

### 3 EIGENE UNTERSUCHUNGEN

#### 3.1 Material und Methoden

Die Untersuchungen fanden in den Labors der elbion AG, Meissner Strasse 191 in 01445 Radebeul statt. Die Durchführung der in dieser Dissertation dargestellten Tierversuche wurde nach § 8 Absatz 1 des Tierschutzgesetzes der Bundesrepublik Deutschland unter den folgenden Aktenzeichen beim Regierungspräsidium Dresden, Referat Veterinärwesen, Pharmazie und Lebensmittelüberwachung genehmigt:

**Tab. 5:** Aktenzeichen der im Rahmen der Dissertation durchgeführten Tierversuche

<i><b>Versuch</b></i>	<i><b>Aktenzeichen</b></i>
Haloperidol-induzierte Katalepsie, Maus und Ratte	24-9168.21-2-2002-22
Lokomotorische Aktivität, Maus und Ratte	74-9168.21-2-2002-21
Schwimmtest, Maus	24-9168.21-2-2004-1
Olfaktorische Bulbektomie, Ratte	24-9168.21-2-2003-3
Passive Avoidance Task, Ratte	74-9168.21-2-2001-16

##### 3.1.1 Tiermaterial

Für die Versuche wurden männliche Wistar-Ratten (CrI:(WI) BR) und männliche NMRI Mäuse (CrI:NMRI BR) von Charles River, Sulzfeld, Deutschland verwendet.

Die Tiere wurden 1-2 Wochen vor der Durchführung der jeweiligen Versuche vom Züchter bezogen, um ihnen eine ausreichende Eingewöhnungszeit zu gewährleisten. Die Mäuse und Ratten wurden unter Standardbedingungen gehalten: konventionelles Lichtregime (12 h hell / 12 h dunkel, Beginn der Lichtphase um 06 Uhr, Beginn der Dunkelphase um 18 Uhr), 20-24°C Raumtemperatur und einer relativen Luftfeuchtigkeit von 55 ± 5 %. Dabei hatten die Tiere ad libitum Zugang zu Futterpellets (ssniff® R/M H, 10 mm Alleinfutter für Ratten und Mäuse, Spezialdiätenfutter GmbH Soest) und Wasser.

Die Ratten wurden in Gruppenhaltung zu fünf Tieren in Makrolonkäfigen Typ VI gehalten. Operierte Ratten wurden in der Zeit nach der Olfaktorischen Bulbektomie in Gruppenhaltung zu drei Tieren des jeweils gleichen Operationsstatus in Makrolonkäfigen Typ VI auf Einstreu (SAWI® Research Bedding) gehalten. Die Mäuse wurden in Gruppenhaltung zu fünf Tieren in Makrolonkäfigen Typ III auf Einstreu (SAWI® Research Bedding) gehalten.

##### 3.1.2 Verwendete Substanzen und Applikationsformulierung

Die Bezugsquelle der in den Katalepsie-Versuchen, den Schwimmtests Maus und der Bulbektomie Ratte verwendeten Substanzen und ihrer Lösungsmittel sind der Tab. 6 zu entnehmen.

Die verwendeten Dosierungen und Prämedikationszeiten in den oben angeführten Versuchen sind bei den einzelnen Versuchsbeschreibungen erwähnt. Die Injektionsvolumina, Zubereitung und Applikationsformen der einzelnen Substanzen sind in der Tab. 7 aufgeführt. Die verschiedenen Substanzen wurden im Schwimmtest Maus und in den Katalepsie-Versuchen Maus resp. Ratte mit unterschiedlichen Prämedikationszeiten akut appliziert, wohingegen die Substanzen in der Olfaktorischen Bulbektomie Ratte bis zur Messung der lokomotorischen Aktivität unter Substanzeinfluss über einen Zeitraum von 15 Tagen appliziert wurden.

**Tab. 6:** Bezugsquellen der verwendeten Substanzen und Lösungsmittel

<b>Substanz</b>	<b>Hersteller bzw. Bezugsquelle</b>
Imipramin HCl	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Amitriptylin HCl	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Theophyllin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
elbion Substanz A	elbion AG, Radebeul
KW-6002 (8-[2-(3,4-Dimethoxy-phenyl)-vinyl]-1,3-diethyl-7-methyl-3,7-dihydro-purine-2,6-dione)	elbion AG, Radebeul
Haloperidol-ratiopharm® 5 Injektionslösung (5 mg Haloperidol/1 ml)	ratiopharm GmbH, Ulm
Chloralhydrat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Isoba® Isofluran	Essex Pharma GmbH, München
Tylose (HEC) 0,5%ig	MERCK-Schuchardt, Hohenbrunn
D(+)-Glucose-Monohydrat	MERCK, Darmstadt
NaCl 0,9%ig	Baxter Deutschland GmbH, Unterschleißheim

**Tab. 7:** Injektionsvolumen, Zubereitung und Applikationsform der verwendeten Substanzen

<b>Substanz</b>	<b>Injektionsvolumen (ml/kg)</b>	<b>Zubereitung</b>	<b>Applikationsform</b>
Imipramin	Maus: 10 Ratte: 5	in 0,9 % NaCl gelöst	i.p.
Amitriptylin	Maus: 10 Ratte: 5	in 0,9 % NaCl gelöst	i.p.
Theophyllin	Maus: 10 Ratte: 5	im Mörser verrieben und in 0,5 % HEC suspendiert	p.o.
elbion Substanz A	Maus: 10 Ratte: 5	im Mörser verrieben und in 0,5 % HEC suspendiert	p.o.
KW-6002	Maus: 10 Ratte: 5	im Mörser verrieben und in 0,5 % HEC suspendiert	p.o.
Haloperidol	Maus: 10 Ratte: 5	Injektionslsg. mit 0,9 % NaCl verdünnt	i.p.

### 3.1.3 Durchführung der Verhaltensuntersuchungen

#### 3.1.3.1 Haloperidol-induzierte Katalepsie an Maus und Ratte als Parkinson-Modell

Dieses Symptommodell der Parkinsonschen Erkrankung wurde ausgewählt, um eine wirksame Dosierung für die nachfolgend durchgeführten Untersuchungen bzgl. einer

antidepressiven Wirksamkeit von Theophyllin, elbion Substanz A und KW-6002 festzulegen. Ferner sollte untersucht werden, inwieweit eine antikataleptische Wirkung in diesem Modell mit dem Grad der Subtypselektivität der drei in dieser Arbeit untersuchten Adenosinrezeptor-Antagonisten korreliert.

Das Gewicht der Ratten zum Zeitpunkt der Katalepsie-Versuche lag zwischen 180 und 240 g, das der Mäuse lag zwischen 24 und 30 g. Am Versuchstag wurden die Tiere etwa eine Stunde vor Beginn der Verhaltenstests in den Versuchsraum verbracht. Anhand von Vorversuchen zu dieser Arbeit wurden die geeigneten Haloperidol-Dosierungen und Prämedikationszeiten zur Induktion einer langanhaltenden und belastbaren Katalepsie bei der Ratte und der Maus ausgewählt. Ein "belastbarer" kataleptischer Zustand ist durch einen hohen *cataleptic score* gekennzeichnet, der  $\geq 4,0$  liegt (siehe Tab. 8). Bei der Ratte lag die adäquate Dosierung von Haloperidol bei 0,75 mg/kg KGW (Applikationsvolumen 0,5 ml/100 g KGW) mit einer 90 minütigen Prämedikationszeit vor dem ersten Katalepsie-Test. Bei der Maus lag die Haloperidol-Dosierung geringfügig höher bei 1,2 mg/kg KGW (Applikationsvolumen 0,2 ml/20 g) und wurde mit einer 60 minütigen Prämedikationszeit vor dem ersten Katalepsie-Test appliziert. Die in dieser Arbeit eingesetzten Haloperidol-Dosierungen und Prämedikationszeiten entsprechen den Literaturangaben (KANDA et al. 1994; MALEC 1997; MANDHANE et al. 1997).

Die Applikation der zu untersuchenden Substanzen fand nach der Haloperidol-Injektion zu jeweils unterschiedlichen Prämedikationszeiten vor dem ersten Katalepsie-Test statt (siehe Tab. 9). Üblicherweise wurde bei der Maus 30 min, bei der Ratte 60 min nach Verabreichung der zu untersuchenden Substanz der erste Test durchgeführt. Neben einer antikataleptischen Wirkung im ersten Katalepsie-Test wurde auch der Zeit-/Wirkungsverlauf untersucht. So fanden weitere Tests in 30 minütigem oder einstündigem Abstand bis zu einem Nachlassen einer antikataleptischen Wirkung statt. Lag der Mittelwert des *cataleptic scores* in allen Dosierungsgruppen der jeweils untersuchten Substanz  $\geq 3,5$ , wurde der Versuch zu diesem Zeitpunkt beendet. Um eine vollständige und belastbare Katalepsie in der Kontrollgruppe (*cataleptic score*  $\geq 4,0$ ) zu gewährleisten und Lerneffekte zu verhindern, wurde der Zeit-/Wirkungsverlauf bei der Ratte höchstens bis 5 h nach der Substanzapplikation untersucht.

Um einen kataleptischen Zustand zu bewerten, wurden die Tiere einzeln auf einen quadratischen Holzwürfel platziert (Ratte: 10 x 10 x 10 cm, Maus: 4 x 4 x 4 cm). Dabei wurden zuerst beide Vorderpfoten auf den Holzwürfel gelegt, so dass sich das Tier in aufgerichteter Position befand. Es wurde die Zeit bis zum Absteigen vom Holzwürfel gemessen (Abstieglatenz). Anschließend wurden die beide Hinterpfoten des Tieres auf dem Holzwürfel platziert. Es wurde wiederum die Abstieglatenz gemessen.

Anhand der gemessenen Abstiegszeiten in sec wurde anschließend der Katalepsie Score (*cataleptic score*) ermittelt (siehe Tabelle 8). Als Obergrenze der Messung wurden >10 sec festgelegt. Fiel das Beurteilen der Abstiegslatenz des Tieres beim ersten Versuch nicht eindeutig aus, wurde die Prozedur wenigstens einmal, im höchsten Fall zweimal wiederholt. Weitere Wiederholungen fanden zur Vermeidung von Gewöhnungseffekten des Tieres nicht statt. Bei einer eindeutigen und maximal ausgeprägten Katalepsie (*cataleptic score* = 5) wurden neben dem Verharren des Tieres in der getesteten Position für >10 sec besonders bei der Ratte charakteristische Verhaltensänderungen wie Schließen der Augen, feinschlägiger Tremor des Körpers und ein Sistieren der Explorationsbewegungen des Kopfes und der Tasthaarbewegungen während der Katalepsie-Versuche registriert.



**Abb. 4:** Haloperidol-induzierter kataleptischer Zustand bei der Ratte

Zwischen den einzelnen Versuchsdurchläufen wurde der Holzwürfel von Exkrementen des Tieres gesäubert und mit einer Desinfektionslösung (Bacillol® AF, BODE Chemie Hamburg) abgewischt.

**Tab. 8:** Beurteilung der Haloperidol-induzierten Katalepsie an der Maus und Ratte nach Scorewerten

Zeit <b>Vorderpfoten</b> auf dem Holzwürfel (sec)	Zeit <b>Hinterpfoten</b> auf dem Holzwürfel (sec)	<b>cataleptic score</b>
<5	<5	0
5-10	<5	1
>10	<5	2
5-10 oder <5	5-10 oder >5	3
>10 oder 5-10	5-10 oder >10	4
>10	>10	5

Die score Werte sind abhängig von dem Verharren der Vorder- bzw. Hinterpfoten auf dem jeweils verwendeten Holzwürfel. Bei einer belastbaren Katalepsie liegt der Wert  $\geq 4$ , ein maximaler kataleptischer Zustand ist in diesem Modell durch einen Wert von 5 gekennzeichnet.

**Tab. 9:** Dosierung, Prämedikationszeiten und Applikationsform in der Haloperidol-induzierten Katalepsie an der Maus und Ratte

<b>Substanz</b>	<b>Dosierung (mg/kg)</b>	<b>Vehikel</b>	<b>Applikations- form</b>	<b>Prämedikations- zeit (min)</b>
Theophyllin	1, 3, 10 (Maus) 10, 30 (Ratte)	0,5 % HEC	p.o.	30 (Maus) 60 (Ratte)
elbion Substanz A	1, 3, 10 (Maus) 10 (Ratte)	0,5 % HEC	p.o.	30 (Maus) 60 (Ratte)
KW-6002	10, 30 (Maus) 10 (Ratte)	0,5 % HEC	p.o.	30 (Maus) 60 (Ratte)

### 3.1.3.2 Forced Swim Test an der Maus als Depressionsmodell

Zur Untersuchung auf eine antidepressive Wirkung der verwendeten Substanzen wurde zunächst der Schwimmtest (modifiziert nach PORSOLT et al. 1977a, b) durchgeführt. Für die Untersuchungen wurden Mäuse mit einem Gewicht von 20 bis 30 g verwendet. Die Mäuse wurden 1-2 Tage vor dem Versuch vortrainiert. Dazu wurden die Tiere einzeln für 15 min in einen transparenten Glaszylinder von 20 cm Höhe und 15 cm Durchmesser, der bis zu einer Höhe von 13 cm mit Leitungswasser (21-23 °C) gefüllt war, eingesetzt und schwimmen gelassen. Nach Ablauf der Zeit wurden die Mäuse wieder herausgenommen, abgetrocknet und in den Heimkäfig zurück gesetzt. Am Versuchstag wurden die Tiere mit der jeweils zu untersuchenden Substanz mit entsprechender Prämedikationszeit appliziert und in den oben beschriebenen Glaszylinder eingesetzt. Die Versuchsdauer betrug insgesamt 6 min, wobei die ersten beiden Minuten als Einschwimmzeit galten und nicht bewertet

wurden. In der eigentlichen Versuchszeit, also in den letzten 4 Minuten, wurde die Zeit des Schwimmens (*swimming*) der Tiere mit Hilfe einer Stoppuhr bestimmt. Als aktives Schwimmen galt in unseren Versuchen die Bewegung aller vier Pfoten unter der Wasseroberfläche. Die aktive Schwimmzeit in Sekunden wurde notiert und von der Gesamtversuchszeit (= 240 sec) abgezogen, so dass die Immobilitätsdauer errechnet werden konnte. Eine hohe Immobilitätsdauer wird in diesem Modell mit einem depressiven Effekt korreliert.

**Tab. 10:** Dosierung, Prämedikationszeiten und Applikationsform im *Forced Swim Test* an der Maus

<b>Substanz</b>	<b>Dosierung (mg/kg KGW)</b>	<b>Vehikel</b>	<b>Applikationsform</b>	<b>Prämedikations- zeit (min)</b>
Imipramin	10, 30	0,9 % NaCl	i.p.	60
Amitriptylin	10, 30	0,9 % NaCl	i.p.	60
Theophyllin	10, 30	0,5 % HEC	p.o.	90
elbion Substanz A	10, 30	0,5 % HEC	p.o.	120
KW-6002	3, 10	0,5 % HEC	p.o.	60

### 3.1.3.3 Olfaktorische Bulbektomie an der Ratte als Depressionsmodell

Als komplexes Krankheitsmodell der Depression wurde zur weiterführenden Untersuchung auf eine potenzielle antidepressive Eigenschaft der drei in dieser Arbeit untersuchten Adenosinrezeptor-Antagonisten im Anschluss an den zuvor beschriebenen *Forced Swim Test* an der Maus die Olfaktorische Bulbektomie an der Ratte eingesetzt.

Da die Olfaktorische Bulbektomie vor Beginn der vorliegenden Arbeit noch nicht Bestandteil der in der ZNS-Abteilung der elbion AG etablierten Depressionsmodelle war, erfolgte zu Beginn der Arbeit zunächst die Etablierung dieses Modells. Im Rahmen der Etablierungsphase wurden in drei Gruppen zwei unterschiedliche Operationsmethoden zur chirurgischen Entfernung der olfaktorischen Bulbi evaluiert. Weiterhin wurden in diesen Etablierungsgruppen verschiedene Methoden zur Charakterisierung des Verhaltens bulbektomierter Tiere untersucht. Ziel der Etablierungsphase war eine Optimierung der Operationsmethode und die Findung eines sensitiven Verhaltensparameters zur Erfassung einer antidepressiven Wirkung der in der Hauptversuchsphase zu untersuchenden Substanzen. In der Hauptversuchsphase wurden insgesamt drei Gruppen verwendet, in denen der Einfluss von Referenzsubstanzen und den drei in dieser Arbeit verwendeten Adenosinrezeptor-Antagonisten in diesem Depressionsmodell untersucht wurde.

### ***Etablierungsphase der Olfaktorischen Bulbektomie als Depressionsmodell***

#### Methoden der Operation der bulbektomierten Tiere in der Etablierungsphase der Olfaktorischen Bulbektomie

In der ersten Etablierungsgruppe wurden die olfaktorischen Bulbi der Ratten chirurgisch mit einem Mikromesser durchtrennt, jedoch nicht durch Absaugen entfernt (siehe Abb. 8, Gruppe A). Die adspektorische Begutachtung der derart operierten Gehirne zeigte jedoch nur einen suboptimalen Erfolg dieser Operationsmethode. So waren in einigen Fällen unilateral oder bilateral noch Bulbusreste vorhanden. Das von LEONARD und TUIE (1981) als *olfactory bulbectomy syndrome* bezeichnete Bild der Veränderungen, das mit der Entfernung der olfaktorischen Bulbi einhergeht und sich unter anderem durch Hyperaktivität in einer neuen Umgebung darstellt (LEONARD und TUIE 1981), zeigt sich in seiner vollständigen Ausprägung jedoch nur nach einer kompletten Durchtrennung der olfaktorischen Bulbi (persönliche Mitteilung, GREKSCH 2003). Aus diesem Grund wurden zur Optimierung der Operationsmethode und zur Gewährleistung einer vollständigeren Durchtrennung die olfaktorischen Bulbi in der zweiten Etablierungsgruppe nach chirurgischer Durchtrennung mit Hilfe einer an eine Wasserstrahlpumpe angeschlossenen Pipettenspitze abgesaugt. Diese Vorgehensweise wird auch von zahlreichen Autoren in der Literatur beschrieben (etwa GRECKSCH et al. 1997; MAR et al. 2000). Diese Methode führte zu einem deutlich besseren Durchtrennungsergebnis bei den bulbektomierten Tieren als die zuvor beschriebene Methode in der ersten Etablierungsgruppe, so dass diese chirurgische Vorgehensweise in allen nachkommenden Operationsgruppen angewendet wurde. Die nachfolgend beschriebene chirurgische Vorgehensweise bei der Olfaktorischen Bulbektomie bezieht sich demzufolge auf die zweite und dritte Etablierungsgruppe und die drei im Ergebnisteil dargestellten Hauptversuchsgruppen, die im Rahmen dieser Arbeit operiert wurden.

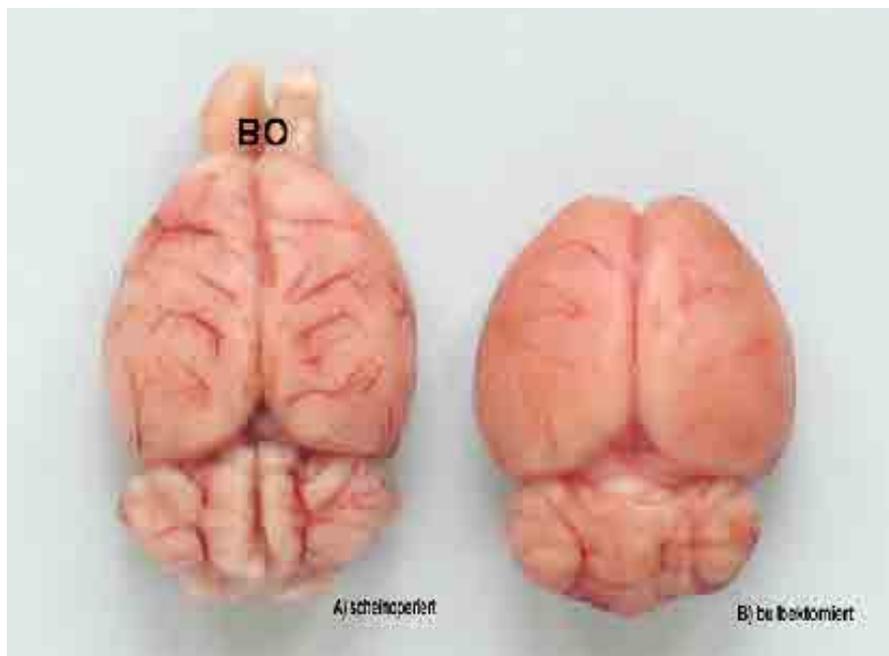
Um eine ausreichende Gruppengröße für die drei Hauptversuchsgruppen zu gewährleisten, die im Anschluss an eine dreiwöchige Rekonvaleszenzphase mit Standardsubstanzen und den drei in dieser Arbeit untersuchten Adenosinrezeptor-Antagonisten behandelt wurden, wurden n=12 Ratten scheinoperiert und mindestens n=30 Tiere bulbektomiert (siehe Tab. 27, Anhang). Das Körpergewicht der in diesem Modell eingesetzten Ratten lag dabei zwischen 200 und 260 g. Zwischen den Tieren, die bulbektomiert wurden und denjenigen, die lediglich scheinoperiert wurden, lag vor dem chirurgischen Eingriff kein signifikanter Unterschied im Körpergewicht vor. Die Tiere wurden am Tag der Operation mit Chloralhydrat (3,6%ig) intraperitoneal narkotisiert (Applikationsvolumen 1 ml/100 g KGW). Nach Erreichen des operationsfähigen Narkosestadiums wurde der Schädel im Bereich zwischen den

Ohren bis auf Höhe der medialen Augenwinkel rasiert und die Ratte in einem stereotaktischen Gerät fixiert. Der Operationsbereich wurde mit 60%igem Alkohol desinfiziert. Mit einem Skalpell wurde von rostral nach kaudal ein etwa 1,5 cm langer Hautschnitt gesetzt und nachfolgend die darunter liegende Muskelschicht durchtrennt und das knöcherne Schädeldach freigelegt. Der Schnittpunkt der medianen und der beiden im interauralen Bereich nach lateral verlaufenden Knochennähte (suturae) charakterisierten die individuelle Lage des Bregma. Dieser Schnittpunkt ist als Bezugspunkt zur Lagebestimmung von Hirngebieten gut geeignet. Ausgehend vom Bregma wurde mit Hilfe eines Zirkels der zu eröffnende Bereich des Schädeldaches 7 mm anterior aufgesucht und entsprechend markiert. Dieser Punkt sollte in etwa auf der gleichen horizontalen Höhe wie das zuvor aufgesuchte Bregma liegen. Die rostrale Markierung wurde beidseitig nach lateral um etwa 0,5 mm verlängert. Mit einem Dentalbohrer (Rosenbohrer 1,8\*35 mm, FST, Heidelberg, Deutschland) wurde der Schädelknochen in diesem Bereich schlitzförmig auf einer Breite von etwa 0,8 cm eröffnet. Die Schein-Operation endete an dieser Stelle und die Muskulatur und Unterhaut wurden mit zwei einfachen Knopfnähten (3-0 Vicryl, Ethicon Products Deutschland) und die Haut mit drei bis vier einfachen Knopfnähten (5-0 Vicryl, Ethicon Products Deutschland) geschlossen. Bei der Bulbus-Operation wurde nach Eröffnung des Schädelknochens auch die Dura mater durchtrennt, so dass die beiden Bulbi sichtbar wurden, welche mit einem Mikromesser (Graefe Micro-dissecting knife, 12 cm, FST, Heidelberg, Deutschland) durchtrennt wurden. Dabei wurde das Mikromesser senkrecht in die zuvor gebohrte Öffnung des Schädelknochens bis zum Kontakt mit dem ventralen Schädeldach eingeführt und mit vorsichtigen transversalen Schneidebewegungen über die ganze Öffnungsbreite am ventralen Schädeldach entlang geführt. Mit einem kleinen scharfen Löffel (Micro-curette, 0,5 mm Durchmesser, 13 cm, FST, Heidelberg, Deutschland) wurde dabei freigewordene Substanz entfernt. Restliches Gewebematerial der beiden Bulbi wurde mit Hilfe einer Eppendorff-Pipettenspitze (gelb), die an eine Wasserstrahlpumpe angeschlossen war, abgesaugt. Darüber hinaus wurde die Kavität mit einer feinen anatomischen Pinzette auf eventuelle Faserreste hin überprüft. Bei allen durchgeführten Arbeitsschritten wurde auf eine Schonung des präfrontalen Kortex der beiden Großhirnhemisphären geachtet. Um auftretende Blutungen zu stillen, wurde ein Haemostyptikum (Gelamp® Gelatinetampons mit 5 % kolloidalem Silber; roeko, Langenau, Deutschland) in die entstandene Kavität eingefüllt und die OP-Wunde wie bei der Schein-OP verschlossen.

Die Tiere erhielten post operationem eine Injektion zur Flüssigkeitssubstitution (Mischspritze von jeweils 1 ml 0,9%iger NaCl-Lösung und 20%iger Glucoselösung s.c.), wurden individuell gekennzeichnet und in Gruppen zu jeweils 3 Tieren

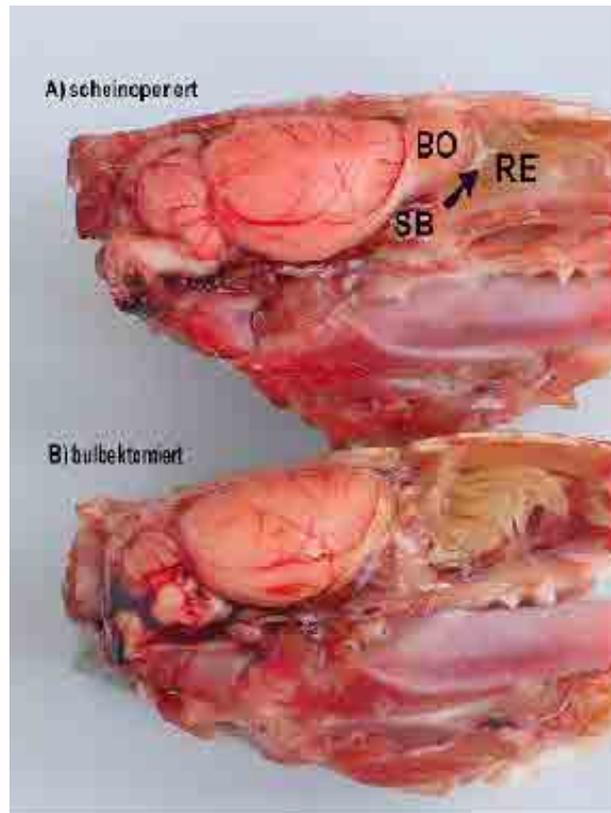
zusammengestellt. Dabei wurden bulbektomierte und scheinoperierte Tiere jeweils getrennt gehalten. Bis zum Erwachen wurden die Tiere in Zellstoff gewickelt unter Rotlicht beobachtet. An die Operation schloss sich eine dreiwöchige Rekonvaleszenzphase an, in der sich außerdem die entsprechenden Verhaltensänderungen bei den bulbektomierten Ratten vollständig ausprägen konnten. Nach dieser Erholungsphase fand die jeweilige Behandlungsphase mit daran anschließenden Verhaltensuntersuchungen statt.

Nach Abschluss der jeweils letzten Verhaltensuntersuchungen wurden die Tiere durch CO<sub>2</sub> Betäubung schmerzfrei euthanasiert. Die bulbektomierten Tiere wurden auf Vollständigkeit der Durchtrennung der Bulbi olfactorii hin untersucht. Dazu wurden die Gehirne sorgfältig aus dem knöchernen Schädel herauspräpariert und die Schnittstelle adspektorisch beurteilt. Dabei wurde auf Gewebereste der beiden Bulbi olfactorii und eine Schädigung des präfrontalen Cortex geachtet. Tiere, die nicht vollständig bulbektomiert waren oder eine eindeutige Schädigung des präfrontalen Cortex aufwiesen, wurden nicht in die statistische Auswertung der Verhaltensuntersuchungen einbezogen. Einzelne Gehirne wurden zur weiteren Aufbewahrung in 10%iges Formalin eingelegt (siehe Abb. 5).



**Abb. 5:** Olfaktorische Bulbektomie: Formalinfixierte Gehirne operierter Ratten

Die Riechkolben (Bulbi olfactorii, **BO**), die bei der scheinoperierten Ratte (links) zu sehen sind, wurden bei der bulbektomierten Ratte (rechts) vollständig chirurgisch entfernt, ohne dabei den präfrontalen Cortex oder andere Gehirnareale zu beschädigen.



**Abb. 6:** Olfaktorische Bulbektomie: Sagittalschnitt durch den Kopf operierter Ratten

Die Nasenhöhle wird zum Gehirn durch das Siebbein (**SB**) begrenzt. Links neben dem Siebbein befindet sich bei der scheinoperierten Ratte (obere Abbildung) der Riechkolben (Bulbus olfactorius, **BO**), direkt neben dem Siebbein sind die Strömungskörper (Conchen) des Riechepithels (olfaktorisches Epithel, **RE**) zu erkennen. Das Riechepithel ist durch vier Conchen aufgefächert. Das Riechepithel ist durch seine bräunliche Färbung zu erkennen. Unterhalb der Nasenhöhle erkennt man das Gaumendach und die Zunge. Bei der bulbektomierten Ratte (untere Abbildung) ist der BO chirurgisch vollständig entfernt worden.

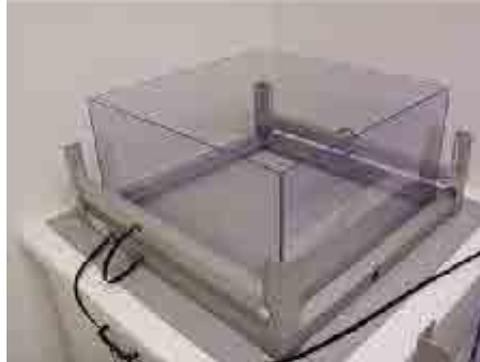
#### Verhaltensuntersuchungen in der Etablierungsphase der Olfaktorischen Bulbektomie

In der Literatur ist eine Vielzahl von Verhaltensänderungen, die Ratten nach der Entfernung der olfaktorischen Bulbi aufweisen, beschrieben (Übersicht dazu in KELLY et al. 1997). Zur Charakterisierung des Modells wurden in der Etablierungsphase folgende Verhaltensuntersuchungen durchgeführt: Messung der lokomotorischen Aktivität im *Open Field*, Evaluierung des Lernvermögens im *Two Compartment Passive Avoidance Task*, Evaluierung des Angstverhaltens auf dem *Elevated Plus Maze* und Verhalten im *Social Interaction Test*. Darüber hinaus wurden Versuche zur Aufnahme einer 5%igen Glucoselösung durchgeführt. Der Glucoseverbrauch zeigte dabei Unterschiede im Belohnungsverhalten scheinoperierter Tiere vs. bulbektomierter Tiere auf.

Die höchste Trennschärfe im Verhalten der bulbektomierten Tiere war dabei in den beiden erstgenannten Verhaltensuntersuchungen zu erzielen. Aus diesem Grund wurden für den Wirkungsnachweis der Substanzen in den drei Hauptversuchsgruppen

nur diese beiden Verhaltensuntersuchungen verwendet. Im Ergebnisteil sind folglich nur die Ergebnisse der lokomotorischen Aktivität im *Open Field* und des Lernverhaltens im *Passive Avoidance Task* dargestellt (siehe unter 3.2). Der Schwerpunkt wurde dabei jedoch auf die Erfassung der lokomotorischen Aktivität gelegt. Dieser Parameter ist in der Literatur als ein sensitiver Parameter zu Bewertung einer antidepressiven Wirkung von Substanzen beschrieben (HARKIN et al. 2003; KELLY et al. 1997; VAN RIEZEN et al. 1990). Neben der lokomotorischen Aktivität und dem Lernverhalten wurde sowohl in der Etablierungsphase als auch in der Hauptversuchsphase der Olfaktorischen Bulbektomie zudem der Gewichtsverlauf der Ratten post operationem ohne Substanzeeinfluss bzw. in der jeweiligen Behandlungsperiode unter Substanzeeinfluss ausgewertet.

Zur Erfassung der lokomotorischen Aktivität wurde als *Open Field* ein ActiMotSystem der Firma TSE, Bad Homburg verwendet. Die Testapparatur bildete durch vier Metalleisten, an deren Innenseite sich jeweils 32 Photosensoren befanden und einem inneren Einsatz aus transparentem Plexiglas (20 cm hoch) eine quadratische Versuchsarena von 48 x 48 cm. Der Boden des *Open Fields* bestand aus hellgrauem Kunststoff. Horizontale Bewegungen wurden mittels Unterbrechung der in der Versuchsarena erzeugten Lichtschranken gemessen.



**Abb. 7:** Open Field Apparatur zur Messung der lokomotorischen Aktivität

Folgende Versuchsparameter wurden durch das an die Testapparatur angeschlossene Computerprogramm ActiMot Version 05.08 (TSE, Bad Homburg) registriert :

1. Aktivität [sec] (Registrierung bei >5 cm/sec)
2. Zurückgelegte Distanz [m]
3. Hyperaktivität [% der Gesamtaktivität] (Registrierung bei >20 cm/sec)
4. counts [n]

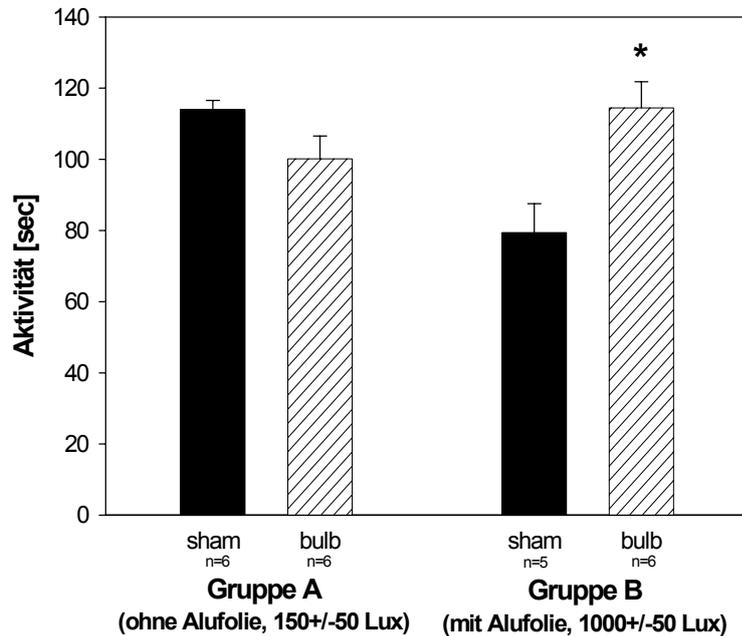
Die lokomotorische Aktivität der Tiere wurde jeweils für drei Minuten bewertet. Die Versuche fanden immer zur gleichen Zeit (07-09 Uhr morgens) statt, um die

Beeinflussung der lokomotorischen Aktivität durch zirkadiane Rhythmen zu minimieren und eine Vergleichbarkeit der Ergebnisse zu gewährleisten. Die Tiere wurden am Versuchstag ohne vorherige Eingewöhnungsphase direkt vom Tierhalteraum in den Versuchsraum verbracht. Die Tiere wurden einzeln aus ihrem Käfig genommen und zu Versuchsbeginn mittig in die Versuchsarena eingesetzt. Nach Ablauf der dreiminütigen Versuchsdauer wurden die Tiere aus der Versuchsarena genommen und in ihren Heimkäfig zurückgesetzt. Eine Zwischendesinfektion der Versuchsarena erfolgte nach jedem Durchgang mit einem Desinfektionsmittel-/Wassergemisch (Bacillol® AF, BODE Chemie Hamburg), um olfaktorische Einflüsse (*scent-marking*) zu vermeiden.

Die erste Etablierungsgruppe (siehe Abb. 8 Gruppe A) wurde zwei Wochen nach der Operation für 3 min im *Open Field* auf ihre lokomotorische Aktivität hin getestet. Die bulbektomierten Tiere wiesen entgegen der Erwartungen dabei eine geringere lokomotorische Aktivität als die scheinoperierten Tiere ( $100,1 \pm 6,4$  sec vs.  $114,0 \pm 2,6$  sec) auf. Der Unterschied erreichte jedoch keine statistische Signifikanz.

Um die Symptomatik der gesteigerten lokomotorischen Aktivität bulbektomierter Tiere in einer neuen Umgebung entsprechend zu provozieren, wurde in der Etablierungsphase eine Optimierung der geeigneten Testbedingungen durchgeführt. In der Literatur existieren uneinheitliche Beschreibungen über die adäquate Gestaltung der Umgebung des *Open Fields*. Allerdings überwiegt die Meinung, dass die Hyperaktivität bulbektomierter Tiere nur in einer ausreichend aversiven Umgebung zu provozieren ist (HARKIN 2003; KELLY et al. 1997; MAR et al. 2002). Dies wurde auch in einer persönlichen Mitteilung eines anerkannten Experten bestätigt (persönliche Mitteilung, KELLY 2003). Demzufolge wurden bei der zweiten Etablierungsgruppe die ursprünglich transparenten Plexiglaswände der Testapparatur in allen Durchgängen an den Außenflächen mit Aluminiumfolie verkleidet. Um die Aversivität des *Open Fields* für die Ratten weiterhin zu steigern, wurden die Lichtverhältnisse während der Versuche ebenfalls modifiziert und die Versuchsarena hell ausgeleuchtet. Dabei wurde die Lichtintensität in der Arena durch 100 W Glühlampen (PHILIPS), die 100 cm mittig über dem Boden der Testapparatur angebracht waren, gleichmäßig von 150 auf  $1000 \pm 50$  Lux Lichtintensität gesteigert. Bei der unter diesen modifizierten Bedingungen durchgeführten Testung, die bei der zweiten Etablierungsgruppe drei Wochen post operationem ausgeführt wurde, zeigten die bulbektomierten Tiere im Vergleich zu den scheinoperierten Tieren entsprechend den ursprünglichen Erwartungen nunmehr eine signifikant gesteigerte Aktivität ( $114,5 \pm 7,4$  sec vs.  $79,4 \pm 8,2$  sec) (siehe Abb. 8 Gruppe B). Dies konnte als Bestätigung für die Wahl der adäquaten Umgebung zum Nachweis der Hyperaktivität bulbektomierter Tiere gewertet werden. Das derart etablierte modifizierte *Open Field* wurde in der Hauptversuchsphase verwendet, um

den Einfluss von potenziell antidepressiv wirksamen Substanzen zu bewerten.



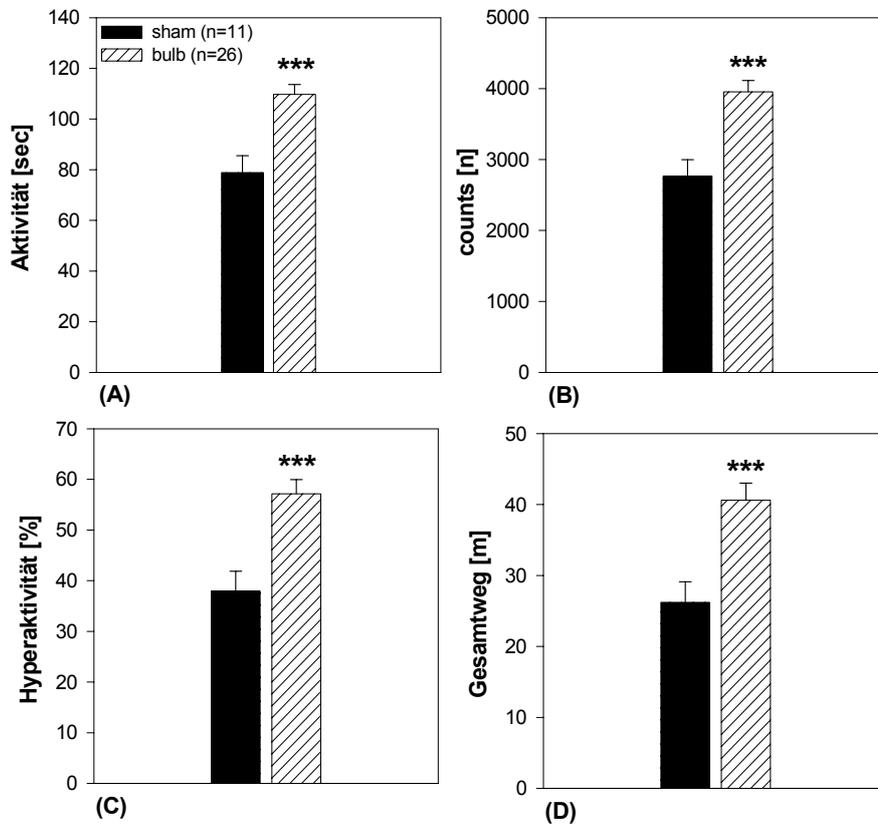
**Abb. 8:** Olfaktorische Bulbektomie: Einfluss der Umgebungskonditionen im Open Field auf die lokomotorische Aktivität bei scheinoperierten (sham) und bulbektomierten (bulb) Ratten

Die lokomotorische Aktivität wurde für jeweils 3 min im Open Field aufgezeichnet und ausgewertet. Die Ergebnisse sind als MW  $\pm$  SEM dargestellt. Die erste Etablierungsgruppe (Gruppe A) wurde 2 Wochen post operationem im nicht-modifizierten Open Field (Raumlicht (150  $\pm$  50 Lux), ohne Alufolie) getestet. Die zweite Etablierungsgruppe (Gruppe B) wurde 3 Wochen post operationem im modifizierten Open Field getestet (Beleuchtung (1000  $\pm$  50 Lux), Verkleidung der Außenwände mit Alufolie). Aus technischen Gründen konnte ein scheinoperiertes Tier der Gruppe B nicht ausgewertet werden.

\*  $p < 0,05$  vs. sham (student's t-test)

Die Modifikation der Testapparatur führte in der zweiten Etablierungsgruppe zur von uns erwarteten signifikant gesteigerten lokomotorischen Aktivität der bulbektomierten Tiere. Mit Hilfe des an die Testapparatur angeschlossenen Computerprogramms können bei der Messung der lokomotorischen Aktivität neben der Aktivität [sec] auch die Parameter Hyperaktivität [%], Gesamtweg [m] und counts [n] elektronisch erfasst werden. Bei der Erfassung der lokomotorischen Aktivität der unter optimierten Bedingungen operierten und unter adäquaten Umgebungsbedingungen im modifizierten *Open Field* getesteten dritten Etablierungsgruppe wurden alle vier Parameter statistisch ausgewertet. Die Abb. 9 zeigt einen hochsignifikanten Unterschied innerhalb der beiden Operationsgruppen (scheinoperiert (n=11) vs. bulbektomiert (n=26)) der dritten Etablierungsgruppe in allen vier Parametern der lokomotorischen Aktivität. Die bulbektomierten Ratten wiesen innerhalb der dreiminütigen Aufzeichnungszeit eine Aktivität [sec] von 109,8  $\pm$  3,9 (sham: 78,9  $\pm$  6,7),

counts [n] von  $3954,8 \pm 158,0$  (sham:  $2763,6 \pm 234,4$ ), Hyperaktivität [%] von  $57,1 \pm 2,8$  (sham:  $38,0 \pm 3,9$ ) und einen zurückgelegten Weg [m] von  $40,6 \pm 2,4$  (sham:  $26,2 \pm 2,9$ ) auf.



**Abb. 9:** Olfaktorische Bulbektomie: Vier Parameter der Messung der lokomotorischen Aktivität der dritten Etablierungsgruppe im Open Field

Das Verhalten scheinoperierter (sham, n=11) und bulbektomierter Ratten (bulb, n=26) der dritten Etablierungsgruppe wurde drei Wochen post operationem für drei Minuten im modifizierten Open Field untersucht. Die Ergebnisse sind als MW  $\pm$  SEM dargestellt. Bei den scheinoperierten Tieren konnte ein Tier aus technischen Gründen nicht aufgezeichnet werden, bei den bulbektomierten Tieren fiel ein Tier aufgrund unvollständiger Bulbektomie aus der Wertung heraus.

(A) Aktivität [sec], (B) counts [n], (C) Hyperaktivität [%], (D) Gesamtweg [m]  
 \*\*\*  $p < 0,001$  vs. sham (student's t-Test)

Da sich bei der Auswertung eine sowohl qualitativ als auch quantitativ gleichmäßige Auslenkung aller vier Parameter zeigte, wurde zur Darstellung der Hyperlokomotion der bulbektomierten Tiere im weiteren Verlauf einzig der Parameter Aktivität [sec] ausgewählt. In der Literatur wird ebenfalls überwiegend dieser Parameter angegeben. Die Beschränkung auf diesen Aktivitätsparameter bei der Darstellung der Versuche unter Substanzeinfluss im Ergebnisteil gewährleistet dem Leser zudem eine bessere

Übersichtlichkeit der Daten.

In der dritten Etablierungsgruppe wurde im Anschluss an die Untersuchung der lokomotorischen Aktivität im *Open Field* zudem das Lernverhalten bulbektomierter Tiere im *one trial step-through passive avoidance task* getestet. In diesem zweitägigen Versuch wird das konditionierte Lernvermögen von Tieren untersucht. Anhand dieses Versuchs sollte im Rahmen der Etablierungsphase der Olfaktorischen Bulbektomie gezeigt werden, dass die olfaktorische Bulbektomie das Lernvermögen bei der Ratte beeinflusst und bulbektomierte Tiere in diesem Modell ein anderes Verhalten als scheinoperierte Tiere aufweisen.

Die Testapparatur (Ugo Basile, Föhr Medical Instruments) bestand aus einer dunklen, schwarzen und einer beleuchteten, weißen Kammer (jeweils 22 x 21 cm). Die beiden Kammern waren durch eine Tür (6 x 6,5 cm) miteinander verbunden. Der Boden der Kammer bestand aus Gitterrosten, über die die Tiere einen schwachen aversiven Stimulus im Bereich der Fußsohlen erhalten konnten.

An der Messeinrichtung wurden für den Versuch folgende Parameter eingestellt:

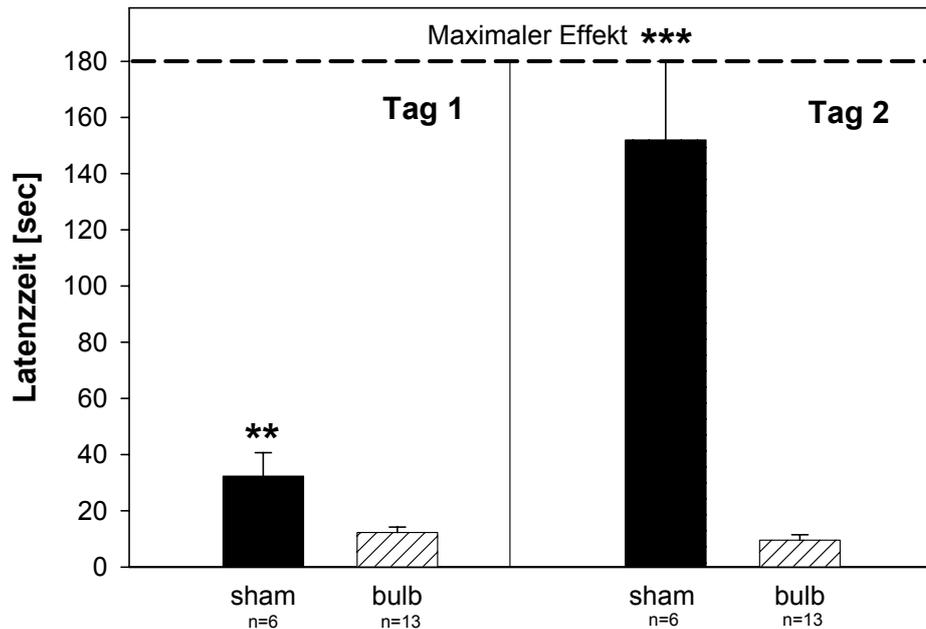
1. *Door delay* (Verzögerung, mit der die Tür nach Übertritt des Tieres von der dunklen in die helle Kammer schließt): 10 sec
2. *Shock duration* (Dauer des in der dunklen Kammer verabreichten aversiven Stimulus im Bereich der Fußsohlen): 5 sec
3. *Shock intensity* (Stärke des in der dunklen Kammer verabreichten aversiven Stimulus): 1 mA
4. *Cut off time* (obere Grenze der Versuchsdauer, bis zu der das Tier die dunkle Kammer betreten haben sollte): 3 min

Am ersten der beiden Versuchstage wurden die Tiere eine Stunde vor Versuchsbeginn in den vollständig verdunkelten Versuchsraum verbracht. In diesem Versuchsraum verblieben die Tiere bis zur Beendigung des Versuches am zweiten Versuchstag.

Am ersten Versuchstag wurden die Tiere einzeln bei zunächst geschlossener Tür in die helle, beleuchtete Kammer eingesetzt, wobei der Kopf des Tieres in die entgegengesetzte Richtung zur Mitteltür zeigte. Die Tür wurde 10 sec nach dem Einsetzen geöffnet und die Ratte konnte durch die Mitteltür in die dunkle, unbeleuchtete Kammer gelangen. Nach Eintritt in die dunkle Kammer schloss sich die Mitteltür automatisch und das Tier erhielt über das Gitterrost für insgesamt 5 sec einen aversiven Stimulus im Bereich der Fußsohlen von 1 mA. Die Zeit [sec] bis zum Eintritt in die dunkle Kammer wurde notiert (= Latenzzeit Tag 1). Unmittelbar nach Beendigung des aversiven Stimulus wurde das Tier aus der dunklen Kammer

herausgeholt und in den Heimkäfig zurückgesetzt. Damit war der erste Versuchstag beendet. Fand innerhalb von drei Minuten kein Übertritt von der hellen in die dunkle Kammer statt, wurde der Versuch für dieses Tier abgebrochen. Am zweiten Versuchstag wurden die Tiere einzeln wie am ersten Tag in die helle Kammer eingesetzt. Im Gegensatz zum ersten Versuchstag war die Mitteltür jedoch geöffnet. Die Versuchsdauer betrug am zweiten Tag drei Minuten und es wurde die Zeit gestoppt, bei der das Tier zum ersten Mal von der hellen in die dunkle Kammer übertrat (= Latenzzeit Tag 2). Im Gegensatz zum ersten Tag erhielten die Tiere nach Übertritt in die dunkle Kammer allerdings keinen aversiven Stimulus. Neben der Latenzzeit Tag 2 wurde die Gesamtaufenthaltszeit in der hellen Kammer und die Anzahl der Übertritte zwischen den Kammern notiert. Nach Ablauf der Versuchsdauer wurde das Tier aus der Testapparatur herausgeholt und in den Heimkäfig gesetzt. Ziel dieses Tests ist es, einen Lerneffekt bei Tieren zu beurteilen. Tiere, die am ersten Tag durch negative Konditionierung in Form eines aversiven Stimulus in der dunklen Kammer gelernt haben, selbige zu meiden, betreten die dunkle Kammer am zweiten Versuchstag mit einer deutlich höheren Latenzzeit und verbringen deutlich mehr Zeit in der hellen, aversiven Kammer. Der maximale Lerneffekt liegt in diesem Modell bei einer Latenzzeit am zweiten Tag von 180 sec (= Gesamtdauer des Versuches). Tiere, die ein beeinträchtigtes Lernverhalten aufweisen, betreten die dunkle Kammer am zweiten Tag hingegen mit einer deutlich geringeren Latenzzeit.

Am ersten Tag zeigte sich zwischen den beiden Operationsgruppen (scheinoperiert vs. bulbektomiert) der dritten Etablierungsgruppe ein signifikanter Unterschied in der Latenzzeit, nach der die dunkle Kammer von der hellen Kammer aus betreten wurde (siehe Abb. 10). Die dunkle Kammer, in der die Tiere an diesem Tag einen aversiven Stimulus erhielten, wurde von den scheinoperierten Tieren nach  $32,3 \pm 8,4$  sec betreten. Die bulbektomierten Tiere betraten die Tiere bereits nach einer Latenzzeit von  $12,3 \pm 1,9$  sec. Am zweiten Tag lag die Latenzzeit der scheinoperierten Tiere mit  $152,0 \pm 28,0$  sec signifikant höher als am ersten Tag. Fünf von sechs Tieren betraten die dunkle Kammer überhaupt nicht. Die bulbektomierten Tiere betraten die dunkle Kammer hingegen mit einer ähnlichen Latenzzeit wie am ersten Tag ( $9,5 \pm 1,9$  sec), offensichtlich ohne sich an den aversiven Stimulus vom Vortag zu erinnern. Im Gegensatz zu den scheinoperierten Tieren, bei denen am zweiten Tag nur eins von sechs Tieren von der hellen in die dunkle Kammer lief, lag die Anzahl der Übertritte bei den bulbektomierten Tieren bei durchschnittlich drei Übertritten. Die Anzahl reichte von einem Übertritt bis zu sieben Übertritten zwischen den beiden Kammern (Anzahl der Übertritte nicht graphisch dargestellt).



**Abb. 10:** Einfluss der Olfaktorischen Bulbektomie auf das Lernverhalten im Two Compartment Passive Avoidance Test

Die Ergebnisse sind als MW  $\pm$  SEM dargestellt. Der maximale Effekt wird erreicht, wenn ein Tier die dunkle Kammer innerhalb der Beobachtungszeit (=180 sec) nicht betritt.

\*\* :  $p < 0,01$  \*\*\* :  $p < 0,001$  scheinoperiert (sham) vs. bulbektomiert (bulb) (student's t-Test)

Es konnte somit gezeigt werden, dass zwischen den scheinoperierten und den bulbektomierten Tieren ein deutlicher Unterschied in diesem Modell besteht. Dies korreliert mit Angaben aus der Literatur, die den bulbektomierten Tieren eine Beeinträchtigung des Lernvermögens in diesem Modell zusprechen (CAIRNCROSS et al. 1979; KELLY et al. 1997; LEONARD 1984; VAN RIEZEN et al. 1977). Das dementsprechend etablierte Modell wurde nachfolgend in einer der drei Hauptversuchsgruppen zur Substanztestung eingesetzt (siehe 3.2.3.3). In diesem Modell spielt ein substanzbedingter, lokomotorisch stimulierender Einfluss möglicherweise eine geringere Rolle bei den bulbektomierten Tieren als dies im zuvor beschriebenen *Open Field* Test der Fall ist. Die Möglichkeit einer falsch negativen antidepressiven Wirkung lokomotorisch stimulierender Substanzen, die sich in Form einer mangelnden Attenuierung der Hyperaktivität bulbektomierter Tiere im *Open Field* darstellen könnte, könnte durch Testung dieser Substanzen im *Two Compartment Passive Avoidance Task* vermutlich reduziert werden.

Obwohl der dargestellte Lernversuch geeignet schien, einen Unterschied zwischen scheinoperierten und bulbektomierten Tieren aufzuzeigen, wurde in den Verhaltensuntersuchungen unter Substanzeinfluss in der Hauptversuchsphase der

Schwerpunkt auf die Erfassung des zuvor beschriebenen Parameters der lokomotorischen Aktivität gelegt. Diese war methodisch einfacher zu erfassen als die Überprüfung des Lernens in dem aufwändigen *Passive Avoidance Test*.

#### Erfassung des Körpergewichts operierter Ratten in der Etablierungsphase der Olfaktorischen Bulbektomie

Neben der Überprüfung der lokomotorischen Aktivität und des Lernverhaltens bulbektomierter Tiere wurde in der Etablierungsphase das Körpergewicht bulbektomierter und scheinoperierter Tiere erfasst. Die Entwicklung des Körpergewichts kann als Parameter gewertet werden, der Rückschlüsse auf das allgemeine Wohlbefinden der Tiere zulässt. Die Beobachtung der Entwicklung des Körpergewichts der operierten Ratten diente so zur weiteren Charakterisierung der durch die Olfaktorische Bulbektomie induzierten Veränderungen. Die Entwicklung des Körpergewichts [g] von scheinoperierten und operierten Ratten (n=12 bei den scheinoperierten und n=26 bei den bulbektomierten Tieren) wurde in der dritten Etablierungsgruppe erfasst und ausgewertet (siehe Tab. 11 und Abb. 11). Ziel war es, einen potenziellen Unterschied in der Gewichtsentwicklung der scheinoperierten Tiere und der bulbektomierten Tiere darzustellen.

In der Hauptversuchsphase sollte zudem eine Aussage über die Verträglichkeit der in der Olfaktorischen Bulbektomie subchronisch applizierten Adenosinrezeptor-Antagonisten getroffen werden. Zu diesem Zweck wurde in der Hauptversuchsphase die tägliche Gewichtsentwicklung der mit Substanz behandelten Tiere mit der Körpergewichtskurve der mit Vehikel behandelten Tiere verglichen. Diese Ergebnisse sind entsprechend im Ergebnisteil unter 3.2.3.4 dargestellt.

Das Körpergewicht der Ratten [g] der dritten Etablierungsgruppe wurde am Tag der Operation und in wöchentlichem Abstand bis drei Wochen nach der Operation im Tierhalteraum erfasst. Dazu wurden Tierwaagen von Sartorius AG, Göttingen verwendet.

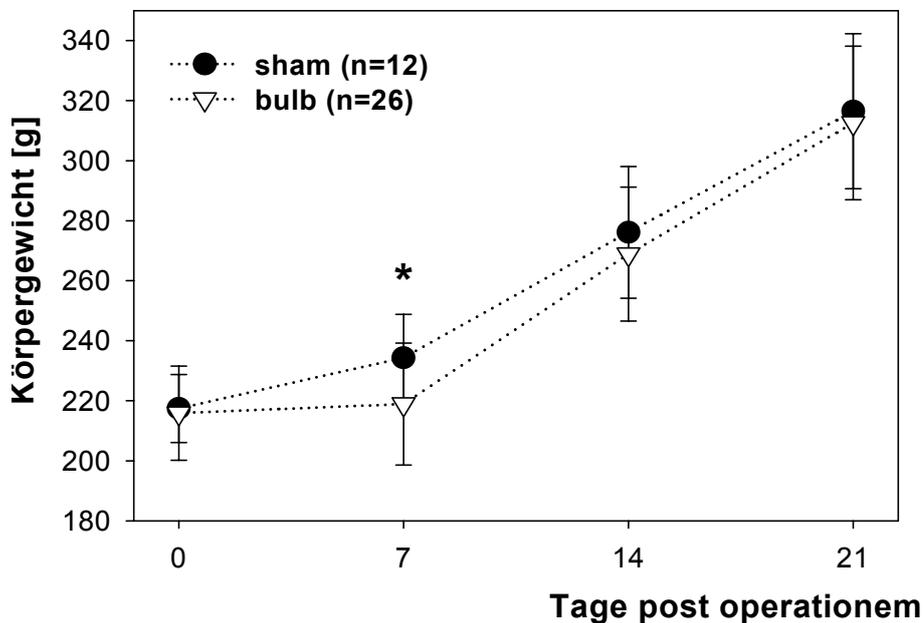
Vor der Operation unterschieden sich die absoluten Körpergewichte der zu operierenden Tiere der dritten Etablierungsgruppe nicht signifikant voneinander. Eine Woche nach der Operation wiesen die bulbektomierten Tiere im Vergleich zu den scheinoperierten Tieren ein signifikant geringeres absolutes Körpergewicht auf ( $p=0,033$ ). Bei den beiden weiteren Messzeitpunkten zwei und drei Wochen nach der Operation war kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Operationsgruppen mehr festzustellen (siehe Tab. 11). Der Gewichtsverlauf der bulbektomierten Tiere näherte sich dem der scheinoperierten Tiere an, wobei er über den gesamten Beobachtungszeitraum unterhalb der Gewichtskurve der scheinoperierten Ratten lag.

Eine graphische Darstellung des Gewichtsverlaufes post operationem kann der Abb. 11 entnommen werden.

**Tab. 11:** Einfluss der Olfaktorischen Bulbektomie an der Ratte auf die Entwicklung des absoluten Körpergewichts post operationem

	sham (n=12)		bulb (n=26)	
	KGW [g]	KGW [%]	KGW [g]	KGW [%]
vor Operation	217,4 ± 11,3	100	213,8 ± 16,8	100
1 Wo post op	234,3 ± 14,5	108	215,2 ± 17,7 *	101
2 Wo post op	276,1 ± 21,9	127	258,3 ± 19,0	121
3 Wo post op	316,5 ± 25,8	146	299,2 ± 23,4	140

Das absolute Körpergewicht der scheinoperierten und bulbektomierten Tiere der dritten Etablierungsgruppe zum Zeitpunkt der Operation bzw. zu drei verschiedenen Zeitpunkten nach der Operation ist in g KGW (MW ± SD) angegeben. Statistisch wurden die Daten mit Hilfe einer Two Way ANOVA mit anschließendem Tukey Test untersucht (\*: p<0,05 vs. sham zum jeweiligen Messzeitpunkt)



**Abb. 11:** Einfluss der Olfaktorischen Bulbektomie auf die Entwicklung des Körpergewichts post operationem

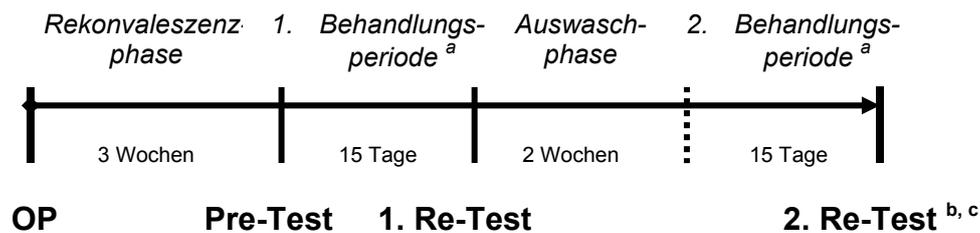
Die Tiere der dritten Etablierungsgruppe wurden am Tag der Operation und darauffolgend im wöchentlichen Abstand gewogen. Die Körpergewichte [g] sind in der Abbildung als MW ± SD dargestellt. Die Gruppengröße beträgt n=12 bei den scheinoperierten (sham) und n=26 bei den bulbektomierten (bulb) Tieren.

\*: p<0,05 vs. sham zum jeweiligen Messzeitpunkt (Two Way ANOVA mit anschließendem Tukey Test)

Die Ergebnisse in dieser Etablierungsgruppe zeigen einen deutlichen Einfluss der Olfaktorischen Bulbektomie auf die Entwicklung des Körpergewichts auf. SLOTKIN et al. (1999) sprechen in diesem Zusammenhang von einem *lesioning effect*, der sich bedingt durch den im Vergleich zur Scheinoperation schwerwiegenderen chirurgischen Eingriff und die mit der Bulbektomie verbundenen weitreichenden und langanhaltenden Veränderungen neurochemischer, neuroendokriner und neuroimmuner Parameter (LEONARD und TUIE 1981) in Form einer geringeren Körpergewichtszunahme der bulbektomierten Tiere post operationem darstellt. Dies konnte in unseren Untersuchungen bestätigt werden.

### **Hauptversuchsphase der Olfaktorischen Bulbektomie als Depressionsmodell**

Entsprechend der Erkenntnisse aus der Etablierungsphase wurde für die Hauptversuchsphase das aus der Abb. 12 ersichtliche Vorgehen ausgewählt:



**Abb. 12:** Versuchsschema in der Hauptversuchsphase bei der Olfaktorischen Bulbektomie an der Ratte

Nach diesem Versuchsschema wurden die Verhaltensuntersuchungen in den drei Hauptversuchsgruppen unter Substanzeinfluss durchgeführt. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sind im entsprechenden Ergebnisteil dieser Arbeit dargestellt.

- <sup>a</sup> Innerhalb der Behandlungsperioden mit den drei in dieser Arbeit untersuchten Adenosinrezeptor- Antagonisten wurde zusätzlich die Entwicklung des Körpergewichts erfasst und ausgewertet.
- <sup>b</sup> In der zweiten Hauptversuchsgruppe wurde im Anschluss an den 2. Re-Test im Open Field das Lernverhalten im Passive Avoidance Test untersucht.
- <sup>c</sup> Im 2. Re-Test wurde der Boden der Testapparatur zusätzlich zu den Wänden mit Aluminiumfolie ausgelegt. Im Pre-Test und im 1. Re-Test waren hingegen nur die Wände der Testapparatur mit Aluminiumfolie verkleidet.

Die Tiere wurden wie zuvor beschrieben mit Hilfe der optimierten chirurgischen Methode bulbektomiert und ihre lokomotorische Aktivität nach einer dreiwöchigen Rekonvaleszenzphase in einem ausreichend aversiven *Open Field* überprüft. Dieser Vorversuch (Pre-Test) sollte der Zusammenstellung im Mittel gleichmäßig aktiver

Behandlungsgruppen für die jeweilige Hauptversuchsgruppe dienen. Im Anschluss an diesen Pre-Test wurden die Tiere in zwei aufeinanderfolgenden Behandlungsperioden über einen 15tägigen Zeitraum mit Referenzsubstanzen bzw. mit Adenosinrezeptor-Antagonisten behandelt. Dabei wurde die Zuordnung der Substanzen zu den jeweiligen Behandlungsphasen randomisiert vorgenommen. Am Ende jedes Behandlungszeitraumes wurde die Wirkung der Substanzen auf die lokomotorische Aktivität im *Open Field* (Re-Test, Hauptversuche) bewertet. In einer der drei Gruppen wurde neben dem Parameter lokomotorische Aktivität auch der Parameter des Lernens als Endpunkt im Modell der Olfaktorischen Bulbektomie ausgewählt. Darüber hinaus wurde die Entwicklung des Körpergewichts während der Behandlung mit Adenosinrezeptor-Antagonisten in allen Hauptversuchsgruppen erfasst und ausgewertet.

#### Verhaltensuntersuchungen in der Hauptversuchsphase der Olfaktorischen Bulbektomie

Die jeweiligen Hauptversuchsgruppen wurden drei Wochen post operationem im sog. Pre-Test vor Behandlungsbeginn im *Open Field* auf ihre lokomotorische Aktivität hin getestet. Der Pre-Test diente zum einen durch den Nachweis einer signifikanten Hyperaktivität der bulbektomierten Tiere der Modellbestätigung, zum anderen diente er der Zusammenstellung randomisierter Behandlungsgruppen in der Hauptversuchsphase. Ziel dieser Randomisierung lag in der gleichmäßigen Verteilung der lokomotorischen Aktivität in den jeweiligen Behandlungsgruppen (Substanz resp. Vehikel) vor Beginn der Behandlung. Geringfügige Unterschiede im Mittel der lokomotorischen Aktivität waren mit Hilfe dieser Randomisierung allerdings nicht auszuschließen. Die Tiere wurden während der Hauptversuchsphasen ebenfalls in 3er-Gruppen gehalten und auch im Falle einer großen Variationsbreite der lokomotorischen Aktivität innerhalb einer 3er-Gruppe nicht separiert. Erkrankte Tiere oder bulbektomierte Tiere, die in diesem Pre-Test durch eine drastisch herabgesetzte Aktivität auffällig wurden, wurden von der weiteren Versuchsdurchführung ausgeschlossen und nicht mit Substanzen behandelt (Ausreißerkontrolle, siehe dazu 3.1.3.4). Es handelte sich in allen drei Hauptversuchsgruppen allerdings nur um wenige Einzeltiere, die auf diese Art und Weise selektiert wurden (siehe dazu Tab. 27, Anhang). Diese Tiere wurden im Anschluss an den Pre-Test auf die Vollständigkeit der olfaktorischen Bulbektomie hin überprüft. Oft waren bei diesen im Pre-Test auffälligen hypolokomotorischen bulbektomierten Ratten Bulbusreste oder eine Schädigung des präfrontalen Cortex zu beobachten. Die Pre-Tests der drei Hauptversuchsgruppen sind im Ergebnisteil weiter ausgeführt (siehe 3.2.3.1).

Die jeweiligen Substanz- resp. Vehikelgruppen wurden wie zuvor beschrieben anhand

der Pre-Test Ergebnisse randomisiert zusammengestellt. Dabei erhielten die Tiere innerhalb eines Käfigs jeweils die gleiche Behandlung (Substanz resp. Vehikel). Die Anzahl der ursprünglich scheinoperierten Tiere ( $n=12$ ) und bulbektomierten Tiere ( $n\geq 30$ ) sollte in der Substanzgruppe resp. Vehikelgruppe bei den scheinoperierten Tieren eine Gruppengröße von jeweils  $n=6$ , bei den bulbektomierten Tieren eine Größe von  $n=12$  ermöglichen, um eine ausreichende Aussagekraft in den Versuchen der Substanztestungsphase zu erzielen. Die genaue Anzahl der Tiere bei den in der jeweiligen Behandlungsperiode durchgeführten Versuchen sind im Ergebnisteil an entsprechender Stelle angegeben.

Die Behandlung der Tiere fand im Tierhalteraum der Tiere täglich morgens zur gleichen Uhrzeit statt. Die Lösungen resp. Verreibungen der jeweiligen Substanz wurden jeden Tag frisch zubereitet (Zubereitung siehe unter 3.1.2). Die Vehikelgruppe wurde mit dem Vehikel allein behandelt. Die Tiere wurden täglich vor der Behandlung im Tierhalteraum gewogen und das aktuelle Applikationsvolumen (Applikationsvolumen siehe unter 3.1.2) berechnet und entsprechend appliziert. Bei 2 x täglicher Applikation wurde das am Morgen festgestellte Körpergewicht der Tiere zu Grunde gelegt.

In drei verschiedenen Hauptversuchsgruppen wurden zum einen zwei Standard-Antidepressiva (Imipramin und Amitriptylin) und zum anderen drei Adenosinrezeptor-Antagonisten mit unterschiedlicher Selektivität zum Adenosin- $A_{2A}$  Rezeptor getestet (Theophyllin, elbion Substanz A und KW-6002) subchronisch appliziert (siehe Tab. 12). Nach 15tägiger Behandlungsdauer mit den in Tab. 13 angeführten Substanzen wurde die lokomotorische Aktivität der Tiere im *Open Field* getestet. Die Behandlung vor dem *Open Field* Test mit der jeweiligen Substanz resp. Vehikel fand 2 h vor der Testung der Tiere statt. Fanden noch weitere Verhaltensuntersuchungen wie das *Passive Avoidance Task* statt, wurde die Behandlung fortgesetzt. Nach Abschluss der Verhaltensuntersuchungen wurde den Tieren am letzten Behandlungstag Blut zur Bestimmung der Plasmaspiegel der eingesetzten Testsubstanzen abgenommen (siehe 3.2.3.5).

Aufgrund des hohen operativen und zeitlichen Aufwandes dieses komplexen Modells durchliefen die operierten Tiere im Idealfall jeweils zwei Behandlungsperioden mit einer Auswaschzeit der ersten Substanz von mindestens 14 Tagen (siehe dazu das in Abb. 12 dargestellte Versuchsschema in der Hauptversuchsphase der Olfaktorischen Bulbektomie, welches in dieser Arbeit verwendet wurde). Ausschlaggebend für die Durchführung einer zweiten Behandlungsperiode innerhalb einer Hauptversuchsgruppe war ein ungestörtes Allgemeinbefinden der operierten Tiere. Um ein Beeinflussung der lokomotorischen Aktivität durch Habituationseffekte im 2. Re-Test und der damit dritten Exposition im *Open Field* zu minimieren, wurde der Boden der Testapparatur bei der

Erfassung der lokomotorischen Aktivität, die sich an die zweite Behandlungsperiode anschloss, zusätzlich zu den Außenwänden ebenfalls mit Aluminiumfolie verkleidet.

Ergänzend für die zweite Hauptversuchsgruppe wurde das Lernvermögen im *Two Compartment Passive Avoidance Task* unter Einfluss des selektiven Adenosinrezeptor-Antagonisten KW-6002 bewertet. Die Testdurchführung entsprach dabei dem zuvor in der Etablierungsphase ausführlich beschriebenen Versuchsaufbau. Der Versuch fand einen Tag nach Messung der lokomotorischen Aktivität während der zweiten Behandlungsperiode der zweiten Hauptversuchsgruppe im *Open Field* statt. Die Tiere wurden in den Versuchsraum verbracht, der mindestens eine Stunde vor Versuchsbeginn verdunkelt wurde. Die Behandlung der Tiere mit KW-6002 fand an den beiden Versuchstagen ebenfalls in dem Versuchsraum statt. Die Ergebnisse des unter Einfluss von KW-6002 sind unter 3.2.3.3 dargestellt.

**Tab. 12:** Hauptversuchsgruppen bei der Olfaktorischen Bulbektomie an der Ratte

	<b>1. Behandlungsperiode</b> (Substanz / Vehikel)	<b>2. Behandlungsperiode</b> (Substanz / Vehikel)
1. Hauptversuchsgruppe	elbion Substanz A / HEC	Imipramin / NaCl
2. Hauptversuchsgruppe	Amitriptylin / NaCl	KW-6002 / HEC
3. Hauptversuchsgruppe	Theophyllin / HEC	-

**Tab. 13:** Dosierung, Prämedikationszeiten und Applikationsform der in der Olfaktorischen Bulbektomie verwendeten Substanzen

<b>Substanz</b>	<b>Dosierung (mg/kg)</b>	<b>Vehikel</b>	<b>Applikations- form</b>	<b>Prämedikations- zeit (h)</b>
Imipramin	10	0,9 % NaCl	i.p.	2
Amitriptylin	10	0,9 % NaCl	i.p.	2
Theophyllin	30	0,5 % HEC	p.o.	2
elbion Substanz A	30 (2 x tgl.)	0,5 % HEC	p.o.	2
KW-6002	10	0,5 % HEC	p.o.	2

Erfassung des Körpergewichts operierter Ratten unter Substanzeinfluss in der Hauptversuchsphase der Olfaktorischen Bulbektomie

Die Gewichtsentwicklung unter Substanzeinfluss wurde während der Behandlungsperioden mit Adenosinrezeptor-Antagonisten zur Beurteilung der Verträglichkeit dieser Substanzen in pharmakologischen Dosierungen bei

Mehrfachgabe erfasst. Um dem Unterschied im absoluten Körpergewicht zwischen den scheinoperierten und den bulbektomierten Tieren Rechnung zu tragen, der anhand der Erkenntnisse aus der Etablierungsphase deutlich aufgezeigt werden konnte, wurde dabei nicht mehr das absolute sondern das relative Körpergewicht [%] ausgewertet. Das Körpergewicht [g] vor der jeweils ersten Behandlung mit Substanz resp. Vehikel (= *pre-dose*) entspricht dabei 100 %. Die darauffolgenden Werte beziehen sich jeweils auf diesen Ausgangswert. Das Körpergewicht der Tiere während der Behandlungsperiode wurde täglich vor der Substanzapplikation im Tierhalteraum erfasst. Bei 2 x täglicher Applikation, wie es während der Behandlungsperiode mit elbion Substanz A der Fall war, wurde für die Auswertung das am Morgen erfasste Körpergewicht zugrunde gelegt. Die Ergebnisse der Körpergewichtsentwicklung unter Einfluss der Testsubstanzen sind im Ergebnisteil unter 3.2.3.4 dargestellt.

#### Blutabnahme zur Bestimmung der Plasmaspiegel der verwendeten Referenz- und Testsubstanzen in der Hauptversuchsphase der Olfaktorischen

Am letzten Tag der jeweiligen Behandlungsperiode wurde den substanzbehandelten scheinoperierten und bulbektomierten Tieren zwei Stunden nach der letzten Applikation Blut zur Plasmagewinnung entnommen. Dazu wurde der retroorbitale Venenplexus der Tiere unter Isoba® Isofluran (Essex Pharma GmbH, München) Narkose mit einer heparinisierten Glaskapillare (REF19-451Sarstedt) punktiert und jedem Tier wurde etwa 0,5 ml Blut entnommen. Das Blut wurde in Lithium-heparinisierten 1,5 ml Eppendorff Tubes® ungerinnbar gemacht. Das Plasma wurde 30 min nach der Blutabnahme durch Zentrifugation (10 min mit 2000 U/min bei 4 °C) abgetrennt. Die im Plasma jedes Tieres vorhandene Konzentration der jeweiligen Substanz wurden anschließend gaschromatographisch bestimmt. Damit sollte eine ausreichende Exposition der subchronisch behandelten Tiere zum Zeitpunkt der durchgeführten Verhaltensuntersuchungen nachgewiesen werden.

#### *3.1.3.4 Versuchsauswertung und Statistik*

In der Arbeit wurden insgesamt drei verschiedene Modelle verwendet: Zum einen die Haloperidol-induzierte Katalepsie bei Maus und Ratte als Screening-Modell für eine antikataleptische Wirksamkeit und die beiden Depressionsmodelle, der *Forced Swim Test* bei der Maus und die Olfaktorische Bulbektomie bei der Ratte. Die Versuchstiere wurden bei den beiden erstgenannten Modellen lediglich einmalig verwendet, wohingegen die Ratten in der Olfaktorischen Bulbektomie unter Substanzeinfluss für zwei Versuchsdurchgänge im *Open Field* eingesetzt wurden. Zwischen diesen beiden Durchgängen lag eine zweiwöchige Auswaschphase und die einzelnen Durchgänge wurden als separate Versuche ausgewertet.

In einer der drei Hauptversuchsgruppen wurde im Anschluss an die Messung der Aktivität im *Open Field* zudem eine Evaluierung des Lernvermögens im *Passive Avoidance Task* unter Substanzeinfluss durchgeführt (zur genauen Versuchsdurchführung siehe 3.1.3.3.).

Bei der Haloperidol-induzierten Katalepsie an der Maus wurden bei den drei in dieser Arbeit untersuchten Adenosinrezeptor-Antagonisten jeweils n=10 Tiere in der jeweiligen Dosisgruppe und n=6 Tiere in der Kontrollgruppe verwendet. Bei der Ratte wurden in der jeweiligen Dosisgruppe n=10 Tiere und in der Kontrollgruppe n=12 Tiere eingesetzt. Entsprechende Abweichungen von diesen Zahlen sind im jeweiligen Ergebnisteil erwähnt. Die Anzahl der Versuchstiere in den jeweiligen Behandlungsgruppen betrug im Schwimmtest Maus n=12. Bei der Olfaktorischen Bulbektomie wurden für die Hauptversuchsphase n=12 Tiere scheinoperiert und mindestens n=30 Tiere bulbektomiert. Damit sollte in der jeweiligen Behandlungsgruppe (Substanz resp. Vehikel) jeweils eine statistisch aussagekräftige Gruppengröße von n=6 (scheinoperiert) bzw. n=12 (bulbektomiert) gewährleistet werden. Tiere, die in ihrem Allgemeinbefinden beeinträchtigt waren oder keine Hyperaktivität zeigten (bulbektomierte Tiere, deren lokomotorische Aktivität im Pre-Test unter dem 25 % Quartil der Aktivität der scheinoperierten Tiere lag), wurden nicht in die Versuchsauswertung einbezogen. Ergab sich in der nach Abschluss der Verhaltensuntersuchungen durchgeführten olfaktorischen Kontrolle der Gehirne der bulbektomierten Tiere eine unvollständige Entfernung der Bulbi olfactorii oder eine massive Schädigung des präfrontalen Cortex, wurden diese Tiere ebenfalls von der Auswertung ausgeschlossen. Darüber hinaus kam es in seltenen Fällen zu technischen Problemen während der computergestützten Versuchsaufzeichnung, die eine Auswertung des jeweiligen Tieres verhinderte. Abweichungen von den ursprünglich angestrebten Tierzahlen sind an entsprechender Stelle erwähnt. Die in den jeweiligen Verhaltensuntersuchungen verwendeten Tiere im Rahmen der Olfaktorischen Bulbektomie sind jeweils an entsprechender Stelle im Ergebnisteil erwähnt. Eine Übersicht über die in den Hauptversuchsgruppen eingesetzten Ratten im Modell der Olfaktorischen Bulbektomie findet sich darüber hinaus im Anhang (siehe Tab. 27, Anhang).

Die statistische Auswertung erfolgte mit Hilfe von SigmaStat®, statistischer Software, Version 2.03. Bei den in der Haloperidol-induzierten Katalepsie gemessenen *cataleptic scores* wurde aufgrund der vorliegenden Daten aus vorher durchgeführten Versuchen von einer parametrischen Verteilung der Werte ausgegangen. Daher wurden hier der Mittelwert der Gruppen und der Standardfehler des arithmetischen Mittels angegeben. Die Signifikanz der Ergebnisse wurde mit einer einfaktorischen Varianzanalyse

(ANOVA) mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von  $p < 0,05$  berechnet. Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen wurden zusätzlich durch einen multiplen Vergleichstest (Tukey Test) statistisch verifiziert. Ausgehend von einer signifikanten antikataleptischen Wirksamkeit in diesem Screening-Modell wurden Anhaltspunkte für die nachfolgend im *Forced Swim Test* und in der Olfaktorischen Bulbektomie eingesetzten Dosierungen gewonnen. Eingehendere Erklärungen diesbezüglich finden sich im entsprechenden Ergebnisteil (siehe 3.2.1).

Bei dem im Schwimmtest Maus evaluierten Verhaltensparameter lag keine Normalverteilung der Werte vor. Daher wurden die Immobilitätszeiten als Median mit der 25. / 75. Perzentile dargestellt. Die Signifikanz der Ergebnisse wurde mit der Rangvarianz-Analyse nach Kruskal Wallis ANOVA und anschließendem Dunn's Test mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von  $p < 0,05$  bestimmt.

Bei den in den verhaltenspharmakologischen Untersuchungen der Olfaktorischen Bulbektomie gemessenen Parametern wurde sowohl bei der lokomotorischen Aktivität [sec] im *Open Field* als auch bei der Latenzzeit [sec] im *Passive Avoidance Task* von einer Normalverteilung der Werte ausgegangen, so dass hier wiederum der Mittelwert der Gruppen und der Standardfehler des arithmetischen Mittels angegeben wurden. Die Signifikanz der lokomotorischen Aktivität im Pre-Test vor Behandlungsbeginn wurde mit einem student's t-Test (bulbektomiert vs. scheinoperiert) mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von  $p < 0,05$  berechnet. Bei den unter Substanz Einfluss durchgeführten Untersuchungen der lokomotorischen Aktivität im *Open Field* wurde zur Berechnung signifikanter Unterschiede in den jeweiligen Behandlungs-/Operationsgruppen eine zweifaktorielle Varianzanalyse (Two Way ANOVA, Faktor A: Operationsgruppe (sham / bulb), Faktor B: Behandlungsgruppe (Vehikel / Substanz) mit anschließendem Tukey Test verwendet. Die Latenzzeiten [sec] der operierten Ratten im *Passive Avoidance Task* wurden bei den unbehandelten operierten Tieren mit Hilfe eines student's t-Test, die der mit KW-6002 resp. Vehikel behandelten operierten Tiere mit Hilfe einer Two Way ANOVA (Faktor A: Operationsgruppe, Faktor B: Behandlungsgruppe) und anschließendem Tukey Test auf statistisch signifikante Unterschiede hin untersucht. Der Einfluss der Olfaktorischen Bulbektomie auf das Körpergewicht [g] der Ratten über einen Zeitraum von drei Wochen post operationem wurde mit Hilfe einer Two Way ANOVA (Faktor A: Operationsgruppe, Faktor B: Messzeitpunkt) und anschließendem Tukey Test ausgewertet. Die Ergebnisse der Gewichtsentwicklung der operierten Ratten unter Einfluss der drei eingesetzten Adenosinrezeptor-Antagonisten sind als Mittelwert  $\pm$  des Standardfehlers des arithmetischen Mittels des relativen Körpergewichtes [%] (absolutes Körpergewicht [g] zu Behandlungsbeginn = 100 %) dargestellt. Die Berechnung der Signifikanz erfolgte mittels einer zweifaktoriellen Varianzanalyse (Two Way ANOVA, Faktor A:

Behandlungsgruppe, Faktor B: Messzeitpunkt) und Tukey Test.

Alle Graphiken wurden mit Hilfe von SigmaPlot®, graphischer Software, Version 7.0 gezeichnet. Mit Ausnahme der Schwimmtests und der Entwicklung des Körpergewichts von Ratten nach der Olfaktorischen Bulbektomie und unter Substanzeinfluss wurden die Ergebnisse als Mittelwerte der einzelnen Versuchsgruppen und dazugehörigem Standardfehler des arithmetischen Mittels als Säulendiagramme dargestellt. Die Ergebnisse der Schwimmtests wurden als box plots, die der Körpergewichtsentwicklung als Liniendiagramme dargestellt.