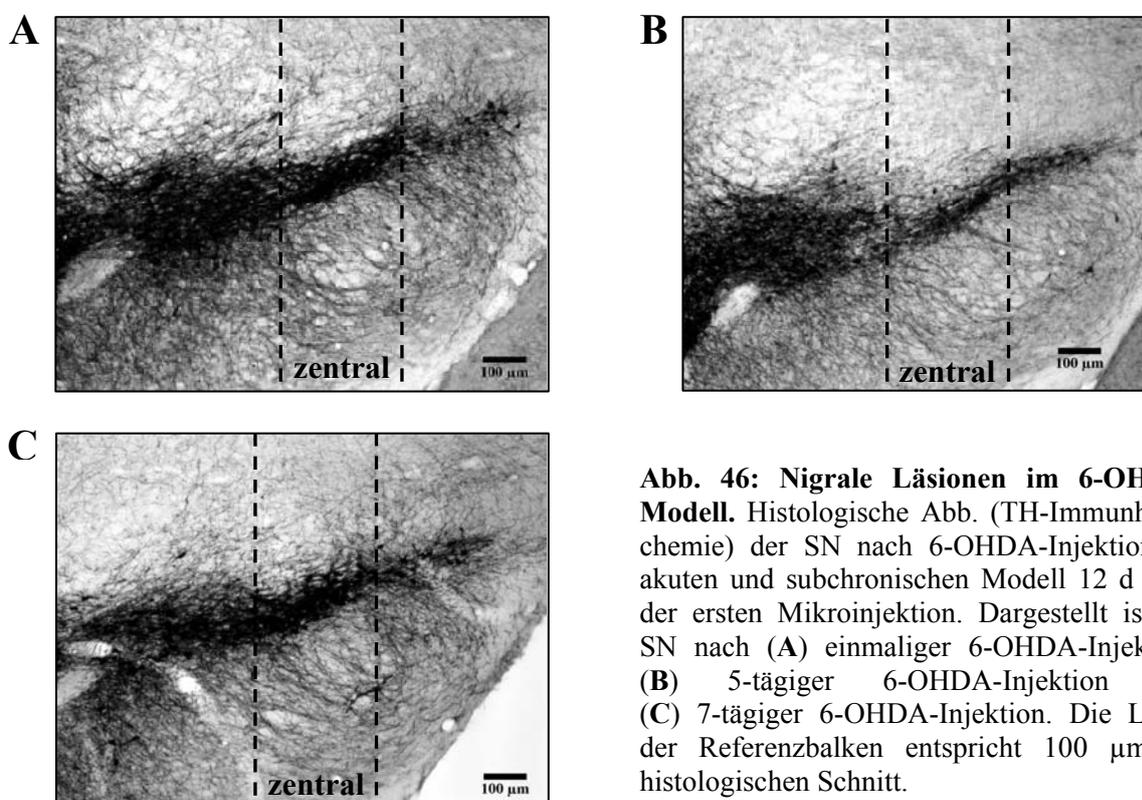


Abb. 46: Nigrale Läsionen im 6-OHDA-Modell. Histologische Abb. (TH-Immunhistochemie) der SN nach 6-OHDA-Injektion im akuten und subchronischen Modell 12 d nach der ersten Mikroinjektion. Dargestellt ist die SN nach (A) einmaliger 6-OHDA-Injektion, (B) 5-tägiger 6-OHDA-Injektion und (C) 7-tägiger 6-OHDA-Injektion. Die Länge der Referenzbalken entspricht 100 μ m im histologischen Schnitt.

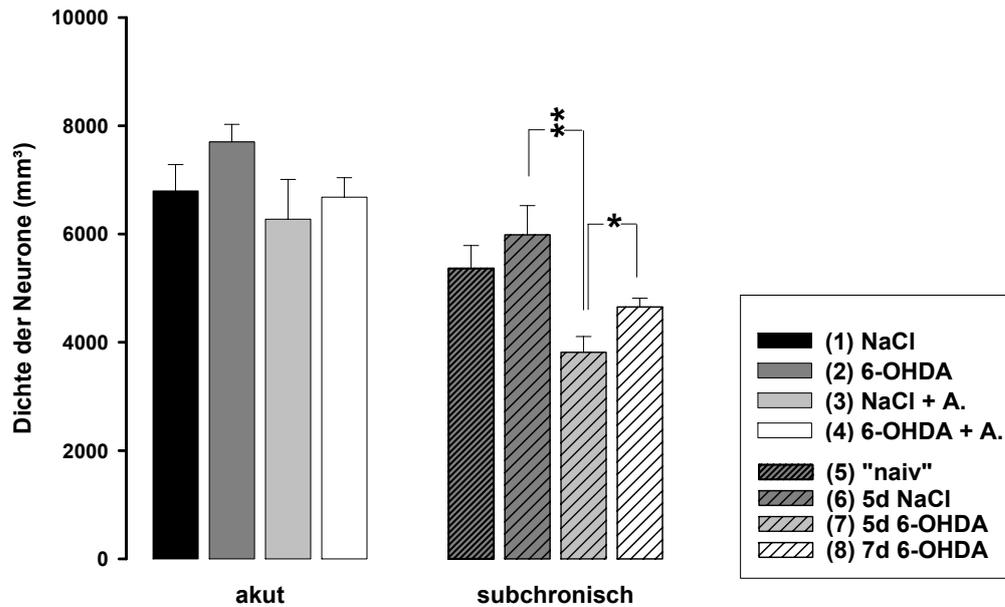


Abb. 47: Dichte TH-positiver dopaminerger Neurone in der zentralen SN im akuten (Gruppen 1-4; A.: Ascorbinsäure) und subchronischen (Gruppen 5-8; jeweils + Vehikel i.p.) 6-OHDA-Modell (bilateral striatal 8 µg 6-OHDA/ 2 µl NaCl/ Hemisphäre) 12 d nach der ersten Mikroinjektion. Dargestellt sind die \bar{x} + S.E. der Neuronendichte. Signifikante Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen nach subchronischer Applikation sind durch Sterne (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$) gekennzeichnet. Die Einteilung und Größe der Tiergruppen sind den Tab. 6 und 7 zu entnehmen.

4.2.4. Zusammenfassung: Effekte im akuten und subchronischen 6-OHDA-Modell

Alle Versuchsgruppen zeigten eine **akzeptable Vitalität** über den Versuchszeitraum. Die **lokomotorische Aktivität** war an d 16 in einigen stereotaktisch operierten und mit NaCl oder 6-OHDA behandelten Gruppen **erhöht** im Vergleich zu d 0, was in „naiven“ Kontrolltieren nicht beobachtet wurde. Die Koordination auf dem Rotarod war in keiner Tiergruppe durch die Behandlung beeinflusst. Messungen der Griffstärke zeigten eine **Abnahme der Muskelkraft** in stereotaktisch operierten Mäusen im subchronischen Modell, welche jedoch unabhängig von der Applikationsdauer und der applizierten Substanz auftrat. Nach 7-tägiger Applikation von 6-OHDA (Gruppe 8) waren **Anzeichen für Katalepsie und Abweichungen im Gangbild** zu verzeichnen. Zwölf d nach der ersten Mikroinjektion von 6-OHDA konnte eine deutliche **Läsionierung dopaminerger Nervenfasern im Striatum** gemessen werden, welche jedoch unabhängig von der Zeitdauer der Applikation oder vom Zusatz von Ascorbinsäure im akuten und subchronischen Modell vergleichbar stark ausgeprägt war. Im Gegensatz hierzu zeigte sich **im subchronischen Modell eine nigrale Läsionierung** durch eine signifikant verringerte Dichte dopaminerger Neurone in der zentralen SN, welche im akuten Modell nicht erreicht wurde. Die Ausprägung der Läsion war jedoch nach 7-tägiger 6-OHDA Behandlung signifikant geringer als nach 5-tägiger Applikation.

4.2.5. Vorläufige Ergebnisse zur Wirkung von Dehydroepiandrosteron (DHEA) im subchronischen 6-OHDA-Modell

Im subchronischen 6-OHDA-Modell (5 bzw. 7 d bilateral striatal 8 µg 6-OHDA/ 2 µl NaCl/ Hemisphäre) wurden die Effekte einer 5- bzw. 7-tägigen Behandlung mit DHEA (10 mg/kg i.p. in 10 ml Vehikel (Miglyol) gelöst) als potentiell neuroprotektive Substanz untersucht. **DHEA** wurde dazu jeweils 3 h vor der Mikroinjektion in vier **Versuchsgruppen (9-12)** appliziert. Als **Kontrolltiere** dienten die **Versuchsgruppen 5-8** des vorangegangenen Kap. mit Applikation des Vehikels Miglyol i.p. jeweils 3 h vor der Mikroinjektion. Eine Übersicht der Versuchsgruppen zeigt Tab. 7. Wie in Abb. 12 dargestellt, wurden die Tiere vor der Operation (d 0) und nach der Mikroinjektion (d 16) Verhaltenstests zur Untersuchung der Motorik unterzogen (Methodik s. 3.2.2.1.).

Da es sich bei diesen Versuchen lediglich um initiale, vorläufige Untersuchungen im Rahmen eines Projekts zur neuroprotektiven Wirkung von Neurosteroiden handelt, wird auf eine ausführliche Darstellung der Ergebnisse bewusst verzichtet. Die Daten sind jedoch den Tab. im Anhang (Tab. A13-A21) zu entnehmen. Im Vergleich zu den Kontrollgruppen hatte DHEA in der Dosis von 10 mg/kg keine Effekte auf Körpergewicht, Vitalität, lokomotorische Aktivität und sonstige Parameter der Motorik, wie Koordination und Muskelkraft.

Auch bei DHEA-Applikation zeigten sich nach 7-tägiger 6-OHDA-Injektion (Gruppe 8) Anzeichen von Katalepsie im Block-Test (vgl. 4.2.2.4.), wobei kein Unterschied zu der entsprechenden Vehikel-Kontrollgruppe (Gruppe 12) auftrat (ohne Abb., s. Tab. A19). Abweichungen der „Footprints“ zwischen DHEA- und Vehikel-applizierten Tieren wurden nicht beobachtet (ohne Abb.).

DHEA zeigte im Vergleich zur Applikation des Vehikels Miglyol keine signifikanten Effekte auf die Ausprägung der striatalen Läsionen nach lokaler 6-OHDA-Injektion (s. Abb. 48). DHEA-injizierte Versuchsgruppen (Gruppe 11 und 12) erreichten nicht die Neuronendichte der Vehikel-injizierten Versuchsgruppe (Gruppe 6), wie in Abb. 49 dargestellt. Die durch eine 5-tägige 6-OHDA-Behandlung verursachte Verringerung der Dichte nigraler Neurone (vgl. 4.2.3., Abb. 47) konnte durch DHEA-Gabe nicht verhindert werden.

Insgesamt hatte DHEA in einer Dosis von 10 mg/kg i.p. keine Effekte auf Verhalten und keine neuroprotektive Wirkung gegen 6-OHDA-induzierte Läsionen. Aufgrund mangelnder Progression der Neurodegeneration bei wiederholten 6-OHDA-Applikationen, d.h. fehlender Eignung des subchronischen 6-OHDA-Modells zur Erfassung neuroprotektiver Effekte, wurde auf Untersuchungen weiterer Dosierungen verzichtet.

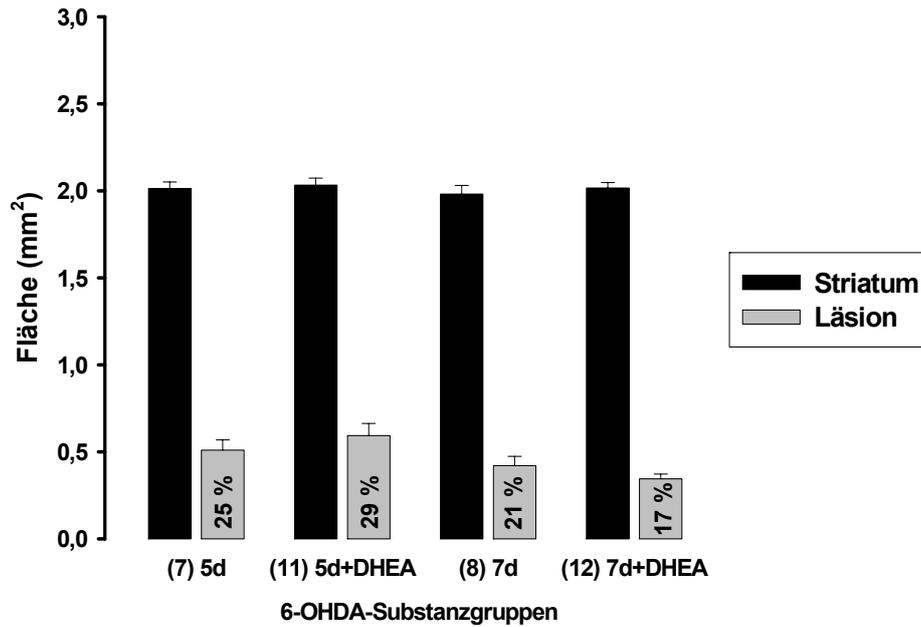


Abb. 48: Striatale Läsionen nach 5- bzw. 7-tägiger (5 d, 7 d) 6-OHDA-Injektion im subchronischen 6-OHDA-Modell in den DHEA-behandelten Gruppen (11 und 12) im Vergleich zu Vehikel-behandelten Gruppen (7 und 8). Dargestellt sind die \bar{x} + S.E. der ausgemessenen Flächen in mm² von Gesamtstriatum und zugehöriger Läsion (Anteil in %) nach Markierung TH-positiver dopaminerger Nervenfasern. Die Einteilung und Größe der Tiergruppen sind der Tab. 7 zu entnehmen.

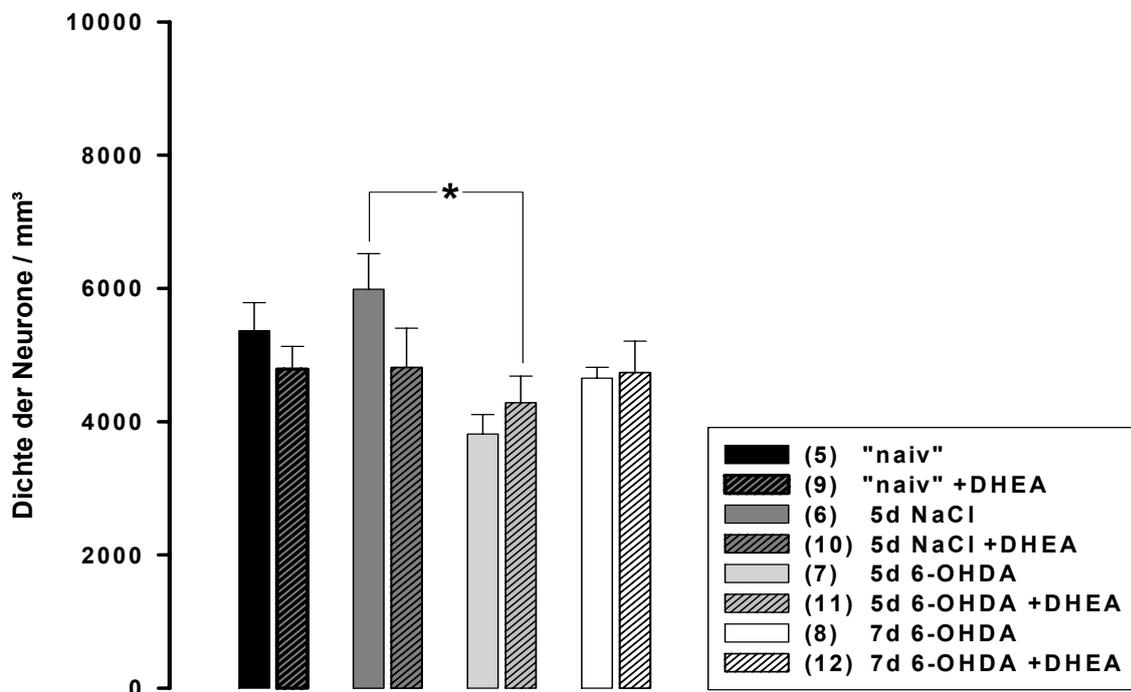


Abb. 49: Dichte TH-positiver dopaminerger Neurone in der SNc im subchronischen 6-OHDA-Modell (bilateral striatal 8 µg 6-OHDA/ 2 µl NaCl/ Hemisphäre) nach DHEA-Applikation (Gruppe 9-12) im Vergleich zur Applikation des Vehikels Miglyol (Gruppe 5-8). Dargestellt sind die \bar{x} + S.E. der Neuronendichte. Signifikante Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen sind durch den Stern (*p<0,05) gekennzeichnet. Die Einteilung und Größe der Tiergruppen sind der Tab. 7 zu entnehmen.