

Aluminiumhydroxid-Injektionen führen zu motorischen Störungen und Abbau von motorischen Neuronen

Christopher A. Shaw and Michael S. Petrik

Zusammenfassung

Das Golfkriegssyndrom (GWS) ist eine Multisystemerkrankung, das viele Veteranen der westlichen Armeen, die im Golfkrieg involviert waren von 1990-1991, betrifft. Etliche Betroffene zeigen neurologische Störungen inklusive viele kognitive Störungen und einer Motoneuronenkrankheit, wobei letztere ununterscheidbar ist von der klassischen Amyotrophen Lateralsklerose (ALS) ausser im Alter des Krankheitsausbruchs. Dieses ALS "Cluster" stellt die zweite von solchen ALS Clustern dar, das bis jetzt in der Literatur beschrieben wurde. Mögliche Gründe von GWS sind mehrere Hilfsmittel in Impfstoffen gegen Anthrax und anderes. Das meist verdächtigste scheint Aluminiumhydroxid zu sein. In einer ersten Serie von Experimenten, haben wir die potentielle Giftigkeit von Aluminiumhydroxid untersucht und es dazu in männlichen, ausgewachsenen CD-1 Mäusen unter die Haut injiziert in zwei Dosen äquivalent für Menschen. Nach der Opferung wurde das Rückenmark und der Motorcortex immunohistochemisch untersucht. Aluminium behandelte Mäuse zeigten eine signifikant erhöhte Apoptose der Motoneuronen und eine Erhöhung von reaktiven Astrozyten und Vermehrung der Mikrogliazellen im Rückenmark als auch im Kortex. Mit Hilfe der Morin-Färbung wurde Aluminium im Cytoplasma der Motoneuronen festgestellt mit einigen davon positiv getestet für das hyperphosphorylierte tau Protein, einem pathologischen Merkmal von vielen neurologischen Krankheiten inklusive Alzheimer-Krankheit und Frontotemporaler Demenz. In einer zweiten Serie von Experimenten wurden Mäusen sechs Dosen von Aluminiumhydroxid injiziert. Untersuchungen des Verhaltens der Mäuse zeigten eine Anzahl von Störungen der motorischen Funktionen als auch verringerte Kapazität des räumlichen Gedächtnisses. Die demonstrierte Giftigkeit von Aluminiumhydroxid und dessen Allgegenwärtigkeit als Hilfsmittel legt nahe, dass eine grössere Untersuchung durch die wissenschaftliche Gemeinschaft gerechtfertigt ist.

1 Einführung

Verschiedenste Studien haben eine Korrelation zwischen dem Golfkriegseinsatz (1990-1991) und der Multisystemkrankheit gewöhnlich als Golfkriegssyndrom bezeichnet etabliert. Das GWS beinhaltet verschiedenste neurologische Störungen inklusive einem deutlichen Cluster von Fällen der Amyotrophen Lateralsklerose (1-4). Haley (3) beschreibt bei Golfkriegsveteranen klassische ALS Symptome wie Muskelschwäche und -schwund, beeinträchtigtetes Sprechen und Schlucken, Atemschwierigkeiten und Faszikulation Jahre nachdem sie zuerst an-

dere Symptome des GWS entwickelt haben. 17 von den 20 Dienstmännern diagnostiziert mit Golfkriegssyndrom und eindeutiger ALS waren weniger als 45 Jahre alt, wobei der Jüngste von ihnen 20 Jahre alt war. Alle 20 Patienten zeigten einen Abbau der oberen (Motorkortex oder bulbren Region) und unteren (Rückenmark) Motoneuronen. Keiner der Patienten hatte eine Familienvorgeschichte mit ALS oder anderen neurodegenerative Erkrankungen. Horner u.a. (2) führte eine landesweite Fallstudie durch um die Neuerkrankungen an ALS für das Jahrzehnt nach August 1990 unter aktiven Diensthabenden der Armee festzustellen. 107 Fälle von ALS wurden unter dem ungefähr 2,5 Millionen zählenden Militärpersonal identifiziert. Wenn standardisiert für die Durchschnittsbevölkerung der USA im Jahre 1990, beträgt die jährliche Neuerkrankung durch ALS unter nicht-eingesetztem Militärpersonal 1,4 pro 100000 Personen pro Jahr im Vergleich zu der generell akzeptierten Neuerkrankungsrate der Gesamtbevölkerung von 1,5 Fällen pro 100000 Personen. Die Neuerkrankungsrate durch ALS unter der im Militär eingesetzten Population war 3,6 pro 100000 Personen/Jahr. Weisskopf u.a. (4) beobachteten einen generellen Anstieg von ALS in der US Militärpopulation das für mehrere Jahrzehnte auftaucht.

ALS-GWS ist ein von nur zwei ALS Krankheitscluster, das gegenwärtig als Cluster akzeptiert wird. Der andere ist eine guamanische Variante von ALS erstmals beschrieben nach dem zweiten Weltkrieg genannt Amyotrophe Lateralsklerose Parkinsonsches Demenzkomplex (ALS-PDC). Dieses Spektrum vom Störungen mit einer Neuerkrankungsrate 100 Mal höher als in der kontinentalen USA (s. Kurland, 1988), erschien in zwei Formen. Die erste war fast wie die klassische Form der ALS; die zweite war eine Form von Parkinson verbunden mit einer Alzheimer-Krankheit ähnlichen Demenz (PDC). Ungefähr 10% der Opfer entwickelten beide Störungen, wobei typischerweise der ALS Phenotyp zuerst erschien. Studien über die potentielle Krankheitsursache konzentrierten sich auf Umweltfaktoren mit dem grössten Schwerpunkt auf den Konsum von giftigen Samen der lokalen Palmfarnen (6) und dem hohen Aluminiumgehalt der Erde in Süd-Guam (7).

In Bezug auf dem GWS-ALS AVA Impfstoff, wurde die Aufmerksamkeit auf den angelagerten Anthrax Impfstoff (AVA) und verschiedenste Inhaltsstoffe von Impfstoffen gelenkt, im Besonderen wurden Hilfsstoffe, Aluminiumhydroxid und Squalen verdächtigt (8). Ein Hilfsstoff ist eine Substanz, das während der Impfstoffproduktion hinzugefügt wird um unspezifisch die Immunantwort auf ein Antigen zu erhöhen (9). Aluminiumverbindungen wurden vor über 90 Jahren als Hilfsmittel identifiziert . Gegenwärtig ist Aluminium, in verschiedenen Formen (Aluminiumhydroxid, Aluminiumphosphat, Aluminiumsulfat) das meist zugelassene Hilfsmittel, dessen Benutzung im Allgemeinen durch die Pharmaindustrie als auch durch verschiedene staatliche Aufsichtsbehörden als sicher eingeschätzt wird (10). Verschiedene Studien haben keinen ungünstigen oder Langzeit-Gesundheitseffekte durch Aluminiumhilfsmittel gefunden (11-13) und die Food and Drug Administration (FDA) hat ihre langjährige Bewilligung für den Nutzen von Aluminium in dieser Art weitergeführt.

Trotz langer Entwicklung des weitverbreiteten Nutzens, sind die physikalisch-chemischen Interaktionen zwischen den Aluminiumverbindungen und dem Antigen relativ schlecht verstanden und deren zugrunde liegenden Mechanismen sind kaum untersucht worden (14). Es scheint, dass keine rigorosen Tierversuche zur potentiellen Giftigkeit von Aluminiumverbindungen durchgeführt worden sind. Das Fehlen von solchen Studien ist seltsam, da Beobachtungen, das Aluminium im Allgemeinen neurotoxisch sein kann unter einer Anzahl von Konditionen bekannt ist (15,16) und vorallem Hilfsmittel mit neurologischen Erkrankungen in Verbindung gebracht worden sind (17-19). Tabelle 1 zeigt die Resultate von bisherigen Studien, in denen Tiere mit Aluminiumhydroxid behandelt worden sind, mit der resultierenden Auswirkung auf das Nervensystem. Im Zusammenhang mit der Nutzung von Aluminium in Impfstoffen, sind LD_{50} Werte für Aluminiumhydroxid bisher noch nicht publiziert worden nach unserem besten Wissen (J.T. Baker Material Safety Data Sheets).

Die Möglichkeit, dass Aluminiuminjektionen makrophagische Myofasciitis auslöst, wurde in der Literatur beobachtet (20-22).

Eine frühere Publikation untersuchte die potentielle Neurotoxizität von mehreren bekannten oder verdächtigten Impfstoffhilfsmitteln. In dieser Studie, werden wir uns ausschliesslich auf die Auswirkung von Aluminiumhydroxid-Injektionen auf das motorische und kognitive Verhalten untersuchen und auf das Erscheinen von verschiedenen Formen von Neuropathologie im *in vivo* Mausmodell.

2 Versuchsvorgänge

2.1 Versuchstiere

In unserer Erststudie (8), wurden junge erwachsene (3 Monate alt), männliche CD-1 Mäuse benutzt (ungefähr 35 g zu Beginn des Experiments). Jüngere Tiere wurden absichtlich gewählt um das typische Einsatzalter während dem Golfkrieg (3) zu imitieren. Vier subkutane Injektionsblöcke (zwei Injektionen im Abstand von 2 Wochen) wurden benutzt: Kontrolle Salz/Phosphat gebufferte Lösung (PBS)(n = 10); Aluminiumhydroxid (n = 11); Squalen (n = 10); und Aluminiumhydroxid und Squalen (n = 10). Diese Studie wird nur von der Aluminium behandelten und der Kontrollgruppe von dieser Versuchsreihe berichten. Eine zweite Versuchsreihe wurde an 9 Monate alten CD-1 Männchen durchgeführt, das sechs Aluminiumhydroxid-Injektionen erhielten über einen Zeitraum von 2 Wochen. Diese Mäuse, mit der Kontroll- und anders behandelter Gruppe (wird andernorts Bericht erstattet), wurden einem strikten Verhaltens-Testsystem unterzogen, das unten beschrieben wird. Histologische Analysen des Rückenmarks und des Gehirns dieser Mäuse sind im Gange.

Alle Tiere in beiden Experimenten wurden einzeln eingesperrt in der Tierbe-

treuungseinrichtung des Jack Bell Forschungszentrums in Vancouver, B.C., Kanada. Das ganze Experiment hindurch wurde eine Raumtemperatur von 22°C und einem 12/12h Lichtzyklus beibehalten. Alle Mäuse wurden mit Purina® Mausefutter gefüttert und Zugang zu Futter und Wasser war gegeben ad libitum.

Mäuse von beiden Studien wurden mit einer Überdosis an Halothan und mit transkardialer künstlicher Durchblutung mit 4% Paraformaldehyd (PFA) geopfert. Das Gewebe vom Zentralnervensystem wurde für histologische Untersuchungen gesammelt. Fixiertes Gehirn und Rückenmark von allen Mäusen wurden über Nacht in eine 30% Saccharose/PBS-Lösung eingelegt und dann eingefroren und gelagert bei -80°C bis zur Sektionierung. Alles Gehirn-/Markgewebe wurde in Tissue-Tek optimaler Schneidetemperatur (O.C.T) Verbindung (Sakura, Zoeterwoude, Niederlande) befestigt und dann durch Kryostat in 30 µm koronale Scheiben geschnitten. Das Rückenmark wurde zu 25 µm in der Querebene geschnitten. Die Schnitte wurden kryogeschützt in 30% Ethylenglycol-20% Glycerol-dibasisch und monobasische Natriumphosphatelösung und bis zur Benutzung bei -20°C gefroren gehalten.

2.2 Hilfsmittel

Alhydrogel[®], ein Aluminiumhydroxid (Al(OH)₃) Gelsuspension, wurde als Quelle für Aluminiumhydroxid benutzt. Alhydrogel wird durch Superfos Biosector a/s (Dänemark) hergestellt und erworben über SIGMA Kanada.

2.2.1 Dosen

Um die ungefähre menschliche Dosis an Aluminiumhydroxid für unsere Experimente zu berechnen, benutzten wir folgende Informationen: Der AVA Impfstoff für den Gebrauch durch Menschen wird durch Bioport Corporation, von Lansing, Michigan hergestellt. Laut Produktdatenblatt vom Michigan Biologic Products Institute (MBPI, Lansing, Michigan, USA; Bioports Vorgänger), enthält eine Einzeldosis von AVA Impfstoff 2,4 mg Aluminiumhydroxid (äquivalent zu 0,83 mg Aluminium). Basierend auf das angenommene menschliche Durchschnittskörpergewicht von 70-80 kg, wäre die Menge pro kg Körpergewicht ungefähr 30-34 µg/kg. Soldaten oder Zivilisten, die den Impfstoff erhalten, würden von 30-34 µg/kg (1 Injektion) bis zu ungefähr 200 µg/kg für 6 Injektionen erhalten.

Die Hilfsmittelinjektionen in den behandelten Mäusen wurden basierend auf dem durchschnittlichen Tiergewicht für beide Experimente kalibriert. In Experiment 1, wurden zwei Injektionen einer Aluminiumhydroxid-Lösung von 50 µg/kg in einem Gesamtvolumen von 200 µL steriler PBS (0.9%) im Abstand von zwei Wochen verrichtet. Die Mäuse in diesem Experiment hätten deshalb 100 µg/kg erhalten versus einer wahrscheinlichen 68 µg/kg in Menschen. Im Experiment 2, erhielten die Mäuse sechs Injektionen zu einem Total von 300 µg/kg

Aluminiumhydroxid über 2 Wochen. Kontrollen in beiden Studien wurden mit 200 μL PBS injiziert.

Der Injektionsort bei Verabreichung an Menschen ist typischerweise subkutan über dem Deltamuskel. Für Injektionen in Mäusen benutzten wir eine subkutane Injektion in der lockeren Haut hinter dem Nacken (das "Genick") um das Unbehagen zu minimieren und für die Einfachheit der Injektion.

2.3 Untersuchung des Verhaltens

In der ersten Studie, wurden die Mäuse in regelmässigen Zeitabständen spezifischen Verhaltenstests bezüglich der motorischen und kognitiven Funktion unterworfen, inklusive Maschendrahtgang (2x/Woche), offenes Feld (1x/Woche) und Wasser-Labyrinth (1x/Woche) über einer 6 monatigen Nachinjektionsperiode (s. (22)). Die Reihenfolge mit der die Tiere getestet wurden war für jeden Versuch zufällig. In der zweiten Studie, haben wir eine detailliertere Verhaltensuntersuchung durchgeführt basierend auf das automatisierte EthoVision System (Noldus EthoVision[®] 3.1). Einzelne Bewegungen der Mäuse wurden für 5 Minuten auf dem offenen Feld in wöchentlichen Intervallen beobachtet. Die Software erlaubte quantitative Messungen für eine Vielzahl von motorischen Funktionen, einschliesslich Bewegungsdistanz, Prozent der Zeit in Bewegung, Geschwindigkeit und eine Vielzahl von anderen. Diese letzteren Experimente wurden für 28 Wochen nach der letzten Injektion weitergeführt.

2.4 Histologische Messungen (Experiment 1)

2.4.1 NeuN und aktive caspase-3

Wie in Petrik u.a. (8) zitiert, wurden pro Behandlungsgruppe fünf Mäuse benutzt. In jeder wurden mehrere Gehirn ($n = 3$) und Rückenmark ($n = 8$) Sektionen in verschiedenen Ebenen untersucht. Die Fluoreszenzintensität von NeuN und aktiver caspase-3 wurde benutzt um Neuronen respektive Zellen, die durch Apoptose sterben, zu identifizieren. Regionen von Interesse wurden unter Benutzung von Orientierungspunkten aus dem stereotaxischen Mausgehirn und -rückenmark Atlas definiert (23,24). Alle Schnitte wurden in einer unverfälschten Art unter einem 40x Objektiv untersucht.

2.4.2. Choline acetyltransferase (ChAt) und Glial fibrillary acidic protein (GFAP)

Wie in Petrik u.a. (8) zitiert, wurde das ChAT Antibody benutzt um die cholinergischen Motoneuronen im Gehirn und dem Rückenmark zu identifizieren (25,26). GFAP wurde benutzt um reaktive Astrozyten zu markieren (27,28).

2.4.3 Iba-1

Ein polyklonaler Hasen-Antibody gegen das ionisierte Kalzium bindende Ad-aptermolekül (Iba-1) (Wako, Richmond, VA, USA) wurde zur Färbung von aktivierten Mirkogliazellen benutzt (29). Für das Iba-1 Fluoreszenzimmuno-Labeling, wurde das gleiche Protokoll benutzt wie für das GFAP Labeling ausser der folgenden Änderung: Sektionen wurden in primärer Hasen-anti-Iba-1 (in PBST mit 1%NGS + 1%BSA; 1:1000 Verdünnung) über Nacht bei 4°C inkubiert. Die Sektionen wurden in anti-Hasen AlexaFluor 546™ sekundärer Antikörper für 2 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert (Molecular Probes; Eugene, OR, 1:200).

2.4.4 Morin (3,5,7,2,4-pentahydroxyflavone, BDH)

Morin (M4008-2G, Sigma) ist ein Fluorochrom, das ein grün fluoreszieren- des Komplex bildet mit dem Aluminium (mit einer Anregungswellenlänge von 420 nm) (15,30). Der Aluminium-Morin Fluoreszenzversuch wurde benutzt um Aluminium im Lendenrückenmark und anderen Zentralnervensystem-Geweben zu visualisieren. Die Morin-Färbung wurde als 0.2% Lösung in 85% Ethylalkohol, das 0.5% Essigsäure enthält benutzt. Jede befestigte Sektion wurde zuerst mit PBS zwei Mal für 5 Minuten gewaschen. Die Sektionen waren vorbehandelt worden für 10 Minuten in einer 1% wässrigen Lösung von Hydrochloresäure, gespült in doppelt destilliertem Wasser (ddH₂O) zwei Mal für 5 Minuten und für 10 Minuten in 0,2% Morin getränkt. Die Sektionen wurden dann zwei Mal in ddH₂O gewaschen für 5 Minuten, entwässert in 70%, 90% und 100% Ethanol (EtOH) und gereinigt mit 100% Xylen. Alle Sektionen wurden dann mit Hilfe von Vectashield mounting medium (Vector Laboratories) befestigt, mit klarem Nagellack abgedichtet und an Luft getrocknet.

2.4.5 Färbung für hyperphosphoryliertes tau Protein

Hyperphosphoryliertes tau (Anti-Human PHF-Tau, Pierce Biotechnology, Inc., Rockford, IL) Labeling wurde mit Hilfe von der nichtfluoreszierenden Diaminobenzidine (DAB) Methode bestimmt. Die Objektträger mit einer Sektion von Lendenrückenmark wurden zuerst zwei Mal mit PBS gespült (2x5 min) bevor das Antigen demaskiert wurde. Endogene Peroxidase-Aktivität wurde mit 0,3% Hydrogenpyroxid in Methanol für 20 Minuten gequenchet. Die Sektionen wurden zwei Mal in PBS gespült (2x5 min) vor der Blockierung bei Raumtemperatur für 1 Stunde in M.O.M Blockiermittel (M.O.M. Kit - Peroxidase, cat # PK 2200, Vector Laboratories, Inc. Burlingame CA), gefolgt von einer schnellen Spülung in PBS und einer 5 minütigen Inkubation in M.O.M. Lösung. Der primäre PHF-Tau Antikörper wurde 100x in M.O.M. Lösung verdünnt und die Inkubation wurde bei Raumtemperatur für 1 h durchgeführt. Nach dem primären Antibody Inkubationsschritt, wurden die Objektträger zwei Mal in PBS gespült und dann in der M.O.M Anti-Maus IgG Reagens inkubiert für 10 min. Die Sektionen wurden in PBS gespült bevor sie mit dem sekundären Antibody (Vectastain ABC Elite Kit, cat # PK-6101) für 1 h inkubiert wurden gefolgt von Inkubation in der Vectorstain ABC Elite Reagens für weitere 30

min. Die Objektträger wurden wieder in 1x PBS gespült. Farbentwicklung wurde durch die Vector ImmPACT™ DAB Lösung (cat # SK-4105) erreicht. Wenn die gewünschte Färbung erreicht war, wurden die Objektträger in ddH₂O gespült für 5 Minuten und gegengefärbt in 0,1% Methylgrün für 5 min. Nach der Gegenfärbung, wurden die Träger kurz in ddH₂O gespült, zwei Mal mit 95% Ethanol und zwei Mal mit 100% Ethanol. Die Träger wurden an der Luft getrocknet bevor sie in Permount® (Fisher Scientific, Fair Lawn, NJ) fixiert wurden.

2.5 Mikroskopie

Die Gehirn und Rückenmarksektionen behandelt mit fluoreszierendem Antikörper oder DAB wurden unter einem Zeiss Axiovert 200 M (Carl Zeiss Kanada Limited, Toronto, ON, Kanada) Mikroskop bei 40x und 100x (unter Öl) Vergrößerung betrachtet. DAPI (blau fluoreszierend) wurde mit einem 359/461 nm Absorptions/Emissions Filter betrachtet. Alexa Fluor 546™ (rot) und Hasen IgG DuoLuX™ (rot) wurden mit einem 556 557/572 573 nm Filter betrachtet. FITC wurde mit einem 490 494/520 525 Filter betrachtet. Gehirn und Lendenrückenmark-Sektionen wurden zufällig für die Histologie gewählt für jede Gruppe. Während dem Zählen bei 40x Vergrößerung wurden zwei Bilder pro Rückenmark-Sektion genommen: ventral links, ventral rechts. Die 40x Bilder waren 350 x 275 μm und die 100x Bilder waren 50 x 115 μm . Die Bilder wurden geschossen unter Benutzung von AxioVision 4.3 Software.

2.6 Kriterien für die Bestimmung und Quantifizierung von gelabelten Zellen

Für die Quantifikation wurden nur Zellen, die im Fokus waren und komplett im Gesichtsfeld waren gezählt. Um die Wahrscheinlichkeit, dass die gleiche Zelle zwei Mal gezählt wird zu eliminieren, wurden die Schnitte für jedes histologische Experiment nur von einer Grube der Sammelschale genommen um zu verwissern dass die Sektionen mindestens 250 μm entfernt voneinander waren. Interessante Regionen für die Zellzählung wurden mit Hilfe von Markierungs- und Referenzpunkten vom stereotaxischen Mausrückenmark und -gehirn Atlas (39,40) festgelegt. Im Rückenmark wurden nur Zellen, die anterior zum Zentralkanal wo sich graue und weisse Substanz treffen in Betracht gezogen als Teil des Vorderhorns; umgekehrt wurden nur Zellen die posterior zum Zentralkanal waren in Betracht gezogen als Teil des Hinterhorns. Diese Kriterien wurden unabhängig welches Rückenmarksegment untersucht wurde angewendet. Im Gehirn, wurden nur Zellfunde in den entsprechenden Hirnstrukturen gezählt. Alle Sektionen wurden auf eine unverfälschte Art gezählt (eine Kennnummer war den Tieren zugeteilt zur Verfolgung, die jedoch nicht die Identität der Behandlung des Tieres verriet).

2.7 Statistik

Für jede Maus wurden Werte bei der individuellen Aufgabe und in der Zellzählung benutzt um den Mittelwert \pm Standardabweichung für jede Gruppe und Kondition zu berechnen. Verhaltenswerte und Zellzählungen wurden normalisiert mit dem Mittelwert der Kontrollen. Die Mittelwerte wurden unter Benutzung von ein- oder zwei-Weg ANOVA (Statistica, Statsoft Inc. Tulsa, OK; GraphPad Prism, San Diego, CA) verglichen.

3. Ergebnisse

Anders als die Studie von Petrik u.a. (8), das in Lendenwirbel einen Verlust von ChAT positiven Motoneuronen bei Aluminiumhydroxid behandelten Mäusen zeigte war kein signifikanter Unterschied im ChAT Labeling oder in der Motoneuronenanzahl weder in Hals- noch in Brust-Rückenmarksegmenten (Fig. 1A und B). Allerdings zeigte die Aluminiuminjizierte Gruppe eine stark signifikante Erhöhung in der Expression von GFAP positiven Astrocyten (70%) (Kontrollgruppe aufgezählt als 100% für alle Graphen; Fig. 1C) im Brustsegment des Rückenmarks. Diese GFAP Ergebnisse spiegeln die früher berichteten Ergebnisse in den Lendenwirbel.

Das Iba-1 Labeling zeigte signifikant erhöhten Level an aktivierten Mikroglialzellen im Lendenrückenmark der Tiere behandelt mit Aluminium (111%) im Vergleich zur Kontrolle (Fig. 1E). Andere Ebenen des Rückenmarks wurden nicht für Mikroglialzellen getestet in dieser Studie.

Nur Mäuse injiziert mit Aluminiumhydroxid zeigten signifikant erhöhtes Morin Labeling der Zellen im Lendenrückenmark im Vergleich zu anderen Gruppen (Fig. 2A-E). Ähnlich zeigten nur Aluminiuminjizierte Mäuse die Präsenz von abnormalem tau Protein in Motoneuronen der Lendenwirbel (Fig 3). Andere Regionen des Rückenmarks wurden in dieser Studie nicht getestet weder für Morin noch für das tau Protein.

Die mehreren Aluminiumhydroxid-Injektionen des Experiments 2 zeigten einen schweren Effekt auf die motorischen und andere Verhaltensweisen wie gezeigt in Fig. 4 und 5. Mehrere Aluminium-Injektionen führten zu signifikanten Auswirkungen auf das Verhalten inklusive Veränderungen im Fortbewegungsverhalten, (Fig 4) und lösten Gedächtnisstörungen aus in der Wasserlabyrinth-Aufgabe (Fig 5). Andere Verhaltensmessungen inklusive Muskelstärke und -ausdauer gemessen mit dem Drahtgang und der Muskelkoordination und Gleichgewicht gemessen durch das Laufrad waren nicht signifikant betroffen.

4. Diskussion

Das vorliegende Ergebnis erweitert die früheren Resultate von Petrik u.a. (8), indem es zeigt, dass mikrogliale Aktivierung Teil der zu Grunde liegenden Pa-

thologie der Lendenwirbel ist. Diese Daten fügen zu den vorherigen hinzu, z.B. der Verlust an motorischen und anderen Neuronen und die Aktivierung von reaktiven Astrozyten. Zusammengefasst mit den aktuellen Daten, deutet die Gesamtaktivierung der glialen Entzündungsantwort in den Lendenwirbel hin, dass dieser Prozess ein Schlüssel ist zur frühen Phase der pathologischen Ereignisse die zum Tod von Motoneuronen führen. Diese Interpretation wird durch die Abwesenheit von Motoneuronen-Verlust und Astrozytenaktivierung in anderen Ebenen des Rückenmarks beobachtet in dieser Studie unterstützt. In ALS und im Tiermodell der Krankheit, scheint die gliale Aktivierung gefolgt vom Tod der Motoneuronen oft fortzuschreiten in einer sequentiellen Art entlang der ventralen Nervenachse mit den ersten Zeichen von Pathologie zuerst in den Lendenwirbel erscheinend (31). Angesichts dessen scheint es möglich zu sein, dass eine Untersuchung zu späterem Zeitpunkt pathologische Antworten in Brust- und Halswirbel zeigen würde. Alternativ, könnte das Aluminium, das in den Lendenwirbel-Motoneuronen gezeigt wurde, die anderen Segmente noch nicht erreicht haben. In laufenden Studien wird bestimmt werden ob Motoneuronen in diesen anderen Segmenten positiv für Aluminium gefärbt werden.

Die positive Morin-Färbung in den Lendenwirbel zeigt deutlich, dass nach der Injektion das Aluminium Zugang zu diesem Teil des Nervensystems findet. Eine Möglichkeit ist, dass es dies durch retrograden Transport von den Muskeln zu den Motoneuronen des jeweiligen Segmentes erreicht. Dies scheint unwahrscheinlich gegeben, dass unser Paradigma der subkutanen Injizierung nicht ein bestimmtes Segment des Rückenmark betreffen sollte. Eine andere Möglichkeit ist, dass das Aluminium in das Zentralnervensystem auf eine bestimmte Art eindringt wenn es das Kreislaufsystem eintritt. Es sind Experimente im Gange, die diese Möglichkeiten unterscheiden sollen.

Die Präsenz von hyperphosphoryliertem tau Protein in Motoneuronen der Lendenwirbel, das ein Kennzeichen der Alzheimer-Krankheit und dem ALS-PDC von Guam ist, deutet darauf hin, dass zusätzliche pathologische Prozesse die mit dem Aluminium in Zusammenhang stehen, stattfinden.

Die Auswirkung auf das Verhalten im zweiten Experiment bestätigt die pathologische Wirkung, das im ersten Experiment beobachtet wurde. Während die histologischen Messungen von diesen Studien noch anstehen, deutet das Ausmass der Verhaltensstörungen stark darauf hin, dass wir weit ausgebreitete neurologische Pathologien beobachten werden. Die grössere Auswirkung auf das Verhalten in diesem Experiment könnte dem experimentellen Paradigma entsprechen, das die Anzahl von Aluminiumhydroxidinjektionen verdreifacht.

Im Gesamten spiegeln die hier berichteten Ergebnisse vorhergehende Arbeit, das klar gezeigt hat, dass Aluminium in oraler als auch injizierter Form, neurotoxisch sein kann (15,16,32,33). Mögliche toxische Aktionsmechanismen für Aluminium könnte die Steigerung der Entzündung (z.B. Mikrogliosis) und die Interferenz mit cholinergen Projektionen (34), reduzierte Glucosennutzung (33),

defekte Phosphorylations-Dephosphorylationsreaktion (35), veränderte Rate der transmembranen Diffusion und selektive Änderungen im sättigbaren Transportsystem in der Blut-Hirn-Schranke (BBB 36) und oxidativem Schaden der zellulären Prozesse durch die Inhibierung vom Glutathion-Redox-Zyklus (37).

Obiges gegeben, ist es nicht überraschend, dass Aluminium weitgehend als einen Faktor für neurodegenerative Erkrankungen vorgeschlagen wird und in Zusammenhang mit degenerierten Neuronen in spezifischen Regionen des Zentralnervensystems gefunden wurde (38-41). In Tierversuchen wurde Aluminium mit der Ansammlung vom tau Protein und Amyloid-beta Protein verbunden und das Induzieren von neuronaler Apoptose *in vivo* als auch *in vitro* (30). Mit Aluminium injizierte Tiere zeigen schwere anterograde Degradation von den cholinergischen Enden im Kortex und im Hippocampus (42).

Aluminium ist ein Hilfsmittel, das sich Zugang zum Zentralnervensystem verschaffen kann (42-44). Wie auch immer erscheinen orale Verabreichung von Aluminiumhydroxidgel nicht neurotoxisch zu sein in Menschen (45), obwohl dies der Fall ist für Aluminiumchlorid in Ratten (46). Der Weg der Aufnahme und vielleicht die Form von Aluminium könnten wichtige Faktoren sein die das Potential der Giftigkeit bestimmen.

Wir spekulieren, dass die beobachteten neurotoxischen Auswirkungen von Aluminiumhydroxid in der aktuellen Studie durch direkte als auch indirekte Wege entstehen, manche von ihnen oben zitiert. Direkte Toxizität werden der physikalischen Präsenz (oder Nähe) von Aluminium zugeschrieben und dessen Potential den Zelltodweg auszulösen. Die Ansammlung von Aluminium im Zytoplasma durch zelluläre Aufnahmemechanismen oder Diffusion könnten die Veränderungen in der Glutaminase und Glutaminsynthetase verursachen und leicht die Verfügbarkeit vom Neurotransmitter Glutamat verändern (47). Aluminium, das eine Ansammlung von abnormalem tau Protein induziert, könnte das Gewirr von Neurofibrillen erhöhen und den zellulären Transportmechanismus behindern (48). Ausserhalb der Zelle könnte Aluminium die Neuronen beeinträchtigen durch Veränderung der Synapsen. Zum Beispiel ist gezeigt worden, dass Aluminium die Dicke der postsynaptischen Dichte verringert, den Abstand des synaptischen Spalts vergrössert und die Anzahl von flachen Synapsen erhöht (49). Aluminium könnte auch die Spannungsaktivierten Kalziumkanäle blockieren (50), die Aktivität der Acetylcholinesterase erhöhen (51) oder mit der synaptischen Übertragung interferieren einfach durch das Ansammeln im synaptischen Spalt (52). Aluminium kann auch Apoptose induzieren in Astrozyten (53). Da die Astrozyten essentiell sind für die Erhaltung der neuronalen Gesundheit, ist jeder Verlust von der Funktion der Astrozyten toxisch für die Neuronen. Indirekte Toxizität von Aluminium könnte durch verschiedene Wege entstehen inklusive durch die Aktivierung von verschiedenen Cytokinen (54), Freisetzung von Glutamat in einer anregungstoxischen Kaskade oder durch Veränderung von enzymatischen Wegen (55).

Zusätzlich zu den obigen Auswirkungen auf neuronalen Zellen, könnte Aluminium indirekt eine abnormale, generalisierte Immunantwort stimulieren. Dies ist wozu Hilfsmittel in erster Linie eingesetzt werden. Neurotoxizität von Hilfsmitteln könnte deshalb das Resultat einer unbalancierten Immunantwort sein. Rook und Zumla (56) nehmen an, dass mehrere Impfungen, Stress und die Impfmethode eine Verschiebung der Immunantwort bewirken kann (56,57). Aluminiumhydroxid wurde früher gezeigt die Th2-Cytokinantwort zu stimulieren (9,58).

Während die aktuellen Ergebnisse und unsere vorhergehende Studie signifikante Auswirkungen von Aluminiumhydroxid auf das Verhalten und die Neuropathologie aufzeigt und zusätzlich signifikante Resultate durch die Kombination von Hilfsmitteln, ist es wichtig zu erkennen, dass diese alle unter minimalen Konditionen erreicht wurden. Tabelle 1 fasst die Aspekte der menschlichen ALS und GWS Symptomen zusammen im Vergleich zu den Auswirkungen beobachtet in Aluminium injizierten Mäusen. Es besteht die Wahrscheinlichkeit, dass ein synergistischer Effekt zwischen den Hilfsmitteln und anderen Variablen wie Stress und mehrere Impfungen und Kontakt zu anderen Giften entsteht. Eine neue Studie, das einige dieser Faktoren in Kombination untersucht, zeigte dass Stress, Impfung und Pyridostigminbromid (ein Carbamat Anticholinesterase (AChE) Inhibitor), synergistisch auf die multiplen Stress-aktivierten Kinasen im Gehirn wirken könnten um eine neurologische Behinderungen in GWS auszulösen (59). Zusätzlich, könnte der genetische Hintergrund im Zusammenhang mit Kontakt zu Aluminium eine wichtige Rolle spielen und könnte ein wichtiger Bereich für die zukünftige Forschung sein.

Die Demonstration der neuropathologischen Auswirkungen und den Verhaltensdefiziten in Aluminiumhydroxid injizierten Mäusen könnte Einblick geben nicht nur in den Ursachen von GWS-ALS, sondern auch Zugang eröffnen für die Erforschung von anderen neurologischen Erkrankungen.

Danksagung

Diese Arbeit wurde unterstützt durch die Scottish Rite Charitable Foundation von Kanada und der Natural Science and Engineering Research Council von Kanada (CAS). Wir danken Dr. Meryl Nass (Mount Desert Island Hospital, Maine, USA) und Lt. Col. John A. Richardson (USAFR, ret.) für deren unschätzbare Bemerkungen und Ratschlägen zum Projekt und Manuskript.

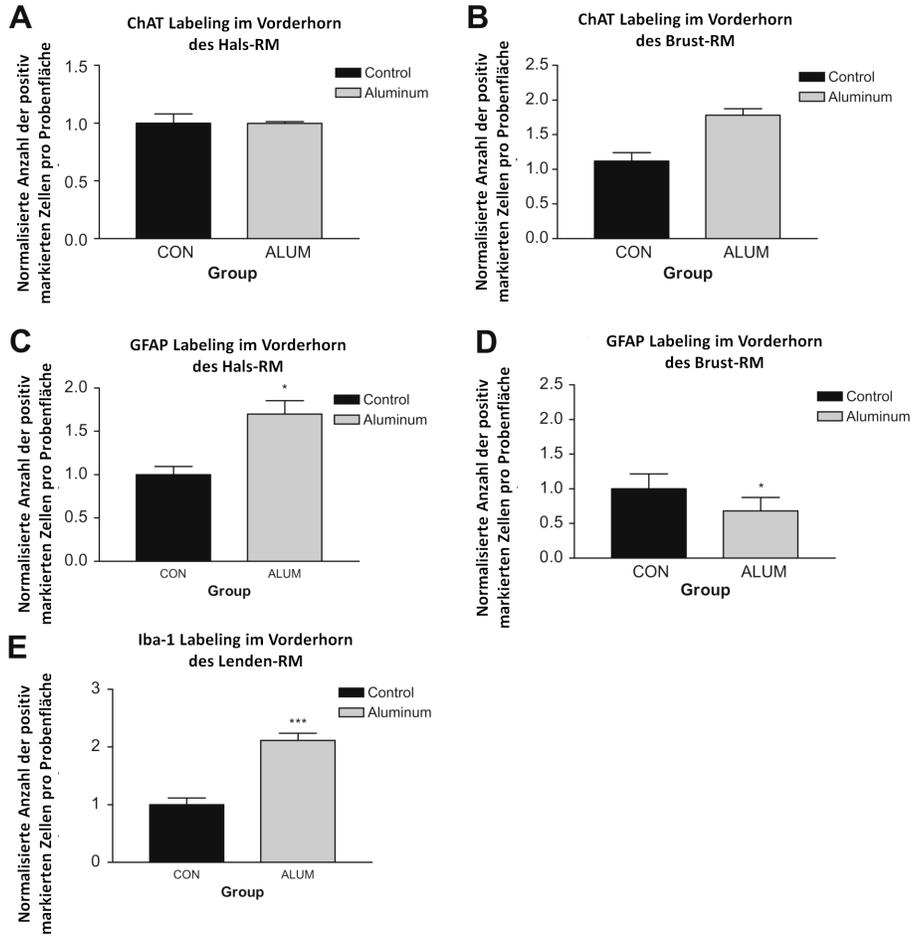


Abbildung 1: Auswirkung von Aluminiumhydroxid auf verschiedenen Ebenen des Rückenmarks (RM). (A und B) ChAT Markierung in Hals- respektive Brustwirbel. (C und D) Normalisierte Anzahl Zellen für GFAP Labeling der reaktiven Astrozyten in Hals- respektive Brustwirbel. Die Aluminiumhydroxid behandelte Gruppe zeigt im Halswirbel höheres GFAP Labeling. (E) Iba-1 Fluoreszenz Labeling im Vorderhorn des Maus Lendenwirbel zeigte dass die Aluminium injizierte Mäuse eine signifikant erhöhte Anzahl von aktivierten Microgliazellen hatte. Daten sind Mittelwert +/- Standardabweichung. *** $p < 0,001$, ein-Weg ANOVA.

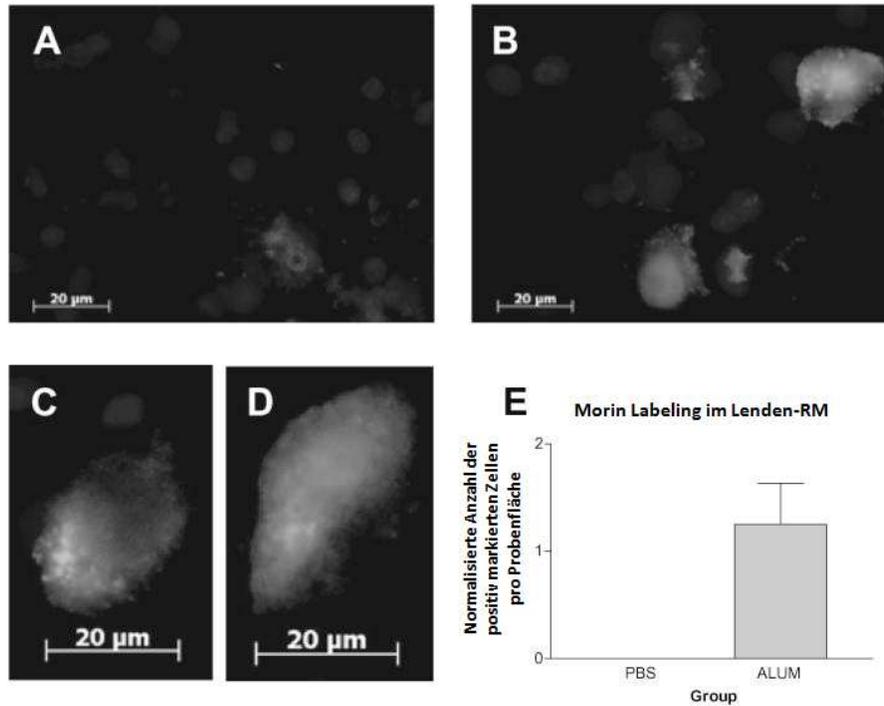


Abbildung 2: Morin Fluoreszenz Labeling im Vorderhorn des Maus Lendenwirbels. Sektionen von der Kontrolle (A) zeigten kein Morin Fluorezenz Labeling. Massleiste = 20 μm . (B) Morin-positive Motoneuronen in Aluminiumhydroxid behandelten Mäusen. (C und D) Höhere Stärke der Motoneuronen in Aluminium injizierten Mäusen zeigt starke Intensität an Morin Labeling. Massleiste = 20 μm . (E) Anzahl Zellen der Morin positiven Zellen in verschiedenen behandelten Gruppen (n = 4 Mäuse/Gruppe, je vier Sektionen). Daten sind Mittelwert +/- Standardabweichung. Ein-Weg ANOVA Analyse ergab einen Signifikanzlevel von *p < 0,005.

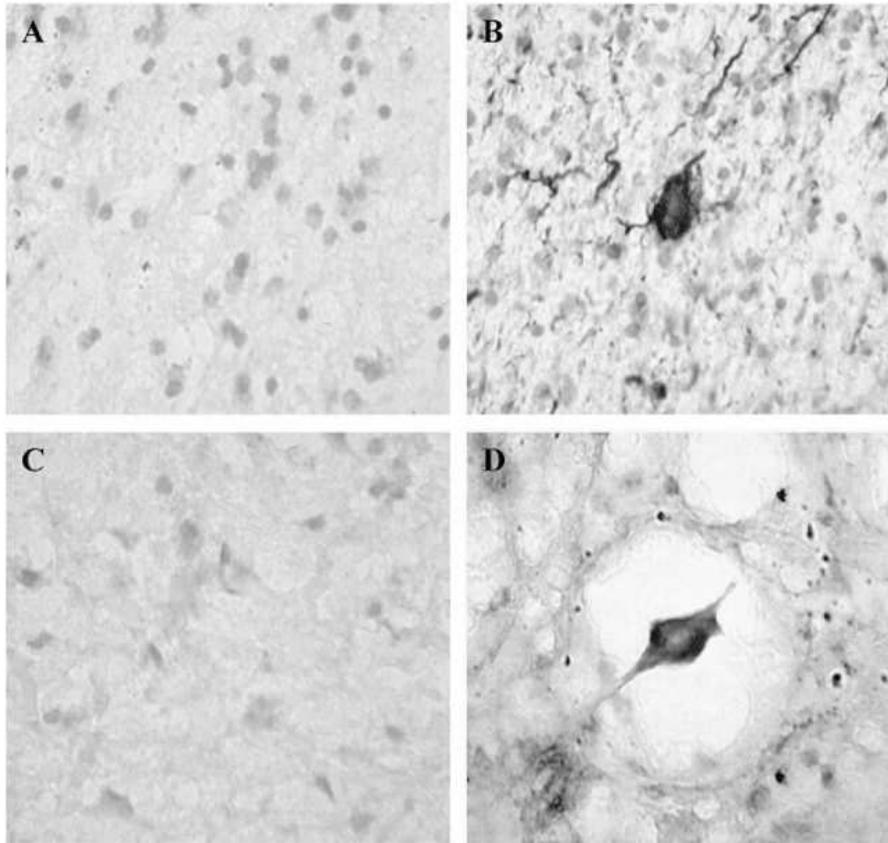


Abbildung 3: Hyperphosphoryliertes tau Immunofärbung im Vorderhorn des Maus Lendenwirbels im Vergleich zur Alzheimer-Krankheit. (A) Eine Sektion der menschlichen entorhinalen Kortex von einem Kontrollpatienten. (B) Menschliche entorhinaler Kortexsektion von einem Patienten mit der Alzheimer-Krankheit (Sektionen von Dr. P. McGeer). (C) Lendenwirbel von einer Maus injiziert mit Salz. (D) Äquivalente Sektion von einer Aluminiumhydroxid injizierter Maus. Alle Bilder sind 100x Vergrößert.

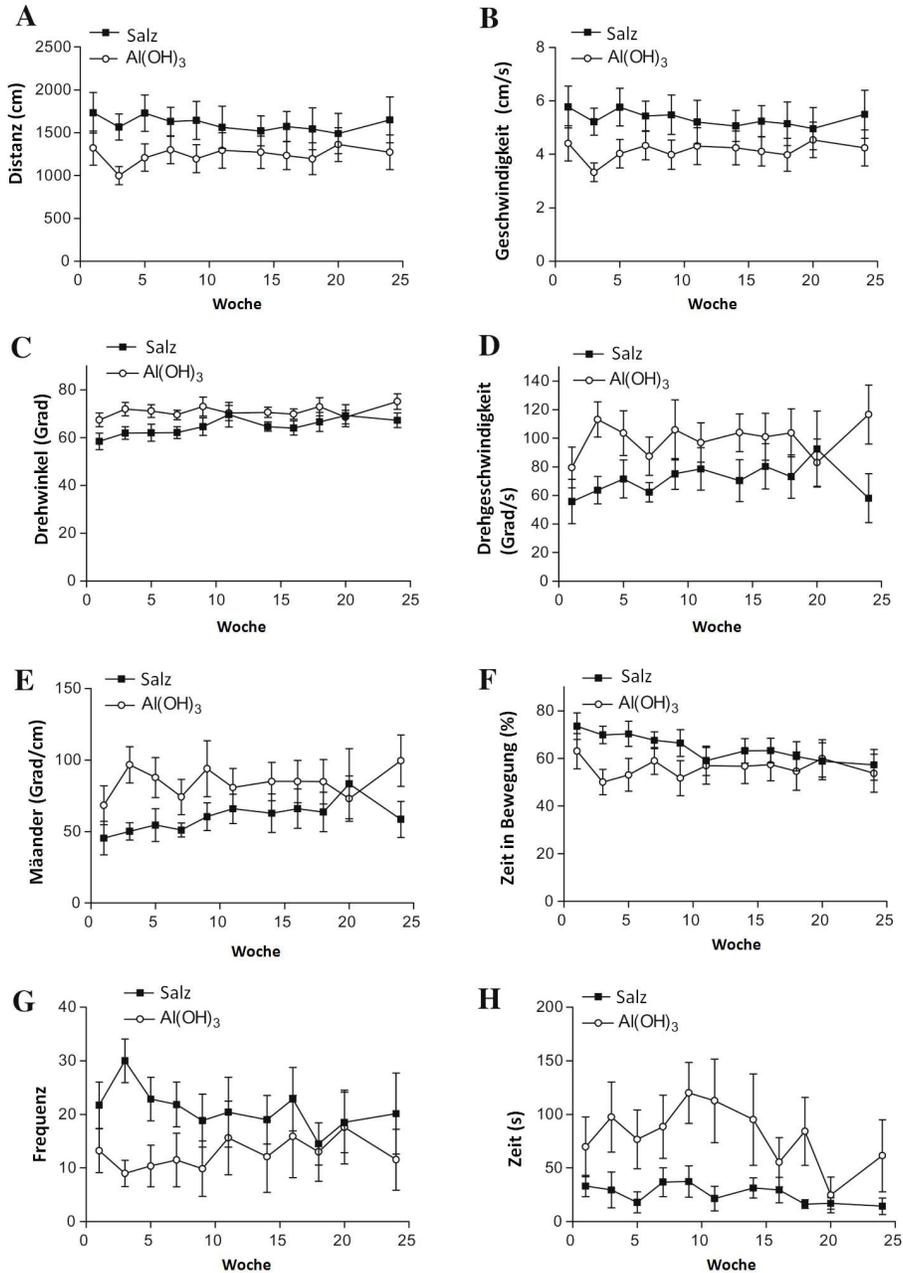


Abbildung 4: Bewegungsanalyse im offenen Feld zur Bestimmung der spontanen Aktivität und Ängstlichkeit in den Kontrollmäusen vs Mäusen, die sechs Mal mit Aluminiumhydroxid injiziert worden sind. Aluminium injizierte Mäuse zeigten folgende Verhaltensänderungen: (A) Kürzere bewegte Distanz ($***p < 0,0001$). (B) Langsamere Bewegung ($***p < 0,0001$). (C) Grössere durchschnittliche Drehwinkel ($***p < 0,0001$). (D) Schnellere Drehungen ($***p < 0,0001$). (E) Grössere Mäander ($***p < 0,0001$). (F) Kleinerer Prozent der Zeit an Gesamtbewegung ($**p = 0,0030$). (G) Weniger Betreten des Zentrums des offenen Feldes ($***p < 0,001$). Spätes Betreten des Zentrums ($***p < 0,0001$). (Alle Messungen, zwei-Weg ANOVA).

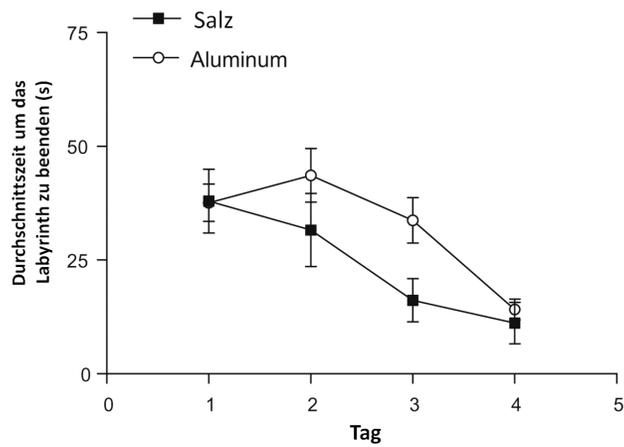


Abbildung 5: Wasser-Labyrinthtest als Evaluation des Lernens und des Gedächtnisses. Mäuse 6x injiziert mit Aluminiumhydroxid brauchten durchschnittlich signifikant länger um das Labyrinth zu beenden im Vergleich zu mit Salz injizierten Mäusen (zwei-Weg ANOVA. * $p=0,0389$).

Tier	Alter	Dosis	Injektionstyp	Ergebnis	Referenz
Weibliche NIH Mäuse	4 Wochen	315-335 $\mu\text{g}/\text{kg}$	i.p.	Signifikant erhöhtes Level an Al im Gehirn	Redhead u.a., 1991
Männliche und weibliche Lang Evan Ratten	2 Monate	100 oder 300 $\text{mg}/\text{kg}/\text{Tag}$	Oral	Signifikant reduzierte Lernfähigkeit und erhöhtes Level an Al im Gehirn	Bilkei-Gorzo, 1993
Männliche Schweizer Albinomäuse	nicht genannt	20 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{Tag}$	Oral	Signifikant erhöhtes Level an Al im Gehirn, Niere und Leber.	Sahin u.a., 1994
Phz:SFIS Mäuse	nicht genannt	1,0 mg jede zweite Woche oder 0,1 mg 5 Tage/Woche	i.p.	Signifikant erhöhtes Level an Al in der Leber, die Tibia (Knochen), aber nicht im Gehirn	Fiejka u.a., 1996

Table 1: Zusammenfassung der menschlichen ALS und GWI Symptomen im Vergleich zu den Symptomen beobachtet in Aluminium injizierten Mäusen und Ratten. Diese Tabelle zeigt auch die Ähnlichkeiten zwischen dem menschlichen ALS und dem Golfkriegssyndrom.