

**Der Einfluss fluorsubstituierter MDMA-Derivate  
auf die motorische Parkinsonsymptomatik  
von Ratten**

**Dissertation**

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der Eberhard Karls Universität Tübingen  
zur Erlangung des Grades eines  
Doktors der Naturwissenschaften  
(Dr. rer. nat.)

vorgelegt von  
Katrín Gittinger  
aus Bietigheim

Tübingen  
2015

Tag der mündlichen Qualifikation

03.06.2015

Dekan:

Prof. Dr. Wolfgang Rosenstiel

1. Berichterstatter:

Prof. Dr. Hanspeter A. Mallot

2. Berichterstatter:

Prof. Dr. Ulrich Nagel

## **Danksagung**

Ich bedanke mich herzlich bei Herrn Professor Hanspeter Mallot der die Rolle des Erstgutachters übernommen hat.

Des Weiteren möchte ich Frau PD Dr. Eva Küppers danken, die mir ermöglicht hat meine Experimente in der Abteilung Neuroanatomie im anatomischen Institut durchzuführen und mir Einblick in das Gebiet der Gliaforschung verschaffte.

Herrn PD Dr. Lothar Just danke ich für seine unkomplizierte und sehr hilfreiche Unterstützung am Ende meiner Arbeit.

Bei Herrn Dr. von Ameln-Mayerhofer möchte ich mich für die Betreuung meiner Arbeit und die vielen hilfreichen Diskussionen bedanken.

Mein großer Dank gilt Herrn Professor Ulrich Nagel für die Bereitstellung des interessanten Themas und seiner großen Unterstützung während der Anfertigung dieser Arbeit.

Ich möchte mich bei meinen Kollegen aus der Chemie bedanken, die mich freundlich im Institut aufgenommen und unterstützt haben. Mein großer Dank gilt Matthias Löffler für seine Hilfe mit der HPLC und den Labortieren.

Insbesondere möchte ich mich bei Nadine Lettfuss, Sonja Seeger-Armbruster, Katrin Riedinger und Rüdiger Sadler für die Korrekturarbeiten und die moralische Unterstützung in der Endphase dieser Arbeit bedanken und hoffe, dass unsere tollen Freundschaften auch in Zukunft bestehen bleiben, egal wo es uns hin verschlägt.

Des weiteren möchte ich allen danken, die mich während der letzten anstrengenden Monate unterstützt haben, vor allem meinem Bruder Daniel auf den ich mich stets verlassen konnte, Sabrina Hennig die mich immer mit vielen großen und kleinen Aufmerksamkeiten motiviert hat und Dominik Henneberger für seine Geduld, Rückhalt und Aufbau.

Der abschließende Dank gilt meinen Eltern die mich stets unterstützten und an mich geglaubt haben und mir so mein Studium und die Promotion ermöglicht haben.

Ich widme diese Arbeit meiner Oma.

# Inhaltsverzeichnis

## Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis.....	3
1. Zusammenfassung.....	1
2. Einleitung.....	3
2.1 Morbus Parkinson - Symptomatik und Pathogenese.....	3
2.1.1 Basalganglien.....	5
2.1.2 Pathologie der BG bei PD.....	8
2.2 Neurotransmitter.....	8
2.2.1 Dopamin (DA).....	9
2.2.2 Serotonin (5-Hydroxytryptamin, 5-HT) .....	9
2.2.2.1 5-HT <sub>1A</sub> -Rezeptor.....	11
2.2.2.2 SERT.....	11
2.3 Therapie des Morbus Parkinson.....	12
2.3.1 Selegilin (Deprenyl®, Jumexal® ).....	13
2.4 Tiermodelle des Morbus Parkinson.....	15
2.4.1 6-OHDA-induziertes Parkinsonmodell.....	16
2.4.2 Haloperidol-induziertes Parkinsonmodell.....	17
2.5 Übersicht: Amphetamine/ Methamphetamin/ MDMA .....	18
2.5.1 Amphetamine allgemein.....	19
2.5.2 Amphetamin.....	19
2.5.3 Methamphetamin.....	21
2.5.4 MDMA.....	22
2.5.5 MDA.....	26
2.5.6 MDE, MDEA.....	26
2.5.7 Fluorierte Derivate.....	27
2.5.7.1 Difluor-Selegilin, DFS (Di- Fluor- N- Propargyl- Amphetamin).....	28
2.5.7.2 MDFPPA (N-Methyl-Difluor-Phenylpropan-amin) und DFA (Difluor- Amphetamin).....	28
2.6 Synthese der fluorierten Derivate.....	29
3. Ziel und Fragestellung.....	30
4. Material&Methoden.....	31
4.1 Versuchstiere und Haltungsbedingungen.....	31
4.2 Übersicht der Experimente.....	31
4.3 Verwendete Substanzen.....	32
4.3.1 Haloperidol.....	32
4.3.2 WAY100635.....	32
4.3.3 Citalopram.....	33
4.3.4 6-Hydroxydopamin.....	33
4.3.5 Desipramin.....	33
4.3.6 Anästhetika und Analgetika.....	34
4.3.6.1 Fentanyl.....	34
4.3.6.2 Carprofen.....	34
4.3.6.3 Isofluran .....	34
4.3.7 MDMA-Derivate.....	34
4.3.7.1 Difluorselegilin.....	34

4.3.7.2	Difluormetamphetamin und Difluoramphetamin .....	35
4.4	Versuchsreihe Katalepsie.....	35
4.5	Versuchsreihe Läsion.....	38
4.5.1	Stereotaktische Operation.....	38
4.5.2	Stepping-Test.....	40
4.5.3	Gehirnpräparation.....	42
4.5.4	HPLC.....	43
4.5.4.1	Allgemein.....	43
4.5.4.2	Probenaufbereitung.....	44
4.5.4.3	Beschreibung der HPLC-Anlage.....	44
4.6	Auswertung.....	45
4.6.1	Versuchsreihe Katalepsie.....	45
4.6.2	Versuchsreihe Läsion .....	46
5.	Ergebnisse.....	47
5.1	Versuchsreihe Katalepsie mit Haloperidol .....	47
5.1.1.	DFS.....	47
	Vergleich der Enantiomere im „Crossover“-Design (0,1,2,4 mg).....	47
5.1.2	Difluor-Metamphetamin (MDFPPA).....	53
5.1.2.1	R&S Enantiomere 0,1,2,4mg im Crossoverdesign.....	53
5.1.2.2	S-MDFPPA 0,1,2 mg konstante Dosierungen.....	57
5.1.2.3	Vergleich der verschiedenen Behandlungs-Design bei S-MDFPPA.....	61
5.1.3	Difluor-Amphetamin (DFA).....	63
5.1.3.1	R&S Enantiomere 0,1,2,4 mg im Crossoverdesign.....	63
5.1.3.2	Enantiomeremischungen mit Finaldosis 0,1,2,4 mg.....	68
5.1.3.3	Enantiormischungen - mit Finaldosis 4-8mg.....	71
5.1.3.4	DFA Enatiomere 4 mg mit Antagonisten.....	74
5.2	Versuchsreihe MFB- Läsionsmodell und Steppingtest.....	76
5.2.1	S-Difluor-Metamphetamin 1,2,4 mg kontinuierlich.....	76
5.2.2	S- Difluor-Amphetamin 1, 2, 4 mg.....	81
5.2.3	MDFPPA, DFA und Kontrolle im direkten Vergleich.....	86
5.3	HPLC.....	88
6.	Diskussion.....	91
6.1	DFS .....	91
6.1.1	R- und S-DFS im Katalepsie-Modell.....	91
6.2	MDFPPA.....	93
6.2.1	R- und S-MDFPPA im Katalepsie-Modell.....	93
6.2.2	S-MDFPPA im unilateralen 6-OHDA-Modell.....	98
6.3	DFA.....	102
6.3.1	R- und S-DFA im Katalepsie-Modell.....	102
6.3.2	S-DFA im unilateralen 6-OHDA-Modell.....	105
6.4	HPLC.....	110
6.5	Schlussfolgerung.....	113
7.	Literaturverzeichnis.....	115

## Abkürzungsverzeichnis

AADC	L-Aminosäure-Decarboxylase
Abb.	Abbildung
AC	Adenylatzyklase
aCPu	Anteriores Caudatoputamen
ADHS	Aufmerksamkeitsdefizit und Hyperaktivitätssyndrom
Amphetamin	alpha-Methylphenylethylamin
ANOVA	Varianzanalyse (engl. Analysis of Variance)
aS	Anteriores Striatum
BG	Basalganglien
ca.	Circa
CIT	Citalopram
cm	Zentimeter
COMT	Catechol-O-Methyl-Transferase
CPP	Konditionierte Platzpräferenz (engl.: conditioned place Preference)
CYP 450	Cytochrom P450
d.h.	Das heißt
D <sub>1</sub>	Dopamin 1 Rezeptor
D <sub>2</sub>	Dopamin 2 Rezeptor
HHMA	3,4-Dihydroxymethamphetamin
DA	Dopamin
DAT	Dopamin-Transporter
DFA	Difluor-Amphetamin
DFS	Difluor-Selegilin ( Di- Fluor- N- Propargyl- Amphetamin)
DHT	5,7-Dihydroxytryptamine
DMS	Desmethyl-Selegilin
DOPAC	3,4-Dihydroxyphenylethylamin
DV	Dorsoventral
EDFPPA	N-ethyl-3,4-Difluor-1-phenylpropan-2-amin
engl.	Englisch
Evtl.	Eventuell
FC	Frontaler Kortex

GABA	$\gamma$ -Aminobuttersäure
Gpe	Globus pallidus externus
Gpi	Globus pallidus internus
GSH	Gluthation
h	Stunde
HMA	4-Hydroxy-3-Methoxy-Amphetamin
HMMA	4-Hydroxy-3-Methoxy-Methamphetamin
5-HIAA	5-Hydroxyindolessigsäure
5-HT	5-Hydroxytryptamin; Serotonin
HC	Hippocampus
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (engl.: High Performance Liquid Chromatography)
HVA	Homovanilinsäure
i.d.R.	In der Regel
i.p.	Intraperitoneal
IAS	Ipsilaterale Asymmetrie-Score
IPS	Idiopathisches Parkinson Syndrom
kf	Korrekturfaktor
kg	Kilogramm
KG	Körpergewicht
L	Lateral
L-DOPA	L-3,4- Dihydroxyphenylalanil
LD	Letale Dosis
LTP	Langzeitpotenzierung (engl. Longterm potentiation)
3-MT	3-Methoxytyramin
MAO	Monoaminoxidase
MDA	3,4-Methylendioxyamphetamin
MDE	3,4-Methylendioxy-N-ethylamphetamin
MDFPPA	N-methyl-3,4-Difluor-1-phenylpropan-2-amin
MDMA	3,4- Methylendioxymethamphetamin
MFB	Mittleres Vorderhirnbündel (engl.: middle forebrain bundle)
mg	Milligramm
min	Minute

ml	Milliliter
mm	Millimeter
MPTP	1-Methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridin
n	Anzahl
DHE	N-Ethyl-3,4-Dihydroxy-amphetamin
HME	N-Ethyl-4-Hydroxy-3-Methoxyamphetamin
NA	Noradrenalin
NAcc	Nukleus accumbens
NAT	Noradrenalin-Transporter
NMDA	N-Methyl-D-aspartate
OP	Operation
PBS	Phosphat buffered Saline
PCPA	<i>para</i> -chlorophenylalanin
pCPu	Posteriores Caudatoputamen
PD	Parkinson Disease
PEA	Phenylethylamin
PFC	Präfrontaler Kortex
PPN	Pedunculopontiner Nukleus
pS	Posteriores Striatum
Rpm	Rounds per minute
s.c.	Subkutan
s.o.	Siehe oben
s.u.	Siehe unten
sek	Sekunde
SERT	Serotonin-Transporter
SNc	Substantia nigra pars compacta
SNr	Substantia nigra pars reticulata
SSRI	Selektiver Serotonin Reuptake Inhibitor
STN	Subthalamischer Nukleus
STR	Striatum
TH	Tyrosinhydroxylase
THAL	Thalamus
TPH	Tryptophan-Hydroxylase
u.a.	Unter anderem



UAW	Unerwünschte Arzneimittelwirkung
VMAT	Vesikulärer Monoaminotransporter
WAY100635	(N-2-[4-(2-methoxyphenyl)-piperazin-1-yl]-ethyl-N-(pyridin-2-yl)- cyclohexancarboxamid
z.B.	Zum Beispiel
ZNS	Zentralnervensystem
µg	Microgramm
µl	Microliter

## 1. Zusammenfassung

Morbus Parkinson ist eine der häufigsten neurodegenerativen Erkrankungen der Gegenwart, deren Ursache bislang noch nicht vollständig geklärt ist. Die Schwerpunkte der Forschung liegen in der Aufklärung der zugrunde liegenden Pathomechanismen sowie der Verbesserung und Aufdeckung neuer Therapiemöglichkeiten. Die Entdeckung der guten antiparkinsonoiden Wirkung von MDMA (3,4-Methylenedioxyamphetamin) wurde bereits in mehreren Tiermodellen nachgewiesen.

Bedenken hinsichtlich der Neurotoxizität sowie die Problematik einer dem Betäubungsmittelgesetz unterliegenden Substanz als Therapeutikum führte zu der Entwicklung neuer modifizierter MDMA-Derivate, die als Grundlage für ein sicheres Medikament dienen können.

In der vorliegenden Arbeit wurden fluorsubstituierte MDMA-Derivate in zwei Tierversuchsmodellen mit Ratten auf ihre antiparkinsonoide Wirkung getestet. Die verwendeten Substanzen, unterscheiden sich am Alkyl-Rest an der Aminogruppe, zudem sollten ihre einzelnen Enantiomere<sup>1</sup> untersucht werden.

Es soll vor allem geklärt werden, welche Effekte sich durch die unterschiedlichen Molekülstrukturen auf das motorische Verhalten der Tiere ergeben. Zudem sollen Aspekte der Pharmakodynamik und Neurotoxizität untersucht werden.

Die Fluorierung am Phenylring anstelle der Methylenedioxy-Gruppe verspricht zum einen eine Umgehung/Verhindern der Neurotoxizität, da der Abbaumechanismus wie beim MDMA, hier nicht angreifen kann. Zum anderen bewirkt die Fluorierung eine Erhöhung der Lipophilie des Moleküls, wodurch es die Blut-Hirn-Schranke leichter passieren kann und somit eine schnellere Wirkung mit geringerer Dosis wahrscheinlich wird.

Die Untersuchungen zeigen, dass die Wirkung der Substanzen sowohl von der Dosis, als auch von der Länge des Alkyl-Rest am Stickstoffatom sowie der Chiralität abhängig ist.

Im Katalepsie-Test erwies sich das fluorierte Selegilin-Derivat DFS, eine Kombination aus dem Medikament Selegilin und MDMA als schwach wirksam und mit Verdacht auf Kumulation.

Die beiden Substanzen DFA (fluoriertes Amphetamin) und MDFPPA (fluoriertes MDMA) zeigten dagegen eine stark enantioselektive antiparkinsonoide Wirkung, wobei sich das jeweilige S-Enantiomere als das Wirksame erwies. R-DFA zeigte im Vergleich zum unwirksamen R-MDFPPA allerdings eine starke akute Wirkung in hoher Dosis.

---

<sup>1</sup> Enantiomere sind spiegelbildlich gebaute Isomere eines Moleküls, die sich in vielen physikalischen Eigenschaften gleichen, in ihren physiologischen jedoch unterscheiden. Sie kommen als linksdrehendes S-Enantiomer und rechtsdrehendes R-Enantiomer vor. Das Racemat ist i.d.R. die 1:1 Mischung der Enantiomere (Mortimer & Müller, 2001).

## 1. Zusammenfassung

Da sich bei beiden Substanzen ein Verdacht auf evtl. Kumulation der Substanz zeigte, wurden zudem bei S-MDFPPA zwei Behandlungsmethoden miteinander verglichen. Bei einer erfolgte die Dosisgabe konstant bei der anderen im sog. Crossover-Design, wobei zu erkennen war, dass die konstante Behandlung Kumulationseffekte leichter erkennen lässt.

Bei DFA wurde zudem detailliert das Zusammenspiel der Enantiomere in Enantiomermischungen mit unterschiedlichen Mischungsverhältnissen untersucht, wobei festzustellen war, dass ein großer oder gleicher R-Anteil die Wirkung herabsetzt und das S-Enantiomer alleine immer noch die beste Wirkung zeigt.

Weiterführende Untersuchungen zu den Bindungseigenschaften von DFA an serotonergen Zielstrukturen wurden mit den Antagonisten WAY100635 und Citalopram durchgeführt, wobei eine Abhängigkeit sowohl von 5-HT<sub>1A</sub>-Rezeptor, als auch von SERT bestätigt wurde.

Im unilateralen 6-Hydroxydopamin-Modell zeigte sich bei S-DFA und -MDFPPA ebenfalls eine dosisabhängige Verbesserung der Parkinsonsymptomatik.

Eine mittlere Dosis (2mg) zeigt bei beiden Versuchsreihen einen stabileren Verlauf und weist auf das Wirkoptimum hin. Hohe Dosierungen leiten eher zu einer Übersteuerung und somit zu einem ungleichmäßigeren Wirkungsverlauf.

Eine Untersuchung auf potentielle Neurotoxizität mittels HPLC-Analyse zeigte keinen direkten Verdacht auf eine toxische Wirkung der Substanzen.

### 2. Einleitung

Der Schwerpunkt dieser Arbeit liegt auf der Untersuchung der antiparkinsonoiden Wirkungsweise verschiedener ringssubstituierter MDMA-Derivate. Diese Motivation hat ihren Ursprung in sporadischen Berichten über eine starke antiparkinsonoide und antidyskinetische Wirkung von MDMA. Da MDMA zwar nicht als Arzneimittel in Frage kommt, aber u.U. eine neue pharmakologische Modellsubstanz darstellt, könnte die Erforschung und Entwicklung neuer Substanzen, welche sich von MDMA ableiten, vielversprechend sein.

In der Einleitung soll zunächst auf das Krankheitsbild des Morbus Parkinson und die aktuelle Therapiemöglichkeiten eingegangen werden, die nötigen Grundlagen über Anatomie und Physiologie der Basalganglien (BG) sowie der wichtigsten Transmittersysteme erläutert werden. Zudem sollen derzeitige Parkinsonmodelle in der Forschung, und detaillierter die hier verwendeten Tiermodelle, angesprochen werden.

Des Weiteren wird ein Hauptaugenmerk auf die Substanzen aus der Familie der Amphetamine gelegt und die Problematik ihrer Rolle als potentielle Suchtmittel, aber auch als Hoffnungsträger in der Therapie, abgegrenzt werden. Zudem werden die hier verwendeten modifizierten Derivate im Vergleich mit ihren bekannten Muttersubstanzen genauer erklärt.

#### 2.1 Morbus Parkinson - Symptomatik und Pathogenese

Bereits 1817 wurde das Krankheitsbild von dem britischen Landarzt James Parkinson beschrieben, der die Kardinalsymptome in „*an essay on the shaking palsy*“ zusammenfasste (Parkinson, 2002), was als „Schüttellähmung“ übersetzt werden kann. Ungefähr 50 Jahre später sprach der französische Arzt Charcot, in Anerkennung an die Arbeit Parkinsons, das erste Mal von Morbus Parkinson (engl.: Parkinsons Disease, PD) (Kempster et al., 2007). Es handelt sich um eine chronische, progressive, neurodegenerative Krankheit, bei der es zu einer Degeneration der dopaminergen Neurone vor allem in der Substantia nigra pars compacta (SNc) der Basalganglien (BG) kommt. Der daraus resultierende Mangel an Dopamin (DA) führt zu einer Dysregulation im Vorderhirn, was zu der Ausprägung der bekannten Parkinson-Symptome Rigor, Tremor und Akinesie sowie der posturalen Instabilität führt (Jankovic, 2008; Schmidt, 2005).

Der demografische Wandel der letzten Jahrzehnte macht eine intensive Forschung auf dem Gebiet altersbedingter neurologischer Krankheiten notwendig. Neben Morbus Alzheimer gilt Morbus

## 2. Einleitung

Parkinson, mit einer Prävalenz (Anteil der erkrankten Personen in einer Population) von 1%, als die zweithäufigste neurodegenerative Erkrankung (Hague, 2005).

Das Risiko an Parkinson zu erkranken ist sowohl vom Alter, als auch vom Geschlecht abhängig. In der Altersgruppe der 65-jährigen sind 1-2% erkrankt, bei den über 85-jährigen bereits 2,6%. Dabei sind Männer häufiger betroffen als Frauen. Die Inzidenz (Anzahl der Neuerkrankungen in einem bestimmten Zeitraum) von PD ist somit stark altersabhängig und wird bei über 55-jährigen mit jährlich 110 bis 330 Fällen und bei über 80-jährigen mit 400 bis 500 Fällen an Neuerkrankungen pro 100.000 Einwohner angegeben (Mayeux, 2003). Ein Auftreten der ersten Symptome vor dem 40. Lebensjahr ist relativ selten. Die Hälfte der Betroffenen erkrankt erst nach dem 60. Lebensjahr (Lozano and Kalia, 2005).

Neben den motorischen Symptomen kommt es zu einer Vielzahl nicht-motorischer Symptome. Dazu gehören vegetative Dysfunktionen sowie kognitive und neuropsychiatrische Störungen, Schlafstörungen und sensorische Anomalien (Jankovic, 2008; Schmidt, 2005).

Werden die ersten motorischen Symptome sichtbar, sind bereits 50-70% der dopaminergen Neurone degeneriert, was einem striatalen DA-Verlust von 80% entspricht (Dunnett and Björklund, 1999; Playfer, 1997). Das Gehirn zeigt eine bemerkenswerte Fähigkeit, den Verlust über Jahre zu kompensieren. Die Dauer von der Manifestation der ersten Symptome bis zum Tod beträgt ca. 9 Jahre. Die Todesursache bei PD sind meist mit Bettlägerigkeit zusammenhängende (auch nosokomial erworbene) Infektionen wie z.B. Pneumonien (Jellinger et al., 2002).

Zudem sind beim Patienten auch andere Transmittersysteme betroffen. Es kommt zu einer Abnahme der Konzentration von Noradrenalin (NA) um 27-56% und von Serotonin (5-HT) um 27-59% in einzelnen Bereichen des Hypothalamus (Shannak et al., 1994).

Die Gründe für die neuronale Degeneration sind bis heute unklar, wodurch nur eine symptomatische, nicht aber eine kausale Therapie möglich ist. Aktuell gibt es mehrere Behandlungsmethoden des Morbus Parkinson. Die medikamentöse Therapie verbessert die Symptomatik bisher nur auf Zeit und ist zudem mit starken Nebenwirkungen verbunden. Trotz intensiver Forschung ist eine Heilung immer noch nicht möglich.

Die Ursache der dopaminergen Degeneration ist bei dem Großteil (90-95%) der Patienten nicht vollständig geklärt. Man spricht dann vom idiopathischen oder sporadischen Parkinsonsyndrom

## 2. Einleitung

(IPS). Vermutet werden nach dem jetzigen Stand der Forschung multifaktorielle Ursachen, wie Umwelteinflüsse und genetische Prädisposition, welche über mitochondriale Dysfunktion, Glutamat- Exzitotoxizität, Inflammation und oxidativen Stress zur Apoptose der dopaminergen Neurone führen (Dauer and Przedborski, 2003; Dunnett and Björklund, 1999; Schapira and Jenner, 2011).

Vom IPS abzugrenzen ist das familiäre Parkinsonsyndrom (ca. 5%), für welches mehrere Gene als Risikofaktoren identifiziert wurden, darunter die bekanntesten *α-Synuclein* und *Parkin*-Gene (Bonifati, 2014; Gasser et al., 2011), und das sekundären Parkinsonsyndrom, welchem definierte Ursachen zugrunde liegen, wie z.B. Toxine, Umweltgifte, Medikamente, Drogen, Traumata oder Tumore (Dauer and Przedborski, 2003).

### 2.1.1 Basalganglien

Die BG sind eine subkortikale d.h. unter dem Kortex liegende Kernstruktur des Gehirns, deren Hauptaufgabe unter anderem das Generieren von Bewegungsabläufen ist. Eine wichtige Rolle spielen sie zudem bei komplexem Verhalten und kognitiven Prozessen.

Funktionell bestehen die BG aus einem Netzwerk verschiedener Regelschleifen, die miteinander verschaltet sind. Neben der skeletomotorischen Schleife (Motorik) gibt es eine okulomotorische (Blickmotorik), zwei assoziative (langfristige Aktionsplanung, Motivation, Bewegungsantrieb und kognitive Leistungen) und eine limbische Schleife (affektive und emotionale Bewertung) (Alexander and Crutcher, 1990; Haber et al., 2005; Kreitzer and Malenka, 2008; Roth and Dicke, 2006). Die motorische nigrostriatale Schleife wird hier aufgrund ihrer wichtigen Bedeutung bei PD im Detail charakterisiert. Eine Darstellung des klassischen BG-Schemas ist in (**Abbildung 1**) zu sehen.

Wie bereits angesprochen, kommt es bei PD zu einer Degeneration der dopaminergen Projektion der SNc in das Striatum (STR), einem Kern der BG. Diese nigrostriatale Verbindung ist Teil der motorischen Schleife, die auch als dorsale BG-Schleife bezeichnet wird.

Vom Kortex ausgehend führt sie über einzelne Kernstrukturen der BG zum Thalamus (THAL) und schließlich wieder zurück zum Kortex. Anatomisch lokalisiert sind die Kerne der BG in den drei Gehirnregionen Telencephalon (Großhirn), Diencephalon (Zwischenhirn) und Mesencephalon (Mittelhirn).

Das Striatum, welches aus einem dorsalen und einem ventralen Teil besteht, gehört zum

## 2. Einleitung

Telencephalon. Der dorsale Teil wiederum ist unterteilt in den Nucleus caudatus und dem Putamen, welche dem Areal eine feine Streifung geben und so zu der Bezeichnung „Striatum“ geführt haben. Bei Nagern handelt es sich um eine einheitliche Struktur, welche als Caudatoputamen bezeichnet wird. Das ventrale Striatum setzt sich aus dem Nucleus accumbens (NAcc) und dem olfaktorischen Tuberculum zusammen. Der Globus pallidus externus (GPe) und Globus pallidus internus (Gpi) bei Primaten, bzw. bei der Ratte Globus pallidus (Smith et al., 1998) und endopedunculären Nucleus (Chesselet, 2002) sowie der subthalamische Nucleus (STN) liegen im Diencephalon.

Zum mesencephalen Teil der BG gehört die Substantia nigra, die in pars compacta (SNc) und Substantia nigra pars reticulata (SNr) unterteilt wird. Namensgebend ist hierbei ihre dunkle Färbung die durch das Pigment Neuromelanin, einem Nebenprodukt der Dopaminsynthese verursacht wird (Blandini et al., 2000; DeLong, 2000).

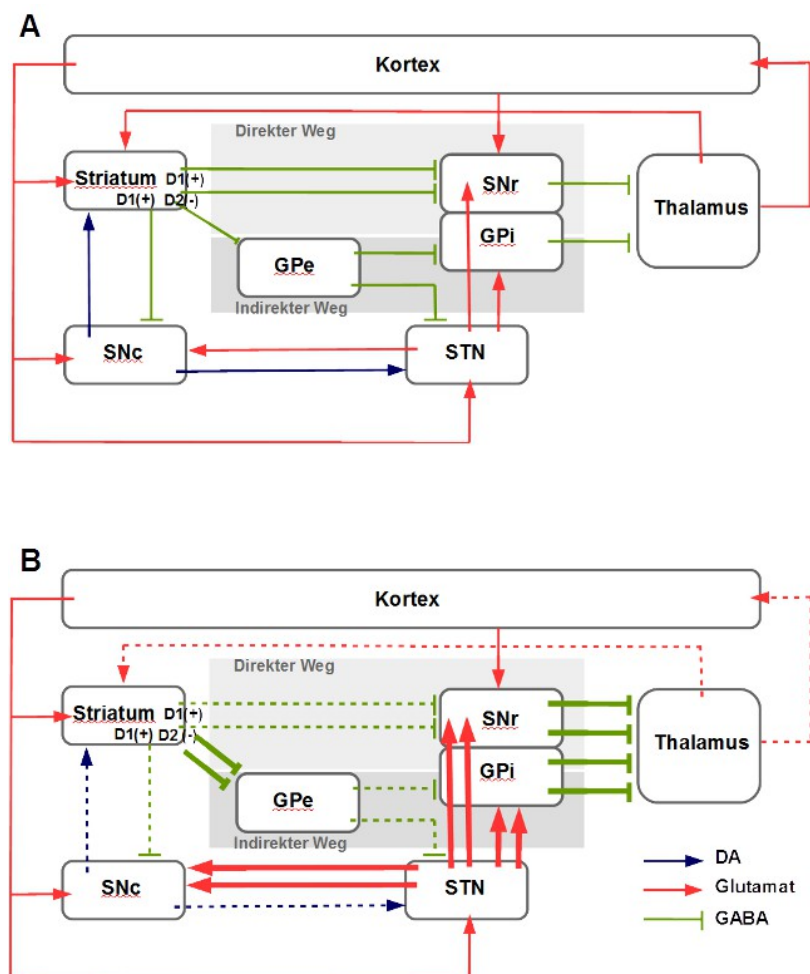
Das Striatum stellt die Haupteingangsstruktur der BG dar. Es erhält glutamatergen, also exzitatorischen Input aus diversen Kortexarealen (vor allem prä- und supplementärmotorische und somatosensorische) sowie dopaminergen Input aus der SNc. Zudem erhält das Striatum serotonergen Input aus den Raphe Kernen und noradrenergen aus dem Locus coeruleus (LC) (Blandini et al., 2000).

Die Ausgangsneurone enthalten  $\gamma$ -Aminobuttersäure (GABA) und projizieren somit inhibitorisch zum Thalamus. Dadurch kommt es zum einen zu einer direkten und zum anderen zu einer indirekten Inhibition des Thalamus. Die glutamatergen Efferenzen des Thalamus schließen durch ihre Rückprojektion zum Kortex die Regelschleife (Obeso et al., 2000).

Die direkte Bahn führt vom Striatum GABAerg zur SNr und zum GPi und von diesen Kernen GABAerg weiter zum Thalamus, der wiederum glutamaterg zum Kortex projiziert (Obeso et al., 2000). Dies bewirkt eine Inhibition der SNc und des GPi und wirkt dadurch „enthemmend“ auf den Thalamus (**Abbildung 1**). Dies wird auch als „Go“-Bahn bezeichnet, da diese Disinhibition die Ausführung von Bewegung bahnt (Frank, 2005; Frank et al., 2007; Wiecki and Frank, 2010).

Bei der indirekten Bahn projizieren diesmal GABAerge, also hemmende Efferenzen vom Striatum zum GPe, der wiederum GABAerg weiter zum STN projiziert. Dies hat eine Disinhibition im STN zur Folge. Glutamaterge Efferenzen führen vom STN zu den Ausgangskernen GPi und SNr sowie zur SNc und aktivieren diese, wodurch der Thalamus inhibiert wird (Obeso et al., 2000) (**Abbildung 1**). Daher auch die Bezeichnung „NoGo-Bahn“, da willkürliche Bewegungen unterdrückt werden (Frank, 2005; Frank et al., 2007; Wiecki and Frank, 2010).

## 2. Einleitung



**Abbildung 1:** Vereinfachte schematische Darstellung des klassischen BG-Schemas mit direkter und indirekter Bahn sowie den beteiligten Neurotransmittern (Glutamat: rot, Dopamin: blau, GABA: grün). Beim gesunden Menschen (A) und beim Parkinson-Patienten (B). GPe: Globus pallidus pars externus, Gpi: Globus pallidus pars internus, Snc: Substantia nigra pars compacta, SNr: Substantia nigra pars reticulata, STN: subthalamischer Nucleus. Exzitatorische Projektionen sind als Pfeile, inhibitorische Projektionen als Balken dargestellt. Gestrichelte Pfeile und Balken zeigen abgeschwächte Aktivität, dicke und doppelt gezeichnete Pfeile und Balken verstärkte Aktivität an. Schema verändert nach Schmidt (2000).

Beide Wege werden durch nigrostriatales DA moduliert (Schmidt, 1998). Dieses hat je nach Bindungsverhalten an den Rezeptoren entweder eine exzitatorische (direkte Bahn; D<sub>1</sub>-Rezeptor vermittelt; G<sub>s</sub>-gekoppelt) oder eine inhibitorische (indirekte Bahn; D<sub>2</sub>-Rezeptor vermittelt; G<sub>i</sub>-gekoppelt) Wirkung auf die Aktivität der striatalen Projektionsneurone.

Das Zusammenspiel beider Bahnen ermöglicht eine Unterdrückung von ungewolltem Verhalten und eine Bahnung von gewolltem Verhalten (Gurney et al., 2001; Mink and Thach, 1993; Schmidt, 1998).



## 2. Einleitung

### 2.1.2 Pathologie der BG bei PD

Bei PD kommt es durch die Degeneration der dopaminergen Afferenzen der SNc in das Striatum zu einem Verlust der striatalen modulatorischen Kontrolle und somit zu einer Störung in der dorsalen Schleife der BG (Obeso et al., 2000; Penney and Young, 1983; Schmidt W.J., 2000).

Da die glutamatergen kortikalen Afferenzen nicht betroffen sind, führt dies im gesamten Netzwerk zu einem Ungleichgewicht der Neurotransmitterbalance und dadurch zu einer vermehrten exzitatorischen Aktivität im Striatum (**Abbildung 1**). Dies resultiert in der Manifestation der krankheitstypischen Symptome.

Die verminderte DA-Konzentration im Striatum bewirkt eine verminderte Exzitation an den D<sub>1</sub>-Rezeptoren, also innerhalb der direkten Bahn, und somit eine abgeschwächte Disinhibition des Thalamus wodurch die „Go-Wirkung“, also das Ausführen von bestimmten Verhalten, vermindert wird.

Die wegfallende Hemmung über D<sub>2</sub>-Rezeptoren im Striatum führt in der indirekte „NoGo-Bahn“ zu einer verstärkten Hemmung des GPe, was eine Disinhibition von GPi und STN zur Folge hat. Der enthemmte STN projiziert wiederum exzitatorisch in die SNr und GPi.

Die Ausgangsstrukturen werden bei DA-Mangel über beide Bahnen enthemmt bzw. aktiviert, was zu einer verstärkten GABAergen Hemmung des Thalamus führt. Die thalamokortikale Rückprojektion (Obeso et al., 2000; Schmidt W.J., 2000) ist in Folge dessen abgeschwächt oder sogar unterdrückt (DeLong and Wichmann, 2007). Eine Planung oder Initiierung von willkürlicher Bewegung ist stark beeinträchtigt und führt zu der bekannten Symptomatik von Akinesie und Rigor. Dem dritten Kardinalsypmtom, dem Ruhetremor liegen andere Mechanismen zugrunde: Durch den Verlust der Filterfunktion der BG kommt es zu rhythmischen Entladungen im GPi und STN, die mit dem oszillierenden Zittern des Tremors assoziiert sind (Hutchison, 2004; Hutchison et al., 1997).

## 2.2 Neurotransmitter

In dieser Arbeit sind zum einem die durch die verwendeten Substanzen hervorgerufenen Veränderung der aminergen Neurotransmitter von Bedeutung und zum anderen wie sie im Gehirn mit degenerativen veränderten Neurotransmitter-Konzentrationen, wie es bei Morbus Parkinson der Fall ist, wirken. Daher soll hier ein kurzer Exkurs zu den relevanten Monoaminen DA und 5-HT gegeben werden.

## 2. Einleitung

### 2.2.1 Dopamin (DA)

DA ist ein wichtiger monoaminerges Neurotransmitter, der wie auch Adrenalin und Noradrenalin (NA), zu den Katecholaminen gehört.

Es wird direkt in den dopaminergen Neuronen gebildet, die sich vor allem im ventralen Mesencephalon befinden. Aus der Aminosäure L-Tyrosin bildet das Enzym Tyrosinhydroxylase durch Anbringen einer zweiten Hydroxyl-Gruppe in ortho-Stellung am Phenylring die DA-Vorstufe L-3,4-Dihydroxyphenylalanin (L-DOPA). Das Abspalten einer Carboxylgruppe unter Bildung von CO<sub>2</sub> durch die DOPA-Decarboxylase resultiert dann in DA.

Dieses wird in der Präsynapse über den Transporter VMAT-2 in Vesikel transportiert und dort gespeichert. Die Ausschüttung in den synaptischen Spalt erfolgt bei Depolarisation der Präsynapse, worauf die Vesikel mit der Membran verschmelzen und das DA freigesetzt wird. Eine Wiederaufnahme erfolgt über den membranständigen, selektiven DA Transporter (DAT). Der Abbau verläuft über zwei Wege, die beide in Homovanilinsäure (HVA) als Endprodukt resultieren. Zum einen verläuft der Metabolismus intrazellulär mittels Monoaminoxidase B (MAO-B) zu 3,4-Dihydroxyphenylelessigsäure (DOPAC) und dann über die Catechol-O-Methyl-Transferase (COMT) zu HVA, zum anderen auch extrazellulär im synaptischen Spalt über die COMT zu 3-Methoxytyramin (3-MT) und anschließend über MAO-B zu HVA.

DA wirkt an fünf verschiedenen Rezeptorsubtypen die alle metabotrop, also G-Protein gekoppelt sind. Dabei unterscheidet man je nach intrazellulärem Signalweg und Wirkung zwei Gruppen. Die D<sub>1</sub>-ähnlichen (D<sub>1</sub> und D<sub>5</sub>) und die D<sub>2</sub>-ähnlichen (D<sub>2</sub>, D<sub>3</sub>, D<sub>4</sub>). Die Rezeptoren der D<sub>1</sub>-Gruppe sind positiv an die Adenylatcyclase (AC) gekoppelt wodurch sie nach einer Stimulation durch DA zu einer Aktivierung der Zelle führen. Die Bindung von DA an Rezeptoren der D<sub>2</sub> Gruppe, die negativ an die AC gekoppelt sind, bewirkt in der Regel eine Hemmung des jeweiligen Neurons (Aizman et al., 2000; Missale et al., 2010).

### 2.2.2 Serotonin (5-Hydroxytryptamin, 5-HT)

Serotonin gehört wie auch Melatonin zu der Familie der Indolamine, welche wiederum wie DA zur Gruppe der Monoamine gehören. 5-HT ist phylogenetisch gesehen einer der ältesten Neurotransmitter und ist bei einer Reihe lebenswichtiger Funktionen von Bedeutung. Dazu gehören Atemregulation, Schlafregulation, Steuerung zirkadianer Rhythmen, Emotionen, reproduktives und kognitives Verhalten sowie Motorik (Filip et al., 2005).

Serotonerge Neurone sind fast ausschließlich in den Raphe-Kernen im Hirnstamm lokalisiert und

## 2. Einleitung

innervieren von dort über zahlreiche Afferenzen fast alle Gehirnareale. Nahezu 80% der serotonergen Innervation des Vorderhirns stammt aus den medialen und dorsalen Raphe Kernen (Di Giovanni et al., 2006). Neben dem Kortex und dem THAL werden innerhalb der BG das Striatum, der GPe und der GPi, der STN und die SNr und die SNc serotonerg innerviert (Lavoie and Parent, 1990).

Die Untersuchung des serotonergen System ist im Zusammenhang mit Morbus Parkinson, von großer Bedeutung, da 5-HT eine Rolle in der Vermittlung von Willkürbewegungen spielt und das serotonerge neben dem dopaminergen System bei den pathologischen Prozessen des Morbus Parkinson ebenfalls beeinträchtigt ist (Hornykiewicz, 1998; Nicholson and Brotchie, 2002).

5-HT wird in den serotonergen Neuronen über einen mehrstufigen Syntheseweg gebildet.

Zunächst wird L-Tryptophan durch die Tryptophan-Hydroxylase (TPH) in L-5-Hydroxytryptophan umgewandelt und dieses anschließend durch die aromatische L-Aminosäure-Decarboxylase (AADC) in 5-HT metabolisiert.

Dieses wird über den VMAT-2 in Vesikel transportiert und bis zu seiner Freisetzung gespeichert. Nach der Ausschüttung erfolgt die Wiederaufnahme aus dem synaptischen Spalt über den membranständigen Serotonin-Transporter (SERT). Der Abbau in der Präsynapse zu 5-Hydroxyindolessigsäure (5-HIAA) läuft über die Monoaminoxidase A (MAO-A) ab (Filip et al., 2005; Walther et al., 2003).

Die Wirkung von 5-HT wird durch Bindung an zahlreiche Rezeptoren vermittelt. Diese werden in sieben Rezeptorfamilien und 16 Subtypen unterteilt. Mit Ausnahme des 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptors der ionotrop ist, sind alle metabotrop d.h. sie wirken über G-Protein-gekoppelte Signalkaskaden. Die Rezeptoren des 5-HT<sub>1</sub>-Subtyps (A-F) inhibieren die AC, 5-HT<sub>4,6</sub> und <sub>7</sub> stimulieren die AC und 5-HT<sub>2</sub>-Rezeptoren stimulieren die Phospholipase C. Welche Effekte durch 5-HT<sub>5</sub> vermittelt werden ist noch nicht abschließend geklärt (Filip et al., 2005; Hoyer et al., 2002).

Im Rahmen dieser Arbeit sind vor allem der 5-HT<sub>1A</sub> Rezeptor und SERT von Bedeutung. Ihre Beteiligung am antiparkinsonoiden Effekt der Testsubstanzen wird mittels Antagonisten überprüft. Im Folgenden wird auf diese detaillierter eingegangen.

## 2. Einleitung

### 2.2.2.1 5-HT<sub>1A</sub>-Rezeptor

Eine Zielstruktur für mögliche therapeutischen Ansätze, sowohl für PD, als auch für L-DOPA bedingte Dyskinesien<sup>2</sup>, stellt der 5-HT<sub>1A</sub>-Rezeptor dar. Die Rezeptoren sind im zentralen Nervensystem (ZNS) weit verbreitet. Sie kommen einerseits als Autorezeptoren auf den Somata und Dendriten der serotonergen Neurone in den Raphe-Kernen vor, welche insbesondere die Aktivität der serotonergen Neurone regulieren und hierdurch indirekt ebenfalls die Freisetzung von 5-HT an den Synapsen. Andererseits kommen sie als postsynaptische Rezeptoren in Teilen des limbischen Systems (Hippocampus, Amygdala), Thalamus, Hypothalamus und im PFC vor (Hoyer et al., 2002; Santana et al., 2004). In den BG sind sie im STR und GP exprimiert (Wright et al., 1995).

Ihre Aktivierung resultiert in einer Vielzahl von Wirkungen/Effekten. Dazu gehört die Verminderung des cAMP-Spiegels aufgrund der negativen Koppelung der AC über das G-Protein. Zudem lösen sie eine neuronale Hyperpolarisation durch G-Protein-gekoppelte K<sup>+</sup>-Kanäle aus. Im Raphe-Kern hemmt die Aktivierung der 5-HT<sub>1A</sub>-Rezeptoren den spannungsabhängigen Ca<sup>2+</sup>-Einstrom und die damit verbundene 5-HT-Freisetzung (Lanfumej and Hamon, 2004).

Der Rezeptor wird mit motorischem Verhalten assoziiert (Lanfumej and Hamon, 2004), spielt eine wichtige Rolle bei Lernprozessen und scheint auch die Langzeitpotenzierung (engl. Longterm potentiation, LTP) zu beeinflussen (Lanfumej and Hamon, 2004; Sanberg et al., 2006).

Hinweise auf einen möglichen therapeutischen Effekt bei Morbus Parkinson ergaben sich durch Versuche mit 5-HT<sub>1A</sub>-Antagonisten auf Haloperidol-induzierte Katalepsie (Lucas et al., 1997), im 6-OHDA-Modell (Mignon and Wolf, 2002) oder L-DOPA-induzierte Dyskinesien (Muñoz et al., 2008). Die Wirkung von MDMA über den Rezeptor wurde ebenfalls belegt (Battaglia et al., 1988a; Bishop et al., 2006)

### 2.2.2.2 SERT

Der SERT ist ein spezifisches Transporterprotein in der Plasmamembran präsynaptischer Neurone. Er dient dem Rücktransport von 5-HT und in geringen Mengen auch DA vom synaptischen Spalt zurück in die Präsynapse. So beendet er die serotonerge Wirkung bzw. beeinflusst er die Dauer und Stärke der Wirkung an der Postsynapse und die Feineinstellung der serotonergen Neurotransmission (Blakely et al., 1994; Murphy et al., 2004). Viele Substanzen aus der Klasse der trizyklischen Antidepressiva (z.B. Amitriptylin) und der selektiven Wiederaufnahmememmer (SSRI, z.B.

---

<sup>2</sup> Dyskinesien sind durch die L-DOPA-Therapie hervorgerufene unwillkürliche Bewegungen, die nach länger andauernder Therapie bei fast allen Patienten auftreten.

## 2. Einleitung

Citalopram) oder aber auch MDMA setzen am SERT an und machen sich die verstärkte serotonerge Transmission, durch die Wiederaufnahmehemmung bedingt, zu Nutze (Quick, 1997; Verrico et al., 2006).

### 2.3 Therapie des Morbus Parkinson

Da die exakte Ursache der Degeneration der dopaminergen Neurone bislang nicht bekannt ist, existiert noch keine kurative oder präventive Therapie. Die aktuellen Therapien zielen auf eine bestmögliche Verbesserung der Symptomatik um den Patienten möglichst lange ein uneingeschränktes Leben zu ermöglichen.

Es gibt verschiedene Ansätze das Neurotransmittergleichgewicht in der dorsalen BG-Schleife auszugleichen. Zur Standardtherapie gehört seit den 1960er Jahren bis heute die Substitution von DA durch die Vorstufe L-DOPA (Levodopa) (Fahn, 2015; Playfer, 1997). Im Gegensatz zu DA passiert dessen Vorstufe die Blut-Hirn-Schranke und wird dann zu DA decarboxyliert. Um einen vorzeitigen Abbau in der Peripherie zu unterbinden und unerwünschte Arzneimittelwirkungen (UAW) zu umgehen wird gleichzeitig ein DOPA-Decarboxylase-Hemmer (z.B. Benserazid oder Carbidopa) verabreicht (Hornykiewicz, 2010; Riederer et al., 2007). Auch wenn die Behandlung mit L-DOPA zum Goldstandard der heutigen Therapiemöglichkeiten zählt, so kommt es doch bei einem großen Teil der Patienten nach langjähriger Behandlung zu massiven Nebenwirkungen. Dazu gehören Wirkungsfluktuationen, das sogenannte „on-off Phänomen“ und Dyskinesien (unwillkürliche Bewegungen) (Navailles and De Deurwaerdère, 2012; Olanow et al., 2009). Zudem kommt es nach einigen Jahren Behandlung zum sog. „wearing off Phänomen“, einer Toleranzentwicklung, die eine Steigerung der Dosis nötig macht, um die nachlassende Wirkung von L-DOPA zu kompensieren (Stocchi, 2006).

Diese UAW führen zu einer massiven Einschränkung der Lebensqualität des Patienten und machen die Entwicklung von Medikamenten mit neuen Wirkmechanismen unabdingbar.

Eine Alternative zu L-DOPA sind direkte DA-Rezeptor-Agonisten (z.B. Bromocriptin oder Apomorphin), die postsynaptisch an D<sub>2</sub>-Rezeptoren wirken und dadurch den fehlenden dopaminergen Input aus dem Striatum ausgleichen.

Als Zusatztherapie zu L-DOPA oder aber auch als Monotherapie im Anfangsstadium gibt es noch folgende Möglichkeiten. Da DA sowohl über die Catechol-O-Methyltransferase (COMT) als auch über die Monoamino-Oxidase (MAO) abgebaut wird, werden COMT-Inhibitoren (z.B. Entacapon oder Tolcapon) oder MAO-Inhibitoren (z.B. Selegilin oder Rasagilin s.u.) verwendet, die den Abbau

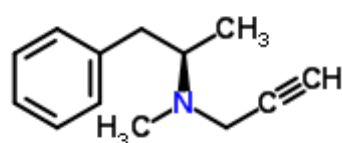
## 2. Einleitung

von DA über den jeweiligen Metabolismusweg verhindern. Aufgrund der engen Verschaltung des dopaminergen Systems mit anderen Neurotransmittersystemen werden auch DA-unabhängige Therapieformen angewandt oder entwickelt. Dazu gehören beispielsweise Anticholinergika, Glutamat-Rezeptor-Antagonisten (z.B. Amantadin), Cholinesterase-Hemmer (z.B. Rivastigmin, Donepezil) oder NMDA-Antagonisten (z.B. Memantin) (Riederer et al., 2007).

Auf die MAO-Inhibitoren wird im Folgenden detaillierter eingegangen, da die in der vorliegenden Arbeit verwendete Substanz Difluor-Selegilin (DFS) ein fluoriertes Derivat des MAO-B-Inhibitors Selegilin darstellt, welches ein Methamphetamin-Molekül mit einer Propargyl-Kette am Stickstoff ist. Durch die Modifikation sind ähnliche wenn nicht sogar bessere Ergebnisse bei der antiparkinsonoiden Wirkung zu vermuten (siehe Kapitelabschnitt 4.3.7.2).

### 2.3.1 Selegilin (Deprenyl®, Jumexal®)

Selegilin (**Abbildung 2**) wird seit vielen Jahren erfolgreich in der Therapie des Morbus Parkinson eingesetzt. Es gilt als relativ gut verträglich (Robottom, 2011) und wird als Komedikation zu L-DOPA verabreicht, um dessen Wirkung zu potenzieren oder aber im frühen Parkinsonstadium als Monotherapie, um den Einsatz von L-DOPA prophylaktisch hinauszuzögern (Miklya, 2014; Myllylä et al., 1997).



*Abbildung 2: Strukturformel von Selegilin (Quelle chemspider.com).*

Selegilin bindet zunächst kompetitiv, dann kovalent an MAO-B. Die kovalente Bindung führt zu einer irreversiblen Hemmung der MAO durch Oxidation der Amingruppe des Selegilin mittels MAO und anschließender Propargylierung des Flavin-Rest im Enzym (Maycock et al., 1976; Rigby

## 2. Einleitung

et al., 2005). Die rasche Metabolisierung von Selegilin durch CYP 450 Enzyme in der Leber mittels Depropargylierung und Demethylierung führt zur Bildung der Metabolite R-Methamphetamin und R-Amphetamin sowie Desmethyl-Selegilin (DMS). Selegilin und DMS wird ein neuroprotektiver Effekt zugeschrieben (Mytilineou et al., 1998; Takahata et al., 2006).

Die Amphetamin Metabolite wirken durch Transporterumkehr und dadurch bedingte DA Freisetzung (Huot et al., 2015). Zudem kommt es durch die MAO-Inhibition zur Verringerung der Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies, die beim Abbau von DA in seine Metabolite DOPAC und HVA entstehen würden. Der schnelle Metabolismus legt nahe, dass ein Großteil der Wirkung auf diese Metabolite zurückzuführen ist (Engberg et al., 1991). Die Wirkung ist durch die Halbwertszeit (2-10 Tage) im Gewebe limitiert. Die MAO-Hemmung hält bis zur Neusynthese des Enzyms an, die nach Absetzen der Selegilin-Behandlung nach wenigen Tagen einsetzt und nach ca. 10 Tagen abgeschlossen ist (Clarke et al., 2003; Youdim and Tipton, 2002).

Therapeutisch wird R-Selegilin verwendet, da die Metabolite des S-Enantiomeres, S-Amphetamine eine bis zu 10 mal höhere Wirkung als die R-Enantiomere aufweisen, wodurch es evtl. zu Neurotoxizität kommen kann. R-Methamphetamin und R-Amphetamin werden nach Hydroxylierung renal eliminiert.

Bei Ratten wurde allerdings keine Verhaltensveränderung festgestellt die durch die Amphetamin-Metabolite hervorgerufen wäre (Tímár et al., 1992).

Durch den hohen First-Pass-Effekt bei peroraler Gabe ist der Plasmaspiegel allerdings relativ inhomogen und die Bioverfügbarkeit je nach Metabolisierungstyp (Schnell- oder Langsam-Metabolisierer) nicht ausreichend oder aber zu hoch, so dass es zu UAW kommen kann. Dies kann durch sublinguale Gabe, einer neuen galenischen Form, umgangen werden, was zudem eine geringere Dosis nötig macht und die Menge der Metabolite verringert (Clarke et al., 2003). Leider ist das Arzneimittel (Xilopar) in Deutschland nicht mehr auf dem Markt. Allerdings können die Selegilin-Schmelztabletten aus Frankreich, Großbritannien oder USA bezogen werden, zudem werden in den USA auch transdermale Pflaster (Emsam) angeboten. Aus solchen Pflastern freigesetztes Selegilin (z.B. 6mg/d) wird direkt über die Haut resorbiert und umgeht ebenfalls den First-Pass-Effekt.

In hoher Dosis bindet Selegilin auch unselektiv an MAO-A, wodurch es aufgrund der zusätzlichen Hemmung zu einer hohen Tyramin-Konzentration kommen kann, der sog. Tyramin-Effekt („cheese-Effekt“- Tyramin-arme Diät wird nötig) welcher zu einer hypertensiven Krise führen kann (Robottom, 2011). Die Möglichkeit eines Serotonin-Syndroms, bei der gleichzeitigen Einnahme

## 2. Einleitung

von SSRI, konnte aber nicht bestätigt werden (Waters, 1994).

Rasagilin (Azilect®) gehört ebenfalls zur Gruppe der MAO-Inhibitoren. Es hemmt MAO-B allerdings im Vergleich zu Selegilin selektiver (kein Tyramin-Effekt) und wirkt primär irreversibel. Zudem ist die Wirkung 5-10 mal höher, wodurch eine geringere Dosis benötigt wird. Rasagilin wird nicht zu Amphetamin metabolisiert, sondern zu Aminoindan (über CYP 450 (1A2)). Dessen neuroprotektive Wirkung wurde bereits *in vitro* (Mandel et al., 2005) und in 6-OHDA lädierten Ratten nachgewiesen (Blandini et al., 2004).

Im Gegensatz zu Selegilin hat Rasagilin allerdings keinen prophylaktisch verzögerten Effekt auf den Einsatz von L-DOPA. Bei mit Selegilin behandelten Patienten wird der Einsatz von L-DOPA signifikant hinausgezögert und der Krankheitsverlauf demnach positiv modifiziert (Miklya, 2014).

Erste Hinweise auf einen therapeutischen Einsatz von MDMA gab es durch einen Patientenbericht über eine zufällige MDMA-Einnahme und der anschließend beobachteten Verbesserung der Symptomatik, als auch der durch die L-DOPA-Therapie bedingten Dyskinesien.

Diese Beobachtung legte den Grundstein für erweiterte Forschung der antiparkinsonoiden und antidyskinetischen Wirkung von MDMA und verwandter Substanzen.

### 2.4 Tiermodelle des Morbus Parkinson

Für die Erforschung der pathologischen Mechanismen der Krankheit sowie die Entwicklung kausaler Therapiemöglichkeiten oder neuer Medikamente ist die Verwendung von Tiermodellen unabdingbar.

Da Morbus Parkinson unter natürlichen Bedingungen im Tierreich nicht vorkommt, muss die Krankheit bei den Tieren exogen induziert werden. Da der genaue Mechanismus der dopaminergen Degeneration unbekannt ist, gelang es bisher nicht, den progredienten Verlauf mit seiner gesamten Symptomatik nachzubilden. Die bekannten Tiermodelle imitieren lediglich die Symptomatik von Morbus Parkinson (Dauer and Przedborski, 2003).

Es gibt zum einen genetische Tiermodelle, denen beispielsweise eine Mutation des  *$\alpha$ -Synuklein* oder anderer PD-assoziiertes Gene zu Grunde liegt, wodurch vornehmlich das familiäre Parkinson-Syndrom dargestellt wird sowie Toxin- oder Neuroleptika-induzierte Parkinson-Modelle. Letztere kamen in dieser Arbeit zum Einsatz und werden daher im Folgenden detaillierter beschrieben.



## 2. Einleitung

### 2.4.1 6-OHDA-induziertes Parkinsonmodell

Toxin-induzierte Tiermodelle machen sich den selektiven Einfluss neurotoxischer Substanzen auf die dopaminerge nigrostriatale Projektion zunutze, die beim idiopathischen Morbus Parkinson degenerieren. Beispiele hierfür sind das reversibel wirkende Reserpin (Carlsson et al., 1957) oder das irreversibel wirkendes Paraquat und Maneb (Brooks et al., 1999), MPTP (Tipton and Singer, 1993), Rotenon (Alam and Schmidt, 2002), 3-Nitrotyrosin (Mihm et al., 2001) oder das hier verwendete 6-Hydroxydopamin (6-OHDA) (Ungerstedt, 1971).

Das 6-OHDA-Läsionsmodell bietet die Möglichkeit, unterschiedlich stark ausgeprägte Läsionen zu setzen, deren DA-Defizit und die dadurch induzierte Symptomatik von der Konzentration des Toxins sowie dem Injektionsort abhängig sind (Przedbroski et al., 1995). Somit ist es möglich unterschiedliche Stadien der humanen Parkinsonerkrankung widerzuspiegeln. Es können Läsionsstärken von über 90% DA-Verlust erreicht werden, die mit ihrer starken Ausprägung der Symptomatik das finale Stadium von Morbus Parkinson imitieren. Um die Belastung für die Tiere gering zu halten und eine intraindividuelle Kontrolle zu haben, wird häufig nur eine Hemisphäre lädiert um einseitige motorische Ausfälle genauer untersuchen zu können. Dabei spricht man dann von unilateralen 6-OHDA-Modell; die Tiere zeigen einen Hemiparkinsonismus.

6-OHDA ist nicht Blut-Hirn-Schranken-gängig und muss daher direkt intrazerebral in das entsprechende Gehirnareal appliziert werden. 6-OHDA weist eine hohe Affinität zum DAT und Noradrenalin-Transporter (NAT) auf und wird über diese in die Neurone aufgenommen, wo es im Zytosol kumuliert. Der genaue Mechanismus der Neurotoxizität ist nicht vollständig geklärt. Es wird vermutet, dass oxidativer Stress durch ein direktes Angreifen am Komplex I der mitochondrialen Atmungskette und die Bildung freier Radikale und  $H_2O_2$  zur Degeneration der Neurone führt (Sachs and Jonsson, 1975; Schwarting and Huston, 1996). Um eine Selektivität für das dopaminerge System zu gewährleisten, müssen die noradrenergen Neurone durch die Gabe des NA-Wiederaufnahme-Inhibitors Desipramin geschützt werden (Breese and Traylor, 1971). In den ersten 24 Stunden nach der 6-OHDA-Injektion setzt die Degeneration der DA-Neurone ein (Schwarting and Huston, 1996) und führt innerhalb von 2-3 Tagen zu einer deutlichen Reduktion der striatalen DA-Konzentration und der Ausprägung von Parkinson-Symptomen (Faull and Laverty, 1969).

In der vorliegenden Arbeit wurde 6-OHDA unilateral in das mediale Vorderhirnbündel (MFB) von Ratten injiziert und der daraus resultierende Hemiparkinsonismus mit Hilfe des Stepping-Tests

## 2. Einleitung

untersucht. Die jeweils kontralateral zur Läsion liegende Körperseite weist eine motorische Beeinträchtigung auf, während die ipsilaterale Seite als gesunde intraindividuelle Kontrolle dient. Die Pyramidenbahnen kreuzen an der Pyramidenbahnkreuzung auf die jeweils andere Seite, daher steuert eine Hemisphäre motorisch die jeweilig kontralaterale Körperseite (Meredith and Kang, 2006).

### 2.4.2 Haloperidol-induziertes Parkinsonmodell

Parkinsonsymptome können auch reversibel durch Neuroleptika induziert werden. Die bei Morbus Parkinson auftretende Enthemmung der dorsalen BG-Schleife durch den Verlust der dopaminergen Neurone wird durch die Blockade der D<sub>2</sub>-Rezeptoren imitiert. Normalerweise bewirkt die Aktivierung der D<sub>2</sub>-Rezeptoren eine gegensteuernde Inhibition der Überaktivierung. Wird dies durch die Antagonisten verhindert, kommt es zur Ausprägung der Katalepsiesymptome Rigor und Akinesie.

D<sub>2</sub>-Rezeptor-Antagonisten wie beispielsweise Fluphenazin, Racloprid oder das hier verwendeten Haloperidol (Elliott et al., 1990; Riederer et al., 2007) sind Mittel der Wahl um ein kataleptisches Verhalten bei Versuchstieren hervorzurufen.

Hierzu werden die Haloperidol-behandelten Tiere in eine für sie ungewohnte Position gebracht und es wird die Zeit gemessen, die vergeht, bis sich das Tier aktiv aus dieser Position entfernt. Bei einem gesunden Tier geschieht dies in der Regel schnell, ein parkinsonoides Tier kann dafür einige Minuten benötigen (Sanberg, 1980).

Wenn die Behandlung mit einem D<sub>2</sub>-Antagonisten (z.B. Haloperidol) wiederholt durchgeführt wird, verbunden mit den anschließend durchgeführten Tests, führt dies zu einer gesteigerten Katalepsieausprägung über die Zeit. Dieser Vorgang nennt sich Katalepsie-Sensitivierung (Klemm, 1989; Sanberg et al., 1988; Schmidt et al., 1999; Srinivasan and Schmidt, 2004).

Die Ausprägung der Katalepsie-Sensitivierung kann als kontextabhängiger Lernprozess angesehen werden. Die Verschlechterung der Parkinson-Symptome Akinesie und Rigor ist an den Kontext gekoppelt in dem die Tests stattfinden, ein vorangegangener Lernprozess wird im gleichen Kontext reaktiviert und die so erlernte Symptomatik maximal ausgeprägt (Hupbach et al., 2008; Wiecki et al., 2009). Der Kontext kann beispielsweise den Raum, die Oberflächenbeschaffenheit und olfaktorische, akustische oder optische Reize umfassen.

Die Zunahme der Katalepsie-Symptomatik ist dosisunabhängig, da auch eine gleichbleibende

## 2. Einleitung

Konzentration zur Verstärkung der Symptomatik führt. Der genaue Mechanismus ist im Detail ungeklärt, eine Wirkungsverstärkung durch Kumulation von Haloperidol kann ausgeschlossen werden (Halbwertszeit 1,5 h (Kapur et al., 2003), da die Symptome auch unabhängig von der Substanz (Haloperidol-Gabe erst nach dem Test) oder auch nach mehrwöchiger Pause (Klein and Schmidt, 2003) auftreten.

Vermutlich kommt es bei der Katalepsie-Sensitivierung zu einer Langzeitpotenzierung innerhalb der BG, da die wiederholte Blockade der D<sub>2</sub>- Rezeptoren verbunden mit der wiederholten Aktivierung kortikaler glutamaterger Afferenzen zu einer Synapsenverstärkung und gesteigerter Glutamatausschüttung führt. Die chronische Behandlung mit Haloperidol resultiert in morphologischen Veränderungen in kortikalen Synapsen (Centonze et al., 2004), was durch vergleichbare Beobachtungen beim Patienten untermauert werden kann (Anglade et al., 1996).

Wie oben bereits angesprochen, zeigt die Katalepsie-Sensitivierung zudem eine starke Kontextabhängigkeit auf und hat darin ebenfalls Parallelen zum Parkinsonpatienten. Es zeigt sich eine Verbesserung der Abstieglatenz, also eine Unterbrechung der Sensitivierung, wenn sich der Kontext ändert (Riedinger, 2014). Im klinischen Alltag ist dies bei Patienten als sogenannter „christmas effect“ bekannt, da in der Weihnachtszeit die Dekoration oder vermehrter Familienbesuch zu einer Verbesserung der Symptomatik führt.

### **2.5 Übersicht: Amphetamine/ Methamphetamin/ MDMA**

Erste Hinweise auf einen therapeutischen Einsatz von MDMA ergaben sich durch den Fall des früh an PD erkrankten Briten T. Lawrence. Dieser stellte eine Verbesserung der Symptomatik sowie der L-DOPA bedingten Dyskinesien nach der Einnahme einer Ecstasy-Pille fest (Margolis, J., 2001). Diese Beobachtung legte den Grundstein für eine Reihe von Studien um den antiparkinsonoiden und antidyskinetischen Effekt von MDMA in verschiedenen Tiermodellen zu reproduzieren.

Bei Ratten zeigte sich sowohl im Neuroleptika-induzierten Katalepsiemodell, als auch im 6-OHDA Läsionsmodell ein antiparkinsonoider Effekt (Lebsanft et al., 2005, 2003; Schmidt et al., 2002).

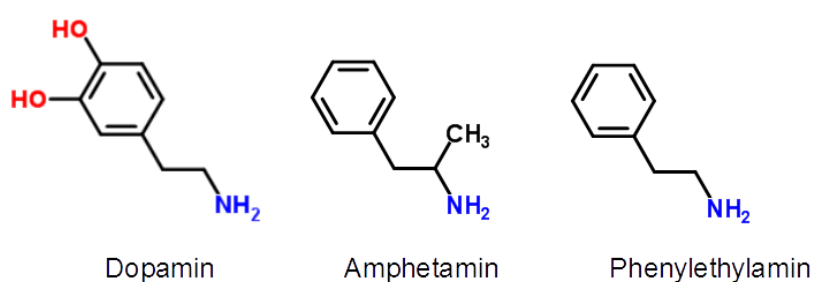
Bei mit L-DOPA behandelten 6-OHDA lädierten Ratten zeigte sich eine Verbesserung der Dyskinesien und dessen Abhängigkeit vom 5-HT<sub>1A</sub>-Rezeptor (Bishop et al., 2006; Lauks, J. and Schmidt, W.J., 2006; Lettfuss et al., 2012). Eine Verbesserung der Dyskinesien und der allgemeinen Motorik in Kombination mit L-DOPA wurde auch bei MPTP-behandelten Primaten gezeigt (Iravani et al., 2003).

## 2. Einleitung

Im folgenden Kapitel soll nun näher auf die geschichtlichen Hintergründe, die Pharmakologie und Neurobiologie von Amphetamin und seinen Derivaten, den Muttersubstanzen der hier verwendeten Substanzen, eingegangen werden.

### 2.5.1 Amphetamine allgemein

Unter Amphetaminen (ein Akronym für **alpha-Methylphenylethylamin**) und ihre Derivate versteht man synthetische Substanzen die, ebenso wie eine Reihe natürlicher Verbindungen wie beispielsweise Dopamin, Phenylethylamin (PEA) als Grundsubstanz haben (**Abbildung 3**).



**Abbildung 3:** Vergleich der Strukturformeln von Dopamin, Amphetamin und Phenylethylamin (Quelle chemspider.com).

Amphetamin wurde bereits 1887 von dem rumänischen Chemiker Edeleanu synthetisch hergestellt. Es hat eine relativ einfache Grundstruktur, aus einem Phenylring, einer Alkylkette mit einem chiralen Kohlenstoffatom und einer endständigen Aminogruppe, die sich modifizieren lässt. Eine Methylierung am Stickstoff ergibt Methamphetamin. Eine Veränderung am Phenylring durch eine Methylendioxygruppe ergibt 3,4-Methylendioxyamphetamin (MDA), mit Methylierung am Stickstoff 3,4- Methylendioxymethamphetamin (MDMA).

Trotz vieler Gemeinsamkeiten unterscheiden sich diese Substanzen, ebenso wie ihre einzelnen Enantiomere, in ihrer pharmakologischen Wirkungsweise.

### 2.5.2 Amphetamin

Amphetamin gehört zur Substanzgruppe der Psychostimulantien. Die primär den Amphetaminen zugeschriebene stimulierende („aufweckende“, daher auch der Begriff „Weckamine“) Wirkung, gesteigerte motorische Aktivität, Appetithemmung, Euphorie wird hauptsächlich über Dopamin und Noradrenalin vermittelt.

## 2. Einleitung

Benzedrin® ein Amphetamin Racemat und seine S- und R-Enantiomere Dexedrin® und Cydril® wurden in den 30er Jahren von Smith, Kline und French auf den Markt gebracht und als Medikament gegen eine Vielzahl von Beschwerden eingesetzt (Schnupfen, Asthma, Schlafstörungen und als Appetitzügler) (Iversen, 2008).

Bradley entdeckte 1937 erstmals den positiven Effekt von Benzedrin® auf ADHS (Aufmerksamkeitsdefizit/ Hyperaktivitäts- Syndrom) bei Kindern. Cydril® erhielt aufgrund seiner schwächeren Wirkung weniger Beachtung als sein potenteres Spiegelbild, in den 70er Jahren zeigten klinische Studien jedoch, dass beide Enantiomere wirkungsvoll ADHS behandeln und das bisher verwendete Racemat signifikant weniger effektiv war. Heute werden eine Vielzahl von Amphetamin basierten Medikamente eingesetzt, das S-Enantiomer nur in Mischungen wie z.B. die 3:1 (S/R)- Racematmischung (Adderall®) (Heal et al., 2013).

Eine neue Entwicklung ist das Amphetamin-Pro-drug Lisdexamfetaminm(Vyvanse®). Nach der Absorption wird Vyvanse® im Blut durch Erythrozyten in die Aminosäure L-Lysin und S-Amphetamin metabolisiert (Pennick, 2010).

Amphetamin ist ein Substrat der membranständigen Monoaminotransporter DAT, SERT und NAT an Neuronen und der Transporter der Speichervesikel (VMAT-2). Es konkurriert also direkt mit den jeweiligen Neurotransmittern um die Aufnahme in die Synapsen bzw. Vesikel und führt durch Richtungsumkehr des membranständigen Transporters zur Ausschüttung der Neurotransmitter in den synaptischen Spalt (Sulzer et al., 2005). Die Amphetamin Wirkung kommt also indirekt, durch nicht-exozytotische, transportervermittelte Freisetzung der Neurotransmitter zustande. Amphetamin führt zu einem Anstieg der NA-Konzentration (v.a. durch R-Enantiomer) im PFC und der DA-Konzentration (v.a. durch S-Enantiomer) im Striatum. Die Ausschüttung von 5-HT ist vergleichsweise gering (Riederer et al., 2007).

Die Pharmakodynamik verläuft mit einem Wirkungshöhepunkt, der sehr früh nach der Administration einsetzt und einem schnellen Abklingen der Wirkung, typisch für Monoamin-freisetzende Substanzen. Zudem führt Amphetamin in geringerem Ausmaß zu einer Wiederaufnahme-Hemmung und wahrscheinlich auch zu einer MAO-Hemmung. Unter anderem kommt es zu einer peripheren Adrenalinausschüttung (Heal et al., 2013).

Untersuchungen zur Interaktion zwischen den beiden Enantiomeren in Racematmischungen zeigen, dass die Dopamin Freisetzung durch S-Amphetamin im Striatum und NAcc in einer 1:1 Mischung nicht beeinflusst wird. Bei einer 3:1 (S:R) Mischung zeigt sich jedoch eine signifikante Verstärkung der Wirkung des S- durch das R-Enantiomer. Es wird vermutet, dass das R-Enantiomer in

## 2. Einleitung

Enantiommischungen die Aktivität von DAT insofern beeinflusst, so dass die Wirkung des S-Enantiomer verlängert und verstärkt wird. Eine Optimierung des Mischungsverhältnisses kann bewirken, dass das S-Enantiomer besser in die Nervenendigungen aufgenommen wird und so die Transmitterfreisetzung verlängert wird (Joyce et al., 2006).

Der Metabolismus von Amphetamin läuft über CYP450 in einem zweistufigen Dealkylierungsprozess ab. Am Anfang steht die Oxidation zu Carbinolamin und dann dessen Umformung zu Phenylaceton (nicht aktiver Metabolit), welches durch Hydroxylierung Benzoesäure bildet.

Ein weiterer Weg ist die Hydroxylierung am Phenylring zu 4-Hydroxyamphetamin, welches nach Hydroxylierung zu Para-Hydroxy-Norephedrin (aktiver Metabolit, periphere Wirkung (als falscher Transmitter) im serotonergen System) oder durch die Hydroxylierung am C-Atom zu Norephedrin führt (aktiver Metabolit, trägt zur Amphetamin-Wirkung bei) (Cho and Segal, 1994).

### 2.5.3 Methamphetamin

Methamphetamin wurde 1919 von dem Japaner Akira Ogata entwickelt. Seit 1938 war es als frei verkäufliches Medikament unter dem Handelsnamen Pervitin<sup>®</sup> erhältlich. Methamphetamin wurde gegen Leistungsschwäche und Lungenerkrankungen eingesetzt und im zweiten Weltkrieg millionenfach zur Leistungssteigerung und als Anxiolytikum für deutsche Soldaten verwendet (Iversen, 2008).

Auf dem Schwarzmarkt ist Methamphetamin auch als Speed oder Crystal Meth bekannt und gilt als Droge mit hohem Abhängigkeitspotential und bei fortschreitendem Missbrauch mit hohem gesundheitlichen und sozialen Verfallsrisiko des Konsumenten.

Der stimulierende Effekt von Methamphetamin ist nahezu doppelt so stark wie der von Amphetamin, da es besser die Blut-Hirn-Schranke überwindet und zudem zu Amphetamin metabolisiert wird. Dies trägt zu seiner längere Wirkung bei und erhöht auch das Suchtpotential der Substanz (Cho and Segal, 1994; van der Schoot et al., 1962).

Methamphetamin bewirkt eine starke DA-Freisetzung und bewirkt dadurch eine neurotoxische Schädigung die vor allem dopaminerge Neurone betrifft, aber auch serotonerge Neurone schädigen kann (Brown, 2000; Itzhak and Achat-Mendes, 2004). Hochdosiert hemmt es die Tyrosinhydroxylase (TH) bzw. die Tryptophanhydroxylase (TPH), die für die DA bzw. 5-HT-Synthese verantwortlich sind, wodurch es zu einer Reduktion der jeweiligen Neurotransmitterkonzentration und seinen Metaboliten kommt (Cho and Segal, 1994).

## 2. Einleitung

Methamphetamin wird zum einen durch N-Demethylierung (durch N-Oxidierung oder C-Hydroxylierung) zu Amphetamin abgebaut. Sowie durch Ringhydroxylierung zu p-Hydroxymethamphetamin (Cho and Segal, 1994).

### 2.5.4 MDMA

MDMA, 1912 von Merck erstmals in einer methodisch orientierten Patentschrift erwähnt, fand allerdings vermutlich aufgrund seines psychotropen Potentials keine therapeutische Anwendung. Klinische Anwendung fand MDMA erst 1976 als sich Psychologen die entaktogene Wirkung zunutze machten um besseren Zugang zu einem „verschlossenen“ Patienten zu bekommen. Gleichzeitig stieg aber auch die Bedeutung von MDMA als Rauschmittel „Ecstasy“ an und erlebte vor allem in den 90er Jahren bei „Rave-Partys“ einen Höhepunkt.

Ab 1985 wurde MDMA in den USA als Droge mit hohem Missbrauchspotential und Sicherheitsbedenken wegen evtl. Neurotoxizität klassifiziert. In Deutschland fällt MDMA seit den 80er Jahren unter das Betäubungsmittelgesetz. Trotz dieser Einstufung ist MDMA auch heute noch stark als Party-Droge verbreitet (Freudenmann et al., 2006).

MDMA wirkt als sogenannte „dirty drug“ unspezifisch an vielen Wirkorten. Neben DA und NA führt MDMA vor allem zu einer massiven 5-HT Freisetzung (Battaglia et al., 1988a). Im Vergleich zu Amphetamin und Methamphetamin, die eher dopaminerg wirken, umfasst die Wirkung nach Substitution mit der Methylendioxy-Gruppe am Phenylring nun vornehmlich das serotonerge System.

MDMA erhöht zudem den 5-HT-Spiegel indem es am SERT wirkt. Zum einen geschieht dies durch Wirkung als Serotonin-Wiederaufnahme-Inhibitor indem es SERT blockiert und so die Wiederaufnahme von 5-HT in die Präsynapse verhindert und zum anderen durch Transporterumkehr, wodurch es zusätzlich zu einer 5-HT-Freisetzung in den synaptischen Spalt kommt.

Zusätzlich wird MDMA über Na<sup>+</sup>-Ko-Transporter in die Synapse aufgenommen (Rudnick and Wall, 1992). Dort bindet es an den VMAT-2 und verhindert so die Aufnahme von Monoaminen in die Vesikel (Mlinar and Corradetti, 2003; Yasumoto et al., 2009). Dies resultiert in einem Anstieg der 5-HT-Konzentration im Zytosol und der Umkehr von SERT, und somit zur 5-HT-Freisetzung in den synaptischen Spalt.

MDMA hemmt zudem TPH, ein Schlüssel-Enzym für die 5-HT-Synthese (Battaglia et al., 1988a; Capela et al., 2009; Verrico et al., 2006).

## 2. Einleitung

MDMA führt auch zu einer partiellen MAO-Hemmung, wodurch der Abbau von 5-HT unterbunden wird und daraus resultierend die Monoamin-Konzentration im Zytosol ansteigt-was wiederum zur verstärkten Ausschüttung in den extrazellulären Raum führt (Rudnick and Wall, 1992).

MDMA scheint dosisabhängig auf die unterschiedlichen Monoamin-Freisetzen zu wirken. In einer geringen Dosis verabreicht ist die Wirkung eher dopaminerg; in einer hohen Dosis wirkt es vornehmlich serotonerg (Schechter, 1997).

MDMA besitzt auch direkte Rezeptor-Bindungseigenschaften an 5-HT-, Adreno-, Histamin-, DA-, und Muskarin-Rezeptoren (Battaglia et al., 1988a). Zudem besteht eine stereoselektive Affinität zu den Bindungsstellen, wodurch die unterschiedliche pharmakologische Wirkung der Enantiomere zu Stande kommt.

S-MDMA wirkt stark präsynaptisch, wohingegen das R-Enantiomere eine postsynaptische Wirkung entfaltet und an eine Vielzahl von Rezeptoren bindet (Shulgin, 1986). Die entaktogene Wirkung liegt vor allem beim R-Enantiomer, wohingegen die psychostimulierende Wirkung eher vom S-Enantiomer verursacht wird. Diese Trennung zwischen den Enantiomeren ist bei N-Methyldioxyamphetamin (MDA) (siehe Kapitel 2.5.5 MDA) noch ausgeprägter. Zudem zeigte sich, dass sich die beiden MDMA-Enantiomere in ihrer Wirkung beeinflussen. So wurde gezeigt, dass das R-Enantiomer die Wirkung des S-Enantiomers im Racemat verbessert (Lebsanft et al., 2005; von Ameln and von Ameln-Mayerhofer, 2010).

MDMA gehört zu der Substanzgruppe der Entaktogene. Geprägt wurde der Begriff 1986 von D.E. Nichols im Zuge seiner Forschung mit Methylendioxy- Derivaten. Aus dem griechisch *en*, „innen“ und *gen* „schaffen“ sowie dem lateinischen *tactus* „berührt“ ergibt sich kombiniert die Bedeutung **entaktogen**, „das Innere berührend“. Entaktogene sind demnach Substanzen die ein Gefühl von emotionaler Nähe und innerer Ruhe verursachen sowie zur gesteigerten Selbstakzeptanz, Angstfreiheit und allgemeiner Zufriedenheit führen (Nichols, 1986).

Der Metabolismus von MDMA läuft primär in der Leber ab (**Abbildung 4**). Mittels O-Demethylierung durch Enzyme der Cytochrom P450 Familie (CYP 2D6) (Malpass et al., 1999) wird die Entstehung von 3,4-Dihydroxymethamphetamin (HHMA, N-Me- $\alpha$ -MeDA) katalysiert. Dabei kommt es zur Spaltung der Methylendioxy-Gruppe am Phenylring, wobei zwei Hydroxylgruppen bestehen bleiben. Dieser Metabolit kann anschließend durch die COMT zu 4-Hydroxy-3-Methoxy-Methamphetamin (HMMA) abgebaut werden.

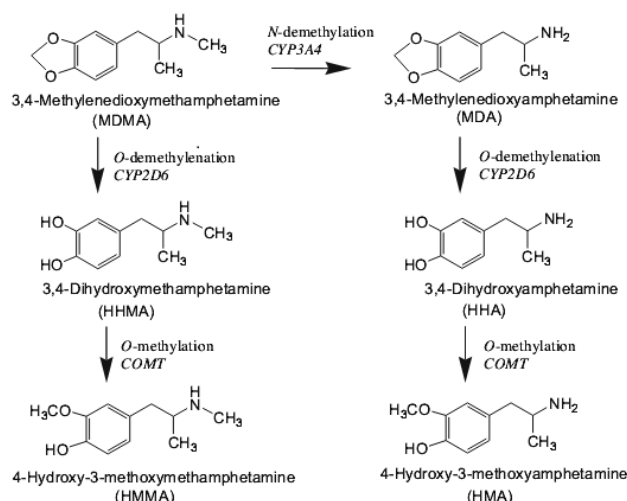
Ein weiterer Abbauweg ist die N-Demethylierung durch CYP3A4, wobei MDA entsteht (Chu et al.,



## 2. Einleitung

1996). Durch CYP 2D6 katalysierte O-Demethylierung, entsteht 3,4-Dihydroxyamphetamin (HHA), welches anschließend durch die COMT zu 4-Hydroxy-3-Methoxy-Amphetamin (HMA) abgebaut wird

Zudem kann es durch eine Ringhydroxylierung am MDMA-Molekül zur Entstehung des Metaboliten Trihydroxymetamphetamin kommen, welches ebenfalls durch die COMT weiter metabolisiert wird (Baumann et al., 2006; De la Torre et al., 2004).



**Abbildung 4:** Metabolismus von MDMA durch CYP450-Enzyme im Menschen (Quelle: Baumann, 2006).

Die diskutierten Gründe für eine mögliche neurotoxische Wirkung von MDMA sind vielfältig. Ein toxischer Einfluss war bereits nach einmaliger Administration von MDMA auf die Konzentration von 5-HT und dessen Metabolit 5-HIAA, auf eine Abnahme der Syntheserate von 5-HT durch TPH-Verlust sowie auf eine Abnahme von SERT in diversen Hirnarealen vor allem Kortex, Hippocampus und Striatum der Ratte zu beobachten. Zudem zeigte die wiederholte Gabe von hohen Dosierungen über kurze Zeit eine Neurodegeneration von 5-HT sowie DA-Neurone im Striatum (Battaglia et al., 1988b). Allerdings wird dies von anderen Arbeitsgruppen kontrovers betrachtet, die das Absinken der 5-HT-Konzentration und Markern nicht als serotonerge Neurotoxizität ansehen, da nur indirekte Messmethoden angewendet wurden (Baumann et al., 2006; Kovács et al., 2007). Zudem sind die hohen Dosierungen, die in den meisten Studien verwendet wurden um eine Toxizität bei Labortieren aufzuzeigen, nicht im pharmakologisch relevanten Bereich, dieser liegt bei 1-2mg/kg, sowohl bei Ratten als auch beim Menschen (Baumann et al., 2006)

## 2. Einleitung

Das Verabreichen von MDMA führt bei der Ratte zu einer akuten (3-6h) aber reversiblen 5-HT Entleerung, gefolgt von einer langfristig (mehrere Tage) andauernden Entleerung. Dies ist vor allem für das S-Enantiomer beschrieben, wodurch es als das neurotoxischere angesehen wird (Schmidt, 1987).

Erwiesen ist eine wichtige Rolle des SERT, da eine Blockade mit einem SSRI wie Fluoxetin zu einer Hemmung der neurotoxischen Wirkungen führt, die anderen Effekte wie Hyperthermie oder Metabolitbildung aber nicht moduliert werden (Sanchez et al., 2001).

Mögliche Gründe, für eine neurotoxische Wirkung, sind die durch MDMA ausgelöste Hyperthermie (Malberg and Seiden, 1998), die mit der Affinität zum 5-HT<sub>2A</sub>-Rezeptor in Verbindung steht (Capela et al., 2009).

Ein anderer wichtiger Effekt, ist die Bildung von neurotoxischen Metaboliten. Dies wird durch Studien untermauert, die bei der direkten intrazerebralen Injektion, keine toxischen Metabolite nachweisen konnten (Paris and Cunningham, 1992).

Zudem zeigten die Primär-Metabolite von MDMA, MDA, 3,4-Dihydroxymethamphetamin (HHMA, N-Me- $\alpha$ -MeDA) und 3,4-Dihydroxyamphetamin (HHA,  $\alpha$ -MeDA) ebenfalls kein Zeichen von Neurotoxizität bei direkter Injektion ins Gehirn, sondern nur bei systemischer Gabe (Capela et al., 2009). Dies deutet auf periphere Metabolismuswege hin, die zu Neurotoxizität durch Bildung toxischer Endprodukte und deren Konjugation mit Gluthation (GSH) führen, wobei Thioether-ortho-Chinone entstehen (Jones, 2004).

Cytochrom P450 Enzyme metabolisieren MDMA durch Demethylierung. Das Zwischenprodukt HHMA kann in einem weiteren Abbauschritt zu einem ortho-Chinon geformt werden (Cho et al., 1993), welches unter spontaner Oxidation zur Bildung reaktiver Hydroxyradikale führen kann. Diese wiederum können die TPH inaktivieren und Axonterminale schädigen. Zudem kann es durch weitere Oxidation zur Bildung von Trihydroxyamphetamin (ein Analog des Neurotoxin 6-OHDA) kommen. Dieser Mechanismus führt zu unspezifischer Neurotoxizität, die nicht nur auf serotonerge Neurone beschränkt ist (Sprague et al., 1998).

Zudem spielt DA eine wichtige Rolle in der serotonergen Neurotoxizität. Durch die akute Entleerung der 5-HT-Speicher durch die massive Monoamin-Freisetzung bewirkt das freigesetzte 5-HT eine Aktivierung postsynaptischer 5-HT<sub>2A/2C</sub> Rezeptoren. Diese befinden sich auf GABAergen Interneuronen, welche ihre Transmission nach Aktivierung verringern. Daraufhin setzt eine gesteigerte DA-Synthese ein, was in einer massiven DA-Freisetzung resultiert. Das vermehrt freigesetzte DA wird über SERT in die entleerten serotonergen Neurone aufgenommen (Sprague et

## 2. Einleitung

al., 1998). Diese Befunde werden dadurch gestärkt, dass eine DA-Verarmung (z.B. 6-OHDA-Läsion oder Reserpin) vor MDMA-Gabe bei Ratten die serotonerge Toxizität verringert oder verhindern kann (Brodkin et al., 1993; Schmidt et al., 1990; Yuan et al., 2002).

Dies liefert Hinweise darauf, dass es aufgrund des DA-Mangels beim Parkinson-Patienten ebenfalls nicht zu einer 5-HT-Neurotoxizität kommen könnte.

MDMA zeigt im Katalepsie-Test, dass seine antiparkinsonoide Wirkung nicht nur durch eine 5-HT-Freisetzung vermittelt wird. Eine Abhängigkeit zum 5-HT<sub>1A</sub>-Rezeptor wurde bereits nachgewiesen (Glennon and Young, 2000). Das R-Enantiomer bindet vorrangig an 5-HT<sub>2A</sub>-Rezeptoren. Durch Vorbehandlung mit dem Antagonisten MDL 100,907 wurde gezeigt, dass die antikataleptische Wirkung zu einem Teil DA vermittelt ist, da die Blockade zu einem Rückgang der DA-Freisetzung führte (Cho and Segal, 1994).

Die starke NA Freisetzung, ebenso wie die Affinität von MDMA zum  $\alpha$ 2-Rezeptor sind mitverantwortlich für Nebenwirkungen wie Hypertonie und Tachykardie (Battaglia et al., 1988a; Capela et al., 2009).

### 2.5.5 MDA

MDA ist in seiner Wirkung vergleichbar mit MDMA. Es zeigt leichte entaktogene Wirkung, wobei die entaktogene bis halluzinogene Wirkung vor allem am R-Enantiomer liegt, während das S-Enantiomer eine psychostimulierende Wirkung ähnlich wie die von Amphetamin zeigt (Baker and Taylor, 1997; O'hearn et al., 1988).

Das R-MDA führt vor allem zu 5-HT-Freisetzung und besitzt eine höhere Affinität zum 5-HT<sub>2A</sub>-Rezeptor, der hauptsächlich für die Vermittlung einer entaktogenen, halluzinogenen Wirkung verantwortlich ist. Das S-Enantiomer führt eher zu DA-Freisetzung (Baker and Taylor, 1997).

Die DA Freisetzung ist stärker als bei MDMA und MDE, also von der Länge der Alkylgruppe abhängig (Nash and Nichols, 1991).

Zudem wirkt MDA toxischer als MDMA, was evtl. an der Beteiligung weiterer Nebenmetabolismuswege liegt (weitere Metabolite sind u.a. Piperonylacetone und Hippursäureverbindungen) (Ensslin et al., 1996).

### 2.5.6 MDE, MDEA

3,4- Methylendioxy-N-ethylamphetamin (MDE; MDEA) wurde in den 1980ern das erste Mal von Shulgin erwähnt und erlangte als Droge vor allem Bekanntheit, als MDMA offiziell verboten

## 2. Einleitung

wurde. Die Hauptwirkung ist eine hohe 5-HT-Freisetzung, die mit der Wirkung von MDMA vergleichbar ist. Die DA-Ausschüttung fällt dagegen vergleichsweise gering aus (Nash and Yamamoto, 1992).

Eine antiparkinsonoide Wirkung wurde im Katalepsietest und Rotationsverhalten nachgewiesen, ist aber viel schwächer als die von MDMA. Allerdings besitzt es auch ein geringeres Neurotoxizitätspotential (Lebsanft et al., 2003; Meyer et al., 2002a). Die Wirkung des Racemat ist stärker als die der Enantiomere allein, wobei wie bei MDMA ein stereoselektiver Effekt besteht (Meyer et al., 2002b; Meyer, Anja, 2002).

Der Metabolismus von MDE verläuft zum einen über MDA (siehe Kapitel 2.5.5 MDA) und zum anderen über eine Demethylierung mittels CYP 2D6, welche zu N-Ethyl-3,4-Dihydroxyamphetamin (DHE) führt. Durch Methylierung einer Hydroxygruppe entsteht N-Ethyl-4-Hydroxy-3-Methoxyamphetamin (HME) (Cho and Segal, 1994).

### 2.5.7 Fluorierte Derivate

Der gezeigte Überblick lässt den Schluss zu, dass Amphetamin und seine Derivate trotz Bedenken als Missbrauchsdroge durchaus zur Behandlung in Parkinson-Patienten geeignet wären. Allerdings sind die Bedenken um eine evtl. Neurotoxizität nicht unberechtigt. Zumal es sich bei den betroffenen Patienten zu einem Großteil um ältere Menschen handelt, bei denen häufig ein erhöhtes Risiko für Herzinfarkte oder Schlaganfälle besteht, was vermehrt zu Komplikationen führen könnte. Nicht zu vernachlässigen ist die Tatsache, dass es sich um dem Betäubungsmittelgesetz unterliegende psychoaktive Substanzen handelt und die Verwendung einer solchen als Medikament Konfliktpotential (betreffend Missbrauch, Toleranz oder Neurotoxizität) birgt (Jerome, 2008).

Eine Modifizierung des Moleküls, wie bereits bei Selegilin gezeigt, könnte zu einem sicheren Medikament führen. Ein anderer Aspekt ist die stereoselektive Wirkung der Stoffe. Als Droge meist als Racemat konsumiert, zeigt sich bei der Auftrennung in die einzelnen Enantiomere, dass diese sich in ihrer Wirkungsweise stark unterscheiden. Bei MDMA liegt die entaktogene Komponente am R-Enantiomere, wohingegen das S-Enantiomere die psychostimulierende Wirkung aufweist.

Die Synthese von MDMA-Derivaten könnte dieses Problem umgehen. Zum einen kann durch die Substitution der Methylendioxy-Gruppe durch Fluor-Atome die Neurotoxizität verhindert werden, da der Abbaumechanismus wie beim MDMA, hier nicht ansetzen kann. Zum anderen erhöht sich durch die Fluorierung die Lipophilie des Moleküls, wodurch es die Blut-Hirn-Schranke leichter passieren kann (Böhm et al., 2004; Smart, 2001).

## 2. Einleitung

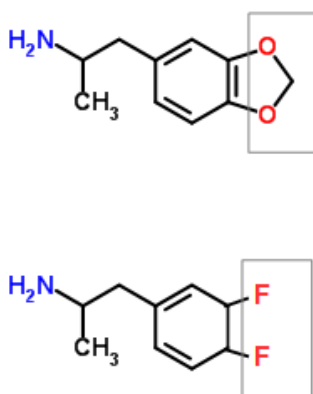
In der vorliegenden Arbeit wurden folgende fluorsubstituierte-Derivate verwendet:

### 2.5.7.1 Difluor-Selegilin, DFS (Di- Fluor- N- Propargyl- Amphetamin)

DFS ist eine Kombination aus Selegilin und fluoriertem MDMA. Dadurch erhofft man sich einen synergistischen Effekt aus der MAO-B-Inhibition und der neuroprotektiven Wirkung des Selegilin, mit der zusätzlichen antiparkinsonoiden Wirkung von MDFPPA (**Abbildung 5**).

### 2.5.7.2 MDFPPA (N-Methyl-Difluor-Phenylpropan-amin) und DFA (Difluor-Amphetamin)

Ein MDMA bzw. Amphetamin Analog, die sich an ihrem Rest am Stickstoff voneinander unterscheiden und am Phenylring eine Substitution der Methylenedioxy-Gruppe mit einer Difluor-Gruppe besitzen.



**Abbildung 5:** Strukturformel von MDA (oben) und seinem fluorierten Derivat DFA. Es wurde die 3,4-Methylenedioxygruppe durch 3,4-Difluor ersetzt (umrahmt) (Quelle: bearbeitet aus chemspider.com).

Sowohl bei DFS, als auch bei MDFPPA und DFA, kommt es erwartungsgemäß zu einer Stabilisierung des Moleküls, wodurch eine Entstehung von toxischen Metaboliten unwahrscheinlich wird. Zudem besitzt die Substanz durch den langsamen Metabolismus eine verlängerte Halbwertszeit und verbleibt länger im Körper. Dies würde eine gleichmäßigere Wirkungskurve und niedrigere Dosierung gewährleisten.

### **2.6 Synthese der fluorierten Derivate**

Die Synthese der in dieser Arbeit verwendeten Substanzen wurde mittels einer Friedel-Crafts-Acylierung durchgeführt. Darunter versteht man im allgemeinen die Einführung einer Keto-Gruppe in ein aromatisches Substrat mit Hilfe eines Carbonsäurechlorids oder Anhydrids in Gegenwart einer als Katalysator dienenden Lewis-Säure.

Hierzu wurden halogenisierte Benzole (Substrat) mit der Aminosäure Alanin durch Friedel-Crafts-Acylierung in einer Salzschmelze (Katalysator) umgesetzt. Dabei entstehen zunächst Aminoketone, die dann zu Aminoalkoholen reduziert werden. Durch die Verwendung von enantiomerenreinen Alanin (D-Alanin bzw. L-Alanin) wird bereits bei der Synthese das R- bzw. S-Enantiomer der Substanz gebildet und sofort nach der Acylierung zum Aminoketon abgetrennt. Eine weitere Reduktion zum Amin führte schließlich zu den hier verwendeten Amphetaminderivaten. Die Bestimmung auf Enantiomerenreinheit erfolgte mittels chiraler Kapillarelektrophorese und zeigte eine Reinheit von 99% (Teufel, 2012).

## 3. Ziel und Fragestellung

Eine antiparkinsonoide Wirkung von MDMA und von fluorierten Derivaten wurde bereits in verschiedenen Tiermodellen des Morbus Parkinson nachgewiesen. Hier sollen die Substanzen, getrennt nach Enantiomeren oder als Racemat (in unterschiedlichen Mischungsverhältnissen) im Katalepsie-Modell und nach 6-OHDA-Läsion auf ihre antiparkinsonoide Wirkung hin untersucht werden.

Durch die Untersuchungen in dieser Arbeit kann die antiparkinsonoide Eigenschaft der Testsubstanzen DFS, MDFPPA und DFA, abhängig von ihrer Chiralität, dem Rest am Stickstoff sowie der Fluorierung am Phenylring in zwei Tiermodellen näher charakterisiert werden.

Dies liefert zum einen Informationen zur Dosis-Wirkung-Beziehung und zum anderen zeigt es den serotonergen Wirkmechanismus in Abhängigkeit des SERT und 5-HT<sub>1A</sub> Rezeptor auf.

Des Weiteren soll eine evtl. vorhandene Neurotoxizität der Substanzen durch eine HPLC-Analyse abgeklärt werden.

Die Experimente dieser Arbeit tragen dazu bei, die vielversprechende antiparkinsonoide Wirkung von Amphetamin-basierten Substanzen besser verstehen zu können und in Betrachtung auf evtl. neurotoxische Bedenken hin besser abzusichern.

Die Erkenntnisse könnten grundlegend zur Entwicklung neuer potentieller Anti-Parkinson-Medikamente beitragen und somit die Lebensqualität der betroffenen Patienten zu verbessern.

### 4. Material&Methoden

#### 4.1 Versuchstiere und Haltungsbedingungen

Für alle durchgeführten Experimente wurden männliche Sprague Dawley Ratten (Charles River, Sulzfeld, Deutschland), mit einem Gewicht von 240-280 g zu Versuchsbeginn verwendet. Diese wurden in Gruppen zu vier Tieren in Standard- Makrolon IV-Käfigen mit Sägespäneeinstreu (Lignocel®, Rettenmeyer und Söhne, Deutschland) und Beschäftigungsmöglichkeiten (Holzhäuschen u.ä.) unter konstanten Bedingungen gehalten (12h Tag-Nachtzyklus, Temperatur 22°C, Luftfeuchtigkeit 50-60%). Sämtliche Experimente fanden in der Hellphase statt. Die Tiere erhielten 15g/Tier Standard-Futter pro Tag (Alleinfutter für Mäuse und Ratten, SSNIFF, Deutschland) und Wasser *ad libitum*.

Nach der Lieferung hatten die Tiere 10 Tage Zeit um sich an die neue Umgebung zu akklimatisieren und sich, durch tägliches „Handling“, an den Experimentator zu gewöhnen.

Sämtliche Experimente erfolgten gemäß den Richtlinien des Tierschutzgesetzes und wurden von der zuständigen Tierschutzkommission (Regierungspräsidium Tübingen) genehmigt.

#### 4.2 Übersicht der Experimente

Es wurden zwei Versuchsreihen mit unterschiedlichen Parkinson-Modellen durchgeführt. In der ersten (n=120 Tiere) wurden die Parkinsonsymptome durch Haloperidolgabe reversibel induziert und die Symptomstärke über den sogenannten Katalpsietest festgestellt. In der zweiten Versuchsreihe wurden die Tiere (n=14) einer unilateralen stereotaktischen Operation unterzogen wodurch sie einen irreversiblen Hemiparkinsonismus ausbildeten. Die motorische Beeinträchtigung wurde über den Steppingtest quantifiziert. In beiden Versuchsreihen wurde der Effekt der Testsubstanzen auf die jeweilige Parkinsonsymptomatik untersucht.

Zur besseren Übersicht wird hier und in den nachfolgenden Kapiteln in „Versuchsreihe Katalepsie“ und „Versuchsreihe Läsion“ unterschieden.



### 4.3 Verwendete Substanzen

Die Substanzen, die den Ratten in den verschiedenen Versuchsreihen subkutan (s.c.), intraperitoneal (i.p.), intrazerebral oder inhalativ appliziert wurden, sind im folgenden Abschnitt beschrieben. Sofern nicht anderweitig angegeben, versteht sich das verabreichte Injektionsvolumen als 1 ml/kg Körpergewicht (KG).

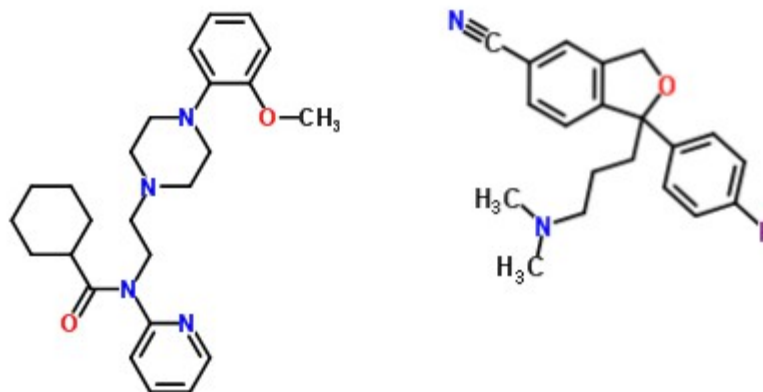
#### 4.3.1 Haloperidol

In der Versuchsreihe Katalepsie diente Haloperidol, ein Antagonist an dopaminergen D<sub>2</sub>-Rezeptoren, zur Induktion der Katalepsiesymptomatik Akinesie und Rigor. Die Injektionslösung (Haloperidol 5 mg/ml, Ratiopharm®, Ulm, Deutschland) wurde mit Saline (isotonische Kochsalzlösung, Fresenius Kabi, Bad Homburg, Deutschland) auf 0,5 mg/ml verdünnt und s.c. verabreicht.

#### 4.3.2 WAY100635

Die Substanz WAY100635 (N-2-[4-(2-methoxyphenyl)-piperazin-1-yl]-ethyl-N-(pyridin-2-yl)-cyclohexancarboxamid, Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland), ein selektiver Antagonist des serotonergen 5-HT<sub>1A</sub> Rezeptors, wurde in der Versuchsreihe Katalepsie zusätzlich zur Testsubstanz (genaues Schema siehe Abbildung 10) verabreicht, um eine Beteiligung dieses Rezeptors aufzuzeigen.

WAY100635 (**Abbildung 6**) wurde in phosphatgepufferten Kochsalzlösung (PBS, Dulbecco, Biochrom AG, Berlin, Deutschland) gelöst und in einer Konzentration von 0,5 mg/ml s.c. injiziert.



**Abbildung 6:** Strukturformeln von WAY100635 und Citalopram (Quelle: chemspider.com).

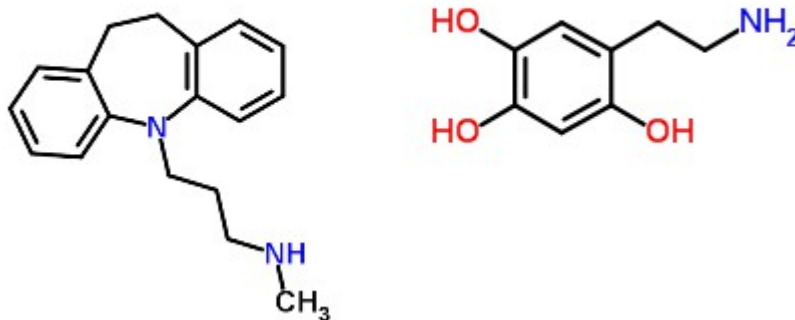
## 4. Material&Methoden

### 4.3.3 Citalopram

Der selektive Serotonin-Reuptake-Inhibitor (SSRI) Citalopram Hydrochlorid (Cipramil; Lundbeck GmbH, Hamburg, Deutschland) wurde ebenfalls in der Versuchsreihe Katalepsie eingesetzt, um die Beteiligung des Serotonin Transporters (SERT) in der Wirkung der Testsubstanz zu untersuchen. Hierbei wurde Citalopram (**Abbildung 6**) in Saline auf 10 mg/ml dosiert und s.c. injiziert.

### 4.3.4 6-Hydroxydopamin

Für die Versuchsreihe Läsion wurde das catecholaminerge Neurotoxin 6-OHDA Hydrobromid in 0,1% Ascorbinsäure gelöst (beides Sigma- Aldrich, Steinheim, Deutschland) und während der Läsion intrazerebral injiziert. Die Konzentration des Injektionsvolumens betrug 12 µg/2 µl freie Base 6-OHDA (**Abbildung 7**). Die benötigte Menge der Lösung wurde unter Tageslichtausschluss (Vermeidung von Oxidation) hergestellt, aliquotiert und bis zur Verwendung bei -20°C gelagert.



*Abbildung 7: Strukturformel von Desipramin und 6-Hydroxydopamin (Quelle: chemspider.com).*

### 4.3.5 Desipramin

Desipramin (Desipramin-Hydrochlorid, Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland) ist ein spezifischer Noradrenalin-Reuptake-Inhibitor (SNRI; trizyklisches Antidepressivum). Es wurde 30 min vor der Injektion des Neurotoxin 6-OHDA i.p. appliziert, um die noradrenergen Neurone vor dessen toxischer Wirkung zu schützen. Desipramin (**Abbildung 7**) wurde mit Saline unter

## 4. Material&Methoden

Wärmeeinwirkung gelöst und mit einer Konzentration von 20 mg/ml i.p. verabreicht.

### **4.3.6 Anästhetika und Analgetika**

#### **4.3.6.1 Fentanyl**

Das Opioidanalgetikum Fentanyl (Fentanylcitrat, Ratiopharm, Ulm, Deutschland) wurde zur perioperativen Analgesie während der Läsions-OP mit Saline auf eine Konzentration von 5 µg/ml (50 µg/ml Injektionsampulle; 1:10) verdünnt und s.c. verabreicht.

#### **4.3.6.2 Carprofen**

Zur postoperativen Analgesie wurde das nichtsteroidale Antiphlogistikum Carprofen (Rimadyl, 50 mg/ml, Pfizer, Berlin, Deutschland) mit Saline auf 5 mg/ml verdünnt und für drei Tage postoperativ täglich s.c. verabreicht.

#### **4.3.6.3 Isofluran**

Während der Läsions-OP wurden die Tiere mit dem Inhalationsnarkotikum Isofluran (1-chloro-2,2,2-trifluorethyldifluormethylether; Forene, Abbott, Wiesbaden, Deutschland) anästhesiert (Initiationsnarkose 4%; perioperativ 2% in Luft).

### **4.3.7 MDMA-Derivate**

Die Synthese und Überprüfung auf Reinheit der hier verwendeten Testsubstanzen, die MDMA-Derivate DFS, MDFPPA und DFA, erfolgte im Labor von Prof. Dr. Ulrich Nagel (Institut für Anorganische Chemie, Fachbereich Chemie und Pharmazie, Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät, Eberhard Karls Universität Tübingen). Die Testsubstanzen lagen als Hydrochlorid-Salze vor. Die Konzentrationen gelten für die freie Base der Substanzen und wurde mit Hilfe des jeweiligen Korrekturfaktors (Kf) berechnet.

#### **4.3.7.1 Difluorselegilin**

DFS wurde in der Versuchsreihe Katalepsie verwendet. Es wurde jeden Tag vor Versuchsbeginn in AMPUWA (Wasser für Injektionszwecke, Fresenius Kabi, Bad Homburg, Deutschland) gelöst (Kf: 1,16345), auf 1, 2 oder 4 mg/ml dosiert und s.c. verabreicht.

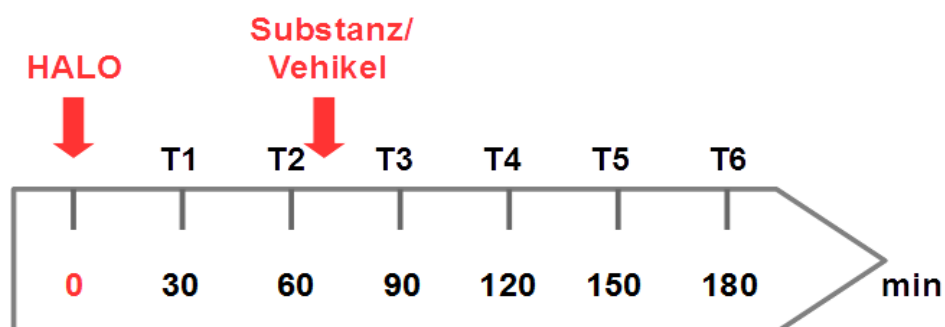
## 4. Material&Methoden

### 4.3.7.2 Difluormetamphetamin und Difluoramphetamin

Difluormethamphetamin (MDFPPA) und Difluor-Amphetamin (DFA) wurden sowohl in der Versuchsreihe Katalepsie, als auch in der Versuchsreihe Läsion untersucht. Sie wurden jeden Tag in PBS auf 1, 2 oder 4 mg/ml dosiert (Kf: MDFPPA: 1,189; DFA: 1,16345) und s.c. appliziert.

### 4.4 Versuchsreihe Katalepsie

Der Katalepsie-Test ist ein einfach durchzuführender, aber verlässlicher Test um die Wirkstärke und Wirkdauer einer Substanz zu evaluieren. In dieser Arbeit wurde der Katalepsie-Test an der Stange (nach (Kuschinsky and Hornykiewicz, 1972)) durchgeführt. Den Tieren wurde zum Auslösen der Parkinsonsymptomatik das Neuroleptikum Haloperidol injiziert, wodurch es zur Ausprägung der bekannten Symptome Akinesie und Rigor kam. Nach 30 min wurde das Tier mit den Vorderpfoten an eine horizontale Stange (Höhe 9 cm) gesetzt. Dies stellt eine für das Tier ungewohnte Haltung dar, aus welcher es sich im Normalfall sofort entfernen würde. Nun wurde die Zeit bis zur ersten aktiven Bewegung mit einer der aufgelegten Pfoten gemessen - die sogenannte Abstiegslatenz. Erfolgte innerhalb von 300 Sekunden (als Obergrenze der Messung) keine aktive Pfotenbewegung, wurde der Test beendet, um unnötige Ermüdungserscheinungen zu verhindern. Die Tests fanden über einen Zeitraum von 180 min alle 30 min statt: zwei Mal nach Haloperidolinjektion, was der Baselinemessung diente, und vier Mal nach Verabreichen der Testsubstanz zum Zeitpunkt 65 min (**Abbildung 8**).



**Abbildung 8:** Zeitlichen Verlauf eines Versuchstages für die Sensitivierungsphase (Vehikel) bzw. die Testphase (Substanz).

#### 4. Material&Methoden

Das Behandlungs-Schema war, bis auf eine Ausnahme (siehe Kapitel 5.1.2.2), im sog. Crossover-Design gehalten. Dabei erhalten alle Tiere konsekutiv jede Dosierung, wobei die Reihenfolge der Behandlung variiert (**Tabelle 1**). Ein sog. „carry-over“-Effekt sollte durch die 2 tägige Pause zwischen den Behandlungen vermieden werden.

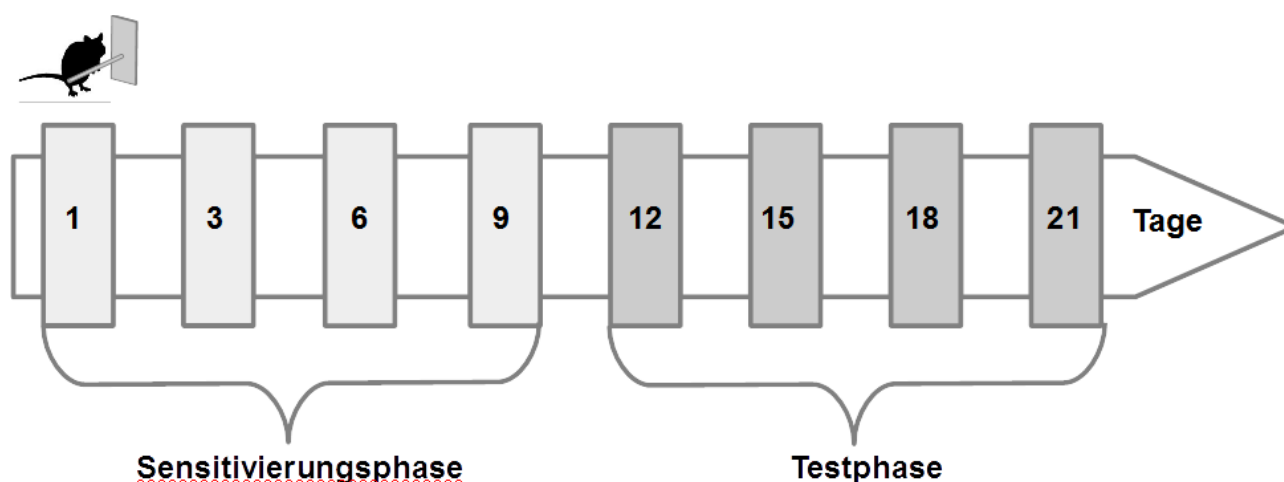
**Tabelle 1:** Behandlungsschema im Crossover-Design. Verteilung der Dosierungen (mg/kg) an den einzelnen Testtagen (d).

Tier/Tag	d12	d15	d18	d21
1	0	4	2	1
2	2	1	0	4
3	4	2	1	0
4	1	0	4	2

Der Versuchsablauf war in zwei Phasen geteilt, die Sensitivierungsphase (Tage 1-9) und die eigentliche Testphase (Tage 12-21), wobei die Tiere alle drei Tage getestet wurden (**Abbildung 9**).

In der Sensitivierungsphase wurde den Tieren anstatt der Testsubstanz das Vehikel PBS injiziert. Die Sensitivierung dient der maximalen und stabilen Ausprägung der Katalepsiesymptomatik, womit das Erlernen der Bewegungsunfähigkeit und damit anschaulich die progressive Verschlechterung der Symptomatik beim Parkinsonpatienten imitiert wird.

Im Anschluss erfolgte nach dem gleichen Schema die eigentliche Testphase. Anstatt des Vehikels wurde nun die jeweils zu testende Substanz verabreicht.



**Abbildung 9:** Versuchsreihe Katalepsie. Verlauf über alle Tage der Sensitivierungsphase sowie der Testphase mit je zweitägiger Pause zwischen den Tagen.

#### 4. Material&Methoden

In diesen Experimenten wurden die untersuchten Substanzen in ihrer Wirkstärke und Wirkdauer verglichen.

Getestet wurden die einzelnen Enantiomere (DFS (n=24); MDFPPA und DFA (je n=16)) sowie das Racemat in unterschiedlichen Mischungsverhältnissen (nur DFA (n=32)).

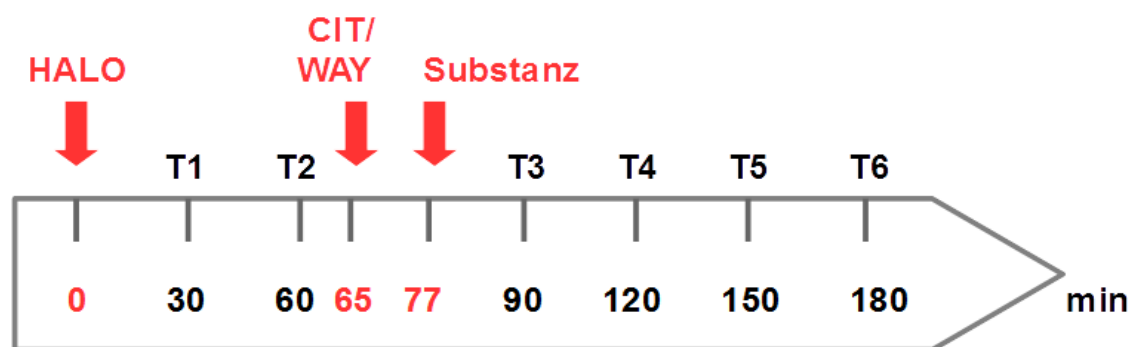
Im Anschluss erfolgte mit DFA (n=16) eine Versuchsreihe bei der zusätzlich Antagonisten verwendet wurden um das Bindungsverhalten der Testsubstanz auf ihren serotonergen Wirkmechanismus hin zu untersuchen. Es wurde der 5-HT<sub>1A</sub>-Antagonist WAY100635 und der SERT Inhibitor Citalopram einzeln oder in Kombination verwendet.

Substanzen können zum einen direkt durch Bindung an den Rezeptor wirken oder aber indirekt durch Freisetzung von Neurotransmitter, nach Bindung an den Transporter. Ob eine direkte oder indirekte Wirkung der Testsubstanz vorliegt, sollte über die Blockade der Zielstrukturen untersucht werden.

Durch eine Blockade des 5-HT<sub>1A</sub>-Rezeptors durch den Antagonisten WAY100635 wird eine Bindung der zu untersuchenden Substanz am selbigen verhindert. Citalopram bindet anstatt der zu untersuchenden Substanz an den SERT und verhindert so die Freisetzung von 5-HT in den synaptischen Spalt.

Durch die Administration von WAY100635 und Citalopram einzeln oder in Kombination lässt sich herausfinden, ob es über einen evtl. indirekten Agonismus am Rezeptor hinaus zu einer direkten Rezeptorwirkung durch die Substanzen kommt. Wenn die Wirkung der Testsubstanz nach Citalopramgabe schwächer wird, so bedeutet dies, dass allgemein freigesetztes 5-HT für die Antiparkinsonwirkung wichtig ist. Hemmt der 5-HT<sub>1A</sub>-Antagonist WAY100635 zusätzlich die Wirkung der Testsubstanz, so deutet dies auf eine direkte Interaktion mit den Rezeptoren hin (der indirekte Weg wurde durch Citalopram inaktiviert). Zeigt der Antagonist keinen Effekt, so besteht keine direkte Bindungseigenschaft zum antagonisierten Rezeptor

Der Versuchsablauf verlief wie oben bereits beschrieben, mit der Abweichung, dass zum Zeitpunkt 65 min der Antagonist (oder das jeweilige Vehikel) injiziert und zum Zeitpunkt 77 min die zu testende Substanz (oder das Vehikel) injiziert wurden. (**Abbildung 10**)



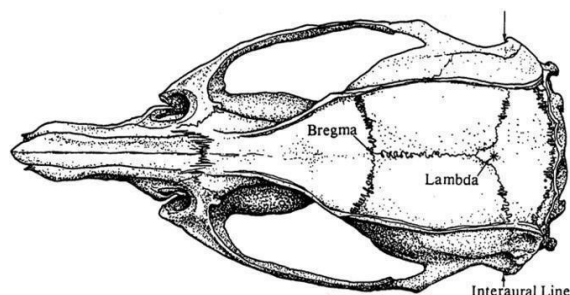
**Abbildung 10:** Zeitlichen Verlauf eines Versuchstages für die Sensitivierungsphase (Vehikel) bzw. die Testphase (Substanz) mit zusätzlicher Antagonistenbehandlung (CIT/WAY).

## 4.5 Versuchsreihe Läsion

### 4.5.1 Stereotaktische Operation

Die Ratten (n=28) wurden vor Beginn der Operation gewogen und in einer Narkosebox mit Isofluran anästhesiert (Initialkonzentration 4% Isofluran Luft Gemisch). Mindestens 30 min vor Injektion der Neurotoxins 6-OHDA wurde zum Schutz der noradrenergen Neurone Desipramin i.p. verabreicht. Die Kopfhaut wurde im Bereich der Läsion mit einer Schere rasiert und das Tier mit Ohrbalken in der stereotaktischen Apparatur (Kopf-Stereotakten, Stoelting, Wood, Dale, Illinois, USA) fixiert. Ein Wärmekissen unter dem Tier verhinderte Hypothermie während der OP, zudem wurden die Augen durch Bepanthen® Augen - und Nasensalbe (Bayer, Leverkusen, Deutschland) vor Austrocknung geschützt. Die stetige Isoflurananästhesie (1,5-2%) erfolgte über eine am Zahnbalken angebrachte spezielle Narkosemaske für Ratten. Nachdem eine ausreichende Narkosetiefe gesichert war (Kontrolle über Zwischenzehenreflex), wurde die Kopfhaut mit einem Skalpellschnitt geöffnet und die Haut mit OP-Klemmen zur Seite gehalten, so dass die Kreuzungspunkte der Schädelnähte, Lamda und Bregma, gut sichtbar waren. Bregma ist der Punkt am Schädel an dem die Kranznaht (*Sutura coronalis*) und die Pfeilnaht (*Sutura sagittalis*), die von Lamda (*Sutura lamdoidea*) ausgehen zusammentreffen (**Abbildung 11**). Zunächst wurden die Nullkoordinaten in anteriorposteriorer (AP) und lateraler (L) Ausrichtung für Bregma festgelegt und der Schädel gegebenenfalls durch Anpassung der Höhe des Zahnbalkens dorsoventral (DV) mit Lamda auf eine Ebene gebracht.

#### 4. Material&Methoden

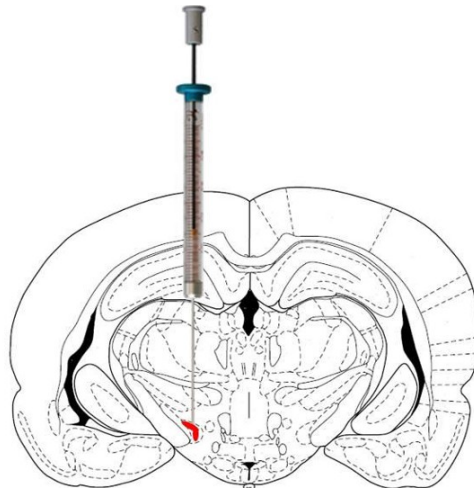


**Abbildung 11:** Aufsicht auf einen Rattenschädel mit den markierten Kreuzungspunkten Bregma und Lambda (Paxinos & Watson, 1998).

Anhand der Koordinaten (AP= -4 mm; L= +1,6 mm) nach Paxinos und Watson (Paxinos and Watson, 1998) wurde die Position des Bohrloches für die Injektion in das linke MFB ermittelt (**Abbildung 12**). Mit einem Bohrer (Kronbohreraufsatz mit 0,7mm Durchmesser; Bohrmaschine Proxxon NG2/E von Proxxon, Niesbach, Deutschland) wurde an dieser Stelle vorsichtig ein Loch in den Schädel gebohrt und anschließend die am Stereotakten befestigte Mikroinfusionskanüle (SGE, Victoria, Australien) langsam in das Gehirn eingeführt (DV= -8,8 mm). Mit einer Geschwindigkeit von 1µl/min wurden insgesamt 2µl 6-OHDA in das MFB injiziert. Die Kanüle wurde weitere 6 min an dieser Stelle belassen, um eine ausreichende Diffusion des Toxins in das Gewebe zu gewährleisten. Danach wurde die Kanüle langsam zurückgezogen, das Bohrloch mit Knochenwachs (W30, Ethicon<sup>®</sup>, Johnson & Johnson, Deutschland) verschlossen und das OP-Feld prophylaktisch mit Nebacitin (Nebacitin<sup>®</sup>, Sandoz GmbH, Kundl, Österreich) Antibiotikapuder bedeckt. Die Kopfhaut wurde mit Perma- Handseide (Ethicon<sup>®</sup>, Johnson & Johnson, Deutschland) zugenäht und die Naht zur Desinfektion mit einer Jodlösung (Braunol<sup>®</sup>, B.Braun GmbH, Melsungen, Deutschland) behandelt. Zur perioperativen Analgesie diente das Opioidanalgetikum Fentanyl das s.c. verabreicht wurde. In der Aufwachphase wurden die Tiere beobachtet und auf einem Wärmekissen vor Hypothermie geschützt. Zur postoperativen Schmerzbehandlung wurde Carprofen 3 Tage i.p. appliziert. In der mehrwöchigen Regenerationsphase wurde das Gewicht der Tiere überwacht und die Futtermengen bei Gewichtsabnahme angepasst.



## 4. Material&Methoden

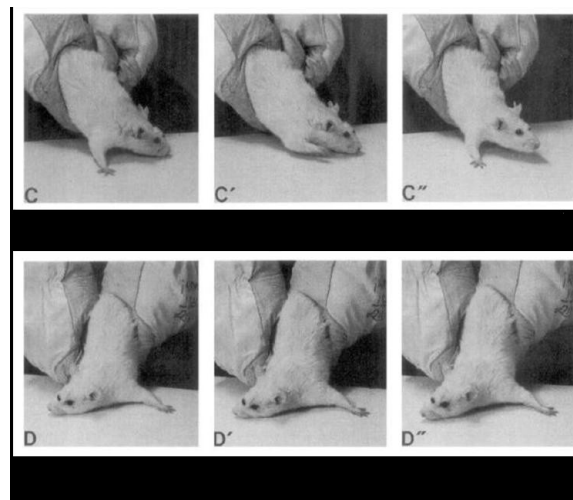


*Abbildung 12:* Schematische Darstellung der unilateralen Injektion in das linke MFB (Verändert nach Paxinos & Watson, 1998).

### 4.5.2 Stepping-Test

Mit Hilfe des Stepping-Tests wurde das, durch die unilaterale Läsion induzierte motorische Defizit der kontra-lateralen Vorderpfote untersucht (Olsson et al., 1995; Tillerson et al., 2001). Dabei wurde das Tier vom Experimentator so gehalten, dass die Hinterbeine und eine Vorderpfote fixiert waren und die zu testende Vorderpfote frei beweglich war. Mit dieser wurde das Tier auf ein Holzbrett gestützt und langsam (ca. 10 s auf 90 cm) seitlich über das Brett gezogen (Definiert als Bewegungsrichtung „Ziehen“) bzw. geschoben (Definiert als Bewegungsrichtung „Schieben“) (**Abbildung 13**). Das Tier macht mit der zu testenden Vorderpfote sog. Ausgleichsschritte um die Position der Pfote an die Position des seitwärts bewegten Körper anzupassen. Der Test wurde zuerst mit der linken Vorderpfote (ipsilateral zur Läsion) und anschließend mit der rechten Vorderpfote (kontralateral zur Läsion) jeweils in beide Bewegungsrichtungen drei Mal durchgeführt und jeweils die Anzahl der ausgeführten Ausgleichsschritte gezählt. Daraus wurde der Mittelwert sowie der jeweiliger SEM bestimmt.

#### 4. Material&Methoden

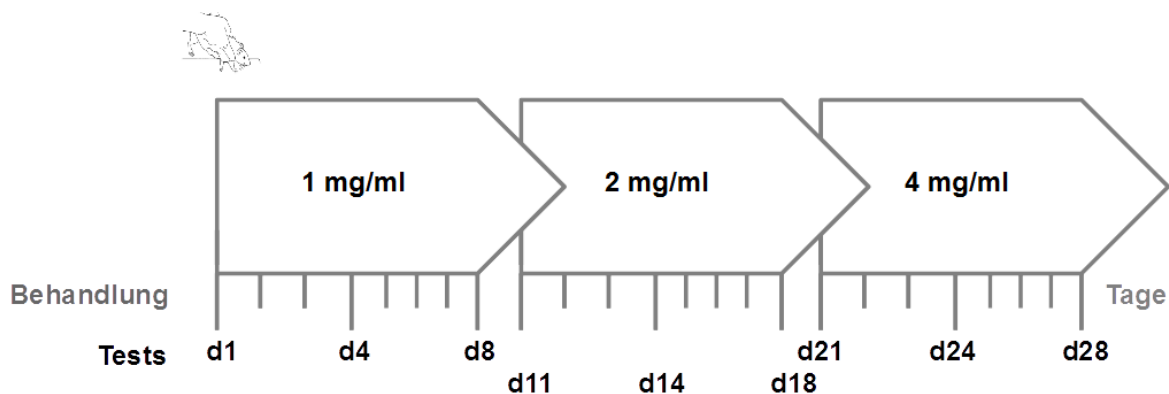


**Abbildung 13:** Stepping-Test (modifiziert nach Olsson, 1995) einer unilateral 6-OHDA-lädierten Ratte in der Bewegungsrichtung „Ziehen“. C, C', C'' zeigen Ausgleichsschritte mit der ipsilateralen gesunden Pfote, D, D', D'' zeigt das Ausbleiben eines Ausgleichsschritt mit der kontralateralen beeinträchtigten Pfote.

Zur besseren Veranschaulichung wurde zudem nach Tillerson (Tillerson et al., 2001) der sog. „Ipsilaterale Asymmetrie-Score“ (IAS) für die Bewegungsrichtungen „Ziehen“ und „Schieben“ bestimmt. Dabei werden die Anzahl der Ausgleichsschritte je Pfote (ipsi- oder kontralateral) zu den insgesamt durchgeführten Ausgleichsschritten in Relation gesetzt und die Differenz zwischen den Werten gebildet  $[(\text{ipsilateral}/(\text{ipsilateral}+\text{kontralateral})) - ((\text{kontralateral}/\text{ipsilateral}+\text{kontralateral}))]$ . Bereits während der einwöchigen „Handling“-Phase wurden die Tiere an die ungewohnte Haltung durch den Experimentator und an die Prozedur des Stepping-Tests gewöhnt um eine Verfälschung der Ergebnisse durch Aufregung zu vermeiden. Nach diesem Training erfolgte vor der Läsion eine Baseline-Messung des Stepping-Tests.

Vor Beginn der eigentlichen Testreihe wurde zudem ca. vier Wochen nach Läsion ein Test auf ausreichende Läsionsstärke durchgeführt. Tiere die nicht ausreichend lädiert (im Mittel mehr als vier Ausgleichsschritte mit der lädierten Pfote) wurden aussortiert. Dabei zeigten 14 Tiere eine ausreichende Läsion auf und wurden für die Tests in Behandlungsgruppen (DFA: n=4; MDFPPA: n=5; Kontrolle: n=5) eingeteilt. Es wurden drei Versuchsblöcke durchgeführt mit je 1, 2 und 4 mg/kg Behandlung. Die Substanzgabe erfolgte an jedem Versuchstag, der Steppingtest wurde nur an jedem ersten, vierten und achten Versuchstag durchgeführt (d1-28). An jedem Testtag fanden ein Prä-Test vor der Substanzgabe und der anschließende Post-Test zum Testen der akuten Substanzwirkung 1,5 h nach Substanzgabe statt. Zwischen den einzelnen Blöcken war eine zweitägige Auswaschphase. (**Abbildung 14**).

## 4. Material&Methoden



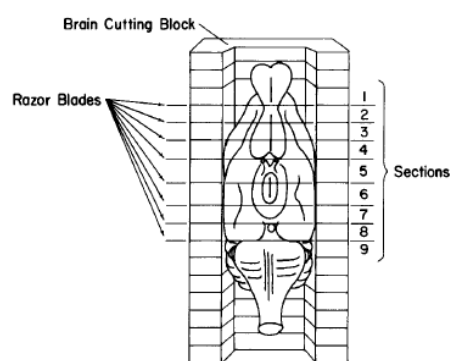
**Abbildung 14:** Zeitlicher Verlauf der Versuchsreihe Stepping über die drei Behandlungsblöcke mit den jeweiligen Dosierungen 1,2 und 4mg/kg .

### 4.5.3 Gehirnpräparation

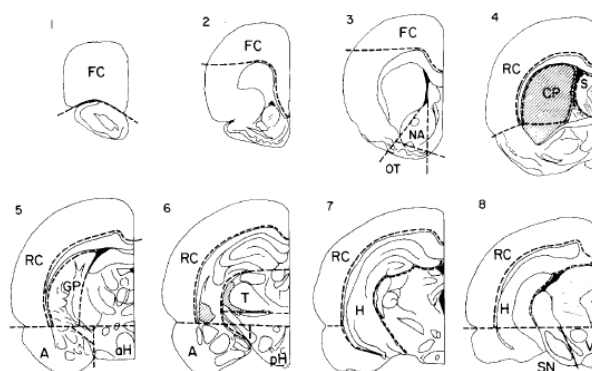
Die Tiere wurden 19 (MDFPPA und Kontrolle) bzw. 15 (DFA) Tage nach Versuchsende dekapitiert, das Gehirn zügig heraus präpariert und für eine Minute in eiskalte Saline eingelegt. Anschließend wurde das Gehirn ventral nach oben auf einen eisgekühlten Aluminiumschneideblock gelegt und mit Mikrotomklingen in 1,5-2 mm dicke Scheiben geschnitten (**Abbildung 15**). Nach der Methode von Heffner (Heffner et al., 1980) wurden die für die Analyse benötigten Areale mit einem Mikroskalpell präpariert, in Kryogefäße überführt, das Frischegewicht abgewogen und die Proben in flüssigem Stickstoff eingefroren, bis sie für die Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (engl. high performance liquid chromatography, HPLC) -Analyse aufbereitet wurden. Für die Analyse wurden folgende Areale (getrennt nach rechter und linker Hemisphäre) ausgewählt: Frontaler Kortex (FC), anteriores und posteriores Caudatoputamen (aCPu und pCPu), Nukleus accumbens (NAcc) und Hippocampus (HC).

Die Gewebeproben wurden getrennt nach lädierter und gesunder Hemisphäre in der HPLC-Analyse untersucht.

## 4. Material&Methoden



*Abbildung 15: Sektion des Rattengehirns nach Heffner et al. (1980).*



*Abbildung 16: Schematische Darstellung der coronalen Gehirnschnitte nach Heffner (1980). Zu sehen sind die Schnittebenen einer Hemisphäre zur Präparation der verschiedenen Gehirnareale (FC, frontaler Kortex; NA, Nukleus accumbens; CP, Caudatoputamen; GP, Globus pallidus; A, Amygdala; T, Thalamus; SN, Substantia nigra; VT, ventrales Tegmentum; H, Hippocampus).*

### 4.5.4 HPLC

#### 4.5.4.1 Allgemein

Die HPLC-Analyse diente der quantitativen und qualitativen Bestimmung der Konzentrationen von DA und 5-HT in den ausgewählten Gehirnarealen. Dabei wird die Probe in ihre einzelnen Substanzen aufgetrennt und diese anhand von Chromatogrammen analysiert.

Es wurde eine sog. Umkehrphasen-Chromatographie (engl. reversed-phase-chromatography) angewandt, wobei das Probengemisch mittels einer mobilen polaren Phase (hydrophil) und eine

## 4. Material&Methoden

stationären apolaren Phase (lipophil) in der HPLC-Säule aufgetrennt wird.

Je nach Wechselwirkung mit der stationären Phase (apolare Stoffe werden später eluiert als polare) ist die Retentionszeit unterschiedlich. Der Detektor erkennt die Signalmaxima der aufgetrennten Substanzen und konvertiert die Informationen in ein elektrisches Signal, welches dann im Computer als Chromatogramm abgebildet wird.

### 4.5.4.2 Probenaufbereitung

Die in flüssigem Stickstoff aufbewahrten Proben wurden mit 500µl Eluent homogenisiert (Silent Crusher M, Heidolph Instrumental GmbH, Schwabach, Deutschland). Der Eluent, also die mobile Phase der HPCL setzte sich zusammen aus: Natriumhydrogenphosphat ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland), Acetonitril (MeCN, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland), Methanol (MeOH, VWR BDH Prolabo, Leuven, Belgien), Natriumoctan-1-sulfonat (OSA, Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland) und Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA, Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland) und speziellem, sterilem und partikelfreiem „HPLC-Wasser“ (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland) im Ultraschallbad entgast) und enthielt den internen Standard 3,4-Dihydroxybenzylamin (DHBA, Sigma Aldrich, Steinheim, Deutschland). Das Homogenat wurde anschließend für eine Minute bei 8000rpm zentrifugiert (Beckmann, Microfuge E™, Buckinghamshire, Großbritannien) und der Überstand abgezogen und filtriert. Eine Probe von 100µl wurde von der entstandenen Mischung in ein Probengefäß gegeben und zur abschließenden chromatographischen Analyse in die Probenaufbewahrung des HPLC-Autosamplers (CMA/200 Refrigerated Microsampler, CMA, Solna, Schweden) gestellt.

### 4.5.4.3 Beschreibung der HPLC-Anlage

Aus dem Probengefäß (300µl Eppendorf-Gefäß) wurden durch den Autosampler 19,9µl der Probe entnommen und in den Kreislauf der mobilen Phase eingespeist. Diese wird durch den Druck der HPLC-Pumpe (HPLC Compact Pump 2250, Bischoff, Leonberg, Deutschland) mit vorgeschaltetem Pulsationsdämpfer (ERC, Riemerling, Deutschland) zur „reversed phase“-Trennsäule (Grom Sil 120 ODS-4HE, 3,0µm, 50 x 4,0mm, Alltech, Grom GmbH, Rottenburg, Deutschland) geleitet. In deren hydrophoben stationären Phase (Silikagel) wird die Probe nach ihrer Lipophilie in ihre einzelnen Bestandteile aufgetrennt, welche diese mit charakteristischer Retentionszeit wieder verlassen. Anschließend werden die einzelnen Bestandteile von der Analysezelle (Model 5011A analytical cell, ESA, USA) elektrochemisch erfasst und zur weiteren Datenverarbeitung an einen Computer

## 4. Material&Methoden

mit der Analysesoftware Chrom Star 6.0 von SCPA (Software für Chromatographie- und Prozess-Analytik GmbH, Stuhr, Deutschland) weitergeleitet.

Für jede Probe wurde ein Chromatogramm erstellt und die Konzentrationen der relevanten Neurotransmitter, durch Verrechnung mit dem internen Standard (DHBA, mit bekannter Konzentration) sowie dem externen Standard (Gemisch aus DA, 5-HT, DOPAC, 3-MT, HVA, und 5-HIAA (alle Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland)) als Referenzwert, bestimmt.

Durch das bei der Präparation bestimmte Frischgewicht jeder Probe, konnte dann die Konzentration der Neurotransmitter in pg pro mg Frischgewicht berechnet und dargestellt werden.

### 4.6 Auswertung

Die Auswertung und die graphische Darstellung der Rohdaten erfolgte in Open Office 4.1.1 Tabellenkalkulation. Die Ergebnis-Grafiken zeigen Mittelwerte und  $\pm$ SEM der Daten. Die statistische Auswertung wurde mit dem Statistikprogramm GB Stat V7.0 (Dynamik Microsystems Inc., USA, 2000) durchgeführt.

#### 4.6.1 Versuchsreihe Katalepsie

Die Ergebnisse der Sensitivierung wurden stets über eine 2-faktorielle repeated measures ANOVA über die Tage (Faktor A) und die Tests (Faktor B) mit einem anschließenden post-hoc Fisher's LSD-Test ausgewertet.

Die Ergebnisse des Testverlauf wurden stets über eine 2-faktorielle repeated measures ANOVA über die Dosis (Faktor A) und die Tests (Faktor B) und anschließendem post-hoc Fisher's LSD-Test analysiert.

Die normalisierten Daten der relativen Katalepsiehemmung wurden immer mit einer 1-faktoriellen completely randomized ANOVA und anschließendem post-hoc Dunnett's-Test berechnet.

Bei der konstanten Behandlung mit S-MDFPPA (**Abbildung 30**) über die einzelnen Testtage wurde eine 2-faktorielle repeated measures ANOVA und anschließendem post-hoc Tukey-Kramer-Test durchgeführt. Verglichen wurden die Messwerte der einzelnen Dosierungs-Gruppen innerhalb eines jeden Tages mit denen der Kontrollgruppe (mit der Dosis 0mg/kg). Zusätzlich wurde ausgewertet, ob es innerhalb einer Dosierung Veränderungen über die Zeit gab, d.h. jeweils Tag 15,18 oder 21 mit Tag 12 verglichen.

Die konstant mit dem Vehikel behandelte Kontrollgruppe wurde (**Abbildung 31**) mit einer 1-

## 4. Material&Methoden

faktoriellen repeated measures ANOVA mit anschließendem post-hoc Dunnett's-Test mit der Baseline verglichen.

### 4.6.2 Versuchsreihe Läsion

Die Daten von S-MDFPPA im Vergleich mit der Kontrolle (**Abbildung 49,50,51**) wurden über eine 3-faktorielle repeated measures ANOVA (Faktor A: Substanz (Vehikel/S-MDFPPA); Faktor B: Pfote (links/rechts); Faktor C: Test (prä/post) für die Bewegungsrichtungen „Ziehen“ und „Schieben“ getrennt berechnet. Anschließend wurde ein post-hoc Fisher's LSD-Test durchgeführt. Bei S-DFA (**Abbildung 52,53,54**) wurde eine 2-faktorielle repeated measures ANOVA berechnet (Faktor A: Pfote (links/rechts); Faktor B: Test (prä/post) mit anschließendem post-hoc Fisher's LSD-Test.

Der direkt Vergleich der Ausgleichsschritte aller Behandlungsgruppen, als Ipsilateraler-Asymmetrie-Score (IAS) aufgetragen (**Abbildung 55**) wurde mit einer 3-faktoriellen repeated measures ANOVA berechnet ((Faktor A: Behandlung (Vehikel/S-MDFPPA/S-DFA); Faktor B: Entwicklung über die Zeit (d1-d4-d8); Faktor C: Test (prä/post) berechnet.

Die Ergebnisse der HPLC-Analyse (**Abbildung 56**) wurden mittels einer 2-faktoriellen repeated measures ANOVA mit Faktor A: Behandlung (Vehikel/S-MDFPPA/S-DFA) und Faktor B: Hemisphäre (Links/Rechts) mit anschließendem post-hoc Fisher-LSD-Test berechnet, wobei die Behandlungsgruppen jeweils für jede Hemisphäre mit der Kontrolle verglichen wurde.

Bei zu geringen Tierzahlen wurde ausschließlich eine deskriptive Statistik durchgeführt und grafisch dargestellt, während auf eine weiterführende, statistische Berechnung verzichtet wurde.

## 5. Ergebnisse

### 5.1 Versuchsreihe Katalepsie mit Haloperidol

Die einzelnen Enantiomere der Substanzen DFS, MDFPPA und DFA wurden in den Dosierungen 0, 1, 2 und 4mg/kg miteinander verglichen. Sofern nicht anders erwähnt erfolgte die Behandlung im „Crossover“-Design. Bei MDFPPA wurde zudem ein Versuchsdurchlauf mit konstanter Behandlung durchgeführt um eine, evtl. durch die Behandlung im „Crossover“-Design maskierte Kumulation, besser erkennen zu können. Des weiteren wurde bei DFA der Einfluss der Enantiomere in unterschiedlichen Enantiomermischungen, sowie die Beteiligung serotonerger Zielstrukturen bei der Vermittlung des antikataleptischen Effekts untersucht.

Die Katalepsie-Tests erfolgten nach folgendem Schema:

Nach einer Sensitivierungsphase (4 Tests im Abstand von 3 Tagen) erfolgte die eigentliche Testphase nach dem gleichen Schema.

Den Tieren wurde der D<sub>2</sub>-Antagonist Haloperidol (0,5 mg/kg) injiziert, wodurch es zur Ausprägung der Katalpesiesymptome Akinesie und Rigor kam. Nach 30 min wurden die Tiere mit den Vorderpfoten an eine horizontale Stange gesetzt und die Abstiegslatenz gemessen. Die Tests fanden über einen Zeitraum von 180 min alle 30 min statt: 2 mal nach Haloperidolinjektion, was der Baselinemessung diente, und 4 mal nach Verabreichen der Testsubstanz (Zeitpunkt 65 min), was deren Wirkstärke durch Reduktion der Abstiegslatenz anzeigt.

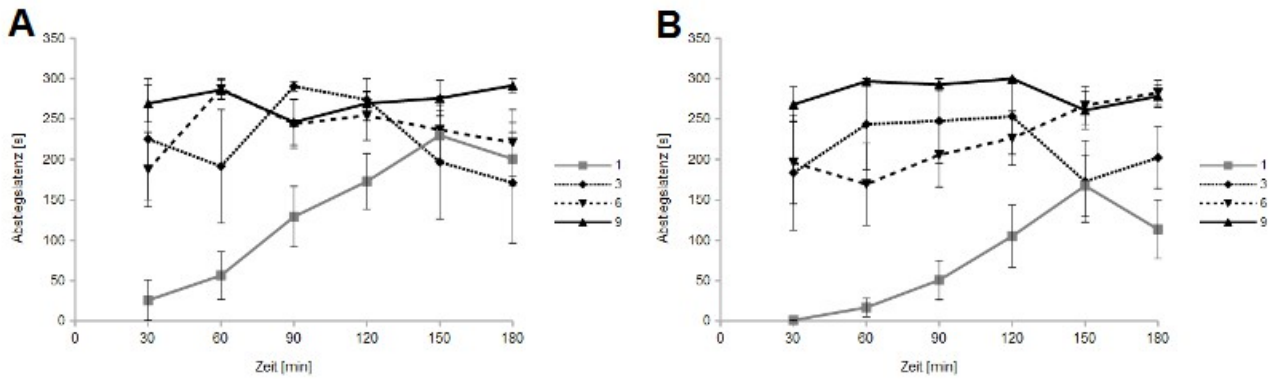
#### 5.1.1. DFS

##### Vergleich der Enantiomere im „Crossover“-Design (0,1,2,4 mg)

Der Verlauf der Sensitivierungsphase von Tag 1 bis Tag 9 sowie die Sensitivierung im Tagesverlauf ist für R-DFS (**A**) und S-DFS (**B**) aufgetragen (**Abbildung 17 A und B**). Es kam sowohl über die Tage (R-DFS [ $F_{\text{Tage}}(3,160)=5,38$ ;  $p=0,04$ ]; S-DFS [ $F_{\text{Tage}}(3,165)=20,4$ ;  $p<0,0001$ ]) als auch über die einzelnen Tests (R-DFS [ $F_{\text{Tests}}(5,160)=3$ ;  $p=0,01$ ]; S-DFS [ $F_{\text{Tests}}(5,165)=3,3$ ;  $p=0,0073$ ]) zu einer Sensitivierung des Abstiegsverhalten. Diese war an Tag 9 maximal ausgeprägt. Die Tiere waren somit zum Beginn der eigentlichen Testphase an Tag 12 maximal hochsensitiviert (R-DFS [ $F_{\text{Tage} \times \text{Tests}}(15,160)=3,54$ ;  $p<0,0001$ ], S-DFS [ $F_{\text{Tage} \times \text{Tests}}(15,165)=2,47$ ;  $p=0,003$ ]).

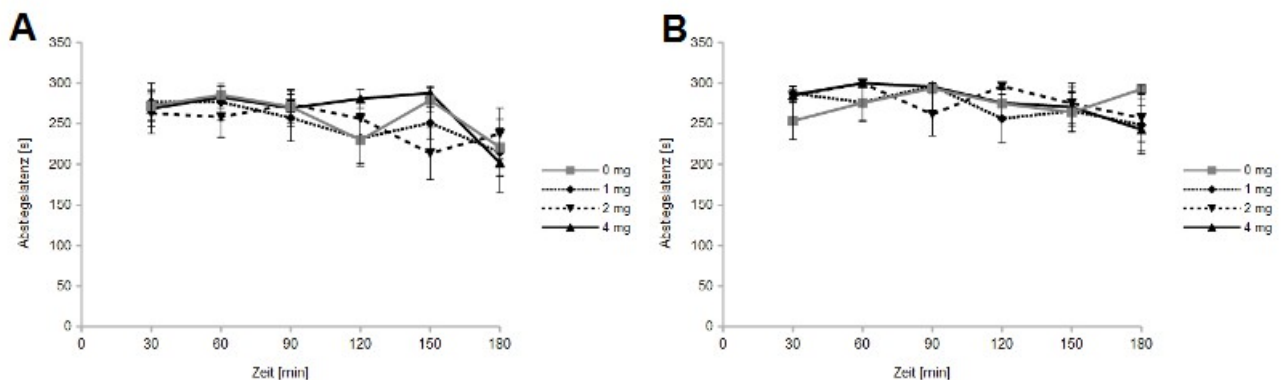


## 5. Ergebnisse



**Abbildung 17:** Die Abstiegslatenzen [s] von R-DFS (A) und S-DFS (B) im Verlauf über die Sensitivierungstage (1-9) im Tagesverlauf. Haloperidolinjektion (0,5mg/kg zum Zeitpunkt 0; Baseline-Tests bei 30 und 60 min; Substanzinjektion bei 65 min, Tests auf Wirkstärke bei 90, 120, 150 und 180 min. Dargestellt als Mittelwerte  $\pm$  SEM ( $n=12$ ).

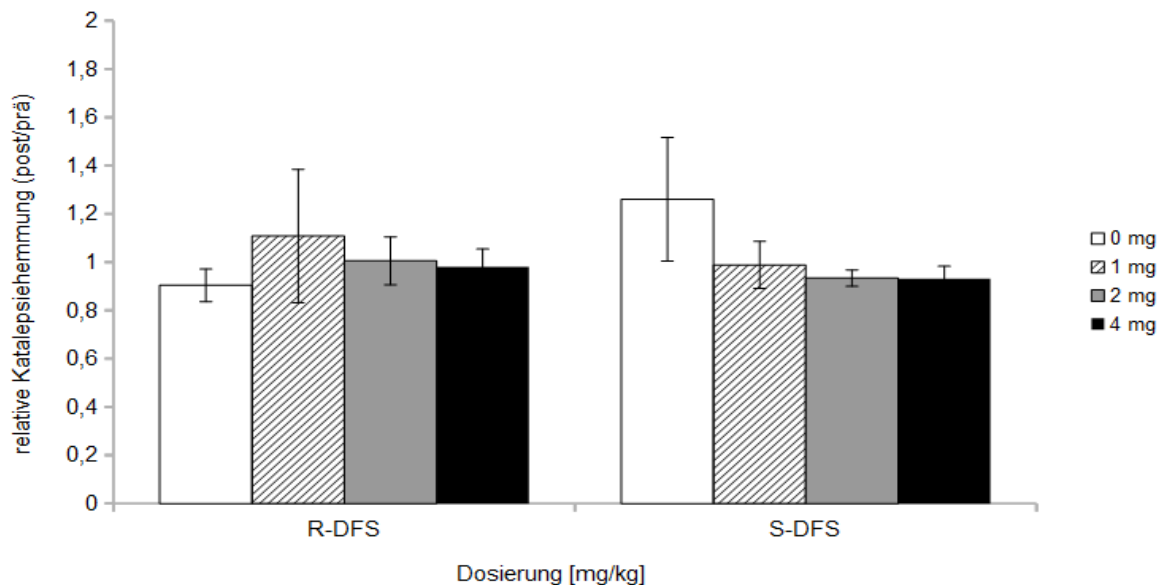
Betrachtet man die Ergebnisse der jeweiligen Dosierungen über alle Versuchstage (12-21) gemittelt, so zeigte sich für R-DFS (A) und S-DFS (B) keine signifikante Reduktion der Katalepsie über den Verlauf der einzelnen Tests (Abbildung 18 A&B). Dies zeigt sich sowohl in der Dosis, als auch über den Verlauf der einzelnen Tests. Einzig bei 2mg R-DFS ist ein signifikanter Effekt im Vergleich des ersten mit dem letzten Test zu erkennen (R-DFS [ $F_{\text{dosis}}(3,220)=0,2$ ;  $p=0,899$ ]; [ $F_{\text{tests}}(5,220)=4,2$ ;  $p=0,0012$ ]; [ $F_{\text{Dosis} \times \text{Tests}}(15,220)=0,89$ ;  $p=0,57$ ]. S-DFS [ $F_{\text{dosis}}(3,220)=0,16$ ;  $p=0,92$ ]; [ $F_{\text{tests}}(5,220)=1,15$ ;  $p=0,33$ ]; [ $F_{\text{Dosis} \times \text{Tests}}(15,220)=0,75$ ;  $p=0,73$ ]).



**Abbildung 18:** Die Abstiegslatenzen [s] von R-DFS (A) und S-DFS (B) für die jeweiligen Dosierungen im Tagesverlauf. Haloperidolinjektion (0,5mg/kg zum Zeitpunkt 0; Baseline-Tests bei 30 und 60 min; Substanzinjektion bei 65 min, Tests auf Wirkstärke bei 90, 120, 150 und 180 min. Dargestellt als Mittelwerte  $\pm$  SEM ( $n=12$ ).

## 5. Ergebnisse

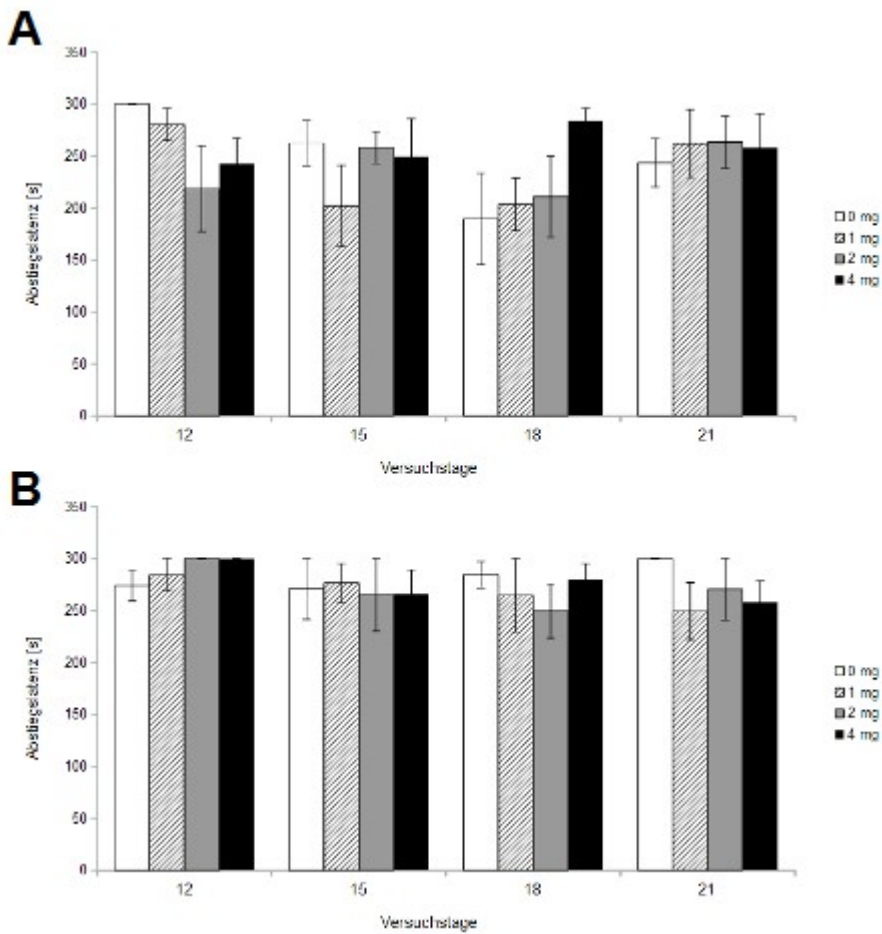
Beim Auftragen der normalisierten Abstiegslatenzen als relative Katalepsiehemmung zeigten die großen Quotienten ebenfalls keinen antikataleptischen Effekt an (R-DFS [ $F_{\text{dosis}}(3,44)=0,144$ ;  $p=0,93$ ] S-DFS [ $F_{\text{dosis}}(3,44)=0,79$ ;  $p=0,5$ ]). Die gemittelten Abstiegslatenzen der Tests 3-6 (nach (=post) Injektion) wurde durch die gemittelte Abstiegslatenzen von Test 1 und 2 (vor (=prä) Injektion) dividiert (**Abbildung 19**).



**Abbildung 19:** Die Darstellung der normalisierten Abstiegslatenzen als relative Katalepsiehemmung (Abstiegslatenz  $t(\text{Test 3-6})/t(\text{Test 1-2})$ )( $n=12$ ).

Eine Auftrennung der Ergebnisse auf die einzelnen Testtage (**Abbildung 20 A und B**) zeigte vor allem beim R-Enantiomer (**A**) eine leichte Reduktion der Abstiegslatenz an Tag 18 an. Allerdings wies die Kontrollgruppe an diesem Tag ebenfalls eine verringerte Abstiegslatenz auf.

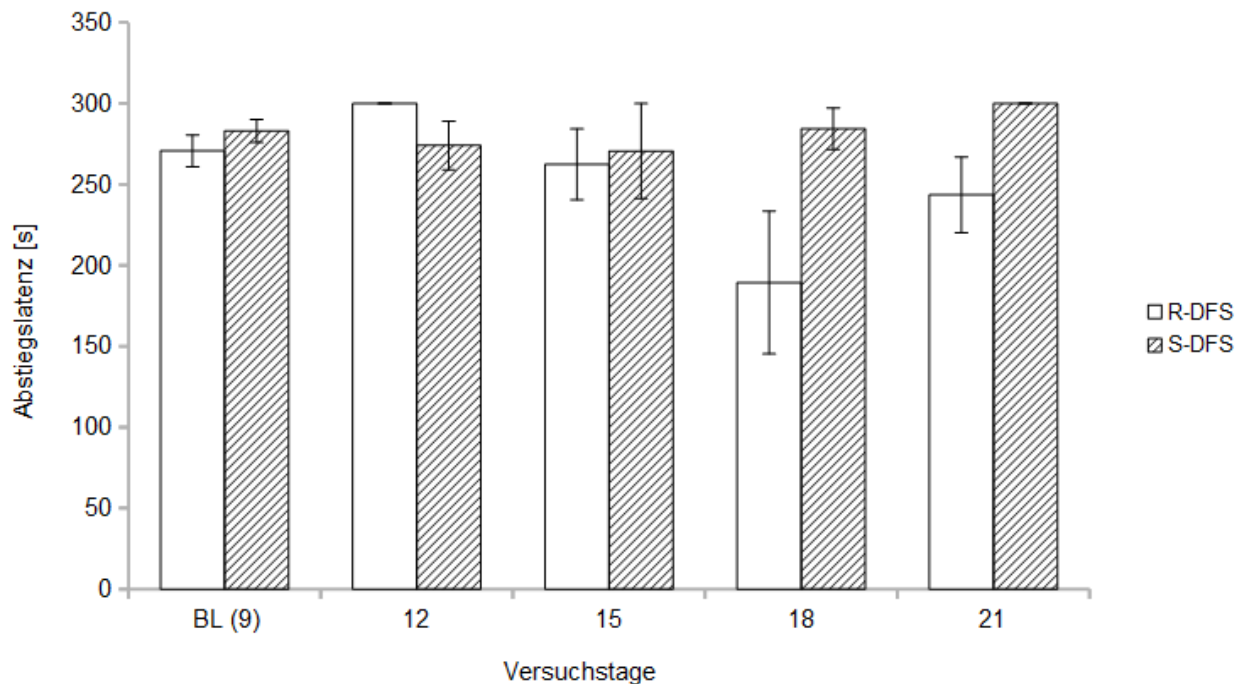
## 5. Ergebnisse



**Abbildung 20:** Verlauf der Abstiegslatenzen [s] von R-DFS (A) und S-DFS (B) der einzelnen Dosierungen über die Testtage. Dargestellt als Mittelwerte  $\pm$  SEM ( $n$ /Dosis/Tag=2;3).

Zudem zeigte die Kontrollgruppe ebenfalls Schwankungen über den Verlauf der Tests. Um dies genauer zu untersuchen wurden die Kontrollgruppe übersichtlicher im Tagesverlauf aufgetragen und mit der Baseline an Tag 9 verglichen (**Abbildung 21**), wobei bei R-DFS ab Tag 18 eine leichte Reduktion der Katalepsie bei R-DFS zu beobachten war, die Kontrollgruppe bei S-DFS allerdings sehr konstant verlief.

## 5. Ergebnisse

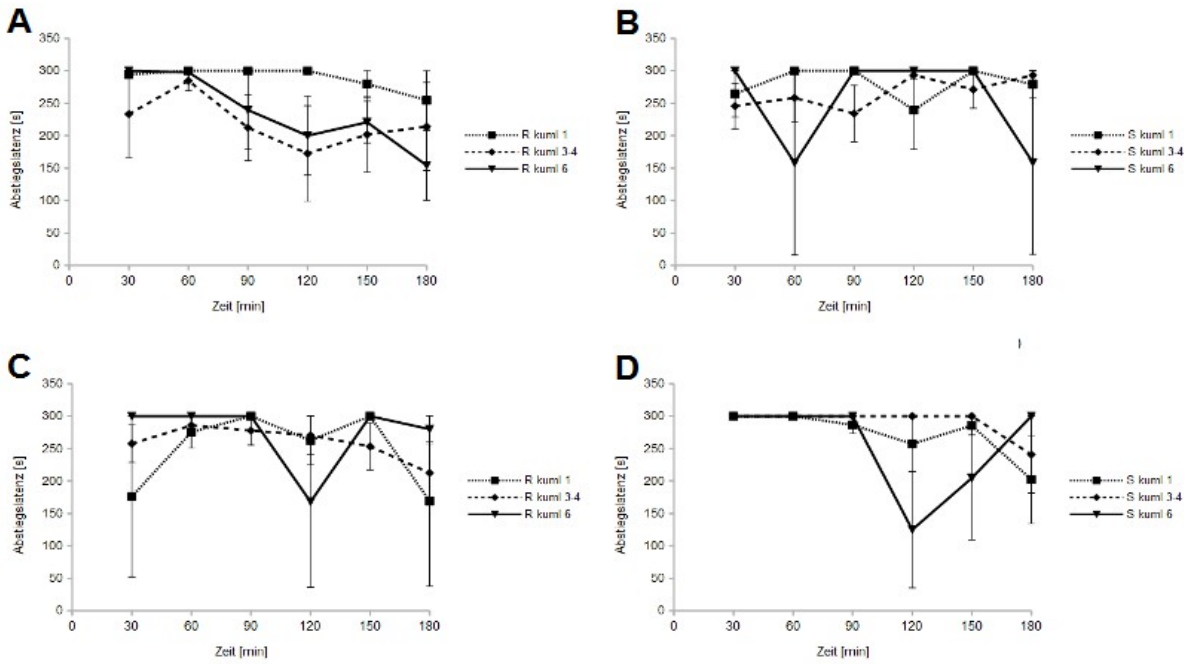


**Abbildung 21:** Verlauf der Abstiegslatenzen [s] der Kontrollgruppe (Vehikel) von R-DFS und S-DFS über die Testtage im Vergleich zur Baseline am letzten Sensitivierungstag. Dargestellt als Mittelwerte  $\pm$  SEM ( $n/\text{Dosis}/\text{Tag}=2,3$ ).

Um Aussagen über die Effekte einer kumulativen Dosis zu erhalten wurden die Ergebnisse von Tag 18 (**A und B**) und 21 (**C und D**) nach der jeweiligen kumulierten Dosis der Vorbehandlung von Tag 12 und 15 bzw. 15 und 18 gruppiert (Gruppen: Gesamtdosis 1 mg oder 3 bzw. 4 mg (zusammengelegt) oder 6 mg) (**Abbildung 22 A-D**). Bei einer höheren kumulativen Dosis zeigte sich eine geringere Abstiegslatenz und somit eine stärkere antikataleptische Wirkung. Dieser Effekt war insbesondere bei R-DFS ( $[F_{\text{dosis}}(2,45)=2,24; p=0,16]$ ;  $[F_{\text{tests}}(5,45)=1,98; p=0,09]$ ;  $[F_{\text{Dosis} \times \text{Tests}}(10,45)=0,55; p=0,84]$ ) vorbehandelten Tieren an Tag 18 (S-DFS ( $[F_{\text{dosis}}(2,40)=0,6; p=0,57]$ ;  $[F_{\text{tests}}(5,40)=0,48; p=0,78]$ ;  $[F_{\text{Dosis} \times \text{Tests}}(10,40)=0,99; p=0,46]$ ) (**A und B**) zu beobachten.

An Tag 21 (**C und D**) zeigte sich ein ähnlicher Verlauf bei beiden Enantiomeren, wobei sich der Test 4 bei 6mg S-DFA signifikant zu Test 1 unterscheidet (R-DFS ( $F_{\text{dosis}}(2,45)=1,67; p=0,84]$ ;  $[F_{\text{tests}}(5,45)=2,41; p=0,53]$ ;  $[F_{\text{Dosis} \times \text{Tests}}(10,45)=0,93; p=0,51]$ ); (S-DFS ( $[F_{\text{dosis}}(2,40)=0,96; p=0,42]$ ;  $[F_{\text{tests}}(5,40)=0,48; p=0,78]$ ;  $[F_{\text{Dosis} \times \text{Tests}}(10,40)=1,94; p=0,07]$ ).

## 5. Ergebnisse



**Abbildung 22:** Verlauf der Abstiegslatenzen [s] der theoretisch kumulierten Dosierungen von R-DFS an Tag 18 und 21 (A und C) und S-DFS (B und D) über die einzelnen Tests. Dargestellt als Mittelwerte  $\pm$  SEM ( $n=12$ ).

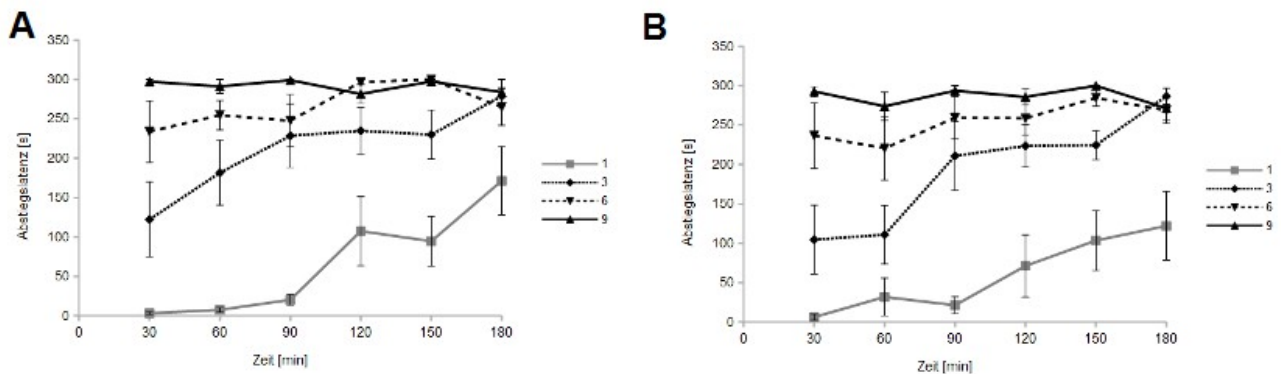
## 5. Ergebnisse

### 5.1.2 Difluor-Metamphetamin (MDFPPA)

#### 5.1.2.1 R&S Enantiomere 0,1,2,4mg im Crossoverdesign

Der Verlauf der Sensitivierungsphase von Tag 1 bis Tag 9 im Verlauf eines Versuchstages (**Abbildung 23**) zeigte, dass es sowohl über die Tage als auch über die einzelnen Tests zu einer Sensitivierung des Abstiegsverhalten kam und diese an Tag 9 maximal ausgeprägt war. Die Tiere waren somit zu Beginn der eigentlichen Testphase an Tag 12 maximal hochsensitiviert.

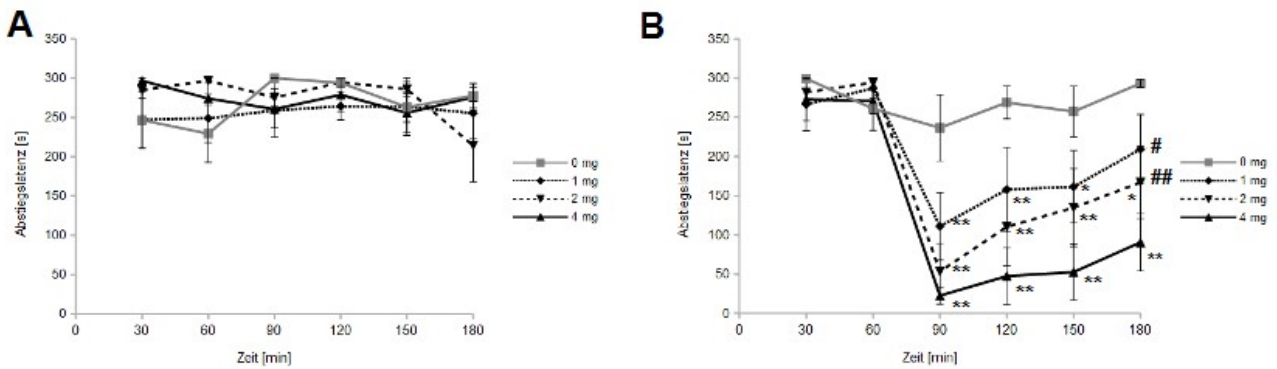
(R-MDFPPA  $[F_{\text{Tage}}(3,140)=26,3; p<0,0001]; [F_{\text{tests}}(5,140)=10,51; p<0,0001]; [F_{\text{Dosis} \times \text{Tests}}(15,140)=0,89; p=0,0007]$ . S-MDFPPA  $[F_{\text{Tage}}(3,140)=30,93; p<0,0001]; [F_{\text{tests}}(5,140)=9,96; p<0,0001]; [F_{\text{Dosis} \times \text{Tests}}(15,140)=3,15; p=0,0002]$ ).



**Abbildung 23:** Die Abstiegslatenzen [s] von R-MDFPPA (A) und S-MDFPPA (B) im Verlauf über die Sensitivierungstage (1-9) im Tagesverlauf. Haloperidolinjektion (0,5mg/kg zum Zeitpunkt 0; Baseline-Tests bei 30 und 60 min; Substanzinjektion bei 65 min, Tests auf Wirkstärke bei 90, 120, 150 und 180 min. Dargestellt als Mittelwerte  $\pm$  SEM ( $n=8$ ).

Die gemittelten Testtage im Verlauf über die einzelnen Tests zeigt eine starke dosisabhängige Wirkung des S-Enantiomer ( $[F_{\text{tage}}(3,140)=6,78; p=0,0014]; [F_{\text{tests}}(5,140)=27,78; p<0,0001]; [F_{\text{Dosis} \times \text{Tests}}(15,140)=2,88; p=0,0002]$ ), wohingegen das R-Enantiomer ( $[F_{\text{tage}}(3,140)=0,25; p=0,86]; [F_{\text{tests}}(5,140)=0,94; p=0,45]; [F_{\text{Dosis} \times \text{Tests}}(15,140)=1,46; p=0,13]$ ) keinen antikataleptischen Effekt aufzeigt (**Abbildung 24 A&B**).

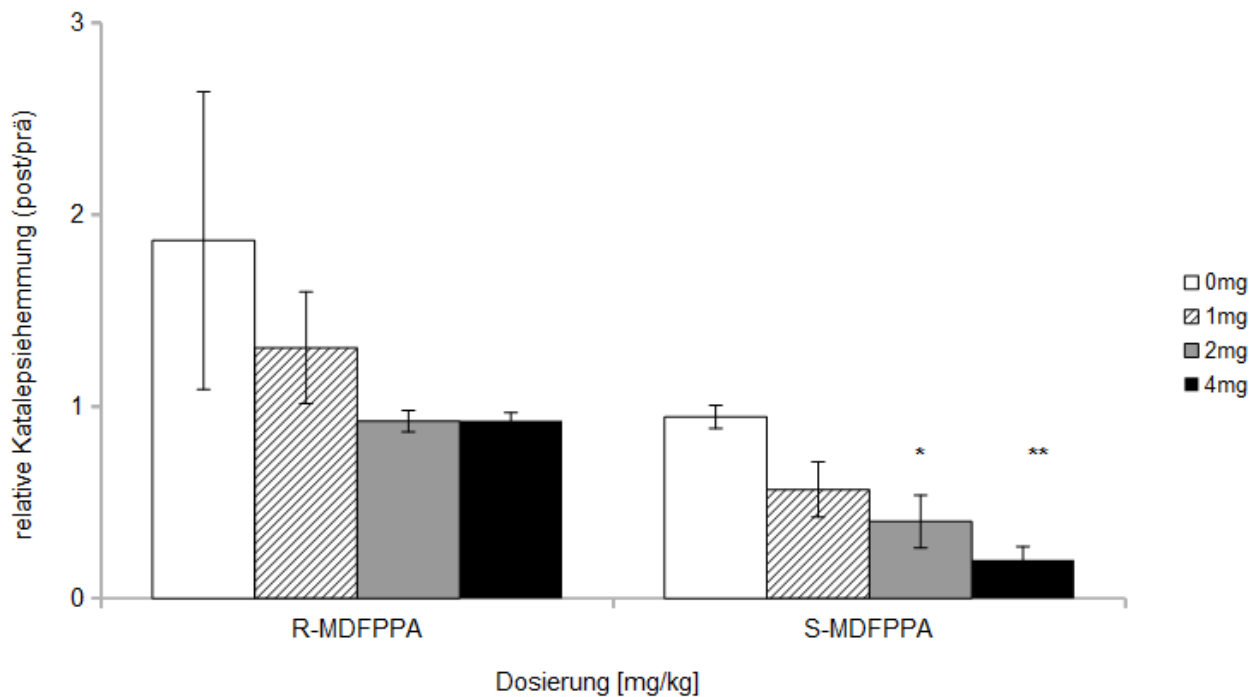
## 5. Ergebnisse



**Abbildung 24:** Die Abstiegslatenzen [s] von R-MDFPPA (A) und S-MDFPPA (B) für die jeweiligen Dosierungen im Tagesverlauf. Haloperidolinjektion (0,5mg/kg zum Zeitpunkt 0; Baseline-Tests bei 30 und 60 min; Substanzinjektion bei 65 min, Tests auf Wirkstärke bei 90, 120, 150 und 180 min. Dargestellt als Mittelwerte  $\pm$  SEM ( $n=8$ ). Post-hoc Fisher's LSD Test: \*\* $p<0,01$ , \*  $p<0,05$  (Vergleich mit 60min); ##  $p<0,01$ , # $p<0,05$  (Vergleich 90 mit 180min).

Die normalisierten Abstiegslatenzen zeigten nochmal deutlich einen starken dosisabhängigen Verlauf bei S-MDFPPA ( $[F_{\text{dosis}}(3,28)=3,84; p=0,02]$ ) und einen schwachen bei R-MDFPPA ( $[F_{\text{dosis}}(3,28)=2,11; p=0,29]$ ) (**Abbildung 25**).

## 5. Ergebnisse



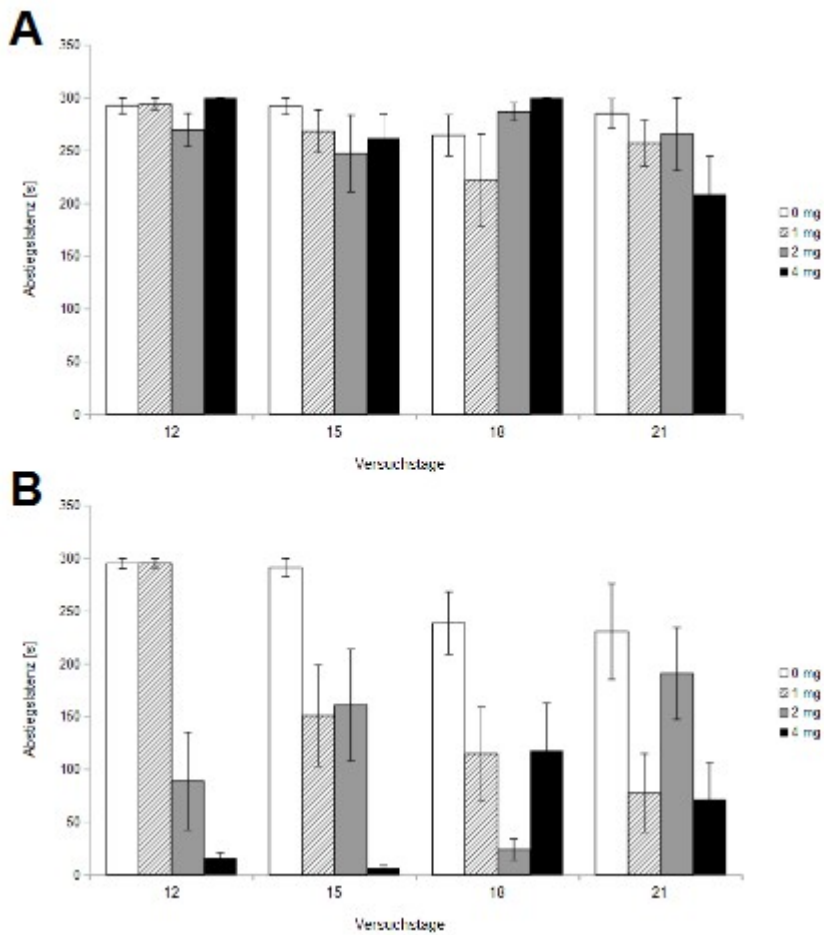
**Abbildung 25:** Die Darstellung der normalisierten Abstiegslatenzen von R- und S-MDFPPA als relative Katalapsiehemmung ( $\text{Abstiegslatenz } t(\text{Test 3-6}) / t(\text{Test 1-2})$ )( $n=8$ ). Post-hoc Dunnett's-Test: \*\*  $p < 0,01$ ; \*  $p < 0,05$  zur Kontroll-Gruppe.

Eine Auftrennung der Ergebnisse auf die einzelnen Testtage (**Abbildung 26**) zeigte bei R-MDFPPA (**A**) eine leichte Reduktion der Abstiegslatenz bei der 4 mg/kg Behandlung an Tag 21 im Vergleich zu den Vortagen. Ansonsten lag insgesamt keine antikataleptische Wirkung vor.

Bei S-MDFPPA (**B**) ist der dosisabhängige Verlauf klar zu erkennen. 1 mg entfaltete seine Wirkung erst am zweiten Behandlungstag, verbesserte sich dann aber über die restlichen Tage. Bei 2 mg schwankte der Verlauf mit hohen Standardabweichungen, an Tag 18 war die Abstiegslatenz am stärksten verringert. Bei 4 mg kam es, nach geringen Abstiegslatenzen an den ersten zwei Behandlungstagen, zu einem Anstieg an Tag 18 und 21.



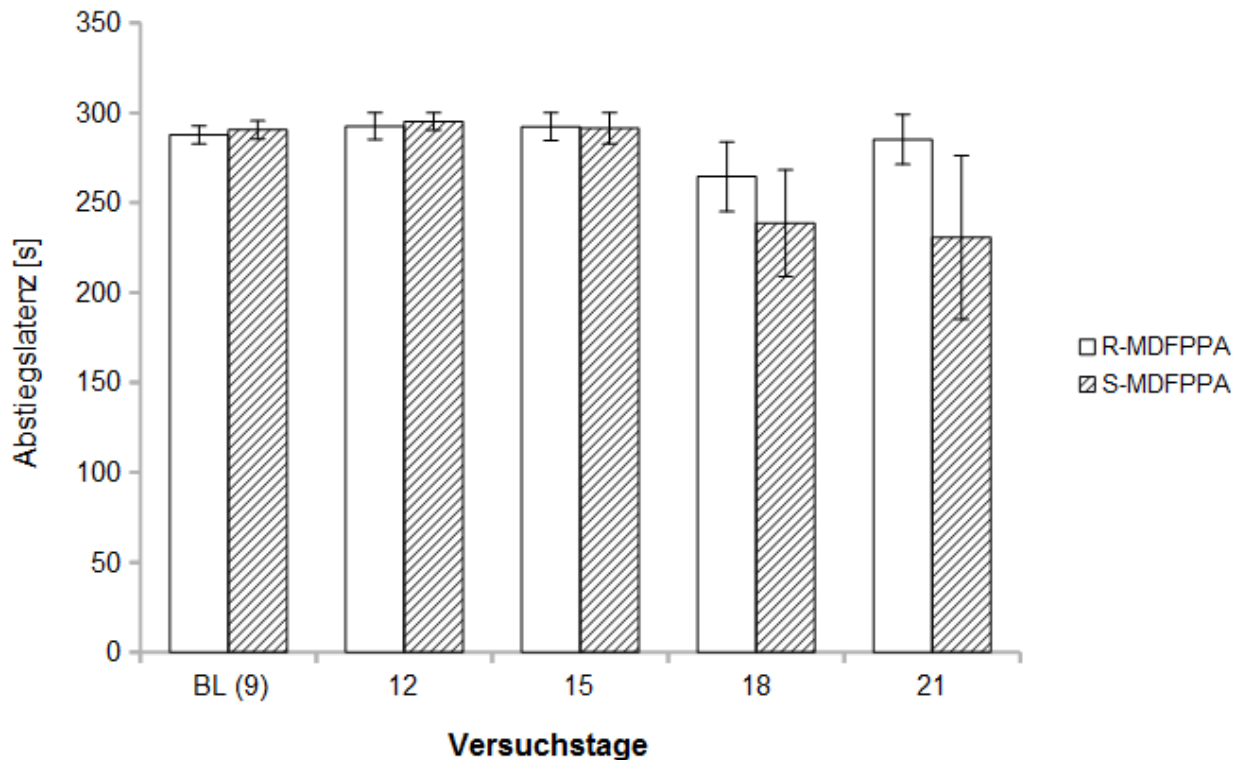
## 5. Ergebnisse



**Abbildung 26:** Verlauf der Abstiegslatenzen [s] von R-MDFPPA (A) und S-MDFPPA (B) der einzelnen Dosierungen über die Testtage. Dargestellt als Mittelwerte  $\pm$  SEM ( $n/Dosis/Tag=2$ ).

Die Kontrolle 0 mg in den zwei Gruppen zeigten einen stabilen Verlauf bei R-MDFPPA und bei S-MDFPPA eine verminderte Abstiegslatenz an Tag 18 und 21 an. Das Auftragen der Kontrolle dient dem Erkennen eines evtl. durch das Crossover-Design bedingten Kumulationseffekt, der sich in der (theoretisch maximal ausgeprägten Katalapsie) als verringerte Abstiegslatenzen zeigt (**Abbildung 27**).

## 5. Ergebnisse



**Abbildung 27:** Verlauf der Abstiegslatenzen [s] der Kontrollgruppe (Vehikel) von R-MDFPPA (A) und S-MDFPPA (B) im Vergleich zur Baseline am letzten Sensitivierungstag über die Testtage. Dargestellt als Mittelwerte  $\pm$  SEM ( $n/\text{Dosis}/\text{Tag}=2$ ).

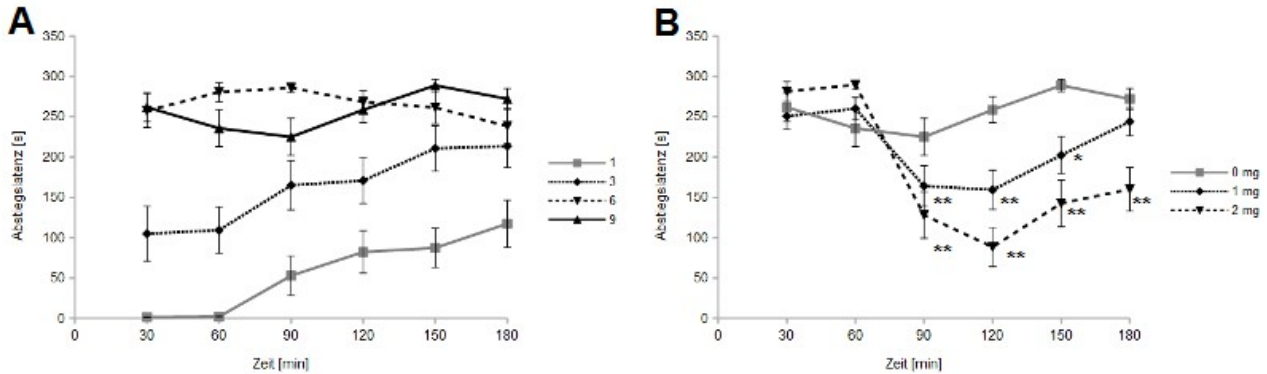
### 5.1.2.2 S-MDFPPA 0,1,2 mg konstante Dosierungen

Bei S-MDFPPA wurde zudem eine Testreihe mit konstanten Dosierungen durchgeführt um einen evtl. kumulativen Effekt besser erkennen zu können. Im Gegensatz zur Behandlung im angewandten „Crossover“-Design in welchem alle Tiere alle Dosierungen erhielten, wurde hierbei konstant eine Dosis verabreicht.

Der stabile Verlauf der Sensitivierungsphase von Tag 1 bis Tag 9, sowie die Sensitivierung im Tagesverlauf ist für S-MDFPPA aufgetragen (**Abbildung 28 A**). Sowohl über die Tage als auch über die einzelnen Tests kam es zu einer Sensitivierung des Abstiegsverhalten und einer maximalen Ausprägung an Tag 9. Die Tiere waren somit zu Beginn der eigentlichen Testphase an Tag 12 maximal hochsensitiviert. [ $F_{\text{tage}}(3,300)=34,9$ ;  $p<0,0001$ ]; [ $F_{\text{tests}}(5,300)=6,83$ ;  $p<0,0001$ ]; [ $F_{\text{Dosis} \times \text{Tests}}(15,300)=2,82$ ;  $p=0,0004$ ].

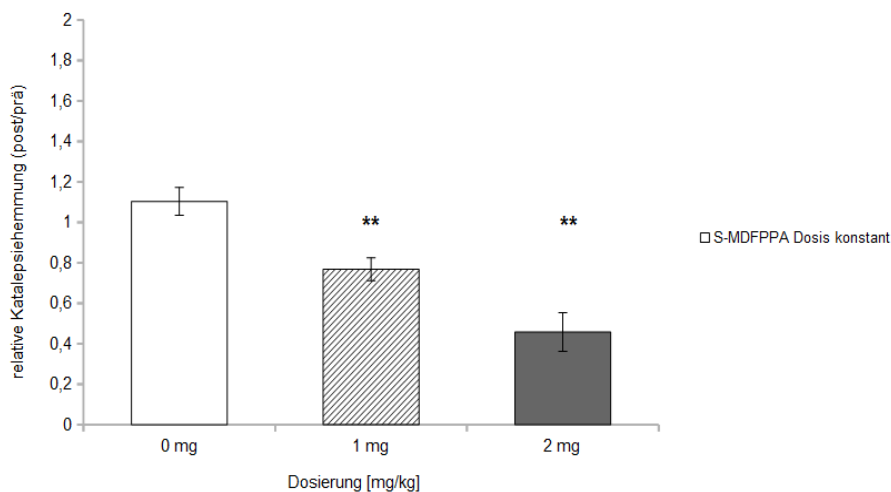
## 5. Ergebnisse

Der Verlauf über die einzelnen Tests in der Testphase der Substanz [ $F_{\text{tage}}(2/305)=6,75$ ;  $p<0,0022$ ]; [ $F_{\text{tests}}(5/305)=16,97$ ;  $p<0,0001$ ]; [ $F_{\text{Dosis} \times \text{Tests}}(10/305)=7,2$ ;  $p<0,0001$ ] zeigt eine dosisabhängige Verbesserung der Katalepsie (**Abbildung 28 B**).



**Abbildung 28:** Die Abstiegslatenzen [s] von S-MDFPPA im Verlauf über die Sensitivierungstage (1-9) im Tagesverlauf ( $n=16$ ) (A). Die Abstiegslatenzen [s] von S-MDFPPA im Verlauf über die Testtage (12-21) im Tagesverlauf (B). Haloperidolinjektion (0,5mg/kg zum Zeitpunkt 0; Baseline-Tests bei 30 und 60 min; Substanzinjektion bei 65 min, Tests auf Wirkstärke bei 90, 120, 150 und 180 min. Dargestellt als Mittelwerte  $\pm$  SEM (0 mg  $n=4$ ; 1 und 2 mg je  $n=6$ ). Post-hoc Fisher's LSD Test: \*\* $p<0,01$ , \*  $p<0,05$  (Vergleich mit 60min).

Die normalisierte Abstiegslatenzen von S-MDFPPA zeigen einen dosisabhängigen Verlauf der Gruppe ([ $F_{\text{dosis}}(2,61)=0,94$ ;  $p=0,007$ ]). Dies ist ebenfalls für jede Dosis im Verlauf über die einzelnen Testtage zu sehen (**Abbildung 29**).

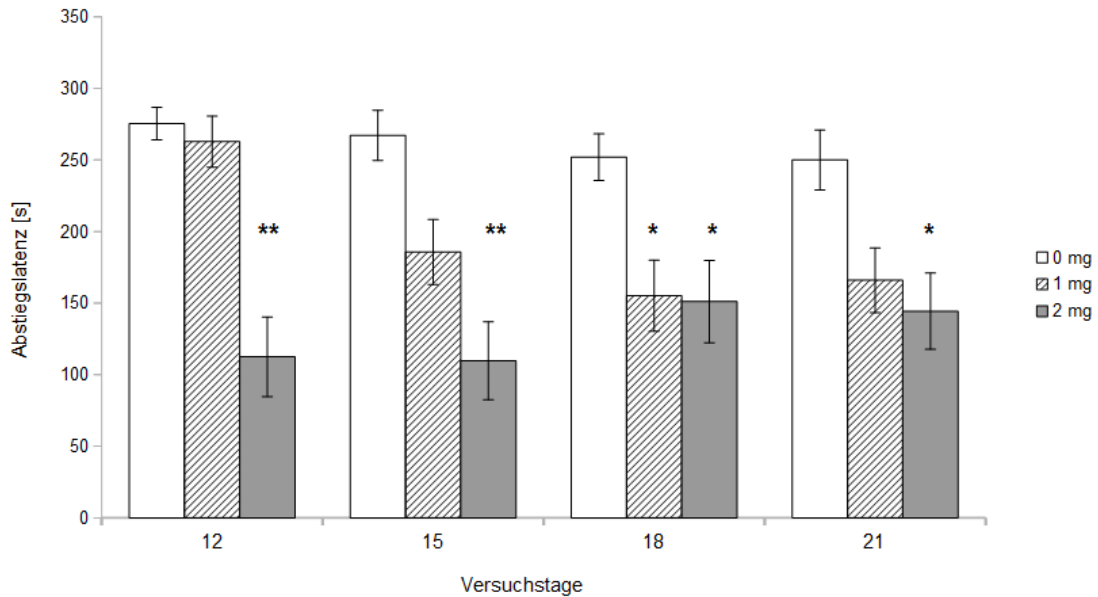


**Abbildung 29:** Die Darstellung der normalisierten Abstiegslatenzen von S-MDFPPA als relative Katalepsiehemmung (Abstiegslatenz  $t(\text{Test 3-6})/t(\text{Test 1-2})$ )(0mg  $n=4$ ; 1 und 2mg je  $n=6$ ). Post-hoc Dunnett 's-Test: \*\*  $p<0,01$ ; \*  $p<0,05$  zur Kontroll-Gruppe.

## 5. Ergebnisse

Bei der Auftrennung der Gruppen auf die einzelnen Testtage ist zu sehen, dass sich der antikataleptische Effekt dosisabhängig über die Zeit entwickelte.

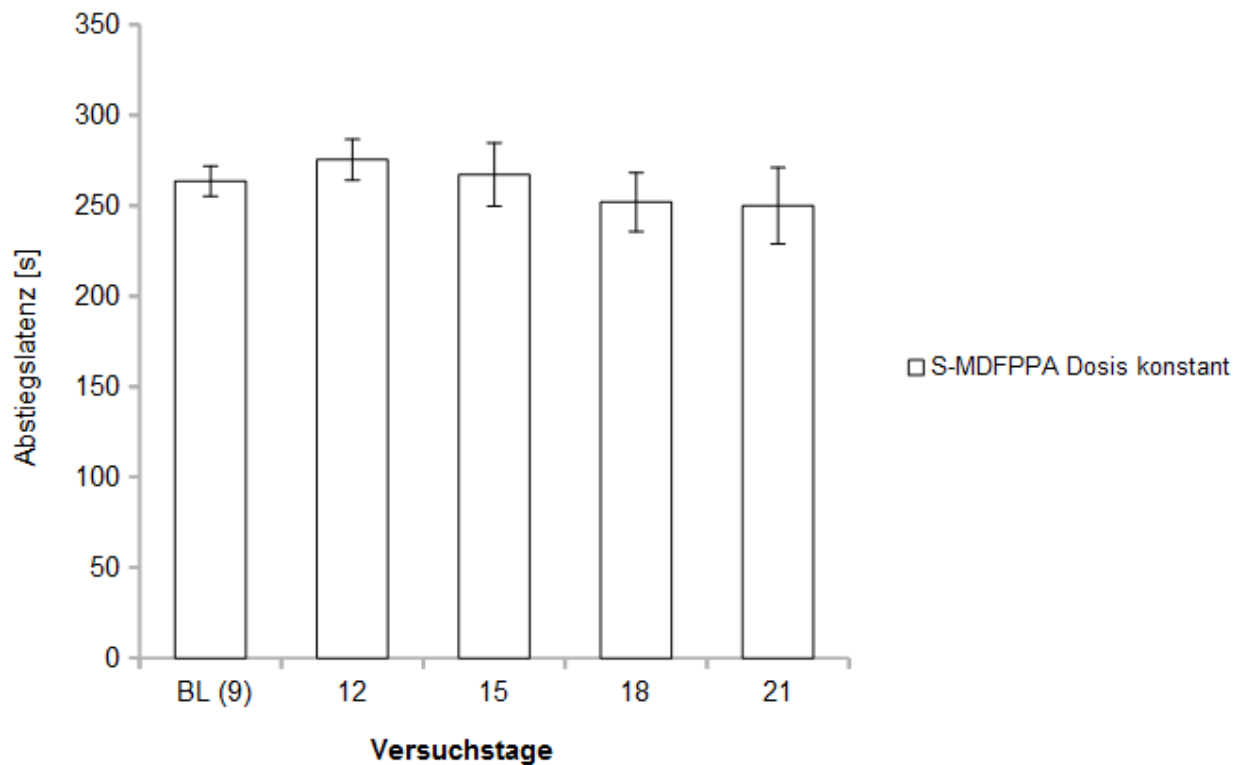
Bei 1mg ist ab Tag 15 eine verbesserte Abstiegslatenz zu sehen, die an Tag 18 signifikant unterschiedlich zur Kontrolle war. Bei 2 mg direkt ab Tag 12 [ $F_{\text{Dosis}}(2,183)=12,05$ ;  $p<0,0001$ ]; [ $F_{\text{tests}}(3,183)=2,23$ ;  $p=0,08$ ]; [ $F_{\text{Dosis} \times \text{Tests}}(6,183)=2,82$ ;  $p=0,002$ ] (**Abbildung 30**).



**Abbildung 30:** Verlauf der Abstiegslatenzen [s] von S-MDFPPA (A) der einzelnen Dosierungen über die Testtage. Dargestellt als Mittelwerte  $\pm$  SEM (0 mg  $n=4$ ; 1 und 2 mg je  $n=6$ ). Post-hoc Tukey-Kramer: \*\*  $p<0,01$ ; \*  $p<0,05$  zur Kontroll-Gruppe.

## 5. Ergebnisse

Die Kontrollgruppe (0mg) zeigte im Vergleich zur Baseline am Tag 9 der Sensitivierungsphase eine stabil hohe Abstiegslatenz im Verlauf über die Testtage [ $F_{\text{tagc}}(4,479)=3,95$   $p=0,0037$ ] (**Abbildung 31**).

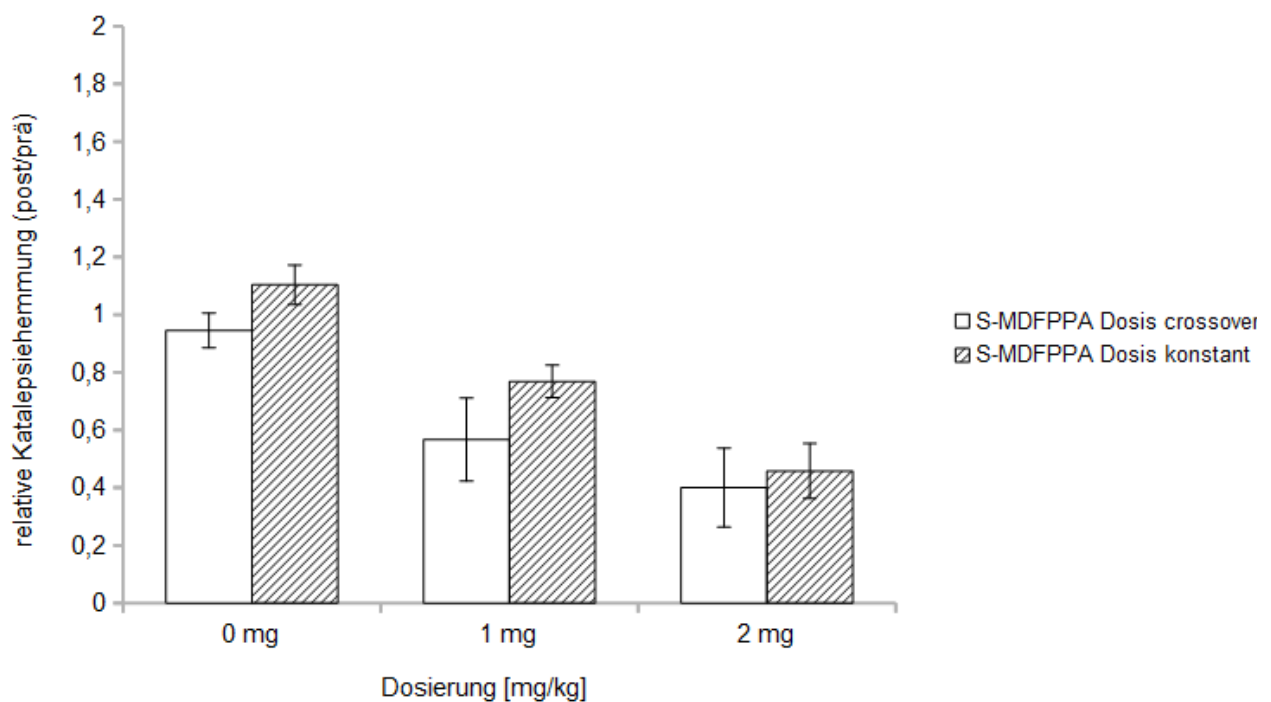


**Abbildung 31:** Verlauf der Abstiegslatenzen [s] der Kontrollgruppe (Vehikel) von S-MDFPPA über die Testtage im Vergleich zur Baseline am letzten Sensitivierungstag. Dargestellt als Mittelwerte  $\pm$  SEM ( $n/\text{Dosis}/\text{Tag}=2$ ).

## 5. Ergebnisse

### 5.1.2.3 Vergleich der verschiedenen Behandlungs-Design bei S-MDFPPA

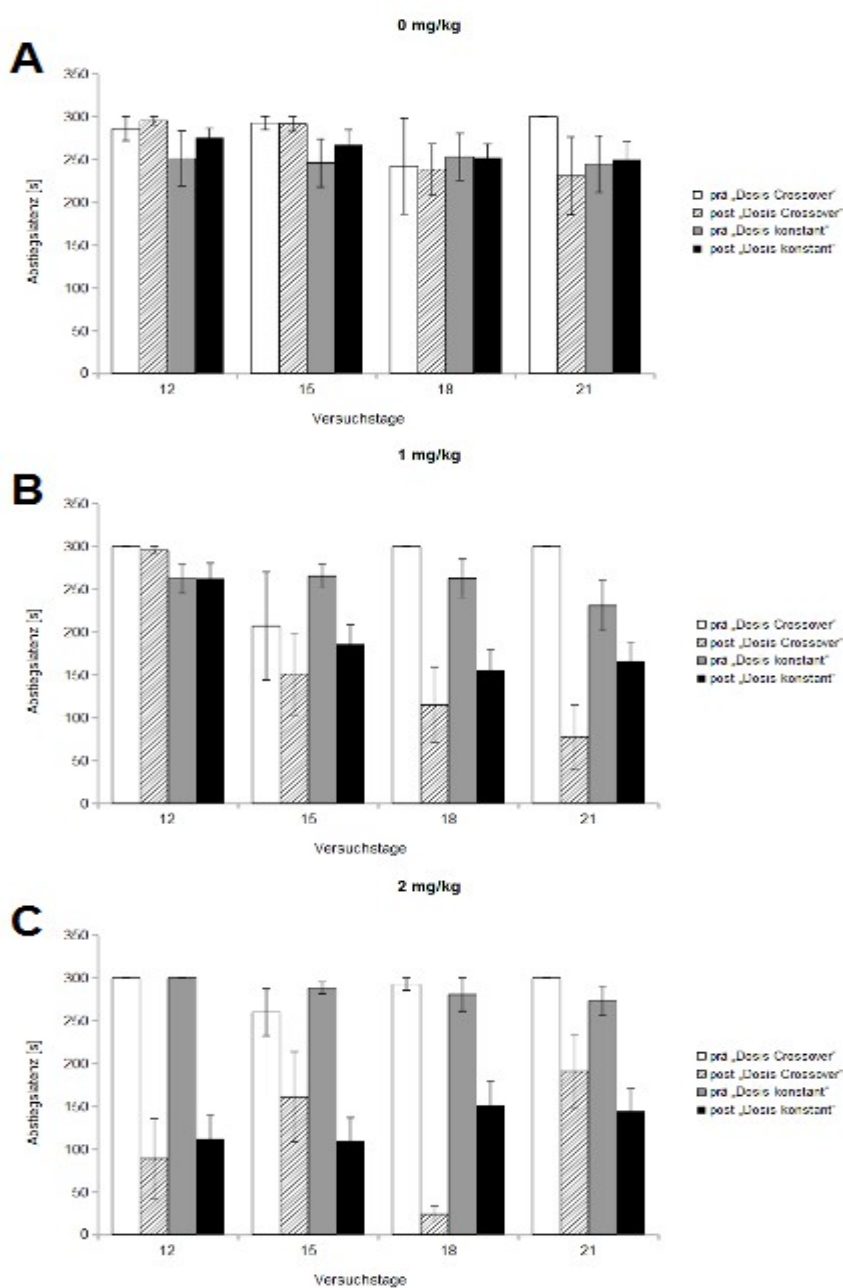
Vergleicht man die 2 Versuchsreihen so ist zu sehen, dass die Ergebnisse für die gemittelten Versuchstage, als relative Katalepsiehemmung dargestellt, keinen signifikanten Unterschied zwischen den zwei Gruppen zeigte [ $F_{\text{Design}}(1,46)=0,11$ ;  $p=0,74$ ]; [ $F_{\text{dosis}}(2,46)=29,77$ ;  $p<0,0001$ ]; [ $F_{\text{Design} \times \text{Dosis}}(2,46)=0,36$ ;  $p=0,7$ ] (**Abbildung 32**).



**Abbildung 32:** Die Darstellung der normalisierten Abstiegslatenzen von S-MDFPPA, mit Behandlung crossover-Dosis und konstanter Dosis, als relative Katalepsiehemmung dargestellt (Abstiegslatenz  $t(\text{Test 3-6})/t(\text{Test 1-2})$ )(konstant: 0 mg  $n=4$ ; 1 und 2 mg je  $n=6$ ; crossover:  $n=8$ ).

Über die Testtage hinweg (**Abbildung 33 A,B,C**) war die Katalepsie der 0 mg Gruppe gleichmäßig hoch (**A**). Bei den Gruppen 1 und 2 mg war die Katalepsie während der Prä-Tests ebenso hoch über die Testtage, bei den Post-Tests wurden Unterschiede sichtbar: bei 1 mg (**B**) zeigte sich von Tag 15 an eine geringere Abstiegslatenz bei der Crossover-Dosierung, der Unterschied war allerdings nur an Tag 21 stark ausgeprägt. Bei 2 mg (**C**) war der Unterschied an Tag 18 sehr stark ausgeprägt. Die hohen Standardabweichungen bei der Betrachtung der einzelnen Versuchstage waren durch die geringe Tierzahl pro Dosis pro Tag bedingt ( $n=2$ ).

## 5. Ergebnisse



**Abbildung 33:** Verlauf der Abstiegslatenzen [s] der 0 mg (A), 1 mg (B) und 2 mg (C)- Dosierung von S-MDFPPA mit Behandlung crossover-Dosis und konstanter Dosis, sowohl prä- als auch post-Injektion der Substanz, über die einzelnen Testtage. Dargestellt als Mittelwerte  $\pm$  SEM ( $n/\text{Tag}/\text{Dosis} = \text{Dosis konstant: } 0 \text{ mg } n=2; 1 \text{ und } 2 \text{ mg je } n=3; \text{ Dosis crossover: } n=2$ ).

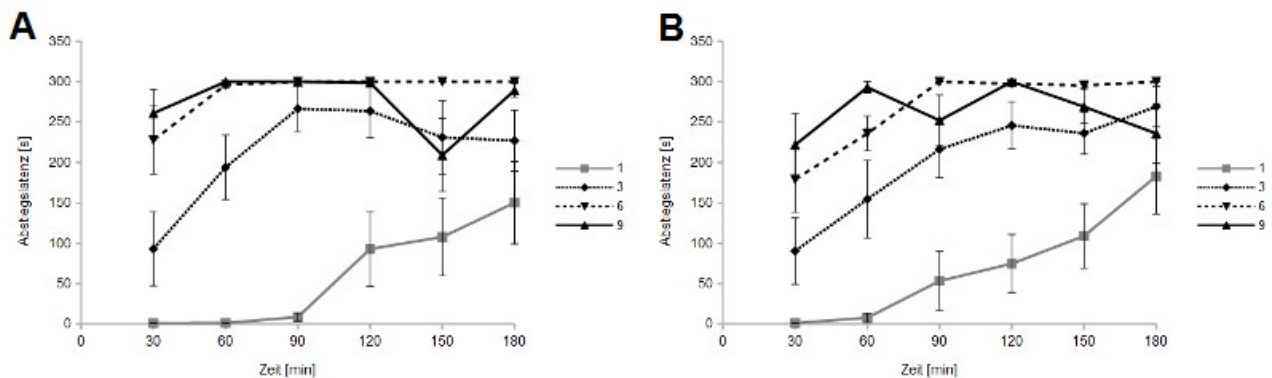
## 5. Ergebnisse

### 5.1.3 Difluor-Amphetamin (DFA)

#### 5.1.3.1 R&S Enantiomere 0,1,2,4 mg im Crossoverdesign

Sowohl über die Tage als auch über die einzelnen Tests kam es im Verlauf der Sensitivierungsphase (Tag 1 – Tag 9, **Abbildung 34**) zu einer Sensitivierung des Abstiegsverhalten. Diese war an Tag 9 maximal ausgeprägt. Die Tiere waren somit bei Beginn der eigentlichen Testphase an Tag 12 maximal hochsensitiviert.

(R-DFA [ $F_{\text{tage}}(3,140)=37,82$ ;  $p<0,0001$ ]; [ $F_{\text{tests}}(5,140)=7,08$ ;  $p<0,0001$ ]; [ $F_{\text{Dosis} \times \text{Tests}}(15,140)=2,65$ ;  $p=0,0014$ ]. S-DFA [ $F_{\text{tage}}(3,40)=21,94$ ;  $p<0,0001$ ]; [ $F_{\text{tests}}(5,140)=14,99$ ;  $p<0,0001$ ]; [ $F_{\text{Dosis} \times \text{Tests}}(15,140)=2,51$ ;  $p=0,0026$ ].

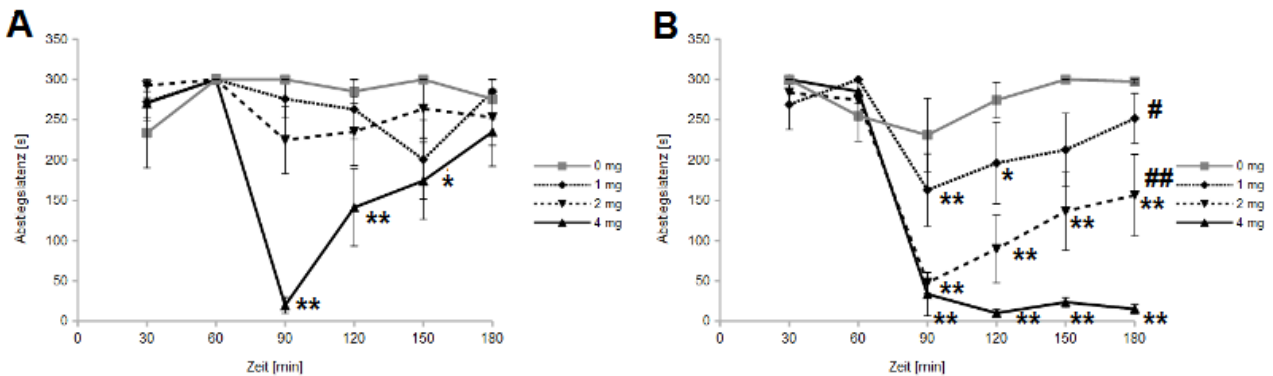


**Abbildung 34:** Die Abstiegslatenzen [s] von R-DFA (A) und S-DFA (B) im Verlauf über die Sensitivierungstage (1-9) im Tagesverlauf. Haloperidolinjektion (0,5mg/kg zum Zeitpunkt 0; Baseline-Tests bei 30 und 60 min; Substanzinjektion bei 65 min, Tests auf Wirkstärke bei 90, 120, 150 und 180 min. Dargestellt als Mittelwerte  $\pm$  SEM ( $n=8$ ).



## 5. Ergebnisse

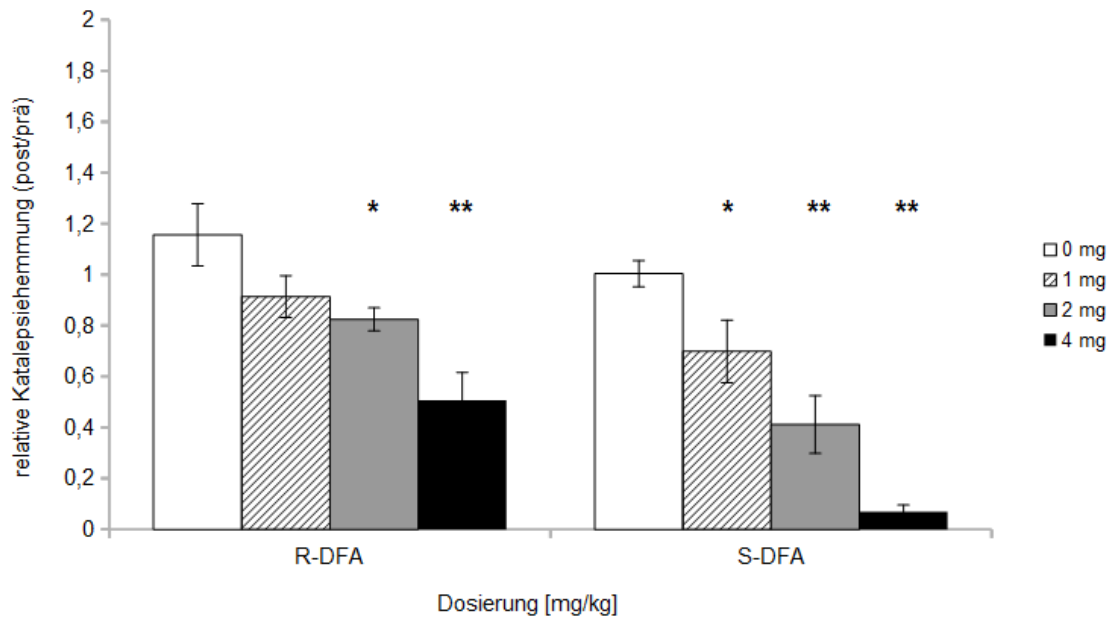
In der Darstellung der gemittelten Testtage im Verlauf über die einzelnen Tests zeigte bei S-DFA eine stark ausgeprägte dosisabhängige Reduktion der Katalepsie, welche bei 4 mg bis zum letzten Test anhielt [ $F_{\text{dosis}}(3,140)=15,1$ ;  $p<0,0001$ ]; [ $F_{\text{tests}}(5,140)=32,52$ ;  $p<0,0001$ ]; [ $F_{\text{Dosis} \times \text{Tests}}(15,140)=6,65$ ;  $p<0,0001$ ]. Bei der mit R-DFA behandelten Gruppe war die Katalepsie ausschließlich bei der 4mg Dosierung an Test 3 stark gehemmt, welche sich aber an den folgenden Testtagen wieder reduzierte [ $F_{\text{dosis}}(3,140)=10,23$ ;  $p=0,0001$ ]; [ $F_{\text{tests}}(5,140)=5,27$ ;  $p=0,0002$ ]; [ $F_{\text{Dosis} \times \text{Tests}}(15,140)=3,47$ ;  $p<0,0001$ ] (**Abbildung 35 A&B**).



**Abbildung 35:** Die Abstiegslatenzen [s] von R-DFA (A) und S-DFA (B) für die jeweiligen Dosierungen (mg/kg/ im Tagesverlauf. Haloperidolinjektion (0,5mg/kg zum Zeitpunkt 0; Baseline-Tests bei 30 und 60 min; Substanzinjektion bei 65 min, Tests auf Wirkstärke bei 90, 120, 150 und 180 min. Dargestellt als Mittelwerte  $\pm$  SEM ( $n=8$ ). Post-hoc Fisher's LSD Test: \*\* $p<0,01$ , \*  $p<0,05$  (Vergleich mit 60min); ##  $p<0,01$ , #  $p<0,05$  (Vergleich 90 mit 180min).

## 5. Ergebnisse

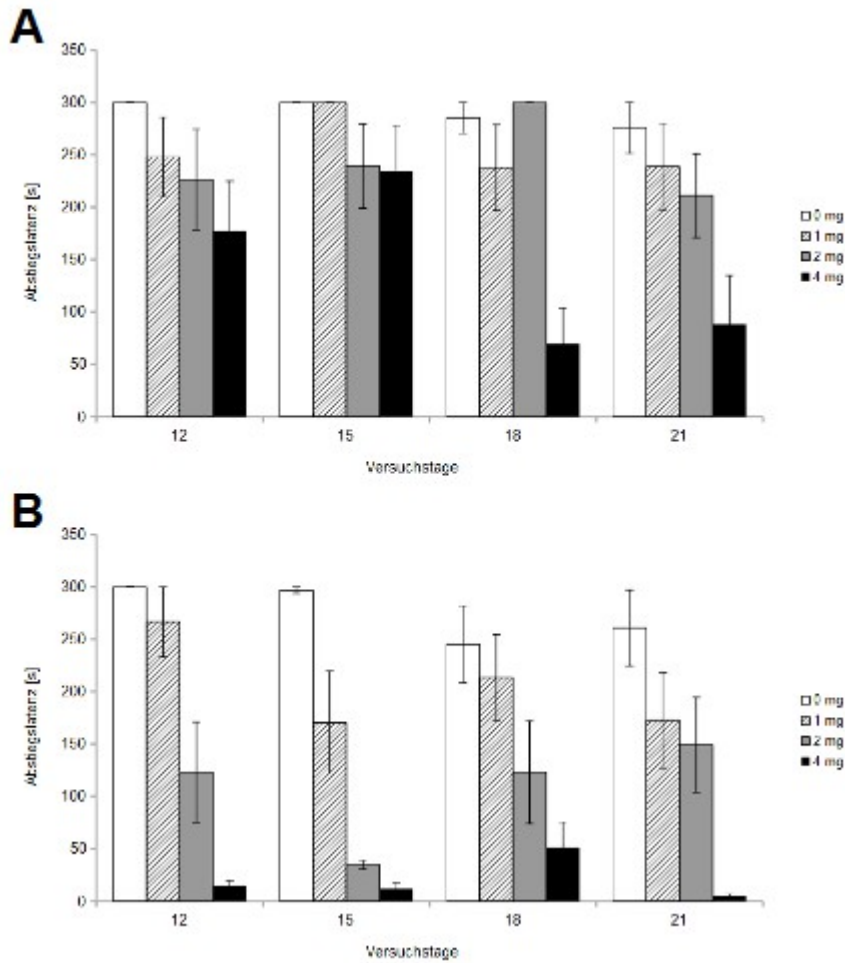
Die Darstellung der normalisierten Abstiegslatenzen als relative Katalepsie verdeutlicht bei R-DFA [ $F_{\text{Dosis}}(3,28)=8,16$ ;  $p=0,0005$ ] und S-DFA [ $F_{\text{Dosis}}(3,28)=20,25$ ;  $p<0,0001$ ] eine dosisabhängige Hemmung der Katalepsie, die bei S-DFA stärker ausgeprägt war (**Abbildung 36**).



**Abbildung 36:** Die Darstellung der normalisierten Abstiegslatenzen von R- und S-DFA als relative Katalepsiehemmung (Abstiegslatenz  $t(\text{Test 3-6})/t(\text{Test 1-2})$ )( $n=8$ ). Post-hoc Dunnett's-Test: \*\*  $p<0,01$ ; \*  $p<0,05$  zur Kontroll-Gruppe.

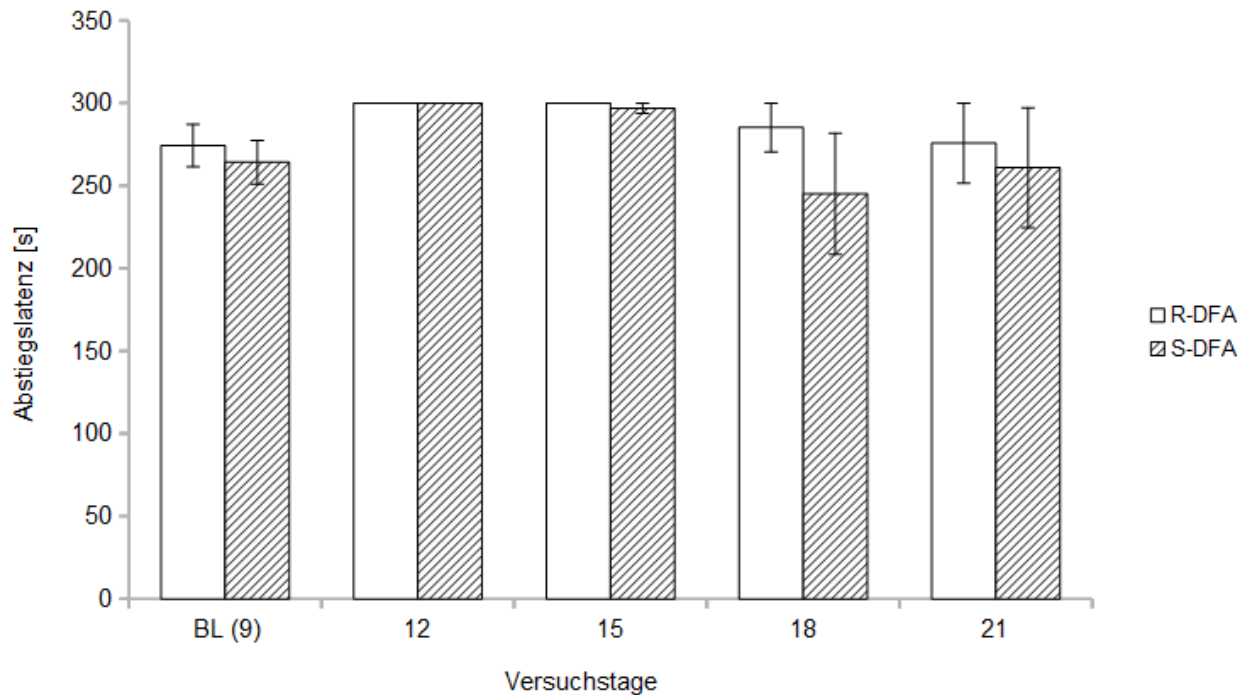
## 5. Ergebnisse

Betrachtet man die Ergebnisse der einzelnen Dosierungen an den jeweiligen Testtagen, so ist zu sehen, dass der starke Effekt von R-DFA (A) an Test 3 hauptsächlich auf eine starke antikataleptische Wirkung am vorletzten und letzten Testtag zurückzuführen war (Abbildung 37 A und B). Bei S-DFA verliefen die antikataleptischen Wirkungen dosisabhängig.



**Abbildung 37:** Verlauf der Abstiegslatenzen [s] von R-DFA (A) und S-DFA (B) der einzelnen Dosierungen über die Testtage. Dargestellt als Mittelwerte  $\pm$  SEM ( $n/Dosis/Tag=2$ ).

## 5. Ergebnisse



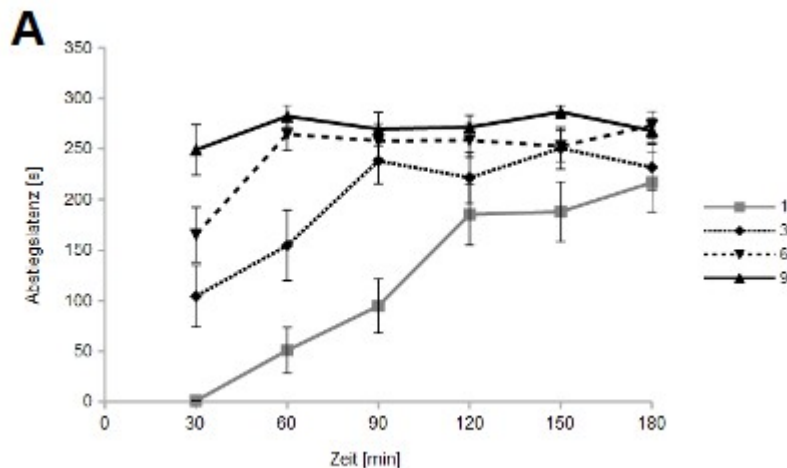
**Abbildung 38:** Verlauf der Abstiegslatenzen [s] der Kontrollgruppe (Vehikel) von R- und S-DFA über die Testtage im Vergleich zur Baseline am letzten Sensitivierungstag. Dargestellt als Mittelwerte  $\pm$  SEM ( $n/\text{Tag}=2$ ).

Die Kontrolle (PBS) wies in der R-DFA-Gruppe an allen Testtagen eine stabil hohe Abstiegslatenz auf, bei S-DFA war die Abstiegslatenz an den beiden letzten Testtagen leicht verringert, jedoch mit höheren Abweichungen (**Abbildung 38**).

## 5. Ergebnisse

### 5.1.3.2 Enantiomeremischungen mit Finaldosis 0,1,2,4 mg

Neben der normalen 1:1 Mischung der Enantiomere, dem sog. Racemat, wurden 1:3 und 3:1 Mischungen für die jeweiligen Finaldosierungen 1, 2 und 4 mg/kg verwendet.

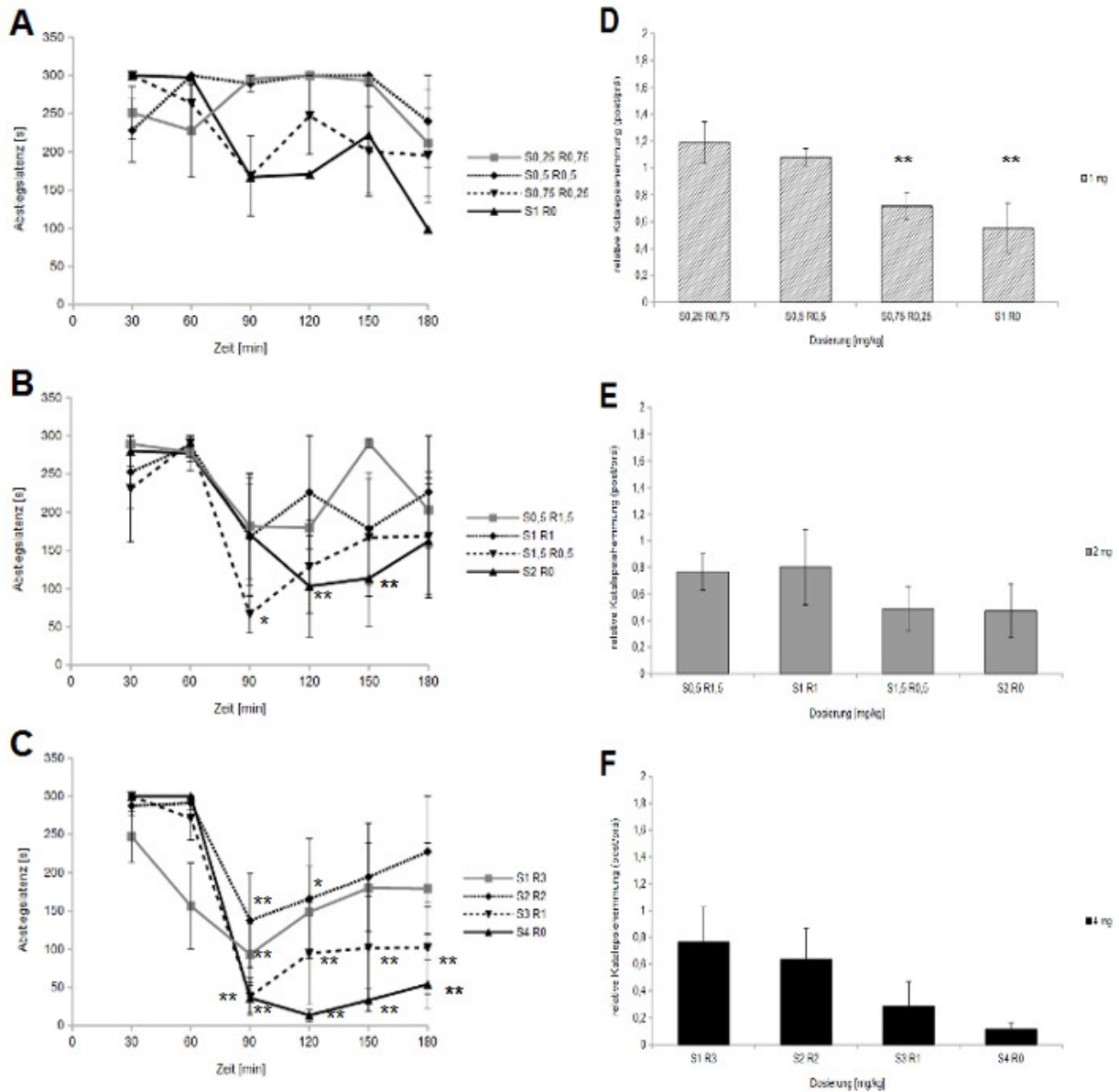


**Abbildung 39:** Die Abstiegslatenzen [s] der Enantiomermischungen im Verlauf über die Sensitivierungstage (1-9) im Tagesverlauf. Haloperidolinjektion (0,5mg/kg zum Zeitpunkt 0; Baseline-Tests bei 30 und 60 min; Substanzinjektion bei 65 min, Tests auf Wirkstärke bei 90, 120, 150 und 180 min. Dargestellt als Mittelwerte  $\pm$  SEM (n=16).

Das Abstiegsverhalten der Tiere stieg über die Sensitivierungsphase und im Tagesverlauf kontinuierlich und war an Tag 9 am höchsten und stabil ( $[F_{\text{tage}}(3,300)=18,51; p<0,0001]$ ;  $[F_{\text{tests}}(5,300)=27,27; p<0,0001]$ ;  $[F_{\text{Dosis} \times \text{Tests}}(15,300)=5,15; p<0,0001]$ ) (**Abbildung 39**).

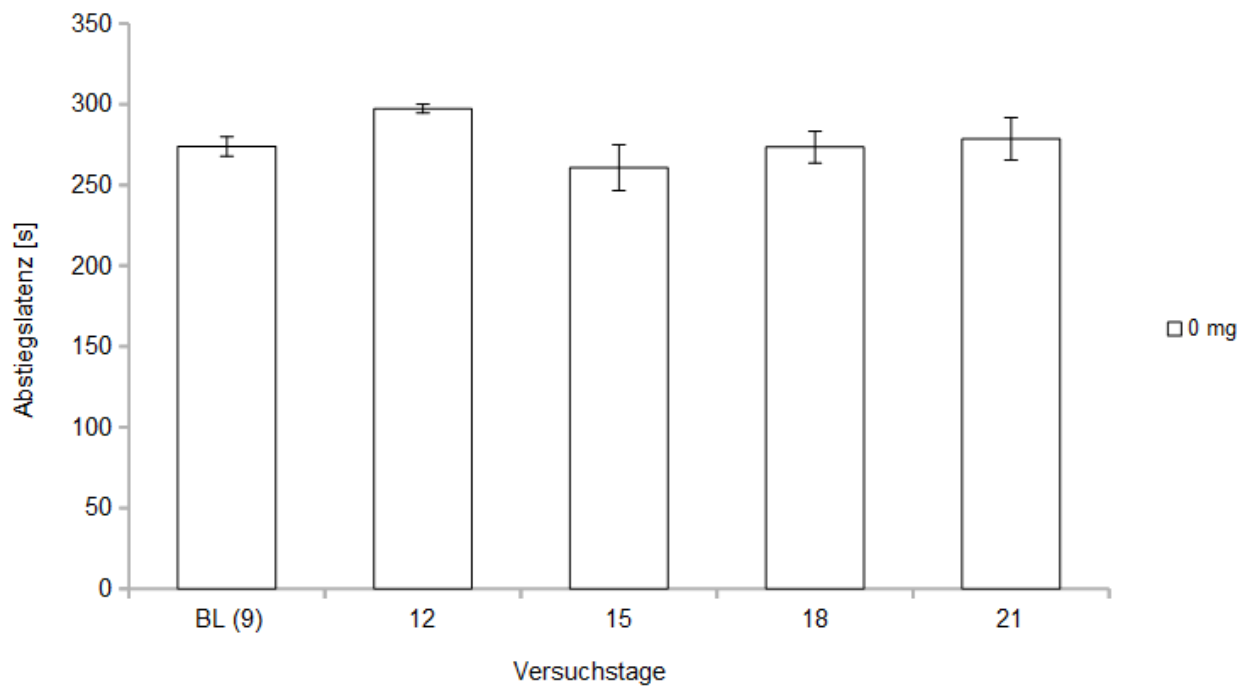
Betrachtet man die gemittelten Versuchstage im Verlauf über die einzelnen Tests (**Abbildung 40 A, B, C**) ist zum einen der dosisabhängige Effekt zu sehen und zum anderen, die stärkste Wirkung bei alleinigen oder großen S-Anteil der Mischungen (**A**  $[F_{\text{dosis}}(3,60)=1,51; p=0,26]$ ;  $[F_{\text{tests}}(5,60)=2,83; p=0,023]$ ;  $[F_{\text{Dosis} \times \text{Tests}}(10,60)=1,63; p=0,092]$ ; **B**  $[F_{\text{dosis}}(3,60)=0,58; p=0,63]$ ;  $[F_{\text{tests}}(5,60)=6,49; p<0,0001]$ ;  $[F_{\text{Dosis} \times \text{Tests}}(10,60)=0,81; p=0,66]$ ; **C**  $[F_{\text{dosis}}(3,60)=1,37; p=0,3]$ ;  $[F_{\text{tests}}(5,60)=22,54; p<0,0001]$ ;  $[F_{\text{Dosis} \times \text{Tests}}(10,60)=2,27; p=0,01]$ ). Je höher der R-Anteil desto schwächer ist die Katalepsiehemmung.

Betrachtet man die normalisierten Abstiegslatenzen (**Abbildung 40 D, E, F**) ist der gleiche Effekt offensichtlich ( $[F_{\text{dosis}}(3,12)=17; p=0,0001]$   $[F_{\text{dosis}}(3,12)=1,32; p=0,33]$   $[F_{\text{dosis}}(3,12)=1,94; p=0,19]$ ).



**Abbildung 40:** Ergebnisse der Racematmischungen von DFA Gesamtdosis 1mg (A und C), 2 mg (B und D) und 4 mg (C und E). Ergebnisse der einzelnen Tests der Testtagen 12-21 gemittelt. Haloperidolgabe (0,5mg/kg) 30 min vor Test 1; Substanzgabe sofort nach Test 2 (Mittelwert $\pm$ SEM) (linke Spalte). Normalisierte Abstiegslatenzen der Racematmischung von DFA (rechte Spalte) als relative Kataleptie für alle Testtage gemittelt. Die mittlere Abstiegslatenz der Tests 3-6 (nach Injektion) wurde durch die mittlere Abstiegslatenz von Test 1 und 2 (vor Injektion) dividiert und als relative Kataleptie angegeben. Kleine Quotienten sprechen hier für eine starke Hemmung der Kataleptie; große Quotienten für eine verminderte Kataleptiehemmung ( $n=4$ ). A-C: Post-hoc Fisher's LSD Test: \*\* $p<0,01$ , \* $p<0,05$  (Vergleich mit 60min). D-F: Post-hoc Dunnett's-Test: \*\* $p<0,01$ ; \* $p<0,05$  zur Kontroll-Gruppe.

Die Kontrollgruppe der Enantiomeremischungen zeigte eine konstant hohe Abstiegslatenz über die einzelnen Versuchstage [ $F_{\text{dosis}}(3,92)=2,44$ ;  $p=0,07$ ] (**Abbildung 41**).

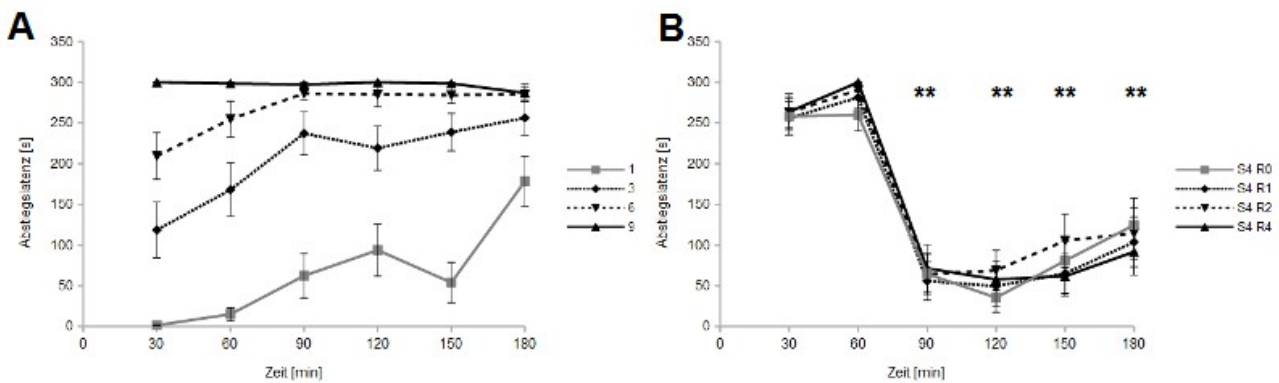


**Abbildung 41:** Verlauf der Abstiegslatenzen [s] der Kontrollgruppe (Vehikel) der Enantiomeremischungen über die Testtage im Vergleich zur Baseline am letzten Sensitivierungstag. Dargestellt als Mittelwerte  $\pm$  SEM ( $n/\text{Dosis}/\text{Tag}=4$ ).

### 5.1.3.3 Enantiomermischungen - mit Finaldosis 4-8mg

In diesem Experiment wurden der S-DFA Anteil stets konstant bei 4 mg gehalten und nur der R-DFA Anteil (0, 1, 2, 4 mg) verändert. Der Verlauf der Sensitivierung verstärkte sich sowohl über die Tage als auch im Tagesverlauf und war an Tag 9 maximal ausgeprägt [ $F_{\text{tage}}(3,300)=47,89$ ;  $p<0,0001$ ]; [ $F_{\text{tests}}(5,300)=18,84$ ;  $p<0,0001$ ]; [ $F_{\text{Dosis} \times \text{Tests}}(15,300)=4,7$ ;  $p<0,0001$ ] (**Abbildung 42 A**).

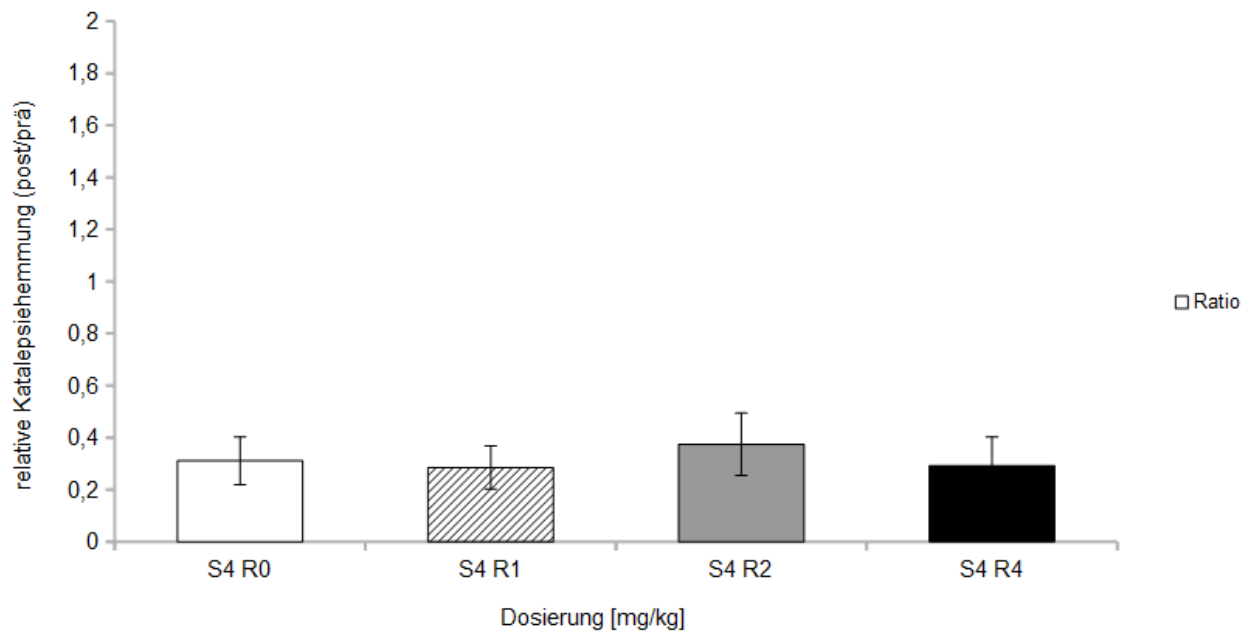
Die Ergebnisse der gemittelten Testtage im Verlauf über die einzelnen Tests zeigten keine Unterschiede zwischen den Gruppen [ $F_{\text{dosis}}(3,300)=0,23$ ;  $p<0,87$ ]; [ $F_{\text{tests}}(5,300)=95,8$ ;  $p<0,0001$ ]; [ $F_{\text{Dosis} \times \text{Tests}}(15,300)=0,38$ ;  $p=0,98$ ] (**Abbildung 42 B**).



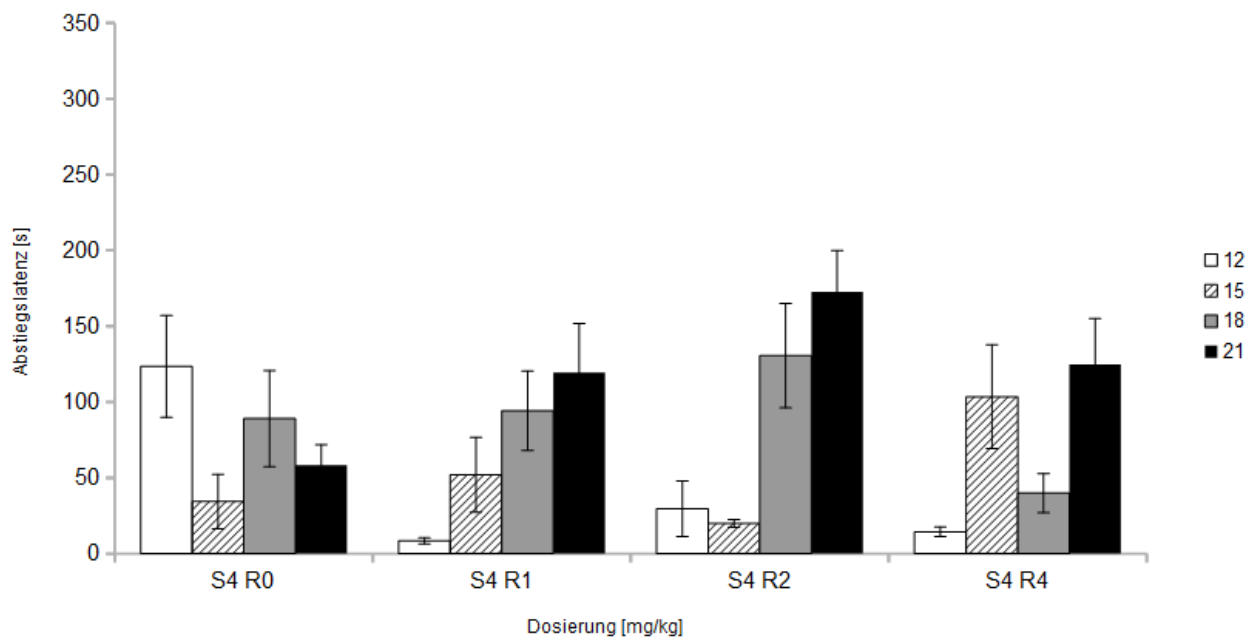
**Abbildung 42:** Die Abstiegslatenzen [s] der Enantiomermischung im Verlauf über die Sensitivierungstage (1-9) im Tagesverlauf (A) und im Verlauf über die Testtage (12-21) (B). Haloperidolinjektion (0,5mg/kg zum Zeitpunkt 0; Baseline-Tests bei 30 und 60 min; Substanzinjektion bei 65 min, Tests auf Wirkstärke bei 90, 120, 150 und 180 min. Dargestellt als Mittelwerte  $\pm$  SEM ( $n=16$  bzw. 4). Post-hoc Fisher's LSD Test:  $**p<0,01$ ,  $*p<0,05$  (Vergleich mit 60min).

Bei den normalisierten Abstiegslatenzen war ebenfalls kein Unterschied zwischen den einzelnen Enantiomermischungen zu erkennen [ $F_{\text{dosis}}(3,60)=0,15$ ;  $p=0,92$ ] (**Abbildung 43**).





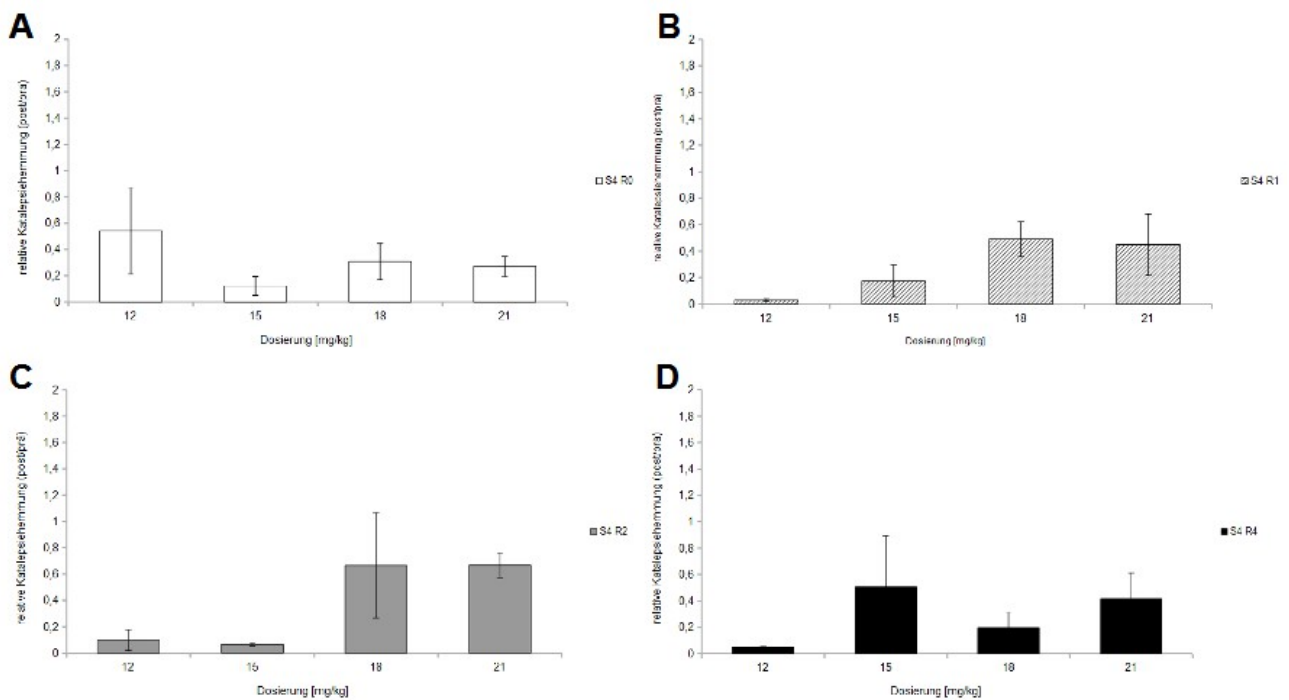
**Abbildung 43:** Die Darstellung der normalisierten Abstiegslatenzen der Enantiomermischungen als relative Katalepsiehemmung (Abstiegslatenz  $t(\text{Test 3-6})/t(\text{Test 1-2})$ )( $n=4$ ).



**Abbildung 44:** Verlauf der Abstiegslatenzen [s] der einzelnen Enantiomermischungen über die Testtage. Dargestellt als Mittelwerte  $\pm$  SEM ( $n=2$ ).

Beim Vergleich der Katalepsiehemmung an den einzelnen Testtagen zeigte sich bei S-DFA alleine eine Reduktion am letzten Tag, bei allen anderen Gruppen war stets am letzten Tag eine geringere Katalepsiehemmung zu verzeichnen, am ersten Tag aber eine sehr hohe (Abbildung 44).

Bei der Auftrennung der relativen Katalepsiehemmung auf die einzelnen Testtage sieht man bei der S4R0 Gruppe eine höhere Abstiegslatenz am ersten Tag und die niedrigste am zweiten Tag. Bei S4R1 stieg die Abstiegslatenz über die Tage an, ebenso bei S4R2. Bei S4R4 zeigten sich niedrige Abstiegslatenzen am ersten und dritten Tag (Abbildung 45).

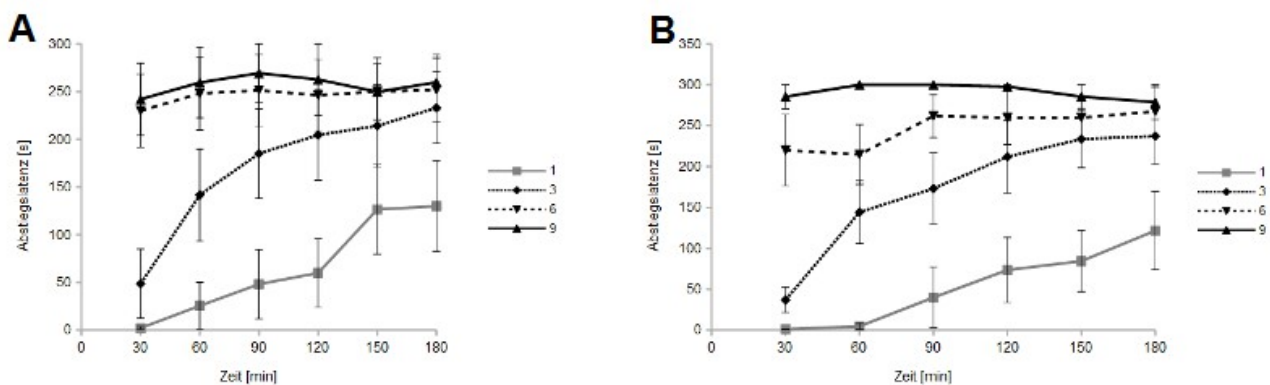


**Abbildung 45:** Die Darstellung der normalisierten Abstiegslatenzen der Enantiomermischungen als relative Katalepsiehemmung an den einzelnen Testtagen (Abstiegslatenz  $t(\text{Test 3-6})/t(\text{Test 1-2})$ ) ( $n=2$ ).

### 5.1.3.4 DFA Enantiomere 4 mg mit Antagonisten

Mit Hilfe der Antagonisten Citalopram (SERT) und WAY 100635 (5-HT<sub>1A</sub>) wurde das Bindungsverhalten von R- und S-DFA untersucht.

Die Sensitivierung verstärkte sich konstant und zeigt eine maximale Ausprägung am letzten Sensitivierungstag [F<sub>tage</sub>(3,140)=20,21; p<0,0001]; [F<sub>tests</sub>(5,140)=10,19; p<0,0001]; [F<sub>Dosis x Tests</sub>(15,140)=2,78; p=0,0009] [F<sub>tage</sub>(3,140)=7,18; p=0,001]; [F<sub>tests</sub>(5,140)=10,45; p<0,0001]; [F<sub>Dosis x Tests</sub>(15,140)=2,97; p=0,0004] (**Abbildung 46 A**).

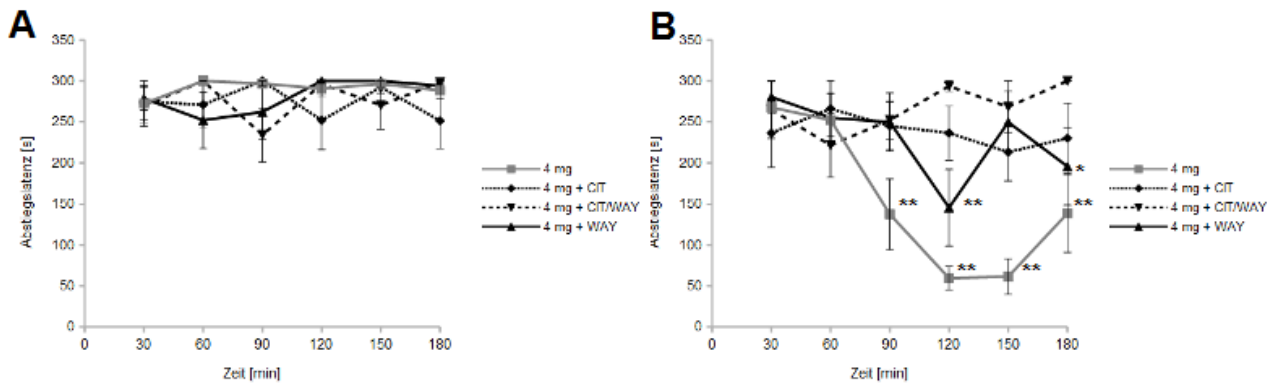


**Abbildung 46:** Die Abstiegslatenzen [s] von R-DFA (A) und S-DFA (B) im Verlauf über die Sensitivierungstage (1-9) im Tagesverlauf. Haloperidolinjektion (0,5mg/kg zum Zeitpunkt 0; Baseline-Tests bei 30 und 60 min; Substanzinjektion bei 65 min, Tests auf Wirkstärke bei 90, 120, 150 und 180 min. Dargestellt als Mittelwerte  $\pm$  SEM (n=8).

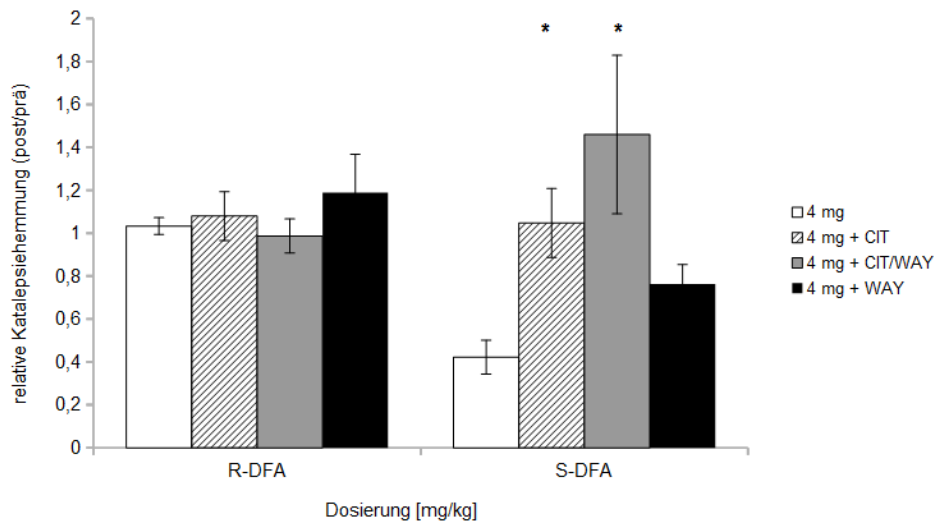
Die Kontrollgruppe 4mg (Behandlung mit 4mg/kg S-DFA alleine) zeigte wie erwartet eine starke antiparkinsonoide Wirkung. Sowohl die Vorbehandlung mit CIT als auch mit WAY zeigten eine signifikante Hemmung dieser Wirkung, wobei CIT tendenziell etwas stärker wirkte, insbesondere zum frühen Zeitpunkt der Messung. Wenn beide Substanzen zusammen gegeben wurden, wurde die antikataleptische Wirkung von S-DFA vollständig antagonisiert, es kam sogar zu einer Verstärkung der Katalapsie [F<sub>dosis</sub>(3,140)=4,2; p=0,014]; [F<sub>tests</sub>(5,140)=5,09; p=0,0003]; [F<sub>Dosis x Tests</sub>(15,140)=3,92; p<0,0001] (**Abbildung 47 B**). Bei R-DFA war keine Wirkung zu sehen [F<sub>dosis</sub>(3,140)=0,4; p=0,75];

[ $F_{\text{tests}}(5,140)=0,51$ ;  $p=0,77$ ]; [ $F_{\text{Dosis} \times \text{Tests}}(15,140)=1,44$ ;  $p=0,13$ ] (A).

Die normalisierten Abstiegslatenzen zeigten eine starke Katalepsiehemmung bei S-DFA alleine. Zusammen mit den Antagonisten zeigte die Kombination Citalopram und WAY-100635 die geringste Katalepsiehemmung, gefolgt von Citalopram alleine [ $F_{\text{dosis}}(1/28)=1$ ;  $p=0,32$ ] [ $F_{\text{dosis}}(1/28)=8,91$ ;  $p=0,058$ ] (Abbildung 48).



**Abbildung 47:** Die Abstiegslatenzen [s] von R-DFA (A) und S-DFA (B) für die jeweiligen Antagonisten-Behandlungen (mg/kg) im Tagesverlauf. Haloperidolinjektion (0,5mg/kg zum Zeitpunkt 0; Baseline-Tests bei 30 und 60 min; Substanzinjektion bei 65 min, Tests auf Wirkstärke bei 90, 120, 150 und 180 min. Dargestellt als Mittelwerte  $\pm$  SEM ( $n=8$ ). Post-hoc Fisher's LSD Test:  $**p<0,01$ ,  $*p<0,05$  (Vergleich mit 60min).



**Abbildung 48:** Die Darstellung der normalisierten Abstiegslatenzen von R- und S-DFA mit Antagonisten-Behandlungen als relative Katalepsiehemmung (Abstiegslatenz  $t(\text{Test } 3-6) / t(\text{Test } 1-2)$ ) ( $n=8$ ). Post-hoc Fisher's LSD Test:  $**p<0,01$ ,  $*p<0,05$  (Vergleich mit 4mg).

## 5.2 Versuchsreihe MFB- Läsionsmodell und Steppingtest

20 (bei MDFPPA) bzw. 14 (bei DFA) Tage postoperativ wurde ein Test zur Läsionskontrolle durchgeführt und unzureichend läsionierte Tiere (mehr als 4 Ausgleichsschritte mit der kontralateralen Pfote) aus dem Experiment ausgeschlossen.

Es wurden aufeinander folgend drei Versuchsblöcke mit jeweils 1, 2 und 4 mg/kg S-MDFPPA bzw. S-DFA durchgeführt. Der Kontrollgruppe wurde das Vehikel (VEH) PBS injiziert.

Die Behandlung erfolgte jeweils täglich über 8 Tage, getestet wurde nur an jedem ersten, vierten und achten Tag. Zwischen den einzelnen Blöcken waren je 2 Tage ohne Behandlung (siehe Abbildung 19).

Direkt vor Substanzgabe wurde ein Prä-Test durchgeführt, der dem Aufzeigen von evtl. kumulativen Effekte diene. Zwischen Substanzgabe und dem Post-Test lagen 1,5 Stunden Wartezeit, zur Anflutung der Substanz.

### 5.2.1 S-Difluor-Metamphetamin 1,2,4 mg kontinuierlich

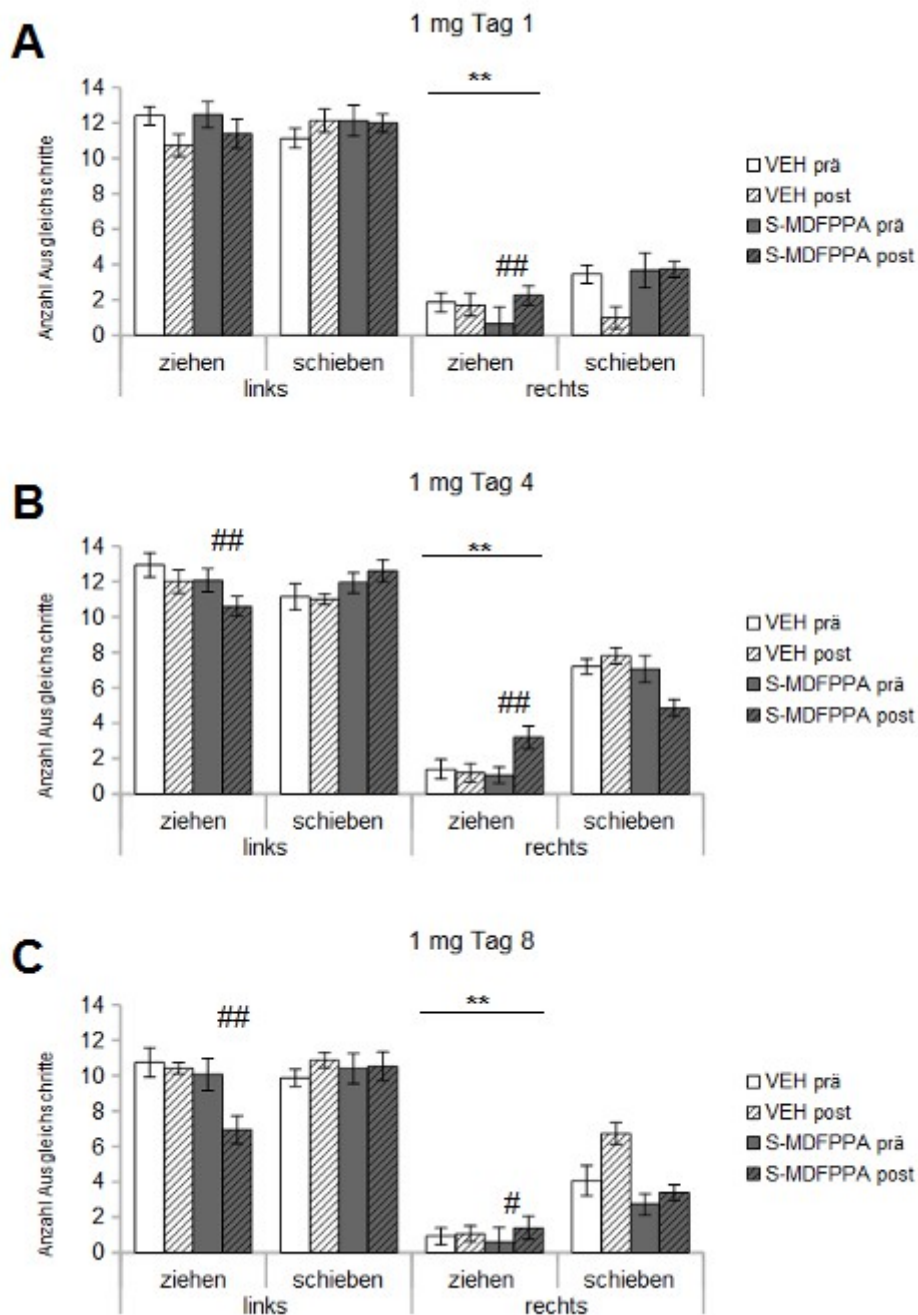
Bei 1 mg S-MDFPPA war an allen Tagen der Unterschied zwischen der linken gesunden (ipsilateral) und der rechten beeinträchtigten (kontralateral) Pfote signifikant. Die Kontrollgruppe (VEH) machte bei der Bewegungsrichtung "Ziehen" vor und nach Behandlung keine signifikant unterschiedlich viele Ausgleichsschritte (**Abbildung 49A,B,C**). An Tag 1 (**A**) waren die Ausgleichsschritte der kontralateralen Pfote für beide Gruppen und Bewegungsrichtungen signifikant reduziert (ziehen:  $[F_{\text{Behandlung}}(1,8)=0,21; p=0,65]$ ;  $[F_{\text{Pfote}}(1,8)=122,14; p<0,0001]$ ;  $[F_{\text{Behandlung} \times \text{Pfote}}(1,8)=0,98; p=0,017]$ ;  $[F_{\text{Test}}(1,8)=3,47; p=0,09]$ ;  $[F_{\text{Behandlung} \times \text{Test}}(1,8)=0,86; p=0,37]$ ;  $[F_{\text{Pfote} \times \text{Test}}(1,8)=4,4; p=0,0,07]$ ;  $[F_{\text{Behandlung} \times \text{Pfote} \times \text{Test}}(1,8)=25,87; p=0,0009]$ ). Betrachtet man die rechte Pfote, so führten die Tiere bei der Bewegungsrichtung "Schieben" eine leicht erhöhte Anzahl an Ausgleichsschritten aus. An Tag 4 (**B**) war bei der rechten Pfote ein großer Unterschied zwischen den Bewegungsrichtungen zu erkennen. Der Posttest zeigte bei der Substanzgruppe bei "Ziehen" einen leichten Anstieg der Ausgleichsschritte  $[F_{\text{Behandlung}}(1,8)=2,18; p=0,17]$ ;  $[F_{\text{Pfote}}(1,8)=170,6; p<0,0001]$ ;  $[F_{\text{Behandlung} \times \text{Pfote}}(1,8)=24,39; p=0,001]$ ;  $[F_{\text{Test}}(1,8)=9,79; p=0,014]$ ;  $[F_{\text{Behandlung} \times \text{Test}}(1,8)=13,5; p=0,0063]$ ;  $[F_{\text{Pfote} \times \text{Test}}(1,8)=2,05; p=0,19]$ ;  $[F_{\text{Behandlung} \times \text{Pfote} \times \text{Test}}(1,8)=5,1; p=0,055]$

An Tag 8 (**C**) kam es bei der linken gesunden Pfote bei "Ziehen" zu einer leichten Abnahme der

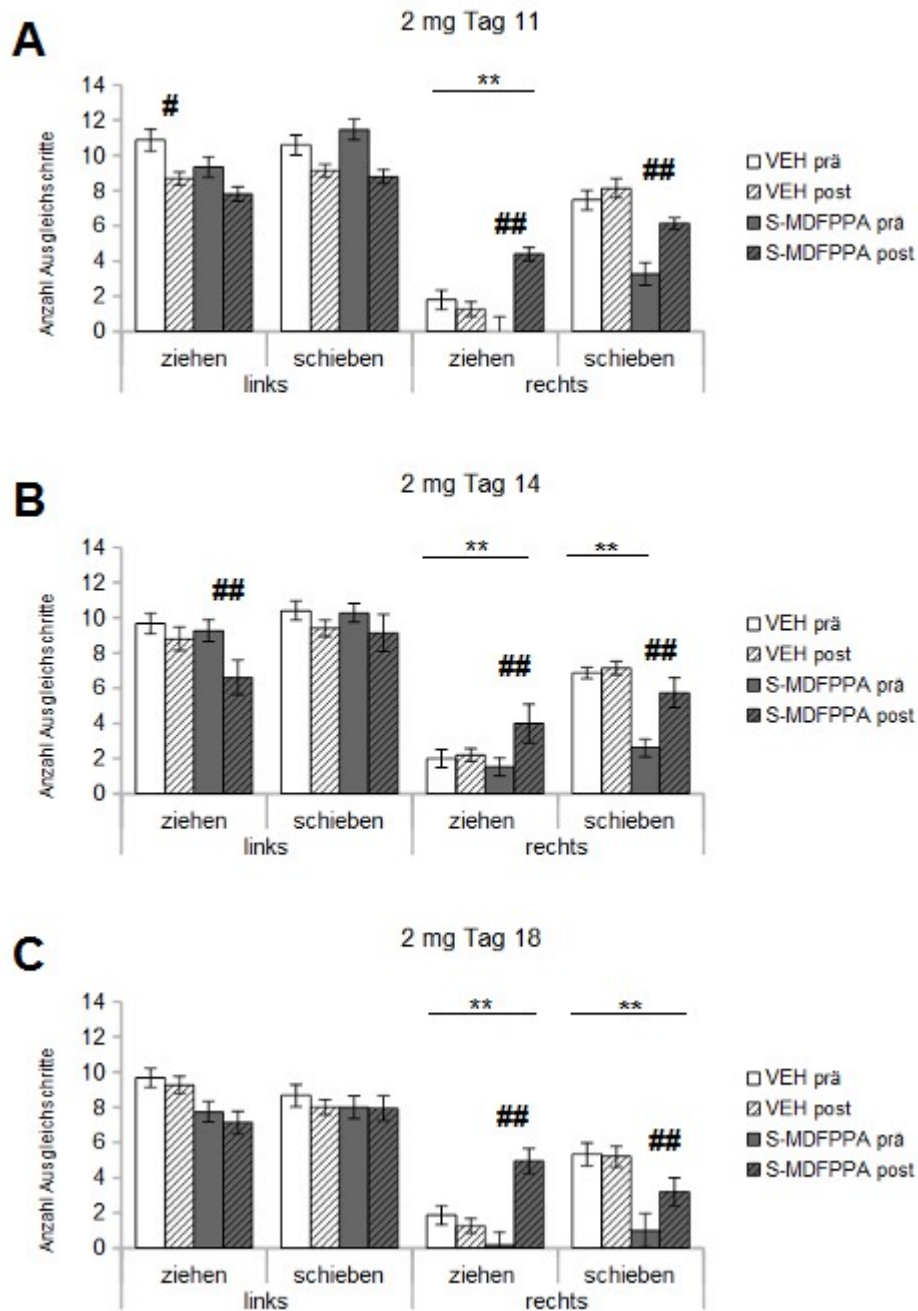
Ausgleichsschritte in der Substanzgruppe. Die rechte Pfote zeigte bei "Ziehen" zwischen den Gruppen und Behandlungen keinen Unterschied [ $F_{\text{Behandlung}}(1,8)=0,167$ ;  $p=0,69$ ]; [ $F_{\text{Pfote}}(1,8)=45,51$ ;  $p=0,0001$ ]; [ $F_{\text{Behandlung} \times \text{Pfote}}(1,8)=18,98$ ;  $p=0,0024$ ]; [ $F_{\text{Test}}(1,8)=0$ ;  $p=1$ ]; [ $F_{\text{Behandlung} \times \text{Test}}(1,8)=0,34$ ;  $p=0,57$ ]; [ $F_{\text{Pfote} \times \text{Test}}(1,8)=5,41$ ;  $p=0,048$ ]; [ $F_{\text{Behandlung} \times \text{Pfote} \times \text{Test}}(1,8)=3,8$ ;  $p=0,081$ ].

Bei "Schieben" waren die Ausgleichsschritte der Kontrolle beim Posttest erhöht, bei der Substanzgruppe beim Prä- und Posttest gleich, aber im Vergleich zu "Ziehen" erhöht.

Bei 2 mg MDFPPA (**Abbildung 50 A,B,C**) war an allen Tagen ein signifikanter Unterschied zwischen der linken gesunden Pfote und der rechten Beeinträchtigten zu erkennen. Betrachtet man die rechte Pfote so machten die Tiere bei der Bewegungsrichtung "Schieben" mehr Ausgleichsschritte (Tag 11 [ $F_{\text{Behandlung}}(1,8)=2,17$ ;  $p=0,18$ ]; [ $F_{\text{Pfote}}(1,8)=22,52$   $p=0,0015$ ]; [ $F_{\text{Behandlung} \times \text{Pfote}}(1,8)=4,53$ ;  $p=0,066$ ]; [ $F_{\text{Test}}(1,8)=0,04$ ;  $p=0,83$ ]; [ $F_{\text{Behandlung} \times \text{Test}}(1,8)=0,13$ ;  $p=0,73$ ]; [ $F_{\text{Pfote} \times \text{Test}}(1,8)=19,36$ ;  $p=0,002$ ]; [ $F_{\text{Behandlung} \times \text{Pfote} \times \text{Test}}(1,8)=3,8$ ;  $p=0,086$ ]; Tag 14 [ $F_{\text{Behandlung}}(1,8)=0,075$ ;  $p=0,79$ ]; [ $F_{\text{Pfote}}(1,8)=34,5$   $p=0,0004$ ]; [ $F_{\text{Behandlung} \times \text{Pfote}}(1,8)=0,88$ ;  $p=0,37$ ]; [ $F_{\text{Test}}(1,8)=0,45$ ;  $p=0,51$ ]; [ $F_{\text{Behandlung} \times \text{Test}}(1,8)=0,13$ ;  $p=0,75$ ]; [ $F_{\text{Pfote} \times \text{Test}}(1,8)=5,4$ ;  $p=0,04$ ]; [ $F_{\text{Behandlung} \times \text{Pfote} \times \text{Test}}(1,8)=2,33$ ;  $p=0,16$ ]; Tag 18 [ $F_{\text{Behandlung}}(1,8)=0,5$ ;  $p=0,49$ ]; [ $F_{\text{Pfote}}(1,8)=102,5$   $p<0,0001$ ]; [ $F_{\text{Behandlung} \times \text{Pfote}}(1,8)=5,8$ ;  $p=0,042$ ]; [ $F_{\text{Test}}(1,8)=6,32$ ;  $p=0,36$ ]; [ $F_{\text{Behandlung} \times \text{Test}}(1,8)=16,9$ ;  $p=0,003$ ]; [ $F_{\text{Pfote} \times \text{Test}}(1,8)=2,03$ ;  $p=0,19$ ]; [ $F_{\text{Behandlung} \times \text{Pfote} \times \text{Test}}(1,8)=2,33$ ;  $p=0,16$ ]). Bei der Bewegungsrichtung "Ziehen" kam es beim Posttest der Substanzgruppe zu einer kontinuierlichen Zunahme der Ausgleichsschritte über die Tage (Tag 11 [ $F_{\text{Behandlung}}(1,8)=0,122$ ;  $p=0,73$ ]; [ $F_{\text{Pfote}}(1,8)=130,1$   $p<0,0001$ ]; [ $F_{\text{Behandlung} \times \text{Pfote}}(1,8)=2,12$ ;  $p=0,18$ ]; [ $F_{\text{Test}}(1,8)=0,0094$ ;  $p=0,92$ ]; [ $F_{\text{Behandlung} \times \text{Test}}(1,8)=17,0$ ;  $p=0,0033$ ]; [ $F_{\text{Pfote} \times \text{Test}}(1,8)=23,16$ ;  $p=0,0013$ ]; [ $F_{\text{Behandlung} \times \text{Pfote} \times \text{Test}}(1,8)=7,3$ ;  $p=0,027$ ]; Tag 14 [ $F_{\text{Behandlung}}(1,8)=0,075$ ;  $p=0,79$ ]; [ $F_{\text{Pfote}}(1,8)=34,5$   $p=0,0004$ ]; [ $F_{\text{Behandlung} \times \text{Pfote}}(1,8)=0,88$ ;  $p=0,37$ ]; [ $F_{\text{Test}}(1,8)=0,45$ ;  $p=0,51$ ]; [ $F_{\text{Behandlung} \times \text{Test}}(1,8)=0,13$ ;  $p=0,75$ ]; [ $F_{\text{Pfote} \times \text{Test}}(1,8)=5,4$ ;  $p=0,04$ ]; [ $F_{\text{Behandlung} \times \text{Pfote} \times \text{Test}}(1,8)=2,33$ ;  $p=0,16$ ]; Tag 18 [ $F_{\text{Behandlung}}(1,8)=0,5$ ;  $p=0,49$ ]; [ $F_{\text{Pfote}}(1,8)=102,5$   $p<0,0001$ ]; [ $F_{\text{Behandlung} \times \text{Pfote}}(1,8)=5,8$ ;  $p=0,042$ ]; [ $F_{\text{Test}}(1,8)=6,32$ ;  $p=0,36$ ]; [ $F_{\text{Behandlung} \times \text{Test}}(1,8)=16,9$ ;  $p=0,003$ ]; [ $F_{\text{Pfote} \times \text{Test}}(1,8)=2,03$ ;  $p=0,19$ ]; [ $F_{\text{Behandlung} \times \text{Pfote} \times \text{Test}}(1,8)=2,33$ ;  $p=0,16$ ]. Bei der Substanzgruppe war die Anzahl der Ausgleichsschritte bei "Ziehen" im Posttest signifikant höher als im Prätest. An allen Tagen waren die Ausgleichsschritte der Bewegungsrichtungen „Ziehen“ für die Kontrolle im Vergleich mit der Substanzgruppe gleichmäßig gering, bei "Schieben" dagegen gleichmäßig erhöht.

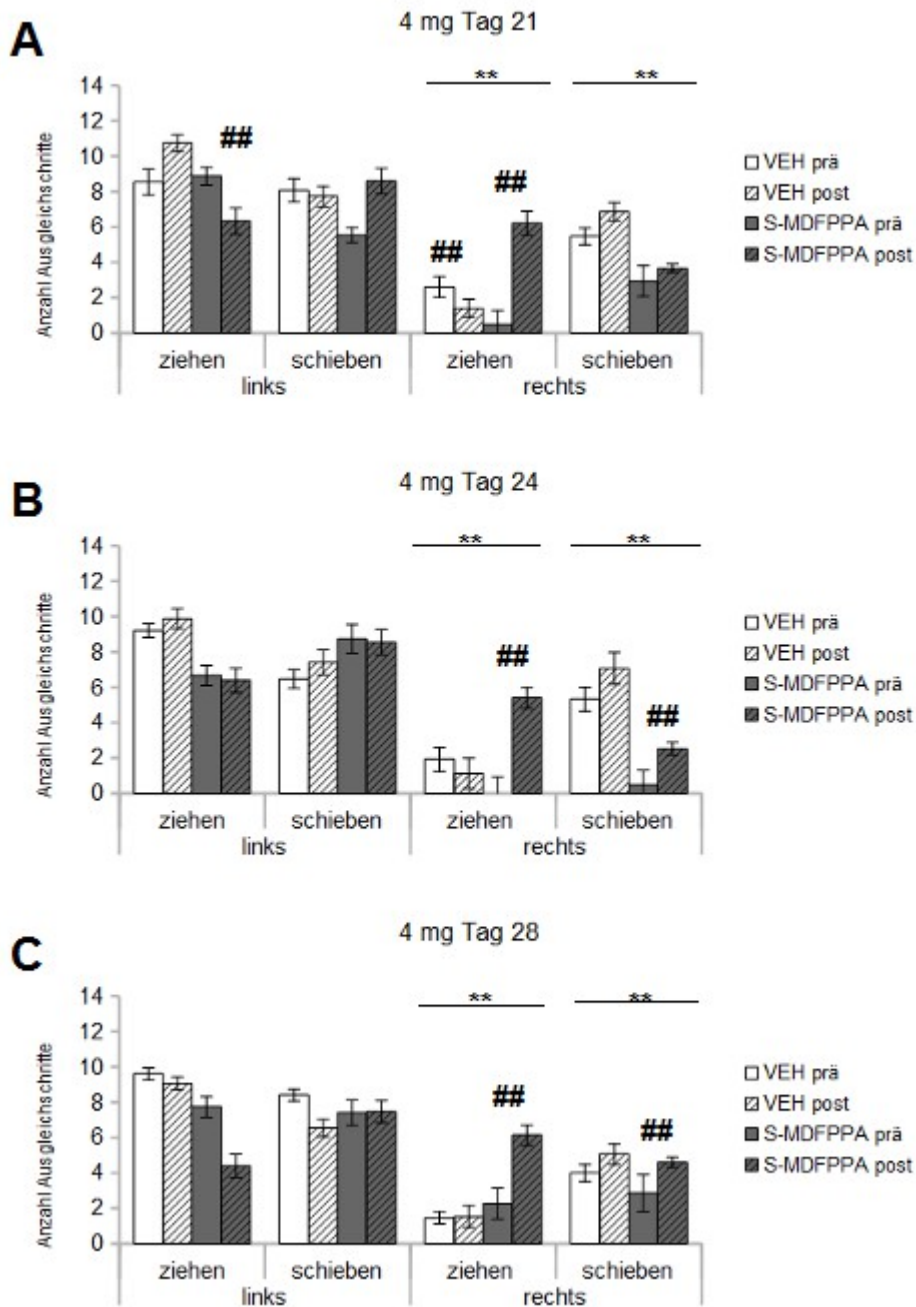


**Abbildung 49:** Ergebnisse der Stepping-Tests für 1 mg S- MDFPPA. Behandlung mit Substanz (n=5) bzw. Vehikel PBS (VEH) (n=5) erfolgte jeden Tag (Tag 1-8), Tests nur an den Tagen 1, 4 und 8. Aufgetragen sind die gemittelten Ausgleichsschritte der ipsilateralen (links) und der kontralateralen (rechts) Pfote, für die beiden Bewegungsrichtung „Ziehen“ und „Schieben“ im Prä- und Post-Test. Dargestellt als Mittelwerte  $\pm$  SEM. Post-hoc Fisher's LSD Test:  $**p < 0,01$ ,  $*p < 0,05$  (Vergleich links, rechts);  $##p < 0,01$ ,  $#p < 0,05$  (Vergleich prä, post).



**Abbildung 50:** Ergebnisse der Stepping-Tests für 2 mg S- MDFPPA. Behandlung mit Substanz (n=5) bzw. Vehikel PBS (VEH) (n=5) erfolgte jeden Tag (Tag 11-18), Tests nur an den Tagen 11, 14 und 18. Aufgetragen sind die gemittelten Ausgleichsschritte der ipsilateralen (links) und der kontralateralen (rechts) Pfote, für die beiden Bewegungsrichtung „Ziehen“ und „Schieben“ im Prä- und Post-Test. Dargestellt als Mittelwerte  $\pm$  SEM. Post-hoc Fisher's LSD Test: \*\* $p < 0,01$ , \*  $p < 0,05$  (Vergleich links, rechts); ##  $p < 0,01$ , #  $p < 0,05$  (Vergleich prä, post).





**Abbildung 51:** Ergebnisse der Stepping-Tests für 4 mg S- MDFPPA. Behandlung mit Substanz (n=5) bzw. Vehikel PBS (VEH) (n=5) erfolgte jeden Tag (Tag 21-28), Tests nur an den Tagen 21, 24 und 28. Aufgetragen sind die gemittelten Ausgleichsschritte der ipsilateralen (links) und der kontralateralen (rechts) Pfote, für die beiden Bewegungsrichtung „Ziehen“ und „Schieben“ im Prä- und Post-Test. Dargestellt als Mittelwerte ± SEM. Post-hoc Fisher's LSD Test: \*\*p<0,01, \*p<0,05 (Vergleich links, rechts); ## p<0,01, # p<0,05 (Vergleich prä, post).

Die höchste Dosis 4 mg (Abbildung 51 A,B,C) bewirkte einen starken Anstieg der Anzahl der Ausgleichsschritte der beeinträchtigten Pfote bei "Ziehen" des Posttest. Die Kontrollgruppe war bei

"Ziehen" konstant niedrig. Bei der linken gesunden Pfote der Substanz-Gruppe kam es bei der Bewegungsrichtung "Ziehen" zu einer Abnahme der Ausgleichsschritte an allen Tagen, die am letzten Tag (C) am stärksten ausgeprägt war (Tag 21  $[F_{\text{Behandlung}}(1,8)=0,00096; p=0,97]$ ;  $[F_{\text{Pfote}}(1,8)=232,8 p<0,0001]$ ;  $[F_{\text{Behandlung} \times \text{Pfote}}(1,8)=0,27; p=0,09]$ ;  $[F_{\text{Test}}(1,8)=0,39; p=0,54]$ ;  $[F_{\text{Behandlung} \times \text{Test}}(1,8)=1,33; p=0,28]$ ;  $[F_{\text{Pfote} \times \text{Test}}(1,8)=7,26; p=0,028]$ ;  $[F_{\text{Behandlung} \times \text{Pfote} \times \text{Test}}(1,8)=0,5; p=0,46]$ ; Tag 24  $[F_{\text{Behandlung}}(1,8)=0,58; p=0,81]$ ;  $[F_{\text{Pfote}}(1,8)=247,1 p<0,0001]$ ;  $[F_{\text{Behandlung} \times \text{Pfote}}(1,8)=2,3; p=0,16]$ ;  $[F_{\text{Test}}(1,8)=0,03; p=0,86]$ ;  $[F_{\text{Behandlung} \times \text{Test}}(1,8)=0,47; p=0,5]$ ;  $[F_{\text{Pfote} \times \text{Test}}(1,8)=8,58; p=0,019]$ ;  $[F_{\text{Behandlung} \times \text{Pfote} \times \text{Test}}(1,8)=3,75; p=0,088]$ ; Tag 28  $[F_{\text{Behandlung}}(1,8)=3,37; p=0,3]$ ;  $[F_{\text{Pfote}}(1,8)=111,6 p<0,0001]$ ;  $[F_{\text{Behandlung} \times \text{Pfote}}(1,8)=1,6; p=0,23]$ ;  $[F_{\text{Test}}(1,8)=1,31; p=0,28]$ ;  $[F_{\text{Behandlung} \times \text{Test}}(1,8)=0,93; p=0,36]$ ;  $[F_{\text{Pfote} \times \text{Test}}(1,8)=4,42; p=0,07]$ ;  $[F_{\text{Behandlung} \times \text{Pfote} \times \text{Test}}(1,8)=2,75; p=0,13]$ ).

Bei der Bewegungsrichtung "Schieben" war die Anzahl der Ausgleichsschritte der Kontrollgruppe stets höher als die der Substanzgruppe, am stärksten war der Unterschied an Testtag 4 (B) (Tag 21  $[F_{\text{Behandlung}}(1,8)=1,1; p=0,32]$ ;  $[F_{\text{Pfote}}(1,8)=64,01 p<0,0001]$ ;  $[F_{\text{Behandlung} \times \text{Pfote}}(1,8)=0,21; p=0,65]$ ;  $[F_{\text{Test}}(1,8)=0,15; p=0,7]$ ;  $[F_{\text{Behandlung} \times \text{Test}}(1,8)=0,13; p=0,72]$ ;  $[F_{\text{Pfote} \times \text{Test}}(1,8)=2,1; p=0,18]$ ;  $[F_{\text{Behandlung} \times \text{Pfote} \times \text{Test}}(1,8)=2,6; p=0,14]$ ; Tag 24  $[F_{\text{Behandlung}}(1,8)=0,04; p=0,81]$ ;  $[F_{\text{Pfote}}(1,8)=15,72 p=0,0041]$ ;  $[F_{\text{Behandlung} \times \text{Pfote}}(1,8)=1,2; p=0,3]$ ;  $[F_{\text{Test}}(1,8)=0,25; p=0,63]$ ;  $[F_{\text{Behandlung} \times \text{Test}}(1,8)=0,88; p=0,37]$ ;  $[F_{\text{Pfote} \times \text{Test}}(1,8)=1,56; p=0,24]$ ;  $[F_{\text{Behandlung} \times \text{Pfote} \times \text{Test}}(1,8)=4,45; p=0,06]$ ; Tag 28  $[F_{\text{Behandlung}}(1,8)=0,04; p=0,81]$ ;  $[F_{\text{Pfote}}(1,8)=15,72 p=0,0041]$ ;  $[F_{\text{Behandlung} \times \text{Pfote}}(1,8)=1,2; p=0,3]$ ;  $[F_{\text{Test}}(1,8)=0,25; p=0,63]$ ;  $[F_{\text{Behandlung} \times \text{Test}}(1,8)=0,88; p=0,37]$ ;  $[F_{\text{Pfote} \times \text{Test}}(1,8)=1,56; p=0,24]$ ;  $[F_{\text{Behandlung} \times \text{Pfote} \times \text{Test}}(1,8)=4,45; p=0,06]$ ).

Bei beiden Gruppen sind mehr Ausgleichsschritte beim Posttest zu sehen.

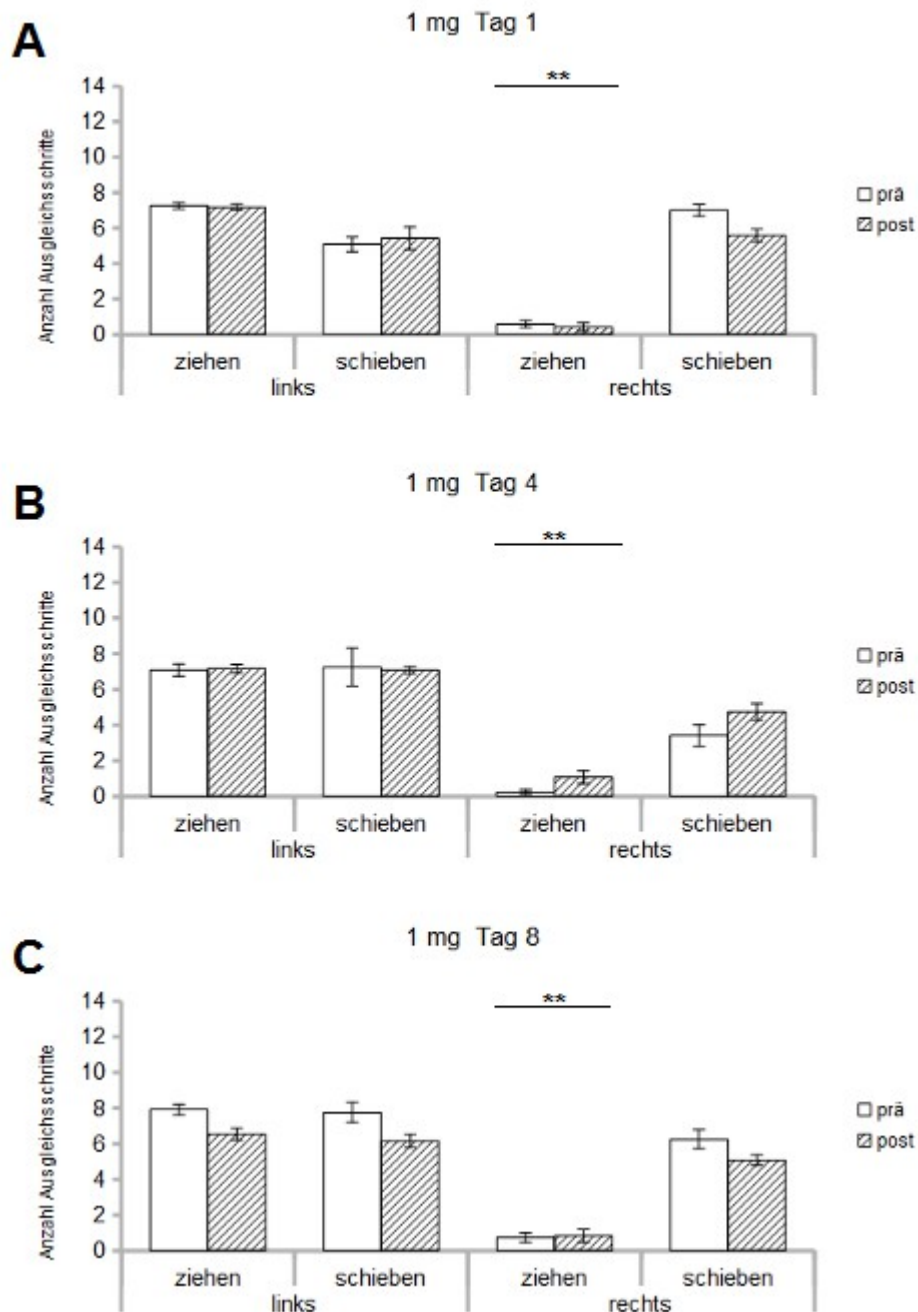
### 5.2.2 S- Difluor-Amphetamin 1, 2, 4 mg

Bei 1 mg DFA war an allen Tagen ein signifikanter Unterschied zwischen der linken gesunden Pfote und der rechten Beeinträchtigten zu erkennen. Bei der beeinträchtigten rechten Pfote zeigte sich jedoch noch kein bzw. nur ein minimaler Effekt bei der Bewegungsrichtung "Ziehen" an Tag 1  $[F_{\text{Pfote}}(1,6)=632,2 p<0,0001]$ ;  $[F_{\text{Test}}(1,6)=0,57; p=0,47]$ ;  $[F_{\text{Pfote} \times \text{Test}}(1,6)=0,06; p=0,8]$ ; Tag 4  $[F_{\text{Pfote}}(1,6)=198,5,2 p<0,0001]$ ;  $[F_{\text{Test}}(1,6)=2,57; p=0,6]$ ;  $[F_{\text{Pfote} \times \text{Test}}(1,6)=1,66; p=0,24]$  und Tag 8  $[F_{\text{Pfote}}(1,6)=225,94 p<0,0001]$ ;  $[F_{\text{Test}}(1,6)=1,798; p=0,23]$ ;  $[F_{\text{Pfote} \times \text{Test}}(1,6)=2,28; p=0,18]$ .

"Schieben" war im Vergleich dazu nahezu bei allen Tagen auf dem Niveau der gesunden Pfote (Tag 1  $[F_{\text{Pfote}}(1,6)=1 p=0,3]$ ;  $[F_{\text{Test}}(1,6)=0,5; p=0,48]$ ;  $[F_{\text{Pfote} \times \text{Test}}(1,6)=1,47; p=0,27]$ ; Tag 4

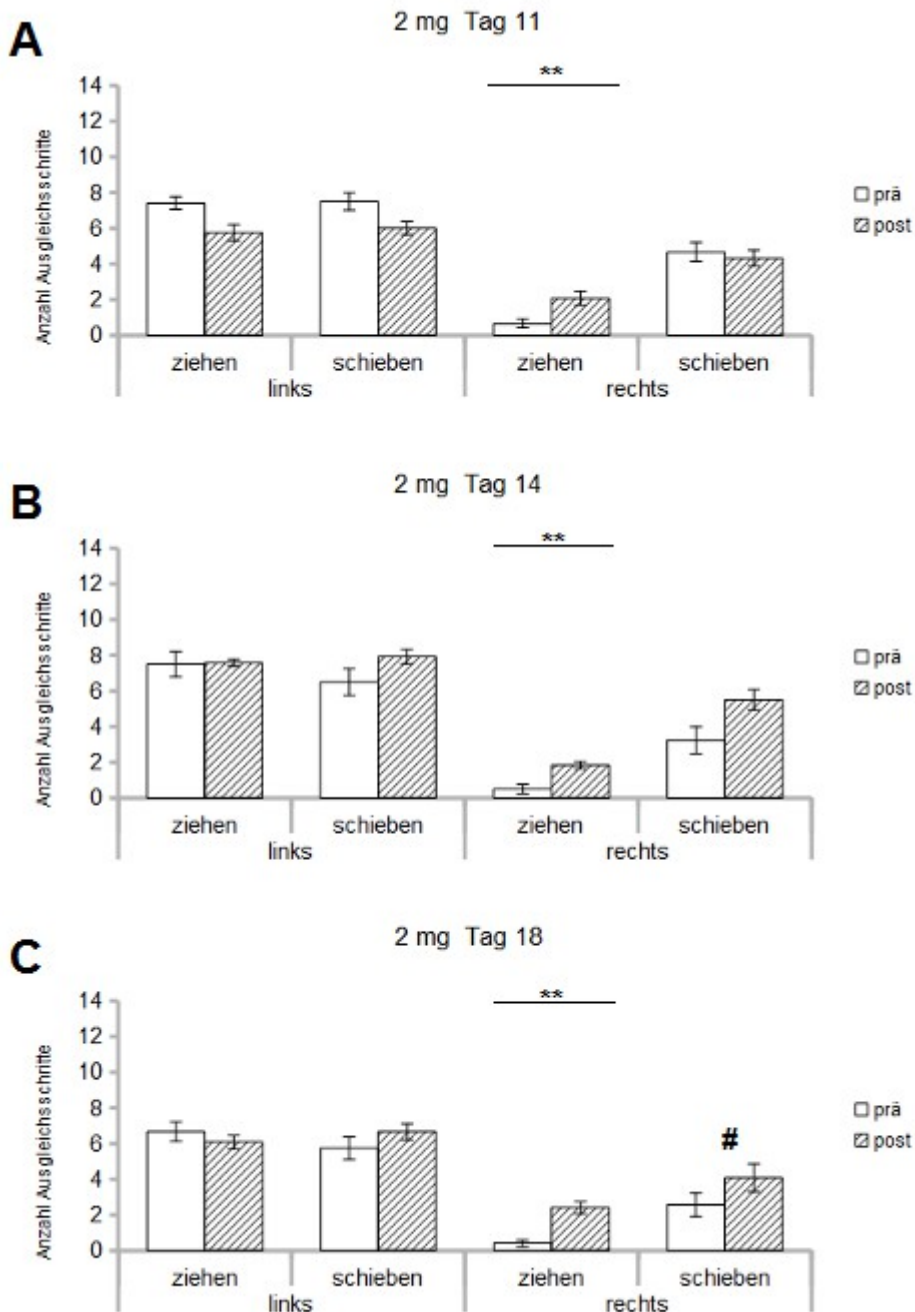
[F<sub>Pfote</sub>(1,6)=12,47 =0,012]; [F<sub>Test</sub>(1,6)=0,22; p=0,65]; [F<sub>Pfote x Test</sub>(1,6)=0,36; p=0,56]; [F<sub>Pfote</sub>(1,6)=3,45 p=0,11]; [F<sub>Test</sub>(1,6)=2,5; p=0,16]; [F<sub>Pfote x Test</sub>(1,6)=0,05; p=0,81]; Tag 8 [F<sub>Pfote</sub>(1,6)=3,45 p=0,11]; [F<sub>Test</sub>(1,6)=2,5; p=0,16]; [F<sub>Pfote x Test</sub>(1,6)=0,05; p=0,81] (**Abbildung 52 A,B,C**).

Bei 2 mg zeigte sich bei der rechten Pfote bei der Bewegungsrichtung "Ziehen" stets eine leichte Verbesserung im Post-Test, der Prä- Test blieb unverändert niedrig (Tag 11 [F<sub>Pfote</sub>(1,6)=103



**Abbildung 52:** Ergebnisse der Stepping-Tests für 1 mg S- DFA (n=4). Die Behandlung erfolgte jeden Tag (Tag 1-8), Tests nur an den Tagen 1, 4 und 8. Aufgetragen sind die gemittelten Ausgleichsschritte der ipsilateralen (links) und der kontralateralen (rechts) Pfote, für die beiden Bewegungsrichtung „Ziehen“ und „Schieben“ im Prä- und Post-Test. Dargestellt als Mittelwerte ± SEM. Post-hoc Fisher's LSD Test: \*\*p<0,01, \*p<0,05 (Vergleich links, rechts); ##p<0,01, #p<0,05 (Vergleich prä, post).

$p < 0,0001$ ]; [ $F_{\text{Test}}(1,6)=0,04$ ;  $p=0,8$ ]; [ $F_{\text{Pfote} \times \text{Test}}(1,6)=7,19$ ;  $p=0,036$ ]; Tag 14 [ $F_{\text{Pfote}}(1,6)=77,42$   $p=0,0001$ ]; [ $F_{\text{Test}}(1,6)=1,41$ ;  $p=0,27$ ]; [ $F_{\text{Pfote} \times \text{Test}}(1,6)=1,1$ ;  $p=0,33$ ]; Tag 18 [ $F_{\text{Pfote}}(1,6)=314,68$   $p < 0,0001$ ]; [ $F_{\text{Test}}(1,6)=1,88$ ;  $p=0,23$ ]; [ $F_{\text{Pfote} \times \text{Test}}(1,6)=6,28$ ;  $p=0,046$ ]).

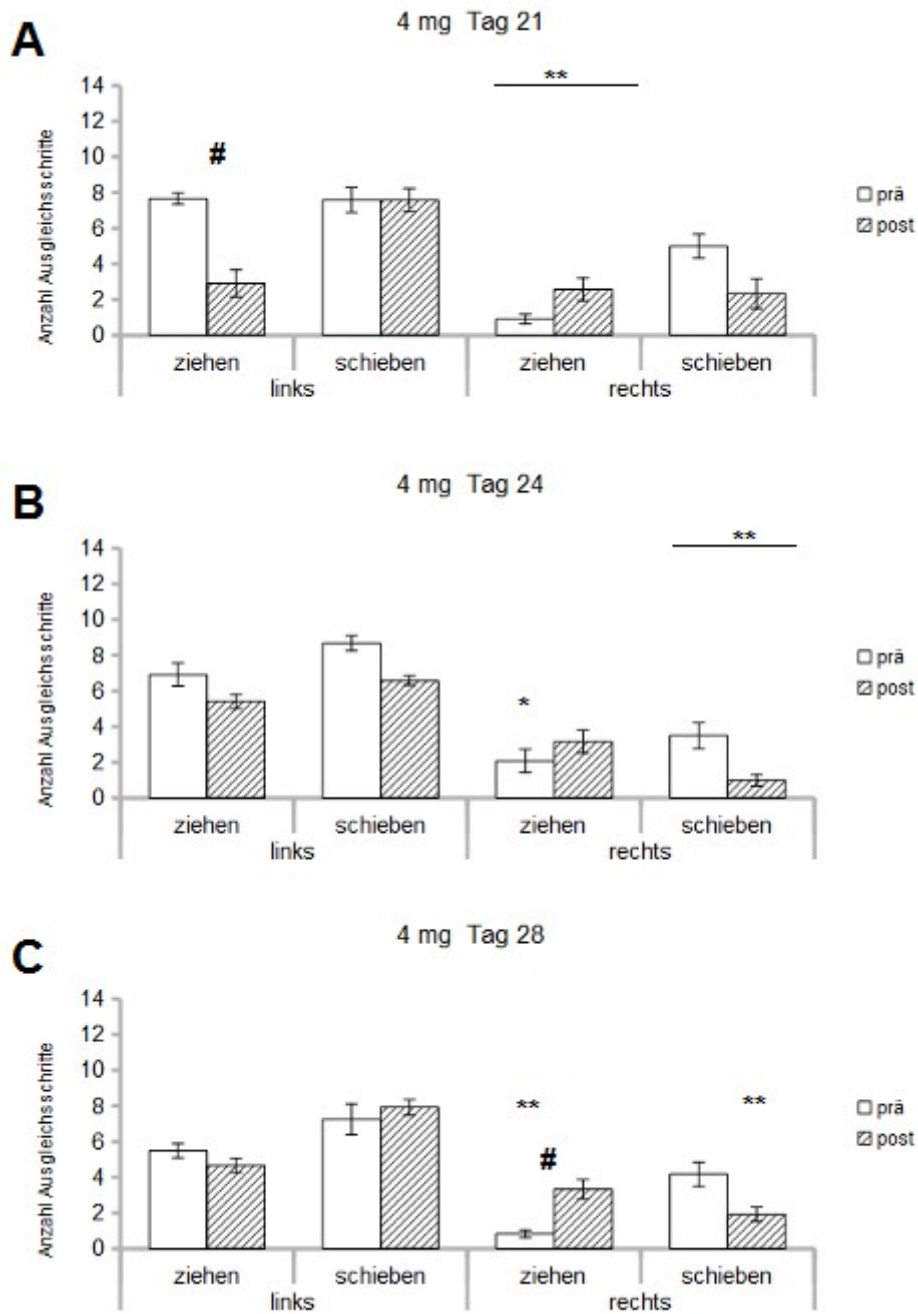


**Abbildung 53:** Ergebnisse der Stepping-Tests für 2 mg S- DFA (n=4). Die Behandlung erfolgte jeden Tag (Tag 11-18), Tests nur an den Tagen 11, 14 und 18. Aufgetragen sind die gemittelten Ausgleichsschritte der ipsilateralen (links) und der kontralateralen (rechts) Pfote, für die beiden Bewegungsrichtung „Ziehen“ und „Schieben“ im Prä- und Post-Test. Dargestellt als Mittelwerte  $\pm$  SEM. Post-hoc Fisher's LSD Test:  $**p < 0,01$ ,  $*p < 0,05$  (Vergleich links, rechts);  $##p < 0,01$ ,  $\#p < 0,05$  (Vergleich prä, post).

Bei "Schieben" ( $[F_{\text{Pfote}}(1,6)=8,71 \text{ p}=0,025]$ ;  $[F_{\text{Test}}(1,6)=1,4; \text{p}=0,28]$ ;  $[F_{\text{Pfote} \times \text{Test}}(1,6)=0,56; \text{p}=0,47]$   $[F_{\text{Pfote}}(1,6)=6,38 \text{ p}=0,044]$ ;  $[F_{\text{Test}}(1,6)=2,8; \text{p}=0,14]$ ;  $[F_{\text{Pfote} \times \text{Test}}(1,6)=0,14; \text{p}=0,7]$ ;  $[F_{\text{Pfote}}(1,6)=7,1 \text{ p}=0,037]$ ;  $[F_{\text{Test}}(1,6)=2,27; \text{p}=0,18]$ ;  $[F_{\text{Pfote} \times \text{Test}}(1,6)=0,13; \text{p}=0,72]$ ) war die Anzahl der Ausgleichsschritte nun insgesamt geringer und an Tag 14 und 18 zeigte sich ebenfalls ein Unterschied zwischen Prä und Post-Test (**Abbildung 53 A,B,C**).

Die 4 mg Dosis zeigte bei der kontralateralen Pfote eine Verbesserung in der Anzahl der Ausgleichsschritte bei der Bewegungsrichtung "Ziehen" im Post-Test, die am Tag 8 (**C**) am höchsten ausgeprägt war (Tag 21  $[F_{\text{Pfote}}(1,6)=25,59 \text{ p}=0,0023]$ ;  $[F_{\text{Test}}(1,6)=2,6; \text{p}=0,15]$ ;  $[F_{\text{Pfote} \times \text{Test}}(1,6)=11,43; \text{p}=0,014]$ ; Tag 24  $[F_{\text{Pfote}}(1,6)=13,45 \text{ p}=0,015]$ ;  $[F_{\text{Test}}(1,6)=0,045; \text{p}=0,83]$ ;  $[F_{\text{Pfote} \times \text{Test}}(1,6)=1,7; \text{p}=0,26]$ ; Tag 28  $[F_{\text{Pfote}}(1,6)=17,67 \text{ p}=0,0057]$ ;  $[F_{\text{Test}}(1,6)=2,02; \text{p}=0,199]$ ;  $[F_{\text{Pfote} \times \text{Test}}(1,6)=8,33; \text{p}=0,02]$ .

Bei "Schieben" nahm Anzahl der Ausgleichsschritten beim Post-Test ab (Tag 21  $[F_{\text{Pfote}}(1,6)=11,52 \text{ p}=0,014]$ ;  $[F_{\text{Test}}(1,6)=1,4; \text{p}=0,28]$ ;  $[F_{\text{Pfote} \times \text{Test}}(1,6)=1,38; \text{p}=0,28]$ ; Tag 24  $[F_{\text{Pfote}}(1,6)=36,9 \text{ p}=0,0009]$ ;  $[F_{\text{Test}}(1,6)=9,8; \text{p}=0,02]$ ;  $[F_{\text{Pfote} \times \text{Test}}(1,6)=0,08; \text{p}=0,78]$ ; Tag 28  $[F_{\text{Pfote}}(1,6)=12,21 \text{ p}=0,019]$ ;  $[F_{\text{Test}}(1,6)=0,74; \text{p}=0,422]$ ;  $[F_{\text{Pfote} \times \text{Test}}(1,6)=2,51; \text{p}=1,63]$ ). Zudem zeigte sich ein Einfluss auf die linke gesunde Pfote bei der Bewegungsrichtung "Ziehen". Am ersten Tag war die Anzahl der Ausgleichsschritte im Post-Test im Vergleich zum Prä-Test (**A**). An Tag 24 (**B**) und 28 (**C**) war der Effekt allerdings wieder geringer ausgeprägt (**Abbildung 54 A,B,C**).



**Abbildung 54:** Ergebnisse der Stepping-Tests für 4 mg S- DFA (n=4). Die Behandlung erfolgte jeden Tag (Tag 21-28), Tests nur an den Tagen 21, 24 und 28. Aufgetragen sind die gemittelten Ausgleichsschritte der ipsilateralen (links) und der kontralateralen (rechts) Pfote, für die beiden Bewegungsrichtung „Ziehen“ und „Schieben“ im Prä- und Post-Test. Dargestellt als Mittelwerte  $\pm$  SEM. Post-hoc Fisher's LSD Test:  $**p < 0,01$ ,  $*p < 0,05$  (Vergleich links, rechts);  $##p < 0,01$ ,  $#p < 0,05$  (Vergleich prä, post).

### 5.2.3 MDFPPA, DFA und Kontrolle im direkten Vergleich

Die Ausgleichsschritte mit der ipsi- und kontralateralen Pfote wurden hier, getrennt nach „Ziehen“ und „Schieben“, als IAS nach Tillerson (Tillerson et al., 2001) aufgetragen. Dabei bedeuten hohe Werte (0,5-1), dass die meisten bzw. alle Ausgleichsschritte mit der ipsilateralen Pfote durchgeführt wurden. Je geringer die Werte desto mehr mehr Ausgleichsschritte wurden mit der kontralateralen Pfote durchgeführt bzw. desto ausgewogener ist das Verhältnis zwischen ipsilateraler und kontralateraler Seite.

Bei der Bewegungsrichtung „Ziehen“ (**Abbildung 55 A**) zeigte sich bei der Behandlung mit 1mg kein Unterschied zwischen den Gruppen. Sie lagen in etwa auf dem Niveau der Kontrollgruppe. Einzig der Post-Test von Tag 4 war bei S-MDFPPA leicht verbessert [ $F_{\text{Behandlung}}(2,22)=0,77$ ;  $p=0,481$ ]; [ $F_{\text{Zeit}}(2,22)=0,073$   $p=0,92$ ]; [ $F_{\text{Behandlung} \times \text{Zeit}}(2,22)=0,65$ ;  $p=0,62$ ]; [ $F_{\text{Test}}(2,22)=5,9$ ;  $p=0,03$ ]; [ $F_{\text{Behandlung} \times \text{Test}}(2,22)=2,9$ ;  $p=0,09$ ]; [ $F_{\text{Zeit} \times \text{Test}}(2,22)=0,89$ ;  $p=0,42$ ]; [ $F_{\text{Behandlung} \times \text{Zeit} \times \text{Test}}(2,22)=0,57$ ;  $p=0,68$ ].

Bei 2mg wurden Unterschiede sichtbar: S-MDFPPA wirkte im Post-Test stärker als S-DFA. Die Wirkung während der Prä-Tests waren vergleichbar [ $F_{\text{Behandlung}}(2,22)=1,09$ ;  $p=0,36$ ]; [ $F_{\text{Zeit}}(2,22)=1,17$   $p=0,32$ ]; [ $F_{\text{Behandlung} \times \text{Zeit}}(2,22)=1,39$ ;  $p=0,26$ ]; [ $F_{\text{Test}}(2,22)=15,3$ ;  $p=0,0024$ ]; [ $F_{\text{Behandlung} \times \text{Test}}(2,22)=5,78$ ;  $p=0,019$ ]; [ $F_{\text{Zeit} \times \text{Test}}(2,22)=1,82$ ;  $p=0,18$ ]; [ $F_{\text{Behandlung} \times \text{Zeit} \times \text{Test}}(2,22)=1,47$ ;  $p=0,25$ ].

Bei 4mg war die stärkere Wirkung von S-MDFPPA im Vergleich zu DFA weiterhin zu sehen, wobei der Unterschied an Tag 28 am stärksten ausgeprägt war. S-MDFPPA unterlag starken Schwankungen zwischen Prä- und Post-Test (sehr hohe Werte bei Prä und sehr geringe bei Post).

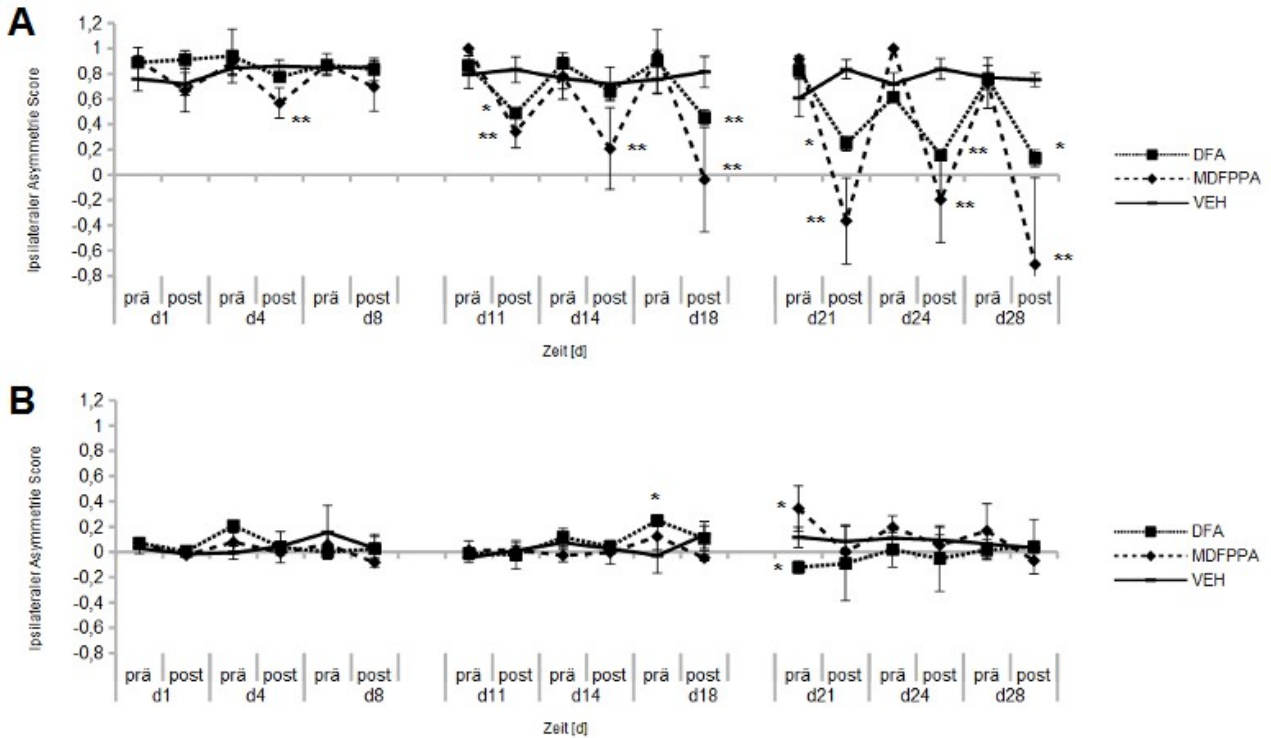
Die Kontrolle zeigte über alle Tage hinweg keinen Effekt [ $F_{\text{Behandlung}}(2,22)=3,42$ ;  $p=0,069$ ]; [ $F_{\text{Zeit}}(2,22)=1,1$ ;  $p=0,36$ ]; [ $F_{\text{Behandlung} \times \text{Zeit}}(2,22)=1,49$ ;  $p=0,24$ ]; [ $F_{\text{Test}}(2,22)=13,33$ ;  $p=0,038$ ]; [ $F_{\text{Behandlung} \times \text{Test}}(2,22)=6,52$ ;  $p=0,0134$ ]; [ $F_{\text{Zeit} \times \text{Test}}(2,22)=0,49$ ;  $p=0,62$ ]; [ $F_{\text{Behandlung} \times \text{Zeit} \times \text{Test}}(2,22)=0,08$ ;  $p=0,98$ ].

Für die Bewegungsrichtung "Schieben" (**Abbildung 55 B**) zeigte sich bei 1mg noch keine nennenswerten Unterschiede zwischen den Behandlungen über die Zeit. Im Vergleich der Tests und zwischen den Behandlungen ist allerdings ein signifikanter Unterschied zu sehen ([ $F_{\text{Behandlung}}(2,22)=0,4$ ;  $p=0,069$ ]; [ $F_{\text{Zeit}}(2,22)=0,24$ ;  $p=0,74$ ]; [ $F_{\text{Behandlung} \times \text{Zeit}}(2,22)=0,55$ ;  $p=0,69$ ]; [ $F_{\text{Test}}(2,22)=4,18$ ;  $p=0,038$ ]; [ $F_{\text{Behandlung} \times \text{Test}}(2,22)=6,52$ ;  $p=0,0134$ ]; [ $F_{\text{Zeit} \times \text{Test}}(2,22)=0,133$ ;  $p=0,98$ ]; [ $F_{\text{Behandlung} \times \text{Zeit} \times \text{Test}}(2,22)=0,67$ ;  $p=0,61$ ]).

Bei 2mg ist ebenfalls kein signifikanter Unterschied zu erkennen ([ $F_{\text{Behandlung}}(2,22)=1,04$ ;  $p=0,38$ ]; [ $F_{\text{Zeit}}(2,22)=1,73$ ;  $p=1,96$ ]; [ $F_{\text{Behandlung} \times \text{Zeit}}(2,22)=0,6$ ;  $p=0,66$ ]; [ $F_{\text{Test}}(2,22)=0,33$ ;  $p=0,57$ ]; [ $F_{\text{Behandlung} \times$

$T_{\text{Test}}(2,22)=1,08$ ;  $p=0,37$ ]; [ $F_{\text{Zeit} \times \text{Test}}(2,22)=0,26$ ;  $p=0,77$ ]; [ $F_{\text{Behandlung} \times \text{Zeit} \times \text{Test}}(2,22)=0,89$ ;  $p=0,48$ ]).

Bei 4mg ist ebenfalls kein Unterschied zu sehen [ $F_{\text{Behandlung}}(2,22)=2,3$ ;  $p=0,14$ ]; [ $F_{\text{Zeit}}(2,22)=0,15$ ;  $p=0,85$ ]; [ $F_{\text{Behandlung} \times \text{Zeit}}(2,22)=1,13$ ;  $p=0,36$ ]; [ $F_{\text{Test}}(2,22)=2,55$ ;  $p=0,138$ ]; [ $F_{\text{Behandlung} \times \text{Test}}(2,22)=1,73$ ;  $p=0,22$ ]; [ $F_{\text{Zeit} \times \text{Test}}(2,22)=0,11$ ;  $p=0,89$ ]; [ $F_{\text{Behandlung} \times \text{Zeit} \times \text{Test}}(2,22)=0,57$ ;  $p=0,68$ ].



**Abbildung 55:** Ipsilateraler Asymmetrie-Score (IAS) der einzelnen Gruppen im Verlauf über die 3 Versuchsblöcke. Für die Bewegungsrichtung "Ziehen" (A) und "Schieben" (B) aufgetragen ( $n=4$  (DFA);  $n=5$  (MDFPPA und VEH)). Post-hoc Fisher's LSD Test:  $**p<0,01$ ,  $*p<0,05$  (Vergleich mit Kontrolle (VEH)).



### 5.3 HPLC

Um eine mögliche Neurotoxizität der Substanzen auszuschließen, wurden die Gehirne der Versuchstiere ca. 2 Wochen nach Ende des letzten Stepping-Test entnommen und mittels HPLC-Analyse die DA und 5-HT-Konzentration in bestimmten Gehirnarealen untersucht. Deutlich ist der Einfluss der dopaminergen Läsion zu sehen. Die gesunde Hemisphäre enthält signifikant mehr DA.

Betrachtet man den DA-Gehalt im anterioren und posterioren Striatum (aS und pS) (**Abbildung 56 A**) so erkennt man für die rechte gesunde Seite, sowohl bei der Kontrolle als auch bei beiden Behandlungsgruppen eine hohe DA-Konzentration im aS [ $F_{\text{Behandlung}}(1,22)=417$ ;  $p=0,075$ ]; [ $F_{\text{Seite}}(2,22)=3,6$ ;  $p=0,043$ ]; [ $F_{\text{Behandlung} \times \text{Seite}}(2,22)=0,55$ ;  $p=0,58$ ]. Im pS war eine geringere aber über alle Gruppen gleich verteilte DA-Konzentration zu sehen, wobei die DFA-Gruppe leicht höher war [ $F_{\text{Behandlung}}(1,24)=119$ ;  $p<0,0001$ ]; [ $F_{\text{Seite}}(2,4)=1,15$ ;  $p=0,33$ ]; [ $F_{\text{Behandlung} \times \text{Seite}}(2,24)=1,29$ ;  $p=0,3$ ].

Die linke lädierte Hemisphäre zeigte lediglich bei der Kontrolle einen geringen DA-Gehalt im aS, im pS ist unabhängig von der jeweiligen Gruppen kein DA vorhanden.

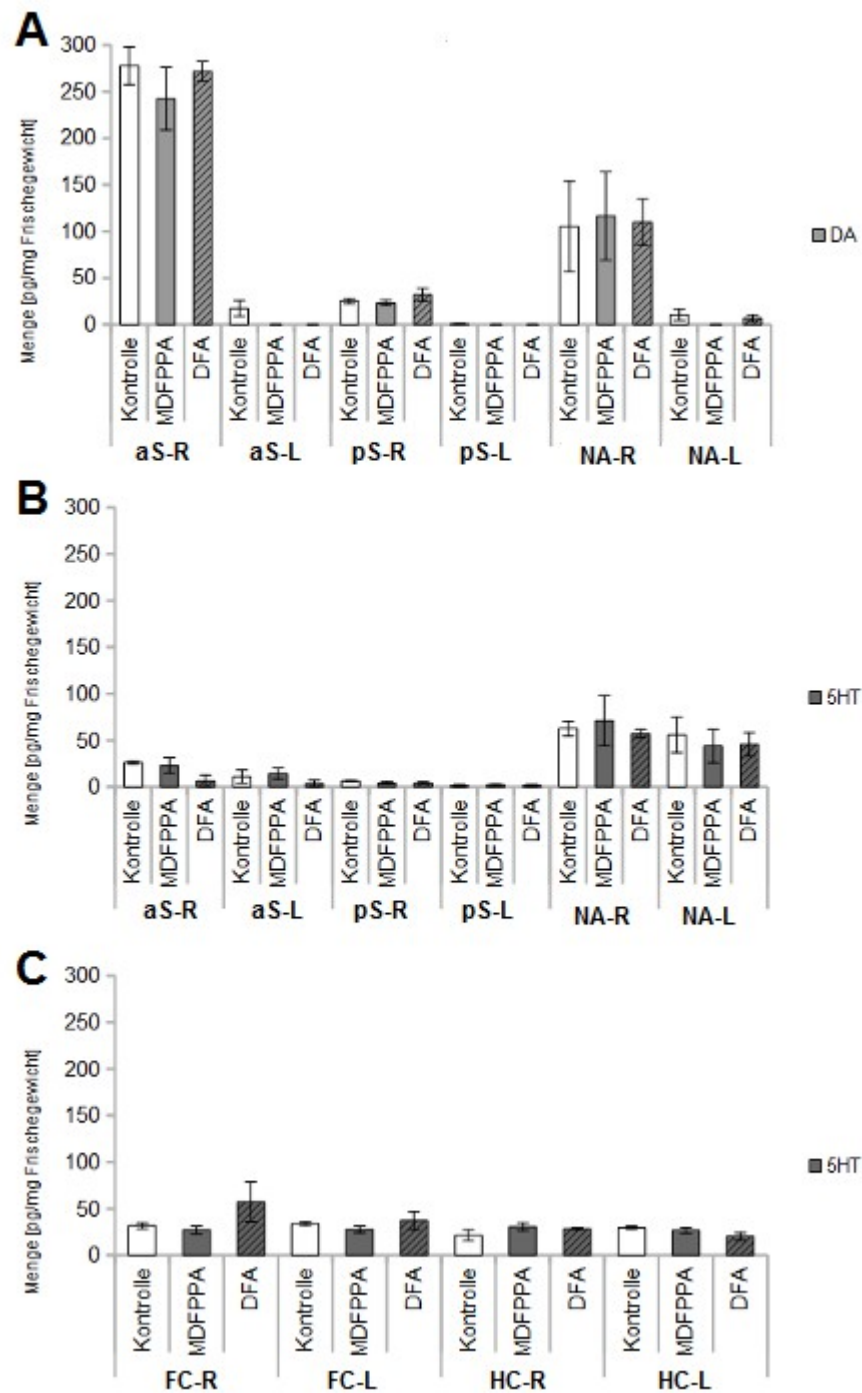
Im Nukleus accumbens (NA) war in der rechten Hemisphäre bei allen Gruppen gleich viel DA vorhanden, wobei die Konzentration in der MDFPPA-Gruppe leicht höher war. Die linke lädierte Seite zeigte nahezu kein DA in der MDFPPA-Gruppe und eine geringe Konzentration bei der Kontrolle und der DFA-Gruppe [ $F_{\text{Behandlung}}(1,20)=17$ ;  $p=0,0005$ ]; [ $F_{\text{Seite}}(2,20)=0,0006$ ;  $p=0,99$ ]; [ $F_{\text{Behandlung} \times \text{Seite}}(2,20)=0,063$ ;  $p=0,96$ ].

Der 5-HT-Gehalt in den gleichen Arealen (**Abbildung 56 B**) war im linken und rechten aS bei DFA im Vergleich zur Kontrolle und MDFPPA-Gruppe signifikant niedriger [ $F_{\text{Behandlung}}(1,21)=3,48$ ;  $p=0,75$ ]; [ $F_{\text{Seite}}(2,21)=3,65$ ;  $p=0,033$ ]; [ $F_{\text{Behandlung} \times \text{Seite}}(2,21)=1,29$ ;  $p=0,58$ ]. Im rechten pS waren die Konzentrationen unabhängig von der jeweiligen Gruppe gleichmäßig gering, im linken pS noch geringer [ $F_{\text{Behandlung}}(1,24)=12$ ;  $p=0,001$ ]; [ $F_{\text{Seite}}(2,4)=0,4$ ;  $p=0,6$ ]; [ $F_{\text{Behandlung} \times \text{Seite}}(2,24)=0,8$ ;  $p=0,43$ ].

Im NA zeigte sich links eine leichte Abnahme der 5-HT-Konzentration im Vergleich zur rechten gesunden Seite. Vor allem bei den behandelten Gruppen [ $F_{\text{Behandlung}}(1/20)=1,29$ ;  $p=0,26$ ]; [ $F_{\text{Seite}}(2,20)=0,11$ ;  $p=0,88$ ]; [ $F_{\text{Behandlung} \times \text{Seite}}(2,20)=0,21$ ;  $p=0,8$ ].

Im Frontalen Kortex (FC) (**Abbildung 56 C**) zeigte sich ein leicht höherer 5-HT-Gehalt bei der DFA-Gruppe in beiden Hemisphären, im Vergleich zu den anderen Gruppen. Im Vergleich mit MDFPPA ist der Unterschied signifikant [ $F_{\text{Behandlung}}(1/20)=0,6$ ;  $p=0,44$ ]; [ $F_{\text{Seite}}(2,20)=2,43$ ;  $p=0,11$ ]; [ $F_{\text{Behandlung} \times \text{Seite}}(2,20)=0,9$ ;  $p=0,47$ ].

Im Hippocampus war der 5-HT-Gehalt der Kontrollgruppe in der rechten Hemisphäre leicht geringer, im Vergleich zu den anderen Behandlungsgruppen und verglichen mit der Kontrolle der linken Hemisphäre. Ansonsten war die Konzentration unabhängig von den Gruppen in beiden Hemisphäre ähnlich verteilt [ $F_{\text{Behandlung}}(1,20)=0,2$ ;  $p=0,69$ ]; [ $F_{\text{Seite}}(2,20)=0,6$ ;  $p=0,5$ ]; [ $F_{\text{Behandlung} \times \text{Seite}}(2,20)=2,47$ ;  $p=0,11$ ].



**Abbildung 56:** Untersuchung der Neurotoxizität der Substanzen MDFPPA und DFA sowie der Kontrolle (Vehikel) in der HPLC. Analysiert wurde der DA- bzw. 5-HT-Gehalt in pg/mg Frischgewicht in folgenden Gehirnanlagen: anteriores und posteriores Striatum (aS und pS), Nucleus Accumbens (NA), Frontaler Kortex (FC) und Hippocampus (HC). Für die linke (L) und rechte (R) Hemisphäre. Angegeben als Mittelwert  $\pm$  SEM.

## 6. Diskussion

### 6.1 DFS

#### 6.1.1 R- und S-DFS im Katalapsie-Modell

Im Haloperidol-Modell zeigte DFS bei allen verwendeten Konzentrationen (0, 1, 2, 4 mg/kg) keinen antiparkinsonoiden Effekt. Über alle Testtage gemittelt (**Abbildung 18**), aber auch jeder Versuchstag getrennt betrachtet (**Abbildung 20**), war nur ein sehr leichter Effekt bei R-DFS zu beobachten. Eine Auswertung der Daten auf evtl. kumulative Effekte, deuten an, dass R-DFS eher in der Baseline, also Test 1 und 2, kumuliert, während S-DFS eher akute kumulative Wirkung zeigt (**Abbildung 22**). Ein Verdacht auf eine bessere Wirksamkeit bei kumulativer Verabreichung wurde nicht bestätigt, da ein Zusatzversuch nach 30 Tagen Pause, dreitägiger Behandlung und anschließendem Katalapsie-Test ebenfalls keinen großen Unterschiede zur Katalapsie-Baseline zeigte (Daten nicht in der Arbeit gezeigt).

Dies stand im Kontrast zu unseren Erwartungen, da das Medikament Selegilin, welches die Grundsubstanz für das fluoridierte Analog DFS bildet, im klinischen Gebrauch als R-Enantiomer verwendet wird. Es hemmt irreversibel die MAO-B und verhindert so den Abbau von Dopamin. Bei der Metabolisierung durch CYP 450 Enzyme in der Leber entstehen die Metabolite R-Methamphetamin und R-Amphetamin.

Amphetamin bewirkt durch Interaktion an DAT, SERT und NAT eine Neurotransmitter Freisetzung. Methamphetamin wirkt nahezu doppelt so stark und bewirkt vor allem eine DA-Ausschüttung.

Die Gründe für die geringe Wirkstärke von DFS können vielfältig sein:

Die Substanz wurde aufgrund von theoretischen Überlegungen synthetisiert (Kombination der Di-Fluor-Amphetamin Struktur mit der von Selegilin), mit dem Ziel die Eigenschaften der beiden Wirkstoffe zu kombinieren und so einen synergistischen Effekt zu erzielen.

Da es sich um eine neuartige Substanz handelt, liegen noch keine Informationen über Bindungsaffinitäten zu MAO oder SERT/DAT vor, sondern konnten bisher nur angenommen werden. Es kann also nicht ausgeschlossen werden, dass die Wirkung an den jeweiligen Zielbindungsstellen, aufgrund der Erweiterung am Stickstoff bzw. am Phenylring nachlässt.

Eine Mono-Fluor-Substitution, an Position 4 des Phenylring, wie bei para-Fluor-Selegilin, zeigte in anderen Arbeiten jedoch keinen Verlust der Wirkung (Knoll et al., 1992; Marona-Lewicka et al.,

## 6. Diskussion

1995; Terleckyj and Heikkila, 1992; Yasar, 2005).

Fuller (Fuller, 1978, 1975) zeigte, dass der para-Fluor-Substituent bei Amphetamin im Vergleich zu anderen Halogenen, die schwächste kurzfristige Wirkung in Bezug auf die Hemmung der TPH und den 5-HT-Level hatte. Eine MAO-Hemmung scheint von der Lipophilie des Substituenten abzuhängen und war bei Fluor im Vergleich zu Chlor oder Brom schwächer ausgeprägt. Allerdings wurde in „drug discrimination“-Studien mit Amphetamin in Ratten gezeigt, dass das Fluoranalogue im Vergleich zu anderen Halogenen komplett dessen Wirkung imitiert. Die DA-Uptake-Inhibition ist stärker (von Größe des Substituenten abhängig), die von 5-HT schwächer ausgeprägt (von Lipophilie abhängig), aber im Vergleich ist Amphetamin immer stärker wirksam (Fuller, 1975; Marona-Lewicka et al., 1995).

Es könnte auch zu unspezifischen Bindungen an anderen Wirkorten (Rezeptoren, Enzymen...) kommen, wodurch die Motorik gehemmt bzw. die Katalepsie verstärkt wird.

Zudem wäre es möglich, dass die MAO Hemmung nur unzureichend erfolgte, evtl. durch zu geringe Dosierungen. Unveröffentlichte Daten (Dangel, 2010) zeigen jedoch bei der Verwendung von DFS im Racemat bei 2,5 mg/kg eine leichte Verringerung der Abstiegslatenz (Verbesserung der Katalepsie), die Maximaldosis von 5 mg/kg zeigte keine weitere Wirkungssteigerung. Die hier verwendeten Dosierungen von 2 und 4 mg/kg DFS liegen im Rahmen der vorliegenden Daten, daher ist eine zu geringe Dosierung nicht naheliegend. Die Maximaldosis orientierte sich an den zugelassenen Human-Dosierungen für Selegilin, die bei 5-10mg/kg täglich liegen und nicht überschritten werden dürfen (Fachinformation Selegilin).

Verwendete Dosierungen in Tierversuchen mit Selegilin befanden sich ebenfalls häufig in diesem Bereich oder darunter (0,25-5 mg/kg) (Kitani et al., 2006; Knoll et al., 1992; Youdim and Tipton, 2002), mit Ausnahmen von 30 mg/kg bei einer Untersuchung zu dosisabhängigen Hyperlokomotion (Engberg et al., 1991).

Aufgrund der ausbleibenden antikataleptischen Wirkung von DFS, wurde angenommen, dass die Bildung aktiver Amphetamin- Metabolite (analog zu dem aus Selegilin entstehenden Amphetamin würde sich hier aus DFS MDFPPA abspalten) eine wichtige Rolle spielen könnten und dies entsprechend untersucht.

Hierzu wurde das Versuchsdesign leicht verändert und insbesondere spätere Messzeitpunkte betrachtet (wenn also theoretisch eine ausreichende Konzentration an Metaboliten bestehen müsste). Jedoch auch in diesem Versuchszeitfenster konnte kein maßgeblicher antikataleptischer

## 6. Diskussion

Effekt von DFS aufgezeigt werden. Als Erklärung könnte dienen, dass die Bildung von MDFPPA, welches als S-Enantiomer im gleichen Testschema verabreicht eine starke antikataleptische Wirkung hatte (s.u.)), durch die sterische Veränderung des Moleküls durch die Fluoratome stark verzögert ablaufen könnte. Die für einen antikataleptischen Effekt nötige Plasmakonzentration könnte so erst nach dem für die Tests begrenzten Zeitfenster von 3 Stunden erreicht worden sein.

Die Argumentation hier kann allerdings aufgrund der limitierten Datenlage nur spekulativ erfolgen, daher müssen wir uns zunächst mit einem nicht-Wirken von DFS begnügen.

## 6.2 MDFPPA

### 6.2.1 R- und S-MDFPPA im Katalepsie-Modell

MDFPPA wirkte enantioselektiv und stark dosisabhängig. Wie erwartet zeigte S-MDFPPA im Vergleich zum R-Enantiomer, analog zu den Befunden mit der Muttersubstanz MDMA, einen starken antiparkinsonoiden Effekt mit dosisabhängigem Verlauf. Es kam zu einer starken Reduktion der Abstiegslatenz an Test 3 also 30 Minuten nach Substanzgabe, danach nahm die Wirkung kontinuierlich bei allen Dosierungen bis zum letzten Test ab (**Abbildung 24**).

Bei der Muttersubstanz MDMA zeigt sich die wichtige Rolle der Chiralität in der pharmakologischen Wirkungsweise der Enantiomere. Das R-Enantiomer bindet postsynaptisch an eine Vielzahl von Rezeptoren, vor allem an 5-HT<sub>2A</sub> Rezeptoren, die auch die psychotrope halluzinogene Wirkung vermitteln („drug discrimination“-Studie (Baker and Taylor, 1997)). Die 5-HT Freisetzung von R-MDMA ist vergleichbar mit der von S-MDMA, die DA Freisetzung aber vergleichsweise geringer.

S-MDMA bindet präsynaptisch an Monoamintransporter, wodurch sich die Konzentration der Neurotransmittern 5-HT, DA und NA im synaptischen Spalt erhöht.

S-MDMA hat eine psychomotorische Wirkung, die sich bei der Ratte als akute Hyperlokomotion und in stereotypen Verhalten zeigt; beim Menschen die bekannte psychostimulierende und empathische Wirkung hat. Im Versuch mit Ratten verstärkt das R-Enantiomer die Wirkung des S-

## 6. Diskussion

Enantiomer, d.h. das racemische MDMA ist stärker wirksam als das S-MDMA alleine- sowohl in der allgemeinen psychomotorisch stimulierenden als auch der antikataleptischen Wirkung (Lebsanft et al., 2005; von Ameln and von Ameln-Mayerhofer, 2010). Betrachtet man die Pharmakokinetik bei Labortieren so sind S-MDMA und dessen Metabolit S-MDA in höheren Konzentrationen im Gehirn und Plasma zu detektieren als die jeweiligen R-Enantiomere- es liegt demnach ein schnellerer Metabolismus zu Grunde (Meyer et al., 2002a; Meyer and Maurer, 2009; Murnane et al., 2009).

Ähnlichkeiten besitzen die beiden MDMA-Enantiomer hinsichtlich der Ergebnisse die bei Versuchen zur konditionierten Platz Präferenz (CPP) und intravenöser Selbst-Administration der MDMA-Enantiomere durchgeführt wurden (Fantegrossi et al., 2002; Meyer et al., 2002b) (Fantegrossi et al., 2002; Meyer et al., 2002b).

Ergebnisse von Humanproben zeigen, dass beim Menschen nach der Einnahme von RS-MDMA die Konzentration des R-Enantiomere im Plasma stärker ansteigt als die des S-Enantiomer. Evtl. wird das S-Enantiomer sehr viel schneller komplett metabolisiert, wodurch es zu keinem Anstieg der Konzentration im Plasma kommen kann. Daraus würde evtl. eine höhere Neurotoxizität resultieren, die durch Metabolite wie S-MDA (und nachfolgende Ring-geöffnete Dyhydroxy-Metabolite) bedingt wäre (Fallon et al., 1999).

MDMA wird auf dem Schwarzmarkt in der Regel als 1:1 Racemat gehandelt. Die Halbwertszeiten der Enantiomere unterscheiden sich stark. Die des S-Enantiomer liegt bei 4,8 Stunden, die des R-Enantiomer bei 14,8 Stunden. Dies spricht für die unterschiedlichen (biphasischen) Wirkungen beim Menschen. Das S-Enantiomer wirkt sich in einem eher subjektive und psychomotorischen Effekt aus, das länger anhaltende R-Enantiomer führt zu kognitiven Effekten und Stimmungsänderungen, die meist auch am nächsten Tag nach der Einnahme von RS-MDMA anhalten (De la Torre et al., 2004).

Eine noch stärkere Trennung der Wirkung ist jedoch eher bei MDA (siehe Abschnitt 2.5.5) zu beobachten (Baker and Taylor, 1997; Glennon, 1999).

Betrachtet man den Verlauf der Ergebnisse für die Kontrolle 0 mg/kg (Test auf Kumulation) für die einzelnen Testtage so zeigt sich ein stabiler Verlauf bei R-MDFPPA und bei S-MDFPPA eine leichte Verbesserung der Katalepsie an den Testtagen 18 und 21. Dies könnte darauf hinweisen, dass zu

## 6. Diskussion

diesem Zeitpunkt ein Effekt durch die kumulierte Substanz die Kontrolle beeinflusst (**Abbildung 27**).

Es ist aber auch generell nicht auszuschließen, dass diesem Effekt ein anderer Mechanismus zugrunde liegt, beispielsweise eine Verhaltens-Sensitivierung. Gerade bei Katalepsie-Messungen mit Haloperidol wurde mehrfach beschrieben, dass wiederholte Tests mit der gleichen Dosis Haloperidol eine Verstärkung der Effekte bewirkt (Amtage and Schmidt, 2003; Klein and Schmidt, 2003; Schmidt and Beninger, 2006).

Für MDMA wurde ein solcher Effekt bereits gezeigt (Amtage and Schmidt, 2003; Banjaw et al., 2003).

Nach Banjaw et al., könnte es also eher zu einer Zunahme der Katalepsie über die Zeit kommen d.h. die Wirkung der Substanz würde über die Zeit abnehmen. Stattdessen sehen wir eine Abnahme der Katalepsie-Baseline, was als Abschwächung des Haloperidol-Effekt gewertet werden kann. Dies kann auch unter Anbetracht der gegensätzlichen Befunde von Banjaw et al. nicht ausgeschlossen werden, nicht zuletzt weil andere Behandlungsschemata verwendet wurden. Bei Banjaw et al. erfolgte keine Sensitivierungsphase mit Haloperidol alleine und zudem wurde jeden Tag behandelt und getestet und nicht wie hier, alle drei Tage.

Es können auch neuroplastische Mechanismen angenommen werden, die zu den Beobachtungen geführt haben können: Bei wiederholter Gabe von Psychostimulantien kommt es zu einer allmählichen Zunahme deren Wirkung (Kalivas et al., 1998; Lettfuss et al., 2013; von Ameln and von Ameln-Mayerhofer, 2010). Dieser Theorie zufolge könnte die wiederholte Gabe von MDMA oder MDFPPA zu einer allmählichen Verstärkung der substanzassoziierten Effekte führen - in dem Fall zu einem stärkeren antikataleptischen Effekt (ohne wirklich zu kumulieren).

Das Ergebnis wäre in beiden Fällen das Selbe, welcher Mechanismus wirklich vorliegt, müsste in gesonderten Experimenten geprüft werden - was jedoch nicht Zielsetzung dieser Arbeit war.

Eine ganz andere Möglichkeit der Abschwächung des Haloperidoleffektes kann auch von einem verstärkten Metabolismus von Haloperidol herrühren. In diesem Fall wäre es zu einer klassischen pharmakokinetischen „Arzneimittel“-Interaktion gekommen. Haloperidol und MDMA sind beides Substrate für die CYP 450 Enzyme in der Leber. Ob dies auch für MDFPPA zutrifft wurde noch nicht untersucht, aber es müsste eine Leberinduktion erfolgen, um den postulierten verstärkten Haloperidolmetabolismus beobachten zu können (Die Kurve von Test 3-6 wäre dann steiler, die Substanzwirkung würde demnach schneller nachlassen (**Abbildung 24**)). Dass MDFPPA ein



## 6. Diskussion

Leberenzyminduktor darstellt ist eher unwahrscheinlich. Unter den bekannten CYP-Induktoren befinden sich unseres Wissens keine Phenylethylamine (PEA), vielmehr fungieren die PEA-Derivate als Substrat für CYP-Enzyme.

Von MDMA ist bekannt, dass die N-Demethylierung zu MDA über CYP3A4 vermittelt wird, während die Demethylierung und die Ringöffnung von MDMA zu 3,4-Dihydroxymethamphetamin bzw. von MDA zu 3,4-Dihydroxyamphetamin über die CYP2D6 katalysiert werden (Kreth et al., 2000; Meyer and Maurer, 2009). Diese stellen toxische Metabolite dar. In einer Studie konnte gezeigt werden, dass weibliche Dark Agouti Ratten, die genetisch bedingt wenig CYP 2D1 exprimieren, weniger vulnerabel für die neurotoxischen Effekte von MDMA sind (Malpass et al., 1999).

Vergleicht man die Ergebnisse der einzelnen Dosierungen am ersten (Tag 12) und letzten Testtag (Tag 21) (**Abbildung 26 A**) so zeigt sich bei R-MDFPPA ein leichter Unterschied bei 4 mg/kg. Am letzten Testtag ist die Katalepsie im Vergleich zum ersten (voll ausgebildete Katalepsie) leicht reduziert. Das R-Enantiomer entfaltet evtl. erst eine Wirkung bei längerer Kumulierung im Körper. Bei S-MDFPPA (**B**) zeigen sich bei allen Dosierungen Unterschiede: Bei der Kontrollgruppe 0 mg/kg und der Dosierung 1 mg/kg ist die Katalepsie an Tag 15 maximal ausgeprägt, an Tag 21 bei 0 mg/kg leicht verringert, bei 1mg/kg stark signifikant erniedrigt. Dies könnte ebenfalls auf einen Kumulationseffekt hindeuten. Bei den höheren Dosierungen von 2 bzw. 4 mg/kg zeigt sich jedoch eine Erhöhung der Katalepsie am letzten Testtag. Dies könnte eher auf einen Sättigungseffekt hindeuten. Die Ergebnisse sind kritisch zu betrachten, da pro Tag/Dosis nur n=2.

Um einen evtl. Kumulationseffekt besser erkennen zu können, wurde eine Testreihe mit S-MDFPPA in Gruppen mit konstanter Behandlung durchgeführt (**Abbildung 28 B**). Die Tiere bekamen durchgehend 0, 1 oder 2 mg/kg verabreicht. Wie bereits beim Crossover-Design zeigt sich eine dosisabhängige Wirkung.

Die Kontrollgruppe zeigt eine konstante ausgeprägte Katalepsie (**Abbildung 31**). Bei der Gruppe mit 1mg zeigt sich am ersten Testtag noch kein Effekt, danach aber tritt eine Reduktion der Katalepsie ein. Die 2mg /kg Gruppe zeigt ab dem ersten Testtag eine starke antikataleptische Wirkung (**Abbildung 30**).

4 mg/kg wurden nicht getestet. Da von einem Kumulationseffekt ausgegangen wurde, wäre die nach 4 Testtagen kumulierte Gesamtdosis bei 16 mg/kg, was mit der Crossover-Gruppe nicht mehr vergleichbar gewesen wäre. Die theoretisch angenommene kumulierte Gesamtdosis an Tag 21

## 6. Diskussion

würde bei der Crossover-Gruppe 7 mg/kg (n=8) und bei der konstanten Gruppe 0 mg/kg (n=4), 4 bzw. 8 mg/kg (n=6) betragen.

Im direkten Vergleich zwischen den zwei Behandlungsansätzen zeigt sich folgendes (**Abbildung 33 A,B,C**): Betrachtet man die Kontrollgruppe 0 mg/kg (**A**) auf die einzelnen Testtage verteilt, so ist ein ähnlich konstanter Verlauf der Abstiegslatenzen bei beiden Behandlungsgruppen zu sehen. Bei der konstanten Dosierung ist der Verlauf sehr gleichmäßig, sowohl in den Prä-Tests als auch in den Post-Tests. Bei der „Crossover“-Gruppe verlaufen die Tests an Tag 12 und 15 gleichmäßig, aber im Vergleich mit der konstanten Gruppe erhöht. An Tag 18 und 21 unterliegen sie stärkeren Schwankungen; sind aber in etwa auf dem Niveau der konstanten Gruppe. Die beiden Gruppen sind demnach prinzipiell vergleichbar, mit einer marginal besseren Wirkung der konstanten Gruppe.

Bei der 1 mg/kg Gruppe (**B**) verlaufen die Prä-Tests (Baseline) beider Gruppen konstant. Eine generelle Substanzwirkung ist bei beiden erst ab Tag 15 ersichtlich. Die Crossover-Gruppe zeigt eine leichte Verbesserung der Abstiegslatenz über die Tage hinweg bis zum letzten Testtag, an dem sie eine deutlich niedrigere Abstiegslatenz besitzt. Die konstante Behandlung verläuft eher gleichmäßig. Die Vorbehandlung könnte, obwohl in der Kontrollgruppe kein Effekt zu sehen war, doch einen Einfluss haben. Direkt vor der 1 mg Behandlung an Tag 21 erhielt die Crossover-Gruppe an Tag 18 2 mg/kg und an Tag 15 4 mg/kg. Dies entspricht einer theoretischen Kumulation von 7 mg am letzten Tag, verglichen mit der von 4 mg bei der konstanten Gruppe. Eine hohe Dosis als Vorbehandlung könnte demnach ein verbesserte Abstiegslatenz am nächsten Testtag bewirken.

Bei der 2 mg/kg Behandlung (**C**) verlaufen die Prä-Tests beider Gruppen konstant, zudem sind bereits ab Tag 12 ähnlich starke Wirkungen zu erkennen. An Tag 18 ein ist eine signifikante Verbesserung bei der Crossover-Gruppe zu sehen. Die Vorbehandlung war an Tag 15 4 mg/kg. Was gegen einen Kumulationseffekt spricht, ist die theoretisch kumulierte Gesamtdosis der konstanten Gruppe die ebenfalls bei 4 mg liegt. Zudem zeigt sich an Tag 15 und 21 eine Abnahme der Abstiegslatenz, obwohl die direkte Vorbehandlung ebenfalls 4 mg betrug, ein Kumulationseffekt ist demnach nicht sehr wahrscheinlich. Die Ergebnisse sind kritisch zu betrachten, da pro Tag/Dosis nur n=2 (crossover), n=5;6 (konstant).

Prinzipiell sind beide Behandlungsmethoden vergleichbar, allerdings erleichtert der stets gleichmäßigere Verlauf der konstanten Gruppe, langfristige Effekte besser zu erkennen.

### 6.2.2 S-MDFPPA im unilateralen 6-OHDA-Modell

Im zweiten Versuchsteil wurde S-MDFPPA im Stepping-Test nach unilateraler MFB-Läsion untersucht. Dafür wurde die dopaminerge Projektion von der SNc in das Striatum (das Haupteingangsareal der BG) irreversibel zerstört.

Es wurde in diesem Modell nur das S- Enantiomer von MDFPPA getestet, da eine antiparkinsonoide Wirkung bei R-MDFPPA bereits im Katalepsie-Test ausgeschlossen wurde und man die Tierzahl gering halten wollte.

Im Vergleich zum Haloperidol-Modell hat das Läsions-Modell eine höhere Validität. Es bildet teilweise den neurochemischen Zustand im Parkinson-Patienten ab, auch wenn die ursächliche Degeneration der Neurone sowie deren progredienter Verlauf nicht exakt nachmoduliert werden kann, so besteht doch der striatale DA-Mangel und wird nicht lediglich durch einen Antagonismus am DA-Rezeptor simuliert.

Durch die Läsion mit dem Neurotoxin 6-OHDA wurde die Motorik der Tiere auf der kontralateralen Körperseite beeinträchtigt (Faull and Laverty, 1969; Przedbroski et al., 1995; Sachs and Jonsson, 1975; Schwarting and Huston, 1996; Ungerstedt, 1968). Beim Stepping- Test nutzt man diesen Aspekt und benutzt die ipsilaterale gesunde Körperhälfte als intraindividuelle Kontrolle zur kontralateralen motorisch beeinträchtigten Seite (Olsson et al., 1995; Tillerson et al., 2001).

Die Initiierung willentlicher und unwillkürlicher Bewegungen werden über die direkte und indirekte BG Bahn ausgeführt und schließlich über die exzitatorische thalamische Rückkoppelung zum Kortex moduliert. Die Bewegung wird letztendlich über den primären motorischen Kortex über die Pyramidenbahn, die in Verbindung mit Motoneuronen im Rückenmark steht und unter Feinabstimmung mit dem Pedunculopontinen Nukleus (PPN), dem Nukleus ruber und dem Cerebellum, generiert. Die Pyramidenbahnen kreuzen an der Pyramidenbahnkreuzung auf die jeweils andere Seite, daher steuert eine Hemisphäre motorisch die jeweilig kontralaterale Körperseite (Meredith and Kang, 2006).

Vor Beginn der eigentlichen Testreihe wurde zum einen eine Baseline-Messung vor der Läsion durchgeführt und zum anderen nach der Läsion ein Test auf ausreichende Läsionsstärke kurz vor Beginn der Tests.

Tiere die nicht ausreichend lädiert waren wurden von der Versuchsreihe ausgeschlossen (mehr als 4

## 6. Diskussion

Ausgleichsschritte mit der kontralateralen Vorderpfote).

Ab einer dopaminergen Degeneration von über 80% (Threshold-Effekt) kommt es zu einer Ausprägung der Symptomatik, also einer Reduktion der Anzahl der Ausgleichsschritte auf ein Minimum (Chang et al., 1999; Kelsey et al., 2004).

Unterhalb dieser Schwelle kommt es im Striatum zu Kompensationsvorgängen, die vor allem DAT-vermittelt den DA-Mangel auszugleichen versuchen (Sossi et al., 2009). Dieser Kompensationsmechanismus gerät erst ab einem Verlust von über 80 % an seine Grenzen, davor ist bei den Tieren die DA-Mangel-vermittelte Dysregulation der BG nicht stark genug ausgeprägt und die Motorik der kontralateralen Vorderpfote ist nicht eingeschränkt.

Dieser Zusammenhang zwischen bestehendem DA-Defizit und der Ausprägung der ersten Symptome tritt als Threshold-Effekt auch beim Parkinson-Patienten auf (Chang et al., 1999; Dunnett and Björklund, 1999). Es wird beschrieben, dass Morbus Parkinson-Patienten erst nach Erreichen dieser Schwelle motor-symptomatisch werden, obwohl schon vorher ein erheblicher Mangel an DA im Gehirn vorliegt. Immer mehr Arbeitsgruppen konzentrieren sich auf die Detektion (Diagnose) von prämotorischen Effekten, welche bereits durch einen moderaten DA-Mangel manifest werden. Ein bekanntes Beispiel für ein prämotorisches Parkinson-assoziiertes Symptom ist die Anosmie (Jankovic, 2008; Schmidt, 2005).

In den hier durchgeführten Experiment wurden allerdings, wie oben beschrieben, nur stark läionierte Tiere verwendet, d.h. von einem DA-Verlust von über 90% ist auszugehen.

Der Versuch lief nach folgendem Schema ab: Es wurden drei jeweils acht Tage dauernde Behandlungsblöcke mit Dosierungen von je 1, 2 und 4 mg/kg durchgeführt. Die Behandlung erfolgte jeden Tag, getestet wurde nur am ersten, vierten und achten Tag eines jeden Behandlungsblocks. Zwischen den einzelnen Blöcken wurde eine 2 tägige Auswaschphase eingehalten. An jedem Testtag fand ein Prä-Test vor der Substanzgabe und der anschließende Post-Test zum Testen der akuten Substanzwirkung 1,5 Stunden nach Substanzgabe statt.

10 Ratten zeigten eine ausreichende Läsionsstärke auf und wurden auf 2 Gruppen (je n=5) verteilt. Die Kontroll-Gruppe, die mit dem Vehikel PBS behandelt wurde und eine Behandlungsgruppe die mit S-MDFPPA behandelt wurde.

Die Behandlungsgruppe zeigte im Vergleich zur Kontrollgruppe eine stetige Verbesserung der rechten motorisch beeinträchtigten Vorderpfote vom ersten Tag der Dosis 1 mg/kg bis zum letzten Tag der Dosis 4 mg/kg. Die Anzahl der Ausgleichsschritte in den Prä-Tests lagen stets unter denen

## 6. Diskussion

der Post-Tests, wodurch eine starke kumulative Wirkung der Substanz auszuschließen ist (**Abbildung 49, 50, 51**).

Dieser Effekt war allerdings nur bei der Bewegungsrichtung „Ziehen“ zu erkennen. Bei „Schieben“ war dies nicht zu beobachten - es zeigte sich stets eine höhere Anzahl an Ausgleichsschritten bei der Kontroll-Gruppe.

Bei der linken gesunden Pfote der Substanz-Gruppe zeigte sich allerdings eine Reduktion der Ausgleichsschritte mit steigender Dosis. Dies könnte auf eine leichte Verkrampfung der Tiere bei steigender Dosis zurückzuführen sein. Zudem zeigten die Tiere nach Substanzgabe ein Rotationsverhalten, wodurch sie bei der Durchführung des Stepping-Test evtl. beeinträchtigt waren.

Diese Unterschiede lassen vermuten, dass den beiden Bewegungsrichtungen unterschiedliche Mechanismen zu Grunde liegen müssen.

Daher wird in anderen Arbeiten tendenziell eher die Bewegungsrichtung „Ziehen“ berücksichtigt (Chang et al., 1999; Kirik et al., 1998).

Dies lässt sich auch nachvollziehen, indem man die eigentliche Rolle der BG nochmals näher betrachtet. Diese liegt vor allem in der Kontrolle der Verhaltensregulierung, also Initiierung, Unterdrückung oder „Switching“ von Verhaltensmustern.

Beim Stepping wird die zu testende Vorderpfote bei der Bewegungsrichtung „Ziehen“ hinter dem Tier hergezogen. Dabei wirken weniger propriozeptive Stimuli auf das Tier ein, im Vergleich zum „Schieben“ also dem Schieben des Tieres, wobei es zu einer stärkeren Ablenkung und Druckausübung auf die zu testende Pfote kommt. Ein vermehrter propriozeptiver Input bewirkt verstärkt eine reflektorische Bewegungsausübung.

Die Daten bei der Bewegungsrichtung „Schieben“ unterscheiden sich bereits ab dem ersten Testtag zu „Ziehen“, was vor allem an Testtag 4 sehr deutlich zu erkennen ist, bei Testtag 8 wieder leicht sinkt. Die Kontroll-Gruppe schneidet hierbei signifikant besser ab im Vergleich zu den behandelten Tieren (**Abbildung 49**). Bei 2 mg/kg schneidet die Kontroll-Gruppe an allen Testtagen besser ab, wobei zwischen Prä- und Post-Test kein großer Unterschied zu erkennen ist. Bei der Substanz-Gruppe ist der Post -Test stets besser (**Abbildung 50**). Bei 4 mg/kg zeigt sich das gleiche Muster bei den Gruppen, allerdings nimmt die Performance bei den behandelten Tieren noch ab (**Abbildung 51**).

Auffallend ist der sehr regelmäßige Verlauf der Daten der Substanz-Gruppe bei der Bewegungsrichtung „Schieben“ der nur bei der 2 mg/kg Behandlung auftritt. Diese Dosierung

## 6. Diskussion

scheint eine stabilere Bewegungsausübung zu bewirken und Hinweise auf das Wirkoptimum der Substanz zu geben. Dies wurde auch bei Experimenten mit dem racemischen MDFPPA festgestellt (Riegel, 2011).

Das allgemein bessere Abschneiden der Kontroll-Gruppe hinsichtlich der Ergebnisse zu „schieben“, lässt sich evtl. durch eine behandlungsbedingte 5-HT- Depression erklären, und eine damit verbundene Antriebslosigkeit. Auch könnte Zustands-abhängiges Lernen „State-Dependence-Memory“ (Zarrindast and Rezayof, 2004) eine Rolle spielt. Dabei wird die Ausführung der Ausgleichsschritte als motorisches Lernen angesehen, das bei der Kontroll-Gruppe ungehindert abläuft. Bei der Behandlungsgruppe ist die Anzahl der Ausgleichsschritte beim Prä-Test (ab 2 mg/kg) stets geringer als nach Substanz-Gabe. Es kommt also zu einer Verbesserung der Motorik, die anscheinend an die Behandlung gekoppelt ist.

Die Anzahl der Ausgleichsschritte wurde zwar signifikant erhöht, aber erreicht nicht das Level der Baseline-Messung oder der Kontroll-Hemisphäre.

Da eine kontinuierliche Verbesserung der Motorik nach Substanzgabe zu beobachten ist, kann man einen (teilweise) dopaminergen Wirkmechanismus von S-MDFPPA in Betracht ziehen, wodurch der Dopaminmangel in den BG- Arealen kompensiert wird.

In einer Arbeit mit racemischem MDFPPA (Riegel, 2011) wurde in der Mikrodialyse eine Ausschüttung von sowohl DA als auch 5-HT beobachtet. Bei der anschließenden HPLC Analyse wurde allerdings kein erhöhtes DA in der lädierten Hemisphäre festgestellt. Der antiparkinsonoide Effekt des racemischen MDFPPA beruht also evtl. auf einer Modulation durch serotonerge Neurone und nicht einer generellen Erhöhung der DA-Level in den BG. Diese Annahme wird durch Vorarbeiten (Grießinger, 2008) unterstützt und konnte in den Antagonistenexperimenten im Haloperidol-Modell bestätigt werden (s.u.).

Bereits nach der ersten Behandlung mit 2 und 4 mg/kg wurde ein starker antiparkinsonoide Effekt auf die beeinträchtigte Vorderpfote sichtbar, der sich stetig verbesserte und bei der niedrigeren Dosis einen stabileren Verlauf aufzeigte.

Eine Untersuchung auf eine mögliche neurotoxische Wirkung des S-MDFPPA mittels HPLC-Analyse zeigte keine durch die Behandlung hervorgerufene Reduktion der DA- oder 5-HT-Konzentrationen in den untersuchten Arealen (siehe Kapitel HPLC).

Dies war auch bei MDFPPA als Racemat zu erkennen (Riegel, 2011). Ein läsionsbedingter DA-Mangel war natürlich ausgeprägt und auch eine Reduktion von 5-HT im Striatum (aCPu; pCPu) zu erkennen. Die Ergebnisse der Mikrodialyse wiesen auf eine Hemmung der MAO-A und B hin. Dies

## 6. Diskussion

zeigte sich durch eine Erhöhung der Umsatzrate, was auf eine langfristige kompensatorische Enzyminduktion hindeutet. Zudem könnte die Kompensation als Folge der Langzeitbehandlung erfolgt sein, die dazu führt, dass die serotonerge Hemmung des dopaminergen System in der SN aufgehoben wird. Dies führt zu einer Erhöhung der dopaminergen Feuerrate in der SN und dadurch zu einer Verstärkung der dopaminergen Stimulation nachfolgender Nuklei wie aCPu und dem Nacc. In einer anderen Arbeit, in welcher allerdings der Einfluss von R/S-MDFPPA auf L-DOPA induzierte Dyskinesien untersucht wurde, wurde zudem gezeigt, dass die antidyskinetische Wirkung abhängig ist von funktionalen 5-HT-Rezeptoren, jedoch nicht vom SERT (Bishop et al., 2006; Griebinger, 2008; Fieblinger, 2008). Im Stepping-Test wurde die Abhängigkeit der Motorik von DA und 5-HT untersucht. Hierzu wurde eine unilaterale 6-OHDA- und bilaterale DHT-Läsion des MFB durchgeführt, mit dem bekannten Ergebnis einer starken Reduktion der ipsilateralen Vorderpfotenbewegung aber auch einer ipsilateralen Beeinträchtigung durch DHT. Dies belegt wiederum die Rolle von 5-HT bei der Vermittlung von Bewegungen (Mignon and Wolf, 2002). Auch (Sotnikova et al., 2005) zeigte sich bei Mäusen die komplett DA entleert waren, eine durch MDMA, also 5-HT vermittelte, hervorgerufene Verbesserung der Motorik.

### 6.3 DFA

#### 6.3.1 R- und S-DFA im Katalepsie-Modell

Bei DFA ist ebenfalls ein dosisabhängiger Effekt zu sehen. R-DFA hat bis auf eine zeitlich begrenzte akute Wirkung in der hohen Dosis (4 mg/kg) 30 min nach Injektion nur einen sehr schwachen antikataleptischen Effekt (**Abbildung 35**). Betrachtet man die relative Katalepsiehemmung, so ist der kurzwirksame Effekt von R-DFA ebenfalls deutlich zu sehen (**Abbildung 36**)

S-DFA zeigt einen starken dosisabhängigen Verlauf, der bei 1 und 2 mg über die einzelnen Tests kontinuierlich schwächer wird, bei 4 mg allerdings eine konstante nahezu maximale Katalepsiehemmung zeigt (**Abbildung 35**).

Trägt man den Verlauf der Abstiegslatenzen über die einzelnen Testtage auf, so ist diese bis auf einen leichten Anstieg an Testtag 18 an allen Tagen minimal und am letzten Tag am geringsten. Bei

## 6. Diskussion

S-DFA ist der dosisabhängige Verlauf auch über die Tage deutlich zu erkennen. Evtl. können wieder kumulative Effekte eine Rolle spielen (**Abbildung 37 B**).

Bei R-DFA ist zu erkennen (**Abbildung 37 A**), dass der relativ gemäßigte Verlauf mit dem auffallenden Effekt bei 4 mg/kg vor allem auf seine starke Wirkung an den zwei letzten Testtagen zurückzuführen ist. Dies könnte evtl. auch ein Hinweis auf einen kumulativen Effekt von R-DFA sein. Davor ist die Wirkung relativ gering.

Ein leichter Kumulationseffekt ist zudem beim Auftragen der Kontroll-Gruppe über die einzelnen Testtage zu sehen (**Abbildung 38**). Bei beiden Enantiomeren zeigt sich eine leichte Reduktion der Abstiegslatenz an den letzten zwei Testtagen, wobei der Effekt bei S-DFA stärker ausgeprägt ist.

Das wichtige Zusammenspiel der beiden Enantiomere wurde bei DFA im Detail untersucht. Dieser Effekt zeigte sich bereits bei R/S-MDMA, wo es zu einer Verbesserung der Wirkung im Vergleich zum S-Enantiomer alleine kam (von Ameln and von Ameln-Mayerhofer, 2010).

Hierbei wurden zunächst Enantiomermischungen mit einer maximalen Finaldosis von 1, 2 und 4 mg/kg (Zusammensetzung 1:3, 1:1 und 3:1 R:S) getestet. Dosierungen wie sie auch in den vorangegangenen Versuchen für die einzelnen Enantiomere verwendet wurden. So konnte untersucht werden, wie ein kleiner oder großer Anteil des R-Enantiomers das S-Enantiomer in seiner Wirksamkeit im Katalepsietest beeinflusst.

Dabei war festzustellen, dass ein großer oder gleicher R-Anteil die antikataleptische Wirkung verschlechtert und S-DFA alleine die beste Wirkung zeigt: es ist ein klarer dosisabhängiger antikataleptischer Effekt von S-DFA zu beobachten (**Abbildung 40 A-F**).

Allerdings muss hier angemerkt werden, dass ein zusätzlicher Versuch mehr über die modulatorische Rolle von R-DFA aussagen könnte; bei gleichbleibender Konzentration von S-DFA würden minimale R-DFA-Mengen u.U. doch zu sichtbaren Ergebnissen führen, da unter diesen Umständen keine S-DFA-Dosis-Effekt die Ausprägung der Katalepsie stören würde.

Daher wurde im nächsten Versuch der Einfluss von 1, 2 und 4 mg/kg R-DFA auf die konstante Maximaldosis 4mg/kg S-DFA untersucht. Hier zeigte sich überraschenderweise – bei erster Betrachtung (gepoolte Daten aus dem Crossover-Design) - nahezu kein Einfluss des R-Enantiomers auf die antikataleptische Wirkung von S-DFA (**Abbildung 42 B**).

Zum Vergleich: Bei der Muttersubstanz Amphetamin (reiner DA-Freisetzer) zeigt sich, dass die DA-Freisetzung durch S-Amphetamin im Striatum und im NAcc in einer 1:1 Mischung nicht beeinflusst wird. Bei einer 3:1 Mischung zeigt sich jedoch eine signifikante Verstärkung der



## 6. Diskussion

Wirkung des S- durch das R-Enantiomer der Substanz. Vermutlich beeinflusst das R-Enantiomer in Enantiomermischungen immer die Aktivität des DAT (d.h. die primäre pharmakologische Zielstruktur für Amphetamin), so dass die Wirkung des S-Enantiomer verlängert und verstärkt wird. Eine Optimierung des Mischungsverhältnisses bewirkt u.U. eine Optimierung der Wirkung an DAT, so dass das S-Enantiomer besser in die Präsynapsen aufgenommen wird und so die Transmitterfreisetzung verlängert wird (Joyce et al., 2006).

Betrachten wir diese Zusammenhänge, so wird klar warum manche Arzneimittel in, auf den ersten Blick, ungewöhnlichen Mischungsverhältnissen angeboten werden.

Im Fertigarzneimittel Adderral, welches in den USA und Kanada zur Behandlung des Aufmerksamkeitsdefizit und Hyperaktivitätsstörung (ADHS) zugelassen ist, wird ebenfalls eine 3:1 Mischung von Amphetamin Enantiomeren verwendet (Pennick, 2010).

Tatsächlich ist Adderral in der aktuellen Version eine Mischung aus verschiedenen Salzen des Amphetamins und des Dexamphetamins (Angaben nach Lauer-Datenbank: in einer 5mg Adderral-Kapsel sind je 1,25mg Amfetaminhydrogenaspartat-1-Wasser, Amfetaminhemisulfat, Dexamfetaminsaccharat und Dexamfetaminhemisulfat enthalten). Dies ergibt rechnerisch 3,72mg freie Amphetamin-Base in einem Verhältnis von 2,67:1,05 S:R. Über den Sinn bzw. Nutzen dieser Enantiomeren-Mischung und des Amphetamins an sich in der Behandlung der ADHS lässt sich jedoch vor dem Hintergrund einer strengen Nutzen-Risiko-Bewertung streiten. In Deutschland sind keine razemischen Amphetaminkapseln bzw. -Tabletten zugelassen, jedoch gibt es Dexamphetaminhemisulfat (Attentin®) und das Lisdexamfetaminhemisulfat (Elvanse®, 30mg entspricht 8,9mg Dexamphetamin, also S-Amphetamin). Das letztgenannte, für den deutschen Markt ausschließlich S-Amphetamin enthaltende, zugelassene Fertigarzneimittel wird übrigens von derselben Firma vertrieben, welche die o.g. Enantiomerenmischung von R- und S-Amphetamin (2,5:1) vertreibt. Mittel der Wahl ist nach wie vor der viel milder wirkende Wirkstoff Methylphenidat (Ritalin®), welcher nicht zu einer massiven Ausschüttung von Dopamin führt, sondern den DAT lediglich inhibiert, was dazu führt, dass die Effekte von einer geringeren und eher regulatorisch wirkenden Ausprägung sind.

Die Effekte von R-DFA auf S-DFA sind teilweise gut mit den Beobachtungen zu der chemisch verwandten Substanz MDMA vergleichbar. R-MDMA verstärkt zwar die antikataleptische bzw. rotatorische Effekte von S-MDMA, diese sind jedoch marginal (Lebsanft et al., 2005).

## 6. Diskussion

Bei dem Versuch einer Beeinflussung der Effekte von 4 mg/kg S-DFA durch steigende Dosierungen R-DFA wurde in der detaillierten Auswertung beobachtet, dass die Effekte mit fortschreitendem Versuch (und demnach mehrmaligen Behandlung mit S-DFA und R-DFA) störender wurden (**Abbildung 44**). Dies lässt auf einen kumulativen Effekt von DFA schließen. Ob S-DFA oder R-DFA kumuliert, kann hier nicht abschließend geklärt werden. Allerdings kann angenommen werden, dass eine Inhibition von Abbauenzymen in der Leber und im Gehirn durch R-DFA zu einer allmählichen Zunahme der Konzentrationen von S-DFA führt.

Dies wäre dann vergleichbar mit den Beobachtungen aus früheren Arbeiten: Für MDMA wurde gezeigt, dass R-MDMA den Abbau von S-MDMA hemmt und es dadurch zu einer Steigerung der Konzentration von S-MDMA führt

Allerdings wurde in den Arbeiten mit MDMA keine kumulativen Effekte auf den antikataleptischen Effekt untersucht. Solch ein Zusammenhang ist jedoch nicht auszuschließen: in den ersten Versuchen zum antikataleptischen Effekt von MDMA wurden zwar noch keine Enantiomere untersucht, es ist jedoch nicht auszuschließen, dass es unter wiederholtem Testen, im damaligen Versuchsdesign, zu verstärkenden Effekten gekommen ist (Amtage and Schmidt, 2003)

Diese Annahme kann nicht vollständig nachgeprüft werden, da beim wiederholten Testen von Haloperidol-behandelten Tieren, auch mit einer initial antikataleptisch wirkenden Substanz, die Katalepsie-Sensitiverung den größten Einfluss auf das Verhalten der Tiere hat (Banjaw et al., 2003).

### 6.3.2 S-DFA im unilateralen 6-OHDA-Modell

Nach unilateralen 6-OHDA-Läsion zeigten 4 Tiere eine ausreichende Läsionsstärke. Diese wurden im gleichen Schema wie S-MDFPPA (s.o.) mit S-DFA behandelt.

Betrachtet man den Parkinson-relevanten Stepping-Test-Parameter „Ziehen“, kann eine dosisabhängige antiparkinsonoide Wirkung des S-DFA (ähnlich dem S-MDFPPA) beobachtet werden (**Abbildung 52, 53, 54**). Allerdings muss hier auch betont werden, dass die ipsilaterale Vorderpfote mit höheren Dosierungen zunehmend behindert wurde. Dies zeigt sich in einer leichten

## 6. Diskussion

Abnahme der Ausgleichsschritte im Parameter „Ziehen“ und teilweise auch in „Schieben“. Diese Störung der Motorik kann mit den psychomotorisch aktivierenden Eigenschaften assoziiert sein: wenn die neuronalen Netzwerke im Gehirn zu sehr aktiviert werden und über das Optimum hinausgehen, dann ist das Verhalten ebenfalls eher gehemmt statt aktiviert zu sein.

Ähnliche Beobachtungen können im Einsatz von klassischen Amphetaminen gemacht werden: hochdosiert führen sie eher zur Katatonie bzw. im Tiermodell zu vermehrtem Schnüffelverhalten, während die Hyperlokomotion nicht mehr so ausgeprägt ist (Singh et al., 2012; Wallace et al., 1999; Yates et al., 2007).

Interessant ist, dass diese Behinderung in „Ziehen“ mit fortschreitender konstanter Behandlung verschwand. Dies wäre mit einer Gewöhnung an die verhaltensverringenden Effekte einer Substanz gleichzusetzen (was aus der Literatur bekannt ist (Banjaw et al., 2003)). Zusammengefasst kann die mittlere Dosis als die mit den stabilsten Verhaltenseffekten eingeordnet werden, zumindest zeigt sich hier ein besseres „Nutzen-Risiko“- Verhältnis (**Abbildung 53**).

Wenn man die „Schieben“-Parameter des Stepping-Tests betrachtet, so ist zunächst erstaunlich, dass die Werte der kontralateralen Pfote am ersten Testtag größer waren als die der gesunden (**Abbildung 49, 52**). Dies könnte ein Artefakt sein, auf eine unzureichende Läsionsstärke hindeuten oder auf überkompensatorische Prozesse. Im weiteren Verlauf des Experiments brechen die Werte der Prä-Tests wieder ein bzw. fluktuieren stark, was eine Interpretation des 1 mg/kg Behandlungsdurchlaufs durch die inkonsistente „Baseline“ schwierig macht. Bei den Tests der mittleren und hohen Dosis ist eine Verstärkung der Stepping-Rate bei der moderaten Dosis und eine Abschwächung in der hohen Dosis zu beobachten. Dies könnte mit dem Verlassen des Dosis-Optimums zusammenhängen (siehe Parameter „Ziehen“) (**Abbildung 50, 51**).

Vergleicht man die Wirkung von S-DFA und S-MDFPPA im 6-OHDA-Modell so ist erkennbar, dass MDFPPA eine stärkere Wirkung besitzt. Dies ist interessant, da die Ergebnisse des Katalepsie-Tests dies nicht zeigen.

Dort besitzt das nichtmethylierte Molekül DFA im Vergleich zum methylierten MDFPPA die stärkere Wirkung. Die mittleren Dosierungen sind zwar ähnlich stark, bei der 4 mg/kg Dosierungen zeigen sich allerdings Unterschiede. Das R-Enantiomer zeigt einen auffallenden Peak an Test 3; bei S-DFA zeigt sich ein stabiler minimaler Verlauf von 4 mg/kg. Dies könnte auf eine unterschiedliche Kinetik bei der Elimination (Sättigung) hinweisen (**Abbildung 24 & 35**).

Die Modell-abhängigen Unterschiede zwischen den Substanzen sind interessant und könnten auf mechanistische Hintergründe zurückzuführen sein.

## 6. Diskussion

Wenn man die Unterschiede zwischen der N-methylierten und der nicht-methylierten Form der, mit unseren fluorierten Derivaten verwandten Muttersubstanzen, betrachtet so findet sich folgendes:

Vergleicht man das reine nicht-ringssubstituierte Amphetamin und Methamphetamin, so zeigt sich eine nahezu doppelt so starke Wirkung des methylierten Moleküls (Cho and Segal, 1994).

Vergleicht man die engen Verwandten der fluorierten Derivate MDA und MDMA hinsichtlich der psychomotorisch aktivierenden Wirkung im Rotationsverhalten, so zeigt sich, dass MDA stärker als MDMA (Anzahl der Drehungen korreliert mit DA- Freisetzung) wirkt.

Im Hinblick auf die ursprünglichen Muttersubstanzen lässt sich nun folgendes postulieren:

Ohne Modifikation am Phenylring (Amphetamin und Methamphetamin) bewirkt die Methylierung am Stickstoff eine Verstärkung der Wirkung.

Bei Vorhandensein einer Methylendioxygruppe am Phenylring (MDA und MDMA) bewirkt die Methylierung jedoch eine Verschlechterung der Wirkung.

Mit einer Di-Fluor Gruppe am Phenylring zeigt sich eine Verbesserung der Wirkung vom fluorierten Derivat zur Muttersubstanz (Grießinger, 2008), aber eine Abnahme der antiparkinsonoiden Wirkung des methylierten Fluoranalogs. DFA ist im Vergleich mit MDFPPA im Katalepsietest ähnlich wirksam, obwohl verschiedene Kinetiken in der hohen Dosis zu beobachten waren. Im Läsionsmodell zeigt sich jedoch eine stärkere Wirkung beim methylierten Derivat. Dies kann daran liegen, dass im Katalepsiemodell mit Haloperidol vorrangig die D<sub>2</sub>-Rezeptoren im Gehirn blockiert werden, was zwar zu Parkinsonsymptomen führt, jedoch nicht einen DA-Mangel abbildet. Über Blockade der D<sub>2</sub>-Rezeptoren und Abschaltung der negativen Rückkopplung dopaminerger Neurotransmission werden sogar erhöhte DA-Spiegel in den BG gemessen (Zhang et al., 1989). Dies ist im Läsionsmodell nicht zu beobachten und könnte verantwortlich sein für die leichten Wirkunterschiede ohne den genauen Mechanismus zu kennen. Man könnte vermuten, dass bei ringssubstituierten Substanzen nicht nur dopaminerge sondern serotonerge Mechanismen eine Rolle spielen: Die Wirkung von MDMA ist dosisabhängig und lässt sich mit dem SSRI Citalopram abschwächen, zudem zeigt der 5-HT-Synthese-Hemmer *para*-chlorophenylalanin (PCPA) nur eine leichte Abschwächung des durch MDMA induzierten Rotationsverhalten. Dies lässt den Schluss zu, dass die Wirkung von MDMA nicht nur von 5-HT und DA abhängig ist (Lebsanft et al., 2003).

Der Zeitverlauf des Rotationsverhalten ist bei beiden Substanzen vergleichbar, allerdings bei MDA stärker ausgeprägt. Dies deutet darauf hin, dass die Mechanismen zur DA-Freisetzung ähnlich sein

## 6. Diskussion

können (Lebsanft et al., 2003). MDA, als Metabolit von MDMA, ist vor allem bei S-MDMA (sehr gute antiparkinsonoide Wirkung) in großen Mengen im Kortex und Striatum zu detektieren (Cho et al., 1990; Meyer et al., 2002a). Ein zeitlicher Zusammenhang mit der Bildung von MDA aus MDMA besteht nicht. Die gute antiparkinsonoide Wirkung wird demnach von der Muttersubstanz MDMA und nicht durch den Metaboliten verursacht (Cho et al., 1990; Hiramatsu et al., 1991).

Die Affinität von R-MDMA und R-MDA zur Bindung an 5-HT-Rezeptoren (5-HT<sub>1</sub> und 5-HT<sub>2</sub>) ist drei mal so hoch wie die der S-Enantiomere (Lyon et al., 1986).

Die jeweiligen S-Enantiomere setzen im Vergleich mit den R-Enantiomeren mehr 5-HT frei und besitzen eine höhere Wiederaufnahmehemmung von 5-HT in die Synapsen (Nichols et al., 1982; Steele et al., 1987). Zudem ist ihre DA-Ausschüttung im Vergleich zum jeweiligen Racemat oder R-Enantiomer am höchsten (Callaway et al., 1991; Johnson et al., 1986).

Der Effekt von MDA und MDMA auf die Wiederaufnahmehemmung von DA und NA in striatale Neurone ist ebenfalls bei den S-Enantiomeren stärker ausgeprägt (Steele et al., 1987).

R-MDMA reduziert die L-DOPA-induzierten Dyskinesien während S-MDMA die „ON“-Wirkung von L-DOPA verlängert (Huot, 2011).

Eine andere neuartige Substanz (UWA-101) mit Strukturverwandtschaft zum MDMA (es ist ein N-methyl-alpha-cyclopropyl-Methylendioxyphenethylamin) besitzt antidyskinetische Wirkungen ohne typische MDMA-ähnliche serotonerge oder neurotoxische Effekte zu zeigen (Johnston et al., 2012).

In Katalepsie- und Rotationsversuchen zeigen MDE und sein fluoriertes Derivat EDFPPA, dass eine Verlängerung der Kette am Stickstoff mit einer Ethyl-Gruppe zu einer weiteren Einschränkung der Wirkung (im Vergleich mit MDMA um die Hälfte) führt (Grießinger, 2008; Lebsanft et al., 2003).

EDFPPA und MDE waren im Vergleich zu MDFPPA und MDMA hinsichtlich ihre Wirkungsdauer und - Stärke weniger effektiv. Die Fluorierung von MDMA und MDE hatten keinen gleichen Effekt, MDFPPA wirkt stärker als MDMA, EDFPPA aber schwächer als MDE.

Die Alkylierung am Stickstoff scheint für die Intensität der Wirkung verantwortlich zu sein, wohingegen die Fluorierung am Phenylring nur bei MDFPPA eine Steigerung der Wirkung zeigt. Bei EDFPPA führt sie zu einer ähnlichen oder sogar schwächeren Wirkung im Vergleich zu MDE. Da MDFPPA im Vergleich zu EDFPPA eine vielfach stärkere Wirkung hat ist dies wohl von der Alkylierung am Stickstoff abhängig (Grießinger, Christoph, 2008).

## 6. Diskussion

Unveröffentlichte Ergebnisse von (Lauks and Schmidt, 2006) zeigen beim Test von DFA auf eine antidykinetische Wirkung keinen Effekt. Die antidykinetische Wirkung scheint demnach maßgeblich an der N-Alkylierung zu hängen.

Die Wirkung von EDFPPA kann im Katalepsiemodell mit 5-HT<sub>1A</sub> Rezeptorantagonist WAY100635 antagonisiert werden (von Ameln- Mayerhofer; eingereicht), nicht aber die antidyskinetische Wirkung. Auch der antidyskinetische Effekt bei MDE wird nicht durch WAY100635 antagonisiert (Grießinger, 2008).

Bei Selegilin zeigte das fluoridierte Analog im Katalepsietest ebenfalls keine antikataleptische Wirkung. Die Fluoratome in Verbindung mit einer langen Alkylkette am Stickstoff, in diesem Fall Propargyl, führt hier zu einer Verschlechterung/Unwirksamkeit des Moleküls.

MDMA führt zu einer stärkeren DA-Freisetzung als MDE (Johnson et al., 1986; Nash and Nichols, 1991). Demnach müsste im gesunden Striatum die DA-Freisetzung für die Rotationsstärke und -Dauer verantwortlich sein, da MDMA und MDE zu einer vergleichbaren 5-HT-Freisetzung führen (Nash and Nichols, 1991; Schmidt et al., 1994; Yamamoto et al., 1995). Diese Ergebnisse machen nochmal den großen Einfluss von MDMA auf andere Neurotransmittersysteme deutlich. Die Effekte ergeben sich aus einem komplexen Zusammenspiel des serotonergen, dopaminergen und noradrenergen Systems.

Die Experimente mit DFA und den Antagonisten WAY100635 und Citalopram zeigen, dass die Wirkung von S-DFA von der Funktionalität der SERT abhängt. 5-HT<sub>1A</sub>-Rezeptoren scheinen ebenfalls involviert zu sein, die Ergebnisse lassen (aufgrund des zeitlichen Verlauf) eine biphasische Wirkung vermuten (mit leichten antagonistischen Effekten des 5-HT<sub>1A</sub>-Antagonisten in der frühen Phase der Testung (bis ca. 60 min nach Gabe von S-DFA; gefolgt von einem viel stärkeren Antagonismus in der späten Testphase, also >60 min nach S-DFA-Gabe). Beide serotonergen Targets sind also im Wirkmechanismus von S-DFA involviert: hauptsächlich scheint S-DFA zwar über den SERT zu wirken (voraussichtlich über eine Transporter-vermittelte Ausschüttung von 5-HT, Vgl. (Verrico et al., 2006), 5-HT<sub>1A</sub>-Rezeptoren scheinen hier jedoch eine untergeordnete Funktion zu übernehmen. Bei den Muttersubstanzen MDA und MDMA wurde ein ähnliches Bindungsverhalten beschrieben. Sie wirken sowohl an 5-HT-Rezeptoren generell (v.a. am 5-HT<sub>1A</sub>-Rezeptor), als auch am SERT (Cho and Segal, 1994).

### 6.4 HPLC

Die Ergebnisse der Neurochemie lassen klar den Einfluss der unilateralen 6-OHDA-Läsion auf den DA-Gehalt der rechten und linken Hemisphäre erkennen, die Läsion war demnach erfolgreich. Dieser Befund korrespondiert auch mit den Verhaltensdaten: die Tiere zeigten einen ausgeprägten Hemiparkinsonismus, welcher auf einen unilateral begrenzten DA-Verlust beruht. Die striatale Läsion war im anterioren Striatum >90% stark, die Schwelle, ab welcher motorische Symptome manifest werden, wurde also überschritten.

Eine Neurotoxizität ist nicht eindeutig zu erkennen, lediglich im rechten anterioren Striatum ist der 5-HT-Gehalt der DFA-vorbehandelten Tiere leicht vermindert.

Dies könnte natürlich als erstes Anzeichen einer potentiell neurotoxischen Wirkung gewertet werden. Ob man in dem (kumulativen) Dosisbereich mit einer Neurotoxizität bei den getesteten Substanzen rechnen müsste, bleibt wegen mangelnder Referenzstudien unklar. Die kumulative Dosis war bei beiden Gruppen 56 mg/kg (1mg/kg, gefolgt von 2mg/kg, gefolgt von 4mg/kg, jeweils acht Tage Behandlung). MDMA zeigte in unserem Labor neurotoxische Wirkungen bei einer 10 tägigen Behandlung mit 20mg/kg einmal täglich, d.h. kumulative Dosis von 200mg/kg (Mayerhofer et al., 2001). Bei niedrigeren täglichen Dosierungen konnte keine Neurotoxizität gezeigt werden (von Ameln and von Ameln-Mayerhofer, 2010). Diese Dosis ist viel höher, jedoch muss ebenfalls der niedrigeren Wirkdosen Rechnung getragen werden. Verglichen mit MDMA ist die notwendige antikataleptische Dosis des Difluor-Derivat MDFPPA um den Faktor 5 kleiner – d.h. 1 bis 2 mg/kg MDFPPA entsprechen der antikataleptischen Wirkung von ca. 5 bis 10 mg/kg MDMA. Umgerechnet auf die neurotoxische Wirkung müsste daher eine kumulative Dosis von 40mg/kg MDFPPA ausreichen um MDMA-ähnliche Effekte auf das serotonerge System auszuüben. Dies war hier bei weitem nicht der Fall. Natürlich muss aber berücksichtigt werden, dass hier trotz der höheren kumulativen Äquivalenz-Dosis täglich nur niedrigere Dosierungen appliziert wurden. Jedoch gerechnet mit dem Äquivalenz-Faktor 5 würden den 8mg/kg MDFPPA 40mg/kg MDMA entsprechen und sogar mit einer vorsichtigeren Rechnung mit dem Äquivalenz-Faktor 2 würden die hier verwendeten 8mg/kg MDFPPA immer noch einer relativ hohen Dosis MDMA von 16mg/kg entsprechen. Bei der hier interessanteren Substanz DFA, wo wir tatsächlich eine Tendenz zur potentiellen Neurotoxizität (oder zumindest zum leichten Abfall in 5-HT-Konzentrationen) beobachten konnten, müssten wir allerdings das N-demethylierte Derivat von MDMA zum

## 6. Diskussion

Vergleich heranziehen – das MDA. MDA ist ebenfalls serotonerg neurotoxisch – diese Wirkungen sind viel stärker als bei MDMA und de facto sind niedrigere Konzentrationen ausreichend. Dass hier eine Parallele bzw. chemisch bedingte Verwandtschaft zwischen den Methylenedioxy- und Difluor-Amphetaminen existiert, wird durch einen weiteren Befund aus der Forschung mit Methylenedioxyderivaten unterstützt: Die neurotoxische Wirkung von DFA – wenn es sich hier tatsächlich um eine handeln sollte – spielt sich insbesondere im gut dopaminerg innervierten (dopaminerg intakten) rechten Striatum ab. Für MDA und MDMA ist die Hypothese postuliert und zumindest für striatal serotonerge Neurotoxizität auch nachgewiesen worden, dass die Stärke der neurotoxischen Wirkung der Methylenedioxyamphetamine mit ihrer Eigenschaft korreliert, DA freizusetzen. Nichols und Kollegen (Sprague et al., 1998) zeigten eine neurotoxische Potenz von  $MDA > MDMA > MDE$  welche korreliert hat mit der DA-freisetzenden Potenz  $MDA > MDMA > MDE$ .

Weiterhin muss aber auch ein anderer möglicher Mechanismus, welcher rein serotonerg vermittelt wird, diskutiert werden. Völlig unabhängig von den Mechanismen welche für die methylenedioxy-Derivate gelten, zeigen halogenierte Amphetamine ebenfalls eine selektiv serotonerge Neurotoxizität. Hierzu gehören vor allem para-Chloroamphetamin (PCA) und Fenfluramin (Berger et al., 1989; De Silva et al., 2005; García-García et al., 2015; Rothman et al., 2004).

Difluoramphetamine stellen ebenfalls halogenierte Amphetamine dar und könnten ähnliche Mechanismen der Neurotoxizität haben. Die neurotoxischen Dosierungen sind bei MDMA und PCA vergleichbar obwohl die LD50 bei PCA (De Silva et al., 2005; García-García et al., 2015) um den Faktor 4 geringer ist (Putzke et al., 2007).

Im FC war sowohl in der rechten als auch in der linken Hemisphäre eine Erhöhung der 5-HT-Konzentrationen zu sehen. Dies könnte an Sensitivierungsprozessen liegen oder evtl. auf ein DFA hervorgerufenes Serotonin-Syndrom hinweisen. Zu den Symptomen eines Serotonin-Syndroms bei Ratten gehören unter anderem Rigor und Krämpfe (Kalivas et al., 1998; Kutscher and Yamamoto, 1979; Spanos and Yamamoto, 1989), wie sie auch bei hoher Dosierung im Stepping-Versuch beobachtet wurden (allerdings nicht evaluiert). In MDFPPA behandelten Ratten ist dieser 5-HT Anstieg nicht zu erkennen, auch im Experiment war keine auffallende Krampfneigung zu sehen.

Eine Kumulation der Substanz erscheint höchst unwahrscheinlich, da eine lange Pause zwischen der letzten Injektion und der Hirnpräparation eingehalten wurde, in welcher die Substanzen höchstwahrscheinlich ausgewaschen wurden. Eine Erhöhung des 5-HT-Gehalt im FC welcher bei der Ratte sowohl somatosensorische als auch motorische und teilweise prämotorische Funktionen



## 6. Diskussion

vermittelt, könnte ebenfalls im Zusammenhang stehen mit der antikataleptischen bzw. hier antiparkinsonoiden Wirkung der fluorierten Amphetamine. Diese Möglichkeit müsste jedoch im Detail untersucht werden, d.h. ohne weitere Erkenntnisse und Kontrollexperimente kann hier nur spekuliert werden. Allerdings ist dies nicht gänzlich unmöglich – wenn die dopaminerge Regulation der Basalganglien ausfällt, wären andere, kortikale Mechanismen theoretisch in der Lage, die neuronal funktionellen Defizite im Gehirn zu kompensieren.

Abschließend lässt sich feststellen, dass die fluorierten Amphetaminderivate MDFPPA und DFA ein antiparkinsonoides therapeutisches Potential besitzen. Hierbei sind vor allem die S-Enantiomere wirksam, obwohl R-DFA in höherer Dosis ein eigenes Wirkprofil zeigt. In der antikataleptischen Wirkung konnten 5-HT<sub>1A</sub>-Rezeptoren und SERT identifiziert werden.

### 6.5 Schlussfolgerung

Der Hinweis auf eine antiparkinsonoide Wirkung von MDMA ergab sich durch Zufall, als ein Patient eine Ecstasy-Pille einnahm und eine Verbesserung seiner Symptome sowie der L-DOPA bedingten Dyskinesien beobachtete. Da die Verwendung von Betäubungsmitteln in der klinischen Praxis allgemein problematisch ist und der Verdacht einer neurotoxischen Wirkung von MDMA besteht wurden neue Derivate entwickelt, welche die gute antiparkinsonoide Wirkung vermitteln aber durch Modifikation der Struktur zu einem sicheren Medikament führen könnten.

Die gute antiparkinsonoide Wirkung der in dieser Arbeit untersuchten fluorsubstituierten MDMA-Derivate, konnte in zwei Tiermodellen nachgewiesen werden.

Zum einen im Haloperidolinduzierten Katalepsiemodell in welchem die Blockade des D<sub>2</sub>-Rezeptors transient zu der Ausprägung der Symptomatik führt und zum anderen im 6-OHDA-Läsions-Modell in welchem den Tieren durch intrazerebrale Injektion des Neurotoxins in das MFB ein DA Mangel ausgelöst wurde. Anschließend wurden die Tiere mit den Substanzen behandelt.

Es wurde gezeigt, dass die Wirkung von der Chiralität und der Länge der Alkylkette abhängt und stark dosisabhängig ist. Des weiteren zeigte sich, durch das Verwenden von Antagonisten an 5-HT<sub>1A</sub>-Rezeptor und SERT, eine Abhängigkeit der Wirkung von serotonergen Zielstrukturen. Bisher durchgeführte Experimente (Grießinger, 2008) mit fluorierten Derivaten beschränkten sich auf die Substanzen als Racemat. In dieser Arbeit wurde erstmals die Rolle der einzelnen Enantiomere, sowie bei DFA, deren Zusammenwirken in Enantiomeremischungen detailliert untersucht. Dabei zeigte sich zum einen die starke Wirkung des S-Enantiomer im Vergleich zu seinem R-Enantiomer und zum anderen der eher gegensteuernde Effekt eines gleichen oder größeren R-Anteil in einer Enantiomermischung, was die gute antiparkinsonoide Wirkung des S-Enantiomer herabsetzt. Die Alkylierung am Stickstoff scheint für die Intensität der Wirkung verantwortlich zu sein. So zeigt sich im Katalepsie-Test eine stärkere Wirkung des nicht-methylierten DFA im Vergleich mit seinem methylierten Derivat. Vergleicht man die engen Verwandten der fluorierten Derivate MDA und MDMA im Rotationsverhalten, so zeigt sich, dass MDA stärker als MDMA (DA-Freisetzung) wirkt. Experimente mit dem ethylierten Derivat zeigten (bei Grießinger, 2008) ebenfalls den Einfluss der Alkyl-Kette: EDFPPA und MDE waren im Vergleich zu MDFPPA und MDMA hinsichtlich ihre Wirkungsdauer und - Stärke weniger effektiv. Die Fluorierung am Phenylring allein scheint keinen Effekt auf die Stärke der Wirkung zu haben, da nur bei MDFPPA eine Steigerung der Wirkung im Vergleich mit der Muttersubstanz MDMA auftrat, EDFPPA aber

## 6. Diskussion

schwächer als MDE wirkte.

Zusammengefasst kann festgestellt werden, dass die hier getesteten Substanzen Difluor-Amphetamin und sein N-methyliertes Derivat (MDFPPA) einen signifikanten starken antiparkinsonoiden Effekt in zwei bekannten Tiermodellen zeigen. In der neurochemischen Analyse ausgewählter Hirnareale zeigte sich kein schädlicher (neurotoxischer) Effekt auf das dopaminerge oder serotonerge System. Vor diesem Hintergrund stellen die vorgestellten Substanzen eine gute Alternative zur Therapie der Parkinsonerkrankung dar.

## 7. Literaturverzeichnis

- Aizman, O., Brismar, H., Uhlén, P., Zettergren, E., Levey, A.I., Forssberg, H., Greengard, P., Aperia, A., 2000. Anatomical and physiological evidence for D1 and D2 dopamine receptor colocalization in neostriatal neurons. *Nat. Neurosci.* 3, 226–230.
- Alam, M., Schmidt, W.J., 2002. Rotenone destroys dopaminergic neurons and induces parkinsonian symptoms in rats. *Behav. Brain Res.* 136, 317–324.
- Alexander, G.E., Crutcher, M.D., 1990. Functional architecture of basal ganglia circuits: neural substrates of parallel processing. *Trends Neurosci.* 13, 266–271.
- Amtage, J., Schmidt, W.J., 2003. Context-dependent catalepsy intensification is due to classical conditioning and sensitization. *Behav. Pharmacol.* 14, 563–567.
- Anglade, P., Mouatt-Prigent, A., Agid, Y., Hirsch, E.C., 1996. Synaptic Plasticity in the Caudate Nucleus of Patients with Parkinson's Disease. *Neurodegeneration* 5, 121–128.
- Baker, L.E., Taylor, M.M., 1997. Assessment of the MDA and MDMA optical isomers in a stimulant-hallucinogen discrimination. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 57, 737–748.
- Banjaw, M.Y., Mayerhofer, A., Schmidt, W.J., 2003. Anticataleptic activity of cathinone and MDMA (Ecstasy) upon acute and subchronic administration in rat. *Synap. N. Y. N* 49, 232–238.
- Battaglia, G., Brooks, B.P., Kulsakdinun, C., De Souza, E.B., 1988a. Pharmacologic profile of MDMA (3,4-methylenedioxymethamphetamine) at various brain recognition sites. *Eur. J. Pharmacol.* 149, 159–163.
- Battaglia, G., Yeh, S.Y., De Souza, E.B., 1988b. MDMA-induced neurotoxicity: parameters of degeneration and recovery of brain serotonin neurons. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 29, 269–274.
- Baumann, M.H., Wang, X., Rothman, R.B., 2006. 3,4-Methylenedioxymethamphetamine (MDMA) neurotoxicity in rats: a reappraisal of past and present findings. *Psychopharmacology (Berl.)* 189, 407–424.
- Berger, U.V., Grzanna, R., Molliver, M.E., 1989. Depletion of serotonin using p-chlorophenylalanine (PCPA) and reserpine protects against the neurotoxic effects of p-chloroamphetamine (PCA) in the brain. *Exp. Neurol.* 103, 111–115.
- Bishop, C., Taylor, J.L., Kuhn, D.M., Eskow, K.L., Park, J.Y., Walker, P.D., 2006. MDMA and fenfluramine reduce L-DOPA-induced dyskinesia via indirect 5-HT1A receptor stimulation. *Eur. J. Neurosci.* 23, 2669–2676

## 7. Literaturverzeichnis

- Blakely, R.D., De Felice, L.J., Hartzell, H.C., 1994. Molecular physiology of norepinephrine and serotonin transporters. *J. Exp. Biol.* 196, 263–281.
- Blandini, F., Armentero, M.T., Fancellu, R., Blaugrund, E., Nappi, G., 2004. Neuroprotective effect of rasagiline in a rodent model of Parkinson's disease. *Exp. Neurol.* 187, 455–459.
- Blandini, F., Nappi, G., Tassorelli, C., Martignoni, E., 2000. Functional changes of the basal ganglia circuitry in Parkinson's disease. *Prog. Neurobiol.* 62, 63–88.
- Böhm, H.-J., Banner, D., Bendels, S., Kansy, M., Kuhn, B., Müller, K., Obst-Sander, U., Stahl, M., 2004. Fluorine in medicinal chemistry. *Chembiochem Eur. J. Chem. Biol.* 5, 637–643.
- Bonifati, V., 2014. Genetics of Parkinson's disease--state of the art, 2013. *Parkinsonism Relat. Disord.* 20 Suppl 1, S23–28.
- Breese, G.R., Traylor, T.D., 1971. Depletion of brain noradrenaline and dopamine by 6-hydroxydopamine. *Br. J. Pharmacol.* 42, 88–99.
- Brodkin, J., Malyala, A., Nash, J.F., 1993. Effect of acute monoamine depletion on 3,4-methylenedioxymethamphetamine-induced neurotoxicity. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 45, 647–653.
- Brooks, A.I., Chadwick, C.A., Gelbard, H.A., Cory-Slechta, D.A., Federoff, H.J., 1999. Paraquat elicited neurobehavioral syndrome caused by dopaminergic neuron loss. *Brain Res.* 823, 1–10.
- Brown, R.G., 2000. Negative symptoms: the “pathology” of motivation and goal-directed behaviour. *TINS.*
- Callaway, C.W., Johnson, M.P., Gold, L.H., Nichols, D.E., Geyer, M.A., 1991. Amphetamine derivatives induce locomotor hyperactivity by acting as indirect serotonin agonists. *Psychopharmacology (Berl.)* 104, 293–301.
- Capela, J.P., Carmo, H., Remião, F., Bastos, M.L., Meisel, A., Carvalho, F., 2009. Molecular and cellular mechanisms of ecstasy-induced neurotoxicity: an overview. *Mol. Neurobiol.* 39, 210–271.
- Carlsson, A., Lindqvist, M., Magnusson, T., 1957. 3,4-Dihydroxyphenylalanine and 5-hydroxytryptophan as reserpine antagonists. *Nature* 180, 1200.
- Centonze, D., Usiello, A., Costa, C., Picconi, B., Erbs, E., Bernardi, G., Borrelli, E., Calabresi, P., 2004. Chronic haloperidol promotes corticostriatal long-term potentiation by targeting dopamine D2L receptors. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 24, 8214–8222.
- Chang, J.W., Wachtel, S.R., Young, D., Kang, U.J., 1999. Biochemical and anatomical characterization of forepaw adjusting steps in rat models of Parkinson's disease: studies on medial forebrain bundle and striatal lesions. *Neuroscience* 88, 617–628.

## 7. Literaturverzeichnis

- Chesselet, M.-F., 2002. Dopamine — GABA Interactions, in: Chiara, P.G.D. (Ed.), Dopamine in the CNS II, Handbook of Experimental Pharmacology. Springer Berlin Heidelberg, pp. 151–172.
- Cho, A.K., Hiramatsu, M., Distefano, E.W., Chang, A.S., Jenden, D.J., 1990. Stereochemical differences in the metabolism of 3,4-methylenedioxymethamphetamine in vivo and in vitro: a pharmacokinetic analysis. *Drug Metab. Dispos. Biol. Fate Chem.* 18, 686–691.
- Cho, A.K., Hiramatsu, M., Kumagai, Y., Patel, N., 1993. Pharmacokinetic approaches to the study of drug action and toxicity. *NIDA Res. Monogr.* 136, 213–225.
- Cho, A.K., Segal, D.S. (Eds.), 1994. Amphetamine and Its Analogs: Psychopharmacology, Toxicology, and Abuse, 1 edition. ed. Academic Press, San Diego.
- Chu, T., Kumagai, Y., DiStefano, E.W., Cho, A.K., 1996. Disposition of methylenedioxymethamphetamine and three metabolites in the brains of different rat strains and their possible roles in acute serotonin depletion. *Biochem. Pharmacol.* 51, 789–796.
- Clarke, A., Brewer, F., Johnson, E.S., Mallard, N., Hartig, F., Taylor, S., Corn, T.H., 2003. A new formulation of selegiline: improved bioavailability and selectivity for MAO-B inhibition. *J. Neural Transm. Vienna Austria* 1996 110, 1241–1255.
- Dangel, Isabel, 2010. Untersuchungen zur Wirkung von (RS)-Difluor-Selegilin in Tiermodellen der Parkinsonkrankheit. Tübingen.
- Dauer, W., Przedborski, S., 2003. Parkinson's disease: mechanisms and models. *Neuron* 39, 889–909.
- De la Torre, R., Farré, M., Roset, P.N., Pizarro, N., Abanades, S., Segura, M., Segura, J., Camí, J., 2004. Human pharmacology of MDMA: pharmacokinetics, metabolism, and disposition. *Ther. Drug Monit.* 26, 137–144.
- DeLong, M.R., 2000. The basal ganglia. *Princ. Neural Sci.* 4, 853–867.
- DeLong, M.R., Wichmann, T., 2007. Circuits and circuit disorders of the basal ganglia. *Arch. Neurol.* 64, 20–24.
- De Silva, D.J., French, S.J., Cheung, N.Y., Swinson, A.K., Bendotti, C., Rattray, M., 2005. Rat brain serotonin neurones that express neuronal nitric oxide synthase have increased sensitivity to the substituted amphetamine serotonin toxins 3,4-methylenedioxymethamphetamine and p-chloroamphetamine. *Neuroscience* 134, 1363–1375.
- Di Giovanni, G., Di Matteo, V., Pierucci, M., Benigno, A., Esposito, E., 2006. Serotonin involvement in the basal ganglia pathophysiology: could the 5-HT<sub>2C</sub> receptor be a new target for therapeutic strategies? *Curr. Med. Chem.* 13, 3069–3081.
- Dunnett, S.B., Björklund, A., 1999. Prospects for new restorative and neuroprotective treatments in Parkinson's disease. *Nature* 399, A32–39.

## 7. Literaturverzeichnis

- Elliott, P.J., Close, S.P., Walsh, D.M., Hayes, A.G., Marriott, A.S., 1990. Neuroleptic-induced catalepsy as a model of Parkinson's disease. I. Effect of dopaminergic agents. *J. Neural Transm. Park. Dis. Dement. Sect. 2*, 79–89.
- Engberg, G., Elebring, T., Nissbrandt, H., 1991. Deprenyl (selegiline), a selective MAO-B inhibitor with active metabolites; effects on locomotor activity, dopaminergic neurotransmission and firing rate of nigral dopamine neurons. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 259, 841–847.
- Ensslin, H.K., Maurer, H.H., Gouzoulis, E., Hermle, L., Kovar, K.A., 1996. Metabolism of racemic 3,4-methylenedioxyethylamphetamine in humans. Isolation, identification, quantification, and synthesis of urinary metabolites. *Drug Metab. Dispos. Biol. Fate Chem.* 24, 813–820.
- Fahn, S., 2015. The medical treatment of Parkinson disease from James Parkinson to George Cotzias: Treatment of PD From Parkinson to Cotzias. *Mov. Disord.* 30, 4–18.
- Fallon, J.K., Kicman, A.T., Henry, J.A., Milligan, P.J., Cowan, D.A., Hutt, A.J., 1999. Stereospecific analysis and enantiomeric disposition of 3, 4-methylenedioxymethamphetamine (Ecstasy) in humans. *Clin. Chem.* 45, 1058–1069.
- Fantegrossi, W.E., Ullrich, T., Rice, K.C., Woods, J.H., Winger, G., 2002. 3,4-Methylenedioxymethamphetamine (MDMA, "ecstasy") and its stereoisomers as reinforcers in rhesus monkeys: serotonergic involvement. *Psychopharmacology (Berl.)* 161, 356–364.
- Faull, R.L.M., Lavery, R., 1969. Changes in dopamine levels in the corpus striatum following lesions in the substantia nigra. *Exp. Neurol.* 23, 332–340. doi:10.1016/0014-4886(69)90081-8
- Filip, M., Frankowska, M., Zaniewska, M., Gołda, A., Przegaliński, E., 2005. The serotonergic system and its role in cocaine addiction. *Pharmacol. Rep. PR* 57, 685–700.
- Frank, M.J., 2005. Dynamic dopamine modulation in the basal ganglia: a neurocomputational account of cognitive deficits in medicated and nonmedicated Parkinsonism. *J. Cogn. Neurosci.* 17, 51–72.
- Frank, M.J., Scheres, A., Sherman, S.J., 2007. Understanding decision-making deficits in neurological conditions: insights from models of natural action selection. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* 362, 1641–1654
- Freudenmann, R.W., Öxler, F., Bernschneider-Reif, S., 2006. The origin of MDMA (ecstasy) revisited: the true story reconstructed from the original documents. *Addiction* 101, 1241–1245.
- Fuller, R.W., 1978. STRUCTURE-ACTIVITY RELATIONSHIPS AMONG THE HALOGENATED AMPHETAMINES. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*
- Fuller, R.W., 1975. COMPARISON OF 4-CHLORO-, 4-BROMO- AND 4-FLUOROAMPHETAMINE IN RATS: DRUG LEVELS IN BRAIN AND EFFECTS ON BRAIN SEROTONIN METABOLISM. *Newopharmacology.*

## 7. Literaturverzeichnis

- García-García, L., Delgado, M., Al-Sayed, A.A., Bascuñana, P., Fernández de la Rosa, R., Bermejo-Bescós, P., Martín-Aragón, S., Pozo, M.A., 2015. In vivo [<sup>18</sup>F] FDG PET imaging reveals that p-chloroamphetamine neurotoxicity is associated with long-term cortical and hippocampal hypometabolism. *Mol. Imaging Biol. MIB Off. Publ. Acad. Mol. Imaging* 17, 239–247.
- Gasser, T., Hardy, J., Mizuno, Y., 2011. Milestones in PD genetics. *Mov. Disord. Off. J. Mov. Disord. Soc.* 26, 1042–1048.
- Glennon, R.A., 1999. Arylalkylamine drugs of abuse: an overview of drug discrimination studies. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 64, 251–256.
- Glennon, R.A., Young, R., 2000. MDMA stimulus generalization to the 5-HT(1A) serotonin agonist 8-hydroxy-2-(di-n-propylamino)tetralin. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 66, 483–488.
- Grießinger, Christoph, 2008. Entstehung und Therapie von L-DOPA induzierten Dyskinesien in hemiparkinsonoiden Ratten. Tübingen.
- Gurney, K., Prescott, T.J., Redgrave, P., 2001. A computational model of action selection in the basal ganglia. I. A new functional anatomy. *Biol. Cybern.* 84, 401–410.
- Haber, S.N., Deniau, J.-M., Groenewegen, H.J., O'Donnell, P., McGinty, J.F., Baunez, C., 2005. The Ventral/Dorsal Divide: To Integrate or Separate, in: Bolam, J.P., Ingham, C.A., Magill, P.J. (Eds.), *The Basal Ganglia VIII, Advances in Behavioral Biology*. Springer US, pp. 437–456.
- Hague, S.M., 2005. Neurodegenerative disorders: Parkinson's disease and Huntington's disease. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 76, 1058–1063.
- Heal, D.J., Smith, S.L., Gosden, J., Nutt, D.J., 2013. Amphetamine, past and present—a pharmacological and clinical perspective. *J. Psychopharmacol. (Oxf.)* 27, 479–496.
- Heffner, T.G., Hartman, J.A., Seiden, L.S., 1980. A rapid method for the regional dissection of the rat brain. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 13, 453–456.
- Hiramatsu, M., DiStefano, E., Chang, A.S., Cho, A.K., 1991. A pharmacokinetic analysis of 3,4-methylenedioxymethamphetamine effects on monoamine concentrations in brain dialysates. *Eur. J. Pharmacol.* 204, 135–140.
- Hornykiewicz, O., 2010. A brief history of levodopa. *J. Neurol.* 257, S249–252.
- Hornykiewicz, O., 1998. Biochemical aspects of Parkinson's disease. *Neurology* 51, S2–9.
- Hoyer, D., Hannon, J.P., Martin, G.R., 2002. Molecular, pharmacological and functional diversity of 5-HT receptors. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 71, 533–554.
- Huot, P., 2011. Anatomically Selective Serotonergic Type 1A and Serotonergic Type 2A Therapies



## 7. Literaturverzeichnis

for Parkinson's Disease: An Approach to Reducing Dyskinesia without Exacerbating Parkinsonism? *J. Pharmacol. Exp. Ther.*

Huot, P., Fox, S.H., Brotchie, J.M., 2015. Monoamine Reuptake Inhibitors in Parkinson's Disease. *Park. Dis.* 2015, 1–71.

Hupbach, A., Hardt, O., Gomez, R., Nadel, L., 2008. The dynamics of memory: Context-dependent updating. *Learn. Mem.* 15, 574–579.

Hutchison, W.D., 2004. Neuronal Oscillations in the Basal Ganglia and Movement Disorders: Evidence from Whole Animal and Human Recordings. *J. Neurosci.* 24, 9240–9243.

Hutchison, W.D., Lozano, A.M., Tasker, R.R., Lang, A.E., Dostrovsky, J.O., 1997. Identification and characterization of neurons with tremor-frequency activity in human globus pallidus. *Exp. Brain Res.* 113, 557–563.

Iravani, M.M., Jackson, M.J., Kuoppamäki, M., Smith, L.A., Jenner, P., 2003. 3, 4-methylenedioxymethamphetamine (ecstasy) inhibits dyskinesia expression and normalizes motor activity in 1-methyl-4-phenyl-1, 2, 3, 6-tetrahydropyridine-treated primates. *J. Neurosci.* 23, 9107–9115.

Itzhak, Y., Achat-Mendes, C., 2004. Methamphetamine and MDMA (Ecstasy) Neurotoxicity: “of Mice and Men.” *IUBMB Life Int. Union Biochem. Mol. Biol. Life* 56, 249–255.

Iversen, L., 2008. Speed, Ecstasy, Ritalin. Amphetamine - Theorie und Praxis, 1st ed. Huber, Bern, Bern.

Jankovic, J., 2008. Parkinson's disease: clinical features and diagnosis. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 79, 368–376.

Jellinger, K.A., Seppi, K., Wenning, G.K., Poewe, W., 2002. Impact of coexistent Alzheimer pathology on the natural history of Parkinson's disease. *J. Neural Transm. Vienna Austria* 1996 109, 329–339.

Jerome, I., 2008. MDMA and Parkinson's: Lots of Research, Few Practical Answers.

Johnson, M.P., Hoffman, A.J., Nichols, D.E., 1986. Effects of the enantiomers of MDA, MDMA and related analogues on [3H]serotonin and [3H]dopamine release from superfused rat brain slices. *Eur. J. Pharmacol.* 132, 269–276.

Johnston, T.H., Millar, Z., Huot, P., Wagg, K., Thiele, S., Salomonczyk, D., Yong-Kee, C.J., Gandy, M.N., McIlldowie, M., Lewis, K.D., Gomez-Ramirez, J., Lee, J., Fox, S.H., Martin-Iverson, M., Nash, J.E., Piggott, M.J., Brotchie, J.M., 2012. A novel MDMA analogue, UWA-101, that lacks psychoactivity and cytotoxicity, enhances L-DOPA benefit in parkinsonian primates. *FASEB J.* 26, 2154–2163.

Jones, D.C., 2004. Serotonergic Neurotoxic Metabolites of Ecstasy Identified in Rat Brain. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 313, 422–431.

## 7. Literaturverzeichnis

- Joyce, B.M., Glaser, P.E.A., Gerhardt, G.A., 2006. Adderall® produces increased striatal dopamine release and a prolonged time course compared to amphetamine isomers. *Psychopharmacology (Berl.)* 191, 669–677.
- Kalivas, P.W., Duffy, P., White, S.R., 1998. MDMA elicits behavioral and neurochemical sensitization in rats. *Neuropsychopharmacology* 18, 469–479.
- Kapur, S., VanderSpek, S.C., Brownlee, B.A., Nobrega, J.N., 2003. Antipsychotic dosing in preclinical models is often unrepresentative of the clinical condition: a suggested solution based on in vivo occupancy. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 305, 625–631.
- Kelsey, J.E., Mague, S.D., Pijanowski, R.S., Harris, R.C., Kleckner, N.W., Matthews, R.T., 2004. NMDA receptor antagonists ameliorate the stepping deficits produced by unilateral medial forebrain bundle injections of 6-OHDA in rats. *Psychopharmacology (Berl.)* 175, 179–188.
- Kempster, P.A., Hurwitz, B., Lees, A.J., 2007. A new look at James Parkinson's Essay on the Shaking Palsy. *Neurology* 69, 482–485.
- Kirik, D., Rosenblad, C., Björklund, A., 1998. Characterization of behavioral and neurodegenerative changes following partial lesions of the nigrostriatal dopamine system induced by intrastriatal 6-hydroxydopamine in the rat. *Exp. Neurol.* 152, 259–277.
- Kitani, K., Kanai, S., Miyasaka, K., Carrillo, M.C., Ivy, G.O., 2006. The necessity of having a proper dose of (-)deprenyl (D) to prolong the life spans of rats explains discrepancies among different studies in the past. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1067, 375–382.
- Klein, A., Schmidt, W.J., 2003. Catalepsy intensifies context-dependently irrespective of whether it is induced by intermittent or chronic dopamine deficiency. *Behav. Pharmacol.* 14, 49–53.
- Klemm, W.R., 1989. Drug effects on active immobility responses: what they tell us about neurotransmitter systems and motor functions. *Prog. Neurobiol.* 32, 403–422.
- Knoll, J., Tóth, V., Kummert, M., Sugár, J., 1992. (-)deprenyl and (-)parafluorodeprenyl-treatment prevents age-related pigment changes in the substantia nigra. A TV-image analysis of neuromelanin. *Mech. Ageing Dev.* 63, 157–163.
- Kovács, G.G., Andó, R.D., Adori, C., Kirilly, E., Benedek, A., Palkovits, M., Bagdy, G., 2007. Single dose of MDMA causes extensive decrement of serotonergic fibre density without blockage of the fast axonal transport in Dark Agouti rat brain and spinal cord. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* 33, 193–203.
- Kreitzer, A.C., Malenka, R.C., 2008. Striatal Plasticity and Basal Ganglia Circuit Function. *Neuron* 60, 543–554.
- Kreth, K., Kovar, K., Schwab, M., Zanger, U.M., 2000. Identification of the human cytochromes P450 involved in the oxidative metabolism of "Ecstasy"-related designer drugs. *Biochem. Pharmacol.* 59, 1563–1571.

## 7. Literaturverzeichnis

- Kuschinsky, K., Hornykiewicz, O., 1972. Morphine catalepsy in the rat: relation to striatal dopamine metabolism. *Eur. J. Pharmacol.* 19, 119–122.
- Kutscher, C.L., Yamamoto, B.K., 1979. A frequency analysis of behavior components of the serotonin syndrome produced by p-chloroamphetamine. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 11, 611–616.
- Lanfumey, L., Hamon, M., 2004. 5-HT1 receptors. *Curr. Drug Targets CNS Neurol. Disord.* 3, 1–10.
- Lauks, J., Schmidt, W.J., 2006. P15 the effect of mdma and mde on l-dopa-induced dyskinesia in parkinsonian rats, *Behavioural Pharmacology*
- Lavoie, B., Parent, A., 1990. Immunohistochemical study of the serotonergic innervation of the basal ganglia in the squirrel monkey. *J. Comp. Neurol.* 299, 1–16.
- Lebsanft, H.B., Kohles, T., Kovar, K.-A., Schmidt, W.J., 2005. 3,4-Methylenedioxymethamphetamine counteracts akinesia enantioselectively in rat rotational behavior and catalepsy. *Synap. N. Y. N* 55, 148–155.
- Lebsanft, H.B., Mayerhofer, A., Kovar, K.-A., Schmidt, W.J., 2003. Is the Ecstasy-induced ipsilateral rotation in 6-hydroxydopamine unilaterally lesioned rats dopamine independent? *J. Neural Transm. Vienna Austria* 1996 110, 707–718.
- Lettfuss, N.Y., Fischer, K., Sossi, V., Pichler, B.J., von Ameln-Mayerhofer, A., 2012. Imaging DA release in a rat model of L-DOPA-induced dyskinesias: a longitudinal in vivo PET investigation of the antidyskinetic effect of MDMA. *NeuroImage* 63, 423–433.
- Lettfuss, N.Y., Seeger-Armbruster, S., von Ameln-Mayerhofer, A., 2013. Is behavioral sensitization to 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA) mediated in part by cholinergic receptors? *Behav. Brain Res.* 244, 116–119.
- Lozano, A.M., Kalia, S.K., 2005. New movement in Parkinson's. *Sci. Am.* 293, 68–75.
- Lucas, G., Bonhomme, N., De Deurwaerdère, P., Le Moal, M., Spampinato, U., 1997. 8-OH-DPAT, a 5-HT1A agonist and ritanserin, a 5-HT2A/C antagonist, reverse haloperidol-induced catalepsy in rats independently of striatal dopamine release. *Psychopharmacology (Berl.)* 131, 57–63.
- Lyon, R.A., Glennon, R.A., Titeler, M., 1986. 3,4-Methylenedioxymethamphetamine (MDMA): stereoselective interactions at brain 5-HT1 and 5-HT2 receptors. *Psychopharmacology (Berl.)* 88, 525–526.
- Malberg, J.E., Seiden, L.S., 1998. Small changes in ambient temperature cause large changes in 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA)-induced serotonin neurotoxicity and core body temperature in the rat. *J. Neurosci.* 18, 5086–5094.
- Malpass, A., White, J.M., Irvine, R.J., Somogyi, A.A., Bochner, F., 1999. Acute toxicity of 3,4-

## 7. Literaturverzeichnis

- methylenedioxyamphetamine (MDMA) in Sprague-Dawley and Dark Agouti rats. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 64, 29–34.
- Mandel, S., Weinreb, O., Amit, T., Youdim, M.B.H., 2005. Mechanism of neuroprotective action of the anti-Parkinson drug rasagiline and its derivatives. *Brain Res. Brain Res. Rev.* 48, 379–
- Margolis, J., 2001. Ecstasy's Dividend. *N. Y. Times*.
- Marona-Lewicka, D., Rhee, G.S., Sprague, J.E., Nichols, D.E., 1995. Psychostimulant-like effects of p-fluoroamphetamine in the rat. *Eur. J. Pharmacol.* 287, 105–113.
- Maycock, A.L., Abeles, R.H., Salach, J.I., Singer, T.P., 1976. The structure of the covalent adduct formed by the interaction of 3-dimethylamino-1-propyne and the flavine of mitochondrial amine oxidase. *Biochemistry (Mosc.)* 15, 114–125.
- Mayerhofer, A., Kovar, K.A., Schmidt, W.J., 2001. Changes in serotonin, dopamine and noradrenaline levels in striatum and nucleus accumbens after repeated administration of the abused drug MDMA in rats. *Neurosci. Lett.* 308, 99–102.
- Mayeux, R., 2003. Epidemiology of neurodegeneration. *Annu. Rev. Neurosci.* 26, 81–104.
- Meredith, G.E., Kang, U.J., 2006. Behavioral models of Parkinson's disease in rodents: a new look at an old problem. *Mov. Disord. Off. J. Mov. Disord. Soc.* 21, 1595–1606.
- Meyer, A., Mayerhofer, A., Kovar, K.-A., Schmidt, W.J., 2002a. Enantioselective metabolism of the designer drugs 3,4-methylenedioxyamphetamine ("ecstasy") and 3,4-methylenedioxyethylamphetamine ("eve") isomers in rat brain and blood. *Neurosci. Lett.* 330, 193–197.
- Meyer, A., Mayerhofer, A., Kovar, K.-A., Schmidt, W.J., 2002b. Rewarding effects of the optical isomers of 3,4-methylenedioxy-methylamphetamine ('Ecstasy') and 3,4-methylenedioxyethylamphetamine ('Eve') measured by conditioned place preference in rats. *Neurosci. Lett.* 330, 280–284.
- Meyer, Anja, 2002. Platzpräferenz und Metabolismus von Enantiomeren der Party-Drogen MDMA und MDE bei der Ratte. Tübingen.
- Meyer, M.R., Maurer, H.H., 2009. Enantioselectivity in the methylation of the catecholic phase I metabolites of methylenedioxy designer drugs and their capability to inhibit catechol-O-methyltransferase-catalyzed dopamine 3-methylation. *Chem. Res. Toxicol.* 22, 1205–1211.
- Mignon, L., Wolf, W.A., 2002. Postsynaptic 5-HT1A receptors mediate an increase in locomotor activity in the monoamine-depleted rat. *Psychopharmacology (Berl.)* 163, 85–94.
- Mihm, M.J., Schanbacher, B.L., Wallace, B.L., Wallace, L.J., Uretsky, N.J., Bauer, J.A., 2001. Free 3-nitrotyrosine causes striatal neurodegeneration in vivo. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 21, RC149.

## 7. Literaturverzeichnis

- Miklya, I., 2014. Essential difference between the pharmacological spectrum of (-)-deprenyl and rasagiline. *Pharmacol. Rep.* 66, 453–458.
- Mink, J.W., Thach, W.T., 1993. Basal ganglia intrinsic circuits and their role in behavior. *Curr. Opin. Neurobiol.* 3, 950–957.
- Missale, C., Fiorentini, C., Collo, G., Spano, P., 2010. The neurobiology of dopamine receptors: evolution from the dual concept to heterodimer complexes. *J. Recept. Signal Transduct. Res.* 30, 347–354
- Mlinar, B., Corradetti, R., 2003. Endogenous 5-HT, released by MDMA through serotonin transporter- and secretory vesicle-dependent mechanisms, reduces hippocampal excitatory synaptic transmission by preferential activation of 5-HT<sub>1B</sub> receptors located on CA1 pyramidal neurons. *Eur. J. Neurosci.* 18, 1559–1571.
- Muñoz, A., Li, Q., Gardoni, F., Marcello, E., Qin, C., Carlsson, T., Kirik, D., Di Luca, M., Björklund, A., Bezard, E., Carta, M., 2008. Combined 5-HT<sub>1A</sub> and 5-HT<sub>1B</sub> receptor agonists for the treatment of L-DOPA-induced dyskinesia. *Brain J. Neurol.* 131, 3380–3394.
- Murnane, K.S., Murai, N., Howell, L.L., Fantegrossi, W.E., 2009. Discriminative Stimulus Effects of Psychostimulants and Hallucinogens in S(+)-3,4-Methylenedioxymethamphetamine (MDMA) and R(-)-MDMA Trained Mice. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 331, 717–723.
- Murphy, D.L., Lerner, A., Rudnick, G., Lesch, K.-P., 2004. Serotonin transporter: gene, genetic disorders, and pharmacogenetics. *Mol. Interv.* 4, 109–123.
- Myllylä, V.V., Sotaniemi, K.A., Hakulinen, P., Mäki-Ikola, O., Heinonen, E.H., 1997. Selegiline as the primary treatment of Parkinson's disease--a long-term double-blind study. *Acta Neurol. Scand.* 95, 211–218.
- Mytilineou, C., Leonardi, E.K., Radcliffe, P., Heinonen, E.H., Han, S.-K., Werner, P., Cohen, G., Olanow, C.W., 1998. Deprenyl and desmethylselegiline protect mesencephalic neurons from toxicity induced by glutathione depletion. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 284, 700–706.
- Nash, J.F., Nichols, D.E., 1991. Microdialysis studies on 3,4-methylenedioxyamphetamine and structurally related analogues. *Eur. J. Pharmacol.* 200, 53–58.
- Nash, J.F., Yamamoto, B.K., 1992. Methamphetamine neurotoxicity and striatal glutamate release: comparison to 3,4-methylenedioxyamphetamine. *Brain Res.* 581, 237–243.
- Navailles, S., De Deurwaerdère, P., 2012. Imbalanced Dopaminergic Transmission Mediated by Serotonergic Neurons in L-DOPA-Induced Dyskinesia. *Park. Dis.* 2012, 1–16.
- Nichols, D.E., 1986. Differences between the mechanism of action of MDMA, MBDB, and the classic hallucinogens. Identification of a new therapeutic class: entactogens. *J. Psychoactive Drugs* 18, 305–313
- Nichols, D.E., Lloyd, D.H., Hoffman, A.J., Nichols, M.B., Yim, G.K., 1982. Effects of certain

## 7. Literaturverzeichnis

hallucinogenic amphetamine analogues on the release of [3H]serotonin from rat brain synaptosomes. *J. Med. Chem.* 25, 530–535.

- Nicholson, S.L., Brotchie, J.M., 2002. 5-hydroxytryptamine (5-HT, serotonin) and Parkinson's disease - opportunities for novel therapeutics to reduce the problems of levodopa therapy. *Eur. J. Neurol. Off. J. Eur. Fed. Neurol. Soc.* 9 Suppl 3, 1–6.
- Obeso, J.A., Rodriguez-Oroz, M.C., Rodriguez, M., Macias, R., Alvarez, L., Guridi, J., Vitek, J., DeLong, M.R., 2000. Pathophysiologic basis of surgery for Parkinson's disease. *Neurology* 55, S7–12.
- O'hearn, E., Battaglia, G., De Souza, E.B., Kuhar, M.J., Molliver, M.E., 1988. Methylenedioxyamphetamine (MDA) and methylenedioxymethamphetamine (MDMA) cause selective ablation of serotonergic axon terminals in forebrain: immunocytochemical evidence for neurotoxicity. *J. Neurosci.* 8, 2788–2803.
- Olanow, C.W., Stern, M.B., Sethi, K., 2009. The scientific and clinical basis for the treatment of Parkinson disease (2009). *Neurology* 72, S1–136.
- Olsson, M., Nikkhah, G., Bentlage, C., Bjorklund, A., 1995. Forelimb akinesia in the rat Parkinson model: differential effects of dopamine agonists and nigral transplants as assessed by a new stepping test. *J. Neurosci.* 15, 3863–3875.
- Paris, J.M., Cunningham, K.A., 1992. Lack of serotonin neurotoxicity after intraraphe microinjection of (+)-3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA). *Brain Res. Bull.* 28, 115–119.
- Parkinson, J., 2002. An essay on the shaking palsy. 1817. *J. Neuropsychiatry Clin. Neurosci.* 14, 223–236; discussion 222.
- Paxinos, G., Watson, C., 1998. *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*. Academic Press.
- Penney, J.B., Young, A.B., 1983. Speculations on the functional anatomy of basal ganglia disorders. *Annu. Rev. Neurosci.* 6, 73–94.
- Pennick, M., 2010. Absorption of lisdexamfetamine dimesylate and its enzymatic conversion to d-amphetamine. *Neuropsychiatr. Dis. Treat.* 6, 317.
- Playfer, J.R., 1997. Parkinson's disease. *Postgrad. Med. J.* 73, 257–264.
- Przedbroski, S., Leviver, M., Jiang, H., Ferreira, M., Jackson-Lewis, V., Donaldson, D., Togasaki, D.M., 1995. Dose-dependent lesions of the dopaminergic nigrostriatal pathway induced by intrastriatal injection of 6-hydroxydopamine. *Neuroscience* 67, 631–647.
- Putzke, J., Spina, M.G., Büchler, J., Kovar, K.-A., Wolf, G., Smalla, K.-H., 2007. The effects of p-chloroamphetamine, methamphetamine and 3,4-methylenedioxymethamphetamine (ecstasy) on the gene expression of cytoskeletal proteins in the rat brain. *Addict. Biol.* 12, 69–80.

## 7. Literaturverzeichnis

- Quick, M.W., 1997. Structure, function and regulation of the 5-hydroxytryptamine (serotonin) transporter. *Nat. Lond.* 390, 302–305.
- Riederer, P., Gerlach, M., Müller, T., Reichmann, H., 2007. Relating mode of action to clinical practice: dopaminergic agents in Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat. Disord.* 13, 466–479.
- Riedinger, Katrin, 2014. Neuropharmakologische und anatomische Untersuchungen zu Lernprozessen der Katalepsie-Sensitivierung. Tübingen.
- Riegel, Christin, 2011. Wirkung von MDFPPA in Verhaltens- Mikrodialyse- Experimenten im 6-OHDA- Hemiparkinson- Modell der Ratte. Tübingen.
- Rigby, S.E., Basran, J., Combe, J.P., Mohsen, A.W., Toogood, H., van Thiel, A., Sutcliffe, M.J., Leys, D., Munro, A.W., Scrutton, N.S., 2005. Flavoenzyme catalysed oxidation of amines: roles for flavin and protein-based radicals. *Biochem. Soc. Trans.* 33, 754–757.
- Robottom, B., 2011. Efficacy, safety, and patient preference of monoamine oxidase B inhibitors in the treatment of Parkinsons disease. *Patient Prefer. Adherence* 57.
- Roth, G., Dicke, U., 2006. Funktionelle Neuroanatomie des limbischen Systems, in: Förstl, P.D. med H., Hautzinger, P.D.D.-P.M., Roth, P.D. phil D. rer nat G. (Eds.), *Neurobiologie psychischer Störungen*. Springer Berlin Heidelberg, pp. 1–74.
- Rothman, R.B., Jayanthi, S., Cadet, J.L., Wang, X., Dersch, C.M., Baumann, M.H., 2004. Substituted amphetamines that produce long-term serotonin depletion in rat brain (“neurotoxicity”) do not decrease serotonin transporter protein expression. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1025, 151–161.
- Rudnick, G., Wall, S.C., 1992. The molecular mechanism of“ ecstasy”[3, 4-methylenedioxy-methamphetamine (MDMA)]: serotonin transporters are targets for MDMA-induced serotonin release. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 89, 1817–1821.
- Sachs, C., Jonsson, G., 1975. Mechanisms of action of 6-hydroxydopamine. *Biochem. Pharmacol.* 24, 1–8.
- Sanberg, C.D., Jones, F.L., Do, V.H., Dieguez, D., Derrick, B.E., 2006. 5-HT1a receptor antagonists block perforant path-dentate LTP induced in novel, but not familiar, environments. *Learn. Mem.* 13, 52–62.
- Sanberg, P.R., 1980. Haloperidol-induced catalepsy is mediated by postsynaptic dopamine receptors. *Nature* 284, 472–473.
- Sanberg, P.R., Bunsey, M.D., Giordano, M., Norman, A.B., 1988. The catalepsy test: its ups and downs. *Behav. Neurosci.* 102, 748–759.
- Sanchez, V., Camarero, J., Esteban, B., Peter, M.J., Green, A.R., Colado, M.I., 2001. The mechanisms involved in the long-lasting neuroprotective effect of fluoxetine against MDMA

## 7. Literaturverzeichnis

- ('ecstasy')-induced degeneration of 5-HT nerve endings in rat brain. *Br. J. Pharmacol.* 134, 46–57.
- Santana, N., Bortolozzi, A., Serrats, J., Mengod, G., Artigas, F., 2004. Expression of serotonin1A and serotonin2A receptors in pyramidal and GABAergic neurons of the rat prefrontal cortex. *Cereb. Cortex N. Y. N 1991* 14, 1100–1109.
- Schapira, A.H., Jenner, P., 2011. Etiology and pathogenesis of Parkinson's disease. *Mov. Disord. Off. J. Mov. Disord. Soc.* 26, 1049–1055.
- Schechter, M.D., 1997. Discrete versus cumulative dosing in dose–response discrimination studies. *Eur. J. Pharmacol.* 326, 113–118.
- Schmidt, C.J., 1987. Neurotoxicity of the psychedelic amphetamine, methylenedioxymethamphetamine. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 240, 1–7.
- Schmidt, C.J., Black, C.K., Taylor, V.L., 1990. Antagonism of the neurotoxicity due to a single administration of methylenedioxymethamphetamine. *Eur. J. Pharmacol.* 181, 59–70.
- Schmidt, C.J., Sullivan, C.K., Fadayel, G.M., 1994. Blockade of striatal 5-hydroxytryptamine2 receptors reduces the increase in extracellular concentrations of dopamine produced by the amphetamine analogue 3,4-methylenedioxymethamphetamine. *J. Neurochem.* 62, 1382–1389.
- Schmidt, W.J., 2005. Dopamine and Glutamate in Motor and Cognitive Symptoms of Parkinson's Disease, in: Schmidt, W.J., Reith, M.E.A. (Eds.), *Dopamine and Glutamate in Psychiatric Disorders*. Humana Press, pp. 523–535.
- Schmidt W.J., 2000. Zur Verhaltensbiologie der Parkinson-Krankheit., in: *Neuroforum* 3:229–234.
- Schmidt, W.J., 1998. Dopamine-glutamate interactions in the basal ganglia. *Amino Acids* 14, 5–10.
- Schmidt, W.J., Beninger, R.J., 2006. Behavioural sensitization in addiction, schizophrenia, Parkinson's disease and dyskinesia. *Neurotox. Res.* 10, 161–166.
- Schmidt, W.J., Mayerhofer, A., Meyer, A., Kovar, K.-A., 2002. Ecstasy counteracts catalepsy in rats, an anti-parkinsonian effect? *Neurosci. Lett.* 330, 251–254.
- Schmidt, W.J., Tzschentke, T.M., Kretschmer, B.D., 1999. State-dependent blockade of haloperidol-induced sensitization of catalepsy by MK-801. *Eur. J. Neurosci.* 11, 3365–3368.
- Schwartz, R.K., Huston, J.P., 1996. Unilateral 6-hydroxydopamine lesions of meso-striatal dopamine neurons and their physiological sequelae. *Prog. Neurobiol.* 49, 215–266.
- Shannak, K., Rajput, A., Rozdilsky, B., Kish, S., Gilbert, J., Hornykiewicz, O., 1994. Noradrenaline, dopamine and serotonin levels and metabolism in the human hypothalamus: observations in Parkinson's disease and normal subjects. *Brain Res.* 639, 33–41.



## 7. Literaturverzeichnis

- Shulgin, A.T., 1986. The Background and Chemistry of MDMA. *J. Psychoactive Drugs* 18, 291–304.
- Singh, R.A.K., Kosten, T.A., Kinsey, B.M., Shen, X., Lopez, A.Y., Kosten, T.R., Orson, F.M., 2012. Dose-dependent changes in the locomotor responses to methamphetamine in BALB/c mice: Low doses induce hypolocomotion. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 103, 230–236.
- Smart, B.E., 2001. Fluorine substituent effects (on bioactivity). *J. Fluor. Chem., Fluorinated Bioactive Compounds* 109, 3–11.
- Smith, Y., Bevan, M.D., Shink, E., Bolam, J.P., 1998. Microcircuitry of the direct and indirect pathways of the basal ganglia. *Neuroscience* 86, 353–387.
- Sossi, V., Dinelle, K., Topping, G.J., Holden, J.E., Doudet, D., Schulzer, M., Ruth, T.J., Stoessl, A.J., de la Fuente-Fernandez, R., 2009. Dopamine transporter relation to levodopa-derived synaptic dopamine in a rat model of Parkinson's: an *in vivo* imaging study. *J. Neurochem.* 109, 85–92.
- Sotnikova, T.D., Beaulieu, J.-M., Barak, L.S., Wetsel, W.C., Caron, M.G., Gainetdinov, R.R., 2005. Dopamine-Independent Locomotor Actions of Amphetamines in a Novel Acute Mouse Model of Parkinson Disease. *PLoS Biol.* 3, e271.
- Spanos, L.J., Yamamoto, B.K., 1989. Acute and subchronic effects of methylenedioxymethamphetamine [(+/-)MDMA] on locomotion and serotonin syndrome behavior in the rat. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 32, 835–840.
- Sprague, J.E., Everman, S.L., Nichols, D.E., 1998. An integrated hypothesis for the serotonergic axonal loss induced by 3,4-methylenedioxymethamphetamine. *Neurotoxicology* 19, 427–441.
- Srinivasan, J., Schmidt, W.J., 2004. Intensification of cataleptic response in 6-hydroxydopamine-induced neurodegeneration of substantia nigra is not dependent on the degree of dopamine depletion. *Synapse* 51, 213–218.
- Steele, T.D., Nichols, D.E., Yim, G.K., 1987. Stereochemical effects of 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA) and related amphetamine derivatives on inhibition of uptake of [3H]monoamines into synaptosomes from different regions of rat brain. *Biochem. Pharmacol.* 36, 2297–2303.
- Stocchi, F., 2006. The levodopa wearing-off phenomenon in Parkinson's disease: pharmacokinetic considerations. *Expert Opin. Pharmacother.* 7, 1399–1407.
- Sulzer, D., Sonders, M.S., Poulsen, N.W., Galli, A., 2005. Mechanisms of neurotransmitter release by amphetamines: A review. *Prog. Neurobiol.* 75, 406–433.
- Takahata, K., Shimazu, S., Katsuki, H., Yoneda, F., Akaike, A., 2006. Effects of selegiline on antioxidant systems in the nigrostriatum in rat. *J. Neural Transm. Vienna Austria* 1996 113, 151–158.

## 7. Literaturverzeichnis

- Terleckyj, I.A., Heikkila, R.E., 1992. In vivo and in vitro pharmacologic profile of two new irreversible MAO-B inhibitors: MDL 72,974A and fluorodeprenyl. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 648, 365–367.
- Teufel, Björn, 2012. Von Aminosäuren und Benzolderivaten via Friedel-Crafts-Acylierung zu chiralen Aminoketonen, Aminoalkoholen und Aminen. Universität Tübingen.
- Tillerson, J.L., Cohen, A.D., Philhower, J., Miller, G.W., Zigmond, M.J., Schallert, T., 2001. Forced limb-use effects on the behavioral and neurochemical effects of 6-hydroxydopamine. *J. Neurosci.* 21, 4427–4435.
- Tímár, J., Knoll, B., Knoll, J., 1992. (-)Deprenyl (selegiline) is devoid of amphetamine-like behavioural effects in rats. *Acta Physiol. Hung.* 79, 131–137.
- Tim Fieblinger, 2008. Elektrophysiologische und verhaltenspharmakologische Untersuchungen zur Beteiligung der 5-HT1A-, 5-HT4-, 5-HT6- und 5-HT7- Rezeptoren in Tiermodellen des Morbus Parkinson. Tübingen.
- Tipton, K.F., Singer, T.P., 1993. Advances in our understanding of the mechanisms of the neurotoxicity of MPTP and related compounds. *J. Neurochem.* 61, 1191–1206.
- Ungerstedt, U., 1971. Postsynaptic Supersensitivity after 6-Hydroxy-dopamine Induced Degeneration of the Nigro-striatal Dopamine System. *Acta Physiol. Scand.* 82, 69–93.
- Ungerstedt, U., 1968. 6-hydroxy-dopamine induced degeneration of central monoamine neurons. *Eur. J. Pharmacol.* 5, 107–110.
- Van der Schoot, J., Ariens, E.J., van ROSSUM, J., Hurkmans, J.A., 1962. Phenylisopropylamine derivatives, structure and action. *Arzneimittelforschung.* 12, 902–907.
- Verrico, C.D., Miller, G.M., Madras, B.K., 2006. MDMA (Ecstasy) and human dopamine, norepinephrine, and serotonin transporters: implications for MDMA-induced neurotoxicity and treatment. *Psychopharmacology (Berl.)* 189, 489–503.
- Von Ameln, N., von Ameln-Mayerhofer, A., 2010. Atypical development of behavioural sensitization to 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA, “Ecstasy”) in adolescent rats and its expression in adulthood: role of the MDMA chirality. *Addict. Biol.* 15, 35–44.
- Wallace, T.L., Gudelsky, G.A., Vorhees, C.V., 1999. Methamphetamine-induced neurotoxicity alters locomotor activity, stereotypic behavior, and stimulated dopamine release in the rat. *J. Neurosci.* 19, 9141–9148.
- Walther, D.J., Peter, J.-U., Bashammakh, S., Hörtnagl, H., Voits, M., Fink, H., Bader, M., 2003. Synthesis of serotonin by a second tryptophan hydroxylase isoform. *Science* 299, 76.
- Waters, C.H., 1994. Fluoxetine and selegiline--lack of significant interaction. *Can. J. Neurol. Sci. J. Can. Sci. Neurol.* 21, 259–261.

## 7. Literaturverzeichnis

- Wiecki, T.V., Frank, M.J., 2010. Neurocomputational models of motor and cognitive deficits in Parkinson's disease. *Prog. Brain Res.* 183, 275–297.
- Wiecki, T.V., Riedinger, K., von Ameln-Mayerhofer, A., Schmidt, W.J., Frank, M.J., 2009. A neurocomputational account of catalepsy sensitization induced by D2 receptor blockade in rats: context dependency, extinction, and renewal. *Psychopharmacology (Berl.)* 204, 265–277.
- Wright, D.E., Seroogy, K.B., Lundgren, K.H., Davis, B.M., Jennes, L., 1995. Comparative localization of serotonin1A, 1C, and 2 receptor subtype mRNAs in rat brain. *J. Comp. Neurol.* 351, 357–373.
- Yamamoto, B.K., Nash, J.F., Gudelsky, G.A., 1995. Modulation of methylenedioxymethamphetamine-induced striatal dopamine release by the interaction between serotonin and gamma-aminobutyric acid in the substantia nigra. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 273, 1063–1070.
- Yasar, S., 2005. Metabolic Transformation Plays a Primary Role in the Psychostimulant-Like Discriminative-Stimulus Effects of Selegiline [(R)-(-)-Deprenyl]. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 317, 387–394
- Yasumoto, S., Tamura, K., Karasawa, J., Hasegawa, R., Ikeda, K., Yamamoto, T., Yamamoto, H., 2009. Inhibitory effect of selective serotonin reuptake inhibitors on the vesicular monoamine transporter 2. *Neurosci. Lett.* 454, 229–232.
- Yates, J.W., Meij, J.T., Sullivan, J.R., Richtand, N.M., Yu, L., 2007. Bimodal effect of amphetamine on motor behaviors in C57BL/6 mice. *Neurosci. Lett.* 427, 66–70.
- Youdim, M.B.H., Tipton, K.F., 2002. Rat striatal monoamine oxidase-B inhibition by l-deprenyl and rasagiline: its relationship to 2-phenylethylamine-induced stereotypy and Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat. Disord.* 8, 247–253.
- Yuan, J., Cord, B.J., McCann, U.D., Callahan, B.T., Ricaurte, G.A., 2002. Effect of depleting vesicular and cytoplasmic dopamine on methylenedioxymethamphetamine neurotoxicity. *J. Neurochem.* 80, 960–969.
- Zarrindast, M.-R., Rezayof, A., 2004. Morphine state-dependent learning: sensitization and interactions with dopamine receptors. *Eur. J. Pharmacol.* 497, 197–204.
- Zhang, W., Tilson, H., Stachowiak, M.K., Hong, J.S., 1989. Repeated haloperidol administration changes basal release of striatal dopamine and subsequent response to haloperidol challenge. *Brain Res.* 484, 389–392.