In-vivo Mikrodialyse Studien an der Maus bezüglich der Bildung reaktiver Sauerstoff- und Stickstoffspezies durch Neurotoxine und Tyramin sowie die Untersuchung von Kavain und IL-6 im MPTP-Parkinson-Modell

Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades

der Naturwissenschaften

(Dr. rer. nat.)

dem

Fachbereich Pharmazie

der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von

Nicole Schmidt

aus Korbach

Marburg\Lahn 2002

Vom Fachbereich Pharmazie der Philipps-Universität Marburg als Dissertation am

_____ angenommen.

Erstgutachter: Prof. Dr. K. Kuschinsky

Zweitgutachter: PD Dr. B. Ferger

Tag der mündlichen Prüfung: 05.06.2002

Danksagung

Die vorliegende Arbeit entstand am Institut für Pharmakologie und Toxikologie des Fachbereichs Pharmazie der Philipps-Universität Marburg unter Leitung von

PD Dr. Boris Ferger

An dieser Stelle möchte ich mich ganz herzlich für die Anregungen und die fachlich kompetente Betreuung sowie die Gelegenheit zu Kongressbesuchen und die Studienaufenthalte in Heidelberg und Zürich bedanken.
In diesem Zusammenhang gilt mein Dank auch der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG) und Arley E. Firch PD Research Foundation (Davis, CA, USA) für die finanzielle Unterstützung unserer Arbeitsgruppe.

Besonders bedanken möchte ich mich auch bei Herrn Prof. Dr. Klaus Kuschinsky für seine Unterstützung und die nette Atmosphäre in seinem Arbeitskreis.

Dr. Markus Schwaninger danke ich für die Möglichkeit in seinem Arbeitskreis am Institut für Neurologie der Universität Heidelberg an IL-6 (-/-) Mäusen forschen zu können. Seinen Mitarbeitern und insbesondere Simone Prinz danke ich für ihre Hilfsbereitschaft und Unterstützung.

Ebenso möchte ich mich bei Prof. Dr. Joram Feldon und den Mitarbeitern am Neurobiochemistery Lab der ETHZ in Schwerzenbach für die freundliche Unterstützung während meines Studienaufenthaltes in der Schweiz bedanken.

Mein Dank für die angenehme Zusammenarbeit und gute Arbeitsatmosphäre gilt vor allem den Mitgliedern des AK Kuschinsky Peter Teismann, Andreas Leng, Martina Grönig, Dr. Awad Atalla, Daniel Alvarez-Fischer und insbesondere Claudia Themann, sowie allen anderen Mitgliedern des Institutes.

Besonderer Dank geht auch an Dr. Christopher Earl, der bei fachlichen Fragen und Problemen immer Zeit für mich hatte. Danke Chris!

Prof. Dr. Wolfgang H. Oertel und seinen technischen Mitarbeiterinnen Beate Ullrich, Dorothee Köhler und Sabine Antimov danke ich für die Hilfe bei den immuncytochemischen und histologischen Untersuchungen.

Bedanken möchte ich auch bei Melanie Köppe für die Bereitstellung der Literatur, bei Regina Löchel für die Betreuung der Versuchstiere und bei Ullrich Korell für die ausgezeichnete technische Unterstützung bei anfallenden Reparaturen.

Desweiteren gilt mein Dank all denen, die mir bei der Durchsicht meines Manuskriptes geholfen haben, insbesonders Tilly Chang, Christiane Stadie und Dorothee Ferger.

Und natürlich danke ich all meinen Freunden, die während der Promotion für die nötige Ablenkung und Aufmunterung gesorgt haben.

Nicht zuletzt möchte ich mich ebenfalls bei meinen Eltern für ihre unerschöpfliche Unterstützung bedanken, ohne die das Studium und die Doktorarbeit in dieser Weise nicht möglich gewesen wären.

Ganz besonderer Dank gilt aber auch meinem Freund Pitt, der mir während der gesamten Promotionszeit und vor allem beim Verfassen meiner Dissertation mit Rat und Tat zur Seite gestanden hat.

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung **1**

1.1 Morbus Parkinson 2

1.1.1 Prävalenz und Inzidenz 2

1.1.2 Diagnostik 3

1.2 Organisation der Basalganglien und ihre Rolle beim Morbus Parkinson 4

1.2.1 Funktionelle Anatomie der Basalganglien 4

1.2.2 Neurotransmitter der Basalganglien 4

1.2.2.1 Dopamin 5

1.2.3 Physiologie der Basalganglien 7

1.2.4 Pathophysiologie der Basalganglien 9

1.2.4.1 Anomalien der Basalganglien beim Morbus Parkinson 9

1.2.4.2 Veränderungen im Alterungsprozess 12

1.3 Pathogenese des Morbus Parkinson 13

1.3.1 Oxidativer Stress 14

1.3.1.1 Dopamin-Toxizität und Neuromelanin 15

1.3.1.2 H_2O_2 und Eisen 17

1.3.1.3 Peroxynitrit 18

1.3.1.4 Endogene antioxidative Mechanismen 19

1.3.2 Mitochondriale Defekte 22
1.3.3 Inflammatorische Prozesse 23
1.3.4 Nekrose und Apoptose 24
1.3.5 Exzitotoxizität 25
1.3.5.1 Direkte Exzitotoxizität und Calciumhomöostase 25
1.3.5.2 Indirekte Exzitotoxizität 26
1.3.6 Genetische Faktoren 26
1.3.7 Umweltfaktoren 27

1.4 Therapie des Morbus Parkinson 28
1.4.1 Grundzüge der Pharmakotherapie 28
1.4.1.1 *L*-DOPA (*L*-Dihydroxyphenylalanin, Levodopa) 28
1.4.1.2 Dopamin-Agonisten 30
1.4.1.3 MAO-B- und COMT-Hemmer 32
1.4.1.4 NMDA-Antagonisten 33
1.4.1.5 Anticholinergika 34
1.4.1.6 Radikalfänger 34
1.4.2 Chirurgische Verfahren 35
1.4.2.1 Stereotaktische Läsion 35
1.4.2.2 Tiefenhirnstimulation 36
1.4.2.3 Transplantationschirurgie 36
1.4.2.4 Gentransfer 36

1.5 Experimentelle Parkinson-Modelle 38
1.5.1 Transiente pharmakologische Manipulationen 38
1.5.2 Selektive Zerstörung nigrostriataler Neurone 38
1.5.2.1 1-Methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridin (MPTP) 39
1.5.2.2 6-Hydroxydopamin (6-OHDA) 44
1.5.2.3 Rotenon 46
1.5.2.4 Genetische Modelle 46

1.6 Ziele der Arbeit 48

2 Material & Methoden **55**

2.1 Tiere und Tierhaltung 55

2.2 Gewebeuntersuchungen 56
2.2.1 Gewebeentnahme 56
2.2.2 Gewebeaufarbeitung 56

2.3 Histologie und Immuncytochemie 56
2.3.1 Gehirnschnitte 56
2.3.2 Nissl-Färbung 57
2.3.3 Tyrosinhydroxylase-Immunreaktivität 57
2.3.4 Mikroskopische Auswertung 58

2.4 Mikrodialyse-Experimente 59
2.4.1 Implantieren der Führungskanüle 59
2.4.2 Sonden 61
2.4.3 Mikrodialyse 62

2.5 HPLC-Untersuchungen 64
2.5.1 Methode zur Bestimmung von Neurotransmittern und ihren Metaboliten sowie Hydroxylradikalmarkern 64
2.5.1.1 Technische Daten 65
2.5.2 Methode zur Bestimmung der Hydroxylradikalmarker *o*-, *m*- und *p*-Tyrosin sowie der Peroxynitritmarker *NO*-Phenylalanin und *NO*-Tyrosin 66
2.5.2.1 Technische Daten 67
2.5.3 Methode zur Bestimmung von Aminosäuren 68
2.5.3.1 Technische Daten 69
2.5.4 Methode zur Bestimmung von MPP^+ 70
2.5.4.1 Technische Daten 71
2.5.5 Herstellung der Fliessmittel 71

2.6 Experimentelle Parkinson-Modelle ... 72
2.6.1 MPTP-Modell ... 72
2.6.2 Neurostimulation ... 73
2.6.2.1 6-OHDA ... 74
2.6.2.2 MPP^+ ... 74
2.6.2.3 3-Nitropropionsäure, Malonsäure und Tyramin ... 75
2.6.2.4 Kalium-Stimulation ... 75

2.7 Verhaltensparameter ... 76
2.7.1 Lokomotorische Aktivität ... 76
2.7.2 Rotarod (Drehstab) ... 76

2.8 Statistik ... 77

3 Ergebnisse **79**

3.1 Aufbau analytischer Methoden ... 79
3.1.1 Umstellung der HPLC-Analytik zur Bestimmung der Neurotransmitter auf ein neues Fliessmittel ... 79
3.1.2 Aufbau der MPP^+-Bestimmung ... 82

3.2 Charakterisierung des MPTP-Modells ... 83
3.2.1 Vergleich verschiedener MPTP-Maus-Modelle ... 83
3.2.1.1 Funktionelle Parameter ... 83
3.2.1.2 Physiologische Parameter ... 85
3.2.1.3 Neurochemische Parameter ... 87
3.2.1.4 Histologische Parameter ... 88
3.2.1.5 Zusammenfassung der Ergebnisse ... 90
3.2.2 Kinetik und MPTP-Metabolismus ... 91
3.2.2.1 Zusammenfassung der Ergebnisse ... 92

3.2.3 Neurotransmitter-Veränderungen im Zeitverlauf nach MPTP 93
3.2.3.1 Messung der Gewebespiegel 93
3.2.3.2 Zusammenfassung der Ergebnisse 95
3.2.3.3 Mikrodialyse 96
3.2.3.4 Radikalentstehung nach MPP^+ 98
3.2.3.5 Zusammenfassung der Ergebnisse 101

3.3 Untersuchungen am MPTP-Modell 102
3.3.1 (±)-Kavain im MPTP-Maus-Modell 102
3.3.1.1 Versuchsprotokoll 102
3.3.1.2 Physiologische Parameter 102
3.3.1.3 Funktionelle Parameter 103
3.3.1.4 Neurochemische Parameter 104
3.3.1.5 Histologische Parameter 109
3.3.1.6 Zusammenfassung der Ergebnisse 110
3.3.2 Akutes und subchronisches MPTP-Modell an IL-6 (-/-) Mäusen 111
3.3.2.1 Funktionelle Parameter 111
3.3.2.2 Neurochemische Parameter 112
3.3.2.3 Histologische Parameter 114
3.3.2.4 Zusammenfassung der Ergebnisse 114

3.4 Neurotoxin-Stimulation in der Mikrodialyse 115
3.4.1 Beteiligung von Hydroxylradikalen und Peroxynitrit an der Toxizität verschiedener Neurotoxine 115
3.4.1.1 Intrastriatale Applikation von 6-OHDA (C57BL/6-Mäuse) 115
3.4.1.2 Intrastriatale Applikation von 6-OHDA (TNF-α (-/-) Mäuse) 118
3.4.1.3 Intrastriatale Applikation von 3-NP 121
3.4.1.4 Intrastriatale Applikation von MPP^+ 121
3.4.1.5 Zusammenfassung der Ergebnisse 121

3.4.2 Mechanismen der Malonat-Toxizität 123
3.4.2.1 Versuchsdesign 123
3.4.2.2 Gewebespiegel 123
3.4.2.3 *In-vivo* Mikrodialyse 123
3.4.2.4 Zusammenfassung der Ergebnisse 124
3.4.3 Tyramin 127
3.4.3.1 Effekte der systemischen Gabe von Tyramin 127
3.4.3.2 Effekte der intrastriatalen Infusion von Tyramin 127
3.4.3.3 Effekte von MPTP auf die Tyramin-induzierte Radikalbildung 129
3.4.3.4 Effekte von Tranylcypromin auf die Tyramin-induzierte Radikalbildung 131
3.4.3.5 Zusammenfassung der Ergebnisse 133

3.5 Einfluss des NST auf das dopaminerge System 134
3.5.1 Unilaterale Mikrodialyse im Striatum 135
3.5.1.1 Dopamin & Metabolite 135
3.5.1.2 2,3-DHBA 135
3.5.1.3 Glutamat 135
3.5.2 Bilaterale Messung in der Substantia nigra 138
3.5.2.1 Dopamin & Metabolite 138
3.5.2.2 2,3-DHBA 138
3.5.2.3 Zusammenfassung der Ergebnisse 140

4 Diskussion **143**

4.1 Diskussion der angewandten Methoden 143
4.1.1 Mikrodialyse-Technik 143
4.1.1.1 Veränderungen im Gewebe 143
4.1.1.2 Vorteile der Führungskanüle 144
4.1.1.3 Messprinzip und Wiederfindungsrate 144
4.1.1.4 Membraneigenschaften 145
4.1.1.5 Flussrate und temporäre Auflösung 146
4.1.1.6 Zusammensetzung der Perfusionslösung 147
4.1.1.7 Vergleich zu der Gewebebestimmung 147
4.1.1.8 Weiterentwicklungen 148

4.1.2 Radikalmessung im Salicylat- und Phenylalanin-Assay 148
4.1.2.1 Salicylat-Assay 149
4.1.2.2 Phenylalanin-Assay 149
4.1.3 MPTP-Modell 150
4.1.3.1 MPTP-Kinetik 150
4.1.3.2 Lokomotorische Aktivität 151
4.1.3.3 Rotarod 151
4.1.3.4 Körpergewicht 152
4.1.3.5 Mortalität 152
4.1.3.6 Veränderungen der Neurotransmitter-Spiegel 153
4.1.3.7 Tyrosinhydroxylase-Aktivität und Nissl-Färbung 153
4.1.3.8 Mikrodialyse (MPTP/MPP^+) 154

4.2 Diskussion der Effekte im MPTP-Modell 158
4.2.1 (±)-Kavain 158
4.2.2 Bedeutung von IL-6 für die MPTP-Toxizität 160

4.3 Diskussion der Effekte im Stimulationsmodell 163
4.3.1 Beteiligung von Peroxynitrit (6-OHDA, 3-NP, MPP^+) 163
4.3.1.1 6-OHDA 163
4.3.1.2 Bedeutung von TNF-α für die akute 6-OHDA-Toxizität 165
4.3.1.3 MPP^+ 167
4.3.1.4 3-NP 168
4.3.2 Malonat 169
4.3.3 Tyramin 172

4.4 Diskussion der Bedeutung des NST 176

5 Zusammenfassung **179**

6 Summary **185**

Anhang **i**

Abbildungsverzeichnis **iii**

Tabellenverzeichnis **vii**

Abkürzungsverzeichnis **ix**

Chemikalien-Liste **xiii**

Publikationen **xix**

Lebenslauf **xix**

Kapitel 1

Einleitung

Das bereits aus dem Altertum unter dem volkstümlichen Namen "Schüttellähmung" bekannte Krankheitsbild wurde erst Mitte des 19. Jahrhunderts nach dem Londoner Arzt James Parkinson benannt. In seiner Monographie von 1817 "The Essay on the Shaking Palsy" beschrieb er als erster die Paralysis agitans als ein klinisch definiertes Krankheitsbild. Plastisch wurde die Erkrankung durch die präzise Beschreibung der Symptomatik aus Sicht eines Patienten: In seinen Briefen schilderte Wilhelm von Humboldt (1767 - 1835) eindrucksvoll seine Parkinson-Krankheit, die er allerdings als beschleunigtes Altern interpretierte [Horowski et al., 1995].

Der Morbus Parkinson ist eine chronisch progrediente, neurodegenerative Erkrankung mit Störungen der willkürlichen und unwillkürlichen Motorik. Die Bewegungsabläufe können verlangsamt (Bradykinese), vermindert (Hypokinese) oder ganz aufgehoben sein (Akinese), der Muskeltonus ist stark erhöht (Rigor) und es tritt ein feinschlägiger Ruhetremor auf [Fahn, 1988; Sian et al., 1999].

Die Ätiopathologie der Krankheit ist bis heute nicht geklärt. Diskutiert werden verschiedene Faktoren, unter denen jedoch der Beteiligung oxidativen Stresses die grösste Bedeutung beigemessen wird.

Da sich viele menschliche Erkrankungen - wie auch der Morbus Parkinson - nicht spontan in Tieren entwickeln, sind experimentelle Tiermodelle neben der klinischen Forschung und der Untersuchung von post-mortem Gehirnen eine wichtige Möglichkeit, die Pathogenese sowie therapeutische Ansatzpunkte zu untersuchen. Besondere Relevanz erlangte hier das Toxin MPTP (1-Methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridin), das in Mensch und Tier einen, der idiopathischen Krankheit stark ähnelnden, sekundären Parkinsonismus erzeugt.

1.1 Morbus Parkinson

Der Morbus Parkinson ist die zweithäufigste neurodegenerative Erkrankung nach dem Morbus Alzheimer und die häufigste neurologische Erkrankung der Basalganglien [Cummings, 1999].

Charakterisiert wird die Krankheit durch die Degeneration Dopamin-produzierender Neurone in der Substantia nigra pars compacta (SNc) und damit einhergehend der Dopamin-Verarmung des Striatums. Folglich kommt es zu der Ausbildung der Symptomen-Trias mit Rigor, Tremor und Akinese. Diese Kardinalsymptome müssen nicht immer gleich stark ausgeprägt sein und sind meist von Haltungsinstabilitäten, vegetativen Symptomen (Seborrhoe, Hyperhidrosis und Thermoregulationsstörungen) sowie psychischen Störungen (wie z.B. Depressionen [Errea und Ara, 1999]) begleitet. In Einzelfällen wird beim Morbus Parkinson auch von dementiellen Prozessen berichtet [Löschmann und Schulz, 1997].

1.1.1 Prävalenz und Inzidenz

Die Prävalenz der Parkinson-Syndrome wird mit 150 Fällen pro 100.000 Einwohner angegeben [Checkoway und Nelson, 1999], wobei Frauen und Männer von der Erkrankung gleich häufig betroffen sind [Rajput et al., 1984].

Die Inzidenz ist durch eine ausgeprägte Altersabhängigkeit gekennzeichnet; die Manifestation der Krankheit beginnt zwischen dem 35. und 70. Lebensjahr mit einem Maximum in der 6. Lebensdekade. Bei Eintritt vor dem 30. Lebensjahr spricht man vom "juvenilen" Parkinsonismus, der meist erblich bedingt ist. Prävalenz und Inzidenz nehmen mit wachsender Lebenserwartung zu [Löschmann und Schulz, 1997].

Insgesamt sind jedoch nur etwa 75% der Krankheitsfälle dem Morbus Parkinson (idiopatisches Parkinson-Syndrom) zuzurechnen. Das *idiopathische Parkinson-Syndrom* mit unbekannter Ätiologie muss streng vom *symptomatischen* oder *sekundären Parkinson-Syndrom* (medikamentös-induziert z.B. durch Neuroleptika oder als Spätfolge von Drogenkonsum, Schädelhirntraumen oder Enzephalitiden) und dem *Parkinson-Syndrom als Bestandteil neuronaler Systemdegenerationen* (wie beispielsweise Multisystematrophie, Morbus Alzheimer, diffuse "Lewi-body-disease", etc.) unterschieden werden.

Im folgenden beziehen sich die Aussagen nur noch auf den Morbus Parkinson.

1.1.2 Diagnostik

Erst das Auftreten motorischer Auffälligkeiten führt zu der Diagnose Morbus Parkinson. Sie gilt als abgesichert, wenn mindestens zwei der Kardinalsymptome beobachtet werden, die Erkrankung mit einem einseitigen Ruhetremor beginnt, der eine gute Ansprechbarkeit auf die Gabe von *L*-DOPA zeigt.

Da jedoch bis heute keine biologischen Marker zur eindeutigen Erkennung des Morbus Parkinson gefunden wurden [Riederer et al., 2000], können trotz steter Verbesserung der klinischen Diagnosekriterien nur etwa 80% der zu Lebzeiten diagnostizierten Parkinson-Erkrankungen post-mortem bestätigt werden. Mit Hilfe funktioneller bildgebender Verfahren wie PET (Positronen-Emissionstomographie) und SPECT (Single-Photon-Emissions-Computertomographie) können aber mittlerweile Veränderungen im Stoffwechsel der Neurotransmitter dargestellt werden [Antonini et al., 1997; Marek et al., 1996]. Diese Methoden gewinnen zunehmend als Stützen der klinischen Diagnostik v.a. bei der Evaluation des Schweregrades der Erkrankung an Bedeutung.

1.2 Organisation der Basalganglien und ihre Rolle beim Morbus Parkinson

1.2.1 Funktionelle Anatomie der Basalganglien

Der Morbus Parkinson betrifft in erster Linie das Gebiet der Stamm- und Basalganglien, das eine Gruppe funktionell zusammengehöriger Kerngebiete bezeichnet. Beim Menschen umfassen sie das Striatum, das sich aus Putamen und Nucleus caudatus zusammensetzt, den Globus pallidus, der sich in ein externes (GPe) und ein internes (GPi) Segment unterteilt, die Substantia nigra pars compacta (SNc) und pars reticularis (SNr) sowie den Nucleus subthalamicus (NST) [Blandini et al., 2000].

Diese Kerne sind zwischen der Hirnrinde (Cortex) und dem Thalamus lokalisiert und bilden einen Regelkreis zur Kontrolle und Modifizierung von Bewegungen. Der im limbischen System entstandene Bewegungsimpuls wird über den Assoziationscortex zum Kleinhirn und den Basalganglien weitergeleitet: Das Kleinhirn ist für die Feinabstimmung zuständig, da es die Bewegungsabläufe modulieren bzw. korrigieren kann. In den Basalganglien hingegen werden Störimpulse herausgefiltert, indem Bewegungsimpulse gebahnt oder unterdrückt werden können. Beide Systeme laufen im Thalamus zusammen, von wo aus die Impulse an den Motorcortex weitergeleitet werden.

1.2.2 Neurotransmitter der Basalganglien

Die Aktivität der einzelnen Basalganglienkerne wird über Neurotransmitter reguliert. Eine wichtige Rolle spielen dabei vor allem die inhibitorische γ-Aminobuttersäure (GABA), die die Aktivität nachgeschalteter Kerne herabsetzt, das exzitatorische Glutamat, das auf die Projektionsgebiete aktivierend wirkt und Dopamin. Eine quantitativ untergeordnete Rolle spielen die Peptide Enkephalin und Substanz P; sie übernehmen aber unter Umständen eine wichtige modulatorische Funktion an den Synapsen der GABA-ergen Neurone.

1.2.2.1 Dopamin

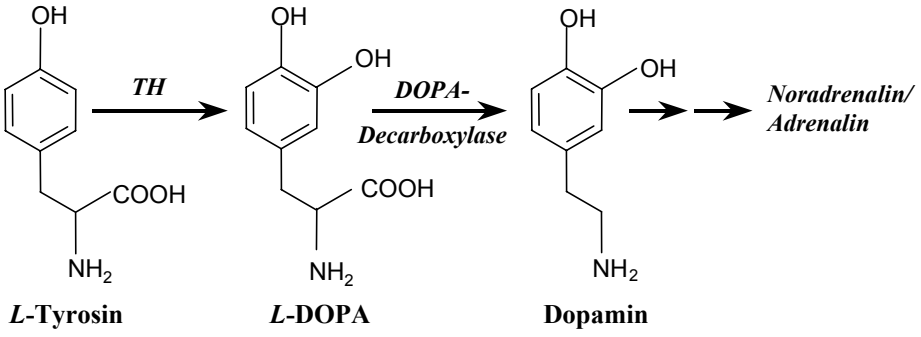
In den nigrostriatalen Fasern ist das Catecholamin Dopamin der vorherrschende Neurotransmitter. Es entsteht in mehreren Schritten aus der Aminosäure *L*-Phenylalanin: bereits in der Leber erfolgt die Umsetzung durch die Phenylalaninhydroxylase zu *L*-Tyrosin, das anschliessend in das Gehirn aufgenommen wird.

Die Catecholamin-produzierenden Neurone besitzen ein Enzym, das die Addition einer Hydroxylgruppe in *meta*-Position an *L*-Tyrosin katalysiert. Mittels der Tyrosinhydroxylase entsteht somit 3,4-Dihydroxyphenylalanin (*L*-DOPA), welches durch Abspaltung der CO_2-Gruppe via DOPA-Decarboxylase zu Dopamin umgewandelt wird (Abb. 1.1).

Der geschwindigkeitsbestimmende Schritt in dieser Synthesekette ist die Hydroxylierung. Die Reaktionskonstante für *L*-Tyrosin liegt im mikromolaren Bereich, so dass die Tyrosinhydroxylase durch die hohen Gewebekonzentrationen an endogenem *L*-Tyrosin praktisch gesättigt ist. Die Aktivität des Enzyms wird durch hohe Endproduktkonzentrationen gesenkt [Nagatsu et al., 1964] und nimmt im Alter durch verstärkte Deaktivierung ab [De La Cruz et al., 1996].

Die DOPA-Decarboxylase weist dagegen eine hohe Umsetzungsgeschwindigkeit auf, so dass *L*-DOPA effizient zu Dopamin umgesetzt wird. In weiteren Schritten kann aus Dopamin auch Noradrenalin und Adrenalin gebildet werden.

Abb. 1.1: Dopamin-Synthese



Schematische Darstellung der Dopamin-Synthese. Das in das Gehirn aufgenommene L-Tyrosin wird über die Tyrosinhydroxylase (TH) zu L-DOPA und weiter über die DOPA-Decarboxylase zu Dopamin umgesetzt. In weiteren Schritten können Noradrenalin und Adrenalin erzeugt werden.

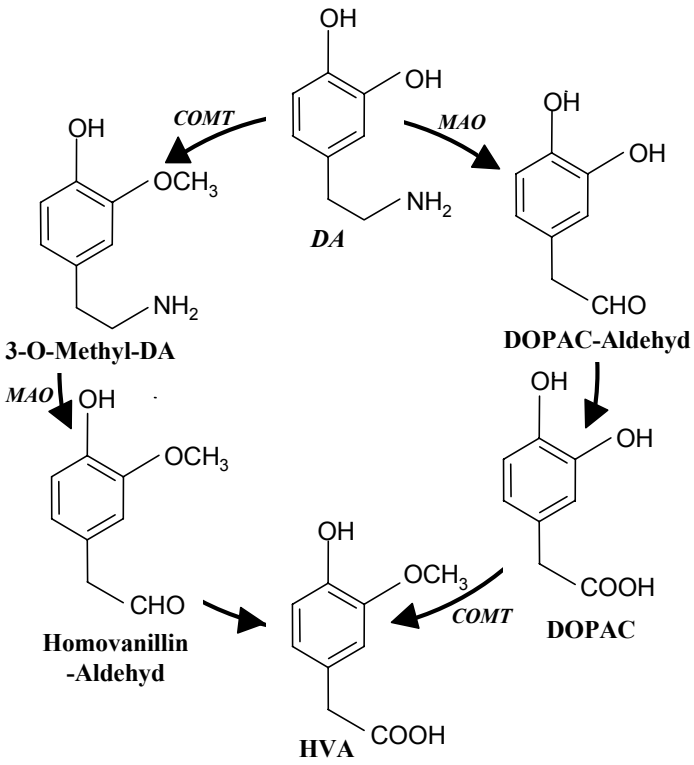
Anschliessend wird das entstandene Dopamin über den vesikulären Dopamintransporter (VMAT-2) in die Speichervesikel der Nervenendigung aufgenommen. Da die basischen Catecholamine nur in ihrer protonierten Form gespeichert werden können, werden über einen ATP-abhängigen Prozess zusätzlich Protonen in die Vesikel gepumpt.

Bei Eintreffen eines adäquaten Nervenimpulses docken einige der Vesikel an die präsynaptische Plasmamembran an und geben Dopamin über exozytotische Prozesse in den synaptischen Spalt ab, von wo aus es zu seinen Rezeptoren diffundiert. Die Dopamin-Rezeptoren werden als D_1- ($\triangleq$ D_1-Rezeptorfamilie mit den Rezeptoren D_1 und D_5) und D_2-Rezeptoren ($\triangleq$ D_2-Rezeptorfamilie mit den Rezeptoren D_2 - D_4) klassifiziert. Während über die Stimulation präsynaptischer Rezeptoren die Neurotransmitter-Freisetzung reguliert wird, korreliert die Stimulation der postsynaptischen Dopamin-Rezeptoren mit einer Aktivierung (D_1-Rezeptor-vermittelt) oder einer Hemmung (D_2-Rezeptor-vermittelt) der Nervenzellen. Allerdings gibt es Hinweise darauf, dass Dopamin-Rezeptoren und -transporter auch in der perisynaptischen Umgebung lokalisiert sind [Smiley et al., 1994], die das Dopamin durch Diffusion erreicht [Hoffmann et al., 1998]. Tatsächlich können derartige Vorgänge im striatalen Gewebe beobachtet werden, wenn die nigrostriatalen dopaminergen Fasern defekt oder die Wiederaufnahme blockiert sind [Doucet et al., 1986; Schneider et al., 1994].

Terminiert wird die Aktivität von Dopamin im synaptischen Spalt durch Re-uptake in die präsynaptische Nervenendigung oder enzymatischen Abbau. Die Wiederaufnahme in das Cytosol wird über den transmembranären Dopamintransporter (DAT) vermittelt, der an der Membran dopaminerger Neurone lokalisiert ist. Anschliessend erfolgt die Rückspeicherung in die Vesikel.

Der Abbau von Dopamin wird hauptsächlich über zwei Enzyme, die Monoaminoxidase-B (MAO) und die Catecholamin-O-methyltransferase (COMT), gesteuert. Beim Menschen weisen beide Isoformen der MAO (A und B) die gleiche Affinität zu Dopamin auf, während bei Mäusen der Dopamin-Abbau vorwiegend über die MAO-A vermittelt wird. Während die MAO an der äusseren Mitochondrienmembran lokalisiert ist [Costa et al., 1972] und so den intrazellulären Abbau von Dopamin und anderen Catecholaminen katalysiert, findet sich die COMT in nahezu allen Zellen (z.B. auch Erythrozyten), wo sie den Abbau extrazellulärer Catecholamine fördert [Nikodejevic et al., 1970]. Über Zwischenstufen entstehen dabei die Dopamin-Metabolite 3,4-Dihydroxyphenylessigsäure (DOPAC) und Homovanillinsäure (HVA) (Abb. 1.2).

Abb. 1.2: Dopamin-Metabolismus



Schematische Darstellung des enzymatischen Dopamin-Abbaus. Über die beiden Enzyme Monoaminoxidase-B (MAO-B) und Catechol-O-methyltransferase (COMT) entstehen über mehrere Zwischenstufen 3,4-Dihydroxyphenylessigsäure (DOPAC) und Homovanillinsäure (HVA).

1.2.3 Physiologie der Basalganglien

Die wichtigste Eingangsstruktur der Basalganglien ist das Striatum. Seine Aktivität wird über glutamaterge Impulse aus dem Cortex [Albin et al., 1992] und dopaminerge aus der SNc [Nieuwenhuys, 1990] moduliert. Dabei übernehmen die dopaminergen Afferenzen eine duale Funktion: Einerseits projizieren sie direkt auf die striatalen Neurone; andererseits konvergieren sie mit den glutamatergen Afferenzen auf die gleichen Dendriten und modulieren die striatale Antwort auf cortikale Impulse über die Beeinflussung der Glutamat-Freisetzung [Lindefors und Ungerstedt, 1990].

Über cholinerge Interneurone werden die cortikalen Impulse aus die striatalen "medium-spiny-neurons" übertragen[Kawaguchi et al., 1995]. Diese repräsentieren den Grossteil der striatalen Neurone und wirken über ihre GABA-ergen Efferenzen inhibitorisch auf die nachgeschalteten Zentren.

Vom Striatum aus werden die Impulse über zwei Projektionssysteme an die Ausgangskerne GPi und SNr weitergeleitet. Dabei unterscheidet man eine direkte und eine indirekte Projektion.

Direkte Projektion

Ausgehend von den D_1-Rezeptoren ziehen die Neurone des direkten striatalen Projektionssystems monosynaptisch zum GPi. Durch die D_1-vermittelte Aktivierung der Neurone wirken seine GABA-ergen Fasern hemmend auf den GPi, der somit seinen inhibitorischen Einfluss auf Thalamus und Hirnstamm verliert. Infolgedessen kann über die glutamaterge thalamocortikale Projektion eine Aktivierung des Cortex erfolgen [Albin et al., 1989; Gerfen et al., 1995].

Indirekte Projektion

Die indirekte striatothalamische Bahn geht von den D_2-Rezeptoren aus und besteht aus zwei aufeinanderfolgenden GABA-ergen inhibitorischen Neuronen, die das Striatum mit dem GPe und den GPe mit dem NST verbinden. Durch die D_2-vermittelte Hemmung der Neurone verliert das Striatum seinen hemmenden Einfluss auf den GPe, der somit die Aktivität des NST herabsetzt.

Die exzitatorische, glutamaterge Innervation der Ausgangskerne (GPi und SNr) durch den NST wird folglich unterdrückt, so dass auch hier die glutamaterge thalamocortikale Projektion zur Aktivierung des Cortex führt [Albin et al., 1989; Gerfen et al., 1995].

Zusammenfassend betrachtet wirken also beide Projektionssysteme in gleicher Weise auf die Ausgangskerne. Dennoch werden ihnen unterschiedliche Funktionen zugeschrieben: Das direkte Projektionssystem verstärkt in erster Linie die Bahnung zweckmässiger Bewegungsimpulse, während das indirekte Projektionssystem potentielle Störimpulse unterdrücken kann [Marsden und Obeso, 1994]. Die Basalganglien erhalten somit eine duale Rolle in der Bewegungsausführung (Abb. 1.3).

1.2.4 Pathophysiologie der Basalganglien

Eine Störung dieses Regelsystems bewirkt funktionelle Veränderungen in den Ein- und Ausgangskernen der Basalganglien, die in einer Beeinträchtigung der Bewegungsausführung resultieren [McGeer et al., 1987*b*; Sian et al., 1999].

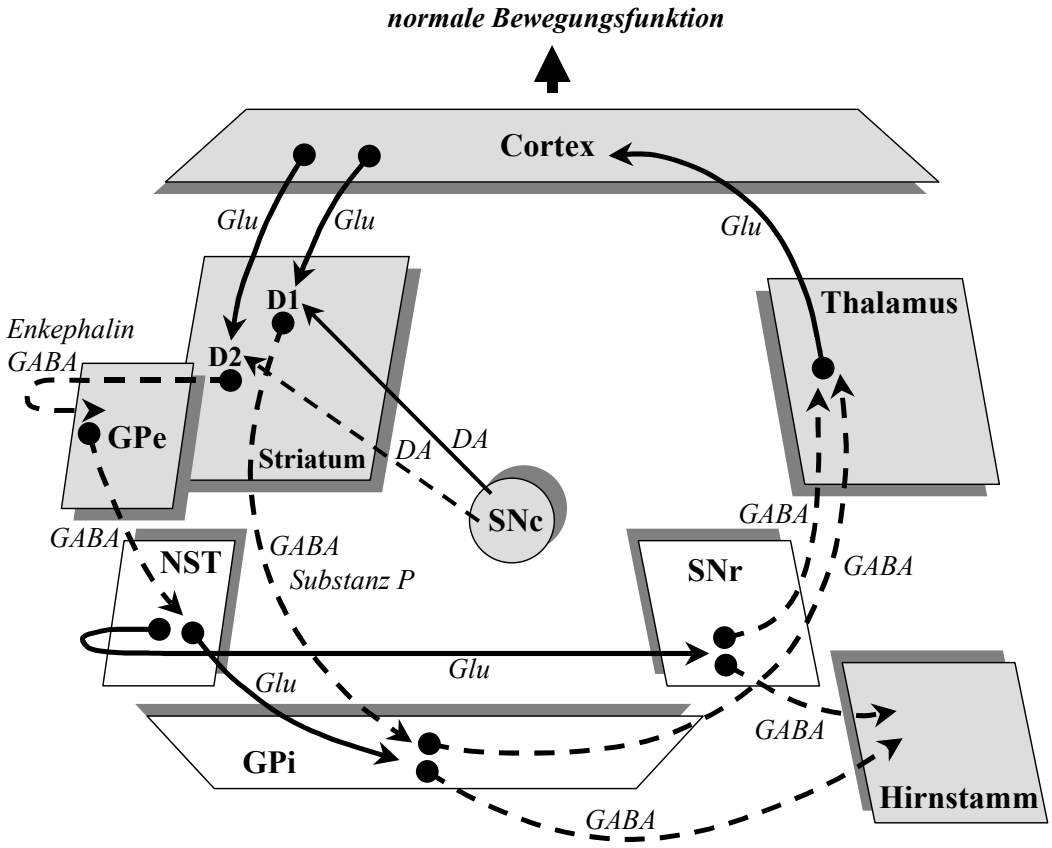
1.2.4.1 Anomalien der Basalganglien beim Morbus Parkinson

Biochemisch betrachtet führt die selektive Degeneration der melaninhaltigen dopaminergen Neurone in der SNc durch axonale Projektion zu einer Dopamin- Verarmung des Striatums [Marsden, 1990; Ehringer und Hornykiewicz, 1960]. Übersteigt diese den Schwellenwert von 80%, verschiebt sich durch eine verstärkte glutamaterge Innervation der cholinergen Interneurone das streng ausbalancierte Verhältnis von Dopamin zu Acetylcholin. Durch die folgenden Veränderungen in der Physiologie der Basalganglien kommt es zur Manifestation der Symptomatik. Die Schwere der Symptome korreliert dabei mit der Abnahme des verfügbaren Dopamins [Müller et al., 1999; Bernheimer et al., 1973].

Die striatale Dopamin-Verarmung zieht einen Verlust der D_1-vermittelten Inhibition des GPi nach sich. Auf diese Weise entsteht eine Überaktivität der hemmenden Projektionen des GPi zum Thalamus. Gleichzeitig entfällt die D_2-vermittelte Inhibition des GPe, der nun seine hemmende Wirkung auf den NST nicht mehr ausüben kann. Die Überaktivität des NST führt zu einer glutamatergen Aktivierung der Ausgangskerne GPi und SNr und folglich zu einer verstärkten Hemmung von Thalamus und Hirnstammkernen. Die verminderte thalamocortikale Aktivität vereitelt die normale Bewegungsausführung und resultiert in den Symptomen Bradykinese und Akinese. Die Hemmung der Hirnstammkerne wird hingegen vor allem für die Auswirkungen auf Gang und Körperhaltung verantwortlich gemacht [Wichmann und DeLong, 1993] (Abb. 1.4).

Mentale, autonome und endokrine Funktionsstörungen werden hingegen auf extranigrale Veränderungen zurückgeführt [Braak et al., 1995]. Der degenerative Prozess ist schliesslich nicht auf die SN beschränkt, sondern betrifft auch in unterschiedlichem Masse andere pigmentierte Hirnareale wie beispielsweise den Locus coeruleus [Gaspar, 1994], das ventrale Tegment des Mittelhirns, den Nucleus basalis Meynert sowie den Thalamus, den Hypothalamus und Bereiche der Hirnrinde [Cornford et al., 1995; Schneider, 1997; Lang und Lozano, 1998].

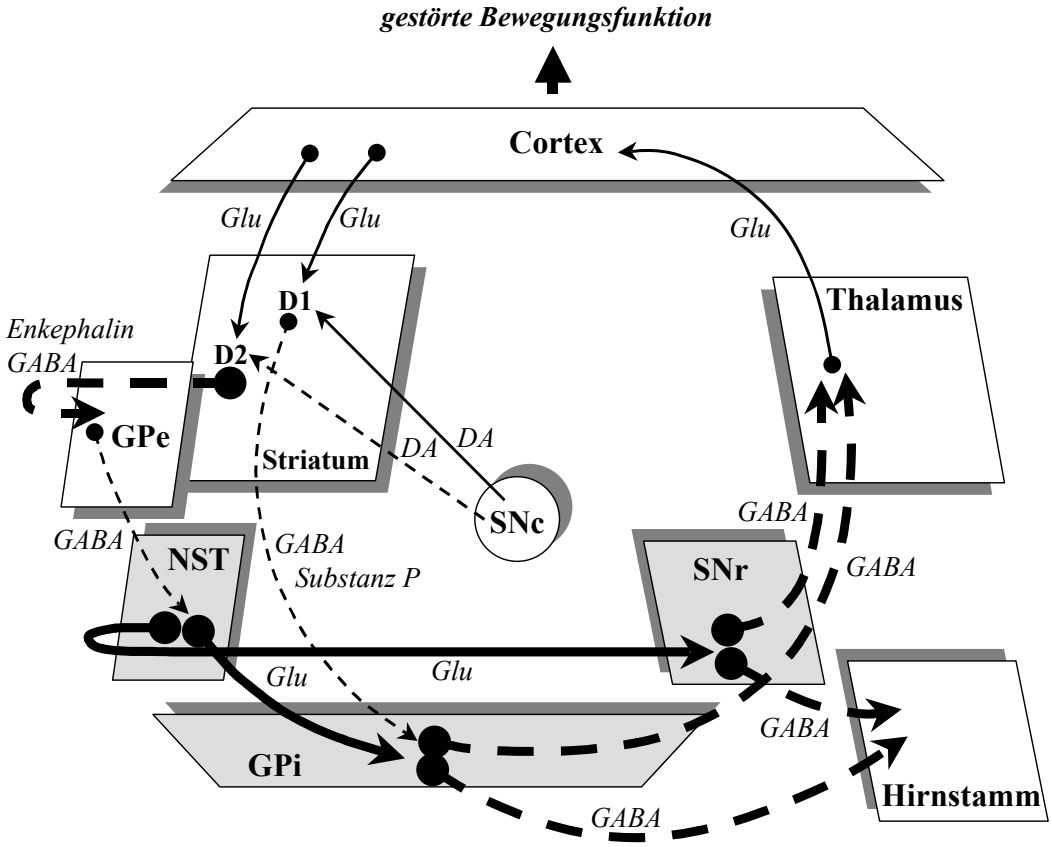
Abb. 1.3: Verschaltung der Basalganglien



Schematische Darstellung der motorischen Kerne der Basalganglien und ihrer Verschaltung im gesunden Gehirn (modifiziert nach Trends in Neuroscience Supplement: Basal ganglia, Parkinson's disease and L-DOPA-therapy).

aktive Kerne (grau) — *aktivierende Projektion (——)*
inaktive Kerne (weiss) — *hemmende Projektion (- - -)*
Glu: Glutamat — *GABA: γ-Aminobuttersäure*
GPe/GPi: Globus pallidus externus/internus — *NST: Nucleus subthalamicus*
SNc/SNr: Substantia nigra pars compacta/reticularis

Abb. 1.4: Veränderungen in den Basalganglien beim MP



Veränderungen in den Basalganglien beim Morbus Parkinson (modifiziert nach Trends in Neuroscience Supplement. Basal ganglia, Parkinson's disease and L-DOPA-therapy.).

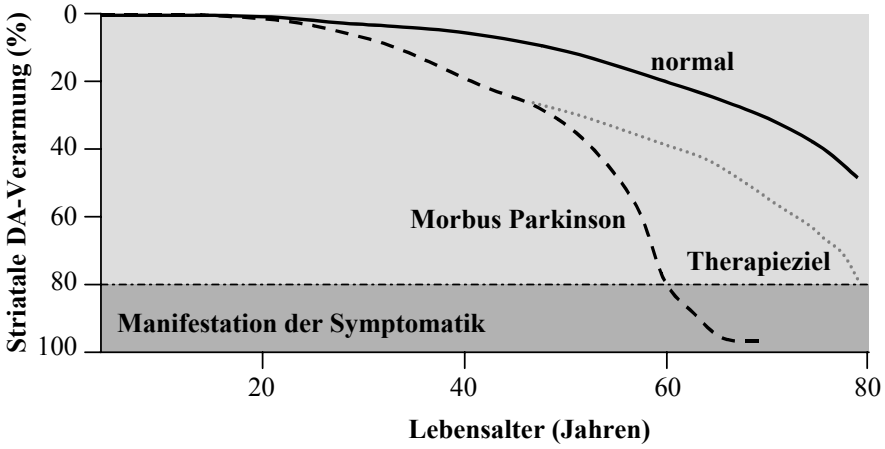
aktive Kerne (grau)
inaktive Kerne (weiss)
abgeschwächte Projektion: dünne Linie
verstärkte Projektion: dicke Linie
GPe/GPi: Globus pallidus externus/internus
SNc/SNr: Substantia nigra pars compacta/reticularis
aktivierende Projektion (——)
hemmende Projektion (- - -)
Glu: Glutamat
GABA: γ-Aminobuttersäure
NST: Nucleus subthalamicus

Neurohistopathologische Merkmale der degenerierten Neurone von Parkinson-Patienten sind im Cytoplasma auftretende 5 - 25 μm grosse, kugelförmige Einschlüsse mit dichtem, eosinophilem Kern und blassem Hof - die sogenannten "Lewy-bodies" [Geodert et al., 1998*b*]. Sie wurden erstmals 1912 beschrieben und später nach ihrem Entdecker Lewy benannt. Neben Ubiquitin [Gai et al., 1995] und Neurofilament-Proteinen [Forno, 1996] gehört das Protein "α-Synuclein" zu den Hauptbestandteilen der Lewy-bodies [Sprillantini et al., 1997; Giasson et al., 2000]. Allerdings können Lewy-bodies auch bei anderen Erkrankungen und in altersentsprechenden Kontrollgehirnen auftreten [Löschmann und Schulz, 1997].

1.2.4.2 Veränderungen im Alterungsprozess

Im Laufe des Lebens nimmt die Zahl dopaminerger Zellen in der SN auch ohne krankhafte Einflüsse ab. Die synaptische Plastizität ermöglicht es dem Gehirn jedoch die neuronale Degeneration bis zu einem bestimmten Grad zu tolerieren [Riederer und Wuketich, 1976]; eine Parkinson-Symptomatik manifestiert sich dadurch nicht mehr zu Lebzeiten (Abb. 1.5).

Abb. 1.5: Verlauf der striatalen Dopamin-Verarmung



Zeitverlauf der striatalen Dopamin-Verarmung im Laufe des Lebens (——) und beim Parkinson-Patienten (- - -). Die dünne Linie zeigt das angestrebte Therapieziel (· · ·). Man geht davon aus, dass sich die Linien bei etwa 120 Jahren wieder treffen.

Auch einige histopathologische Aspekte des Morbus Parkinson sind mit den Erscheinungen des Alterungsprozesses vergleichbar [Cruz-Sanchez et al., 1997]. Man hat beispielsweise morphologische Merkmale gefunden, die stark an Lewy-bodies erinnern und als "Grabsteine" der Neurone bezeichnet werden [Calne et al., 1986].

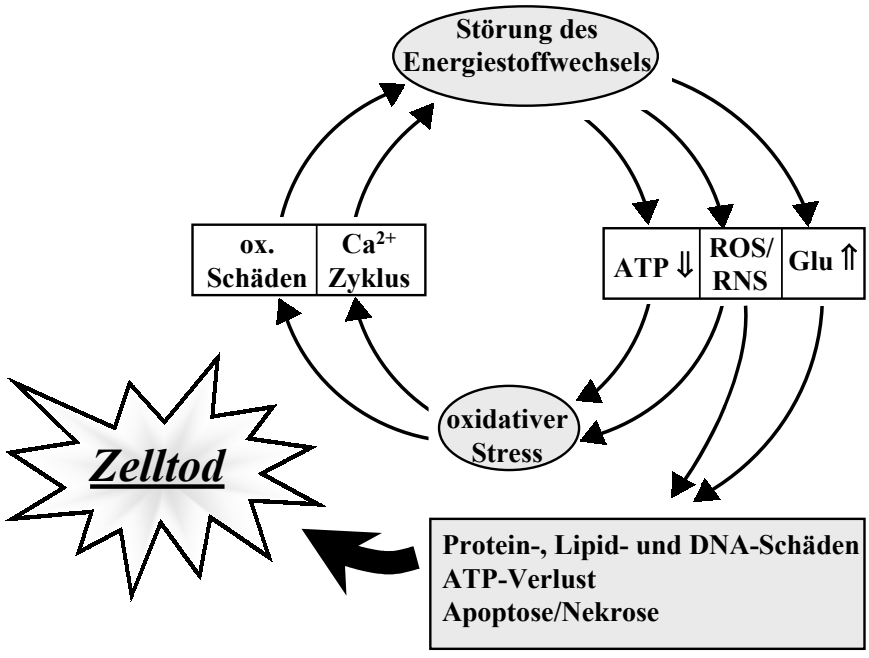
Unter diesem Blickwinkel trifft die Interpretation Wilhelm von Humboldts zu, der seine Krankheit als frühzeitiges Altern beschrieb.

1.3 Pathogenese des Morbus Parkinson

Eine Vielzahl pathologischer Faktoren, die in ihren Mechanismen ineinandergreifen, spielen für die Ausbildung des Morbus Parkinson eine fundamentale Rolle. Diskutiert werden vor allem oxidativer Stress, inflammatorische Prozesse, mitochondriale Defekte, Exzitotoxizität, apoptotische Mechanismen und genetische Prädisposition [Larkin, 1999]. Durch die Verflechtung dieser Faktoren ist jedoch die Identifizierung eines ursächlichen Phänomens bis heute nicht möglich [Jenner, 1998]. Man geht infolgedessen von einer multifaktoriellen Etiopathogenese aus (Abb. 1.6).

Dennoch wird der neuronale Zelltod verstärkt mit der Entstehung freier Radikale und oxidativer Schädigung in Verbindung gebracht [Coyle und Puttfarken, 1993; Jenner und Olanow, 1996].

Abb. 1.6: Zusammenspiel der pathologischen Faktoren



Schematische Darstellung des Zusammenspiels der pathogenetischen Faktoren des Morbus Parkinson (modifiziert nach Bowling und Beal, 1995).

Glu: Glutamat
ROS: reaktive Sauerstoffspezies
RNS: reaktive Stickstoffspezies

1.3.1 Oxidativer Stress

Unter freien Radikalen versteht man Moleküle, die ein ungepaartes Elektron auf der äusseren Schale besitzen und somit sehr instabile Verbindungen darstellen. Sie reagieren sehr schnell mit Zellbestandteilen, insbesondere mit Membranlipiden, Mitochondrien, Proteinen und Nukleinsäuren [Blandini et al., 2000], und führen so zu Funktionsstörungen von Enzymen, Schäden an Zellbestandteilen und letztlich zum Tod der Neurone [Halliwell, 1992].

Zu den *reaktiven Sauerstoffspezies* (ROS), bei denen das Sauerstoffatom Träger des ungepaarten Elektrons ist, gehören das Superoxidanion- ($O_2^{\cdot -}$) und das Hydroxylradikal ($OH^{\cdot}$), aber auch nicht radikalische Verbindungen wie Wasserstoffperoxid (H_2O_2). Unter den ROS wird die schädliche Wirkung vor allem dem $OH^{\cdot}$ zugeschrieben, da es die höchste Reaktivität besitzt.

Die wichtigsten Vertreter der *reaktiven Stickstoffspezies* (RNS) sind das Stickstoffmonoxidradikal ($NO^{\cdot}$) und das nicht-radikalische Peroxynitrit ($ONOO^-$).

Freie Radikale werden kontinuierlich als Nebenprodukte vieler biochemischer Reaktionen (Dopamin-Katabolismus, oxidative Phosphorylierung, usw.) im Körper gebildet. Spezifische endogene Abwehrsysteme minimieren im gesunden Gewebe ihren schädlichen Effekt (siehe Kap. 1.3.1.4).

Im Vergleich zum restlichen Gehirn ist die SNc grösseren Mengen an oxidativem Stress ausgesetzt: Der Katabolismus von Dopamin via MAO-B, die Autoxidation von Dopamin, steigende Konzentrationen an Neuromelanin und hohe Eisenspiegel führen zu einer vermehrten Entstehung freier Radikale [Coyle und Puttfarcken, 1993].

Die oxidativen Schäden resultieren hauptsächlich in der Veränderungen von Proteinen. Durch die Modifikation von Aminosäureresten oder Lipidperoxidation werden Funktionsstörungen membranassoziierter Proteine [Bowling und Beal, 1995], DNA-Veränderungen (Erhöhung des 8-OH-2-Desoxyguanosin-Anteils) [Yoritaka et al., 1996], mitochondriale Defekte [Allen et al., 1995] sowie apoptotische Mechanismen ausgelöst.

1.3.1.1 Dopamin-Toxizität und Neuromelanin

Schon seit einiger Zeit wird Dopamin mit neurotoxischen Effekten in Verbindung gebracht: Man sagt ihm nach, dass es die Nervenzellen zerstört, in denen es gebildet wird.

Bereits während der Synthese kann die Tyrosinhydroxylase, die zu den eisenabhängigen Biopterinenzymen gehört, durch einen 1-Elektron-Transfer in die radikalische Form übergehen und in Gegenwart von Sauerstoff Superoxidradikale erzeugen [Adams et al., 1997].

Desweiteren spielt die MAO-B induzierte Radikalbildung eine wichtige Rolle, denn der Grossteil des neuronalen Dopamins wird über dieses Enzym abgebaut. Dabei entsteht pro Molekül Dopamin ein Molekül H_2O_2.

$$DA\ (RCH_2NH_2) + O_2 + H_2O \overset{MAO}{\rightarrow} DOPAC\ (RCHO) + NH_3 + H_2O_2$$

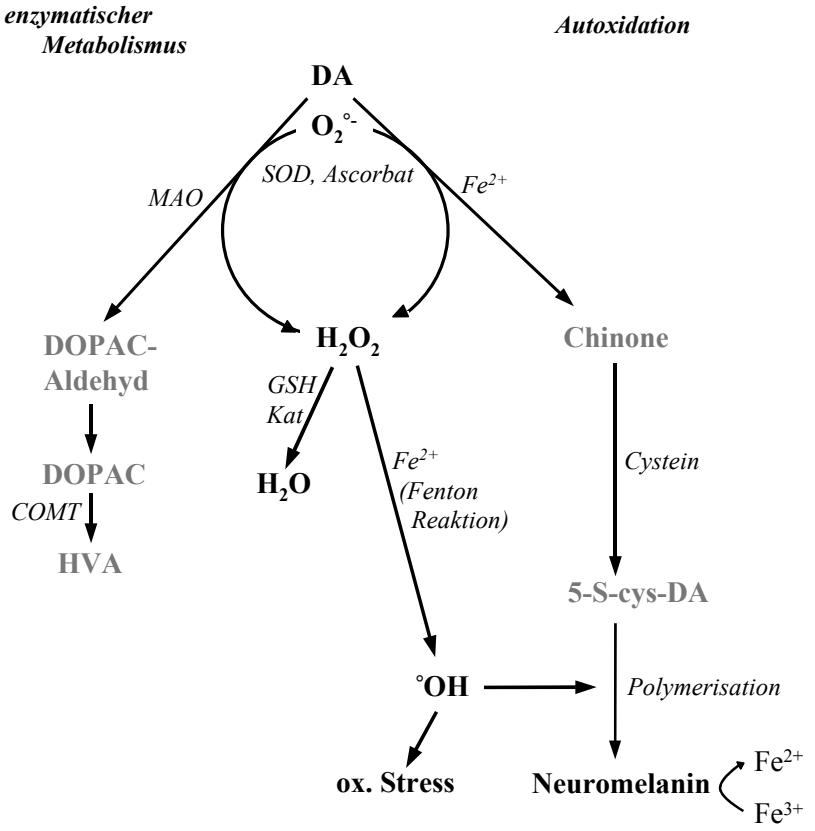
Dopamin kann aber auch bei Anwesenheit von Sauerstoff autoxidativ umgesetzt werden, wobei neben H_2O_2 zytotoxische Semichinone ($SQ^{\cdot}$) gebildet werden (Abb. 1.7).

$$DA + O_2 \ \rightarrow SQ^{\cdot -} + O_2^{\cdot -} + 2\ H^+$$

$$DA + O_2^{\cdot -} \rightarrow SQ^{\cdot -} + O_2 + H_2O_2$$

Diese Semichinone polymerisieren über eine metabolische Kaskade zu Neuromelanin, das vom Körper nicht weiter abgebaut werden kann und in der SNc kumuliert [Graham, 1978]. Die Ablagerung von Neuromelanin schränkt ab einem gewissen Grad die Funktionsfähigkeit der Zelle ein und stellt gleichzeitig einen Risikofaktor für oxidativen Stress dar: Neben der verstärkten Einlagerung von Eisen steigert es dessen Anteil an radikalbildenden Prozessen [Miller et al., 1990].

Abb. 1.7: Dopamin-Metabolismus und Radikalentstehung



Mechanismus der Dopamin-induzierten Radikalentstehung (modifiziert nach Jenner, 1998).

DA: Dopamin
DOPAC: 3,4-Dihydroxyindolessigsäure
HVA: Homovanillinsäure
COMT: Catechol-O-methyltransferase
MAO: Monoaminoxidase
SOD: Superoxiddismutase
GSH: Glutathion
Kat: Katalase
5-S-cys-DA: 5-S-Cysteinyl-Dopamin

Inwieweit die Dopamin-Toxizität zu der Progression der Erkrankung beiträgt ist dennoch umstritten: Dafür sprechen die bereits im präsymptomatischen Stadium des Morbus Parkinson einsetzenden Kompensationsmechanismen zur Aufrechterhaltung der dopaminergen Funktion. Der in den verbliebenen Neuronen stark erhöhte Dopamin-Umsatz führt zu einer Bildung von Neuromelanin sowie exzessiver Mengen an H_2O_2.

Zwar sind die melanisierten Neurone der SNc tatsächlich die empfindlichsten und sterben im Verlauf des Morbus Parkinson als erste ab [Hirsch et al., 1988], aber von der Erkrankung sind auch nicht-melanisierte Kerngebiete (Nucleus basalis Meynert) betroffen [Braak et al., 1998]. Dopamin spielt sicherlich eine wichtige Rolle im Zusammenhang mit der Degeneration des nigrostriatalen Systems, kann aber vermutlich nicht als ursächlicher Faktor angesehen werden [Foley und Riederer, 1999].

1.3.1.2 H_2O_2 und Eisen

Das beim Dopamin-Abbau entstandene H_2O_2 wird in Gegenwart von Eisenionen (Fe^{2+}) über die Fenton-Reaktion zu freien Radikalen umgesetzt. Bei physiologischem pH und aerober Atmosphäre ist zwar die oxidierte Form des Eisens stabiler, aber in lebender Zellen wird gelöstes Eisen via Superoxid, Glutathion oder Ascorbat in die reduzierte Form überführt. Das reaktive Fe^{2+}-Ion katalysiert Oxidationsreaktionen, darunter die Entstehung von Hydroxylradikalen aus $O_2^{\cdot -}$ und H_2O_2 [Aisen et al., 1990]. In dieser reduzierenden Umgebung ist das Eisen selbst in Spuren katalytisch aktiv und ermöglicht so eine kontinuierliche Umsetzung von H_2O_2 zu $OH^{\cdot}$ [Kang et al., 1989].

$$O_2^{\cdot -} + Fe^{3+} \rightarrow O_2 + Fe^{2+}$$

$$H_2O_2 + Fe^{2+} \rightarrow OH^{\cdot} + OH^- + Fe^{3+} \quad (Fenton - Reaktion)$$

$$- -$$

$$O_2^{\cdot -} + H_2O_2 \overset{Metall-}{\underset{ionen}{\rightarrow}} O_2 + OH^{\cdot} + OH^- \quad (Haber - Weiss - Zyklus)$$

Ungünstigerweise sind die Basalganglien ein sehr Eisen-reiches Gewebe mit höchsten Konzentrationen in der Substantia nigra [Dexter et al., 1987]. Zwar werden die Spiegel an freiem Eisen streng kontrolliert, indem es auf zellulärer Ebene in grosse Proteine wie Ferritin und im Blut in Hämoglobin bzw. Transferrin eingebunden wird, jedoch kann es durch reduzierende Stoffe und freie Radikale wieder aus diesen Bindungen freigesetzt werden [Riederer et al., 1989].

Derartige Veränderungen im Eisen-Haushalt von Parkinson-Patienten sind bereits beschrieben [Dexter et al., 1991; Connor et al., 1995]. Neuere Befunde deuten sogar auf einen systemischen Defekt im Eisen-Metabolismus hin [Logroscino et al., 1997], da sie neben erhöhten Eisen-Spiegeln zusätzlich eine Abnahme der Ferritin- bzw. Transferritin-Spiegel, der Eisen- bindungskapazität und der Transferritinsättigung zeigen. Anstiege der absoluten Eisen- Konzentrationen in der SNc um bis zu 35% mit Verschiebung des Fe^{2+}/Fe^{3+} Gleichgewichts in Richtung Fe^{3+} stehen im Einklang mit der verstärkten Umsetzung von H_2O_2 zu $OH^{\cdot}$ im Haber-Weiss-Zyklus [Gerlach et al., 1994]. Dennoch scheint die Erhöhung der Eisen-Konzentration ein sekundärer Effekt zu sein, da derartige Veränderungen nur in sehr schweren Fällen des Morbus Parkinson gemessen werden [Riederer et al., 1989]. Durch die Fähigkeit Radikale zu erzeugen, könnten Veränderungen der Eisen-Spiegel jedoch an der Progression der Erkrankung beteiligt sein.

1.3.1.3 Peroxynitrit

Peroxynitrit entsteht durch die Reaktion des Superoxidanionradikals mit dem Stickstoffmonoxidradikal. Letzteres wird in verschiedenen Zelltypen mittels NO-Synthase (NOS) aus Arginin synthetisiert [Moncada et al., 1994]. Man unterscheidet 4 Isoformen der NOS, die durch ihre Lokalisation gekennzeichnet werden: die neuronale NOS (nNOS), die im gesamten ZNS vorkommt, die endotheliale NOS (eNOS), die mitochondriale NOS (mtNOS) und die induzierbare NOS (iNOS), die bei entzündlichen Prozessen durch Zytokine wie IL-1β, INF-γ oder TNF-α in den Gliazellen hochreguliert wird [Simmons und Murphy, 1992].

$NO^{\cdot}$ stellt einen weitverbreiteten intra- und interzellularen Messenger dar, der sich schnell über Zellen und Gewebe ausbreiten kann [Lancester, 1994]. Trotz des ungepaarten Elektrons zeigt es aber nur geringe Reaktivität und somit auch nur moderate Toxizität. Seine inhibitorische Wirkung auf den Komplex IV der Atmungskette [Cleeter et al., 1994] scheint ebenfalls nicht der Hauptschädigungsmechanismus zu sein, viel entscheidender ist die unter physiologischen Bedingungen spontan ablaufende Reaktion mit $O_2^{\cdot -}$ unter Entstehung des nicht radikalischen Peroxynitrits ($ONOO^-$).

$$O_2^{\cdot -} + NO^{\cdot} \rightarrow ONOO^- \overset{+H^+}{\rightarrow} ONOOH$$

Nach seiner Protonierung zerfällt Peroxynitrit sehr schnell unter Entstehung freier Radikale (Stickstoffdioxidradikal ($NO_2^{\cdot}$), Nitroniumion (NO^{2+}) und $OH^{\cdot}$) [Beckmann et al., 1990].

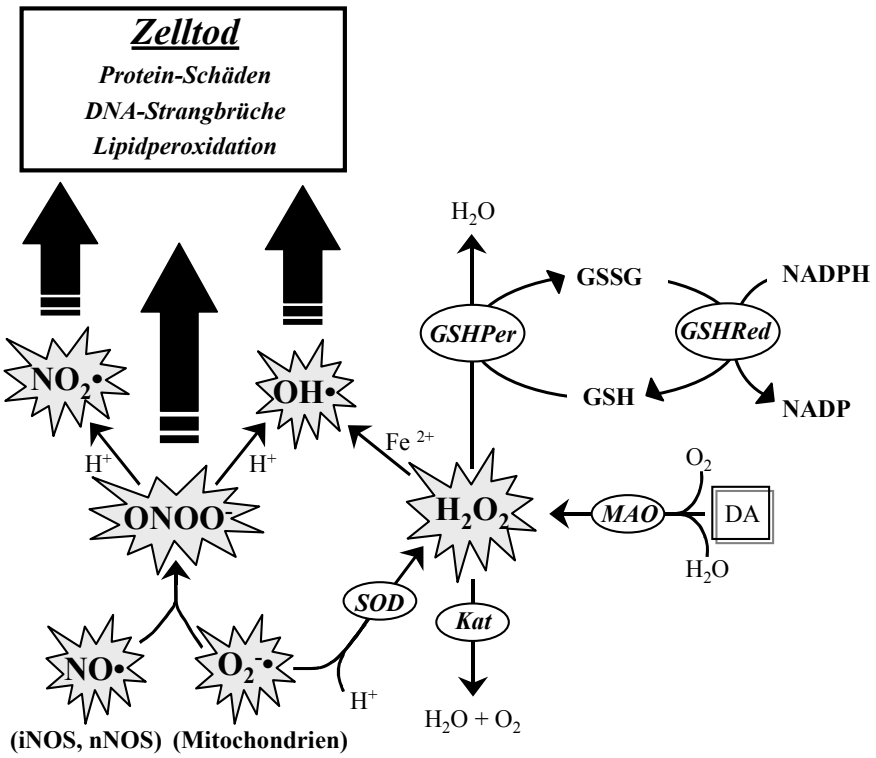
$$3\ ONOOH \rightarrow NO_2^{\cdot} + NO_3^- + NO_2^+ + OH^{\cdot} + H^+ + OH^-$$

Trotz des schnellen Zerfalls kann Peroxynitrit seine Wirkung in einem Umkreis seines sechsfachen Durchmessers entfalten; Zellmembranen stellen dabei keine Barriere für Peroxynitrit dar [Groves, 1999].

Seine Toxizität ist vor allem durch die Übertragung von NO-Gruppen gekennzeichnet. In Gegenwart von katalytischen Metallionen nitriert es die Tyrosinreste von Proteinen und führt so zu Funktionsstörungen von Enzymen und Rezeptoren [van der Vliet et al., 1994]. Gleichzeitig greift es die Zellen durch Oxidation von Sulfiden [Pryor et al., 1994], Thiolen [Radi et al., 1991*a*], Lipiden [Radi et al., 1991*b*], Proteinen [Moreno und Pryor, 1992] und Nukleinsäuren an und schwächt die antioxidativen Systeme durch Depletion des Glutathion-Pools. Dadurch sensitiviert es die Zellen gegen oxidative und zytotoxische Prozesse [Phlebs et al., 1995] (Abb. 1.8).

Die Proteinnitrierung erwies sich als guter Indikator für bereits erfolgte oxidative Reaktionen, wie sie auch bei neurodegenerativen Erkrankungen wie dem Morbus Parkinson gezeigt werden konnten [Beal, 1998; Good et al., 1998].

Abb. 1.8: Die Entstehung von oxidativem Stress und seine Auswirkungen



Die Quellen des oxidativen Stresses liegen in der oxidativen Phosphorylierung sowie dem Metabolismus von Dopamin. Das entstandene Wasserstoffperoxid (H_2O_2) wird zu Hydroxylradikalen ($OH\cdot$) umgesetzt, die zusammen mit den radikalischen Folgeprodukten des Peroxynitrits ($ONOO^-$) schwere Zellschäden auslösen (modifiziert nach Knight et al., 1997).

DA: Dopamin — *GSH Per: Glutathion-Peroxidase*
SOD: Superoxiddismutase — *GSH Red: Glutathion-Reduktase*
iNOS: induzierbare NO-Synthase — *GSH: Glutathion*
nNOS: neuronale NO-Synthase — *GSSG: oxidiertes Glutathion*
NADP/NADPH: Nicotinsäureamid-Adenindinukleotidphosphat

1.3.1.4 Endogene antioxidative Mechanismen

Gut funktionierende Abwehrsysteme begrenzen die Lebensdauer der ROS im gesunden Organismus. Das grösste antioxidative System des Körpers setzt sich aus den Enzymen Superoxiddismutase (SOD), Glutathion-Peroxidase (GSH Per), Glutathion-Reduktase (GSH Red) und Katalase (Kat) zusammen [Cohen, 1983].

Die Superoxiddismutase stellt die erste Barriere in der Abwehr des $O_2^{\cdot -}$ dar und katalysiert dessen Umsetzung zu H_2O_2. Obwohl dieses Enzym H_2O_2 erzeugt, gilt es als antioxidativ, da die Bildung von $OH^{\cdot}$ über die Haber-Weiss-Reaktion unterbunden wird [Fridovich, 1986].

$$2\ O_2^{\cdot -} + 2\ H^+ \overset{SOD}{\rightarrow} H_2O_2 + O_2$$

Die Katalase fördert die Dismutation von H_2O_2 zu Wasser und Sauerstoff.

$$2\ H_2O_2 \overset{Kat}{\rightarrow} 2\ H_2O + O_2$$

Das vorherrschende Enzym zur Senkung der H_2O_2-Spiegel ist jedoch die Glutathion-Peroxidase (GSH Per). Neben der Umsetzung von H_2O_2 katalysiert sie auch die Reduktion organischer Hydroperoxide zu nicht-toxischen Alkoholen. Auf diese Weise verhindert das Enzym Radikalkettenreaktionen, die zu Störungen in der Membranfunktion und -stabilität führen würden.

$$H_2O_2 + 2\ GSH \overset{GSHPer}{\rightarrow} GSSG + 2\ H_2O$$

$$Lipid - OOH + 2\ GSH \overset{GSHPer}{\rightarrow} GSSG + Lipid - OH$$

Oxidiertes Glutathion (GSSG) wird mittels GSSG-Reduktase wieder in die aktive Form überführt.

$$GSSG + NADPH + H^+ \overset{GSSGRed}{\rightarrow} 2\ GSH + NADP^+$$

GSSG kann aber auch spontan mit freien Thiolgruppen reagieren. Wenn die betroffenen Proteine essentielle Funktionen für die Zelle erfüllen wie z.B. die Komplexe I - V der Atmungskette, kann es durch eine derartige Reaktion zu Dysfunktionen mit Einschränkung der Lebensfähigkeit der Zelle kommen [Berridge und Tan, 1993].

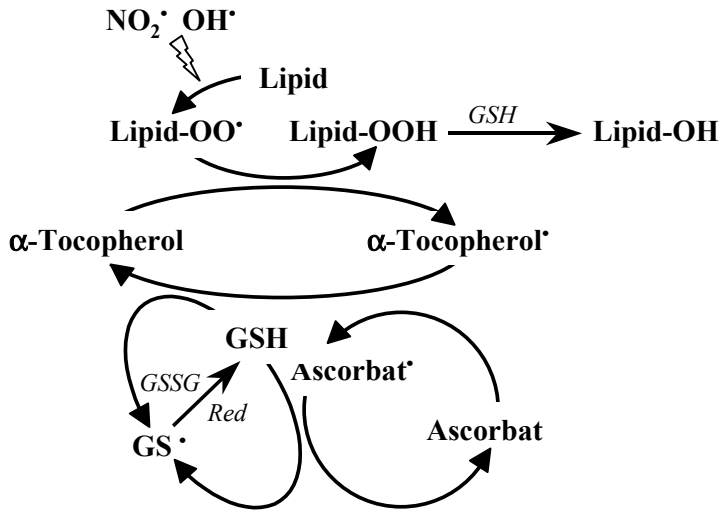
$$GSSG + Protein - SH \rightarrow GSH + Protein - SSG$$

Ein weiteres Radikal-Abwehrsystem setzt sich aus den Substanzen Glutathion (GSH), Ascorbinsäure (Vitamin C) und α-Tocopherol (Vitamin E) zusammen. Das lipidlösliche α-Tocopherol ist in den Membranen lokalisiert, wo es Radikalkettenreaktionen unterbricht und dadurch die Lipidperoxidation verhindert. Diese Reaktion führt zu der Entstehung des Tocopherylradikals, das durch Ascorbat und GSH wieder in seine ursprüngliche Form überführt wird.

Das wasserlösliche Ascorbat kommtin vesikulären Kompartimenten monoaminerger Neurone in hohen Konzentrationen vor. Neben der Reduktion des α-Tocopherols reagiert es auch direkt mit freien Radikalen unter Bildung von Dehydroascorbat. Dieses wird durch GSH-abhängige Reaktionen wieder in Ascorbat überführt (Abb. 1.9).

GSH ist ebenfalls ein ausgezeichneter Radikalfänger und ist neben der Regeneration von Ascorbat und α-Tocopherol an der Reduktion von Chinonen und SH-abhängigen Enzymen beteiligt. Selbst wird es über die GSSG-Reduktase wieder in den aktiven Zustand versetzt [Cadet und Brannock, 1998].

Abb. 1.9: Endogene Radikal-Abwehrsysteme



Die drei Substanzen Glutathion, Ascorbat und α-Tocopherol bilden ein effektives Abfangsystem gegen Radikale.
DA: Dopamin *GSH: Glutathion*
·: Radikal *GSSG Red: oxidiertes Glutathion*

Befunde von Veränderungen in den endogenen Abwehrsystemen im Parkinson-Gehirn lieferten weitere Hinweise für die Beteiligung von oxidativem Stress an der Pathogenese der Erkrankung. Die erhöhte Aktivität der mitochondrialen SOD in der SNc von Parkinson-Patienten [Piorier et al., 1994] lässt einen Schutzmechanismus gegen die exzessiv anfallenden Radikale vermuten. Ein weiterer Hinweis ist die bevorzugte Erhöhung der SOD mRNA in melanisierten Neuronen, die als erste von der Degeneration betroffen sind [Ceballos et al., 1990].

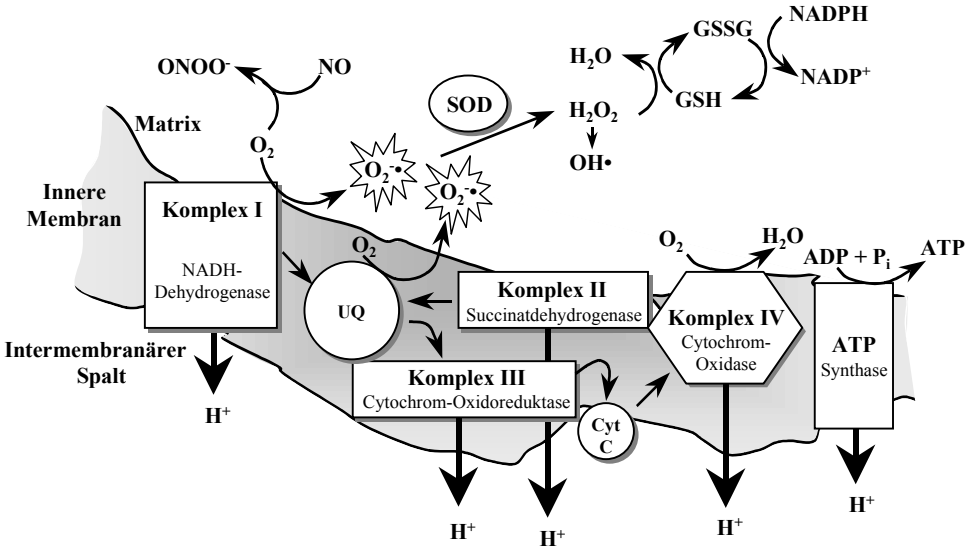
Die Aktivität der Glutathion-Peroxidase und der Katalase nimmt auch im normalen Alterungsprozess ab und ist im Vergleich dazu beim gleichaltrigen Parkinson-Patienten nicht verändert [Hirsch, 1992].

Die Glutathionspiegel dagegen sind beim Morbus Parkinson deutlich erniedrigt [Sian et al., 1994], es findet sich allerdings kein Anstieg der oxidierten Form [Sofic et al., 1992]. Dieses Bild ist typisch für den Morbus Parkinson und betrifft sowohl die Spiegel an Gesamt-Glutathion als auch an reduziertem Glutathion mit folgenschweren Konsequenzen für die Clearance der steigenden Mengen an H_2O_2. Man nimmt an, dass der Glutathion-Verlust dem oxidativen Stress vorausgeht und die Zellen gegen die steigenden Mengen an freien Radikalen sensibilisiert.

1.3.2 Mitochondriale Defekte

Die Mitochondrien sind die Energiekraftwerke der Zelle. Die fünf Proteinkomplexe der oxidativen Phosphorylierung sind an der inneren Membran lokalisiert: Komplex I (NADH-Dehydrogenase), Komplex II (Succinatdehydrogenase), Komplex III (Cytochrom C-Oxidoreduktase), Komplex IV (Cytochrom C-Oxidase) und Komplex V (ATP-Synthase).

Abb. 1.10: Mitochondriale Atmungskette



Mechanismen der Radikalentstehung während der oxidativen Phosphorylierung (modifiziert nach Murphy et al., 1999).

DA: Dopamin *GSH: Glutathion*
UQ: Ubichinon *GSSG: oxidiertes Glutathion*
Cyt C: Cytochrom C *SOD: Superoxiddismutase*
NADP/NADPH: Nicotinsäureamid-Adenindinucleotidphosphat

Während der oxidativen Phosphorylierung wird ATP durch die Reduktion von Sauerstoff zu Wasser erzeugt. Als Zwischenstufen entstehen grosse Mengen freier Radikale, deren Bildung bei Störungen in der Elektronentransportkette stark gesteigert werden kann [Nohl et al., 1978].

$$O_2 \overset{+e^-}{\rightarrow} O_2^{\cdot -} \underset{+2H^+}{\overset{+e^-}{\rightarrow}} H_2O_2 \overset{-e^-}{\rightarrow} OH^{\cdot} + OH^- \underset{+2H^+}{\overset{+e^-}{\rightarrow}} 2\ H_2O$$

Gleichzeitig ist die Elektronentransportkette aber auch empfindlich gegen die eigens erzeugten, freien Radikale. Sie bedingen oxidative Schäden der mitochondrialen DNA und Funktionsstörungen der Komplexe I, II und IV [Wallace, 1992]. Diese Störungen beruhen auf veränderten Protein- und Lipidfunktionen, von denen die membrangebundenen Komplexe abhängig sind [Fry und Green, 1981]. So kommt es wieder zur Bildung freier Radikale und es entsteht ein Circulus vitiosus, den die Zelle nicht mehr durchbrechen kann.

Das "Parkinson-Gehirn" zeigt eine deutliche mitochondriale Dysfunktion, die auf einen Aktivitätsverlust des Komplex I der Atmungskette zurückzuführen ist [Schapira et al., 1989]. Die Entstehung der freien Radikale wird mit dem Abbau der Komplex-Untereinheiten in Verbindung gebracht [Irwin et al., 1994].

Allerdings ist der progressive Aktivitätsverlust der mitochondrialen Elektronentransportkette ebenfalls eine Erscheinung des normalen Alterungsprozesses [Di Monte, 1991]. Im Zusammenspiel mit anderen Faktoren könnte er jedoch eine Erklärung für den späten Eintritt sowie die starke Progression der neurodegenerativen Erkrankungen bieten [Beal et al., 1993].

1.3.3 Inflammatorische Prozesse

Das Gehirn wurde lange Zeit aufgrund der Bluthirnschranke und der ungewöhnlichen Toleranz gegen transplantiertes Gewebe als immunologisch privilegiert betrachtet [McGeer und McGeer, 1998]. Mittlerweile weiss man jedoch, dass das Gehirn ein eigenes Immunsystem besitzt, welches sich unter Umständen auch gegen das gesunde Gewebe richten kann. Da abgestorbene Neurone im Gegensatz zu anderen Körperzellen jedoch nicht mehr ersetzt werden können, ist das Gehirn eher als immunologisch benachteiligt anzusehen. Dementsprechend zeigen neuere immunohistochemische und molekularbiologische Forschungen, dass die chronische Inflammation eine wichtige Rolle im progressiven Zelltod übernimmt [McGeer und McGeer, 1997; McGeer et al., 2001].

Die immunologisch kompetenten Zellen des ZNS sind die Gliazellen, insbesondere Mikroglia und Astrozyten. Sie produzieren die inflammatorischen Mediatoren (Zytokine), die nach einer Schädigung des Hirngewebes (z.B. durch exzitotoxische Reize) freigesetzt werden. Zu diesen Substanzen zählen die Interleukine (IL), Tumor-Nekrose-Faktoren (TNF) und Interferone (IFN).

Der wichtigste Vertreter der Interleukine ist das IL-1. Es erhöht die NO-Synthase-Aktivität und fördert so die Entstehung von NO und folglich von Peroxynitrit [Chao et al., 1996].

Der TNF-α verhindert die Aufnahme von Glutamat durch die Astrozyten. Da diese wesentlich an der Regulation der extrazellulären Glutamat-Spiegel beteiligt sind, trägt TNF-α somit entscheidend zur exzitotoxischen Zellschädigung bei [Fine et al., 1996].

Erhöhte Cytokinspiegel sind eine regelmässige Beobachtung in chronisch-neurologischen Erkrankungen wie dem Morbus Alzheimer und dem Morbus Parkinson. McGeer und Mitarbeiter zeigten erhöhte Werte reaktiver Mikroglia und hohe Spiegel inflammatorischer Proteine im geschädigten Gewebe von Parkinson-Gehirnen [McGeer et al., 1987/1988]. Deutlich erhöhte Spiegel von TNF-α in Striatum und Cerebrospinalflüssigkeit [Mogi et al., 1994*b*] sowie TNF-α-immunreaktive Mikroglia in der Substantia nigra belegen diese Befunde. Desweiteren wurden erhöhte IL-1β-, IL-2- und IL-4-Werte bei juvenilen Parkinson-Patienten [Mogi et al., 1996] und erhöhte IL-1- und IL-6-Spiegel in der Cerebrospinalflüssigkeit nachgewiesen, während neurologisch gesunde Kontrollen diese Effekte nicht zeigten [Mogi et al., 1994*a*].

1.3.4 Nekrose und Apoptose

Neuere Erkenntnisse weisen darauf hin, dass eher apoptotische als nekrotische Prozesse für den Zelltod in neurodegenerativen Erkrankungen von Bedeutung sind [Tatton et al., 1998].

Apoptose und Nekrose unterscheiden sich in einigen Aspekten: Die Nekrose ist ein schneller Prozess, der passiv, das heisst ohne Teilnahme der Zelle, abläuft. Dagegen ist die Apoptose ein genetisch kontrolliertes Zelltodprogramm, das durch verschiedene Stimuli ausgelöst werden kann [Searle et al., 1982]. Als potente Trigger der neuronalen Apoptose werden z.B. Komplex I-Inhibition [Hartley et al., 1994], Dopamin im Zusammenhang mit oxidativem Stress [Ziv et al., 1994], Glutamat [Kure et al., 1991], Calcium [Orrenius und Nicotera, 1994] und inflammatorische Mediatoren [Mogi und Nagatsu, 1996] diskutiert, von denen etliche auch in die Pathogenese des Morbus Parkinson impliziert sind.

Die abnehmende Komplex I-Aktivität in den Mitochondrien der SNc scheint das Gewebe gegen apoptotische Prozesse verletzlich zu machen [Tatton und Chalmers-Redman, 1998]. Dabei ist die Abnahme des mitochondrialen Membranpotentials die kritische Kraft, die durch die Wirkung der gleichzeitig entstehenden Hydroxylradikale noch potenziert wird [Zamzami et al., 1996; Scorrano et al., 1997].

Tatsächlich wurden Hinweise auf apoptotische Mechanismen beim Zelltod in der SNc von Parkinson-Patienten gefunden [Anglade et al., 1997]. Ein Defekt im Apoptosekontrollsystem als Ursache des Morbus Parkinson ist jedoch unwahrscheinlich, da ein solcher Defekt wesentlich mehr systemische und weitreichendere Schäden auslösen müsste. Dennoch bieten die nigralen Neurone eine derart apoptose-begünstigende Umgebung, dass ein schwacher Defekt im Apoptosekontrollapparat die selektive Degeneration dieser Neurone verursachen könnte [Ziv und Melamed, 1998].

1.3.5 Exzitotoxizität

In den letzten Jahren stieg die Erkenntnis um die Bedeutung der exzitatorischen Aminosäure Glutamat in der Pathophysiologie des Morbus Parkinson. Neben seiner Rolle als wichtiger Neurotransmitter im Bereich der Basalganglien ist Glutamat mit neurotoxischen Eigenschaften behaftet, die über seine Rezeptoren vermittelt werden. Die Glutamat-Rezeptoren sind über das gesamte ZNS verteilt und werden in die Ionenkanalrezeptoren NMDA (N-Methyl-D-aspartat), AMPA (α-Amino-3-hydroxy-5-methylisazolpropionsäure) und KA (Kainsäure) sowie die Protein G-gekoppelten, metabotropen Rezeptoren unterteilt [Greenamyre und Porter, 1994].

1.3.5.1 Direkte Exzitotoxizität und Calciumhomöostase

Die NMDA-Rezeptoren sind die im Striatum am stärksten vertretenen Glutamat-Rezeptoren, deren übermässige Aktivierung zu einem massiven Calcium-Einstrom in die Zelle führt. Die dadurch hervorgerufene Aktivierung Calcium-abhängiger Enzyme wie der Proteinkinase C, der Phospholipasen A_2 und C, der calmodulinabhängigen Proteinkinase II, der Stickstoffoxidsynthase und weiteren Proteasen und Nukleasen führt zum Abbau von Proteinen, Phospholipiden und Nukleinsäuren sowie zur Bildung von NO [Coyle und Puttfarken, 1993; Meldrum und Garthwaite, 1990]. Eine Überaktivierung dieser Rezeptoren bedeutet neuronale Schädigung bis hin zum Zelltod.

Der exzitotoxische Zelltod ist hauptsächlich nekrotisch vermittelt, wobei der Calcium-Einstrom aber auch apoptotische Prozesse triggern kann [Orrenius und Nicotera, 1994]. Das bevorzugte Ziel scheinen die Mitochondrien zu sein, denn sie regulieren durch Aufnahme von Calcium dessen zytoplasmatische Spiegel. Dieser Prozess ist zunächst reversibel, geht aber nach dauerhafter Rezeptorstimulation und dadurch ständig erhöhten Calcium-Werten in einen irreversiblen Vorgang über, wodurch eine permanente Beeinträchtigung der mitochondrialen Funktion entsteht [DeLong, 1990].

Diese Art des neurotoxischen Prozesses bezeichnet man auch als direkte Exzitotoxizität. Sie wird durch starke Anstiege der Glutamat-Spiegel mit dadurch bedingter Stimulation von NMDA-Rezeptoren ausgelöst.

1.3.5.2 Indirekte Exzitotoxizität

Unter bestimmten Umständen kann die Glutamat-Toxizität allerdings auch indirekt ausgelöst werden.

Extrazelluläres Magnesium bewirkt eine spannungsabhängige Blockade des NMDA-Rezeptor-Ionenkanals und verhindert unter physiologischen Glutamat-Konzentrationen den Calcium-Einstrom. Ist ein Neuron depolarisiert, wird die Magnesium-abhängige Sperre aufgehoben und die Bindung von Glutamat bewirkt einen starken Calcium-Einstrom mit den oben beschriebenen Folgen. Die Aufrechterhaltung der Membranpolarität bedarf jedoch der kontinuierlichen Energiebereitstellung. Ist die Zelle durch ein bioenergetisches Defizit, etwa durch eine gestörte Mitochondrienfunktion dauerhaft depolarisiert, können auch nicht-toxische Glutamat-Spiegel für die Zelle tödlich sein [Novelli et al., 1988].

Dies führte zu der Formulierung der indirekten Exzitotoxizitätshypothese [Albin und Greenamyre, 1992], die durchaus in der Pathogenese des Morbus Parkinson eine wichtige Rolle spielen kann, da mitochondriale Störungen in der SNc bereits nachgewiesen wurden.

1.3.6 Genetische Faktoren

In den vergangenen Jahren wurde immer wieder nach genetischen Markern des Morbus Parkinson gesucht. Obwohl die Erkrankung in den meisten Fällen sporadisch auftritt, konnten verschiedene Genmutationen identifiziert werden.

Das α-Synuclein-Protein wird normalerweise in allen Hirnregionen gebildet und trägt zur Ausbildung der neuronalen Plastizität bei [Nussbaum und Polymeropoulos, 1997]. Unter bestimmten Umständen kommt es zu einer Aggregation dieses Moleküls [Goedert et al., 1998*a*], die eine selektive Schädigung dopaminerger Neurone mit dem Auftreten von Lewy-bodies bewirkt [Golbe et al., 1990]. Da α-Synuclein sowohl in der sporadisch auftretenden als auch der erblich bedingten Erkrankung als Hauptbestandteil der Lewy-bodies auftritt, war die Identifizierung dieses Gens ein grosser Erfolg in Bezug auf die genetischen Mechanismen in der Pathogenese des Morbus Parkinson [Spillantini et al., 1997].

Ein weiteres Gen, das ebenfalls das Parkinson-Syndrom auslösen kann, ist das Parkin. In diesem Fall führen die Veränderungen allerdings nicht zur Ausbildung von Lewy-bodies. Parkin ist ein Protein, das sowohl im Zytosol als auch membranassoziiert vorkommt und als Ligase am Abbau von synaptischen Proteinen beteiligt ist [Zhang et al., 2000]. Durch Funktionsstörungen des Enzyms fallen zwar Substrate an, die aufgrund ihrer Struktur jedoch nicht in den Lewy-bodies akkumulieren [Kahle et al., 2000]. Die Bedeutung dieser Befunde wird durch Mutationen im UCH L1 -Gen (Ubiquitin Carboxy-Terminal Hydrolase L1), die ebenfalls zu einem Funktionsverlust des Proteinabbaus führen, unterstrichen [Leroy et al., 1998].

Weiterführende Untersuchungen müssen zeigen, ob diese oder andere Mutationen auch für einen grösseren Teil der Parkinson-Erkrankungen Bedeutung haben.

1.3.7 Umweltfaktoren

Epidemiologische Daten und die geographische Abhängigkeit der Prävalenz sowie die Parallelen zu dem MPTP-induzierten Parkinson-Syndrom lassen eine Beteiligung von Umweltfaktoren an der Auslösung des Morbus Parkinson vermuten [Tanner et al., 1999]. Theoretisch kann die Exposition mit niedrigen Dosen MPTP-ähnlicher Substanzen (diskutiert werden vor allem Insektizide) über Jahre hinweg die Degeneration der Neurone einleiten. Einige der bereits in experimentellen Modellen verwendeten Substanzen - wie z.B. Rotenon - wurden tatsächlich aufgrund ihrer inhibitorischen Eigenschaften auf die Zellatmung ursprünglich als Insektizide entwickelt.

Post-mortem Untersuchungen an humanen Parkinson-Gehirnen lieferten jedoch keine Anzeichen für die Akkumulation derartiger Stoffe [Ikeda et al., 1992; Goodwin und Kite, 1998].

1.4 Therapie des Morbus Parkinson

Da die Ursachen des Morbus Parkinson noch nicht bekannt sind und es sich ausserdem um einen chronisch progredienten Prozess handelt, kann die Therapie bis heute nur symptomatisch erfolgen. Um für den Patienten dennoch ein optimales Ergebnis zu erzielen, setzt sich die Behandlung oft aus mehreren Komponenten zusammen und sollte von psychosozialer und physiotherapeutischer Betreuung begleitet sein.

In den letzten Jahren ist das Interesse an kausalen Behandlungsmöglichkeiten stetig gewachsen. In diesem Zusammenhang sucht man nach pharmakologischen bzw. operativen Methoden, die in die Pathologie der Erkrankung eingreifen und dadurch die Progression des neurodegenerativen Prozesses verlangsamen oder stoppen können [Jankovic, 1999]. Experimentelle Untersuchungen der bereits klinisch eingesetzten Arzneistoffe lassen bei einigen dieser Substanzen tatsächlich neuroprotektive Eigenschaften vermuten.

1.4.1 Grundzüge der Pharmakotherapie

Ansatzpunkt der palliativen Behandlung des Morbus Parkinson ist die Substitution des striatalen Dopamin-Defizits, das durch die neurodegenerativen Prozesse präsynaptisch entsteht. Dafür ist entscheidend, dass Dichte und Sensibilität der Dopaminrezeptoren postsynaptisch zunächst erhalten bleiben. Erst mit transsynaptischer Degeneration kommt es auch zu postsynaptischen Veränderungen, die dann als Wirkungsfluktuationen in der Pharmakotherapie zeigen.

1.4.1.1 *L*-DOPA (*L*-Dihydroxyphenylalanin, Levodopa)

Für moderate und fortgeschrittene Stadien des Morbus Parkinson ist und bleibt die Gabe von *L*-DOPA mit den günstigen Effekten auf die Kardinalsymptome Rigor, Tremor und Akinese der Goldstandard der Pharmakotherapie [Jenner und Brin, 1998].

L-DOPA ist eine Aminosäure und wird im Gegensatz zu Dopamin mittels aktiver Carriersysteme über die Bluthirnschranke in das ZNS transportiert. In dopaminergen Neuronen wird es durch die DOPA-Decarboxylase enzymatisch zu Dopamin umgewandelt und kann so dem entstandenen Mangel entgegenwirken. Um periphere Effekte zu vermeiden und eine effiziente Aufnahme von *L*-DOPA in das Gehirn zu gewährleisten, wird es gewöhnlicherweise in Kombination mit Decarboxylasehemmern (z.B. Benserazid oder Carbidopa) verabreicht. Diese Stoffe sind nicht zentralgängig und verhindern den Abbau in der Peripherie.

Bedauerlicherweise stellt die Substanz *L*-DOPA aus unterschiedlichen Gründen keine ideale Behandlungsmöglichkeit dar:

Die Substanz besitzt nur eine kurze Halbwertszeit im Körper, so dass eine mehrmalige Einnahme am Tag erforderlich ist. Dies kann leicht zu Problemen mit der Patienten-Compliance führen.

Von grossem Nachteil ist ausserdem die fehlende Spezifität zum nigrostriatalen System, d.h. *L*-DOPA verteilt sich nach der Applikation diffus über das gesamte ZNS. Dies könnte die Ursache für weitere Nebenwirkungen wie kognitive Veränderungen und Verhaltenseffekte sein [Javoy-Agid und Agid, 1980]. Desweiteren können durch *L*-DOPA psychotische Komplikationen wie Halluzinationen oder Psychosen ausgelöst werden.

Bei der Langzeittherapie treten Wirkungsfluktuationen (On-Off-Phänomene) und Dyskinesien auf, die man in Peak-of-dose-Dyskinesien (unfreiwillige Bewegungen bei maximalen Wirkspiegeln) und End-of-dose-Akinesien (Bewegungsarmut bei Absinken des Plasmaspiegels) unterscheidet. Sie sind wahrscheinlich auf Veränderungen der Pharmakodynamik und -kinetik von *L*-Dopa zurückzuführen [Nutt und Holford, 1996]. Ab einer Therapiedauer von etwa 5 Jahren läßt die Wirksamkeit von *L*-DOPA drastisch nach. Circa 75% der Patienten zeigen dann keine gleichmässige und effektive Antwort mehr auf das Medikament [Fahn, 1999]. Diese Komplikationen gaben Anlass zu der Diskussion, die *L*-DOPA-Therapie soweit hinauszuschieben, bis die Symptome mit anderen Arzneistoffen nicht mehr beherrschbar sind. Durch dieses Konzept soll sowohl der Zeitpunkt des Wirkungsverlustes als auch das Auftreten schwerer Nebenwirkungen aufgeschoben werden.

Gleichzeitig steht *L*-DOPA unter Verdacht die nigrale Zelldegeneration durch Bildung freier Hydroxylradikale zu beschleunigen. Durch seine strukturelle Ähnlichkeit zu Dopamin folgt es den gleichen Abbauwegen und führt so über den MAO-B-abhängigen Metabolismus zu der Bildung freier Radikale [Blin et al., 1988]. Zusätzlich wurde in Tiermodelle eine reversible Hemmung des mitochondrialen Komplex I in SNc und Striatum nachgewiesen, die ebenfalls die Entstehung freier Radikale provoziert [Sian et al., 1999]. Obwohl viele *in-vitro* Studien die Toxizität von *L*-DOPA bereits belegen [Cheng et al., 1996; Ziv et al., 1997], muss man einige Schwachstellen dieser Untersuchungen bemängeln: Zum einen ist die gewählte *L*-DOPA-Konzentration nicht mit therapeutischen Dosierungen vergleichbar und zum anderen weisen Zellkulturen nur einen sehr geringen Anteil an Astrozyten auf, die *L*-DOPA und auch Dopamin aufnehmen und metabolisieren [Pelton et al., 1981]. So entsteht über den MAO-B-vermittelten Abbau zwar tatsächlich H_2O_2, das aber durch die hohen Konzentrationen an Katalase und Glutathion-Peroxidase ausreichend abgefangen werden kann.

Ausserdem liefern Studien an gesunden Tieren, die mit *L*-DOPA behandelt wurden, keine Anhaltspunkte für degenerative Veränderungen in der Substantia nigra [Quinn et al., 1986; Rajput et al., 1997]. Auch die Vermutung, dass im gesunden Gewebe eine ausreichende, antioxidative Abwehr die neurodegenerativen Effekte von *L*-DOPA verhindern könnte, konnte in post-mortem Untersuchungen widerlegt werden. Sie zeigen weder eine erhöhte Zelltodrate noch eine stärkere Melanisierung der Neurone bei den *L*-DOPA-behandelten Tieren im Vergleich zu den nicht behandelten Tieren [Yahr, 1972]. Bezüglich der Freisetzung von Hydroxylradikalen liefern die Studien an Nagetieren allerdings widersprüchliche Ergebnisse [Smith et al., 1994; Xia et al., 2001; Camp et al., 2000]. Stattdessen deutet sich in einer weiteren Studie eine Senkung der Mortalität sowie eine Erhöhung der Lebenserwartung bei den *L*-DOPA-behandelten Parkinson-Patienten an [Scigliano et al., 1990].

Zusammenfassend betrachtet überwiegt die gute Wirksamkeit von *L*-DOPA letztlich die Nachteile. Die Substanz ist in der Therapie des Morbus Parkinson bis heute unersetzlich; lediglich der Beginn der Behandlung kann durch Gabe anderer Substanzen bis zu einem gewissen Grad hinausgezögert werden [Jenner, 1998]. Entwicklungen schnell löslicher Prodrugs und neuer Formulierungen können die regelmässige Einnahme des Medikaments in Zukunft eventuell vereinfachen [Goetz, 1997].

1.4.1.2 Dopamin-Agonisten

Eine Substanzgruppe, die als frühe Form der dopaminergen Therapie von Pharmakologen empfohlen wird, sind die Dopamin-Agonisten [Jankovic, 1999]. Als Monotherapeutika zeigen sie jedoch nur moderate Verbesserungen der Kardinalsymptome.

Ihre Wirkung beruht auf der direkten Aktivierung von D_2-Rezeptoren [Jemmer und Tulloch, 1997]. Über eine negative Rückkopplung senken sie so Synthese, Freisetzung und Umsatz von Dopamin, sowie den dadurch erzeugten oxidativen Stress [Zou et al., 1999]. Gleichzeitig erhöhen sie die Präsenz des radikalabbauenden Enzyms Superoxiddismutase in den Zellen [Sawada et al., 1998]. Ihr positiver Einfluss auf Grösse und Überlebensrate der dopaminergen Neurone *in-vitro* unterstützt die neuroprotektive Hypothese [Zou et al., 1999].

Dopamin-Agonisten wirken in der Regel länger als *L*-DOPA und zeigen weit weniger dosisabhängige Schwankungen in den motorischen Funktionen. Und obwohl diese Stoffe eine Reihe weiterer Vorteile gegenüber *L*-DOPA aufweisen, können sie dieses nicht ersetzen. Die frühzeitige Gabe der Dopamin-Agonisten kann aber die Probleme einer *L*-DOPA-Langzeittherapie sowie das

Auftreten von Dyskinesien verzögern. Sind allerdings durch die Gabe von *L*-DOPA bereits Dyskinesien aufgetreten, bleiben diese auch nach dem Wechsel auf Dopamin-Agonisten bestehen [Blanchet et al., 1993]. Dieser Effekt wird als "priming" bezeichnet und kann durch die Monotherapie mit Dopamin-Agonisten im Frühstadium der Erkrankung vermieden werden. Diese Behandlung sollte solange beibehalten werden, bis kein ausreichender therapeutischer Effekt mehr erzielt werden kann [Jenner, 2002].

Der älteste Dopamin-Agonist ist das Apomorphin (D_1/D_2), das durch seine Wasserlöslichkeit für die intravenöse, subkutane, intranasale oder sublinguale Applikation geeignet ist [Ondo et al., 1999]. Die Substanz ermöglicht in einigen Fällen eine Unterbrechung der *L*-DOPA-Therapie, zumindest jedoch die Reduktion der Dosis. Die Abschwächung der Dyskinesien wird vor allem auf die D_1-agonistische Komponente zurückgeführt [Shiosaki et al., 1996]. Allerdings kann Apomorphin aufgrund seiner stark emetischen Wirkung nur in Kombination mit dem peripheren Dopamin-Antagonisten Domperidon verabreicht werden.

Durch strukturelle Modifikationen konnten selektive Dopamin-Rezeptoragonisten erzeugt werden, die im Gegensatz zu *L*-DOPA nur auf einen oder wenige Subtypen der Dopamin-Rezeptoren wirken. Man unterteilt diese Substanzen in die Gruppe der Ergolinderivate und Stoffe nicht-ergoliner Struktur.

Ergolinderivate

Bromocriptin, Lisurid, Pergolid sowie das langwirksame Cabergolin sind D_2-Agonisten mit schwachen antagonistischen Wirkungen auf D_1-Rezeptoren. Letztere Wirkung erfordert die Gegenwart endogenen Dopamins für eine ausreichende Wirksamkeit der Arzneistoffe. Die neueren Substanzen ohne D_1-antagonistische Komponente sind dagegen vom Degenerationszustand der präsynaptischen Neurone unabhängig. Sie behalten ihre Wirksamkeit auch im fortgeschrittenen Krankheitsstadium bei.

Stoffe nicht-ergoliner Struktur

Zu dieser Gruppe gehören die Substanzen Ropinirol und Pramipexol. Während Ropinirol ein reiner D_2-Agonist ist [Tulloch, 1997], zeichnet sich Pramipexol durch eine D_2-Selektivität mit bevorzugter Affinität zu D_3-Rezeptoren aus. Diese Substanzen haben sich als effektive Monotherapeutika im Frühstadium der Erkrankung und leichten bis mittleren Parkinson erwiesen [Shannon et al., 1997].

Pramipexol bewirkt eine Abschwächung der Wirkfluktuationen und senkt die erforderliche *L*-DOPA-Dosis um bis zu 25% der täglichen Gabe. Neben den positiven Wirkungen auf die motorischen Symptome weist es ausserdem radikalfangende Eigenschaften auf [Cassarino et al., 1998; Ferger et al., 2000a; Zou et al., 1999]. Eine mögliche neuroprotektive Wirkung wird noch untersucht [Schapira, 2002].

1.4.1.3 MAO-B- und COMT-Hemmer

Die Entdeckung, dass die Parkinson-Symptomatik durch Erhöhung des striatalen Dopaminspiegels rückgängig gemacht werden kann, führte zu einer weiteren therapeutischen Strategie: Auch über die Hemmung der beiden Dopamin-abbauenden Enzyme kann dessen Konzentration im synaptischen Spalt erhöht werden.

MAO-B-Hemmstoffe

Die Monotherapie mit dem selektiven und irreversiblen MAO-B-Hemmstoff Selegilin bewirkt nur moderate symptomatische Verbesserungen [Elizan et al., 1989]. Selegilin führt durch die Hemmung des Dopamin-Metabolismus zu einer erhöhten Präsenz des Neurotransmitters in den Nervenendigungen [Gerlach et al., 1996]. Dadurch steigt die striatale Aktivität und endogenes Dopamin wird eingespart. Aufgrund seiner schwachen Wirksamkeit wird es häufig in Kombination mit *L*-DOPA eingesetzt. Obwohl Selegilin die Wirkung von *L*-DOPA potenziert und so eine deutliche Dosisreduktion ermöglicht, kann dieser Stoff jedoch die Entstehung der *L*-DOPA-induzierten Motorfluktuationen und Dyskinesien nicht verhindern.

Mittlerweile werden aber auch neuroprotektive Eigenschaften von Selegilin diskutiert. Im Tiermodell wurde eine Herabregulation der Tyrosinhydroxylase gefunden [Themann et al., 2002; Haavik et al., 1997], deren Aktivität die Entstehung freier Radikale bewirkt [Adams et al., 1997]. Als weitere Mechanismen werden die Erhöhung des neurotrophen Faktors GDNF (Glia-abgeleiteter neurotropher Faktor), der besonders für das dopaminerge System von Bedeutung ist [Lin et al., 1993], dem Regulatorprotein des Apoptosewegs Bcl-2 [Tatton und Kish, 1997] sowie der Konzentrationen von Superoxiddismutase, Katalase und Glutathion [Jenner und Olanow, 1996] diskutiert. Eine direkte radikalfangende Eigenschaft konnte *in-vivo* jedoch nicht nachgewiesen werden [Ferger et al., 1998*a*].

Die reversiblen MAO-B-Inhibitoren Lazabemid und Rasagilin zeigen ähnliche Aktionsmuster wie Selegilin, müssen sich im klinischen Vergleich aber erst noch durchsetzen [Kupsch et al., 2001].

COMT-Hemmer

Die zweite Möglichkeit den Dopamin-Abbau effizient zu senken, ist die Gabe von COMT-Inhibitoren. Die extraneuronal vorkommende COMT ist erheblich am Abbau von Dopamin, aber auch von *L*-DOPA beteiligt und findet sich sowohl peripher als auch zentral im Körper. COMT-Inhibitoren wie Tolcapon, die sowohl zentral als auch peripher wirken, unterscheiden sich in ihrer Wirksamkeit nicht von der Substanz Entacapon, die ausschliesslich die periphere COMT hemmt [Kurth und Adler, 1999].

Diese Substanzen erhöhen die *L*-DOPA-Konzentration im Blut, was sich positiv auf das verfügbare Dopamin im Gehirn auswirkt. Dabei werden weder die maximale Konzentration noch die Zeit bis zum Erreichen dieser Konzentration verändert [Sian et al., 1999].

Allerdings ist die Therapie mit COMT-Hemmern mit zusätzlichen Risiken verbunden, die unter Umständen zu einer Progression der Erkrankung beitragen können. Eine Hemmung dieses Dopamin-abbauenden Enzyms bewirkt eine Verlagerung des Metabolismus zur Autoxidation und dem Katabolismus via MAO-B. Dadurch besteht vor allem bei zentral-wirksamen Substanzen die Gefahr einer erhöhten Radikalbildung, die im Tierversuch bereits belegt werden konnte [Gerlach et al., 2001].

Aufgrund schwerer Hepatitiden mit Todesfolge bei einigen Patienten [Assal et al., 1998] musste Tolcapon letztendlich aus dem Handel zurückgerufen werden. Die Zulassung ruht zur Zeit.

1.4.1.4 NMDA-Antagonisten

Glutamat-Antagonisten greifen an zwei Stellen in den Krankheitsprozess ein: Zum einen können sie durch Hemmung der glutamatergen Neurotransmission zu symptomatischen Verbesserungen führen und zum anderen durch die Reduktion des exzitotoxischen Potentials neuroprotektive Effekte erzielen [Blandini und Greenamyre, 1998].

Die systemische Applikation von Glutamat-Antagonisten auch in Kombination mit *L*-DOPA zeigt sich im Tiermodell effektiv [Turski et al., 1991]: Sie können die Wirkung von *L*-DOPA verstärken und so die Parkinson-Symptomatik deutlich verbessern [Klockgether et al., 1991; Löschmann et al., 1991]. Desweiteren können die *L*-DOPA-induzierten Motorfluktuationen im Tiermodell durch systemische Gabe eines Glutamat-Antagonisten rückgängig gemacht werden [Vila et al., 1996].

Den bereits erfolgreich in der klinischen Parkinson-Therapie eingesetzten Arzneistoffen Amantadin und Memantin konnte nachträglich eine NMDA-Rezeptor-antagonistische Wirkkomponente zugeordnet werden [Kornhuber et al., 1989].

Interessanterweise zeigt auch eine Läsion des Nucleus subthalamicus, die den moderaten Einfluss glutamaterger Projektionen zur SNc unterbindet, neuroprotektive Eigenschaften gegen 6-OHDA-induzierte nigrostriatale Schäden [Piallat et al., 1996]. Diese Ergebnisse geben Anlass zu der Vermutung, dass eine gesenkte glutamaterge Neurotransmission protektive Effekte gegenüber nigralen Neuronen und somit eine Verzögerung des progressiven Krankheitsverlaufes haben könnte.

1.4.1.5 Anticholinergika

Die Anticholinergika verkörpern die älteste Form der Parkinson-Therapie und sollen die gestörte Balance zwischen striatalem Acetylcholin und Dopamin auf einem neuen Niveau wieder herstellen.

Ihre Wirksamkeit ist jedoch hauptsächlich auf den Tremor beschränkt und es besteht eine strikte Kontraindikation bei Parkinson-Patienten mit dementiellem Syndrom. Kognitive Dysfunktion und dementielle Prozesse, wie sie in späten Krankheitsstadien durch die zunehmende Läsionen cholinerger Bahnen auftreten können, würden sich unter anticholinerger Behandlung weiter verschlechtern. Aus diesen Gründen werden Anticholinergika nur bei ungenügender Ansprechbarkeit auf *L*-DOPA oder starken vegetativen Symptomen eingesetzt. Ein Vertreter dieser Gruppe ist das Biperiden.

1.4.1.6 Radikalfänger

Da oxidativer Stress als eine der Hauptursachen des Morbus Parkinson angesehen wird, könnten Substanzen mit radikalfangenden Eigenschaften günstige Effekte in der Behandlung bringen.

Neben den Substanzen, die bereits aufgrund anderer Wirkungen für die Therapie eingesetzt werden, aber auch radikalfangende Eigenschaften haben können, werden vor allem natürliche Stoffe wie α-Tocopherol (Vitamin E) und Ascorbinsäure (Vitamin C) diskutiert. Der tatsächliche Nutzen dieser Substanzen kann aber weder in Tiermodellen noch in klinischen Studien überzeugend belegt werden (Datatop Studie [Shoulson et al., 1989/1998]).

Salicylsäure zeigt radikalfangende Eigenschaften in-vitro und auch *in-vivo* [Ferger et al., 1999*a*; Mohanakumar et al., 2000]. Sie reagiert mit freien Radikalen durch aromatische Hydroxylierung unter Entstehung von di- und trihydroxylierten Salicylsäurederivaten und ist im MPTP-Parkinson-Modell an der Maus protektiv. Auch der aus der Literatur bekannte Radikalfänger PBN (α-Phenyl-

tert.-butylnitron) zeigt eine protektive Wirkung im MPTP-Parkinson-Modell [Ferger et al., 2000*b*] und senkt die Glutamat-induzierte Radikalbildung *in-vivo* [Ferger et al., 1998*a*]. Es ist allerdings fraglich, ob entsprechend hohe Konzentrationen eines Radikalfängers im nigrostriatalen System erzeugt werden können, um eine akute Radikalproduktion entscheidend abzufangen. Eventuell könnte die Stärke der Radikalfänger aber auch in der prophylaktischen Langzeittherapie liegen.

1.4.2 Chirurgische Verfahren

Neben der medikamentösen Therapie, die den Schwerpunkt der Behandlung des Morbus Parkinson darstellt, stehen in schweren Fällen auch invasive Methoden zur Verfügung.

Allerdings ist ihr Einsatz nur bei einem Bruchteil der Patienten möglich und der Langzeiterfolg dieser Methoden noch nicht ausreichend belegt. Daher wird ihr Einsatz vorerst auf sehr schwere Fälle, bei denen pharmakotherapeutische Massnahmen keinen Erfolg mehr bringen, beschränkt bleiben.

1.4.2.1 Stereotaktische Läsion

Stereotaktische Läsionen unterbrechen präzise die Projektionen verschiedener Kerngebiete des Thalamus, des GPi oder des NST. Ihre Hauptindikation sind medikamentös nicht beherrschbarer Tremor, Dyskinesien und Wirkungsfluktuationen [Iacono et al., 1995].

Da die Symptomatik des Morbus Parkinson mit einer Überaktivität der Basalganglienausgangskerne in Verbindung gebracht wird, soll die irreversible Läsion des Globus pallidus in erster Linie die gesteigerte Aktivität des internen Segments reduzieren und darüber die Aktivität des Motorcortex erhöhen [Baron et al., 2000]. Tatsächlich zeigen sich auch im fortgeschrittenen Stadium gute Wirkungen auf Tremor, Rigor und Bradykinese [Lozano und Lang, 2001]. Die anfänglich vorherrschende Pallidotomie wurde allerdings schnell durch die wirksameren Läsionen des Nucleus subthalamicus verdrängt.

Die stereotaktischen Läsionen verstärken ausserdem die Wirkung dopaminerger Substanzen und vermindern die *L*-DOPA-induzierten Dyskinesien. Die Motorfluktuationen verbunden mit den On-Phasen sowie die Schwere und das Auftreten von Off-Perioden werden ebenfalls reduziert [Sian et al., 1999].

1.4.2.2 Tiefenhirnstimulation

Durch Implantation einer Mikroelektrode können Zielgebiete mittels Hochfrequenzstimulation ausgeschaltet werden [Benabid et al., 1991; Limousin et al., 1995]. Im Gegensatz zu den ablativen Methoden ist die Hochfrequenzstimulation ein reversibler Prozess, wodurch permanente neurologische Defizite weitestgehend vermeidbar sind.

Man vermutet eine direkte Hemmung der Subthalamicus-Neurone durch die Hochfrequenzstimulation sowie eine Erhöhung der GABA-ergen Aktivität im Globus pallidus, der direkt zu den Ausgangskernen projiziert [Blandini et al., 2000]. Dies führt zu einer Verbesserung der Symptome Akinese und Rigidität bei den Parkinson-Patienten. Als Mechanismus werden eine dauerhafte Depolarisation der Neurone, eine Unterbrechung des neuronalen Netzwerkes durch die zusätzlichen Impulse oder eine Aktivitätssteigerung der inhibitorischen Neurone vermutet.

1.4.2.3 Transplantationschirurgie

Durch die Transplantation embryonaler dopaminerger Neurone in das Striatum von Parkinson-Patienten soll ein Ausgleich des Dopamin-Mangels erreicht werden [Dunnett und Björklund, 1999].

In klinischen Studien konnte gezeigt werden, dass mesencephale dopaminerge Neurone von aborten Embryos (autologe Transplantation) im Gehirn tatsächlich diese Funktion übernehmen [Lindvall, 1997]. Da aber nur ein Bruchteil der transplantierten Neurone überlebt, wird das Gewebe von 3 - 4 Embryos für die Behandlung eines Patienten benötigt. Aus ethischen Gründen wird daher versucht, embryonale Zelllinien zu entwickeln [Napolitano, 1998] oder embryonale Stammzellen aus Schweinen (heterologe Transplantation) zu gewinnen [Deacon et al., 1997]. Allerdings spielen bei der heterologen Transplantation neben technischen Problemen ebenfalls ethische Bedenken aufgrund möglicher Einflüsse des fremden Hirngewebes auf die Persönlichkeit eine wichtige Rolle [Kupsch und Oertel, 1996].

1.4.2.4 Gentransfer

Die Strategien dieser Methode beruhen auf der Einführung neuroregenerativer Moleküle in die SNc bzw. des Dopamin-Syntheseenzyms in das Striatum [Dunnett und Björklund, 1999].

Neuroregenerative Faktoren wie z.B. GDNF können die Überlebensrate dopaminerger Neurone erhöhen [Lin et al., 1993]. Da GDNF in weiten Teilen des Gehirns gebildet wird, bietet der Transfer GDNF-produzierender Zellen eine einmalige Möglichkeit die kontinuierliche Freisetzung kleiner Mengen in einem ausgewählten Areal zu erreichen [Tseng et al., 1997]. Die Transplantationen zeigen vielversprechende Ergebnisse *in-vivo* [Tomac et al., 1995].

In einem weiteren Ansatz wurden Zellen transplantiert, die das Enzym Tyrosinhydroxylase exprimieren. Durch eine erhöhte Syntheserate von Dopamin soll die Verarmung des Striatums aufgehoben werden [Kang et al., 1998; Raymon et al., 1997]. Da funktionelle Tests jedoch keine Langzeiteffekte zeigen, bleibt der Nutzen dieser Methode fraglich [Dunnett und Björklund, 1999].

1.5 Experimentelle Parkinson-Modelle

Tiermodelle sind eine wichtige Methode, um die pathologischen Prozesse menschlicher Erkrankungen sowie neue therapeutische Strategien zu untersuchen. Obwohl keine spontane Entwicklung des Parkinson'schen Schädigungsmusters in Tieren auftritt, konnten verschiedene Modelle mit Simulation des klinischen Erscheinungsbildes entwickelt werden.

1.5.1 Transiente pharmakologische Manipulationen

Diese Modelle basieren auf den pharmakologischen Effekten von Arzneistoffen wie Reserpin oder Dopamin-Antagonisten, die eine funktionelle Störung der dopaminergen Neurotransmission auslösen.

Reserpin blockiert die Magnesium-abhängige ATPase am VMAT-2, die aktiv Protonen in die Speichervesikel pumpt, und hebt dadurch die Speicherfähigkeit für basische Catecholamine auf. Gleichzeitig senkt es durch den direkten Angriff am VMAT-2 die Aufnahme der Neurotransmitter in die Vesikel. Es kommt zu einer temporären Depletion der Catecholamine, die durch Gabe von *L*-DOPA reversibel ist.

Der Einsatz dieser Modelle für die Parkinson-Forschung ist jedoch nur begrenzt möglich, da es sich hier um akute Effekte handelt, die keine degenerativen Veränderungen an dopaminergen Nervenendigungen auslösen. Sie werden vorzugsweise zur Untersuchung therapeutischer Effekte von dopaminergen Substanzen wie z.B. *L*-DOPA eingesetzt.

1.5.2 Selektive Zerstörung nigrostriataler Neurone

Die Entdeckung chemischer Substanzen, die selektiv dopaminerge Neurone im Gehirn der Tiere zerstören, leitete eine neue Ära der Parkinson-Forschung ein. Zu dieser Gruppe gehören die Neurotoxine MPTP, 6-Hydroxydopamin und Rotenon.

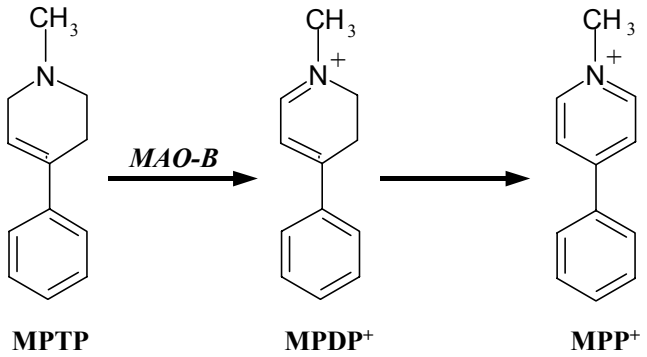
1.5.2.1 1-Methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridin (MPTP)

In den frühen 80er Jahren wurde das Neurotoxin MPTP entdeckt. Als Begleitstoff des Meperidin-Analogon 1-Methyl-4-phenyl-propionoxypiperidin (MPPP), das als synthetisches Heroin gehandelt wurde, löste MPTP nach unbeabsichtigter Selbstadministration Parkinson-Symptome in jungen Drogenabhängigen aus [Langston et al., 1983]. Diese Entdeckung ebnete den Weg für ein experimentelles Parkinson-Modell, das bis heute als das beste gilt [Beal, 2001].

Biotransformation

MPTP kann nach systemischer Applikation durch seine hohe Lipophilie schnell die Bluthirnschranke passieren und erfährt dann im Gehirn eine zweischrittige Giftung: In Astrozyten wird MPTP im ersten Metabolisierungsschritt durch die MAO-B zu dem 1-Methyl-4-phenyl-1,2-dihydroxypyridiniumion ($MPDP^+$) [Chiba et al., 1984; Markey et al., 1984] umgesetzt; im zweiten Schritt wird $MPDP^+$ dann spontan zu dem 1-Methyl-4-phenyl-pyridiniumion (MPP^+), dem toxischen Agens, oxidiert (Abb. 1.11).

Abb. 1.11: Giftung von MPTP



Die Biotransformation von MPTP beginnt mit der enzymatischen Umsetzung zu $MPDP^+$ via MAO-B. Anschliessend erfolgt die Giftung zu MPP^+ durch spontane Oxidation.

MPTP: 1- Methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridin
$MPDP^+$: 1-Methyl-4-phenyl-1,2-dihydroxypyridiniumion
MPP^+: 1-Methyl-4-phenylpyridiniumion
MAO-B: Monoaminoxidase

MPP^+ wird von den Gliazellen freigesetzt und selektiv über den Dopamintransporter in dopaminerge Neurone aufgenommen [Chiba et al., 1985; Javitch et al., 1985]. Im Tiermodell konnte gezeigt werden, dass eine verminderte Exprimierung des Dopamintransporters tatsächlich zur Resistenz gegenüber MPTP führt [Takahashi et al., 1997; Gainetdinov et al., 1997], während eine Überproduktion die Neurotoxizität der Substanz verstärkt. Da der Dopamintransporter ebenso an den Dendriten der Neurone vorkommt, kann MPTP auch die Zellkörper in der Substantia nigra angreifen.

Intrazellulär wird MPP^+ durch den VMAT-2 in die synaptosomalen Vesikel transportiert und gespeichert. Die intravesikuläre Speicherung von MPP^+ über den VMAT-2 bewirkt die Abnahme der intrazellulären Konzentration und vermindert auf diesem Weg die Toxizität [Liu et al., 1991]. Eine *in-vivo* Studie an VMAT-2-defizienten Mäusen, die eine verstärkte Sensibilität gegen MPTP zeigen, belegt diese Hypothese [Gainetdinov et al., 1998; Takahaschi et al., 1997].

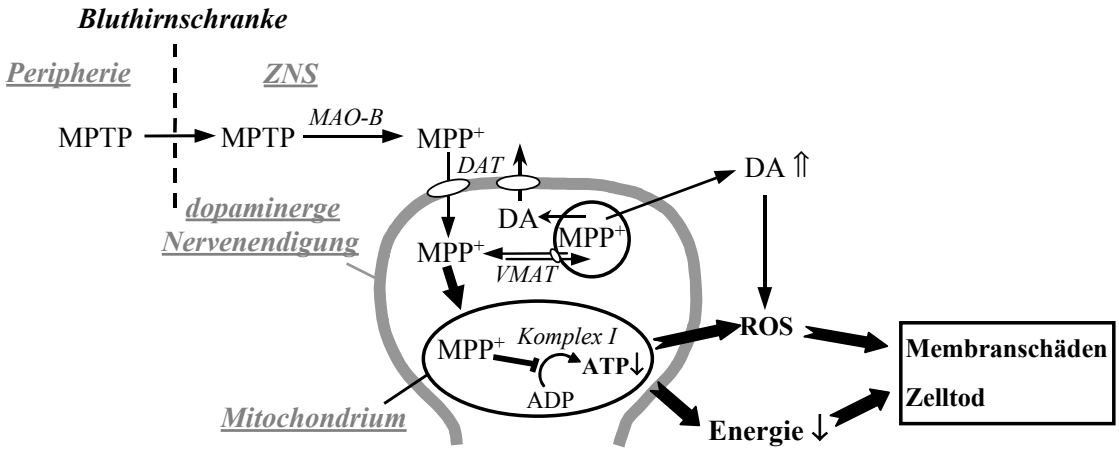
MPP^+, das nicht in die Vesikel aufgenommen werden kann, akkumuliert in den Mitochondrien [Singer et al., 1987].

Mechanismen der MPTP-Toxizität

Die Akkumulation von MPP^+ in den Mitochondrien dopaminerger Neurone führt zu einer **Beeinträchtigung der mitochondrialen Funktion**. MPP^+ bindet an den Komplex I der Atmungskette [Nicklas et al., 1985], wodurch der Elektronentransport gestoppt wird. Es tritt eine ATP-Verarmung der Zelle mit erhöhter Produktion freier Radikale auf. Zusätzlich wirkt die MPP^+-induzierte Blockade des Komplex II der Atmungskette (α-Ketoglutaratdehydrogenase des Tricarbonsäure-Zyklusses) synergistisch zum entstehenden Energieverlust [Mizuno et al., 1987]. Der Zeitverlauf des ATP-Verlustes korreliert dabei mit dem Anstieg der MPP^+-Spiegel [Chan et al., 1991/1992].

Die Störungen in der Energieversorgung der Zellen bewirken eine Reduktion energieabhängiger Prozesse wie der Aufrechterhaltung der Calciumhomöostase, des Membranpotentials sowie des Ionen- und Transmittertransportes [Di Monte, 1991]. Aber auch ATP-abhängige Enzyme für die Reparatur von DNA-Schäden wie die Poly(ADP-ribose)polymerase werden durch das Energiedefizit gehemmt [Cosi et al., 1996].

Abb. 1.12: Mitochondriale Dysfunktion.



Mechanismus der MPTP-Toxizität (modifiziert nach Sian et al., 1999).

MPTP: 1- Methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridin	*DA: Dopamin*
$MPDP^+$: 1-Methyl-4-phenyl-1,2-dihydroxypyridiniumion	*MAO-B: Monoaminoxidase*
MPP^+: 1-Methyl-4-penyhlpyridiniumion	*DAT: Dopamintransporter*
VMAT: vesikulärer Monoamintransporter	*ROS: reaktive Sauerstoffspezies*

Durch den Funktionsverlust der energieabhängigen Calcium-ATPase kommt es zu einer Störung der **Calciumhomöostase**: Durch die intrazelluläre Calcium-Überladung werden abbauende Enzyme wie Phosphatasen und Proteasen aktiviert. Die Zerstörung der Zellmembranproteine inklusive des Zytoskeletts und der Verlust des Membranpotentials führen schliesslich zum Zelltod.

Die Beteiligung **inflammatorischer Prozesse** an der Pathogenese der MPTP-Toxizität wird durch Befunde in menschlichen und tierischen Gehirnen unterstützt.

Die MPTP-induzierte Infiltration und Aktivierung der Mikroglia fördert die Produktion an ROS und NO [Czlonkowska et al., 1996; Kurkowska-Jastrzebska et al., 1999]. Tatsächlich werden bei MPTP-behandelten Tieren erhöhte proinflammatorische Zytokinspiegel gefunden [Mogi et al., 1998; Kaku et al., 1999]. In diesem Sinne erstaunt es auch nicht, dass antiinflammatorische Arzneistoffe wie Acetylsalicylsäure und Meloxicam einen deutlich neuroprotektiven Effekt gegen die MPTP-Toxizität zeigen [Teismann und Ferger, 2001].

Die MPTP-induzierte striatale Dopamin-Freisetzung und der dadurch erhöhte Metabolismus führen zu einer **Entstehung reaktiver Sauerstoffspezies** [Lang et al., 1990; Santiago et al., 1991]. Die erhöhten Werte des Nitrierungsmarkers 3-Nitrotyrosin lassen aber auch die Beteiligung **reaktiver Stickstoffspezies** wie Peroxynitrit an der MPTP-Toxizität vermuten [Pennathur et al., 1999].

Przedborski und Mitarbeiter [1992] zeigten an transgenen Mäusen, die die entgiftende Superoxiddismutase überexprimieren, protektive Effekte gegenüber MPTP. Und auch die Gabe eines NO-Synthasehemmers oder die verminderte Expression der NO-Synthase erwies sich als protektiv gegenüber der MPTP-Toxizität [Schulz et al., 1995; Hantraye et al., 1996; Przedborski et al., 1996; Liberatore et al., 1999].

Als Folge des oxidativen Stresses kann eine verstärkte **Glutamat-Freisetzung** entstehen [Carboni et al., 1990], die wiederum zur Entgleisung des Calcium-Haushalts beiträgt und die Synthese des antioxidativen Glutathions senkt. Gleichzeitig erfolgt die Aktivierung der NO-Synthase mit einer Verstärkung des oxidativen Stresses, der wiederum zu DNA-Schäden führt.

Ähnlich wie bei der menschlichen Erkrankung greifen auch die Mechanismen der MPTP-Toxizität ineinander. Die Hemmung des Komplex I der Atmungskette [Cleeter et al., 1992] bewirkt die Entstehung reaktiver Sauerstoffspezies, die wiederum die Integrität der Mitochondrienmembran zerstören und so die Calciumhomöostase negativ beeinflussen [Allen et al., 1995]. Die eng zusammenhängenden Mechanismen verstärken sich letztlich zu einem Teufelskreis, der mit dem Zelltod endet.

Bis heute ist es nicht möglich, zwischen einer kausalen Rolle oder einer Konsequenz der Radikalentstehung in der MPTP-Toxizität zu unterscheiden. Dennoch bietet die Erforschung von radikalfangenden Substanzen einen guten Ansatzpunkt, dopaminerge Neurone vor oxidativem Stress zu schützen.

Neurochemie und Immunohistochemie

Nach der Aufnahme von MPP^+ in die dopaminergen Neurone kommt es zum Tod der Zellkörper in der SNc. Die Degeneration beginnt einige Stunden nach der Behandlung und hält bis zu 4 Tagen an. Als Merkmale gelten die Abnahme der Tyrosinhydroxylase-Immunreaktivität sowie die Färbung auf Nissl-Substanzen. Anfangs zeigt sich allerdings nicht zwingend eine Korrelation,

da schwächer geschädigte Zellen - sogenannte Geisterzellen - ihre Tyrosinhydroxylase-Aktivität nur vorübergehend verlieren und sich in den folgenden Tagen wieder erholen [Jackson-Lewis et al., 1995]. Nach 7 Tagen findet man jedoch eine signifikante Reduktion von Tyrosinhydroxylase-Immunreaktivität und Nissl-positiven Zellen. Ausserdem kommt es zu einer verminderten Dichte an Dopamin-Rezeptoren [Mitsumoto et al., 1998].

Speziesunterschiede in der Empfindlichkeit gegen die MPTP-Neurotoxizität

Das MPTP-Modell wird hauptsächlich an Affen und Mäusen eingesetzt [Gerlach und Riederer, 1996]. Die in Primaten ausgelösten Defizite spiegeln die neurologischen Veränderungen im Parkinson-Patienten sehr gut wieder: Bradykinese, Rigidität, Gang- und Standinstabilitäten, Einschränkungen in der Bewegungsinitialisierung, Maskengesicht und Tremor. Ethische Bedenken im Gebrauch von Primaten und deren begrenzte Verfügbarkeit limitieren allerdings den Einsatz dieses Modells.

Im Gegensatz zu den Primaten reagieren Nagetiere wesentlich weniger empfindlich auf die MPTP-Toxizität. Die höchste Sensitivität und die selektivste Toxizität zeigen Mäuse vom Stamm C57black/6; sie werden daher gewöhnlich im MPTP-Modell eingesetzt. Neben der Art ist aber auch das Alter der Tiere von Bedeutung. Ältere Tiere zeigen eine schwere und langanhaltende Schädigung, während junge Tiere eine wesentlich höhere MPTP-Dosis benötigen, um die gleichen Defizite zu entwickeln [Gerlach et al., 1991]. Nach systemischer Injektion zeigen sich massive Schäden im dopaminergen System. Die biochemischen, pathologischen und klinischen Erscheinungen entsprechen den Kennzeichen des Morbus Parkinson mit Ausnahme des Auftretens von Lewy-bodies [Langston et al., 1983]. Im Verhalten zeigen sich kurz nach der Injektion Mydriasis, Hypersalivation und klonische Krämpfe, die allerdings innerhalb weniger Stunden reversibel sind.

Ratten hingegen sind durch eine hohe Aktivität der endothelialen MAO-B unempfindlich gegen die systemische MPTP-Applikation. Die bereits in der Peripherie ablaufende Umwandlung von MPTP zu seinem geladenen Metaboliten MPP^+ verhindert die Aufnahme in das Gehirn [Heikkila et al., 1984; Boyce et al., 1984].

Behandlungsschemata

Die unterschiedlichen Behandlungsschemata (siehe Kap. 2.6.1) beeinflussen nicht nur den Zeitverlauf der Neurodegeneration, sondern ermöglichen auch neue Einblicke in die verschiedenen Phasen des Zelltods. Dennoch erreichen alle Modelle nur Endpunkte innerhalb von Tagen oder Wochen und reichen nicht an den chronischen Verlauf des Morbus Parkinson heran, der sich über mehrere Lebensdekaden erstreckt.

Die MPTP-Modelle bieten jedoch unschätzbare Möglichkeiten zur Aufdeckung zellulärer Mechanismen der neurodegenerativen Prozesse [Jackson-Lewis et al., 1995; Tipton und Singer, 1993], neuroanatomischer und neurochemischer Veränderungen sowie neuer therapeutischer Strategien [Heikkila et al., 1984; Schmidt und Ferger, 2001a].

1.5.2.2 6-Hydroxydopamin (6-OHDA)

Ursprünglich wurde 6-OHDA entwickelt, um das noradrenerge System zu schädigen. Durch seine strukturelle Ähnlichkeit zu Catecholaminen wird es über dieselben Transportersysteme in die Zellen aufgenommen. Erst durch die Blockade noradrenerger Neurone wird eine selektive Schädigung dopaminerger Neurone möglich[Thoenen und Tranzer, 1973].

Seine Toxizität beruht auf der Induktion von oxidativem Stress. Durch seine Ähnlichkeit zu Dopamin folgt es den gleichen Abbauwegen [Karoum et al., 1993] und setzt auf diesem Wege Wasserstoffperoxid frei. Zusätzlich löst es Ferritin-gebundenes Eisen, wodurch die effiziente Umsetzung von Wasserstoffperoxid zu Hydroxylradikalen gewährleistet wird. Gleichzeitig senkt 6-OHDA aber auch die Glutathion- und Superoxiddismutase-Aktivität, so dass neben der erhöhten Radikalproduktion eine Schwächung der endogenen Abwehrsysteme erfolgt [Sachs und Jonsson, 1975; Cohen und Heikkila, 1974].

Die am häufigsten praktizierte Technik eine selektive Läsion des nigrostriatalen Systems in Nagern und Primaten zu erreichen, ist die intracerebrale Injektion [Ungerstedt, 1970; Roberts, 1975], da 6-OHDA die Bluthirnschranke nicht passieren kann. Die bilaterale Injektion in die Substantia nigra oder das mediale Vorderhirnbündel der Ratte führt zu einem nahezu vollständigen Verlust dopaminerger Neurone in der SN. Die schweren neurologischen Störungen erinnern an die Parkinson-Symptomatik.

Eine unilaterale Injektion hingegen verursacht deutlich schwächere Verhaltensstörungen, anhand derer nach systemischer Gabe von Dopamin-Agonisten (wie Apomorphin) oder Dopamin-freisetzenden Stoffen (wie Amphetamin) das Ausmass der Schädigung im charakteristischen Rotationsverhalten bestimmt werden kann. Dieses Drehverhalten ist die Konsequenz der dopaminergen Denervierung mit folgender Sensitivitätssteigerung und Hochregulation der Dopamin-Rezeptoren. Das entstehende Ungleichgewicht zwischen den Basalganglien-outputs der beiden Hemisphären führt zu Stereotypien und Körperrotationen. Diese Erscheinung muss nicht spontan auftreten, sondern kann, wie bereits erwähnt, durch bestimmte pharmakologische Stoffe ausgelöst werden.

Auch dieses Modell ist ein bedeutendes pharmakologisches Werkzeug und Standardmodell der Parkinson-Forschung. Dennoch unterscheiden sich die schnellen Veränderungen nach 6-OHDA-Injektion von der temporalen Progression, die der menschlichen Neuropathologie zugrunde liegt. Daher eignet es sich vornehmlich für das pharmakologische Screening von dopaminergen Substanzen und Stoffen mit Wirkung auf die Dopamin-Rezeptoren [Beal, 2001].

Alternativ kann 6-OHDA auch in das Striatum injiziert werden. Dadurch wird eine Degeneration der striatalen Nervenendigungen ausgelöst, die von einer retrograden, progressiven Degeneration dopaminerger Zellkörper in der SNc gefolgt wird [Sauer und Oertel, 1994]. Obwohl steigende Dosen an 6-OHDA zu einer verstärkten Dopamin-Depletion führen, können in diesem Modell nur schwache Verhaltenseffekte nachgewiesen werden. Eine Veränderung der Dosis und der Zahl der Injektionen soll aber spezifischere und stärker ausgeprägte Verhaltensdefizite auslösen [Kirik et al., 1998]. Unilaterale Dopamin-Depletionen im Bereich von 50% zeigen durch effektive Kompensationsmechanismen keine offensichtlichen Änderungen des Spontanverhaltens und bedürfen ausgewählter pharmakologischer Interventionen, um funktionelle Defizite nachweisen zu können.

Dieses Modell kommt der langsamen Entwicklung der menschlichen Erkrankung auf zellulärer Ebene in der SN deutlich näher und wird eingesetzt, um die Mechanismen von Therapeutika, Transplantationen, neurotrophen Faktoren und Neuroprotektiva zu untersuchen.

1.5.2.3 Rotenon

Die Idee, dass auch Umweltgifte oder Pestizide in die Pathogenese des Morbus Parkinson verwickelt sein könnten [Seidler et al., 1996], führte zum Rotenon-Modell.

Rotenon ist ein natürlicher Wurzelbestandteil vieler Pflanzen, der auch als Insektizid eingesetzt wurde. Es hat eine hohe Affinität zum Komplex I der Atmungskette, den es effizient hemmt. Im Gehirn entwickelt sich eine progressive Degeneration nigrostriataler Neurone mit zytoplasmatischen Einschlüssen, die in den histologischen Merkmalen an Lewy-bodies erinnern. Im Verhalten zeigen sich Bradykinese, Haltungsstörungen, ungleichmässiger Gang und Anzeichen eines Tremors.

Durch die hohe Übereinstimmung des ausgelösten Parkinsonoids mit der menschlichen Erkrankung stellt dieses Modell ein exzellentes Tiermodell dar, das für die Untersuchung von Zelltransplantationen von grosser Bedeutung sein könnte. Leider ist die individuelle Ansprechbarkeit auf das Toxin ein grosses Problem, da nur etwa die Hälfte der Versuchstiere überhaupt eine Schädigung zeigt. Problematisch gestaltet sich auch die Applikation von Rotenon, da die Substanz hochgradig hydrophob ist und den Tieren nur intravenös über osmotische Pumpen appliziert werden kann [Betarbet et al., 2000].

1.5.2.4 Genetische Modelle

Obwohl der Morbus Parkinson meistens sporadisch auftritt, konnten bereits einige Mutationen nachgewiesen werden. Die wachsenden Kenntnisse auf dem Gebiet der molekularen Genetik schufen die Voraussetzungen für transgene Tiermodelle zur Erforschung neurodegenerativer Erkrankungen. Anhand gezielter Mutationen konnten Gene ausgeschaltet (knockout) oder ihre Expression verändert werden (deficient/overexpressing). Dadurch sind unzählige Tiervariationen entstanden, die Aufschluss über die Regulation und Funktion einzelner Gene zulassen.

Die Entdeckung, dass Punktmutationen im α-Synuclein-Gen in die Pathogenese des Morbus Parkinson involviert sind, führte zu der Identifikation des α-Synucleins als Hauptbestandteil der Lewy-bodies [Spillantini et al., 1997]. Ratten, die mittels AAV-Gentransfer α-Synuclein überexprimieren zeigen immunhistochemische, neurochemische und funktionelle Anzeichen einer nigrostriatalen Degeneration [Kirik, 2002]. Transgene Mäuse, die sowohl α-Synuclein als auch Mutationen des α-Synucleins überexprimieren, zeigen allerdings keine nigrostriatale Degeneration [Matsuoka et al., 2001].

α-Synuclein greift über die Hemmung der Tyrosinhydroxylase in die Biosynthese von Dopamin ein [Perez et al., 2002]. Dieser Zusammenhang zwischen α-Synuclein und der Regulation der Dopamin-vermittelten Neurotransmission könnte die selektive Sensibilität dopaminerger Neurone erklären [Abeliovich et al., 2000].

Ähnliche Veränderungen wurden auch an der Fliegenart Drosophila ausgelöst. Dort konnten Lewy-body-ähnliche Einschlüsse sowie altersabhängige Bewegungsstörungen erzeugt werden. Allerdings konnte noch nicht geklärt werden, ob diese Veränderungen auch mit einer Störung der dopaminergen Neurone einhergeht. Nichtsdestotrotz erlaubt dieses Modell durch die gut charakterisierten Gene und die kurze Lebensdauer der Drosophila Fliegen die Untersuchung neuer Proteine, die in die Parkinson-Pathogenese involviert sein könnten [Feany und Bender, 2000].

Tiermodelle zur Untersuchung der Mutationen am Parkin- und UCH-L1-Gen (siehe Kap. 1.3.6) müssen erst noch entwickelt werden.

1.6 Ziele der Arbeit

Die aktuelle Parkinson-Forschung strebt die Aufklärung sowie das Verständnis der Pathomechanismen der Erkrankung an, um aktiv in den Krankheitsprozess eingreifen und ihn im Idealfall stoppen zu können.

Ziel dieser Arbeit war die Untersuchung der neurodegenerativen Prozesse des Morbus Parkinson, die durch Applikation verschiedener Neurotoxine (wie MPTP und seinem Metaboliten MPP^+, 6-OHDA, 3-Nitropropionsäure und Malonsäure) in experimentellen Tiermodellen imitiert werden sollte. Ausgehend von validierten Tiermodellen sollten zudem innovative neuroprotektive Interventionsmassnahmen entwickelt werden. Dazu wurden 7 Teilprojekte bearbeitet:

1. Validierung des MPTP-Modells

Um die Effekte potentieller Neuroprotektiva im MPTP-Modell interpretieren zu können, ist die Kenntnis von Ausmass und Zeitverlauf der Schädigung wichtig. Die verschiedenen Dosierungsschemata des MPTP-Maus-Modells (akut, subchronisch, chronisch) zeigen unterschiedliche Auswirkungen auf den Grad der Neurodegeneration, den Zeitverlauf der Schädigung und die Reversibilität der Symptomatik. Diese Aspekte spielen für die Untersuchung neuer Arzneistoffe und die Interpretation ihrer Effekte eine wichtige Rolle. So können Substanzen durch Erhöhung des Dopamin-Spiegels (als Eigeneffekt) oder Beeinflussung des MPTP-Metabolismus im Tiermodell neuroprotektive Effekte "vortäuschen". Um derartige symptomatische oder kinetische Effekte von der Neuroprotektion unterscheiden zu können, ist die genaue Kenntnis des angewandten Modells notwendig.

Es wurden drei Standardmodelle der akuten MPTP-Toxizität ausgewählt und miteinander verglichen. Die subkutane Behandlung mit 1 x 30 mg/kg MPTP war bereits im Arbeitskreis etabliert, sollte aber aufgrund der sichereren Handhabung auf die intraperitoneale Injektion von 1 x 40 mg/kg MPTP umgestellt werden. Da Modelle mit Mehrfachapplikation kleinerer Dosen die Wirkungen von MPTP hervorheben können, wurde eine Dosierung aus der Literatur mit 4 x 20 mg/kg MPTP i.p. im Abstand von jeweils 2 Stunden mit den beiden anderen Behandlungsschemata verglichen.

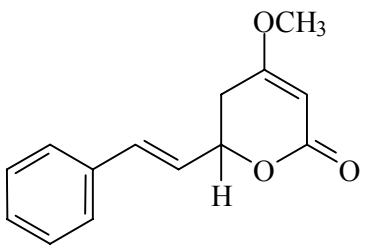
Um das Ausmass der MPTP-induzierten Schädigung zu erfassen, wurden funktionelle (lokomotorische Aktivität und Koordinationsfähigkeit), neurochemische (Dopamin und seine Metabolite) und histologische Parameter (Tyrosinhydroxylase-Aktivität und Zelltodrate) an C57BL/6-Mäusen untersucht. Zusätzlich wurde der Zeitverlauf der striatalen Dopamin-Abnahme nach Behandlung mit MPTP bestimmt. Durch diese Untersuchung sollte ein geeignetes Behandlungsschema für die weiteren Experimente aufgezeigt und Informationen für die Auswahl der Applikationszeitpunkte potentieller Neuroprotektiva sowie des experimentellen Zeitrahmens gefunden werden.

Neben den funktionellen und neurochemischen Parametern ist die Kenntnis der Pharmakokinetik von MPTP von grosser Bedeutung für die Auswahl günstiger Applikationszeitpunkte potentieller Arzneistoffe oder Festlegung des Zeitfensters der Experimente. Da die MPTP-Toxizität enorm von seinem Metabolismus abhängt, müssen eventuelle Veränderungen der Pharmakokinetik für eine korrekte Beurteilung der Ergebnisse berücksichtigt werden. Durch den **Aufbau einer analytischen Methode** zur Bestimmung des toxischen MPTP-Metaboliten MPP^+ wurden derartige Effekte von Arzneistoffen untersucht. Als Positivkontrolle diente der bekannte MAO-B-Hemmstoff Selegilin.

2. Untersuchung von (±)-Kavain im akuten MPTP-Modell

Für die Untersuchung innovativer Ansatzpunkte für die Therapie des Morbus Parkinson wurde der Naturstoff **(±)-Kavain**, der in der *in-vivo* Mikrodialyse durch Senkung der Veratridin-induzierten Glutamat-Freisetzung aufgefallen war [Ferger et al., 1998*b*], im MPTP-Modell an C57BL/6-Mäusen auf eine mögliche Neuroprotektion getestet. Da für die Pathomechanismen des Morbus Parkinson bereits die Beteiligung der Glutamat-induzierten Exzitotoxizität diskutiert wird und NMDA-Antagonisten erfolgreich in der Therapie eingesetzt werden, lag die Vermutung nahe, dass Kavain auch im MPTP-Modell positive Effekte zeigen könnte.

Abb. 1.13: Strukturformel von (±)-Kavain



Seine Wirkungen wurden anhand der funktionellen (lokomotorische Aktivität), neurochemischen (Gewebespiegel von Dopamin und Serotonin sowie ihren jeweiligen Metaboliten) und histologischen Marker (Tyrosinhydroxylase-Aktivität sowie die Zelltodrate (Nissl-Färbung)) bestimmt und mit der MPTP-induzierten Schädigung verglichen.

(±)-Kavain ist ein natürlicher Inhaltsstoff des Wurzelstocks Piper methysticum Forst. und gehört zur Gruppe der pharmakologisch wirksamen Kavapyrone (Abb. 3.16). Diese Stoffe sind stark lipophil und werden aufgrund ihrer zentralen Wirkungen als Genussmittel, bei Konzentrations- und Leistungsschwäche aber auch als Psychotonikum bei Angst- und Spannungszuständen eingesetzt. In Tiermodellen der Epilepsie zeigte (±)-Kavain antikonvulsive Eigenschaften, wohingegen das Kava-Extrakt in Modellen der fokalen Ischämie in der Maus neuroprotektive Eigenschaften zeigte [Backhauss und Krieglstein, 1992]. Weiterhin ist (±)-Kavain für seine spezifische Blockade spannungsabhängiger Natriumkanäle und seiner leichten Hemmung spannungsabhängiger Calciumkanäle *in-vitro* bekannt [Gleitz et al., 1995].

Zur Untersuchung von (±)-Kavain im MPTP-Maus-Modell wurden als funktioneller Parameter die lokomotorische Aktivität, als pharmakokinetischer Parameter die striatalen MPP^+-Spiegel und als neuroprotektive Parameter Dopamin und seine Metabolite DOPAC und HVA, Serotonin und sein Abbauprodukt 5-HIAA sowie die Tyrosinhydroxylase-Aktivität und der Zellverlust in der SNc bestimmt.

3. Untersuchung von IL-6 als Mediator inflammatorischer Prozesse in der akuten und subchronischen MPTP-Toxizität

In einer Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Dr. M. Schwaninger (Klinikum Heidelberg) wurde an Wildtyp (C57BL/6) - und IL-6 knockout-Mäusen der Einfluss dieses Zytokins auf die MPTP-Toxizität untersucht (Tab. 3.10). Um dem chronischen Charakter der inflammatorischen Prozesse gerecht zu werden, wurde neben einer akuten Dosierung (2 x 30 mg/kg MPTP i.p. im Abstand von 4 Stunden) auch ein subchronisches Modell der MPTP-Toxizität (5 x 30 mg/kg i.p. im Abstand von jeweils einem Tag) untersucht. Diese Modelle wurden bereits durch Studien im eigenen Arbeitskreis ausführlich charakterisiert.

Wie in den vorangegangenen Experimenten wurden die lokomotorische Aktivität, die Gewebespiegel von Dopamin und seinen Metaboliten sowie die histologischen Parameter bestimmt.

4. Untersuchungen zur Beteiligung reaktiver Sauerstoff- und Stickstoffspezies an den Mechanismen verschiedener Neurotoxine

Immer häufiger wird im Zusammenhang mit oxidativem Stress auch die Beteiligung des nicht-radikalischen Peroxynitrits diskutiert (siehe Kap. 1.3.1.3), das durch die Nitrierung von Tyrosinresten einen messbaren Fingerabdruck im Gewebe hinterlässt. Die Detektion freier Hydroxylradikale durch das Salicylat-Assay ist eine weitverbreitete Methode, die jedoch nicht die Möglichkeit bietet, dersrtige Nitrierungsreaktionen zu erfassen. Ein anderes Molekül, das sich aufgrund seines geringen Nebenwirkungspotentials sehr gut für die Detektion freier Radikale eignet, ist Phenylalanin. Durch die Fähigkeit an aromatischen Hydroxylierungs- und Nitrierungsreaktionen teilzunehmen, erlaubt es die parallele Messung reaktiver Sauerstoff- und Stickstoffspezies.

Mittels reverser Mikrodialyse wurde die Bedeutung der Hydroxylradikal- und Peroxynitritbildung auf den pathologischen Mechanismus verschiedener Neurotoxine (**6-OHDA**, **3-NP** und **MPP$^+$**) in C57BL/6- Mäusen bestimmt. Zusätzlich sollte anhand von **TNF-α** knockout-Mäusen der Einfluss dieses proinflammatorischen Zytokins auf die 6-OHDA-induzierte Radikalbildung konkretisiert werden.

5. Untersuchung der Einflüsse von DAT und VMAT-2 bei der Radikalbildung

Diese *in-vivo* Mikrodialyse-Studie an Wistar-Ratten sollte zur Aufklärung der Mechanismen der Malonat-Toxizität beitragen. Eine vorangegangene Studie im eigenen Arbeitskreis untersuchte mögliche Faktoren, die zu der Toxizität des reversiblen Succinatdehydrogenase-Inhibitors Malonat beitragen. Die intrastriatale Applikation dieses Toxins bewirkte eine massive Dopamin-Freisetzung, die von der Bildung freier Hydroxylradikale begleitet war [Ferger et al., 1999*b*]. Da Dopamin neben anderen Mechanismen über seine Metabolisierung die Entstehung von oxidativem Stress induziert (siehe Kap. 1.3.1.1), könnte es für die Hydroxylradikalentstehung nach Malonat-Infusion verantwortlich sein. In einer Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Dr. J.B. Schulz aus Tübingen wurde als Erweiterung der Studie die Rolle von Dopamin in der Malonat-Toxizität anhand von DAT- und VMAT-Inhibitoren *in-vivo* untersucht.

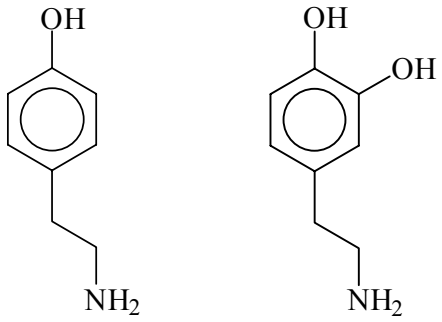
Der DAT zeigt eine hohe Affinität zu Dopamin und vermittelt dessen Aufnahme aus dem synaptischen Spalt; er beendet somit zeitlich dessen extrazelluläre Präsenz [Tanda et al., 1997]. Im Cytoplasma wird Dopamin dann in Vesikeln gespeichert, bevor es erneut freigesetzt wird.

Die Aufnahme von Dopamin aus dem Cytosol in die Vesikel wird über den VMAT-2 vermittelt [Hong et al., 1987]. Eine Behandlung mit DAT- und VMAT-Inhibitoren sollte also zu einer Dopamin-Verarmung des Gewebes führen und die Entstehung von Hydroxylradikalen deutlich vermindern.

6. Untersuchung von Tyramin bzw. MAO-abhängigen Prozessen bei der Hydroxylradikalbildung

Neueren Forschungsberichten zufolge können auch Nahrungsbestandteile wie beispielsweise Tyramin neurochemische Veränderungen bewirken**.** Zwar ist die funktionelle Rolle von Tyramin im Gehirn noch nicht geklärt, dennoch werden modulatorische Eigenschaften an monoaminergen Neuronen vermutet. Seine strukturelle Ähnlichkeit zu Dopamin, das auch als 3-Hydroxytyramin bezeichnet wird, gab die Idee zur potentiellen Neurotoxizität von Tyramin im dopaminergen System (Abb. 3.32).

Abb. 1.14: Strukturvergleich zwischen Tyramin und Dopamin



Tyramin **Dopamin**

Tyramin interferiert auf folgende Weise mit der Dopamin-Homöostase: Durch die Hemmung der Dopamin-Aufnahme und die noch stärkere Erhöhung der Freisetzung resultieren hohe extrazelluläre Dopamin-Spiegel [Zetterström et al., 1988; Fairbrother et al., 1990]. Gleichzeitig aber ist Tyramin ein gutes Substrat für beide Isoenzyme der Monoaminoxidase, die an der äusseren Mitochondrienmembran lokalisiert sind, wo sie die oxidative Deaminierung nicht nur von Dopamin, Noradrenalin und Serotonin, sondern auch von biogenen Aminen wie Tyramin katalysieren. Dabei entsteht Wasserstoffperoxid, das selbst zwar nur mässig reaktiv ist, aber in der Gegenwart von Übergangsmetallen wie z.B. Eisen-Ionen über die Fenton-Reaktion schnell zu den reaktiven Hydroxylradikalen umgesetzt wird [Halliwell, 1992].

Das Ziel der Studie war herauszufinden, ob und über welche Mechanismen Tyramin die Entstehung freier Radikale im dopaminergen System beeinflussen kann. Mit Hilfe der reversen Mikrodialyse wurden die Dopamin-Freisetzung sowie die Radikalproduktion im Salicylat-Assay durch Tyramin in gesunden und MPTP-lädierten C57BL/6-Mäusen gemessen. In einem weiterführenden Experiment wurde die Rolle der Monoaminoxidase für die Tyramin-induzierte Radikalbildung anhand des MAO-A/B-Inhibitors Tranylcypromin präzisiert.

7. Einfluss des Nucleus subthalamicus auf striatale und nigrale neurochemische Parameter und Hydroxylradikalbildung

Die Inaktivierung bestimmter Basalganglienkerne wird mittlerweile erfolgreich in der klinischen Behandlung schwerer Parkinson-Fälle eingesetzt. Dennoch ist die Rolle des Nucleus subthalamicus in der Pathogenese der Erkrankung unklar.Es konnten aber bereits glutamaterge Projektionen vom NST zur Region der SNc, sowie eine hohe Anzahl an NMDA-Rezeptoren in der SNc nachgewiesen werden [Hammond et al., 1978].

Da Glutamat über die Mechanismen der indirekten Exzitotoxizität neurotoxische Eigenschaften erlangen kann (siehe Kap. 1.3.5.2), lag die Vermutung nahe, durch die chemische Inaktivierung des NST mittels Kainsäure-Läsion neuroprotektive Effekte erzielen zu können. Derartige Protektionsversuche wurden bereits durchgeführt, jedoch mit teils widersprüchlichen Ergebnissen [Piallat et al., 1996; Nakao et al., 1999] und ohne die Auswirkungen auf die dopaminerge Neurotransmission und die Radikalbildung zu erforschen.

Anhand von Mikrodialyse-Experimenten auf striataler und nigraler Ebene sollte der Einfluss des Nucleus subthalamicus auf Veränderungen in der striatalen und nigralen Neurotransmission sowie auf die Entstehung von Hydroxylradikalen in gesunden und Kainsäure-lädierten Tieren konkretisiert werden.

Kapitel 2

Material & Methoden

2.1 Tiere und Tierhaltung

Die Experimente wurden an männlichen Mäusen (Stamm: C57BL/6, 25 - 30 g) der Firma Charles River (Sulzfeld) oder aus der institutseigenen Zucht und an männlichen Albino-Wistar-Ratten (Stamm: Hsd/Win: WU, 250 - 300 g) der Firma Harlan Winkelmann (Borchen) durchgeführt.

Vor Beginn der Experimente wurden die Tiere zur Eingewöhnung mehrere Tage im institutseigenen Tierstall unter Standardbedingungen gehalten (Raumtemperatur 23 ± 1°C, relative Luftfeuchtigkeit 55 ± 5%, zwölfstündiger Hell-Dunkel-Rhythmus (Licht an um 6.30 Uhr)). Die Tiere sassen in Gruppen zu 5 - 10 Mäusen bzw. 4 - 5 Ratten in Kunststoffkäfigen mit Metallabdeckung (Makrolon®) unter freiem Zugang zu Trinkwasser aus Saugflaschen und Standardfutter ("Altromin® Haltungsdiät: Ratten und Mäuse" der Firma Altromin, Lage). Sie wurden während des gesamten Zeitraums von einem Tierpfleger betreut.

Zum Schutz der implantierten Führungskanülen wurden operierte Tiere bis zum Tag des Mikrodialyse-Experiments in höhere Einzelkäfige (Savic, Belgien) (40 x 20 x 24 cm) mit gelochter Leichtmetallabdeckung umgesetzt. Auch sie hatten darin freien Zugang zu Trinkwasser aus Saugflaschen und Standardfutter.

Die durchgeführten Tierversuche waren von der zuständigen Behörde (Regierungspräsidium Giessen) genehmigt.

2.2 Gewebeuntersuchungen

2.2.1 Gewebeentnahme

Die Versuchstiere wurden durch Luxation der Halswirbelsäule (Mäuse) oder direkte Dekapitation mit der Guillotine (Ratten) getötet. Die Schädelkalotte wurde längs der Sagitalnaht aufgeschnitten und durch zwei weitere seitliche Schnitte rostralwärts aufgeklappt. Nach Entfernung der Dura mater wurde das Gehirn entnommen und auf einer eisgekühlten Metallplatte dissektiert. Dazu wurde das frontale Drittel abgetrennt, die Cortexhemisphären auseinandergezogen, die darunterliegenden feingestreiften Striata vorsichtig herausgetrennt und auf Aluminiumfolie gewogen.

Der okzipitale Teil des Gehirns wurde in Fixierlösung überführt und für die Histologie vorbereitet (siehe Kap. 2.3).

2.2.2 Gewebeaufarbeitung

Die Striata wurden in 1,6 ml Plastikvials (Biozym Diagnostik GmbH, Hess. Oldendorf) überführt und in 200 oder 500 μl 0.4 M Perchlorsäure mit dem Ultraturrax für 1 Minute mit 20 000 Umdrehungen pro Minute (UPM) (Ultra Turrax T5, Bachhofer, Reutlingen) homogenisiert. Um eine quantitative Proteinfällung zu erreichen, wurden die Proben weitere 15 - 20 Minuten bei 4°C gelagert. Anschliessend wurde mit 5000 - 8000 UPM und bei 4°C zentrifugiert (Hermle Z 252 MK, Gosheim) und der Überstand über einen Membranfilter (0.2 μm Porenweite, Spartan 13/0.2 RC, Schleicher & Schuell, Dassel) gereinigt. Die auf diesem Wege gewonnene Lösung konnte direkt mittels HPLC analysiert oder bei -70°C gelagert werden.

2.3 Histologie und Immuncytochemie

2.3.1 Gehirnschnitte

Zur Untersuchung der Gehirne auf Nissl-positive Zellen und Tyrosinhydroxylase-Immunreaktivität wurden die entnommenen Gehirne in einer Fixierlösung *(8 Teile Methanol, 2 Teile Formaldehyd und 1 Teil Essigsäure)* über 24 Stunden fixiert und anschliessend erst in 20%-iger, dann in 30%-iger Saccharose-Phosphatpuffer (PBS) -Lösung dehydratisiert. Je nach weiterer Lagerungsdauer wurde diesen Lösungen 0.1% Natriumazid zur Konservierung zugesetzt.

Mit einem Gefriermikrotom (Modell 2800, Frigocut Reichert-Jung, Nussloch) wurden 30 μm dicke coronale Mittelhirnschnitte angefertigt und bis zur Färbung in Antifreezelösung *(5.18 g Na_2HPO_4* 2 H_2O, 1.57 g NaH_2PO_4* 2 H_2O, 400 ml Aqua dest., 300 ml Ethylenglykol und 300 ml Glycerin)* bei - 25°C aufbewahrt.

2.3.2 Nissl-Färbung

Mittels der sogenannten "free floating"-Technik wurden die Gehirnschnitte auf zelluläre Merkmale (Nissl-Substanzen) gefärbt. Dazu wurden sie 7 - 10 Minuten in 0.5% Kresylviolettacetat in Acetatpuffer (pH = 3.8 - 4.0) belassen und gegebenenfalls etwaige Überfärbungen in Acetatpuffer (Essigsäure/Ethanol 96%) ausgewaschen.

Nach dem Aufziehen auf gelatinisierte Objektträger wurden die Schnitte in einer aufsteigenden Alkoholreihe dehydriert, um das Eindeckeln zu ermöglichen.

2.3.3 Tyrosinhydroxylase-Immunreaktivität

Die Tyrosinhydroxylase-Färbung wurde ebenfalls mit der "free floating"-Technik durchgeführt.

Färbeprotokoll

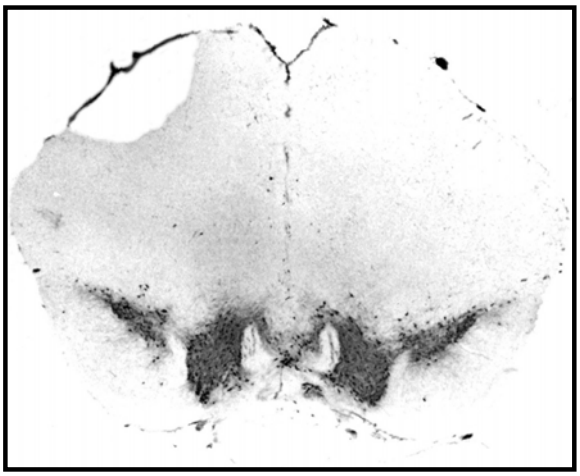
Art des Vorgangs	***Inkubationszeit***	***Zusammensetzung der Lösungen***
waschen	*3 x 10 Min.*	*0.1 M PBS*
Peroxidaseblockierung	15 Min.	3 % H_2O_2 und 10 % Methanol in PBS
waschen	*3 x 10 Min.*	*0.1 M PBS*
Präinkubation	60 Min.	5 % normal horse serum (NHS) und 0.3 % Triton X-100 in PBS
1. Antikörper	über Nacht	anti-Tyrosinhydroxylase in 2 % NHS und 0.3 % Triton X-100 in PBS (1:4000)
waschen	*3 x 10 Min.*	*0.1 M PBS*
2. Antikörper	60 Min.	anti-mouse in 0.3 % Triton X-100 in PBS (1:200)
waschen	*3 x 10 Min.*	*0.1 M PBS*
3. Antikörper	60 Min.	Streptavidin in PBS (1:200)
waschen	*3 x 10 Min.*	*0.1 M PBS*
DAB-Färbung	1 - 5 Min.	0.05 % 3,3'-Diaminobenzidin und 0.01 % H_2O_2 in PBS
waschen	*3 x 10 Min.*	*0.1 M PBS*

Die gefärbten Schnitte wurden auf gelatinisierte Objektträger aufgezogen und über Nacht luftgetrocknet. Abschliessend wurden sie in einer aufsteigenden Alkoholreihe dehydriert, für 60 Minuten in Xylol belassen und mit Corbit-Balsam fixiert.

2.3.4 Mikroskopische Auswertung

Die Tyrosinhydroxylase- und Nissl-positiven Zellen der Substantia nigra pars compacta wurden unter einem Lichtmikroskop anhand von drei aufeinanderfolgenden Schnitten "blind" gezählt. Als Orientierung diente der dritte Hirnnerv (Ebene AP: -3.16, basierend auf dem Hirnatlas für Mäuse von Franklin und Paxinos, 1997). Die Auszählung erfolgte beidseitig, wobei die Ergebnisse als Mittelwert pro Substantia nigra ausgedrückt wurden (Abb. 2.1).

Abb. 2.1: Tyrosinhydroxylase-Färbung der Substantia nigra



Die Photomikrographie zeigt einen Schnitt der auf Tyrosinhydroxylase gefärbten Substantia nigra eines ungeschädigten Tiers auf Höhe des 3. Hirnnervs.

2.4 Mikrodialyse-Experimente

2.4.1 Implantieren der Führungskanüle

Zur Implantation der Führungskanülen wurden die Tiere mit Chloralhydrat (400 mg/kg i.p.) narkotisiert und die Narkosetiefe durch Prüfung auf Areflexie ("tail-flick-Test") kontrolliert. Zusätzlich wurde die Cornea zum Schutz vor Austrocknen und Fremdkörpern mit Bepanthen® Augensalbe versorgt.

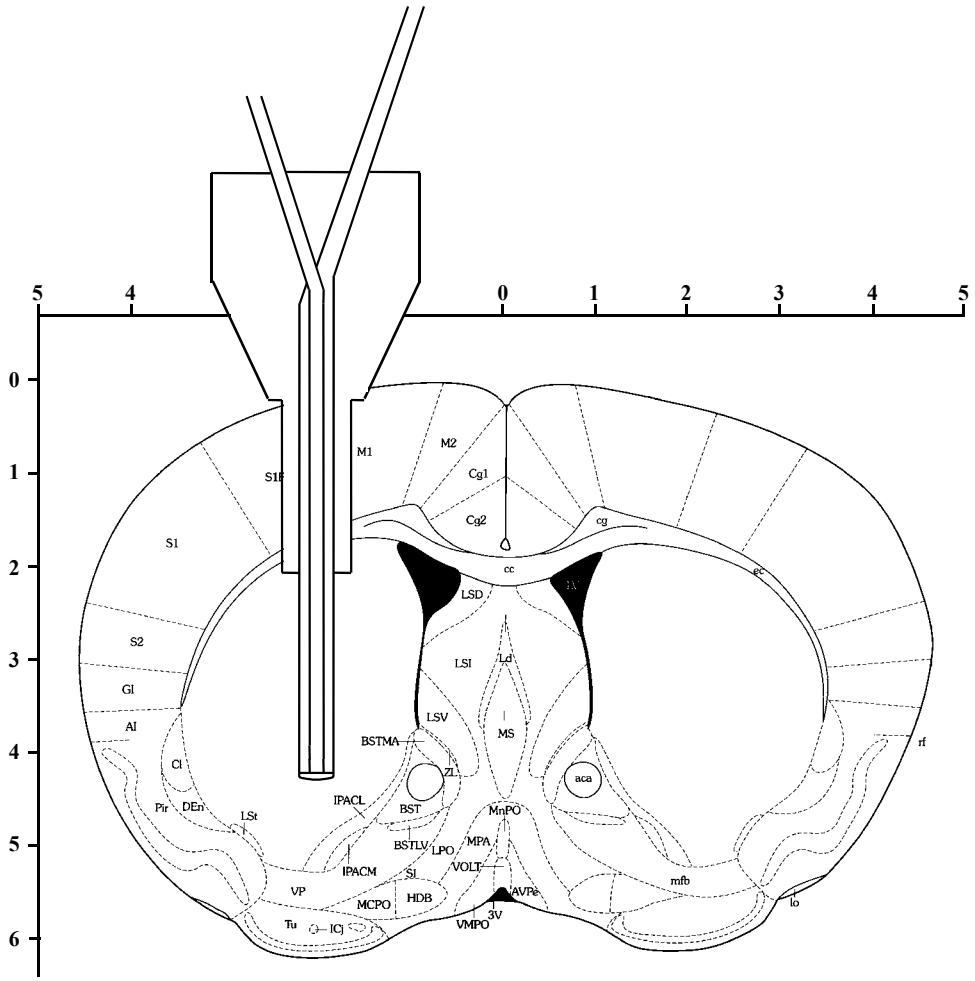
Die Tiere wurden in einem für Mäuse modifizierten stereotaktischen Gerät nach David Kopf fixiert. Nach Desinfektion der Kopfhaut mit einer alkoholischen Lösung wurde ein möglichst kleines Hautareal über dem Bregma entfernt und der Schädelknochen vom Periost befreit. Ausgehend vom Bregma, dem Schnittpunkt von Sagital (Pfeil)- und Kranznaht, konnte nun die Führungskanüle über dem Zielgebiet positioniert werden.

Tab. 2.1: Zielkoordinaten für die Führungskanüle in verschiedenen Geweben

	Zielgewebe	**Koordinaten**		
		AP	**ML**	**VD**
Maus	**Striatum**	+0.5	+2.0	-2.50
Ratte	**Striatum**	+1.25	+2.6	-2.5
	Substantia nigra	- 5.5	±2.4	-8.1

Die Koordinaten des Zielgewebes wurden für die Maus anhand des Hirnatlas nach Franklin und Paxinos [1997], die der Ratten nach Paxinos und Watson [1982] ermittelt und die ventrale Koordinate von der Dura mater aus derart berechnet, dass die aus dem Schaft der Führungskanüle herausragende Sonde genau im Zielgewebe zu liegen kommt (Tab. 2.1/Abb. 2.2).

Abb. 2.2: Zielkoordinaten der Mikrodialyse-Sonde im Striatum der Maus



Die Abbildung zeigt die gewünschte Lage der Mikrodialyse-Sonde im Striatum der Maus [Franklin und Paxinos, 1997].

Mit Hilfe eines Dentalbohrers wurde der Schädelknochen an der entsprechenden Stelle aufgebohrt, ohne dabei die Dura mater zu verletzen. Zusätzlich wurden 1 - 2 weitere Löcher im frontalen beziehungsweise parietalen Schädelknochen angebracht, in die Verankerungsschrauben aus V2A-Stahl (DIN 84-M1, Fa. Hülden, Düren) eingesetzt wurden. Die Führungskanüle wurde vorsichtig über dem Zielgebiet abgesenkt und mit Methylacrylzement (Technovit® 5071, Fa. Kulzer, Wehrheim; geeignet für Ratten) oder Zinkphosphatzement (Harvard Cement, Richter & Hoffmann, Harvard Dental-GmbH, Berlin; geeignet für Mäuse) dauerhaft fixiert.

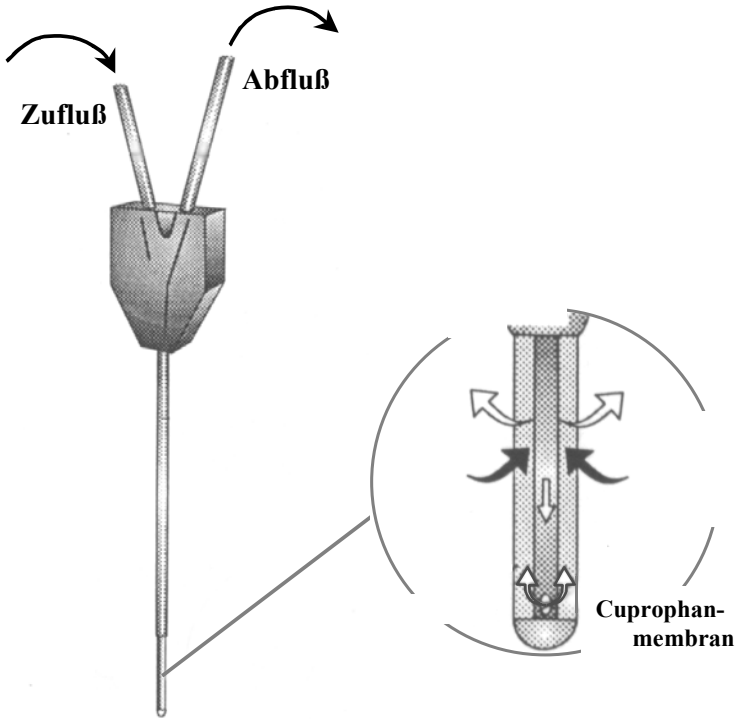
Die Lage der Sonden wurde nach Beendigung des Experimentes überprüft. Tiere, deren Sonde nicht einwandfrei im Zielgebiet lag, wurden nachträglich von dem Versuch ausgeschlossen.

2.4.2 Sonden

Je nach Grösse des Zielgewebes mussten Sonden unterschiedlicher Membranlänge und -dicke verwendet werden. Für Messungen im Striatum der Maus oder der Substantia nigra der Ratte wurden Sonden vom Typ CMA 11 oder MAB 4.15.2.CU (Membrandurchmesser 0.24 mm, Membranlänge 2 mm, CMA/Microdialysis bzw. Microbiotech, Stockholm, Schweden) eingesetzt, während Messungen im Striatum der Ratte mit den grösseren Sonden vom Typ CMA 12 (Membrandurchmesser 0.5 mm, Membranlänge 4 mm, CMA/Microdialysis, Stockholm, Schweden) durchgeführt wurden.

Die Sonden wurden mindestens 1 h vor Gebrauch mit Dialysierflüssigkeit gespült, um das zum Schutz der Membran enthaltene Glycerin auszuwaschen. Bei Mehrfachverwendung der Sonden wurde zwischen den Mikrodialyse-Versuchen ein Recovery-Test zur Bestimmung der Wiederfindungsrate durchgeführt. Sie musste für Sonden vom Typ CMA 12 mindestens 7%, für Sonden vom Typ CMA 11 mindestens 4% betragen.

Abb. 2.3: Prinzip der Mikrodialyse-Sonde



Die Abbildung zeigt das Prinzip einer Mikrodialyse-Sonde (gezeigt wird hier eine Sonde vom Typ CMA 11 der Firma Axel Semrau, Sprockhövel).

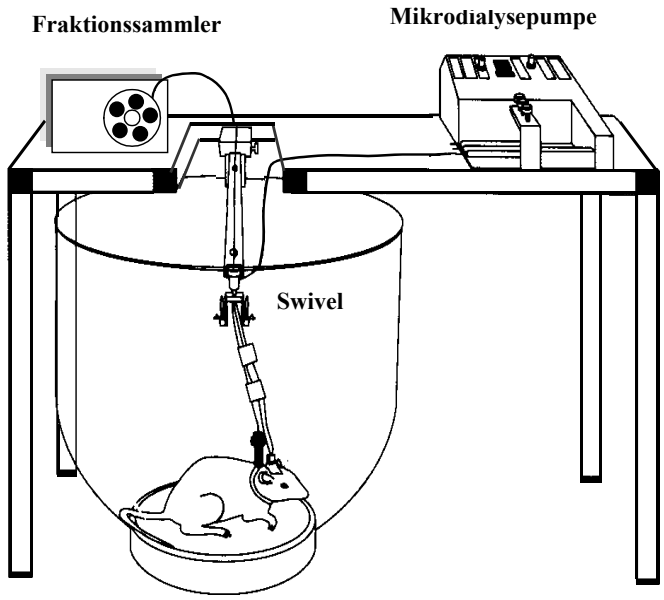
2.4.3 Mikrodialyse

Das Prinzip der Mikrodialyse beruht auf Diffusionsvorgängen an der Dialysemembran. Bei der konventionellen Mikrodialyse diffundieren Substanzen wie beispielsweise Neurotransmitter in Richtung des Konzentrationsgefälles aus dem Extrazellularraum in die Dialysierflüssigkeit (Abb. 2.3).

Umgekehrt können der Dialysierflüssigkeit Stoffe wie z.B. Neurotoxine zugesetzt werden, die sich dann im umgebenden Gewebe anreichern. In diesem Fall spricht man von reverser Mikrodialyse, die den Vorteil hat, dass kein Volumeneffekt wie bei der Injektion von Wirkstofflösungen im Gewebe auftritt.

Die Mikrodialyse-Experimente wurden unter "freely moving"-Bedingungen am Tag nach Implantation der Führungskanüle durchgeführt. Dazu wurde am nicht-narkotisierten Tier der Mandrin der Führungskanüle durch die Mikrodialyse-Sonde ersetzt und die Ratte zum Schutz der zu- und abführenden Mikrodialyseschläuche über ein Halsband und eine Metalleine mit einem um 360° drehbaren Swivel (TSE 2-23, AgnTho's Trading & Consulting HB, Schweden) verbunden. Dieser ermöglichte eine nahezu freie Beweglichkeit im Messkäfig. Bei Mäusen war die zusätzliche Befestigung am Swivel nicht nötig (Abb. 2.4).

Abb. 2.4: Mikrodialyse unter "freely moving" -Bedingungen



Aufbau der Mikrodialyse-Anlage zur Messung unter "freely-moving" Bedingungen.

Als Dialysierflüssigkeit wurde eine, der Extrazellularflüssigkeit angepasste, Calcium-reduzierte Ringer-Lösung verwendet (Tab. 2.2). Die Flussrate betrug 2 μl/Minute.

Tab. 2.2: Zusammensetzung der Calcium-reduzierten Ringerlösung

	Menge [mM]
$\mathbf{Na^+}$	147.0
$\mathbf{K^+}$	4.0
$\mathbf{Ca^{2+}}$	1.3
$\mathbf{Mg^{2+}}$	1.0
$\mathbf{Cl^-}$	155.6

Das Dialysat der ersten 120 Minuten wurde verworfen, da diese Zeit der Equilibrierung der Diffusionsvorgänge und Stabilisierung der Basislinie diente. Anschliessend wurden fünf 20 Minuten-Fraktionen als Basislinienwerte gesammelt, bevor die Behandlung mit Arzneistoffen durch intraperitoneale Injektion oder 60 minütige Stimulation über die Dialysierflüssigkeit erfolgte. Die Fraktionen wurden in 250 μl Plastikreaktionsgefässen aufgefangen, in denen zur Stabilisierung der gewonnenen Proben 10 μl 0.1 N Perchlorsäure vorgelegt war. Die Proben wurden sofort mittels HPLC analysiert oder bei -70°C gelagert.

2.5 HPLC-Untersuchungen

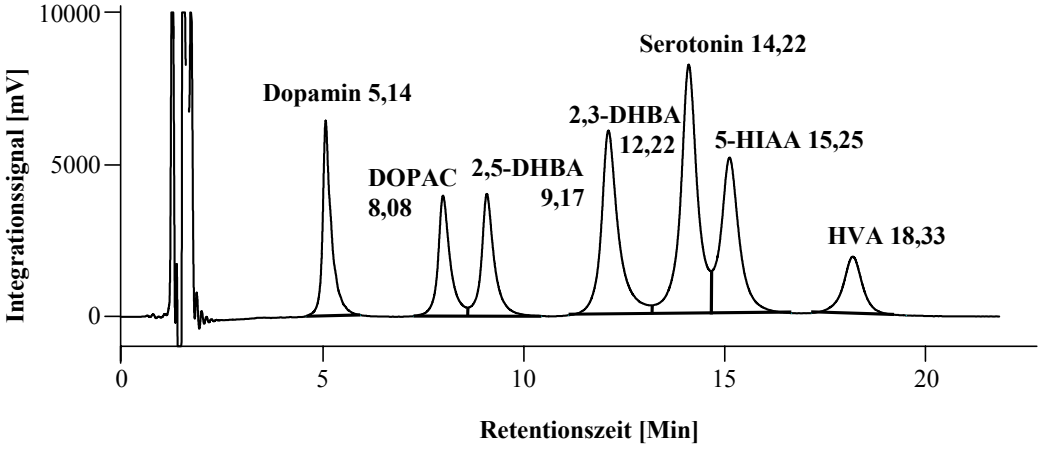
Zur Bestimmung von Neurotransmittern und ihren Metaboliten, Aminosäuren, Peroxynitrit- und Hydroxylradikalmarkern sowie dem toxischen MPTP-Metaboliten MPP^+ standen mehrere Chromatographiemethoden zur Verfügung.

Die Gehaltsbestimmung erfolgte über externe Kalibriergeraden (4 - bis 6 -Punkt-Eichung) aus der Fläche unter den Peaks (Gynkosoft, Dionex, Germering beziehungsweise der Weiterentwicklung Chromeleon 6.20, Dionex, Germering).

2.5.1 Methode zur Bestimmung von Neurotransmittern und ihren Metaboliten sowie Hydroxylradikalmarkern

Dopamin und seine Metabolite 3,4-Dihydroxyphenylessigsäure (DOPAC) und Homovanillinsäure (HVA), Serotonin (5-HT) und dessen Abbauprodukt 5-Hydroxyindolessigsäure (5-HIAA) sowie die Hydroxylierungsprodukte der Salicylsäure 2,3- und 2,5-Dihydroxybenzoesäure (DHBA) als auch Catechol wurden durch RP- (reversed-phase) -Ionenpaarchromatographie unter isokratischen Bedingungen bestimmt (Abb. 2.5).

Abb. 2.5: Beispielchromatogramm für die Bestimmung von Neurotransmittern und ihren Metaboliten sowie Hydroxylradikalmarkern



Das Chromatogramm zeigt einen Standard mit einer Konzentration von 5 x 10^{-7} mol/l. Diese Methode ermöglicht die Trennung von Dopamin, DOPAC, HVA, Serotonin und 5-HIAA sowie den Hydroxylradikalmarkern 2,3- und 2,5-DHBA innerhalb von 20 Minuten.

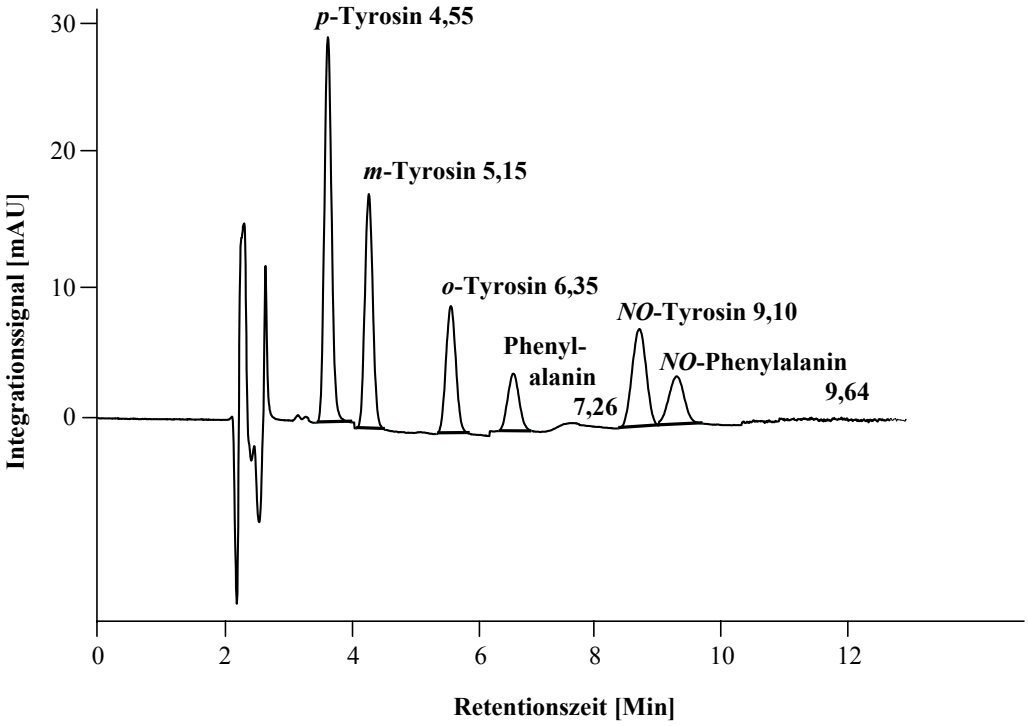
2.5.1.1 Technische Daten

Degasser	A 260, Carnegie Medicin, Stockholm, Schweden	
Pumpe	Waters 616, Waters, Milford, USA oder	
	M 300, Gynkotek, Germering	
Flussrate	0.5 ml/min	
Autosampler	Waters 717 plus mit Kühlmodul, West Lafayette, USA	
Temperatur im Probenraum	4°C	
Injektionsvolumen	20 μl	
Säule	Vertex 125 x 3 mm mit Vorsäule 5 x 3 mm,	
	Nucleosil 120 - 3 C 18, Knauer, Berlin	
Detektor	elektrochemisch, BAS LC 4B,	
	Bioanalytical Systems, West Lafayette, USA	
Arbeitselektrode	Glassy-Carbon, BAS, West-Lafayette, USA	
Referenzelektrode	Ag/AgCl, BAS, West Lafayette, USA	
Detektorempfindlichkeit	1 nA/V (Mikrodialyse/Gewebe)	
	2 nA/V (Gewebe)	
Oxidationspotential	+ 750 mV	
Temperatur der Messzelle	22°C	
Mobile Phase	Octansulfonsäure-Natriumsalz (Ionenpaarreagenz)	0.14 g
(Puffer)	Dinatrium-EDTA	0.10 g
	Triethylamin	6 ml
	Phosphorsäure zum Einstellen von	pH 2,95
	Millipore® Wasser	ad 1000 ml
	Acetonitril	35 ml

2.5.2 Methode zur Bestimmung der Hydroxylradikalmarker *o*-, *m*- und *p*-Tyrosin sowie der Peroxynitritmarker *NO*-Phenylalanin und *NO*-Tyrosin

Mittels RP-Chromatographie können die Produkte des Phenylalanin-Assays unter isokratischen Bedingungen bestimmt werden (Abb. 2.6).

Abb. 2.6: Beispielchromatogramm für die Trennung der Hydroxylradikalmarker *o*-, *m*- und *p*-Tyrosin sowie der Peroxynitritmarker *NO*-Tyrosin und *NO*-Phenylalanin



Die Trennung der Substanzen konnte innerhalb von 13 Minuten erreicht werden. Für die Abbildung wurde ein optimaler Integrationspfad gelegt, d.h. für jede Substanz wurde die optimale Messwellenlänge eingestellt. Gezeigt ist ein Standard mit einer Konzentration von 10^{-6} *mol/l.*

2.5.2.1 Technische Daten

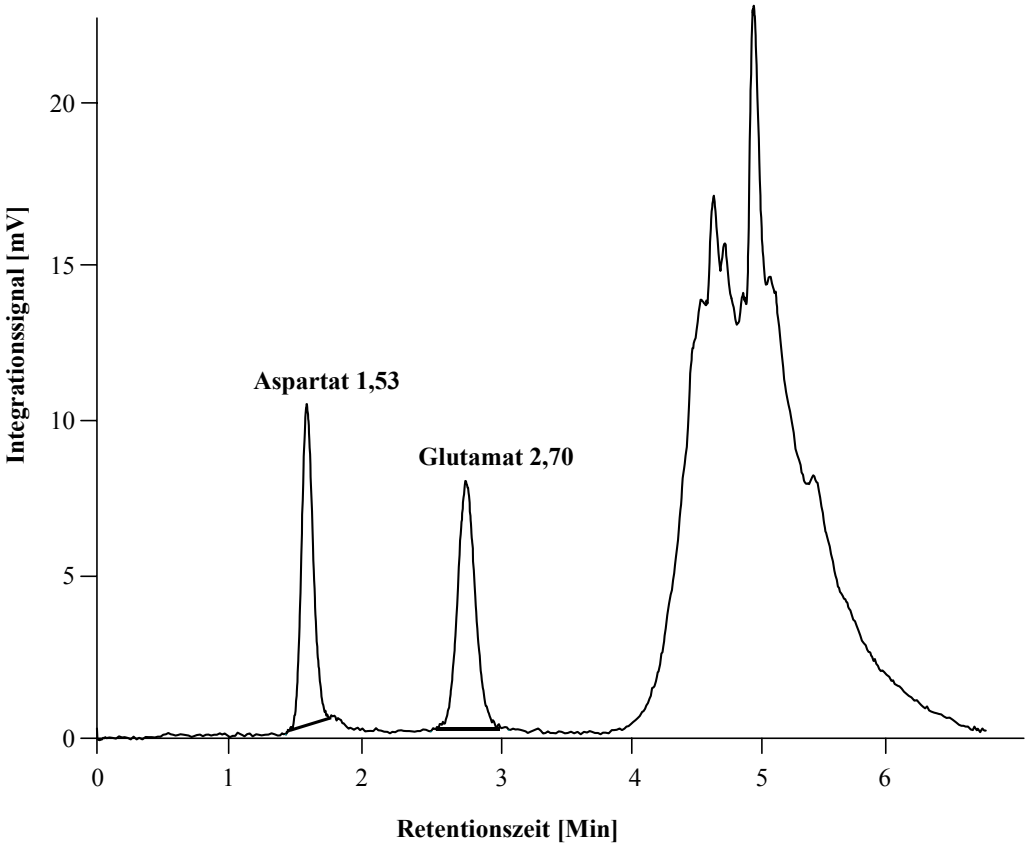
Pumpe	P 580 mit internem Degasser, Gynkotek, Germering	
Flussrate	1.0 ml/min	
Autosampler	Gina 50 mit Kühlmodul, Dionex, Germering	
Temperatur Probenteller	5°C	
Injektionsvolumen	35 μl	
Säule	Vertex 250 x 4 mm mit Vorsäule 5 x 4 mm,	
	Nucleosil 100 C 18, Knauer, Berlin	
Säulenthermostat	STH 585, Dionex, Germering	
Säulentemperatur	45°C	
Detektor	Photodiodenarray-Detektor UVD 340S, Dionex, Germering	
	$\lambda_1 = 225$ nm	
	$\lambda_2 = 275$ nm	
Mobile Phase	Kaliumdihydrogenphosphat	6.8 g
(Puffer)	Phosphorsäure zum Einstellen von	pH = 3.15
	Millipore® Wasser	ad 1000 ml
	Methanol	85 ml

2.5.3 Methode zur Bestimmung von Aminosäuren

Die Aminosäuren Glutamat und Aspartat können nach Vorsäulenderivatisierung mit *o*-Phthalaldehyd (OPA) über einen Mehrschrittgradienten mit Fluoreszenzdetektion erfasst werden (Abb. 2.8).

Da der OPA-Aminosäure-Komplex in saurer Lösung nicht beständig ist, wurde Millipore® Wasser anstelle von Perchlorsäure zum Verdünnen der Proben verwendet.

Abb. 2.8: Beispielchromatogramm für die Bestimmung von Glutamat und Aspartat



Durch den lineraren Gradienten konnte eine Trennung der Substanzen innerhalb von 7 Minuten erreicht werden. Die Abbildung zeigt einen Standard mit einer Konzentration von 10^{-6} mol/l.

2.5.3.1 Technische Daten

Degasser 4-Kanal-Degasser, Knauer, Berlin

Pumpe P 580, Dionex, Germering

Flussrate 1.0 ml/min

Gradientenprogramm lineares Gradientenprogramm zum "Spülen" der Säule:

Zeitpunkt [Min.]	FM A [%]	FM B [%]	Flussrate [ml/min]
0	95	5	1.0
2	95	5	1.0
3	0	100	1.5
4	0	100	1.5
5	95	5	1.0

Säule Vertex 60 x 4 mm mit Vorsäule 5 x 4 mm,
Nucleosil 120 C 18, Knauer, Berlin

Autosampler Gilson/Abimed 401/231, Abimed Analysentechnik GmbH, Langenfeld

Temperatur Probenraum 22°C

Injektionsvolumen 10 μl (5 μl Probe + 5 μl OPA-Reagenz)

Reaktionszeit 120 Sek.

Detektor Fluoreszensdetektor, RF-535 Schimadzu, Kyoto, Japan

Extinktionswellenlänge $\lambda = 340$ nm

Emissionswellenlänge $\lambda = 450$ nm

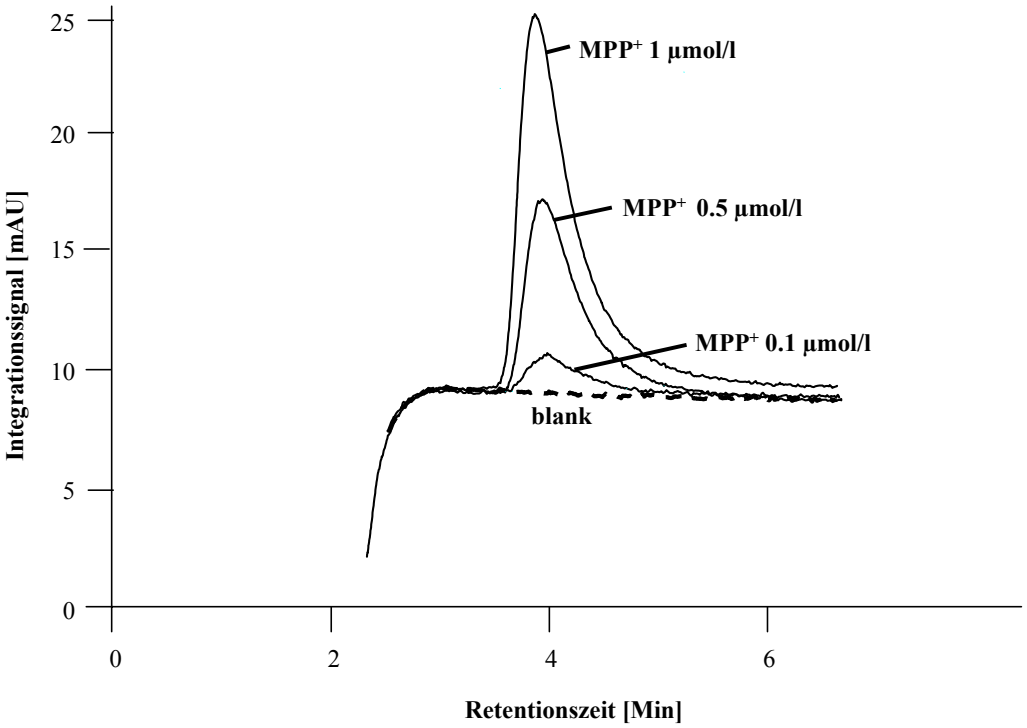
Mobile Phase A	Natriumacetat* 3 H_2O	27.22 g
(Puffer)	Essigsäure zum Einstellen von	pH = 6.95
	Millipore® Wasser	ad 2000 ml
	Methanol	220 ml

Mobile Phase B Methanol 100%

2.5.4 Methode zur Bestimmung von MPP^+

MPP^+, der aktive Metabolit des Neurotoxins MPTP, kann aufgrund seines Phenylrings mittels UV-Detektion bestimmt werden. Die Methode wurde nach Langston et al. [1984] entwickelt (Abb. 2.7).

Abb. 2.7: Eichreihe für die Bestimmung von MPP^+



Das Chromatogramm zeigt eine Eichreihe für die Bestimmung von MPP^+ mit Konzentrationen von 10^{-6}, 5 x 10^{-7} und 10^{-7} mol/l. Die Substanz erscheint mit einer Retentionszeit von 4.17 Minuten.

2.5.4.1 Technische Daten

Degasser	4-Kanal-Degasser, Knauer, Berlin	
Pumpe	Beckmann 114 M, Solvent Delivery Modul, USA	
Flussrate	1ml/min	
Autosampler	Gilson/Abimed 401/231, Abimed Analysentechnik GmbH, Langenfeld	
Probentemperatur	22°C	
Injektionsvolumen	20 μl	
Säule	Vertex 250 x 4 mm mit Vorsäule 5 x 4 mm,	
	Nucleosil 100 C 18, Knauer, Berlin	
Detektor	UV-Detektor ERC 7210, Alteglofsheim	
	λ = 295 nm	
Mobile Phase	Kaliumdihydrogenphosphat	2.722 g
(Puffer)	Phosphorsäure zum Einstellen von	pH = 2.5
	Millipore® Wasser	ad 1000 ml
	Acetonitril	697 ml

2.5.5 Herstellung der Fließmittel

Für die Herstellung der Fließmittel wurden die Substanzen in Millipore® Wasser zu 1000 ml gelöst und der pH-Wert mit der angegebenen Säure eingestellt. Diese Pufferlösung wurde durch einen Membranfilter mit einer Porenweite von 0.45 μm filtriert. Anschließend wurde die angegebnene Menge Lösungsmittel in einem Meßkolben vorgelegt und mit der Pufferlösung zum Eichstrich aufgefüllt. Das Fließmittel wurde bei 4°C gelagert und wöchentlich frisch hergestellt.

2.6 Experimentelle Parkinson-Modelle

2.6.1 MPTP-Modell

Für das MPTP-Modell hat sich der Mäusestamm C57BL/6 als der empfindlichste und selektivste bezogen auf die Schädigung nigrostriataler, dopaminerger Neurone herausgestellt und wurde aus diesem Grund für die Versuche eingesetzt.

Innerhalb dieses Modells stehen mehrere Behandlungsschemata zur Verfügung, die unterschiedlich starke Schädigungen verursachen:

Modell für präsymptomatischen Morbus Parkinson:

Die akute Behandlung mit einer niedrigen Dosis an MPTP (1 x 10 - 20 mg/kg) [Aubin et al., 1998] eignet sich vor allem zur Studie kompensatorischer Mechanismen und wurde aufgrund der schwachen Neurodegeneration nicht eingesetzt.

Akutes Parkinson-Modell mit rapider Neurodegeneration und nekrotischem Zelltod:

Die akute Behandlung mit einer hohen Dosis an MPTP (1 - 4 x 20 - 40 mg/kg im Abstand von jeweils 2 Stunden) [Jackson-Lewis et al., 1995] erzielt eine Schädigung der Neurone von ca. 60%. Dieses Modell führt zu einer rapiden Neurodegeneration mit vorwiegend nekrotischem Zelltod und dient vor allem der Untersuchung pathologischer Mechanismen und therapeutischer Ansatzpunkte.

Anfangs wurde dieses Modell mit Dosierungen von 1 x 30 mg/kg MPTP s.c. eingesetzt, später aber aufgrund der einfacheren Handhabung auf 1 x 40 mg/kg MPTP mit intraperitonealer Injektion umgestellt.

Subchronisches Parkinson-Modell mit verzögerter Degeneration und apoptotischem Zelltod:

Die subchronische MPTP-Behandlung (1 - 2 x 20 - 30 mg/kg, 5 Tage) [Tatton und Kish, 1997] bedingt eine langsame Neurodegeneration mit vorwiegend apoptotischem Zelltod.

Progressives chronisches Parkinson-Modell:

Die chronische MPTP-Behandlung (1 x 4 - 10 mg/kg, 20 Tage) [Bezard et al., 1997] führt zu einer progressiven Degeneration und stellt eine bessere Annäherung an den Pathomechanismus des Morbus Parkinson dar.

Während der Anwendung von MPTP wurde aufgrund seiner enormen Toxizität auf einen hohen Sicherheitsstandard geachtet (doppelte Handschuhe, geschlossener Laborkittel und beim Herstellen der Lösungen ein Mundschutz). Alle Kontaktgegenstände einschliesslich der Tierkäfige wurden mit Klorix-Lösung (Inhaltsstoff: Hypochlorit) abgespült, die verbliebenes MPTP oxidiert [Przedborski et al., 2001].

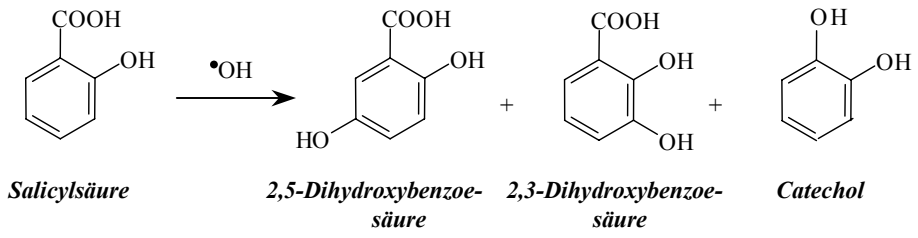
2.6.2 Neurostimulation

Die lokale Stimulation der Neurotransmitter-Freisetzung erfolgte mittels reverser Mikrodialyse (siehe Kap. 2.4.2) unilateral im Striatum von Mäusen und Ratten sowie bilateral in der Substantia nigra der Ratte.

Zusätzlich wurden der Dialysierflüssigkeit Salicylsäure [Floyd et al., 1984; Grootveld und Halliwell, 1986] oder D-Phenylalanin [Themann et al., 2001] zugesetzt, um Effekte auf die Radikalbildung detektieren zu können (Abb. 2.9/2.10).

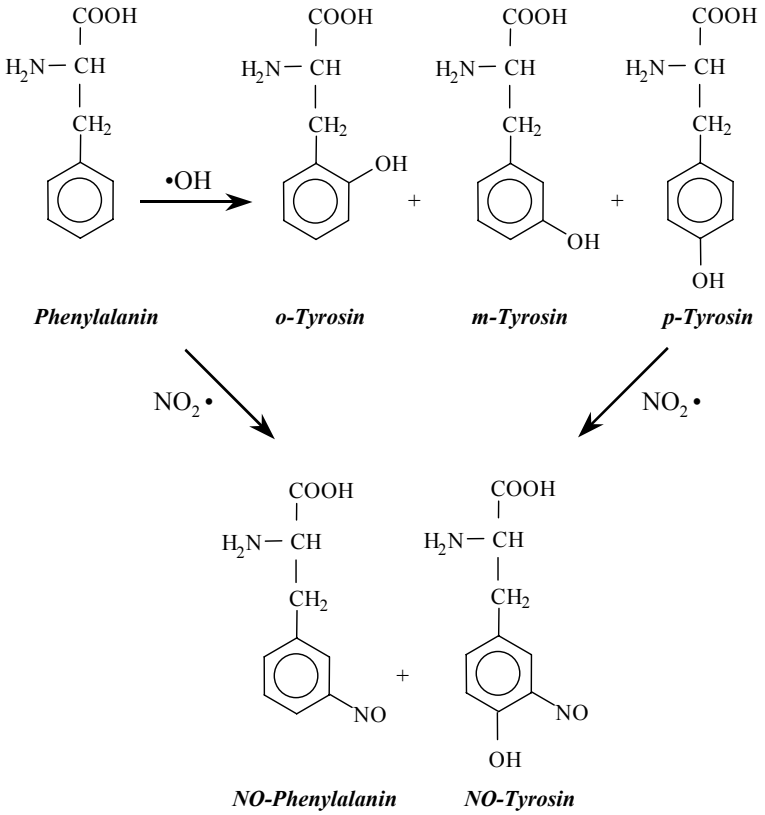
	Zusatz	**Menge**	**Markierung**	**Messvariable**
Salicylat-Assay	Na-Salicylat	5 mM	Hydroxylradikale	2,3- und 2,5-DHBA
Phenylalanin-Assay	D-Phenylalanin	5 mM	Hydroxylradikale	*o*-, *m*-, *p*-Tyrosin
			Peroxynitrit	*NO*-Tyrosin
				NO-Phenylalanin

Abb. 2.9: Reaktionsmechanismus des Salicylat-Assays



Durch die hohe Reaktivität der Hydroxylradikale kommt es zu Hydroxylierungen des Phenylrings der Salicylsäure, wodurch in erster Linie 2,5- und 2,3-DHBA und Catechol entstehen.

Abb. 2.10: Reaktionsmechanismus des Phenylalanin-Assays



Bei Zusatz von Phenylalanin zur Ringerlösung entstehen o-, m- *und* p-*Tyrosin durch Hydroxylierungsreaktionen sowie* NO-*Tyrosin und* NO-*Phenylalanin durch Nitrierungsreaktionen.*

2.6.2.1 6-OHDA

Um einen frühzeitigen Zerfall der Substanz durch seine starke Lichtempfindlichkeit zu vermeiden, wurde 6-OHDA der Dialysierflüssigkeit erst unmittelbar vor der Stimulationsphase zugesetzt und während des gesamten Versuches durch Folie vor einfallendem Licht geschützt. Es wurden Konzentrationen von 1 und 10 mM an Mäusen untersucht.

2.6.2.2 MPP^+

Für die lokale Applikation konnte direkt der toxische MPTP-Metabolit MPP^+ verwendet werden, da die Bluthirnschranke umgangen wurde. Die Messungen an Mäusen erfolgten mit MPP^+-Konzentrationen von 10, 50 und 100 mM.

2.6.2.3 3-Nitropropionsäure, Malonsäure und Tyramin

Zur Stimulation wurden für 3-Nitropropionsäure Konzentrationen von 10 und 100 mM, für Malonsäure von 10 mM und für Tyramin von 1, 10 und 100 mM eingesetzt.

2.6.2.4 Kalium-Stimulation

Die Stimulation der Neurotransmitter-Freisetzung durch eine Erhöhung der Kaliumionenkonzentration auf 100 mM in der Dialysierflüssigkeit bedurfte der entsprechenden Absenkung der Natriumionenkonzentration (Tab. 2.3).

Tab. 2.3: Zusammensetzung der Perfusionslösung für die Kalium-Stimulation

	Menge [mM]
$\mathbf{Na^+}$	51.0
$\mathbf{K^+}$	100.0
$\mathbf{Ca^{2+}}$	1.3
$\mathbf{Mg^{2+}}$	1.0
$\mathbf{Cl^-}$	155.6

2.7 Verhaltensparameter

Als funktionelle Parameter wurden im MPTP-Modell die lokomotorische Aktivität und die Koordinationsfähigkeit bestimmt.

2.7.1 Lokomotorische Aktivität

Am Tag vor der Behandlung wurde die Ausgangslokomotion bestimmt, um individuelle Unterschiede festzustellen und die Gruppen auf einen einheitlichen Ausgangswert einzustellen. Der Test am Tag nach der MPTP-Behandlung lieferte den funktionellen Parameter der Erholung ("recovery") gegenüber der MPTP-Behandlung.

System 1

Sechs Messkäfige (Masse: 50 x 50 x 35 cm) mit jeweils 8 Lichtschranken 2 cm oberhalb des Käfigbodens waren mit einem IBM-Computer verbunden. Dieser registrierte die horizontalen Bewegungen der Tiere durch die Unterbrechung der Lichtschranken während eines Messzeitraumes von 30 oder 60 Minuten (Messfrequenz 50 Hz). Die lokomotorische Aktivität wurde von Einzeltieren bestimmt, denen vor Beginn der Messung eine 5 minütige Habituationszeit gewährt wurde.

System 2

In einem Messkäfig (Masse: 23 x 35 x 20 cm) (Activity Cage, Ugo Basile, Biological Research Apparatus, Varese, Italien) wurden die horizontalen Bewegungen der Versuchstiere über elektrische Impulse vom Käfigboden aus gemessen. Ein Zähler nahm die Bewegungen in 1-Minuten-Intervallen auf, die über 15 Minuten addiert wurden. Auch hier wurde den Tieren vor der Messung eine Eingewöhnungszeit von 5 Minuten gewährt.

2.7.2 Rotarod (Drehstab)

Das Rotarod (Constant Speed Model, Ugo Basile, Biological Research Apparatus, Varese, Italien) misst die motorische Koordination von Vorder- und Hinterläufen. Gemessen wird die Zeit, während der die Tiere auf dem rotierenden Stab balancieren können. Zur Vorbereitung wurden die Tiere bei einer konstanten Geschwindigkeit von 24 UPM über einen Zeitraum von maximal 240 Sekunden trainiert, so dass alle Tiere am Tag vor der Behandlung eine Zeit von 180 Sekunden bei einer Geschwindigkeit von 24 UPM erreichten. An den Tagen nach der MPTP-Behandlung hatte jedes Tier 5 Laufversuche, von denen aber nur die höchste Zeit in das Ergebnis einging.

2.8 Statistik

Die Ergebnisse sind als Mittelwerte ± Standardfehler der Mittelwerte (SEM) aus n Tieren angegeben.

Nach der Prüfung auf Normalverteilung (Bartlett-Test auf Varianzhomogenität) wurden die Daten mittels einfaktorieller Varianzanalyse und nachfolgendem Duncan-, Bonferroni- oder Tukey-Test statistisch ausgewertet. Wiederholte Messungen wurden mittels zweifacher Varianzanalyse auf Signifikanzen geprüft.

Das Signifikanzniveau wurde auf $p < 0.05$ festgelegt und für den Vergleich mit der Kontrolle als Stern (*) oder mit Gruppen anderer Dosierungen als Kreuz (#) gekennzeichnet.

Die Untersuchung der Korrelation erfolgte mittels linearer Regressionsanalyse. Der Korrelationskoeffizient r nach Pearson wurde zur Beurteilung der Beziehung zwischen x- und y-Werten berechnet, wobei R^2 als das Bestimmtheitsmass der Regressionsfunktion gilt.

Kapitel 3

Ergebnisse

3.1 Aufbau analytischer Methoden

3.1.1 Umstellung der HPLC-Analytik zur Bestimmung der Neurotransmitter auf ein neues Fliessmittel

Acetonitril wird aufgrund seiner kanzerogenen und teratogenen Eigenschaften als Gefahrstoff eingestuft, für dessen Verwendung spezielle Sicherheitsmassnahmen zu beachten sind. Die Bestimmung von Dopamin, DOPAC, HVA, Serotonin und 5-HIAA sowie den Hydroxylradikalmarkern 2,3- und 2,5-DHBA (siehe Kap. 2.5.1) sollte aus diesem Grund auf ein neues Fliessmittel auf Methanolbasis umgestellt werden (Tab. 3.1).

Tab. 3.1: Vorgegebene Zusammensetzung der mobilen Phase auf Methanolbasis

	Menge
Zitronensäure	64.5 mM
Natriumacetat (wasserfrei)	55.3 mM
Natriumhydroxid	100 mM
Dinatrium-EDTA	2.21 mM
Octansulfonsäure Na^+-Salz	0.28 mM
Millipore® Wasser	ad 2000 ml
Methanol	10%
pH-Wert	5.0

Diese Zusammensetzung führte jedoch zu keiner ausreichenden Trennung. Daraufhin wurden Veränderungen der folgenden Variablen auf eine bessere Trennung untersucht:

(1) Art des Ionenpaarreagenzes
(2) pH-Wert
(3) Methanolgehalt

Nach Austausch des Ionenpaarreagenzes Octansulfonsäure durch Heptansulfonsäure und Reduktion der eingesetzten Menge auf 0.1 mM veränderten sich die Retentionszeiten und die Reihenfolge der detektierten Substanzen derart, dass durch Senkung des pH-Wertes auf 4.1 und des Methanolgehaltes auf 3.5% eine mit der in Kapitel 2.5.1 beschriebenen Methode vergleichbare Trennung erreicht wurde (Tab. 3.2/Tab. 3.3).

Tab. 3.2: Zusammensetzung der mobilen Phase mit optimalem Trennergebnis

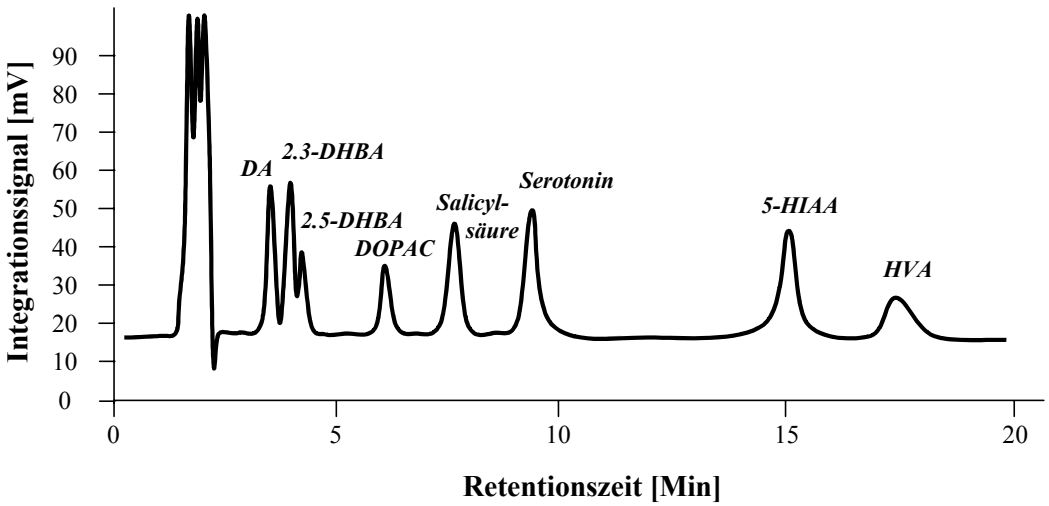
	Menge
Zitronensäure	64.5 mM
Natriumacetat (wasserfrei)	55.3 mM
Natriumhydroxid	100 mM
Dinatrium-EDTA	2.21 mM
Heptansulfonsäure Na^+-Salz	0.10 mM
Millipore® Wasser	ad 2000 ml
Methanol	3.5%
pH-Wert	4.1

Die unter elektrochemischer Detektion nur als negativer Peak erscheinende Salicylsäure konnte in diesem Versuch durch den Einsatz eines UV-Detektors direkt mitbestimmt werden. Ihre Retentionszeit verkürzte sich von 32 auf 7.5 Minuten (Abb. 3.1).

Tab. 3.3: Retentionszeiten der Substanzen bei Bestimmung mittels mobiler Phase auf Methanolbasis

Retentionszeit [min]	**Peak**
3.430	Dopamin
3.873	2,3-DHBA
4.124	2,5-DHBA
5.993	DOPAC
7.550	Salicylsäure
9.303	Serotonin
15.007	5-HIAA
17.573	HVA

Abb. 3.1: Beispielchromatogramm der neuen mobilen Phase auf Methanolbasis



Beispielchromatogramm für die Bestimmung von Dopamin (DA), DOPAC, HVA, Serotonin, 5-HIAA, 2,3-DHBA, 2,5-DHBA und Salicylsäure unter Verwendung des neuen Fliessmittels auf Methanolbasis.
Zusammensetzung der mobilen Phase: Zitronensäure 64.5 mM, Natriumacetat (wasserfrei) 55.3 mM, Natriumhydroxid 100 mM, Dinatrium-EDTA 2.21 mM, Heptansulfonsäure 0.1 mM, Millipore® Wasser ad 2000 ml, 3.5% Methanol. Der pH-Wert wurde mit Essigsäure auf 4.1 eingestellt.

3.1.2 Aufbau der MPP^+-Bestimmung

Um die neuroprotektiven Effekte von Arzneistoffen im MPTP-Modell gegen Veränderungen des MPTP-Metabolismus abzugrenzen, sollte eine Methode zur Bestimmung von MPP^+, dem toxischen MPTP-Metaboliten, etabliert werden. Ausgehend von [Langston et al., 1984] wurde die in Kapitel 2.5.4 beschriebene Analytik entwickelt.

3.2 Charakterisierung des MPTP-Modells

3.2.1 Vergleich verschiedener MPTP-Maus-Modelle

Zur Charakterisierung des MPTP-Maus-Modells wurden 3 akute Standard-Behandlungsschemata im Vergleich untersucht:

		Dosierung [**mg/kg Körpergewicht**]	**Applikationsart**
(1)	akutes Modell	1 x 30	s.c.
(2)	akutes Modell	1 x 40	i.p.
(3)	akutes Modell	4 x 20 alle 2 h	i.p.

Bestimmt wurden funktionelle, physiologische, neurochemische und immuncytochemische Parameter nach der Behandlung von C57BL/6-Mäusen.

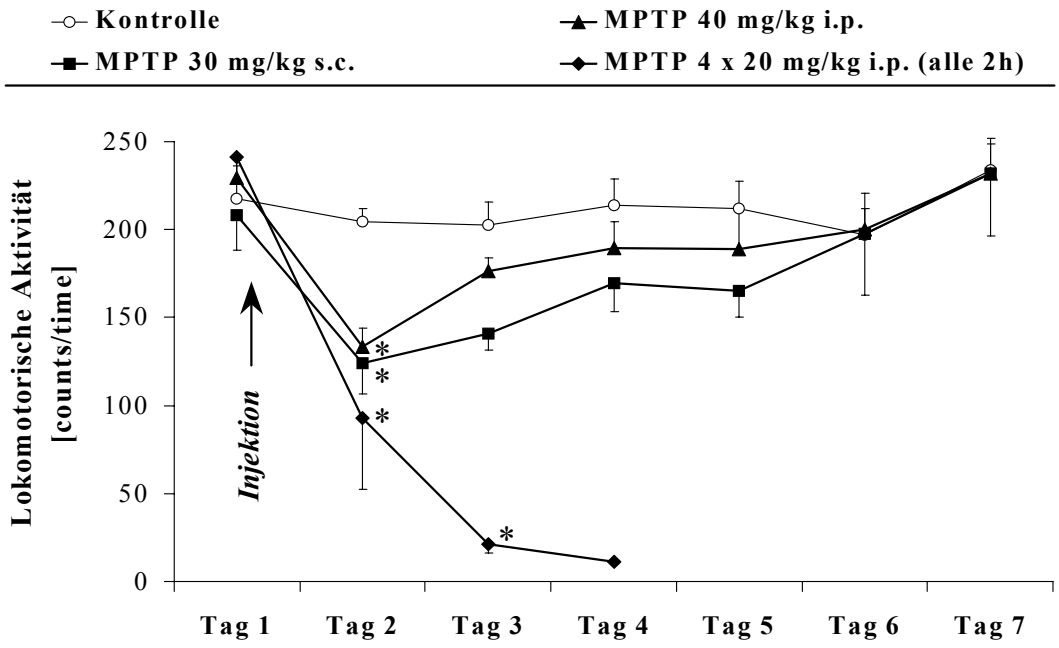
3.2.1.1 Funktionelle Parameter

Lokomotorische Aktivität

Die lokomotorische Aktivität war einen Tag nach der MPTP-Behandlung in den akuten Gruppen mit einmaliger Injektion von 30 mg/kg MPTP s.c. oder 40 mg/kg MPTP i.p. auf etwa 60% signifikant erniedrigt; die Tiere erholten sich jedoch innerhalb von zwei Tagen wieder bis auf das Kontrollniveau.

Nach Applikation von 4 x 20 mg/kg MPTP i.p. (alle 2 h) trat eine progressive und lang anhaltende Hypokinese auf (Abb. 3.2).

Abb. 3.2: MPTP-induzierte Veränderungen der lokomotorischen Aktivität



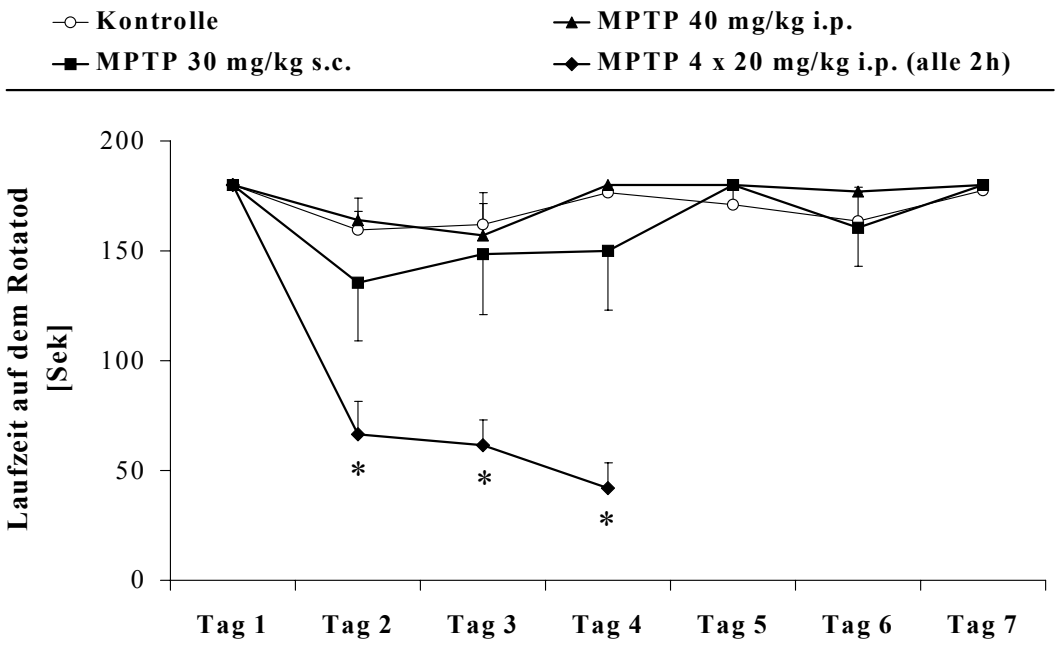
Effekte der akuten Applikation von MPTP (1 x 30 mg/kg s.c., 1 x 40 mg/kg i.p. und 4 x 20 mg/kg i.p. im Abstand von je 2 h) auf die lokomotorische Aktivität von C57BL/6-Mäusen. Gemessen wurde je eine 30-minütige Sitzung täglich.
Dargestellt sind Mittelwerte ± SEM von n = 6 - 10 Tieren. Die statistische Auswertung im Vergleich mit der Kontrollgruppe erfolgte mittels Varianzanalyse und nachfolgendem Duncan's-Test ($p < 0.05$).*
Die letzten Werte der mehrfach behandelten Gruppe wurden aus der statistischen Bewertung ausgeschlossen, da keine ausreichende Gruppengrösse mehr gewährleistet war.

Koordination

In den akuten Gruppen mit einmaliger Injektion von 30 mg/kg MPTP s.c. oder 40 mg/kg MPTP i.p. zeigte sich keine signifikante Abnahme der motorischen Koordination gemessen als Laufzeit auf dem Rotarod (siehe Kap. 2.7.2).

Nach Applikation von 4 x 20 mg/kg MPTP i.p. (alle 2 h) nahm die Fähigkeit auf dem Stab zu balancieren jedoch drastisch ab (Abb. 3.3).

Abb. 3.3: MPTP-induzierte Defizite in der Bewegungskoordination



Effekte der akuten Applikation von MPTP (1 x 30 mg/kg s.c., 1 x 40 mg/kg i.p. und 4 x 20 mg/kg i.p. im Abstand von je 2 h) auf die motorische Koordination von C57BL/6-Mäusen. Gemessen wurde die Zeit, während der die Tiere auf dem rotierenden Stab balancieren konnten. Zur Vorbereitung wurden die Tiere bei einer konstanten Geschwindigkeit von 24 UPM über einen Zeitraum von maximal 240 Sekunden trainiert, so dass alle Tiere am Tag vor der Behandlung eine Zeit von 180 Sekunden auf dem Drehstab erreichten.
Dargestellt sind Mittelwerte ± SEM von n = 6 - 10 Tieren. Die statistische Auswertung im Vergleich mit der Kontrollgruppe erfolgte mittels Varianzanalyse und nachfolgendem Duncan's-Test ($p < 0.05$).*
Die letzten Werte der mehrfach behandelten Gruppe wurden aus der Abbildung herausgenommen, da keine ausreichende Gruppengrösse mehr gewährleistet war.

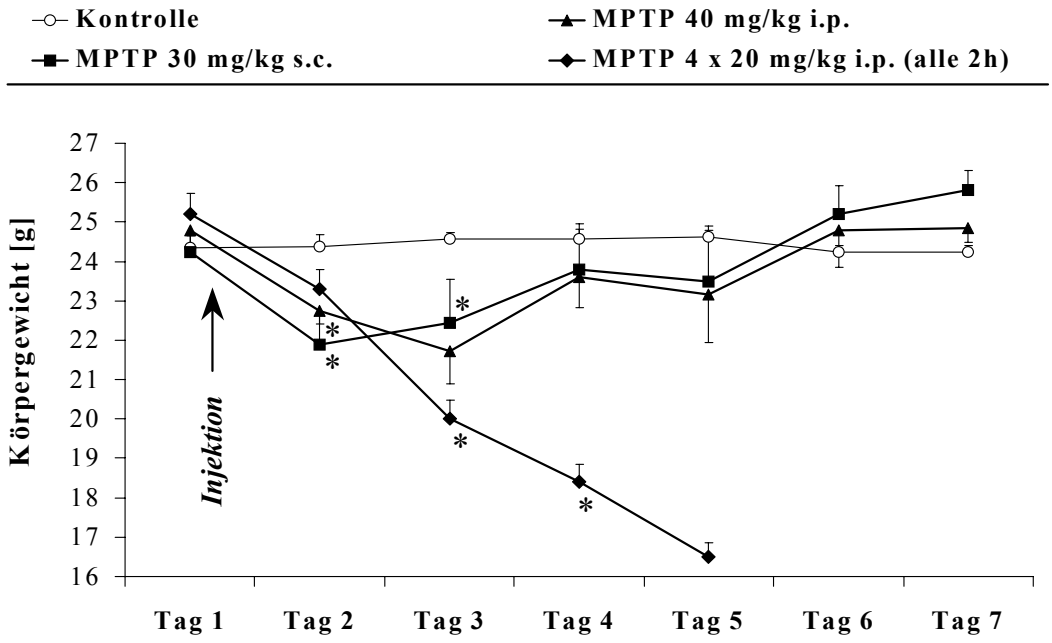
3.2.1.2 Physiologische Parameter

Körpergewicht

Das Körpergewicht sank nach Injektion von 1 x 30 mg/kg MPTP s.c. oder 1 x 40 mg/kg MPTP i.p. um etwa 7%. Dieser Effekt war am 2. bzw. 3. Versuchstag signifikant, an den folgenden Tagen nahmen die Tiere wieder an Gewicht zu.

Die Applikation von 4 x 20 mg/kg MPTP i.p. (alle 2 h) bedingte einen lebensbedrohlichen Gewichtsverlust (Abb. 3.4).

Abb. 3.4: Effekte der MPTP-Behandlung auf das Körpergewicht



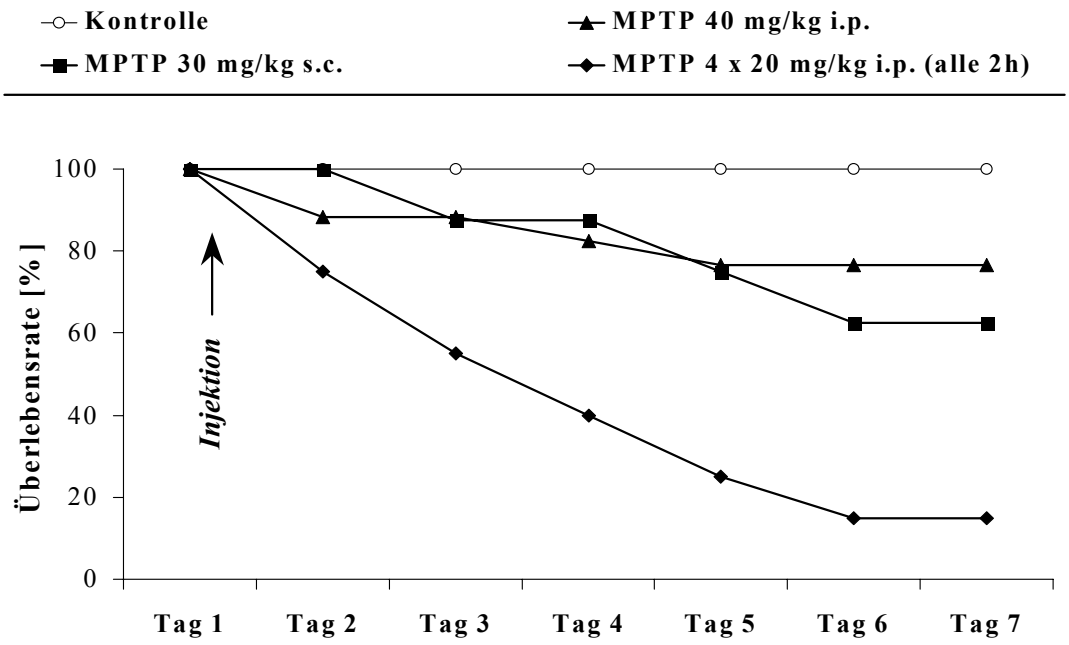
Auswirkungen der akuten Applikation von MPTP (30 mg/kg s.c., 40 mg/kg i.p. und 4 x 20 mg/kg i.p. im Abstand von je 2 h) auf das Körpergewicht von C57BL/6-Mäusen. Dargestellt sind Mittelwerte ± SEM von n = 6 - 10 Tieren. Die statistische Auswertung im Vergleich mit der Kontrollgruppe erfolgte mittels Varianzanalyse und nachfolgendem Duncan's-Test ($p < 0.05$).*
Die letzten Werte der mehrfach behandelten Gruppe wurden aus der statistischen Bewertung ausgeschlossen, da keine ausreichende Gruppengrösse mehr gewährleistet war.

Mortalität nach MPTP

Im akuten Modell zeigte sich für beide Dosierungen eine vergleichbare Überlebensrate von 60 - 70% (Abb. 3.5).

Das in der Literatur sehr häufig aufgeführte Modell mit einer Dosierung von 4 x 20 mg/kg MPTP i.p. hingegen erwies sich aufgrund einer unerwartet hohen Mortalität von 85% als unbrauchbar und wird daher im folgenden nicht mehr aufgeführt.

Abb. 3.5: Mortalität nach MPTP-Behandlung



Gezeigt wird die Überlebensrate von C57BL/6-Mäusen im Zeitverlauf nach akuter Applikation von MPTP (1 x 30 mg/kg s.c., 1 x 40 mg/kg i.p. sowie 4 x 20 mg/kg i.p. im Abstand von jeweils 2 h).
Dargestellt sind die jeweiligen Zahlen der überlebenden Tiere als Prozent der ursprünglichen Gruppengrösse.

3.2.1.3 Neurochemische Parameter

Dopamin und seine Metabolite

Eine Woche nach der Behandlung mit MPTP wurden die Gehirne entnommen und die striatalen Gewebespiegel von Dopamin und seinen Metaboliten DOPAC und HVA mittels HPLC bestimmt (Tab. 3.4).

Tab. 3.4: Striatale Spiegel von Dopamin, DOPAC und HVA

	Dopamin [ng/mg]	**DOPAC** [ng/mg]	**HVA** [ng/mg]
Kontrolle	9.27 ± 0.61	0.55 ± 0.03	0.44 ± 0.03
MPTP 30 mg/kg s.c.	3.38 ± 0.57	0.20 ± 0.06	0.22 ± 0.06
MPTP 40 mg/kg i.p.	4.26 ± 1.07	0.26 ± 0.01	0.29 ± 0.04

Die Gewebewerte von Dopamin wurden durch Behandlung mit 1 x 30 mg/kg MPTP s.c. auf 36.4% (von 9.27 ± 0.61 auf 3.38 ± 0.57 ng/mg Nassgewebegewicht) und mit 1 x 40 mg/kg MPTP i.p. auf 45.9% (von 9.27 ± 0.61 auf 4.26 ± 1.07 ng/mg Nassgewebegewicht) signifikant gesenkt.

Ebenfalls signifikant erniedrigt waren die Dopamin-Metabolite DOPAC (von 0.55 ± 0.03 auf 0.20 ± 0.06 ng/mg Nassgewebegewicht bei 30 mg/kg MPTP s.c. bzw. von 0.55 ± 0.03 auf 0.26 ± 0.01 ng/mg Nassgewebegewicht bei 40 mg/kg MPTP i.p.) und HVA (von 0.44 ± 0.03 auf 0.22 ± 0.06 ng/mg Nassgewebegewicht bei 30 mg/kg MPTP s.c. bzw. von 0.44 ± 0.03 auf 0.29 ± 0.04 ng/mg Nassgewebegewicht bei 40 mg/kg MPTP i.p.) (Abb. 3.6 A-C).

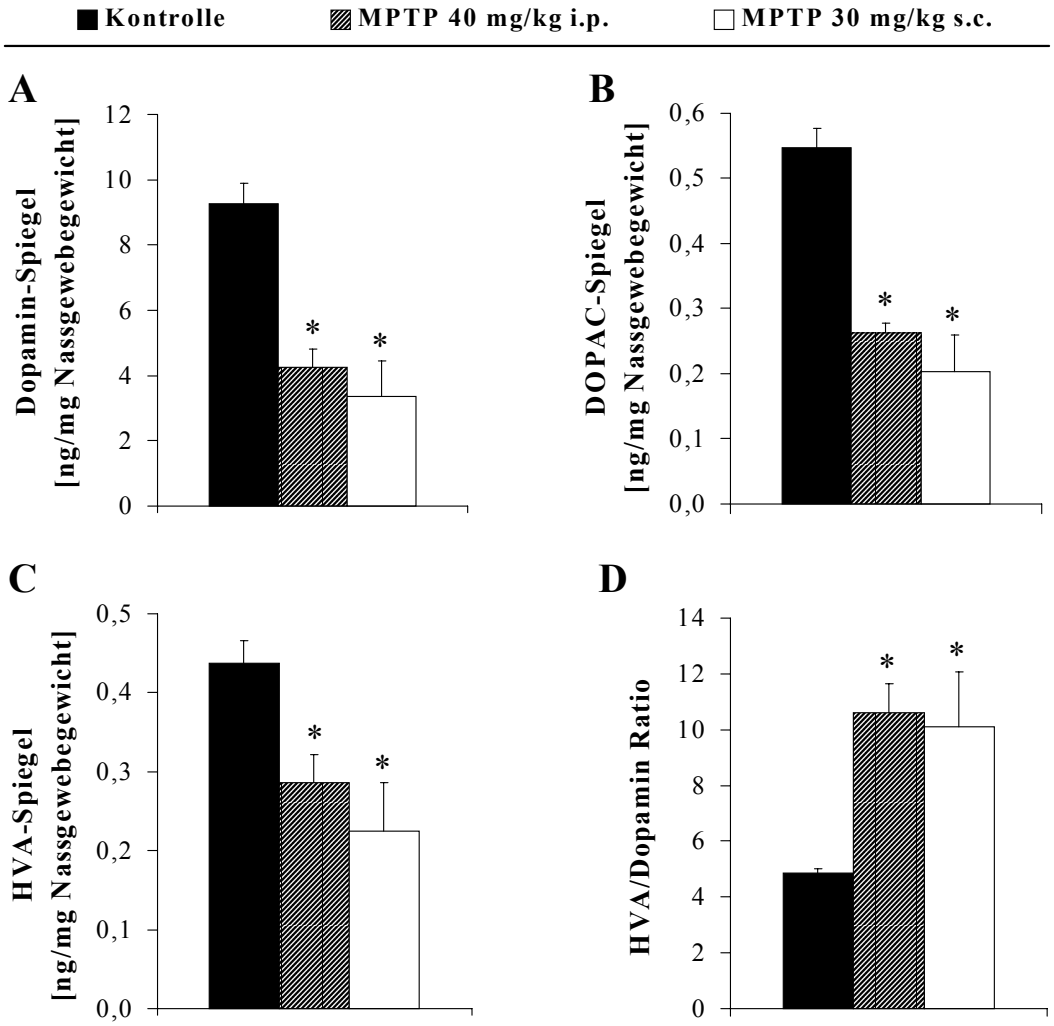
Für den Quotienten HVA/Dopamin als Marker der MPTP-induzierten kompensatorischen Erhöhung des Dopamin-Umsatzes ergab sich ein Faktor von 2.5 in beiden Gruppen (Abb. 3.6 D).

3.2.1.4 Histologische Parameter

Tyrosinhydroxylase-Immunreaktivität in der Substantia nigra

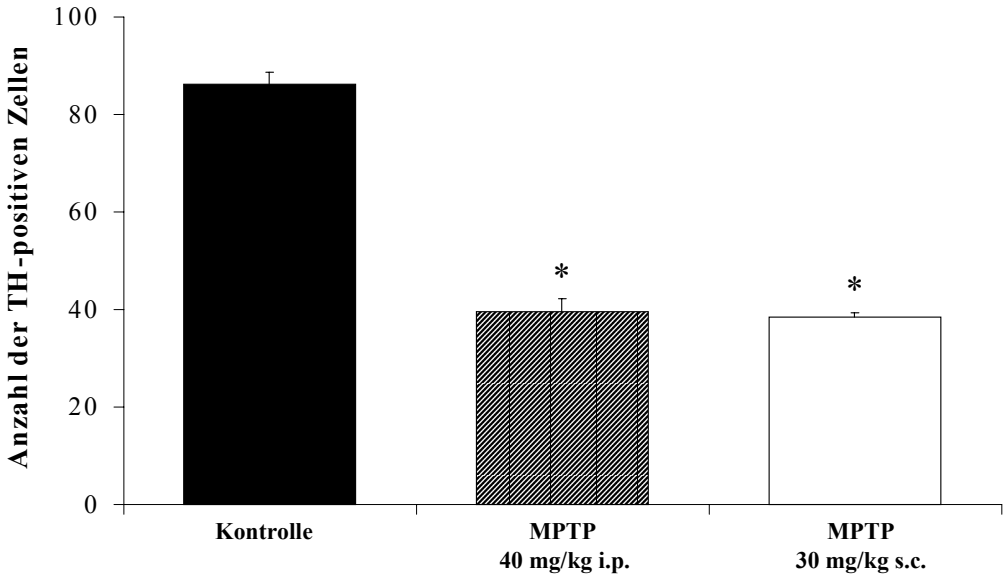
Die Behandlung mit MPTP führte zu einer signifikanten Abnahme der Tyrosinhydroxylase-Aktivität in der SNc um etwa 46% (MPTP 40 mg/kg i.p.) und 45% (MPTP 30 mg/kg i.p.) verglichen mit den Kontrollen (Abb. 3.7).

Abb. 3.6: Striatale Neurotransmitter-Veränderungen nach MPTP-Behandlung



Effekte der akuten Applikation von MPTP (1 x 30 mg/kg s.c., 1 x 40 mg/kg i.p.) auf die Gewebespiegel von Dopamin (A) und seinen Metaboliten DOPAC (B) und HVA (C) sowie den Dopamin-Umsatz dargestellt als Quotient HVA/DA (D) im Striatum von C57BL/6-Mäusen. Die Gewebe wurden am 8. Tag nach der Behandlung entnommen und mittels HPLC unter elektrochemischer Detektion bestimmt.
Dargestellt sind Mittelwerte ± SEM von n = 6 - 10 Tieren. Die statistische Auswertung im Vergleich mit der Kontrollgruppe erfolgte mittels Varianzanalyse und nachfolgendem Duncan's-Test ($p < 0.05$).*

Abb. 3.7: Effekte der MPTP-Behandlung auf die nigrale Tyrosinhydroxylase-Aktivität



Auswirkungen der akuten Applikation von MPTP (30 mg/kg s.c., 40 mg/kg i.p. und 4 x 20 mg/kg i.p. im Abstand von je 2 h) auf die Tyrosinhydroxylase (TH) -Aktivität in der Substantia nigra von C57BL/6-Mäusen.
Dargestellt sind Mittelwerte ± SEM von n = 6 - 10 Tieren. Die statistische Auswertung im Vergleich mit der Kontrollgruppe erfolgte mittels Varianzanalyse und nachfolgendem Duncan's-Test ($p < 0.05$).*

3.2.1.5 *Zusammenfassung der Ergebnisse*

7 Tage nach der Behandlung führte MPTP im akuten Modell zu einer signifikanten Abnahme der funktionellen (lokomotorische Aktivität, Rotarod), neurochemischen (Dopamin, Serotonin und ihre jeweiligen Metabolite) sowie immuncytochemischen Marker (Tyrosinhydroxylase-Aktivität). Der Dopamin-Umsatz hingegen wurde durch die Behandlung signifikant erhöht.

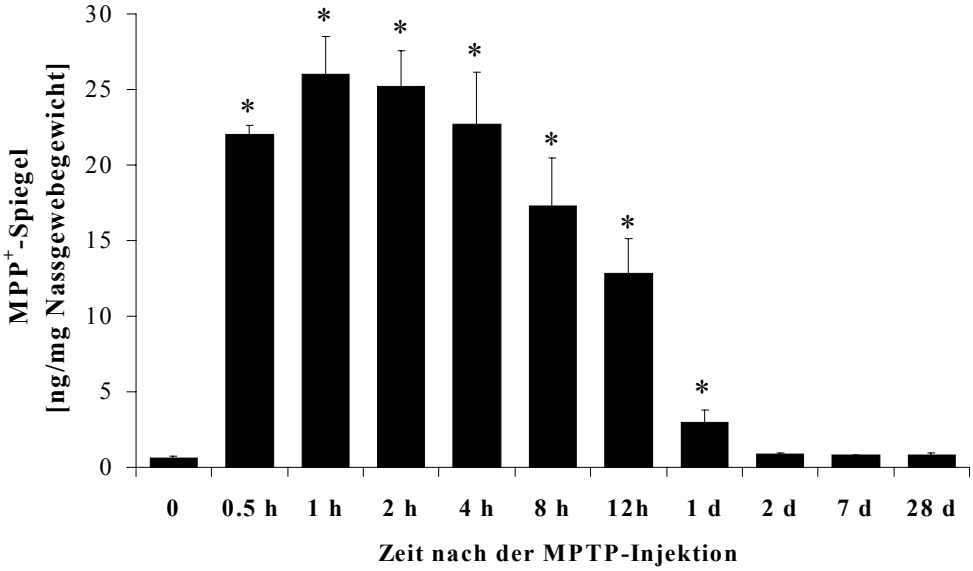
3.2.2 Kinetik und MPTP-Metabolismus

Für dieses Experiment wurden C57BL/6-Mäuse subcutan mit 30 mg/kg MPTP behandelt und die Gehirne zu den verschiedenen Zeitpunkten mittels HPLC auf MPP^+ untersucht.

Nach systemischer Applikation wird MPTP in das Gehirn aufgenommen und zu MPP^+ - dem toxischen Agens - umgewandelt. Demnach dürften unbehandelte Tiere keine messbaren MPP^+-Spiegel zeigen. Dennoch sind in der Kontrollgruppe minimale Werte angegeben, die aber auf Schwankungen in der Basislinie zurückzuführen sind.

Bereits eine halbe Stunde nach der Applikation zeigten sich signifikant erhöhte striatale MPP^+-Konzentrationen mit einem Spitzengewebespiegel von 26.05 ng/mg Nassgewebegewicht; im Verlauf von 24 h fielen die Gewebespiegel wieder auf Kontrollniveau ab (Abb. 3.8).

Abb. 3.8: Zeitverlauf des MPTP-Metabolismus

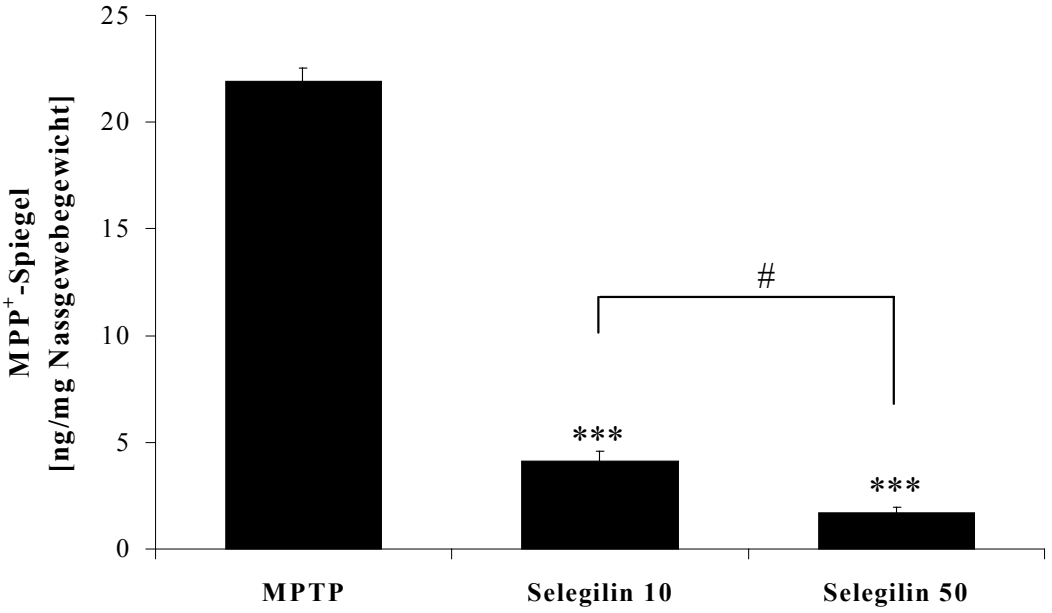


Zeitverlauf der MPP^+-Gewebekonzentration im Striatum von C57BL/6-Mäusen nach der Gabe von 1 x 30 mg/kg MPTP s.c. Die Striata wurden zu den unterschiedlichen Zeitpunkten nach der Applikation entnommen und mittels HPLC unter UV-Detektion bei einer Wellenlänge von 295 nm bestimmt.
Dargestellt sind Mittelwerte ± SEM von n = 6 - 8 Tieren. Die statistische Auswertung im Vergleich mit der Kontrollgruppe erfolgte mittels einfacher Varianzanalyse und nachfolgendem Duncan's-Test ($p < 0.05$).*

Durch die Applikation von Selegilin (10 und 50 mg/kg i.p.) 5 Minuten vor MPTP-Behandlung konnte ein signifikanter und dosisabhängiger Effekt auf die MPP^+-Spiegel erzielt werden. Die niedrige Dosis von 10 mg/kg Selegilin senkte die Umsetzung zu MPP^+ auf 18.7% des Kontrollniveaus, während die hohe Dosis von 50 mg/kg Selegilin sogar eine Erniedrigung auf 7.7% des Kontrollniveaus bewirkte (Abb. 3.9).

Die in Mikrodialyse-Experimenten oft zur Detektion von Hydroxylradikalen eingesetzte Salicylsäure zeigte beispielsweise keinen Effekt auf die MPP^+-Spiegel (27.25 ng/mg Nassgewebegewicht).

Abb. 3.9: Effekte des MAO-B-Hemmstoffs Selegilin auf den MPTP-Metabolismus



Striatale MPP^+-Gewebekonzentrationen nach Gabe von 1 x 30 mg/kg MPTP s.c. ohne und mit Vorbehandlung mit dem MAO-B-Hemmstoff Selegilin (1 x 10 oder 1 x 50 mg/kg i.p. 5 Minuten vor der MPTP-Injektion). Die Striata der C57BL/6-Mäuse wurden 2 Stunden nach der MPTP-Behandlung entnommen und mittels HPLC unter UV-Detektion bei einer Wellenlänge von 295 nm bestimmt.
*Dargestellt sind Mittelwerte ± SEM von n = 5 - 6 Tieren. Die statistische Auswertung im Vergleich mit der Kontrolle (*** $p < 0.001$) sowie zwischen den behandelten Gruppen (# $p < 0.05$) erfolgte mittels Varianzanalyse und nachfolgendem Duncan's-Test (* $p < 0.05$).*

3.2.2.1 *Zusammenfassung der Ergebnisse*

Nach der Injektion von MPTP stiegen die striatalen MPP^+-Gewebespiegel innerhalb 1 h auf ein Maximum an und blieben insgesamt über 24 h signifikant erhöht.

Der MAO-Hemmstoff Selegilin konnte die MPP^+-Entstehung dosisabhängig senken.

3.2.3 Neurotransmitter-Veränderungen im Zeitverlauf nach MPTP

3.2.3.1 Messung der Gewebespiegel

Nach der Injektion von 1 x 40 mg/kg MPTP i.p. wurden die Gehirne von C57BL/6-Mäusen zu unterschiedlichen Zeitpunkten entnommen und die Neurotransmitter Dopamin, Serotonin sowie ihre Metabolite DOPAC, HVA und 5-HIAA mittels HPLC im Zeitverlauf bestimmt.

Dopamin

Die striatalen Dopamin-Spiegel fielen innerhalb einiger Stunden signifikant gegenüber der Kontrolle (8.81 ± 1.28 ng/mg Nassgewebegewicht) auf Werte von etwa 4 ng/mg Nassgewebegewicht ab. Die niedrigsten Gewebewerte (1.76 ± 0.56 ng/mg Nassgewebegewicht) wurden sieben Tage nach der Behandlung erreicht. In den folgenden Wochen kam es zu einer leichten Erholung des dopaminergen Systems auf Werte von 3.63 ± 0.64 ng/mg Nassgewebegewicht (Abb. 3.10 A).

DOPAC & HVA

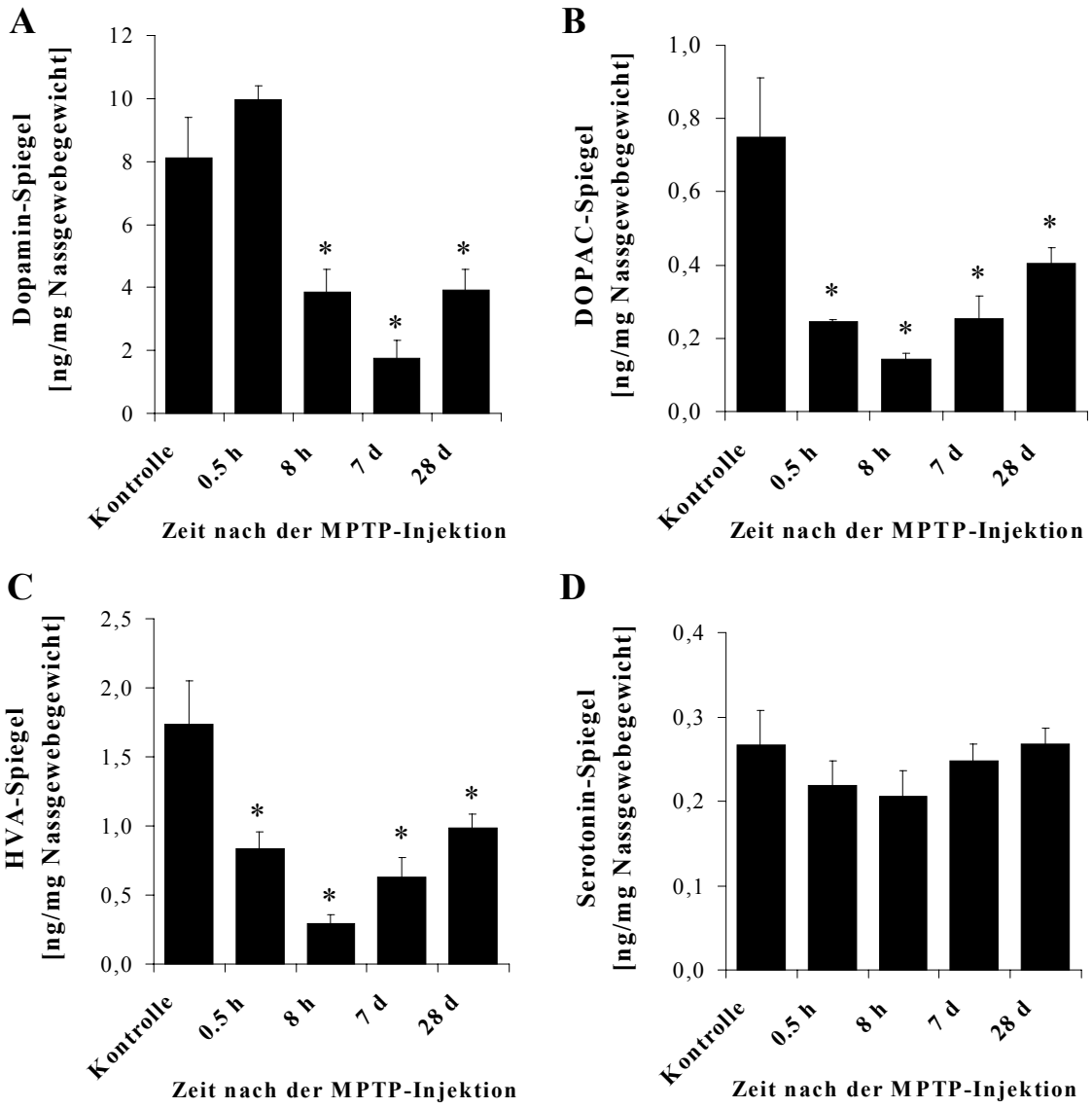
Die Gewebespiegel der Dopamin-Metabolite nahmen direkt nach der Behandlung ab und blieben über den gesamten Zeitraum signifikant erniedrigt. Die niedrigsten Werte (DOPAC: 0.14 ± 0.02 ng/mg und HVA: 0.30 ± 0.06 ng/mg Nassgewebegewicht) wurden bereits nach wenigen Stunden erreicht.

Eine Woche nach der Behandlung stiegen die Gewebespiegel der Metabolite leicht an und erreichten für DOPAC 0.25 ± 0.06 ng/mg und für HVA 0.63 ± 0.14 ng/mg Nassgewebegewicht (Abb. 3.10 B+C).

Serotonin & 5-HIAA

Die Gewebespiegel von Serotonin (durchschnittlich 0.32 ± 0.04 ng/mg Nassgewebegewicht) (Abb. 3.10 D) sowie der Serotoninumsatz ausgedrückt als 5-HIAA/Serotonin wurden durch MPTP nicht beeinflusst (Daten nicht gezeigt).

Abb. 3.10: Striatale Neurotransmitter-Veränderungen nach MPTP

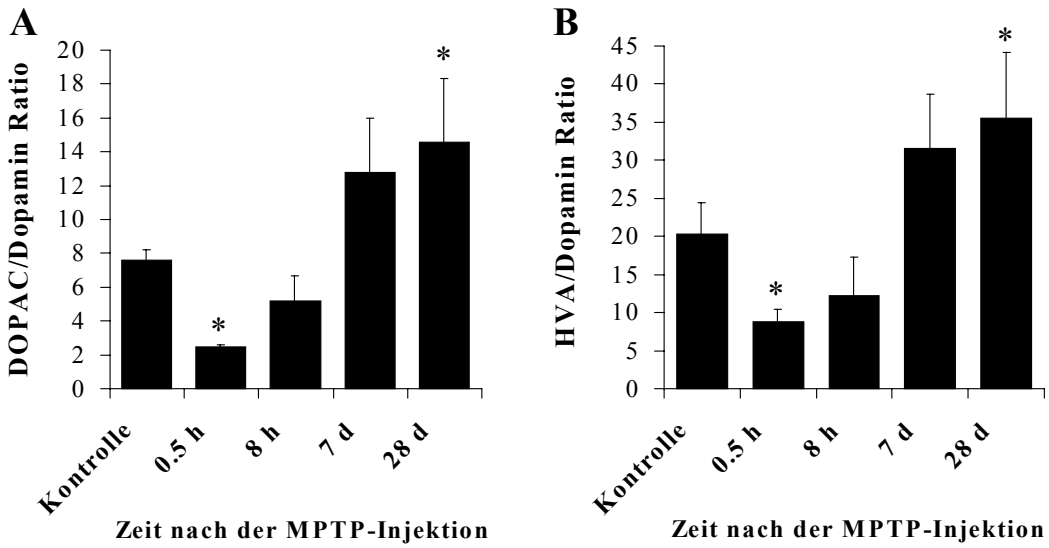


Effekte einer einmaligen Gabe von 40 mg/kg MPTP i.p. auf die striatalen Spiegel von Dopamin (A), DOPAC (B), HVA (C) und Serotonin (D) im Zeitverlauf über 28 Tage. Die Striata der C57BL/6-Mäuse wurden zu den unterschiedlichen Zeitpunkten nach der MPTP-Applikation entnommen und mittels HPLC unter elektrochemischer Detektion bestimmt. Dargestellt sind Mittelwerte ± SEM von n = 5 - 8 Tieren. Die statistische Auswertung im Vergleich mit der Kontrollgruppe erfolgte mittels Varianzanalyse und nachfolgendem Duncan's-Test ($p < 0.05$).*

Dopamin-Umsatz

Die Werte des Dopamin-Umsatzes gemessen als die Quotienten DOPAC/Dopamin und HVA/Dopamin stiegen bereits am 8. Tag leicht an und blieben über die folgenden Wochen signifikant um den Faktor 1.5 bis 2.0 erhöht (Abb. 3.11 A+B).

Abb. 3.11: Effekte von MPTP auf den Dopamin-Umsatz im Striatum



Veränderungen im Dopamin-Umsatz nach einmaliger Injektion von 40 mg/kg MPTP i.p. Die Daten wurden als Quotienten aus DOPAC/Dopamin (A) und HVA/Dopamin (B) im Zeitverlauf über 28 Tage ermittelt.
Dargestellt sind Mittelwerte ± SEM von n = 5 - 8 Tieren. Die statistische Auswertung im Vergleich mit der Kontrollgruppe erfolgte mittels Varianzanalyse und nachfolgendem Duncan's-Test ($p < 0.05$).*

3.2.3.2 *Zusammenfassung der Ergebnisse*

Die striatale Dopamin-Depletion war 7 Tage nach der MPTP-Behandlung maximal, dann stiegen die Werte wieder leicht an. Die Spiegel der Dopamin-Metabolite fielen direkt nach der Behandlung ab und stiegen im Verlauf der folgenden Wochen ebenfalls wieder leicht an. Insgesamt blieben die Gewebespiegel von Dopamin, DOPAC und HVA jedoch signifikant unter dem Ausgangsniveau.

Der Dopamin-Umsatz wurde durch MPTP kurzzeitig signifikant erniedrigt, stieg jedoch in den folgenden 4 Wochen signifikant über das Ausgangsniveau an.

Das serotoninerge System wurde durch MPTP nicht beeinflusst.

3.2.3.3 Mikrodialyse

Mittels Mikrodialyse wurden die Veränderungen der extrazellulären Neurotransmitter-Spiegel nach einer einmaligen Injektion von 40 mg/kg MPTP i.p. gemessen. Die Sonde wurde einen Tag vor der Mikrodialyse in das linke Striatum der C57BL/6-Mäuse implantiert.

Um auch die MPTP-induzierte Radikalproduktion gemessen als 2,3-DHBA mittels reverser Mikrodialyse erfassen zu können, wurden der Perfusionslösung (Calcium-reduzierte Ringerlösung) 5 mM Natriumsalicylat zugesetzt.

Nach zweistündiger Equilibrierung lieferte die Perfusion der Striata stabile Basislinienwerte (Mittelwert der Fraktionen 1 - 5), die sich nicht von denen der Kontrollgruppe unterschieden (Tab. 3.5).

Tab. 3.5: Basislinienwerte der experimentellen Gruppen

	Dopamin	**DOPAC**	**HVA**	**2,3-DHBA**
	[nmol/l]	**[nmol/l]**	**[nmol/l]**	**[nmol/l]**
Kontrolle	1.1 ± 0.1	98.8 ± 5.1	286.8 ± 31.4	38.4 ± 4.1
MPTP	1.2 ± 0.1	93.7 ± 6.0	245.1 ± 32.5	38.4 ± 3.4

Dopamin, DOPAC & HVA

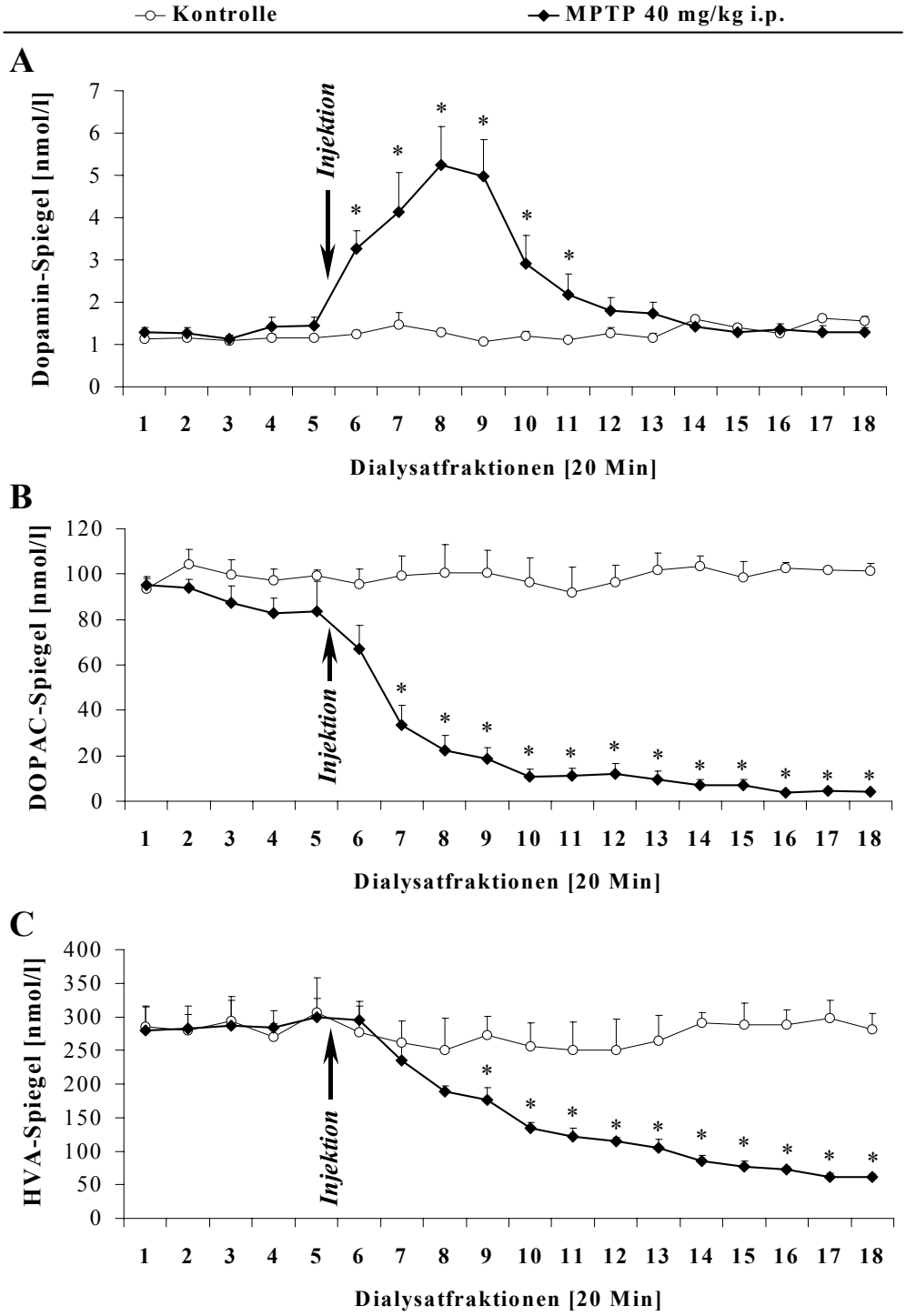
Während die Werte der Kontrollgruppe in allen Parametern konstant blieben, führte die Injektion von 40 mg/kg MPTP i.p. zu einer signifikant erhöhten Freisetzung von Dopamin. Der Anstieg erreichte 1 h nach der Injektion das Maximum von etwa 5.2 nmol/l und hielt über 2 h an (Abb. 3.12 A).

Die signifikante Abnahme der Metabolite DOPAC und HVA begann direkt nach der Injektion und setzte sich kontinuierlich über den gesamten Messzeitraum fort (Abb. 3.12 B+C).

2,3-DHBA

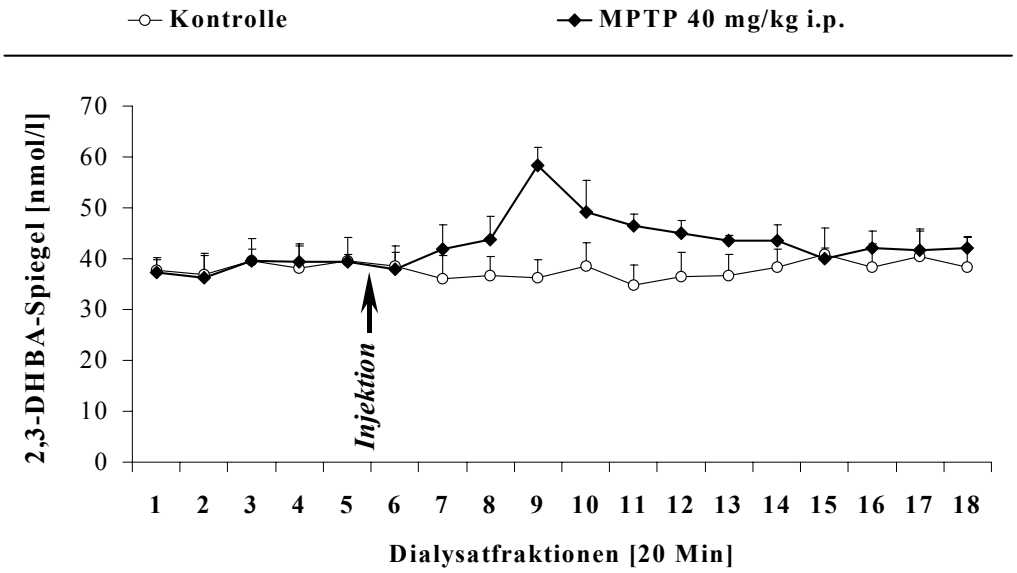
Die Radikalbildung gemessen als 2,3-DHBA zeigte zwar einen schwachen Anstieg von 39.4 auf 58.3 nmol/l 80 Minuten nach MPTP-Injektion, dieser war jedoch nicht signifikant (Abb. 3.13).

Abb. 3.12: Effekte von MPTP auf das dopaminerge System



MPTP (40 mg/kg i.p.) -induzierte Veränderungen in den extrazellulären Konzentrationen von Dopamin (A), DOPAC (B) und HVA (C). Die Implantation der Sonde erfolgte einen Tag vor der Mikrodialyse in das linke Striatum der C57BL/6-Mäuse.
Dargestellt sind Mittelwerte ± SEM von n = 5 - 6 Tieren. Die statistische Auswertung im Vergleich mit der Kontrollgruppe erfolgte mittels Varianzanalyse und nachfolgendem Duncan's-Test ($p < 0.05$).*

Abb. 3.13: Effekte von MPTP auf die Hydroxylradikalbildung



MPTP (40 mg/kg i.p.) -induzierte Hydroxylradikalbildung gemessen in Form des Radikalmarkers 2,3-DHBA. Die Implantation der Sonde erfolgte einen Tag vor der Mikrodialyse in das linke Striatum der C57BL/6-Mäuse.
Dargestellt sind Mittelwerte ± SEM von n = 5 - 6 Tieren. Die statistische Auswertung im Vergleich mit der Kontrollgruppe erfolgte mittels Varianzanalyse und nachfolgendem Duncan's-Test ($p < 0.05$).*

3.2.3.4 Radikalentstehung nach MPP^+

Das aufgrund seiner Ladung nicht bluthirnschrankengängige MPP^+ wurde der Perfusionslösung in verschiedenen Konzentrationen (10, 50 und 100 mM) zugesetzt und die Radikalentstehung mittels reverser Mikrodialyse (Salicylat-Assay) verfolgt. Um Konzentrationseffekte des MPP^+-Gegenions Iodid auszuschliessen, wurde eine weitere Gruppe mit 100 mM Natriumiodid behandelt. Die Basislinienwerte zeigten keine Unterschiede zwischen den verschiedenen Gruppen (Tab. 3.6).

Tab. 3.6: Basislinienwerte der experimentellen Gruppen

	Dopamin	**DOPAC**	**HVA**	**2,3-DHBA**
	[nmol/l]	**[nmol/l]**	**[nmol/l]**	**[nmol/l]**
Kontrolle	2.0 ± 0.2	285.3 ± 62.0	201.0 ± 35.3	35.4 ± 1.0
NaI-Kontrolle	1.9 ± 0.3	258.8 ± 46.8	197.0 ± 20.7	33.2 ± 1.3
MPP^+ 10 mM	2.2 ± 0.3	225.7 ± 23.8	167.6 ± 17.3	35.3 ± 1.4
MPP^+ 50 mM	2.3 ± 0.2	277.6 ± 63.5	198.3 ± 41.8	35.5 ± 2.2
MPP^+ 100 mM	1.7 ± 0.1	259.5 ± 57.5	181.9 ± 41.4	35.5 ± 2.2

Dopamin, DOPAC & HVA

Durch die Verdrängung von Dopamin aus den Speichervesikeln führte die MPP^+-Stimulation zu einem kurzfristigen und dosisabhängigen Anstieg der extrazellulären Dopamin-Konzentrationen. Die niedrige Dosis (10 mM MPP^+) erzeugte einen Dopamin-Anstieg auf 267.1 ± 39.01 nmol/l, die mittlere (50 mM MPP^+) auf 358.8 ± 79.06 nmol/l und die hohe (100 mM MPP^+) auf 567.7 ± 84.11 nmol/l. Dieser Effekt war in allen 3 Gruppen signifikant (Abb. 3.14 A).

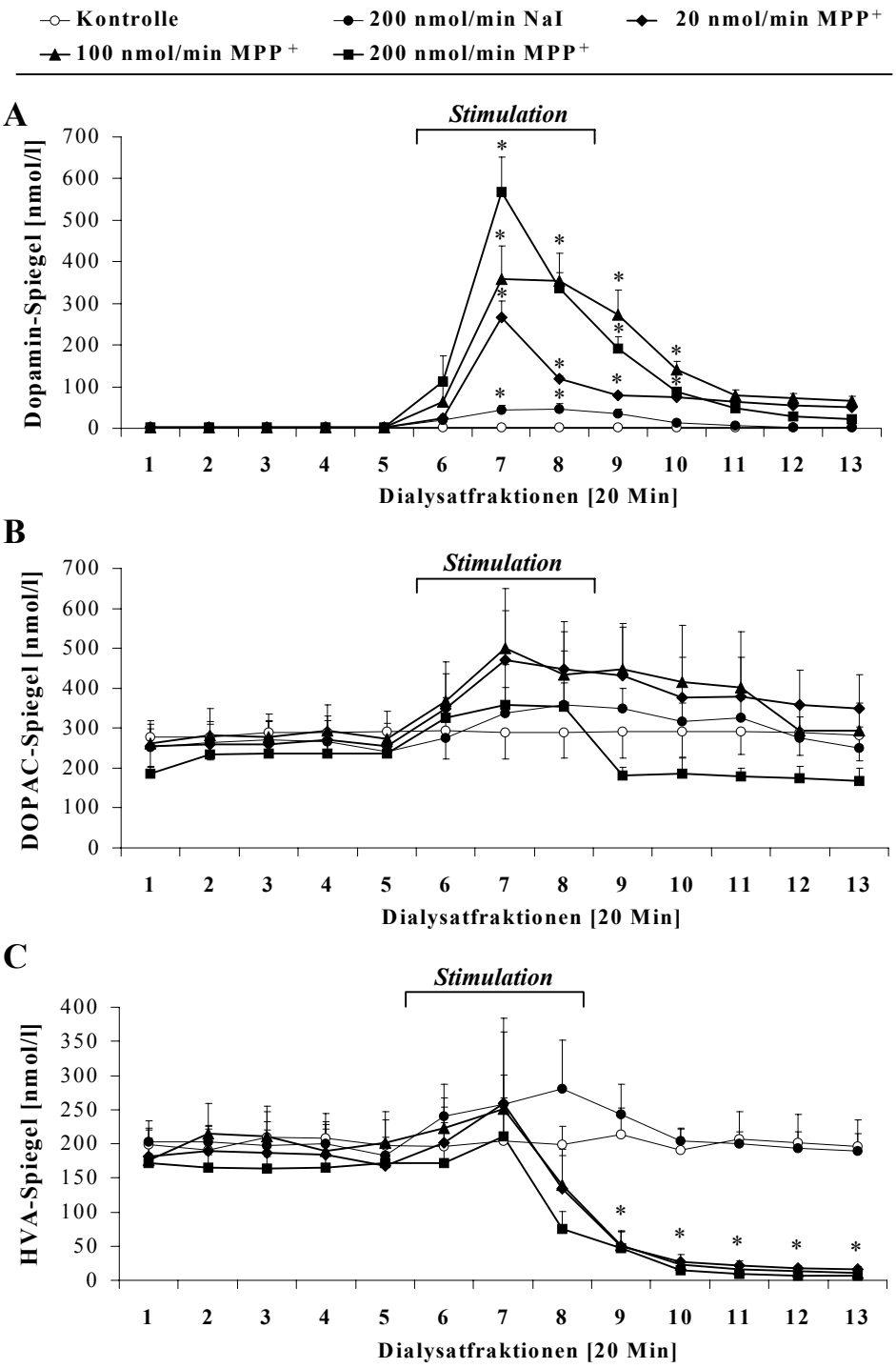
Natriumiodid zeigte zwar ebenfalls einen signifikanten Effekt auf den Dopamin-Spiegel (46.1 ± 11.85 nmol/l); dieser war jedoch deutlich schwächer ausgeprägt als in den MPP^+-stimulierten Gruppen. Auf die Dopamin-Metabolite zeigte es keinen Effekt (Abb. 3.14 A-C).

Während keine signifikanten Veränderungen in der extrazellulären Konzentration von DOPAC auftraten, bewirkte die MPP^+-Stimulation eine signifikante Abnahme des extrazellulären HVA auf Werte von 5 - 10 nmol/l. Dabei spielte die Dosierung von MPP^+ keine entscheidende Rolle (Abb. 3.14 B+C).

2,3-DHBA

Während durch Natriumiodid keine Radikalbildung erzeugt wurde, führten 10 mM MPP^+ zu einem verzögerten Anstieg der Spiegel von 2,3-DHBA auf signifikante 130%, die innerhalb des Messzeitraumes nicht wieder absanken. Im Gegensatz dazu bewirkten die beiden höheren Dosierungen (50 und 100 mM MPP^+) eine kurzfristige, signifikante Abnahme an 2,3-DHBA auf jeweils 57.9% (50 mM MPP^+) und 58.5% (100 mM MPP^+). Im Falle der mittleren Dosierung (50 mM MPP^+) stiegen die Spiegel anschliessend wieder leicht, auf nicht signifikante 130%, bei der hohen Dosierung (100 mM MPP^+) kehrten sie auf Basislinienniveau zurück (Abb. 3.15).

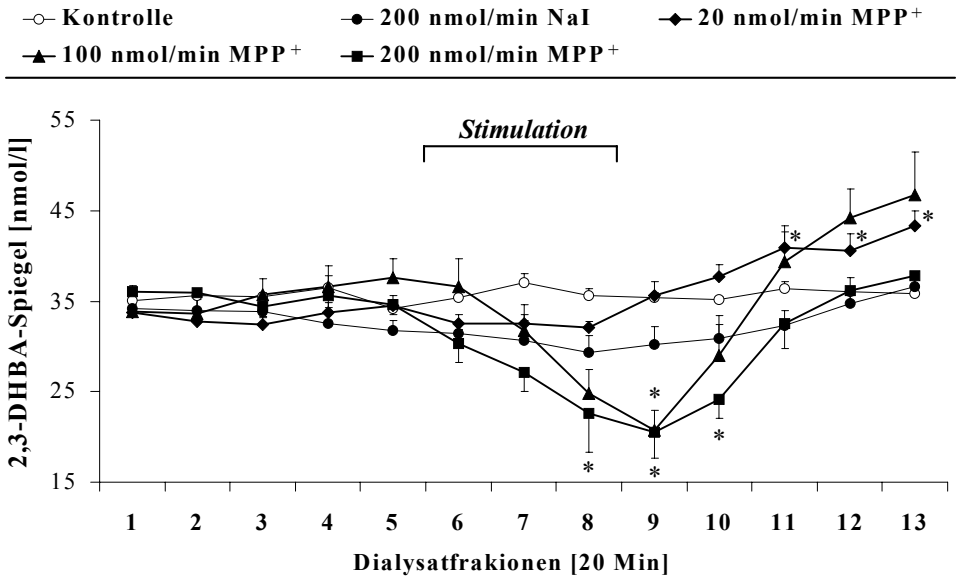
Abb. 3.14: Effekte von MPP^+ auf das dopaminerge System



MPP^+ (10, 50 und 100 mM $\triangleq$ 20, 100 und 200 nmol/min) -induzierte Veränderungen in den extrazellulären Konzentrationen von Dopamin (A), DOPAC (B) und HVA (C). Die Implantation der Sonde erfolgte einen Tag vor der Mikrodialyse in das linke Striatum der C57BL/6-Mäuse.

Dargestellt sind Mittelwerte $\pm$ SEM von $n = 5$ - 6 Tieren. Die statistische Auswertung im Vergleich mit der Kontrollgruppe erfolgte mittels Varianzanalyse und nachfolgendem Duncan's-Test ($p < 0.05$).*

Abb. 3.15: Effekte von MPP^+ auf die Hydroxylradikalbildung



MPP^+ (10, 50 und 100 mM $\triangleq$ 20, 100 und 200 nmol/min) -induzierte Hydroxylradikalbildung gemessen in Form des Radikalmarkers 2,3-DHBA. Die Implantation der Sonde erfolgte einen Tag vor der Mikrodialyse in das linke Striatum der C57BL/6-Mäuse.
Dargestellt sind Mittelwerte $\pm$ SEM von n = 5 - 6 Tieren. Die statistische Auswertung im Vergleich mit der Kontrollgruppe erfolgte mittels Varianzanalyse und nachfolgendem Duncan's-Test ($p < 0.05$).*

3.2.3.5 *Zusammenfassung der Ergebnisse*

Während die Extrazellularspiegel von Dopamin sowohl durch die Injektion von MPTP als auch durch die Stimulation mit MPP^+ massiv erhöht wurden, nahmen die Spiegel der Dopamin-Metabolite DOPAC und HVA dagegen ab.

Der Radikalproduktion stieg nach MPTP oder niedrigen Dosen von MPP^+ leicht an; hohe Dosen von MPP^+ erniedrigten diese jedoch.

3.3 Untersuchungen am MPTP-Modell

3.3.1 (±)-Kavain im MPTP-Maus-Modell

3.3.1.1 Versuchsprotokoll

Für den Versuch wurden 8 Gruppen zu je 7 - 10 C57BL/6-Mäusen eingesetzt, die (±)-Kavain in Dosierungen von 50, 100 und 200 mg/kg i.p. 60 Minuten vor und nochmals 60 Minuten nach der MPTP-Injektion erhielten.

(±)-Kavain musste aufgrund seiner lipophilen Eigenschaften in Neutralöl (Miglyol®) suspendiert werden. Dementsprechend erhielten die Kontrolltiere Neutralöl anstelle von (±)-Kavain und Kochsalzlösung anstelle von MPTP (Tab. 3.7).

Tab. 3.7: Experimentelle Gruppen

Gruppe	Vorbehandlung	Behandlung	Gruppenbezeichnung
(**1**)	Öl	physiolog. Kochsalzlsg	**Öl + Sal**
(**2**)	Kavain 50 mg/kg i.p.	physiolog. Kochsalzlsg	**Kav 50 + Sal**
(**3**)	Kavain 100 mg/kg i.p.	physiolog. Kochsalzlsg	**Kav 100 + Sal**
(**4**)	Kavain 200 mg/kg i.p.	physiolog. Kochsalzlsg	**Kav 200 + Sal**
(**5**)	Öl	MPTP 30 mg/kg s.c.	**Öl + MPTP**
(**6**)	Kavain 50 mg/kg i.p.	MPTP 30 mg/kg s.c.	**Kav 50 + MPTP**
(**7**)	Kavain 100 mg/kg i.p.	MPTP 30 mg/kg s.c.	**Kav 100 + MPTP**
(**8**)	Kavain 200 mg/kg i.p.	MPTP 30 mg/kg s.c.	**Kav 100 + MPTP**

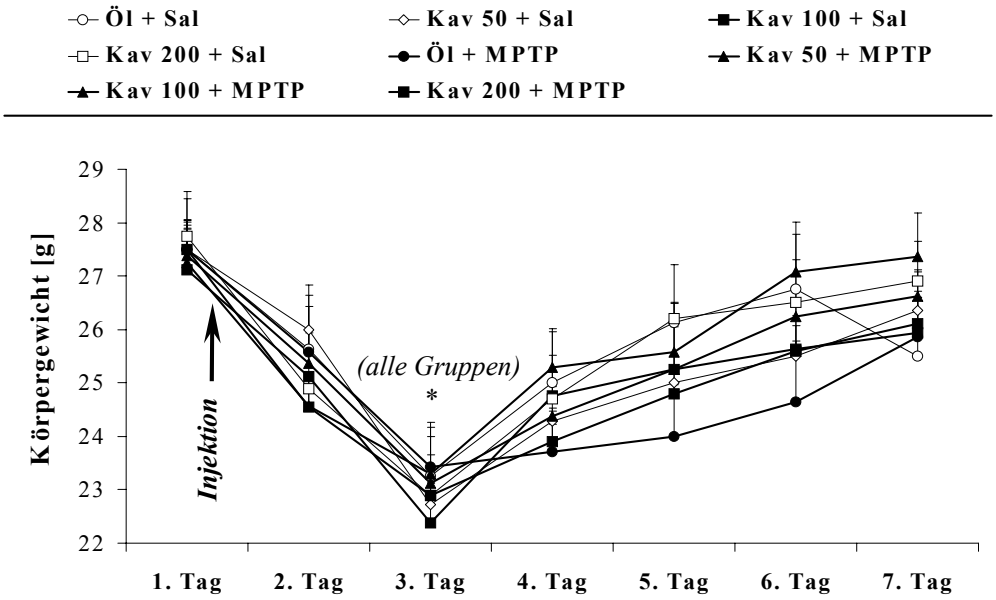
3.3.1.2 Physiologische Parameter

Einflüsse auf das Körpergewicht

Über die gesamte Dauer des Versuchs wurde täglich das Gewicht der Mäuse bestimmt. Unüblicherweise zeigten auch die Kontrolltiere nach der Behandlung einen Gewichtsverlust, der über einige Tage anhielt. Dieser Effekt könnte auf das ölige Lösungsmittel zurückzuführen sein.

Das durchschnittliche Körpergewicht war in allen Gruppen gleichermassen um etwa 16% erniedrigt (Abb. 3.16).

Abb. 3.16: (±)-Kavain im MPTP-Modell: Gewichtsverlauf



Effekte von (±)-Kavain (50, 100 und 200 mg/kg i.p.) ohne (Sal ≙ physiolog. Kochsalzlösung) und mit MPTP-Injektion auf das Körpergewicht von C57BL/6-Mäusen.
Dargestellt sind Mittelwerte ± SEM von n = 7 - 10 Tieren. Die statistische Auswertung erfolgte mittels Varianzanalyse und nachfolgendem Bonferroni-Test zum Vergleich der MPTP-behandelten Gruppen mit den entsprechenden Kochsalzkontrollen ($p < 0.05$) sowie der Öl/MPTP-behandelten Gruppe mit den (±)-Kavain/MPTP-behandelten Gruppen (# $p < 0.05$).*

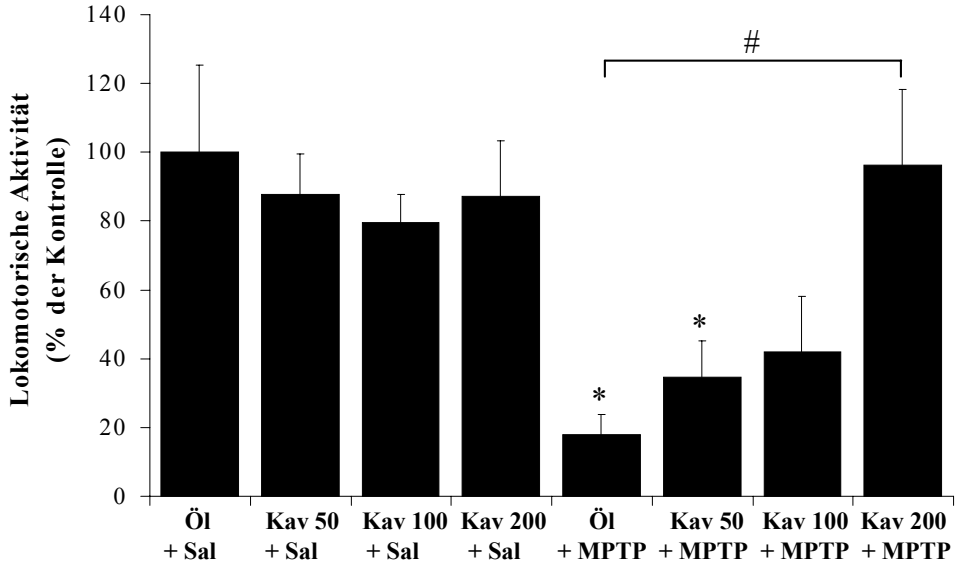
3.3.1.3 Funktionelle Parameter

Lokomotorische Aktivität

Die Behandlung mit (±)-Kavain hatte keinen Einfluss auf die Aktivität der Tiere.

MPTP dagegen führte zu einer signifikanten Reduktion der lokomotorischen Aktivität auf einen Wert von 18.14 ± 5.32%. Während die niedrigeren Dosierungen von (±)-Kavain (50 und 100 mg/kg) den MPTP-induzierten Aktivitätsverlust nur leicht verbessern konnten, erhöhte die hohe Dosis von 200 mg/kg (±)-Kavain die lokomotorische Aktivität signifikant auf 110.21 ± 18.87% im Vergleich zu der entsprechenden Kontrollgruppe (Abb. 3.17).

Abb. 3.17: (±)-Kavain im MPTP-Modell: Lokomotorische Aktivität



Effekte von (±)-Kavain (50, 100 und 200 mg/kg i.p.) ohne (Sal ≙ physiolog. Kochsalzlösung) und mit MPTP-Injektion auf die lokomotorische Aktivität von C57BL/6-Mäusen. Dargestellt sind Mittelwerte ± SEM von n = 7 - 10 Tieren. Die statistische Auswertung erfolgte mittels Varianzanalyse und nachfolgendem Bonferroni-Test zum Vergleich der MPTP-behandelten Gruppen mit den entsprechenden Kochsalzkontrollen ($p < 0.05$) sowie der Öl/MPTP-behandelten Gruppe mit den (±)-Kavain/MPTP-behandelten Gruppen (# $p < 0.05$).*

3.3.1.4 Neurochemische Parameter

Die Gewebespiegel von Dopamin und Serotonin sowie ihren Metaboliten wurden am 8. Tag nach der Behandlung bestimmt und folgende Mittelwerte als 100% definiert (Tab. 3.8).

Tab. 3.8: Striatale Gewebespiegel von Dopamin und Serotonin sowie ihren Metaboliten

	Gewebespiegel [ng/mg Nassgewebegewicht]
Dopamin	15.22 ± 1.96
DOPAC	0.77 ± 0.11
HVA	1.37 ± 0.25
Serotonin	0.42 ± 0.12
5-HIAA	0.31 ± 0.02

Dopamin & seine Metabolite

Die (±)-Kavainbehandlung allein zeigte zwar eine schwache, dosisabhängige Erhöhung des Dopamin-Spiegels, die aber nicht signifikant war.

MPTP reduzierte Dopamin auf 12.61%, DOPAC auf 31.25% und HVA auf 36.36% der Kontrollwerte. Die höchste Dosis von (±)-Kavain konnte den Dopamin-Verlust (58.93 ± 5.39%) und den Verlust an Dopamin-Metaboliten (DOPAC: 54.48 ± 8.96%, HVA: 96.85 ± 11.13%) signifikant antagonisieren (Abb. 3.18 A-C).

Zusätzlich senkte es den MPTP-induzierten Anstieg des Dopamin-Umsatz gemessen als Quotient aus DOPAC/Dopamin beziehungsweise HVA/Dopamin (Abb. 3.19 A+B).

Serotoninerges System

Das serotoninerge System dagegen wurde weder durch (±)-Kavain noch durch MPTP beeinflusst. Auch der Serotonin-Umsatz veränderte sich durch die Behandlung nicht (Abb. 3.20 A-C).

MPP^+

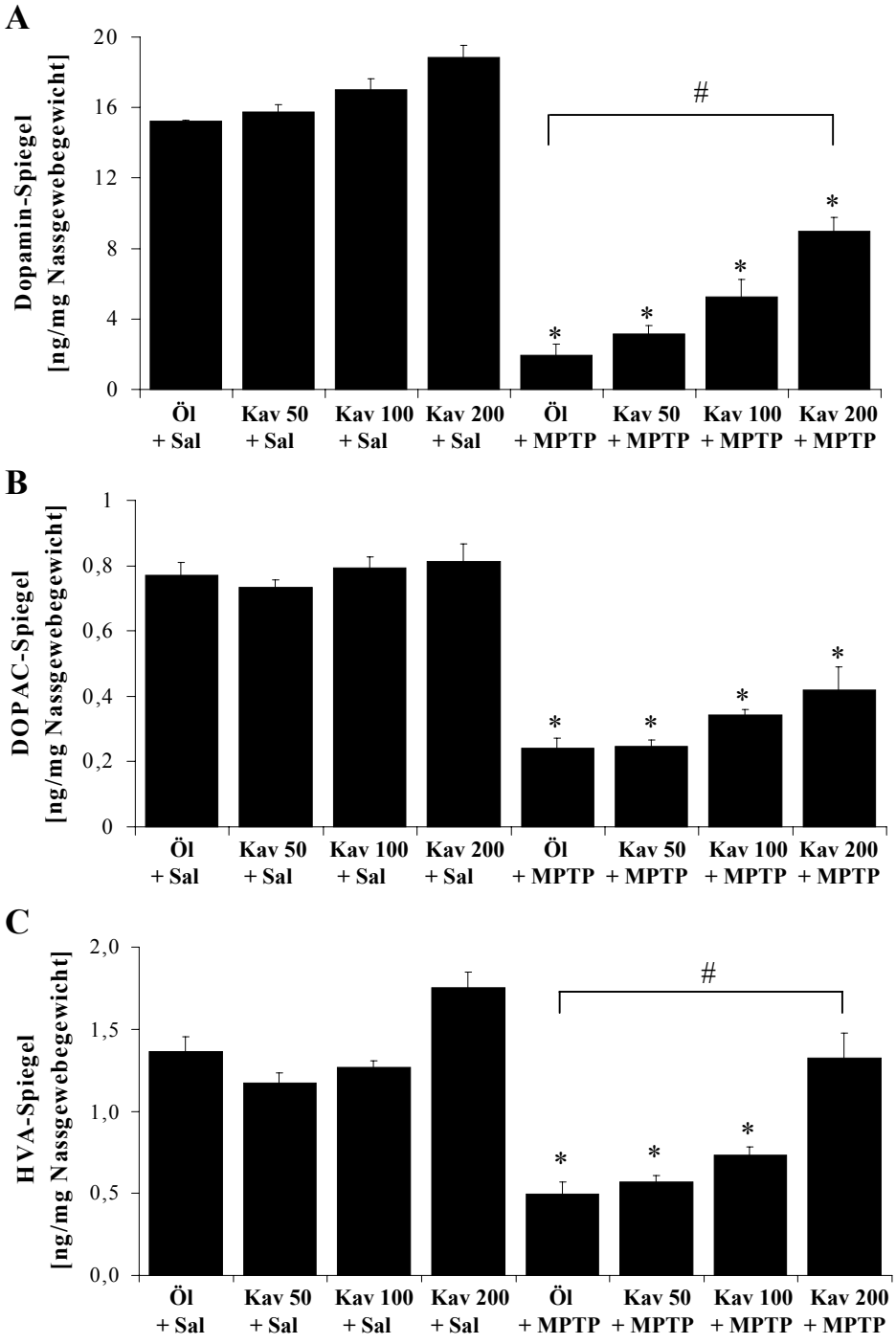
Um Veränderungen der MPTP-Kinetik durch (±)-Kavain auszuschliessen, wurden die striatalen MPP^+-Gewebespiegel nach Vorbehandlung mit (±)-Kavain bestimmt. Die Injektionen erfolgten im Abstand von 5 Minuten, die Gewebeentnahme 231.5% (wt) und 35.0% (IL-6 (-/-)) 2 h nach der MPTP-Applikation (siehe Kap. 3.2.2).

Die Vorbehandlung mit Kavain zeigte keine Veränderungen in den MPP^+-Werten (Tab. 3.9).

Tab. 3.9: MPP^+-Gewebespiegel nach (±)-Kavain-Behandlung

	Gewebespiegel [ng/mg Nassgewebegewicht]
MPTP	21.89 ± 0.64
MPTP/(±)-Kavain	26.34 ± 1.32

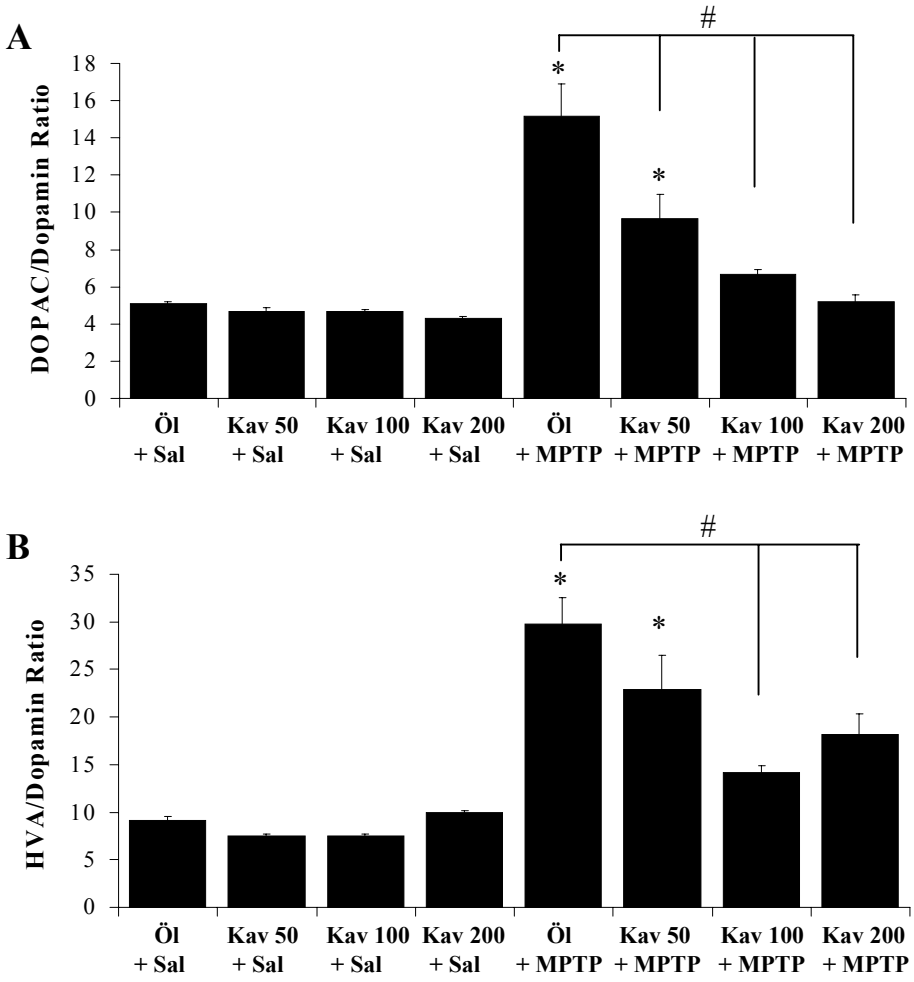
Abb. 3.18: (±)-Kavain im MPTP-Modell: Dopaminerges System



Effekte von (±)-Kavain (50, 100 und 200 mg/kg i.p.) ohne (Sal ≙ physiolog. Kochsalzlösung) und mit MPTP-Injektion auf die Gewebespiegel von Dopamin (A), DOPAC (B) und HVA (C).

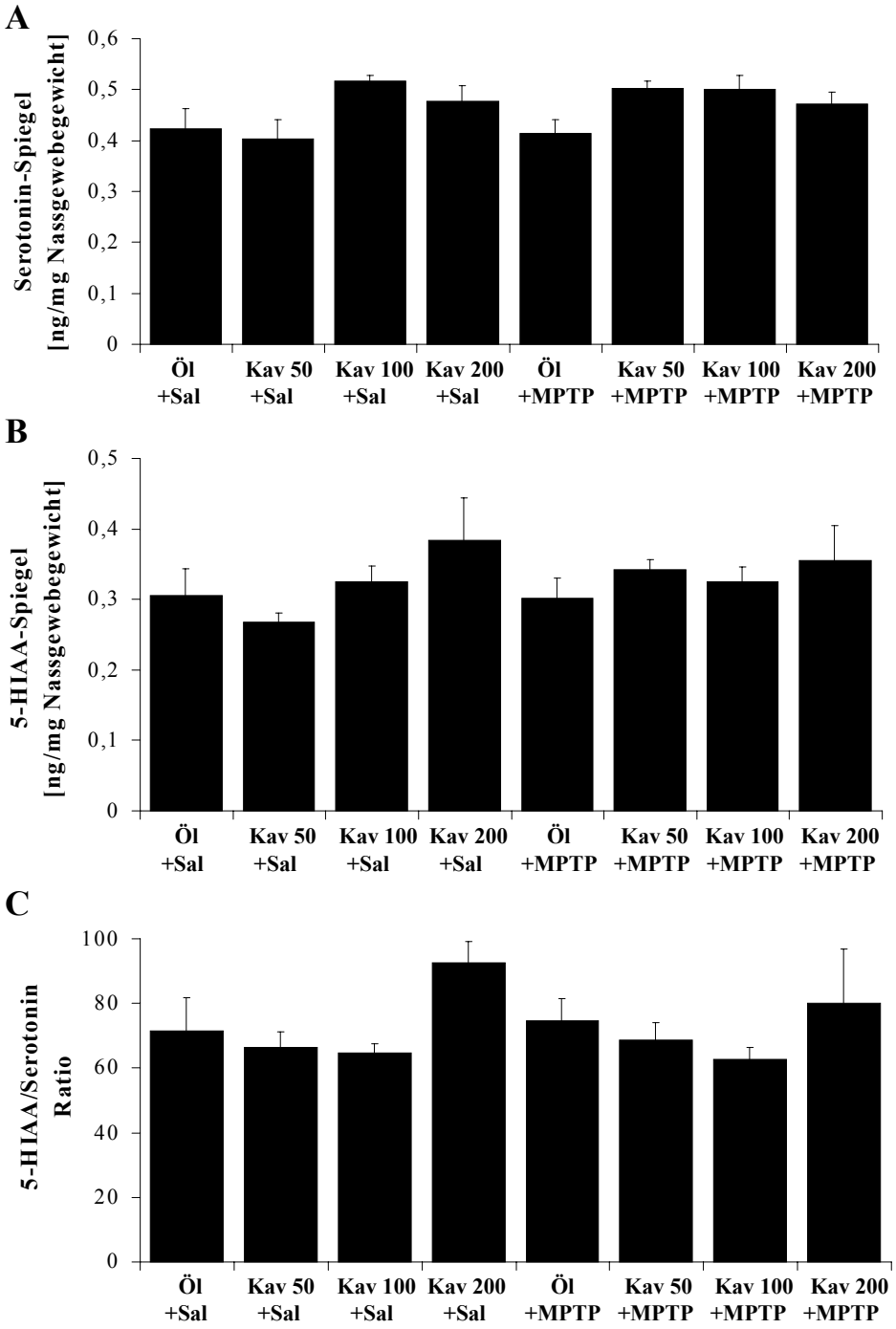
Dargestellt sind Mittelwerte ± SEM von n = 7 - 10 Tieren. Die statistische Auswertung erfolgte mittels Varianzanalyse und nachfolgendem Bonferroni-Test zum Vergleich der MPTP-behandelten Gruppen mit den entsprechenden Kochsalzkontrollen ($p < 0.05$) sowie der Öl/MPTP-behandelten Gruppe mit den (±)-Kavain/MPTP-behandelten Gruppen (# $p < 0.05$).*

Abb. 3.19: (±)-Kavain im MPTP-Modell: Dopamin-Umsatz



Effekte von (±)-Kavain (50, 100 und 200 mg/kg i.p.) ohne (Sal ≙ physiolog. Kochsalzlösung) und mit MPTP-Injektion auf den striatalen Dopamin-Umsatz berechnet als Quotient aus DOPAC/Dopamin (A) und HVA/Dopamin (B).
Dargestellt sind Mittelwerte ± SEM von n = 7 - 10 Tieren. Die statistische Auswertung erfolgte mittels Varianzanalyse und nachfolgendem Bonferroni-Test zum Vergleich der MPTP-behandelten Gruppen mit den entsprechenden Kochsalzkontrollen ($p < 0.05$) sowie der Öl/MPTP-behandelten Gruppe mit den (±)-Kavain/MPTP-behandelten Gruppen (# $p < 0.05$).*

Abb. 3.20: (±)-Kavain im MPTP-Modell: Serotoninerges System



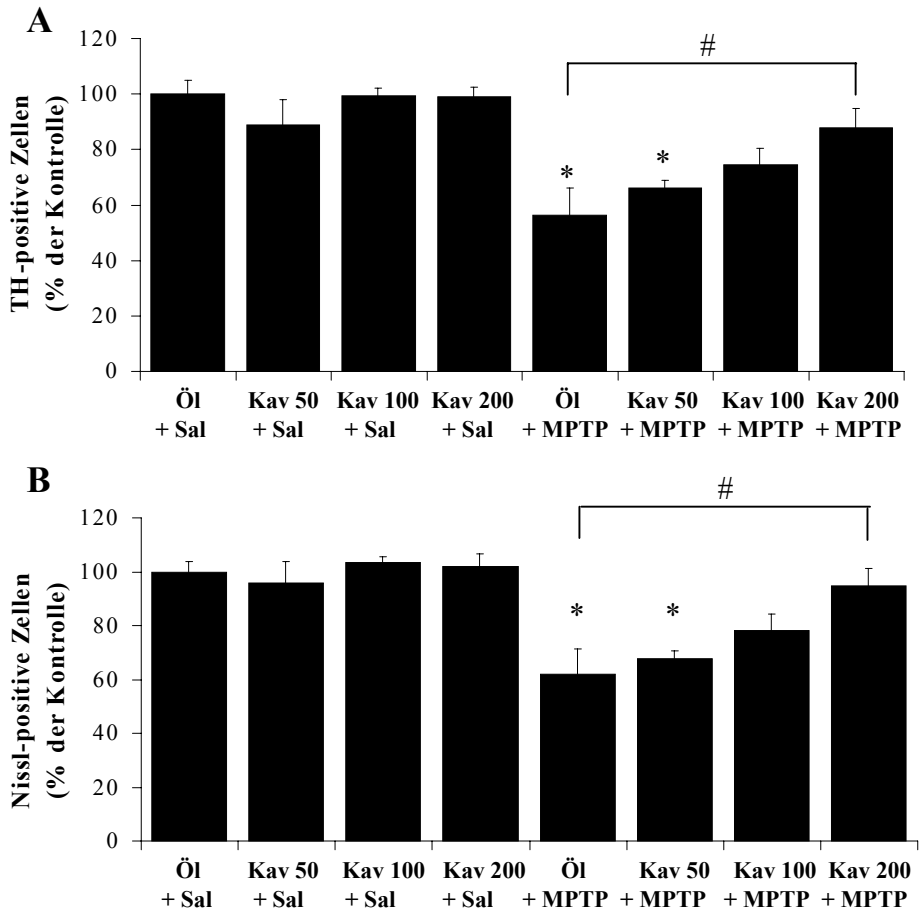
Effekte von (±)-Kavain (50, 100 und 200 mg/kg i.p.) ohne (Sal ≙ physiolog. Kochsalzlösung) und mit MPTP-Injektion auf die Gewebespiegel von Serotonin (A) und 5-HIAA (B) sowie den striatalen Serotonin-Umsatz berechnet als Quotient aus 5-HIAA/Serotonin (C). Dargestellt sind Mittelwerte ± SEM von n = 7 - 10 Tieren. Die statistische Auswertung erfolgte mittels Varianzanalyse und nachfolgendem Bonferroni-Test zum Vergleich der MPTP-behandelten Gruppen mit den entsprechenden Kochsalzkontrollen ($p < 0.05$) sowie der Öl/MPTP-behandelten Gruppe mit den (±)-Kavain/MPTP-behandelten Gruppen (# $p < 0.05$).*

3.3.1.5 Histologische Parameter

Tyrosinhydroxylase-Immunreaktivität und Nissl-Färbung

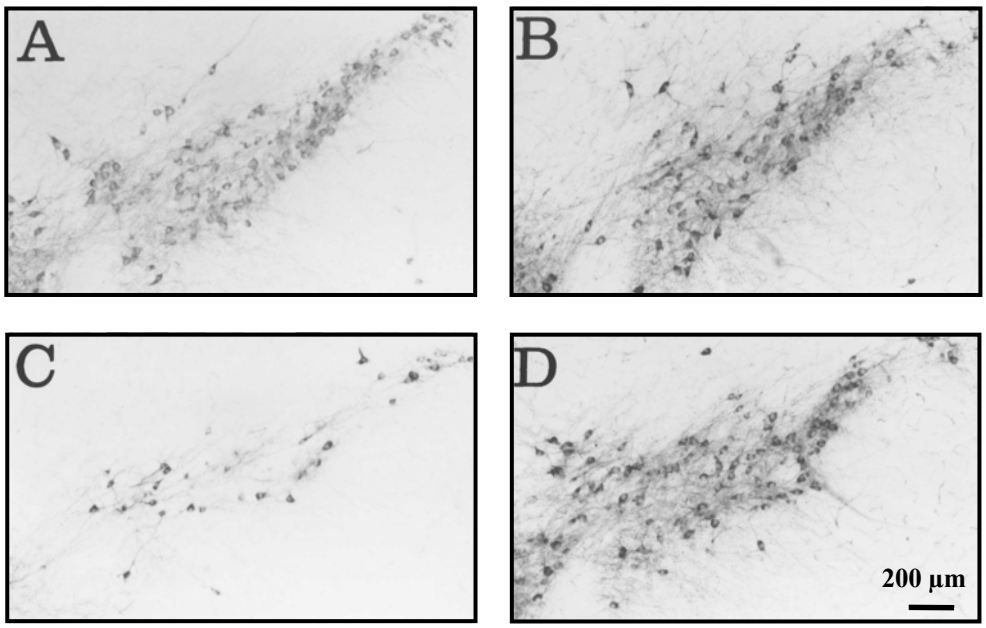
Die MPTP-Behandlung führt zu einer signifikanten Abnahme der Tyrosinhydroxylase-Aktivität und Nissl-gefärbten Zellen in der SNc um jeweils mehr als 43% und 38% verglichen mit den Kontrollen. Die niedrigeren Dosierungen zeigten einen tendentiellen Effekt, aber nur die hohe Dosierung von 200 mg/kg (±)-Kavain konnte die Reduktion an Tyrosinhydroxylase-Aktivität und Nissl-gefärbten Zellen signifikant aufheben (Abb. 3.21 A+B/Abb. 3.22 A-D).

Abb. 3.21: (±)-Kavain im MPTP-Modell: Tyrosinhydroxylase-Immunreaktivtät und Nissl-Färbung



Effekte von (±)-Kavain (50, 100 und 200 mg/kg i.p.) ohne (Sal ≙ physiolog. Kochsalzlösung) und mit MPTP-Injektion auf die Tyrosinhydroxylase (TH) -Aktivität (A) und Nissl-Färbung (B)
Die Werte der ÖL/Kochsalz-Kontrolle wurden als 100% Wert definiert. Dargestellt sind Mittelwerte ± SEM von n = 7 - 10 Tieren. Die statistische Auswertung erfolgte mittels Varianzanalyse und nachfolgendem Bonferroni-Test zum Vergleich der MPTP-behandelten Gruppen mit den entsprechenden Kochsalzkontrollen ($p < 0.05$) sowie der Öl/MPTP-behandelten Gruppe mit den (±)-Kavain/MPTP- behandelten Gruppen (# $p < 0.05$).*

Abb. 3.22: (±)-Kavain im MPTP-Modell: Mikrophotographien der Substantia nigra



Mikrophotographie der mit Tyrosinhydroxylase-Antikörper gefärbten Substantia nigra. Die Schnitte liegen auf Höhe des 3. Hirnnervs und zeigen die Kochsalzkontrolle (Öl + Sal) (A), (±)-Kavain 200 mg/kg i.p. mit Kochsalz (Kav 200 + Sal) (B), Öl mit MPTP 30 mg/kg s.c. (Öl + MPTP) (C) und (±)-Kavain 200 mg/kg i.p. mit MPTP 30 mg/kg s.c. (Kav 200 + MPTP) (D) eine Woche nach der Behandlung.

3.3.1.6 *Zusammenfassung der Ergebnisse*

(±)-Kavain verbesserte die funktionellen Parameter und bewirkte Verbesserung der dopaminergen Neurotransmission auf striataler Ebene sowie eine Verminderung des MPTP-induzierten Zellverlustes in der Substantia nigra.

3.3.2 Akutes und subchronisches MPTP-Modell an IL-6 (-/-) Mäusen

Jeweils 8 Wildtyp (C57BL/6) und IL-6 (-/-) Mäuse pro Gruppe wurden nach dem angegebenen Schema behandelt und auf Veränderungen in der lokomotorischen Aktivität sowie den neurochemischen Parametern Dopamin, DOPAC und HVA untersucht. Zusätzlich wurde die Substantia nigra auf die Tyrosinhydroxylase-Immunreaktivität und Nissl-positive Zellen gefärbt.

Tab. 3.10: Behandlungsschemata zum Vergleich von Wildtyp- (wt) und IL-6 (-/-) Tieren

	Kontrolle	**MPTP (i.p.)**	**MPTP (i.p.)**
	physiolog. Kochsalzlösung	**akut**	**subchronisch**
Wildtyp	2 x i.p. (4h)	2 x 30 mg/kg i.p. (4h)	5 x 30 mg/kg i.p. (je 1d)
IL-6 (-/-)	2 x i.p. (4h)	2 x 30 mg/kg i.p. (4h)	5 x 30 mg/kg i.p. (je 1d)

3.3.2.1 Funktionelle Parameter

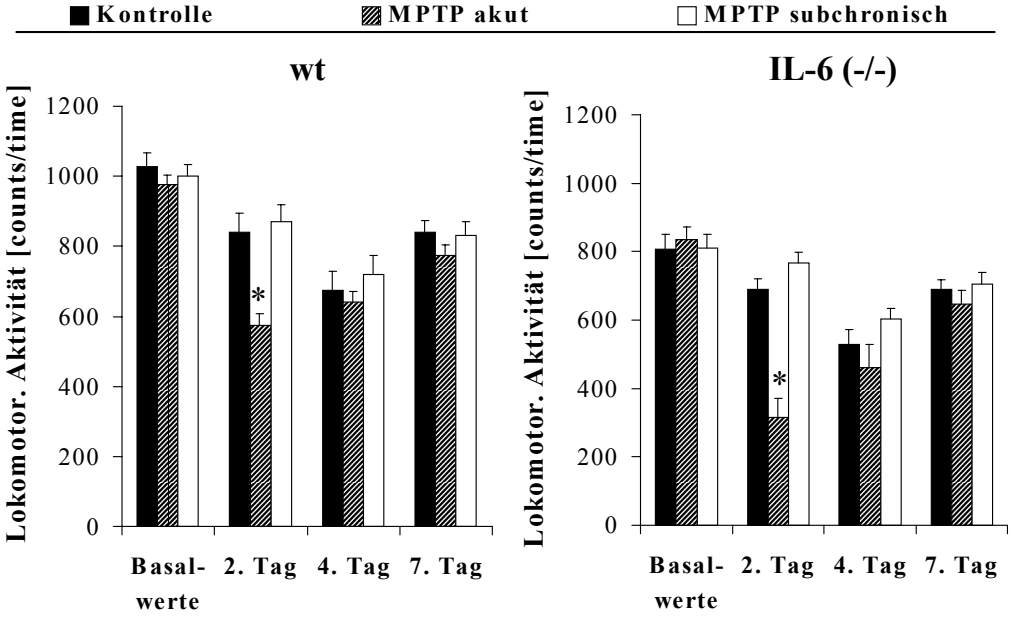
Lokomotorische Aktivität

Die lokomotorische Aktivität der Tiere wurde vor der Behandlung nach Methode 2 (siehe Kap. 2.7.1) in einer 15 minütigen Sitzung am Einzeltier gemessen und die Gruppen nach Gewicht und Aktivität "gematcht". Die IL-6 (-/-) Mäuse zeigten eine leicht verminderte Aktivität, die sich aber nicht signifikant von der der Wildtyp-Tiere unterschied.

Nach der Behandlung mit MPTP sanken die Werte der lokomotorischen Aktivität in den akuten Gruppen auf 58.8% bei den Wildtyp-Tieren und auf 37.9% bei den IL-6 (-/-) Mäusen signifikant ab. Innerhalb von 2 Tagen trat eine Erholung der Symptomatik ein (Abb. 3.23).

Die subchronisch mit MPTP-behandelten Tiere zeigten am Tag nach der letzten Injektion keine Veränderungen mehr in der lokomotorischen Aktivität. Dieser Effekt ist wahrscheinlich auf die bereits nach der ersten Behandlung einsetzenden Kompensationsmechanismen zurückzuführen (Abb. 3.23).

Abb. 3.23: Effekte von MPTP-Behandlung IL-6 (-/-) Mäusen: Lokomotorische Aktivität



Effekte einer akuten (2 x 30 mg/kg i.p. im Abstand von 4h) und subchronischen (5 x 30 mg/kg i.p. jeweils eine Injektion pro Tag) MPTP-Behandlung auf die lokomotorische Aktivität in Wildtyp- (wt ≙ C57BL/6-Mäusen) und IL-6 (-/-) Mäusen. Gemessen wurde je eine 15 minütige Sitzung von (±)-Kavain (50, 100 und 200 mg/kg i.p.). Dargestellt sind Mittelwerte ± SEM von n = 8 - 10 Tieren. Die statistische Auswertung im Vergleich mit der Kontrollgruppe erfolgte mittels Varianzanalyse und nachfolgendem Bonferroni-Test ($p < 0.05$).*

3.3.2.2 Neurochemische Parameter

Dopamin und seine Metabolite

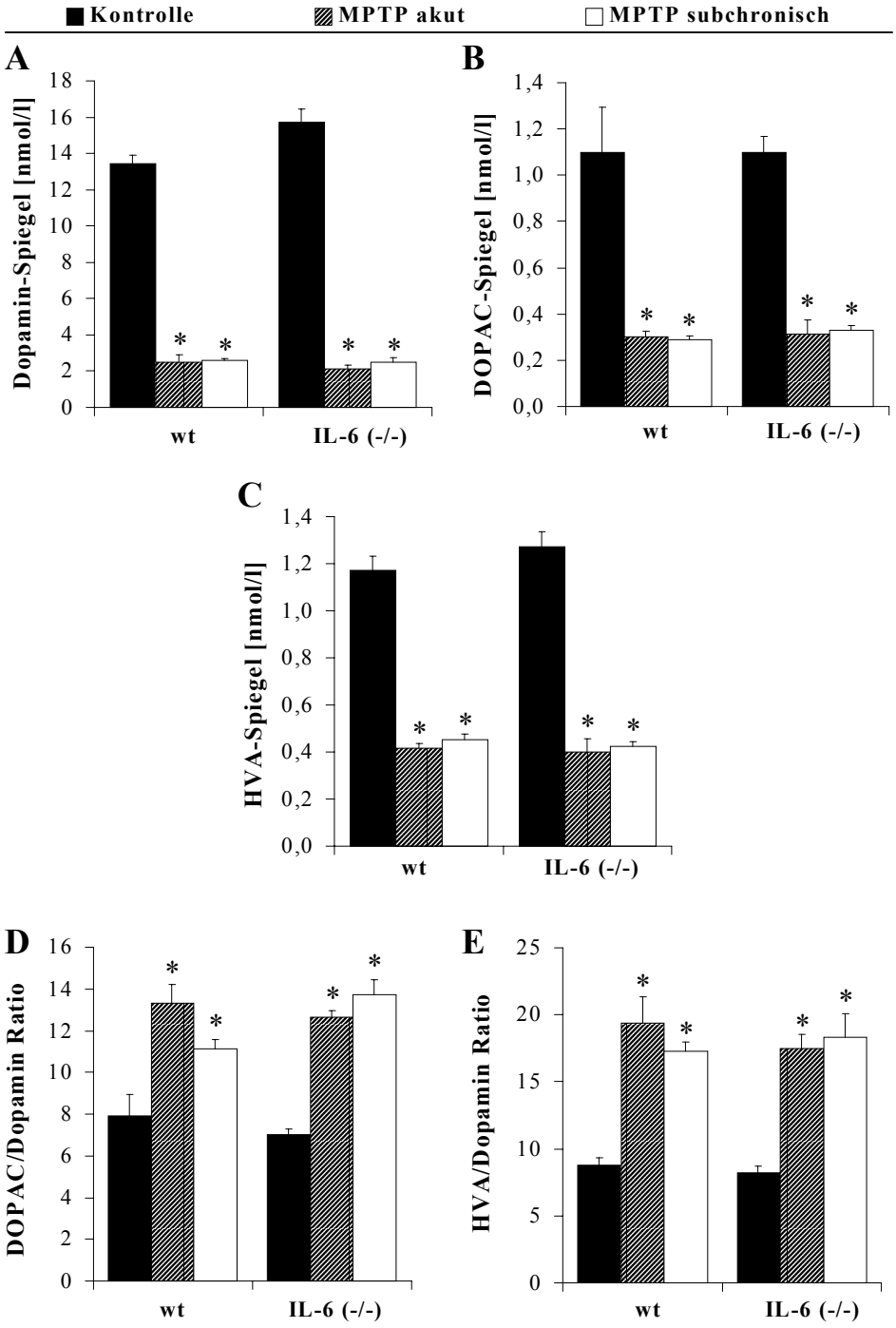
Eine Woche nach der Behandlung wurden die Gehirne entnommen und die Gewebespiegel von Dopamin und seinen Metaboliten DOPAC und HVA mittels HPLC gemessen.

Die Gewebewerte von Dopamin wurden durch Behandlung mit 2 x 30 mg/kg MPTP i.p. von 15.73 ± 0.72 auf 2.14 ± 0.22 (wt) bzw. von 13.42 ± 0.50 auf 2.48 ± 0.44 ng/mg Nassgewebegewicht (IL-6 (-/-)) vermindert. Die Behandlung mit 5 x 30 mg/kg MPTP i.p. senkte die Werte auf 2.50 ± 0.26 (wt) bzw. auf 2.61 ± 0.10 ng/mg Nassgewebegewicht (IL-6 (-/-)) (Abb. 3.24 A).

DOPAC sank in den akuten Gruppen auf 28.2% (wt) und 27.2% (IL-6 (-/-)), bzw. auf 30.0% (wt) und 26.4% (IL-6 (-/-)) in den subchronischen Gruppen. HVA sank in den akuten Gruppen bzw. in den subchronischen Gruppen auf 33.1% (wt) und 38.5% (IL-6 (-/-)) (Abb. 3.24 B+C).

Für die Dopamin-Umsatzes ergaben sich Faktoren von 1.7 (DOPAC/Dopamin) und 2.2 (HVA/Dopamin) für jeweils alle MPTP-behandelten Gruppen (Abb. 3.24 D+E).

Abb. 3.24: Effekte von MPTP in IL-6 (-/-) Mäusen: Dopaminerges System



Effekte einer akuten (2 x 30 mg/kg i.p. im Abstand von 4 h) und subchronischen (5 x 30 mg/kg i.p. jeweils eine Injektion pro Tag) MPTP-Behandlung auf die Gewebespiegel von Dopamin (A), DOPAC (B) und HVA (C) sowie den Dopamin-Umsatz angegeben als Quotient aus DOPAC/Dopamin (D) und HVA/Dopamin (E) 7 Tage nach der Behandlung.

Dargestellt sind Mittelwerte ± SEM von n = 8 - 10 Tieren. Die statistische Auswertung im Vergleich mit der Kontrollgruppe erfolgte mittels Varianzanalyse und nachfolgendem Bonferroni-Test ($p < 0.05$).*

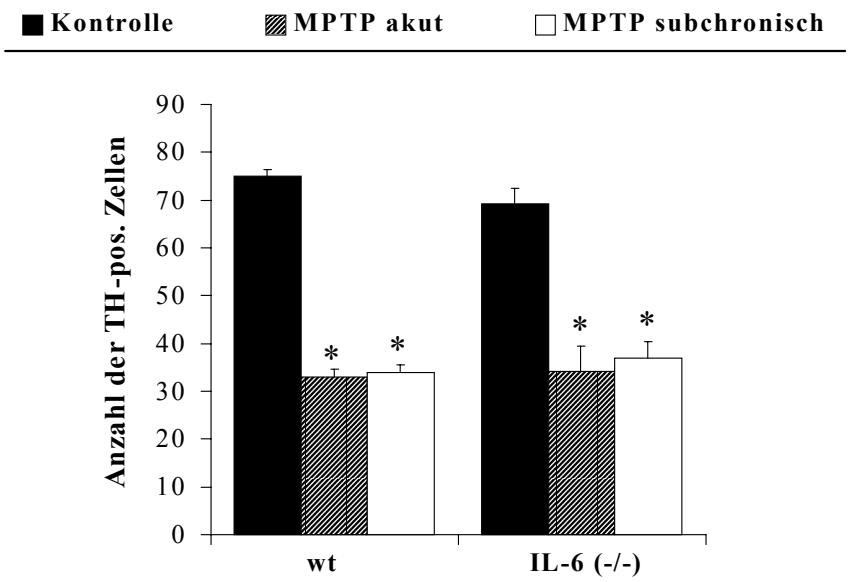
3.3.2.3 Histologische Parameter

Tyrosinhydroxylase-Immunreaktivität in der Substantia nigra

Die Substantia nigra der am 8. Tag nach der MPTP-Behandlung entnommenen Gehirne wurden geschnitten und auf Tyrosinhydroxylase gefärbt.

Die Auszählung ergab eine Abnahme der TH-positiven Zellen, die sich für die Dosierung von 2 x 30 mg/kg MPTP i.p. auf 44.1% (wt) und 45.4% (IL-6 (-/-)) und für 5 x 30 mg/kg MPTP i.p. auf 49.5% (wt) und 53.2% (IL-6 (-/-)) beläuft (Abb. 3.25).

Abb. 3.25: Effekte von MPTP in IL-6 (-/-) Tieren:
TH-Immunreaktivität und Nissl-Färbung



Effekte einer akuten (2 x 30 mg/kg i.p. im Abstand von 4 h) und subchronischen (5 x 30 mg/kg i.p. jeweils eine Injektion pro Tag) MPTP-Behandlung auf die Tyrosinhydroxylase-Aktivität in Wildtyp- (wt $\triangleq$ C57BL/6-Mäusen) und IL-6 (-/-) Mäusen 7 Tage nach der Behandlung.
Dargestellt sind Mittelwerte $\pm$ SEM von n = 8 - 10 Tieren. Die statistische Auswertung im Vergleich mit der Kontrollgruppe erfolgte mittels Varianzanalyse und nachfolgendem Bonferroni-Test ($p < 0.05$).*

3.3.2.4 *Zusammenfassung der Ergebnisse*

Ein Mangel an IL-6 zeigte weder im akuten noch im subchronischen MPTP-Modell Veränderungen in den funktionellen, neurochemischen und histologischen Parametern im Vergleich zu Wildtyp-Tieren.

3.4 Neurotoxin-Stimulation in der Mikrodialyse

3.4.1 Beteiligung von Hydroxylradikalen und Peroxynitrit an der Toxizität verschiedener Neurotoxine

Die Toxine wurden der Perfusionslösung in verschiedenen Konzentrationen zusammen mit 5 mM D-Phenylalanin zugesetzt und mittels reverser Mikrodialyse in das Striatum von C57Bl/6-Mäusen appliziert. Anschliessend wurden die Hydroxylierungsmarker *o*- und *m*-Tyrosin sowie die Nitrierungsmarker *NO*-Tyrosin und *NO*-Phenylalanin bestimmt.

3.4.1.1 Intrastriatale Applikation von 6-OHDA (C57BL/6-Mäuse)

Die reverse Mikrodialyse mit 5 mM D-Phenylalanin ergab stabile Basislinienwerte (Mittelwert der Fraktionen 1 - 5) der Hydroxylierungsprodukte (Tab. 3.11).

Tab. 3.11: Basislinienwerte der experimentellen Gruppen im Vergleich (C57BL/6-Mäuse)

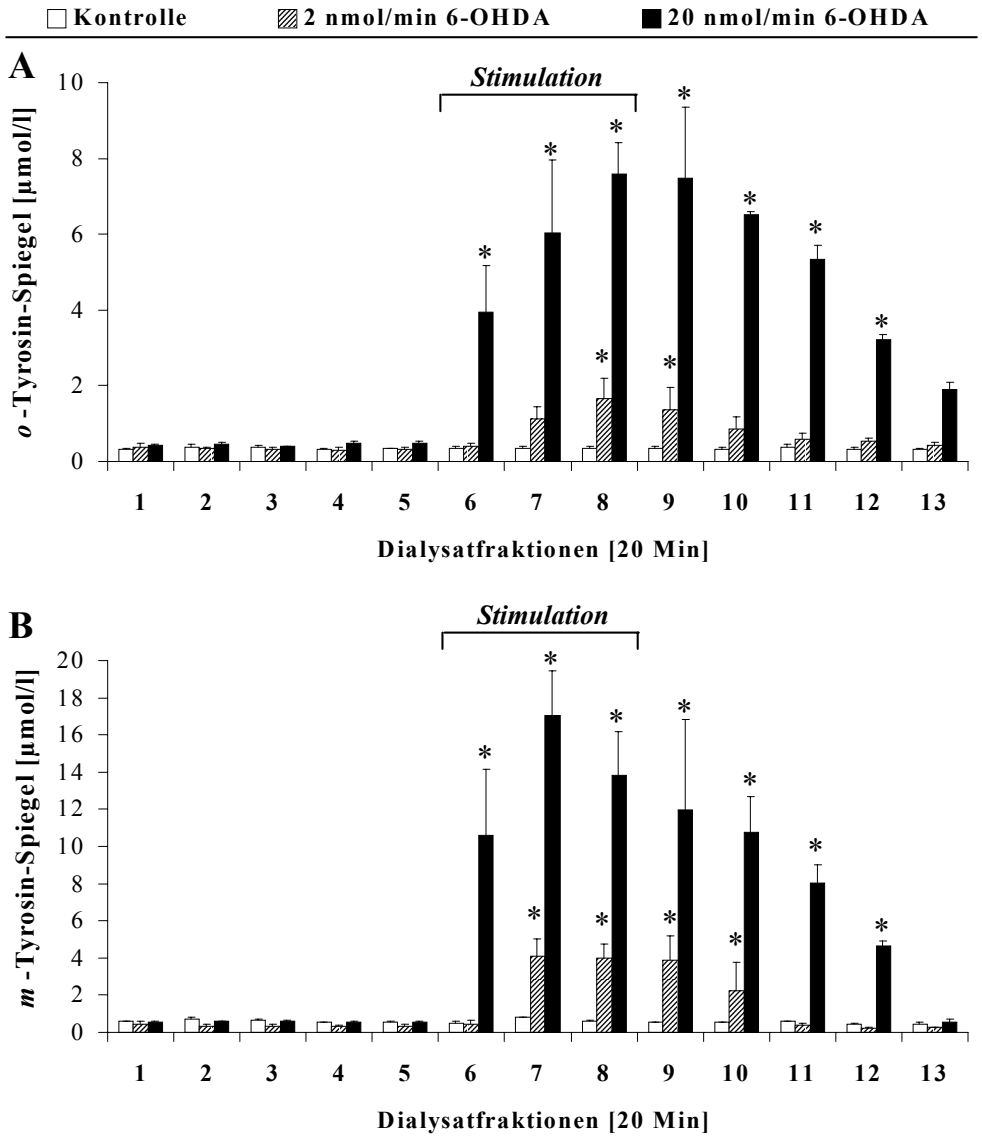
	***o*-Tyrosin**	***m*-Tyrosin**	***NO*-Tyrosin**	***NO*-Phenylalanin**
	[μmol/l]	**[μmol/l]**	**[nmol/l]**	**[nmol/l]**
Kontrolle	0.35 ± 0.04	0.63 ± 0.04	3.64 ± 1.15	3.99 ± 3.31
6-OHDA 1 mM	0.33 ± 0.07	0.34 ± 0.07	3.22 ± 0.79	3.74 ± 2.06
6-OHDA 10 mM	0.49 ± 0.02	0.55 ± 0.05	4.21 ± 1.12	2.86 ± 0.64

ROS & RNS

Die intrastriatale 6-OHDA-Stimulation zeigte einen dosisabhängigen Anstieg der Hydroxylradikalbildung gemessen als *o*- und *m*-Tyrosin, der 40 - 60 Minuten nach Stimulationsbeginn maximal war. *o*-Tyrosin stieg signifikant auf Werte von 1.65 ± 0.53 μmol/l (1 mM 6-OHDA) bzw. 7.60 ± 0.83 μmol/l (10 mM 6-OHDA) und *m*-Tyrosin auf 4.08 ± 0.93 μmol/l (1 mM 6-OHDA) bzw. 17.07 ± 2.41 μmol/l (10 mM 6-OHDA) (Abb. 3.26 A+B).

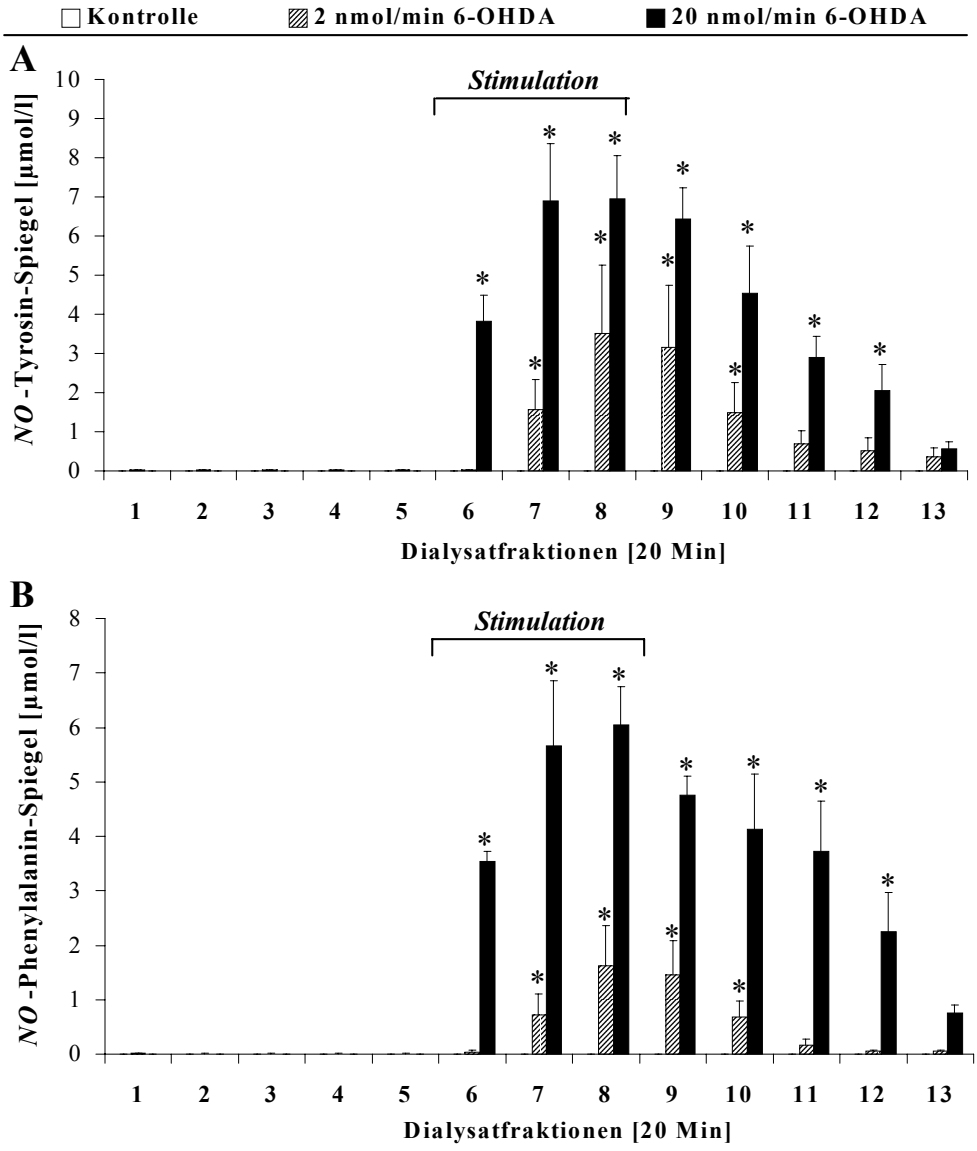
Gleichzeitig kam es zu einem Anstieg von *NO*-Tyrosin und *NO*-Phenylalanin, die die Bildung von Peroxynitrit anzeigen. *NO*-Tyrosin stieg signifikant auf Werte von 2.89 ± 1.67 μmol/l (1 mM 6-OHDA) bzw. 6.96 ± 1.10 μmol/l (10 mM 6-OHDA) und *NO*-Phenylalanin auf 1.62 ± 0.75 μmol/l (1 mM 6-OHDA) bzw. 6.05 ± 0.70 μmol/l (10 mM 6-OHDA) (Abb. 3.27 A+B).

Abb. 3.26: Effekte einer 6-OHDA-Stimulation auf die Hydroxylradikalproduktion



Effekte der intrastriatalen Applikation von 1 und 10 mM (≙ 2 und 20 nmol/min) 6-Hydroxydopamin auf die Extrazellularspiegel von o- (A) und m-Tyrosin (B). Die Implantation der Sonde erfolgte einen Tag vor der Mikrodialyse in das linke Striatum von C57BL/6-Mäusen.
Dargestellt sind Mittelwerte ± SEM von n = 5 - 6 Tieren. Die statistische Auswertung im Vergleich mit der Kontrollgruppe erfolgte mittels Varianzanalyse und nachfolgendem Duncan's-Test ($p < 0.05$).*

Abb. 3.27: Effekte einer 6-OHDA-Stimulation auf die Peroxynitrit-Entstehung



Effekte der intrastriatalen Applikation von 1 und 10 mM (≙ 2 und 20 nmol/min) 6-Hydroxydopamin auf die Extrazellularspiegel von NO-Tyrosin (A) und NO-Phenylalanin (B). Die Implantation der Sonde erfolgte einen Tag vor der Mikrodialyse in das linke Striatum der Mäuse.
Dargestellt sind Mittelwerte ± SEM von n = 5 - 6 Tieren. Die statistische Auswertung im Vergleich mit der Kontrollgruppe erfolgte mittels Varianzanalyse und nachfolgendem Duncan's-Test ($p < 0.05$).*

3.4.1.2 Intrastriatale Applikation von 6-OHDA (TNF-α (-/-) Mäuse)

Um den Einfluss inflammatorischer Effekte auf die Neurodegeneration zu untersuchen, wurden TNF-α (-/-) Mäuse wie im vorangegangenen Versuch mit 6-OHDA im Striatum stimuliert und die neurochemischen Veränderungen gemessen.

Die reverse Mikrodialyse mit 5 mM D-Phenylalanin ergab stabile Basislinienwerte (Mittelwert der Fraktionen 1 - 5) der Hydroxylierungsprodukte (Tab. 3.12).

Tab. 3.12: Basislinienwerte der experimentellen Gruppen im Vergleich (TNF-α (-/-) Mäuse)

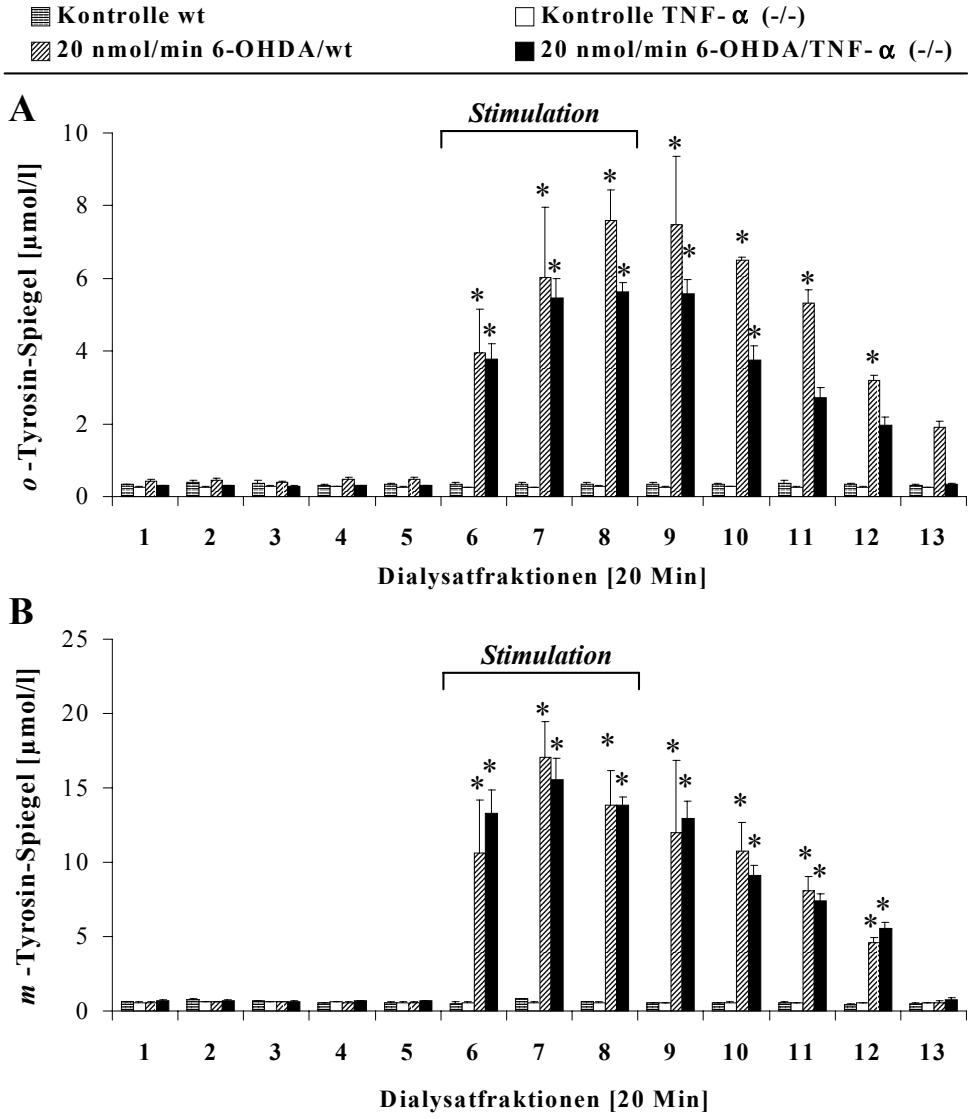
	o-Tyrosin	*m*-Tyrosin	*NO*-Tyrosin	*NO*-Phenylalanin
	[μmol/l]	[μmol/l]	[nmol/l]	[nmol/l]
Kontrolle wt	0.35 ± 0.04	0.63 ± 0.04	3.64 ± 1.15	3.99 ± 3.31
Kontrolle TNF-α (-/-)	0.27 ± 0.02	0.58 ± 0.05	2.26 ± 1.09	1.76 ± 0.78
6-OHDA	0.49 ± 0.02	0.55 ± 0.05	4.21 ± 1.12	2.86 ± 0.66
6-OHDA TNF-α (-/-)	0.30 ± 0.01	0.67 ± 0.04	3.30 ± 0.37	2.96 ± 0.35

ROS & RNS

Die intrastriatale 6-OHDA-Stimulation zeigte auch hier eine dosisabhängige Hydroxylradikalbildung, die als Anstieg der Spiegel von *o*- und *m*-Tyrosin gemessen werden konnte. 40 - 60 Minuten nach Stimulationsbeginn erreichte *o*-Tyrosin signifikante Werte von 7.60 ± 0.83 μmol/l (wt) bzw. 5.15 ± 0.26 μmol/l (TNF-α (-/-)) und *m*-Tyrosin von 17.07 ± 2.41 μmol/l (wt) bzw. 15.55 ± 1.41 μmol/l (TNF-α (-/-)) (Abb. 3.28 A+B).

Gleichzeitig kam es zu einem Anstieg von *NO*-Tyrosin und *NO*-Phenylalanin, die die Bildung von Peroxynitrit anzeigen. *NO*-Tyrosin stieg signifikant auf Werte 6.96 ± 1.10 μmol/l (wt) bzw. 6.16 ± 0.57 μmol/l (TNF-α (-/-)) und *NO*-Phenylalanin auf 6.05 ± 0.70 μmol/l (wt) bzw. 5.73 ± 0.51 μmol/l (TNF-α (-/-)) (Abb. 3.29 A+B).

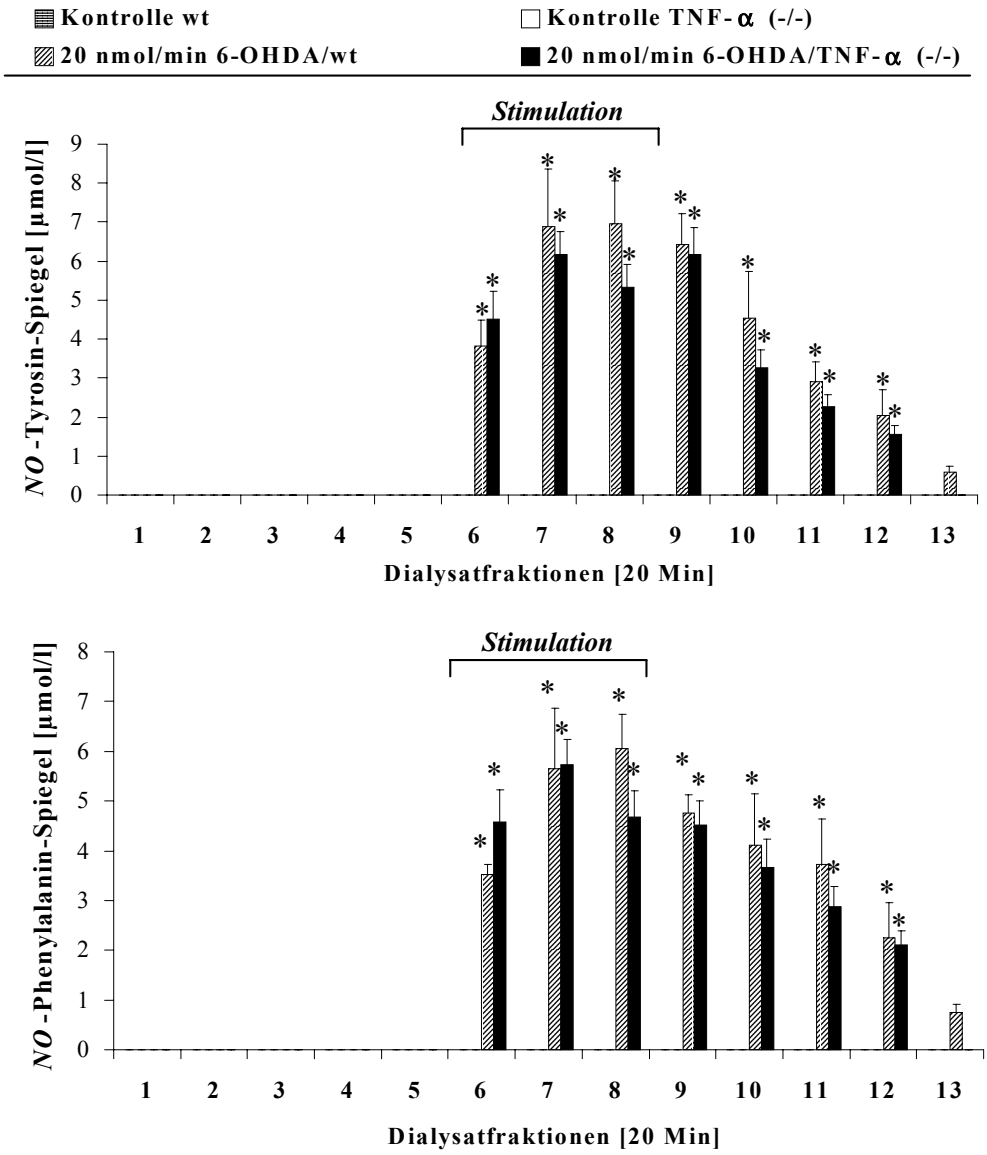
Abb. 3.28: Effekte von 6-OHDA auf die Hydroxylradikalproduktion in TNF-α (-/-) Mäusen



Effekte der intrastriatalen Applikation von 10 mM ($\triangleq$ 20 nmol/min) 6-OHDA auf die Extrazellularspiegel von o-Tyrosin (A) und m-Tyrosin (B) in wt- und TNF-α (-/-) Tieren. Die Implantation der Sonde erfolgte einen Tag vor der Mikrodialyse in das linke Striatum der Mäuse.

Dargestellt sind Mittelwerte $\pm$ SEM von n = 5 - 6 Tieren. Die statistische Auswertung im Vergleich mit der Kontrollgruppe erfolgte mittels Varianzanalyse und nachfolgendem Duncan's-Test ($p < 0.05$).*

Abb. 3.29: Effekte von 6-OHDA auf die Peroxynitrit-Entstehung in TNF-α (-/-) Mäusen



Effekte der intrastriatalen Applikation von 10 mM ($\triangleq$ 20 nmol/min) 6-Hydroxydopamin auf die Extrazellularspiegel von NO-Tyrosin (A) und NO-Phenylalanin (B) in wt- und TNF-α (-/-) Tieren. Die Implantation der Sonde erfolgte einen Tag vor der Mikrodialyse in das linke Striatum der Mäuse.
Dargestellt sind Mittelwerte $\pm$ SEM von n = 5 - 6 Tieren. Die statistische Auswertung im Vergleich mit der Kontrollgruppe erfolgte mittels Varianzanalyse und nachfolgendem Duncan's-Test ($p < 0.05$).*

3.4.1.3 Intrastriatale Applikation von 3-NP

Auch die Perfusion mit 3-NP lieferte stabile Basislinienwerte (Mittelwerte der Fraktionen 1 - 5) für die Hydroxylierungsprodukte (Tab. 3.13).

Tab. 3.13: Basislinienwerte der experimentellen Gruppen im Vergleich

	o-Tyrosin	*m*-Tyrosin	*NO*-Tyrosin	*NO*-Phenylalanin
	[μmol/l]	[μmol/l]	[nmol/l]	[nmol/l]
Kontrolle	0.34 ± 0.03	0.21 ± 0.01	3.64 ± 1.15	3.99 ± 3.31
3-NP 10 mM	0.26 ± 0.01	0.21 ± 0.01	3.47 ± 1.90	5.39 ± 2.81
3-NP 100 mM	0.29 ± 0.02	0.20 ± 0.01	4.56 ± 0.90	4.73 ± 1.12

Wie 6-OHDA erzeugte die Stimulation mit 3-NP eine dosisabhängige Produktion von Hydroxylradikalen. 60 Minuten nach Stimulationsbeginn bewirkte die niedrige Dosis (10 mM 3-NP) einen signifikanten Anstieg von *o*-Tyrosin auf einen Maximalwert von 0.58 ± 0.01 μmol/l, die hohe Dosis (100 mM 3-NP) auf 3.9 ± 0.19 μmol/l. Gleichzeitig stiegen die Werte für *m*-Tyrosin auf 0.31 ± 0.09 μmol/l (10 mM 3-NP) bzw. 2.38 ± 0.66 μmol/l (100 mM 3-NP) (Abb. 3.30 A+B).

Bei den Nitrierungsprodukten *NO*-Tyrosin und *NO*-Phenylalanin war hingegen kein Anstieg der Extrazellularspiegel durch 3-NP über die Nachweisgrenze zu erkennen.

3.4.1.4 Intrastriatale Applikation von MPP^+

Ein ähnlicher Effekt zeigte sich bei der Stimulation mit MPP^+. Weder die niedrige Konzentration von 10 mM MPP^+ noch die hohe Dosis von 100 mM MPP^+ konnten einen Anstieg der Nitrierungsprodukte über die Nachweisgrenze erzeugen (zur Hydroxylradikalbildung siehe Kap. 3.2.3.4).

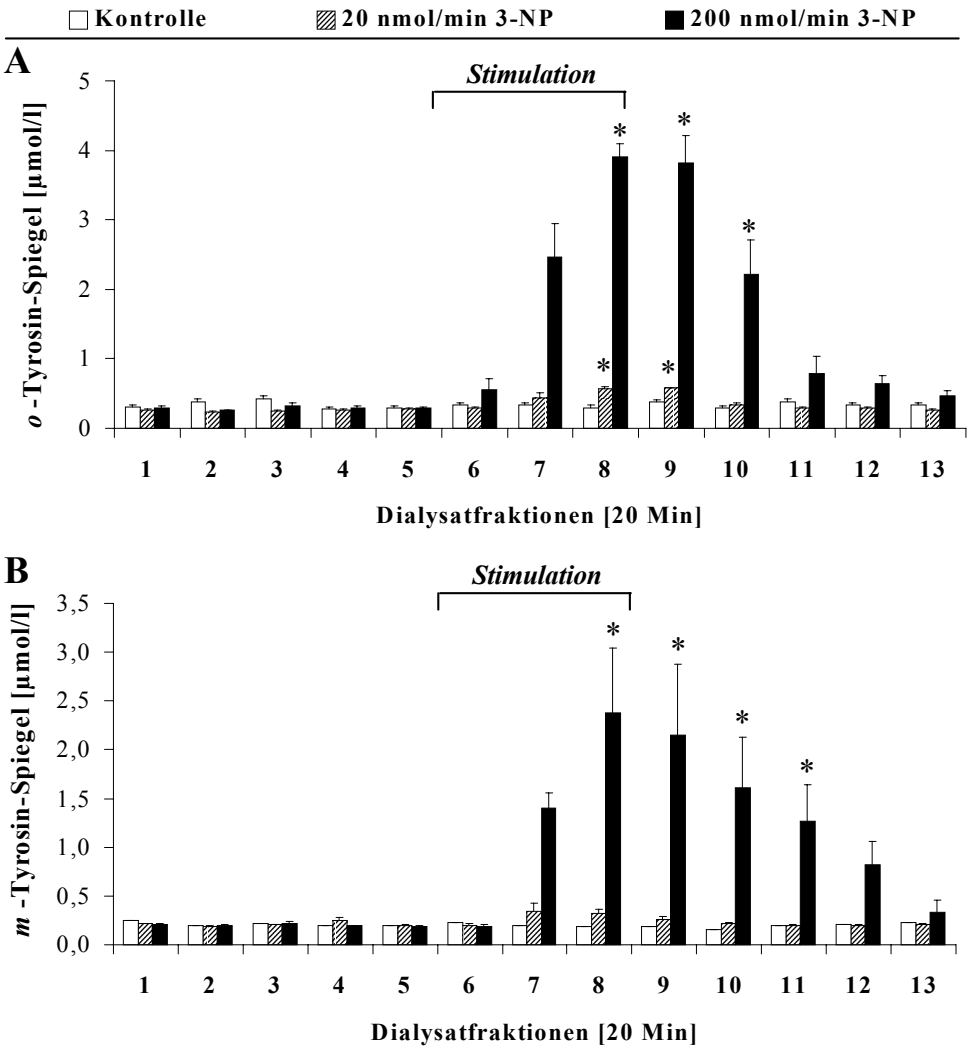
3.4.1.5 *Zusammenfassung der Ergebnisse*

Die Stimulation mit 6-OHDA bewirkte einen kurzzeitigen starken Anstieg der Hydroxylierungs- und Nitrierungsprodukte zeitgleich zur Applikation, auf den das pro-inflammatorische Zytokin TNF-α keinen Einfluss zeigte

Die Stimulation mit 3-NP führte zu einem deutlichen Anstieg der Hydroxylradikalmarker, dieser war jedoch um den Faktor 2 schwächer als nach 6-Hydroxydopamin. Ein Anstieg der Nitrierungsmarker konnte nicht nachgewiesen werden.

MPP$^+$ hatte bereits im Salicylat-Assay zu einer Abnahme der Hydroxylradikalbildung geführt und auch im Phenylalanin-Assay wurde kein Anstieg der Nitrierungsprodukte gemessen.

Abb. 3.30: Effekte von 3-NP auf die Hydroxylradikalbildung



Effekte der intrastriatalen Applikation von 10 und 100 mM (≙ 20 und 200 nmol/min) 3-Nitropropionsäure auf die Extrazellularspiegel von o-Tyrosin (A) und m-Tyrosin (B). Die Implantation der Sonde erfolgte einen Tag vor der Mikrodialyse in das linke Striatum von C57BL/6-Mäusen.
Dargestellt sind Mittelwerte ± SEM von n = 5 - 6 Tieren. Die statistische Auswertung im Vergleich mit der Kontrollgruppe erfolgte mittels Varianzanalyse und nachfolgendem Duncan's-Test ($p < 0.05$).*

3.4.2 Mechanismen der Malonat-Toxizität

3.4.2.1 Versuchsdesign

Das Experiment wurde an männlichen Wistar-Ratten durchgeführt. Für die Gewebeuntersuchungen wurden pro Gruppe 9 Tiere eingesetzt, für die Mikrodialyse jeweils 6.

	Wirkstoff & Dosierung		**Injektionszeitpunkt (vor der Gehirnentnahme)**
Gruppe 1	physiologische Kochsalzlösung		
Gruppe 2	Reserpin	1 x 5 mg/kg i.p.	12 h
	+ AMPT	1 x 250 mg/kg i.p.	1 h
Gruppe 3	GBR 12909	2 x 4 mg/kg i.p.	4 h + 1 h

3.4.2.2 Bestimmung der Gewebespiegel

GBR 12909

Der DAT-Inhibitor GBR 12909 führte nur zu einer schwachen, nicht-signifikanten Reduktion der Dopamin-Konzentration.

Reserpin/AMPT

Die Behandlung mit der Kombination von Reserpin und AMPT dagegen bewirkte eine striatale Verarmung an Dopamin von etwa 99% (von 11.65 ± 1.45 auf 0.12 ± 0.01 ng/mg Nassgewebegewicht). Für seine Metabolite DOPAC und HVA ergaben sich vergleichbare Werte (Abb. 3.31 A+B).

3.4.2.3 *In-vivo* Mikrodialyse

Die Perfusion der Striata lieferte stabile Basislinienwerte (Mittelwerte der Fraktionen 1 - 5) (Tab. 3.14). Die Vorbehandlung mit Reserpin/AMPT führte zu einer leichten Erhöhung der Basalwerte von Dopamin, während eine Vorbehandlung mit GBR 12909 zu einem Absinken führte.

Tab. 3.14: Basislinienwerte der experimentellen Gruppen im Vergleich

	Dopamin	**2,3-DHBA**
	[nmol/l]	**[nmol/l]**
Kontrolle	5.15 ± 0.85	29.91 ± 3.23
Reserpin/AMPT	8.57 ± 2.15	21.83 ± 4.51
GBR 12909	2.47 ± 0.44	31.70 ± 1.24

GBR 12909

GBR 12909 zeigte eine zwar signifikante, aber nur schwache Senkung der Dopamin-Freisetzung um 37.2% (Abb. 3.32 A). Dennoch senkte GBR 12909 die Radikalbildung um 57.9% (Abb. 3.32 B).

Reserpin/AMPT

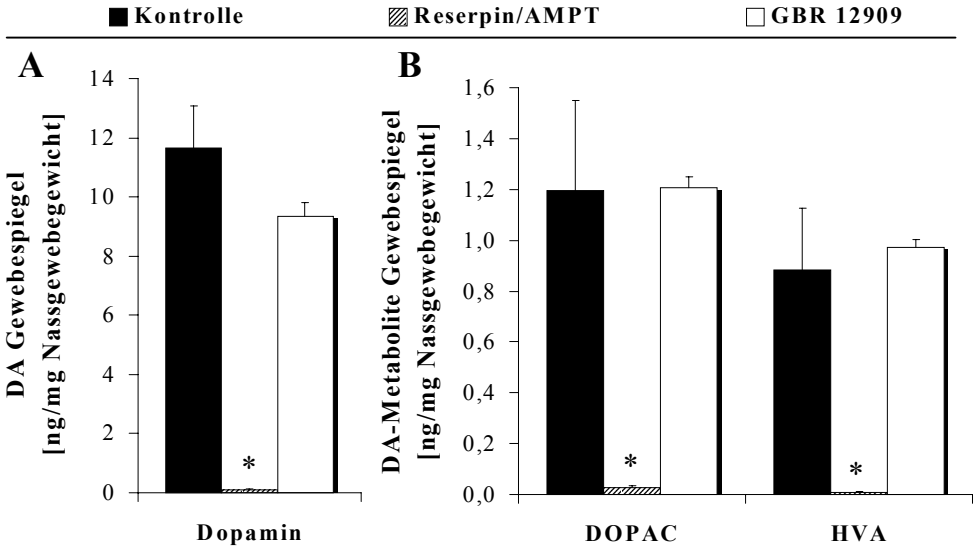
Die Kombination aus Reserpin und AMPT senkte die Malonat-induzierte Freisetzung von Dopamin signifikant um 95.8% (Abb. 3.32 A). Die Radikalbildung nahm um 64.8% (Reserpin/AMPT) ab (Abb. 3.32 B).

3.4.2.4 *Zusammenfassung der Ergebnisse*

Während die kombinierte Hemmung des VMAT und der Tyrosinhydroxylase die striatalen Gewebespiegel von Dopamin und seinen Metaboliten nahezu vollständig depletierte, zeigte die Hemmung des DAT keinen Einfluss auf die Gewebespiegel.

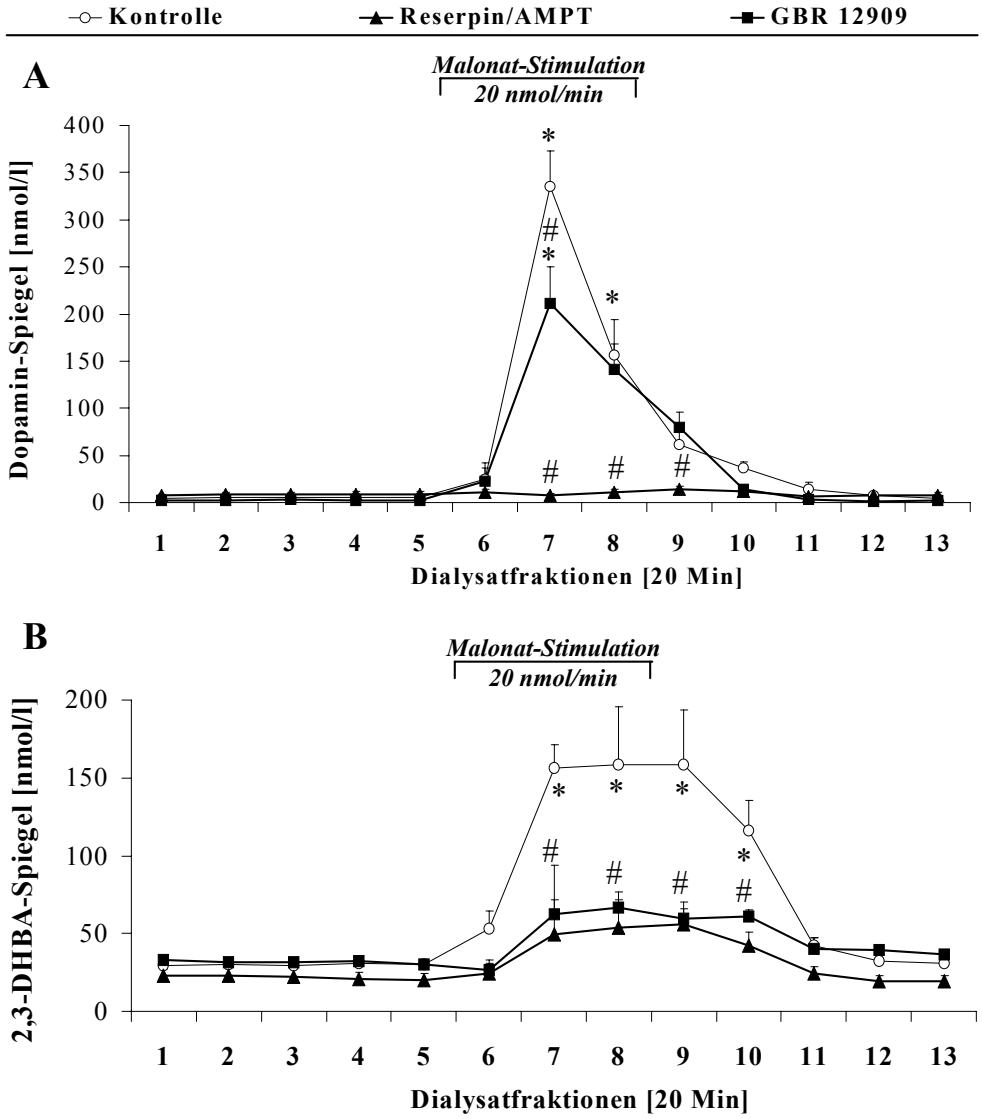
Die Malonat-induzierte Bildung freier Hydroxylradikale wurde dennoch durch beide Vorbehandlungen effizient gesenkt.

Abb. 3.31: Effekte von DAT- und VMAT-Inhibitoren auf die striatalen Gewebespiegel



Effekte von Reserpin/AMPT (Reserpin 5 mg/kg i.p. 12 h und AMPT 250 mg/kg i.p. 1 h vor der Gehirnentnahme) und GBR 12909 (4 mg/kg i.p. 4 h und 1 h vor der Gehirnentnahme) auf die striatalen Konzentrationen von Dopamin (A) und seinen Metaboliten DOPAC und HVA (B).
Dargestellt sind Mittelwerte ± SEM von $n = 8$ Tieren. Die statistische Auswertung im Vergleich mit der Kontrollgruppe erfolgte mittels Varianzanalyse und nachfolgendem Duncan's-Test ($p < 0.05$).*

Abb. 3.32: Effekte von DAT- und VMAT- Inhibitoren auf die striatalen Extrazellularwerte von Dopamin und 2,3-DHBA



Effekte von Reserpin/AMPT (Reserpin 5 mg/kg i.p., 12 h vor der Basislinienmessung und AMPT 250 mg/kg i.p., 1 h vor der Basislinienmessung) und GBR 12909 (4 mg/kg i.p., 4 h und 1 h vor der Malonatstimulation) auf die Malonat-induzierte Freisetzung von Dopamin (A) und die Bildung von 2,3-DHBA (B). Die Implantation der Sonde erfolgte einen Tag vor der Mikrodialyse in das linke Striatum der Wistar-Ratten.
Dargestellt sind Mittelwerte ± SEM von n = 6 - 8 Tieren. Die statistische Auswertung erfolgte mittels zweifacher Varianzanalyse und nachfolgendem Tuckey's Test zum Vergleich mit der behandelten Gruppen mit der Kontrolle ($p < 0.05$) sowie der behandelten Gruppen untereinander (# $p < 0.05$).*

3.4.3 Tyramin

Die Perfusion der Striata lieferte stabile Basislinienwerte, die für Dopamin bei durchschnittlich 1.41 nmol/l, für DOPAC bei 103.5 nmol/l, Für HVA bei 241.8 und für 2,3-DHBA bei 31.5 nmol/l lagen. Zwischen den experimentellen Gruppen ergaben sich keine signifikanten Unterschiede.

3.4.3.1 Effekte der systemischen Gabe von Tyramin

Nach intraperitonealer Injektion von 200 mg/kg Tyramin zeigten sich keine signifikanten Veränderungen in den striatalen Werten von Dopamin, DOPAC, HVA und 2,3-DHBA im Vergleich zur Basislinie (Abb. 3.31 A-C).

3.4.3.2 Effekte der intrastriatalen Infusion von Tyramin

Die Perfusion mit Tyramin (1, 10 und 100 mM) über die Mikrodialyse-Sonde bewirkte eine dosisabhängige Erhöhung der Dopamin-Spiegel sowie der Radikalbildung.

Dopamin & Metabolite

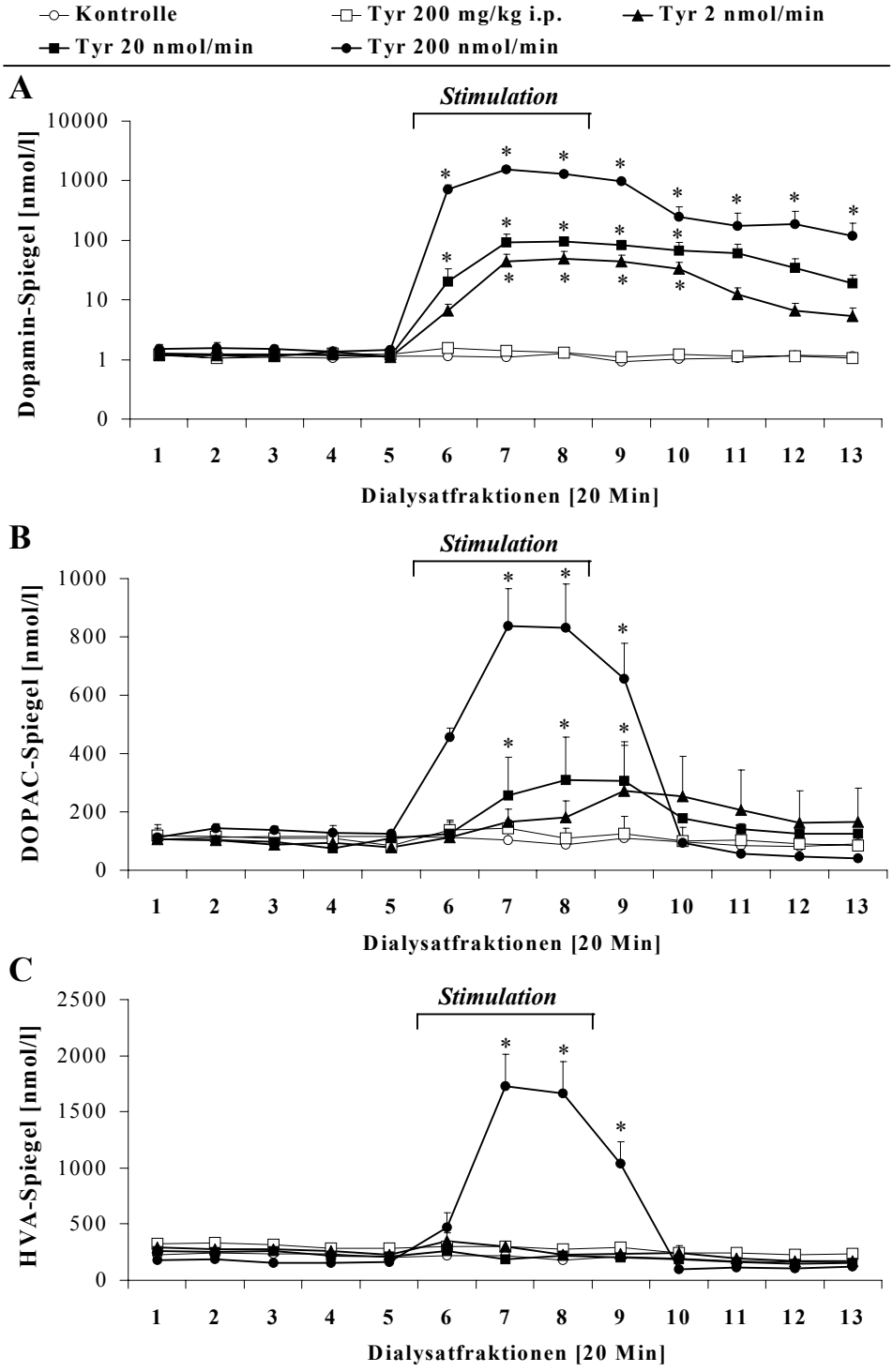
Die niedrige Tyramindosis (1 mM) erhöhte die maximalen Dopamin-Spiegel signifikant auf 49.8 ± 15.2 nmol/l, die mittlere (10 mM Tyr) auf 94.6 ± 18.5 nmol/l und die hohe (100 mM Tyr) auf 1550.4 ± 179.5 nmol/l (Abb. 3.33 A).

Die Dopamin-Metabolite DOPAC und HVA wurden nur in den höheren Dosierungen durch Tyramin signifikant erhöht. DOPAC stieg nach Stimulation mit 10 mM Tyramin auf 309.2 ± 45.5 nmol/l und nach 100 mM Tyramin auf 836.4 ± 130.1 nmol/l. Bei HVA zeigte sich nur in der hohen Dosierung von 100 mM Tyramin ein Effekt mit einem Anstieg der Extrazellularwerte auf 1725.8 ± 285.5 nmol/l (Abb. 3.33 B+C).

2,3-DHBA

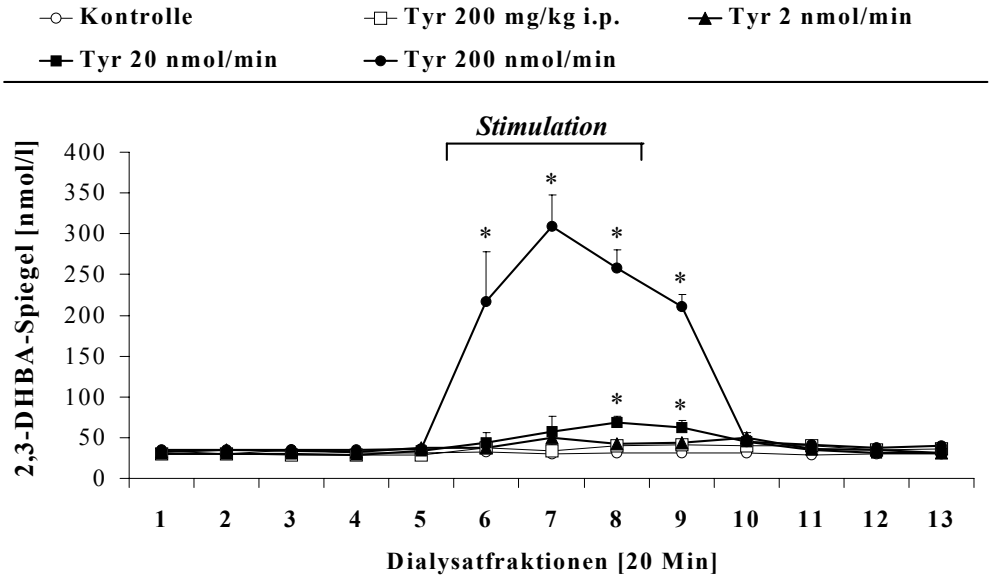
Gleichzeitig stiegen die 2,3-DHBA-Spiegel jeweils signifikant auf 49.6 ± 6.3 (1 mM Tyr), 68.0 ± 7.6 (10 mM Tyr) und 308.7 ± 39.4 nmol/l (100 mM Tyr) (Abb. 3.34).

Abb. 3.33: Effekte von Tyramin auf das dopaminerge System



Effekte der systemischen (Tyr 200 mg/kg i.p.) und intrastriatalen Gabe von 1, 10 und 100 mM Tyramin (≙ Tyr 2, 20, 200 nmol/min) auf die striatalen Dopamin- (A), DOPAC- (B) und HVA- Spiegel (C) in nicht geschädigten Tieren.
Angegeben sind Mittelwerte ± SEM von n = 5 - 6 Tieren. Die Dopamin-Werte sind auf einer logarithmischen Skala dargestellt. Die statistische Auswertung im Vergleich mit der Kontrollgruppe erfolgte mittels Varianzanalyse und nachfolgendem Duncan's-Test ($p < 0.05$).*

Abb. 3.34: Effekte von Tyramin auf die Hydroxylradikalbildung



Effekte der systemischen (Tyr 200 mg/kg i.p.) und intrastriatalen Gabe von 1, 10 und 100 mM Tyramin (≙ Tyr 2, 20, 200 nmol/min) auf die striatale Hydroxylradikalproduktion gemessen als 2,3-DHBA in nicht geschädigten Tieren.
Dargestellt sind Mittelwerte ± SEM von n = 5 - 6 Tieren. Die statistische Auswertung im Vergleich mit der Kontrollgruppe erfolgte mittels Varianzanalyse und nachfolgendem Duncan's-Test ($p < 0.05$).*

3.4.3.3 Effekte von MPTP auf die Tyramin-induzierte Radikalbildung

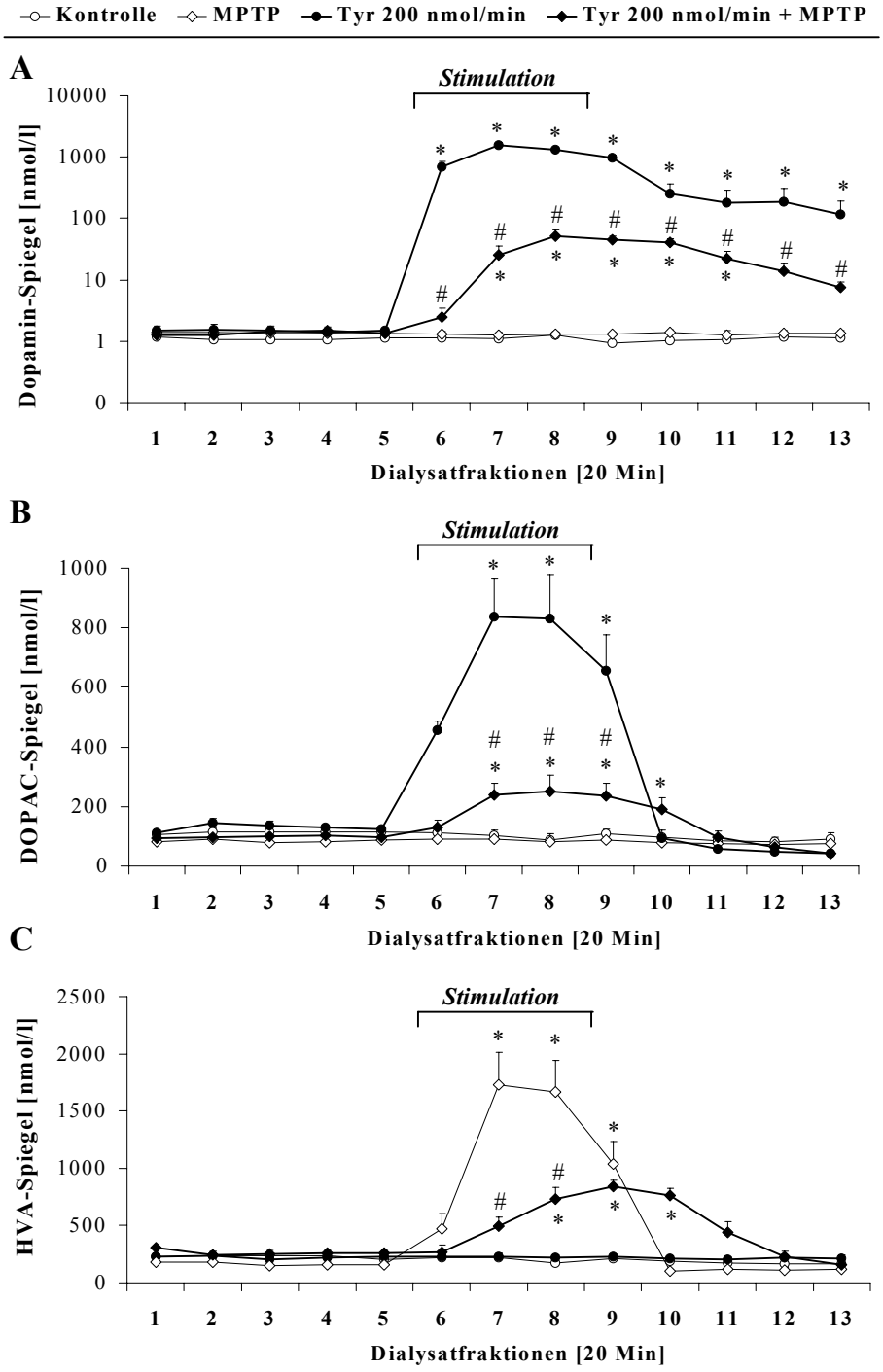
Dopamin & Metabolite

Die extrazellulären Spiegel von Dopamin und seinen Metaboliten der MPTP-behandelten und gesunden Tiere unterschieden sich nicht in den Basalwerten. Trotzdem erzeugte die MPTP-Behandlung (40 mg/kg i.p., 7 Tage vor der Mikrodialyse) eine signifikante Dopamin-Depletion um ca. 65% im striatalen Gewebe (von 9.27 ± 0.61 auf 3.38 ± 1.07 ng/mg Nassgewebegewicht Dopamin). Die Tyramin-induzierte Freisetzung von Dopamin, DOPAC und HVA wurde im Vergleich zu den gesunden Tieren signifikant auf 3.29% (Dopamin), 30.0% (DOPAC) und 48.9% (HVA) gesenkt (Abb. 3.35 A-C).

2,3-DHBA

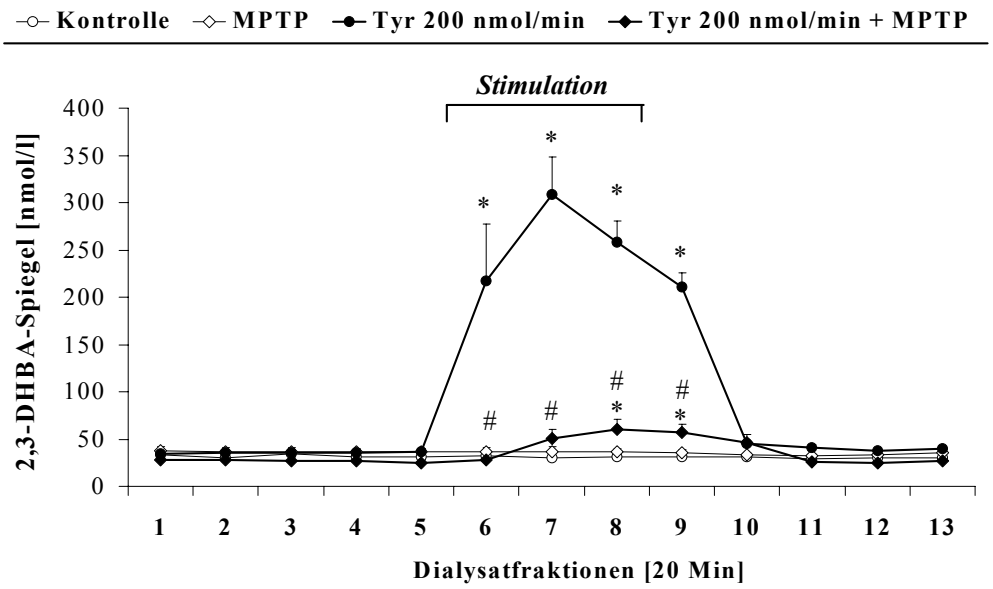
Die Basalwerte von 2,3-DHBA blieben durch die MPTP-Behandlung unverändert. Die Tyramin-induzierte Hydroxylradikalbildung sank um 80.6% (Abb. 3.36).

Abb. 3.35: Effekte von Tyramin auf das dopaminerge System in MPTP-geschädigten Tieren



Effekte von MPTP (40 mg/kg i.p., 7 Tage vor Durchführung der Mikrodialyse) auf die Tyramin (100 mM $\triangleq$ 200 nmol/min) -induzierte Erhöhung der striatalen Dopamin- (A), DOPAC- (B) und HVA-Spiegel (C) im Vergleich zu gesunden Tieren.
Angegeben sind Mittelwerte $\pm$ SEM von $n = 5$ - 6 Tieren. Die Dopamin-Werte sind auf einer logarithmischen Skala dargestellt. Die statistische Auswertung erfolgte mittels Varianzanalyse und nachfolgendem Duncan's-Test ($p < 0.05$ für den Vergleich mit der Kontrollgruppe; # $p < 0.05$ für den Vergleich zwischen den behandelten Gruppen).*

Abb. 3.36: Effekte von Tyramin auf die Hydroxylradikalbildung in MPTP-geschädigten Tieren



Effekte von MPTP (40 mg/kg i.p., 7 Tage vor Durchführung der Mikrodialyse) auf die Tyramin (100 mM ≙ 200 nmol/min) -induzierte Erhöhung der striatalen Hydroxylradikalbildung gemessen als 2,3-DHBA im Vergleich zu gesunden Tieren.
Dargestellt sind Mittelwerte ± SEM von n = 5 - 6 Tieren. Die statistische Auswertung erfolgte mittels Varianzanalyse und nachfolgendem Duncan's-Test ($p < 0.05$ für den Vergleich mit der Kontrollgruppe; # $p < 0.05$ für den Vergleich zwischen den behandelten Gruppen).*

3.4.3.4 Effekte von Tranylcypromin auf die Tyramin-induzierte Radikalbildung

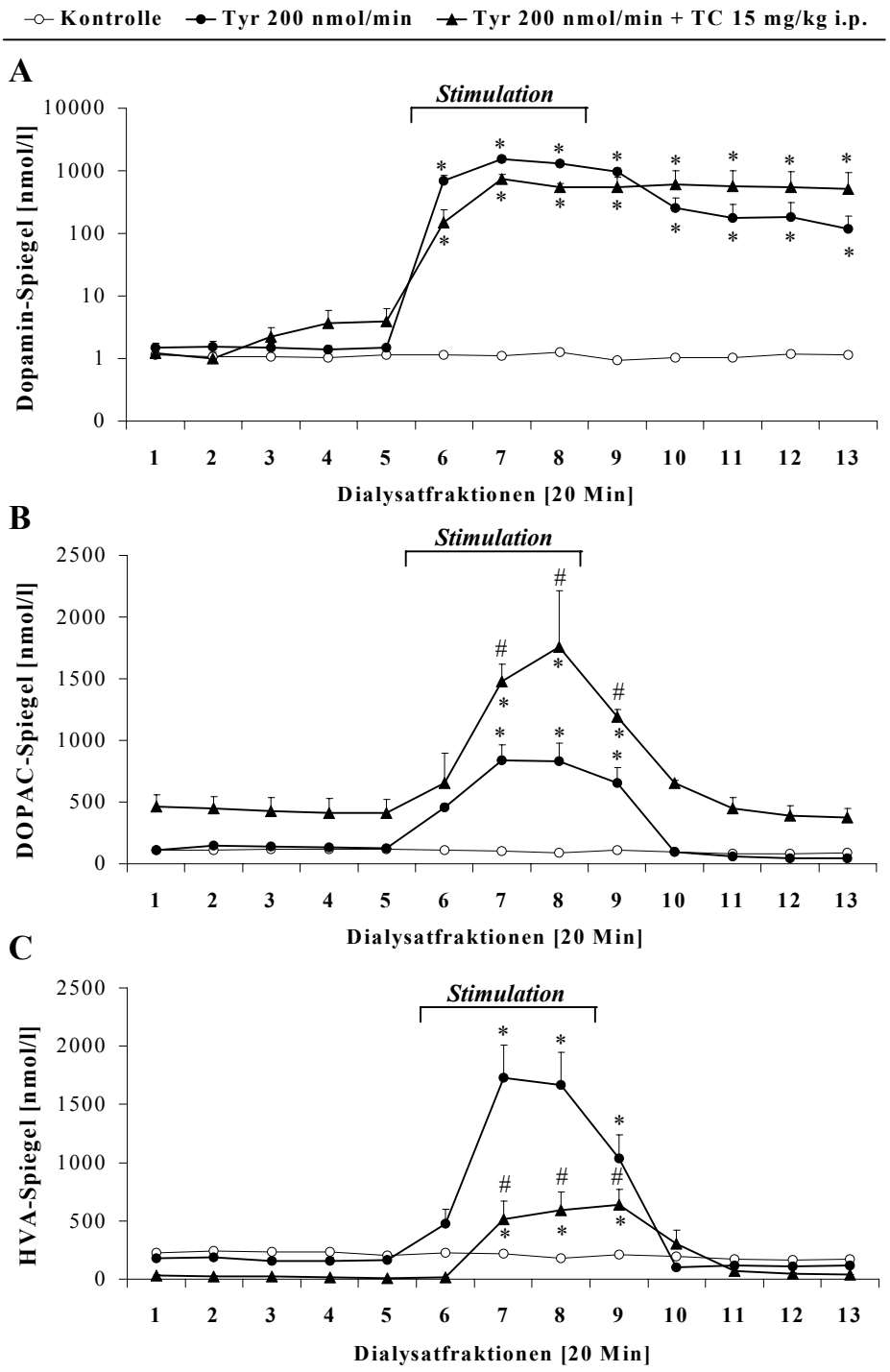
Dopamin & Metabolite

Die Vorbehandlung mit dem MAO-A/B-Inhibitor Tranylcypromin (15 mg/kg i.p.) führte zu einem leichten Anstieg der basalen Dopamin- (2.42 ± 1.15 nmol/l) und einem starken Anstieg der DOPAC-Spiegel (432.89 ± 106.13 nmol/l). Die basalen HVA-Spiegel waren dagegen deutlich erniedrigt (20.16 ± 2.69 nmol/l) (Abb. 3.37 A). Während die Vorbehandlung keinen Einfluss auf die Tyramin-induzierte Dopamin-Freisetzung zeigte, lagen die Spiegel von DOPAC während der Stimulation bei 1753.78 ± 456.5 nmol/l und damit deutlich höher als in der nicht-vorbehandelten Gruppe. HVA stieg zwar signifikant auf 636.94 ± 130.8 nmol/l, diese Werte lagen jedoch signifikant unterhalb der nicht-vorbehandelten Gruppe (Abb. 3.37 B+C).

2,3-DHBA

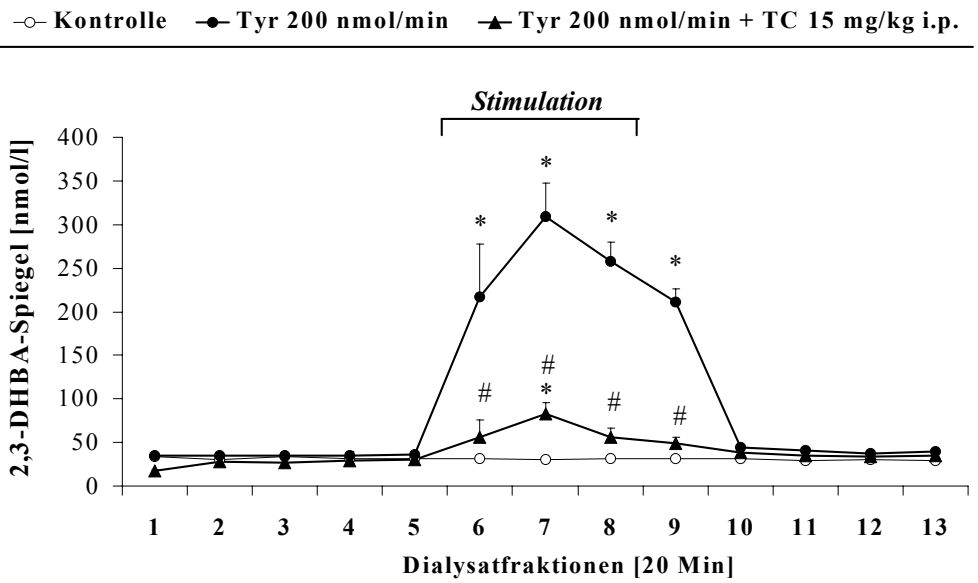
Die Hydroxylradikalbildung gemessen als 2,3-DHBA wurde um 73.2% gesenkt (Abb. 3.38).

Abb. 3.37: Effekte von Tyramin auf das dopaminerge System in Tranylcypromin–vorbehandelten Tieren



Effekte der Vorbehandlung mit Tranylcypromin (TC) (15 mg/kg i.p.) auf die Tyramin (100 mM ≙ 200 nmol/min) -induzierte Erhöhung der striatalen Dopamin- (A), DOPAC- (B) und HVA-Spiegel (C) im Vergleich zu gesunden Tieren.
Angegeben sind Mittelwerte ± SEM von n = 5 - 8 Tieren. Die Dopamin-Werte sind auf einer logarithmischen Skala dargestellt. Die statistische Auswertung erfolgte mittels Varianzanalyse und nachfolgendem Duncan's-Test ($p < 0.05$ für den Vergleich mit der Kontrollgruppe; # $p < 0.05$ für den Vergleich zwischen den behandelten Gruppen).*

Abb. 3.38: Effekte von Tyramin auf die Hydroxylradikalbildung in Tranylcypromin-vorbehandelten Tieren



Effekte der Vorbehandlung mit Tranylcypromin (TC) (15 mg/kg i.p.) auf die Tyramin (100 mM $\triangleq$ 200 nmol/min) -induzierte Erhöhung der striatalen Hydroxylradikalbildung gemessen als 2,3-DHBA im Vergleich zu gesunden Tieren.
Dargestellt sind Mittelwerte $\pm$ SEM von n = 5 - 6 Tieren. Die statistische Auswertung erfolgte mittels Varianzanalyse und nachfolgendem Duncan's-Test ($p < 0.05$ für den Vergleich mit der Kontrollgruppe; # $p < 0.05$ für den Vergleich zwischen den behandelten Gruppen).*

3.4.3.5 *Zusammenfassung der Ergebnisse*

Die intrastriatale Applikation von Tyramin führte zu einer Freisetzung von Dopamin und der Entstehung von Hydroxylradikalen. Die Tyramin-induzierte Radikalbildung konnte sowohl durch MPTP-Schädigung als auch durch die Tranylcypromin-induzierte Hemmung der Monoaminoxidase nahezu vollständig antagonisiert werden.

3.5 Einfluss des NST auf das dopaminerge System

Experimentelle Gruppen und Versuchsdesign:

Für den Versuch wurden 5 Gruppen zu je 6 - 9 männlichen Wistar-Ratten (250 - 275g) eingesetzt, die unilateral mit Kainsäure oder Kochsalzlösung auf Höhe des NST (Koordinaten nach Piallat et al., 1996) lädiert wurden oder unbehandelt blieben (Tab. 3.15).

Kainsäure bedingt über die Aktivierung metabotropher Glutamat-Rezeptoren eine exzitotoxische Zerstörung der Neurone über apoptotische Mechanismen [Filipkowski et al., 1994]. Zur Schädigung wurde die Kainsäure zu 2 mg in 500 μl Kochsalzlösung gelöst und 0.5 μl dieser Lösung mit einer Injektionsgeschwindigkeit von 0.05 μl/30 Sek in den NST injiziert. Die Läsion erfolgte eine Woche vor dem Mikrodialyse-Experiment zusammen mit der Sondenimplantation.

	AP [mm]	**ML [mm]**	**VD [mm]**
NST	+ 5.2	+ 2.5	- 7.5
	von der Interaurallinie	von der Interaurallinie	von der Dura mater

Eine Woche später wurde entweder eine unilaterale Mikrodialyse im Striatum oder eine bilaterale Mikrodialyse in der Substantia nigra mit Kalium-stimulierter Neurotransmitter-Freisetzung durchgeführt (Koordinaten siehe Kap. 2.4.1). Für die Messungen im Striatum wurden CMA 12 Sonden verwendet, während für die kleineren Strukturen wie die Substantia nigra CMA 11 Sonden eingesetzt wurden.

Tab. 3.15: Experimentelle Gruppen

Gruppe	**Anzahl**	**Läsionstyp**	**Lokalisation der Sonde**
(1)	(n=9)	STN nicht-lädiert	unilateral im Striatum
(2)	(n=9)	STN "schein-lädiert" mit Vehikel	unilateral im Striatum
(3)	(n=9)	STN lädiert mit Kainsäure	unilateral im Striatum
(4)	(n=9)	STN "schein-lädiert" mit Vehikel	bilateral in der SN
(5)	(n=9)	STN lädiert mit Kainsäure	bilateral in der SN

3.5.1 Unilaterale Mikrodialyse im Striatum

3.5.1.1 Dopamin und Metabolite

Nach zweistündiger Equilibrierung lieferte die Perfusion der Striata stabile Basislinienwerte, die sich zwischen den Gruppen nicht unterschieden (Tab. 3.16).

Tab. 3.16: Basislinienwerte der experimentellen Gruppen bei Messung im Striatum

	Dopamin	**DOPAC**	**HVA**	**2,3-DHBA**
	[nmol/l]	**[nmol/l]**	**[nmol/l]**	**[nmol/l]**
naiv-Kontrolle	3.43 ± 0.38	442.38 ± 42.86	91.13 ± 8.63	10.38 ± 0.30
Kochsalz-Kontrolle	2.13 ± 0.24	375.46 ± 20.21	81.03 ± 3.73	16.08 ± 1.34
Kainsäure	2.87 ± 0.31	453.73 ± 38.48	81.23 ± 7.95	13.68 ± 0.47

Die Stimulation mit 100 mM Kalium führte zu einem signifikanten Anstieg des extrazellulären Dopamins auf 26.86 ± 4.31 nmol/l (naiv), auf 19,35 ± 3.91 nmol/l (Kochsalzkontrolle) und auf 26,03 ± 7.06 nmol/l bei den Kainsäure-lädierten Tieren (Abb. 3.39 A).

Die Dopamin-Metaboliten nahmen nach Kalium-Stimulation in ihren Konzentrationen ab. DOPAC sank kurzzeitig auf 44.3% bei den naiven Tieren, auf 41.3% in der Kochsalzkontrolle und auf 30.9% bei den Kainsäure-lädierten Tieren. HVA verhielt sich mit einer Abnahme auf 31.4% nmol/l (naiv), auf 39.9% (Kochsalzkontrolle) und auf 31.2% bei den Kainsäure-lädierten Tieren ähnlich (Abb. 3.39 B+C).

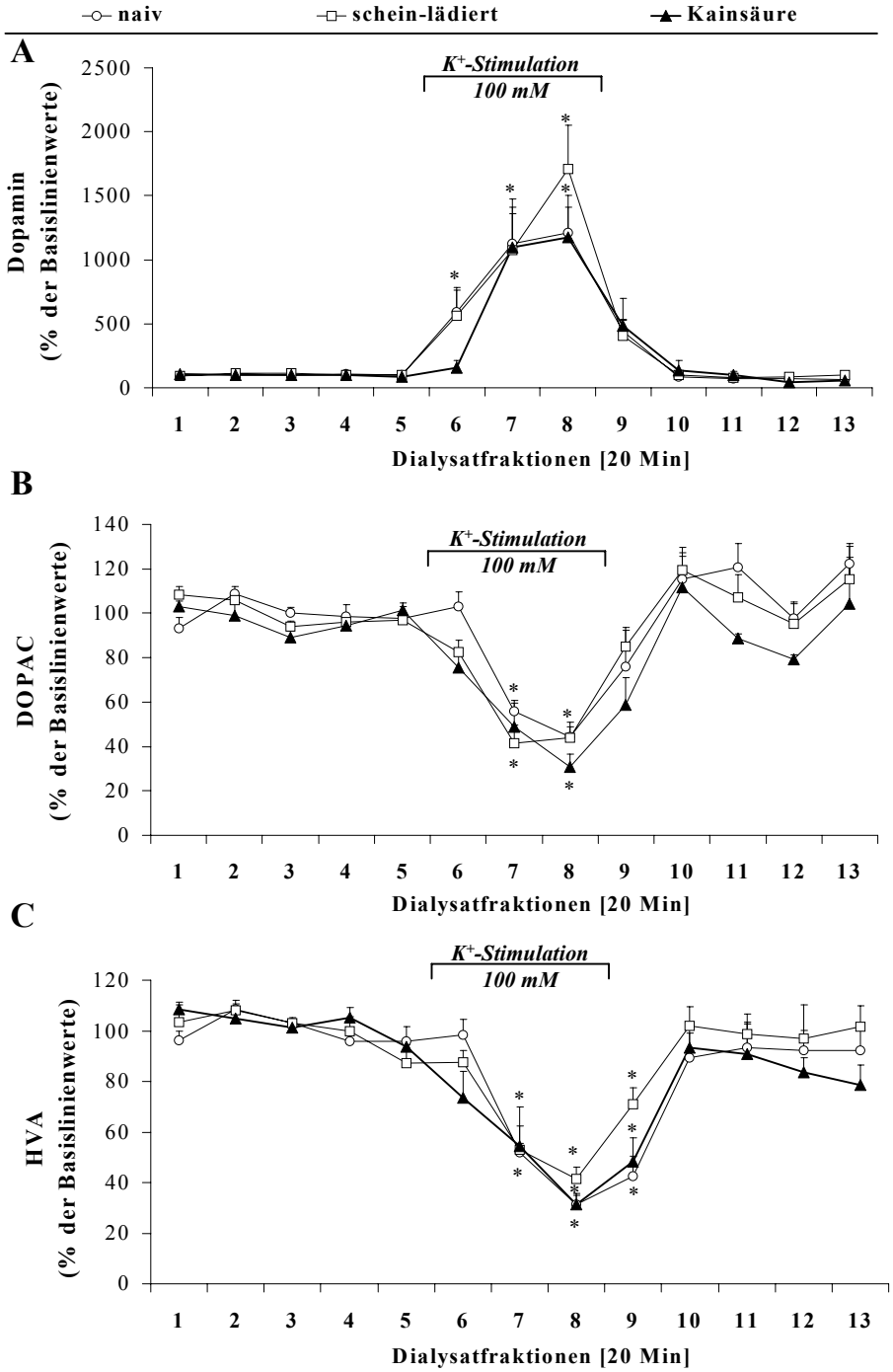
3.5.1.2 2,3-DHBA

Die Spiegel von 2,3-DHBA zeigten einen schwachen, nicht signifikanten Anstieg auf etwa 150% (Abb. 3.40 A).

3.5.1.3 Glutamat

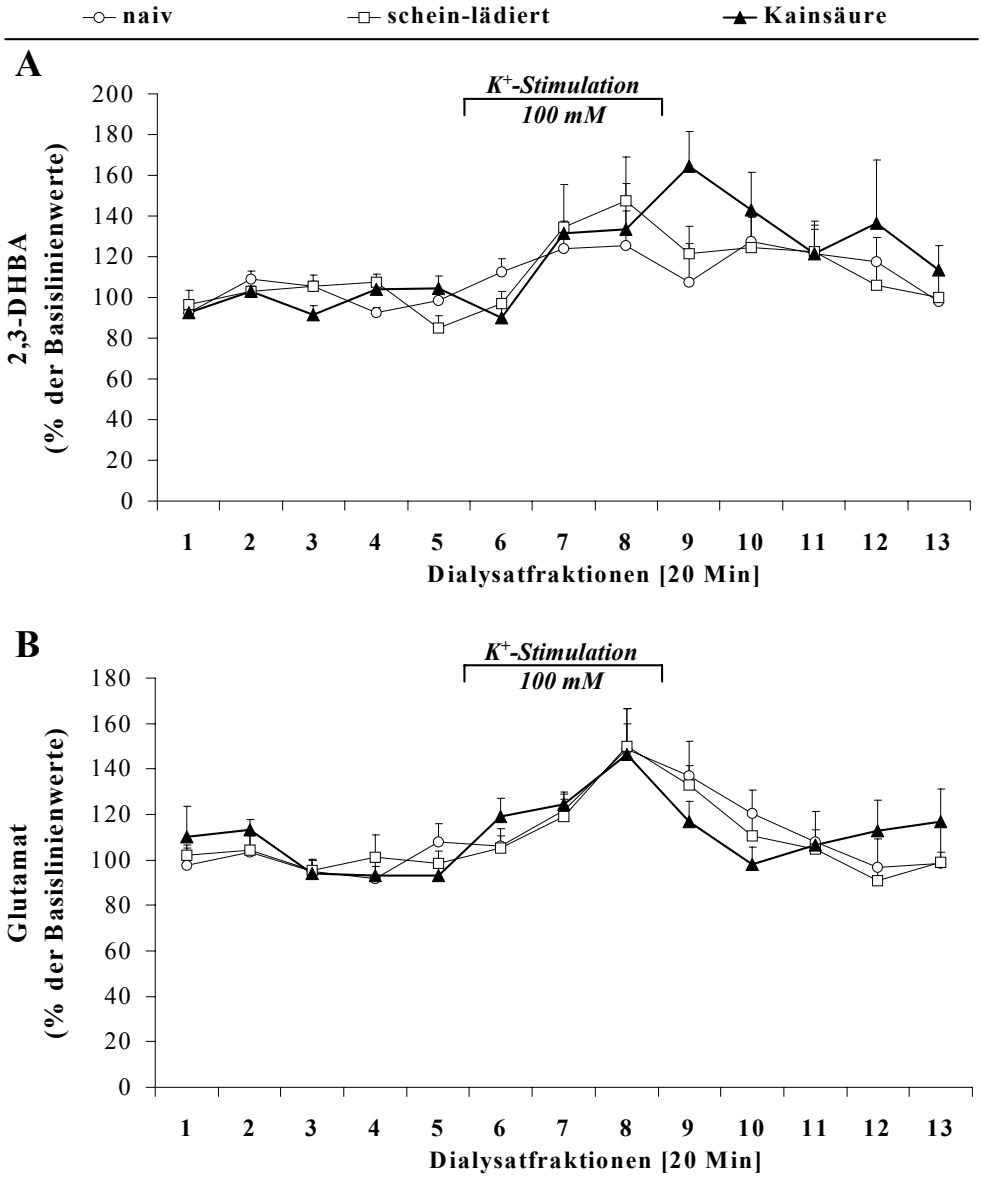
Auch die Werte von Glutamat zeigten nur eine schwache, nicht-signifikante Erhöhung auf ca. 150% (Abb. 3.40 B).

Abb. 3.39: Einfluss der NST-Läsion auf die striatale Neurotransmission



Effekte einer Kainsäureläsion des STN auf die Kalium-stimulierte Freisetzung von Dopamin (A) und seinen Metaboliten DOPAC (B) und HVA (C). Gemessen wurden extrazelluläre Konzentrationen im Striatum unilateral auf der Seite der Schädigung. Die Kainsäureläsion des linken Nucleus subthalamicus sowie die Sonden-Implantation fanden 1 Woche vor der Mikrodialyse statt.
Dargestellt sind Mittelwerte ± SEM von n = 5 - 6 Tieren. Die statistische Auswertung erfolgte mittels Varianzanalyse und nachfolgendem Duncan's Test ($p < 0.05$).*

Abb. 3.40: Einfluss der NST-Läsion auf die striatale Radikalproduktion und Glutamat



Effekte einer Kainsäureläsion des STN auf die Kalium-stimulierte Freisetzung von Hydroxylradikalen gemessen als 2,3-DHBA (A) und die Gewebespiegel von Glutamat (B). Gemessen wurden extrazelluläre Konzentrationen im Striatum unilateral auf der Seite der Schädigung. Die Kainsäureläsion des linken Nucleus subthalamicus sowie die Sonden-Implantation fanden 1 Woche vor der Mikrodialyse statt.
Dargestellt sind Mittelwerte ± SEM von n = 5 - 6 Tieren. Die statistische Auswertung erfolgte mittels Varianzanalyse und nachfolgendem Duncan's Test ($p < 0.05$).*

Zusammenfassung:

Die Läsion des NST zeigte auf striataler Ebene keine Effekte bezüglich Dopamin und seinen Metaboliten, 2,3-DHBA sowie Glutamat im Vergleich zu den naiven Tieren.

3.5.2 Bilaterale Messung in der Substantia nigra

3.5.2.1 Dopamin und Metabolite

Nach zweistündiger Equilibrierung lieferte die Perfusion der Substantia nigra beidseitig stabile Basislinienwerte, die sich zwischen den Gruppen nicht unterschieden (Tab. 3.17).

Tab. 3.17: Basislinienwerte der experimentellen Gruppen bei Messung in der Substantia nigra

	Dopamin	**DOPAC**	**HVA**	**2,3-DHBA**
	[nmol/l]	**[nmol/l]**	**[nmol/l]**	**[nmol/l]**
Kontrolle ipsi	0.72 ± 0.02	7.94 ± 0.40	4.55 ± 0.50	22.38 ± 1.50
Kontrolle contra	0.77 ± 0.06	6.95 ± 1.51	4.39 ± 0.50	22.45 ± 1.01
Kainsäure ipsi	0.67 ± 0.07	7.34 ± 1.26	4.08 ± 0.40	19.54 ± 1.83
Kainsäure	0.60 ± 0.04	6.99 ± 0.51	4.27 ± 0.30	18.89 ± 1.92

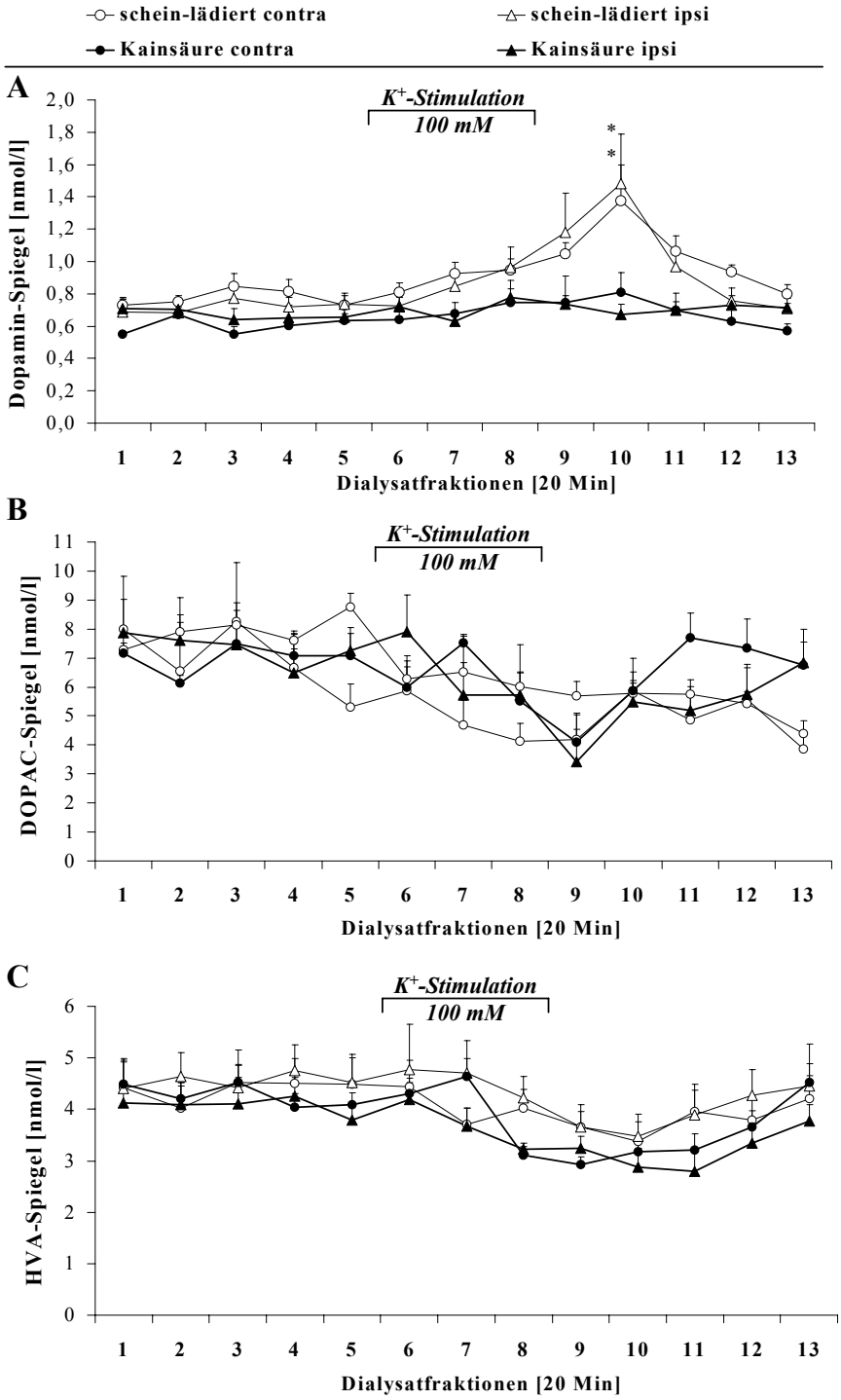
Die Stimulation mit 100 mM Kalium führte zu einem beidseitigen signifikanten Anstieg von extrazellulärem Dopamin in der Kochsalzkontrollgruppe auf 1.48 ± 0.22 (ipsilateral) bzw. 1.37 ± 0.31 nmol/l (contralateral), während der schwache Anstieg in der Kainsäure-lädierten Gruppe auf 0.78 ± 0.11 (ipsilateral) bzw. 0.81 ± 0.21 nmol/l (contralateral) nicht signifikant war (Abb. 3.41 A).

Die Dopamin-Metabolite nahmen auch in der Substantia nigra nach Kalium-Stimulation in ihren Konzentrationen ab: DOPAC sank kurzzeitig und nicht signifikant auf ca. 71.3% (ipsilateral) bzw. 69.4% (contralateral) bei den Kontrolltieren und auf 46.3% (ipsilateral) bzw. 58.6% (contralateral) in der lädierten Gruppe. HVA verhielt sich mit Abfall auf 75.5% (ipsilateral) bzw. 80.5% (contralateral) bei den Kontrolltieren und auf 70.2% (ipsilateral) bzw. 77.7% (contralateral) in der lädierten Gruppe entsprechend (Abb. 3.41 B+C).

3.5.2.2 2,3-DHBA

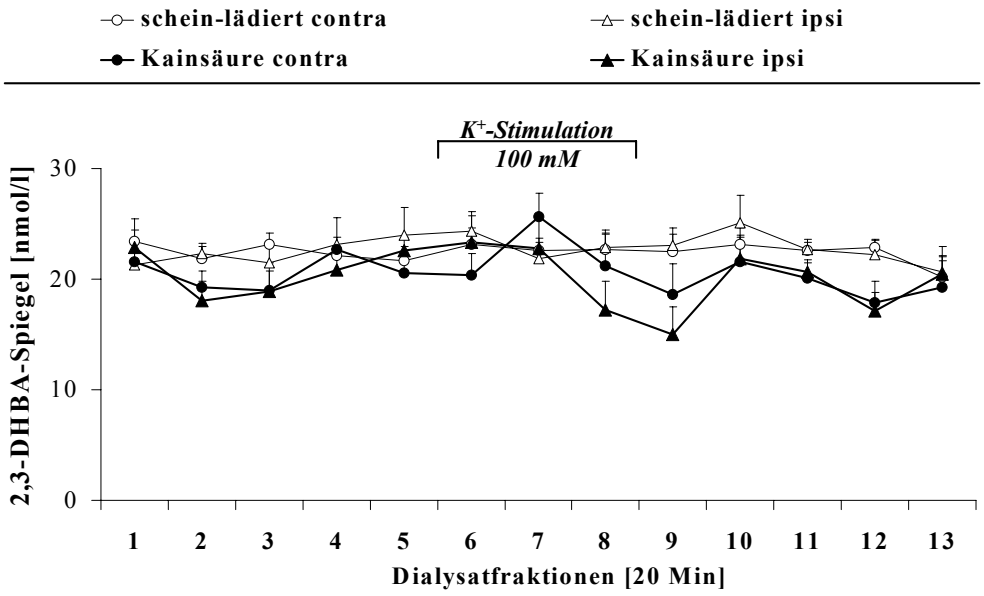
Die Bildung der Hydroxylradikale in der Substantia nigra verminderte sich in der lädierten Gruppe beidseitig auf nicht signifikante 85%. Die Kontrollgruppe zeigte keine Veränderungen (Abb. 3.42).

Abb. 3.41: Einfluss der NST-Läsion auf die nigrale Neurotransmission



Effekte einer Kainsäureläsion des STN auf die Kalium-stimulierte Freisetzung von Dopamin (A) und seinen Metaboliten DOPAC (B) und HVA (C). Gemessen wurden extrazelluläre Konzentrationen bilateral in der Substantia nigra. Die Kainsäureläsion des linken Nucleus subthalamicus sowie die Sonden-Implantation fanden 1 Woche vor der Mikrodialyse statt. Dargestellt sind Mittelwerte ± SEM von n = 5 - 8 Tieren. Die statistische Auswertung im Vergleich zur Kontrolle erfolgte mittels Varianzanalyse und nachfolgendem Duncan's Test ($p < 0.05$).*

Abb. 3.42: Einfluss der NST-Läsion auf die nigrale Radikalbildung



Effekte einer Kainsäureläsion des STN auf die Kalium-stimulierte Bildung freier Hydroxylradikale. Gemessen wurden extrazelluläre Konzentrationen bilateral in der Substantia nigra. Die Kainsäureläsion des linken Nucleus subthalamicus sowie die Sonden-Implantation fanden 1 Woche vor der Mikrodialyse statt.
Dargestellt sind die Mittelwerte ± SEM von n = 5 - 8 Tieren. Die statistische Auswertung erfolgte mittels Varianzanalyse und nachfolgendem Duncan's Test zum Vergleich der behandelten Gruppen zur Kontrolle ($p < 0.05$).*

Nach Beendigung des Mikrodialyse-Experiments wurden die Striata entnommen, wie in Kap. 2.2 beschrieben aufgearbeitet und die Gewebespiegel von Dopamin, DOPAC und HVA unter elektrochemischer Detektion bestimmt.

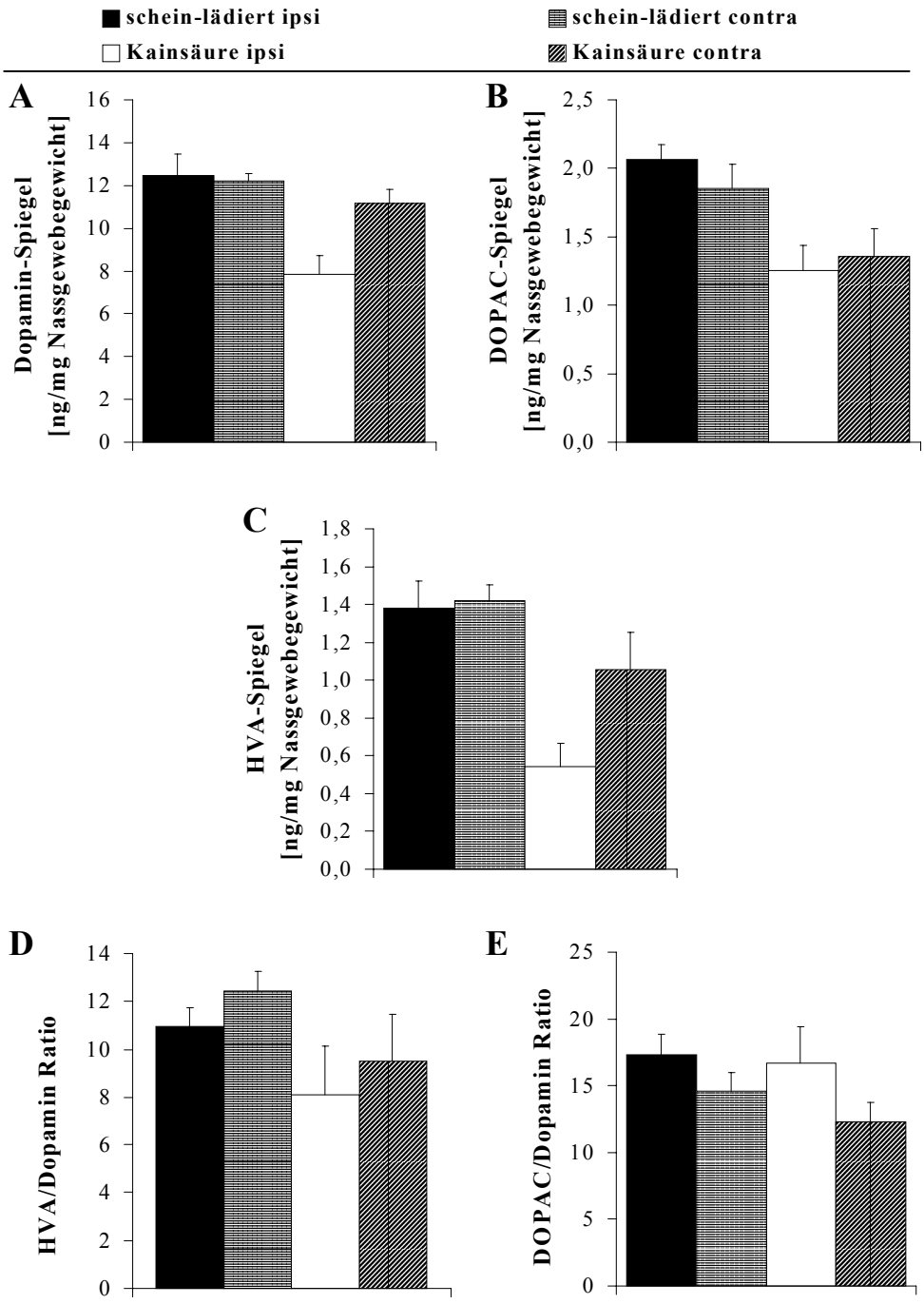
Dabei zeigten sich sowohl bei Dopamin als auch bei seinen Metaboliten tendentiell erniedrigte Gewebespiegel in den geschädigten Tieren, wobei die ipsilaterale Seite etwas stärker betroffen zu sein schien als die contralaterale (Abb. 3.43 A - E).

3.5.2.3 *Zusammenfassung der Ergebnisse*

Die Läsion des NST bewirkte auf nigraler Ebene eine Abnahme der dopaminergen Neurotransmission sowohl ipsi- als auch contralateral zur Kainsäureläsion.

Die Gewebespiegel von Dopamin, DOPAC und HVA sowie der errechnete Turnover waren jedoch nur leicht erniedrigt.

Abb. 3.43: Einfluss der NST-Läsion auf die striatalen Neurotransmitter-Spiegel



Effekte einer subthalamicus-Läsion auf die ipsi- und contralateralen Gewebespiegel von Dopamin (A) und seinen Metaboliten DOPAC (B) und HVA (C) sowie den Dopamin-Turnover dargestellt als Quotient aus DOPAC/Dopamin (D) und HVA/Dopamin (E). Dargestellt sind die Mittelwerte ± SEM von n = 5 - 8 Tieren. Die statistische Auswertung erfolgte mittels Varianzanalyse und nachfolgendem Duncan's Test zum Vergleich der behandelten Gruppen zur Kontrolle ($p < 0.05$).*

Kapitel 4

Diskussion

4.1 Diskussion der angewandten Methoden

4.1.1 Mikrodialyse-Technik

Die Mikrodialyse wurde in den frühen 80er Jahren eingeführt und dient heute als bedeutendes Werkzeug für die Untersuchung der Neurotransmitter-Freisetzung *in-vivo* [Benveniste und Hüttemeier, 1990]. Sie misst die pharmakodynamische Antwort eines Gewebes auf einen Reiz und liefert so direkte Informationen über die Interaktionen von Reiz und neurochemischen Parametern. Derartige Messungen können mittlerweile in nahezu allen Geweben des Körpers durchgeführt werden; sehr feine Sonden ermöglichen selbst Bestimmungen in kleinsten Hirnarealen. Für die Interpretation der im Mikrodialyse-Experiment gewonnenen Ergebnisse bedarf es allerdings der Kenntnis folgender zugrundeliegender Sachverhalte:

4.1.1.1 Veränderungen im Gewebe

Durch die Implantation der Mikrodialyse-Sonde treten zum Teil gravierende Veränderungen im umgebenden Gewebe auf. Für kurze Zeit sinkt sowohl die lokale Durchblutung des Gewebes als auch der Glucose-Metabolismus [Benveniste et al., 1987]. Gleichzeitig kommt es zu einer Erhöhung der Kapillarpermeabilität sowie zu einer Drucksteigerung in den Hirnventrikeln. Die mechanische Schädigung der Zellen führt zu einem Ausstrom von Neurotransmittern, Aminosäuren und Ionen, die sich auf die spannungsabhängige Aktivität der intakten Neurone auswirken [Elmquist und Sawchuk, 1997]. In dieser Zeit ist keine aussagekräftige Messung möglich.

Nach 2 - 3 h hat sich das Gewebe wieder auf normale Verhältnisse eingestellt. Ab dem 3. Tag kommt es aber zu einer Astrozyten-Hypertrophie, einsetzender Gliaproliferation [Woodroof et al., 1991] und dauerhaften Gewebeveränderungen [Benveniste und Diemer, 1987], die sich ebenfalls auf die Neurotransmitter-Spiegel auswirken können.

Zusätzlich konnten unabhängig von der Grösse der Sonde, der Operationstechnik und dem postoperativen Zeitfenster Veränderungen in der Funktion der Bluthirnschranke nachgewiesen werden [Groothius, 1998]. Dies ist im Zusammenhang mit der systemischen Applikation von Arzneistoffen zu berücksichtigen, da durch die erhöhte Permeabilität die anflutende Wirkstoffmenge steigen kann.

4.1.1.2 Vorteile der Führungskanüle

Anstelle der direkten Implantation einer Sonde kann auch eine Führungskanüle eingesetzt werden. Sie garantiert als Platzhalter die Lage der Sonde im Gewebe, so dass die Sonde selbst erst am Tag des Experiments in die Führungskanüle eingesetzt wird (siehe Kap. 2.4.1).

Diese Methode bringt im Hinblick auf die Gewebeveränderungen vielerlei Vorteile: So schützt sie die hoch empfindliche Dialysemembran vor dem frühzeitigen Funktionsverlust, da diese nur für den Zeitraum der Messung in das Gewebe eingebracht wird. Desweiteren kann in der Zeitspanne von der Operation bis zum Einsatz der Sonde deren Funktionsfähigkeit anhand von *in-vitro* Testsystemen bestimmt werden, so dass ein Mehrfachgebrauch der Sonden möglich wird. Die leichte Austauschbarkeit defekter Sonden senkt wiederum die Zahl der erforderlichen Tiere.

Wird die Sonde am Tag des Experiments in das Gewebe eingeführt, treten durch die mechanische Verletzung des Gewebes erneut kurzfristige Veränderungen auf, da die Sondenmembran über den Schaft der Führungskanüle hinausragt. Die physiologischen Verhältnisse stellen sich jedoch innerhalb der Equilibrierungsphase von 2 - 3 h wieder ein. Allerdings führt auch die Mikrodialyse selbst zu morphologischen Veränderungen im umgebenden Gewebe [Clapp-Lilly et al., 1999].

4.1.1.3 Messprinzip und Wiederfindungsrate

Die Messung der tatsächlichen Stoffkonzentrationen mittels Mikrodialyse-Technik erweist sich allerdings als schwierig. Genaueste Neurotransmitter-Spiegel könnten nur am Freisetzungsort gemessen werden, jedoch wird dies durch physikalische Gesetzmässigkeiten wie dem Grössenverhältnis der Membran zur Nervenendigung verhindert. Dementsprechend müssen die Neurotransmitter vom Freisetzungsort über den Extrazellularraum zur Sondenmembran diffundieren.

Re-uptake- und Metabolisierungsvorgänge führen unterwegs zu Veränderungen der Stoffkonzentrationen [Elmquist und Sawchuk, 1997]. Desweiteren liegt den Diffusionsvorgängen immer ein Konzentrationsgradient zugrunde [Benveniste et al., 1987], dessen Gleichgewichtseinstellung während der Mikrodialyse nicht erreicht wird. Dementsprechend liegen die Konzentrationen der physiologischen Substanzen im Dialysat niedriger als in der Extrazellularflüssigkeit. Der Quotient aus diesen beiden Konzentrationen gilt als Qualitätsmerkmal der Sondenfunktion und wird als "Recovery" bzw. Wiederfindungsrate bezeichnet.

Da bei der *in-vivo* Mikrodialyse meist relative Veränderungen der Neurotransmitter-Spiegel im Vergleich zur Basislinie gemessen werden, müssen die Werte hinsichtlich der Recovery der Sonde nicht korrigiert werden. Anders liegt der Fall bei der Interpretation pharmakokinetischer Studien, denen keine Basislinienbestimmung vorangehen kann.

In diesem Fall stehen für die Bestimmung der Wiederfindungsrate *in-vitro* Methoden zur Verfügung, die beim Mehrfachgebrauch der Sonden auch als Funktionalitätstest eingesetzt werden können. Dazu wird beispielsweise die Sonde in ein Gefäss getaucht, das eine Neurotransmitterlösung in bekannter Konzentration enthält, und mit Calcium-reduzierter Ringerlösung perfundiert. Nach einer zweistündigen Equilibrierungszeit werden 3 Fraktionen gesammelt und deren Gehalt mittels HPLC bestimmt. Das Verhältnis zu der Konzentration der Ausgangslösung gibt die Recovery der Sonde an. Dieser Wert entspricht jedoch nur einer Näherung, da sich die Konzentrationen der Neurotransmitter im Gewebe ständig durch Freisetzungs- und Metabolisierungsvorgänge ändern.

4.1.1.4 Membraneigenschaften

Die Membraneigenschaften wie die Grösse der Austauschfläche, die Porengrösse sowie das Membranmaterial haben ebenfalls Einfluss auf die Wiederfindungsrate:

Membranlänge und -durchmesser definieren die Geschwindigkeit der Gleichgewichtseinstellung über die Grösse der Austauschfläche. Je grösser sie ist, um so grösser ist auch die Stoffmenge, die pro Zeiteinheit in das Dialysat gelangt und damit die Endkonzentration in der Probe. Daher werden die Fraktionsintervalle so gewählt, dass eine gute zeitliche Auflösung der Messung gewährleistet wird. Andererseits muss aber auch streng darauf geachtet werden, dass die Kapazität des Zielgewebes nicht überschritten wird, da die Neurotransmitter-Verteilung in verschiedenartigen Geweben stark voneinander abweichen kann.

Die Porengrösse der Membran begrenzt die Diffusion über die Molekülgrösse. So wird der Übertritt von grossen Molekülen wie Proteinen in das Dialysat verhindert, während kleinere Moleküle frei permeieren können. Üblicherweise wird für die Messung der Neurotransmitter eine Porengrösse verwendet, die eine freie Diffusion von Substanzen mit einer Molekülmasse von 2000 - 30000 Dalton zulässt [Westerink, 1995].

Zum anderen kann auch das Membranmaterial durch Wechselwirkungen mit den Substanzen deren Diffusion behindern und sollte daher inert sein.

4.1.1.5 Flussrate und temporäre Auflösung

Die Flussrate nimmt massgeblichen Einfluss auf die zeitliche Auflösung der Messung:

Je höher die Flussrate gewählt wird, um so grösser wird das Konzentrationsgefälle zwischen Perfusionslösung und Extrazellularflüssigkeit und um so höher ist auch die absolute Wiederfindungsrate. Dementsprechend steigt durch das stärkere Konzentrationsgefälle die Gesamtmenge der physiologischen Substanzen, die pro Zeiteinheit in das Dialysat diffundiert (absolute Wiederfindung). Ab einer bestimmten Flussrate kommt es jedoch durch den sich aufbauenden enormen Druck zu Filtrationseffekten, d.h. zum Übertritt von Perfusionslösung in das Gewebe. Dies ist wegen der entstehenden Gewebe-Irritationen (Ödembildung) nicht erwünscht und ausserdem führen Flussraten in diesem Bereich zu keinem weiteren Anstieg der absoluten Wiederfindungsrate.

Die relative Recovery gibt den prozentualen Anteil der Substanz im Dialysat bezogen auf die Konzentration in der Extrazellularflüssigkeit an und wächst mit sinkender Flussrate. Der langsame Flüssigkeitsvorschub ermöglicht die Annäherung an das Diffusionsgleichgewicht und erzeugt somit nahezu physiologische Konzentrationen der Substanzen im Dialysat. Bei kleinen Flussraten muss aber auch das Fraktionsintervall verlängert werden, um ausreichend Dialysat für die Bestimmung auffangen zu können. Dadurch wird jedoch die Bestimmung der pharmakokinetischen Parameter wie z.B. c_{max} (maximale Konzentration) und t_{max} (Zeitpunkt der maximalen Konzentration) ungenauer [Patsalos et al., 1995].

Der Kompromiss zwischen temporärer Auflösung und ausreichender Wiederfindung definiert demzufolge die Flussrate. Der optimale Bereich liegt zwischen 0.3 - 2.5 μl/min.

4.1.1.6 Zusammensetzung der Perfusionslösung

Ein weiterer wichtiger Parameter für die Beurteilung der Basalwerte ist die Zusammensetzung der Perfusionslösung. Aufgrund exozytotischer Prozesse ergeben sich die Basalwerte als Funktion der Calciumionen-Konzentration. Die Perfusionslösung sollte daher der physiologischen Zusammensetzung der Extrazellularflüssigkeit insbesondere in Bezug auf die Calciumionen-Konzentration entsprechen [DeBoer et al., 1990]. Mit 1.2 mM Calciumionen in der Perfusionslösung erhält man annähernd physiologische Werte [Damsma et al., 1990; DeBoer et al., 1990], höhere Konzentrationen steigern die basale Neurotransmitter-Freisetzung. Dadurch können Arzneistoffwirkungen abgeschwächt oder sogar maskiert werden.

4.1.1.7 Vergleich zu der Gewebebestimmung

Mit der kontinuierlichen Bestimmung der extrazellulären Neurotransmitter-Spiegel [Ungerstedt, 1984] am wachen und frei beweglichen (freely-moving) Tier bietet die Mikrodialyse enorme Vorteile gegenüber der post-mortem Gewebeentnahme, die zu einem festgelegten Zeitpunkt nach der Behandlung erfolgen muss. Die Aufarbeitung des Gewebes führt ausserdem zu der Zerstörung der Zellen, wodurch die Unterscheidung zwischen intra- und extrazellulären Neurotransmitter-Konzentrationen unmöglich wird. Der Gewebewert entspricht also der Summe aus beiden Konzentrationen zu eben jenem definierten Zeitpunkt. Um einen vergleichbaren Zeitverlauf darzustellen, erfordert diese Technik einen wesentlich höheren Einsatz an Tieren als die Mikrodialyse.

Zusätzlich schliesst die Mikrodialyse-Technik interindividuelle Schwankungen aus, da die Kontrollwerte vor der Behandlung in demselben Tier gemessen werden ("within-subject"-Studien). Um auch die Pharmakokinetik von akuten und chronischen Gaben sowie die Dosisabhängigkeit pharmakokinetischer Interaktionen beurteilen zu können, werden wiederholte Mikrodialyse-Messungen in einem Tier angestrebt. Allerdings ist die Zuverlässigkeit solcher Studien fraglich, da noch nicht genügend Informationen über die im Gewebe auftretenden Veränderungen vorliegen [Georgieva et al., 1993]. Beispielsweise zeigte sich bei wiederholter Messung der striatalen Dopamin-Spiegel nach einer Woche zwar kein Unterschied in den Basalwerten, aber dennoch war die Amphetamin-induzierte Dopamin-Freisetzung während der zweiten Mikrodialyse-Messung deutlich abgeschwächt [Camp und Robinson, 1992].

4.1.1.8 Weiterentwicklungen

Da durch die geringe Porengrösse der Membran die Diffusion grösserer Moleküle wie Proteine verhindert wird [Westerink, 1995], besteht keine Notwendigkeit einer weiteren Aufreinigung des Dialysates vor der Bestimmung. Diese Tatsache führte zu der Entwicklung von "online"-Techniken, die eine unmittelbare Analyse der Dialysate mittels hochempfindlicher analytischer Methoden (HPLC) praktizieren.

Durch die Modifikation der Perfusionslösung können kontrollierte Veränderungen der Extrazellularflüssigkeit erzielt werden. Die "reverse" Mikrodialyse eignet sich für die lokale Applikation von Arzneistoffen (Stimulation), die systemisch verabreicht sonst zu undifferenzierten Schädigungen führen würden oder nicht bluthirnschrankengängig wären [Di Chiara, 1990]. Die Substanzen folgen dem umgekehrten Diffusionsgradienten von der Perfusionslösung in die Extrazellularflüssigkeit und das umliegende Gewebe. Der grosse Vorteil liegt hier in der Vermeidung von Volumeneffekten, wie sie bei der Injektion wässriger Lösungen auftreten würden.

Allerdings treten beim manuellen Umschalten auf die Stimulationslösung Schwankungen in der Flussrate auf, so dass der darauffolgende Wert sehr kritisch zu bewerten ist [Wayment et al., 2001].

In der vorliegenden Arbeit wurde die Mikrodialyse einerseits dazu eingesetzt, die akuten Effekte der lokalen Gabe verschiedener Neurotoxine zu untersuchen (konventionelle Mikrodialyse) und andererseits durch Zusatz radikalfangender Substanzen die Hydroxylradikalbildung im Gewebe zu verfolgen (reverse Mikrodialyse).

4.1.2 Radikalmessung im Salicylat- und Phenylalanin-Assay

Die Messung freier Radikale kann auf verschiedene Arten erfolgen:

1. direkte Messung mittels Elektronen-Spin-Resonanz (ESR) -Technik

2. indirekte Bestimmung durch Umsetzung zu langlebigeren Produkten

Die ESR-Technik erlaubt eine direkte Messung freier Radikale. Allerdings werden für die Bestimmung der extrem kurzlebigen Hydroxylradikale die Grenzen dieser Technik erreicht [Halliwell und Gutteridge, 1999].

Die indirekte Radikalbestimmung durch Umsetzung zu langlebigeren Produkten basiert auf ihrer hohen Affinität zu aromatischen Verbindungen. Diese sogenannten Radikalfänger werden der Perfusionslösung zugesetzt [Halliwell et al., 1989; Kaur und Halliwell, 1994] und konkurrieren im

Extrazellularraum mit den endogenen Substanzen um die dort gebildeten freien Radikale. Durch aromatische Hydroxylierung entstehen langlebige Produkte, die aufgrund des Konzentrationsgefälles wieder in das Dialysat aufgenommen werden. Anschliessend können diese mittels HPLC bestimmt werden.

Die Grundlagen dieser Technik gehen auf frühe chemische Erkenntnisse bezüglich der aromatischen Hydroxylierung zurück. Mittlerweile weiss man, dass diese Reaktion empfindlich von verschiedenen Faktoren abhängt und daher nur unter festen Rahmenbedingungen reproduzierbar wird [Halliwell et al., 1989]: Dies ist unter physiologischen Bedingungen (pH = 7.4, aerobe Atmosphäre, Anwesenheit von Metallionen) gegeben, sodass die Bildung hydroxylierter aromatischer Verbindungen als Index der Radikalentstehung *in-vivo* herangezogen werden kann.

4.1.2.1 Salicylat-Assay

Das bekannteste Zielmolekül aromatischer Hydroxylierungen ist die Salicylsäure, die die Radikale unter Bildung von 2,3-Dihydroxybenzoesäure (DHBA), 2,5-DHBA und Catechol abfängt. Das Salicylat-Assay gilt als zuverlässige Methode der Radikalbestimmung, weist aber dennoch einige Kritikpunkte auf.

Da 2,5-DHBA auch metabolisch durch die Cytochrom C 450 -Oxidase gebildet wird, kann es nicht als Marker der Radikalentstehung herangezogen werden [Kaur und Halliwell, 1994; Halliwell und Kaur, 1997]. Statt dessen wird im allgemeinen 2,3-DHBA zur Beurteilung der Radikalbildung herangezogen. Allerdings wird aufgrund des schnellen intestinalen Abbaus von 2,3-DHBA die Messung beider Derivate empfohlen [Udassin et al., 1991; Chiueh et al., 1993]. Neuere Studien bevorzugen Catechol als Marker der Radikalentstehung. Seine Werte steigen um ein vielfaches stärker an als die von 2,3- oder 2,5-DHBA [Sam et al., 1998].

Obwohl die Salicylsäure nur ein relativ schwacher Hemmstoff der Cyclooxygenase ist, weist sie dennoch starke biologische Effekte auf. Ihre analgetischen, antiinflammatorischen, antipyretischen und thrombozytenaggregationshemmenden Eigenschaften können zusätzliche Effekte auf die Radikalbildung auslösen und sind bei der Interpretation der Ergebnisse zu berücksichtigen.

4.1.2.2 Phenylalanin-Assay

Eine Alternative zum Salicylsäure-Assay stellt die Verwendung von Phenylalanin dar [Themann et al., 2001; van der Vliet et al., 1994]. Obwohl es weit weniger bekannt ist, weist es gegenüber der Salicylsäure einige Vorteile auf.

Sowohl die *L*- als auch die *D*-Form des Phenylalanins wird zu den drei Isomeren *o*-, *m*- und *p*-Tyrosin hydroxyliert. Gleichzeitig entstehen in Gegenwart von Peroxynitrit die Nitrierungsprodukte 3-Nitrophenylalanin und 3-Nitrotyrosin [Kaur et al., 1997]. Letzteres konnte bereits als Marker der Peroxynitritentstehung in post-mortem Studien an Gehirnen von Parkinson-Patienten nachgewiesen werden [Beal, 1998; Good, 1998].

Durch die Konkurrenz mit endogenen Substanzen um die freien Radikale müssen die Radikalfänger der Perfusionslösung in extrem hohen Dosen zugesetzt werden. Da es sich bei *L*-Phenylalanin aber um eine natürliche Aminosäure handelt, die über spezielle Carrier aktiv in die Zellen aufgenommen wird, treten selbst bei hochdosierter Anwendung nur geringe Nebenwirkungen auf [Sun et al., 1993].

Allerdings liegt die Reaktionsgeschwindigkeit des Phenylalanins deutlich unter der des Salicylats, wodurch die gemessenen Absolutwerte wesentlich niedriger ausfallen. Durch hochempfindliche Analysemethoden ist die Empfindlichkeit für die Bestimmung der Radikalentstehung aber dennoch ausreichend.

In der Praxis erwiesen sich die beiden Methoden als absolut gleichwertig. *In-vitro* und *in-vivo* zeigte sich kein Unterschied im Zeitverlauf der Radikalbildung oder den Zeitpunkten der Maximalwerte [Themann et al., 2001].

4.1.3 MPTP-Modell

Die Entdeckung des dopaminergen Neurotoxins MPTP schaffte die Voraussetzung für ein experimentelles Parkinson-Modell von unschätzbarem Wert.

MPTP wird nach systemischer Applikation über die Bluthirnschranke in das Gehirn aufgenommen und dort zu dem toxischen MPP^+ metabolisiert. Über eine Kaskade noch nicht genau bekannter Prozesse entsteht ein dem Morbus Parkinson stark verwandtes Schädigungsmuster im Gehirn von Menschen, Affen und Mäusen (siehe Kap. 1.5.2.1).

4.1.3.1 MPTP-Kinetik

Ein wichtiger Aspekt für die Interpretation von Wirkstoff-Effekten im MPTP-Modell ist die Abhängigkeit der MPTP-Toxizität vom MAO-Metabolismus. Verändert eine Substanz die Umsetzung von MPTP zu seinem toxischen Metaboliten MPP^+, kann eine neuroprotektive Wirkung durch einen rein kinetischen Effekt vorgetäuscht werden. Um Fehlinterpretationen zu vermeiden, kann

über die Bestimmung der MPP^+-Gewebespiegel eine Veränderung des MPTP-Metabolismus ausgeschlossen werden. Die massive Erniedrigung der MPP^+-Werte durch den selektiven MAO-B-Hemmstoff Selegilin untermauert diese Hypothese.

4.1.3.2 Lokomotorische Aktivität

Durch die Behandlung mit MPTP kommt es zu einer starken Abnahme der lokomotorischen Aktivität (Hypokinese). Die Symptome treten innerhalb von 30 Minuten nach Behandlung auf und halten in der Regel für 1 - 2 Tage an.

4.1.3.3 Rotarod

In den durchgeführten Versuchen hat sich die Balancierzeit auf dem rotierenden Stab durch die MPTP-Behandlung nicht entscheidend verändert.

Mit dieser Methode ist es nicht immer möglich das Verhalten von behandelten und nichtbehandelten Tieren zu differenzieren. Das Rotarod misst im Gegensatz zu der lokomotorischen Aktivität nicht die Störungen in der freiwilligen Bewegungsausführung, sondern die motorische Koordination in der Bewegung. Obwohl dieses Modell allgemein gebräuchlich ist [Kelly et al., 1998], kommt es immer wieder zu widersprüchlichen Befunden [Sedelis et al., 2000], die sich vor allem durch Variationen im Durchmesser des Drehstabes, der Zahl der Trainingseinheiten und der Drehgeschwindigkeit ergeben. Ausserdem können sich die Tiere bei Einsatz eines Rotarod-Gerätes mit fester Drehgeschwindigkeit auf die gleichmässige Bewegung einstellen. Die Parkinson-Symptomatik zeichnet sich aber vor allem durch Schwierigkeiten bei der Bewegungsinitialisierung und -änderung aus. Mit Hilfe neuerer Geräte, die eine Veränderung der Drehgeschwindigkeit während der Testphase zulassen ("accelerated" Verfahren), werden die MPTP-induzierten Defizite in der Bewegungskoordination stärker hervorgehoben [Rozas et al., 1998].

Die MPTP-induzierte Symptomatik ist allerdings auch stark von der Tierspezies abhängig: Die in Primaten ausgelösten Defizite spiegeln die neurologischen Veränderungen im Parkinson-Patienten sehr gut wieder: Bradykinese, Rigidität, Haltungsabnormalitäten, Einschränkungen in der Bewegungsinitialisierung, Maskengesicht und Tremor. Im Verhalten von Mäusen zeigen sich kurz nach der Injektion Mydriasis, Hypersalivation und klonische Krämpfe, die allerdings innerhalb weniger Stunden reversibel sind [Colotla et al., 1990].

4.1.3.4 Körpergewicht

Nach der Behandlung mit MPTP verlieren die Tiere vorübergehend an Gewicht.

Durch die Abnahme der motorischen Aktivität und den damit verbundenen Schwierigkeiten bei der Nahrungsaufnahme kommt es zu diesem kurzzeitigen Gewichtsverlust. Durch Regenerierung erreichen die Tiere rasch wieder ihr Ausgangsgewicht.

4.1.3.5 Mortalität

Während die Tiere eine MPTP-Dosis von 30 mg/kg s.c. und 40 mg/kg i.p. problemlos vertrugen, kam es bei der aus der Literatur gewählten Dosierung von 4 x 20 mg/kg i.p. im Abstand von je 2 Stunden zu einer extrem hohen, nicht vorhersehbaren Sterblichkeit.

In einem technischen Bericht zur Anwendung von MPTP wurde kürzlich auf eine stark schwankende Mortalität in verschiedenen Studien hingewiesen, obwohl derselbe Tierstamm und dasselbe Dosierungsschema verwendet wurden [Przedborski et al., 2001]. Je nach Spezies, Stamm und Züchtung können Tiere unterschiedlich stark auf toxische Substanzen reagieren. Der Grad der Schädigung hängt jedoch noch von einer Reihe weiterer Faktoren wie dem Behandlungsschema, dem Geschlecht und dem Alter der Tiere ab.

Die Empfindlichkeit gegenüber der MPTP-Toxizität ist bei den Mäusen deutlich geringer ausgeprägt als bei Affen, bei Ratten fehlt sie vollständig. Ihre Resistenz erklärt sich durch eine hohe Aktivität der endothelialen MAO-B an der Bluthirnschranke, da diese bereits in der Peripherie zur Umwandlung von MPTP führt. Der geladene Metabolit MPP^+ kann nicht mehr in das Gehirn aufgenommen werden [Heikkila et al., 1984; Boyce et al., 1984].

Aber auch innerhalb der Spezies Maus reagieren Stämme und sogar verschiedene Züchtungen eines Stammes unterschiedlich auf das Toxin [Heikkila et al., 1985; Giovanni et al., 1991]. Diese Tatsache ist ebenfalls in einer unterschiedlich starken Aktivität der endothelialen Monoaminoxidase begründet [Kalaria et al., 1987; Riachi et al., 1991]. Weitere genetisch bedingte Unterschiede liegen in der Funktionalität der Neurotransmitter-Transporter (vor allem DAT und VMAT-2 [Gainetdinov et al., 1997/1998]), Enzymen (neuronale NO-Synthase [Matthews et al., 1997], Superoxiddismutase, etc.), endogenen Abwehrmechanismen (Synthese neurotropher Faktoren) und dem Geschlecht. So zeigen weibliche Mäuse bei gleicher MPP^+-Konzentration eine schwächere Degeneration als männliche, da einerseits dem höheren Östrogenspiegel ein neuroprotektiver Effekt zugeschrieben wird [Dluzen et al., 1996] und andererseits eine erhöhte vesikuläre Speicherkapazität für MPP^+ gefunden wurde [Giovanni et al., 1994].

Ältere Tiere zeigen eine schwere und lang anhaltende Schädigung, während junge Tiere eine wesentlich höhere MPTP-Dosis benötigen, um die gleichen Defizite zu entwickeln [Gerlach et al., 1991].

Nach der MPTP-Behandlung tritt eine vorübergehende Hypothermie auf, die zum Grossteil über die Freisetzung von Noradrenalin und nachfolgender Stimulation adrenerger (α_2) Rezeptoren vermittelt wird. Dadurch können sogar klimatische Bedingungen Einfluss auf die MPTP-Toxizität nehmen [Drouet et al., 1997].

Der Einfluss einzelner oder auch mehrerer dieser Faktoren kann auch bei Standardmodellen plötzlich zu extrem hohen Todesraten führen.

4.1.3.6 Veränderungen der Neurotransmitter-Spiegel

Nach der akuten Behandlung mit MPTP kommt es durch die Zerstörung dopaminerger Neurone in der SNc zu einer Dopamin-Verarmung der striatalen Nervenendigungen. Der flüchtige Anstieg der Extrazellular- oder Gewebewerte von Dopamin ist durch eine Verdrängung aus den Speichervesikeln seitens des MPTP-Metaboliten MPP^+ bedingt. Anschliessend sinken die Werte bis auf ein Minimum am 8. Tag ab; danach lösen die einsetzenden Kompensationsmechanismen wieder einen leichten Anstieg aus.

Neben Dopamin sinken auch die Werte seiner Metabolite DOPAC und HVA signifikant. Sie bleiben über den gesamten Zeitraum signifikant erniedrigt. Der Dopamin-Umsatz nimmt direkt nach Schädigung durch die MAO-hemmenden Eigenschaften von MPP^+ ab [Arai et al., 1986], steigt innerhalb von 7 Tagen aber wieder bis über das Kontrollniveau hinaus.

Das serotoninerge System ist im Gegensatz dazu von der MPTP-Toxizität wesentlich schwächer betroffen. Selten findet sich eine leichte Reduktion der Serotonin-Werte.

4.1.3.7 Tyrosinhydroxylase-Aktivität und Nissl-Färbung

Die akuten Dosierungen von MPTP (1 x 30 mg/kg s.c. und 1 x 40 mg i.p.) führen zu einer signifikanten Reduktion der Tyrosinhydroxylase-Aktivität und Nissl-positiven Zellen am 8. Tag nach der Behandlung.

Nach der Aufnahme von MPP^+ kommt es zum Tod der Zellkörper in der SNc. Als Degenerationsmarker gelten die Abnahme der Tyrosinhydroxylase-Immunreaktivität und der nigrale Zellverlust, welcher mittels Färbung der zellulären Nissl-Substanzen (Nissl-Färbung) bestimmt werden kann. Die beiden Parameter müssen anfangs nicht zwingend miteinander korrelieren,

da schwächer geschädigte Zellen - sogenannte Geisterzellen - ihre Tyrosinhydroxylase-Aktivität nur vorübergehend verloren haben, sich aber während der nächsten Tage wieder erholen [Jackson-Lewis et al., 1995]. Die Degeneration der nigralen Neurone erreicht ein Maximum nach 2 - 4 Tagen [Sundström et al., 1988]. Nach 7 Tagen findet man jedoch eine signifikante Reduktion der Tyrosinhydroxylase-Aktivität und Nissl-positiven Zellen.

4.1.3.8 Mikrodialyse (MPTP/MPP^+)

Im Mikrodialyse-Experiment bewirkte die Injektion von 40 mg/kg MPTP i.p. einen signifikanten Anstieg von Dopamin sowie die Abnahme seiner Metabolite DOPAC und HVA. 2,3-DHBA stieg kurzfristig auf das ca. 1,5-fache seiner Basalwerte, jedoch nicht signifikant, an.

Die Umwandlung von MPTP zu MPP^+ und dessen Aufnahme in die Nervenendigung dopaminerger Neurone führt zu einer Verdrängung von Dopamin aus den Speichervesikeln. Durch Umkehr des Dopamintransporters kommt es dann zu einem Anstieg der Extrazellularwerte [Lotharius und O'Malley, 2000].

Der Dopamin-Metabolismus dagegen wird durch den kompetitiven Antagonismus von MPTP und die MAO-hemmenden Eigenschaften von MPP^+ stark gesenkt. Dadurch nehmen die Extrazellularwerte der Dopamin-Metabolite DOPAC und HVA signifikant ab. Entspeichertes Dopamin kann leicht autoxidieren und fördert so die Entstehung freier Radikale. Erstaunlicherweise ergab sich jedoch in diesem Zusammenhang, dass 2,3-DHBA nach der MPTP-Behandlung nur schwach ansteigt. Ähnliche Daten wurden bereits berichtet [Teismann et al., 2001].

Um ausschliessen zu können, dass die einmalige Injektion von 40 mg/kg i.p. nicht zu einer ausreichenden MPP^+-Gewebekonzentration führte, wurde die Hydroxylradikalbildung nach lokaler Applikation von MPP^+ in verschiedenen Konzentrationen untersucht. Die reverse Mikrodialyse mit MPP^+ erzeugte eine konzentrationsabhängige Freisetzung von Dopamin. Die Metabolisierung von Dopamin und die Hydroxylradikalbildung wurden durch steigende MPP^+-Konzentrationen allerdings gehemmt.

Nach heutigem Stand der Kenntnisse kann MPP^+ die radikalbildenden Prozesse einerseits durch die Blockade des Komplex I der Atmungskette [Nicklas et al., 1985] und andererseits durch die Freisetzung von Dopamin, Glutamat oder Eisenionen erhöhen [Santiago et al., 1991; Carboni et al., 1990].

Die Komplex I-Aktivität ist 1 h nach MPTP-Behandlung effektiv gehemmt [Sriram et al., 1997] und korreliert bezüglich der t_{max} mit dem MPP^+-Spiegel. Der Anstieg von 2,3-DHBA liegt ebenfalls in diesem Zeitrahmen und könnte demnach durch die Mitochondrien vermittelt sein. Da der klassische Komplex I-Inhibitor Rotenon jedoch keine entsprechende Radikalentstehung bewirken konnte, ziehen Lotharius und O'Malley [2000] den Schluss, dass die MPP^+-induzierte Hydroxylradikalbildung nicht mitochondrialen Ursprungs ist. Ausserdem ist die mitochondriale Dysfunktion im Anfangsstadium nach der MPP^+-Applikation ein transienter Prozess, der erst nach 18 Stunden in eine irreversible Hemmung übergeht [Sriram et al., 1997]. Die auftretenden Störungen in der Speicherung, der Freisetzung und dem Abbau von Dopamin mit folgender Entstehung freier Radikale scheint demnach die Blockade der Atmungskette nachträglich zu potenzieren und so zum neurodegenerativen Prozess beizutragen [Boada et al., 2000].

Dementsprechend wird die MPP^+-induzierte Radikalbildung eher auf die Folgen der Dopamin-Entspeicherung zurückgeführt [Obata et al., 2001]. Die exzessiven zytosolischen Dopamin-Spiegel bedingen einen gesteigerten Dopamin-Metabolismus, der sowohl über den enzymatischen als auch den autoxidativen Abbauweg vermittelt wird [Boismenu et al., 1996]. Dabei entsteht unter anderem Wasserstoffperoxid, das wiederum über die Fenton-Reaktion zu Hydroxylradikalen umgesetzt wird. Die Korrelation von Dopamin-Freisetzung und Hydroxylradikalbildung konnte bereits nachgewiesen werden [Chiueh et al., 1994].

Allerdings postulierten Weingarten und Zhou [2001] auf der Basis neuerer Untersuchungen auch einen nicht-oxidativen Mechanismus der intrazellulären Dopamin-Toxizität, die daher auch nicht durch antioxidative Systeme (Superoxiddismutase, Katalase) gehemmt werden konnte. Dementsprechend soll nicht der Metabolismus von Dopamin für die intrazelluläre Radikalentstehung verantwortlich sein, sondern eine Aktivierung des Nuklear-Faktors (NF) -κB, der über die Stimulation des Immunsystems die Entstehung oxidativen Stresses bewirkt [Bowie und O'Neill, 2000].

Die Hypothese der intrazellulären Dopamin-Toxizität wird durch mehrere Untersuchungen unterstützt, die zeigen, dass durch die Entspeicherung von Dopamin mittels Reserpin-

Vorbehandlung die Radikalentstehung deutlich vermindert werden kann [Obata, 1999], während die Vorbehandlung mit Calciumkanalblockern keinen Einfluss auf die induzierte Dopamin-Freisetzung zeigen. Dementsprechend kann ein Calcium-abhängiger, exozytotischer Prozess der Dopamin-Freisetzung durch MPP^+ ausgeschlossen werden [Lotharius und O'Malley, 2000].

Desweiteren wird die MPP^+-induzierte Hydroxylradikalbildung *in-vitro* bei Konzentrationen über 1 mM MPP^+ nicht mehr über Dopamin vermittelt, sondern unspezifisch durch eine nicht selektive Blockade der Atmungskette ausgelöst [Ambrosio et al., 1996]. Durch hohe MPP^+-Konzentrationen könnte es daher zu einer vollständigen Unterbrechung der Atmungskette mit nachfolgender Unterdrückung energieabhängiger, radikalbildender Prozesse kommen.
Ausserdem werden für MPP^+ schon seit langem MAO-inhibitorische Eigenschaften postuliert [Singer et al., 1985], die ebenfalls zu einer Reduktion der Radikalbildung führen kann, da Wasserstoffperoxid bevorzugt über den enzymatischen Abbauweg gebildet wird.

Ab einer Dosis von 10 mM MPP^+ wird die Dopamin-Freisetzung von einem Anstieg der Glutamat-Spiegel begleitet, der durch NMDA-Antagonisten gehemmt werden konnte. Da diese Behandlung keinen Effekt auf die Dopamin-Freisetzung zeigte, handelt es sich folglich um voneinander unabhängige Prozesse [Carboni et al., 1990]. Die Freisetzung von Glutamat löst über die Stimulation der Glutamat-Rezeptoren einen Einstrom von Calcium aus, der eine Aktivierung der NO-Synthase und die Bildung von Peroxynitrit bewirkt.

Dies führte zu der Hypothese, dass die MPP^+-induzierte Radikalbildung nicht Dopamin-abhängig ist, da Inhibitoren der NO-Synthase die Radikalbildung signifikant senken konnten, ohne die Dopamin-Spiegel zu beeinflussen [Uezono et al., 2001; Rose et al., 1999]. Und auch andere Arbeitsgruppen konnten durch NMDA-Antagonisten [Turski et al., 1991] oder durch Verwendung von nNOS-knockout Mäusen [Matthews et al., 1997] eine Abschwächung der MPP^+-Toxizität erzielen. Allerdings gehören NOS-Inhibitoren wie 7-Nitroindazol auch zu den MAO-hemmenden Stoffen und könnten die Radikalbildung auch über diesen Weg beeinflussen [Castalogni et al., 1997].

Die Neurotoxizität von MPTP scheint also auf einer Kombination von erhöhter Hydroxyl-radikal- und Peroxynitritbildung zu beruhen [Smith und Bennett, 1997]. Es gibt aber auch weitere Studien, die nach MPP^+-Stimulation keinen Anstieg der Hydroxylradikalproduktion fanden [Montgomery et al., 1995; Ste-Marie et al., 1999].

Sicherlich wäre es aber falsch, aufgrund der verminderten akuten Radikalbildung nach MPP^+ in der Maus auf eine verminderte Toxizität zu schliessen, da weit mehr Faktoren in diesen Prozess hineinspielen und das ursächliche Phänomen sowohl der menschlichen Erkrankung als auch der experimentellen Pathogenese bis heute nicht identifiziert werden konnte.

Und obwohl das MPTP-Modell mit seinen funktionellen und neurochemischen Veränderungen sehr nahe an das klinische Erscheinungsbild des Morbus Parkinson heranreicht, bietet es nur eine Annäherung an die menschliche Erkrankung. Wie alle experimentellen Modelle wählt es einen Endpunkt innerhalb von Tagen (akute Modelle) oder Wochen (chronische Modelle), während sich die Erkrankung selbst über mehrere Lebensdekaden entwickelt. Die grosse Variation der Behandlungsschemata trägt zwar zu einer weiteren Annäherung an den Verlauf der menschlichen Erkrankung bei, erschwert aber gleichzeitig die Interpretation und den Vergleich der Befunde.

4.2 Diskussion der Effekte im MPTP-Modell

4.2.1 (±)-Kavain

Die Ergebnisse der Studie zeigen deutlich protektive Effekte von (±)-Kavain gegenüber der MPTP-Toxizität. Es verminderte die MPTP-induzierte Abnahme der striatalen Dopamin-Spiegel, der lokomotorischen Aktivität, der Tyrosinhydroxylase-Immunreaktivität und den Verlust nigraler Neurone. Die niedrigen Dosierungen zeigten bereits einen tendentiellen Schutz, aber erst die hohe Dosierung von 200 mg/kg (±)-Kavain führte zu einer signifikanten Verbesserung aller Parameter.

Diesen Effekten von (±)-Kavain können verschiedene Ursachen zugrunde liegen, z.B. eine Erhöhung der dopaminergen Neurotransmission, eine Veränderung des MPTP-Metabolismus oder neuroprotektive Eigenschaften der Substanz.

Ein symptomatischer Effekt ist in diesem Fall unwahrscheinlich, da (±)-Kavain weder in die Dopamin-Freisetzung noch in den Dopamin-Abbau eingreift. In einer Mikrodialyse-Studie an der Ratte zeigte (±)-Kavain eher die Tendenz die extrazellulären Dopamin-Spiegel zu erniedrigen [Baum et al., 1998]. Eine Studie der akuten bzw. chronischen (±)-Kavain-Gabe führte zu keiner Veränderung in den striatalen Gewebespiegeln von Dopamin und Serotonin [Boonen et al., 1998]. Weiterhin zeigte (±)-Kavain in verschiedenen Bindungsstudien keine Affinität zu den Dopamin-Rezeptoren [Dr. S.S. Chatterjee, persönliche Mitteilung]. Die deutlichen Effekte von (±)-Kavain auf die Tyrosinhydroxylase-Immunreaktivität und Nissl-Färbung als neuroprotektive Marker zeigten eine deutliche Abschwächung der MPTP-Toxizität. Ein symptomatischer Effekt von (±)-Kavain ist demnach unwahrscheinlich.

Da die Entstehung von MPP^+ direkt mit den degenerativen Veränderungen im Nervengewebe zusammenhängt, könnte die Abschwächung der MPTP-Toxizität durch (±)-Kavain auch auf einer Hemmung des MPTP-Metabolismus beruhen. Tatsächlich schützt auch der MAO-B Inhibitor Selegilin die Zellen vor der MPTP-Toxizität [Heikkila et al., 1985]. In dieser Studie wurde jedoch durch die Bestimmung der striatalen MPP^+-Gewebekonzentration belegt, dass (±)-Kavain definitiv keine Senkung der MPP^+-Spiegel bewirkt. Somit kann ein Einfluss von (±)-Kavain auf die Aufnahme von MPTP in das Gehirn oder die Umsetzung zu MPP^+ als Wirkmechanismus ausgeschlossen werden.

In der Literatur finden sich zwar Nachweise, dass der Kava-Extrakt MAO-B-hemmende Eigenschaften aufweist; dies gilt jedoch nicht für (±)-Kavain selbst. Die Einzelsubstanz weicht in vielen Eigenschaften vom Kava-Extrakt ab, da sich dieser aus mehreren strukturell und pharmakologisch stark unterschiedlichen Substanzen zusammensetzt, die das veränderte Wirkspektrum hervorrufen [Uebelhack et al., 1998]. Daher ist es empfehlenswert, die pharmakologischen Eigenschaften für die Einzelsubstanzen anstelle des Gesamtextraktes zu untersuchen. Beispielsweise ist der Kava-Extrakt in letzter Zeit durch lebertoxische Nebenwirkungen aufgefallen und befindet sich zur Zeit im Stufenplanverfahren. Da aber nicht bekannt ist, welcher Bestandteil des Extraktes für diese Nebenwirkung verantwortlich ist, kann ein günstiges Nutzen-Risiko-Verhältnis für (±)-Kavain nicht ausgeschlossen werden.

MPP^+ wird selektiv via Dopamin-Transporter in die dopaminergen Neurone aufgenommen und löst durch direkte Hemmung des Komplex I der Atmungskette, mit Unterbrechung der oxidativen Phosphorylierung und Energieverarmung der Zelle, einen mitochondrialen Defekt aus [Tipton und Singer, 1993]. Die Konsequenz ist die partielle neuronale Depolarisation mit sekundärer Aktivierung spannungsabhängiger Glutamat-Rezeptoren, Senkung der Glutamat-Aufnahme und somit die Auslösung exzitotoxischer Prozesse. (±)-Kavain zeigte in einer *in-vivo* Mikrodialyse-Studie eine Verminderung der Glutamat-Freisetzung [Ferger et al., 1998*b*] und könnte dadurch die zytotoxische Kaskade durchbrechen und die Neurone vor der Degeneration bewahren.

Beim Morbus Parkinson führt die Degeneration nigraler Neurone zur dopaminergen Verarmung des Striatums. Die kompensatorisch erhöhte Aktivität der verbliebenen Neurone kann im Zusammenspiel mit einer erhöhten striatalen Dopamin-Rezeptorendichte die dopaminerge Funktion anfangs aufrechterhalten. Die fortschreitende Dopamin-Depletion der nigrostriatalen Bahnen resultiert in einer Hyperaktivität der glutamatergen Neurotransmission [Sian et al., 1999]. Veränderungen in den Basalganglien bedingen die erhöhte glutamaterge Aktivität des Nucleus subthalamicus. Durch die folgende Hemmung der thalamocortikalen Bahnen entsteht das Hauptsymptom - die Akinese. In dieser Hinsicht könnte (±)-Kavain durch die Hemmung von Natrium- [Gleitz et al., 1995] und Calciumkanälen [Gleitz et al., 1996] normalisierend auf die glutamaterge Überaktivität im Nucleus subthalamicus wirken und so eine Verbesserung der MPTP-induzierten Hypomotilität herbeiführen. Die durch (±)-Kavain reduzierte Glutamat-Freisetzung könnte gleichzeitig die glutamatergen Projektionen vom Nucleus subthalamicus zur Substantia nigra unterdrücken und so antiexzitotoxische, neuroprotektive Effekte auslösen.

Neue invasive Therapien zielen ebenfalls auf eine Senkung der glutamatergen Überaktivität, die durch Hemmung des Nucleus subthalamicus vermittelt wird [Limousin-Dowsey et al., 1999]. Da aber nur wenige Kliniken Erfahrung mit solchen Eingriffen haben und die Langzeiteffekte noch nicht abgeschätzt werden können, ist diese Therapie nur einem Bruchteil der Patienten zugänglich. Folglich wird für die meisten Patienten eine pharmakologische Therapie bevorzugt, die durch Reduktion der glutamatergen Aktivität ebenso zu einer verbesserten Symptomatik führt und gleichzeitig die neuroprotektiven Effekte vermittelt. Dieser Therapie liegen zwei Strategien zugrunde: Einerseits können exzitotoxische Effekte durch Glutamat-Rezeptorantagonisten abgefangen werden [Turski et al., 1991; Klockgether et al., 1991; Santiago et al., 1992; Boireau et al., 1994]; andererseits erreichen Natriumkanalblocker eine verminderte Glutamat-Freisetzung [Bezard et al., 1998].

Ausgehend von (±)-Kavain und seinen Derivaten können in dieser Hinsicht möglicherweise neue effektive Arzneistoffe für die Parkinson-Therapie entwickelt werden.

4.2.2 Bedeutung von IL-6 für die MPTP-Toxizität

Die Untersuchung von IL-6 (-/-) -Mäusen im akuten und subchronischen MPTP-Modell ergab keine Veränderungen bezüglich der funktionellen (lokomotorische Aktivität), neurochemischen (Bestimmung der Gewebespiegel der Neurotransmitter und ihrer Metabolite) und histologischen Parameter (Tyrosinhydroxylase-Immunreaktivität und Nissl-Färbung) im Vergleich zu Wildtyp-Tieren.

IL-6 ist ein pluripotentes Zytokin, das in die Regulation inflammatorischer Prozesse involviert ist [Hirano et al., 1990; Balkwill, 1993]. Es wird von verschiedenen Zellen wie Makrophagen, Astrozyten [Frei et al., 1989] und Neuronen produziert [Fattori et al., 1995; Schöbitz et al., 1993] und bewirkt die Einwanderung von Mikroglia und Astrozyten in das betroffene Gewebe. Über die Astrozyten werden neurotrophe Faktoren ausgeschüttet, die den Effekten der Mikroglia entgegenwirken [Giulian et al., 1993]. Letztere sezernieren zytotoxische Zytokine, darunter auch IL-6 und phagozytieren die degenerierenden Neurone [Banati et al., 1993]. Allerdings spielt IL-6 auch für die regenerativen Prozesse eine wichtige Rolle, da es neben der Mikroglia-Einwanderung auch die Anzahl der Astrozyten im betroffenen Gewebe erhöht [Fattori et al., 1995]. Als regeneratives Element cholinerger und dopaminerger Neurone [Hama et al., 1991; Kushima et al., 1992] bewirkt IL-6 die Synthese neurotropher Faktoren [Frei et al., 1989] und hemmt die Synthese von neurotoxischen Botenstoffen [Aderka et al., 1989].

Tatsächlich konnte IL-6 *in-vitro* die Neurotoxizität von MPP^+ gegenüber dopaminergen Neuronen abschwächen [von Coelln et al., 1995; Akaneya et al., 1995]. Und auch *in-vivo* wurden inflammatorische Prozesse als Reaktion auf die Behandlung mit MPTP durch Einwanderung reaktiver Mikroglia in das geschädigte Gewebe nachgewiesen [Czlonkowska et al., 1996]. Zwei bis drei Tage nach der Behandlung waren ebenfalls erhöhte Werte für IL-6 messbar [Kohutnicka et al., 1998; Kaku et al., 1999].

Parallel zu den eigenen Experimenten wurde auf der Tagung der Amerikanischen Gesellschaft für Neurowissenschaft (SFN) im vergangenen Jahr in San Diego in einem vergleichbaren Versuchsdesign ein deutlicher Einfluss von IL-6 auf die MPTP-Toxizität als Posterbeitrag vorgestellt [Bolin et al., 2001]. Die Applikation von 30 mg/kg MPTP s.c. führte in Mäusen mit fehlender IL-6-Produktion zu einer wesentlich stärkeren Schädigung der dopaminergen Neurone im Vergleich zu den Wildtyp-Tieren.

Kaku und Mitarbeiter [1999] fanden eine Abhängigkeit des IL-6 Anstiegs vom Grad der striatalen Dopamin-Depletion und folgerten einen kompensatorischen Mechanismus zum Schutz der verbliebenen Neurone.

Die Diskrepanz zu den eigenen Ergebnissen könnte auf verschiedene Punkte zurückgeführt werden, denn der Grad der neuronalen Degeneration und die Art des ausgelösten Zelltods werden durch das Behandlungsschema bestimmt. Dementsprechend kann auch die Beteiligung einzelner Faktoren unterschiedlich stark ausgeprägt sein. Allerdings wurde in beiden Fällen die akute MPTP-Toxizität untersucht und der nigrale Zellverlust lag trotz abweichender Dosierungen vergleichbar bei 50% (Wildtyp-Tiere). Der Einfluss des Behandlungsschemas kann also ausgeschlossen werden.

Allerdings weist IL-6 neben neurotrophen auch zytotoxische Eigenschaften auf. Die chronische Überexpression von IL-6 führte in transgenen Tieren zu einer progressiven inflammatorischen Reaktion mit Aktivierung von Mikroglia und Astrozyten, Zytokin-Ausschüttung und erhöhter Permeabilität der Bluthirnschranke [Heyser et al., 1997]. Als Folge fanden sich schwere neurologische Symptome und degenerative Veränderungen verschiedener Hirnareale [Campbell et al., 1993].

Eindeutige Hinweise, die eine Beteiligung von IL-6 an neurodegenerativen Mechanismen vermuten lassen, liegen aber noch nicht vor. Die erhöhten Werte für IL-6 in Striatum und Cortex [Mogi et al., 1994*a*] sowie der Cerebrospinalflüssigkeit [Blum-Degen et al., 1995] von Parkinson-Gehirnen können auch die von Kaku postulierten Kompensationsmechanismen widerspiegeln.

Für die MPTP-Toxizität scheint IL-6 daher keine Schlüsselrolle zu übernehmen. Allerdings muss bei den vorliegenden Ergebnissen berücksichtigt werden, dass Kompensationsmechanismen bei genetisch veränderten Tieren einen möglichen Effekt maskieren können. Da das Immunsystem ein Netzwerk komplexer Vorgänge umfasst, die sowohl protektive als auch zytotoxische Prozesse auslösen können, scheint vielmehr das Zusammenspiel der einzelnen Faktoren die inflammatorischen Prozesse auszumachen. Gegenläufige zytotoxische und protektive Wirkungen könnten als Resultat ebenfalls zu keiner Wirkung geführt haben.

Abschliessend bleibt zu sagen, dass weder Hinweise auf toxische noch auf protektive Effekte von IL-6 bezüglich der MPTP-Toxizität nachgewiesen werden konnten. Weitere Untersuchungen müssen zur Aufklärung der inflammatorischen Mechanismen beitragen, bevor die Bedeutung einzelner Zytokine präzisiert werden kann.

4.3 Diskussion der Effekte im Stimulationsmodell

4.3.1 Beteiligung von Peroxynitrit (6-OHDA, 3-NP, MPP^+)

Nach intrastriataler 6-OHDA-Applikation kam es zeitgleich zu einem Anstieg der Hydroxylradikale gemessen als *o*- und *m*- Tyrosin, sowie der Nitrierungsprodukte 3-Nitrotyrosin und 3-Nitrophenylalanin. Genetisch veränderte Mäuse, bei denen mittels "knockout"-Technologie die TNF-α Expression unterdrückt wurde, zeigten keinen Einfluss auf die Entstehung reaktiver Sauerstoff- und Stickstoffspezies.

Das Potential von MPP^+ Hydroxylradikale zu erzeugen, wurde bereits im Salicylat-Assay untersucht (siehe Kap. 4.1.3.8). Im Phenylalanin-Assay bewirkte es keinen Anstieg der Nitrierungsprodukte.

Das striatale Neurotoxin 3-Nitropropionsäure löste ebenfalls keinen Anstieg der Nitrierungsprodukte aus.

4.3.1.1 6-OHDA

Im üblichen 6-OHDA-Injektionsmodell wird durch die striatale Applikation von 20 μg 6-OHDA eine retrograde, progressive Degeneration der nigralen, dopaminergen Neurone erzeugt [Sauer und Oertel, 1994]. Derartige Läsionen bewirken normalerweise innerhalb von 2 Monaten eine Abnahme der Dopamin-, DOPAC- und HVA-Spiegel auf etwa 20% der Kontrollwerte, die nicht reversibel ist [Espino et al., 1995; Berger et al., 1991; Cadet et al., 1991; Gottfries et al., 1969]. Demgegenüber müssen bei der reversen Mikrodialyse-Technik deutlich höhere Ausgangskonzentrationen eingesetzt werden, um eine vergleichbare Menge an 6-OHDA im Gewebe zu erreichen: Bei einer Flussrate von 2 μl/min und einer Stimulationsdauer von 60 Minuten ergibt sich für eine Konzentration von 10 mM 6-OHDA in der Perfusionslösung eine applizierte Menge von maximal 200 μg 6-OHDA im Extrazellularraum. Von dieser Menge erreichen jedoch nur etwa 10 - 20% und damit höchstens 40 μg durch Diffusion über die Sondenmembran tatsächlich die Cerebrospinalflüssigkeit. Bei der reversen Mikrodialyse erreichen die applizierten Substanzen allerdings nur das Gewebe in der direkten Umgebung der Sonde. Die neurotoxische Schädigung mit folgender Degeneration der Neurone bleibt dementsprechend auf ein kleines Areal innerhalb des Striatums begrenzt. Dieser Effekt wird jedoch verschleiert, da die Gewebewerte nur die Situation im gesamten Striatum widerspiegeln können.

Desweiteren erweist sich die schnelle Zersetzung von 6-OHDA im Stimulationsmodell als problematisch. Obwohl man über verschiedene Ansätze die Autoxidation von 6-OHDA einzuschränken versucht, bleibt der Nutzen dieser Methoden fraglich. Zum einen wird der Zusatz von Ascorbinsäure als Antioxidans noch kontrovers diskutiert, da seine antioxidative Wirkung nicht zuverlässig nachgewiesen werden konnte [Cathcart, 1985; Frei et al., 1989; Halliwell, 1996; Carr und Frei, 1999]. Zum anderen kann die Kühlung der Perfusionslösung auf 4°C zwar die Zersetzungsgeschwindigkeit senken, aber andererseits im Gewebe auch unphysiologische Reaktionen hervorrufen. Um dennoch die Applikation einheitlicher 6-OHDA-Dosen zu ermöglichen, bleibt die exakte Standardisierung der Versuchsbedingungen.

Tatsächlich erfolgte die Hydroxylierung von Phenylalanin bereits in der Perfusionslösung. Dieser Effekt äusserte sich in den hohen Basalwerten der Tyrosine, die im mikromolaren Bereich lagen. Die Basalwerte der Nitrierungsprodukte lagen jedoch deutlich niedriger. *In-vitro* Untersuchungen zeigten, dass der Zusatz der Neurotoxine zu der Perfusionslösung nicht für den starken Anstieg der Hydroxylierungs- und Nitrierungsprodukte *in-vivo* verantwortlich gemacht werden kann. Dennoch resultiert diese Hydroxylradikalbildung *ex-vivo* bereits in einer unspezifischen Schädigung der Nervenzellen, bevor das Toxin in die dopaminergen Neurone aufgenommen wird.

Die Ergebnisse dieser Studie stehen im Einklang mit der Theorie, dass die 6-OHDA-Toxizität hauptsächlich über die Entstehung freier Radikale vermittelt wird. Durch seine strukturelle Ähnlichkeit zu Dopamin stellt 6-OHDA ein gutes Substrat für die Monoaminoxidase dar [Karoum et al., 1993]. Ausserdem ist es dafür bekannt durch rapide Autoxidation Wasserstoffperoxid und Superoxidradikale zu erzeugen, die über die Metallionen-katalysierte Haber-Weiss-Reaktion zu Hydroxylradikalen umgesetzt werden. Es folgt also den gleichen Abbauwegen wie Dopamin und führt auf diese Weise ebenfalls zu der Entstehung exzessiver Mengen an freien Radikalen.

Unabhängig von der Radikalbildung blockiert es die Komplexe I und IV der mitochondrialen Atmungskette [Glinka und Youdim, 1995]. Gleichzeitig senkt es die Spiegel an reduziertem Glutathion [Naveilhan et al., 1994] und setzt Ferritin-gebundenes Eisen frei [Monteiro und Winterbourn, 1989].

Ausserdem konkurriert 6-OHDA mit Dopamin auch um den vesikulären Monoamintransporter [Decker et al., 1993] und löst direkt nach der Applikation einen massiven Efflux von Dopamin in den Extrazellularraum aus [Opacka-Juffry et al., 1998], der gleichermassen für die 6-OHDA-induzierten Wirkungen und somit auch für die zytotoxischen Effekte verantwortlich sein könnte. Allerdings konnte nach striataler Dopamin-Applikation keine Erhöhung der Hydroxylierungs- oder Nitrierungsprodukte herbeigeführt werden [Ferger et al., 2001*a*], so dass Dopamin doch nur eine untergeordnete Rolle in der 6-OHDA-Toxizität zu spielen scheint.

Aufgrund dieser Zusammenhänge konzentrieren sich die meisten Studien der 6-OHDA-Toxizität auf die Entstehung reaktiver Sauerstoffspezies. Neuerdings wird aber auch die Bildung reaktiver Stickstoffspezies wie z.B. Peroxynitrit mit den neurodegenerativen Prozessen in Verbindung gebracht [Torreilles et al., 1999; Beckman und Koppenol, 1996]. Peroxynitrit entsteht *in-vivo* bei der Reaktion von NO und Superoxid [Beckman et al., 1990; Huie und Padmaja, 1993] und hinterlässt durch die Nitrierung der Tyrosinreste von Proteinen einen messbaren Fingerabdruck im Gewebe. Im Gehirn von Parkinson-Patienten konnten bereits Nitrierungsreaktionen nachgewiesen werden [Good et al., 1998].

Untersuchungen im 6-OHDA-Modell an der Ratte zeigten eine parallele Entstehung reaktiver Sauerstoff- und Stickstoffspezies nach striataler Stimulation [Ferger et al., 2001*a*]. Die Entstehung von Peroxynitrit könnte folgendermassen erklärt werden: Die nach 6-OHDA gebildeten reaktiven Sauerstoffspezies Wasserstoffperoxid und das Superoxidradikal können mit endogenem NO zu Peroxynitrit reagieren [Imam et al., 2001], das als Folge der Blockade der mitochondrialen Atmungskette mit folgender Calcium-Überladung der Zellen und erhöhter Aktivität der NO-Synthase entsteht [Bredt und Snyder, 1994]. Die reaktiven Stickstoffspezies bewirken wiederum eine Verstärkung der Dopamin-Autoxidation und dadurch die Bildung von Chinonen. Auf diese Weise könnte die selektive Empfindlichkeit der dopaminergen Neurone gegenüber Peroxynitrit erklärt werden [LaVoie und Hastings, 1999].

4.3.1.2 Bedeutung von TNF-α für die akute 6-OHDA-Toxizität

Der Tumor-Nekrose-Faktor (TNF) -α ist ein proinflammatorisches Zytokin, das von verschiedenen Zellen des Immunsystems wie Mikroglia und Astrozyten [Sawada et al., 1998], aber auch von Neuronen gebildet wird.

TNF-α wirkt zytotoxisch auf Oligodendrozyten sowie über die Aktivierung des Nuklear-Faktors-κB proliferativ auf Astrozyten und Mikroglia. Zusätzlich verhindert es die Aufnahme von Glutamat durch die Astrozyten. Da diese wesentlich an der Regulation der extrazellulären Glutamat-Spiegel beteiligt sind, trägt TNF-α dadurch entscheidend zur exzitotoxischen Schädigung dopaminerger Neurone bei. TNF-α führt desweiteren zu einer Aktivierung der induzierbaren NO-Synthase und kann so die Bildung von Peroxynitrit ermöglichen.

Die Wirkungen von TNF-α werden über membranständige Rezeptorsysteme vermittelt. Die Hauptfunktion von TNF-α (Auslösung der Zytotoxizität [Tartaglia et al., 1991]) wird wahrscheinlich über den Typ I (55kDA = p55) Rezeptor vermittelt, da dieser von nigralen Neuronen gebildet wird [Boka et al., 1994]. Die Funktion des Typ II Rezeptors (75kDA = p75) ist noch weitestgehend unbekannt. Ihm wird die Proliferation von Thymocyten, T-Lymphozyten sowie die Auslösung der apoptotischen Kaskade auf bestimmte Signale zugeschrieben [Akassoglou et al., 1998]. Beide Rezeptoren existieren auch in nicht-membrangebundener Form im Extrazellularraum, wo sie TNF-α abfangen und dadurch seine Wirkungen unterbinden [Van Zee et al., 1992].

Neben zytotoxischen Eigenschaften werden aber auch protektive Effekte für TNF-α *in-vitro* [Cheng et al., 1994; Barger et al., 1995] und *in-vivo* [Gary et al., 1998; Sullivan et al., 1999] beschrieben, die auch hier einen sehr komplexen Mechanismus der Zytotoxizität vermuten lassen.

Erhöhte Zytokinspiegel sind eine regelmässige Beobachtung in chronisch-neurologischen Erkrankungen wie dem Morbus Alzheimer und dem Morbus Parkinson. McGeer und McGeer [1987/1988] konnten erhöhte Werte reaktiver Mikroglia und hohe Spiegel inflammatorischer Proteine im geschädigten Gewebe von Parkinson-Gehirnen nachweisen. Deutlich erhöhte Spiegel von TNF-α in Striatum und Cerebrospinalflüssigkeit sowie TNF-α-immunreaktive Mikroglia in der Substantia nigra konnten ebenfalls beobachtet werden [McGeer et al., 2001].

Im MPTP-Modell konnte bereits ein Anstieg von TNF-α auf striataler Ebene nachgewiesen werden [Mogi et al., 1994*b*] und TNF-α (-/-) Mäuse zeigten eine höhere Überlebensrate sowie eine Verbesserung der lokomotorischen Aktivität [Ferger et al., 2001*b*].

Vier Wochen nach der Injektion von 6-OHDA konnten deutlich erhöhte Werte von TNF-α in Striatum und Substantia nigra beobachtet werden [Mogi et al., 1999]. Da die intrastriatale Applikation von 6-OHDA erst durch den retrograden Transport in die SN zu einer

Degeneration der Neurone führt, kann der fehlende Effekt von TNF-α in der akuten 6-OHDA-Toxizität auf einen sekundären Mechanismus inflammatorischer Prozesse zurückgeführt werden. In der Regel kommt es erst infolge neurochemischer Veränderungen zu inflammatorischen Reaktionen, die dann zu einer Progression der degenerativen Prozesse beitragen können. Somit lässt das Versuchsdesign nur beschränkt Rückschlüsse auf die Beteiligung von TNF-α an der 6-OHDA-Toxizität zu und kann lediglich die Beteiligung an den akuten Effekten von 6-OHDA ausschliessen.

4.3.1.3 MPP^+

Die Peroxynitrit-vermittelte Neurodegeneration wird auch als Mechanismus der Toxizität weiterer Stoffe wie beispielsweise MPTP vermutet. Mittels Massenspektrometrie konnten bereits erhöhte Werte von 3-Nitrotyrosin nach MPTP-Behandlung nachgewiesen werden [Pennathur et al., 1999]. Da die Bildung von Peroxynitrit an die erhöhte Aktivität der NO-Synthase gekoppelt ist, konzentrierten sich viele Arbeitsgruppen auf diesen Aspekt. Die Untersuchung des selektiven nNOS-Inhibitors 7-Nitroindazol zeigte eine deutliche Protektion gegenüber der MPTP-Toxizität [Schulz et al., 1995*b*]. Allerdings senkt die Substanz die Durchblutung des Gehirns und kann als Hemmstoff der Monoaminoxidase die Entstehung des toxischen Metaboliten beeinflussen [Castalogni et al., 1997]. Derartige Effekte konnten jedoch für die in den Protektionsversuchen eingesetzten Dosierungen von 7-Nitroindazol ausgeschlossen werden [Przedborski et al., 1996; Schulz et al., 1995b]. Studien an transgenen Tieren mit defizienter nNOS-Expression zeigten eine geringere Empfindlichkeit gegenüber MPTP, die neurochemischen Parameter waren im Vergleich zu den Wildtyp-Tieren jedoch deutlich verbessert. Heterozygote Tiere, die lediglich eine verminderte Expression der nNOS aufwiesen, zeigten keine protektiven Effekte [Przedborski et al., 1996].

Die Bedeutung von Peroxynitrit in der MPTP-Toxizität wurde jedoch durch Untersuchungen relativiert, die nach intranigraler Infusion von NO oder Peroxynitrit keinen Anstieg der oxidativen Schäden in diesem Hirnareal erzeugen konnten [Rauhala et al., 1996/1998]. Da in den nigrostriatalen dopaminergen Neuronen keine NO-Synthase lokalisiert ist, handelt es sich bei der Entstehung von Peroxynitrit wahrscheinlich um einen sekundären Mechanismus, der erst durch inflammatorische Prozesse mit der Einwanderung reaktiver Mikroglia eingeleitet wird. Um die Rolle von Peroxynitrit besser beurteilen zu können müssten im nächsten Schritt die Langzeiteffekte von MPTP auf die Spiegel von 3-Nitrotyrosin und 3-Nitrophenylalanin untersucht werden.

4.3.1.4 3-NP

3-Nitropropionsäure (3-NP) ist ein weiteres Neurotoxin, das die Zerstörung striataler Neurone verursacht. Als irreversibler Hemmstoff der Succinat-Dehydrogenase hemmt es den Komplex II der mitochondrialen Atmungskette [Browne et al., 1999]. Das resultierende Energiedefizit erhöht die Vulnerabilität der Neurone gegenüber exzitotoxischen Prozessen [Albin und Greenamyre, 1992; Ankarcrona et al., 1995; Beal, 1992].

Die durch 3-NP erzeugten Schädigungen entsprechen in vielerlei Hinsicht dem Erscheinungsbild der Chorea Huntington. Diese Erkrankung ist durch die progressive Degeneration von Neuronen gekennzeichnet, die von einer reaktiven Gliosis mit verstärkter Einwanderung von Astrozyten begleitet ist. Die degenerativen Prozesse sind nicht auf die Neurone einer diskreten anatomischen Region begrenzt, sondern betreffen mehrere Hirnareale wie das Striatum, den Cortex, den Globus Pallidus und das Cerebellum. Als erste und am schwersten betroffen sind jedoch die Neurone des Striatums. Dennoch bleibt die dopaminerge Neurotransmission intakt [Bruyn et al., 1979]. Obwohl die striatalen Glutamat-Spiegel im Normbereich bleiben, erinnern die Schäden im Gewebe an exzitotoxische Prozesse. Dies führte zur Hypothese der indirekten Exzitotoxizität [Novelli et al., 1988]: Der 3-NP-induzierte Energieverlust bedingt den Zusammenbruch des Membranpotentials mit folgender Aufhebung der spannungsabhängigen Blockade der Glutamat-Rezeptoren. Zeewak und Nicklas [1991/1992] lieferten weitere Hinweise darauf, dass die Aktivierung von NMDA-Rezeptoren nach Störung der mitochondrialen Funktion zu exzitotoxischen Mechanismen führt.

Die Aktivierung der Glutamat-Rezeptoren führt zu Veränderungen der Calciumhomöostase mit folgender Aktivierung der NO-Synthase, die die Bildung reaktiver Stickstoffspezies inklusive Peroxynitrit auslösen könnte [Tabrizi et al., 2000*b*]. In post-mortem Untersuchungen der Gehirne von Huntington-Patienten konnten jedoch keine Anhaltspunkte für die Beteiligung von oxidativem Stress gefunden werden [Alam et al., 2000]. Oxidativer Stress scheint daher im Vergleich zur mitochondrialen Dysfunktion und Exzitotoxizität für die Pathologie dieser Erkrankung eine eher untergeordnete Rolle zu spielen [Alam et al., 2000]. Das erklärt den schwachen Anstieg der Hydroxylradikalmarker nach reverser Mikrodialyse mit 3-NP. Beal [1995], sowie Schulz und Mitarbeiter [1996*b*] belegten diesen Effekt, indem sie ebenfalls einen Anstieg der Hydroxylradikale im Striatum sowie protektive Effekte einer antioxidativen Behandlung berichteten. Die Produktion

freier Radikale könnte somit ein sekundärer Effekt der mitochondrialen Dysfunktion sein, die ja ohnehin zu der Produktion reaktiver Sauerstoffspezies beiträgt. Allerdings käme als Erklärung auch die Entstehung reaktiver Sauerstoff- und Stickstoffspezies als Folge exzitatorischer Prozesse in Frage.

Diese Theorie steht im Einklang mit den Befunden, dass der NO-Synthase-Inhibitor 7-Nitroindazol die Toxizität von 3-NP abschwächen konnte [Schulz et al., 1995*b*]. Desweiteren konnte Beal [1998] einen signifikanten Anstieg von 3-Nitrotyrosin, dem Marker für Peroxynitrit-vermittelte Nitrierungsreaktionen, im Gewebe zeigen. Die Veränderungen der Gewebespiegel von 3-Nitrotyrosin treten auch hier wahrscheinlich erst als Langzeiteffekt nach der Schädigung auf. Da die Untersuchung der akuten Toxizität mittels Mikrodialyse keine Rückschlüsse auf die chronischen Effekte von 3-NP zulässt, müssen weitere Experimente die Rolle von Peroxynitrit in der 3-NP-Toxizität präzisieren.

4.3.2 Malonat

Im Stimulationsmodell an der Ratte löste die intrastriatale Applikation von Malonsäure einen massiven Anstieg der extrazellulären Dopamin-Spiegel aus, der von der erhöhten Bildung freier Hydroxylradikale begleitet war.

Mittels Gabe von Reserpin kann ein Funktionalitätsverlust des VMAT-2 simuliert werden: Zum einen senkt Reserpin die Aufnahme der Catecholamine in die Speichervesikel durch direkten Angriff am Transporter; zum anderen setzt es die Speicherfähigkeit für basische Catecholamine herab, indem es durch die Blockade der vesikulären Protonenpumpe die für die Speicherung notwendige Protonierung der Catecholamine verhindert. Durch die zusätzliche Injektion des Tyrosinhydroxylase-Hemmstoffes AMPT kann eine nahezu vollständige Depletion des striatalen Dopamins erzeugt werden. Folglich wurden der striatale Dopamin-Efflux sowie die Entstehung freier Radikale effektiv gesenkt.

Die Behandlung mit dem Dopamintransporter-Inhibitor GBR 12909 dagegen senkte den Gewebespiegel von Dopamin nur schwach und konnte auch die Malonat-induzierte Dopamin-Freisetzung nicht beeinflussen. Dennoch verringerte sich die Entstehung freier Hydroxylradikale nach Malonat-Infusion.

Die Malonsäure gehört zu den Exzitotoxinen und blockiert ebenso wie 3-Nitropropionsäure den Komplex II der Atmungskette (Succinat-Dehydrogenase), allerdings reversibel. Die Malonat-induzierten Läsionen sind exzitotoxischen Ursprungs [Greene et al., 1993; Henshaw et al., 1994]

und lösen eine Kaskade zytotoxischer Reaktionen aus. Dazu zählt unter anderem auch die Induktion von oxidativem Stress [Schulz et al., 1995*c*], der durch die massive Freisetzung von Dopamin vermittelt werden kann [Ferger et al., 1999*b*]. Dopamin zeigte bereits *in-vitro* [McLaughlin et al., 1998] und *in-vivo* [Hastings et al., 1996] neurotoxische Eigenschaften. Der Mechanismus seiner Toxizität kann auf verschiedenen Mechanismen beruhen:

Durch die Instabilität der Catecholgruppe wird Dopamin einerseits enzymatisch über die Monoaminoxidase abgebaut, wobei pro Molekül jeweils ein Molekül 3,4-Dihydroxyphenylacetaldehyd und Wasserstoffperoxid entsteht; andererseits unterliegt es der schnellen Autoxidation, die zu einer Entstehung von Chinonen, Semichinonen und Wasserstoffperoxid führt, das via Fenton-Reaktion anschliessend zu freien Hydroxylradikalen umgesetzt wird. Die Erhöhung des Dopamin-Turnovers, wie sie durch die Malonat-induzierte Freisetzung von Dopamin ausgelöst wird, resultiert also in der Entstehung freier Hydroxylradikale.

Diese Hypothese der Malonat-induzierten Dopamin-Toxizität konnte durch eine Studie im eigenen Arbeitskreis belegt werden: Die striatale Dopamin-Depletion durch 6-OHDA senkte sowohl den Dopamin-Efflux als auch die Bildung der Hydroxylradikale [Ferger et al., 1999*b*]. Die systemische Gabe von *L*-DOPA stellten die striatalen Dopamin-Spiegel sowie die Malonat-Toxizität in den 6-OHDA-lädierten Tieren wieder her [Melamed et al., 1984; Ferger et al., 1999b].

Allerdings scheint neben Dopamin auch die Funktionalität der spezifischen Carriersysteme Einfluss auf die Hydroxylradikalbildung zu nehmen. Die intrazelluläre Dopamin-Depletion mittels kombinierter Gabe von Reserpin und AMPT führt zu einer Verminderung des freisetzbaren Dopamins sowie reduzierten Extrazellularspiegeln und senkt auch die Bildung freier Radikale. Die Gabe von *L*-DOPA kann in diesem Fall die extrazellulären Dopamin-Werte nicht wieder auf Kontrollniveau erhöhen [Kannari et al., 2000]. Auch der DAT-Inhibitor GBR 12909 vermindert die Malonat-induzierte Freisetzung der Hydroxylradikale, allerdings unabhängig vom freigesetzten Dopamin. Diese Effekte sprechen für einen intrazellulären Mechanismus der Hydroxylradikalbildung.

Seit bekannt wurde, dass der D_2-Rezeptoragonist Lisurid teilweise die Malonat-Toxizität in denervierten Tieren zurückbringen kann, ohne die Entstehung freier Radikale zu erhöhen, muss neben der Hydroxylradikalbildung noch ein weiterer Mechanismen der Dopamin-Toxizität in Betracht gezogen werden. Die Aktivierung der D_2-Rezeptoren könnte zu einer intrazellulären Signalkette führen, die zu der Dopamin-Toxizität beisteuert [Löschmann et al., 1997].

Diese Überlegungen erscheinen auf den ersten Blick widersprüchlich, da D_2-Rezeptoragonisten in den experimentellen Modellen des Morbus Parkinson bereits protektive Effekte gezeigt hatten [Iida et al., 1999]. Allerdings wurden im Striatum Neurone entdeckt, die neben Neuropeptiden (wie Somatostatin) auch den Neurotransmitter NO enthalten [Dawson et al., 1991]. Garside und Mitarbeiter [1992] zeigten, dass die Stimulation von D_2-Rezeptoren striataler Kulturen *in-vitro* zu einer erhöhten Somatostatin-Freisetzung führt und eine verstärkte NO-Freisetzung bewirkt.

D_2-Agonisten könnten also auch *in-vivo* über die Stimulation solcher Neurone zu einer Produktion von NO führen. Die Bildung von NO über die neuronale NO-Synthase ist Calcium-abhängig, so dass parallel wahrscheinlich eine Erhöhung der Arachidonsäure-Freisetzung resultiert [Felder et al., 1991; Kanterman et al., 1991; Piomelli et al., 1991]. Die Metaboliten der Arachidonsäure sind potente Inhibitoren der Natrium/Kalium-ATPase [McGiff, 1991], über die sie das Energiedefizit der Zelle verstärken.

Eine D_2-Rezeptor-Stimulation trägt über die Potenzierung des Malonat-induzierten Energieverlustes zur Ausbildung der striatalen Neurotoxizität bei. Studien an transgenen Tieren, die durch eine verminderte Aktivität der neuronalen NO-Synthase eine deutliche Protektion gegenüber der striatalen Malonat-Toxizität zeigten, unterstützen diese Theorie [Schulz et al., 1995*b*].

Obwohl bekannt ist, dass Dopamin in Kulturen toxisch auf Neurone wirkt, wurde umstritten diskutiert, ob eine systemische Gabe von *L*-DOPA als Dopamin-Precursor auch *in-vivo* neurotoxische Effekte aufweist. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen lassen vermuten, dass eine Erhöhung der extrazellulären Dopamin-Konzentration die striatale Neurotoxizität durch Schädigung des mitochondrialen Energieumsatzes potenziert. Ähnliche Effekte wurden auch schon in Untersuchungen am MPTP-Modell vermutet [Boada et al., 2000]. Solange die Neurone keine mitochondrialen Defekte mit Zusammenbruch der Energieversorgung zeigen, besitzt Dopamin nur eine schwache Toxizität; gegenüber vorgeschädigten Neuronen kann es aber in bedeutendem Umfang zu den degenerativen Mechanismen beitragen.

Dies würde auch die widersprüchlichen Ergebnisse bezüglich der stark umstrittenen *L*-DOPA-Toxizität erklären. Für die akute Behandlung mit *L*-DOPA konnten weder im Striatum von nichtgeschädigten Tieren noch von 6-OHDA-denervierten Tieren ein Anstieg von 2,3-DHBA nachgewiesen werden [Camp et al., 2000; Ishida et al., 2000]. Erst die chronische *L*-DOPA Behandlung brachte eine transiente Erhöhung der striatalen Radikalbildung [Ishida et al., 2000], die auch

in der Substantia nigra beobachtet werden konnte [Smith et al., 1994]. Die Hemmung der mitochondrialen Funktion könnte also *L*-DOPA erst die Fähigkeit verleihen Hydroxylradikale zu erzeugen. Und obwohl die chronische Gabe von *L*-DOPA in weiterführenden Experimenten keine toxischen Effekte in 6-OHDA-denervierten Tieren auslöste [Murer et al., 1998], könnten diese Ergebnisse direkte Bedeutung für die Behandlung des Morbus Parkinson haben. Da sowohl die menschliche Erkrankung als auch die Tiermodelle einen Zusammenhang zwischen der Störung des Energieumsatzes und oxidativen Stress als Pathomechanismus vermuten lassen [Browne et al., 1999; Schulz und Beal, 1995], könnte die Modulation des dopaminergen Systems ein guter Angriffspunkt nicht nur für symptomatische, sondern auch für die neuroprotektive Therapie sein.

4.3.3 Tyramin

Tyramin ist ein endogenes Amin, das unter physiologischen Bedingungen im Gehirn nur in Spuren vorkommt. Es entsteht durch die Decarboxylierung von Tyrosin, Hydroxylierung von β-Phenylethylamin oder durch Dehydroxylierung von Dopamin [Boulton und Huebert, 1981].

Seine höchsten Konzentrationen finden sich im Striatum, wobei sie grössenordnungsmässig mit 9.5 pg/mg Nassgewebegewicht deutlich unter den Werten für Dopamin liegen [Sardar et al., 1987]. Welche funktionelle Rolle Tyramin im Gehirn übernimmt ist noch unklar, es werden aber neuromodulatorische Aktivitäten an monoaminergen Neuronen vermutet [Nguyen und Juorio, 1989].

Anhand von Bindungsstudien konnte eine hohe Affinität zu dopaminergen Neuronen des Striatums [Vaccari und Saba, 1995] und dem vesikulären Monoamintransporter (VMAT) festgestellt werden [Nguyen und Juorio, 1989]. Tritium-markiertes Tyramin bindet effizient an den VMAT und wurde zur Untersuchung dieses Transporters als Angriffsziel von Pestiziden und Neurotoxinen im Striatum verwendet [Vaccari und Saba, 1995]. Auch die Vulnerabilität der Neurone beim Morbus Parkinson wird mit den Transportern DAT und VMAT in Zusammenhang gebracht [Miller et al., 1999]. Selektive Hemmstoffe des Dopamintransporters sind in der Lage, die Aufnahme dopaminerger Toxine (wie MPP^+) in die Nervenendigung zu unterbinden. Dementsprechend zeigen Mäuse mit einem Mangel an Dopamintransportern eine deutliche Abschwächung der MPTP-Toxizität [Gainetdinov et al., 1997]. Im Gegensatz dazu führt ein Mangel an VMAT zu einer Verstärkung der Toxizität, da sich die Neurone durch Einlagerung der Toxine in die Vesikel selbst vor deren Toxizität schützen können [Gainetdinov et al., 1998].

Desweiteren ist auch die Kompartimentierung von Dopamin abhängig von DAT und VMAT. Der VMAT terminiert die Aktivität von Dopamin durch Aufnahme in die Vesikel. Dadurch werden niedrige zytosolische Spiegel gewährleistet [Erickson et al., 1992], die die metabolisch- und autoxidativ-induzierte Entstehung reaktiver Sauerstoffspezies [Halliwell, 1992] auf einem unschädlichen Niveau halten.

Tyramin interferiert mit der Dopamin-Homöostase durch Konkurrenz um die beiden Transporter. Die verminderte Wiederaufnahmekapazität für Dopamin sowie die vermehrte Abgabe in den Extrazellularraum erhöhen die Dopamin-Spiegel auf nicht-physiologische Werte [Zetterström et al., 1988; Fairbrother et al., 1990]. Zusätzlich senkt es den enzymatischen Metabolismus von Dopamin, da es selbst ein gutes Substrat für die beiden Isoformen der Monoaminoxidase (MAO) darstellt [Juorio und Boulton, 1982]. Die MAO-B ist an der äusseren Mitochondrienmembran lokalisiert und fördert die oxidative Deaminierung nicht nur von Dopamin, Noradrenalin und Serotonin, sondern auch biogener Amine wie Tyramin. Über diesen Katabolismus entsteht Wasserstoffperoxid, das in Anwesenheit katalytischer Metallionen zu Hydroxylradikalen umgesetzt wird [Halliwell, 1992].

Oxidativer Stress wird heute als wichtiger Faktor in der Entstehung des Morbus Parkinson sowie der Pathomechanismen experimenteller Modelle angesehen [Jenner und Olanow, 1996]. Tatsächlich zeigte Tyramin nach lokaler Applikation in das Striatum der Maus einen deutlichen Anstieg der Hydroxylradikalbildung. Dieser Effekt konnte sowohl durch eine MPTP-induzierte Dopamin-Verarmung als auch durch die Vorbehandlung mit dem unspezifischen MAO-A/B-Inhibitor Tranylcypromin aufgehoben werden.

Nun liegt die Vermutung nahe, dass der Tyramin-induzierten Hydroxylradikalbildung ein MAO-abhängiger Mechanismus zugrunde liegt, der von der induzierten Dopamin-Freisetzung unabhängig ist. Diese Schlussfolgerung ergibt sich beim Vergleich der Zeitverläufe von Dopamin und dem Hydroxylradikalmarker 2,3-DHBA: Die Spiegel von 2,3-DHBA steigen in Gegenwart von Tyramin an und fallen mit Beendigung der Stimulationsphase auf Basalwerte ab, obwohl die extrazellulären Dopamin-Spiegel weiterhin auf einem stark erhöhten Niveau bleiben.

In Übereinstimmung mit den Daten dieses Mikrodialyse-Experiments an der Maus zeigte Tyramin in verschiedenen Studien an der Ratte eine signifikante Freisetzung von Dopamin [Fairbrother et al., 1990], die wahrscheinlich auf die Mobilisation vesikulären Dopamins zurückzuführen ist [Zetterström et al., 1988].

Die Beteiligung von Dopamin an den Mechanismen verschiedener Neurotoxine wird mittlerweile verstärkt untersucht. Im Falle von MPP^+ wird Dopamin als Trigger der mitochondrialen Dysfunktion diskutiert [Boada et al., 2000], während für die Malonat-Toxizität eine entscheidende Rolle von Dopamin bereits bestätigt werden konnte [Xia et al., 2001].

In einem indirekten Ansatz sollte der Einfluss von Dopamin auf die Tyramin-induzierte Radikalbildung untersucht werden. Im anerkannten MPTP-Modell [Schmidt und Ferger, 2001*a*] wurde eine Woche vor der Behandlung die Zerstörung dopaminerger Nervenendigungen ausgelöst. Anhand vorangegangener Studien wurde eine folgende striatale Dopamin-Verarmung von etwa 65% erwartet [Schmidt und Ferger, 2001*b*], die sich nicht auf die Extrazellularspiegel auswirkte. Dies steht im Einklang mit dem Befund, dass Veränderungen der Extrazellularwerte nach 6-OHDA erst bei einer Depletion über 80% erreicht werden [Zigmond et al., 1990]. Das dopaminerge System scheint durch Kompensationsmechanismen die Extrazellularwerte über einen sehr weiten Bereich konstant halten zu können [Zigmond et al., 1990].

Die Behandlung führte zu einer signifikanten Absenkung der Radikalproduktion. Dennoch spielt Dopamin nur eine untergeordnete Rolle in der Tyramin-induzierten Radikalbildung. Statt dessen scheint Tyramin selbst für die Radikalbildung verantwortlich zu sein, da die Werte von 2,3-DHBA noch während der Auswaschphase (Fraktion 8 - 9) unter die Signifikanzgrenze fielen. Obwohl MPTP neben der Dopamin-depletierenden Wirkung auch kompetitiv MAO-hemmende Eigenschaften besitzt [Singer et al., 1985], können die Effekte nach einer Zeitspanne von 8 Tagen nicht mehr darauf zurückgeführt werden.

Um diesen potentiellen Mechanismus der Tyramin-induzierten Hydroxylradikalbildung dennoch zu untersuchen, wurde der MAO-vermittelte Metabolismus pharmakologisch antagonisiert. Da Tyramin ein Substrat beider Isoenzyme darstellt und auch für die Maus bei hohen Substratkonzentrationen ein von beiden Isoformen abhängiger Metabolismus gefunden wurde [Fornai et al., 1999], wurde der unspezifische MAO-A/B-Inhibitor Tranylcypromin eingesetzt.

Auch diese Behandlung senkte die Tyramin-induzierte Radikalbildung, ohne die extrazellulären Dopamin-Spiegel signifikant zu beeinflussen. Anhand dieser Daten erscheint die Hypothese der enzymatisch-bedingten Hydroxylradikalbildung wahrscheinlich, da weder die Dopamin-Depletion noch die hohen Dopamin-Konzentrationen unter MAO-blockierten Bedingungen die Radikalbildung wesentlich beeinflussen konnte.

Die systemische Injektion von Tyramin konnte dagegen keine Wirkung erzielen, was sich durch die Tatsache erklären lässt, dass Tyramin unter physiologischen Bedingungen nicht bluthirnschrankengängig ist. Normalerweise verhindern 2 Abwehrsysteme, nämlich der MAO-Metabolismus im GIT/Leber und die Funktion der intakten Bluthirnschranke, zusätzliche Effekte von Tyramin im ZNS. Unter pathologischen Bedingungen (z.B. perforierte Bluthirnschranke ausgelöst durch inflammatorische Prozesse) könnte die Tyramin-Aufnahme jedoch zum Risikofaktor für das dopaminerge System werden. Tatsächlich kam Tyramin-reiche Nahrung kürzlich in den Verdacht, die Parkinson-Symptomatik zu verschlimmern. Dabei sollen allerdings weder eine verstärkte Hemmung der MAO noch der Cheese-Effekt eine entscheidende Rolle spielen [Cosens, persönliche Mitteilung].

Bis heute ist die pathophysiologische Rolle von Tyramin bezüglich der Entstehung von oxidativem Stress unbekannt. Klinische Beobachtungen ohne Messung der Tyramin-Spiegel im Gehirn können schwerlich zu einer Abschätzung pharmakologischer Effekte herangezogen werden. Weitere experimentelle Studien sind notwendig, um zu zeigen, ob sich die Tyramin-induzierte Hydroxylradikalbildung als neuronale Toxizität auswirkt. Die interessante Frage, ob Tyramin-reiche Nahrung tatsächlich die Parkinson-Symptomatik verschlechtern kann, muss vorerst unbeantwortet bleiben.

Dennoch wächst das Interesse am Mechanismus der Tyramin-induzierten Hydroxylradikalbildung. Kürzlich konnte *in-vivo* gezeigt werden, dass mitochondriale Schädigungen durch den MAO-induzierten Monoamin-Abbau getriggert werden [Cohen und Kesler, 1999] und Tyramin über eben diesen Metabolismusweg mitochondriale DNA-Schäden verursachen kann [Hauptmann et al., 1996].

4.4 Diskussion der Bedeutung des NST

Die Kainsäure-Läsion des Nucleus subthalamicus (NST) im nicht-vorgeschädigten Tier konnte nach Kalium-Stimulation auf striataler Ebene weder eine Veränderung der Neurotransmitter-Freisetzung noch der Entstehung freier Radikale im Vergleich zur Kontrollgruppe hervorrufen. Messungen in der Substantia nigra zeigten dagegen eine signifikante Reduktion der Dopamin-Freisetzung sowohl ipsi- als auch contralateral zur Schädigung des NST. Bezüglich der Radikalbildung war eine tendentielle Abnahme an 2,3-DHBA zu sehen, die auf der ipsilateralen Seite etwas stärker ausgeprägt schien.

Der Abfall der Dopamin-Metabolite nach Kalium-Stimulation steht in guter Übereinstimmung zu verschiedenen anderen Mikrodialyse-Untersuchungen [Fairbrother et al., 1988; Guan und McBride, 1987; Chen und Kandasamy 1996]. Die Stimulation der Neurotransmitter-Freisetzung durch hohe Kaliumionen-Konzentrationen beruht auf der Depolarisation neuronaler Membranen mit folgendem Calcium-Influx [Leslie et al., 1985], der direkt mit der exozytotischen Freisetzung des vesikulären Dopamins verknüpft ist [Blaustein, 1975]. Da extrazelluläres DOPAC aber vorwiegend aus neu-synthetisiertem, nicht vesikulärem Dopamin gebildet wird, erklärt sich das Absinken der Dopamin-Metabolite nach der Kalium-Stimulation [Zetterström et al., 1988].

Die glutamaterge Überaktivität des NST und seiner Projektionsgebiete wird mittlerweile als wichtiger Mechanismus bei der Ausbildung der Parkinson-Symptomatik sowie der Progression der Erkrankung angesehen [Blandini et al., 1997; Guridi et al., 1993; Obeso et al., 1998]. Nach heutigem Verständnis der Basalganglien-Organisation geht man davon aus, dass neurodegenerative Prozesse (wie z.B. die mitochondriale Dysfunktion mit folgender Energieverarmung der Zelle) die Neurone der Substantia nigra gegen exzitotoxische Einflüsse empfindlich machen. Über subthalamonigrale Projektionen kann der am Ende der pathologischen Veränderungen stehende "überexzitatorische" NST die dopaminergen Neurone zunehmend schädigen und auf diese Weise die Progression der Erkrankung vorantreiben [Rodriguez et al., 1998].

Trotz steigenden Verständnisses der physiologischen Verschaltungen der Basalganglien sind die schematischen Darstellungen noch unvollständig und es werden ständig neue Bahnen postuliert. So konnten Glutamat-Rezeptor-vermittelte Afferenzen auf dopaminerge SNc-Neurone [Chegui et al., 1994] sowie glutamaterge Verbindungen zwischen dem NST und der SNc nachge-

wiesen werden [Hammond et al., 1978; Smith und Grace, 1992]. Hinzukommt, dass sich die Basalganglienkerne bei Nagern und Menschen leicht unterscheiden. Bei Ratten und Mäusen sind im Gegensatz zum Menschen die beiden Strukturen des Striatums, der Nucleus caudatus und das Putamen, nicht voneinander abgrenzbar. Das Analogon zum GPi wird bei den Nagern als Nucleus Entopeduncularis bezeichnet, während der Globus Pallidus dem menschlichen GPe entspricht. Die Verbindungen zwischen den Kernen als auch zu anderen Hirnarealen sind aber durchaus vergleichbar, so dass tierexperimentelle Erkenntnisse auf den Menschen übertragen werden können. Die überzeugenden Behandlungserfolge der Subthalamikus-Inaktivierung in Fällen mit schwerster Ausprägung der Symptomatik unterstützen diese Hypothese [Bergmann et al., 1990; Aziz et al., 1991/1992].

Dennoch sind die neurochemischen Grundlagen der Hochfrequenzstimulation zur reversiblen Inaktivierung sowie der irreversiblen chemischen Läsion des NST noch weitestgehend ungeklärt. Die qualitativen Wirkungen der beiden Methoden zur Inaktivierung des NST sind annähernd identisch [Benazzouz et al., 2000], allerdings scheint die phasische Inaktivierung des NST Vorteile mit sich zu bringen. Zahlreiche Studien zielen auf die Aufklärung dieser Mechanismen sowie der Unterschiede zwischen reversibler und irreversibler Inaktivierung.

Die Senkung der NST-Aktivität führt zu einer erhöhten Aktivität der Neurone in der SNc [Benazzouz et al., 2000]. Dieser Effekt könnte durch eine direkte subthalamonigrale Projektion vermittelt werden, oder über die Hemmung der SNr zustande kommen, die die inhibitorische Kontrolle über die SNc inne hat [Paul et al., 2000].

Die Hochfrequenzstimulation des NST führt im naiven Tieren zu einem deutlichen Anstieg des striatalen Dopamins, während die striatalen Glutamat-Spiegel eher gesenkt wurden [Bruet et al., 2001]. Ähnliche Ergebnisse bezüglich der Dopamin-Spiegel in Striatum und Substantia nigra wurden auch durch die chemische Läsion des NST erreicht [Mintz et al., 1986]. Diese Befunde sprechen ebenfalls für eine Steigerung der dopaminergen Neurotransmission durch die Hemmung des NST [Mintz et al., 1986; Jaffer et al., 1994] und deuten ebenso wie die Ergebnisse des Mikrodialyse-Experiments auf eine wichtige Rolle des Nucleus subthalamicus in der physiologischen dopaminergen Transmission hin.

Die Inaktivierung des NST in Tieren mit nigrostriataler Degeneration durch verschiedene Neurotoxine lieferte widersprüchliche Ergebnisse. Piallat und Mitarbeiter [1996] wiesen

protektive Effekte der Kainsäure-Läsion an 6-OHDA-denervierten Tieren nach und postulierten diese Methode als geeignete Möglichkeit, in die Progression des Morbus Parkinson einzugreifen. Andere Arbeitsgruppen relativierten diese Hypothese durch abweichende Ergebnisse [Nakao et al., 1999].

Da protektive Effekte der NST-Inaktivierung nicht einwandfrei nachgewiesen werden konnten und die Langzeiteffekte dieser Methode noch nicht abzuschätzen sind, sollte die therapeutische Anwendung nur nach strenger Indikationsstellung erfolgen. Weitere Untersuchungen der neurochemischen Veränderungen in den einzelnen Kernen der Basalganglien müssen dazu beitragen, die komplexen Interaktionen zwischen den Kernen sowie die Mechanismen der stereotaktischen Operationen vollständig zu verstehen.

Kapitel 5

Zusammenfassung

Der Morbus Parkinson ist eine häufige neurologische Erkrankung, die mit der Degeneration dopaminerger Nervenzellen einhergeht, welche von der Substantia nigra pars compacta ausgehen und zum Striatum projizieren. Aufgrund mangelnder Kenntnis bezüglich der Pathogenese, kann die Behandlung nur rein symptomatisch erfolgen. Infolgedessen liegt das Ziel der aktuellen Forschung vor allem in einem besseren Verständnis der Pathomechanismen und der Entwicklung neuer Therapiestrategien, die den Krankheitsverlauf verlangsamen, stoppen oder den Beginn der Erkrankung hinauszögern können.

Die Entdeckung des dopaminergen Neurotoxins MPTP (1-Methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridin) ebnete den Weg für ein experimentelles Parkinson-Modell von unschätzbarem Wert. Dieses Modell weist bezüglich der neurodegenerativen Mechanismen zahlreiche Parallelen zu der menschlichen Parkinson-Erkrankung auf. Zu den pathogenetischen Faktoren zählen vor allem die Induktion oxidativen Stresses sowie die mitochondriale Dysfunktion mit sekundär auftretenden exzitotoxischen und immunologischen Prozessen.

Zielsetzung dieser Doktorarbeit war es, anhand der Untersuchung verschiedener Neurotoxine zur Aufklärung der Pathomechanismen des Morbus Parkinson beizutragen sowie innovative Interventionsmassnahmen an etablierten Modellen zu entwickeln.

Um die Effekte potentieller Arzneistoffe zur Behandlung des Morbus Parkinson im MPTP-Modell bewerten zu können, ist die genaue Kenntnis der degenerativen Veränderungen erforderlich. Zur Charakterisierung des akuten MPTP-Modells wurden physiologische (Körpergewicht), funktionelle (lokomotorische Aktivität, motorische Koordination), neurochemische (Dopamin und Metabolite) sowie neuroanatomische Parameter (TH-Aktivität und Zellverlust) bestimmt.

MPTP führte im akuten Modell zu einer deutlichen Abnahme der lokomotorischen Aktivität am Tag nach der Behandlung. Die Abnahme der Gewebekonzentrationen von Dopamin und seinen Metaboliten war am 8. Tag maximal und führte zu einer kompensatorischen Erhöhung des Dopamin-Umsatzes, der auch über die folgenden Wochen anhielt. Der Verlust an nigralen Neuronen lag am 8. Tag bei etwa 60%.

In einem weiterführenden Versuch wurde die Beteiligung von freien Radikalen an der MPTP-Toxizität untersucht, denen sowohl in den Tiermodellen als auch der menschlichen Erkrankung eine massgebliche Rolle in der Neurodegeneration zugeschrieben wird. Anders als erwartet senkten hohe Konzentrationen von MPP^+ jedoch die Entstehung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS). Die Ursache könnte einerseits in der Hemmung der Monoaminoxidase (MAO) -vermittelten Radikalbildung liegen, oder auf die relativ hohen Dosierungen zurückzuführen sein, die eine vollständige Blockade der Atmungskette und somit einer wichtigen Quelle der freien Radikale bewirken. Sicherlich wäre es aber falsch, aufgrund der verminderten Radikalbildung nach MPP^+ in der Maus auf eine verminderte Toxizität zu schliessen, da weit mehr Faktoren in diesen Prozess mit hinein spielen. Die einzelnen pathologischen Faktoren bilden einen Teufelskreis, der bis heute die Identifizierung des ursächlichen Phänomens der Neurodegeneration beim Morbus Parkinson verhindert.

Ein weiterer wichtiger Aspekt für die Interpretation der Wirkstoffeffekte im MPTP-Modell ist die Beeinflussung des MPTP-Metabolismus. Verändert eine Substanz die Umsetzung von MPTP zu seinem toxischen Metaboliten MPP^+, kann eine neuroprotektive Wirkung durch einen rein kinetischen Effekt vorgetäuscht werden. Die deutliche Erniedrigung der MPP^+-Gewebewerte durch den selektiven MAO-B-Hemmstoff Selegilin untermauert diese Hypothese. Um Fehlinterpretationen zu vermeiden, wurde deshalb eine analytische Methode zur Bestimmung der MPP^+-Gewebespiegel aufgebaut und die verschiedenen Substanzen auf eine Veränderung des MPTP-Metabolismus untersucht. Ein derartiger Effekt konnte beispielsweise für Salicylsäure und (±)-Kavain ausgeschlossen werden.

Der Naturstoff (±)-Kavain hatte in einer vorangegangenen Mikrodialyse-Untersuchung der eigenen Arbeitsgruppe deutliche Effekte auf die glutamaterge Neurotransmission gezeigt. Da exzitatorische Mechanismen auch für die Pathologie des Morbus Parkinson diskutiert werden, entstand die Idee, seinen Einfluss auch im MPTP-Modell zu untersuchen.

(±)-Kavain war nach systemischer Applikation in der Lage, die MPTP-Neurotoxizität signifikant abzuschwächen. Es bewirkte eine deutliche Abnahme des Zellverlustes in der Substantia nigra sowie die Erhöhung der dopaminergen Neurotransmission im Striatum. Gleichzeitig verbesserten sich die funktionellen Parameter. Die gute Wirksamkeit im Tiermodell macht (±)-Kavain zu einem interessanten Ansatzpunkt für die Entwicklung neuer Arzneistoffe für die Behandlung des Morbus Parkinson.

Erhöhte Spiegel der Zytokine IL-1β, IL-6 und TNF-α aus Proben von Parkinson-Patienten bestätigen die Beteiligung inflammatorischer Reaktionen an der Pathogenese der Erkrankung. Neben den schädlichen proinflammatorischen Effekten kann IL-6 aber auch als regeneratives Element cholinerger und dopaminerger Neurone die Synthese neurotropher Faktoren erhöhen und die Synthese neurotoxischer Botenstoffe hemmen. In einer Kooperation mit der Arbeitsgruppe von PD Dr. M. Schwaninger (Universität Heidelberg) wurden genetisch veränderte homozygote Mäuse, die defizient für IL-6 waren, auf ihre Empfindlichkeit gegenüber MPTP untersucht. Da inflammatorische Prozesse meist chronischer Natur sind, wurde für die Versuche neben dem akuten auch ein subchronisches Behandlungsschema gewählt.

Dabei ergaben sich keine Veränderungen bezüglich der funktionellen, neurochemischen und neuroanatomischen Parameter nach der Gabe von MPTP im Vergleich zu den Wildtyp-Tieren sowie zwischen den unterschiedlichen Behandlungsschemata. IL-6 scheint daher keine Schlüsselrolle in der MPTP-Toxizität zu übernehmen. Allerdings müssen zwei Aspekte bei den vorliegenden Ergebnissen berücksichtigt werden: Zum einen können Kompensationsmechanismen bei genetisch veränderten Tieren einen möglichen Effekt maskieren; zum anderen können komplexe Veränderungen im immunologischen System gegenläufige zytotoxische und protektive Wirkungen hervorrufen, die als Resultat ebenfalls keine Wirkung erzielen.

Mikrodialyse-Experimente erlauben die Messung von pharmakologischen Effekten auf die Extrazellularspiegel der Neurotransmitter. Seit die Pathologie des Morbus Parkinson verstärkt mit der Beteiligung oxidativen Stresses in Zusammenhang gebracht wird, ist die Induktion reaktiver Sauerstoff- und Stickstoffspezies durch die Neurotoxine (6-Hydroxydopamin (6-OHDA), 3-Nitropropionsäure (3-NP) und MPP^+) und deren Bestimmung mit der *in-vivo* Mikrodialyse von steigendem Interesse.

6-OHDA bewirkt als Neurotoxin die Degeneration catecholaminerger Neurone und führte nach lokaler Applikation in der Maus zu einem parallelen Anstieg der Hydroxylierungs- und Nitrierungsprodukte. Diese Ergebnisse lassen darauf schliessen, dass auch Peroxynitrit an den neurodegenerativen Prozessen nach 6-OHDA-Stimulation beteiligt ist. Der schnelle Anstieg der Radikalproduktion direkt nach der Applikation zeigt den primären Charakter des oxidativen Stresses in der 6-OHDA-Toxizität.

Ob auch entzündliche Prozesse an der Toxizität von 6-OHDA beteiligt sind, wurde mittels reverser Mikrodialyse an TNF-α (-/-) Mäusen untersucht. Ein Defizit des proinflammatorischen Zytokins zeigte jedoch keinen Effekt auf die akute Entstehung reaktiver Sauerstoff- und Stickstoffspezies nach 6-OHDA-Stimulation. Diese Untersuchung der 6-OHDA-Toxizität auf die Entstehung von reaktiven Sauerstoff- und Stickstoffspezies lässt jedoch nur begrenzt Rückschlüsse auf den Gesamtverlauf der 6-OHDA-Toxizität und auf eine mögliche Beteiligung von TNF-α zu. Da Mikrodialyse-Messungen nur während und direkt im Anschluss an die Neurotoxin-Applikation vorgenommen wurden, konnten auch nur akute Veränderungen im Gewebe gemessen werden. Die inflammatorischen Prozesse entwickeln sich aber wahrscheinlich als Folge der Gewebeschädigungen und könnten in einem weiterführenden Mikrodialyse-Experiment zu einem späteren Zeitpunkt nach der 6-OHDA-Applikation neu untersucht werden.

3-NP ist ein irreversibler Hemmstoff des Komplex II der Atmungskette und erzeugt ein dem Morbus Huntington ähnliches, exzitotoxisches Schädigungsbild. Die Entstehung von Peroxynitrit nach 3-NP-Applikation wurde bisher noch nicht direkt untersucht und sollte als Kontrollexperiment zu den dopaminergen Neurotoxinen 6-OHDA und MPP^+ dienen.

3-Nitropropionsäure führte zwar zu einem deutlichen Anstieg der Hydroxylradikalmarker, dieser fiel jedoch um den Faktor 2 schwächer aus als nach 6-OHDA-Gabe, jedoch stärker als nach MPP^+. Der fehlende Anstieg der Nitrierungsmarker deutet auf eine untergeordnete Rolle von Peroxynitrit bei der 3-NP-Toxizität hin.

Die Peroxynitrit-vermittelte Neurodegeneration wird auch als Mechanismus der MPTP- Toxizität vermutet. Mittels Massenspektrometrie wurden bereits erhöhte Werte von 3-Nitrotyrosin im Gewebe nachgewiesen. Anhand dieser Studie ergab sich allerdings für die akute MPP^+-Toxizität, die auch bereits im Salicylat-Assay keine Induktion der Hydroxylradikalbildung gezeigt hatte, kein Hinweis auf die Entstehung von Peroxynitrit.

Ein reversibler Hemmstoff des Komplex II der Atmungskette, der ebenfalls zur Untersuchung der Morbus Huntington eingesetzt wird, ist das Malonat. Für den Mechanismus seiner Toxizität wird wie beim Morbus Huntington die Störung der mitochondrialen Funktion mit nachfolgender Induktion exzitotoxischer Prozesse postuliert. Aus vorangegangenen Studien war bekannt, dass das verfügbare Dopamin eine entscheidende Rolle in der Malonat-Toxizität übernimmt, dessen Mechanismen in einem weiterführenden Experiment anhand von DAT - und VMAT-2- Inhibitoren präzisiert wurden.

Die Hemmung der spezifischen Carriersysteme für Dopamin senkte effektiv die Bildung freier Radikale. Durch Hemmung des vesikulären Monoamintransporters in Kombination mit der Blockade der Tyrosinhydroxylase konnte eine intrazelluläre Dopamin-Depletion erreicht werden, die zu einem verminderten Anstieg der Hydroxylierungsmarker führte. Die Hemmung des Dopamintransporters dagegen reduzierte die Bildung der Hydroxylradikale unabhängig vom verfügbaren Dopamin. Diese Ergebnisse, die im Rahmen einer Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von PD Dr. J.B. Schulz (Tübingen) gewonnen wurden, sprechen für einen intrazellulären Mechanismus der Malonat-induzierten Dopamin-Toxizität. Da sowohl für die menschliche Erkrankung als auch für die experimentellen Modelle ein Zusammenhang zwischen der Störung des mitochondrialen Energieumsatzes und der Entstehung oxidativen Stresses als Pathomechanismus vermutet wird, könnte die Modulation des dopaminergen Systems eventuell einen guten Angriffspunkt nicht nur für die symptomatische, sondern auch für die neuroprotektive Therapie darstellen.

Die enorme strukturelle Ähnlichkeit zwischen Dopamin und Tyramin könnte dafür verantwortlich sein, dass das biogene Amin als Nahrungsbestandteil ungünstig die Symptomatik der Parkinson-Erkrankung beeinflusst. Seine Effekte auf die dopaminerge Neurotransmission sowie die Entstehung freier Radikale wurde mittels lokaler Gabe über die Mikrodialyse-Sonde untersucht.

Tyramin induzierte einen deutlichen Anstieg des extrazellulären Dopamins sowie der freien Hydroxylradikale. Durch vorhergehende dopaminerge Depletion mittels MPTP-Behandlung konnte die Radikalbildung signifikant gesenkt werden. Aber auch der unspezifische MAO-A/B-Hemmstoff Tranylcypromin senkte die Radikalproduktion unabhängig von der Dopamin-Freisetzung. Zusammenfassend zeigen diese Untersuchungen, dass die Freisetzung von Catecholaminen für die Tyramin-induzierte Radikalbildung nur eine untergeordnete Rolle spielt, da Tyramin selbst einen deutlichen Effekt auf die Hydroxylradikalbildung besitzt: Der Grossteil der Radikale entsteht wahr-

scheinlich über den enzymatischen Metabolismus von Tyramin, da sowohl die neurotoxische als auch die pharmakologische Hemmung der Monoaminoxidase nahezu vollständig die Entstehung der Hydroxylradikale verhinderte.

Nach heutigem Verständnis der Basalganglien-Organisation führt der progressive Zellverlust in der Substantia nigra und das daraus resultierende striatale Dopamin-Defizit zu einer Überaktivität des Nucleus subthalamicus, einem exzitatorischen Kern der Basalganglien. Durch direkte Efferenzen zur Substantia nigra, die gleichzeitig einen hohen Anteil an Glutamat-Rezeptoren aufweist, können exzitatorische Schädigungen auf nigraler Ebene entstehen. Schon seit einiger Zeit wird die funktionelle Ausschaltung des Nucleus subthalamicus klinisch erfolgreich durch Tiefenhirnstimulation am Parkinson-Patienten praktiziert. Der genaue Mechanismus ist jedoch noch nicht geklärt, was aber für die Beurteilung des Langzeiterfolges dieser neuen Behandlungsmethode wichtig wäre.

Die Einflüsse des Nucleus subthalamicus bzw. seine Hemmung wurden an Tieren untersucht, bei denen der Nucleus subthalamicus durch eine Kainsäure-Mikroinjektion irreversibel ausgeschaltet wurde. Auf striataler Ebene zeigte diese Läsion keinen Effekt auf die dopaminerge Neurotransmission im Vergleich zur Kontrolle. Auf nigraler Ebene konnte jedoch eine Abnahme der dopaminergen Neurotransmission sowohl ipsi- als auch contralateral zur Kainsäure-Läsion mittels Mikrodialyse-Untersuchungen gefunden werden. Dies deutet daraufhin, dass der Nucleus subthalamicus bei Tieren mit intakter nigrostriataler Bahn für die physiologische dopaminerge Transmission wichtig ist. Demnach sollte die therapeutische Ausschaltung des Nucleus subthalamicus nur nach einer sehr strengen Indikationsstellung erfolgen. Weitere Untersuchungen an Tieren mit einer Schädigung des nigrostriatalen Systems müssen zeigen, ob sich hierbei die Ausschaltung des Nucleus subthalamicus günstig auf die dopaminerge Transmission auswirkt und eventuell sogar die Radikalbildung in der Substatia nigra zu hemmen vermag.

Kapitel 6

Summary

Parkinson's disease (PD) is a common neurological disorder which is marked by a selective degeneration of dopaminergic neurons in the substantia nigra pars compacta (SNc) and subsequent striatal dopamine depletion. As the pathological mechanisms still remain unclear, there is no cure, only the symptoms can be treated. Therefore, PD research focuses on the degenerative mechanisms of PD and the development of new therapeutic strategies to slow the progression or to delay the onset of the disease.

The discovery of the dopaminergic neurotoxin MPTP (1-methyl-4phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine) led to an experimental model of PD, which is stated to be the best one up to date. MPTP mimics closely the pathobiochemical alterations of the disease and gives further insight in the pathological mechanisms like oxidative stress, mitochondrial dysfunction, excitotoxicity and inflammatory processes.

The general aim of my doctoral thesis was the investigation of neurotoxin-induced pathological mechanisms along with the elucidation of neuroprotective intervention strategies.

To estimate drug-induced effects on MPTP-toxicity, the degenerative changes due to the neurotoxin have to be well characterized. Physiological (body weight), functional (locomotor activity and coordination), neurochemical (dopamine and metabolites) and histological parameters (tyrosine hydroxylase activity and cell loss in the SN) were determined to validate the acute model of MPTP-toxicity.

The application of MPTP resulted in a significant reduction in locomotor activity one day after treatment as well as a decrease in striatal dopamine and metabolites levels with lowest levels 8 days after treatment. At the same time dopamine-turnover was increased due to compensatory mechanisms of the remaining neurons. The extent of nigral cell loss reached nearly 60%.

Further investigations focused on the induction of free radicals after MPTP-treatment, as oxidative stress is a main factor of neurodegeneration in PD as well as in animal models of PD. Unexpectedly, high concentrations of MPP^+ acutely reduced but not enhanced the levels of the hydroxyl radical marker 2,3-dihydroxybenzoic acid (DHBA) in an *in-vivo* microdialysis experiment. Such an effect could be due to inhibition of monoaminoxidase (MAO) -induced free radical formation or to a total block of the electron transport chain, a main source of radical formation. However, free radicals may play no or an minor role at an early stage of MPTP-toxicity, but may have more impact at a later stage. As several other factors are involved in the cytotoxic processes of MPTP, which sum up in a vicious circle, the idenfication of the main factor of neurodegeneration is still difficult.

As drug-induced alterations of MPTP-metabolism could affect MPTP-neurotoxicity, kinetic effects may be interpreted as neuroprotective action. Reduced MPP^+-levels after pretreatment with the MAO-B inhibitor selegiline confirmed this hypothesis.

To prevent such misinterpretation an analytical method was established to measure the tissue concentrations of the toxic MPTP-metabolite MPP^+. The results of this investigation exclude an influence of substances like salicylic acid or (±)-kavain towards MPTP-metabolism.

(±)-Kavain, a natural compound, had shown pronounced effects on glutamatergic neurotransmission in a previous experiment. Since excitotoxic processes are postulated to be involved in neurodegeneration, compounds which interfere with glutamatergic neurotransmission might improve parkinsonian symptoms and prevent nigral degeneration. Therefore, effects of (±)-kavain seemed worth to be studied in the MPTP-model of PD.

Systemic administration of (±)-kavain attenuated the MPTP-induced decrease in locomotor activity, striatal dopamine levels, tyrosine hydroxylase-immunoreactivity as well as loss of nigral neurons. These results demonstrate that (±)-kavain is able to protect nigrostriatal dopaminergic neurons against MPTP-toxicity and might be of interest to develop novel drugs for the treatment of PD.

Elevated levels of cytokines like IL-1β, IL-6 and TNF-α are a common observation in chronic neurological diseases like PD. However, IL-6 shows proinflammatory properties as well as neuroprotective actions: It is a regenerative element of cholinergic and dopaminergic neurons by increasing the synthesis of neurotrophic factors and inhibiting the release of neurotoxic messengers. In order to elucidate the role of IL-6 in MPTP-toxicity a subchronic treatment schedule was compared to the acute model of MPTP-toxicity in IL-6 (-/-) and wild-type mice (in cooperation with PD Dr. M. Schwaninger (University of Heidelberg)).

The results in MPTP-treated IL-6 deficient mice showed no alterations in functional, neurochemical and neuroanatomical parameters in comparison to the wild-type animals and between the different MPTP treatment schedules, indicating a subordinate role of IL-6 in MPTP-induced toxicity. However, compensatory mechanisms in gene knock out mice or complexity of inflammatory reactions exerting cytotoxic and cytoprotective actions at the same time may disguise potential MPTP-effects.

Microdialysis experiments are widely used to investigate pharmacological effects on extracellular levels of neurotransmitters. Since oxidative stress is considered to be a main factor of degeneration, measurements of reactive oxygen species (ROS) and nitrogen species (RNS) formation (6-hydroxydopamine (6-OHDA), 3-nitropropionic acid (3-NP) and MPP^+) became more important.

6-OHDA leads to the degeneration of dopaminergic neurons in rats and has shown comparable effects in mice. Apparently, the pronounced increase in hydroxyl radical formation was paralleled by an increase in the formation of peroxynitrite after the administration of 6-OHDA, indicating an essential feature that not only ROS, but in addition RNS are involved in 6-OHDA-toxicity.

A potential effect of the proinflammatory cytokine TNF-α on ROS and RNS formation was investigated in TNF-α deficient mice in a further microdialysis experiment using 6-OHDA. However, the lack of TNF-α expression showed no alterations in the 6-OHDA-induced formation of ROS and RNS.

These microdialysis studies on 6-OHDA-induced free radical production permit only limited conclusions towards the general role of TNF-α in 6-OHDA-toxicity. As microdialysis experiments were performed at a very early time point after neurotoxin application, only acute effects could be measured. Further studies should investigate the effects of TNF-α on 6-OHDA toxicity at a later time point, which may not only effect ROS and RNS formation, but in addition inflammatory processes.

3-NP is an irreversible inhibitor of the succinat dehydrogenase (complex II of the electron transport chain) and produces brain damage comparable to other excitotoxins. The formation of peroxynitrite after 3-NP application has not been investigated directly, until now. Although 3-NP led to an increase of hydroxyl radicals in the present study, it was less pronounced than in the previous 6-OHDA study. In contrast to 6-OHDA there was no peroxynitrite formation after 3-NP, supposing a subordinate role of RNS in 3-NP toxicity.

Peroxynitrite-induced neurodegeneration is discussed as one mechanism of MPP^+-toxicity. However, stimulation with MPP^+, which failed to acutely induce hydroxyl radical formation, did not elevate peroxynitrite levels. Again this clearly suggests that ROS and RNS play no role in the acute stage of MPP^+ toxicity, but cannot rule out its effect at a later stage.

Malonate, a reversible inhibitor of succinat dehydrogenase, produces cell loss that mimics many of the biochemical and neuropathological features of Huntington's disease. Malonate-toxicity in the striatum primarily results from inhibition of succinat dehydrogenase and thereby blockade of complex II of the mitochondrial electron transport chain. The events leading to cell death after the loss of intracellular ATP are mediated through a massive release of dopamine, the generation of free radicals, activation of glutamate receptors, as well as the activation of specific proteases. In the present study, which was done in cooperation with PD J. B. Schulz (University of Tübingen), we investigated the contribution and mechanism of dopamine on striatal malonate-toxicity.

Pretreatment with reserpine, an inhibitor of the vesicular monoamine transporter type-2, in combination with α-methyl-p-tyrosine, an inhibitor of tyrosine hydroxylase, nearly completely depleted striatal dopamine concentrations, reduced the malonate-induced release of dopamine and generation of hydroxyl radicals. Blocking the dopamine transporter by GBR 12909 only marginally reduced striatal dopamine concentrations and did not reduce malonate-induced release of dopamine. However, it significantly attenuated the malonate-induced generation of hydroxyl radicals. Therefore, the mechanism of GBR 12909 to decrease malonate-induced hydroxyl radical generation seems to be independent of the releasable dopamine. This argues for an intracellular generation of ROS after uptake of dopamine through the dopamine transporter. Since defects of oxidative phosphorylation have been associated with the induction of oxidative stress in the pathogeneses of PD, modulation of the dopaminergic system may be a promising target not only for a symptomatic but also for a neuroprotective therapy.

The structural similarities between tyramine and dopamine, which is sometimes called 3-hydroxy-tyramine, gave rise to the idea of the potential neurotoxicity of tyramine in the dopaminergic system. To investigate whether, and by which mechanism tyramine increases the formation of hydroxyl free radicals in the dopaminergic system and thereby may act as a possible risk factor to aggravate PD symptoms, we determined dopamine release and hydroxyl free radical production using the *in-vivo* microdialysis technique.

In the present study, tyramine clearly showed a marked hydroxyl radical formation after its local administration into the striatum. Both, administration of the dopaminergic neurotoxin MPTP one week prior to microdialysis and pretreatment with the MAO-A/B inhibitor tranylcypromine antagonized the tyramine-induced hydroxyl radical formation. In conclusion, our data suggest that tyramine is able to produce hydroxyl radicals on its own and by releasing catecholamines. The formation of hydrogen peroxide derived from MAO-metabolism most likely contributes to the subsequent hydroxyl radical formation because neurotoxic and pharmacological inhibition of MAO almost completely prevented the tyramine-induced hydroxyl radical formation.

A model of basal ganglia organization suggests that an increased activity in the output nuclei underlies the features of PD. The loss of nigral dopaminergic neurons and the resulting striatal dopamine depletion lead to an overactivity of the nucleus subthalamicus (NST). Direct subthalamonigral projections and a high abundance of glutamate receptors render the SN vulnerable towards NST-induced excitotoxicity. This hypothesis is supported by the fact, that reversible inhibition of the NST by deep brain stimulation has been successfully used in PD patients. However, the long-term benefit as well as the underlying symtomatic or protective mechanisms of this procedure still remain unclear.

The impact of irreversible NST lesions with kainic acid were investigated in naive animals. Inactivation of the NST did not alter striatal neurotransmission, but in the SN dopaminergic transmission was significantly decreased ipsi- as well as contralateral to the lesion side. These results indicate an important role of the NST for physiological dopaminergic neurotransmission in animals with intact nigrostriatal projections. Therefore, therapeutic inactivation of the NST should be restricted to severe cases of PD only. Experiments in animals with lesions of the nigrostriatal system may obtain further information about the benefits of NST-inactivation on dopaminergic neurotransmission and perhaps free radical formation at the nigral level.

Literaturverzeichnis

[Abeliovich et al., 2000] Abeliovich A, Schmitz Y, Farinas I, Choi-Lundberg D, Ho WH, Castillo PE, Shinsky N, Verdugo JM, Armanini M, Ryan A, Hynes M, Phillips H, Sulzer D and Rosenthal A. Mice lacking α-synuclein display functional deficits in the nigrostriatal dopamine system. Neuron 2000, 25, 239-52.

[Adams et al., 1997] Adams JD Jr, Klaidman LK and Ribeiro P. Tyrosine hydroxylase: mechanisms of oxygen radical formation. Redox Rep 1997, 3, 273-9.

[Aderka et al., 1989] Aderka D, Le JM and Vilcek J. IL-6 inhibits lipopolysaccharide induced tumor necrosis factor production in cultured human monocytes, U937 cells, and in mice. J Immunol 1989, 143, 3517-23.

[Aisen et al., 1990] Aisen P, Cohen G and Kang JO. Iron toxicosis. Int Rev Exp Pathol 1990, 31, 1-46.

[Akaneya et al., 1995] Akaneya Y, Takahashi M and Hatanaka H. Survival of and 1-methyl-4-phenylpyridinium (MPP^+) neurotoxicity against dopaminergic neurons in coculture of rat mesencephalon with their target on non-target regions. Neurosci Res 1995, 23, 55-63.

[Akassoglou et al., 1998] Akassoglou K, Bauer J, Kassiotis G, Pasparakis M, Lassmann H, Kollias G and Probert L. Oligodendrocyte apoptosis and primary demyelination induced by local TNF/p55 TNF receptor signaling in the central nervous system of transgenic mice: models for multiple sclerosis with primary oligodendrogliopathy. Am J Pathol 1998, 153, 801-13.

[Alam et al., 2000] Alam ZI, Halliwell B and Jenner P. No evidence for increased oxidative damage to lipids, proteins, or DNA in Huntington's disease. J Neurochem 2000, 75, 840-6.

[Albin et al., 1989] Albin RL, Young AB and Penney JB. The functional anatomy of the basal ganglia disorders. Trends Neurosci 1989, 12, 366-75.

[Albin et al., 1992] Albin RL, Makowiec RL, Hollingsworth ZR, Dure LS 4th, Penney JB and Young AB. Excitatory amino acid binding sites in the basal ganglia of the rat: a quantitative autoradiographic study. Neuroscience 1992, 46, 35-48.

[Albin und Greenamyre, 1992] Albin RL and Greenamyre JT. Alternative excitotoxic hypotheses. Neurology 1992, 42, 733-8.

[Allen et al., 1995] Allen KL, Almeida A, Bates TE and Clark JB. Changes of respiratory chain activity in mitochondrial and synaptosomal fractions isolated from the gerbil brain after graded ischaemia. J Neurochem 1995, 64, 2222-9.

[Ambrosio et al., 1996] Ambrosio S, Espino A, Cutillas B and Bartrons R. MPP^+ toxicity in rat striatal slices: relationship between non-selective effects and free radical production. Neurochem Res 1996, 21, 73-8.

[Ankarcrona et al., 1995] Ankarcrona M, Dypbukt JM, Bonfoco E, Zhivotovsky B, Orrenius S, Lipton SA and Nicotera P. Glutamate-induced neuronal death: a succession of necrosis or apoptosis depending on mitochondrial function. Neuron 1995, 15, 961-73.

[Anglade et al., 1997] Anglade P, Vyas S, Javoy-Agid F, Herrero MT, Michel PP, Marquez J, Mouatt-Prigent A, Ruberg M, Hirsch EC and Agid Y. Apoptosis and autophagy in nigral neurons of patients with Parkinson's disease. Histol Histopathol 1997, 12, 25-31.

[Antonini et al., 1997] Antonini A, Schwarz J, Oertel WH, Pogarell O and Leenders KL. Longterm changes of striatal dopamine D_2 receptors in patients with Parkinson's disease: a study with positron emission tomography and [11C]raclopride. Mov Disord 1997, 12, 33-8.

[Arai et al., 1986] Arai Y, Kinemuchi H, Hamamichi N, Satoh N, Tadano T and Kisara K. Inhibition of rat brain monoamine oxidase by some analogues of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine and 1-methyl-4-phenylpyridinium ion. Neurosci Lett 1986, 66, 43-8.

[Assal et al., 1998] Assal F, Spahr L, Hadengue A, Rubbia-Brandt L, Burkhard PR and Rubbici-Brandt L. Tolcapone and fulminant hepatitis. Lancet 1998, 352, 958.

[Aubin et al., 1998] Aubin N, Curet O, Deffois A and Carter C. Aspirin and salicylate protect against MPTP-induced dopamine depletion in mice. J Neurochem 1998, 71, 1635-42.

[Aziz et al., 1991] Aziz TZ, Peggs D, Sambrook MA, Crossman AR. Lesion of the subthalamic nucleus for the alleviation of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP)-induced parkinsonism in the primate. Mov Disord 1991, 6, 288-92.

[Aziz et al., 1992] Aziz TZ, Peggs D, Agarwal E, Sambrook MA, Crossman AR. Subthalamic nucleotomy alleviates parkinsonism in the 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP)-exposed primate. Br J Neurosurg 1992, 6, 575-82.

[Backhauss und Krieglstein, 1992] Backhauss C and Krieglstein J. Extract of kava (Piper methysticum) and its methysticin constituents protect brain tissue against ischemic damage in rodents. Eur J Pharmacol 1992, 125, 265-269.

[Balkwill, 1993] Balkwill F. Cytokines in health and disease. Immunol Today 1993, 14, 149-50.

[Banati et al., 1993] Banati RB, Gehrmann J, Schubert P and Kreutzberg GW. Cytotoxicity of microglia. Glia 1993, 7, 111-8.

[Barger et al., 1995] Barger SW, Horster D, Furukawa K, Goodman Y, Krieglstein J and Mattson MP. Tumor necrosis factors α and β protect neurons against amyloid beta-peptide toxicity: evidence for involvement of a κB-binding factor and attenuation of peroxide and Ca^{2+} accumulation. Proc Natl Acad Sci USA 1995, 92, 9328-32.

[Baron et al., 2000] Baron MS, Vitek JL, Bakay RA, Green J, McDonald WM, Cole SA and DeLong MR. Treatment of advanced Parkinson's disease by unilateral posterior GPi pallidotomy: 4-year results of a pilot study. Mov Disord 2000, 15, 230-7.

[Baum et al., 1998] Baum SS, Hill R and Rommelspacher H. Effect of kava extract and individual kavapyrones on neurotransmitter levels in the nucleus accumbens of rats. Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry 1998, 22, 1105-20.

[Beal, 1992] Beal MF. Mechanisms of excitotoxicity in neurologic diseases. FASEB J 1992, 6, 3338-44.

[Beal, 1998] Beal MF. Excitotoxicity and nitric oxide in Parkinson's disease pathogenesis. Ann Neurol 1998, 44, 110-4.

[Beal et al., 1993] Beal MF, Hyman BT and Koroshetz W. Do defects in mitochondrial energy metabolism underlie the pathology of neurodegenerative diseases? Trends Neurosci 1993, 16, 125-31.

[Beal et al., 1995] Beal MF, Ferrante RJ, Henshaw R, Matthews RT, Chan PH, Kowall NW, Epstein CJ and Schulz JB. 3-Nitropropionic acid neurotoxicity is attenuated in copper/zinc superoxide dismutase transgenic mice. J Neurochem 1995, 65, 919-22.

[Beal, 2001] Beal MF. Experimental models of Parkinson's disease. Nat Rev Neurosci 2001, 2, 325-34.

[Beckmann et al., 1990] Beckman JS, Beckman TW, Chen J, Marshall PA and Freeman BA. Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide. Proc Natl Acad Sci USA 1990, 87, 1620-4.

[Beckmann und Koppenol, 1996] Beckman JS and Koppenol WH. Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and ugly. Am J Physiol 1996, 271, 1424-37.

[Benabid et al., 1991] Benabid AL, Pollak P, Gervason C, Hoffmann D, Gao DM, Hommel M, Perret JE and de Rougemont J. Long-term suppression of tremor by chronic stimulation of the ventral intermediate thalamic nucleus. Lancet 1991, 337, 403-6.

[Benazzouz et al., 2000] Benazzouz A, Gao DM, Ni ZG, Piallat B, Bouali-Benazzouz and Benabid AL. Effect of high-frequency stimulation of the subthalamic nucleus on the neuronal activities of the substantia nigra pars reticulata and ventrolateral nucleus of the thalamus in the rat. Neurosci 2000, 99, 289-295.

[Benveniste und Diemer, 1987] Benveniste H and Diemer H. Cellular reactions to implantation of a microdialysis tube in the rat hippocampus. Acta Neuropathol 1987, 43, 1207-17.

[Benveniste et al., 1987] Benveniste H, Drejer I, Schousboe A and Diemer NH. Regional cerebral glucose phosphorylation and blood flow after insertion of a microdialysis fiber through the dorsal hippocampus in the rat. J Neurochem 1987, 49, 729-34.

[Benveniste und Hüttemeier, 1990] Benveniste H and Hüttemeier PC. Microdialysis: theory and application. Prog Neurobiol 1990, 35, 195-215.

[Berger et al., 1991] Berger K, Przedborski S and Cadet JL. Retrograde degeneration of nigrostriatal neurons induced by intrastriatal 6-hydroxydopamine injection in rats. Brain Res Bull 1991, 26, 301-7.

[Bergmann et al., 1990] Bergmann M, Schmidtke K, Danek A, Gullotta F and Mehraein P. Striato-nigral degeneration (SND): a multisystem atrophy? Schweiz Arch Neurol Psychiatr 1990, 141, 389-405.

[Bernheimer et al., 1973] Bernheimer H, Birkmayer W, Hornykiewicz O, Jellinger K and Seitelberger F. Brain dopamine and the syndromes of Parkinson and Huntington. Clinical, morphological and neurochemical correlations. J Neurol Sci 1973, 20, 415-55.

[Berridge und Tan, 1993] Berridge MV and Tan AS. Characterization of the cellular reduction of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT): subcellular localization, substrate dependence, and involvement of mitochondrial electron transport in MTT reduction. Arch Biochem Biophys 1993, 303, 474-82.

[Betarbet et al., 2000] Betarbet R, Sherer TB, MacKenzie G, Garcia-Osuna M, Panov AV and Greenamyre JT. Chronic systemic pesticide exposure reproduces features of Parkinson's disease. Nat Neurosci 2000, 3, 1301-6.

[Bezard et al., 1997] Bezard E, Imbert C, Deloire X, Bioulac B and Gross CE. A chronic MPTP model reproducing the slow evolution of Parkinson's disease: evolution of motor symptoms in the monkey. Brain Res 1997, 766, 107-12.

[Bezard et al., 1998] Bezard E, Stutzmann JM, Imbert C, Boraud T, Boireau A and Gross CE. Riluzole delayed appearance of parkinsonian motor abnormalities in a chronic MPTP monkey model. Eur J Pharmacol 1998, 356, 101-04.

[Blanchet et al., 1993] Blanchet P, Bédard PJ, Britton DR and Kebabian JW. Differential effect of selective D_1 and D_2 dopamine receptor agonists on levodopa-induced dyskinesia in 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-exposed monkeys. J Pharmacol Exp Ther 1993, 267, 275-9.

[Blandini et al., 1997] Blandini F, Garcia-Osuna M and Greenamyre JT. Subthalamic ablation reverses changes in basal ganglia oxidative metabolism and motor response to apomorphine induced by nigrostriatal lesion in rats. Eur J Neurosci 1997, 9, 1407-13.

[Blandini et al., 2000] Blandini F, Nappi G, Tassorelli C and Martignoni E. Functional changes of the basal ganglia circuitry in Parkinson's disease. Prog Neurobiol 2000, 62, 63-88.

[Blandini und Greenamyre, 1998] Blandini F and Greenamyre JT. Prospects of glutamate antagonists in the therapy of Parkinson's disease. Fundam Clin Pharmacol 1998, 12, 4-12.

[Blaustein, 1975] Blaustein MP. Effects of K^+, veratridine and scorpion venom on calcium accumulation and transmitter release by nerve terminals *in-vitro*. J Physiol 1975, 247, 617-55.

[Blin et al., 1988] Blin J, Bonnet AM and Agid Y. Does levodopa aggravate Parkinson's disease? Neurology 1988, 38, 1410-6.

[Blum-Degen et al., 1995] Blum-Degen D, Muller T, Kuhn W, Gerlach M, Przuntek H and Riederer P. Interleukin-1 beta and interleukin-6 are elevated in the cerebrospinal fluid of Alzheimer's and de novo Parkinson's disease patients. Neurosci Lett 1995, 202, 17-20.

[Boada et al., 2000] Boada J, Cutillas B, Roig T, Bermudez J and Ambrosio S. MPP^+-induced mitochondrial dysfunction is potentiated by dopamine. Biochem Biophys Res Commun 2000, 268, 916-20.

[Boireau et al., 1994] Boireau A, Dubedat P, Bordier F, Peny C, Miquet JM, Durand G, Meunier M and Doble A. Riluzole and experimental parkinsonism: antagonism of MPTP-induced decrease in central dopamine levels in mice. NeuroReport 1994, 5, 2657-60.

[Boismenu et al., 1996] Boismenu D, Mamer O, Ste-Marie L, Vachon L and Montgomery J. *In-vivo* hydroxylation of the neurotoxin, 1-methyl-4-phenylpyridinium, and the effect of monoamine oxidase inhibitors: electrospray-MS analysis of intra-striatal microdialysates. J Mass Spectrom 1996, 31, 1101-8.

[Boka et al., 1994] Boka G, Anglade P, Wallach D, Javoy-Agid F, Agid Y and Hirsch EC. Immunocytochemical analysis of tumor necrosis factor and its receptors in Parkinson's disease. Neurosci Lett 1994, 172, 151-4.

[Boonen et al., 1998] Boonen G, Ferger B, Kuschinsky K and Häberlein H. *in-vivo* effects of the kavapyrones (+)-dihydromethysticin and (±)-kavain on dopamine, 3,4-dihydroxyphenylacetic acid, serotonin and 5-hydroxyindoleacetic acid levels in striatal and cortical brain regions. Planta Med 1998, 64, 507-10.

[Boulton und Huebert, 1981] Boulton AA and Huebert ND. Biosynthesis of some urinary trace amines in the rat brain and the human. Res Commun Chem Pathol Pharmacol 1981, 34, 295-310.

[Bowie und O'Neill, 2000] Bowie AG and O'Neill LA. Vitamin C inhibits NF-κB activation by TNF via the activation of p38 mitogen-activated protein kinase. J Immunol 2000, 165, 7180-8.

[Bowling und Beal, 1995] Bowling AC and Beal MF. Bioenergetic and oxidative stress in neurodegenerative diseases. Life Sci 1995, 56, 1151-71.

[Boyce et al., 1984] Boyce S, Kelly E, Reavill C, Jenner P and Marsden CD. Repeated administration of N-methyl-4-phenyl-1,2,5,6-tetrahydropyridine to rats is not toxic to striatal dopamine neurons. Biochem Pharmacol 1984, 33, 1747-52.

[Braak et al., 1995] Braak H, Braak E, Yilmazer D, Schultz C, de Vos RA and Jansen EN. Nigral and extranigral pathology in Parkinson's disease. J Neural Transm Suppl 1995, 46, 15-31.

[Braak et al., 1998] Braak H, de Vos RA, Jansen EN, Bratzke H and Braak E. Neuropathological hallmarks of Alzheimer's and Parkinson's diseases. Prog Brain Res 1998, 117, 267-85.

[Bredt und Snyder, 1994] Bredt DS and Snyder SH. Nitric oxide: a physiologic messenger molecule. Annu Rev Biochem 1994, 63, 175-95.

[Browne et al., 1999] Browne SE, Ferrante RJ and Beal MF. Oxidative stress in Huntington's disease. Brain Pathol 1999, 9 (1), 147-63.

[Bruet et al., 2001] Bruet N, Windels F, Bertrand A, Feuerstein C, Poupard A and Savasta M. High frequency stimulation of the subthalamic nucleus increases the extracellular contents of striatal dopamine in normal and partially dopaminergic denervated rats. J Neuropathol Exp Neurol 2001, 60, 15-24.

[Bruyn et al., 1979] Bruyn GW, Bots GTAM and Dom R. Huntington's chorea: current neuropathological status. Adv Neurol 1979, 23, 83-93.

[Cadet et al., 1991] Cadet JL, Last R, Kostic V, Przedborski S and Jackson-Lewis V. Long-term behavioral and biochemical effects of 6-hydroxydopamine injections in rat caudate-putamen. Brain Res Bull 1991, 26, 707-13.

[Cadet und Brannock, 1998] Cadet JL and Brannock C. Free radicals and the pathobiology of brain dopamine systems. Neurochem Int 1998, 32, 117-31.

[Calne et al., 1986] Calne DB, Eisen A, McGeer E and Spancer. Alzheimer's disease, Parkinson's disease and motor neurone disease: abiotrophic interaction between aging and environment? Lancet 1986, 8, 1067-70.

[Camp et al., 2000] Camp DM, Loeffler DA and LeWitt PA. *L*-DOPA does not enhance hydroxyl radical formation in the nigrostriatal dopamine system of rats with a unilateral 6-hydroxydopamine lesion. J Neurochem 2000, 74, 1229-40.

[Camp und Robinson, 1992] Camp DM and Robinson TE. On the use of multiple probe insertions at the same site for repeated intracerebral microdialysis experiments in the nigrostriatal dopamine system of rats. J Neurochem 1992, 58, 1706-15.

[Campbell et al., 1993] Campbell IL, Abraham CR, Masliah E, Kemper P, Inglis JD, Oldstone MB and Mucke L. Neurologic disease induced in transgenic mice by cerebral overexpression of interleukin 6. Proc Natl Acad Sci USA 1993, 90, 10061-5.

[Carboni et al., 1990] Carboni S, Melis F, Pani L, Hadjiconstantinou M and Rossett ZL. The non-competitive NMDA-receptor antagonist MK-801 prevents the massive release of glutamate and aspartate from rat striatum induced by 1-methyl-4-phenylpyridinium (MPP^+). Neurosci Lett 1990, 117, 129-33.

[Carr und Frei, 1999] Carr A and Frei B. Does vitamin C act as a pro-oxidant under physiological conditions? FASEB J 1999, 13, 1007-24.

[Cassarino et al., 1998] Cassarino DS, Fall CP, Smith TS and Bennett JP Jr. Pramipexole reduces reactive oxygen species production *in-vivo* and *in-vitro* and inhibits the mitochondrial permeability transition produced by the parkinsonian neurotoxin methylpyridinium ion. J Neurochem 1998, 71, 348-51.

[Castalogni et al., 1997] Castagnoli K, Palmer S, Anderson A, Bueters T and Castagnoli N Jr. The neuronal nitric oxide synthase inhibitor 7-nitroindazole also inhibits the monoamine oxidase-B-catalyzed oxidation of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine. Chem Res Toxicol 1997, 10, 364-8.

[Cathcart, 1985] Cathcart RF 3rd. Vitamin C: the nontoxic, nonrate-limited, antioxidant free radical scavenger. Med Hypotheses 1985, 18, 61-77.

[Ceballos et al., 1990] Ceballos I, Lafon M and Javoy-Agid F. Superoxide dismutase and Parkinson's disease. Lancet 1990, 335, 1035-6.

[Chan et al., 1991] Chan P, DeLanney LE, Irwin I, Langston JW and Di Monte DA. Rapid ATP loss caused by 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine in mouse brain. J Neurochem 1991, 57, 348-51.

[Chan et al., 1992] Chan P, DeLanney LE, Irwin I, Langston JW and Di Monte DA. MPTP-induced ATP loss in mouse brain. Ann NY Acad Sci 1992, 648, 306-308.

[Chao et al., 1996] Chao CC, Lokensgard JR, Sheng WS, Hu S and Peterson PK. IL-1-induced iNOS expression in human astrocytes via NF-κB. Neuroreport 1997, 8, 3163-6.

[Checkoway und Nelson, 1999] Checkoway H and Nelson LM. Epidemiologic approaches to the study of Parkinson's disease etiology. Epidemiology 1999, 10, 327-36.

[Chegui et al., 1994] Chergui K, Akaoka H, Charletly PJ, Saunier CF, Buda M and Chouvet G. Subthalamic nucleus modulates burst firing of nigral dopamine neurons via NMDA receptors. Neuroreport 1994, 5, 1185-8.

[Chen und Kandasamy, 1996] Chen HAT and Kandasamy SB. Effect of chloral hydrate on *in-vivo* KCl-induced striatal dopamine release in the rat. Neurochem Res 1996, 21, 695-700.

[Cheng et al., 1996] Cheng N, Maeda T, Kume T, Kaneko S, Kochiyama H, Akaike A, Goshima Y and Misu Y. Differential neurotoxicity induced by *L*-DOPA and dopamine in cultured striatal neurons. Brain Res 1996, 743, 278-83.

[Chiba et al., 1984] Chiba K, Trevor AJ and Castagnoli N Jr. Metabolism of the neurotoxic tertiary amine, MPTP, by brain monoamine oxidase. Biochem Biophys Res Commun 1984, 120, 574-8.

[Chiba et al., 1985] Chiba K, Trevor AJ and Castagnoli N Jr. Active uptake of MPP^+, a metabolite of MPTP, by brain synaptosomes. Biochem Biophys Res Commun 1985, 128, 1229-32.

[Chiueh et al., 1993] Chiueh CC, Murphy DL, Miyake H, Lang K, Tulsi PK and Huang SJ. Hydroxyl free radical (°OH) formation reflected by salicylate hydroxylation and neuromelanin. *In-vivo* markers for oxidant injury of nigral neurons. Ann N Y Acad Sci 1993, 679, 370-5.

[Chiueh et al., 1994] Chiueh CC, Wu RM, Mohanakumar KP, Sternberger LM, Krishna G, Obata T and Murphy DL. *In-vivo* generation of hydroxyl radicals and MPTP-induced dopaminergic toxicity in the basal ganglia. Ann N Y Acad Sci 1994, 738, 25-36.

[Clapp-Lilly et al., 1999] Clapp-Lilly KL, Roberts RC, Duffy LK, Irons KP, Hu Y and Drew KL. An ultrastructural analysis of tissue surrounding a microdialysis probe. J of Neurosci Meth 1999, 90, 129-42.

[Cleeter et al., 1992] Cleeter MW, Cooper JM and Schapira AH. Irreversible inhibition of mitochondrial complex I by 1-methyl-4-phenylpyridinium: evidence for free radical involvement. J Neurochem 1992, 58, 786-89.

[Cleeter et al., 1994] Cleeter MW, Cooper JM, Darley-Usmar VM, Moncada S and Schapira AH. Reversible inhibition of cytochrome c oxidase, the terminal enzyme of the mitochondrial respiratory chain, by nitric oxide. Implications for neurodegenerative diseases. FEBS Lett 1994, 345, 50-4.

[Cohen, 1983] Cohen G. The pathobiology of Parkinson's disease: biochemical aspects of dopamine neuron senescence. J Neural Transm Suppl 1983, 19, 89-103.

[Cohen und Heikkila, 1974] Cohen G, Heikkila RE. The generation of hydrogen peroxide, superoxide radical, and hydroxyl radical by 6-hydroxydopamine, dialuric acid, and related cytotoxic agents. J Biol Chem 1974, 249, 2447-52.

[Cohen und Kesler, 1999] Cohen G and Kesler N. Monoamine oxidase and mitochondrial respiration. J Neurochem 1999, 73, 2310-5.

[Colotla et al., 1990] Colotla VA, Flores E, Oscos A, Meneses A and Tapia R. Effects of MPTP on locomotor activity in mice. Neurotoxicol Teratol 1990, 12, 405-7.

[Connor et al., 1995] Connor JR, Snyder BS, Arosio P, Löffler DA and LeWatt P. A quantative analysis of isoferritins in select regions of aged parkinsonian and Alzheimer's diseased brains. J Neurochem 1995, 65, 717-21.

[Cornford et al., 1995] Cornford ME, Chang L and Miller BL. The neuropathology of parkinsonism: an overview. Brain Cogn 1995, 28, 321-41.

[Cosi et al., 1996] Cosi C, Colpaert F, Koek W, Degryse A and Marien M. Poly(ADP-ribose) polymerase inhibitors protect against MPTP-induced depletions of striatal dopamine and cortical noradrenaline in C57Bl/6 mice. Brain Res 1996, 729, 264-9.

[Costa et al., 1972] Costa E, Groppetti A and Naimzada MK. Effects of amphetamine on the turnover rate of brain catecholamines and motor activity. Br J Pharmacol 1972, 44, 742-51.

[Coyle und Puttfarcken, 1993] Coyle JT and Puttfarcken P. Oxidative stress, glutamate, and neurodegenerative disorders. Science 1993, 262, 689-95.

[Cruz-Sanchez et al., 1997] Cruz-Sanchez FF, Cardozo A, Castejon C, Tolosa E and Rossi ML. Aging and the nigro-striatal pathway. J Neural Transm Suppl 1997, 51, 9-25.

[Cummings, 1999] Cummings JL. Understanding Parkinson's disease. JAMA 1999, 281, 376-8.

[Czlonkowska et al., 1996] Czlonkowska A, Kohutnicka M, Kurkowska-Jastrzebska I and Czlonkowski A. Microglial reaction in MPTP (1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine) induced Parkinson's disease mice model. Neurodegeneration 1996, 5, 137-43.

[Damsma et al., 1990] Damsma G, de Boer P, Westerink BH and Fibiger HC. Dopaminergic regulation of striatal cholinergic interneurons: an *in-vivo* microdialysis study. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol 1990, 342, 523-7.

[Dawson et al., 1991] Dawson TM, Bredt DS, Fotuhi M, Hwang PM and Snyder SH. Nitric oxide synthase and neuronal NADPH diaphorase are identical in brain and peripheral tissues. Proc Natl Acad Sci USA 1991, 88, 7797-801.

[Deacon et al., 1997] Deacon T, Schumacher J, Dinsmore J, Thomas C, Palmer P, Kott S, Edge A, Penney D, Kassissieh S, Dempsey P and Isacson O. Histological evidence of fetal pig neural cell survival after transplantation into a patient with Parkinson's disease. Nat Med 1997, 3, 350-3.

[De La Cruz et al., 1996] De La Cruz CP, Revilla E, Venero JL, Ayala A, Cano J and Machado A. Oxidative inactivation of tyrosine hydroxylase in substantia nigra of aged rat. Free Radic Biol Med 1996, 20, 53-61.

[DeBoer et al., 1990] DeBoer P, Damsma G, Fibiger HC, Timmermann W, DeVries JB and Westerink BHC. Dopaminergic-cholinergic interactions in the striatum: the critical significance of calcium concentrations in brain microdialysis. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol 1990, 342, 528-34.

[Decker et al., 1993] Decker DE, Althaus JS, Buxser SE, VonVoigtlander PF and Ruppel PL. Competitive irreversible inhibition of dopamine uptake by 6-hydroxydopamine. Res Commun Chem Pathol Pharmacol 1993, 79, 195-208.

[DeLong, 1990] DeLong MR. Primate models of movement disorders of basal ganglia origin. Trends Neurosci 1990, 13, 281-5.

[Dexter et al., 1987] Dexter DT, Wells FR, Agid F, Agid Y, Lees AJ, Jenner P and Marsden CD. Increased nigral iron content in postmortem parkinsonian brain. Lancet 1987, 2, 1219-20.

[Dexter et al., 1991] Dexter DT, Carayon A and Agid JF. Alterations in the levels of iron, ferritin and other trace metals in Parkinson's disease and other neurodegenerating diseases affecting the basal ganglia. Brain 1991, 114, 1953-75.

[Di Chiara, 1990] Di Chiara G. *In-vivo* brain dialysis of neurotransmitters. Trends Pharmacol Sci 1990, 11, 1990.

[Di Monte, 1991] Di Monte DA. Mitochondrial DNA and Parkinson's disease. Neurology 1991, 41, 38-42.

[Dluzen et al., 1996] Dluzen DE, McDermott JL and Liu B. Estrogen alters MPTP-induced neurotoxicity in female mice: effects on striatal dopamine concentrations and release. J Neurochem 1996, 66, 658-66.

[Doucet et al., 1986] Doucet G, Descarries L and Garcia S. Quantification of the dopamine innervation in adult rat striatum. Neurosci 1986, 19, 427-45.

[Dunnett und Björklund, 1999] Dunnett SB, Bjorklund A. Prospects for new restorative and neuroprotective treatments in Parkinson's disease. Nature 1999, 399 Suppl, 32-9.

[Drouet et al., 1997] Drouet I, Suaudeau C, Dourmap N and Costentin J. Mechanism of the hypothermic effect of MPP^+ administered centrally in mice. Neuropharmacology 1997, 36, 993-7.

[Ehringer und Hornykiewicz, 1960] Ehringer H und Hornykiewicz O. Verteilung von Noradrenalin und Dopamin (3-Hydroxytyramin) im Gehirn des Menschen und ihr Verhalten bei Erkrankungen des extrapyramidalen Systems. Klin Wochenschr 1960, 38, 1236-9.

[Elizan et al., 1989] Elizan TS, Yahr MD, Moros DA, Mendoza MR, Pang S and Bodian CA. Selegiline as an adjunct to conventional levodopa therapy in Parkinson's disease. Experience with this type B monoamine oxidase inhibitor in 200 patients. Arch Neurol 1989, 46, 1280-3.

[Elmquist und Sawchuk, 1997] Elmquist WF and Sawchuk RJ. Application of microdialysis in pharmacokinetic studies. Pharmaceutical Research 1997, 14, 267-88.

[Erickson et al., 1992] Erickson JD, Eiden LE and Hoffman BJ. Expression cloning of a reserpine-sensitive vesicular monoamine transporter. Proc Natl Acad Sci USA, 1992, 89, 10993-7.

[Errea und Ara, 1999] Errea JM and Ara JR. Depression and Parkinson's disease. Rev Neurol 1999, 28, 694-8.

[Espino et al., 1996] Espino A, Llorens J, Calopa M, Bartrons R, Rodriguez-Farre E and Ambrosio S. Cerebrospinal dopamine metabolites in rats after intrastriatal administration of 6-hydroxydopamine or 1-methyl-4-phenylpyridinium ion. Brain Res 1995, 669, 19-25.

[Fahn, 1988] Fahn S. Concept and classification of dystonia. Adv Neurol 1988, 50, 1-8.

[Fahn, 1999] Fahn S. Parkinson disease, the effect of levodopa, and the ELLDOPA trial. Earlier vs later *L*-DOPA. Arch Neurol 1999, 56, 529-35.

[Fairbrother et al., 1990] Fairbrother IS, Arbuthnott GW, Kelly JS and Butcher SP. *In-vivo* mechanisms underlying dopamine release from rat nigro-striatal terminals: II. Studies using potassium and tyramine. J Neurochem 1990, 6, 1844-51.

[Fattori et al., 1995] Fattori E, Lazzaro D, Musiani P, Modesti A, Alonzi T and Ciliberto G. IL-6 expression in neurons of transgenic mice causes reactive astrocytosis and increase in ramified microglial cells but no neuronal damage. Eur J Neurosci 1995, 7, 2441-9.

[Feany und Bender, 2000] Feany MB and Bender WW. A Drosophila model of Parkinson's disease. Nature 2000, 404, 394-8.

[Felder et al., 1991] Felder CC, Williams HL and Axelrod J. A transduction pathway associated with receptors coupled to the inhibitory guanine nucleotide binding protein Gi that amplifies ATP-mediated arachidonic acid release. Proc Natl Acad Sci USA 1991, 88, 6477-80.

[Ferger et al., 1998*a*] Ferger B, van Amsterdam C, Seyfried C and Kuschinsky K. Effects of α-phenyl-tert-butylnitrone and selegiline on hydroxyl free radicals in rat striatum produced by local application of glutamate. J Neurochem 1998*a,* 70, 276-80.

[Ferger et al., 1998*b*] Ferger B, Boonen G, Häberlein H and Kuschinsky K. *In-vivo* microdialysis study of (±)-kavain on veratridine-induced glutamate release. Eur J Pharmacol 1998*b*, 347, 211-4.

[Ferger et al., 1999*a*] Ferger B, Teismann P, Earl CD, Kuschinsky K and Oertel WH. Salicylate protects against MPTP-induced impairments in dopaminergic neurotransmission at the striatal and nigral level in mice. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol 1999*a*, 360, 256-61.

[Ferger et al., 1999*b*] Ferger B, Eberhardt O, Teismann P, de Groote C and Schulz JB. Malonate-induced generation of reactive oxygen species in rat striatum depends on dopamine release but not on NMDA-receptor activation. J Neurochem 1999*b,* 73, 1329-32.

[Ferger et al., 2000*a*] Ferger B, Teismann P and Mierau J. The dopamine agonist pramipexole scavenges hydroxyl free radicals induced by striatal application of 6-hydroxydopamine in rats: an *in-vivo* microdialysis study. Brain Res 2000*a,* 883, 216-23.

[Ferger et al., 2000*b*] Ferger B, Teismann P, Earl CD, Kuschinsky K and Oertel WH. The protective effects of PBN against MPTP toxicity are independent of hydroxyl radical trapping. Pharmacol Biochem Behav, 2000*b,* 65, 425-31.

[Ferger et al., 2001*a*] Ferger B, Themann C, Rose S, Halliwell B and Jenner P. 6-hydroxydopamine increases the hydroxylation and nitration of phenylalanine *in-vivo*: implication of peroxynitrite formation. J Neurochem 2001*a*, 78, 509-14.

[Ferger et al., 2001*b*] Ferger B, Leng A, Mura A, Bahr N and Feldon J. Tumor necrosis factor (TNF) deficient mice are protected against functional impairments in the acute model of Parkinson's disease. Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol 364, Suppl R4.

[Filipkowski et al., 1994] Filipkowski RK, Hetman M, Kaminska B and Kaczmarek L. DNA fragmentation in rat brain after intraperitoneal administration of kainate. Neuroreport 1994, 5, 1538-40.

[Fine et al., 1996] Fine SM, Angel RA, Perry SW, Epstein LG, Rothstein JD, Dewhurst S and Gelbard HA. Tumor necrosis factor α inhibits glutamate uptake by primary human astrocytes. Implications for pathogenesis of HIV-1 dementia. J Biol Chem 1996, 271, 15303-6.

[Foley und Riederer, 1999] Foley P and Riederer P. Pathogenesis and preclinical course of Parkinson's disease. J Neural Transm Suppl 1999, 56, 31-74.

[Fornai et al., 1999] Fornai F, Chen K, Giorgi FS, Gesi M, Alessandri MG and Shih JC. Striatal dopamine metabolism in monoamine oxidase B-deficient mice: a brain dialysis study. J Neurochem 1999, 73, 2434-2440.

[Forno, 1996] Forno LS. Neuropathology of Parkinson's disease. J Neuropathol Exp Neurol 1996, 55, 259-72.

[Franklin und Paxinos, 1997] Franklin KBJ and Paxinos G. The mouse brain in stereotaxic coordinates. New York: Akademic Press 1997.

[Fridovich, 1986] Fridovich I. Biological effects of the superoxide radical. Arch Bichem Biophys 1986, 247, 1-11.

[Frei et al., 1989] Frei K, Malipiero UV, Leist TP, Zinkernagel RM, Schwab ME and Fontana A. On the cellular source and function of interleukin 6 produced in the central nervous system in viral diseases. Eur J Immunol 1989, 19, 689-94.

[Fry und Green, 1981] Fry M and Green DE. Cardiolipin requirement for electron transfer in complex I and III of the mitochondrial respiratory chain. J Biol Chem 1981, 256, 1874-80.

[Gai et al., 1995] Gai WP, Blessing WW and Blumbergs PC. Ubiquitin-positive degenerating neurites in the brainstem in Parkinson's disease. Brain 1995, 118, 1447-59.

[Gainetdinov et al., 1997] Gainetdinov RR, Fumagalli F, Jones SR and Caron MG. Dopamine transporter is required for *in-vivo* MPTP neurotoxicity: evidence from mice lacking the transporter. J Neurochem 1997, 69, 1322-5.

[Gainetdinov et al., 1998] Gainetdinov RR, Fumagalli F, Wang YM, Jones SR, Levey AI, Miller GW and Caron MG. Increased MPTP neurotoxicity in vesicular monoamine transporter 2 heterozygote knockout mice. J Neurochem 1998, 70, 1973-8.

[Garside et al., 1992] Garside S, Weiss S and Mazurek M F. Comparative effects of D_1 an D_2 dopamine agonists on somatostatin and neuropeptide Y release in cultured striatal neurons. Soc Neurosci Abstr 1992, 18, 851.

[Gary et al., 1998] Gary DS, Bruce-Keller AJ, Kindy MS and Mattson MP. Ischemic and excitotoxic brain injury is enhanced in mice lacking the p55 tumor necrosis factor receptor. J Cereb Blood Flow Metab 1998, 18, 1283-7.

[Gaspar, 1994] Gaspar P. Anatomy of the noradrenergic pathways in the primate brain: alteration in Parkinson's disease. In: Noradrenergic mechanisms in Parkinson's disease, Marien M, Briley M (eds), Boca Raton: CRC Press, 1994, 74-88.

[Georgieva et al., 1993] Georgieva J, Luthman J, Mohringe B and Magnusson O. Tissue and microdialysate changes after repeated and permanent probe implantation in the striatum of freely moving rats. Brain Res Bull 1993, 31, 463-70.

[Gerlach et al., 1991] Gerlach M, Riederer P, Przuntek H and Youdim MBH. MPTP mechanisms of neurotoxicity and their implication for Parkinson's disease. Eur J Pharmacol Mol Pharmacol Sect 1991, 208, 279-86.

[Gerlach et al., 1994] Gerlach M, Ben-Shachar D, Riederer P and Youdim MB. Altered brain metabolism of iron as a cause of neurodegenerative diseases? J Neurochem 1994, 63, 793-807.

[Gerfen et al., 1995] Gerfen CR, Keefe KA and Gauda EB. D_1- and D_2-dopamine receptors on separate populations of neurons result in potentiated immediate early gene response in D_1-containing neurons. J Neurosci 1995, 15, 8167-76.

[Gerlach et al., 1996] Gerlach M, Riederer P and Vogt H. Effect of adding selegeline to levodopa in early, mild Parkinson's disease. "On treatment" rather than intention to treat analysis should have been used. BMJ 1996, 312, 704-5.

[Gerlach et al., 2001] Gerlach M, Xiao AY, Kuhn W, Lehnfeld R, Waldmeier P, Sontag KH and Riederer P. The central catechol-O-methyltransferase inhibitor tolcapone increases striatal hydroxyl radical production in *L*-DOPA/carbidopa treated rats. J Neural Transm 2001, 108, 189-204.

[Gerlach und Riederer, 1996] Gerlach M and Riederer P. Animal models of Parkinson's disease: an empirical comparison with phenomenology of the disease in man. J Neural Transm 1996, 103, 987-1041.

[Giasson et al., 2000] Giasson BI, Jakes R, Goedert M, Duda JE, Leight S, Trojanowski JQ and Lee VM. A panel of epitope-specific antibodies detects protein domains distributed throughout human α-synuclein in Lewy bodies of Parkinson's disease. J Neurosci Res 2000, 59, 528-33.

[Giovanni et al., 1991] Giovanni A, Sieber BA, Heikkila RE and Sonsalla PK. Correlation between the neostriatal content of the 1-methyl-4-phenylpyridinium species and dopaminergic neurotoxicity following 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine administration to several strains of mice. J Pharmacol Exp Ther 1991, 257, 691-7.

[Giovanni et al., 1994] Giovanni A, Sieber BA, Heikkila RE and Sonsalla PK. Studies on species sensitivity to the dopaminergic neurotoxin 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine. Part 1: Systemic administration. J Pharmacol Exp Ther 1994, 270, 1000-7.

[Giulian et al., 1993] Giulian D, Vaca K and Corpuz M. Brain glia release factors with opposing actions upon neuronal survival. J Neurosci 1993, 13, 29-37.

[Gleitz et al., 1995] Gleitz J, Beile A and Peters T. (±)-Kavain inhibits veratridine-activated voltage-dependent Na^+-channels in synaptosomes prepared from rat cerebral cortex. Neuropharmacol 1995, 34, 1133-8.

[Gleitz et al., 1996] Gleitz J, Beile A, Peters T. (±)-Kavain inhibits the veratridine- and KCl-induced increase in intracellular Ca^{2+} and glutamate-release of rat cerebrocortical synaptosomes. Neuropharmacol 1996, 35, 179-86.

[Glinka und Youdim, 1995] Glinka Y and Youdim MB. Inhibition of mitochondrial complexes I and IV by 6-hydroxydopamine. Eur J Pharmacol 1995, 292, 329-32.

[Goedert et al., 1998*a*] Goedert M, Jakes R, Crowther RA, Hasegawa M, Smith MJ and Spillantini MG. Intraneuronal filamentous tau protein and α-synuclein deposits in neurodegenerative diseases. Biochem Soc Trans 1998*a*, 26, 463-71.

[Geodert et al., 1998*b*] Goedert M, Spillantini MG and Davies SW. Filamentous nerve cell inclusions in neurodegenerative diseases. Curr Opin Neurobio 1998*b*, 8, 619-32.

[Goetz et al., 1991] Goetz CG, Stebbins GT 3rd, Klawans HL, Koller WC, Grossman RG, Bakay RA and Penn RD. United Parkinson Foundation Neurotransplantation Registry on adrenal medullary transplants: presurgical, and 1- and 2-year follow-up. Neurology 1991, 41, 1719-22.

[Goetz, 1997] Goetz CG. New strategies with dopaminergic drugs: modified formulations of levodopa and novel agonists. Exp Neurol 1997, 144, 17-20.

[Golbe et al., 1990] Golbe LI, Di Iorio G, Bonavita V, Miller DC and Duvoisin RC. A large kindred with autosomal dominant Parkinson's disease. Ann Neurol 1990, 27, 276-82.

[Good et al., 1998] Good PF, Hsu A, Werner P, Perl DP and Olanow CW. Protein nitration in Parkinson's disease. J Neuropathol Exp Neurol 1998, 57, 338-42.

[Goodwin und Kite, 1998] Goodwin BL and Kite GC. Environmental MPTP as a factor in the aetiology of Parkinson's disease? J Neural Transm 1998, 105, 1265-9.

[Gottfries et al., 1969] Gottfries CG, Gottfries I and Roos BE. Homovanillic acid and 5-hydroxyindoleacetic acid in the cerebrospinal fluid of patients with senile dementia, presenile dementia and parkinsonism. J Neurochem 1969, 16, 1341-5.

[Graham, 1978] Graham DG. Oxidative pathways for catecholamines in the genesis of neuromelanin and cytotoxic quinones. Mol Pharmacol 1978, 14, 633-43.

[Greenamyre und Porter, 1994] Greenamyre JT and Porter RH. Anatomy and physiology of glutamate in the CNS. Neurology 1994, 44 Suppl, 7-13.

[Greene et al., 1993] Greene JG, Porter RH, Eller RV and Greenamyre JT. Inhibition of succinate dehydrogenase by malonic acid produces an "excitotoxic" lesion in rat striatum. J Neurochem 1993, 61, 1151-4.

[Groothius, 1998] Groothius DR, Ward S, Schlageter KE, Itskovich AC, Schwerin SC, Allen CV, Dills C and Levy RM. Changes in blood-brain barrier permeability associated with insertion of brain cannulas and microdialysis probes. Brain Res 1998, 803, 218-30.

[Grootveld und Halliwell, 1986] Grootveld M and Halliwell B. Aromatic hydroxylation as a potential measure of hydroxylradical formation *in-vivo*. Identification of hydroxylated derivatives of salicylate in human body fluids. J Biochem 1986, 237, 499-504.

[Groves, 1999] Groves JT. Peroxynitrite: reactive, invasive and enigmatic. Curr Opin Chem Biol 1999, 3, 226-35.

[Guan und McBride, 1987] Guan XM and McBride WJ. Effects of K^+-stimulation and precursor loading on the *in-vivo* release of dopamine, serotonin and their metabolites in the Nucleus Accumbens of the rat. Life Sci 1987, 40, 2579-86.

[Guridi et al., 1993] Guridi J, Luquin MR, Herrero MT and Obeso JA. The subthalamic nucleus: a possible target for stereotaxic surgery in Parkinson's disease. Mov Disord 1993, 8, 421-9.

[Haavik et al., 1997] Haavik J, Almas B and Flatmark T. Generation of reactive oxygen species by tyrosine hydroxylase: a possible contribution to degeneration of dopaminergic neurons? J Neurochem 1997, 68, 328-32.

[Hama et al., 1991] Hama T, Kushima Y, Miyamoto M, Kubota M, Takei N and Hatanaka H. Interleukin-6 improves the survival of mesencephalic catecholaminergic and septal cholinergic neurons from postnatal, two-week-old rats in cultures. Neuroscience 1991, 40, 445-52.

[Hammond et al., 1978] Hammond C, Deniau JM, Rizk A and Feger J. Electrophysiological demonstration of an excitatory subthalamonigral pathway in the rat. Brain Res 1978, 151, 235-44.

[Halliwell et al., 1989] Halliwell B, Grootveld M and Gutteridge JMC. Methods for the measurement of hxdroxyl radicals in biochemical systems: deoxyribose degradation and aromatic hydroxylation. Meth Biochem Analysis 1989, 33, 59-90.

[Halliwell, 1992] Halliwell B. Reactive oxygen species and the central nervous system. J Neurochem 1992, 59, 1609-23.

[Halliwell, 1996] Halliwell B. Vitamin C: antioxidant or pro-oxidant *in-vivo*? Free Radic Res 1996, 25, 439-54.

[Halliwell und Gutteridge, 1999] Halliwell B and Gutteridge JMC. Free radicals in biology and medicine. Oxford University Press, New York 1999.

[Halliwell und Kaur, 1997] Halliwell B and Kaur H. Hydroxylation of salicylate and phenylalanine as assays for hydroxyl radicals: a cautionary note visited for the third time. Free Radic Res 1997, 27, 239-44.

[Hantraye et al., 1996] Hantraye P, Brouillet E, Ferrante R, Palfi S, Dolan R, Matthews RT and Beal MF. Inhibition of neuronal nitric oxide synthase prevents MPTP-induced parkinsonism in baboons. Nature Med 1996, 2, 1017-21.

[Hastings et al., 1996] Hastings TG, Lewis DA and Zigmond MJ. Role of oxidation in the neurotoxic effects of intrastriatal dopamine injections. Proc Natl Acad Sci USA 1996, 93, 1956-61.

[Hartley et al., 1994] Hartley A, Stone JM, Heron C, Cooper JM and Schapira AH. Complex I inhibitors induce dose-dependent apoptosis in PC12 cells: relevance to Parkinson's disease. J Neurochem 1994, 63, 1987-90.

[Hauptmann et al., 1996] Hauptmann N, Grimsby J, Shih, JC and Cadenas E. The metabolism of tyramine by monoamine oxidase A/B causes oxidative damage to mitochondrial DNA. Arch Biochem Biophys 1996, 335, 295-304.

[Heikkila et al., 1984] Heikkila RE, Manzino L, Cabbat FS and Duvoisin RC. Protection against the dopaminergic neurotoxicity of 1-methyl-4-phenyl-1,2,5,6-tetrahydropyridine by monoamine oxidase inhibitors. Nature 1984, 311, 467-9.

[Heikkila et al., 1985] Heikkila RE, Hess A and Duvoisin RC. Dopaminergic neurotoxicity of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) in the mouse: relationships between monoamine oxidase, MPTP metabolism and neurotoxicity. Life Sci 1985, 36, 231-6.

[Henshaw et al., 1994] Henshaw R, Jenkins BG, Schulz JB, Ferrante RJ, Kowall NW, Rosen BR and Beal MF. Malonate produces striatal lesions by indirect NMDA receptor activation. Brain Res 1994, 647, 161-166.

[Heyser et al., 1997] Heyser CJ, Masliah E, Samimi A, Campbell IL and Gold LH. Progressive decline in avoidance learning paralleled by inflammatory neurodegeneration in transgenic mice expressing interleukin 6 in the brain. Proc Natl Acad Sci USA 1997, 94, 1500-5.

[Hirano et al., 1990] Hirano T, Akira S, Taga T and Kishimoto T. Biological and clinical aspects of interleukin 6. Immunol Today 1990, 11, 443-9.

[Hirsch, 1992] Hirsch EC. Why are nigral catecholaminergic neurons more vulnerable than other cells in Parkinson's disease. Ann Neurol 1992, 32 Suppl, 88-93.

[Hirsch et al., 1988] Hirsch EC, Graybiel AM and Agid YA. Melanized dopaminergic neurons are differentially susceptible to degeneration in Parkinson's disease. Nature 1988, 334, 345-8.

[Hoffmann et al., 1998] Hoffmann BJ, Hansson SR, Mezey E and Palkovits M. Localization and dynamic regulation of biogenic amine transporters in the mammilian central nervous system. Front Neuroendocrinol 1998, 19, 187-231.

[Hong et al., 1987] Hong M, Jenner P and Marsden CD. Comparison of the acute actions of amine-depleting drugs and dopamine receptor antagonists on dopamine function in the brain in rats. Neuropharmacology 1987, 26, 237-245.

[Horowski et al., 1995] Horowski R, Horowski L, Vogel S, Poewe W and Kielhorn FW. An essay on Wilhelm von Humboldt and the shaking palsy: first comprehensive description of Parkinson's disease by a patient. Neurology 1995, 45, 565-8.

[Huie und Padjama, 1993] Huie RE and Padmaja S. The reaction of NO with superoxide. Free Radic Res Commun 1993, 18, 195-199.

[Iacono et al., 1995] Iacono RP, Shima F, Lonser RR, Kuniyoshi S, Maeda G and Yamada S. The results, indications, and physiology of posteroventral pallidotomy for patients with Parkinson's disease. Neurosurgery 1995, 36, 1118-25.

[Iida et al., 1999] Iida M, Miyazaki I, Tanaka K, Kabuto H, Iwata-Ichikawa E and Ogawa N. Dopamine D2 receptor-mediated antioxidant and neuroprotective effects of ropinirole, a dopamine agonist. Brain Res 1999, 838, 51-9.

[Ikeda et al., 1992] Ikeda H, Markey CJ and Markey SP. Search for neurotoxins structurally related to 1-methyl-4-phenylpyridine (MPP^+) in the pathogenesis of Parkinson's disease. Brain Res 1992, 575, 285-98.

[Imam et al., 2001] Imam SZ, Newport GD, Itzhak Y, Cadet JL, Islam F, Slikker W Jr and Ali SF. Peroxynitrite plays a role in methamphetamine-induced dopaminergic neurotoxicity: evidence from mice lacking neuronal nitric oxide synthase gene or overexpressing copper-zinc superoxide dismutase. J Neurochem 2001, 76, 745-9.

[Irwin et al., 1994] Irwin I, DeLanney LE, McNeill T, Chan P, Forno LS, Murphy GM Jr, Di Monte DA, Sandy MS and Langston JW. Aging and the nigrostriatal dopamine system: a non-human primate study. Neurodegeneration 1994, 3, 251-65.

[Ishida et al., 2000] Ishida Y, Hashiguchi H, Todaka K, Ishizuka Y and Mitsuyama Y. Repeated administration of high dose levodopa enhances hydroxyl radical production in the rat striatum denervated with 6-hydroxydopamine. Neurosci Lett 2000, 290, 33-6.

[Jackson-Lewis et al., 1995] Jackson-Lewis V, Jakowec M, Burke RE and Przedborski S. Time course and morphology of dopaminergic neuronal death caused by the neurotoxin 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine. Neurodegeneration 1995, 4, 257-69.

[Jaffer et al., 1995] Jaffer A, van der Spuy GD, Russell VA, Mintz M and Taljaard JJF. Activation of the subthalamic nucleus and pedunculopontine Tegmentum: does it affect dopamine levels in the substantia nigra, nucleus accumbens and striatum? Neurodegeneration 1995, 4, 1-7.

[Jankovic, 1999] Jankovic J. New and emerging therapies for Parkinson's disease. Arch Neurol 1999, 56 (7), 785-90.

[Javitch et al., 1985] Javitch JA, Damat, RJ, Strittmatter SM and Snyder SH. Parkinsonism-inducing neurotoxin, N-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine: Uptake of the metabolite N-methyl-4-phenylpyridine by dopamine neurons explains selective toxicity. Proc Natl Acad Sci USA 1985, 82, 2173-7.

[Javoy-Agid und Agid, 1980] Javoy-Agid F and Agid Y. Is the mesocortical dopaminergic system involved in Parkinson disease? Neurology 1980, 30, 1326-30.

[Jenner, 1998] Jenner P. Oxidative mechanisms in nigral cell death in Parkinson's disease. Mov Disord 1998, 13 Suppl, 24-34.

[Jenner, 2002] Jenner P. Pharmacology of dopamine agonists in the treatment of Parkinson's disease. Neurology 2002, 58 Suppl, 1-8.

[Jenner und Brin, 1998] Jenner P and Brin MF. Levodopa neurotoxicity: experimental studies versus clinical relevance. Neurology 1998, 50, 39-43.

[Jenner und Olanow, 1996] Jenner P and Olanow CW. Oxidative stress and the pathogenesis of Parkinson's disease. Neurology 1996, 47 Suppl, 161-70.

[Jenner und Tulloch, 1997] Jenner P and Tulloch I. The preclinical pharmacology of ropinirole receptor interactions, antiparkinsonian activity and potential to induce dyskinesia. In: Olanow WC, Obeso JA, eds. Beyond the Decade of the Brain, vol 2. Kent, UK: Wells Medical, 1997, 115-28.

[Juorio und Boulton, 1982] Juorio AV and Boulton AA. The effect of some precursor amino acids and enzyme inhibitors on the mouse striatal concentration of tyramines and homovanillic acid. J Neurochem 1982, 39, 859-63.

[Kahle et al., 2000] Kahle PJ, Leimer U and Haass C. Does failure of parkin-mediated ubiquitination cause juvenile parkinsonism? Trends Biochem Sci 2000, 25, 524-7.

[Kaku et al., 1999] Kaku K, Shikimi T, Kamisaki Y, Shinozuka K, Ishino H, Okunishi H and Takaori S. Elevation of striatal interleukin-6 and serum corticosterone contents in MPTP-treated mice. Clin Exp Pharmacol Physiol 1999, 26, 680-3.

[Kalaria et al., 1987] Kalaria RN, Mitchell MJ and Harik SI. Correlation of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine neurotoxicity with blood-brain barrier monoamine oxidase activity. Proc Natl Acad Sci USA 1987, 84, 3521-5.

[Kang et al., 1989] Kang JO, Slivka A, Slater G and Cohen G. *In-vivo* formation of hydroxyl radicals following intragastric administration of ferrous salt in rats. J Inorg Biochem 1989, 35, 55-69.

[Kang et al., 1998] Kang UJ, Bencsics C, Wachtel S and Lew R. The effect of GTP cyclohydrolase-1 on tyrosine hydroxylase expression: implications in DOPA-responsive dystonia. Adv Neurol 1998, 78, 319-24.

[Kannari et al., 2000] Kannari K, Tanaka, H, Maeda T, Tomiyama M, Suda T and Matsunaga M. Reserpine pretreatment prevents increases in extracellular striatal dopamine following *L*-DOPA administration in rats with nigrostriatal denervation. J Neurochem 2000, 74, 263-9.

[Kanterman et al., 1991] Kanterman RY, Mahan LC, Briley EM, Monsma FJ Jr, Sibley DR, Axelrod J and Felder CC. Transfected D_2 dopamine receptors mediate the potentiation of arachidonic acid release Chinese hamster ovary cells. Mol Pharmacol 1991, 39, 364-9.

[Karoum et al., 1993] Karoum F, Chrapusta SJ, Egan MF and Wyatt RJ. Absence of 6-hydroxydopamine in the rat brain after treatment with stimulants and other dopaminergic agents: a mass fragmentographic study. J Neurochem 1993, 6, 1369-75.

[Kaur et al., 1997] Kaur H, Whiteman M and Halliwell B. Peroxynitrite-dependent aromatic hydroxylation and nitration of salicylate and phenylalanine. Is hydroxyl radical involved. Free Radic Res 1997, 26, 71-82.

[Kaur und Halliwell, 1994] Kaur H and Halliwell B. Detection of hydroxyl radicals by aromatic hydroxylation. Methods Enzymol 1994, 233, 67-82.

[Kawaguchi et al., 1995] Kawaguchi Y, Wilson CJ, Augood SJ and Emson PC. Striatal interneurons: chemical, physiological and morphological characterization. Trends Neurosci 1995, 17, 527-35.

[Kelly et al., 1998] Kelly MA, Rubinstein M, Phillips TJ, Lessov CN, Burkhart-Kasch S, Zhang G, Bunzow JR, Fang Y, Gerhardt GA, Grandy DK and Low MJ. Locomotor activity in D_2 dopamine receptor-deficient mice is determined by gene dosage, genetic background, and developmental adaptations. J Neurosci 1998, 18, 3470-9.

[Kirik et al., 1998] Kirik D, Rosenblad C and Björklund A. Characterization of behavioural and neurodegenerative changes following partial lesions of the nigrostriatal dopamine system induced by intrastriatal 6-hydroxydopamine in the rat. Exp Neurol 1998, 152, 259-77.

[Kirik, 2002] Kirik D, Rosenblad C, Burger C, Lundberg C, Johansen TE, Muzyczka N, Mandel RJ and Bjorklund A. Parkinson-like neurodegeneration induced by targeted overexpression of α-synuclein in the nigrostriatal system. J Neurosci 2002, 22, 2780-91.

[Klockgether et al., 1991] Klockgether T, Turski L, Honore T, Zhang ZM, Gash DM, Kurlan R and Greenamyre JT. The AMPA receptor antagonist NBQX has antiparkinsonian effects in monoamine-depleted rats and MPTP-treated monkeys. Ann Neurol 1991, 30, 717-23.

[Knight, 1997] Knight JA. Reactive oxygen species and the neurodegenerative disorders. Ann Clin Lab Sci 1997, 27, 11-25.

[Kohutnicka et al., 1998] Kohutnicka M, Lewandowska E, Kurkowska-Jastrzebska I, Czlonkowski A and Czlonkowska A. Microglial and astrocytic involvement in a murine model of Parkinson's disease induced by 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP). Immunopharmacol 1998, 39, 167-80.

[Kornhuber et al., 1989] Kornhuber J, Bormann J, Retz W, Hubers M and Riederer P. Memantine displaces [3H]MK-801 at therapeutic concentrations in postmortem human frontal cortex. Eur J Pharmacol 1989, 166, 589-90.

[Kupsch et al., 2001] Kupsch A, Sautter J, Gotz ME, Breithaupt W, Schwarz J, Youdim MB, Riederer P, Gerlach M and Oertel WH. Monoamine oxidase-inhibition and MPTP-induced neurotoxicity in the non-human primate: comparison of rasagiline (TVP 1012) with selegiline. J Neural Transm 2001, 108, 985-1009.

[Kupsch und Oertel, 1996] Kupsch A and Oertel WH. Operative Therapieverfahren beim idiopathischen Parkinson-Syndrom. Psycho 1996, 22, 37-47.

[Kure et al., 1991] Kure S, Tominaga T, Yoshimoto T, Tada K and Narisawa K. Glutamate triggers internucleosomal DNA cleavage in neuronal cells. Biochem Biophys Res Commun 1991, 179, 39-45.

[Kurkowska-Jastrzebska et al., 1999] Kurkowska-Jastrzebska I, Wronska A, Kohutnicka M, Czlonkowski A and Czlonkowska A. The inflammatory reaction following 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine intoxication in mouse. Exp Neurol 1999, 156, 50-61.

[Kurth und Adler, 1999] Kurth MC and Adler CH. COMT inhibition: a new treatment strategy for Parkinson's disease. Neurology 1998, 50 Suppl, 3-14.

[Lancester, 1994] Lancester JR. Stimulation of the diffusion and reaction of endogenously produced nitric oxide. Proc Natl Acad Sci USA 1994, 91, 8137-41.

[Lang und Lozano, 1998] Lang AE and Lozano AM. Parkinson's disease. First of two parts. N Engl J Med 1998, 339, 1044-53.

[Lang et al., 1990] Lang K, Huang SJ, Miyake H and Chiueh CC. Calcium ion fluxes mediate sustained release of endogenous striatal dopamine by toxic doses of MPP^+ *in-vivo*. FASEB J 1990, 4, 605-8.

[Langston et al., 1983] Langston JW, Ballard PA, Tetrud JW and Irwin I. Chronic parkinsonism in humans due to a product of meperidine-analog synthesis. Science 1983, 219, 979-80.

[Langston et al., 1984] Langston JW, Irwin I, Langston EB and Forno LS. 1-methyl-4-phenylpyridinium ion (MPP^+): Identification of a metabolite of MPTP, a toxin selective to the substantia nigra. Neurosci Lett 1984, 48, 87-92.

[Larkin, 1999] Larkin M. Parkinson's disease research moves on briskly. Lancet 1999, 353, 566.

[LaVoie und Hastings, 1999] LaVoie MJ and Hastings TG. Peroxynitrite- and nitrite-induced oxidation of dopamine: implications for nitric oxide in dopaminergic cell loss. J Neurochem 1999, 73, 2546-54.

[Leroy et al., 1998] Leroy E. The ubiquitin pathway in Parkinson's disease. Nature 1998, 395, 451-2.

[Leslie et al., 1985] Leslie SW, Woodward JJ and Wilcox RG. Correlation of the rates of calcium entry and endogenous dopamine release in mouse striatal synaptosomes. Brain Res 1985, 325, 99-101.

[Liberatore et al., 1999] Liberatore GT, Jackson-Lewis V, Vukosavic S, Mandir AS, Vila M, McAuliffe WG, Dawson VL, Dawson TM and Przedborski S. Inducible nitric oxide synthase stimulates dopaminergic neurotransmission in the MPTP model of Parkinson's disease. Nat Med 1999, 5, 1403-9.

[Limousin et al., 1995] Limousin P, Pollak P, Benazzouz A, Hoffmann D, Broussolle E, Perret JE and Benabid AL. Bilateral subthalamic nucleus stimulation for severe Parkinson's disease. Mov Disord 1995, 10, 672-4.

[Limousin-Dowsey et al., 1999] Limousin-Dowsey P, Pollak P, Van Blercom N, Krack P, Benazzouz A and Benabid A. Thalamic, subthalamic nucleus and internal pallidum stimulation in Parkinson's disease. J Neurol 1999, 246 Suppl, 1142-5.

[Lin et al., 1993] Lin LF, Doherty DH, Lile JD, Bektesh S and Collins F. GDNF: a glial cell line-derived neurotrophic factor for midbrain dopaminergic neurons. Science 1993, 260, 1130-2.

[Lindefors und Ungerstedt, 1990] Lindefors N and Ungerstedt U. Bilateral regulation of glutamate tissue and extracellular levels in caudate-putamen by midbrain dopamine neurons. Neurosci Lett 1990, 115, 248-52.

[Lindvall, 1997] Lindvall O. Neural transplantation: a hope for patients with Parkinson's disease. Neuroreport 1997, 8, iii-x.

[Liu et al., 1991] Liu D, Thangnipon W and McAdoo DJ. Excitatory amino acids rise to toxic levels upon impact injury to the rat spinal cord. Brain Res 1991, 54, 344-8.

[Logroscino et al., 1997] Logroscino G, Marder K, Graziano J, Freyer G, Slavkovich V, Lolacono N, Cote L and Mayeux R. Altered systemis iron metabolism in Parkinson's disease. Neurology 1997, 49, 714-7.

[Löschmann et al., 1991] Löschmann PA, Lange KW, Kunow M, Rettig KJ, Jahnig P, Honore T, Turski L, Wachtel H, Jenner P and Marsden CD. Synergism of the AMPA-antagonist NBQX and the NMDA-antagonist CPP with L-dopa in models of Parkinson's disease. J Neural Transm Park Dis Dement Sect 1991, 3, 203-13.

[Löschmann et al., 1997] Löschmann PA, Wüllner U, Heneka MT, Schulz JB, Kunow M, Wachtel H and Klockgether T. Differential interaction of competitive NMDA and AMPA antagonists with selective dopamine D_1 and D_2 agonists in a rat model of Parkinson's disease. Synapse 1997, 26, 381-391.

[Löschmann und Schulz, 1997] Löschmann PA and Schulz JB. Degenerative Erkrankungen der Basalganglien. In: Klinische Neurobiologie, Herdegen T, Tölle TR, Bähr M (eds). Spektrum Akademischer Verlag GmbH, Heidelberg Berlin Oxford, 1997, 245-80.

[Lotharius und O'Malley, 2000] Lotharius J and O'Malley KL. The parkinsonism-inducing drug 1-methyl-4-phenylpyridinium triggers intracellular dopamine oxidation. A novel mechanism of toxicity. J Biol Chem 2000, 275, 38581-8.

[Lozano und Lang, 2001] Lozano AM and Lang AE. Pallidotomy for Parkinson's disease. Adv Neurol 2001, 86, 413-20.

[Marek et al., 1996] Marek KL, Seibyl JP, Zoghbi SS, Zea-Ponce Y, Baldwin RM, Fussell B, Charney DS, van Dyck C, Hoffer PB and Innis RP. [123I] beta-CIT/SPECT imaging demonstrates bilateral loss of dopamine transporters in hemi-Parkinson's disease. Neurology 1996, 46, 231-7.

[Markey et al., 1994] Markey SP, Johannessen JN, Chiueh CC, Burns RS and Herkenham MA. Intraneuronal generation of a pyridinium metabolite may cause drug-induced parkinsonism. Nature 1994, 311, 464-7.

[Marsden, 1990] Marsden CD. Parkinson's disease. Lancet 1990, 335, 948-52.

[Marsden und Obeso, 1994] Marsden CD and Obeso JA. The functions of the basal ganglia and the paradox of stereotaxic surgery in Parkinson's disease. Brain 1994, 117, 877-97.

[Martin et al., 1998] Martin WR, Ye FQ and Allen PA. Increasing striatal iron content associated with normal aging. Movement Disorders 1998, 13, 281-6.

[Matsuoka et al., 2001] Matsuoka Y, Vila M, Lincoln S, McCormack A, Picciano M, LaFrancois J, Yu X, Dickson D, Langston WJ, McGowan E, Farrer M, Hardy J, Duff K, Przedborski S and Di Monte DA. Lack of nigral pathology in transgenic mice expressing human α-synuclein driven by the tyrosine hydroxylase promoter. Neurobiol Dis 2001, 8, 535-9.

[Matthews et al., 1997] Matthews RT, Beal MF, Fallon J, Fedorchak K, Huang PL, Fishman MC and Hyman BT. MPP^+ induced substantia nigra degeneration is attenuated in nNOS knockout mice. Neurobiol Dis 1997, 4, 114-21.

[McGeer et al., 2001] McGeer PL, Yasojima K and McGeer EG. Inflammation in Parkinson's disease. Adv Neurol 2001, 86, 83-9.

[McGeer et al., 1987*a*] McGeer PL, Itagaki S, Tago H and McGeer EG. Reactive microglia in patients with senile dementia of the Alzheimer type are positive for the histocompatibility glycoprotein HLA-DR. Neurosci Lett 1987*a*, 79, 195-200.

[McGeer et al., 1987*b*] McGeer PL, McGeer EG, Itagaki S and Mizukawa K. Anatomy and pathology of the basal ganglia. Can J Neurol Sci 1987*b*, 14 Suppl, 363-72.

[McGeer et al., 1988] McGeer PL, Itagaki S, Akiyama H and McGeer EG. Rate of cell death in parkinsonism indicates active neuropathological process. Ann Neurol 1988, 24, 574-6.

[McGeer und McGeer, 1997] McGeer EG and McGeer PL. The role of the immune system in neurodegenerative disorders. Mov Disord 1997, 12, 855-8.

[McGeer und McGeer, 1998] McGeer PL and McGeer EG. Glial cell reactions in neurodegenerative diseases: pathophysiology and therapeutic interventions. Alzheimer Dis Assoc Disord 1998, 12 Suppl, 1-6.

[McGiff, 1991] McGiff JC. Cytochrome P-450 metabolism of arachidonic acid. Annu Rev Pharmacol Toxicol 1991, 31, 339-69.

[McLaughlin et al., 1998] McLaughlin BA, Nelson D, Erecinska M and Chesselet MF. Toxicity of dopamine to striatal neurons *in-vitro* and potentiation of cell death by a inhibitor. J Neurochem 1998, 70, 2406-15.

[Melamed et al., 1984] Melamed E, Hefti F, Bitton V and Globus M. Suppression of L-dopa-induced circling in rats with nigral lesions by blockade of central dopa-decarboxylase: implications for mechanism of action of L-dopa in parkinsonism. Neurology 1984, 34, 1566-70.

[Meldrum und Garthwaite, 1990] Meldrum B and Garthwaite J. Excitatory amino acid neurotoxicity and neurodegenerative disease. Trends Pharmacol Sci 1990, 11, 379-87.

[Miller et al., 1990] Miller DM, Buettner GR and Aust SD. Transition metals as catalysts of "autoxidation" reactions. Free Radic Biol Med 1990, 8, 95-108.

[Miller et al., 1999] Miller GW, Gainetdinov RR, Levey AI and Caron MG. Dopamine transporters and neuronal injury. Trends Pharmacol Sci 1999, 20, 424-9.

[Mintz et al., 1986] Mintz I, Hammond C, Giubert B and Leviel V. Stimulation of the subthalamic nucleus enhances the release of dopamine in the rat substantia nigra. Brain Res 1984, 376, 406-8.

[Mitsumoto et al., 1998] Mitsumoto Y, Watanabe A, Mori A and Koga N. Spontaneous regeneration of nigrostriatal dopaminergic neurons in MPTP-treated C57BL/6 mice. Biochem Biophys Res Commun 1998, 248, 660-3.

[Mizuno et al., 1987] Mizuno Y, Saitoh T and Sone N. Inhibition of mitochondrial α-ketoglutarate dehydrogenase by 1-methyl-4-phenyl-pyridinium ion. Biochem Biophys Res Commun 1987, 143, 971-976.

[Mogi et al., 1994a] Mogi M, Harada M, Kondo T, Riederer P, Inagaki H, Minami M and Nagatsu T. Interleukin-1β, interleukin-6, epidermal growth factor and transforming growth factor-α are elevated in the brain from parkinsonian patients. Neurosci Lett 1994a, 180, 147-50.

[Mogi et al., 1994b] Mogi M, Harada M, Riederer P, Narabayashi H, Fujita K and Nagatsu T. Tumor necrosis factor-α (TNF-α) increases both in the brain and in the cerebrospinal fluid from parkinsonian patients. Neurosci Lett 1994b, 165, 208-10.

[Mogi et al., 1996] Mogi M, Harada M, Narabayashi H, Inagaki H, Minami M and Nagatsu T. Interleukin (IL)-1β, IL-2, IL-4, IL-6 and transforming growth factor-α levels are elevated in ventricular cerebrospinal fluid in juvenile parkinsonism and Parkinson's disease. Neurosci Lett 1996, 211, 13-6.

[Mogi et al., 1998] Mogi M, Togari A, Ogawa M, Ikeguchi K, Shizuma N, Fan D, Nakano I and Nagatsu T. Effects of repeated systemic administration of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) to mice on interleukin-1β and nerve growth factor in the striatum. Neurosci Lett 1998, 250, 25-28.

[Mogi et al., 1999] Mogi M, Togari A, Tanaka K, Ogawa N, Ichinose H and Nagatsu T. Increase in level of tumor necrosis factor (TNF) -α in 6-hydroxydopamine-lesioned striatum in rats without influence of systemic *L*-DOPA on the TNF-α induction. Neurosci Lett 1999, 268, 101-4.

[Mogi und Nagatsu, 1996] Mogi M and Nagatsu T. Neurotrophins and cytokines in Parkinson's disease. Adv Neurol 1999, 80, 135-9.

[Mohanakumar et al., 2000] Mohanakumar KP, Muralikrishnan D and Thomas B. Neuroprotection by sodium salicylate against 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-induced neurotoxicity. Brain Res 2000, 864, 281-90.

[Moncada et al., 1994] Moncada S, Palmer RM and Higgs EA. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. Pharmacol Rev 1991, 43, 109-42.

[Monteiro und Winterbourn, 1989] Monteiro HP and Winterbourn CC. 6-Hydroxydopamine releases iron from ferritin and promotes ferritin-dependent lipid peroxidation. Biochem Pharmacol 1989, 38, 4177-82.

[Montgomery et al., 1995] Montgomery J, Ste-Marie L, Boismenu D and Vachon L. Hydroxylation of aromatic compounds as indices of hydroxyl radical production: a coutionary note revisited. Free Rad Biol Med 1995, 19, 927-33.

[Moreno und Pryor, 1992] Moreno JJ and Pryor WA. Inactivation of α 1-proteinase inhibitor by peroxynitrite. Chem Res Toxicol 1992, 5, 425-31.

[Müller et al., 1999] Müller T, Eising E, Kuhn W, Büttner T, Coenen HH and Przuntek H. Delayed motor response correlates with striatal degeneration in Parkinson's disease. Acta Neurol Scand 1999, 100, 227-30.

[Murer et al., 1998] Murer MG, Dziewczapolski G, Menalled LB, Garcia MC, Agid Y, Gershanik O and Raisman-Vozari R. Chronic levodopa is not toxic for remaining dopamine neurons, but instead promotes their recovery, in rats with moderate nigrostriatal lesions. Ann Neurol 1998, 43, 561-75.

[Murphy et al., 1999] Murphy AN, Fiskum G and Beal MF. Mitochondria in neurodegeneration: bioenergetic function in cell life and death. J Cereb Blood Flow Metab 1999, 19, 231-45.

[Nagatsu et al., 1964] Nagatsu T, Levitt M and Udenfried S. Tyrosine hydroxylase. The initial step in norepinephrine biosyntheses. J Biol Chem 1964, 239, 2910-7.

[Nakao et al., 1999] Nakao N, Nakai E, Nakai K and Itakura T. The basal ganglia II. In: Carpenter MB, Jayaaman A (eds.), Plenum Press, New York, 1987, 415-27.

[Napolitano, 1998] Napolitano A, Pezzela A, Miscuraca G and Prota G. New directions in Parkinson's research and treatment. Exp Opin Ther Patents 1998, 8, 1249-66.

[Naveilhan et al., 1994] Naveilhan P, Neveu I, Jehan F, Baudet C, Wion D and Brachet P. Reactive oxygen species influence nerve growth factor synthesis in primary rat astrocytes. J Neurochem 1994, 62, 2178-86.

[Nguyen und Juorio, 1989] Nguyen TV and Juorio AV. Binding sites for brain trace amines. Cell Mol Neurobiol 1989, 9, 297-311.

[Nicklas et al., 1985] Nicklas WJ, Vyas I and Heikkila RE. Inhibition of NADH-linked oxidation in brain mitochondria by 1-methyl-4-phenylpyridine, a metabolite of the neurotoxin 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine. Life Sci 1985, 36, 2503-8.

[Nieuwenhuys, 1990] Nieuwenhuys R. Chemoarchitecture of the brain. Kluwer, Acad Publ, 1990, Drodrecht.

[Nikodejevic et al., 1970] Nikodejevic B, Sinoh S, Daly JW and Creveling CR. Catechol-O-methyltransferase II: A new class of inhibitors of catechol-O-methyltransferase; 3,5-dihydroxy-4-methoxybenzoic acid and related compounds. J Pharmacol Exp Ther 1970, 174, 83-93.

[Nohl et al., 1978] Nohl H, Breuninger V and Hegner D. Influence of mitochondrial radical formation on energy-linked respiration. Eur J Biochem 1978, 90, 385-90.

[Novelli et al., 1988] Novelli A, Reilly JA, Lysko PG and Henneberry RC. Glutamate becomes neurotoxic via the N-methyl-D-aspartate receptor when intracellular energy levels are reduced. Brain Res 1988, 451, 205-12.

[Nussbaum und Polymeropoulos, 1997] Nussbaum RL and Polymeropoulos MH. Genetics of Parkinson's disease. Hum Mol Genet 1997, 6, 1687-91.

[Nutt und Holford, 1996] Nutt JG and Holford NH. The response to levodopa in Parkinson's disease: imposing pharmacological law and order. Ann Neurol 1996, 39, 561-73.

[Obata, 1999] Obata T. Reserpine prevents hydroxyl radical formation by MPP^+ in rat striatum. Brain Res 1999, 828, 68-73.

[Obata et al., 2001] Obata T, Yamanaka Y, Kinemuchi H and Oreland L. Release of dopamine by perfusion with 1-methyl-4-phenylpyridinium ion (MPP^+) into the striatum is associated with hydroxyl free radical generation. Brain Res 2001, 906, 170-5.

[Obeso et al., 1998] Obeso JA, Rodriguez MC, Gorospe A, Guridi J, Alvarez L and Macias R. Surgical treatment of Parkinson's disease. Baillieres Clin Neurol 1997, 6, 125-45.

[Ondo et al., 1999] Ondo W, Hunter C, Almaguer M and Jankovic J. A novel sublingual apomorphine treatment for patients with fluctuating Parkinson's disease. Mov Disord 1999, 14, 664-8.

[Opacka-Juffry et al., 1998] Opacka-Juffry J, Wilson AW and Blunt SB. Effects of pergolide treatment on *in-vivo* hydroxyl free radical formation during infusion of 6-hydroxydopamine in rat striatum. Brain Res 1998, 810, 27-33.

[Orrenius und Nicotera, 1994] Orrenius S and Nicotera P. The calcium ion and cell death. J Neural Transm Suppl 1994, 43, 1-11.

[Patsalos et al., 1995] Patsalos PN, Abed WT, Alavijeh MS and O'Connell MT. The use of microdialysis for the study of drug kinetics: some methodological considerations illustrated with antipyrine in rat frontal cortex. Br J Pharmacol 1995, 115, 503-9.

[Paul et al., 2000] Paul G, Reum T, Meissner W, Marburger A, Sohr R, Morgenstern R and Kupsch A. High frequency stimulation of the subthalamic nucleus influences striatal dopaminergic metabolism in the naive rat. Neuroreport 2000, 11, 441-4.

[Paxinos und Watson, 1982] Paxinos G and Watson C. The rat brain in stereotaxic coordinates. New York: Academic Press 1982.

[Pelton et al., 1981] Pelton EW 2nd, Kimelberg HK, Shipherd SV and Bourke RS. Dopamine and norepinephrine uptake and metabolism by astroglial cells in culture. Life Sci 1981, 28, 1655-63.

[Pennathur et al., 1999] Pennathur S, Jackson-Lewis V, Przedborski S and Heinecke JW. Mass spectrometric quantification of 3-nitrotyrosine, *o*-tyrosine, and o,o'-dityrosine in brain tissue of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-treated mice, a model of oxidative stress in Parkinson's disease. J Biol Chem 1999, 274, 34621-8.

[Perez et al., 2002] Perez RG, Waymire JC, Lin E, Liu JJ, Guo F and Zigmond MJ. A role for α-synuclein in the regulation of dopamine biosynthesis. J Neurosci 2002, 22, 3090-9.

[Phlebs et al., 1995] Phlebs DT, Ferro TJ, Higgins PJ, Shankar R, Parker DM and Johnson A. TNF-α induces peroxynitrite-mediated depletion of lung endotheliel glutathione via protein kinase C. Amer J Physiol 1995, 269, 551-9.

[Piallat et al., 1996] Piallat B, Benazzouz A and Benabid AL. Subthalamic nucleus lesion in rats prevents dopaminergic nigral neuron degeneration after striatal 6-OHDA injection: behavioural and immunohistochemical studies. Eur J Neurosci 1996, 8, 1408-14.

[Piomelli et al., 1991] Piomelli D, Pilon C, Giros B, Sokoloff P, Martres MP and Schwartz JC. Dopamine activation of the arachidonic acid cascade as a basis for D_1/D_2 receptor synergism. Nature 1991, 353, 164-7.

[Poirier et al., 1994] Poirier J, Dea D, Baccichet A and Thiffault C. Superoxide dismutase expression in Parkinson's disease. Ann N Y Acad Sci 1994, 738, 116-20.

[Pryor et al., 1994] Pryor WA, Jin X and Squadrito GL. One- and two-electron oxidations of methionine by peroxynitrite. Proc Natl Acad Sci USA 1994, 91, 11173-7.

[Przedborski et al., 1992] Przedborski S, Kostic V, Jackson-Lewis V, Naini S, Simonetti S, Fahn S, Carlson E, Epstein CJ and Cadet JL. Transgenic mice with increased Cu/Zn-superoxide dismutase activity are resistant to N-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-induced neurotoxicity. J Neurosci 1992, 12, 1658-67.

[Przedborski et al., 1996] Przedborski S, Jackson-Lewis V, Yokoyama R, Shibata T, Dawson VL and Dawson TM. Role of neuronal nitric oxide in 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP)-induced dopaminergic neurotoxicity. Proc Natl Acad Sci USA 1996, 93, 4565-71.

[Przedborski et al., 2001] Przedborski S, Jackson-Lewis V, Naini AB, Jankowec M, Petzinger G, Miller R and Akram M. The parkinsonian toxin 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP): a technical review of its utility and safety. J Neurochem 2001, 76, 1265-74.

[Quinn et al., 1986] Quinn N, Parkes D, Janota I and Marsden CD. Preservation of the substantia nigra and locus coeruleus in a patient receiving levo-dopa (2 kg) plus decarboxylase inhibitor over a four-year period. Mov Disord 1986, 1, 65-8.

[Radi et al., 1991*a*] Radi R, Beckman JS, Bush KM and Freeman BA. Peroxynitrite oxidation of sulfhydryls. The cytotoxic potential of superoxide and nitric oxide. J Biol Chem 1991*a*, 266, 4244-50.

[Radi et al., 1991*b*] Radi R, Beckman JS, Bush KM and Freeman BA. Peroxynitrite-induced membrane lipid peroxidation: the cytotoxic potential of superoxide and nitric oxide. Arch Biochem Biophys 1991*b*, 288, 481-7.

[Rajput et al., 1984] Rajput AH, Offord KP, Beard CM and Kurland LT. Epidemiology of parkinsonism: incidence, classification, and mortality. Ann Neurol 1984, 16, 278-82.

[Rajput et al., 1997] Rajput AH, Fenton M, Birdi S and Macaulay R. Is levodopa toxic to human substantia nigra? Mov Disord 1997, 12, 634-8.

[Rauhala et al., 1996] Rauhala P, Mohanakumar KP, Sziraki I, Lin AM and Chiueh CC. S-nitrosothiols and nitric oxide, but not sodium nitroprusside, protect nigrostriatal dopamine neurons against iron-induced oxidative stress *in-vivo*. Synapse 1996, 23, 58-60.

[Rauhala et al., 1998] Rauhala P, Lin AM and Chiueh CC. Neuroprotection by S-nitrosoglutathione of brain dopamine neurons from oxidative stress. FASEB J 1998, 12, 165-73.

[Raymon et al., 1997] Raymon HK, Thode S and Gage FH. Application of *ex-vivo* gene therapy in the treatment of Parkinson's disease. Exp Neurol 1997, 144, 82-91.

[Riachi et al., 1991] Riachi NJ, Behmand RA and Harik SI. Correlation of MPTP neurotoxicity *in-vivo* with oxidation of MPTP by the brain and blood-brain barrier *in-vitro* in five rat strains. Brain Res 1991, 555, 19-24.

[Riederer et al., 1989] Riederer P, Sofic E, Rausch WD, Schmidt B, Reynolds GP, Jellinger K and Youdim MB. Transition metals, ferritin, glutathione, and ascorbic acid in parkinsonian brains. J Neurochem 1989, 52, 515-20.

[Riederer et al., 2000] Riederer P, Sian J and Gerlach M. Is there neuroprotection in Parkinson syndrome? J Neurol 2000, 247 Suppl, 8-11.

[Riederer und Wuketich, 1976] Riederer P and Wuketich S. Time course of nigrostriatal degeneration in parkinson's disease. A detailed study of influential factors in human brain amine analysis. J Neural Transm 1976, 38, 277-301.

[Roberts et al., 1975] Roberts DCS, Zis AP and Fibinger HC. Ascending catecholamine pathways and amphetamine-induced locomotor activity: importance of dopamine and apparent non-involvement of norepinephrin. Brain Res 1975, 93, 441-54.

[Rodriguez et al., 1998] Rodriguez MC, Obeso JA and Olanow CW. Subthalamic nucleus-mediated excitotoxicity in Parkinson's disease: a target for neuroprotection. Ann Neurol 1998, 44 Suppl, 175-88.

[Rose et al., 1999] Rose S, Hindmarsh JG and Jenner P. Neuronal nitric oxide synthase inhibition reduces MPP^+-evoked hydroxyl radical formation but not dopamine efflux in rat striatum. J Neural Transm 1999, 106, 477-86.

[Rozas et al., 1998] Rozas G, Lopez-Martin E, Guerra MJ and Labandeira-Garcia JL. The overall rod performance test in the MPTP-treated-mouse model of Parkinsonism. J Neurosci Methods 1998, 83, 165-75.

[Sachs und Jonsson, 1975] Sachs CH and Jonsson G. Mechanisms of action of 6-hydroxydopamine. Biochem Pharmacol 1975, 24, 1-8.

[Sam et al., 1998] Sam E, Sarre S, Michotte Y and Verbeke N. Catechol is the major product of salicylate hydroxylation in 1-methyl-4-phenylpyridinium ion treated rats. Eur J Drug Metab Pharmacokinet 1998, 23, 137-42.

[Santiago et al., 1991] Santiago M, Rollema H, de Vries JB and Westerink BH. Acute effects of intranigral application of MPP^+ on nigral and bilateral striatal release of dopamine simultaneously recorded by microdialysis. Brain Res 1991, 538, 226-30.

[Sardar et al., 1987] Sardar A, Juorio AV and Boulton AA. The concentration of *p*- and *m*-tyramine in the rat mesolimbic system: its regional distribution and effect of monoamine oxidase inhibition. Brain Res 1987, 412, 370-4.

[Sauer und Oertel, 1994] Sauer H and Oertel WH. Progressive degeneration of nigrostriatal dopamine neurons following intrastriatal terminal lesions with 6-hydroxydopamine: a combined retrograde tracing and immunocytochemical study in the rat. Neuroscience 1994, 59, 401-15.

[Sawada et al., 1998] Sawada H, Ibi M, Kihara T, Urushitani M, Akaike A, Kimura J and Shimohama S. Dopamine D2-type agonists protect mesencephalic neurons from glutamate neurotoxicity: mechanisms of neuroprotective treatment against oxidative stress. Ann Neurol 1998, 44, 110-9.

[Schapira et al., 1989] Schapira AH, Cooper JM, Dexter D, Jenner P, Clark JB and Marsden CD. Mitochondrial complex I deficiency in Parkinson's disease. Lancet 1989, 1, 1269.

[Schapira, 2002] Schapira AH. Neuroprotection and dopamine agonists. Neurology 2002, 58 Suppl, 9-18.

[Schmidt und Ferger, 2001*a*] Schmidt N and Ferger B. Neurochemical findings in the MPTP model of Parkinson's disease. J Neural Transm 2001*a*, 108, 1263-82.

[Schmidt und Ferger, 2001*b*] Schmidt N and Ferger B. Neuroprotective effects of (±)-kavain in the MPTP mouse model of Parkinsons disease. Synapse 2001*b*, 40, 47-54.

[Schneider et al., 1994] Schneider JS, Rothblat DS and DiStefano L. Volume transmission of dopamine over large distances may contribute to recovery from experimental parkinsonism. Brain Res 1994, 643, 86-91.

[Schneider et al., 1997] Schneider JA, Watts RL, Gearing M, Brewer RP and Mirra SS. Corticobasal degeneration: neuropathologic and clinical heterogeneity. Neurology 1997, 48, 959-69.

[Schulz et al., 1995*a*] Schulz JB, Matthews RT, Muqit MMK, Browne SE and Beal MF. Inhibition of neuronal nitric oxide synthase by 7-nitroindazole protects against MPTP-induced neurotoxicity in mice. J Neurochem 1995*a*, 64, 936-9.

[Schulz et al., 1995*b*] Schulz JB, Matthews RT, Jenkins BG, Ferrante RJ, Siwek D, Henshaw DR, Cipolloni PB, Mecocci P, Kowall NW and Rosen BR. Blockade of neuronal nitric oxide synthase protects against excitotoxicity *in-vivo*. J Neurosci 1995*b*, 12, 8419-29.

[Schulz et al., 1995*c*] Schulz JB, Henshaw DR, Siwek D, Jenkins BG, Ferrante RJ, Cipolloni PB, Kowall NW, Rosen BR and Beal MF. Involvement of free radicals in excitotoxicity *in-vivo*. J Neurochem 1995*c*, 64, 2239-2247.

[Schulz et al., 1996*a*] Schulz JB, Matthews RT, Henshaw DR and Beal MF. Neuroprotective strategies for treatment of lesions produced by mitochondrial toxins: for neurodegenerative diseases. Neuroscience 1996*a*, 71, 1043-8.

[Schulz et al., 1996*b*] Schulz JB, Henshaw DR, MacGarvey U and Beal MF. Involvement of oxidative stress in 3-nitropropionic acid neurotoxicity. Neurochem Int, 1996*b*, 29 (2), 167-71

[Schulz und Beal, 1995] Schulz JB and Beal MF. Neuroprotective effects of free radical scavengers and energy repletion in animal models of neurodegenerative disease. Ann N Y Acad Sci 1995, 765, 100-10.

[Scigliano et al., 1990] Scigliano G, Musicco M, Soliveri P, Piccolo I, Girotti F, Giovannini P and Caraceni T. Mortality associated with early and late levodopa therapy initiation in Parkinson's disease. Neurol 1990, 40, 265-9.

[Scorrano et al., 1997] Scorrano L, Petronilli V and Bernardi P. On the voltage dependence of the mitochondrial permeability transition pore. A critical appraisal. J Biol Chem 1997, 272, 12295-9.

[Searle et al., 1982] Searle J, Kerr JF and Bishop CJ. Necrosis and apoptosis: distinct modes of cell death with fundamentally different significance. Pathol Annu 1982, 17, 229-59.

[Sedelis et al., 2000] Sedelis M, Hofele K, Auburger GW, Morgan S, Huston JP and Schwarting RK. MPTP susceptibility in the mouse: behavioral, neurochemical, and histological analysis of gender and strain differences. Behav Genet 2000, 30, 171-82.

[Seidler et al., 1996] Seidler A, Hellenbrand W, Robra BP, Vieregge P, Nischan P, Joerg J, Oertel WH, Ulm G and Schneider E. Possible environmental, occupational, and other etiologic factors for Parkinson's disease: a case-control study in Germany. Neurology 1996, 46, 1275-84.

[Shannon et al., 1997] Shannon KM, Bennett JP Jr and Friedman JH. Efficacy of pramipexole, a novel dopamine agonist, as monotherapy in mild to moderate Parkinson's disease. The Pramipexole Study Group. Neurology 1997, 49, 724-8.

[Shiosaki et al., 1996] Shiosaki K, Jenner P, Asin KE, Britton DR, Lin CW, Michaelides M, Smith L, Bianchi B, Didomenico S, Hodges L, Hong Y, Mahan L, Mikusa J, Miller T, Nikkel A, Stashko M, Witte D and Williams M. ABT-431: the diacetyl prodrug of A-86929, a potent and selective dopamine D_1 receptor agonist: *in-vitro* characterization and effects in animal models of Parkinson's disease. J Pharmacol Exp Ther 1996, 276, 150-60.

[Shoulson, 1989] Shoulson I. Deprenyl and tocopherol antioxidative therapy of parkinsonism (DATATOP). Parkinson Study Group. Acta Neurol Scand Suppl 1989, 126, 171-5.

[Shoulson, 1998] Shoulson I. DATATOP: a decade of neuroprotective inquiry. Parkinson Study Group. Deprenyl and tocopherol antioxidative therapy of parkinsonism. Ann Neurol 1998, 44 Suppl, 160-6.

[Sian et al., 1994] Sian J, Dexter DT, Lees AJ, Daniel S, Agid Y, Javoy-Agid F, Jenner P and Marsden CD. Alterations in glutathione levels in Parkinson's disease and other neurodegenerative disorders affecting basal ganglia. Ann Neurol 1994, 36, 348-55.

[Sian et al., 1999] Sian J, Gerlach M, Youdim MB and Riederer P. Parkinson's disease: a major hypokinetic basal ganglia disorder. J Neural Transm 1999, 106, 443-76.

[Simmons und Murphy, 1992] Simmons ML and Murphy S. Induction of nitric oxide synthase in glial cells. J Neurochem 1992, 49, 1-8.

[Simmons und Murphy, 1994] Simmons ML and Murphy S. Roles for protein kinases in the induction of nitric oxide synthase in astrocytes. Glia 1994, 11, 227-34.

[Singer et al., 1987] Singer TP, Castagnoli N Jr, Ramsay RR and Trevor AJ. Biochemical events in the development of parkinsonism induced by 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine. J Neurochem 1987, 49, 1-8.

[Singer et al., 1985] Singer TP, Salach JI and Crabtree D. Reversible inhibition and mechanism-based irreversible inactivation of monoamine oxidases by 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP). Biochem Biophys Res Commun 1985, 127, 707-12.

[Smiley et al., 1994] Smiley JF, Levey AI, Ciliax BJ and Goldman-Rakic PS. D_1 dopamine receptor immunoreactivity in human and monkey cerebral cortex: Predominant and extransynaptic localization in dendritic spines. Proc Natl Acad Sci 1994, 91, 5720-4.

[Smith et al., 1994] Smith TS, Parker WD Jr and Bennett JP Jr. L-dopa increases nigral production of hydroxyl radicals *in-vivo*: potential L-dopa toxicity? Neuroreport 1994, 5, 1009-11.

[Smith und Bennett, 1997] Smith TS and Bennett JP Jr. Mitochondrial toxins in models of neurodegenerative diseases. I: *in-vivo* brain hydroxyl radical production during systemic MPTP treatment or following microdialysis infusion of methylpyridinium or azide ions. Brain Res 1997, 765, 183-8.

[Smith und Grace, 1992] Smith ID and Grace AA. Role of the subthalamic nucleus in the regulation of nigral dopamine neuron activity. Synapse 1992, 12, 287-303.

[Sofic et al., 1992] Sofic E, Lange KW, Jellinger K and Riederer P. Reduced and oxidized glutathione in the substantia nigra of patients with Parkinson's disease. Neurosci Lett 1992, 142, 128-30.

[Spillantini et al., 1997] Spillantini MG, Schmidt ML, Lee VM, Trojanowski JQ, Jakes R and Goedert M. *Alpha*-synuclein in Lewy bodies. Nature 1997, 388, 839-40.

[Sriram et al., 1997] Sriram K, Pai KS, Boyd MR and Ravindranath V. Evidence for generation of oxidative stress in brain by MPTP: *in-vitro* and *in-vivo* studies in mice. Brain Res 1997, 749, 44-52.

[Ste-Marie et al., 1999] Ste-Marie L, Vachon L, Bemeur C, Lambert J and Montgomery J. Local striatal infusion of MPP^+ does not result in increased hydroxylation after administration of 4-hydroxybenzoat. Free Radic Biol Med 1999, 27, 997-1007.

[Sullivan et al., 1999] Sullivan GW, Linden J, Buster BL and Scheld WM. Neutrophil A2A adenosine receptor inhibits inflammation in a rat model of meningitis: synergy with the type IV phosphodiesterase inhibitor, rolipram. J Infect Dis 1999, 180, 1550-60.

[Sun et al., 1993] Sun JZ, Kaur H, Halliwell B, Li XY and Bolli R. Use of aromatic hydroxylation of phenylalanine to measure production of hydroxyl radicals after myocardial ischemia *in-vivo*. Direct evidence for a pathogenetic role of the hydroxyl radical in myocardial stunning. Circ Res 1993, 73, 534-49.

[Sundström et al., 1988] Sundström E, Luthman J, Goldstein M and Jonsson G. Time course of MPTP-induced degeneration of the nigrostriatal dopamine system in C57 BL/6 mice. Brain Res Bull 1988, 21, 257-63.

[Tabrizi et al., 2000*a*] Tabrizi SJ, Workman J, Hart PE, Mangiarini L, Mahal A, Bates G, Cooper JM and Schapira AH. Mitochondrial dysfunction and free radical damage in the Huntington R6/2 transgenic mouse. Ann Neurol 2000*a*, 47, 80-6.

[Tabrizi et al., 2000*b*] Tabrizi SJ, Orth M, Wilkinson JM, Taanman JW, Warner TT, Cooper JM and Schapira AH. Expression of mutant α-synuclein causes increased susceptibility to dopamine toxicity. Hum Mol Genet 2000*b*, 9, 2683-9.

[Takahashi et al., 1997] Takahashi N, Miner LL, Sora I, Ujike H, Revay RS, Kostic V, Jackson-Lewis V, Przedborski S and Uhl GR. VMAT2 knockout mice: heterozygotes display reduced amphetamine-conditioned reward, enhanced amphetamine locomotion and enhanced MPTP toxicity. Proc Natl Acad Sci USA 1997, 94, 9938-43.

[Tanda et al., 1997] Tanda G, Pontieri FE, Frau R and Chiara GD. Contribution of blockade of the noradrenaline carrier to the increase of extracellular dopamine in the rat prefrontal cortex by amphetamine and cocaine. Eur J Neurosci 1997, 9, 2077-2085.

[Tanner et al., 1999] Tanner CM, Ottman R, Goldman SM, Ellenberg J, Chan P, Mayeux R and Langston JW. Parkinson disease in twins: an etiologic study. JAMA 1999, 281, 341-6.

[Tartaglia et al., 1991] Tartaglia LA, Weber RF, Figari IS, Reynolds C, Palladino MA Jr and Goeddel DV. The two different receptors for tumor necrosis factor mediate distinct cellular responses. Proc Natl Acad Sci USA 1991, 88, 9292-6.

[Tatton, 2000] Tatton NA. Increased caspase 3 and Bax immunoreactivity accompany nuclear GAPDH translocation and neuronal apoptosis in Parkinson's disease. Exp Neurol 2000, 166, 29-43.

[Tatton et al., 1998] Tatton NA, Maclean-Fraser A, Tatton WG, Perl DP and CW. A fluorescent double-labeling method to detect and confirm apoptotic nuclei in Parkinson's disease. Ann Neurol 1998, 44 Suppl, 142-8.

[Tatton und Chalmers-Redman, 1998] Tatton WG and Chalmers-Redman RM. Mitochondria in neurodegenerative apoptosis: an opportunity for therapy? Ann Neurol 1998, 44 Suppl, 134-41.

[Tatton und Kish, 1997] Tatton NA and Kish SJ. In situ detection of apoptotic nuclei in the substantia nigra compacta of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-treated mice using terminal deoxynucleotidyl transferase labelling and acridine orange staining. Neuroscience 1997, 77, 1037-48.

[Teismann et al., 2001] Teismann P, Schwaninger M, Weihe F and Ferger B. Nuclear factor-κB activation is not involved in a MPTP model of Parkinson's disease. NeuroReport 2001, 12, 1049-53.

[Teismann und Ferger, 2001] Teismann P and Ferger B. Inhibition of the cyclooxygenase isoenzymes COX-1 and COX-2 provide neuroprotection in the MPTP-mouse model of Parkinson's disease. Synapse 2001, 39, 167-74.

[Themann et al., 2001] Themann C, Teismann P, Kuschinsky K and Ferger B. Comparison of two independent aromatic hydroxylation assays in combination with intracerebral microdialysis to determine hydroxyl free radicals. J Neurosci Methods 2001, 108, 57-64.

[Themann et al., 2002] Themann C, Alvarez Fischer D, Gross S, Westermann R, Weihe E, Kuschinsky K, Schäfer H and Ferger B. Effect of repeated treatment with high doses of selegiline on behaviour, striatal dopaminergic neurotransmission and tyrosine hydroxylase mRNA levels. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol 2002, 365, 22-8.

[Thoenen und Tranzer, 1973] Thoenen H and Tranzer JP. The pharmacology of 6-hydroxydopamine. Ann Rev Pharmacol 1973, 13, 169-180.

[Tipton und Singer, 1993] Tipton KF and Singer TP. Advances in our understanding of the mechanisms of the neurotoxicity of MPTP and related compounds. J Neurochem 1993, 61, 1191-206.

[Tomac et al., 1995] Tomac A, Lindqvist E, Lin LFH, Ögren SO, Young D, Hoffer BJ and Olson L. Protection and repair of the nigrostriatal dopaminergic system by GDNF *in-vivo*. Nature 1995, 373, 335-9.

[Torreilles et al., 1999] Torreilles F, Salman-Tabcheh S, Guerin M and Torreilles J. Neurodegenerative disorders: the role of peroxynitrite. Brain Res Brain Res Rev 1999, 30, 153-63.

[Tseng et al., 1997] Tseng JL, Baetge EE, Zurn AD and Aebischer P. GDNF reduces drug-induced rotational behavior after medial forebrain bundle transection by a mechanism not involving striatal dopamine. J Neurosci 1997, 17, 325-33.

[Tulloch, 1997] Tulloch IF. Pharmacologic profile of ropinirole: a nonergoline dopamine agonist. Neurology 1997, 49 Suppl, 58-62.

[Turski et al., 1991] Turski L, Bressler K, Rettig KJ, Löschmann PA and Wachtel H. Protection of substantia nigra from MPP^+ neurotoxicity by N-methyl-D-aspartate antagonists. Nature 1991, 349, 414-8.

[Udassin et al., 1991] Udassin R, Ariel I, Haskel Y, Kitrossky N and Chevion M. Salicylate as an *in-vivo* free radical trap: studies on ischemic insult to the rat intestine. Free radic Biol Med 1991, 10, 1-6.

[Uebelhack et al., 1998] Uebelhack R, Franke L and Schewe HJ. Inhibition of platelet MAO-B by kavapyrone-enriched extract from Piper methysticum Forster (kava-kava). Pharmacopsychiatry 1998, 31, 187-92.

[Uezono et al., 2001] Uezono T, Matsubara K, Shimizu K, Mizukami H, Ogawa K, Saito O, Hayase N, Eto H, Kimura K and Shiono H. Glutamate is not involved in the MPP^+-induced dopamine overflow in the striatum of freely moving C57BL/6 mice. J Neural Transm 2001, 108, 899-908.

[Ungerstedt und Arbuthnott, 1970] Ungerstedt U and Arbuthnott GW. Quantitative recording of rotational behaviour in rats after 6-hydroxydopamine lesions of the nigrostriatal dopamine system. Brain Res 1970, 24, 485-93.

[Ungerstedt, 1984] Ungerstedt U. Measurement of neurotransmitter release by intracranial dialysis. In: Marsden CA (ed) Measurement of neurotransmitter release *in-vivo*. John Wiley and Sons Ltd, Chichester, 1984, 81-105.

[Vaccari und Saba, 1995] Vaccari A and Saba P. The tyramine-labelled vesicular transporter for dopamine: a putative target of pesticides and neurotoxins. Eur J Pharmacol 1995, 292, 309-14.

[van der Putten et al., 2000] van der Putten H, Wiederhold KH, Probst A, Barbieri S, Mistl C, Danner S, Kauffmann S, Hofele K, Spooren WP, Ruegg MA, Lin S, Caroni P, Sommer B, Tolnay M and Bilbe G. Neuropathology in mice expressing human α-synuclein. J Neurosci 2000, 20, 6021-9.

[van der Vliet et al., 1994] van der Vliet A, O'Neill CA, Halliwell B, Cross CE and Kaur H. Aromatic hydroxylation and nitration of phenylalanine and tyrosine by peroxynitrite. Evidence for hydroxyl radical production from peroxynitrite. FEBS Lett 1994, 339, 89-92.

[Van Zee et al., 1992] Van Zee KJ, Kohno T, Fischer E, Rock CS, Moldawer LL and Lowry SF. Tumor necrosis factor soluble receptors circulate during experimental and clinical inflammation and can protect against excessive tumor necrosis factor α *in-vitro* and *in-vivo*. Proc Natl Acad Sci USA 1992, 89, 4845-9.

[Vila et al., 1996] Vila M, Herrero MT, Levy R, Faucheux B, Ruberg M, Guillen J, Luquin MR, Guridi J, Javoy-Agid F, Agid Y, Obeso JA and Hirsch EC. Consequences of nigrostriatal denervation on the γ-aminobutyric acidic neurons of substantia nigra pars reticulata and superior colliculus in parkinsonian syndromes. Neurology 1996, 46, 802-9.

[von Coelln et al., 1995] von Coelln R, Unsicker K and Krieglstein K. Screening of interleukins for survival-promoting effects on cultured mesencephalic dopaminergic neurons from embryonic rat brain. Brain Res Dev Brain Res 1995, 89, 150-4.

[Wallace, 1992] Wallace DC. Mitochondrial genetics: a paradigm for aging and degenerative diseases? Science 1992, 256, 628-32.

[Wayment et al., 2001] Wayment HK, Schenk JO and Sorg BA. Characterization of extracellular dopamine clearance in the medial prefrontal cortex: role of monoamine uptake and monoamine oxidase inhibition. J Neurosci 2001, 21, 35-44.

[Weingarten und Zhou] Weingarten P and Zhou QY. Protection of intracellular dopamine cytotoxicity by dopamine disposition and metabolism factors. J Neurochem 2001, 77, 776-85.

[Westerink, 1995] Westerink BH. Brain microdialysis and its application for the study of animal behaviour. Behav Brain Res 1995, 70, 103-24.

[Wichmann und DeLong, 1993] Wichmann T and DeLong MR. Pathophysiology of parkinsonian motor abnormalities. Adv Neurol 1993, 60, 53-61.

[Woodroof et al., 1991] Woodroof MM, Sarna GS, Wadhwa M, Hayes GM, Louglin AJ, Tinker A and Cuzner ML. Detection of interleukin-1 and interleukin-6 in adult rat brain following mechanical injury by *in-vivo* microdialysis: evidence of a role for microglia in cytokine production. J Neuroimmunol 1991, 33, 227-36.

[Xia et al., 2001] Xia XG, Schmidt N, Teismann P, Ferger B and Schulz JB. Dopamine mediates striatal malonate toxicity via dopamine transporter-dependent generation of reactive oxygen species and D_2 but not D_1 receptor activation. J Neurochem 2001, 79, 63-70.

[Yahr, 1972] Yahr MD. L-dopa in neurological disease: current status. Res Publ Assoc Res Nerv Ment Dis 1972, 50, 494-511.

[Yoritaka et al., 1996] Yoritaka A, Hattori N, Uchida K, Tanaka M, Stadtman ER and Mizuno Y. Immunohistochemical detection of 4-hydroxynonenal protein adducts in Parkinson disease. Proc Natl Acad Sci USA 1996, 93, 2696-701.

[Zamzami et al., 1996] Zamzami N, Susin SA, Marchetti P, Hirsch T, Gomez-Monterrey I, Castedo M and Kroemer G. Mitochondrial control of nuclear apoptosis. J Exp Med 1996, 183, 1533-44.

[Zeevalk und Nicklas, 1991] Zeevalk GD and Nicklas WJ. Mechanisms underlying initiation of excitotoxicity associated with metabolic inhibition. J Pharmacol Exp Ther, 1991, 257, 870-8.

[Zeevalk und Nicklas, 1992] Zeevalk GD and Nicklas WJ. Evidence that the loss of the voltage-dependent Mg2+ block at the N-methyl-D-aspartate receptor underlies receptor activation during inhibition of neuronal metabolism. J Neurochem 1992, 59, 1211-20.

[Zetterström et al., 1988] Zetterström T, Sharp T, Collin AK and Ungerstedt U. *In-vivo* measurement of extracellular dopamine and DOPAC in rat striatum after various dopamine-releasing drugs; implications for the origin of extracellular DOPAC. Eur J Pharmacol 1988, 148, 327-34.

[Zhang et al., 2000] Zhang Y, Gao J, Chung KK, Huang H, Dawson VL and Dawson TM. Parkin functions as an E2-dependent ubiquitin-protein ligase and promotes the degradation of the synaptic vesicle-associated protein, CDCrel-1. Proc Natl Acad Sci USA 2000, 97, 13354-9.

[Zigmond et al., 1990] Zigmond MJ, Abercrombie ED, Berger TW, Grace AA and Stricker EM. Compensations after lesions of central dopaminergic neurons: some clinical and basic implications. Trends Neurosci 1990, 17, 290-6.

[Ziv et al., 1994] Ziv I, Melamed E, Nardi N, Luria D, Achiron A, Offen D and Barzilai A. Dopamine induces apoptosis-like cell death in cultured chick sympathetic neurons–a novel pathogenetic mechanism in Parkinson's disease. Neurosci Lett 1994, 170, 136-40.

[Ziv et al., 1997] Ziv I, Zilkha-Falb R, Offen D, Shirvan A, Barzilai A and Melamed E. Levodopa induces apoptosis in cultured neuronal cells – a possible accelerator of nigrostriatal degeneration in Parkinson's disease? Mov Disord 1997, 12, 17-23.

[Ziv und Melamed, 1998] Ziv I and Melamed E. Role of apoptosis in the pathogenesis of Parkinson's disease: A novel therapeutic opportunity? Mov Disord 1998, 13, 865-70.

[Zou et al., 1999] Zou L, Jankovic J, Rowe DB, Xie W, Appel SH and Le W. Neuroprotection by pramipexole against dopamine- and levodopa-induced cytotoxicity. Life Sci 1999, 64, 1275-85.

Anhang

Abbildungsverzeichnis

1.1 Dopamin-Synthese 5
1.2 Dopamin-Metabolismus 7
1.3 Verschaltung der Basalganglien 10
1.4 Veränderungen in den Basalganglien beim MP 11
1.5 Verlauf der striatalen Dopamin-Verarmung 12
1.6 Zusammenspiel der pathologischen Faktoren 13
1.7 Dopaminmetabolismus und Radikalbildung 16
1.8 Die Entstehung von oxidativem Stress und seine Auswirkungen 19
1.9 Endogene Radikalabwehrsysteme 21
1.10 Radikalentstehung in der mitochondrialen Atmungskette 22
1.11 Giftung von MPTP 39
1.12 Mechanismus der MPTP-Toxizität 41
1.13 Strukturformel von Kavain 49
1.14 Strukturvergleich zwischen Tyramin und DA 52

2.1 TH-Färbung der Substantia nigra 58
2.2 Zielkoordinaten der Mikrodialysesonde im Striatum der Maus 60
2.3 Prinzip der Mikrodialysesonde 61
2.4 Mikrodialyse unter freely moving-Bedingungen 62
2.5 Beispielchromatogramm für die Bestimmung von DA, DOPAC, HVA, 5-HT, 5-HIAA, 2,3- und 2,3-DHBA 64
2.6 Beispielchromatogramm für die Bestimmung von *o-, m-, p-* und *NO*-Tyrosin sowie *NO*-Phenylalanin 66
2.7 Beispielchromatogramm für die Bestimmung von Glutamat 68
2.8 Eichreihe für die Bestimmung von MPP^+ 70

2.9 Salicylat-Assay 73
2.10 Phenylalanin-Assay 74

3.1 Beispielchromatogramm der neuen mobilen Phase auf Methanolbasis 81
3.2 MPTP-induzierte Veränderungen der lokomotorischen Aktivität 84
3.3 MPTP-induzierte Defizite in der Bewegungskoordination 85
3.4 MPTP-induzierte Effekte auf das Körpergewicht 86
3.5 Mortalität nach MPTP 87
3.6 MPTP-induzierte Neurotransmitter-Veränderungen (DA, DOPAC, HVA und HVA/DA Ratio) 89
3.7 MPTP-induzierte Veränderungen der Tyrosinhydroxylase-Aktivität 90
3.8 Zeitverlauf des MPTP-Metabolismus 91
3.9 Effekte von Selegilin auf den MPTP-Metabolismus 92
3.10 Neurotransmitter-Veränderungen im Zeitverlauf nach MPTP (DA, DOPAC, HVA und Serotonin) 94
3.11 Effekte von MPTP auf den Dopamin-Umsatz im Zeitverlauf über 28 Tage 95
3.12 Effekte von MPTP auf die Extrazellularwerte von Dopamin, DOPAC, HVA 97
3.13 Effekte von MPTP auf die Hydroxylradikalbildung 98
3.14 Effekte von MPP^+ auf die Extrazellularwerte von DA, DOPAC und HVA 100
3.15 Effekte von MPP^+ auf die Hydroxylradikalbildung 101
3.16 Kavain im MPTP-Modell: Gewichtsverlauf 103
3.17 Kavain im MPTP-Modell: Lokomotorische Aktivität 104
3.18 Kavain im MPTP-Modell: Neurotransmitter-Veränderungen (DA, DOPAC und HVA) . 106
3.19 Kavain im MPTP-Modell: Dopamin-Turnover 107
3.20 Kavain im MPTP-Modell: Neurotransmitter-Veränderungen (Serotonin, 5-HIAA und Turnover) 108
3.21 Kavain im MPTP-Modell: TH-Immunreaktivität und Nissl-Färbung 109
3.22 Kavain im MPTP-Modell: Mikrophotographien der Substantia nigra 110
3.23 Effekte von MPTP in IL-6 (-/-) Mäusen: Lokomotorische Aktivität 112
3.24 Effekte von MPTP in IL-6 (-/-) Mäusen: Neurotransmitter-Veränderungen (DA, DOPAC und HVA) 113
3.25 Effekte von MPTP in IL-6 (-/-) Tieren: TH-Immunreaktivität und Nissl-Färbung 114
3.26 Effekte einer 6-OHDA-Stimulation auf die Hydroxylradikalproduktion 116

3.27 Effekte einer 6-OHDA-Stimulation auf Peroxynitrit-Entstehung 117
3.28 Effekte einer 6-OHDA-Stimulation auf die Hydroxylradikalproduktion in TNF-α (-/-) Mäusen 119
3.29 Effekte einer 6-OHDA-Stimulation auf die Peroxynitrit-Entstehung in TNF-α (-/-) Mäusen 120
3.30 Effekte einer 3-NP-Stimulation auf die Hydroxylradikalbildung 122
3.31 Effekte von Reserpin/AMPT und GBR 12909 auf die Gewebespiegel von DA, DOPAC und HVA 125
3.32 Effekte von Reserpin/AMPT und GBR 12909 auf die Extrazellularwerte von DA und 2,3-DHBA 126
3.33 Effekte von Tyramin auf die Extrazellularspiegel von DA, DOPAC und HVA 128
3.34 Effekte von Tyramin auf die Hydroxylradikalbildung 129
3.35 Effekte von Tyramin auf die Extrazellularspiegel von DA, DOPAC und HVA in MPTP-geschädigten Tieren 130
3.36 Effekte von Tyramin auf die Hydroxylradikalbildung in MPTP-geschädigten Tieren 131
3.37 Effekte von Tyramin auf die Extrazellularspiegel von DA, DOPAC und HVA in Tranylcypromin-vorbehandelten Tieren 132
3.38 Effekte von Tyramin auf die Hydroxylradikalbildung in TC-vorbehandelten Tieren 133
3.39 Einfluss einer Subthalamicus-Läsion auf die striatalen Spiegel von DA, DOPAC und HVA 136
3.40 Einfluss einer Subthalamicus-Läsion auf die striatalen Spiegel von 2,3-DHBA und Glutamat 137
3.41 Einfluss einer Subthalamicus-Läsion auf die nigralen Spiegel von DA, DOPAC und HVA 139
3.42 Einfluss einer Subthalamicus-Läsion auf die nigralen 2,3-DHBA-Spiegel 140
3.43 Effekte einer Subthalamicus-Läsion auf die Gewebewerte von DA, DOPAC und HVA 141

Tabellenverzeichnis

2.1 Zielkoordinaten für das Striatum und die Substantia nigra 59

2.2 Zusammensetzung der Calcium-reduzierten Ringerlösung 63

2.3 Zusammensetzung der Perfusionslösung für die Kalium-Stimulation 75

3.1 Vorgegebene Zusammensetzung der mobilen Phase auf Methanolbasis 79

3.2 Zusammensetzung der mobilen Phase mit optimalem Trennergebnis 80

3.3 Retentionszeiten der Substanzen bei Bestimmung mittels mobiler Phase auf Methanolbasis 81

3.4 Striatale Spiegel von DA, DOPAC und HVA in Kontroll- und akut MPTP-behandelten Tieren 88

3.5 Basislinienwerte der experimentellen Gruppen 96

3.6 Basislinienwerte der experimentellen Gruppen nach in-vivo Perfusion mit 5 mM Natriumsalicylat 98

3.7 Kavain: Experimentelle Gruppen 102

3.8 Gewebespiegel von DA und Serotonin sowie ihren Metaboliten 104

3.9 MPP^+-Gewebespiegel nach Kavain-Behandlung 105

3.10 Behandlungsschemata zum Vergleich von wt- und IL-6 (-/-) Tieren 111

3.11 6-OHDA: Basislinienwerte der experimentellen Gruppen im Vergleich (C57BL/6-Mäuse) 115

3.12 6-OHDA: Basislinienwerte der experimentellen Gruppen im Vergleich (TNF-α (-/-) Mäuse) 118

3.13 3-NP: Basislinienwerte der experimentellen Gruppen im Vergleich 121

3.14 Malonat: Basislinienwerte der experimentellen Gruppen im Vergleich 124
3.15 Experimentelle Gruppen 134
3.16 NST: Basislinienwerte der experimentellen Gruppen bei Messung im Striatum 135
3.17 NST: Basislinienwerte der experimentellen Gruppen bei Messung in der Substantia nigra 138

Abkürzungsverzeichnis

ADP ..... Adenosindiphosphat
ATP ..... Adenosintriphosphat
Kat ..... Katalase
COMT ..... Catechol-O-methyltransferase
DA ..... Dopamin
DAT ..... Dopamintransporter
DHBA ..... Dihydroxybenzoesäure
DNA ..... Desoxyribonucleinsäure
DOPAC 3,4-Dihydroxyphenylessigsäure
EDTA ..... Ethylendiamintetraessigsäure
GPe ..... Globus pallidus externus
GPi ..... Globus pallidus internus
GSH ..... Glutathion/reduziertes Glutathion
GSH Per ..... Glutathion-Peroxidase
GSSG ..... oxidiertes Glutathion
GSSG Red ..... Glutathion-Reduktase
H_2O_2 ..... Wasserstoffperoxid
5-HIAA 5-Hydroxyindolessigsäure
HPLC ..... Hochleistungsflüssigchromatographie
5-HT ..... Serotonin
HVA ..... Homovanillinsäure
i.p. ..... intraperitoneal
IL ..... Interleukin
IR ..... Immunreaktivität
KA ..... Kainsäure

Kav ..... Kavain

MAO ..... Monoaminoxidase

MP ..... Morbus Parkinson

$MPDP^+$ 1-Methyl-4-phenyl-2,3-dihydropyridinium-Ion

MPP^+ 1-Methyl-4-phenylpyridinium-Ion

MPTP 1-Methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridin

mRNA ..... messenger RNA

NaI ..... Natriumiodid

3-NP 3-Nitropropionsäure

NMDA ..... N-methyl-D-aspartat

$NO/NO^{\cdot}$ ..... Stickstoffmonoxid/Stickstoffoxidradikal

NOS ..... NO-Synthase

NST ..... Nucleus subthalamicus

O_2 ..... Sauerstoff

$O_2^{\cdot -}$ ..... Superoxid-Anionradikal

$OH^{\cdot}$ ..... Hydroxylradikal

6-OHDA 6-Hydroxydopamin

$ONOO^-$ ..... Peroxynitrit

OPA ..... *o*-Phthaldialdehyd

PBS ..... Phosphate buffered saline

PD ..... Parkinson's Disease

PET ..... Positronen-Emissionstomographie

ROS ..... reaktive Sauerstoffspezies

s.c ..... subcutan

Sal ..... physiologische Kochsalzlösung

SEM ..... mittlerer Standardfehler

SN ..... Substantia nigra

SNc ..... Substantia nigra pars compacta

SNr ..... Substantia nigra pars reticularis

SOD ..... Superoxiddismutase

SPECT ..... Single-Photon-Emissions-Computertomographie

$SQ^{\cdot}$ ..... Semichinonradikal

TH ..... Tyrosinhydroxylase
Thal ..... Thalamus
TNF ..... Tumor-Nekrose-Faktor
UPM ..... Umdrehungen pro Minute
VMAT ..... vesikulärer Monoamintransporter
ZNS ..... Zentralnervensystem

Chemikalien-Liste

1-Methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridin * HCl (MPTP)	Research Biochemicals International (RBI), Köln
2,3- und 2,5-Dihydroxybenzoesäure (DHBA)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
3,3'-Diaminobenzidin	Boehringer, Mannheim
3-Nitrotyrosin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
4-Nitrophenylalanin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
5-Hydroxyindolessigsäure (5-HIAA)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
6-Hydroxydopamin * HBr (6-OHDA)	Research Biochemicals International (RBI) Köln/Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Acetonitril gradient grade	Merck, Darmstadt
Aspartat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Borsäure	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Chloralhydrat	Merck, Darmstadt
Dihydroxyphenylessigsäure (DOPAC)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Dikaliumhydrogenphosphat (K_2HPO_4)	Merck, Darmstadt
Di-Natrium-EDTA	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Dinatriumhydrogenphosphat (Na_2HPO_4 * 2 H_2O)	Merck, Darmstadt
Dopamin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen

Eisensulfat (Fe_2SO_4)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Eisessig	Merck, Darmstadt
Ethanol 96%	Merck, Darmstadt
Ethylenglycol	Merck, Darmstadt
Formaldehyd 37 % stabilisiert	Merck, Darmstadt
Gelatine	Merck, Darmstadt
Glutamat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Glycerin 87%	Merck, Darmstadt
Homovanillinsäure (HVA)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Kaliumdihydrogenphosphat (KH_2PO_4)	Merck, Darmstadt
(±)-Kavain	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Kochsalzlösung, isotonische (NaCl)	Braun, Melsungen
Kresyviolett	Merck, Darmstadt
Methanol gradient grade	Merck, Darmstadt
α-Methyl-*p*-Tyrosin (AMPT)	Fluka, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Methylphenylpyridinium (MPP^+) iodid	Research Biochemicals International (RBI), Köln
Natriumacetat	Merck, Darmstadt
Natriumazid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Natriumdihydrogenphosphat (NaH_2PO_4 * 2 H_2O)	Merck, Darmstadt
Oktansulfonsäure (Natriumsalz)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Perchlorsäure ($HClO_4$) 60%	Merck, Darmstadt
Phosphorsäure	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
D-Phenylalanin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
o-Phthaldialdehyd	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Reserpin	Fluka, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen

Saccharose	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Salicylsäure/Natriumsalicylat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Salzsäure 37 %	Riedl-de Haen, Seelze
Serotonin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Triethylamin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Triton X-100	Fluka, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Tryptanblau	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Tyramin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
m-, *o*- und *p*-Tyrosin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Wasserstoffperoxid (H_2O_2)	Fluka, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Xylol	Merck, Darmstadt

Publikationen

Paper

Schmidt N and Ferger B. Neurochemical findings in the MPTP model of Parkinson's disease. J Neural Transm 2001, 108, 1263-82.

Xia XG, Schmidt N, Teismann P, Ferger B and Schulz JB. Dopamine mediates striatal malonate toxicity via dopamine transporter-dependent generation of reactive oxygen species and D_2 but not D_1 receptor activation. J Neurochem 2001, 79, 63-70.

Schmidt N and Ferger B. Neuroprotective effects of (±)-kavain in the MPTP mouse model of Parkinson's disease. Synapse 2001 ,40, 47-54.

Schmidt N and Ferger B. The biogenic trace amine tyramine induces a pronounced hydroxyl radical production *in-vivo* in mouse striatum. (In Vorbereitung).

Abstracts/Poster

Schmidt N and Ferger B. Investigation of the pharmacological efficacy of the natural compound (±)-kavain in Parkinson's disease. Arch Pharm Pharm Med Chem 1999, 332, Suppl 2, 42.

Schmidt N, Teismann P and Ferger B. Effects of selegiline, (±)-kavain, meloxicam and acetylsalicylic acid on the conversion of MPTP to its toxic metabolite MPP^+ *in-vivo* and the relevance to the MPTP-model of Parkinson's disease. Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol 2000, 361 Suppl 4, R 104.

Schmidt N, Themann C and Ferger B. Tyramine induces a pronounced hydroxyl free radical production *in-vivo*: a reverse microdialysis study to elucidate risk factors in Parkinson's disease. Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol 2001, 363 Suppl 4, R 92.

Schmidt N and Ferger B. (±)-Kavain antagonizes MPTP-induced neurotoxicity in black mice. Abstracts Soc for Neurosci 2000, 25, 540, 19.

Schmidt N, Themann C, Teismann P and Ferger B. Improved HPLC-methodology for the detection of hydroxyl free radicals in biological samples. Arch Pharm Pharm Med Chem 1999, 331 Suppl 1, 61.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name:	**Nicole Schmidt**
Anschrift:	**Im Gefälle 36a**
	35039 Marburg
geboren am:	**14.02.1972**
Geburtsort:	**Korbach**
Staatsangehörigkeit:	**deutsch**
Familienstand:	**ledig**

Promotion

Mai 1999 - Mai 2002	Beginn der Promotion an der Philipps-Universität Marburg am Institut für Pharmakologie und Toxikologie unter Leitung von PD Dr. B. Ferger

Approbation

Mai 1999	Pharmazeutische Prüfung, Approbation als Apothekerin

Praktisches Jahr

Nov. 1998 - Apr. 1999	2. Hälfte des Praktischen Jahres an der Philipps-Universität, am Institut für Pharmakologie, AK Prof. K. Kuschinsky
Mai 1998 - Okt. 1998	1. Hälfte des Praktischen Jahres in der Brunnen-Apotheke in Hofgeismar

Hochschulstudium

bis Apr. 1998	Hauptstudium, Zweites Staatsexamen
bis Apr. 1996	Grundstudium, Erstes Staatsexamen
Apr. 1994	Immatrikulation zum Studium der Pharmazie an der Philipps-Universität Marburg

Ausbildung

März 1994	Prüfung zur Pharmazeutisch-technischen Assistentin
Sept. 1993 - März 1994	Praktische PTA-Ausbildung in der Kilian-Apotheke in Korbach
Sept. 1991 - Aug.1993	PTA-Schule der Deutschen Angestellten Akademie (DAA) in Marburg

Schulausbildung

Jun. 1991	Abitur
1982 - 1991	Besuch des Gymnasiums Alte Landesschule Korbach
1978 - 1982	Besuch der Humboldt-Schule in Korbach