

## 5. DISKUSSION

Tiermodelle für PD sind zur präklinischen Erforschung der Ätiopathogenese und zur Testung innovativer Therapiestrategien unverzichtbar, denn ein komplexes neuronales Netzwerk kann durch Zellkulturen kaum modelliert werden. Untersuchungen in pharmakologisch induzierten PD-Modellen waren Ausgangspunkt der heute als „Goldstandard“ bezeichneten palliativen Dopaminersatztherapie mit L-DOPA (Hornykiewicz, 1963). Die experimentell durch Toxine (MPTP, 6-OHDA, Rotenon) induzierten Tiermodelle mit neurodegenerativen Veränderungen ermöglichten Untersuchungen zur Pathophysiologie und Pathomorphologie der Erkrankung und die Entwicklung ergänzender symptomatischer Therapieverfahren, auch wenn bislang kein Tiermodell den progressiven Verlauf der Erkrankung widerspiegelt (Betarbet et al., 2002).

Für diese Untersuchungen werden zumeist Nagemodelle bevorzugt, die gegenüber dem heute noch oft verwendeten MPTP-Primatenmodell abgesehen von ökonomischen Aspekten Vorteile bezüglich des Tierschutzes bieten. Hierbei müssen jedoch anatomische und physiologische Abweichungen zwischen Nager und Menschen in der Interpretation und Übertragbarkeit der Ergebnisse berücksichtigt werden (Matthews, 2001; Sandoe, 1994). Es muss eine möglichst hohe Vergleichbarkeit zur Erkrankung des Menschen gewährleistet sein, d.h. Tiermodelle sollten die pathologischen („construct validity“), klinischen („face validity“) und therapeutischen (predictive validity“) Merkmale des IPS widerspiegeln und auf den zur Zeit favorisierten ätiologischen Komponenten Alterdefizite, Umweltfaktoren und genetische Prädisposition basieren (Gerlach und Riederer, 1996; Willner, 1986). Nur sorgfältig validierte Tiermodelle sind geeignet, um Therapiestrategien bei der Entwicklung von Arzneimitteln vor der klinischen Anwendung am Menschen zu untersuchen.

Mit der zurzeit verfügbaren Therapie ist lediglich eine Verbesserung der Symptomatik von PD erreichbar, nicht jedoch eine kausale Behandlung oder eine Protektion verbliebener Neurone. Die Erforschung von Therapiestrategien, welche in den progressiven Verlauf der Neurodegeneration eingreifen können, ist daher zukunftsweisend. Bisher konnte keiner der präklinisch in den etablierten Tiermodellen eingesetzten Wirkstoffe in klinischen Studien überzeugende Einflüsse auf die Progression der Erkrankung ausüben (Meissner et al., 2004; Schapira, 2005). Hierdurch wird deutlich, dass diese Effekte in Tiermodellen an progressiven Neuronenverlusten gemessen werden müssen, um prospektive Aussagen über die Wirkung im Humanpatienten treffen zu können. Die verwendeten Tiermodelle sind hierfür nicht ausreichend geeignet oder validiert.

Erste Schritte zur Entwicklung eines Mausmodells, welches die beschriebenen Kriterien erfüllt, sowie erste Untersuchungen einer potentiell neuroprotektiven Substanz, sind daher Inhalt dieser Arbeit.

## **5.1. Aspekte zur Methodik**

### **5.1.1. Systemische und striatale Applikationen**

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., 2003b). Die Applikation erfolgte bei den Mäusen in der vorliegenden Arbeit systemisch, denn Rotenon wurde früher bereits im Gehirn der Ratte und der Maus nach systemischer Applikation bestimmt und die Passage der BHS nachgewiesen (Caboni et al., 2004; Ilivicky und Casida, 1969). In einer Untersuchung war nach akuter Injektion von 10 mg/kg s.c. Rotenon bei Mäusen ein Anstieg der Dopaminmetaboliten und des Laktatspiegels im Striatum gemessen worden (Thiffault et al., 2000). Bedingt durch die hohe Lichtempfindlichkeit zerfällt Rotenon innerhalb weniger Tage in der Umwelt, so dass v.a. die direkte Exposition und Inhalation oder die Aufnahme über Nahrungsmittel epidemiologisch von Bedeutung sind (Hisata, 2002). In der vorliegenden Arbeit wurde darauf geachtet, dass die Rotenon-Lösung in lichtundurchlässigen Gefäßen gekühlt aufbewahrt wurde. Da Rotenon nach oraler Aufnahme kaum resorbiert wird, wie Toxizitätsstudien an Ratten und Hunden über bis zu 24 Monate zeigten (Gorell et al., 1998; Marking, 1988), wurden s.c. Injektionen gewählt. Sie wurden i.p. Injektionen vorgezogen, da Rotenon organotoxische Eigenschaften besitzt (Lapointe et al., 2004), welche sich wahrscheinlich bei Applikation in die Bauchhöhle stärker ausgewirkt hätten. So ist für Rotenon bei der Maus eine LD50 von 5,4 mg/kg bei i.p. Injektion beschrieben (Ellenhorn und Barceloux, 1988), dagegen geben Thiffault et al. (2000) eine signifikante Letalität nach akuter Injektion für 15 mg/kg s.c., nicht jedoch für 5-10 mg/kg an. Zudem sollte die s.c. Injektion möglichst kontinuierliche Plasmaspiegel des Toxins erreichen. Die s.c. oder i.v. Injektion über Minipumpen, wie sie z.T. im Rattenmodell angewandt wird (Betarbet et al., 2000), ist im Mausmodell jedoch mit großem Laboraufwand verbunden und schränkt die Bewegungsfähigkeit der Tiere in den Verhaltensuntersuchungen ein. Zudem waren auch im Rattenmodell bereits Komplikationen durch die Methodik erwähnt worden, so war die korrekte Lage der Katheter nicht immer gewährleistet (Fleming et al., 2004). Daher erschien die tägliche s.c. Gabe in den eigenen Versuchen am sinnvollsten zu sein. Die

Verwendung von Miglyol® 812 (mittelkettige Triglyceride) als Vehikel in Anlehnung an Alam und Schmidt (2004) erwies sich als geeignet, da sich Rotenon darin vollständig und stabil löste. Die ölige Lösung wird in der Unterhaut nicht sofort resorbiert. Die Absenkung des Injektionsvolumen von 10 ml/kg KGW (Standardvolumen für die Maus) auf 5 ml/kg KGW führte zu einer deutlichen Verringerung der Kontamination des Felles der Tiere mit der toxischen Lösung. Auch wenn über die Freisetzung von Rotenon aus einer Miglyol Lösung keine Literaturangaben vorhanden sind, kann basierend auf den beschriebenen neuropathologischen Effekten im Rattenmodell (Alam und Schmidt, 2004) und der in der vorliegenden Arbeit ermittelten systemischen Toxizität bei Mäusen (s. 5.2.1.) von einer ausreichenden Liberation ausgegangen werden.

Zur Entwicklung eines subchronischen *6-OHDA-induzierten Mausmodells* wurde das akute 6-OHDA-Modell in der Maus und der Ratte zugrunde gelegt (Cunningham und Su, 2002; Gerlach und Riederer, 1996; He et al., 2001; Ungerstedt, 1968). Studien mit striataler Applikation von 6-OHDA in der Maus sind selten, wobei 6-OHDA in allen Fällen akut und unilateral injiziert wurde. Gründe hierfür liegen vermutlich in der für Mikroinjektionen über einen längeren Zeitraum benötigten Implantation chronischer Führungskanülen, die bei kleinen Nagern, wie der Maus, Erfahrungen mit der Operationstechnik voraussetzen. Die verwendete stereotaktische Operation und die Mikroinjektionstechnik zur lokalen striatalen Applikation pharmakologischer Substanzen waren im hiesigen Institut bereits in einem Hamstermodell erfolgreich angewendet worden (Hamann und Richter, 2002; Sander und Richter, 2006). Die chronische stereotaktische Implantation von Führungskanülen erwies sich in dieser Arbeit auch bei Mäusen als praktikabel zur subchronischen Applikation von 6-OHDA via Mikroinjektion über den Zeitraum von 5 bzw. 7 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. Da die chronisch implantierten Führungskanülen mit einem äußeren Durchmesser von 0,7 mm im Verhältnis zur lateromedialen Ausdehnung des Striatums der Maus von ca. 2 mm (in 0,8 mm anterior zu Bregma) relativ viel striatales Gewebe verdrängen würden, wurde die Implantation im Bereich des dorsalen Striatums vorgenommen, auch wenn bei einer weiter ventral abgesenkten Führungskanüle die radiäre Verteilungsfläche von 6-OHDA um die Kanülenöffnung einen größeren Bereich des Striatums einbezogen und somit wahrscheinlich zu einer umfangreicheren Läsionierung geführt hätte.

Durch histologische Untersuchungen der Gehirne konnte die korrekte Lage der Führungskanülen im Striatum nachgewiesen werden. Das mittels Mikroinjektionstechnik applizierte Volumen konnte durch die aufgezogenen Farbstoffspiegel in den Plastikschläuchen und die auftretenden akuten Verhaltenseffekte in den mit 6-OHDA injizierten Mäusen gut verfolgt werden. Das Injektionsvolumen von 2 µl ist vergleichbar zu früheren akuten Applikationen von 6-OHDA in der Maus, wobei hier keine Angaben zur Verteilungstrecke vorliegen (Cunningham und Su, 2002; Lundblad et al., 2005; Perez et al., 2005). Bei intraoperativen einmaligen intrakortikalen Injektionen von 1 µl wurde bei Ratten eine radial von der Injektionsstelle ausgehende Verteilung von 1-2 mm angegeben (Arikan et al., 2002; Martin, 1991). In der vorliegenden Arbeit war der durchschnittliche Effektradius unabhängig von der Anzahl der Injektionen mit etwa 0,6 mm ausgehend von der Injektionsstelle deutlich geringer. Ein System, vergleichbar mit den hier chronisch implantierten Führungskanülen, in welche Injektionskanülen abgesenkt wurden, erreichte bei Applikation von 0,2 µl einer Methylenblau-Lösung (appliziert über 5 min) eine radiale Verteilungstrecke von 0,5 mm. Eine Erhöhung des Injektionsvolumens auf 0,5 µl führte nicht zu einer Erweiterung dieser Strecke, stattdessen wurde ein erhöhter Rückfluss entlang des Kanülensystems gemessen (Lohman et al., 2005). Daher könnte es sich hier um einen durch die Methodik der chronisch implantierten Kanülen begrenzten Verteilungsbereich für hydrophile Substanzen handeln.

6-OHDA löste sich sofort in NaCl- bzw. NaCl/Ascorbat-Lösung. Da 6-OHDA unter Lichteinwirkung innerhalb weniger Stunden oxidiert, wurde die Lösung immer unmittelbar vor der Injektion angesetzt. Wie in der Literatur beschrieben entstand eine farblose Lösung, welche unter Lichteinwirkung innerhalb von 1 h durch die Bildung von Oxidationsprodukten (6-OHDA-Quinon) eine rote Färbung annahm (Kostrzewa und Jacobowitz, 1974). Nach eigenen Beobachtungen verminderte der Zusatz von Ascorbat zur Lösung diese Verfärbung, aber auch die Lagerung auf Eis lichtgeschützt durch eine Aluminiumfolie war über einen Zeitraum von 2 h vergleichbar geeignet. Erstaunlicherweise ließen sich keine Literaturangaben finden, in denen gezielt der Umfang der 6-OHDA-induzierten Läsionen mit und ohne Ascorbatzusatz untersucht wurde. Es finden sich lediglich in vitro Untersuchungen, aus denen hervorgeht, dass Ascorbat die Bildung von 6-OHDA-Quinon vermindert und dabei zugleich das hochtoxische H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> freisetzt (Kostrzewa und Jacobowitz, 1974). Da Quinone, wie auch andere Oxidationsprodukte von 6-OHDA, ebenso zu den ROS gezählt werden und toxisch sind für die Zelle, muss hieraus nicht direkt ein Toxizitätsverlust resultieren.

Wahrscheinlich ist jedoch, dass durch eine vermehrte Bildung des hochtoxischen und vielfältig reagierenden  $H_2O_2$  eine umfangreichere Zellschädigung auftreten könnte sowie eine stärkere Beanspruchung antioxidativer Systeme. In dieser Arbeit konnte bei einmaliger Applikation von 6-OHDA die striatale Läsion durch eine Stabilisierung der Lösung mit Ascorbat nicht verstärkt werden. Weder mit noch ohne Ascorbatzusatz konnte nach einmaliger Applikation eine striatale Läsion erreicht werden, die eine umfangreiche retrograde Degeneration nigraler Neurone nach sich zog. Daher erscheint es möglich, wenn es die Fragestellung verlangt, bei entsprechenden Schutzmaßnahmen auf den Zusatz von Ascorbat zu verzichten, so dass die subchronische Injektion von 6-OHDA über 5 bzw. 7 Tage ohne Ascorbatzusatz vorgenommen wurde. Diese Information ist wichtig, wenn in diesem Modell Wirkstoffe auf Neuroprotektion untersucht werden sollen, denn für Ascorbat wird weniger eine Verstärkung der Toxizität sondern auch eine gewisse neuroprotektive Wirkung als Antioxidans diskutiert (Ehrhart und Zeevalk, 2003).

Unter Berücksichtigung von Tierschutzaspekten bei invasiven Eingriffen und aufgrund des großen operativen Aufwandes wurden die Gruppengrößen im 6-OHDA-Mausmodell möglichst klein gehalten. Eine deutliche Zunahme nigrostriataler Läsionen nach 5- bzw. 7-tägiger Applikation im Vergleich zur einmaligen Injektion ist jedoch bei den gewählten Gruppengrößen erkennbar.

### **5.1.2. Untersuchungsmethoden zur Beurteilung des motorischen Verhaltens**

Bei Entwicklung eines PD-Modells müssen die Tiere auf die Ausprägung der im Patienten beschriebenen Kardinalsymptome untersucht werden, d.h. auf Bradykinese, Rigor, Tremor und posturale Instabilität (Gerlach und Riederer, 1996). Die verwendeten Verhaltenstests waren geeignet zur Untersuchung dieser Parameter, wie in der Literatur und in früheren Studien beschrieben (Crawley, 1999b; Ellenbroek et al., 1987; Hamann et al., 2003; Sanberg PR et al., 1996). Das Open field und der Activity cage ermöglichen eine Einschätzung der spontanen Aktivität, basierend auf dem Erkundungsverhalten der Tiere. Hieraus lassen sich v.a. Rückschlüsse auf Bradykinese, Hypokinese und Akinese (Definition s. Literaturübersicht 2.4.) ziehen. Im Activity cage wurde die Messung der horizontalen und vertikalen Aktivität vom System ausgeführt, im Open field vom Untersucher mittels eines Monitors, auf dem die Apparatur durch eine Kamera abgebildet wurde. Der Activity cage zeigte in den Messergebnissen zwischen den Tiergruppen bereits vor der Behandlung stärkere Unterschiede, v.a. in der vertikalen Aktivität, als im Open field. Insgesamt waren die Daten im Open field robuster.

Die Zeit, in der sich die Tiere auf der rotierenden Walze des Rotarod halten konnten, zeigt die Fähigkeit die Motorik des gesamten Körpers einer äußeren Stimulation in einer Stresssituation anzupassen. Durch die Anwendung des akzelerierenden Rotarod mussten die Tiere das Bewegungsmuster ständig einer höheren Geschwindigkeit angleichen und die Bewegungen neu initiieren (Crawley, 1999b). Eine Verminderung der Koordination der Gliedmaßen auf dem Rotarod könnte somit durch Bradykinese, Rigor oder posturale Instabilität bedingt sein.

Im Block-Test wurde Hypokinese und Rigor in Form einer Katalepsie gemessen, wobei gesunde Mäuse eine vom Untersucher auferlegte Körperposition in weniger als 1 s korrigieren können. Im MPTP-Mausmodell ist z.B. eine Latenzzeit bis zur Bewegung von 8 s als Katalepsie beschrieben (Muralikrishnan und Mohanakumar, 1998), im Reserpin-Mausmodell von über 10 s und im Rotenon-Rattenmodell bis etwa 50 s (Alam und Schmidt, 2002). In diesen Modellen wurde keine absolute Latenzzeit definiert, ab welcher von einer Katalepsie gesprochen wird, sondern ein signifikanter Unterschied zu Kontrollzeitpunkten bzw. Kontrolltieren als Orientierung verwendet. Eine maximale Messdauer von 30 s erwies sich in dieser Arbeit als geeignet, da bei Erreichen dieses Wertes bereits ein hochsignifikanter Unterschied zu den Kontrollwerten ( $p < 0,001$ ) vorlag. Im Paw-retraction Test konnte die durch den Block-Test ermittelte Katalepsie nicht bestätigt werden. Vor dem experimentellen Einsatz in den vorliegenden Studien wurde die Eignung zur Feststellung eines kataleptischen Zustandes an einzelnen Mäusen, welche durch die Behandlung mit Haloperidol (0,1-1,0 mg/kg KGW i.p.) eine ausgeprägte Katalepsie zeigten, bestätigt. Dieser Test wird zur Untersuchung der Wirkung von Neuroleptika in der Ratte verwendet, wobei 30 s als Maximum angesetzt und auch erreicht wurden (Ellenbroek et al., 1987). In einer Untersuchung im bilateralen 6-OHDA-Rattenmodell erbrachte dieser Test lediglich eine maximale Zeit bis zum Zurückziehen der Gliedmaßen von 3 s (Andringa et al., 2000). In diesem Modell handelte es sich zudem um Ratten, in welchen dieses Verhalten aufgrund der Größe und der langsameren Bewegungen leichter zu beurteilen ist. Daher scheint dieser Test in der Maus eher geeignet, um eine sehr stark ausgeprägte Katalepsie unter Neuroleptika zu erkennen und dabei Unterschiede zwischen Vorder- und Hintergliedmaßen herauszustellen, wie es in allen zur Etablierung des Testes verwendeten Mäusen gezeigt werden konnte.

Die Ganganalysen mittels „Footprints“ waren gut geeignet, um Ganganomalien zu erkennen und aufzuzeichnen. Eine Verkürzung der Schrittlänge und das Innehalten in der Bewegung können auch als Bradykinese oder Hypokinese interpretiert werden. Unregelmäßigkeiten im

Aufsetzen und Vorführen der Gliedmaßen könnten Anzeichen für einen Mangel an Koordinationsfähigkeit und für posturale Instabilität sein (Sedelis et al., 2001).

Beachtet werden muss bei der Interpretation von Untersuchungen des motorischen Verhaltens, dass dieses nicht nur von der zentralen Modulation durch die Basalganglien, sondern von weiteren zentralen und peripheren Nervenstrukturen sowie vom Allgemeinzustand der Tiere abhängig ist (Matthews, 2001). Hierauf muss v.a. dann geachtet werden, wenn die pharmakologische, toxikologische oder genetische Manipulation am Tier systemisch vorgenommen wird und Verhaltenseffekte nicht von vornherein auf spezifische Strukturen oder Gewebe zurückführbar sind (Buccafusco, 2001; Crawley, 1999b), was häufig bei der Untersuchung spezifischer Fragestellungen vernachlässigt wird. Daher wurden über die Versuchszeiträume die Vitalität der Tiere aufgezeichnet und anschließend der Tierkörper auf periphere toxische Schädigungen untersucht. Untersuchungen im Wire-hang Test und im Grip-strength Test dienten in dieser Arbeit v.a. der Überprüfung der Muskelkraft, da unspezifische und periphere Effekte der Toxine diese herabsetzen könnten, was in einem PD-Modell zentral bedingte motorische Defizite maskieren oder verstärken könnte. Der Grip-strength Test war geeignet, um die Muskelkraft der Vordergliedmaßen ( $\bar{x}$  aus 5 aufeinanderfolgenden Kraftmessungen) bei der Maus zu bestimmen. Der Wire-hang Test wird in einigen Untersuchungen auch als „Klettertest“ verwendet, womit motorische Aktivität und Koordination bestimmt werden (Colotla et al., 1990). In dieser Arbeit wurde jedoch weniger Geschicklichkeit und Beweglichkeit untersucht, sondern eher die Befähigung sich aus eigener Kraft eine vorgegebene Zeit am Gitter festzuhalten. Die Festlegung des Maximalwertes auf 60 s basiert auf einer Standardprozedur (Crawley, 1999a).

Defizite im motorischen Verhalten können auch durch Störungen der Sensorik verursacht sein, und ebenso kann eine verminderte motorische Reaktion auf eine Stimulation als sensorisches Defizit interpretiert werden, wie es z. B. im 6-OHDA-Rattenmodell aber auch im PD-Patienten beschrieben ist (Gerlach, 2003; Schwarting und Huston, 1996a). Sensorische Defizite wurden in dieser Arbeit nicht explizit untersucht, die motorischen Verhaltenstests enthalten jedoch eine sensorische Komponente (v.a. Erkundungsaktivität und Rotarod), was in der Diskussion der Ergebnisse berücksichtigt werden muss. Kognitive und psychische Störungen, wie sie im PD-Patienten auftreten (Jellinger, 1991), sind hier wie auch in anderen Tiermodellen für PD selten untersucht worden (Dluzen und Kreutzberg, 1993; Le Moal und Simon, 1991; Tanila et al., 1998), könnten jedoch als Anzeichen von pathologischen Veränderungen außerhalb des nigrostriatalen Systems (z.B. noradrenerges, serotonerges, mesolimbisch-dopaminerges System) eine Rolle bei der Interpretation von motorischem

Verhalten spielen. Weiterhin wird das motorische Verhalten vom Stresszustand der Tiere beeinflusst und variiert mit dem Testprotokoll (Testdauer, Dauer der Habituation), der Untersuchungsumgebung (Apparatur, Transportstress, Tageszeit) und dem Untersucher (Erfahrung im Umgang mit den Tieren) selbst, so dass ein hohes Maß an Standardisierung erforderlich ist (Bailey et al., 2006; Crawley, 1999b; McIlwain et al., 2001; Paylor et al., 2006; Van Zutphen et al., 1995; Wahlsten et al., 2003). Das dopaminerge System zeigt unter Stresseinfluss eine erhöhte Aktivität, messbar in einer ansteigenden Dopaminausschüttung u.a. im Striatum, was insbesondere im PD-Modell beachtet werden muss (Abercrombie et al., 1989; Weihmuller et al., 1988). In eigenen Untersuchungen zeigten die Tiere nach einstündiger Eingewöhnungszeit im Versuchsraum in ihren Heimkäfigen keine äußeren Anzeichen von stressgestörtem Verhalten. Die Tageszeit und Dauer der Versuche, die Reihenfolge der Tiere und der Verhaltenstests und die Umgebungsbedingungen waren standardisiert. Da für das Open field eine höhere Sensitivität hinsichtlich vorangegangener Testdurchläufe beschrieben ist, wurden die Verhaltensuntersuchungen auf 2 Tage aufgeteilt (Paylor et al., 2006) und aufgereiht nach Sensitivität hinsichtlich vorangegangener Testdurchläufe. Zudem wurde im Rotenon-Mausmodell am 1. Testtag (Open field) erst nach erfolgtem Verhaltenstest injiziert und am 2. Testtag darauf verzichtet, um Einflüsse akuter Effekte auf das Verhalten der Tiere zu minimieren. Eine Habituation, welche bei mehreren Testdurchgängen v.a. für die Erkundungsaktivität im Open field oder im Activity cage beschrieben wird (Bolivar et al., 2000; Platel und Porsolt, 1982), ist auch in dieser Arbeit möglich. Im Open field zeigten Kontrollgruppen häufiger eine Aktivitätsabnahme als im Activity cage, allerdings waren im Activity cage, wie oben erwähnt, generell höhere Schwankungen aufgetreten. Die verschiedenen Altersgruppen im Rotenon-Mausmodell sowie die akuten gegenüber den subchronisch injizierten Versuchsgruppen im 6-OHDA-Mausmodell wurden nicht parallel, sondern im Jahresverlauf aufeinander folgend untersucht. Trotz hochgradiger Standardisierung der Versuche sind Unterschiede im Verhalten bedingt durch jahreszeitliche oder veränderte äußere Einflüsse nicht auszuschließen (Wager-Smith und Kay, 2000), so dass die Vergleiche zwischen diesen Gruppen nicht statistisch sondern nur beschreibend anhand der jeweils aufgezeigten Effekte vorgenommen worden sind.

Da in einigen Verhaltenstests maximale Beobachtungszeiten festgelegt wurden, kann es in diesen Testverfahren zur Erhebung zensierter Daten kommen. Ein Gruppenmittelwert spiegelt dann nur bedingt die tatsächliche Leistung in dieser Gruppe wider. Eine statistische



Auswertung mit komplexen Verfahren für zensierte Daten erschien für die Fragestellung nicht notwendig und ist auch in der zitierten Literatur nicht verwendet worden.

### 5.1.3. Neuropathologische Untersuchungsmethoden

Ein geeignetes PD-Modell muss die pathomorphologischen Kriterien im PD-Patienten möglichst umfassend widerspiegeln. Hierzu gehört als Hauptkriterium die Degeneration dopaminergener Neurone der SN und ein daraus resultierender Nervenfaserverlust im Striatum. Dieses Merkmal wurde in beiden PD-Mausmodellen durch eine immunhistochemische Markierung untersucht, welche die gezielte Darstellung dopaminergener Neurone ermöglicht, indem ein spezifischer Antikörper an die TH, das geschwindigkeitsbestimmende Enzym der Dopaminsynthese, gebunden wurde. Beachtet werden muss hierbei, dass die Stärke der Markierung abhängig ist vom Gehalt der Neurone und Nervenfasern an TH, d.h. es sind nicht zwingend Faser- oder Zellverluste vorhanden, wenn diese nicht dargestellt sind. Untersuchungen im MPTP-Modell zeigten durch vergleichende histologische Quantifizierung (mittels z.B. einer Nissl-Färbung), dass die Abnahme der TH-Immunreaktivität stärker ausgeprägt ist, als der Neuronenverlust, d.h. MPTP führt zu einer Abnahme des TH-Gehaltes (Jackson-Lewis et al., 1995). Umgekehrt ist im 6-OHDA-Modell beschrieben, dass bei Neuronenschädigungen im dopaminergen System die verbliebenen Nervenzellen kompensatorisch verstärkt DA ausschütten (Robinson und Whishaw, 1988), TH stärker exprimieren (Onn et al., 1986) und somit den Neuronenverlust maskieren könnten. Die positive Korrelation im MPTP-Modell zwischen TH-Immunreaktivität und Neuronenverlust und die Möglichkeit einzelne Nervenzellen zu detektieren und zu quantifizieren (Seniuk et al., 1990) steht einer sehr variablen Korrelation zwischen striatalem Dopamingehalt und Neuronenverlust gegenüber (Jackson-Lewis et al., 1995; Sved et al., 1984). Unter Beachtung dieser Zusammenhänge ist die TH-Immunhistochemie daher der neurochemischen Analyse des Dopamingehaltes vorzuziehen, um erste Aussagen zu neuropathologischen Effekten in den Mausmodellen zu treffen. Die Anfertigung von histologischen Färbungen (Silbernitrat-, Thionin-Färbung) diente zusätzlich der Auswertung pathologischer Effekte, da hier die Morphologie der dopaminergen Neurone, aber auch anderer Nervenzelltypen beurteilt werden konnte.

Dargestellt werden immunhistochemisch im nigrostriatalen System die dopaminergen Nervenfasern im Striatum und die spindelförmig gestreckten Nervenzellkörper (He et al., 2001) in der SN durch eine spezifische tiefschwarze Färbung. Die verwendete TH-

immunhistochemische Färbung von Gefrierschnitten ist eine Standardmethode (Jackson-Lewis et al., 1995) und war geeignet zur Untersuchung des dopaminergen Systems.

Ausgewertet wurden nur dopaminerge Neurone innerhalb der SN (2,80-3,80 mm posterior zu Bregma), deren mediolaterale Aufteilung in drei Subregionen die Aussage über etwaige subregionale Unterschiede in der Degeneration im *Rotenon-Mausmodell* ermöglichte, wie sie im PD-Patienten beobachtet wurden (Damier et al., 1999; Fearnley und Lees, 1991; Gibb und Lees, 1991). Die Neurone wurden in den unterschiedlichen Bildebenen fokussiert und ausgezählt (Hamann et al., 2003), woraus nach Abzug der von einer Ebene angeschnittenen und doppelt gezählten Zellkörper (Abercrombie, 1946) auf die Neuronendichte der Struktur geschlossen werden kann (Hamann et al., 2003; Sander et al., 2006). Da im Rotenon-Mausmodell keine Unterschiede in der anterioposterioren und mediolateralen Ausdehnung der SNc/l zwischen Substanz- und Kontrolltieren auftrat, ist die Neuronendichte geeignet, um Aussagen über Neuronenverluste zu treffen. Im *6-OHDA-Mausmodell* wurde aufgrund von Erkenntnissen der funktionalen Anatomie (Hedreen und DeLong, 1991; Przedborski et al., 1995) eine Degeneration v.a. in der zentralen Subregion erwartet, welche vom Bildausschnitt vollständig erfasst wird, wodurch die Neuronendichte unabhängig von der Ausdehnung der Struktur aussagekräftig ist. Die ermittelten Neuronendichten waren vergleichbar mit früheren Studien in einem Mausmodell (Hamann et al., 2003). Beachtet werden muss, dass die ermittelten Werte nach dieser Zählmethode keine absoluten Neuronenzahlen darstellen und auch abhängig sind von einer gleichmäßigen Schnittdicke und Behandlung der Präparate (Coggeshall und Lekan, 1996). Da Kontroll- und Substanztiere jedoch alternierend perfundiert und die Gehirne immer gleichzeitig und abwechselnd geschnitten und gefärbt wurden, ist eine Vergleichbarkeit gegeben.

Im Striatum stellt sich das dopaminerge System in Form der schwarz gefärbten Nervenfasern der nigralen Neurone dar. Im *Rotenon-Modell* zeigten sich durch die systemische Behandlung mit dem Toxin keine umschriebenen oder mit dem Auge sichtbaren Aufhellungen im immunhistochemisch markierten Striatum. Um dennoch eine quantifizierbare Aussage zur striatalen Faserdichte treffen zu können, wurde eine Grauwertmessung mit einem Bildanalyzesystem durchgeführt, eine Methode, die nicht selten für die betreffende Fragestellung verwendet wird (Peretti-Renucci et al., 1991). Durch die Festlegung eines minimalen Grauwertes eines zu zählenden Bildpunktes wurden ausreichend schwarz markierte Fasern vor einer helleren Hintergrundfärbung hervorgehoben und ihr Anteil an der Gesamtfläche berechnet. Da alle Fasern über einem minimalen Grauwert gezählt wurden, war

die maximale Farbtiefe der Fasern nicht ausschlaggebend, sondern nur die Fasermenge. Vorteil der Methode ist somit, dass die Quantität der Fasern bestimmt wurde, und nicht die Qualität (Intensität) ihrer Färbung. Dennoch könnten sich bei generell erhöhtem TH-Gehalt insgesamt mehr Nervenfasern darstellen. Jeweils zu vergleichende Präparate wurden gemeinsam fixiert und gefärbt, um Abweichungen in der Farbtiefe der Markierung durch die immunhistochemische Methodik zu minimieren. Deskriptive Vergleiche zwischen den Altersgruppen sind kritisch vorzunehmen, da die immunhistochemische Markierung nicht gemeinsam erfolgte und die Zuordnung eines minimalen Grauwertes für jede Altersgruppe separat anhand der durchschnittlichen Farbtiefe der Markierung vorgenommen wurde.

Im *6-OHDA-Mausmodell* stellt sich die lokale Läsionierung durch das Toxin als eine gut abgrenzbare, deutlich aufgehellte und halbkreisförmige Zone unterhalb des Einstichkanals der Führungskanüle dar. Die Ausmessung mittels Bildanalyse-System war daher präzise durchführbar. Durch die Gegenüberstellung der  $\bar{x}$  der Flächen des Gesamtstriatum und der Läsionen aller ausgewerteten Gehirnschnitte, konnte die Ausprägung der Läsionierung gut beurteilt werden.

Im *Rotenon-Mausmodell* war die HE-Färbung geeignet, um dopaminerge Neurone der SN darzustellen und auf Einschlusskörperchen, welche den Lewy-Körperchen der PD ähnelten, zu untersuchen (Schneider et al., 2002). Da das Hauptkriterium eines Verlustes nigrostriataler dopaminergener Neurone nicht erfüllt war, wurde auf weitere spezifische Markierungen von  $\alpha$ -Synuclein als Bestandteil der Lewy-Körperchen, verzichtet. Nigrale Neurone besitzen große (25  $\mu\text{m}$ ) Zellkörper mit deutlich erkennbaren Nervenzellfortsätzen, was sie von den umgebenen Gliazellen und degenerativ veränderten Neuronen gut unterscheiden lässt (Jackson-Lewis et al., 1995). Es konnten Strukturen der Basalganglien auf verschiedene Kriterien der Neurodegeneration untersucht und auch unspezifische Effekte von Rotenon auf nichtdopaminerge Systeme eingeschätzt werden, wie in der Literatur beschrieben (Höglinger et al., 2003; Jackson-Lewis et al., 1995). Eine Unterscheidung verschiedener Nervenzelltypen ist jedoch in diesen Färbungen nur unspezifisch anhand morphologischer und histologischer Kriterien möglich, da keine Rückschlüsse auf die exprimierten Proteine der Zellen möglich sind, so dass eine Quantifizierung nicht vorgenommen wurde. Die HE-Färbung von Paraffinschnitten der Leber, Niere, Hoden und Milz ist eine Standardprozedur der Histopathologie, um degenerative Veränderungen darzustellen (Dahme und Weiss, 1999). Die in den Ergebnissen zusammengefassten Befunde wurden in Abstimmung mit erfahrenen Pathologen erstellt. Die Kodierung und die große Anzahl der ausgewerteten Gehirnschnitte lässt eine objektive und repräsentative Ermittlung der untersuchten Parameter annehmen.

## 5.2. Ergebnisse

### 5.2.1. Untersuchungen zur Entwicklung eines Rotenon-Mausmodells

Im Rotenon-Rattenmodell wurden Schädigungen des nigrostriatalen dopaminergen Systems bei chronischer (28-56 Tage) systemischer (i.v., s.c., i.p) Injektion von Rotenon 1,5-3,0 mg/kg beschrieben (Alam und Schmidt, 2002; Betarbet et al., 2000; Sherer et al., 2003b). Aufgrund dieser Befunde wurde die chronische Applikation von Rotenon in niedrigen Dosierungen als neues PD-Modell propagiert. Die bei einer hohen Letalität von 40% überlebt habenden Ratten wiesen in der Ausprägung innerhalb des dopaminergen Systems und der Ausweitung auf andere Systeme in verschiedenen Studien variierende Läsionierungen auf. Quantifiziert wurden nach i.p. Injektion eine Reduktion des striatalen Dopamingehaltes von 44% und der striatalen TH von 74% (Alam und Schmidt, 2002). In Neuronen der SN wurden eosinophile zytoplasmatische Einschlusskörperchen gefunden, welche  $\alpha$ -Synuclein enthielten (Betarbet et al., 2000). Subchronische Injektionen hoher Dosen (10-18 mg/kg i.v.) dagegen führten zu unspezifischen Läsionen und nigrale dopaminerge Neurone waren nicht betroffen (Ferrante et al., 1997). Stammesunterschiede in der Empfindlichkeit gegenüber der Toxizität von Rotenon mit einer besonders hohen Suszeptibilität des Rattenstammes „Lewis“ im Gegensatz zu „Sprague-Dawley“ und „Wistar“ (Sherer et al., 2003b) lassen genetische Einflüsse vermuten. Transgene Rattenstämme sind zu einer weitergehenden Untersuchung genetischer Prädispositionen noch nicht verfügbar, dagegen jedoch eine Vielzahl transgener Mäuselinien. Da bislang keine Daten zu chronischen Applikationen von Rotenon bei der Maus vorliegen, wurde basierend auf dem Rotenon-Rattenmodell genetisch unveränderten Mäusen der Inzuchtlinie C57Bl/6 Rotenon s.c. über 30-45 d injiziert und neuropathologische Effekte auf das nigrostriatale dopaminerge System sowie Einflüsse auf das motorische Verhalten ermittelt. Hierbei wurden verschiedene Altersgruppen verwendet, um den Einfluss von Altersdefiziten zu untersuchen, der für Paraquat beschrieben ist (Thiruchelvam et al., 2003). In Versuchen zur Dosisfindung wurde basierend auf der LD50 von 5,4 mg/kg i.p. für die Maus die Dosis auf 2,5 mg/kg s.c. festgelegt (Ellenhorn und Barceloux, 1988). Da keine Neuroläsionen auftraten, wurde die tägliche Dosis von Rotenon auf 5,0 mg/kg bei 5 Monate alten Tieren erhöht, was jedoch an d 30 aufgrund der hohen Letalität (40%) zu einem Abbruch der Applikation und zu einer Absenkung der Dosis bei 2,5 und 12 Monate alten Mäusen auf 4,0 mg/kg führte. Eine Dosis von 4,0 mg/kg ging mit einer akzeptablen Vitalität einher, welche auch Aussagen zur motorischen Fähigkeiten ermöglichte. Im Rotenon-

Rattenmodell wurden Katalepsie, Rigor, Bradykinese und Tremor beobachtet, wobei sowohl läsierte als auch nichtläsierte Tiere Störungen des motorischen Verhaltens zeigten (Zhu et al., 2004). Basierend auf diesen Daten wurden in der vorliegenden Arbeit Untersuchungen zur Vitalität und zum motorischen Verhalten im Rotenon-Mausmodell durchgeführt. Rotenon-behandelte Mäuse wiesen verschiedene Charakteristika der motorischen Defizite von PD des Menschen auf, wie nachfolgend diskutiert.

Die Bewegungsaktivität im Open field und im Activity cage nahm erwartungsgemäß über den Behandlungszeitraum in allen Altersgruppen ab. Auch in den Kontrollgruppen war eine wahrscheinlich durch Habituation (Bolivar et al., 2000; Platel und Porsolt, 1982) bedingte Aktivitätsabnahme zu verzeichnen. Die Behandlung mit Rotenon bewirkte jedoch eine z.T. dosisabhängige, im Alter von 2,5 und 12 Monaten signifikante und mit 5 Monaten tendenziell stärker ausgeprägte Reduktion als in den Kontrolltieren. Diese verminderte horizontale und vertikale Lokomotion war nicht bedingt durch eine vermehrte Putzaktivität. Der Verlust der Bewegungsaktivität kann als Bradykinese, Akinese und Hypokinese interpretiert werden (Sedelis et al., 2001). Einige Tiere blieben bis zu 1 min bewegungslos (akinetisch) im Zentrum der Apparatur sitzen. Auch die Koordination auf dem Rotarod war erwartungsgemäß zumindest nach Applikation der hohen Dosis von 4,0-5,0 mg/kg Rotenon über den Behandlungszeitraum im Vergleich zu Kontrolltieren vermindert. Dies kann als Bradykinese, Rigor und/oder posturale Instabilität interpretiert werden (Rozas et al., 1998). 12 Monate alte Tiere waren hiervon nicht betroffen, zeigten aber bereits vor der Behandlung nur etwa 50% der Laufzeiten im Vergleich zu 2,5 oder 5 Monate alten Tieren. Für Mäuse höheren Alters ist eine verminderte motorische Leistung beschrieben, allerdings in geringerer Ausprägung (Ingram et al., 1983; Ingram et al., 1987). Wahrscheinlich ist das deutlich höhere KGW der 12 Monate alten Tiere in der vorliegenden Arbeit eher ausschlaggebend als das Alter, denn die Tiere mussten sich mit den Krallen an dem profilierten Hartgummi festhalten, was mit steigendem KGW offenbar schwerer wurde, denn die Tiere glitten eher von der Walze als jüngere, respektive leichtere Tiere. Dieser Faktor wurde noch deutlicher im Wire-hang Test, da hier ebenfalls 12 Monate alte Tiere lediglich 50% der Latenzzeiten der jüngeren Tiere erreichten, während dessen im Grip-strength Test, wo die Kraftereinwirkung von der Zugbewegung des Untersuchers und nicht vom KGW ausging, die Ausgangswerte aller Gruppen in etwa gleich waren. Über den Behandlungszeitraum zeigten Rotenon-behandelte und Kontrollgruppen eine im Hinblick auf das PD-Syndrom nicht erwünschte Abnahme der Muskelkraft der Vordergliedmaßen. Die PD-Symptomatik beruht jedoch nicht auf Schädigungen der Muskulatur bzw. Muskelschwäche beruht, sondern auf zentralnervösen

Defekten. Auch wenn im Verlauf der Krankheit des Menschen durch Hypokinese sekundär Muskelschwäche entstehen kann (Dibble et al., 2006), wird dies innerhalb der 45 d Behandlungszeit im Mausmodell nicht erwartet. Da Kontrolltiere nahezu gleichermaßen betroffen waren, scheint es sich hier auch weniger um einen Substanzeffekt zu handeln. Denkbar wäre zum einen eine Schwächung der Vorderhand durch die täglichen s.c. Injektionen in den Nackenbereich. Andererseits besteht auch in diesem Verhaltenstest die Möglichkeit einer Habituation. Tatsächlich waren im Wire-Hang Test keine signifikanten Effekte der Behandlung auf die Muskelkraft sichtbar, somit ist insgesamt nicht von einer generellen Muskelschwäche auszugehen. Rotenon-behandelte Mäuse zeigten eine Dosis- und Versuchsdauer-abhängige Katalepsie auf dem Block-Test, was wahrscheinlich aus Gründen der Methodik (s. 5.1.2.) im Paw-retraction Test nicht bestätigt werden konnte. Katalepsie kann als Kombination aus Akinese und Rigor angesehen werden (Lorenc-Koci et al., 1996; Sanberg et al., 1988). Rotenon-behandelte Mäuse, welche Katalepsie zeigten, verharrten auch häufig im Lauf („freezing“), was in der Ganganalyse sichtbar wurde. Diese bestätigte auch Anzeichen für Bradykinese und posturale Instabilität. Zudem war bei 25% der Tiere nach ca. 30 Tagen Rotenon-Behandlung ein in Ruhephasen zwischen der Bewegung auftretendes Zittern des Kopfes oder des ganzen Körpers zu beobachten, was als Ruhetremor interpretiert werden kann. Der Tremor war in hoch-dosierten Tieren verstärkt zu beobachten, blieb aber nicht bis zum Ende der Behandlung (d 45) erhalten. Tremor wird definiert als unwillkürliche rhythmische Bewegung eines oder mehrerer Körperabschnitte. Als Kriterium zählt die periodische Oszillation. In Mausmodellen ist Tremor bislang nur als akuter Effekt nach Injektion von MPTP beobachtet worden (Sedelis et al., 2001). Die Ursache für diese Beobachtungen und weshalb der Ruhetremor an d 45 nicht mehr auftrat, bleibt unklar, denn über die Tremorgenese und -physiologie im IPS ist noch wenig bekannt (Hutchison et al., 1997). Da die Tiere keine Auffälligkeiten im Allgemeinbefinden und keine Piloerreaktion zeigten, und der Tremor insbesondere in akinetischen Phasen auftrat, z.B. während des Block-Tests, ist es weniger wahrscheinlich, dass es sich lediglich um Kältezittern handelte.

Auch wenn Rotenon-behandelte Mäuse Anzeichen für Bradykinese, Rigor, Tremor und posturale Instabilität zeigten, waren diese Verhaltenseffekte nicht begleitet von einer Reduktion TH-immunreaktiver nigraler Neurone oder striataler Nervenfasern. Die Dichte dopaminerger Neurone war in keiner Subregion der SN signifikant durch die Rotenon-Behandlung verringert worden. Im immunhistochemisch markierten Striatum waren keine zentralen oder lokalen Aufhellung erkennbar, und auch die Quantifizierung der Faserdichte

mittels Grauwertanalyse erbrachte keine signifikanten Verringerungen dopaminerger Nervenfasern in Rotenon-behandelten Mäusen aller Altersgruppen. Da im Rotenon-Rattenmodell beschrieben ist, dass nur etwa 50% der überlebenden Tiere Läsionen des nigrostriatalen Systems zeigten (Zhu et al., 2004), wurde die Datenmenge hierauf überprüft. Es waren keine Auffälligkeiten in Rotenon-behandelten Mäusen verglichen mit Kontrollgruppen erkennbar. Striatal zeigte sich sogar eine signifikant höhere TH-Immunreaktivität in 2,5 und 12 Monate alten Rotenon-behandelten Tieren. Dass dieser Effekt in 5 Monate alten Mäusen nicht auftrat, könnte durch den vorzeitigen Abbruch der Injektion in der hoch-dosierten Substanzgruppe an d 30 bedingt sein. Auch wenn kompensatorische Aussprossungen dopaminerger Nervenfasern in Läsionsmodellen beschrieben sind (Ho und Blum, 1998; Mitsumoto et al., 1998), gingen diese doch mit signifikanten Neuronenverlusten in der SN einher, so dass für die hier gefundene Erhöhung der TH-Immunreaktivität eher ein erhöhter TH-Gehalt ursächlich in Frage kommt.

Auch wurde in der vorliegenden Arbeit eine mit dem Alter steigende TH-Immunreaktivität im Striatum gemessen, was (unter Beachtung der Aspekte zur Methodik) als kompensatorischer Anstieg des TH-Gehaltes im Alter gewertet werden kann und bereits beschrieben wurde (Kim et al., 2006). Im MPTP- und 6-OHDA-Modell sind kompensatorische Effekte in Form eines erhöhten Dopaminmetabolismus und auch eines erhöhten TH-Gehaltes beschrieben, allerdings sind DA und Dopaminmetaboliten in diesen Modellen reduziert (Blanchard et al., 1995; Jakowec et al., 2004; Rothblatt et al., 2001; Schwarting und Huston, 1996a; Sershen et al., 1987; Snyder et al., 1990). Thiffault et al. (2000) fanden nach akuter Applikation von 10 mg/kg Rotenon bei der Maus einen Anstieg der Dopaminmetaboliten und des Laktatspiegels im Striatum, ohne Beeinflussung des Dopaminspiegels. Untersuchungen in Zellkulturen ergaben, dass Rotenon vornehmlich durch seine Eigenschaft als Komplex I-Hemmer toxisch ist, wobei Kalzium-abhängig oxidativer Stress und Störungen des Energiehaushaltes zu neurodegenerativen Effekten in dopaminergen Zellen führen (Kweon et al., 2004; Sherer et al., 2003a; Testa et al., 2005; Votyakova und Reynolds, 2005; Zeevalk und Bernard, 2005; Zoccarato et al., 2005). Moderate Reduktionen der ATP-Spiegel könnten zu Störungen energieabhängiger Zellfunktionen führen, z.B. des DAT, und somit bei verringerter präsynaptischer Dopaminwiederaufnahme auch chronisch eine Erhöhung des Dopaminstoffwechsels verursachen. Ob eine daraus resultierende erhöhte Expression der TH auch nach 45 d vorhanden ist, ohne dass morphologische Schädigungen der striatalen Nervenfasern sichtbar werden, bleibt jedoch fraglich. Ebenso zweifelhaft ist, dass hier eine Ursache für die deutlich ausgeprägten Verhaltenseffekte vorliegt.

Im Rotenon-Rattenmodell sind Reduktionen des striatalen Dopamingehaltes von 44% und der striatalen TH von 74%, sowie in 50% der überlebenden Tiere eine Faserdichtereduktion von 30-63% angegeben, auch wenn Verhaltenseffekte nicht mit der Neuropathologie korreliert waren. So zeigten auch Ratten ohne Neuroläsionen vergleichbare Verhaltensdefizite (Lapointe et al., 2004; Zhu et al., 2004). Im MPTP-Mausmodell ist zur Ausprägung von Verhaltenseffekten eine Dopamindepletion, eine Reduktion der TH-Aktivität und eine Faserdichtereduktion im Striatum von mindestens 50-80% beschrieben, wobei in diesem Modell Verhaltensdefizite auch an pathomorphologische Veränderungen gebunden waren (Hadjiconstantinou und Neff, 1990; Rozas et al., 1998; Sedelis et al., 2001; Sundstrom et al., 1990). Vergleichbare Läsionen sind im unilateralen und bilateralen 6-OHDA-Modell Voraussetzung für die Ausprägung von Verhaltensdefiziten (Lee et al., 1996; Lindner et al., 1999). Da in der vorliegenden Arbeit mittels TH-Immunhistochemie an d 45 weder eine signifikante Reduktion der nigralen Zellzahl noch der striatalen Nervenfaserdichte im Rotenon-Mausmodell nachgewiesen werden konnten, Verhaltensdefizite aber bis zu d 45 anhielten oder sogar noch verstärkt gezeigt wurden, ist auch nicht von kompensatorischen Mechanismen über den Behandlungszeitraum auszugehen. Somit ist unwahrscheinlich, dass die hier ausgeprägten Verhaltenseffekte durch neurochemische Imbalancen im dopaminergen System ausgelöst werden konnten, und es verbleiben die Möglichkeiten unspezifischer neuronaler Läsionen oder systemischer toxischer Effekte von Rotenon, da es als hochlipophile Substanz nach systemischer Applikation theoretisch jede Körperzelle erreichen könnte. So würde auch eine Störung postsynaptischer striataler Neurone zu vergleichbaren Verhaltensdefiziten führen können. Im Rotenon-Rattenmodell ist eine Reduktion striataler GABAerger Projektionsneurone um 25% beschrieben, wobei ein Zusammenhang mit motorischen Defiziten diskutiert wird (Höglinger et al., 2003; Lapointe et al., 2004). Histologische Untersuchungen von Basalganglienstrukturen in den in der vorliegenden Arbeit angefertigten Gehirnschnitten zeigten keine Hinweise auf pathomorphologische Veränderungen in Form sichtbarer Neurodegeneration, hierbei wurden striatale Neurone jedoch nicht spezifisch markiert oder quantifiziert, so dass keine abschließenden Aussagen möglich sind. Auch neurochemische Analysen könnten weitere Informationen nicht nur zum dopaminergen, sondern auch zum serotonergen, cholinergen oder GABAergen Neurotransmittersystem der Basalganglien liefern.

Für die mitochondrialen Toxine 3-Nitropropionsäure und Natriumazid, welche wie das Rotenon v.a. in den zellulären Energiehaushalt eingreifen und exzitotoxische Mechanismen



stimulieren, ist nach intrastriatler Applikation in der Ratte eine unspezifische Depletion dopaminerger und nichtdopaminerger Transmitter beschrieben, nach systemischer Applikation war DA im Gegensatz zu GABA jedoch nicht mehr reduziert (Beal et al., 1993; Brouillet et al., 1994). Vergleichbar zum subchronischen Rotenon-Mausmodell (Thiffault et al., 2000) waren auch in diesen systemischen Toxinmodellen bei unveränderten Dopaminspiegeln nur die Dopaminmetaboliten erhöht. Neurodegenerative Effekte waren in histologischen Färbungen nach chronischer Applikation von 3-Nitropropionsäure und Natriumazid ebenso nicht sichtbar, lediglich spezifische Markierungen und Quantifizierungen zeigten signifikante Zellverluste v.a. im GABAergen System. Diese führten jedoch auch zu motorischen Defiziten. Ob im Rotenon-Mausmodell eine vergleichbare Neuropathologie der Basalganglien außerhalb des nigrostriatalen dopaminergen Systems oder Läsionen im übrigen ZNS, z.B. im motorischen System (obere (motorischer Kortex) und untere (Rückenmark) Motoneuronen, Kleinhirn) eine Rolle spielen, wäre möglich, ist aber nicht Fragestellung der vorliegenden Arbeit. In jedem Fall ist das Rotenon-Mausmodell kein geeignetes PD-Modell, da weder die gewünschten spezifischen Läsionen im nigrostriatalen System gezeigt, noch unspezifische Effekte ausgeschlossen werden können.

Wie im Rotenon-Rattenmodell beschrieben (Lapointe et al., 2004), war auch in Rotenon-behandelten Mäusen aller Altersgruppen eine dosisabhängig ausgeprägte Leberdegeneration festgestellt worden, was systemische zytotoxische Effekte aufzeigt. Auch wenn die Vitalfunktionen Allgemeinbefinden, KGW, neurologische Reflexe und generelle Muskelkraft behandelter Mäuse über den Behandlungszeitraum nicht abnahmen, war jedoch, vergleichbar zum Rotenon-Rattenmodell, eine Letalität von bis zu 40% (5,0 mg/kg Rotenon) zu verzeichnen. Auch im Rotenon-Rattenmodell wurden motorische Verhaltensdefizite auf unspezifische neuronale und systemisch toxische Effekte zurückgeführt (Höglinger et al., 2003; Lapointe et al., 2004), wobei oft nur unzureichende Angaben zur Vitalität und Letalität der Tiere gemacht wurden.

Da nach Applikation von 2,5 mg/kg keine Neuroläsionen in der Maus auftraten, wurde die tägliche Dosis von Rotenon auf 4,0-5,0 mg/kg erhöht. Die Injektion von 5,0 mg/kg s.c. in 5 Monate alten Tieren musste an d 30 aufgrund der hohen Letalität (40%) abgebrochen werden. Dies entspricht der LD50 von 5,4 mg/kg i.p. für Rotenon bei der Maus (Ellenhorn und Barceloux, 1988) und lässt keine weitere Dosiserhöhung zu, auch wenn bei dieser sehr hohen Dosis keine Neuroläsionen entstanden. Da im Rotenon-Rattenmodell auch nach 28 d bereits neurodegenerative Effekte im dopaminergen System nachgewiesen wurden (Betarbet et al., 2000), erscheint die tägliche Injektion über 45 d als ausreichend langer Zeitraum um

Reduktionen der Nervenfaserdichte erwarten zu können, wenn Rotenon ausreichende toxische Effekte auf das dopaminerge System der Maus gehabt hätte. Da nach systemischer Injektion Rotenon als hochlipophile Substanz im Gehirn nachgewiesen wurde (Caboni et al., 2004), und die dosisabhängig aufgetretenen Leberschädigungen und die Letalität keinen Zweifel an einem Eintritt des Toxins in den Blutkreislauf lassen, kann mit einer Passage der BHS gerechnet werden. In der Ratte war eine Akkumulation von Rotenon nach s.c. Applikation über 28 Tage im Vergleich zu 14 Tagen messbar, und die immunhistochemisch nachgewiesene Neuropathologie war positiv korreliert mit den Toxinspiegeln im Gehirn, nicht jedoch in der Leber (Caboni et al., 2004). In der Maus wurden nach akuter Applikation vergleichbare Rotenonspiegel im Gehirn erreicht, es war 2 h nach i.p. Injektion von 2 mg/kg Rotenon eine Konzentration im Gehirn von 0,39 ppm (Leber 0,05 ppm) vorhanden, vergleichbar hierzu war in der Ratte nach 28 d s.c. Injektion von 3 mg/kg Rotenon eine Konzentration im Gehirn von 0,1-0,4 ppm messbar. Neben dem Nachweis ausreichend hoher Gehirnkonzentrationen verglichen mit der Ratte, wurde auch die komplette Inhibition der mitochondrialen Atmungskette nach einmaliger Injektion von 2,5 mg/kg Rotenon i.p. in der Maus bestätigt (Caboni et al., 2004; Ilivicky und Casida, 1969). Somit ist das Ausbleiben pathologischer Effekte im nigrostriatalen System nach akuter, subchronischer (Thiffault et al., 2000) und chronischer (vorliegende Arbeit) Injektion von Rotenon in der Maus im Vergleich zur Ratte wahrscheinlich nicht auf eine zu geringe Konzentration oder Komplex-I-Inhibition zurückzuführen. Allerdings sind für toxische Rotenoneffekte neben der mitochondrialen Dysfunktion Zusammenhänge mit allen in Kap. 2 beschriebenen Pathomechanismen aufgezeigt worden (Uversky, 2004), so dass hieraus speziesspezifische Variationen z.B. in Enzymprofilen der Zellen eine unterschiedliche Suszeptibilität bedingen könnten. Auch Rotenonmetaboliten spielen keine Rolle im Vergleich zwischen Ratte und Maus, da sie schwächere Komplex-I-Inhibitoren sind und auch in geringerer Konzentration im Gehirn der Ratte gemessen wurden, als Rotenon selbst. Rotenon wird hauptsächlich in der Leber mikrosomal durch Cytochrom-P450-Oxidase abgebaut (Caboni et al., 2004; Lykken und Casida, 1969; Skrinjaric-Spoljar et al., 1971). Eine beschleunigte Detoxifizierung der Substanz und geringere Plasma-Halbwertszeiten in der Maus verglichen mit der Ratte können nicht ausgeschlossen werden. Die Infusion mittels Minipumpen, wie im Rotenon-Rattenmodell beschrieben, könnte einen kontinuierlicheren Plasmaspiegel herstellen. Es sind jedoch im Rattenmodell selbst nach i.p. Injektion, für die stärkere Fluktuationen der Rotenonspiegel zu erwarten sind, toxische Effekte von Rotenon auf das dopaminerge System

beschrieben. Somit wären nach s.c. Injektion bei vorhandener Suszeptibilität der Maus neurodegenerative Effekte zu erwarten gewesen.

Im Rotenon-Rattenmodell sind Suszeptibilitätsunterschiede zwischen verschiedenen Rattenstämmen beschrieben (Sherer et al., 2003b), so dass andere Mäusestämme als der C57Bl/6 Stamm möglicherweise eine höhere Empfindlichkeit gegenüber dem Toxin zeigen. In der vorliegenden Arbeit wurde zudem untersucht, ob in Tieren höheren Alters die toxischen Effekte von Rotenon verstärkt auftreten. Dies wurde aktuell im Rotenon-Rattenmodell im Alter von 15 Monaten (Phinney et al., 2006), im Paraquat/Maneb-Modell für die Maus im Alter von 18 Monaten (Thiruchelvam et al., 2003) und für die Ratte im Alter von 6 Monaten (Saint-Pierre et al., 2006), im MPTP-Mausmodell im Alter bis zu 10 Monaten (Irwin et al., 1992) und im 6-OHDA-Rattenmodell ab einem Alter von 14 Monaten (Cass et al., 2002; Lindner et al., 1999), nicht jedoch im 6-OHDA-Mausmodell (Ricaurte et al., 1988) beschrieben. Die exponentiell steigende Prävalenz in der Bevölkerung mit höherem Alter an IPS zu erkranken, gibt Hinweise auf einen altersabhängigen Anstieg neuronaler Suszeptibilität gegenüber neurotoxischen Faktoren (Le Couteur et al., 2002). Begründet werden diese Effekte im PD-Patienten und im Tiermodell damit, dass im Alter die Zahl nigraler Neurone abnimmt und striatale Dopaminspiegel sinken (Fearnley und Lees, 1991; Kish et al., 1992; Lindner et al., 1999), aber auch die Suszeptibilität dopaminerger Neurone zunimmt. So wurde ein Anstieg der Expression mitochondrial kodierter Gene in 12-18 Monate alten Neuronen der C57Bl/6-Mauslinie verglichen zu einem Alter von 2 Monaten nachgewiesen und als kompensatorische Heraufregulierung in Reaktion auf im Alter ansteigenden oxidativen Stress interpretiert. Im Alter von 24 Monaten sinkt die Expressionsrate jedoch wieder deutlich, was als Dekompensation gewertet wurde (Manczak et al., 2005). Im MPTP-Mausmodell geht die Verstärkung der Toxizität nicht mit einer höheren Suszeptibilität der Neurone im Alter einher (Irwin et al., 1988), sondern mit erhöhter Metabolisierung zu MPP<sup>+</sup> via MAO-B. Daraus folgt, dass auch Veränderungen der Enzymgehalte und -aktivitäten von Körperzellen, welche im xenobiotischen Stoffwechsel eine Rolle spielen, nicht nur die Entgiftung verzögern, sondern auch die Giftung beschleunigen können (Yang et al., 2002). In der vorliegenden Arbeit war in 12 Monate alten Mäusen nach Injektion von 4,0 mg/kg über 45 d eine Tendenz ( $p=0,065$ ) zur Reduktion nigraler dopaminerger Neurone in der zentralen Subregion verglichen zu Kontrolltieren evident, was einem Neuronenverlust von 16% entspricht. Da vergleichbar mit Befunden im Rotenon-Rattenmodell 12 Monate alte Tiere keine Anzeichen einer höheren systemischen Toxizität zeigten, resultierte die Fragestellung, ob Tiere noch höheren Alters eine

zunehmende Suszeptibilität gegenüber Rotenon zeigen könnten. Erste Versuche zur Dosisfindung mit Injektion von Rotenon (2,5 mg/kg s.c.) in 18 Monate alten Tieren waren mit einer hohen Letalität und sehr schlechtem Allgemeinbefinden verbunden und mussten nach 7 Injektionen und einem Zeitraum von 2 Wochen abgebrochen werden. Deutliche Leberdegenerationen waren in den getöteten Tieren bereits makroskopisch zu erkennen. Auch wenn in 12 Monate alten Tieren Anzeichen neurodegenerativer Effekte auf das nigrostriatale System vorhanden waren, zeigten alle Altersgruppen vergleichbare Verhaltensdefizite.

Zusammenfassend ist bei s.c. Injektion von Rotenon in der Maus weder eine Erhöhung der Dosis noch des Alters der Tiere aus Gründen des Tierschutzes zu vertreten. Das Rotenon-Mausmodell stellt basierend auf den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit kein geeignetes Tiermodell der PD dar. Es verbleibt jedoch die Fragestellung, ob genetisch veränderte (transgene) Mauslinien eine höhere Suszeptibilität gegenüber Rotenon aufweisen.

Über die Eignung des Rotenon-Rattenmodells bestehen seit dem Nachweis unspezifischer neuronaler und systemisch toxischer Effekte in den behandelten Tieren kontroverse Ansichten (Höglinger et al., 2003; Lapointe et al., 2004). Hinzu kommt, dass lediglich ein Drittel der verwendeten Tiere überhaupt neurodegenerative Veränderungen aufweist und zudem noch eine hohe Variabilität der gezeigten Neuropathologie und der Verhaltensdefizite auftritt (Zhu et al., 2004). Die vorliegenden Befunde bei der Maus bestärken diese Zweifel und unterstützen die Ansicht, dass sich das Rotenon-Rattenmodell wahrscheinlich nur eingeschränkt zur Untersuchung ätiopathogenetischer Zusammenhänge verwenden lässt und zur Testung therapeutischer Strategien ungeeignet ist.

### **5.2.2. Akute und subchronische Effekte von intrastriatalen 6-OHDA-Injektionen bei Mäusen**

Da das Rotenon-Mausmodell kein geeignetes Tiermodell für PD darstellte, wurde in einer zweiten Versuchsreihe der Einfluss subchronischer Injektionen von 6-OHDA in der Maus getestet. Auch wenn es sich bei 6-OHDA um eine Substanz handelt, welche die BHS nicht überwinden kann und stereotaktisch appliziert werden muss, ist es dennoch in der Ätiologie des IPS von Interesse, denn es kann endogen als Reaktion des Dopaminmetabolismus auf andere Toxine und im Rahmen des L-DOPA-Metabolismus gebildet werden (Graham, 1978; Maharaj et al., 2005; Seiden und Vosmer, 1984). Durch eine striatale Applikation wird ein langsam fortschreitender retrograder Verlauf der Neurodegeneration erreicht, der auch im PD-Patienten beschrieben wird (Ichitani et al., 1994). Da in diesem Modell neuroprotektive

Substanzen getestet werden sollen, wurde eine bilaterale Läsionierung dem gebräuchlichen unilateralen Rotationsmodell vorgezogen, um protektive Einflüsse der nichtläsionierten Seite ausschließen zu können (Roedter et al., 2001). Akute stereotaktische Injektionen konnten bisher keine progressive Neurodegeneration in 6-OHDA-Modellen hervorrufen (Schober, 2004), und da nach ausführlicher Literaturrecherche offenbar bisher keine Erfahrungen mit subchronischen intrastriatalen Injektionen von 6-OHDA vorliegen (Betarbet et al., 2002), wurde dieses Toxin zur Entwicklung eines subchronischen Modells im Rahmen der Dissertation in der Inzucht-Mauslinie C57Bl/6 verwendet und dazu mit Effekten akuter bilateraler Injektionen verglichen.

Auch wenn in diesem Modell moderate pathomorphologische striatale und nigrale Effekte durch subchronische Injektionen von 6-OHDA über 5 d erreicht wurden, waren diese nicht ausreichend von charakteristischen Verhaltenseffekten begleitet und konnten auch durch eine Verlängerung der Injektionsdauer auf 7 d nicht verstärkt werden. Wie in der Diskussion „methodischer Aspekte“ erläutert, zeigte der Vergleich eines Ascorbatzusatzes im akuten Modell keine Verstärkung der Effekte von 6-OHDA, so dass im subchronischen Modell hierauf verzichtet wurde.

Bei bilateraler akuter Applikation von 6-OHDA in das Striatum im Rattenmodell wird eine starke Abnahme der Vitalität der Tiere beschrieben (Gerlach und Riederer, 1996), die bei den verwendeten Mäusen weder nach akuter noch nach subchronischer Injektion auftrat. Das KGW war im subchronischen Modell über den Injektionszeitraum (d 7-d 14) verringert, stieg jedoch bis zu den Verhaltensuntersuchungen (d 16) wieder an. Da auch das Allgemeinbefinden gut und die neurologischen Reflexe ungestört waren, ist von einer akzeptablen Vitalität im 6-OHDA-Mausmodell auszugehen. Bei lediglich partieller Läsionierung des dopaminergen Systems ist auch im Rattenmodell die akute bilaterale Applikation mit einer akzeptablen Vitalität verbunden (Deumens et al., 2002; Lindner et al., 1999).

Bilateral mit 6-OHDA läsionierte Mäuse zeigten weder nach akuter noch nach subchronischer Injektion (10 d nach der ersten Injektion) eine Reduktion der spontanen Bewegungsaktivität im Open field oder im Activity cage. Lediglich unbehandelte („naive“) Kontrolltiere zeigten eine verringerte horizontale Bewegungsaktivität im Activity cage, welche wahrscheinlich durch Habituation bedingt war (Bolivar et al., 2000). Dies war in schein-läsionierten Kontrolltieren nicht zu beobachten, stattdessen jedoch ein Anstieg der lokomotorischen Aktivität, welcher in einigen akut und subchronisch (5 d) injizierten Mäusen ebenso auftrat. Auch wenn bei Schädigung des nigrostriatalen dopaminergen Systems mit primär

hypokinetischen Verhaltensmustern gerechnet wird, ist ein Anstieg der Bewegungsaktivität z.B. auch im MPTP-Modell beschrieben (Chia et al., 1999). Da jedoch v.a. schein-läsionierte Tiere betroffen sind, ist davon auszugehen, dass nicht das Toxin, sondern die stereotaktische Operation und/oder die Mikroinjektionen in der vorliegenden Arbeit die Ursache für die erhöhte Bewegungsaktivität enthalten. Beide Prozeduren sind mit Stress verbunden, denen naive Kontrolltiere ohne Operation und Mikroinjektion in der Form nicht ausgesetzt waren. Emotionaler Stress ist als Ursache einer Hyperaktivität im Open field beschrieben, wobei die Tiere vergleichbar zur vorliegenden Arbeit 5 Tage lang gestresst und weitere 5 Tage später getestet wurden (Pijlman et al., 2003). Dagegen spricht jedoch, dass akut, d.h. einmalig mit NaCl-Lösung schein-läsionierte Tiere eine stärkere Aktivitätszunahme zeigten als subchronisch schein-läsionierte Tiere, obwohl diese dem Injektionsstress über 5 d ausgesetzt waren. Da die Zusammenhänge zwischen Dauer, Art und Intensität des Stressimpulses und der Verhaltensantwort jedoch vielfältig sind (Pijlman et al., 2003), ist ein Zusammenhang dennoch nicht ausgeschlossen. Die Umsetzung aus Gruppen- in Einzelhaltung ist mit emotionalem Stress verbunden, wurde jedoch bereits 1 Woche vor der Operation und zu einem vergleichbaren Zeitpunkt auch in naiven Gruppen vorgenommen. Eine andere Ursache könnte in stereotaktisch operierten Tieren eine nicht zu vermeidende partielle Läsionierung des Kortex sein, wodurch in der Ratte Hyperaktivität ausgelöst werden kann (Pearlson et al., 1984).

Einige der stereotaktisch operierten Tiere zeigten darüber hinaus eine unerwünschte Abnahme der Muskelkraft im Grip-strength Test und im Wire-hang Test, welche nach subchronischer Injektion in beiden Tests und für akut injizierte Mäuse (ohne Ascorbatzusatz) im Wire-hang Test signifikant war. Die Daten zeigen, dass dieser Effekt unabhängig von der 6-OHDA-Injektion auftrat, daher ist in den betroffenen Tieren von einer moderaten allgemeinen Muskelschwäche auszugehen, wahrscheinlich bedingt durch die stereotaktische Operation. Da jedoch nur von einer maximalen Versuchsdauer von 14 d nach der Operation ausgegangen werden konnte, denn unter Tierschutz- und Versuchsaspekten mussten die Paladuraufbauten stabil bleiben, war eine Verlängerung der Rekonvaleszenzzeit nach der Operation nicht möglich.

Nach subchronischer Injektion über 7 d waren erste signifikante Latenzzeiten (6 s) im Block-Katalepsie-Test messbar, wobei diese Versuchsgruppe auch eine verkürzte Schrittlänge in der Ganganalyse zeigte. Diese ersten auf Katalepsie (Akinese und Rigor) und Bradykinese

hinweisenden Verhaltensdefizite waren jedoch nicht mit stärker ausgeprägten pathomorphologischen Effekten verbunden.

Die immunhistochemische Markierung des Striatums zeigte in allen mit 6-OHDA injizierten Mäusen Läsionen mit einem Anteil am Gesamtstriatum von 21% (7 d 6-OHDA) bis 26% (1 d 6-OHDA). Nur nach wiederholten 6-OHDA-Injektionen resultierten hieraus zu den jeweiligen Vergleichs (1 d)- bzw. Kontrollgruppen (Vehikel) signifikante Neuronenverluste in der SN. Die Injektion von 6-OHDA über 5 d ergab eine zur schein-läsionierten Kontrollgruppe signifikant um 37% verringerte nigrale Neuronendichte ( $p < 0,01$ ). Der Vergleich von 5-tägiger zu 7-tägiger Injektion von 6-OHDA konnte jedoch keine weitere Abnahme der Neuronenzahl durch die verlängerte Injektionsdauer belegen. Im Gegenteil, über 7 d injizierte Tiere zeigten sogar eine signifikant höhere Neuronendichte als über 5 d behandelte Tiere ( $p < 0,05$ ). Die stereotaktische Operation und die NaCl-Injektion hatten keinen Einfluss auf die Neuronendichte, wie der Vergleich der schein-läsionierten zu den unbehandelten, naiven Tieren zeigt. Da die Ausbreitung der striatalen Läsionen durch die mehrmalige Injektion von 6-OHDA nicht vergrößert werden konnte, ist wahrscheinlich eine Akkumulation des Toxins verantwortlich für die im Gegensatz zur akuten Applikation gezeigten nigralen Neuronenverluste. Im 6-OHDA-Rattenmodell ist eine Abhängigkeit der Neurodegeneration nach akuter striataler Applikation von der Gesamtdosis an 6-OHDA beschrieben (Lee et al., 1996). Damit das Toxin jedoch auch nachhaltige Schädigungen nigraler Neurone bewirken kann, muss es ausreichend über die dopaminergen Nervenendigungen aufgenommen werden. Da sich die Verteilung des Applikationsvolumens im Striatum, wie in der Diskussion methodischer Aspekte beschrieben, jedoch über einen begrenzten Radius erstreckte, waren hierfür wahrscheinlich nur die innerhalb dieses Radius erreichbaren Nervenfasern vorhanden. Direkte neurotoxische Effekte von 6-OHDA sind innerhalb von 3-4 Tagen maximal ausgeprägt (Schwartz und Huston, 1996a). Deshalb könnten die Nervenendigungen zu stark beschädigt worden sein, um eine weitere Aufnahme des Toxins zu gewährleisten und somit keine Verstärkung des nigralen Neuronenverlustes nach 7 d im Vergleich zu 5 d erreichbar sein.

Da nach 7 d keine Verstärkung pathomorphologischer Befunde, jedoch Verhaltenseffekte auftraten, besteht keine Korrelation zu den hier gemessenen striatalen Läsionen bzw. den Neuronenverlusten der SN. Spontane Verhaltenseffekte, d.h. ohne zusätzliche pharmakologische Manipulation, sind auch im unilateralen 6-OHDA-Rattenmodell beschrieben, und korrelieren mit der Denervation dopaminerg Fasern im Striatum (Schwartz und Huston, 1996a). Die striatale Denervation kann mittels der Dopaminaktivität, d.h. dem Gesamtgehalt des Striatums an DA (intrazellulär und

extrazellulär) oder wie in der vorliegenden Arbeit durch die Bestimmung des TH-Gehaltes der Nervenfasern gezeigt werden (Peretti-Renucci et al., 1991). Es ist eine striatale Denervation von über 80% und ein nigraler Neuronenverlust von über 50% notwendig, damit die verbliebenen nigralen Neurone den Dopaminverlust nicht mehr kompensieren können, und extrazellulär eine Dopamindepletion messbar wird, die mit Verhaltenseffekten einhergeht (Deumens et al., 2002; Lee et al., 1996; Schwarting und Huston, 1996b). Eine bilaterale Läsionierung des Striatums von 21-26% und ein Neuronenverlust von 37% im hier untersuchten subchronischen 6-OHDA-Mausmodell erscheinen daher in der Ausprägung als nicht ausreichend, um den extrazellulären striatalen Dopamingehalt zu senken und somit Verhaltenseffekte hervorrufen zu können. In diesem Fall wird eine nigrostriatale Läsionierung als „moderat“ bezeichnet und ist eher mit einer präsymptomatischen Phase von PD vergleichbar (Schwarting und Huston, 1996b). Es ist jedoch beschrieben, dass unter Stresseinfluss auch moderate Läsionen Verhaltenseffekte und insbesondere Akinese auslösen können, da die Dopaminausschüttung unter Stress nicht mehr adäquat gewährleistet werden kann (Snyder et al., 1985; Zigmond und Stricker, 1984). Es wäre daher möglich, dass über 7 d injizierten Mäusen durch die längere Behandlungszeit und den kurzen Abstand (2 d) zwischen letzter Injektion und Verhaltenstest mit einer höheren Stressantwort auf die Handgriffe reagierten, welche insbesondere beim Aufsetzen auf den Block im Katalepsietest und beim Markieren der Tiere zur Ganganalyse notwendig sind. Unwahrscheinlich dagegen ist, dass die Verhaltenseffekte durch eine Verstärkung neurochemischer Imbalancen im Vergleich zur 5tägigen Injektion bedingt waren, da die sehr moderaten Läsionen und Neuronenverluste kaum extrazelluläre Dopamindepletionen verursachen konnten.

Retrograde neurodegenerative Effekte, wie sie im 6-OHDA-Rattenmodell z.T. über mehrere Wochen gezeigt wurden (Deumens et al., 2002), und somit auch progressive Degenerationsverläufe, konnten durch die Begrenzung des Versuchszeitraumes auf 14 d nach der stereotaktischen Operation nicht weiter untersucht werden. Wie in der Diskussion der methodischen Aspekte bereits erläutert, konnten die implantierten Führungskanülen bedingt durch die Größe ihres äußeren Durchmessers nicht tiefer abgesenkt werden. Hierdurch befand sich die striatale Läsion im dorsalen Striatum, wobei der weitaus größere Teil nigraler Neurone in den ventrolateralen Anteil, welcher dem Putamen des Primaten entspricht, projiziert (Deumens et al., 2002). Zusammenfassend sind die Vorteile, die in der akkumulativen Toxinexposition mittels der subchronischen Mikroinjektion nach dieser Methodik bestehen, durch die Einschränkungen des Injektionsvolumens und seiner



Verteilung, des Applikationsortes und der Gesamtdauer des Untersuchungszeitraumes aufgehoben. Eine geeignete Methode zur subchronischen Applikation sollte diese Einschränkungen daher nicht aufweisen.

Im subchronischen 6-OHDA-Mausmodell wurden erste Versuche zu neuroprotektiven Effekten von DHEA durchgeführt, indem das Neurosteroid parallel zur 6-OHDA-Injektion jeweils 3 h zuvor i.p. appliziert wurde. Die nach 7tägiger Injektion aufgetretenen Verhaltenseffekte, die striatalen Läsionen und die nigralen Neuronenverluste konnten durch DHEA nicht beeinflusst werden. Eine abschließende Aussage ist jedoch durch die beschränkte Eignung des Modells zur Untersuchung neuroprotektiver Effekte und daher bisher fehlender Untersuchungen verschiedener DHEA-Dosierungen nicht zu treffen.

### **5.3. Schlussbetrachtungen**

Eine Vielzahl von Substanzen zeigte in Zellkulturen potentiell neuroprotektive Effekte, welche vor der Anwendung am Humanpatienten in Tiermodellen der PD untersucht werden müssen (Meissner et al., 2004). Um hier aussagekräftige Ergebnisse zu erreichen, müssen die verwendeten Tiermodelle eine hohe Vorhersagevalidität (predictive validity) aufweisen, d.h. möglichst gut eine klinische Wirksamkeit von Therapeutika voraussagen können (Willner, 1986). Um dies zu gewährleisten muss zunächst das klinische Erscheinungsbild im Menschen ausgeprägt (face validity) und kausal durch eine vergleichbare Ätiopathogenese wie die Erkrankung bedingt sein (construct validity) (Willner, 1986). Da das IPS ätiopathogenetisch noch unzureichend aufgeklärt ist, sollten sich zumindest die zurzeit vorliegenden Erkenntnisse im Tiermodell widerspiegeln. Das Rotenon-Modell basiert auf dem Nachweis als epidemiologisch relevanter Umweltfaktor, welcher in den Energiehaushalt der Zelle, vorzugsweise mitochondrial, eingreift, und bei der Ratte Neuronenverluste im nigrostriatalen System hervorruft. Vergleichbare Applikationsregime konnten im Mausmodell der vorliegenden Arbeit keine signifikanten Neuronenverluste verursachen, führten jedoch zu ähnlichen Verhaltenseffekten wie im Rattenmodell. Somit erfüllt dieses Modell zwar bedingt die face validity, diese konnte aber nicht an eine überzeugende construct validity geknüpft werden. Zudem zeigten sich Leberdegenerationen, d.h. unerwünschte systemisch-toxische Effekte durch das Pestizid. Da mit einer Passage der BHS gerechnet werden kann, ist eine spezifisch höhere Suszeptibilität dopaminerger Neurone gegenüber Rotenon im Mausmodell sehr zweifelhaft, auch wenn die tendenzielle Reduktion der nigralen Neuronendichte in 12

Monate alten Mäusen auf altersabhängige Defizite hinweisen könnte. Die Untersuchung der Pathogenese und der Therapie von PD verlangt jedoch unbedingt eine deutliche, reproduzierbare und spezifische Degeneration nigraler dopaminerger Neurone. Somit stellen chronische systemische Applikationen von Rotenon bei Mäusen kein geeignetes Tiermodell für PD dar. Die vorliegenden Ergebnisse zeigen zudem auf, dass Verhaltenseffekte im Tiermodell eine PD-Symptomatik auch unabhängig von tatsächlich vorliegenden Neuronenverlusten imitieren können, so dass neben der pathologischen Untersuchung immer ein diagnostischer Nachweis, z.B. in der L-DOPA-Ansprechbarkeit der Symptome, geführt werden sollte, um unspezifische Ursachen auszuschließen.

Im subchronischen 6-OHDA-Mausmodell hingegen ist die construct validity in Form der selektiven und reproduzierbaren Reduktion striataler dopaminerger Nervenfasern und nigraler Neurone gegeben, jedoch ist dies nur moderat ausgeprägt, so dass Verhaltenseffekte hierdurch nicht auslösbar sind. Zur Untersuchung neuroprotektiver Substanzen wäre die Neurodegeneration zu moderat, auch wenn sie das frühe, präklinische PD-Syndrom reflektieren mag, in welches diese Form der Therapie eingreifen sollte. Dieses Modell ist dennoch nicht geeignet Neuroprotektiva zu untersuchen, denn eine Progressivität des Neuronenverlustes konnte nicht nachgewiesen werden. Aus diesem Grund wurden die Untersuchungen des Neurosteroids DHEA in diesem Modell auch nicht fortgeführt.

In den Untersuchungen der vorliegenden Arbeit wurden Mäuse einer genetisch unveränderten Inzuchtlinie verwendet. Da ein Einfluss genetischer Prädispositionen in der Ätiopathogenese des IPS angenommen wird, verbleibt die Möglichkeit, dass andere Mauslinien und insbesondere genetische Mausmodelle eine höhere Suszeptibilität gegenüber den Toxinen 6-OHDA und Rotenon zeigen könnten. Insbesondere Rotenon als chronisch systemisch applizierbare Substanz ist interessant zur Untersuchung der Wechselwirkungen von Umweltfaktoren und genetischen Prädispositionen. Strukturell verändertes oder überexprimiertes  $\alpha$ -Synuclein liegt im Falle der hereditären PD mit den genetischen Mutationen PARK1 und 4 vor und geht im Humanpatienten und im genetischen Mausmodell mit einer moderaten Bildung von Lewy-Körperchen einher (Le und Appel, 2004). Kürzlich wurde eine Verbindung zwischen  $\alpha$ -Synuclein und dem proteasomalen Enzym Parkin hergestellt. Mutationen des Gens, welches für Parkin kodiert, werden als PARK2 bezeichnet, wobei die selektive dopaminerge Neurodegeneration im Humanpatienten hier ohne Ausbildung von Lewy-Körperchen auftritt (Le und Appel, 2004). In den Mausmutanten für Parkin und  $\alpha$ -Synuclein konnten zurzeit noch keine überzeugenden nigralen Neuroläsionen gezeigt werden.

Zelltoxische Mechanismen wie oxidativer Stress, Eisenmetabolismus oder exogene Toxine, wozu auch das Pestizid Rotenon zählt, führen ebenso zur Bildung von toxischen  $\alpha$ -Synuclein-Fibrillen (Kahle et al., 2002; Mirzaei et al., 2006). Zudem sind Zusammenhänge zwischen Rotenon und dem Protein DJ-1 (PARK7) sowie mit dem Proteasomsystem beschrieben (Betarbet et al., 2006). Daher könnte eine Applikation von Rotenon in diesen Mäusestämmen die genetisch erzeugten Defekte potenzieren und so die bisher fehlenden neuropathologischen Kriterien hervorrufen. Diese Hypothese wird unterstützt von kürzlich veröffentlichten Daten aus Zellkulturuntersuchungen, wobei dopaminerge Neurone aus einer Mauslinie mit einer Parkin-Deletion eine höhere Suszeptibilität gegenüber Rotenon zeigten als die Kontrollzelllinie (Casarejos et al., 2006).