

Aus dem Institut für
Tierschutz, Tierverhalten und Labortierkunde
des Fachbereiches Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin

**Untersuchung zur Beurteilung der Belastung von Laborratten
durch einfache Manipulationen, an den Parametern
Kortikosteron und Prolaktin**

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Veterinärmedizin
an der
Freien Universität Berlin

vorgelegt von
GERALD MENDE
Tierarzt aus Darfeld

Berlin 1999

Journal Nr. 2346

Gedruckt mit Genehmigung
des Fachbereiches Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin

Dekan:	Univ.-Prof. Dr. K. Hartung
Erster Gutachter:	Univ.-Prof. Dr. N.-C. Jühr
Zweiter Gutachter:	Prof. Dr. W. Scharmann

Tag der Promotion: 16.12.1999

Meinen Eltern

sowie

Meiner Patentante

und

Ihrem Mann

Inhaltsverzeichnis

	Seite
1 Einleitung	1
2 Literaturübersicht	2
2.1 Überblick zu Belastungen von Versuchstieren.....	2
2.1.1 Streß.....	4
2.1.1.1 Stressoren	8
2.1.1.2 Streßreaktion.....	9
2.2 Hormonelle Antwort auf Belastungen.....	10
2.2.1 Hormone als Streßindikatoren.....	11
2.2.1.1 Prolaktin	11
2.2.1.2 Kortikosteron.....	14
2.3 Reaktionen von Versuchstieren auf unterschiedliche Manipulationen	16
2.3.1 Nichtinvasive Manipulationen	16
2.3.1.1 Handling	16
2.3.1.2 Wiegen.....	18
2.3.1.3 Fixierung	19
2.3.1.4 Transport	20
2.3.2 Invasive Manipulationen.....	22
2.3.2.1 Verabreichungen.....	22
2.3.2.2 Kennzeichnungen.....	23
2.3.2.3 Blutentnahme	25
2.3.2.4 CO ₂ -Anästhesie.....	25
2.4 Zielsetzung	27
3 Material und Methode	29
3.1 Tiere.....	29
3.1.1 Vorversuche	29
3.1.2 Hauptversuche	29
3.2 Haltungsbedingungen.....	29
3.2.1 Vorversuche	30
3.2.2 Hauptversuche	30

	Seite
3.3 Vorversuche.....	31
3.3.1 Erster Vorversuch.....	31
3.3.1.1 Inhalationsnarkose	31
3.3.1.2 Blutentnahme	32
3.3.1.3 Probenaufbereitung.....	33
3.3.2 Weitere Vorversuche.....	33
3.3.2.1 Anheben.....	34
3.3.2.2 Wiegen.....	34
3.3.2.3 Intramuskuläre Injektion	35
3.3.3 Abschließender Vorversuch.....	35
3.4 Hauptversuche	35
3.4.1 Wiegen	37
3.4.2 Handtuch-Fixierung	37
3.4.3 Intramuskuläre Injektion.....	37
3.4.4 Mikrochip-Implantation.....	37
3.4.5 Transportieren.....	38
3.4.6 Nackengriff-Fixierung	38
3.4.7 Orale Applikation.....	39
3.4.8 Ohrlochung	39
3.5 Abschlußversuch.....	39
3.6 Analysemethoden.....	41
3.6.1 Prolaktin.....	41
3.6.2 Kortikosteron.....	42
3.6.3 Auswertung.....	42
3.7 Statistik.....	43
3.7.1 Versuchsplanung	43
3.7.2 Versuchsauswertung und Darstellungen.....	44

	Seite
4 Ergebnisse	46
4.1 Erster Vorversuch.....	46
4.2 Weitere Vorversuche	56
4.3 Abschließender Vorversuch.....	60
4.4 Hauptversuch.....	63
4.5 Abschlußversuch.....	78
5 Diskussion	85
5.1 Beeinflussung durch das Geschlecht.....	85
5.2 Beeinflussung durch den zirkadianen Rhythmus	89
5.3 Beeinflussung durch Narkose und Blutentnahme.....	91
5.4 Beeinflussung durch den Zeitverlauf der Hormonantwort.....	93
5.5 Beeinflussung durch die individuellen Unterschiede	96
5.6 Beeinflussung durch Veränderung der Umgebung.....	99
5.7 Beeinflussung durch Fixierung	102
5.8 Beeinflussung durch Verabreichungen.....	107
5.9 Beeinflussung durch Kennzeichnung	110
5.10 Beeinflussung durch einen ausgewählten Stressor.....	112
5.11 Allgemeine Beurteilung	115
6 Zusammenfassung	118
7 Summary	120
8 Literaturverzeichnis	122
9 Abkürzungsverzeichnis	137
10 Anhang	139
Danksagung	142
Lebenslauf	143

1 Einleitung

Die Bewertung der Belastungen von Versuchstieren spielt in der Versuchstierkunde eine sehr große Rolle, ist aber aufgrund der vielfältigen Reaktionen des Organismus auf einwirkende Reize nur sehr schwer vorzunehmen.

Da das Verhalten der Tiere zunächst einen relativ einfach zu interpretierenden Indikator darstellt, wird es häufig zur ersten Einschätzung der Belastung herangezogen. Jedoch handelt es sich hierbei um eine relativ subjektive Bewertung, welche mit Hilfe von objektivierbaren Daten (z. B. Kreislauf, Hormone) gestützt werden muß.

Aus diesem Grund besteht ein aktueller Bedarf an gesicherten Daten, welche eine Aussage darüber möglich machen, wie stark der Einfluß von tierexperimentellen Maßnahmen auf das Befinden von Versuchstieren ist. Um eine möglichst objektive Bewertung unterschiedlicher Maßnahmen zu gewährleisten, wurden für diese Arbeit die Hormone Prolaktin und Kortikosteron ausgewählt, deren Konzentrationen im Blut nachweislich in direktem Zusammenhang mit streßauslösenden Situationen stehen.

Die ausgewählten Manipulationen, deren Überprüfung Aufschluß über eine mögliche Belastung von Versuchstieren geben soll, stellen laborübliche Behandlungsprozeduren dar, welche bei vielen tierexperimentellen Untersuchungen routinemäßig durchgeführt werden.

Aufgrund der Unterschiede zwischen den Manipulationen soll auf der Basis der gefundenen Hormonwerte eine differenzierte Bewertung des Schweregrades dieser Maßnahmen versucht werden.

2 Literaturübersicht

2.1 Überblick zu Belastungen von Versuchstieren

Die Versuchstierkunde kann als multidisziplinäre Wissenschaft definiert werden mit dem vorrangigen Ziel eines tierschutzgerechten Einsatzes von Tieren in der biomedizinischen Forschung und dem weiteren Ziel, informative, unbeeinflusste und reproduzierbare Daten zu erhalten (Zutphen et al., 1995).

Viele Beispiele belegen, wie rasch und empfindlich der Organismus des Versuchstieres schon auf geringfügige Störungen reagiert. Deshalb liegt es im Eigeninteresse des Experimentators, die Belastung des Tieres und damit die unkontrollierte Beeinflussung der zu untersuchenden Parameter möglichst gering zu halten (Scharmann, 1988).

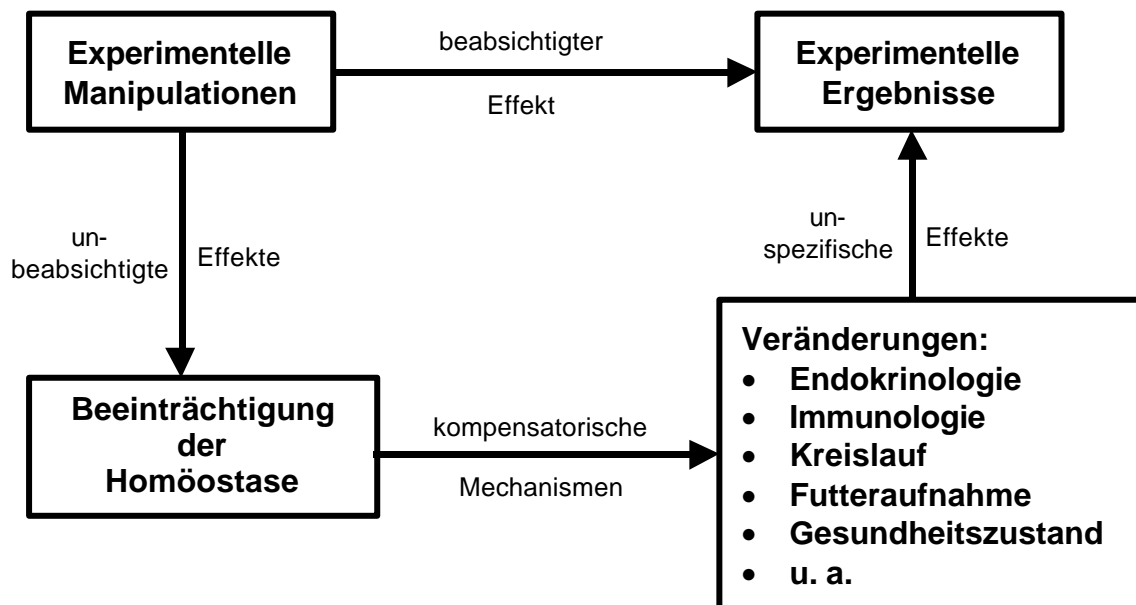


Abbildung 1: Beabsichtigte und unbeabsichtigte Effekte von Manipulationen auf experimentelle Ergebnisse (nach Herck et al., 1994)

Aufgrund der Haltung oder aufgrund experimenteller Manipulationen kommt es im Labor immer wieder zu Situationen, welche für die Tiere mit einer Belastung verbunden sind. Eine Folge daraus ist, daß diese Belastung häufig zu einer

Zunahme der Unterschiede von experimentellen Ergebnissen führt und somit einen entscheidenden Einfluß auf diese Ergebnisse hat (Herck et al., 1994). Die dadurch verursachte starke Varianz der Ergebnisse wird über die Verwendung großer Tierzahlen versucht zu kompensieren, was aber aus Tierschutzaspekten abzulehnen ist.

Die Beurteilung von Belastungen bei Versuchstieren, zum Beispiel durch Schmerzen, Distreß und Leiden, verlangt von dem Experimentator die Kenntnis der komplizierten Mechanismen, die diesen "Gemütszuständen" zugrunde liegen. Er muß in der Lage sein, diese Zustände bei den Tieren zu erkennen und zu bewerten. Weiterhin haben die Experimentatoren eine ethische wie eine gesetzliche Verpflichtung den Einfluß solcher Faktoren auf den Tierversuch zu minimieren (GV-SOLAS, 1995).

Moberg (1999) definiert Distreß als einen Zustand, der als Folge von Streß auftreten kann. Aufgrund von Streß kommt es beim Tier zu einer biologischen Antwort, die der Bewältigung der Situation dient, welche die eigene Homöostase bedroht. Der Begriff Homöostase besagt, daß die Bedingungen sowohl des inneren Zustands (wie Körpertemperatur, Blutglukose, Wassergehalt des Körpers) als auch der Umwelt (wie Rangplatz in einer sozialen Gruppe usw.) für eine bestimmte Zeit in einem vorhersehbaren Bereich konstant gehalten werden. Ein Tier kann seine Homöostase nur aufrechterhalten, wenn es seine aktuelle Situation mit der Norm für innere und äußere Faktoren vergleichen kann und es verhaltensmäßige und physiologische Wege findet, um die Norm zu realisieren (Koolhaas et al., 1995). Streß fungiert bei Tieren somit als Triebfeder zur Entwicklung biologischer Strategien um Stressoren besser zu bewältigen. In den meisten Fällen bleibt die Auswirkung von kurz dauerndem Streß auf das Tier ohne Folgen. Kommt es aber durch länger dauernde Belastung, aufgrund streßverursachender Experimente oder einer permanenten Bedrohung, zu einer erheblichen biologischen Reaktion der Tiere, welche zu einer pathologischen Veränderung führt, ist dieser Zustand als Distreß zu bezeichnen.

Von der UFAW (1989) wird Distreß als Zustand definiert, in dem das Tier einen beträchtlichen Teil seiner Anstrengungen bzw. seiner Ressourcen adaptiven

Reaktionen widmen muß, die darauf gerichtet sind, der Herausforderung einer bestimmten Umweltsituation zu begegnen.

Der Begriff Distreß umfaßt solche Zustände, welche als "Angst", "Frustration" oder "Depression" bezeichnet werden, ebenso wie "Diskomfort", welcher als eine milde Form von Distreß betrachtet wird. Die potentiell zu Distreß führenden Reize sind Extremwerte jener Faktoren, die zur normalen Umwelt des Tieres gehören. Sie schließen das Verhalten des Experimentators, des an Versuchen beteiligten Personals und der Tierpfleger ein. Bei dem Versuch Distreß zu bewerten, muß man sich darüber im Klaren sein, daß die gleiche Situation für bestimmte Tiere mehr und für andere weniger belastend sein kann, in Abhängigkeit von den bisherigen Erfahrungen sowie den individuellen Möglichkeiten und Fähigkeiten, diese Situation zu bewältigen, auch "Coping" genannt. Je erfolgreicher das Coping eines Tieres ist, um so weniger belastend ist der Distreß (GV-SOLAS, 1995).

Nach Jones und Gillham (1988) sind Copingmuster Verhaltensreaktionen, die den Streß, welcher durch physiologische Parameter gemessen werden kann, verringern. Das Copingmuster hängt dabei von einer Reihe von Faktoren ab, zum Beispiel der genetischen Anlage, der körperlichen Verfassung und den früheren Erfahrungen mit ähnlichen oder anderen Streßsituationen, wobei die Vorhersehbarkeit der Situation von großer Bedeutung ist (Henry und Stephens, 1977).

Im weiteren Verlauf der vorliegenden Arbeit findet keine Differenzierung zwischen "gutem Streß" (Eustreß), "neutralem Streß" und "schlechtem Streß" (Distreß) statt, da mit dem Begriff Streß in dieser Arbeit grundsätzlich eine mehr oder minder starke Beeinträchtigung des Tieres gemeint ist.

2.1.1 Streß

Streß bei Tieren ist nicht immer leicht zu erkennen oder zu definieren. Fraser et al. (1975) definierten Streß als einen Zustand, welcher sich ereignet, wenn ein Tier mit unangenehmen physikalischen oder psychischen Situationen konfrontiert wird, welche bei ihm eine Störung des normalen physiologischen und mentalen Gleichgewichts verursachen.

Bereits um die Jahrhundertwende wurde das Konzept von der Notwehrfunktion des Nebennierenmarks (NNM), welches eine entscheidende Rolle während des Streßgeschehens spielt, formuliert. Grundlage dieses Konzeptes ist die Intensivierung der Körperfunktionen, welche die Reaktionsfähigkeit eines Tieres in bezug auf Kampf oder Flucht erhöhen. Die daraus folgende gesteigerte Sauerstoff- und Energieversorgung der Skelettmuskulatur sowie des Gehirnes führen beim Tier dazu, sich gegenüber Gefahren optimal zu verteidigen (Cannon, 1929).

Mit dem Begriff "Streß" bezeichnete Selye (1981) einerseits den Stimulus (Stressor) andererseits die Reaktion oder die Interaktion zwischen Stimulus und Reaktion. Das "allgemeine Anpassungssyndrom", welches von ihm formuliert wurde, gliedert sich in drei Stadien der Körperreaktion auf Streßreize. Erstens die "Alarmreaktion", welche hauptsächlich durch eine gesteigerte Freisetzung von Kortikosteroiden aus den Nebennieren gekennzeichnet ist und deren Funktion es ist, die Widerstandsfähigkeit wieder herzustellen. Bei fortgesetzter Einwirkung des Reizes geht die Alarmreaktion in eine zweite Phase, das "Adaptationsstadium" über und bei Fortbestehen der Einwirkung bricht die Anpassung des Organismus zusammen und endet in der dritten Phase, dem "Stadium der Erschöpfung", welches nach neueren Untersuchungen nur in ganz wenigen Ausnahmefällen nachgewiesen wurde.

Von Mason (1974) wurde festgestellt, daß viele Stressoren nur dann zu Streßreaktionen führten, wenn das Bewußtsein davon beeinflusst wurde. Die Aktivierung des psychologischen Apparates stellt einen ersten Boten bei der Streßreaktion dar und ist somit eine spezifische Antwort auf Streß, welche auf bestimmte psychologische Zustände hin erfolgt. Diese "Kognitive Mediator-Theorie" mußte relativiert werden, da nicht nur psychische, sondern auch physische Stimuli die Hypothalamus-Hypophysen-Nebennieren-Achse (HHA-Achse) aktivieren können, ohne Beteiligung des kognitiven zentralen Nervensystems (ZNS). Zusätzlich gelangte man zu der Erkenntnis, daß nicht nur die Aktivierung der hypothalamo-hypophysär-adrenalen Achse zur Streßreaktion gehört, sondern daß Veränderungen in der Plasmakonzentration vieler Hormone in einer organisierten und integrierten Weise stattfinden.

Streßsituationen, bei denen ein Kontrollverlust droht, bewirken über die Amygdala des Limbischen Systems, das sympathische autonome Nervensystem und das Nebennierenmark eine erhöhte Katecholaminfreisetzung zur Unterstützung der notwendig gewordenen Handlungsfähigkeit ("Fight and Flight"). Ist ein Kontrollverlust bereits eingetreten, führt dieser zur Unterdrückung (Depression) von Verhalten, was durch Aktivierung der Hippocampus-Septum-Achse des Limbischen Systems und des HHA-Systems sowie die daraus resultierende ACTH- (Kortikotropin) und Kortikosteroidfreisetzung unterstützt wird (Henry und Stephens, 1977).

Die aktuelle Vorstellung von Streß umfaßt alle möglichen extraindividuellen Ereignisse, die in der Lage sind, ein breites Spektrum von intraindividuellen Reaktionen hervorzurufen, nachdem sie durch einen komplexen Filter von individuellen Unterschieden gegangen sind (Veith-Flanigan und Sandman, 1985).

Das Phänomen Streß umfaßt sowohl Ereignisse in der Umwelt (Streßstimuli, Stressoren), als auch die darauffolgende Körperreaktion (Streßreaktion), wobei verschiedene Individuen unterschiedlich stark auf das gleiche Umweltereignis reagieren. Somit handelt es sich bei der Streßreaktion nicht um eine klar definierbare Änderung in speziellen Organen, sondern um ein Syndrom von Veränderungen im gesamten Organismus (Moberg, 1985).

Die Reaktion des Organismus auf Streß setzt sich aus einer abgestimmten Koordination von Verhalten, Endokrinium und autonomen Nervensystem zusammen, was zu einer Vielzahl von Veränderungen bei dem entsprechenden Individuum führt (siehe Tabelle 1).

Änderungen des Verhaltens	Zunahme / Abnahme	Hormonelle Veränderungen	Zunahme / Abnahme	Veränderungen des autonomen Systems	Zunahme / Abnahme
Bewegungsaktivität		Hormone der Hirnanhangdrüse		Aktivität des Sympatikus	↑
Neue Umgebung	↓	β-Endorphin	↑	Blutdruck	↑
Soziale Veränderungen	↑	ACTH	↑	Temperatur	↑
Rückzug	↑	Prolaktin	↑	Herzfrequenz	↑
Immobilität	↑	Vasopressin	↑	Plasma-Noradrenalin	↑
Sozialkontakt	↑	Wachstumshormon	↑	Plasma-Renin	↑
Verstecken	↑	Thyreotrophes Hormon	↑	Plasma-Glukose	↑
Erschrecken	↑	FSH	↑	Aktivität des Parasympatikus	↓
Nahrungsaufnahme	↓	LH	↑	Magensäure-Sekretion	↓
Exploration	↓	Hormone der Nebennieren		Magenleerung	↓
Sexuelle Aktivität	↓	Kortikosteroide	↑	Magen-geschwüre	↑
Soziale Interaktion	↓	Adrenalin	↑	Defäkation	↑
Spontanes Verhalten	↓	Hormone des Pankreas		Funktion des Immunsystems	↓
		Glukagon	↑		
		Insulin	↓/↑		

Tabelle 1: Darstellung der verhaltensmäßigen, endokrinen und autonomen Reaktionen von Ratten auf Streß (↑ = Erhöhung; ↓ = Erniedrigung), (nach Herck et al., 1994)

Bei der Streßforschung ist zu berücksichtigen, daß eine Veränderung in einem der Systeme der Streßantwort nicht notwendigerweise einen negativen Effekt auf das Tier haben muß. Zum Beispiel ist der Anstieg der Nebennieren Kortikosteroide als Antwort auf einen Stimulus nicht natürlicherweise schädlich. Vielmehr wurde im Rahmen der Evolution bei den Säugetieren unter anderem das Nebennieren-System entwickelt, um das Tier mit einem Mechanismus auszustatten, der durch die Veränderung der biologischen Funktionen das Individuum in die Lage versetzt besser mit einem Stressor fertig zu werden (Moberg, 1985).

2.1.1.1 Stressoren

Die Einteilung der Stressoren, welche zu Streßreaktionen führen, erfolgt sowohl nach qualitativen als auch nach quantitativen Kriterien. Eine qualitative Einteilung nach physikalischen Eigenschaften eines Stressors (z. B. thermisch, elektrisch, chemisch, narkosebedingt) sowie nach der Gesamtsituation (z. B. Immobilisation, soziale Isolation) scheint jedoch unzureichend, da oft mehrere Faktoren gleichzeitig einwirken oder aber qualitativ unterschiedliche Stressoren ein und dieselbe Reaktion auslösen können. Dabei hängt die subjektiv empfundene Belastung nicht nur von der physikalischen Größe des Stressors ab, sondern ebenfalls von der Voraussagbarkeit und Kontrollierbarkeit des Stressors. So verursacht ein Stressor, welcher vorhersehbar oder kontrollierbar ist, weniger Streß, als der selbe Stressor, wenn er von den Tieren nicht voraussagbar oder kontrollierbar ist (Murison, 1985; Quirce et al., 1981).

Bei der quantitativen Einteilung des Stressors wird zwischen Dauer und Intensität der Einwirkung unterschieden. Obwohl man die Intensität eines physikalischen Stressors objektiv messen kann (z. B. in Grad, Dezibel oder Ampere), besteht keine Möglichkeit eine Aussage darüber zu machen, wie intensiv der Organismus den Stimulus wirklich wahrnimmt. Von größerer Bedeutung ist deshalb in diesem Zusammenhang eine Angabe über die Dauer des einwirkenden Stressors. So wird in den meisten Untersuchungen zwischen akutem und chronischem Streß unterschieden.

Diese beiden Formen des Stresses können nach Koolhaas et al. (1995) wie folgt definiert werden:

- Akuter Streß ist der Zustand eines Lebewesens, der nach einer plötzlichen Abnahme der Voraussagbarkeit und/oder Kontrollierbarkeit wesentlicher Umweltveränderungen auftritt.
- Chronischer Streß ist der Zustand eines Lebewesens immer dann, wenn umweltbedingte Aspekte eine niedrige Vorhersagbarkeit haben und/oder über eine lange Zeit nicht oder nur schlecht kontrolliert werden können.

Diese Einteilung nach der Dauer der Einwirkung eines Stressors wurde von Burchfield (1979) durch eine dritte Streßkategorie, den chronisch intermittierenden Streß, ergänzt. Er ist gekennzeichnet durch einen akuten

Stressor, welcher in regelmäßigen oder unregelmäßigen Intervallen wiederholt wird. Bei dieser Streßform kann es dazu kommen, daß die Reaktion der Tiere auf einen mehrfach wiederholten weniger intensiven Stressoren bei jeder Wiederkehr abnimmt, bis keine Reaktion mehr wahrnehmbar ist, weil in diesem Fall eine Gewöhnung (Habituation) an den Stimulus eingetreten ist (De Boer et al., 1990). Andererseits kann die Streßreaktion auf einen wiederkehrenden intensiven Stressor entweder unverändert bleiben, oder aber sie fällt zunehmend stärker aus, da eine Sensibilisierung stattgefunden hat (Konarska et al., 1989).

Die im Leben von Labortieren vorkommenden Streßsituationen sind von vielen beeinflussenden Faktoren abhängig, stellen aber vorwiegend eine Wiederholung von gleichen (homotypischen) oder verschiedenen (heterotypischen) Stressoren dar (Ladewig, 1994).

2.1.1.2 Streßreaktion

Bei der Reaktion auf einwirkende Stressoren werden unterschiedliche endokrine Systeme aktiviert. Eine zentrale integrierende Rolle bei der Regulation der Streßreaktion spielt hierbei der Hypothalamus. Durch ein Netz von Nervenbahnen steht er in enger Verbindung sowohl mit höheren (Limbisches System, Neocortex) als auch mit niedrigeren Hirnstrukturen (Hirnstamm, Rückenmark). Über afferente Nervenbahnen empfängt er ständig Informationen über externe und interne Ereignisse, welche nach Abstimmung mit den verschiedenen Strukturen in Reaktionen umgewandelt und über efferente Nervenbahnen beziehungsweise über Hormone weitergeleitet werden (Henry und Stephens, 1977).

Akute belastende Stressoren aktivieren dabei das sympatho-adrenomedulläre System, so daß es zur Ausschüttung von Adrenalin und Noradrenalin in den peripheren Blutkreislauf kommt. Dadurch erhöhen sich Herzfrequenz und Blutdruck und es kommt zur Umverteilung des Blutes aus den inneren Organen in die Skelettmuskulatur und zur Mobilisierung der Energievorräte in der Leber. Somit ist der Organismus auf eine rasche Reaktion vorbereitet. Im Gegensatz dazu aktivieren länger wirkende oder chronische Stressoren die Hypophysen-

Hypothalamus-Nebennierenrinden-Achse, so daß der Plasma-Glukokortikoid-Spiegel ansteigt und durch Glukoneogenese der Kohlenhydratgehalt der Leber erhöht wird. Die hypothalamo-adrenokortikale Antwort setzt somit den Energieversorgungsprozeß, welcher im sympatho-adrenomedullären System begann, folgerichtig fort (Lawrence, 1994).

2.2 Hormonelle Antwort auf Belastungen

Schon früh wurde eine streßbedingte Aktivierung des sympatho-adrenomedullären Systems und die damit verbundene Freisetzung der Katecholamine nachgewiesen (Cannon, 1929).

Dabei kommt dem Katecholamin Dopamin als Neurotransmitter im zentralen und im peripheren autonomen Nervensystem sowie als hypothalamischer Hemmfaktor für die Prolaktinfreisetzung aus der Hypophyse eine wichtige physiologische Bedeutung zu (Döcke, 1994).

Auf die Darstellung der physiologischen Funktionen der Katecholamine im Zusammenhang mit dem Streßgeschehen wird an dieser Stelle nicht näher eingegangen, da sie bereits im Rahmen einer anderen Dissertation des Institutes ausführlich besprochen wurden (Brand, 1998).

Untersuchungen der letzten Jahrzehnte haben gezeigt, daß viele neuroendokrine Systeme auf einen Stressor reagieren. Dies schließt nicht nur Systeme mit ein, die an der Regulation der Nebenniere (CRH - Kortikotropes-Releasing-Hormon, Vasopressin, ACTH) beteiligt sind, sondern auch solche, die an der Reproduktion (FSH, LH, Testosteron, Östrogen, Prolaktin), dem Stoffwechsel (Wachstumshormon, Thyreotropes Hormon, Thyroxin, Insulin) sowie der Regulation des Blutdrucks und anderer Körperflüssigkeiten (Vasopressin, Oxytocin) beteiligt sind. Das Hypophysenhormon, welches die Nebenniere zur Ausschüttung von Kortikosteron anregt, ist das ACTH (Adrenokortikotropes Hormon). Die Auswirkungen von Streß auf diese neuroendokrinen Systeme können direkt, aber auch indirekt durch Interaktion mit anderen neuroendokrinen Systemen erfolgen (Koolhaas et al., 1995).

Ein allgemeiner Überblick über die vielfältigen hormonellen Veränderungen auf den Streßreiz wurde bereits in der Tabelle 1 gegeben.

2.2.1 Hormone als Streßindikatoren

Die Verhaltensänderung als Folge einer Streßeinwirkung ist sicherlich die erste Reaktion, welche bei einem Tier am einfachsten und offensichtlichsten zu deuten ist. Jedoch reicht dieser Parameter alleine zur Beurteilung der Belastung nicht aus und so müssen die Reaktionen des autonomen Nervensystems und des endokrinen Systems mit einbezogen werden (GV-SOLAS, 1995).

Es existieren viele Untersuchungen zu unterschiedlichen Hormonen, welche als "Streßindikatoren" bezeichnet werden. Bei der Verwendung von Hormonen zur Bewertung von Streß ist zu berücksichtigen, daß die Höhe ihrer Konzentration aufgrund individueller Schwankungen, unter anderem verursacht durch biologische Rhythmen, Fütterungsgewohnheiten und die Art der Blutentnahme, stark variiert. Die Messung von Hormonen ist also nur dann von Nutzen für die Beurteilung des Streßgeschehens, wenn sie unter äußerst exakt kontrollierten Bedingungen stattfindet (Moberg, 1999).

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Hormone Prolaktin und Kortikosteron untersucht, so daß im Folgenden nur diese beiden Hormone besprochen werden.

2.2.1.1 Prolaktin

Aufgrund seiner luteotropen Wirkung bei den Nagetieren wurde das Prolaktin in früheren Zeiten den Gonadotropinen zugeordnet. Es wurde von Stricker und Grueter (1928) in Extrakten aus Rinderhypophysen als eine die Milchsekretion stimulierende Substanz entdeckt. Im Jahre 1937 konnte es dann als erstes Hypophysenvorderlappen-Hormon in hochgereinigter Form aus Schafhypophysen dargestellt werden.

Das Prolaktin ist ein einkettiges Polypeptidhormon, welches bei Wiederkäuer und Schwein aus 198 bzw. 199 Aminosäuren mit 3 Disulfidbrücken besteht, von denen die im Zentrum des Moleküls gelegene Disulfidbrücke für die laktogene Aktivität erforderlich ist. Das Molekulargewicht beträgt ca. 23.000 Dalton. Die Prolaktine unterschiedlicher Spezies zeigen signifikante Variationen in der Aminosäuren-Sequenz, so daß z. B. Menschen- und Ratten-Prolaktin nur in 50 Prozent der Aminosäurenreste übereinstimmen (Döcke, 1994).

In der Hypophyse der Ratte wurden mehr als 10 Varianten des Prolaktin mit unterschiedlichem Molekulargewicht und zum Teil auch unterschiedlicher biologischer Wirkung festgestellt.

Die Biosynthese des Prolaktin durch Abspaltung von einem größeren Präkursormolekül erfolgt in erster Linie in den sogenannten laktotropen Zellen der Pars distalis der Hypophyse. Diese liegen vorwiegend im lateralen und anteromedialen Teil des Hypophysenvorderlappens, gehören zum azidophilen Typ, und machen bei nicht graviden Tieren 10 - 25% der Drüsenzellen in der Adenohypophyse aus.

Wie bei den anderen hypophysären Hormonen erfolgt die Freisetzung episodisch und unterliegt einer zirkadianen Rhythmik.

Im Blut sind die Prolaktin-Konzentrationen im Erwachsenenalter bei männlichen Tieren generell niedriger als bei weiblichen und zeigen bei letzteren zusätzlich eine Beziehung zum Ovarialzyklus, mit höchsten Werten um die Ovulation. Die etwas höheren Prolaktin-Konzentrationen im Blut der weiblichen Tiere beruhen auf der Wirkung des Östrogens, welches ebenfalls für den präovulatorischen Prolaktinipfel, dessen Ausprägung bei Ratten sehr deutlich ist, verantwortlich gemacht wird (Döcke, 1994).

Die wesentlichsten Wirkungen des Prolaktin bei den weiblichen Säugetieren beziehen sich auf die Mammogenese, die Laktogenese und die Galaktopoese. Im Hoden männlicher Nagetiere fördert Prolaktin über Rezeptoren in den Leydigzellen die Androgensynthese. Es wurden noch zahlreiche andere Aktivitäten des Prolaktins gefunden, wie zum Beispiel seine Bedeutung bei der Regulation des Salz- und Wasserhaushaltes, die Wirkungen im Fett- und Kohlenhydratstoffwechsel sowie die Förderung des somatischen Wachstums.

Der Hypophysenvorderlappen spielt im Rahmen der neurohormonalen Regulation der Prolaktinfreisetzung bei der Ratte eine zentrale Rolle. Im Gegensatz zur Wirkung auf die Sekretion aller anderen Hormone der Adenohypophyse übt der Hypothalamus auf die Freisetzung von Prolaktin bei den Säugetieren primär einen hemmenden Einfluß aus. Dies wurde schon frühzeitig daran erkannt, daß sich bei kleinen Versuchstieren nach einer Hypophysektomie und nachfolgender Transplantation der Hypophyse in ein

anderes Körpergebiet die Sekretion der übrigen Hormone deutlich verringerte, die des Prolaktin aber anstieg (Döcke, 1994). Verantwortlich für den tonisch hemmenden Einfluß des Hypothalamus auf die Prolaktinsekretion ist u. a. das Katecholamin Dopamin, welches als der wichtigste Prolaktin-Inhibiting-Faktor (PIF) zu bezeichnen ist (Ben-Jonathan, 1985). Weitere Neurotransmitter, für die entsprechende Hemmeffekte festgestellt wurden, sind die γ -Aminobuttersäure (GABA), das Histamin, die Neuropeptide GAP (Gonadotropin-Releasing Hormon-Associated Peptide), Neurotensin und die Substanz P (Bonsack, 1988).

Die bei den Säugetieren bestehende tonische Hemmung der Prolaktinsekretion wird unter physiologischen Bedingungen vor allem in der Laktation, in Streßzuständen, sowie vor der Ovulation unterbrochen.

Außerdem wurde eine größere Anzahl von Stimulatoren der Prolaktinsekretion gefunden. Von diesen weist aber keiner die Eigenschaften eines unter allen Bedingungen wirksamen Freisetzungsfaktors auf. Aufgrund bisheriger Ergebnisse wird davon ausgegangen, daß in Abhängigkeit vom physiologischen Prozeß und auch von der Spezies unterschiedliche Mechanismen aktiviert werden, in denen unterschiedliche Mediatoren wirksam werden. Bei der Ratte scheint das Neuropeptid Oxytocin das für die Prolaktinfreisetzung wichtigste neurohypophysäre Hormon zu sein. Der Neurotransmitter Serotonin verstärkt zwar bei der Ratte nicht die basale Prolaktinausschüttung, hat jedoch eine wichtige Funktion bei der Vermittlung der stimulierenden Wirkung eines Stressors in bezug auf die vermehrte Ausschüttung des Hormons Prolaktin (Döcke, 1994).

Seggie und Brown (1975) zeigten, daß die Prolaktinsekretion sehr empfindlich auf Streß reagiert, so daß schon ein fünf Sekunden andauerndes Handling zu einer dreifachen Erhöhung der Plasma Prolaktin-Spiegel führte. Andere leichte Stressoren wie z. B. die Blutentnahme und die intraperitoneale Injektion von Kochsalzlösung (Krulich et al., 1974) oder das einfache Herausnehmen eines Käfigs mit Ratten aus dem Haltungsregal (Gärtner et al., 1980) führten ebenfalls zu einer signifikanten Prolaktin-Reaktion. Werden Ratten in Transportkisten gesetzt und in einen anderen Raum gebracht, so führt dieses ebenfalls zu

einem deutlichen Anstieg der Prolaktin-Spiegel im Plasma dieser Tiere (Euker et al., 1975).

Ein akuter elektrischer Fußschock provoziert bei Ratten einen deutlichen Anstieg der Freisetzung von Prolaktin ins Blut. Jedoch zeigte diese Studie von Höllt et al. (1986), daß chronischer Streß nicht zu einer Veränderung der Konzentration der messenger-RNA, welche für Prolaktin im Hypophysenvorderlappen kodiert, führt. Dies kann ein Indiz dafür sein, daß Prolaktin nur eine Rolle bei der Kurzzeit-Antwort auf Streß spielt.

In der Literatur werden basale Plasma-Prolaktin-Spiegel für Ratten mit Werten zwischen 5 bis 10 ng/ml angegeben (Taché et al., 1978; Yelvington et al., 1985; Kant et al., 1987). Jedoch sind auch Kontrollwerte von 19 ng/ml (♂, 18^o Uhr) gefunden worden (Kant et al., 1986).

2.2.1.2 Kortikosteron

Bei Mensch, Schwein, Rind und Hund stellt das Kortisol, bei Kaninchen, Maus und Ratte stellt das Kortikosteron das wichtigste Glukokortikoid dar (Schulster et al., 1976).

Bei der Frage nach der Lokalisation der Glukokortikosteroidsynthese hat sich inzwischen die Vorstellung durchgesetzt, daß die Produktion dieser Steroide vornehmlich in der Zona fasciculata der Nebennierenrinde (NNR) erfolgen soll (Hill et al., 1983).

Beim Tier ist die Glukokortikoidproduktion in erster Linie von der ACTH-Konzentration im Plasma abhängig. Da die Nebennierenrinde größere Mengen an Kortikosteroiden nicht zu speichern vermag, muß sie bei vermehrtem Bedarf in der Lage sein, rasch mit einer erhöhten Biosynthese zu reagieren.

Glukokortikosteroide werden, wie die meisten Hormone, nicht kontinuierlich, sondern episodisch sezerniert und besitzen einen deutlichen zirkadianen Rhythmus, der die episodische Glukokortikosteroidsekretion überlagert (Thun, 1987).

Kortikosteron (11 β ,21-Dihydroxy-4-pregnen-3,20-dion) ist das im Blutkreislauf der Ratte am häufigsten vorkommende Steroid, da ihr das Enzym C-17 Hydrolase fehlt und ihre Nebennierenrinde, im Gegensatz zum Menschen und

den meisten anderen Säugetieren, nicht in der Lage ist, Kortisol zu synthetisieren (Eisenstein, 1967). Kortikosteron stellt damit das Hauptsekretionsprodukt der Nebennierenrinde der Ratte dar (Gomez-Sanchez et al., 1975).

Die Regulation der Kortikosteron-Konzentration im Plasma erfolgt durch negative Rückkopplung. Diese Rückkopplung zu den übergeordneten Zentren (Hypothalamus, Hypophyse) wird durch die Glukokortikoidkonzentration im Plasma hergestellt, wobei ein Anstieg auf die CRH-Sekretion hemmend, ein Abfall hingegen stimulierend wirkt (negatives Feedback). Intensiver Streß kann diese Feedback-Regulation überspielen. Ebenso ist die NNR-Aktivität verschiedenen exogenen und endogenen Einflüssen (Stressoren) unterworfen, welche durch die Aktivierung des Hypothalamus-Hypophysen-NNR-Systems zu einer gesteigerten Kortikosteronsekretion führen, die ihrerseits die zirkadiane Tagesrhythmik durchbrechen kann (Döcke, 1994).

Aufgrund der Empfindlichkeit der Kortikosteron Reaktion auf Streß kann mit ihr die Intensität eines einwirkenden Stressors gut bewertet werden (Kant et al., 1985). So führt z. B. der kurzfristige Aufenthalt in unterschiedlich angereicherten Käfigen bei Ratten zu deutlich abgestuften Kortikosteron-Konzentrationen (Hennessy et al., 1979). Andere Untersuchungen zeigen, daß es bei Ratten mit steigender Intensität von Elektrostimulationen ("Fußschock") ebenfalls zu einer proportionalen Erhöhung der Kortikosteron-Spiegel kommt (Kant et al., 1983c).

Bei Nagetieren greift Kortikosteron in eine Fülle von Stoffwechselprozessen ein. So spielt es eine Rolle bei der Erhaltung des Blutdruckes und ist an der Gluconeogenese, der Kalziumabsorption und der Sekretion von Magensäure beteiligt. Es greift in den Kohlenhydrat-, den Protein-, sowie den Fettstoffwechsel ein. Daneben ist Kortikosteron auch in die Kontrolle des Elektrolyt- und Wasserhaushaltes integriert. Eine entzündungshemmende Wirkung, wie es das Kortisol beim Menschen hat, besitzt das Kortikosteron nicht.

Durch den Einfluß zahlreicher Faktoren differieren die basalen Plasma-Kortikosteron-Spiegel der Ratte in der Literatur zum Teil recht erheblich. So

liegen die Werte bei 37 ng/ml um 6° Uhr und 145 ng/ml um 18° Uhr (Kant et al., 1986), oder bei 80 ng/ml um 8° Uhr (Hennessy et al., 1979). Weiterhin existieren deutliche Unterschiede zwischen verschiedenen Rattenstämmen. Keim und Sigg (1976) fanden Werte zwischen 48 - 56 ng/ml bei fünf verschiedenen Stämmen. Gärtner (1971a) verglich ebenfalls die biologische Variabilität der Kortikosteron-Werte verschiedener Rattenstämme und unterschiedlicher Haltungsformen (Einzelhaltung/Gruppenhaltung) und ermittelte dabei Ruhewerte von 92 bis 380 ng/ml (9° Uhr, nach Chloroform-Narkose). Hohe Basiswerte wurden auch von Natelson et al., (1981) bei katheterisierten jungen männlichen Ratten am Morgen mit 200 ng/ml gefunden.

2.3 Reaktionen von Versuchstieren auf unterschiedliche Manipulationen

Im Rahmen dieser Untersuchung wurden acht Manipulationen vorgenommen. Sie wurden mit Bezug auf die häufigsten und gebräuchlichsten Maßnahmen, welche bei Labortieren routinemäßig durchgeführt werden, ausgewählt. Diese Manipulationen lassen sich grob einteilen in die nichtinvasiven Maßnahmen, zu denen auch der allgemeine Umgang mit Labortieren ("Handling")¹ zählt, sowie die invasiven Maßnahmen.

2.3.1 Nichtinvasive Manipulationen

In diesem Zusammenhang werden unter nichtinvasiven Manipulationen alle Maßnahmen verstanden, bei denen der Tierkörper unverletzt bleibt und nichts in ihn hineingebracht wird.

2.3.1.1 Handling

Jede Art von Tierhaltung ist mit "Handling" und mit Einschränkungen in der Bewegungsfreiheit der Tiere verknüpft (Anderson et al., 1994).

¹ Das englische Wort "Handling" bezeichnet jeglichen Umgang mit Tieren. Eine adäquate deutsche Übersetzung ist nicht möglich (to handle = sich befassen mit), so daß in allen Fällen, in denen der Umgang mit dem Tier nur durch umständliche Umschreibung darstellbar wäre, das Wort "Handling" als Lehnwort übernommen wurde.

Die Tiere reagieren darauf sowohl mit Flucht- als auch mit Angriffsverhalten (agonistisches Verhalten) gegenüber dem Menschen, wenn sie in eine furchtauslösende Situation (z. B. Fixation) geraten. Im Gegensatz zu diesen Flucht- und Kampfreaktionen kann ein Handling aber auch eine "Erstarrungsreaktion" oder "Immobilisierung" auslösen. Subjektiv können diese Reaktionen auf Fixation oder Handling als Indikator für Furcht oder Streß gewertet werden (Lawrence, 1994). Furcht wurde bisher vor allem aus Verhaltensreaktionen wie dem Fluchtverhalten abgeleitet, während der klassische Streß auf Reaktionen des autonomen Nervensystems und des endokrinen Systems auf eine breite Palette von Umwelteinflüssen zurückzuführen ist. Andererseits wird die Furcht als bedeutsamster emotionaler Ausdruck von Streß von der breiten Streßdefinition mit erfaßt. Furcht und Streß erscheinen dann am ähnlichsten, wenn das Tier einer Kurzzeitbelastung ausgesetzt ist, die sowohl Verhaltensreaktionen, welche typisch für Furcht sind, als auch streßbedingte Aktivierung des sympathischen Nervensystems auslösen. Furcht und Streß können aber auch in chronischen Belastungssituationen eng miteinander verbunden sein, so daß es bei einem belastenden Handling, bedingt durch eine Erhöhung des Glukokortikoid-Spiegels, zu einer verstärkten Fluchtbereitschaft kommt (Lawrence, 1994).

Doch nicht nur ein belastendes Handling führt zu physiologischen Reaktionen des Tieres. So zeigten Steinberg und Watson (1960), daß schon routinemäßig durchgeführtes Handling einen starken Einfluß auf die von ihnen untersuchte Gewichtszunahme von 200 Tage alten Ratten hatte. Eine Gruppe von Ratten wurde den folgenden Veränderungen ausgesetzt: Umsetzen in einen neuen Raum, Wechsel von Futterpellets zu mehlartigem Futter, Wechsel von Dreiergruppen zu Einzelhaltung, orale Verabreichung von Wasser, täglicher Käfigwechsel. Nach einer Untersuchungszeit von 44 Tagen zeigten diese Ratten einen Gewichtsverlust gegenüber den ungestörten Tieren von 9%. Diese Gewichtsreduktion kann als ein Indiz für eine Belastung der Tiere angesehen werden (Morton und Griffiths, 1985).

2.3.1.2 Wiegen

Das Wiegen gehört zu den routinemäßig durchgeführten Prozeduren in der Labortierhaltung. Dennoch bedeutet auch eine so einfache und häufig wiederkehrende Tätigkeit für ein Tier zunächst ein unvorhersehbares Ereignis und kann somit durchaus eine Belastung für das Tier darstellen.

Andererseits ist eine regelmäßige Kontrolle der Tiere zur Beurteilung ihres Gesundheitszustandes unerlässlich, da sich gerade die Nahrungs- und Flüssigkeitsaufnahme sowie das Körpergewicht bei vielen akuten und chronischen Beschwerden ändert. So ist zum Beispiel der Grad des Leidens bei Ratten, welche an experimentellen chronischen Erkrankungen litten, gut an den individuellen Gewichtsverlusten erkennbar. Aufgrund dieser Erkenntnisse wurden semiquantitative Bewertungsformen (Scores) entwickelt, mit denen verschiedene Grade von Schmerzen, Leiden und Schäden differenziert werden können, wobei die Gewichtsreduktion als das entscheidende Kriterium herangezogen wird (Gärtner und Militzer, 1993).

Die Bestimmung des Körpergewichtes dient nicht nur der Gesundheitsüberwachung, sondern stellt zudem ein wichtiges Instrumentarium zur Bewertung von haltungs- oder versuchsbedingten Einflüssen auf das Wohlbefinden von Labortieren dar. Es ermöglicht die Beurteilung von "Handling-Effekten", "sozialem Streß", sowie von Auswirkungen experimenteller Stressoren auf die Labortiere.

Zahlreiche Untersuchungen haben gezeigt, daß chronischer Streß zu einer Gewichtsverminderung oder einer reduzierten Gewichtsentwicklung bei heranwachsenden Tieren führt. Dabei führt der katabole Effekt einiger Hormone, welche während des Stresses freigesetzt werden, wie zum Beispiel die Glukokortikoide und Katecholamine, vermutlich zu einer Gewichtsreduktion (Klasing, 1985).

Armario et al. (1987) berichteten darüber, daß die Futtermittelaufnahme und die Gewichtsentwicklung von zwei Monate alten Ratten, welche zu dritt in einem Käfig saßen, geringer war, als bei gleich alten Tieren, die sich zu zehnt in einem Käfig befanden. Dieser Unterschied zeigte sich nach zwei Wochen.

All diese Untersuchungen zeigen, welche wichtige Rolle das regelmäßige Wiegen der Tiere bei der Beurteilung ihres Wohlbefindens spielt.

2.3.1.3 Fixierung

Das richtige Fassen, Aufheben und Festhalten (Fixieren) von Versuchstieren ist eine wesentliche Voraussetzung für eine tierschutzgerechte Haltung wie auch für eine versuchsgerechte Durchführung tierexperimenteller Maßnahmen. Zahlreiche physiologische Parameter wie z. B. Pulsfrequenz, Blutdruck sowie die Sekretion bestimmter Hormone sprechen über das sonst übliche Maß hinaus an, wenn Tiere unsachgemäßer Behandlung ausgesetzt sind (Weiß et al., 1996). Doch auch eine lege artis Fixation einer Ratte, z. B. zur oralen Eingabe mit der Schlundsonde, kann bei Erstaktion einen lebensbedrohenden Eingriff für das Tier darstellen, bei dem alle Parameter, die für Belastung bisher herangezogen wurden, Höchstwerte erreichen können (Juhr, 1996).

In vielen Fällen ist das Handling mit einer Fixation der Tiere verbunden, so daß ein Kontrollverlust durch Verhinderung des Fluchtverhaltens auftritt. Manifestiert sich diese Blockade des Fluchtverhaltens über einen längeren Zeitraum, so versucht das Tier die Kontrolle über die Umwelt so lange wieder zu erlangen, bis dieser Kontrollverlust offensichtlich wird und das Tier sich auf den "Rückzugsstatus" (conservation-withdrawal state) umstellt. Dieses Modell wird durch zahlreiche Beobachtungen gestützt. So zeigten die Forscher Kvetnanský et al. (1970) in Untersuchungen mit Ratten, daß regelmäßig wiederholter Immobilisierungsstreß am Anfang einen Zustand von Hilflosigkeit hervorruft, in dem die Aktivierung der HHA-Achse dominiert. Bei zunehmender Wiederholung erhöht sich die Vorhersagbarkeit der Streßsituation und eine entsprechende Änderung der Streßreaktion in Richtung Aktivierung des sympathischen autonomen Nervensystems und des Nebennierenmarks tritt ein.

Durch Immobilisation bedingter Streß verursachte einen schnellen Anstieg von Katecholaminen, während Kortikosteron nur langsam anstieg (Grimée und Wülfert, 1995). Außerdem wurden erhöhte Werte von ACTH gemessen.

Aus der Kenntnis, daß die Fixierung einen erheblichen Streß darstellt und zu einem hohen und lang anhaltenden Kortikosteron-Spiegel im Plasma von

Ratten führt, wurden männliche Ratten über eine Dauer von vier Stunden fixiert. Danach wurde der zeitliche Verlauf der Kortikosteron-Konzentration bestimmt. Das Maximum der Plasmakonzentration während der Fixierung wurde zwischen dreißig Minuten und einer Stunde gemessen. Der Wert nach vier Stunden Fixierung war zwar gegenüber dem Wert der ersten Stunde signifikant erniedrigt, lag aber immer noch über dem Anfangswert (Dallman und Jones, 1973).

Unterschiedliche Formen der Fixierung von Ratten wurden von der UFAW (1988) daraufhin verglichen, ob Unterschiede in bezug auf die ausführende Person bestehen, oder ob das Tragen von Handschuhen bei der Fixierung einen meßbaren Einfluß auf die Beunruhigung der Tiere hat. Nach Ausführung der entsprechenden Fixierungen wurde die Bewegungsaktivität der Tiere (als Maß für den "Störeffekt") bestimmt. Fixiert ein erfahrener Experimentator (ohne Handschuh) eine Ratte durch Ergreifen des Nackenfells oder Umgreifen des Brustkorbes, so gibt es anschließend keine signifikante Veränderung der Aktivität. Bei der Fixierung durch unerfahrene Experimentatoren, welche dabei Handschuhe trugen, war die Beunruhigung der Tiere deutlich geringer, als bei den Tieren, welche durch unerfahrene Personen ohne Handschuhe gehalten wurden. Der Grund dafür ist, daß die zuletzt genannten Personen aus Angst verletzt zu werden wahrscheinlich fester zugriffen, was die Tiere mehr belastete. Ungeübten Experimentatoren wird deshalb das Tragen von Handschuhen empfohlen.

2.3.1.4 Transport

Da Versuchstiere nur in Ausnahmefällen an dem Ort in den Versuch genommen werden, an dem sie gezüchtet wurden, gehört der Transport von Labortieren zu den unumgänglichen Maßnahmen, mit denen diese Tiere im Laufe ihres Lebens konfrontiert werden. Im günstigsten Fall findet ein Transport nur innerhalb einer Versuchstiereinrichtung statt, im Extremfall sogar über Kontinente hinweg.

Dieser Transport stellt für die Versuchstiere eine Veränderung ihrer Umwelt dar und ruft endokrine und metabolische Reaktionen bei ihnen hervor. Dieser

sogenannte Transportstreß kann die einzelnen Individuen unterschiedlich beeinflussen und so die interindividuelle Streuung bestimmter physiologischer Meßwerte erhöhen (Beynen et al., 1995b). Somit vermag der Transportstreß den physiologischen Zustand eines Tieres zu beeinflussen, wobei der Umfang dieser Störung der Homöostase von der Entfernung, der Länge und der Art und Weise des Transportes abhängig ist (Ruiven et al., 1996).

Selbst kurze Transporte innerhalb eines Gebäudes zwischen zwei Räumen zeigten einen signifikanten Anstieg der Kortikosteron-Konzentrationen im Blut von Mäusen im Vergleich zu den nicht transportierten Kontrolltieren (Drozdowicz et al., 1990). Nach solchen Kurztransporten erfolgte die Normalisierung der Kortikosteron-Werte innerhalb eines Tages, trotz der zusätzlichen Veränderungen in der Umwelt dieser Tiere, wie ein neuer Käfig, neue Einstreu, Isolation vom gewohnten Käfigpartner, Neugruppierung und anderes Personal (Tuli et al., 1995).

Längere Transporte z. B. mit einem Transportfahrzeug oder dem Flugzeug erhöhten den Kortikosteron-Spiegel im Blut von Mäusen dagegen über einen Zeitraum von mehr als 48 Stunden nach Ankunft der Tiere (Landi et al., 1988). Vergleichbare Ergebnisse gib es auch für andere Tierspezies. So war der Kortisol-Spiegel im Blut von Kaninchen, welche zuvor mit einem Transporter bzw. Flugzeug befördert wurden, direkt nach der Ankunft signifikant höher, als der Wert, welcher nach einer Woche Aufenthalt gemessen wurde (Toth und January, 1990).

Eine Untersuchung von insgesamt 25 Blutparametern, welche für die Streßreaktion repräsentativ sind, wurden an Laborratten durchgeführt. Nachdem diese Tiere kurzfristig in ihren Käfigen transportiert oder einer 1-minütigen Ätheranästhesie unterzogen worden waren, stiegen die Serumspiegel für Prolaktin, Kortikosteron, TSH, FSH, LH, T₃, T₄, um das 2,5- bis 5-fache gegenüber den Kontrollseren an (Gärtner et al., 1980).

Auch andere Parameter werden durch den Käfigtransport oder nur durch das Berühren des Tieres im Käfig beeinflusst. Bei Ratten steigerten solche Manipulationen die Herzfrequenz gegenüber dem Ruhewert um bis zu 55% (Büttner, 1982).

2.3.2 Invasive Manipulationen

Unter invasiven Manipulationen versteht man Maßnahmen, die mit einem Eingriff in den Körper verbunden sind (Pschyrembel, 1982). Zu ihnen gehören die Verabreichungen (z. B. Injektion, orale Applikation) sowie die Entnahmen (z. B. Blutentnahme), die Kennzeichnungen (z. B. Mikrochip-Implantation, Ohrlochung) und in diesem Zusammenhang auch die Anästhesie (z. B. CO₂-Narkose).

2.3.2.1 Verabreichungen

Das häufig vorgebrachte Argument, die überwiegende Zahl der Tierexperimente sei für die Versuchstiere nur mit unerheblichen Belastungen verbunden, wie es zum Beispiel auch der menschliche Patient mit dem Einstich einer Spritze erduldet, ist nicht zutreffend, denn der Mensch weiß um die Bedeutung und die Notwendigkeit einer Injektion, das Tier jedoch nicht. Vielmehr gerät es in Panik, wenn es ergriffen wird und in einer unnatürlichen Lage fixiert wird. Somit können schon geringfügige Eingriffe wie z. B. eine Injektion oder das Einführen einer Magenschlundsonde ein Tier in Todesangst versetzen, wenn es dabei in eine ihm ungewohnte Zwangslage versetzt wird, die es ja nicht verstehen kann (Scharmann, 1988).

Der Zusammenhang zwischen Verabreichungen und Veränderung von Hormonen wurde schon Ende der 60er Jahre von Haas und Fischer (1969) untersucht, welche i. m., i. v. und per os Applikationen bei Laborratten vornahmen. Die i. m. Injektion von 0,1 ml/kg NaCl in physiologischer Lösung änderte den zirkadianen Rhythmus des Kortikosteron-Spiegels nicht. Bei i. v. Applikation der gleichen Menge trat kurzfristig nach 30 Minuten eine signifikante Erhöhung des Kortikosteron-Blutspiegels auf. Die Belastung der Tiere per os mit 5,0 ml/kg Aqua dest. führt gleichfalls zu keiner signifikanten Abweichung der Kortikosteron-Werte von den Werten der Kontrolltiere ohne Behandlung.

Dallman und Jones (1973) bewerteten eine Injektion bei Ratten als einen milden Streß und untersuchten den zeitlichen Verlauf der Kortikosteron-Konzentrationen im Plasma nach einer intraperitonealen Injektion. Nach dieser Manipulation kam es zu einer diskreten Hormonantwort mit einem Maximum

nach fünfzehn Minuten und einem schnellen Abfall der Konzentration bis zur dreißigsten Minute.

Die Verabreichung von Substanzen direkt in den Magen mittels einer Magenschlundsonde ist eine gebräuchliche und besonders in der pharmazeutischen Industrie häufig angewandte Methode. Nach der oralen Verabreichung unterschiedlich großer Volumina von einfachem Leitungswasser wurde die Beunruhigung der Tiere über einen Zeitraum von einer Stunde post applikationem gemessen. Die Beunruhigung der Tiere ist 10 bis 30 Minuten nach der Applikation von 6,0 ml/kg KGW am stärksten ausgeprägt, danach folgt eine rasche Beruhigung. Dadurch, daß eine so moderate Dosierung eine so auffällige Beunruhigung der Tiere hervorruft, sollte die Dosis von 6,0 ml/kg KGW für eine orale Verabreichung als absolute Obergrenze angesehen werden (UFAW, 1988).

2.3.2.2 Kennzeichnungen

Grundsätzlich ist die Idee des Kennzeichnens und Identifizierens von Tieren im Sinne des Tierschutzes positiv zu bewerten (Wormuth, 1998). Inzwischen ist die Kennzeichnung von Tieren teilweise sogar gesetzlich vorgeschrieben. So existiert für den Bereich der Forschung eine Verordnung über die Aufzeichnung über Versuchstiere und deren Kennzeichnung (BGBl., 1988).

Die Vorbereitung des Tieres zur Kennzeichnung wie auch die Kennzeichnung selbst müssen tierverträglich sein. Die Kennzeichnung des Tieres sollte möglichst wenig Einfluß auf das Wohlbefinden des Tieres sowohl aus klinischer als auch aus ethologischer Sicht haben. Neben Streß und Schmerzempfindung während der Kennzeichnung zählen hierzu örtliche Gewebereaktionen, Beeinträchtigung des Allgemeinbefindens und Verhaltensänderungen des gekennzeichneten Tieres (Hartmann et al., 1997).

Die gebräuchlichsten Methoden zur Kennzeichnung von Labornagern sind zur Zeit Haut- und Fellfärbung, Tätowierungen, Ohrlochung und -kerbung sowie elektronische Identifikationsverfahren (Galen et al., 1975).

Besonders in der Versuchstierhaltung war und ist die Ohrlochung oder Ohrkerbung bei Ratten und Mäusen häufig die Methode der Wahl für die

Einzelidentifizierung. Die dünnhäutigen Ohrmuscheln sollten in den Bereichen, welche frei von Blutgefäßen und Empfindungsnerven sind, gelocht oder gekerbt werden (Weiß et al., 1996).

Jedoch stellt diese Art der Kennzeichnung einen substantiellen Eingriff dar, bei dem eine mögliche Belastung der Tiere nicht auszuschließen ist, wobei dieses weniger den kurzfristigen und geringfügigen Schmerzreiz bei der Perforation betrifft, als vielmehr die sich anschließenden Komplikationen wie Blutungen oder Entzündungen (Rusche, 1987).

Durch die Entwicklung der Transponder-Technik steht heute eine sichere und viel Arbeit ersparende Methode der Kennzeichnung auch für Kleintiere zur Verfügung. Die subkutane Applikation des Transponders erfolgt in der Regel auf dem Rücken oder im Schulterbereich und kann bei Ratten und Mäusen mit dem Absetzen erfolgen. Eine Betäubung der Tiere ist nicht unbedingt erforderlich, jedoch wäre eventuell eine kurze Inhalationsnarkose für die sorgfältige Durchführung der Implantation von Vorteil (Weiß et al., 1996).

Bereits 1983 wurden in Amerika die ersten Transponder bei Psittaciden, Fohlen und adulten Pferden eingepflanzt. 1986 erfolgte dann in einer Versuchsanstalt in Kansas die Kennzeichnung von 35 weißen Mäusen mit dem Transponder. Mittlerweile hat sich das Mikrochip-Identifikationssystem als eine komplikationsfreie, unschädliche und fälschungssichere Kennzeichnungsart bei Tieren erwiesen (Dorn, 1987).

Die Reaktion der Tiere auf die Implantation von Glastranspondern ist im wesentlichen von ihrer Körpergröße und artspezifischen Besonderheiten abhängig. So wurden zahlreiche Untersuchungen an verschiedenen Tierarten wie z. B. Amphibien (Mrozek et al., 1995), Vögeln (Kummerfeld, 1996), Kleintieren (Arndt und Wiedemann, 1991), Hunden (Hesselholt et al., 1992) sowie Schweinen (Lammers et al., 1995) u. a. durchgeführt. Während das Implantat von größeren Tieren sehr gut vertragen wird, kann es bei kleineren Tierarten (z. B. Vögeln) zu örtlichen Gewebereaktionen kommen (Hartmann et al., 1997).

Bei Untersuchungen an Laborratten, denen die Transponder in der Mitte des Rückens subkutan implantiert wurden, konnten in einer Langzeitstudie (1 Jahr)

weder klinische noch histopathologische Veränderungen festgestellt werden (Ball et al., 1991).

2.3.2.3 Blutentnahme

Bei der Blutentnahme ist zu bedenken, daß nur eine sachkundige Vorbereitung und Durchführung gewährleistet, daß diese Prozedur für die Tiere mit einem Minimum an Belastung verbunden ist. Dies ist grundsätzlich zwar bei jeder tierexperimentellen Maßnahme zu fordern, bei der Blutentnahme kann jedoch eine unsachgemäße Durchführung unmittelbar in die Versuchsergebnisse eingehen, da Angst und Streß innerhalb von Sekunden wichtige Blutparameter verändern können (Weiß et al., 1996). Des weiteren muß beachtet werden, daß schon das Bewegen oder Öffnen des Käfigs bei Ratten innerhalb von Minuten zu einem erheblichen Anstieg von Kortikosteroiden und anderen Hormonen (auch Prolaktin) sowie zu Veränderungen in der Kreislaufreaktion führen (Gärtner et al., 1980). Für die Bestimmung der Kortikosteron-Ruhewerte im Blut wird eine Manipulationszeit von maximal 100 Sekunden empfohlen (Gärtner und Messow, 1976).

In einer Untersuchung zur Methode der Blutentnahme wurden bei männlichen Wistar-Ratten keine signifikanten Unterschiede der Plasma Kortikosteron-Spiegel zwischen einer Blutentnahme aus der Aorta abdominalis unter Äthernarkose und einer Entnahme nach Dekapitation gefunden, vorausgesetzt, daß die Zeit zwischen dem Herausnehmen des Tieres aus dem Käfig und dem Abschluß der Blutentnahme 150 Sekunden nicht überschritt (Barrett und Stockham, 1963).

2.3.2.4 CO₂-Anästhesie

Die zur Zeit gebräuchlichsten Anästhesiemethoden bei Labortieren sind die Inhalationsanästhesie und die Injektionsanästhesie, wobei die letztere apparativ weniger aufwendig ist, aber länger dauert und wegen der Manipulation der Tiere zu erheblichem Streß führt. Ein Vergleich dieser beiden Anästhesiemethoden von Borkowski et al. (1995) zeigte, daß Ratten, welche nur kurzfristig Kohlendioxid ausgesetzt waren, die niedrigsten Kortikosteron-Konzentrationen besaßen, wohingegen Ratten die mit Ketamin – Xylazin oder

Pentobarbital anästhesiert wurden, die höchsten Konzentrationen an Kortikosteron aufwiesen.

Für eine Inhalationsanästhesie stehen mittlerweile eine Vielzahl an Präparaten zur Verfügung. Neben dem Äther, welcher wegen seiner langsamen Anflutung und seiner schleimhautreizenden Wirkung vor allem zur Euthanasie verwendet wird, sind die "moderneren" Inhalationsanästhetika (Halothan, Isofluran und Methoxyfluran) unter Laborbedingungen ohne einen Verdampfer nicht dosierbar. Deshalb bietet sich das Kohlendioxid-Gas, welches nicht nur zu einer schnellen Bewußtlosigkeit führt, sondern sich auch einfach und problemlos applizieren läßt, als durchaus probates Narkosegas im Hinblick auf eine kurze Anästhesie bei kleinen Labortieren an (Meier, 1994).

Zur Objektivierung des Faktors Streß, induziert durch die Kohlendioxid-Anästhesie, wurde Kortikosteron im Serum von Ratten während der Anästhesie gemessen. Alle erhaltenen Hormonwerte zwischen 300 und 550 ng/ml, gleich bei welcher Gaskonzentration (60% CO₂ – 40% O₂; 80% CO₂ – 20% O₂; 100% CO₂), waren um ein Vielfaches erhöht. Zum Vergleich betrug der Kortikosteron-Wert unter Isoflurannarkose 390 ng/ml. Somit stellte der Kortikosteron-Wert einen sensitiven Index für emotionalen Streß dar, stieg jedoch schon vor der Anästhesieeinleitung und nicht während der Narkose an. Daraus wurde der Schluß gezogen, daß die Kortikosteronerhöhung mit dem Handling selbst zu erklären ist (Meier, 1994). Das konnten auch Urbanski und Kelley (1991) zeigen, die an Hand der Plasma Kortikosteron- und Prolaktin-Konzentration nachwiesen, daß die Streßbelastung durch Dekapitation bei Ratten nach einer vorhergehenden CO₂-Narkose erheblich gemindert wurde, daß also der Streß durch das Handling größer ist, als durch die CO₂-Narkose. Diese Befunde wurden auch von Hackbarth et al. (1998) durch ihre Untersuchung zur Tierschutzrelevanz der Euthanasie mit CO₂ bestätigt. Küppers (1997) stellte in ihrer Arbeit fest, daß die Kortikosteron-Werte der untersuchten Ratten durch die CO₂-Betäubung nicht verändert wurden und schloß daraus, daß die Tiere während dieser Betäubung keinen Streß empfanden.

Als routinemäßige Methode für kurz dauernde Eingriffe, wie zum Beispiel Blutentnahmen, wird die CO₂-Anästhesie bei Labortieren empfohlen (Abel und

Bartling, 1978). So wurden Tiere in einer sieben Liter fassenden Betäubungskammer einem Gasfluß von zwei Litern CO₂ pro Minute, was einer Konzentration von 25 - 35 Volumenprozent entspricht, ausgesetzt. Der Narkosebeginn lag bei den Ratten zwischen der 13. und 33. Sekunde. Nach einer Expositionszeit von 30 Sekunden betrug die Narkosedauer bei den Ratten im Mittel 30 Sekunden. Diese Expositionszeit (bei 2 l/min Gasstrom) kann bei Ratten um das 14-fache überschritten werden, bevor der Tod eintritt.

Die Inhalation von 80%igem CO₂ führt bei adulten Ratten nach 15 bis 30 Sekunden zu einer Bewußtlosigkeit mit einer geringgradigen Veränderung der Herzfrequenz und des Blutdrucks (Cranach und Gassmann-Langmoen, 1990). Das Stadium der chirurgischen Toleranz bei dieser CO₂-Konzentration hielt in Abhängigkeit von der Expositionszeit von 60 bzw. 120 Sekunden zwischen 54 und 77 Sekunden lang an (Kohler et al., 1999). Bei niedrigen CO₂-Konzentrationen wurden hingegen erhöhte Glukose- und Adrenalin-Werte gefunden (Küppers, 1997).

Während einige Autoren empfehlen, die Narkosekammer mit CO₂ vorzufluten (Blackshaw et al., 1988; Smith, 1986), zeigten andere Untersucher, daß die Tiere weniger beunruhigt sind, wenn das CO₂-Gas erst dann eingeleitet wird, wenn sich die Tiere bereits im Narkosekäfig befinden (Hewett et al., 1993; Woodbury et al., 1958).

2.4 Zielsetzung

Die für diese Untersuchung ausgewählten Manipulationen, wie das Wiegen, der Transport in einem fremden Käfig, die Fixierung mittels Handtuch bzw. Nackengriff, die intramuskuläre- und die orale Applikation sowie die Kennzeichnung durch Ohrlochung und Mikrochip, stehen beispielhaft für versuchstierkundliche Routinemanipulationen, die im allgemeinen als wenig bis gering belastend eingestuft werden.

Für die Beurteilung der Belastung von Labortieren stehen eine Reihe unterschiedlicher Indikatoren zu Verfügung. Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Hormone Prolaktin und Kortikosteron untersucht, welche nach dem

Einwirken eines Stressors zwar unterschiedlich schnell, jedoch sehr sensibel mit einer Veränderung ihrer Serumkonzentrationen reagieren.

Es scheint bei beiden Hormonen ein gleichartiger Mechanismus für die Regulation der Hormonfreisetzung zu existieren, wobei die Schwelle zur Aktivierung dieses Freisetzungsmechanismuses beim Kortikosteron niedriger als bei der Prolaktin-Freisetzung zu sein scheint (Kawakami et al., 1979).

Die physiologische Bedeutung der Prolaktin-Freisetzung durch negative Stimuli ist nicht geklärt, aber die Bestimmung der Prolaktin Plasmakonzentration wird als guter Indikator für das "Belastungsniveau" von Tieren angesehen (Clark et al., 1997).

Das NNR-Hormon Kortikosteron dient zum Nachweis der Aktivierung der HHA-Achse und ist in diesem Zusammenhang ein oft untersuchtes "Stresshormon" (O'Brien et al., 1993). Nach der Aktivierung der HHA-Achse durch Stress zeigt dieses Glukokortikoid einen signifikanten Anstieg seiner Plasmakonzentration innerhalb von 5 bis 10 Minuten nach Setzen eines Stressors. Bei Nagern werden maximale Plasmaspiegel ungefähr 20 Minuten nach dem Beginn des Stresses beobachtet, wobei der Zeitverlauf von der Intensität des Stressors abhängig ist (Manser, 1992).

Durch verschiedene Untersuchungen konnte bestätigt werden, daß ein enger Zusammenhang zwischen der Quantität und Qualität eines Stressors und dessen Effekt auf die Hormonspiegel von Prolaktin und Kortikosteron besteht (Armario et al., 1986; Jones und Gillham, 1988).

Das Ziel dieser Arbeit ist es, durch die Untersuchung definierter Situationen des routinemäßigen Umgangs mit Laborratten in der Versuchstierhaltung, eine Stressreaktion nachzuweisen.

Wie gezeigt stellen die ausgewählten Hormone anerkannte Stressindikatoren dar und bieten sich somit zur Untersuchung von manipulationsbedingten Belastungen an. Zudem existieren für beide Hormone etablierte Labortests, mit deren Hilfe sich ihre Serumkonzentrationen exakt bestimmen lassen.

3 Material und Methode

Die in diesem Kapitel erwähnten Materialien sind noch einmal ausführlich im Anhang (Seite 139) dargestellt.

3.1 Tiere

Die Untersuchungen wurden an Albinoratten (*Rattus norvegicus*) des Auszuchtstammes Wistar, welche aus der SPF-Zucht des Bundesinstitutes für gesundheitlichen Verbraucherschutz und Veterinärmedizin in Berlin stammten, durchgeführt.

3.1.1 Vorversuche

Für den ersten Vorversuch wurden elf Monate alte Tiere, zwanzig männliche mit einem durchschnittlichem Gewicht von $534,5 \text{ g} \pm 78,6 \text{ g}$ und zwanzig weibliche mit einem durchschnittlichem Gewicht von $286,4 \text{ g} \pm 38,8 \text{ g}$, verwendet. Die Kennzeichnung der Labortiere erfolgte durch Einfärbung der Schwanzwurzel mittels eines Filzstiftes (Marker 3000, Fa. Edding, Ahrensburg), wodurch sich die beiden Tiere eines Käfigs unterscheiden ließen.

Die weiteren Vorversuche fanden an insgesamt vierundzwanzig männlichen, sechs Monate alten Ratten mit einem durchschnittlichem Gewicht von $467,5 \pm 69,3 \text{ g}$ statt. Diese Tiere wurden nicht gekennzeichnet, da sie während der Versuchsdurchführung einzeln saßen.

3.1.2 Hauptversuche

Bei den sechzehn Tieren, welche für die Hauptversuche verwendet wurden, handelte es sich um sechzehn Monate alte männliche Ratten mit einem durchschnittlichem Gewicht von $523,9 \pm 58,5 \text{ g}$. Jedes Tier erhielt eine Woche vor Versuchsbeginn eine schwarze Farbmarkierung.

3.2 Haltungsbedingungen

Die Haltung der Tiere erfolgte in mit Weichholzgranulat (Typ H 9, Fa. Altromin, Lage) eingestreuten Polykarbonat-Käfigen (Makrolon[®], Fa. Bayer, Leverkusen),

welche mit einem Deckel aus Drahtgitter verschlossen waren. Zur Fütterung der Tiere wurde eine pelletierte Alleindiät der Firma Altromin (Haltungsdiät 1324) verwendet. Das Tränkwasser (pH 7, Gesamthärte >21 °d), welches sich in durchsichtigen Polykarbonflaschen befand, sowie das Futter, welches über eine Futterraufe gereicht wurde, standen den Tieren ad libitum zur Verfügung. Im Tierraum herrschte eine 16-fache Luftwechselrate, bei einer Raumtemperatur von 21 ± 1 °C und einer Luftfeuchte von $60 \pm 5\%$. Die Beleuchtungsperiode erstreckte sich von 6⁰⁰ Uhr bis 18⁰⁰ Uhr (MEZ) und wurde morgens mit einer 10-minütigen Dämmerungsphase eingeleitet und abends ebenso beendet.

3.2.1 Vorversuche

Bei den ersten Vorversuchen befanden sich jeweils zwei gleichgeschlechtliche Tiere, die von Anfang an aneinander gewöhnt waren, in einem Käfig (Typ III, 37 cm Länge x 21 cm Breite x 15 cm Höhe). Die Reinigung der Käfige erfolgte nach einem vorher exakt festgelegten Käfigwechselplan, so daß die Tiere vor jeder Manipulation zwei Tage lang ungestört waren. Die Tür zum Tierraum stand während der gesamten Versuchszeit unter Verschluss und wurde nur zur Blutentnahme und gleichzeitigem Käfigwechsel geöffnet, um zu gewährleisten, daß eine unvorhersehbare Störung der Tiere ausgeschlossen werden konnte.

Für die folgenden Untersuchungen wurden sechs Ratten zwei Wochen vor Versuchsbeginn einzeln in Käfige des Typs III gesetzt, wobei die Auswahl der Tiere willkürlich stattfand. Die Reihenfolge der Blutentnahme wurde durch Randomisation festgelegt (siehe Kapitel 3.7.1).

3.2.2 Hauptversuche

Vor den Untersuchungen des Hauptversuches wurden die 16 Tiere durch Randomisation in vier Gruppen mit jeweils vier Tieren aufgeteilt, welche dann in Käfigen des Typs IV (55 cm Länge x 33 cm Breite x 19,5 cm Höhe) gehalten wurden. Je zwei der Gruppen wurden den gleichen Manipulationen ausgesetzt und zu je einem Block zusammengefaßt (siehe Kapitel 3.7.1). Die gekennzeichneten Käfige wurden dann blockweise, also je zwei übereinander, in das Haltungsregal gestellt.

3.3 Vorversuche

3.3.1 Erster Vorversuch

Ziel dieser ersten Untersuchung war es, eine Methode zu entwickeln mit der es möglich war, weitgehend unbeeinflusste Hormonwerte bei den Tieren zu ermitteln. Aus diesem Grund fand die Einleitung des Narkosegases (CO₂) von außerhalb ohne Öffnung des Tierraumes statt. Weiterhin wurde ein Blutentnahmeplan (siehe Tabelle 2) erstellt, welcher gewährleisten sollte, daß von jedem Tier drei Proben genommen wurden, welche sich hinsichtlich der Entnahmezeit unterschieden.

Tier-Nr.	Käfig-Nr.	Uhrzeit 1	Uhrzeit 2	Uhrzeit 3
1	1	10 ⁰⁰	11 ⁰⁰	10 ⁰⁰
2				
3	2	11 ⁰⁰	10 ⁰⁰	11 ⁰⁰ *
4				
5	3	10 ⁰⁰	11 ⁰⁰	10 ⁰⁰
6				
7	4	11 ⁰⁰	10 ⁰⁰	11 ⁰⁰
8				
9	5	11 ⁰⁰	10 ⁰⁰	11 ⁰⁰
10				
11	6	10 ⁰⁰	11 ⁰⁰	10 ⁰⁰
12				
13	7	11 ⁰⁰	10 ⁰⁰	11 ⁰⁰
14				
15	8	11 ⁰⁰	10 ⁰⁰	11 ⁰⁰
16				
17	9	11 ⁰⁰	10 ⁰⁰	11 ⁰⁰
18				
19	10	10 ⁰⁰	11 ⁰⁰	10 ⁰⁰
20				

Tabelle 2: Blutentnahmeplan für die männlichen Wistar-Ratten des ersten Vorversuchs (* aufgrund unzureichender Narkose bei Tier-Nr. 3 keine Blutentnahme möglich)

3.3.1.1 Inhalationsnarkose

Vierundzwanzig Stunden vor der Blutentnahme wurden zwei Haltungskäfige, der durch Randomisation festgelegten Tiere, unter Gewährleistung

ausreichender Luft-, Wasser- und Futterzufuhr, mit einem durchsichtigen Plexiglasdeckel verschlossen. Durch einen Gummischlauch (Rotilabo[®], Fa. Roth, Karlsruhe), welcher im Bereich zwischen der Türzarge und der Raamtür mit einem stabilen Röhrchen (Edelstahl, Eigenanfertigung) versehen war, wurde der Käfig mit einer, außerhalb des Tierraumes befindlichen, CO₂-Gasflasche (Kohlensäureflasche, Fa. Air Liquide, Düsseldorf) mit Druckminderer (Pluto, Fa. Dräger, Berlin) verbunden und der Tierraum sodann bis zum nächsten Tag mit einem Vorhängeschloß gegen unvorhersehbares Betreten gesichert.

Am Entnahmetag wurden dann jeweils um 10^{°°} und um 11^{°°} Uhr die Blutproben durch Punktion des retrobulbären Venenplexus (Plexus venosus orbitalis) gewonnen. Zuerst wurde für die Dauer von fünfzig Sekunden das Narkosegas von außen, ohne Öffnung des Tierraumes und unter Sichtkontrolle, in den entsprechenden Käfig geleitet. Danach wurde die Tür geöffnet und innerhalb von fünfzehn bis dreißig Sekunden für das jeweils erste Tier, beziehungsweise dreißig bis fünfzig Sekunden für das zweite Tier, die Blutprobe entnommen.

Die Tiere wachten unverzüglich nach der etwa vierzig bis sechzig Sekunden andauernden Kurznarkose wieder auf, wurden gewogen und in einen gereinigten Käfig umgesetzt.

Das Umsetzen der Tiere in den neuen Käfig erfolgte jeweils nach der Entnahme der Blutprobe und war durch einen vorher festgelegten Käfigwechselplan so koordiniert, daß die Tiere mindestens zwei Tage vor der Entnahme der Blutprobe nicht durch das Wechseln beeinträchtigt wurden.

3.3.1.2 Blutentnahme

Unter vorsichtiger Stauung der Halsgefäße mittels Daumen und Zeigefinger, wobei die Augen deutlich hervortraten, wurde ein zuvor in der Mitte durchgebrochenes Kapillarröhrchen (Mikro-Haematokrit-Kapillaren, Fa. Heiland, Hamburg) am nasalen Augenwinkel drehend in Richtung auf das gegenüberliegende Kiefergelenk eingeführt, bis nach Überwindung der Tenon-Kapsel (elastischer Widerstand) die knöcherne Orbita erreicht wurde. Nach leichtem Zurückziehen der Kapillare wurde dann das austretende Blut in einem aus Polypropylen bestehenden Reaktionsgefäß (1,5 ml Volumen, Fa.

Eppendorf, Hamburg) solange aufgefangen, bis auf der angebrachten Skalierung ein Wert von 0,8 bis 1,0 ml erreicht war. Nach dem Herausziehen der Hämatokritkapillare wurden eventuell auftretende Nachblutungen mit einem Zellstofftupfer bis zum völligen Stillstand versorgt.

(Die durchgeführten Blutentnahmen wurden bei der Senatsverwaltung für Gesundheit in Berlin unter der Nummer T 0025/94 angezeigt.)

3.3.1.3 Probenaufbereitung

Die so gewonnenen Vollblutproben wurden zehn Minuten nach der Entnahme bei 12000 Umdrehungen pro Minute (entspricht 8050 g) zentrifugiert (Centrifuge 5412, Fa. Eppendorf, Hamburg). Der gesamte Überstand wurde vorsichtig mit einer Pipette (Varipette 4810, Fa. Eppendorf, Hamburg) entnommen und portionsweise in neue Reaktionsgefäße übertragen, so daß insgesamt vier gleich große Einzelproben (je zwei für die Bestimmung von Prolaktin und Kortikosteron) entstanden. Diese Reaktionsgefäße wurden in einer Einfrierkassette aus Polycarbonat (Größe 81, Fa. NeoLab, Heidelberg) aufbewahrt, welche dann in einen Tiefkühlraum verbracht wurden, wo sie bei einer Temperatur von - 20 °C bis zum Analysetermin lagerten. Die Aufbereitung und Aufbewahrung aller weiteren Serumproben geschah auf die gleiche Art und Weise.

3.3.2 Weitere Vorversuche

Alle für diese Untersuchung verwendeten Tiere wurden zwei Wochen vor Beginn der jeweiligen Manipulation einzeln in Käfige (Typ III) gesetzt. Die Auswahl der jeweils sechs Tiere eines Versuchsdurchganges, sowie die Numerierung der Käfige erfolgte willkürlich, die dann folgenden Manipulationen ("Anheben", "Wiegen", "i. m.-Injektion") wurden in der Reihenfolge eines vorher festgelegten Randomisationsplanes durchgeführt. Für jede Manipulation wurden somit auf diese Weise an jeweils drei Terminen, welche mindestens zwei Tage auseinander lagen, die Proben entnommen, wobei die Entnahmezeit immer zwischen 10⁰⁰ und 11⁰⁰ Uhr lag. Es wurden insgesamt zwei Versuchsdurchgänge mit jeweils sechs Tieren durchgeführt.

Zur Narkose der Tiere wurden diese in einen neuen Käfig (Typ III), welcher mit einem durchsichtigen, mit einer Klappe versehenen Plexiglasdeckel verschlossen war, hineingesetzt. Die Einleitung des Kohlendioxids in die vorgeflutete Kammer erfolgte mit einer Durchflußmenge von vier Litern pro Minute bis zur Bewußtlosigkeit der Tiere. Dieses wurde durch das Auflegen des Kopfes auf den Käfigboden festgestellt. Dieser Zustand trat je nach Individuum innerhalb von 30 bis 40 Sekunden ein und dauerte je nach Tiefe zwischen 25 und 35 Sekunden weiter an.

Die Blutentnahme erfolgte bei allen Tieren in der bereits weiter oben beschriebenen Art und Weise (3.3.1.2).

3.3.2.1 Anheben

Nach dem Betreten des Tierraumes wurde der Käfig des ersten Tieres aus dem Regal genommen, auf einen Labortisch gestellt, der Käfigdeckel entfernt und das Tier an der Schwanzbasis ergriffen, um es für zwei Sekunden aus seinem Käfig herauszuheben. Nach dem Zurücksetzen des Tieres in den Haltungskäfig wurde die erste von sechs Stoppuhren (Kronen-Stoppuhr, Fa. Heiland, Hamburg), welche für die Messung der unterschiedlich langen Zeitintervalle bis zu den Blutentnahmen benötigt wurden, gestartet. Anschließend wurde dieser Käfig wieder in das Regal zurück gestellt und der nächste herausgenommen, so daß am Ende des gesamten Durchganges alle sechs Tiere der gleichen Behandlung unterzogen worden waren. In Abständen einer entsprechenden Zeitreihe von 2, 5, 10, 20, 40 und 60 Minuten wurden dann die Blutproben von den zuvor durch Kohlendioxid narkotisierten Tieren, durch Punktion des retrobulbären Venenplexus, gewonnen.

3.3.2.2 Wiegen

Die Entnahme der Tiere aus ihren Käfigen zum Zwecke des Wiegens geschah in der gleichen Weise, wie es bereits beim Versuch "Anheben" beschrieben wurde. Der eigentliche Vorgang des Wiegens dauerte 15 Sekunden und erfolgte mittels einer elektrischen Laborwaage (Picco 1000, Fa. Wedo, Dieburg). Auf dieser Waage befand sich ein leerer Käfig (Makrolon[®], Typ I), in

den die Ratten hineingesetzt wurden. Nach Beendigung jedes Wiegevorganges wurde wiederum jeweils eine Stoppuhr gestartet. Nach Ablauf der entsprechenden Zeitintervalle (s. o.) wurde die Narkose eingeleitet und die Blutentnahme vorgenommen.

3.3.2.3 Intramuskuläre Injektion

Zur Injektion von 0,5 ml physiologischer Kochsalzlösung (Isotone Natriumchloridlösung 0,9%, Fa. Braun, Melsungen) in die kaudale Oberschenkelmuskulatur (Muskulus semitendinosus) wurden die Tiere mittels eines Nackengriffes fixiert. Die Spritze (Omnifix, Tuberkulin SOLO, Fa. Heiland, Hamburg) wurde mit der Kanüle (Sterican[®], 0,90 × 40 mm, Fa. Braun, Melsungen) in einem stumpfen Winkel parallel zum Oberschenkelknochen (Os femoris) von distal nach proximal in das Muskelbündel der abgespreizten Gliedmaße vorgeschoben. Auf das Aspirieren folgte die langsame Injektion der vorgegebenen Lösung. Nach dieser Verabreichung wurde das Tier zurückgesetzt und gleichzeitig die Stoppuhr gestartet. Narkose und Blutentnahme erfolgten in der gleichen Weise wie bei den anderen Manipulationen schon beschrieben.

3.3.3 Abschließender Vorversuch

Bei dieser letzten Voruntersuchung wurden zwölf einzeln im Käfig sitzende Tiere für eine Dauer von je dreißig Sekunden gewogen. Bei sechs Tieren fand daraufhin die Blutentnahme nach zehn Minuten, bei den anderen sechs nach zwanzig Minuten statt. Mit einem Abstand von jeweils einem Tag wurde dieser Vorgang insgesamt dreimal pro Tier durchgeführt.

3.4 Hauptversuche

Vor dem eigentlichen Hauptversuch wurde jedes Tier zweimal gewogen, ohne die anschließende Entnahme einer Blutprobe, um den genauen Ablauf dieses Vorganges vorab durchzuspielen und die Tiere mit dieser Prozedur ein wenig vertraut zu machen. Die gesamte Untersuchung wurde in zwei Durchgängen vorgenommen, welche jeweils zwei Wochen dauerten und zwischen denen eine Woche ohne Behandlung lag. Diese Unterbrechung wurde aus

Tierschutzgründen eingefügt, um die Belastung der Tiere so gering wie möglich zu halten und ihnen die Möglichkeit zur Regeneration zu gewähren. Aus den gleichen Gründen erfolgte die Entnahme der Proben und die Ausführung der invasiven Methoden alternierend auf beiden Körperseiten.

Der auf den zuvor durchgeführten Vorversuchen basierende erstellte Versuchsplan (Tabelle 3) gewährleistete eine statistisch abgesicherte Ausgewogenheit der vorgenommenen Prozeduren. An den Tieren eines jeden Blockes wurden jeweils vier, in ihrem vermuteten Schweregrad ansteigende, Manipulationen [Block A: Wiegen (1), Handtuch-Fixierung (2), i. m.-Injektion (3), Mikrochip-Implantation (4), bzw. Block B: Transport (5), Nackengriff-Fixierung (6), p. o.-Applikation (7), Ohrlochung (8)], mit zwei unterschiedlichen Entnahmezeiten (nach 10 und 20 Minuten), vorgenommen. Alle durchgeführten Manipulationen fanden innerhalb einer Minute statt, woran sich eine Pause von einer weiteren Minute anschloß, die nötig war, um bei der sich später anschließenden Blutentnahme genügend Zeit für jede Entnahme zu haben.

Käfig	Tier Nr.	Manipulationen									
		Eingewöhnung		Blutentnahme nach:							
		Ohne Entn.	Ohne Entn.	20 min	10 min	20 min	10 min	10 min	20 min	10 min	20 min
A 1	1	1	1	1	2	4	3	1	2	4	3
	2	1	1	2	3	1	4	2	3	1	4
	3	1	1	3	4	2	1	3	4	2	1
	4	1	1	4	1	3	2	4	1	3	2
A 2	5	1	1	1	2	4	3	1	2	4	3
	6	1	1	2	3	1	4	2	3	1	4
	7	1	1	3	4	2	1	3	4	2	1
	8	1	1	4	1	3	2	4	1	3	2
B 1	9	1	1	5	6	8	7	5	6	8	7
	10	1	1	6	7	5	8	6	7	5	8
	11	1	1	7	8	6	5	7	8	6	5
	12	1	1	8	5	7	6	8	5	7	6
B 2	13	1	1	5	6	8	7	5	6	8	7
	14	1	1	6	7	5	8	6	7	5	8
	15	1	1	7	8	6	5	7	8	6	5
	16	1	1	8	5	7	6	8	5	7	6

Tabelle 3: Versuchsplan für den Ablauf des Hauptversuches

Da es für die Bewertung des Einflusses der Manipulation auf die untersuchten Blutparameter von entscheidender Bedeutung ist, das die Entnahme der

Blutprobe so schnell wie möglich nach Eintritt der Bewußtlosigkeit erfolgt, wurden die Tiere in den bereits vorgefluteten Narkosekäfig gesetzt.

3.4.1 Wiegen

Zum Wiegen auf einer elektrischen Waage (Pico 1000, Fa. Wedo, Dieburg) wurde zunächst der Haltungskäfig aus dem Regal - und dann ein Tier, entsprechend der vorher festgelegten Reihenfolge, aus seinem Käfig genommen. Dazu wurde es an der Schwanzwurzel ergriffen, in den Wiegekäfig (Typ I) gehoben und eine Minute lang gewogen. Nach dem Protokollieren des Ergebnisses schloß sich die oben erwähnte 1-minütige Pause an, nach welcher dann die nächste Manipulation an einem anderen Tier vorgenommen wurde.

3.4.2 Handtuch-Fixierung

Das zur Fixierung verwendete Handtuch (Baumwollhandtuch, Fa. Glet, Berlin) wurde über das Tier, welches sich nach Entnahme aus dem Käfig auf der leeren Labortischplatte befand, gelegt. Dann wurde das Tier durch das Handtuch hindurch ergriffen und unter mäßigem Druck so fixiert, wie es auch zur Durchführung einer Manipulation notwendig gewesen wäre. Nach Beendigung der eine Minute andauernden Prozedur wurde das Tier wieder in seinen Käfig zurück gesetzt. Bei den sich anschließenden Manipulationen "Injektion" und "Mikrochip-Implantation" wurde diese Art der Fixierung in der gleichen Weise beibehalten.

3.4.3 Intramuskuläre Injektion

Die Verabreichungstechnik entsprach der Methode, welche auch bei den Vorversuchen (siehe 3.3.2.3) angewandt wurde. Die Injektion von 0,5 ml physiologischer Kochsalzlösung wurde jeweils nur einmal pro Körperseite durchgeführt.

3.4.4 Mikrochip-Implantation

Ein Mikrochip (Gewicht: 120 mg, Länge: 14 mm, Durchmesser 2,2 mm) mit unveränderbarem Code (zehnstellige Kombination aus Großbuchstaben und Ziffern in alternierender Reihenfolge) steckt luftdicht eingeschlossen in einer

biokompatiblen Glaskapsel mit patentierter Kunststoffkappe, die das Verrutschen (Wandern) der Kapsel verhindert. Dieser Transponder (Implantierbares Mikro-Identifikationssystem, Fa. Plexx, Elst, Niederlande) wurde den entsprechenden Tieren subkutan appliziert. Dazu wurden die Tiere dem Käfig entnommen und unter Zuhilfenahme eines Handtuches, wie bereits oben beschrieben, fixiert. Die Implantation erfolgte in der Mitte der seitlichen Brustwand auf Höhe des kaudalen Rippenbogens. Die verwendete Kanüle (\varnothing außen = 2,8 mm) wurde mit dem scharfen Anschliff, dessen Öffnung dem Applizierenden zugewandt war, so weit unter die mit zwei Fingern abgehobene Haut vorgeschoben, bis die Austrittsöffnung der Kanüle nicht mehr sichtbar war. Durch Betätigung eines verschiebbaren Kolbens wurde dann der Transponder in die gebildete Hautfalte hineingeschoben und danach das Kanülenende vorsichtig aus der Haut zurückgezogen.

3.4.5 Transportieren

Der Transport erfolgte in einem frischen, nur mit Einstreu versehenen Kunststoffkäfig (Makrolon[®], Typ III), welcher mit einem konventionellen Drahtgitterdeckel verschlossen war. Nach dem Hineinsetzen des Tieres in den Transportkäfig wurde derselbe aus dem Haltungsraum hinaus auf den Flur und nach einem kurzen Weg wieder zurück in den Tierraum getragen. Dieser gesamte Vorgang, vom Ergreifen des Tieres bis zum Zurücksetzen, dauerte jeweils genau eine Minute.

3.4.6 Nackengriff-Fixierung

Nach Entfernen des Käfigdeckels wurde das entsprechende Tier angehoben indem man die Hand um den Brustkorb und den Nacken des Tieres legte, den Daumen kaudal der Schultergliedmaße hindurch auf dem Brustbein plazierte und dabei den Kopf zwischen Zeigefinger und Mittelfinger fixierte. Um Abwehrbewegungen und damit unter Umständen verbundene Verletzungen des Tieres und des Untersuchers zu vermeiden, wurde zusätzlich mit der anderen Hand die Schwanzwurzel ergriffen und festgehalten. Ebenso wie bei allen anderen Manipulationen wurden auch hierbei Handschuhe aus grauem

Nappaleder (Fa. Glet, Berlin) getragen, um die Bedingungen bei allen Untersuchungen gleich zu halten.

3.4.7 Orale Applikation

Die Fixierung der Tiere erfolgte mittels Nackengriff auf die oben beschriebene Art und Weise, so daß sich der Kopf des Tieres in gestreckter Haltung befand. Dann wurde eine starre, leicht gebogene Edelstahlsonde mit olivenförmiger Verdickung am Vorderende (Knopfkanüle, Fa. Heiland, Hamburg) soweit über den Zungenrücken geschoben, bis sich am Zungengrund ein leichter Widerstand bemerkbar machte. Durch eine leichte Drehung der Sonde ließ sich der Schluckreflex auslösen, woraufhin die Sonde leicht und ohne weiteren Widerstand bis in den Magen vorgeschoben werden konnte. Dort wurde dann ein Milliliter physiologische Kochsalzlösung (Isotone Natriumchloridlösung 0,9%, Fa. Braun, Melsungen) aus einer Spritze (Injekt 2 ml, Fa. Heiland, Hamburg) appliziert. Die Kanüle wurde vorsichtig zurückgezogen und das Tier bis zum Ablauf einer Minute gehalten und anschließend zurückgesetzt.

3.4.8 Ohrlochung

Zur Kennzeichnung der Tiere mittels einer aus Metall bestehenden Ohrlochstanze ($\varnothing = 2$ mm, Fa. Lösenbeck, Iserlohn) wurden die Tiere, wie bereits unter Punkt 3.4.6 beschrieben, fixiert. Der mechanische Vorgang dieser Manipulation war nur mit großem Kraftaufwand zu bewältigen und gelang nicht immer vollständig bis zur kompletten Perforation sämtlicher Anteile des Ohres. Folge war eine, bei einigen Tieren aufgrund der mechanischen Belastung aufgetretene, Quetschwunde (Vulnus contusum).

3.5 Abschlußversuch

Einen Tag vor der eigentlichen Untersuchung wurden die verbliebenen zwölf Tiere des Hauptversuches durch eine erneute Farbmarkierung an der Schwanzbasis gekennzeichnet, so daß danach vier Gruppen mit jeweils drei Tieren entstanden. Es wurden wieder zwei Blöcke gebildet, deren zugehörige Käfige dann übereinander im Haltungsregal angeordnet waren.

Die durchgeführte Manipulation bei allen Tieren bestand in der Implantation eines Mikrochips. Dieses geschah mit der bereits weiter oben erwähnten Methode (3.4.4). An einem Untersuchungstag wurde somit jeweils ein Käfig jedes Blockes behandelt, während die Tiere des zweiten Käfigs ohne Behandlung blieben und nur zur Blutentnahme herangezogen wurden. Diese Untersuchung wurde an vier aufeinander folgenden Tagen durchgeführt, um von jedem Tier vier Proben, zwei mit und zwei ohne vorherige Manipulation, zu erhalten. Um auch hier die Ausgewogenheit der Versuchsanordnung zu gewährleisten wurde ein eigener Versuchsplan (Tabelle 4) erstellt.

Datum:		Uhrzeit:		
Gruppe/Käfig	1/1	2/1	1/2	2/2
Manipulation	Chip (rechts)	Keine	Chip (rechts)	Keine
Tier-Nr.	1	4	7	10
	2	5	8	11
	3	6	9	12
Datum:		Uhrzeit:		
Gruppe/Käfig	2/2	1/2	2/1	1/1
Manipulation	Chip (rechts)	Keine	Chip (rechts)	Keine
Tier-Nr.	11	8	5	2
	12	9	6	3
	10	7	4	1
Datum:		Uhrzeit:		
Gruppe/Käfig	1/1	2/1	1/2	2/2
Manipulation	Chip (links)	Keine	Chip (links)	Keine
Tier-Nr.	3	6	9	12
	1	4	7	10
	2	5	8	11
Datum:		Uhrzeit:		
Gruppe/Käfig	2/2	1/2	2/1	1/1
Manipulation	Chip (links)	Keine	Chip (links)	Keine
Tier-Nr.	10	7	4	1
	11	8	5	2
	12	9	6	3

Tabelle 4: Versuchsablaufplan des Abschlußversuches

3.6 Analysemethoden

Über den gesamten Zeitraum der Untersuchungen wurden 310 Proben für die Bestimmung der Prolaktin-Konzentration und 358 Proben für die Analyse der Kortikosteron-Konzentration genommen.

Die zur Analyse der Serumproben verwendeten Tests stammten beide von der Firma DPC Biermann GmbH (Bad Nauheim). Die Zwischenlagerung der Proben bis zum Labortermin erfolgte in Reaktionsgefäßen aus Polypropylen (1,5 ml Volumen, Fa. Heiland, Hamburg) bei einer Temperatur von -20 °C in einem Tiefkühlraum. Die Testkomponenten, welche in einem Kühlraum bei 8 °C aufbewahrt wurden, sowie die eingefrorenen Serumproben wurden vor Testbeginn auf Raumtemperatur erwärmt.

3.6.1 Prolaktin

Das verwendete Testbesteck (Milenia[®]) ist ein immunometrischer Enzymimmunoassay mit Flüssigphasen-Inkubation und anschließender Festphasen-Trennung zur quantitativen Bestimmung von Prolaktin im Serum der Ratte.

Die Serumproben und die vom Testhersteller vorgegebenen Standards werden zusammen mit im Überschuß befindlichen polyklonalen, Ligand-gekoppelten Prolaktin-Antikörpern und monoklonalen, mit Meerrettichperoxidase markierten Antikörpern in die Ligand-beschichteten Küvetten einer Mikroplatte pipettiert. Während der ersten einstündigen Inkubation erkennen diese spezifischen Antikörper unterschiedliche Epitope der in den Proben vorliegenden Prolaktin-Moleküle und bilden einen sogenannten Sandwich-Komplex aus, welcher aus den beiden Antikörpern und dem eingeschlossenen Prolaktin besteht. Durch die Zugabe eines multivalenten Anti-Liganden werden die entstandenen Antigen-Antikörper-Komplexe während der darauf folgenden sechzig Minuten an der Innenwand der Mikroplattenkavitäten immobilisiert. Die ungebundenen Reaktionspartner werden in einem anschließenden Waschgang entfernt.

Das zugegebene Substrat, in diesem Fall TMB (3,3',5,5'-Tetra-Methyl-Benzidin), wird vom gebundenen Enzym zu einem farbigen Endprodukt

umgesetzt. Durch die Zugabe der Stopplösung wird nach dreißig Minuten die enzymatische Reaktion unterbrochen.

Die bei einer Wellenlänge von 490 nm im Mikroplatten-Photometer (Microelisa[®], Fa. Dynatech, Denkendorf) gemessene optische Dichte der Lösung ist der Konzentration an vorhandenem Ratten-Prolaktin in der entsprechenden Serumprobe direkt proportional.

3.6.2 Kortikosteron

Es handelt sich bei dem hier verwendeten Test (Coat-A-Count[®]) um einen kompetitiven Festphasen-Radioimmunoassay zur Bestimmung von Kortikosteron im Serum der Ratte.

Die vorhandenen Serumproben sowie die Standards werden zusammen mit dem ¹²⁵J-markierten Ratten-Kortikosteron in mit spezifischen Antikörpern markierten Polypropylen-Röhrchen pipettiert. Während der zweistündigen Inkubation konkurrieren das im Rattenserum vorhandene Kortikosteron und das ¹²⁵J-markierte Kortikosteron um eine limitierte Anzahl von Bindungsstellen der an die Röhrchenwand gebundenen spezifischen Antikörper. Nach Abschluß der Reaktion werden die ungebundenen Reaktionspartner durch Dekantieren entfernt, bevor die Menge gebundener Radioaktivität im Gammacounter (Gammamaster, Fa. Wallac, Deutschland) gemessen wird. Die gemessenen Counts sind der Konzentration an Ratten-Kortikosteron in der entsprechenden Serumprobe indirekt proportional.

3.6.3 Auswertung

Zur Auswertung des Prolaktin-Tests war eine lineare Darstellung der Regressionsgeraden im XY-Diagramm die Kurvenanpassung der Wahl, wobei zunächst von allen Doppelwerten der Extinktionen der Standards die Mittelwerte errechnet wurden. Aus diesen Mittelwerten wurde dann die prozentuale Bindungsrate jeder einzelnen Standardkonzentration im Verhältnis zum Maximalstandard (100% Bindungsrate) berechnet und die sich daraus ergebende Gerade in die Darstellung eingezeichnet. Anhand der so gewonnenen Standardkurve wurden anschließend, nach Berechnung der Steigung der Geraden, die Konzentrationen der unbekanntenen Proben bestimmt.

Bei der Auswertung des Ratten-Kortikosteron-Radioimmunoassays wurde die Darstellungsform eines XY-Diagramms mit halblogarithmischer Auftragung verwendet. Die Berechnung der Werte, sowie die graphische Darstellung der Ergebnisse, erfolgte vollautomatisch durch das integrierte Computerprogramm des verwendeten Gammacounters.

3.7 Statistik

3.7.1 Versuchsplanung

Die biometrische Analyse von Tierversuchen setzt voraus, daß zwischen den Versuchsgruppen nicht schon bei Versuchsbeginn schwerwiegende Unterschiede vorhanden sind. Das Risiko solcher Meßwertverzerrungen ist insbesondere dann sehr groß, wenn die Versuchstiere rein willkürlich zu Käfiggruppen zusammengestellt werden. Der beste Weg, dies zu vermeiden, ist die zufällige Zuordnung der Tiere, die sogenannte Randomisation (Dietzel et al., 1978).

Aus diesem Grund wurden alle Untersuchungen an den Tieren nach dem Prinzip der Randomisation durchgeführt. In den Voruntersuchungen wurde die einfache, vollständige Randomisation der Versuchstiere zur Festlegung der Reihenfolge der Manipulationen bzw. Zeitpunkte benutzt. Alle Manipulationen wurden an mindestens sechs Tieren wiederholt.

Bei dem Hauptversuch wurden in einem ersten Schritt die auf Grund des aufgestellten Versuchsplans vorgesehenen sechzehn Versuchstiere mit einer einfachen, vollständigen Randomisation auf die acht Manipulationen (je 2 Tiere pro Manipulation) aufgeteilt. Je vier Manipulationen wurden zu einem Block von Manipulationen mit aufsteigendem Schweregrad zusammengefaßt, welcher dann aus zwei Käfigen mit je vier Tieren bestand. Jedes Tier wurde jeder Manipulation seines Blocks zweimal ausgesetzt, weil die darauf folgende Blutentnahme einmal nach zehn Minuten (zur Bestimmung von Prolaktin) und das andere Mal nach zwanzig Minuten (für die Kortikosteron-Bestimmung) erfolgen mußte. Die Reihenfolge der Manipulationen pro Tier wurde mit Hilfe eines lateinischen Quadrats (siehe Tabelle 3, Seite 36) mit balancierten Nachbarschaftsbeziehungen (Durier et al., 1997) für beide Blöcke gleich

festgelegt. Damit wurden alle drei Grundprinzipien der Versuchsplanung nach Herzberg und Cox (1969) erfüllt, Randomisation, ausreichende Versuchswiederholung und Einschränkung der Variabilität durch Blockbildung (in diesem Fall ist Block = Tier).

Für den Abschlußversuch wurden die sechzehn bisher benutzten Tiere auf zwölf Tiere (4 Käfige mit je 3 Tieren) reduziert, wegen eines zwischenzeitlich aufgetretenen Tierverlustes in zwei Käfigen. Diese zwölf verbliebenen Tiere wurden in zwei Gruppen randomisiert. In der Gruppe 1 war die Abfolge der Manipulationen bei vier weiteren Blutentnahmen "Chip-Implantation – keine Manipulation – Chip – keine", bei der Gruppe 2 wurde die Abfolge "keine Manipulation – Chip-Implantation – keine – Chip" verwendet.

3.7.2 Versuchsauswertung und Darstellungen

Als Darstellungsform für die Ergebnisse des Vorversuches, sowie des Hauptversuches, wurde das Boxplot-Diagramm verwendet.

Die Box eines Plots wird vom ersten und dritten Quartil (25% bzw. 75% Perzentil) begrenzt. Dessen innere Linie repräsentiert den Median (= zweites Quartil). Daraus folgt, daß sich innerhalb der Box die mittleren 50% der Werte befinden. Ferner werden der kleinste und größte Wert einer Meßreihe markiert, sofern diese nicht als "Ausreißer" interpretiert werden. Werte, die um mehr als drei Kastenlängen außerhalb liegen, werden im Boxplot als Extremwerte mit einem Stern gekennzeichnet. Werte, die um mehr als anderthalb Kastenlängen außerhalb liegen, werden mit einem Kreis gekennzeichnet (Bühl und Zöfel, 1998).

Zur Interpretation der graphischen Darstellungen wurden der Median und die beiden weiteren Perzentile und das arithmetische Mittel sowie die Standardabweichung als Zahlenwerte in tabellarischer Form angegeben.

Zur Darstellung aller weiteren Versuche wurden Streudiagramme verwendet. Sie verdeutlichen zum einen den zeitlichen Verlauf der Hormonausschüttung und zum anderen die inter- und intraindividuelle Varianz der Hormonkonzentrationen.

Die statistische Analyse der Ergebnisse des Hauptversuches erfolgte mit Hilfe der zweifaktoriellen Varianzanalyse mit den beiden Faktoren "Manipulation" und "Tier". Sie soll die Frage klären, ob sich die auftretenden Mittelwertunterschiede der Manipulationen bzw. der Tiere mit zufälligen Schwankungen erklären lassen, oder ob es sich um signifikante Unterschiede handelt.

Zur bildlichen Darstellung der varianzanalytischen Ergebnisse wurde in Anlehnung an die Technik der Qualitätskontrollkarten das 95%-Konfidenzintervall um das jeweilige Gesamtmittel eines Blockes gewählt und die Mittelwerte der einzelnen Manipulationen eingefügt.

Das Ergebnis des Abschlußversuchs wurde mit dem t-Test für verbundene Stichproben ausgewertet. Dabei wurden nur die Messungen der beiden ersten aufeinander folgenden Blutentnahmen verwendet, weil ein zeitlich bedingter Verstärkungseffekt bei den weiteren zwei Blutentnahmen nicht auszuschließen war. Zur Prüfung der Paardifferenzen wurde bei allen zwölf Tieren die Differenz zwischen dem Kortikosteron-Wert des Tieres "mit Chip" gegen den Kortikosteron-Wert des gleichen Tieres ohne Manipulation ("ohne Chip") berechnet.

Zur graphischen Darstellung der Ergebnisse wurde das Computerprogramm SPSS (Version 7.5.3, Fa. SPSS Inc.) eingesetzt, während die Berechnungen der statistischen Auswertung mit dem Programm Statgraphics (Version 3.0, Fa. Statistical Graphics Corp.) durchgeführt wurden.

4 Ergebnisse

4.1 Erster Vorversuch

In einem ersten Vorversuch sollten zwei mögliche Einflußfaktoren auf die Serumkonzentration der zu untersuchenden Hormone geprüft werden. Zum einen ist dieses der Entnahmezeitpunkt (10⁰⁰ Uhr / 11⁰⁰ Uhr) und zum anderen das Geschlecht der Tiere.

Als Versuchstiere standen zwanzig männliche und zwanzig weibliche Wistar-Ratten im Alter von elf Monaten zu Verfügung, welche jeweils zu zweit (gleichgeschlechtlich) in einem Käfig saßen. Von jedem Tier wurden drei Blutproben genommen, wobei die CO₂-Narkose von den Tieren unbemerkt von außerhalb des Tierraumes eingeleitet wurde. Der Zeitpunkt der Blutentnahme wurden so alterniert, daß von jedem Tier mindestens von einem Zeitpunkt zwei Meßwerte verglichen werden konnten (siehe Kapitel 3.3.1).

Der Einfluß des Geschlechtes auf die Hormone erwies sich als besonders bedeutend und wird im Folgenden zuerst behandelt.

In Abbildung 2 und Abbildung 3 sind die Hormonspiegel der zwanzig männlichen und zwanzig weiblichen Tiere einander in Form von Boxplot-Diagrammen gegenübergestellt. Als Hormonspiegel eines Tieres wurde jeweils der arithmetische Mittelwert aus den drei Blutentnahmen verwendet.

Bei der Auswertung zeigt sich ein großer geschlechtsspezifischer Unterschied in bezug auf die Hormonausschüttung. Für Prolaktin sind die Ergebnisse in Abbildung 2 und Tabelle 5 dargestellt, in Abbildung 3 und Tabelle 6 die Ergebnisse für Kortikosteron.

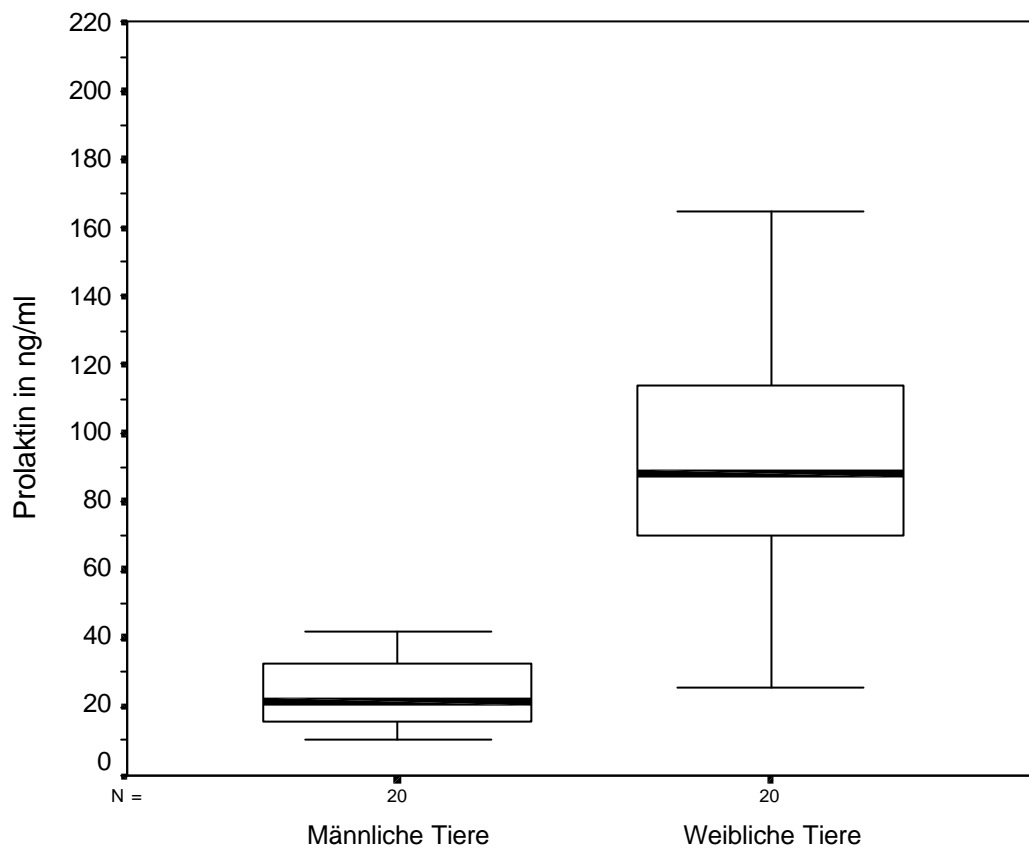


Abbildung 2: Unterschied der Prolaktin-Konzentrationen im Serum männlicher und weiblicher Wistar-Ratten, nach einfacher Blutentnahme unter CO₂-Narkose, ohne vorherige Beeinflussung

Prolaktin (ng/ml)		Männliche Tiere	Weibliche Tiere
N		20	20
Minimum		10,6	25,7
Perzentile	25%	15,6	66,7
	Median	21,8	88,5
	75%	33,7	114,5
Maximum		42,3	165,1
Arithm. Mittelwert		23,4	88,6
Std. Abweichung		9,6	35,0

Tabelle 5: Statistische Kennwerte zur Abbildung 2

Die mittlere Prolaktin-Konzentration der weiblichen Tiere (Median = 88,5 ng/ml) ist um das Vierfache höher, als die mittlere Prolaktin-Konzentration der männlichen Tiere (21,8 ng/ml). Die Streuung der Prolaktin-Werte ist bei den weiblichen Tieren ebenfalls deutlich größer, um das 3- bis 4-fache im Vergleich

zu den männlichen Individuen (vergl. Standardabweichungen bzw. Spannweiten). So wurde bei den weiblichen Tieren als höchster Prolaktin-Wert 165,1 ng/ml gemessen, bei den männlichen dagegen nur 42,3 ng/ml.

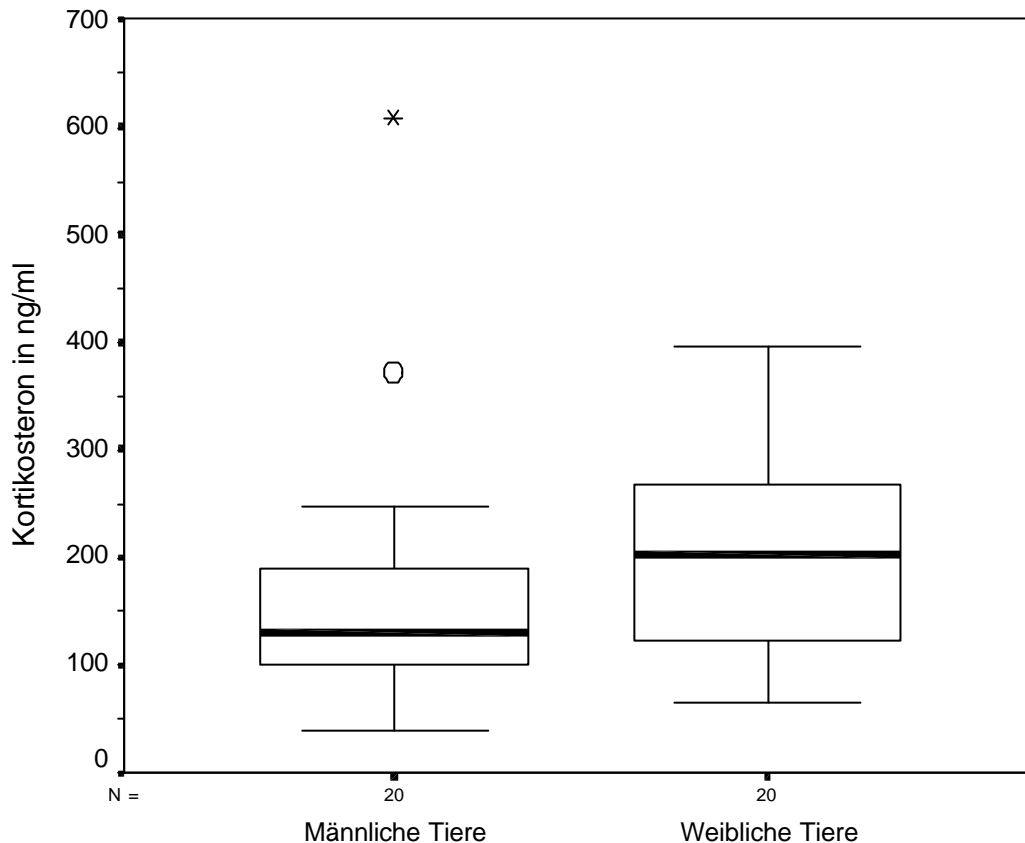


Abbildung 3: Unterschied der Kortikosteron-Konzentrationen im Serum männlicher und weiblicher Wistar-Ratten, nach einfacher Blutentnahme unter CO₂-Narkose, ohne vorherige Beeinflussung

Kortikosteron (ng/ml)		Männliche Tiere	Weibliche Tiere
N		20	20
Minimum		39,8	65,6
Perzentile	25%	93,5	121,7
	Median	130,5	202,7
	75%	193,0	270,4
Maximum		607,5	396,0
Arithm. Mittelwert		164,2	199,5
Std. Abweichung		129,3	93,0

Tabelle 6: Statistische Kennwerte zur Abbildung 3

Der Geschlechtsunterschied ist beim Kortikosteron nicht ganz so groß, aber noch immer bedeutend.

Die mittlere Kortikosteron-Konzentration der männlichen Tiere (Median = 130,5 ng/ml) liegt um 35,6% niedriger als bei den weiblichen Tieren (202,7 ng/ml). Bei den männlichen Tieren traten zwei Extremwerte auf, die vom verwendeten Statistikprogramm (SPSS) in Abbildung 3 automatisch als "Ausreißer" klassifiziert wurden. Diese führen dazu, daß das arithmetische Mittel der Kortikosteron-Werte bei den männlichen Tieren um 33,7 Einheiten über ihrem Median liegt und auch die Standardabweichung ihrer Werte wesentlich größer ist, als bei den weiblichen Tieren. Vergleicht man statt der Standardabweichung die Differenzen zwischen dem 25% und dem 75% Perzentil der beiden Geschlechter (männlich = 99,5 ng/ml; weiblich = 148,7 ng/ml), so erweist sich wie beim Prolaktin auch die Streuung der männlichen Kortikosteron-Spiegel als eindeutig kleiner.

Im Weiteren wird eine Gegenüberstellung der mittleren Hormonkonzentrationen zu unterschiedlichen Entnahmezeiten (10⁰⁰/11⁰⁰ Uhr) nach Geschlechtern getrennt vorgenommen. Die Ergebnisse dieser Auswertung sind in den Abbildungen 4 bis 7 und den dazugehörigen Tabellen 6 bis 9 wiedergegeben.

Die unterschiedliche Anzahl der Proben resultiert zum einen aus einer aufgrund einer nicht ausreichenden Narkose mißlungenen Blutentnahme. Zum anderen mußte aus organisatorischen Gründen ein 10⁰⁰ Uhr Entnahmetermin auf 11⁰⁰ Uhr verschoben werden.

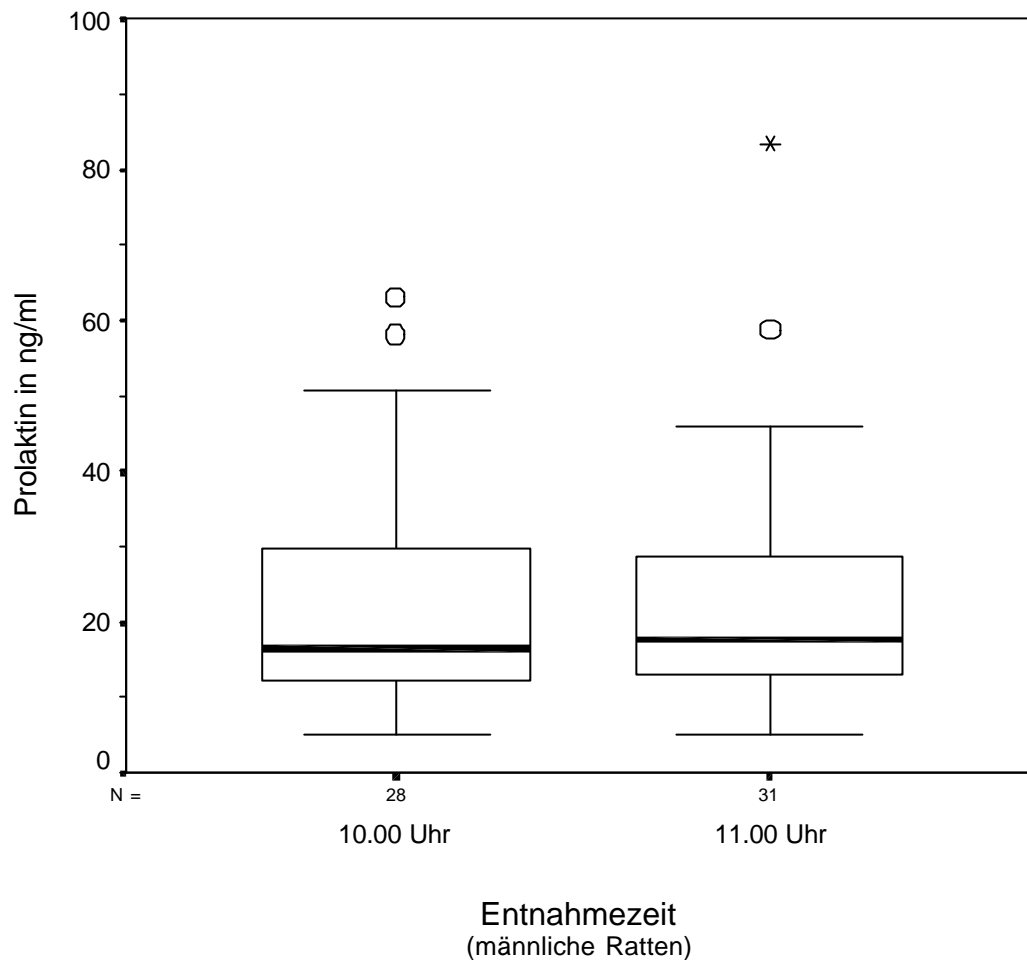


Abbildung 4: Prolaktin-Konzentrationen im Serum männlicher Wistar-Ratten zu den Entnahmezeiten 10⁰⁰ und 11⁰⁰ Uhr, nach Blutentnahme unter CO₂-Narkose, ohne vorherige Beeinflussung

Prolaktin (ng/ml) – männliche Tiere		10 ⁰⁰ Uhr	11 ⁰⁰ Uhr
N		28	31
Minimum		5,1	5,1
Perzentile	25%	12,2	12,8
	Median	16,5	17,8
	75%	30,7	29,0
Maximum		63,1	83,5
Arithm. Mittelwert		23,5	23,7
Std. Abweichung		15,9	16,6

Tabelle 7: Statistische Kennwerte zur Abbildung 4

Der Median der Prolaktin-Konzentrationen der männlichen Tiere zum Entnahmezeitpunkt 10⁰⁰ Uhr (16,5 ng/ml) unterscheidet sich kaum von dem

Median der Entnahmen zum Zeitpunkt 11⁰⁰ Uhr (17,8 ng/ml). Bei beiden Entnahmezeiten traten jeweils zwei "Ausreißer" auf, die eine geringfügige Erhöhung der arithmetischen Mittelwerte der Gruppen im Vergleich zu ihren Medianwerten verursachten. Die Standardabweichungen und die Differenzen zwischen dem 25% und 75% Perzentil unterscheiden sich zwischen 10⁰⁰ Uhr und 11⁰⁰ Uhr ebenfalls nur marginal.

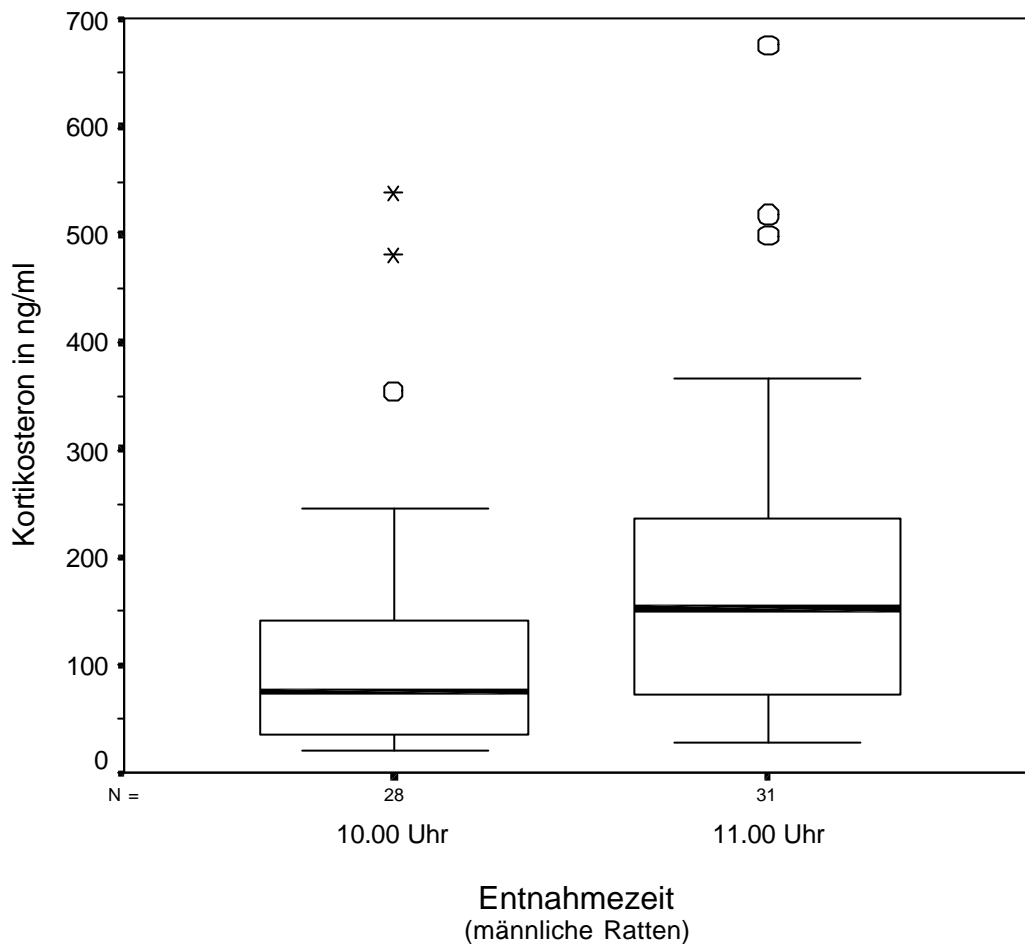


Abbildung 5: Kortikosteron-Konzentrationen im Serum männlicher Wistar-Ratten zu den Entnahmezeiten 10⁰⁰ und 11⁰⁰ Uhr, nach Blutentnahme unter CO₂-Narkose, ohne vorherige Beeinflussung

Kortikosteron (ng/ml) – männl. Tiere		10 ⁰⁰ Uhr	11 ⁰⁰ Uhr
N		28	31
Minimum		19,5	29,1
Perzentile	25%	34,4	71,2
	Median	74,7	151,8
	75%	144,0	239,9
Maximum		538,9	676,1
Arithm. Mittelwert		121,6	188,4
Std. Abweichung		134,1	156,2

Tabelle 8: Statistische Kennwerte zur Abbildung 5

Bei den Kortikosteron-Konzentrationen der männlichen Tiere traten an beiden Entnahmezeitpunkten jeweils drei "Ausreißer" auf. Der Median aus den Bestimmungen um 11⁰⁰ Uhr (151,8 ng/ml) ist um das Doppelte größer als der

10⁰⁰ Uhr Wert (74,7 ng/ml). Die Streuung der Kortikosteron-Konzentrationen ist bei den Bestimmungen um 11⁰⁰ Uhr eindeutig größer, wenn man die Differenzen zwischen den 25% und 75% Perzentilen zugrunde legt (109,6 ng/ml zu 168,7 ng/ml).

Die entsprechenden Ergebnisse der weiblichen Tiere sind in den folgenden Abbildungen dargestellt. Die unterschiedliche Probenzahl kommt hier durch eine unzureichende Narkose bei einem Tier sowie durch den Exitus eines anderen Tieres nach der zweiten Entnahme zustande. Der Verlust wurde durch ein gleichaltes Tier ausgeglichen, um das soziale Gleichgewicht innerhalb der Käfige nicht zu stören, doch wurden seine Prolaktin- und Kortikosteron-Werte bei der Auswertung nicht mit berücksichtigt.

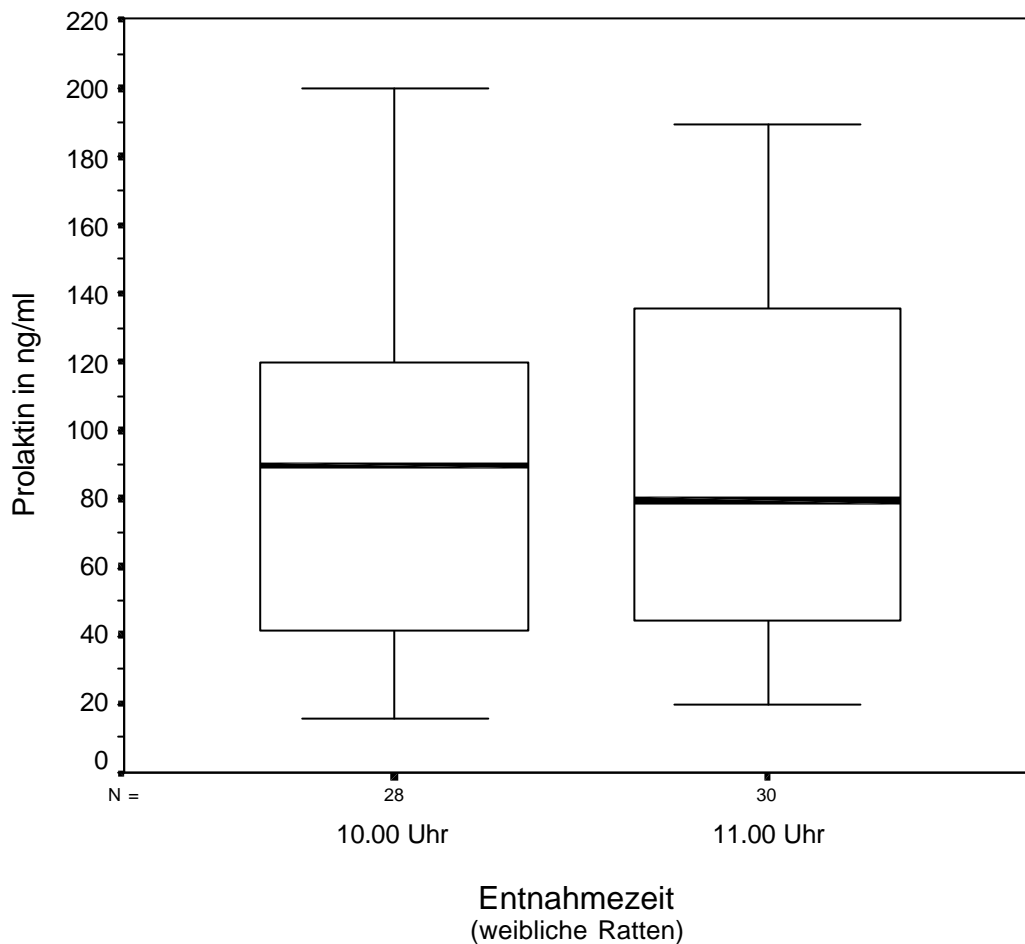


Abbildung 6: Prolaktin-Konzentrationen im Serum weiblicher Wistar-Ratten zu den Entnahmezeiten 10⁰⁰ und 11⁰⁰ Uhr, nach Blutentnahme unter CO₂-Narkose, ohne vorherige Beeinflussung

Prolaktin (ng/ml) – weibliche Tiere		10 ⁰⁰ Uhr	11 ⁰⁰ Uhr
N		28	30
Minimum		15,6	19,8
Perzentile	25%	38,9	44,3
	Median	89,5	79,6
	75%	121,0	136,8
Maximum		200,1	188,8
Arithm. Mittelwert		88,5	86,8
Std. Abweichung		53,5	51,9

Tabelle 9: Statistische Kennwerte zur Abbildung 6

Auch bei den weiblichen Tieren unterscheiden sich die mittleren Prolaktin-Konzentrationen, welche um 10⁰⁰ Uhr (Median 89,5 ng/ml) gemessen wurden, kaum von den 11⁰⁰ Uhr Werten (79,6 ng/ml). Ebenso sind die Streuungen der

Werte, gemessen an den Standardabweichungen bzw. Spannweiten, um 10⁰⁰ Uhr und 11⁰⁰ Uhr nahezu gleich.

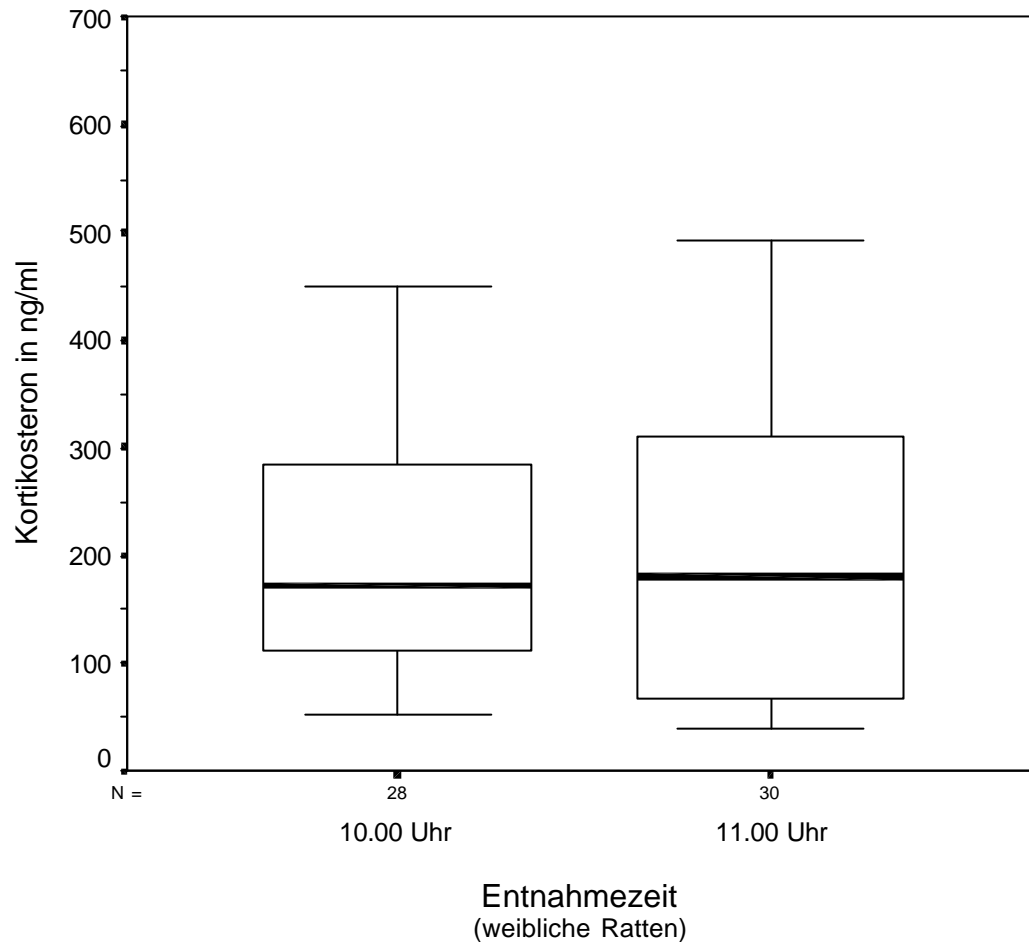


Abbildung 7: Kortikosteron-Konzentrationen im Serum weiblicher Wistar-Ratten zu den Entnahmezeiten 10⁰⁰ und 11⁰⁰ Uhr, nach Blutentnahme unter CO₂-Narkose, ohne vorherige Beeinflussung

Kortikosteron (ng/ml) – weibl. Tiere		10 ⁰⁰ Uhr	11 ⁰⁰ Uhr
N		28	30
Minimum		52,5	40,4
Perzentile	25%	106,0	65,0
	Median	170,9	180,2
	75%	290,1	313,6
Maximum		449,8	491,1
Arithm. Mittelwert		198,8	197,5
Std. Abweichung		115,4	140,5

Tabelle 10: Statistische Kennwerte zur Abbildung 7

Im Gegensatz zu den männlichen Tieren gibt es dagegen bei den Kortikosteron

Konzentrationen der weiblichen Tiere nur einen ganz geringen Unterschied zwischen den Medianwerten der 10⁰⁰ Uhr (170,9 ng/ml) und 11⁰⁰ Uhr (180,2 ng/ml) Entnahmen. Die Standardabweichung der 11⁰⁰ Uhr Entnahmen ist mit 140,5 ng/ml etwas größer als bei den 10⁰⁰ Uhr Entnahmen (115,4 ng/ml).

• **Als Ergebnis der ersten Vorversuche kann zusammengefaßt werden:**

1. Es besteht ein klar ausgeprägter Geschlechtsunterschied der Prolaktin- und der Kortikosteron-Konzentration im Serum der untersuchten Tiere. Der Prolaktin-Spiegel ist bei den weiblichen Ratten fast viermal größer als bei den männlichen Tieren. Der Geschlechtsunterschied ist bei den Kortikosteron-Konzentrationen nicht ganz so extrem ausgeprägt, beträgt aber immerhin noch 36%, um welche die Hormonwerte der Weibchen höher liegen.
2. Beim Prolaktin hat die Uhrzeit der Blutentnahmen bei männlichen und weiblichen Tieren keinen eindeutig gerichteten Einfluß.
3. Dagegen ist der Kortikosteron-Spiegel bei den männlichen Ratten von der Uhrzeit der Blutentnahme deutlich abhängig. Der Kortikosteron-Spiegel war um 11⁰⁰ Uhr im Mittel doppelt so hoch wie um 10⁰⁰ Uhr. Die Uhrzeit der Blutentnahmen hatte bei den weiblichen Ratten dagegen kaum Einfluß auf den Kortikosteron-Spiegel.

Die großen geschlechtsspezifischen Unterschiede in der Konzentration der untersuchten Hormone führten dazu, für alle weiteren Untersuchungen nur noch männliche Tiere zu verwenden, wegen der deutlich kleineren Streuung ihrer Werte.

4.2 Weitere Vorversuche

In weiteren Vorversuchen sollte geklärt werden, welcher zeitliche Abstand zwischen dem Streß einer Manipulation und nachfolgender Blutentnahme für die Bestimmung der beiden Hormone Prolaktin und Kortikosteron optimal ist. Als Manipulationen wurden "Anheben", "Wiegen" und eine intramuskuläre

"Injektion" durchgeführt. Dabei wurde jede Manipulation an sechs Tieren dreimal wiederholt, und bei jeder Wiederholung wurden die sechs Tiere zufällig den sechs Blutentnahmezeitpunkten (2, 5, 10, 20, 40 und 60 Minuten nach der Manipulation) zugeordnet. Pro Blutentnahmezeitpunkt wurde aus den Werten der drei gleich behandelten Tiere ein mittlerer Hormonspiegel (arithmetisches Mittel) berechnet. Mit sechs anderen Tieren wurde dieser Versuchsplan ein zweites Mal durchgeführt, so daß schließlich für jeden Blutentnahmezeitpunkt und jede Manipulation zwei von einander unabhängige mittlere Hormonspiegel aus zwei Tiergruppen zur Verfügung standen.

Aus den Mittelwerten der drei Manipulationen eines Zeitpunktes wurden wiederum die arithmetischen Mittel gebildet. Diese wurden in der graphischen Darstellung der Ergebnisse in Abbildung 8 und Abbildung 9 zum besseren Erkennen des Zeitverlaufs durch eine Linie miteinander verbunden. Die mittleren Hormonkonzentrationen der einzelnen Manipulationen wurden durch unterschiedliche Symbole dargestellt. Dabei wurde allerdings nicht zwischen den beiden Tiergruppen unterschieden, so daß jedes Symbol an jedem Zeitpunkt zweimal vorkommt.

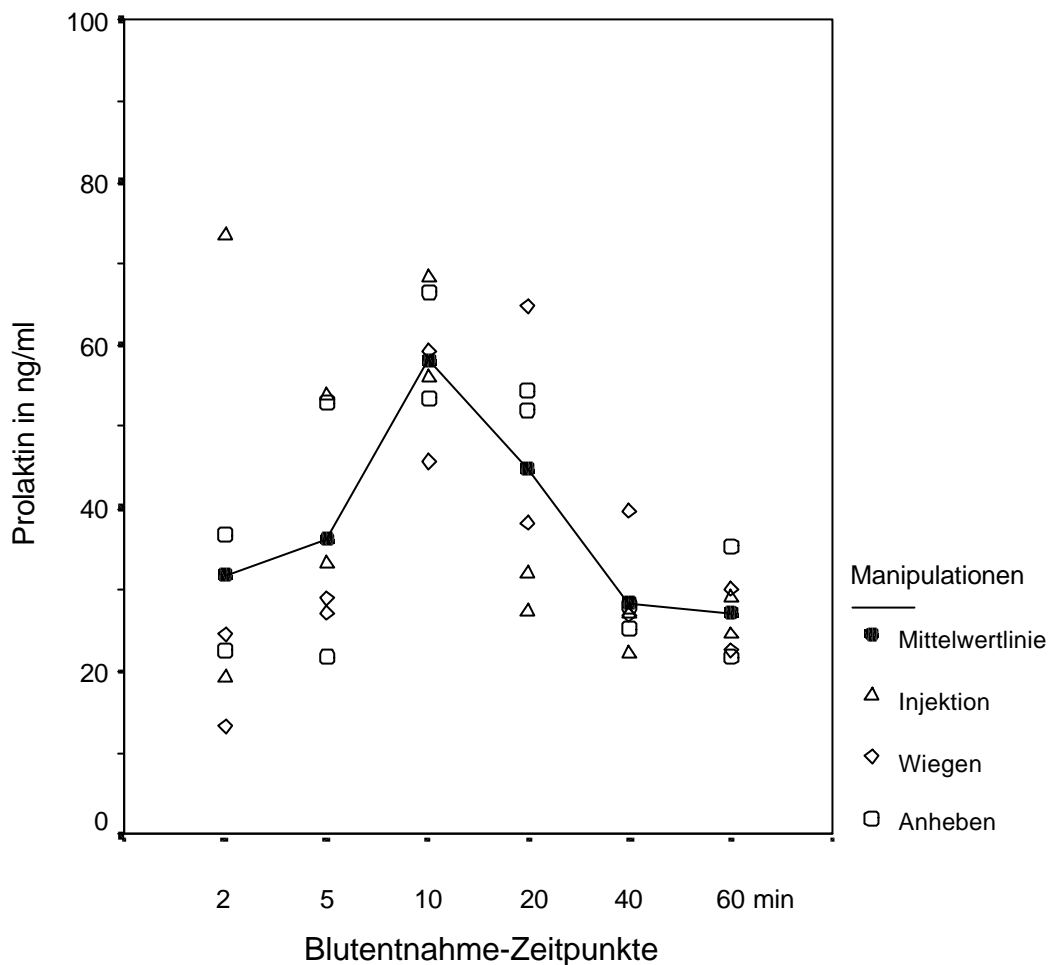


Abbildung 8: Prolaktin-Konzentrationen im Serum männlicher Wistar-Ratten, zu unterschiedlichen Wartezeiten nach den Manipulationen "Anheben", "Wiegen" und "Injektion"

Für das Hormon Prolaktin ergibt sich, gemessen an der Mittelwertlinie in Abbildung 8, eine deutliche Spitze zum Zeitpunkt "10 min" (58,4 ng/ml). Danach kommt es mit zunehmendem Abstand zwischen Manipulation und Blutentnahme zu einer kontinuierlichen Abnahme der Prolaktin-Konzentrationen bis diese nach 60 Minuten sogar unter das Anfangsniveau gesunken sind.

Bei der Darstellung der Kortikosteron-Werte standen für die Manipulation "Anheben" nur die Werte einer Gruppe zur Verfügung, so daß in der Abbildung 9 das entsprechende Symbol pro Entnahmezeitpunkt nur einmal dargestellt ist.

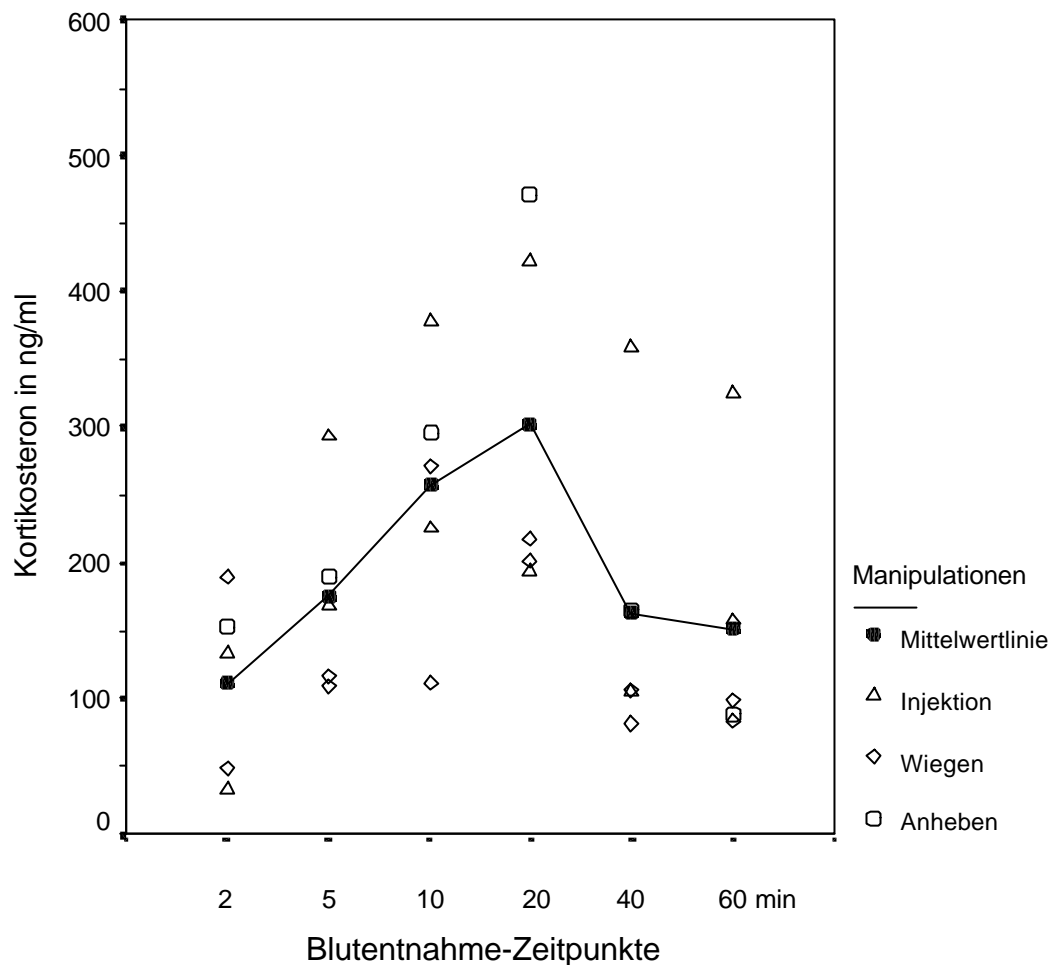


Abbildung 9: Kortikosteron-Konzentrationen im Serum männlicher Wistar-Ratten, zu unterschiedlichen Wartezeiten nach den Manipulationen "Anheben", "Wiegen" und "Injektion"

Die gemittelten Kortikosteron-Werte steigen im hier dargestellten Zeitverlauf von einem Basiswert bei zwei Minuten (112 ng/ml) kontinuierlich (175,4 ng/ml - 256,5 ng/ml) bis zu einem Gipfel bei zwanzig Minuten (301,9 ng/ml) an. Nach weiteren zwanzig Minuten fallen sie zunächst steil (163,9 ng/ml) und in den letzten zwanzig Minuten nur noch geringfügig ab, so daß sie nach einer Stunde (150,8 ng/ml) fast wieder das Anfangsniveau erreicht haben.

- **Zusammenfassung der Ergebnisse der weiteren Vorversuche**

Die Zeitverlaufskurve für das Hormon Prolaktin zeigt ein deutliches Maximum der Serumkonzentration zehn Minuten nach Durchführung der Manipulationen.

Bei dem Hormon Kortikosteron zeigt sich dieser Maximalwert zwanzig Minuten nach den Manipulationen.

Als Konsequenz der Ergebnisse dieser weiteren Vorversuche wurde bei den folgenden Versuchen für die Bestimmung des Hormons Prolaktin immer ein Abstand von zehn Minuten zwischen Manipulation und Blutentnahme eingehalten, für die Bestimmung von Kortikosteron dagegen ein Abstand von zwanzig Minuten.

4.3 Abschließender Vorversuch

Bei den bisherigen Vorversuchen waren die Hormonspiegel der Blutproben eines Zeitpunktes auch bei gleicher Manipulation sehr unterschiedlich. Da diese Blutproben jeweils von verschiedenen Tieren stammten, war es das Ziel dieses abschließenden Vorversuches, durch den intraindividuellen Vergleich von Blutproben eines Tieres zu klären, ob die Meßwerte eines Tieres weniger streuen als die Werte verschiedener Tiere und ob sich dadurch eine versuchsplanerische Möglichkeit ergibt, die Varianz der Hormonspiegel einzuschränken.

Hierzu wurden sechs Tiere dieser Versuchsreihe zunächst gewogen (= eigentliche Manipulation) und ihnen anschließend nach zehn Minuten Blutproben für die Prolaktin-Bestimmung entnommen, während bei sechs anderen Tieren die Blutentnahmen für die Kortikosteron-Bestimmung erst zwanzig Minuten nach dem "Wiegen" stattfanden. Bei allen zwölf Tieren wurde diese Manipulation mit anschließender Blutentnahme dreimal identisch wiederholt, jeweils zur gleichen Uhrzeit (10⁰⁰ Uhr), mit einem Tag Pause zwischen den Entnahmen.

Die Ergebnisse der drei Hormonbestimmungen jedes Tieres sind in Abbildung 10 und Abbildung 11 individuell getrennt dargestellt.

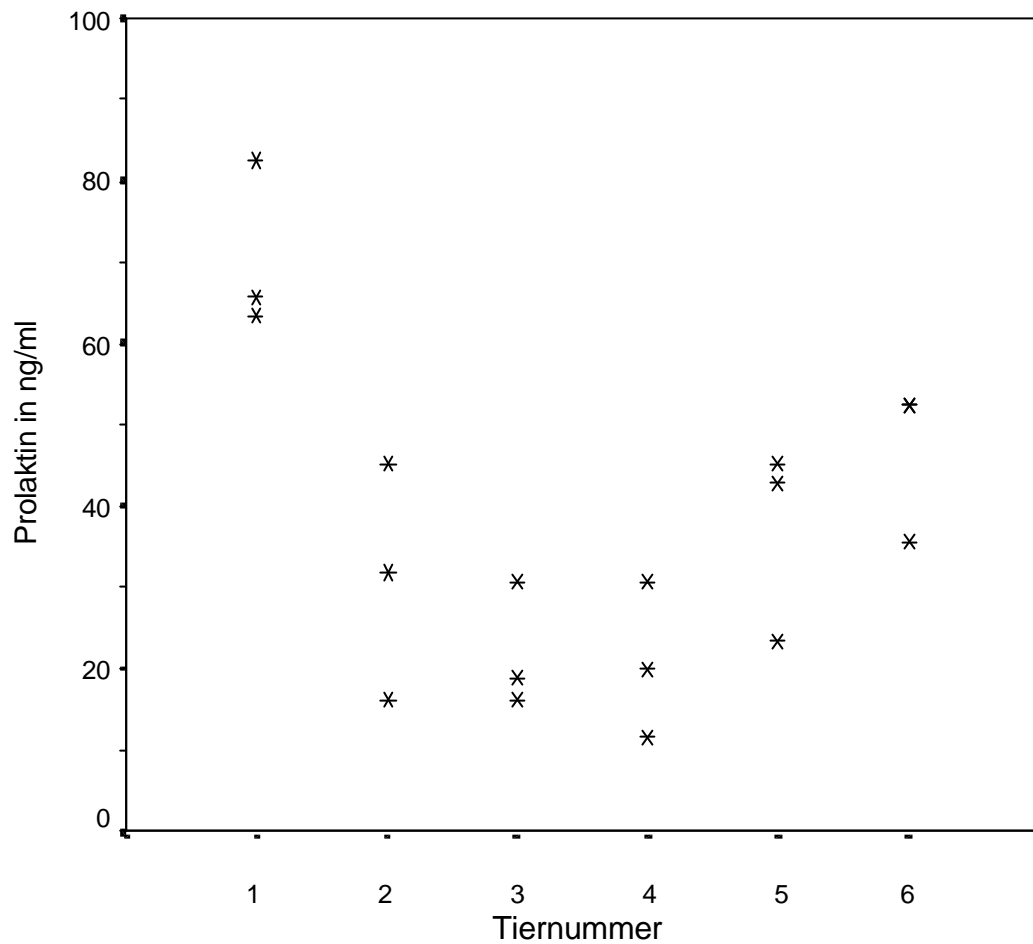


Abbildung 10: Inter- und intraindividuelle Varianz der Prolaktin-Konzentration im Serum von sechs männlichen Wistar-Ratten, an drei unterschiedlichen Entnahmetermen, jeweils zehn Minuten nach dem "Wiegen"

Die Abbildung 10 zeigt, daß die Prolaktin-Werte eines Tieres, auch wenn sie an drei verschiedenen Tagen gemessen wurden, relativ nahe beieinander liegen. Zwischen den sechs untersuchten Tieren bestehen dagegen teilweise erhebliche Unterschiede (vergl. z. B. Tier-Nr. 1 zu Tier-Nr. 3).

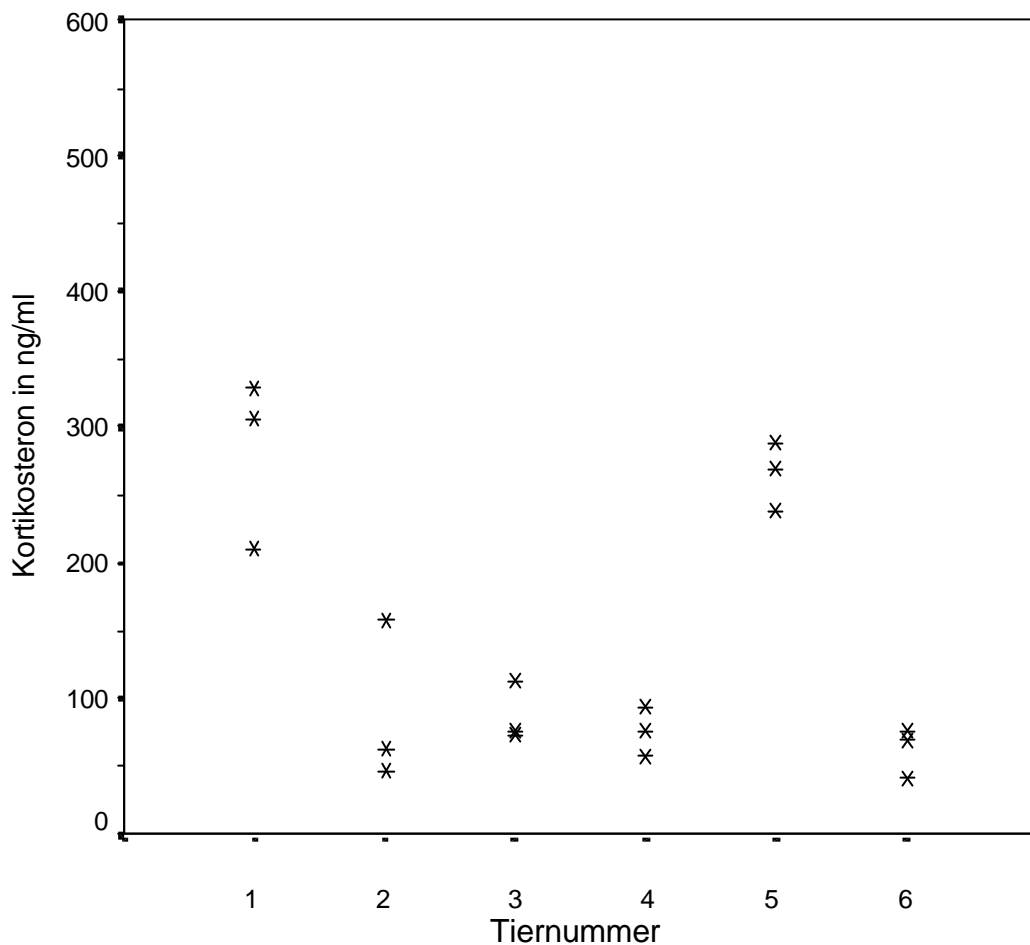


Abbildung 11: Inter- und intraindividuelle Varianz der Kortikosteron-Konzentration im Serum von sechs männlichen Wistar-Ratten, an drei unterschiedlichen Entnahmetermi- nenen, jeweils zwanzig Minuten nach dem "Wiegen"

Auch beim Vergleich der Kortikosteron-Spiegel der sechs anderen untersuchten Tiere zeigt sich ein deutlicher interindividueller Unterschied bei geringer intraindividuelle Varianz (vergl. z. B. Tier-Nr. 4 und Tier-Nr. 5).

- **Zusammenfassung der Ergebnisse des abschließenden Vorversuchs**

Als Ergebnis dieses Versuches kann festgehalten werden, daß die untersuchten Tiere auf die Manipulation "Wiegen" zwar mit einem von Tier zu Tier sehr unterschiedlich hohen Ausschüttungsniveau von Prolaktin und Kortikosteron reagieren. Ihre individuelle Reaktion auf den wiederholten Stressor ist aber annähernd gleich, was sowohl für die Prolaktin- als auch für

die Kortikosteron-Konzentrationen gilt. Daraus folgt, daß ein Versuchsplan, der die interindividuellen Unterschiede ausschalten würde, zu einer Einschränkung der Variabilität der Hormonspiegel und damit auch zu einer Einsparung von Versuchstieren führen könnte.

4.4 Hauptversuch

Auf der Grundlage der Ergebnisse aus den Vorversuchen wurden im Hauptteil der Ergebnisse dieser Arbeit zwei Fragestellungen getrennt bearbeitet.

Im Rahmen dieses Hauptversuches wurde zuerst untersucht, ob Streß durch Manipulationen, die nach menschlichem Ermessen in ihrem Schweregrad abgestuft sind, auch zu abgestuften Reaktionen mit entsprechenden Hormonspiegeln bei den Ratten führt.

Der daran anschließende Abschlußversuch (siehe Kapitel 4.5) sollte klären, ob Streß durch eine definierte Manipulation bei Ratten überhaupt höhere Hormonwerte verursacht, im Vergleich zu den Werten dieser Tiere ohne vorhergehende Manipulation.

Aus der Vielzahl der möglichen Manipulationen wurden acht Methoden für den Hauptversuch ausgewählt, die bei der Haltung von kleinen Versuchstieren zur täglichen Routine gehören und als nicht besonders schmerzhaft eingestuft sind. Als weiteres Auswahlkriterium galt für die Methoden, daß jeweils zwei Manipulationen im Schweregrad vergleichbar sein sollten (siehe Tabelle 11). Dadurch konnte der Hauptversuch zur Sicherheit nämlich in Form von zwei gleichartigen Behandlungsblöcken (A und B) wiederholt werden, mit jeweils vier Manipulationen von ähnlich aufsteigendem Schweregrad.

Manipulationen	Nummer Block A	Nummer Block B	Manipulationen
Wiegen im fremden Käfig	1	5	Transport im fremden Käfig
Fixierung mit Handtuch	2	6	Fixierung mit Nackengriff
Fixierung und i. m.-Injektion	3	7	Fixierung und p. o.-Applikation
Fixierung und Mikrochip-Implantation	4	8	Fixierung und Ohrlochung

Tabelle 11: Numerierung der durchgeführten Manipulationen

Der nach den Ergebnissen der Vorversuche erstellte Versuchsplan des Hauptversuches ("Lateinisches Quadrat" in Tabelle 12) basierte auf einer ausgewogenen Reihenfolge der Durchführung der Manipulationen. Auf Kontrollmessungen ohne vorherige Manipulation wurde bei diesen Tieren verzichtet, um ihre Belastung durch weitere zwei Blutentnahmen in Serie nicht noch zu erhöhen. Zumal die Frage, ob eine Manipulation im Vergleich mit unbehandelten Kontrollwerten zu einer Änderung der Hormonspiegel führt, noch ausführlich im Abschlußversuch untersucht werden sollte.

Block A					
Käfig-Nr.	Tier-Nr.	Reihenfolge der Durchführung der Manipulationen			
1	1	1	2	4	3
	2	2	3	1	4
	3	3	4	2	1
	4	4	1	3	2
2	5	1	2	4	3
	6	2	3	1	4
	7	3	4	2	1
	8	4	1	3	2
Block B					
Käfig-Nr.	Tier-Nr.	Reihenfolge der Durchführung der Manipulationen			
3	9	5	6	8	7
	10	6	7	5	8
	11	7	8	6	5
	12	8	5	7	6
4	13	5	6	8	7
	14	6	7	5	8
	15	7	8	6	5
	16	8	5	7	6

Tabelle 12: Behandlungsplan des Hauptversuches auf der Grundlage eines lateinischen Quadrats mit balancierten Nachbarschaftsbeziehungen (in Anlehnung an Durier et al., 1997)

Der Hauptversuch wurde an sechzehn männlichen Wistar-Ratten durchgeführt, die, vor Versuchsbeginn, zufällig auf vier Käfige verteilt wurden. Die Tiere der Käfige 1 und 2 wurden den Manipulationen des Blocks A unterworfen, die Tiere in den Käfigen 3 und 4 denjenigen des Blocks B. Pro Block wurden entsprechend die Hormonspiegel von jeweils acht männlichen Ratten bestimmt, wobei jedes Tier jeder der vier Manipulationen seines Blocks in der dargestellten Reihenfolge ausgesetzt wurde.

Bei dem ausgewählten Versuchsplan wird an den Tieren eines Käfigs an jedem Versuchstag jede Manipulation einmal ausgeführt. Jeder Manipulation folgt jede der drei anderen Manipulationen einmal nach, verteilt auf die vier Tiere eines Käfigs.

Wegen der unterschiedlich langen Wartezeiten, die zwischen den Manipulationen und den Blutentnahmen für die Bestimmungen von Prolaktin bzw. Kortikosteron abzuwarten waren, mußten die Manipulationen in der gleichen Reihenfolge zweimal pro Tier wiederholt werden, was hier tabellarisch nicht mehr dargestellt wurde (vergl. aber Tabelle 3 im Kapitel 3.4). Zur Eingewöhnung wurde jedes Tier vor dieser Serie der acht Blutentnahmen zweimal dem "Wiegen" in einem fremden Käfig ohne nachfolgende Blutentnahme ausgesetzt.

Als erste Übersicht der Ergebnisse sind in der Abbildung 12 die Konzentrationen des Hormons Prolaktin für alle durchgeführten Manipulationen in Block A und B dargestellt. Jedem Boxplot einer Manipulation liegen die Einzelwerte der acht Tiere eines Blocks zugrunde.

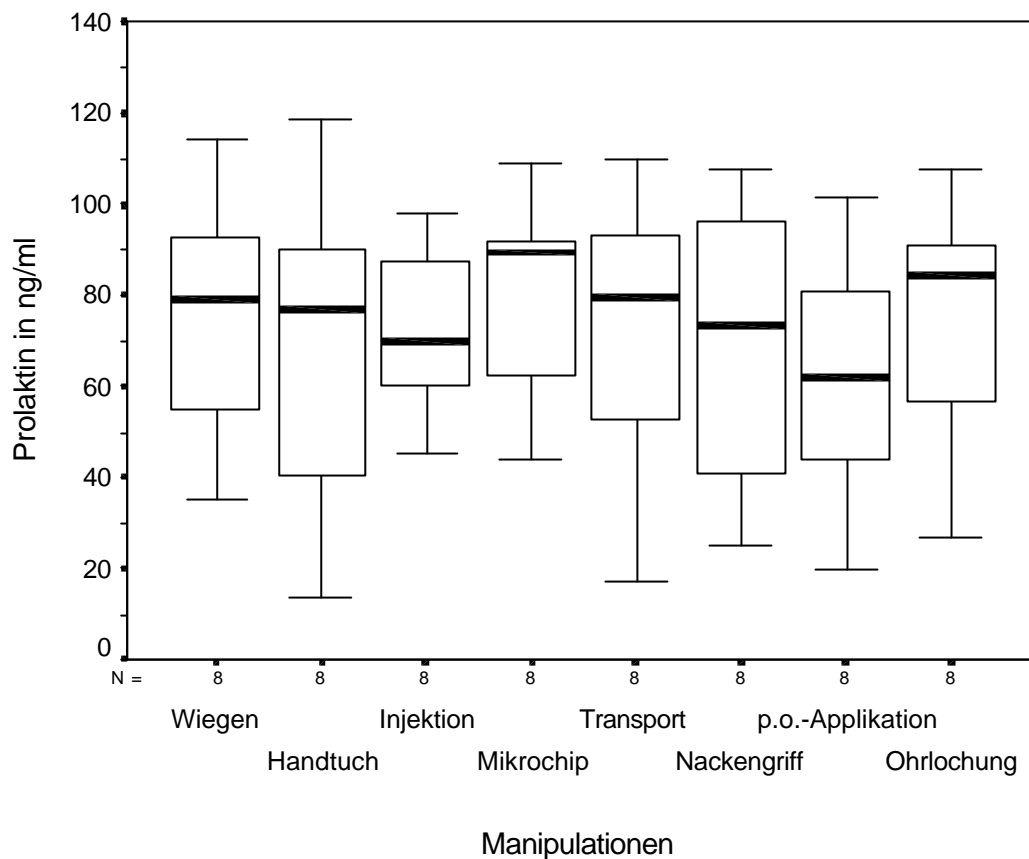


Abbildung 12: Prolaktin-Konzentrationen im Serum männlicher Wistar-Ratten, jeweils 10 Minuten nach der Durchführung aller experimentellen Manipulationen

Zwar sind die Mittelwerte und Streuungen der Prolaktin-Spiegel in den einzelnen Manipulationsgruppen unterschiedlich, aber ein systematischer Unterschied zwischen Block A und Block B ist nicht zu erkennen. Die niedrigsten Medianwerte der Prolaktin-Konzentrationen insgesamt zeigen sich bei der "p. o.-Applikation" (62 ng/ml) und der "Injektion" (69,7 ng/ml), während es nur geringfügige Differenzen zwischen dem "Nackengriff" (73,6 ng/ml) und der Fixierung mittels "Handtuch" (77,1 ng/ml), sowie dem "Wiegen" (78,9 ng/ml) und dem "Transport" (79,6 ng/ml) gibt. Die höchsten mittleren Hormonwerte wurden bei den Manipulationen "Ohrlochung" (84,1 ng/ml) und der "Mikrochip"-Implantation (89,3 ng/ml) gefunden. Die niedrigsten Streuungen der Hormonspiegel finden sich bei den Manipulationen intramuskuläre "Injektion" und "Mikrochip"-Implantation.

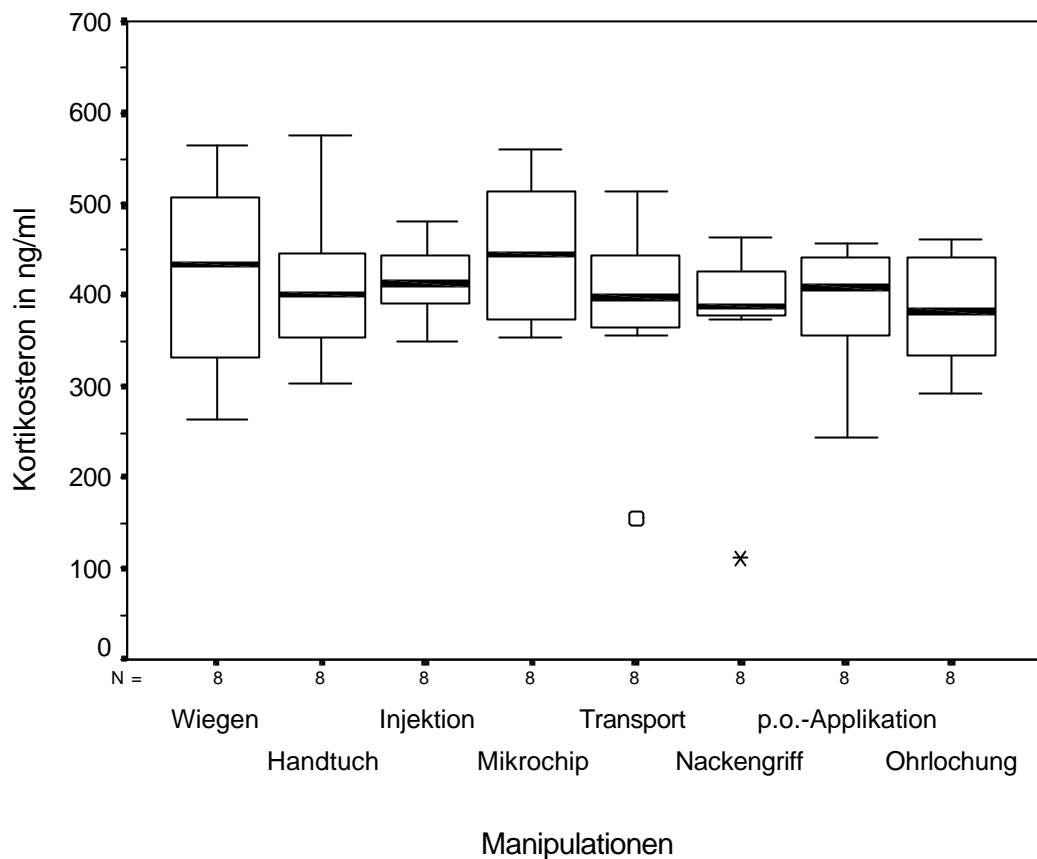


Abbildung 13: Kortikosteron-Konzentrationen im Serum männlicher Wistar-Ratten, jeweils 20 Minuten nach der Durchführung aller experimentellen Manipulationen

Auch bei der Darstellung der Ergebnisse für das Hormon Kortikosteron ist ein systematischer Unterschied zwischen den Blöcken A und B mit ihren jeweils acht verschiedenen Tieren nicht zu sehen. Bei den Medianwerten der Kortikosteron-Konzentrationen ergeben sich für die "Ohrlochung" (381,2 ng/ml) und den "Nackengriff" (388,2 ng/ml) die niedrigsten Werte. Die Werte für den "Transport" (397,7 ng/ml), die Fixierung mittels "Handtuch" (401,4 ng/ml), die "p. o.-Applikation" (408,7 ng/ml) und die "Injektion" (413 ng/ml) unterscheiden sich nur unwesentlich voneinander. Die höchsten mittleren Kortikosteron-Konzentrationen ergeben sich hier für die Manipulationen "Wiegen" (435,2 ng/ml) und "Mikrochip"-Implantation (445 ng/ml). "Injektion" und "Nackengriff" weisen die kleinsten Streuungen der Hormonspiegel auf,

wohingegen die Manipulation "Wiegen" in einem fremden Käfig zur größten Streuung der Meßwerte führt.

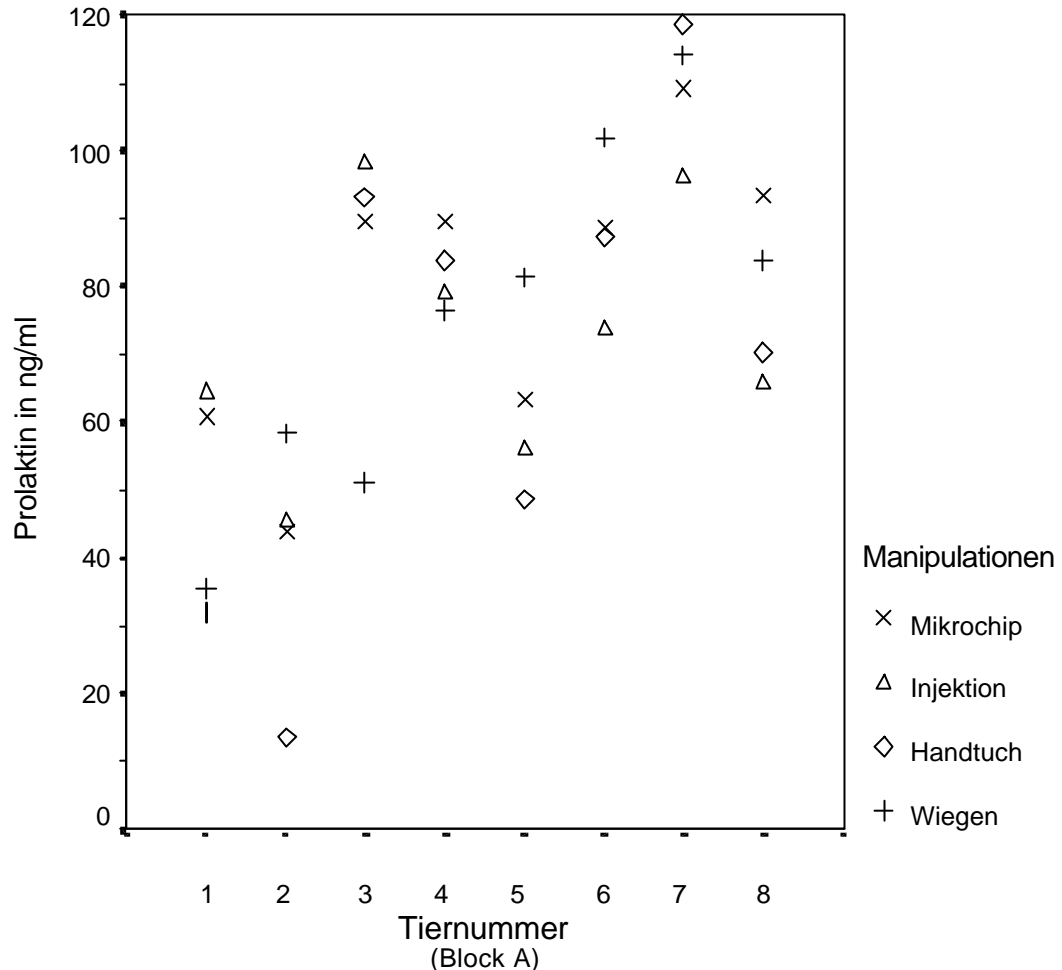


Abbildung 14: Prolaktin-Konzentrationen im Serum jeder männlichen Wistar-Ratte des Blocks A, jeweils 10 Minuten nach der Durchführung der experimentellen Manipulationen

In Abbildung 14 sind die individuellen Reaktionen der Tiere des Blocks A auf die bei ihnen durchgeführten Manipulationen dargestellt. Es ergibt sich ein ähnliches Bild, wie beim abschließenden Vorversuch. Die Tiere reagieren im Vergleich zueinander sehr unterschiedlich, während die Prolaktin-Werte eines einzelnen Tieres, trotz der verschiedenen Manipulationen, nur geringfügig schwanken. Zur Absicherung dieses Ergebnisses wurden die ermittelten Daten einer statistischen Überprüfung mittels zweifacher Varianzanalyse unterzogen.

In den folgenden Ergebnistabellen der Varianzanalysen werden zunächst die Manipulationen 1-4, welche nur bei den Tieren des Blocks A (Tiernummern 1-8) durchgeführt wurden, dargestellt. In einer weiteren Analyse erfolgt die Auswertung von den Manipulationen 5-8, welche ausschließlich bei den Tieren des Blocks B (Tiernummern 9-16) stattfanden.

Ursache	Summe der quadrierten Abweichungen	Freiheitsgrade	Mittlere Varianz	F	p-Wert
Manipulationen (1-4)	557,05	3	185,68	0,84	0,4849
Tiere (1-8)	14261,70	7	2037,38	9,27	0,0000
Rest	4617,76	21	219,89		
Gesamt	19436,51	31			

Tabelle 13: Varianzanalyse der Prolaktin-Konzentrationen bei den Tieren von Block A: "Wiegen", "Handtuch-Fixierung", "i. m.-Injektion" und "Mikrochip-Implantation"

Aus der Tabelle 13 ist ersichtlich, daß es bei der Ausschüttung des Hormons Prolaktin keinen signifikanten Unterschied ($p > 0,05$) zwischen "Wiegen", "Handtuch-Fixierung", "Injektion" und "Mikrochip" gibt, während dagegen die interindividuellen Unterschiede von Tier zu Tier hoch signifikant sind ($p < 0,001$).

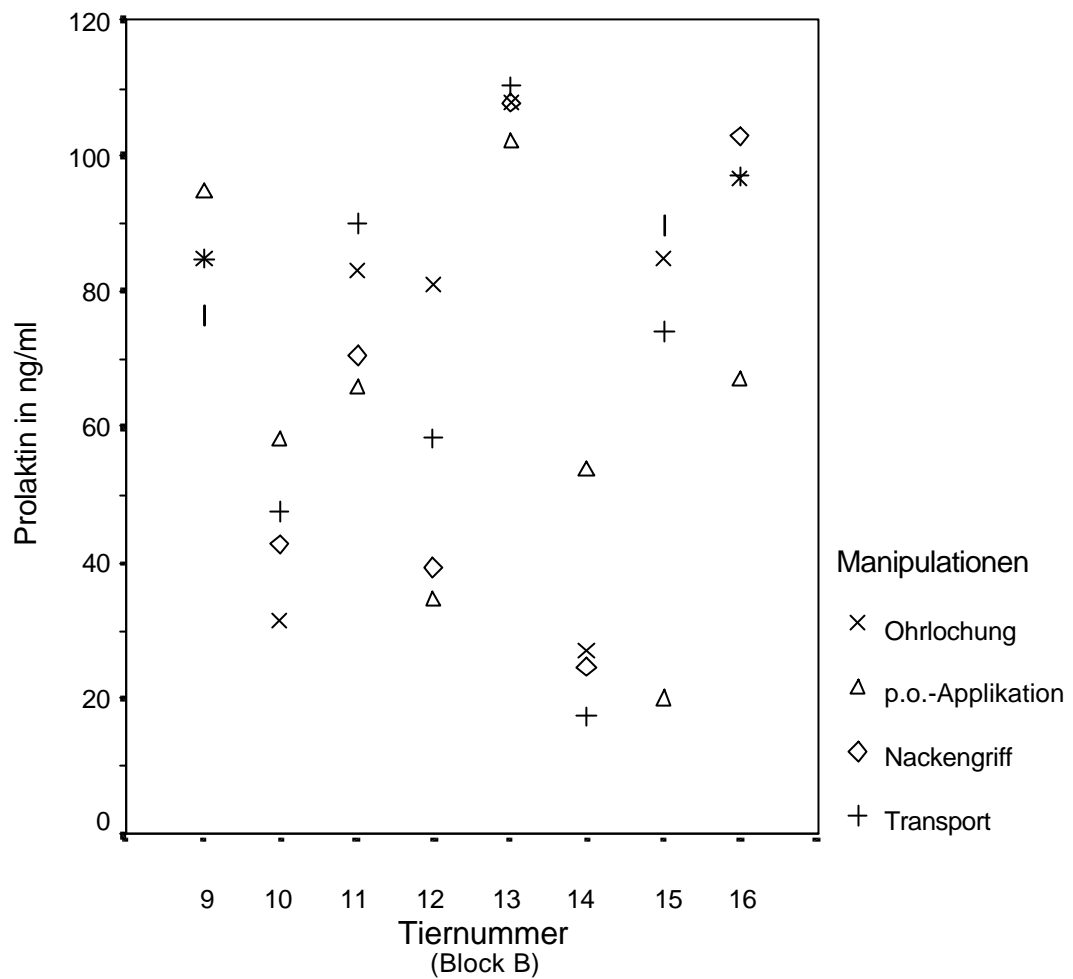


Abbildung 15: Prolaktin-Konzentrationen im Serum jeder männlichen Wistar-Ratte des Blocks B, jeweils 10 Minuten nach der Durchführung der experimentellen Manipulationen

Auch bei den Tieren von Block B zeigt die Abbildung 15 einen deutlichen interindividuellen Unterschied bezüglich ihrer endokrinen Reaktion auf die durchgeführten Manipulationen. Die Reaktionen auf unterschiedliche Manipulationen innerhalb eines Tieres differieren nur wenig.

Ursache	Summe der quadrierten Abweichungen	Freiheitsgrade	Mittlere Varianz	F	p-Wert
Manipulationen (5-8)	753,80	3	251,26	0,85	0,4817
Tiere (9-16)	18156,60	7	2593,80	8,78	0,0000
Rest	6202,07	21	295,33		
Gesamt	25112,47	31			

Tabelle 14: Varianzanalyse der Prolaktin-Konzentrationen bei den Tieren von Block B: "Transport", "Nackengriff-Fixierung", "p. o.-Applikation" und "Ohrlochung"

Der Eindruck von Abbildung 15 wird durch die entsprechende Varianzanalyse (Tabelle 14) eindeutig bestätigt, deren Ergebnis nahezu identisch ist mit demjenigen der Manipulationen 1-4. Auch hier existiert kein signifikanter Unterschied ($p > 0,05$) zwischen "Transport", "Nackengriff-Fixierung", "p. o.-Applikation" und "Ohrlochung", während der Unterschied zwischen den Tieren hoch signifikant ist ($p < 0,001$).

Bei der statistischen Auswertung der Kortikosteron-Werte kommt es zu den gleichen Ergebnissen, wie sie schon bei den Prolaktin-Werten beschrieben wurden.

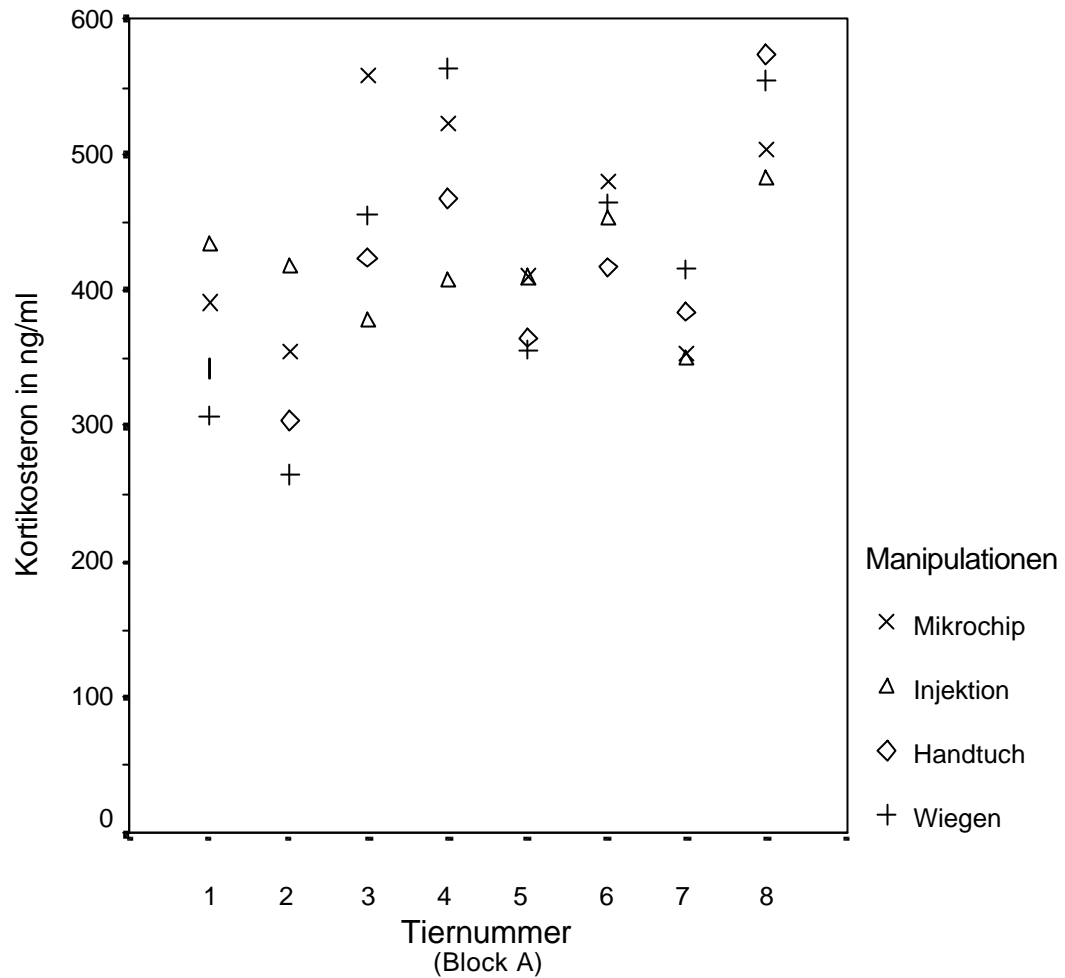


Abbildung 16: Kortikosteron-Konzentrationen im Serum jeder männlichen Wistar-Ratte des Blocks A, jeweils 20 Minuten nach der Durchführung der experimentellen Manipulationen

Ursache	Summe der quadrierten Abweichungen	Freiheitsgrade	Mittlere Varianz	F	p-Wert
Manipulationen (1-4)	6325,00	3	2108,36	0,73	0,5457
Tiere (1-8)	128749,00	7	18392,70	6,37	0,0004
Rest	60675,00	21	2889,28		
Gesamt	195749,00	31			

Tabelle 15: Varianzanalyse der Kortikosteron-Konzentrationen bei den Tieren von Block A: "Wiegen", "Handtuch-Fixierung", "i. m.-Injektion" und "Mikrochip-Implantation"

Schon die Abbildung 16 zeigt, daß die Ausschüttung von Kortikosteron sehr starke interindividuelle Unterschiede von Tier zu Tier aufweist. Kein Unterschied existiert jedoch in bezug auf die durchgeführten Manipulationen "Wiegen", "Handtuch-Fixierung", "i. m.-Injektion" und "Mikrochip-Implantation".

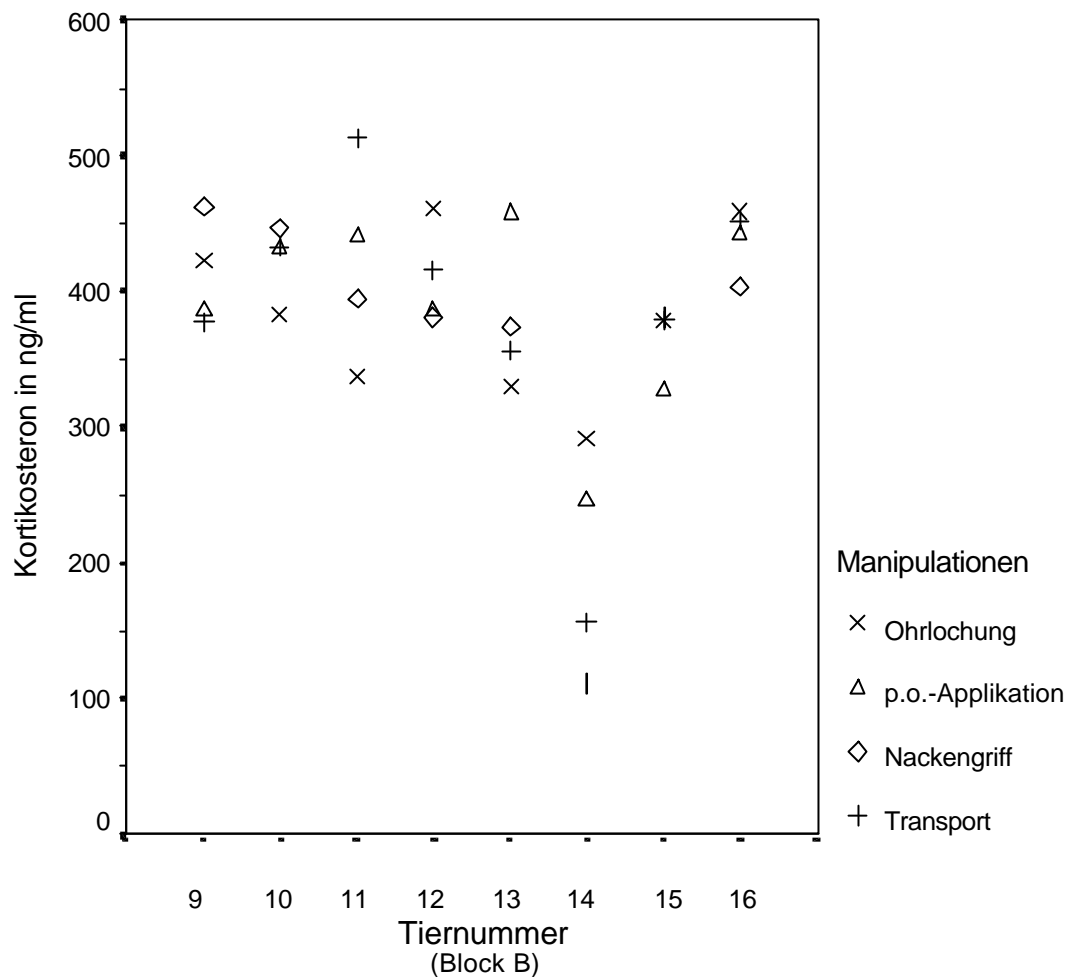


Abbildung 17: Kortikosteron-Konzentrationen im Serum jeder männlichen Wistar-Ratte des Blocks B, jeweils 20 Minuten nach der Durchführung der experimentellen Manipulationen

Ursache	Summe der quadrierten Abweichungen	Freiheitsgrade	Mittlere Varianz	F	p-Wert
Manipulationen (5-8)	1740,61	3	580,20	0,21	0,8908
Tiere (9-16)	165093,00	7	23584,70	8,39	0,0001
Rest	59008,20	21	2809,91		
Gesamt	225841,81	31			

Tabelle 16: Varianzanalyse der Kortikosteron-Konzentrationen bei den Tieren von Block B: "Transport", "Nackengriff-Fixierung", "p. o.-Applikation" und "Ohrlochung"

Die Manipulationen "Transport", "Nackengriff-Fixierung", "p. o.-Applikation" und "Ohrlochung" ergaben ebenfalls keine Unterschiede bezüglich der Kortikosteron-Konzentration im Serum der Tiere vom Block B. Die zweifache

Varianzanalyse in Tabelle 16 bestätigt dieses eindeutig. Der Unterschied zwischen den Tieren ist jedoch auch hier deutlich vorhanden (siehe besonders Tier-Nr. 14).

Als Zusammenfassung der Ergebnisse aller durchgeführten Varianzanalysen bot es sich an, die arithmetischen Mittelwerte der Hormonbestimmungen nach den einzelnen Manipulationen im Rahmen eines 95%-Konfidenzintervalls dem jeweiligen Gesamtmittelwert des Hormons in einem Block gegenüber zu stellen.

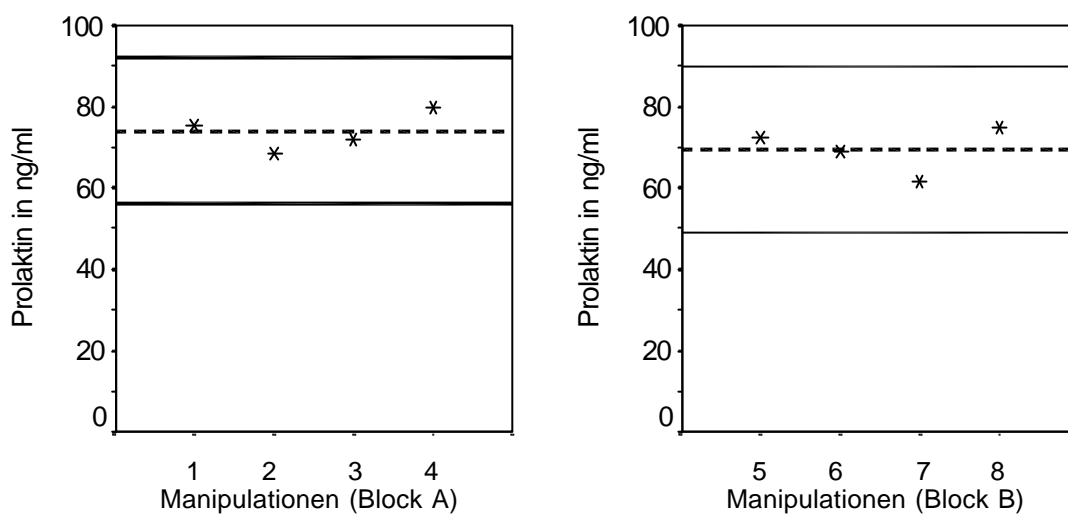


Abbildung 18: 95%-Konfidenzintervalle der mittleren Prolaktin-Konzentrationen männlicher Wistar-Ratten nach den experimentellen Manipulationen²

Die gestrichelte Linie in den Abbildungen 18 und 19 stellt jeweils das Gesamtmittel eines Hormons in einem Block dar, die durchgezogenen Linien sind die Grenzen seines 95%-Konfidenzintervalls, welches aus der Restvarianz der entsprechenden Varianzanalyse berechnet wurde.

Wie aus Abbildung 18 ersichtlich, liegen alle Mittelwerte der Prolaktin-Konzentrationen der Manipulationen in den Blöcken A und B eng um das Gesamtmittel und ganz eindeutig innerhalb des 95%-Konfidenzintervalls.

² Manipulationen Block A: 1 = "Wiegen", 2 = "Handtuch-Fixierung", 3 = "i. m.-Injektion", 4 = "Mikrochip-Implantation"

Block B: 5 = "Transport", 6 = "Nackengriff-Fixierung", 7 = "p. o.-Applikation", 8 = "Ohrlochung"

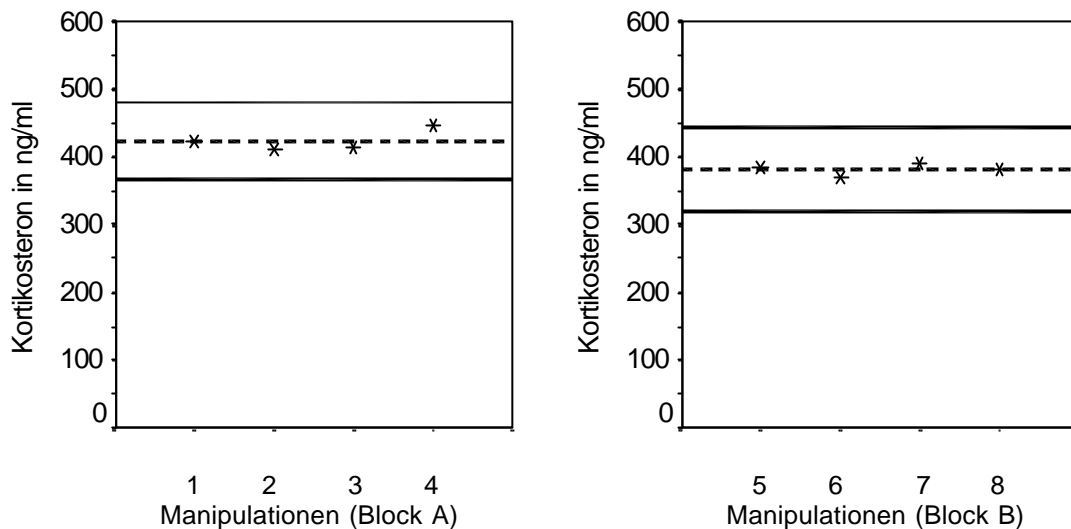


Abbildung 19: 95%-Konfidenzintervalle der mittleren Kortikosteron-Konzentrationen männlicher Wistar-Ratten nach den experimentellen Manipulationen (siehe Fußnote Seite 45)

Auch beim Kortikosteron (Abbildung 19) liegen die mittleren Hormonspiegel nach den Manipulationen ganz eng um das Hormon-Gesamtmittel des jeweiligen Blockes und ebenfalls eindeutig innerhalb der Grenzen des Konfidenzintervalls.

Diese Abbildungen machen klar, daß durch die Manipulationen nur ganz geringe, zufallsbedingte Abweichungen, von dem für alle Tiere gültigen mittleren Hormonspiegel verursacht wurden. Der vermutete Schweregrad einer Manipulation hatte also keinen Einfluß, weder beim Prolaktin noch beim Kortikosteron.

- **Zusammenfassung der Ergebnisse des Hauptversuches**

1. Es konnten keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den durchgeführten Manipulationen nachgewiesen werden, weder durch die Bestimmung der Prolaktin- noch der Kortikosteron-Konzentrationen.
2. Es zeigte sich ein hoch signifikanter Unterschied zwischen den einzelnen Tieren in bezug auf ihre individuellen Hormonantworten auf die bei ihnen vorgenommenen Manipulationen.

4.5 Abschlußversuch

Mit der letzten Untersuchungsreihe sollte der Versuch unternommen werden nachzuweisen, ob die Durchführung einer Manipulation im Vergleich zu einer Bestimmung ohne vorherige Manipulation zu einem generellen Unterschied in der Ausschüttung des Hormons Kortikosteron führt.

Als Manipulation wurde die für besonders schwerwiegend gehaltene "Mikrochip-Implantation" (siehe Abbildung 13) ausgewählt. Es sollten die Kortikosteron-Werte von zwölf Tieren intraindividuell verglichen werden, die sich ohne diese Manipulation bzw. nach der "Mikrochip-Implantation" ergaben. Zur Sicherheit sollte die Manipulation zweimal an einem Tier durchgeführt werden und auch mit zwei Blutentnahmen (des gleichen Tieres) ohne Manipulation verglichen werden. Um hierbei eine ausgewogene Versuchsanordnung zu gewährleisten, wurde ein eigener Versuchsablaufplan mit alternierender Behandlung (siehe Tabelle 4, Seite 40) erstellt.

Es waren zwei Gruppen mit jeweils zwei Käfigen zu je drei Tieren vorgesehen, auf welche die zwölf Versuchstiere bei Beginn zufällig aufgeteilt wurden. Allen sechs Tieren der ersten Gruppe (Tier-Nr. 1, 2, 3 und 7, 8, 9) wurde am ersten Versuchstag auf der rechten Körperseite auf Höhe des kaudalen Rippenbogens ein Mikrochip implantiert, wobei die Tiere mit einem Handtuch fixiert wurden (siehe Kapitel 3.4.4). Die sechs Tiere der zweiten Gruppe (Tier-Nr. 4, 5, 6 und 10, 11, 12) blieben am ersten Versuchstag bei der Blutentnahme zur Kortikosteron-Bestimmung ohne vorherige Manipulation. Am zweiten Versuchstag blieben die Tiere der ersten Gruppe dann alternierend ohne Manipulation. Den Tieren der zweiten Gruppe wurde an diesem Tag der Mikrochip auf der rechten Körperseite implantiert, usw. bis am vierten Versuchstag von allen Tieren zwei Blutproben mit "Mikrochip-Implantation" und zwei Blutproben ohne vorherige Manipulation vorlagen.

Im Folgenden (Abbildung 20 und Abbildung 21) wird der intraindividuelle Verlauf der Kortikosteron-Werte der Tiere für die beiden Gruppen getrennt dargestellt. Die einzelnen Tiere der Gruppen sind durch verschiedene Symbole gekennzeichnet und ihre Meßwerte durch individuell markierte Linien verbunden.

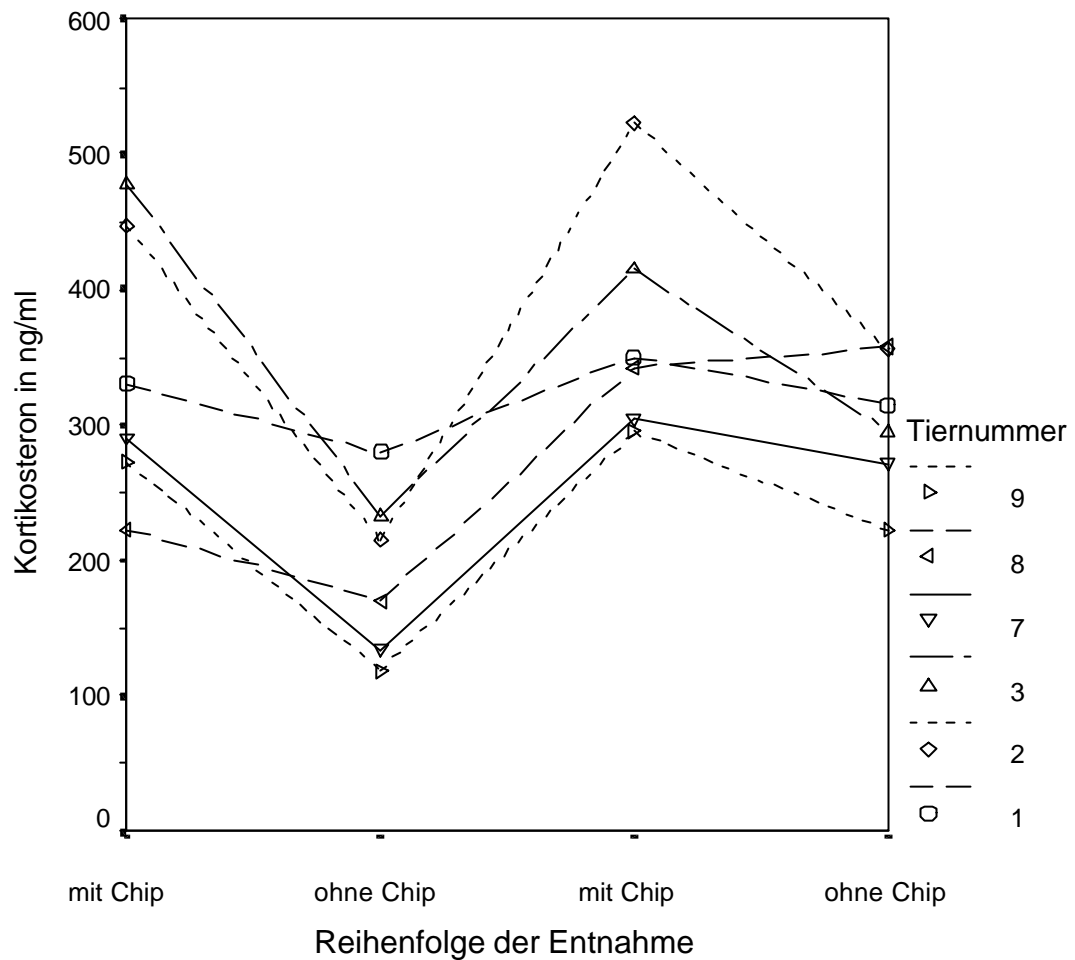


Abbildung 20: Kortikosteron-Konzentration im Serum der männlichen Wistar-Ratten von Gruppe 1 mit und ohne experimentelle Manipulation

Bei den Tieren der Gruppe 1, welche am ersten Versuchstag alle vor der Blutentnahme einen Mikrochip implantiert bekamen, ist am zweiten Versuchstag "ohne Chip" ein deutlicher Abfall der Kortikosteron-Werte zu sehen, gefolgt von einem neuerlichen kräftigen Anstieg am dritten Tag "mit Chip" und wiederum einem Abfall der Werte am vierten Tag "ohne Chip". Bei zwei Tieren (Nr. 1 und Nr. 8) ist dieser Verlauf nicht so ausgeprägt.

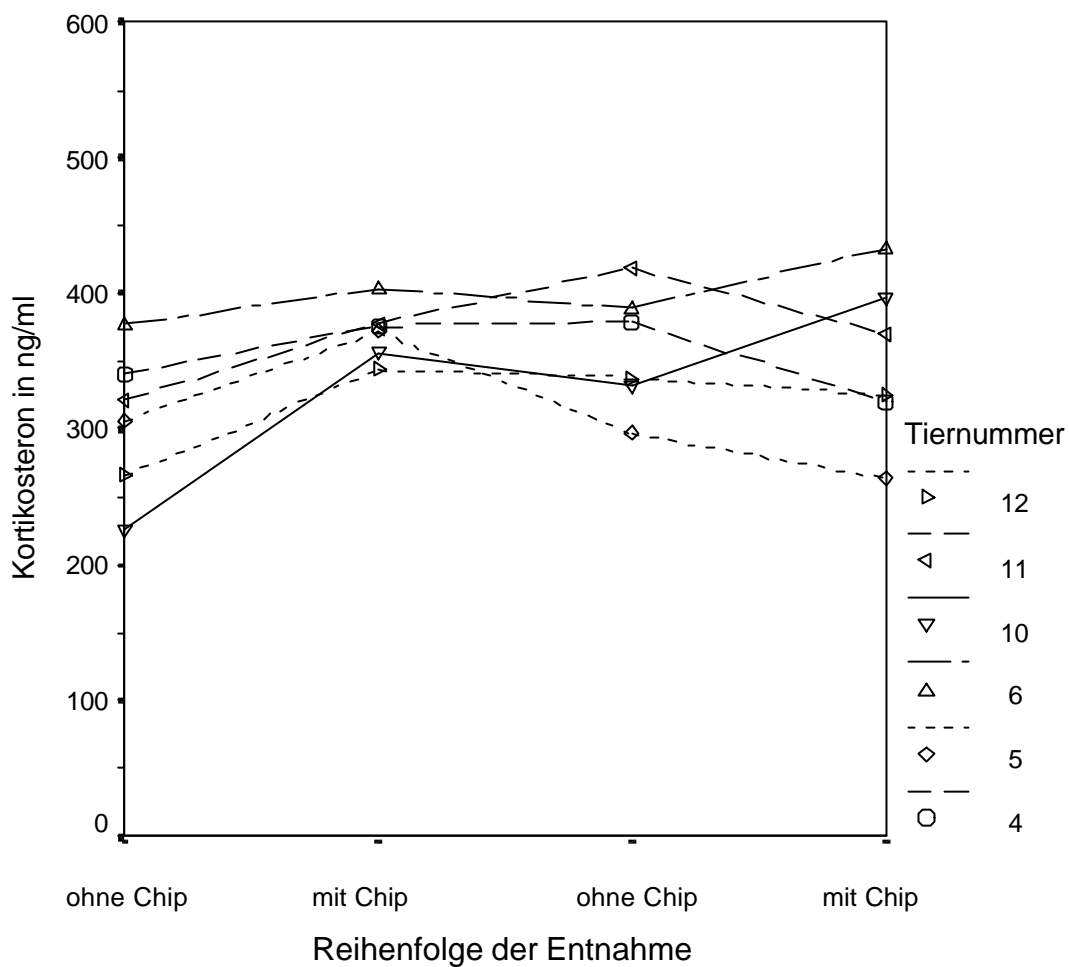


Abbildung 21: Kortikosteron-Konzentration im Serum der männlichen Wistar-Ratten von Gruppe 2 ohne und mit experimenteller Manipulation

Die Tiere der Gruppe 2 zeigen dagegen einen ganz anderen Verlauf der Kortikosteron-Werte. Der Anstieg nach der ersten Blutentnahme ohne vorherige Manipulation zu dem Wert des zweiten Versuchstages "mit Chip" ist gering. Nachfolgend findet zum dritten Versuchstag "ohne Chip" kaum ein Abfall statt und nur bei zwei Tieren (Nr. 6 und Nr. 10) kommt es bei der zweiten Mikrochip-Implantation zu einem neuerlichen Anstieg der Werte.

Um zu prüfen, ob ein zeitlich bedingter Verstärkungseffekt (siehe Kapitel 3.7.2) im Verlauf dieser Untersuchungen eine Rolle spielt, wurde für jedes Tier (ohne Berücksichtigung der Manipulationen) ein Mittelwert aus der ersten und zweiten Kortikosteron-Bestimmung und ein weiterer Mittelwert aus der dritten und vierten Bestimmung gebildet und verglichen (Abbildung 22). In beiden

Mittelwerten eines Tieres ist jeweils eine Messung mit und eine Messung ohne "Mikrochip-Implantation" vertreten.

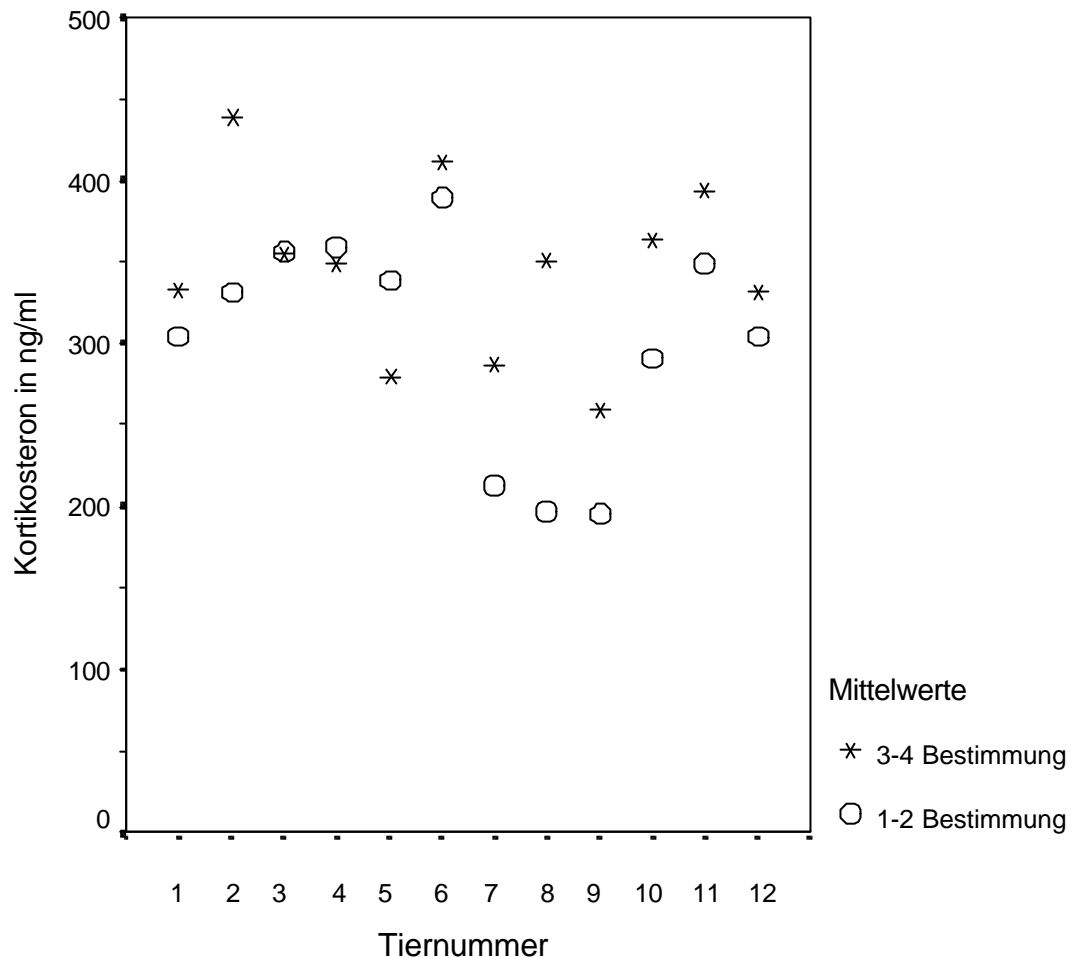


Abbildung 22: Mittelwerte aller 12 männlichen Wistar-Ratten der beiden ersten bzw. der beiden letzten Kortikosteron-Bestimmungen

Die Darstellung dieses Vergleiches zeigt, daß bei neun der zwölf Tiere der Mittelwert der beiden letzten Bestimmungen höher liegt als der Mittelwert der beiden ersten Bestimmungen; bei einem Tier (Nr. 3) sind sie gleich, und nur bei zwei Tieren (Nr. 4 und Nr. 5) niedriger.

Dieser Befund spricht dafür, daß der Kortikosteron-Wert durch die vorhergegangene Blutentnahme erhöht wird, möglicherweise sogar unabhängig von der zusätzlichen Manipulation.

Geht man von einem Verstärkungseffekt durch die Blutentnahmen aus, so ergeben sich in einem einfachen hypothetischen Modell, ganz ähnlich wie bei

den hier untersuchten Ratten der Gruppen 1 und 2, zwei sehr unterschiedliche Kurvenverläufe.

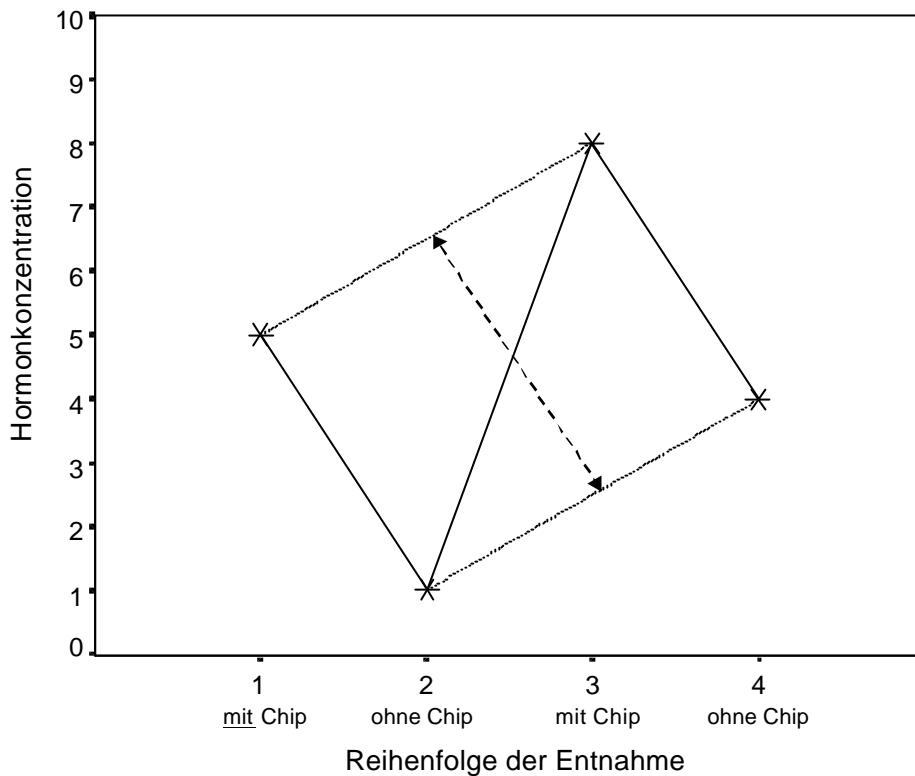


Abbildung 23: Theoretischer Versuchsablauf³, wenn der Versuch mit experimenteller Manipulation beginnt

In Abbildung 23 wird in dem hypothetischen Versuch vor der ersten Blutentnahme ein Mikrochip implantiert. Im Vergleich zur folgenden Blutentnahme "ohne Chip" ist die Hormonkonzentration bei dieser ersten Entnahme fünf mal so hoch. Bei der dritten Blutentnahme (wiederum "mit Chip") führt ein Verstärkungseffekt zu einer zusätzlichen Erhöhung um drei Einheiten, so daß die Hormonkonzentration jetzt bei acht Einheiten liegt. Der Verstärkungseffekt führt bei der vierten Blutentnahme "ohne Chip", gegenüber der zweiten Entnahme "ohne Chip", ebenfalls zu einer zusätzlichen Erhöhung der Hormonkonzentration um drei Einheiten auf insgesamt vier Einheiten.

³ Bei festen Effekten für Manipulations- und Gewöhnungseinfluß.

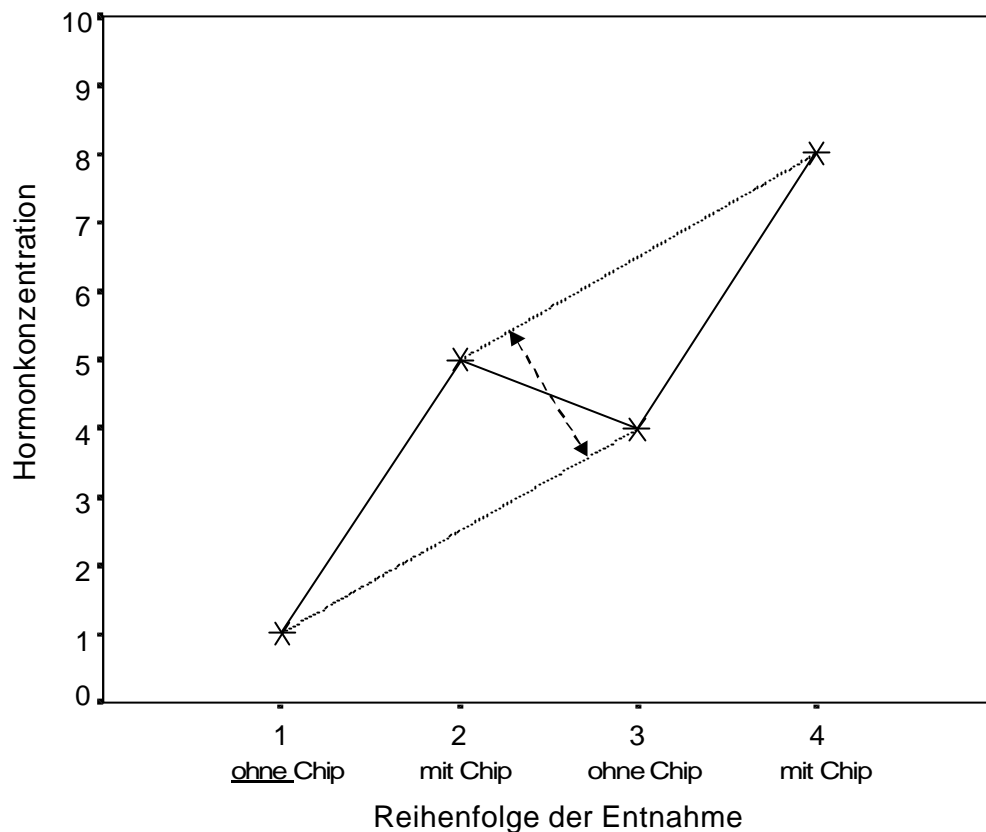


Abbildung 24: Theoretischer Versuchsablauf, wenn der Versuch ohne experimentelle Manipulation beginnt

Unter genau den gleichen Voraussetzungen führt dagegen ein Versuchsbeginn mit einer ersten Blutentnahme "ohne Chip" in Abbildung 24 bei genau den gleichen Hormonkonzentrationen zu einem ganz anderen, stark abgeflachten Kurvenverlauf des hypothetischen Versuchs. Dies könnte eine Erklärung dafür sein, weshalb der Verlauf der Hormonspiegel bei den Ratten der ersten und der zweiten Gruppe so unterschiedlich war.

Für die Beantwortung der Frage, ob die "Chip-Implantation" generell zu einer Erhöhung des Kortikosteron-Spiegels geführt hat, scheint es daher ausreichend und auch besser zu sein, nur die Werte der ersten beiden Blutentnahmen jedes Tieres heranzuziehen. Wegen des nicht zu quantifizierenden Verstärkungseffekts wurden die Meßwerte der dritten und vierten Blutentnahme nicht mehr verwendet.

Als statistisches Auswertungsverfahren wurde der t-Test für gepaarte Differenzen durchgeführt (siehe Tabelle 17).

Manipulation	Gepaarte Differenzen		t _{ber.}	df	Sig.
	Mittelwert	Standardfehler des Mittelwertes			
Ohne Chip - Mit Chip	106,9	21,8	4,9	11	0,000

(t_{ber.}= berechnete Prüfgröße t; df = Anzahl der Freiheitsgrade; Sig.= Irrtumswahrscheinlichkeit p)

Tabelle 17: Ergebnis des t-Tests der gepaarten Differenzen zwischen den beiden ersten Meßwerten aller 12 Tiere

Für jedes Tier wurde aus seinen ersten beiden Meßwerten die Differenz der Hormonspiegel mit und ohne "Chip-Implantation" berechnet. Im Mittel lag der Kortikosteron-Wert der Ratten um 106,9 ng/ml höher, wenn vor der Blutentnahme eine "Chip-Implantation" stattgefunden hat. Diese Erhöhung nach einer Manipulation erwies sich im t-Test als hoch signifikant ($p < 0,001$).

- **Zusammenfassung des Ergebnisses des Abschlußversuchs**

Im Vergleich zur Blutentnahme ohne vorherige Manipulation führte bei den hier untersuchten Tieren die durchgeführte Manipulation (Implantation eines Mikrochip) mit anschließender Blutentnahme zu einer signifikanten Erhöhung der Kortikosteron-Serumkonzentration um durchschnittlich 106,9 ng/ml.

5 Diskussion

Die Bewertung der Belastungen von Versuchstieren beruht oft nur auf einer intuitiven Beurteilung (Juhr, 1996), was unter anderem ein Grund dafür ist, die Problematik des Schweregrades experimenteller Eingriffe hier erneut zu diskutieren.

Für Labortiere kann schon das einfachste Handling mit einem mehr oder weniger intensiven Streß verbunden sein, der sich je nach Art, Dauer und Intensität des einwirkenden Stressors durch unterschiedlich starke neuronale, biochemische, metabolische, endokrinologische, immunologische oder ethologische Veränderungen des physiologischen Gleichgewichts der Tiere äußert.

In der vorliegenden Arbeit wurde versucht, den Einfluß von definierten Stressoren wie "Wiegen, Transport, Fixierung" etc. auf die Prolaktin- und Kortikosteron-Spiegel im Serum von Ratten zu messen.

Dabei müssen neben diesen eigentlich interessierenden Stressoren auch die Einflüsse physiologischer und methodischer Faktoren berücksichtigt werden, die ebenfalls nicht zu vernachlässigende Effekte auf die hier untersuchten Hormonwerte besitzen. Zu diesen Faktoren gehören das Geschlecht der Tiere, der zirkadiane Rhythmus der Hormonspiegel, sowie ganz wesentlich, die Umstände der Blutentnahme.

5.1 Beeinflussung durch das Geschlecht

Die ersten eigenen Voruntersuchungen fanden an weiblichen und männlichen Wistar-Ratten statt. Der Vergleich der Prolaktin-Konzentrationen beider Geschlechter ergibt einen 4-fach höheren Mittelwert der weiblichen Tiere (88,5 ng/ml) gegenüber dem Mittelwert der männlichen Tiere (21,8 ng/ml). Die Streuung der Prolaktin-Einzelwerte ist bei den weiblichen Tieren ebenfalls um annähernd das 4-fache größer.

Untersuchungen von Kant et al. (1983b) zeigten im Gegensatz zu den hier gefundenen Ergebnissen keinen so deutlichen Unterschied der Prolaktin-

Konzentrationen bei ungestreßten männlichen (4,6 ng/ml) und ungestreßten weiblichen Ratten (6,4 ng/ml).

Zu ähnlichen Ergebnissen kamen auch Milenkovic et al. (1984), die ebenfalls keinen Unterschied der Prolaktin-Reaktion zwischen jungen (Alter: 3 Monate) männlichen und weiblichen Wistar-Ratten nach der Durchführung einer Schmerz verursachenden Manipulation fanden. Das Maximum der Hormonkonzentration bei beiden Geschlechtern ($\text{♂} = 112,4 \text{ ng/ml}$; $\text{♀} = 112,5 \text{ ng/ml}$) wurde nach 10 Minuten erreicht (siehe auch 5.4), fiel danach jedoch rasch wieder ab. Einen deutlichen Unterschied zeigte hingegen der Vergleich der Prolaktin-Werte dieser jungen gegenüber älteren Ratten (Alter: $\text{♂} = 25 \text{ Monate}$; $\text{♀} = 15 \text{ Monate}$) bei gleicher Versuchsanordnung. Die älteren Tiere reagierten nicht nur mit wesentlich niedrigeren Prolaktin-Spiegeln auf die Manipulation, sondern zeigten auch einen deutlichen Geschlechtsunterschied ($\text{♂} = 28,9 \text{ ng/ml}$; $\text{♀} = 43,3 \text{ ng/ml}$), der auch durch frühere Untersuchungen von Du Ruisseau et al. (1978), mit Prolaktin-Werten von 12 ng/ml für die männlichen und 80 ng/ml für die weiblichen Tiere, bestätigt wird.

Fenske und Wuttke (1977) untersuchten den altersabhängigen Unterschied der Prolaktin-Konzentrationen bei männlichen Ratten. Sie fanden, daß die Tiere während der ersten 15 Tage nach der Geburt durchgehend niedrige Prolaktin-Spiegel (25 ng/ml) zeigten. Ein signifikanter Unterschied zwischen ungestreßten und gestreßten Tieren während dieses Zeitraumes war nicht vorhanden. Die Serum Prolaktin-Konzentration der ungestreßten Tiere stieg zwischen dem 16. und 35. Tag zunehmend bis auf 74,5 ng/ml an. Nach 45 Tagen waren die Werte wieder auf das Niveau der erwachsenen ungestreßten Tiere (46 ng/ml) abgesunken. Zwischen dem 16. und 20. Tag zeigten sich erstmalig signifikant höhere Werte bei gestreßten gegenüber ungestreßten Tieren. Bei erwachsenen Tieren (200-250 g KGW) wurde dann nach einem 10-minütigen Käfigtransport ein starker Anstieg der Prolaktin-Werte, um bis zu 119 ng/ml gegenüber der ungestreßten Kontrollgruppe, festgestellt.

Bei einer anderen Untersuchung (Odio und Brodish, 1989), der durch Streß induzierten altersabhängigen Ausschüttung von Kortikosteron bei Ratten,

zeigten beide Altersgruppen (6 bzw. 22 Monate) nach Einwirken eines ersten akuten Stressors keine Unterschiede in der Kortikosteron-Konzentration. Nach der dritten Stressorexposition waren die Kortikosteron-Werte der jungen Tiere jedoch deutlich höher, als die der älteren Tiere. Vermutet wird, daß die Sensibilität des adrenokortikalen Kontrollsystems bei älteren Tieren abnimmt (Riegle, 1973), was sich in einer Abnahme der Ansprechbarkeit der Nebennieren gegenüber ACTH äußert (Sapolsky et al., 1986).

Neben dieser altersabhängigen Veränderung der Reaktionslage des endokrinen Systems spielt das Zyklusstadium weiblicher Tiere in diesem Zusammenhang eine ebenfalls bedeutende Rolle.

Die Untersuchung von Riegle und Meites (1976) zeigte, daß verschiedenartige Stressoren, in Abhängigkeit vom Zyklusstadium der weiblichen Ratten, zu unterschiedlich starken Veränderungen der Serum Prolaktin-Spiegel führten. Ein leichter Streß (Äther-Narkose) beeinflusste die Prolaktin-Konzentration bei diesen Ratten nicht, welche sich in verschiedenen Zyklusphasen befanden. Bei hohen Basalwerten am Nachmittag des Proöstrus führte ein intensiver Stressor (Fixierung) sogar zu einer Erniedrigung der Prolaktin-Werte um 52% gegenüber der unbehandelten Kontrollgruppe, während im Diöstrus (einer Zyklusphase⁴ mit einer niedrigen Prolaktin-Konzentration) ein intensiver Stressor zu einem starken Anstieg (um 75%) der Serumkonzentration von Prolaktin führte.

Eine andere Untersuchung des zyklusabhängigen Verlaufes der Prolaktin-Konzentration bei Ratten mittels zweier unterschiedlicher Blutentnahmefethoden (Dekapitation / Dauerkatheter) zeigte deutliche Unterschiede hinsichtlich des Zeitverlaufes und der Höhe der gemessenen Hormonkonzentrationen. Am Tag des Proöstrus zeigten die dekapitierten Tiere einen Maximalwert mit 40 ng/ml um 17⁰⁰ Uhr, während die katheterisierten Tiere einen Maximalwert von 100 ng/ml bereits um 15⁰⁰ Uhr aufwiesen. Die Ursache für diese Diskrepanz sah Neill (1972) in dem chronischen Streß, den die Katheterisierung für die Tiere wohl darstellte.

⁴ Bei unbehandelten weiblichen Ratten wurden erhöhte Prolaktin-Konzentrationen am Nachmittag des Proöstrus, am Tag des Östrus, am ersten Tag der Trächtigkeit und während der Laktation gefunden. Niedrige Basalwerte wurden während des Diöstrus und am Morgen des Östrus beobachtet.

Bei den Kortikosteron-Werten der eigenen Voruntersuchung zeigte sich ebenfalls ein Unterschied zwischen den Geschlechtern, auch wenn dieser geringer als bei den Prolaktin-Werten ausfiel. Die mittleren Hormonspiegel der weiblichen Tiere (202,7 ng/ml) liegen um ein Drittel über denen der männlichen Ratten (130,5 ng/ml).

Der Vergleich der Kortikosteron-Werte bei ungestreßten Ratten zeigte auch bei Kant et al. (1983b) einen geschlechtsbezogenen Unterschied. Die Werte der männlichen Tiere (98 ng/ml) lagen geringfügig unter den Konzentrationen der weiblichen Tiere (112 ng/ml), während die Streuung der Werte beider Geschlechter in etwa gleich war ($\text{♂} \pm 30 \text{ ng/ml}$; $\text{♀} \pm 35 \text{ ng/ml}$). Auch Critchlow et al. (1963) berichteten von höheren Kortikosteron-Basalwerten bei weiblichen Ratten (24 Stunden Mittelwert = 300 ng/ml) gegenüber männlichen Individuen (100 ng/ml), bei ebenfalls erhöhter Streuung der Werte bei den weiblichen Tieren ($\text{♂} \pm 14 \text{ ng/ml}$; $\text{♀} \pm 35 \text{ ng/ml}$). Die Kortikosteron-Spiegel der weiblichen Tiere waren zudem stark zyklusabhängig (während des Proöstrus 367 ng/ml, im Östrus 239 ng/ml und im Diöstrus 168 ng/ml).

Livezey et al. (1985) fanden nur geringfügig erhöhte basale Kortikosteron-Werte bei weiblichen Ratten ($\text{♀} = 260 \text{ ng/ml}$; $\text{♂} = 230 \text{ ng/ml}$) und für beide Geschlechter die gleiche Standardabweichung ($\pm 34 \text{ ng/ml}$). Doch nahm dieser geringe Unterschied zwischen den Geschlechtern nach einem "Fixierungsstreß" deutlich zu. Die weiblichen Tiere wiesen 15 Minuten nach dem Beginn des Stresses Werte von $610 \pm 53 \text{ ng/ml}$ auf, während die Werte der männlichen Ratten nur bei $350 \pm 15 \text{ ng/ml}$ lagen.

Kurz gefaßt, unterstützen die Befunde aus der Literatur die nach den eigenen Voruntersuchungen getroffene Entscheidung, für die weiteren Untersuchungen der vorliegenden Arbeit nur noch männliche Tiere zu verwenden, aufgrund der großen Variabilität der Hormonwerte bei den weiblichen Tieren, als Folge ihrer Zyklusabhängigkeit.

5.2 Beeinflussung durch den zirkadianen Rhythmus

Die Prolaktin- und die Kortikosteron-Werte im Serum der Ratte unterliegen starken tageszeitlichen Schwankungen. Einige Untersuchungen weisen daraufhin, daß eine hormonelle Reaktion auf Streß durch die Tageszeit beeinflusst wird, zu der sich der Streß ereignet (Dunn et al., 1972b; Engeland et al., 1977; Martí et al., 1993; Torrellas et al., 1981).

Aufgrund einer ausgeprägten zirkadianen Rhythmik der hier untersuchten Hormone sollte an Hand der Voruntersuchungen auch eine eventuell vorhandene Auswirkung dieser Hormonschwankungen innerhalb eines kurzen Zeitraumes zwischen 10⁰⁰ und 11⁰⁰ Uhr überprüft werden.

Bei dem Hormon Prolaktin hat die hier untersuchte Zeitspanne bei beiden Geschlechtern keinen eindeutig gerichteten Einfluß auf die Höhe der Serumkonzentration. So liegt der 10⁰⁰ Uhr-Wert (16,5 ng/ml) der männlichen Tiere nur geringfügig unter ihrem 11⁰⁰ Uhr-Wert (17,8 ng/ml), während bei den Weibchen die Konzentration um 10⁰⁰ Uhr (89,5 ng/ml) geringfügig größer ist als um 11⁰⁰ Uhr (79,6 ng/ml).

Dagegen ist der Kortikosteron-Spiegel bei den männlichen Ratten deutlicher von der Uhrzeit abhängig. Er ist um 11⁰⁰ Uhr (151,8 ng/ml) im Mittel doppelt so hoch als um 10⁰⁰ Uhr (74,7 ng/ml). Die weiblichen Tiere zeigen hingegen nur einen minimalen Unterschied, wobei der Hormonwert um 11⁰⁰ Uhr (180,2 ng/ml) über dem 10⁰⁰ Uhr-Wert (170,9 ng/ml) liegt.

Bei Kant et al. (1986) zeigte der Vergleich der Prolaktin- und Kortikosteron-Konzentrationen von gestreßten (Fixierung in einem Glasrohr) und ungestreßten männlichen Ratten während einer 24-stündigen Untersuchungsperiode eine ausgeprägte zirkadiane Rhythmik, wobei sowohl die Prolaktin- als auch die Kortikosteron-Werte der gestreßten Tiere über den gesamten Zeitraum insgesamt erhöht waren. Beim Prolaktin hatte die Entnahmezeit nur bei den ungestreßten Tieren einen signifikanten Einfluß auf die Höhe der Plasmakonzentration (10⁰⁰ Uhr = 3 ng/ml; 12⁰⁰ Uhr = 23 ng/ml), nicht aber bei den gestreßten Tieren. Beim Kortikosteron bestand in beiden Untersuchungsgruppen (ungestreßte / gestreßte Tiere) ein eindeutiger Zusammenhang zwischen der Hormonkonzentration und der Entnahmezeit. Die

Kortikosteron-Konzentration der ungestreßten Tiere war um 10⁰⁰ Uhr (19 ng/ml) deutlich niedriger als um 12⁰⁰ Uhr (95 ng/ml). Allgemein wurde festgestellt (Torrellas et al., 1981), daß ein Stressor einen stärkeren Anstieg der Kortikosteron-Werte am Vormittag auslöste, als dieses am Nachmittag der Fall war, weil morgens die basalen Konzentrationen generell niedriger als nachmittags waren.

Wie eine Untersuchung von Dunn et al. (1972a) zeigte, stieg der Prolaktin-Spiegel bei männlichen Ratten zum späten Nachmittag hin an und erreichte einen ersten Gipfel um 17⁰⁰ Uhr, gefolgt von einem zweiten Gipfel und Tageshöchstwert um 23⁰⁰ Uhr (18,63 ng/ml), während in den Morgenstunden (8⁰⁰ Uhr) die niedrigsten Konzentrationen (8,13 ng/ml) gemessen wurden. In dieser Studie verursachte Streß ("Äthernarkose") ebenfalls ein deutlich höheres Niveau der Serum Prolaktin-Spiegel bei den Tieren über die gesamte 24-Stunden Periode. Sowohl die gestreßten, als auch die nicht gestreßten Ratten, zeigten eine deutliche zirkadiane Rhythmik der Serum Prolaktin-Spiegel mit tageszeitlichen Schwankungen zwischen 130% bei den ungestreßten und 90% bei den gestreßten Tieren.

In einer weiteren Arbeit von Dunn et al. (1972b) ergab sich ein deutlicher Anstieg der Kortikosteron-Konzentration nicht gestreßter Ratten ab 11⁰⁰ Uhr (♀ 197 ng/ml, ♂ 124 ng/ml), bis diese schließlich um 17⁰⁰ Uhr ihre Höchstwerte (♀ = 526 ng/ml; ♂ = 268 ng/ml) erreichten. Es zeigten sich ebenfalls durchweg signifikant höhere Serumspiegel bei den gestreßten Ratten (♀ = 789 ng/ml; ♂ = 349 ng/ml) gegenüber den nicht gestreßten Tieren (♀ = 285 ng/ml; ♂ = 131 ng/ml) unter Beibehaltung des zirkadianen Rhythmus über die gesamte 24-Stunden Periode.

Diese zirkadiane Periodizität der Kortikosteron-Spiegel im Blut von weiblichen Ratten blieb selbst bei einer "Dauerbeleuchtung" des Tierraumes, welche zu pathologischen Veränderungen der Retina dieser Tiere führte, in ihrer charakteristischen Form erhalten (Dunn et al., 1972).

Auch Manser (1992) weist für wiederholte Untersuchungen auf die große Bedeutung der tageszeitlichen Schwankungen der Hormonwerte hin. Deshalb

sollten die Probenentnahmen zur Bestimmung der Hormone Prolaktin und Kortikosteron jeweils zur gleichen Tageszeit vorgenommen werden. Die Versuchsplanung der vorliegenden Arbeit wurde aus diesem Grunde auch so gestaltet, daß alle Blutentnahmen zwischen 10⁵⁰ Uhr und 11¹⁰ Uhr stattfinden konnten, was auch strikt eingehalten wurde.

5.3 Beeinflussung durch Narkose und Blutentnahme

Die in dieser Arbeit angewandte Narkoseform (CO₂-Inhalationsnarkose) sowie die Art der Blutentnahme (Punktion des Plexus venosus orbitalis) sind zwei anerkannte Methoden der Versuchstiertechnik zur schonenden und tierschutzgerechten Gewinnung von Blutproben.

Die CO₂-Narkose, als eine Form der Kurznarkose für kleinere Eingriffe, wird im Vergleich zu anderen Narkoseformen von vielen Autoren als geeignet empfohlen, da es durch eine Inhalationsnarkose mit CO₂ zu geringeren Veränderungen der Blutparameter und des Verhaltens kommt (Blackshaw et al., 1988; Borkowski et al., 1995; Fowler et al., 1980; Hackbarth et al., 1998; Küppers, 1997; Meier, 1994).

Da es bei dem eigenen Hauptversuch zu keiner weiteren Beeinflussung der Blutparameter kommen sollte, mußte die Entnahme der Blutprobe so schnell wie möglich nach Eintritt der Bewußtlosigkeit erfolgen, weshalb die Tiere in einen mit Kohlendioxid vorgefluteten Narkosekäfig gesetzt wurden. Ein entnahmefähiger Zustand wurde bereits nach 15-17 Sekunden erreicht, was mit den Untersuchungen von Blackshaw et al. (1988), der für Ratten eine Dauer von 12-13 Sekunden ermittelte, in etwa übereinstimmt. Hewett et al. (1993) ermittelten eine Zeitspanne von 12 Sekunden bis zur Immobilität und 19 Sekunden bis zum Verlust des Umdrehreflexes bei Ratten, die in einen mit CO₂-vorgefluteten Käfig gesetzt wurden.

Die Blutentnahme aus dem retrobulbären Venenplexus hat bei Maus, Ratte und Hamster in den letzten Jahren eine starke Verbreitung gefunden. Bei sachgerechter Durchführung werden lediglich Bindegewebe, peribulbäres Fett und Venen punktiert (Nicklas, 1994). Wichtig für die Punktion des retrobulbären Venengeflechts ist die korrekte Fixierung des narkotisierten Tieres (Joint

Working Group on Refinement, 1993). Untersuchungen zur Auswirkung von Punktionen des retrobulbären Venenplexus bei der Ratte ergaben, daß bei ordnungsgemäßer Durchführung wesentliche Schädigungen des Auges oder Beeinträchtigungen des Wohlbefindens nicht auftraten (Beynen et al., 1995a; Herck et al., 1992).

Eine Reihe von Untersuchungen dieser Methode zeigte jedoch, daß nicht nur die sachgerechte Durchführung dieser Entnahmemethode sondern vor allem die dabei angewandte Narkoseform einen entscheidenden Einfluß auf verschiedene Blutparameter hatte. So hatte die Orbitalpunktion bei Äthernarkose keinen weiteren Einfluß auf die Kortikosteron-Konzentration. Im Vergleich zu dekapitierten Kontrolltieren führte die Äthernarkose schon allein zu einem starken Anstieg dieses Hormonspiegels (Herck et al., 1991; Herck et al., 1997).

Cook et al. (1973) beobachteten bei männlichen Ratten, daß sich der Kortikosteron-Spiegel 2,5 Minuten nach einer 30 Sekunden dauernden Äthereinwirkung gegenüber dem Ruhewert verdoppelt hatte und nach 15 Minuten auf den 5-fachen Ausgangswert angestiegen war. Für eine Kurznarkose bei Ratten ist Äther zwar nach wie vor ein gebräuchliches Narkosemittel, sollte jedoch bei Untersuchungen des chronischen und subakuten Streßgeschehens nicht verwendet werden, da es eine starke Aktivierung der bekannten "Streßachsen" induziert (Sarlis, 1991).

Der Vergleich der retrobulbären Punktion mit der Entnahme durch Herzpunktion - beide unter leichter Äthernarkose - und der Blutgewinnung durch Dekapitation ergab für das Hormon Kortikosteron keine signifikante Änderung der Serumkonzentration, während das Hormon Prolaktin höhere Serumspiegel bei der Punktion des retrobulbären Venenplexus aufwies (Döhler et al., 1977b).

Dies wird relativiert durch die Untersuchungen von Riegle und Meites (1976), die an ungestreßten weiblichen Ratten keinen Unterschied der Prolaktin-Werte fanden, beim Vergleich der Blutentnahmen durch Orbitalpunktion beziehungsweise durch Dekapitation.

Urbanski und Kelley (1991) konnten sogar zeigen, daß sich durch eine vorhergehende CO₂-Narkose die Streßbelastung weiblichen Ratten durch

Dekapitation erheblich mindern ließ. Die Prolaktin- und Kortikosteron-Werte der zuvor betäubten Tiere waren deutlich niedriger, woraus geschlossen wurde, daß der Streß durch das Handling größer war, als durch die CO₂-Narkose.

Da für die vorliegende Arbeit achtmal Blutproben von denselben Tieren genommen werden sollten, mußte ein möglichst schonendes Blutentnahmeverfahren mit entsprechender Kurzzeitrnarkose verwendet werden. Dieses sollte auch bei häufiger Anwendung von den Tieren gut toleriert werden und zu keinem zusätzlichen Anstieg der Hormonwerte führen.

Die Blutentnahme aus dem retrobulbären Venenplexus unter CO₂-Narkose hat sich im Laufe der Versuche als eine Methode zur wiederholten Probengewinnung bei länger andauernden Untersuchungen bestens bewährt.

5.4 Beeinflussung durch den Zeitverlauf der Hormonantwort

Ebenfalls von entscheidender Bedeutung für eine korrekte Bewertung der gefundenen Hormonkonzentrationen ist die Berücksichtigung des Zeitabstandes zwischen dem Setzen eines Stressors und der sich daran anschließenden Blutentnahme. Für Prolaktin und Kortikosteron sind charakteristische Konzentrationskurven der Plasmaspiegel beschrieben worden (Paris et al., 1987; Seggie und Brown, 1975). Dabei zeigten beide Hormone nach Einwirken eines Stressors ähnliche Verlaufskurven.

Ein Gipfel der Prolaktin-Konzentration wurde zwischen 8 bis 15 Minuten nach dem Einsetzen des Stressors gemessen. Die Dauer des Prolaktin-Anstiegs ist dabei vom Charakter, der Intensität und der Dauer des Stressors abhängig. Die Rückkehr zu den Basalwerten erfolgte ungefähr 20 bis 60 Minuten nach dem Setzen eines akuten Stressors (Krulich et al., 1974; Paris et al., 1987).

Briski und Sylvester (1987) beobachteten ab der dreißigsten Minute sogar einen Abfall der Prolaktin-Konzentration unter die Basalwerte.

Die eigenen Vorversuche, welche im Zusammenhang mit dem Entnahmepunkt⁵ nach vorangegangener Manipulation durchgeführt wurden, zeigten für das Hormon Prolaktin ein deutliches Maximum (58,4 ng/ml) nach zehn Minuten.

⁵ Zeitpunkte: 2, 5, 10, 20, 40, 60 Minuten nach Manipulation

Dieser Befund stimmt mit den Ergebnissen von Krulich et al. (1974) überein. Nach einem kurzen Aufenthalt männlicher Ratten in einem leeren Glasgefäß wurde bei den daraufhin folgenden Blutentnahmen der höchste Prolaktin-Spiegel (125 ng/ml) zehn Minuten nach dieser Manipulation gefunden. Der Vergleich weiterer Manipulationen, wie zum Beispiel ein 2-minütiger Ätherstreß oder ein mehrfach wiederholter Ätherstreß, zeigte ebenfalls hohe Serumspiegel nach zehn Minuten, wobei nach dem alleinigen Ätherstreß die maximale Prolaktin-Konzentration (150 ng/ml) erst nach dreißig Minuten gemessen wurde.

Die Ergebnisse von Döhler et al. (1977a) und Gärtner et al. (1980) zeigten hingegen ein erstes Prolaktin-Maximum (53 ng/ml) schon fünf Minuten nach einer Störung der Tiere und im weiteren Verlauf nach 10 Minuten einen Abfall, gefolgt von einem zweiten Maximalwert (93 ng/ml) nach einer Stunde. Eine noch schnellere Reaktion von Prolaktin auf das Einwirken eines Stressors beschrieben Clark et al. (1997). Die Prolaktin-Konzentration stieg sehr schnell an und erreichte innerhalb von 3 Minuten das Maximum, gefolgt von einem leichten Abfall, bis nach einer Stunde die Ausgangswerte wieder erreicht wurden.

Nach Clark et al. (1997) stiegen die Konzentrationen der Glukokortikoide bei plötzlicher Aktivierung der HHA-Achse innerhalb von 5 bis 10 Minuten signifikant an. Bei Nagetieren wurden die maximalen Konzentrationen ungefähr 20 Minuten nach Stimulation erreicht, wobei die Zeitspanne von der Intensität des Stressors abhängig war. Nach Erreichen des Maximalwertes kam es dann zu einem langsamen aber kontinuierlichem Abfall der Kortikosteron-Konzentration bis nach 2 Stunden das Niveau der Basalwerte erreicht wurde. Dieser Abfall beruht zum einen auf dem bekannten Feedback-Mechanismus der HHA-Achse und ist zum anderen das Ergebnis der Kortikosteron Halbwertszeit von ungefähr 60 Minuten (Haemisch et al., 1999).

In den eigenen Vorversuchen wurde die höchste mittlere Kortikosteron-Konzentration (301,9 ng/ml) 20 Minuten nach den durchgeführten Manipulationen gemessen.

Dieses Ergebnis wird durch die Untersuchung des zeitlichen Verlaufes der Kortikosteron-Konzentration von Haemisch et al. (1999) bestätigt. Bei dem Vergleich der Kortikosteron-Spiegel am Morgen (8⁰⁰ Uhr) und am Abend (18⁰⁰ Uhr) zeigten sich zwar bei der Entnahme am Abend insgesamt deutlich höhere Werte. Ein Maximum wurde aber für beide Tageszeiten übereinstimmend nach 20 Minuten gemessen.

Einen ähnlichen Verlauf der Kortikosteron-Antwort fanden auch Dallman und Jones (1973), Döhler et al. (1977a) und Gärtner et al. (1980). Übereinstimmend ergab sich ein maximaler Hormonspiegel mit Werten zwischen 320 und 490 ng/ml 15 Minuten nach einer Stressor-Konfrontation.

Vergleichbare Ergebnisse wurden auch von Seggie und Brown (1975) beschrieben, welche bei männlichen Wistar-Ratten die Auswirkung eines 5 Sekunden dauernden Handlings oder einer 3-minütigen Konfrontation mit einer neuen Umgebung untersuchten. Die Hormonreaktion auf die neue Umgebung war insgesamt stärker und die höchste Kortikosteron-Konzentration (220 ng/ml) wurde nach 15 Minuten gefunden, während die Hormonspiegel nach dem Handling zunächst etwas langsamer anstiegen und die höchsten Werte (116 ng/ml) zwischen 15 und 30 Minuten aufwiesen.

Akuter Streß bei Ratten, z. B. provoziert durch die Anwesenheit eines Hundes im Tierraum, führte ebenfalls nach 20 Minuten zu einem maximalen Kortikosteron-Wert (324 ng/ml), wie Armario et al. (1984) berichteten.

Dobráková et al. (1993) hoben männliche Ratten aus ihrem Haltungskäfig heraus und setzten sie nach einer Minute wieder zurück. In Abständen von einer, fünf und fünfzehn Minuten wurden über einen in der Schwanzarterie liegenden Katheter Blutproben entnommen. Die Kortikosteron-Spiegel lagen nach fünf und fünfzehn Minuten 90% über dem Basalwert. Ebenso konnte nach dem Verbringen von weiblichen Ratten in eine ungewohnte Umgebung und anschließender Bestimmung der Blutwerte ein deutlicher Anstieg (80%) der Kortikosteron-Konzentrationen innerhalb von 30 Minuten nach dieser Manipulation nachgewiesen werden (Baldwin et al., 1974).

Die Ergebnisse der eigenen Vorversuche werden somit durch die Befunde in der Literatur als richtig bestätigt und damit auch die für die Hauptversuche

getroffene Festlegung, nach einer vorangegangenen Manipulation 10 Minuten bis zur Blutentnahme für die Prolaktin-Bestimmung zu warten und für die Kortikosteron-Werte 20 Minuten verstreichen zu lassen, um den maximalen Anstieg der jeweiligen Hormonspiegel zu erfassen.

5.5 Beeinflussung durch die individuellen Unterschiede

Es existiert eine große Vielfalt sowohl an physiologischen Reaktionen wie auch an Verhaltensänderungen, welche Tiere zeigen, wenn sie gestört werden. Zusätzlich zu den Unterschieden zwischen den Tierarten gibt es noch erhebliche Unterschiede zwischen den Individuen innerhalb einer Art, in ihrer Reaktion auf einen störenden Einfluß (Broom et al., 1993).

Obwohl jedes Tier das gleiche Repertoire an biologischen Möglichkeiten zur Bewältigung von Streß besitzt, benutzen die Individuen unterschiedliche Strategien zur Streßbewältigung. Die Anwendung einer individuellen Strategie basiert auf einer Reihe von modulierenden Faktoren, wie frühere Erfahrungen, genetischer Hintergrund, Alter oder physiologischer Status. Gerade wenn sich ein Experimentator auf die Untersuchung eines bestimmten Stressors konzentriert hat, wird die Bewertung dieses Stressors zusätzlich durch diese interindividuelle Variabilität der Streßantwort verkompliziert (Moberg, 1987).

Daß Individuen sehr unterschiedlich auf äußere Reize reagieren, ist aus einigen Untersuchungen an Nagern bekannt (Lawrence, 1994). So lassen sich zwei grundsätzlich verschiedene Wege erkennen, wie die einzelnen Individuen in furcht- und streßauslösenden Situationen reagieren. Einmal gibt es Tiere, welche durch Flucht oder Kampf reagieren, zum anderen solche, die passiv mit eingeschränkter Bewegung bis hin zur völligen Immobilisierung antworten.

Auch Ratten reagieren verhaltenmäßig sehr unterschiedlich auf Belastungen. Dieses scheint ebenfalls für physiologische Reaktionen zu gelten, wobei eine enge Beziehung zwischen den individuellen Unterschieden im Verhalten und in der physiologischen Reaktion bestehen. Diese Beziehung ist bei den Katecholaminen enger als bei den Kortikosteroiden ausgeprägt (Natelson et al., 1987). Ein solcher Zusammenhang wurde auch von Gilad und Jimerson (1981) bei zwei unterschiedlichen Rattenstämmen beschrieben. Auch hier bestand

eine Beziehung zwischen der verhaltensmäßigen Reaktion der beiden Stämme und deren Ausschüttung von Katecholaminen bei Streß, während dieser Bezug beim Kortikosteron nicht nachgewiesen wurde.

Fokkema et al. (1988) untersuchten den Zusammenhang zwischen sozialen Verhaltensmustern und der Ausschüttung von Katecholaminen und Kortikosteron an 18 einzeln gehaltenen, kanulierten männlichen Ratten. Die Studie zeigte, daß erhebliche Unterschiede sowohl bei den Basalwerten als auch bei der Amplitude der Hormonantwort zwischen den einzelnen Individuen existierten. Diese Untersuchung belegte, daß die Reaktion von männlichen Ratten auf sozialen Streß (z. B. Rangordnung) einen deutlichen Zusammenhang zwischen ihrem Verhalten und ihrer sympatho-adrenalen Hormonantwort zeigte. Dabei hing die Höhe der Amplitude dieser Hormonantwort sowohl von der Art des Stressors, als auch von der individuellen Reaktionslage, welche sich aufgrund der basalen Noradrenalin-Konzentration vorhersagen ließ, ab.

Im allgemeinen wird aber in der versuchstierkundlichen Literatur und auch bei vielen bisherigen Hormon- bzw. Streß-Untersuchungen die sehr große interindividuelle Variabilität weitgehend unbeachtet gelassen. Wie die hier vorliegende Untersuchung gezeigt hat, besteht zwischen den einzelnen Individuen ein deutlicher Unterschied in der Reaktionslage, welcher durch die Untersuchungen von Shin (1979), der den Mechanismus der Prolaktin-Ausschüttung an einzelnen Ratten verglich und Vogel und Jensh (1988), die die individuelle Kortikosteron-Freisetzung bei chronischem Streß beschrieben, bestätigt wird.

Der eigene abschließende Vorversuch sowie der Hauptversuch lassen den Schluß zu, daß diese interindividuelle Varianz einen ganz entscheidenden Anteil an der oftmals in der Literatur festgestellten großen Streuung der Werte von Tierkollektiven hat. Die gefundenen Ergebnisse zeigen, daß die Intensität eines Stressors nur einen geringen Einfluß auf die Höhe der bestimmten Hormone hat, da ein Individuum auf jede Art von Störung mit einer relativ gleich hohen Hormonausschüttung reagiert. Die Reaktionen der einzelnen Individuen (Tiere) auf den gleichen Stressor variieren jedoch signifikant voneinander.

Es ist davon auszugehen, daß der Einfluß sozialer Bedingungen auf die Varianz endokrin gesteuerter Parameter erheblich ist, da Rangauseinandersetzungen im besonderen Maße das Hypophysen-Nebennierenrinden-System stimulieren. Der Vergleich der Kortikosteron-Konzentrationen im Serum von Ratten bei Einzelhaltung und Gruppenhaltung zeigte, daß durch Einzelhaltung die Gesamtvarianz um 64-86% vermindert wird und somit der Einfluß der Gruppenhaltung auf die Streuung der Kortikosteron-Gehalte besonders groß ist (Gärtner und Bonath, 1971b).

Ein Zusammenhang zwischen der Haltungsform (Einzel- oder Gruppenhaltung) und der individuellen Reaktion auf stressauslösende Situationen wurde auch von Barrett und Stockham (1963) beschrieben. Die Tiere, welche einzeln in Käfigen gehalten wurden und 16 Stunden ungestört blieben, zeigten basale Kortikosteron-Plasmawerte von 58 ng/ml. Die Basalwerte von Ratten, welche in größeren Gruppen (20 Tiere) gehalten wurden, waren mit 95 ng/ml annähernd doppelt so hoch. Die einzeln gehaltenen Ratten zeigten insgesamt eine geringere individuelle Schwankung (± 3 ng/ml) ihrer Kortikosteron-Werte, als die Tiere aus der Gruppenhaltung (± 11 ng/ml). Andererseits reagierten die Tiere der Gruppenhaltung nach dem Wechsel der Umgebung nur mit einem 3-fachen Anstieg ihrer Kortikosteron-Werte, während sich die Werte bei den einzeln gehaltenen Tieren um das 5-fache erhöhten. Diese Unterschiede der Hormonwerte lassen sich im Zusammenhang mit der sozialen Struktur innerhalb einer Gruppe begründen. So zeigten ranghohe Individuen in einer Gruppe geringere Kortikosteron-Blutspiegel, während rangniedrige Tiere hohe Kortikosteron-Werte besaßen (Gärtner und Bonath, 1971b).

Die großen interindividuellen Schwankungen der Hormonwerte der eigenen Untersuchung könnten demnach dadurch bedingt sein, daß jeweils 4 Tiere in einem Käfig gehalten wurden, was aber aus versuchstechnischen Gründen (siehe Kapitel 3.7 Statistik) nicht anders möglich war. Außerdem sollte aus Gründen des Tierschutzes eine Einzelhaltung von Ratten, soweit diese nicht zwingend notwendig ist, vermieden werden.

5.6 Beeinflussung durch Veränderung der Umgebung

Das Wiegen sowie der Transport von Ratten sind in der Versuchstierzucht und Haltung häufig vorkommende Maßnahmen, welche mit wenig offensichtlichen Belastungen für die Tiere verbunden sind. Dennoch sind das Herausnehmen aus dem Käfig sowie das Verbringen in eine neue oder ungewohnte Umgebung (Waagschale, Transportbehältnis) als nicht zu vernachlässigende Stressoren anzusehen. Levine (1985) behauptet sogar, daß die Exposition eines Tieres gegenüber etwas "Neuartigem" eine der schwerwiegendsten Versuchsbedingungen darstellt, die zu einem Anstieg der Hypophysen-Nebennieren-Aktivität führt.

Beim direkten Vergleich aller durchgeführten Manipulationen zeigen beide Hormone nach diesen beiden Maßnahmen in ihrer jeweiligen Versuchsgruppe (= Block) die zweit höchsten mittleren Serumkonzentrationen. Die Prolaktin-Werte für das "Wiegen" und den "Transport" liegen bei 78,9 ng/ml bzw. 79,6 ng/ml. Für das Hormon Kortikosteron wurden Werte von 435,2 ng/ml für das "Wiegen" und 397,7 ng/ml nach dem "Transport" ermittelt.

Zu anderen Ergebnissen kamen Barrett und Stockham (1963). In ihrer Untersuchung der Kortikosteron-Konzentrationen bei einzeln gehaltenen Ratten fanden sie 15 Minuten nach dem Wiegen einen Maximalwert von 219 ng/ml. Im Vergleich dazu waren die Kortikosteron-Spiegel nach dem Transport mit 304 ng/ml höher als nach dem Wiegen. Zum Vergleich lag in dieser Untersuchung der Kortikosteron-Wert nach einer i. p.-Injektion mit 262 ng/ml zwischen diesen beiden Werten. Gegenüber den ermittelten Basalwerten (58 ng/ml) kam es durch die durchgeführten Manipulationen somit zu Erhöhungen der Kortikosteron-Konzentrationen im Serum um das 4- bis 5-fache. Zu ähnlichen Ergebnissen gelangten auch Baldwin et al. (1974). Sie verbrachten weibliche Ratten in eine ungewohnte Umgebung (offenen Käfig) und registrierten Veränderungen von Plasma-Prolaktin, Luteinisierendem Hormon (LH) und Kortikosteron. Die Blutwerte des Kortikosterons stiegen besonders stark an (um das 5-fache), während die Prolaktin-Werte der im Proöstrus befindlichen Tiere sich nicht veränderten. Krulich et al. (1974) untersuchten in diesem Zusammenhang ebenfalls die Veränderung der

Prolaktin-Spiegel. Einzeln gehaltene Ratten wurden für 2 Minuten in ein Glasgefäß gesetzt und sofort danach bzw. 10, 30, und 60 Minuten nach dem Zurücksetzen in ihren Haltungskäfig Blutproben durch Dekapitation gewonnen. Die Prolaktin-Spiegel (Basalwert = 30 ng/ml) zeigten nach dieser Manipulation einen deutlichen, aber nur vorübergehenden Anstieg mit einem Maximum nach 10 Minuten (125 ng/ml) und Rückkehr auf den Ausgangswert nach 2 Stunden.

Bei einem anderen Versuchsansatz von De Boer et al. (1990) wurden einzelne Tiere einer Gruppe männlicher Wistar-Ratten vorsichtig aus ihrem Haltungskäfig herausgehoben, über einen anderen Käfig gehalten und danach wieder in ihren Käfig zurückgesetzt. Die Tiere einer weiteren Gruppe wurden einzeln in einen leeren Käfig gesetzt und dort für 15 Minuten belassen. Die Tiere der ersten Gruppe zeigten nach 15 Minuten eine 2,5-fach höhere (159 ng/ml), die der zweiten Gruppe sogar eine 6-fach höhere Kortikosteron-Konzentration (373 ng/ml) gegenüber einer unbeeinflussten Kontrollgruppe (61 ng/ml). Einen gleich starken Anstieg der Kortikosteron-Spiegel beschrieben auch Herck et al. (1991). Nach dem kurz dauernden Umsetzen (2 Minuten) von Ratten in einen anderen Käfig wurden 15 Minuten später durchschnittlich 6-fach höhere Kortikosteron-Werte (165 ng/ml) gemessen.

Der Einfluß eines Käfigtransportes auf die Zeitverläufe von verschiedenen Blutparametern, die repräsentativ für Streßreaktionen sind, wurden von Gärtner et al. (1980) an männlichen Ratten untersucht, nachdem diese Tiere kurzfristig mit ihrem Käfig bewegt worden waren. Fünf Minuten nach der Stressorkonfrontation waren die Serumspiegel für Prolaktin mit 60 ng/ml um das 2,5-fache höher als im Kontrollserum (24 ng/ml), welches innerhalb von 100 Sekunden nach Betreten des Tierraumes durch Dekapitation gewonnen wurde. Die Kortikosteron-Spiegel (Kontrollserum = 180 ng/ml) waren nach 15 Minuten um nicht ganz das Doppelte erhöht (320 ng/ml).

In einer anderen Untersuchung wurde der Effekt eines Transportes von männlichen Ratten aus einem Tierraum in ein Labor überprüft. Der gesamte Transport dauerte 5 Minuten. In Abständen von 10, 30, 60, 120 und 240 Minuten nach Beginn des Transportes, wurden die Blutproben genommen. In einem weiteren Experiment wurden die Tiere für 3 Tage in einem ungewohnten

Raum gehalten und am 4. Tag innerhalb einer Minute in einen Nebenraum gebracht um dort nach 10, 30, 60, und 120 Minuten die Blutproben zu nehmen. Die Tiere beider Gruppen zeigten einen biphasischen Verlauf der Prolaktin-Konzentration. Die Werte der ersten Gruppe zeigten ein erstes Maximum nach 30 Minuten (43 ng/ml) gefolgt von einem zweiten nach 240 Minuten (43 ng/ml). Die zweite Gruppe hatte bereits nach 10 Minuten die maximale Prolaktin-Konzentration (80 ng/ml) und bei der letzten Bestimmung (120 min) noch einmal erhöhte Werte (70 ng/ml), wobei die mittleren Konzentrationen der zweiten Gruppe insgesamt deutlich höher lagen (Krulich et al., 1974). Diese Ergebnisse wurden auch von Fenske und Wuttke (1977) bestätigt, die bei ungestreßten erwachsenen männlichen Ratten (200-250 g KGW) basale Prolaktin-Werte von 46 ng/ml gemessen hatten und 20 Minuten nach einem 10-minütigen Käfigtransport stellten sie einen starken Anstieg (um 119 ng/ml) der Prolaktin-Werte fest.

Für die Amplitude der hormonellen Reaktion ist unter anderem die Zunahme der Veränderung der Umgebung mit verantwortlich. Die Höhe der Kortikosteron-Spiegel steigt proportional mit dem Grad der Umgebungsveränderung an (Flaherty et al., 1986).

Ein weiterer Faktor beim Zustandekommen unterschiedlicher Hormonspiegel ist in diesem Zusammenhang die Vorhersehbarkeit eines Ereignisses. So produzierte ein unberechenbares Hineinsetzen in einen neuen Käfig einen stärkeren Anstieg der Kortikosteron-Spiegel, als ein vorhersehbares Umsetzen in einen neuen Käfig. Daraus wurde geschlossen, daß die Art und Weise der Konfrontation mit etwas Neuartigem die Stärke der hormonellen Antwort beeinflußt. Darüber hinaus wurde beobachtet, daß sowohl Kortikosteron als auch Prolaktin 30 Minuten nach der fünften Exposition gegenüber einem neuen Käfig auf das Ausgangsniveau zurückkehrten, was nach Muir und Pfister (1986) für eine Adaptation dieser beiden Hormone an wiederholte Stressoren spricht. Zu der gleichen Erkenntnis gelangten auch Dobrakovová und Jurcovicová (1984), die eine wiederholte Konfrontation von Ratten mit den Stressoren Handling und Transport untersuchten. Sie stellten die Prolaktin- und Kortikosteron-Werte einer einmaligen Manipulation den Werten nach 8- bzw.

15-maliger Wiederholung gegenüber. Beide Hormone offenbarten eine parallel verlaufende Reaktion auf Streß, wobei sich die Prolaktin-Konzentration nach 8-maligem Handling gegenüber dem erstmaligen Handling deutlich um 53% verringert hatte, während 8-maliger Transport nur zu einer geringen Erniedrigung (um 19%) führte. Andererseits zeigten die Tiere nach 15-maligem Handling und Transport leicht erhöhte Werte. Die Kortikosteron-Konzentrationen waren hingegen nach allen mehrfach durchgeführten Manipulationen erniedrigt, wobei sich der Unterschied nach 8- und 15-maligem Handling mit 28 bzw. 26% am deutlichsten darstellte. Aufgrund dieser Ergebnisse wurde geschlossen, daß das Prolaktin keine einheitlich gerichtete Reaktion aufwies, während für das Kortikosteron eine deutliche Anpassung an wiederholten moderaten Streß erfolgte.

All diese Untersuchungen und die eigenen Ergebnisse bestätigen, daß für Ratten sowohl der Transport als auch das mit dem Wiegen verknüpfte Umsetzen in einen leeren Käfig schon eine meßbare Belastung darstellt, die sich anhand der beschriebenen Veränderungen, insbesondere der Kortikosteron-Werte, sehr eindrucksvoll nachweisen läßt.

5.7 Beeinflussung durch Fixierung

Zur Durchführung von Behandlungsmaßnahmen ist bei Laborratten in den meisten Fällen eine Fixierung der Tiere unumgänglich, da sie sich gegen viele Manipulationen vehement zu Wehr setzen. Auf der anderen Seite bedeutet jede Art von Fixierung Streß für die Tiere. Deshalb wurde im Rahmen dieser Arbeit eine wenig bekannte Methode zur schonenden Fixierung von Ratten untersucht. Dazu wurde ein Handtuch über den gesamten Tierkörper gelegt und das darunter befindliche Tier mit leichtem Druck festgehalten. Hinter dieser Methode steht die Intention, dem Bedürfnis der Tiere nach einer dunklen schützenden Umgebung ("Höhle") nachzukommen, um sie dadurch etwas zu beruhigen. Diese Technik wurde mit der gängigen Fixierung mittels Nackengriff verglichen, wobei die Dauer der Immobilisation mit einer Minute für beide Methoden gleich lang war.

Die Bestimmung der Prolaktin-Konzentration ergab für beide Fixierungsarten die zweitniedrigsten Gruppenwerte. Die Fixierung mittels Handtuch ergab einen Wert von 77,1 ng/ml im Block A und nach der Immobilisierung durch Nackengriff (Block B) wurde ein Wert von 73,6 ng/ml gefunden. Die Kortikosteron-Konzentrationen nach diesen beiden Fixierungsmethoden, zeigten gegenüber den anderen Manipulationen mit 401,4 ng/ml den kleinsten Wert im Block A für die "Handtuch-Fixierung" und mit 388,2 ng/ml für die "Nackengriff-Fixierung" die zweitniedrigste Serumkonzentration der untersuchten Gruppe Block B.

In der Literatur wird eine Vielzahl von Fixierungs-Methoden für Laborratten beschrieben, wobei die Art und Weise der Immobilisierung zu unterschiedlich starken psychischen und/oder physischen Belastungen der Tiere führen kann. Ein weit verbreitetes Gerät zur Immobilisation von Ratten stellt das "Fixationsrohr" aus Glas oder transparentem Kunststoff dar.

Die Isolation und Beschränkung der Bewegungsfreiheit bei Ratten durch einen solchen Plastikzylinder verursachte in einer Untersuchung von Donnerer und Lembeck (1990) einen deutlichen Anstieg sowohl der Prolaktin-Sekretion von einem Basalwert von 4 ng/ml auf einen Wert von 40 ng/ml, als auch der Kortikosteron-Spiegel, welcher von einem Basalwert von rund 45 ng/ml auf einen Wert von 570 ng/ml anstieg. Damit sollte nachgewiesen werden, daß emotionaler bzw. kognitiver Stress, wie ihn eine Immobilisation im Plastikzylinder nach Auffassung der Autoren darstellt, zu einer Freisetzung sowohl von Kortikosteron als auch von Prolaktin führte.

Auch andere Autoren nehmen eine Unterscheidung zwischen "emotionalen" (z. B. Immobilisation) und physischen Stressoren (z. B. Kälte) vor. Direkte Vergleiche dieser beiden "Stressorqualitäten" haben gezeigt, daß die Prolaktin-Antwort auf diese Reize unterschiedlich ausfällt. Bei einem Vergleich solcher unterschiedlicher Stressoren wie "Injektion", "Kälteexposition", "forciertes Laufen", "Immobilisation" und "elektrischer Fußschock" provozierte die 15-minütige Immobilisation in einem Plastikrohr mit 135 ng/ml die zweithöchsten Prolaktin-Werte aller untersuchten Manipulationen. Nur die Elektrostimulation verursachte einen höheren Wert (197 ng/ml), während die

"Kältexposition" nur zu einer geringfügigen Erhöhung der Prolaktin-Werte von 5 ng/ml führte (Kant et al., 1983a). Zu vergleichbaren Ergebnissen beim Prolaktin gelangten auch Lenox et al. (1980). Sie fanden nach einer 5-minütigen Kälteexposition bei männlichen Ratten eine Prolaktin-Konzentration von 10 ng/ml, während eine gleich lange Fixierung in einem Plastikrohr zu einem Prolaktin-Spiegel von 50 ng/ml führte. Ein völlig anderes Ergebnis zeigten hingegen die Kortikosteron-Werte. Mit 690 ng/ml nach der Kälteexposition und 650 ng/ml nach der Immobilisation lagen diese Konzentrationen praktisch auf einem gleich hohen Niveau. Dieses Ergebnis konnte durch die Untersuchungen von Odio und Maickel (1985) und Sakellaris und Vernikos-Danellis (1975) jedoch nicht bestätigt werden. Beide Gruppen fanden höhere Kortikosteron-Konzentrationen nach einer Immobilisation im Gegensatz zur Kälteexposition.

Die Immobilisation bei männlichen Ratten übt einen biphasischen Effekt auf die Serum Prolaktin-Spiegel aus. Er ist gekennzeichnet durch eine frühe kurze Stimulationsphase, gefolgt von einer langen Inhibitionsphase (Kawakami et al., 1979). Eine 10-minütige Immobilisation induzierte einen schnellen Anstieg (um 600%) der Prolaktin-Konzentration mit einem Maximum nach 10 Minuten und einem anschließenden langsamen Abfall der Werte, welche nach 5 Stunden unter das Anfangsniveau abgesunken waren.

In einem anderen Versuch von Krulich et al. (1974) wurden männliche Ratten für 10, 30 und 60 Minuten in Drahröhren fixiert und anschließend Blutproben auf die Prolaktin-Konzentration untersucht. Diese Immobilisation führte zu einem mehr als 7-fachen Anstieg der Prolaktin-Spiegel, welche ebenfalls eine maximale Konzentration zum Entnahmezeitpunkt 10 Minuten zeigten. Die maximalen Konzentrationen nach Immobilisation (42 ng/ml) lagen im Vergleich zu denen einer intraperitonealen Injektion von physiologischer Kochsalzlösung höher, wobei die letztgenannte Manipulation bereits nach 2 Minuten ihren Maximalwert (35 ng/ml) erreicht hatte.

Briski und Sylvester (1987) untersuchten den Gewöhnungseffekt auf eine wiederholte Immobilisation. Ein einmaliger 15-minütiger Fixierungsstreß in einer Plexiglasröhre resultierte in einer 100%igen Erhöhung der Prolaktin-Werte von männlichen Ratten. Tiere, welche an 10 vorangegangenen Tagen für jeweils

15 Minuten fixiert worden waren, zeigten nach dieser Zeitspanne bei einer erneuten Immobilisation um bis zu 60% erniedrigte Prolaktin-Werte, was nach Meinung der Autoren eventuell auf eine Habituation zurückzuführen sei.

Perhach jr. und Barry III (1970) verglichen in ihrer Untersuchung die Kortikosteron-Konzentrationen von Ratten während einer "Körperfixierung" gegenüber einer "Nackenfixierung". Die "Körperfixierung" bestand aus der Umwicklung des Tieres mit Maschendraht und anschließender Befestigung auf einer Holzplatte. Bei der "Nackenfixierung" wurde der Kopf des Tieres durch die Öffnung einer Haltevorrichtung gesteckt und dann durch einen Schieber am Hals fixiert, so daß der Hinterkörper frei beweglich war. Obwohl durch die "Nackenfixierung" nur ein kleiner Teil des Körpers des Tieres eingeengt wurde, stellte sie eine stärkere Belastung als die "Körperfixierung" dar. Nach einer Fixierungsdauer von einer Stunde waren die Kortikosteron-Spiegel der Tiere während der "Körperfixierung" auf 210 ng/ml und die der "Nackenfixierung" auf 360 ng/ml angestiegen, was eine deutliche Erhöhung gegenüber der Kontrollgruppe mit einem Wert von 125 ng/ml darstellt.

Doch nicht nur die Methode der Fixation hat einen entscheidenden Einfluß auf die Modulation der hormonellen Reaktion, sondern ebenso die Dauer der Immobilisation. Die Kortikosteron-Werte von Ratten nach einer zwei Minuten dauernden Fixierung in einem Fixationglas erreichten nach 15 Minuten ein Maximum von 410 ng/ml. Dieser Wert verringerte sich nur unwesentlich bis zur dreißigsten Minute, wonach es aber dann zu einem kontinuierlichen Abfall der Werte kam, bis nach 90 Minuten wieder der Basiswert von 80 ng/ml erreicht wurde (De Souza und Loon, 1982).

Der Verlauf der Kortikosteron-Konzentration während einer 4-stündigen Immobilisierung in einer Plexiglasröhre begann mit einem Basalwert von 100 ng/ml gefolgt von einem drastischen Anstieg auf 600 ng/ml nach 30 Minuten und einem Maximum mit 635 ng/ml nach einer Stunde. Selbst nach 4 Stunden wurde noch ein Spiegel von 330 ng/ml im Serum der Tiere gemessen. In einem anderen Versuchsansatz hatte eine 90-minütige Fixierung, gefolgt von einer anschließenden Pause von 2 ½ Stunden, keinen Einfluß auf die Höhe der Kortikosteron-Werte, die nach einer anschließend

vorgenommenen Injektion gemessen wurden, gegenüber einer unfixierten Kontrolle. Das wurde von Dallman und Jones (1973) als Indiz dafür gewertet, daß nach dieser Pause (2 ½ Stunden) die Kortikosteron-Werte zumindest auf das Anfangsniveau zurückgesunken waren. Die Injektion verursachte, mit oder ohne vorherige Fixation, einen Kortikosteron-Spiegel von 300 ng/ml und damit deutlich weniger als die Immobilisation.

Bei der Untersuchung von Stressoren, wie "neuer Käfig" und "Immobilisation" (in einer Plastikröhre), von denen Keim und Sigg (1976) annahmen, daß beide eine gleiche Intensität besaßen, fanden sie unterschiedliche Ausprägungen der Kortikosteron-Verlaufskurven. Die Hormonwerte während des 2-stündigen Aufenthaltes in einem neuen Käfig stiegen in einer flachen Kurve an und erreichten mit 300 ng/ml nach 120 Minuten ihren Maximalwert. Die durchgeführte Immobilisation von gleicher Dauer führte hingegen zu einem raschen Anstieg der Kortikosteron-Konzentration innerhalb von 30 Minuten und erreichte eine wesentlich höhere Maximalkonzentration mit 510 ng/ml. Aus diesen Differenzen in der Charakteristik der Verlaufskurven wurde geschlossen, daß es sich hier offensichtlich um Stressoren mit unterschiedlicher Intensität handelte.

In einem Langzeitversuch von Vogel und Jensh (1988) konnte gezeigt werden, daß eine tägliche Immobilisation bei Ratten zu einer Sensibilisierung der Kortikosteron-Anwort nach 2 Wochen führt. Erst nach dieser Zeit kommt es zu einem deutlichen Anstieg der Kortikosteron-Werte.

Allgemein übereinstimmend, wird die Einschränkung der Bewegungsfreiheit von Tieren als ein anerkannter Stressor gewertet. Jedoch ist eine Abgrenzung, ob es sich bei der Immobilisation um einen psychischen oder physischen Stressor handelt, aufgrund der verschiedenen angewandten Methoden, nicht immer eindeutig vorzunehmen.

Die eigenen Ergebnisse lassen vermuten, daß eine Fixierung von Ratten mittels eines Handtuches, im Gegensatz zu den in der Literatur beschriebenen Verfahren zur Immobilisation dieser Tiere, eine relativ "tierschonende" Methode darstellt, deren Anwendung auch für den Untersucher recht komfortabel ist.

5.8 Beeinflussung durch Verabreichungen

Bei einer Vielzahl von Tierversuchen (z. B. Arzneimittelzulassung, Toxikologie) besteht die Notwendigkeit, eine Substanz in den Körper eines Labortieres hineinzubringen. Bei den vielfältigen Möglichkeiten eine Applikation vorzunehmen, spielen die intramuskuläre Injektion sowie die orale Verabreichung von Lösungen eine große Rolle. Der gesamte Vorgang einer Applikation setzt sich aus einer Kombination von Handling, Fixierung und kurzfristigem Schmerz bzw. Unbehagen zusammen.

Die "i. m.-Injektion", in Kombination mit der "Handtuch-Fixierung", verursachte im Vergleich zu den anderen durchgeführten Manipulationen relativ niedrige Hormonwerte. Die Tiere vom Block A zeigten nach der "Injektion" den niedrigsten Prolaktin-Wert mit 69,7 ng/ml. Bei den Kortikosteron-Werten hatte diese Gruppe nach der "Injektion" den zweitniedrigsten Plasmawert mit 413 ng/ml.

Laut Lasa Working Party (1990) wird einer einfachen subkutanen Injektion, welche ein mildes, vorübergehendes Unbehagen verursacht, das niedrigste Schmerzniveau zugewiesen. Eine intramuskuläre Injektion wird mit einem geringfügig höherem Schweregrad bewertet, wobei die höhere Einstufung durch das eventuelle Fortbestehen der Schmerzen nach der Injektion begründet wird. Der "Belastungs-Index" der UFAW (1988) bestätigt, daß es nach einer subkutanen Injektion von physiologischer Kochsalzlösung zu keiner signifikanten Änderung der Bewegungsaktivität von Ratten kommt, woraus geschlossen wurde, daß diese Manipulation keine oder nur eine geringgradige Beunruhigung der Tiere zur Folge hat.

Rerup (1961) konstatierte, daß es die weit verbreitete Auffassung zu geben schien, daß jede Art von Injektion an einem nicht-anästhesierten Labortier, durch einen Anstieg der Sekretion von Corticotropin (ACTH) aus der Hypophyse, als Antwort auf einen unspezifischen Streß, gekennzeichnet sei. In einer späteren Untersuchung belegten Rerup und Hedner (1962) hingegen, daß eine subkutane oder intraperitoneale Injektion bei nicht-anästhesierten Ratten nicht per se zu einer Beeinflussung der frei im Plasma zirkulierenden Steroide führt. So kam es bei ihrer Untersuchung 30 Minuten nach einer Kochsalz-

Injektion zu keiner signifikanten Veränderung der Plasma Kortikosteroide. Die Kontrolltiere ohne Injektion besaßen Plasmaspiegel von 326 ng/ml, während die Tiere nach einer subkutanen Injektion einen Wert von 285 ng/ml und nach einer intraperitonealen Injektion einen Wert von 292 ng/ml aufwiesen. Dem entgegen stehen die Ergebnisse von Barrett und Stockham (1963), die eine Erhöhung der Kortikosteron-Werte nach einer i. p.-Injektion von Kochsalzlösung gegenüber den Basalwerten (58 ng/ml) bei einzeln gehaltenen Ratten von 230% (nach 15 min) bis zu 350% (nach 60 min) fanden. Die maximale Konzentration wurde mit 262 ng/ml eine Stunde nach Applikation gemessen. Diese Ergebnisse konnten auch von Dallman und Jones (1973) bestätigt werden, die ebenfalls 15 Minuten nach einer Injektion einen deutlichen Anstieg der Kortikosteron-Konzentration von 100 ng/ml auf 385 ng/ml fanden. Selbst nach einer Zeitspanne von 45 Minuten post injektionem fanden Hackbarth et al. (1998) mit 250 bis 300 ng/ml noch deutlich erhöhte Kortikosteron-Plasmakonzentrationen. Dieser Kortikosteron-Anstieg bei Ratten infolge einer Injektion wurde auch nicht durch eine mehrfache Wiederholung beeinflusst. Der Vergleich der Kortikosteron-Werte von trainierten (eine / zwei / zehn vorangegangene Injektionen, tägliches Handling über eine Woche) gegenüber untrainierten Ratten zeigte, daß eine s. c.-Injektion jedesmal ein streßvoller Stimulus war, unabhängig von einem vorausgegangenem Training (Hodges und Mitchley, 1970).

Ähnliches gilt auch für die Veränderung des Prolaktin-Spiegels durch eine Injektion. Nach der intraperitonealen Injektion von 1 ml physiologischer Kochsalzlösung wurden in Abständen von 2, 10, 30 und 60 Minuten Blutproben entnommen. Es zeigte sich ein starker Anstieg der Prolaktin-Konzentration um 60% innerhalb von 2 Minuten nach der Injektion. Danach kam es zu einem kontinuierlichen langsamen Abfall der Konzentration bis diese nach einer Stunde wieder das Basisniveau (13 ng/ml) erreicht hatte (Krulich et al., 1974).

Im Gegensatz zu diesen Einschätzungen der Belastung durch eine Injektion gibt es nur recht wenige Bewertungsansätze für eine Belastung der Tiere durch eine orale Applikation. Auch die eigenen Ergebnisse zeigen eine sehr gegenläufige Entwicklung der Prolaktin- und der Kortikosteron-Konzentrationen

nach der oralen Verabreichung von physiologischer Kochsalzlösung und Fixation mittels "Nackengriff". Nach dieser Manipulation wurde zwar bei den Prolaktin-Werten mit 62 ng/ml die niedrigste Serumkonzentration der Versuchsgruppe gemessen, provozierte aber andererseits beim Kortikosteron mit 408,7 ng/ml den höchsten Wert der Gruppe.

Haas und Fischer (1969) beschrieben schon früh neben einem zirkadianen Rhythmus auch den Effekt einer Injektion bzw. oralen Applikation auf den Kortikosteron-Gehalt. Dieser Tagesrhythmus wurde weder durch eine i. m.-Injektion von physiologischer Kochsalzlösung in einer Menge 0,1 ml/kg, noch durch eine orale Belastung der Tiere mit 5,0 ml/kg beeinflusst und führte dementsprechend zu keiner Veränderung der Kortikosteron-Werte. Die UFAW (1988) bewertete das Verhalten von Ratten nach oraler Applikation unterschiedlicher Mengen von Flüssigkeit als Anzeichen für eine Belastung. Dabei wurde festgestellt, daß eine orale Verabreichung von physiologischer Kochsalzlösung in Dosierungen von 1,5 bis 3,0 ml/kg KGW zu keiner meßbaren Beunruhigung bei Ratten führte. Jedoch ließ sich 10 bis 30 Minuten nach der oralen Applikation von 6,0 ml/kg physiologischer Kochsalzlösung eine starke Beunruhigung der Ratten beobachten, was zu der Feststellung führte, daß es bei dieser Dosierung zu einer Belastung der Tiere kam und daß diese Dosis das obere Limit für eine orale Verabreichung darstellen sollte.

Der in der eigenen Untersuchung gefundene gegenläufige Effekt auf die beiden Hormone Prolaktin und Kortikosteron (nach einer oralen Applikation) als Reaktion auf den gleichen Stressor, wurde auch von Yelvington et al. (1984) bei männlichen Ratten beschrieben. Ihre Ergebnisse und die anderer Autoren (Krieg jr. et al., 1984; Leung et al., 1980) zeigten, daß der Kortikosteron-Spiegel eines Tieres die Stärke der Prolaktin-Antwort auf physischen und psychischen Streß eindeutig vermindern kann. Das könnte bedeuten, daß der hier gefundene hohe Kortikosteron-Spiegel zu einem verringerten Prolaktin-Spiegel führte, was dieses konträre Ergebnis erklären würde.

Trotz der eigenen gegensätzlichen Befunde kann wohl davon ausgegangen werden, daß es sich bei der oralen Applikation von Substanzen, durch die dazu notwendige Fixierung sowie das Einführen der Sonde in den Ösophagus, um

eine insgesamt belastende Situation für Tiere handelt. Bei der Durchführung dieser Prozedur kommt es insbesondere durch die Fixation dazu, daß das Verhaltensrepertoire der Tiere nicht mehr ausreicht sich dieser unangenehmen Situation zu entziehen. Tritt dieser Fall ein, kommt es generell zu einer vermehrten Ausschüttung von Kortikosteron, was durch die eigenen Ergebnisse bestätigt wird.

5.9 Beeinflussung durch Kennzeichnung

Die Kennzeichnung von Versuchstieren ist eine wichtige Maßnahme zur eindeutigen Identifizierung eines Individuums. Gegenüber den gebräuchlichen Methoden der Kennzeichnung wie z. B. Tätowierungen, Ohrmarken oder Ohrlochungen hat durch die Entwicklungen im Bereich der Mikroelektronik die Kennzeichnung mittels Transponder an Bedeutung gewonnen. Die Kennzeichnung selbst sollte möglichst wenig Einfluß auf das Wohlbefinden des Tieres sowohl aus klinischer, als auch ethologischer Sicht haben. Neben Streß und Schmerzempfindung während der Kennzeichnung zählen hierzu örtliche Gewebereaktionen, Beeinträchtigung des Allgemeinbefindens und Verhaltensänderungen des gekennzeichneten Tieres (DVG, 1996).

Die Ergebnisse der Auswertung der Prolaktin-Bestimmungen zeigen für beide Methoden der Kennzeichnung ("Mikrochip"/"Ohrlochung") in den beiden Untersuchungsgruppen (Block A und B) die höchsten Serumkonzentrationen mit 89,3 ng/ml nach "Chip-Applikation" und 84,1 ng/ml nach der "Ohrlochung".

Die Analyse der Kortikosteron-Konzentrationen zeigt ein absolut gegensätzliches Ergebnis. Hier reagieren die Tiere des Blocks A mit dem höchsten Kortikosteron-Wert (445 ng/ml) auf die Implantation eines Mikrochips, während die Tiere des Blocks B nach der "Ohrlochung" den niedrigsten Kortikosteron-Spiegel (381,2 ng/ml) besitzen.

Allgemein kann die Methode der Implantation eines Mikrochips als eine subkutane Injektion, mit einer entsprechend stärkeren Kanüle, beschrieben werden. Während sie nur mit einer geringfügigen oberflächlichen Gewebetrennung einhergeht, stellt die Perforation der Ohrmuschel zum Zwecke der Kennzeichnung einen offensichtlich etwas stärker gewebeverletzenden

Eingriff dar, wobei beide Maßnahmen vermutlich mit Schmerzen verbunden sind.

Die Bewertung des Umfangs der Schmerzwahrnehmung eines Tieres basiert auf der Spannweite der Schmerzsensibilität und der Schmerztoleranzschwelle (maximal tolerierter, experimenteller Schmerz), welche weitgehend auf dem Analogieschluß zur menschlichen Schmerzempfindung beruht. Es ist jedoch unmöglich ein Überschreiten der (minimalen) Schmerzschwelle im Zusammenhang mit einfachem Handling (z. B. subkutane Injektion) völlig auszuschließen (Kitchell und Johnson, 1985).

Des Weiteren ist noch unklar, ob eine Wechselbeziehung zwischen der Veränderung von biochemischen Parametern und der Empfindung von Schmerz existiert. Zur Bewertung von Streß kann der Anstieg der Plasmakonzentrationen der Nebennierenrinden-Hormone herangezogen werden. Ein klarer Zusammenhang dieses Anstiegs in Verbindung mit Schmerzen bedarf jedoch noch des Nachweises (AVTRW, 1986). Üblicherweise steigen die Atemfrequenz, die Herzfrequenz und der Blutdruck unter Schmerzen an. Diese Reaktionen können allerdings auch alleine durch den Streß einer Manipulation ausgelöst werden. Auch die Bestimmung von Kortikosteroid- oder Katecholamin-Spiegeln bereitet Schwierigkeiten bei der Beurteilung von Schmerzzuständen, da sich diese Parameter durch jeden Stressor verändern (Erhardt et al., 1998).

Die Empfindlichkeit der Haut ist abhängig von der Körperregion. Obwohl die Tiere sich oft gegen das Berühren ihrer Ohrmuscheln wehren, scheint dieses Körperteil schmerzhaften Reizen gegenüber nicht besonders empfindlich zu sein (Gärtner und Militzer, 1993). Auch die Lasa Working Party (1990) beurteilt die Empfindlichkeit der Ohrmuschel dahingehend, daß sie nicht besonders sensitiv für schmerzhaft stimuli zu sein scheint, wobei sich akute Schmerzzustände der Haut durch Kratzen, Belecken oder Beknabbern der entsprechenden Stelle zeigen. Bei akuten schmerzhaften Stimuli kommt es bei der Ratte zu deutlichen Lautäußerungen. Da es bei der Durchführung der Ohrlochung nur bei wenigen Tieren zu einer wahrnehmbaren Lautäußerung und bei keinem der Tiere zu einer nachträglichen Beschäftigung mit dem markierten

Ohr kam, ist davon auszugehen, daß es (Analogieschluß zum Menschen: "Ohrlochstechen") nur zu einer geringen Belastung der Tiere kommt, was das Zustandekommen der relativ niedrigeren Kortikosteron-Werte erklären könnte.

Bisherige Untersuchungen der Belastung von Tieren durch die Implantation eines Mikrochips führten zu den Ergebnissen, daß es erstens zu keiner Verhaltensänderung der Tiere während und nach der Applikation kam (Arndt und Wiedemann, 1991) und zweitens, daß keine histopathologischen Veränderungen nachgewiesen wurden (Ball et al., 1991; Behlert, 1989; Mrozek et al., 1995; Rao und Edmondson, 1990).

Die eigene Untersuchung zeigt ebenfalls, daß es während der Applikation nur selten zu Lautäußerungen, als Zeichen für einen akuten Schmerz, kam. Außerdem wiesen die Lautäußerungen keinen direkten Bezug zu dem kurzen Einstich der Kanüle auf, sondern waren vielmehr kontinuierlich während der gesamten Zeitspanne der Fixierung zu vernehmen. Außerdem kann durch die eigenen Erfahrungen mit dieser Methode bestätigt werden, daß es post applikationem zu keiner sichtbaren klinischen Veränderung bei den Tieren gekommen ist. Auf die Beurteilung der Belastung, auf Basis endokriner Veränderungen, wird im nachfolgenden Kapitel eingegangen.

5.10 Beeinflussung durch einen ausgewählten Stressor

Ging es im Hauptversuch der vorliegenden Arbeit um die Beantwortung der Frage ob der vermutete Schweregrad einer Manipulation zu einer abgestuften Hormonreaktion bei den Versuchstieren führt, sollte der Abschlußversuch Klarheit darüber schaffen ob die Hormonwerte nach einer Manipulation tatsächlich höher ansteigen als bei einer Blutentnahme ohne vorhergehende Manipulation. Als Testmanipulation wurde die "Mikrochip-Implantation" mit "Handtuchfixierung" ausgewählt. Es zeigte sich, daß es nach einer "Mikrochip-Implantation" zu einer signifikanten Erhöhung des Kortikosteron-Spiegels im Serum von Ratten kommt. Dieses kann als ein Anzeichen für eine Belastung der Tiere gewertet werden. Worauf aber letztendlich dieser Hormonanstieg zurückzuführen ist, kann aufgrund der zusätzlich einwirkenden Stressoren in Form des Handlings und der Fixierung nicht eindeutig differenziert werden. Alle

Ergebnisse deuten jedoch an, daß nicht nur die Implantation für die endokrine Reaktion allein verantwortlich ist.

Dieses mag auch eine Erklärung für die zuvor diskutierten Ergebnisse der anderen Manipulationen sein, bei denen kein signifikanter Unterschied der Hormonantwort auf die verschiedenen Stressoren nachgewiesen werden konnte. Allen durchgeführten Manipulationen geht ebenfalls ein Handling voraus, welches vermutlich alleine schon zu einer starken Hormonantwort führt, so daß die nachfolgende eigentliche Maßnahme nur noch zu geringgradigen Differenzen in den Hormonspiegeln führt.

Die Durchführung des Abschlußversuches wurde notwendig, weil es im Hauptversuch keine Versuchsgruppe ohne Manipulation gab. Dieses hätte entweder die Anzahl der Blutentnahmen noch mehr erhöht oder es hätte auf eine der ausgewählten Manipulationen verzichtet werden müssen. Auf jeden Fall wäre der Plan der ausgewogenen Nachbarschaftsbeziehungen nicht vollständig zu verwirklichen gewesen, da alle Tiere entweder als erstes oder zweites ohne Manipulation hätten untersucht werden müssen.

Ein weiterer nicht zu vernachlässigender Effekt bei der Untersuchung von Belastungszuständen ist die Sensibilisierung. Sie tritt als Reaktion auf einen täglich wiederholten, stark aversiven Stressor auf und führt zu einer zunehmend intensiveren adrenokortikalen Streßreaktion. Im Abschlußversuch wurde auch eine Sensibilisierung und eine daraus resultierende Verstärkung der Kortikosteron-Antwort nach wiederholtem Streß festgestellt, unabhängig davon, ob der Blutentnahme zur Kortikosteron-Bestimmung eine Manipulation vorausging oder nicht. Dieser Effekt tritt nach Auffassung von Taché et al. (1976) in den ersten 6 Tagen nach dem Einwirken eines wiederkehrenden intensiven Stressors (chronische Immobilisation) besonders deutlich auf. Die Kortikosteron-Werte stiegen bei der Untersuchung dieser Autoren am ersten Tag auf 365 ng/ml an, zeigten am dritten Tag einen Wert von 417 ng/ml und erreichten am sechsten Tag den Maximalwert von 582 ng/ml. Mit 548 ng/ml lag die Hormonkonzentration am fünfzehnten Tag immer noch deutlich über dem Anfangswert von 156 ng/ml. Damit konnte eine Verstärkung der

adenohypophysären Aktivität während eines chronisch intermittierenden intensiven Stresses bei Ratten nachgewiesen werden.

Nach einer wiederholten Exposition gegenüber einem Stressor kann es unter gewissen Umständen aber auch zu einer Gewöhnung (Habituation) und damit zu einer sukzessiv verminderten Streßhormonausschüttung kommen. Welcher der beiden Effekte auftritt, ist von verschiedenen Faktoren, die nachfolgend dargestellt werden, abhängig.

Bei der Untersuchung der Intensität eines Stressors stellten Pitman et al. (1988) nach der Wiederholung eines milden Stressors (Fixierung in einem Plastikrohr) eine Habituation innerhalb von 3 Tagen fest, wohingegen ein intensiver Fixierungs-Streß ("Ausbinden des Tieres") selbst nach 7 Tagen noch keine Anzeichen für eine Gewöhnung erkennen ließ. Eine Stunde nach Beginn des intensiven Stresses betrug die Kortikosteron-Konzentration am siebten Tag der Versuchsreihe 310 ng/ml und unterschied sich damit nur unwesentlich von dem Wert des ersten Tages (375 ng/ml).

Der Gewöhnungseffekt ist nicht nur von der Intensität des Stressors abhängig, sondern wird auch von dem "Interstressor-Intervall" mitbestimmt. Bei weniger intensiven Stressoren (z. B. einer nicht schmerzhaften Immobilisation von begrenzter Dauer) nimmt die Streßreaktion bei jeder Wiederholung ab, bis keine Reaktion mehr wahrnehmbar ist. Daraus folgt, je weniger intensiv der Stressor ist, je öfter die Wiederholung erfolgt und je kürzer das "Interstressor-Intervall" ist, desto schneller tritt die Gewöhnung an den Stimulus ein (De Boer et al., 1990). Zudem ist die Gewöhnung an einen wiederholten Stressor auch stressorspezifisch und wird nicht auf neue Stressoren übertragen (Kant et al., 1985).

Im Zusammenhang mit einer Gewöhnung an einen Stressor steht auch die individuelle Reaktionslage der Tiere. Die Tiere, die ursprünglich weniger intensiv auf unterschiedlich starke Stressoren reagierten, zeigten später weder Anzeichen einer Habituation noch Unterschiede in ihrer hormonellen Antwort auf die verschiedenen Stressoren. Dem entgegen reagierten die Ratten, welche anfänglich eine starke Reaktion auf die Stressoren zeigten, mit einer teilweisen

Gewöhnung, wobei es in Abhängigkeit von der Intensität des Stressors zu unterschiedlichen Mustern der Reaktion kam (Natelson et al., 1988).

Die Übertragung der Befunde aus der Literatur auf das Ergebnis des eigenen Abschlußversuches ergibt, daß es sich bei der Manipulation "Mikrochip-Implantation", in Kombination mit der Fixation, eher um einen intensiven Stressor aufgrund einer Verstärkung der Kortikosteron-Antwort handeln wird.

5.11 Allgemeine Beurteilung

Wie die zahlreichen Beispiele aus der Literatur belegen, sind die hier untersuchten Hormone sensitive Indikatoren für ein Streßgeschehen.

Krulich et al. (1974) fanden das einfachste und am besten reproduzierbare Ausschüttungsmuster nach einer vorangegangenen Streß-Situation bei der Veränderung der Plasma Prolaktin-Spiegel, im Vergleich zu den Hormonen LH, FSH und GH. So rief ein einfacher Reiz von kurzer Dauer eine unverzügliche sekretorische Reaktion hervor, welche so stark war, daß die Prolaktin-Spiegel innerhalb von 2 Minuten um das 4- bis 6-fache ansteigen. Sie schlossen daraus, daß von diesen vier untersuchten Hormonen das Prolaktin das empfindlichste für eine Stimulation durch Streß zu sein scheint, weil es bei allen Manipulationen eine signifikante Veränderung zeigte, selbst nach den leichtesten Stressoren. Somit zeigt das Prolaktin der Ratte viele Charakteristika eines Streßhormones ähnlich denen des ACTH, auch wenn seine physiologische Bedeutung in diesem Zusammenhang noch nicht geklärt ist.

Aber auch die Konzentration von Kortikosteron, dem am häufigsten verwendeten Streßparameter, ist im Zusammenhang mit einem akuten Streß ein ganz effizienter Indikator. Eine kurzfristig erhöhte Kortikosteron-Sekretion wurde übereinstimmend als Reaktion auf unterschiedliche Stressoren nachgewiesen. In diesem Zusammenhang rufen bereits laborübliche Prozeduren eine kurzfristige adrenokortikale Streßreaktion hervor (Haemisch, 1998).

Die im eigenen Vorversuch (ohne vorhergehende Manipulation) ermittelten Hormonwerte der männlichen Tiere für Prolaktin mit 21,8 ng/ml und Kortikosteron mit 130,5 ng/ml unterscheiden sich im direkten Vergleich mit den

aus allen Manipulationen gemittelten Werten für Prolaktin mit 76,6 ng/ml und Kortikosteron mit 408 ng/ml sehr deutlich voneinander. Gegenüber den "Ruhewerten" beträgt der Unterschied der Kortikosteron-Konzentrationen 213%, der der Prolaktin-Konzentrationen rund 250%. Zu fast dem gleichen Ergebnis kamen auch Krulich et al. (1974) nach der Durchführung von zehn unterschiedlichen Manipulationen. Die durchschnittliche Veränderung der Prolaktin-Spiegel nach allen durchgeführten Manipulationen betrug bei ihnen ebenfalls rund 250%.

Trotz der sehr unterschiedlichen Manipulationen, die in der eigenen Arbeit durchgeführt wurden, zeigen beide Hormone als Reaktion auf die verschiedenen experimentellen Prozeduren nur relativ geringe Unterschiede in der Höhe ihrer Serumspiegel. Da es beim Zustandekommen solcher Hormonwerte eine Vielzahl an beeinflussenden Faktoren gibt, wird die Interpretation dieser gefundenen Ergebnisse erschwert. Zum einen kommt es durch stressverursachende Situationen zur Aktivierung multipler neuroendokriner Systeme, welche sich gegenseitig beeinflussen. Zum anderen geht jeder durchgeführten Manipulation ein stressinduzierendes Handling (u. U. eine Fixierung) voraus, wodurch es schon vor der eigentlichen Maßnahme zu einer Aktivierung der neuroendokrinen Systeme kommt. Das führt dazu, daß nicht nur die eigentliche Manipulation für die Amplitude der Hormonausschüttung allein verantwortlich ist, sondern die gesamten Umstände dieser Aktion zu einem Anstieg der Hormonkonzentrationen bei den Tieren führt, wodurch der zu untersuchende Manipulationseffekt überdeckt wird. Demzufolge besteht die Möglichkeit, daß der eigentliche Stressor für ein Tier im Vergleich zu den "Nebenwirkungen" nur wenig oder gar keine Bedeutung besitzt (Ladewig, 1994). Auch kann die von einigen Autoren beschriebene Sensitivität der beiden Hormone schon gegenüber milden Stressoren ein weiterer Grund dafür sein, daß eine Differenzierung des Schweregrades der hier untersuchten Manipulationen nur bedingt möglich ist. Generell kann bei Ratten davon ausgegangen werden, daß Prolaktin ein ebenso sensibles Stress-Hormon ist, wie das Kortikosteron (Manser, 1992). Jedoch reflektieren die Plasma-Spiegel dieser beiden Hormone nicht immer exakt die Stärke einer Stress

verursachenden Situation, da sie dazu neigen, schon während eines moderaten Stresses, maximale Spiegel zu entwickeln.

Die vorgenannten Gründe erschweren somit eine differenzierte Bewertung von unterschiedlich intensiven Stressoren auf der Basis der hier bestimmten Hormone.

Es bleibt noch zu erwähnen, daß die für diese Untersuchung verwendeten Tiere nur mit den routinemäßig durchgeführten tierpflegerischen Maßnahmen vertraut waren. Darüber hinaus fand ein zusätzliches Handling nicht statt. Dieses könnte dazu geführt haben, daß der Faktor "Handling" die hier gefundenen Ergebnisse entscheidend mit beeinflußt hat. Clausen (1998) konstatiert, daß es aufgrund eines frühen Handlings bei jungen Laborratten in ihrem späteren Leben zu einer Reduzierung der neuroendokrinen Reaktionen sowie der Verhaltensparameter kommt. Meaney et al. (1989) konnten nachweisen, daß ein frühes Handling bei diesen Tieren zu einer dauerhaften Erhöhung der Anzahl der Glukokortikosteroidrezeptoren im Hippocampus führte, wodurch der Effekt zirkulierender Kortikosteroide im negativen Feedback verstärkt wird. Die Wirkung dieser Rezeptorzunahme ist, daß die NNR-Reaktion dieser Tiere auf akute Stressoren später geringer ausfällt als bei den Ratten, welche in der neonatalen Periode keinem Stressor ausgesetzt waren.

Diese frühe Konditionierung könnte zur Reduzierung eines später auftretenden negativen Handling-Effektes ausgenutzt werden. Für nachfolgende Untersuchungen würde es sich deshalb anbieten, durch eine möglichst frühe Gewöhnungsphase zur Minimierung des Faktors Handling beizutragen, um auf diese Weise später den "reinen" Manipulationseffekt besser bewerten zu können.

Hinzu kommt ein weiterer praktischer Aspekt und zwar, daß es auch möglich ist, ältere Labortiere an unangenehme Situationen allmählich zu gewöhnen, um dadurch zu intensive Streßreaktionen zu vermeiden. Dies ist nicht nur für die Forschung von Bedeutung (z. B. bei der Gewöhnung an methodisch bedingte Eingriffe), sondern auch für den praktischen Umgang mit diesen Tieren (Ladewig, 1994).

6 Zusammenfassung

Ziel dieser Untersuchung war es, die Belastung von Laborratten durch experimentelle Methoden zu objektivieren. In der vorliegenden Arbeit wurde versucht, den Einfluß definierter Manipulationen wie "Wiegen", "Transport", "Fixierung mittels Nackengriff", "Fixierung mittels Handtuch", "i. m.-Injektion", "p. o.-Applikation", Markierung durch "Ohrlochung" bzw. durch "Mikrochip-Implantation" auf die Belastungsparameter Prolaktin und Kortikosteron bei männlichen Wistar-Ratten zu messen und zu überprüfen, ob diese Hormone eine graduierte Bewertung der durch diese verschiedenen Manipulationen hervorgerufenen Belastung zulassen.

Die Ergebnisse zeigen, daß alle durchgeführten Manipulationen zu einer deutlichen Streßreaktion bei den Tieren führen. Eine differenzierte Beurteilung der unterschiedlichen Manipulationen lassen diese Befunde jedoch nicht zu, da die Analyse der Blutproben, welche durch Punktion des retrobulbären Venenplexus unter CO₂-Narkose gewonnen wurden, keinen signifikanten Unterschied der Hormonwerte zwischen den einzelnen Manipulationen ergab, obwohl diese als unterschiedlich schwerwiegend betrachtet werden. Alle Manipulationen führten jedoch zu höheren Hormonwerten als eine alleinige CO₂-Narkose. Dieses wurde durch den Abschlußversuch noch einmal deutlich nachgewiesen. Der Vergleich zwischen einer einfachen Blutentnahme ohne vorhergehende Manipulation und einer Entnahme nach Mikrochip-Implantation ergab einen eindeutig signifikanten Anstieg der gemessenen Kortikosteron-Werte nach der Durchführung dieser Manipulation.

Die Ergebnisse der Vorversuche zeigen einen großen geschlechtsspezifischen Unterschied in der Konzentration der untersuchten Hormone. Weibliche Ratten besaßen fast viermal höhere Prolaktin-Spiegel und um 36% höhere Kortikosteron-Konzentrationen als die männlichen Tiere. Die Streuung der Prolaktin-Werte war bei den weiblichen Tieren ebenfalls deutlich größer, um das 3- bis 4-fache im Vergleich zu den männlichen Individuen.

Dagegen ist der Kortikosteron-Spiegel bei den männlichen Ratten deutlich von dem Zeitpunkt der Blutentnahme abhängig. Dieser Hormonspiegel war bei ihnen um 11⁰⁰ Uhr im Mittel doppelt so hoch wie um 10⁰⁰ Uhr.

Die Untersuchung des zeitlichen Verlaufs der Hormonantwort ergab für das Prolaktin einen Maximalwert zehn Minuten nach der Durchführung der Manipulationen, während die höchste Kortikosteron-Konzentration zwanzig Minuten nach den vorangegangenen Manipulationen gemessen wurde.

Weiterhin wurde ein großer interindividueller Unterschied in der Hormonausschüttung zwischen den Tieren gefunden, wohingegen die intraindividuellen Schwankungen der Tiere bei Wiederholungsmessungen relativ gering waren. Dies wurde bei der Versuchsplanung (lateinisches Quadrat mit balancierten Nachbarschaftsbeziehungen) dazu ausgenutzt, um mit einer im Vergleich mit der sonstigen Literatur sehr geringen Anzahl von 16 Tieren die Untersuchung durchzuführen.

Wiederholungsmessungen an den Einzeltieren führen zu einer deutlichen Einschränkung des Versuchsfehlers und tragen damit entscheidend zur Verbesserung der Versuchsergebnisse bei, was schließlich den Aussagewert der gefundenen Ergebnisse entsprechend steigert. Eine optimierte Versuchsplanung kann das wichtige Anliegen der Versuchstierkunde - die Reduzierung des Tierverbrauchs - erfüllen.

7 Summary

Effect of simple manipulations on the concentration of prolactin and corticosterone in laboratory rats

The aim of this investigation was to determine the degree of stress experienced by laboratory rats when subjected to defined manipulations such as: "weighing", "transportation", "fixation using neck restraint", "fixation using a towel", "i. m. injection", "oral administration" and marking by means of "earperforation" or "microchip implantation". Induced stress was evaluated by the production of prolactin and corticosterone in male Wistar rats.

The results show that all the manipulations carried out gave rise to stress responses in the animals. However a differentiated assessment of the various manipulations, i.e. analysis of the blood samples taken by puncture of the retrobulbar plexus vein under CO₂ anaesthetic, did not confirm this. There was no significant difference between the hormone values resulting from individual manipulations whereby all the values were higher than would be the case for a CO₂ anaesthetic alone. This could be shown more clearly by comparing blood taken from animals which had not been subjected to a manipulation with that of blood taken from animals after removal of a microchip implant. The results of this experiment showed that there was a significant increase in the measured corticosterone level post manipulation.

The results of preliminary investigations show a large difference in the concentration of the selected hormones according to the sex of the animal. Female rats had prolactin levels almost four times that of male rats and corticosterone levels which were up to 36% higher. The scattering of the prolactin values was also three to four times greater for female rats than for male animals. In the case of the male rats the corticosterone level varied according to the time of sampling i.e. samples taken at 11.00 am were twice as high as those taken at an hour previously.

The hormone response was at a peak for prolactin ten minutes after the manipulation had been carried out compared with twenty minutes post manipulation for corticosterone.

Although there was a considerable difference in the hormone levels between individual animals, the levels measured for each individual animal varied very little. This factor (Latin square with balanced neighbour relationship) enabled us to plan and carry out the experiments using only sixteen animals, a number which the relevant literature confirms, is very small.

Repeated measurements on individual animals not only limit the experimental error but lead to an improvement in the results and the confidence in the resulting conclusion. An optimally planned experiment can help fulfill the most important goal in animal testing, namely the reduction in the number of animals used for animal experiments.

8 Literaturverzeichnis⁶

- Abel, H.H. und Bartling, H. (1978) Narkose mit Kohlendioxyd für kurz dauernde Eingriffe bei kleinen Versuchstieren. *Z Versuchstierk* **20**, 132-136.
- Anderson, R.S., Edney, A.T.B. (Hrsg.) (1994) Handling bei Nutz- und Heimtieren, Jena, Stuttgart, New York: Gustav Fischer Verlag.
- Armario, A., Castellanos, J.M. and Balasch, J. (1984) Dissociation between corticosterone and growth hormone adaptation to chronic stress in the rat. *Horm Metab Res* **16**, 142-145.
- Armario, A., Garcia-Marquez, C. and Jolín, T. (1987) Crowding-induced changes in basal and stress levels of thyrotropin and somatropin in male rats. *Behav Neural Biol* **48**, 334-343.
- Armario, A., Lopez-Calderon, A., Jolín, T. and Castellanos, J.M. (1986) Sensitivity of anterior pituitary hormones to graded levels of psychological stress. *Life Sci* **39**, 471-475.
- Arndt, J. und Wiedemann, C. (1991) Zusammenfassung von Verträglichkeitsprüfungen mit Transpondern des elektronischen Markierungssystems INDEXEL. *Kleintierpraxis* **36**, 381-389.
- AVTRW (1986) Guidelines for the recognition and assessment of pain in animals. Prepared by a working party of the Association of Veterinary Teachers and Research Workers. *Vet Rec* **118**, 334-338.
- Baldwin, D.M., Colombo, J.A. and Sawyer, C.H. (1974) Plasma prolactin, LH, and corticosterone in rats exposed to a novel environment. *Am J Physiol* **226**, 1366-1369.
- Ball, D.J., Argentieri, G., Krause, R., Lipinski, M., Robinson, R.L., Stoll, R.E. and Visscher, G.E. (1991) Evaluation of a microchip implant system used for animal identification in rats. *Lab Anim Sci* **41**, 185-186.
- Barrett, A.M. and Stockham, M.A. (1963) The effect of housing conditions and simple experimental procedures upon the corticosterone level in the plasma of rats. *J Endocrinol* **26**, 97-105.
- Behlert, O. (1989) Die Markierung von Zoo- und Haustieren mit dem elektronischen Markierungsverfahren EURO I. D. *Kleintierpraxis* **34**, 477-479.

⁶ - Zeitschriftentitelabkürzungen gemäß: List of journals indexed in Index Medicus. Bethesda, Maryland: National Library of Medicine, 1997

- Erstellt mit dem Programm Reference Manager, Version 8, © 1997 Institute for Scientific Information

- Ben-Jonathan, N. (1985) Dopamine: a prolactin-inhibiting hormone. *Endocr Rev* **6**, 564-589.
- Beynen, A.C., Baumans, V., Haas, J.W.M., Hellemond, K.K. van, Stafleu, F.R. and Tintelen, G. van (1995a) Assessment of discomfort induced by orbital puncture in rats. *Lab Anim* **29**, 431-344.
- Beynen, A.C., Gärtner, K. und Zutphen, L.F.M. van (1995b) Standardisierung von Tierversuchen. In: Zutphen, L.F.M. van, Baumans, V. und Beynen, A.C., (Hrsg.) *Grundlagen der Versuchstierkunde*, S. 93-99. Stuttgart, Jena, New York: Gustav Fischer Verlag.
- BGBl. (1988) Verordnung über Aufzeichnungen über Versuchstiere und deren Kennzeichnung vom 20.05.1988. *Bundesgesetzblatt I*, 639.
- Blackshaw, J.K., Fenwick, D.C., Beattie, A.W. and Allan, D.J. (1988) The behaviour of chickens, mice and rats during euthanasia with chloroform, carbon dioxide and ether. *Lab Anim* **22**, 67-75.
- Bonsack, H. (1988) Untersuchungen zur Rolle des Prolaktins für die Milchleistung beim Rind. Leipzig: Karl-Marx-Universität, Fakultät für Agrarwissenschaften, Dissertation.
- Borkowski, G.L., Kraemer, W.J., Potter, M.P. and Gordon, S.E. (1995) Interaction of euthanasia method and acclimation to handling on corticosterone concentrations in adult rats. *Lab Anim Sci* **45**, 464.
- Brand, U. (1998) Untersuchungen zu Streßparametern bei männlichen Wistar-Ratten unter dem Einfluß einfacher Manipulationen. Berlin: Freie Universität, Fachbereich Veterinärmedizin, Dissertation.
- Briski, K.P. and Sylvester, P.W. (1987) Effects of repetitive daily acute stress on pituitary LH and prolactin release during exposure to the same stressor or a second novel stress. *Psychoneuroendocrinology* **12**, 429-437.
- Broom, D.M., Johnson, K.G. (Hrsg.) (1993) Stress and animal welfare, 1 edn. London, New York, Tokyo, Melbourne: Chapman & Hall.
- Burchfield, S.R. (1979) The stress response: a new perspective. *Psychosom Med* **41**, 661-672.
- Bühl, A. und Zöfel, P. (1998) SPSS Version 8: Einführung in die moderne Datenanalyse unter Windows, 5. Aufl. Bonn, New York; Sydney: Addison-Wesley.
- Büttner, D. (1982) Körpergewichts- und Stammeseinflüsse auf die Herzfrequenz der Ratte unter Ruhebedingungen und Handling. *Tierlaboratorium* **8**, 52-64.

- Cannon, W.B. (Hrsg.) (1929) Bodily changes in pain, hunger, fear and rage: an account of recent researches into the function of emotional excitement, New York, London: D. Appleton & Co.
- Clark, J.D., Rager, D.R. and Calpin, J.P. (1997) Animal well-being. IV. Specific assessment criteria. *Lab Anim Sci* **47**, 586-597.
- Clausing, P. (1998) Langanhaltende Verbesserung in Verhalten und Stress-Bewältigung bei Ratten und Mäusen durch Handling in den ersten 3 Lebenswochen - eine Übersicht. In: GV-SOLAS, (Hrsg.) *Versuchstierkunde: Mittler zwischen Forschung und Tierschutz. Tagung der Gesellschaft für Versuchstierkunde. Hamburg, 07.-10.09.1998*, S. 109-122.
- Cook, D.M., Kendall, J.W., Greer, M.A. and Kramer, R.M. (1973) The effect of acute or chronic ether stress on plasma ACTH concentration in the rat. *Endocrinology* **93**, 1019-1024.
- Cranach, J. von und Gassmann-Langmoen, A.B. (1990) Euthanasie bei Labornagetieren. Untersuchungen über die Tierschutzgerechtheit verschiedener Methoden. Universität Bern: Fachbereich Veterinärmedizin, Dissertation.
- Critchlow, V., Liebelt, A., Bar-Sela, M., Mountcastle, W. and Lipscomb, H.S. (1963) Sex difference in resting pituitary-adrenal function in the rat. *Am J Physiol* **205**, 807-815.
- Dallman, M.F. and Jones, M.T. (1973) Corticosteroid feedback control of ACTH secretion: effect of stress-induced corticosterone secretion on subsequent stress responses in the rat. *Endocrinology* **92**, 1367-1375.
- De Boer, S.F., Koopmans, S.J., Slangen, J.L. and Gugten, J. van der (1990) Plasma catecholamine, corticosterone and glucose response to repeated stress in rats: effect of interstressor interval length. *Physiol Behav* **47**, 1117-1124.
- De Souza, E.B. and Loon, G.R. van (1982) Stress-induced inhibition of the plasma corticosterone response to a subsequent stress in rats: a noradrenocorticotropin-mediated mechanism. *Endocrinology* **110**, 23-33.
- Dietzel, L., Kretschmer, F.J. und Günther, J. (1978) Computerunterstützte Randomisation von Tierkollektiven. *Z Versuchstierk* **20**, 286-292.
- Dobrákovová, M. and Jurčovicová, J. (1984) Corticosterone and prolactin responses to repeated handling and transfer of male rats. *Exp Clin Endocrinol* **83**, 21-27.

- Dobrákovová, M., Kvetnanský, R., Oprsalová, Z. and Jezová, D. (1993) Specificity of the effect of repeated handling on sympathetic-adrenomedullary and pituitary-adrenocortical activity in rat. *Psychoneuroendocrinology* **18**, 163-174.
- Donnerer, J. and Lembeck, F. (1990) Different control of the adrenocorticotropin-corticosterone response and of prolactin secretion during cold stress, anesthesia, surgery, and nicotine injection in the rat: involvement of capsaicin-sensitive sensory neurons. *Endocrinology* **126**, 921-926.
- Dorn, H.J. (1987) Vorstellung des EURO I. D. Systems zur Kennzeichnung von Tieren mit Mikrochips in Transpondern. *Tierärztl Umschau* **42**, 978-981.
- Döcke, F. (Hrsg.) (1994) Veterinärmedizinische Endokrinologie, 3. Aufl. Jena, Stuttgart, New York: Gustav Fischer Verlag.
- Döhler, K.D., Gärtner, K., Mühlen, A. von zur and Döhler, U. (1977a) Activation of anterior pituitary, thyroid and adrenal gland in rats after disturbance stress. *Acta Endocrinol* **86**, 486-497.
- Döhler, K.D., Mühlen, A. von zur, Gärtner, K. and Döhler, U. (1977b) Effect of various blood sampling techniques on serum levels of pituitary and thyroid hormones in the rat. *J Endocrinol* **74**, 341-342.
- Drozdowicz, C.K., Bowman, T.A., Webb, M.L. and Lang, C.M. (1990) Effect of in-house transport on murine plasma corticosterone concentration and blood lymphocyte populations. *Am J Vet Res* **51**, 1841-1846.
- Du Ruisseau, P., Taché, Y., Brazeau, P. and Collu, R. (1978) Pattern of adenohipophyseal hormone changes induced by various stressors in female and male rats. *Neuroendocrinology* **27**, 257-271.
- Dunn, J., Dyer, R. and Bennett, M. (1972) Diurnal variation in plasma corticosterone following long-term exposure to continuous illumination. *Endocrinology* **90**, 1660-1663.
- Dunn, J.D., Arimura, A. and Scheving, L.E. (1972a) Effect of stress on circadian periodicity in serum LH and prolactin concentration. *Endocrinology* **90**, 29-33.
- Dunn, J.D., Scheving, L.E. and Millet, P. (1972b) Circadian variation in stress-evoked increases in plasma corticosterone. *Am J Physiol* **223**, 402-406.
- Durier, C., Monod, H. and Bruetschy, A. (1997) Design and analysis of factorial sensory experiments with carry-over effects. *Food Quality and Preference* **8**, 141-149.

- DVG (1996) Methoden und Zwecke der Kennzeichnung. Tagung der Fachgruppe Tierschutzrecht und gerichtliche Veterinärmedizin. Thema: Tötung von Tieren und Kennzeichnung von Tieren. *Deutsche Veterinärmedizinische Gesellschaft* 81-99.
- Eisenstein, A.B. (Hrsg.) (1967) *The adrenal cortex*, 1 edn. Boston: Little, Brown and Company.
- Engeland, W.C., Shinsako, J., Winget, C.M., Vernikos-Danellis, J. and Dallman, M.F. (1977) Circadian patterns of stress-induced ACTH secretion are modified by corticosterone responses. *Endocrinology* **100**, 138-147.
- Erhardt, W., Henke, J. und Brill, T. (1998) Schmerzwirkung und postoperative Schmerztherapie. In: GV-SOLAS, (Hrsg.) *Versuchstierkunde: Mittler zwischen Forschung und Tierschutz. Tagung der Gesellschaft für Versuchstierkunde. Hamburg, 07.-10.09.1998*, S. 49-62.
- Euker, J.S., Meites, J. and Riegler, G.D. (1975) Effects of acute stress on serum LH and prolactin in intact, castrate and dexamethasone-treated male rats. *Endocrinology* **96**, 85-92.
- Fenske, M. and Wuttke, W. (1977) Development of stress-induced pituitary prolactin and TSH release in male rat. *Acta Endocrinol* **85**, 729-735.
- Flaherty, C.F., Rowan, G.A. and Pohorecky, L.A. (1986) Corticosterone, novelty-induced hyperglycemia, and chlordiazepoxide. *Physiol Behav* **37**, 393-396.
- Fokkema, D.S., Smit, K., Gugten, J. van der and Koolhaas, J.M. (1988) A coherent pattern among social behavior, blood pressure, corticosterone and catecholamine measures in individual male rats. *Physiol Behav* **42**, 485-489.
- Fowler, J.S.L., Brown, J.S. and Flower, E.W. (1980) Comparison between ether and carbon dioxide anaesthesia for removal of small blood samples from rats. *Lab Anim* **14**, 275-278.
- Fraser, D., Richie, J.S.D. and Fraser, A.F. (1975) The term stress in a veterinary context. *Br Vet J* **131**, 653-662.
- Gaalen, I.M. van, Kruyt, B.C. und Nieuwerkerk, H.T.M. (1975) Zootechnik - Nagetiere, Raubtiere. In: Gulden, W.J.I. van der, Hooijdonk, C.L. van, De Jong, P. und Kremer, A.K., (Hrsg.) *Versuchstiere und Versuchstiertechnik. Bd. I*, S. 128-132. Basel: Gesellschaft für Versuchstierkunde Nr. 4.

- Gärtner, K. (1971a) Der Anteil sozialer Ursachen an der Varianz physiologischer und morphologischer Größen, demonstriert am Beispiel des Serumcorticosterongehaltes und der Gewichte von Nebennieren, Testes und Samenblasen bei Ratten. *Berl Münch Tierärztl Wochenschr* **23**, 451-455.
- Gärtner, K. und Bonath, K. (1971b) Der Einfluß der Gruppengröße auf den Kortikosterongehalt der Nebennieren und des Serums männlicher Mäuse und Ratten. *Endokrinologie* **58**, 129-139.
- Gärtner, K., Büttner, D., Döhler, K., Friedel, R., Lindena, J. and Trautschold, I. (1980) Stress response of rats to handling and experimental procedures. *Lab Anim* **14**, 267-274.
- Gärtner, K. und Messow, C. (1976) Tierschutzgerechtes Töten von Versuchstieren. In: Hauser, K.W., (Hrsg.) *Tierschutzgerechtes Töten von Wirbeltieren*, S. 85-88. Hannover: Schlütersche Verlagsanstalt und Druckerei.
- Gärtner, K. und Militzer, K. (1993) *Zur Bewertung von Schmerzen, Leiden und Schäden bei Versuchstieren*, Berlin, Hamburg: Verlag Paul Parey.
- Gilad, G.M. and Jimerson, D.C. (1981) Modes of adaptation of peripheral neuroendocrine mechanisms of the sympatho-adrenal system to short-term stress as studied in two inbred rat strains. *Brain Res* **206**, 83-93.
- Gomez-Sanchez, C., Murry, B.A. and Kem, D.C. (1975) A direct radioimmunoassay of corticosterone in rat serum. *Endocrinology* **96**, 796-798.
- Grimée, R. and Wülfert, E. (1995) Acute stress in rats produces a rapid and sustained increase in prostacycline production in aortic tissue: dependence on corticosterone. *Life Sci* **57**, 69-81.
- GV-SOLAS (1995) Schmerz und Distress bei Labornagern und Kaninchen. Gesellschaft für Versuchstierkunde - Society of Laboratory Animal Science.
- Haas, H. und Fischer, H.L. (1969) Die Beeinflussung des Corticosteron-Gehaltes im Rattenplasma bei Entzündungsreaktionen. *Naunyn-Schmiedebergs Arch Pharmacol* **264**, 86-98.
- Hackbarth, H., Küppers, N. und Bohnet, W. (1998) CO₂ zur Anästhesie und Euthanasie von Versuchstieren. In: GV-SOLAS, (Hrsg.) *Versuchstierkunde: Mittler zwischen Forschung und Tierschutz. Tagung der Gesellschaft für Versuchstierkunde. Hamburg, 07.-10.09.1998*, S. 204-218.

- Haemisch, A. (1998) Hormone als Befindlichkeitsindikatoren in der Versuchstierhaltung. In: GV-SOLAS, (Hrsg.) *Versuchstierkunde: Mittler zwischen Forschung und Tierschutz. Tagung der Gesellschaft für Versuchstierkunde. Hamburg, 07.-10.09.1998*, S. 28-41.
- Haemisch, A., Guerra, G. and Furkert, J. (1999) Adaptation of corticosterone - but not β -endorphin - secretion to repeated blood sampling in rats. *Lab Anim* **33**, 185-191.
- Hartmann, S., Kummerfeld, N. und Richter, T. (1997) Gründe, Anforderungen und Methoden der Kennzeichnung warmblütiger Tiere. *Der praktische Tierarzt* **78**, 1119-1126.
- Hennessy, M.B., Heybach, J.P., Vernikos, J. and Levine, S. (1979) Plasma corticosterone concentrations sensitively reflect levels of stimulus intensity in the rat. *Physiol Behav* **22**, 821-825.
- Henry, J.P. and Stephens, P.M. (1977) *Stress, health and the social environment. A sociobiologic approach to medicine. Topics in environmental physiology and medicine*, New York: Springer Verlag.
- Herck, H. van, Baumans, V., Craats, N.R. van der., Hesp, A.P.M., Meijer, G.W., Tintelen, G. van, Walvoort, H.C. and Beynen, A.C. (1992) Histological changes in the orbital region of rats after orbital puncture. *Lab Anim* **26**, 53-58.
- Herck, H. van, Baumans, V. and De Boer, S.F. (1994) Assessment of discomfort in laboratory animals. In: Cohen, I.R. and Miller, A., (Eds.) *Autoimmune disease models. A guidebook*, pp. 303-320. New York: Academic Press.
- Herck, H. van, Baumans, V., De Boer, S.F., Gugten, J. van der., Woerkom, A.B. van and Beynen, A.C. (1991) Endocrine stress response in rats subjected to singular orbital puncture while under diethyl-ether anaesthesia. *Lab Anim* **25**, 325-329.
- Herck, H. van, De Boer, S.F., Hesp, A.P.M., Lith, H.A. van, Baumans, V. and Beynen, A.C. (1997) Orbital bleeding in rats while under diethylether anaesthesia does not influence telemetrically determined heart rate, body temperature, locomotor and eating activity when compared with anaesthesia alone. *Lab Anim* **31**, 271-278.
- Herzberg, A.M. and Cox, D.R. (1969) Recent work on the design of experiments: a bibliography and a review. *J Roy Statist Soc* **132A**, 29-67.
- Hesselholt, M., Ockens, N., Christensen, E., Elling, F. and Mickelsen, M. (1992) Identification of dogs with microchips. *Dansk Veterinærtidsskrift* **75**, 597-601.

- Hewett, T.A., Kovacs, M.S., Artwohl, J.E. and Bennett, B.T. (1993) A comparison of euthanasia methods in rats, using carbon dioxide in prefilled and fixed flow rate filled chambers. *Lab Anim Sci* **43**, 579-582.
- Hill, P.A., Coghlan, J.P., Buktus, A. and Ryan, G.B. (1983) Structural and funktional studies of the adrenal zona glomerulosa in sodium-depleted and sodium-loaded sheep. *Cell Tissue Res* **229**, 515-531.
- Hodges, J.R. and Mitchley, S. (1970) The effect of training on the release of corticotrophin in response to minor stressful procedures in the rat. *J Endocrinol* **47**, 253-254.
- Höllt, V., Przewlocki, R., Haarmann, I., Almeida, O.F.X., Kley, N., Millan, M.J. and Herz, A. (1986) Stress-induced alterations in the levels of messenger RNA coding for proopiomelanocortin and prolactin in rat pituitary. *Neuroendocrinology* **43**, 277-282.
- Joint Working Group on Refinement (1993) Removal of blood from laboratory mammals and birds. First report of the BVA/FRAME/RSPCA/UFAW joint working group on refinement. *Lab Anim* **27**, 1-22.
- Jones, M.T. and Gillham, B. (1988) Factors involved in the regulation of adrenocorticotrophic hormone / β -lipotrophic hormone. *Physiol Rev* **68**, 744-800.
- Juhr, N.C. (1996) Zur Subjektivität der Beurteilung des Schweregrades von Behandlungen und Eingriffen bei Versuchstieren. *Tierlaboratorium* **19**, 138-144.
- Kant, G.J., Bunnell, B.N., Mougey, E.H., Pennington, L.L. and Meyerhoff, J.L. (1983a) Effects of repeated stress on pituitary cyclic AMP, and plasma prolactin, corticosterone and growth hormone in male rats. *Pharmacol Biochem Behav* **18**, 967-971.
- Kant, G.J., Eggleston, T., Landman-Roberts, L., Kenion, C.C., Driver, G.C. and Meyerhoff, J.L. (1985) Habituation to repeated stress is stressor specific. *Pharmacol Biochem Behav* **22**, 631-634.
- Kant, G.J., Lenox, R.H., Bunnell, B.N., Mougey, E.H., Pennington, L.L. and Meyerhoff, J.L. (1983b) Comparison of stress response in male and female rats: pituitary cyclic AMP and plasma prolactin, growth hormone and corticosterone. *Psychoneuroendocrinology* **8**, 421-428.
- Kant, G.J., Leu, J.R., Anderson, S.M. and Mougey, E.H. (1987) Effects of chronic stress on plasma corticosterone, ACTH and prolactin. *Physiol Behav* **40**, 775-779.

- Kant, G.J., Mougey, E.H. and Meyerhoff, J.L. (1986) Diurnal variation in neuroendocrine response to stress in rats: plasma ACTH, β -endorphin, β -LPH, corticosterone, prolactin and pituitary cyclic AMP responses. *Neuroendocrinology* **43**, 383-390.
- Kant, G.J., Mougey, E.H., Pennington, L.L. and Meyerhoff, J.L. (1983c) Graded footshock stress elevates pituitary cyclic AMP and plasma β -endorphin, β -LH, corticosterone and prolactin. *Life Sci* **33**, 2657-2663.
- Kawakami, M., Higuchi, T. and Matsuura, M. (1979) Immobilization stress and prolactin secretion in male rats. *Neuroendocrinology* **29**, 262-269.
- Keim, K.L. and Sigg, E.B. (1976) Physiological and biochemical concomitants of restraint stress in rats. *Pharmacol Biochem Behav* **4**, 289-297.
- Kitchell, R.L. and Johnson, R.D. (1985) Assessment of pain in animals. In: Moberg, G.P., (Ed.) *Animal Stress*, pp. 113-140. Bethesda, Maryland: American Physiological Society.
- Klasing, J.C. (1985) Influence of stress on protein metabolism. In: Moberg, G.P., (Ed.) *Animal Stress*, pp. 269-280. Bethesda, Maryland: American Physiological Society.
- Kohler, I., Meier, R., Busato, A., Neiger-Aeschbacher, G. and Schatzmann, U. (1999) Is carbon dioxide (CO₂) a useful short acting anaesthetic for small laboratory animals? *Lab Anim* **33**, 155-161.
- Konarska, M., Stewart, R.E. and McCarty, R. (1989) Sensitization of sympathetic-adrenal medullary responses to a novel stressor in chronically stressed laboratory rats. *Physiol Behav* **46**, 129-135.
- Koolhaas, J.M., Baumans, V., Blom, H.J.M., Holst, D. von, Timmermans, P.J.A. und Wiepkema, R.P. (1995) Verhalten, Streß und Wohlbefinden. In: Zutphen, L.F.M.van, Baumans, V. und Beynen, A.C., (Hrsg.) *Grundlagen der Versuchstierkunde*, 1. Aufl. S. 71-92. Stuttgart, Jena, New York: Gustav Fischer Verlag.
- Krieg jr., R.J., Lamberts, S.W.J. and MacLeod, R.M. (1984) Paradoxical suppression of prolactin secretion: involvement of catecholaminergic mechanisms and the adrenal gland. *Acta Endocrinol* **105**, 463-467.
- Krulich, L., Hefco, E., Illner, P. and Read, C.B. (1974) The effects of acute stress on the secretion of LH, FSH, prolactin and GH in the normal male rat, with comments on their statistical evaluation. *Neuroendocrinology* **16**, 293-311.
- Kummerfeld, N. (1996) Methoden zur Kennzeichnung von Vögeln - Ziele und Tierschutzaspekte. *Der praktische Tierarzt* **77**, 792-800.

- Küppers, N. (1997) Beurteilung der CO₂-Betäubung von Laborratten auf Tierschutzgerechtigkeit. Berlin: Freie Universität, Fachbereich Veterinärmedizin, Dissertation.
- Kvetnanský, R., Weise, V.K. and Kopin, I.J. (1970) Elevation of adrenal tyrosine hydroxylase and phenylethanolamine-N-methyl transferase by repeated immobilization of rats. *Endocrinology* **87**, 744-749.
- Ladewig, J. (1994) Streß. In: Döcke, F., (Hrsg.) *Veterinärmedizinische Endokrinologie*, 3. Aufl. S. 379-396. Jena, Stuttgart, New York: Gustav Fischer Verlag.
- Lammers, G.H., Langeveld, N.G., Lambooi, E. and Gruys, E. (1995) Effect of injecting electronic transponders into the auricle of pigs. *Vet Rec* **136**, 606-609.
- Landi, M.S., Bowman, T. and Campbell, S. (1988) Effects of handling and transportation stress on rodents. In: Beynen, A.C. and Solleveld, H.A., (Eds.) *New developments in biosciences: their implications for laboratory animal science*, pp. 44-457. Dordrecht: Martinus Nijhoff Publishers.
- Lasa Working Party (1990) The assessment and control of the severity of scientific procedures on laboratory animals. *24*, pp.97-130.
- Lawrence, A.B. (1994) Biologische Grundlagen des Umgangs mit Tieren. In: Anderson, R.S. und Edney, A.T.B., (Hrsg.) *Handling bei Nutz- und Heimtieren*, S. 15-29. Jena, Stuttgart, New York: Gustav Fischer Verlag.
- Lenox, R.H., Kant, G.J., Sessions, G.R., Pennington, L.L., Mougey, E.H. and Meyerhoff, J.L. (1980) Specific hormonal and neurochemical responses to different stressors. *Neuroendocrinology* **30**, 300-308.
- Leung, F.C., Chen, H.T., Verkaik, S.J., Steger, R.W., Peluso, J.J., Campbell, G.A. and Meites, J. (1980) Mechanism(s) by which adrenalectomy and corticosterone influence prolactin release in the rat. *J Endocrinol* **87**, 131-140.
- Levine, S. (1985) A definition of stress? In: Moberg, G.P., (Ed.) *Animal Stress*, pp. 51-69. Bethesda Maryland: American Physiological Society.
- Livezey, G.T., Miller, J.M. and Vogel, W.H. (1985) Plasma norepinephrine, epinephrine and corticosterone stress responses to restraint in individual male and female rats, and their correlations. *Neurosci Lett* **62**, 51-56.
- Manser, C.E. (Hrsg.) (1992) The assessment of stress in laboratory animals, Horsham, West Sussex, UK: Causeway, RSPCA.

- Martí, O., Gavaldà, A., Jolín, T. and Armario, A. (1993) Effect of regularity of exposure to chronic immobilization stress on the circadian pattern of pituitary adrenal hormones, growth hormone, and thyroid stimulating hormone in the adult male rat. *Psychoneuroendocrinology* **18**, 67-77.
- Mason, J.W. (1974) Specificity in the organisation of neuroendocrine response profiles. In: Seeman, P. and Brown, G., (Eds.) *Frontiers in neurology and neuroscience research*, pp. 68-80. Toronto: University of Toronto.
- Meaney, M.J., Aitken, D.H., Viau, V., Sharma, S. and Sarrieau, A. (1989) Neonatal handling alters adrenocortical negative feedback sensitivity and hippocampal type II glucocorticoid receptor binding in the rat. *Neuroendocrinology* **50**, 597-604.
- Meier, R.I. (1994) Untersuchungen zur CO₂-Anästhesie bei Labortieren. Universität Bern: Fachbereich Veterinärmedizin, Dissertation.
- Milenkovic, L., Bogic, L., Musicki, B. and Martinovic, J.V. (1984) Effects of aging on prolactin release after stress in female and male rats. *Acta Endocrinol* **107**, 337-339.
- Moberg, G.P. (Hrsg.) (1985) Biological response to stress: key to assessment of animal well-being? In: Moberg, G.P., (Ed.) *Animal stress*, pp. 27-49. Bethesda Maryland: American Physiological Society.
- Moberg, G.P. (1987) Problems in defining stress and distress in animals. *J Am Vet Med Assoc* **191**, 1207-1211.
- Moberg, G.P. (1999) When does stress become distress? *Lab Anim* **28**, 22-26.
- Morton, D.B. and Griffiths, P.H.M. (1985) Guidelines on the recognition of pain, distress and discomfort in experimental animals and an hypothesis for assessment. *Vet Rec* **116**, 431-436.
- Mrozek, M., Fischer, R., Trendelenburg, M. and Zillmann, U. (1995) Microchip implant system used for animal identification in laboratory rabbits, guineapigs, woodchucks and in amphibians. *Lab Anim* **29**, 339-344.
- Muir, J.L. and Pfister, H.P. (1986) Corticosterone and prolactin responses to predictable and unpredictable novelty stress in rats. *Physiol Behav* **37**, 285-288.
- Murison, R. (1985) Stress in laboratory animal studies: preconceptions misconceptions. *Scand J Lab Anim Sci* **12**, 37-39.
- Natelson, B.H., Creighton, D., McCarty, R., Tapp, W.N., Pitman, D. and Ottenweller, J.E. (1987) Adrenal hormonal indices of stress in laboratory rats. *Physiol Behav* **39**, 117-125.

- Natelson, B.H., Ottenweller, J.E., Cook, J.A., Pitman, D., McCarty, R. and Tapp, W.N. (1988) Effect of stressor intensity on habituation of the adrenocortical stress response. *Physiol Behav* **43**, 41-46.
- Natelson, B.H., Tapp, W.N., Adamus, J.E., Mittler, J. and Levin, E. (1981) Humoral indices of stress in rats. *Physiol Behav* **26**, 1049-1054.
- Neill, J.D. (1972) Comparison of plasma prolactin levels in cannulated and decapitated rats. *Endocrinology* **90**, 568-572.
- Nicklas, W. (1994) Blutentnahme bei Versuchstieren. *Der Tierschutz-beauftragte* **2**, 64-67.
- O'Brien, D., Opi, P.T., Stodulski, G., Saibaba, P. and Hau, J. (1993) Comparison of stress induced in rats by four different anaesthetic regimens as recorded by urinary concentrations of corticosterone and testosterone. *Scand J Lab Anim Sci* **20**, 113-116.
- Odio, M. and Brodish, A. (1989) Age-related adaptation of pituitary-adrenocortical response to stress. *Neuroendocrinology* **49**, 382-388.
- Odio, M.R. and Maickel, R.P. (1985) Comparative biochemical responses of rats to different stressfull stimuli. *Physiol Behav* **34**, 595-599.
- Paris, J.M., Lorens, S.A., Kar, L.D. van de, Urban, J.H., Richardson-Morton, K.D. and Bethea, C.L. (1987) A comparison of acute stress paradigms: hormonal responses and hypothalamic serotonin. *Physiol Behav* **39**, 33-43.
- Perhach jr., J.L. and Barry III, H. (1970) Stress responses of rats to acute body or neck restraint. *Physiol Behav* **5**, 443-448.
- Pitman, D.L., Ottenweller, J.E. and Natelson, B.H. (1988) Plasma corticosterone levels during repeated presentation of two intensities of restraint stress: chronic stress and habituation. *Physiol Behav* **43**, 47-55.
- Pschyrembel, W. (Hrsg.) (1982) *Klinisches Wörterbuch*, 254. Aufl. Berlin, New York: Walter de Gruyter.
- Quirce, C.M., Odio, M. and Solano, J.M. (1981) The effects of predictable and unpredictable schedules of physical restraint upon rats. *Life Sci* **28**, 1897-1902.
- Rao, G.N. and Edmondson, J. (1990) Tissue reaction to an implantable identification device in mice. *Toxicologic Pathology* **18**, 412-416.
- Rerup, C. (1961) Corticotrophin release in intact rats following subcutaneous and intraperitoneal injection. *Acta Endocrinol* **36**, 409-416.

- Rerup, C. and Hedner, P. (1962) The effect of pentobarbital (Nembutal, Mebumal NFN) on corticotrophin release in the rat. *Acta Endocrinol* **39**, 518-526.
- Riegle, G.D. (1973) Chronic stress effects on adrenocortical responsiveness in young and aged rats. *Neuroendocrinology* **11**, 1-10.
- Riegle, G.D. and Meites, J. (1976) The effect of stress on serum prolactin in the female rat. *Proc Soc Exp Biol Med* **152**, 441-448.
- Ruiven, R. van, Meijer, G.W., Zutphen, L.F.M. van and Ritskes-Hoitinga, J. (1996) Adaptation period of laboratory animals after transport: a review. *Scand J Lab Anim Sci* **23**, 185-190.
- Rusche, B. (1987) Loch im Ohr. *Du und das Tier* **3**, 25.
- Sakellaris, P.C. and Vernikos-Danellis, J. (1975) Increased rate of response of the pituitary-adrenal system in rats adapted to chronic stress. *Endocrinology* **97**, 597-602.
- Sapolsky, R.M., Krey, L.C. and McEwen, B.S. (1986) The neuroendocrinology of stress and aging: the glucocorticoid cascade hypothesis. *Endocr Rev* **7**, 284-304.
- Sarlis, N.J. (1991) Chronic blood sampling techniques in stress experiments in the rat - a mini review. *Animal Technology* **42**, 51-59.
- Scharmann, W. (1988) Angst und Angstverminderung im Tierversuch. *Tierärztl Umschau* **46**, 383-384.
- Schulster, D., Burstein, S., Cooke, B.A. (Hrsg.) (1976) Molecular endocrinology of the steroid hormones, London, New York, Sydney, Toronto: John Wiley & Sons.
- Seggie, J.A. and Brown, G.M. (1975) Stress response patterns of plasma corticosterone, prolactin, and growth hormone in the rat, following handling or exposure to novel environment. *Can J Physiol Pharmacol* **53**, 629-637.
- Selye, H. (1981) Geschichte und Grundzüge des Streßkonzepts. In: Nitsch, J.R., (Hrsg.) *Stress. Theorien, Untersuchungen, Maßnahmen*, S. 163-187. Bern: Verlag Hans Huber.
- Shin, S.H. (1979) Prolactin secretion in acute stress is controlled by prolactin releasing factor. *Life Sci* **25**, 1829-1836.
- Smith, A.W. (1986) Panel on euthanasia. *J Am Vet Med Assoc* **188**, 253-268.
- Steinberg, H. and Watson, R.H.J. (1960) Failure of growth in disturbed laboratory rats. *Nature* **185**, 615-616.

- Stricker, P. et Grueter, F. (1928) Action du lobe antérieur de l'hypophyse sur la montée lactéuse. *C R Seances Soc Biol Fil* **99**, 1978-1980.
- Taché, Y., Du Ruisseau, P., Ducharme, J.R. and Collu, R. (1978) Pattern of adenohipophyseal hormone changes in male rats following chronic stress. *Neuroendocrinology* **26**, 208-219.
- Taché, Y., Du Ruisseau, P., Taché, J., Selye, H. and Collu, R. (1976) Shift in adenohipophyseal activity during chronic intermittent immobilization of rats. *Neuroendocrinology* **22**, 325-336.
- Thun, R. (1987) *Untersuchungen über die Tagesrhythmik von Cortisol beim Rind*, Stuttgart: Ferdinand Enke Verlag.
- Torrellas, A., Guaza, C., Borrell, J. and Borrell, S. (1981) Adrenal hormones and brain catecholamines responses to morning and afternoon immobilization stress in rats. *Physiol Behav* **26**, 129-133.
- Toth, L.A. and January, B. (1990) Physiological stabilisation of rabbits after shipping. *Lab Anim Sci* **40**, 384-387.
- Tuli, J.S., Smith, J.A. and Morton, D.B. (1995) Stress measurements in mice after transportation. *Lab Anim* **29**, 132-138.
- UFAW (1988) Disturbance index: Method for assessing severity of procedures on rodents. Animal Welfare Research Report No.2. Potters Bar: Universities Federation for Animal Welfare.
- UFAW (1989) Guidelines for the recognition and assessment of pain in animals. Potters Bar: Universities Federation for Animal Welfare.
- Urbanski, H.F. and Kelley, S.T. (1991) Sedation by exposure to a gaseous carbon dioxide-oxygen mixture: Application to studies involving small laboratory animal species. *Lab Anim Sci* **41**, 80-82.
- Veith-Flanigan, J. and Sandman, C.A. (1985) Neuroendocrine relationships with stress. In: Burchfield, S.R., (Ed.) *Stress. Psychological and physiological interactions*, pp. 129-161. Washington, D.C.: Hemisphere.
- Vogel, W.H. and Jensh, R. (1988) Chronic stress and plasma catecholamine and corticosterone levels in male rats. *Neurosci Lett* **87**, 183-188.
- Weiß, J., Mae, J., Nebendahl, K., Rossbach, W. (Hrsg.) (1996) *Haus- und Versuchstierpflege*, Stuttgart, Jena, New York: Gustav Fischer Verlag.
- Woodbury, D.M., Rollins, L.T. and Gardener, M.D. (1958) Effects of CO₂ on brain excitability and electrolytes. *Am J Physiol* **192**, 79-90.

- Wormuth, H.J. (1998) Marken, Mängel, Möglichkeiten - Tierschutz bei der Kennzeichnung von Tieren. *Berl Münch Tierärztl Wochenschr* **104**, 293-298.
- Yelvington, D.B., Weiss, G.K. and Ratner, A. (1984) Effect of corticosterone on the prolactin response to psychological and physical stress in rats. *Life Sci* **35**, 1705-1711.
- Yelvington, D.B., Weiss, G.K. and Ratner, A. (1985) Habituation of the prolactin response in rats to psychological stress. *Psychoneuroendocrinology* **10**, 95-102.
- Zutphen, L.F.M. van., Baumans, V., Beynen, A.C. (Hrsg.) (1995) Grundlagen der Versuchstierkunde, Stuttgart, Jena, New York: Gustav Fischer Verlag.

9 Abkürzungsverzeichnis

ACTH	Adrenocorticotropes Hormon (Kortikotropin)
Arithm.	Arithmetisches (Mittel)
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
CO ₂	Kohlendioxid
Corp.	Corporation (Firma)
CRH	Corticotropin-Releasing-Hormon (Kortikoliberin)
dest.	destillata (destilliert)
df	Freiheitsgrade
Entn.	Entnahme
et al.	et altera (und andere)
etc.	et cetera (und so weiter)
Fa.	Firma
FSH	Folikel stimulierendes Hormon (Follitropin)
GABA	γ-Aminobuttersäure
GAP	Gonadotropin-Releasing Hormon-Associated Peptide
GH	Growth Hormone (Somatotropin)
HHA	Hypothalamus-Hypophyse-Adrenal
i. m.	intramuskulär
i. v.	intravenös
Inc.	Incorporation (Vereinigung)
jr.	junior
kg	Kilogramm
KGW	Körpergewicht
l	Liter
LH	Luteinisierendes Hormon (Lutropin)
männl.	männliche
mm	Millimeter
min	Minute
MJ	Mega Joule
ml	Milliliter
N	Anzahl der Versuchstiere
NaCl	Natriumchlorid
N-frei	keinen Stickstoff enthaltend
ng	Nanogramm
NNM	Nebennierenmark
NNR	Nebennierenrinde
O ₂	Sauerstoff
p	Irrtumswahrscheinlichkeit
per os	peroral (durch den Mund)
per se	(lat.; "durch sich"): an sich, von selbst
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionen-Konzentration
PIF	Prolaktin-Inhibiting-Faktor

RNA	ribonucleic acid (Ribonukleinsäure)
Sig.	Signifikanz
s. o.	siehe oben
SPF	spezifiziert pathogenfrei
SPSS	Statistical Package for the Social Sciences
Std.	Standard
T ₃	Trijodthyronin
T ₄	Tetrajodthyronin (Thyroxin)
t _{ber.}	berechnete Prüfgröße t
TSH	Thyreoidea stimulierendes Hormon (Thyreotropin)
t-Test	statistisches Analyseverfahren (Signifikanztest)
usw.	und so weiter
u. U.	unter Umständen
vergl.	vergleiche
weibl.	weibliche
z. B.	zum Beispiel
ZNS	Zentrales Nervensystem

10 Anhang

Für die vorliegende Arbeit wurden die folgenden Materialien verwendet:

- **Baumwollhandtücher:** grau, kariert, Größe 50 × 70 cm, Firma John Glet, Berlin, Deutschland, (Best.-Nr. 2345)
- **Cryobox:** Einfrierkassette aus Polycarbonat, Größe 81, 9 x 9 Öffnungen, Abmessung außen 133 x 133 x 51 mm hoch, Firma NeoLab, Heidelberg, Deutschland
- **Druckminderer:** Pluto, Firma Dräger, Berlin, Deutschland
- **Edelstahlröhrchen:** Durchmesser innen 5,35 mm, (Eigenanfertigung)
- **Filzstift:** Permanent Marker 3000, geruchsneutral, ungiftig, wasserfest, Firma Edding, Ahrensburg, Deutschland
- **Futter:** Haltungsdiät 1324, Pelletdurchmesser 10 mm, Gesamtprotein 19%, Fett 4%, N-freie Extraktstoffe 50,5%, umsetzbare Energie 11,9 MJ/kg, Firma Altromin, Lage, Deutschland
- **Gammacounter:** Gammamaster Typ 1277, Automatic Gamma Counter; Hersteller: Firma LKB Wallac, Deutschland
- **Hämatokritröhrchen:** Mikro-Haematokrit-Kapillaren, ungraduiert, 75 µl Inhalt, 75 mm Länge, Na-heparin, O.D. (original Durchmesser) 1,5 - 1,6 mm, Firma Heiland, Hamburg, Deutschland, (Code-No. 910 02 75, Best.-Nr. 380-400)
- **Handschuhe:** LHS (Lederhandschuhe) aus grauem Nappaleder, 240 mm, Größe 10, Firma John Glet, Berlin, Deutschland, (Best.-Nr. 64335)
- **Kanülen:** Sterican[®], 0,90 × 40 mm, steril, pyrogenfrei, Luer-Lock, Facettenschliff, entsprechend DIN: 13095 / ISI 6009, Farbcode gelb,: Firma Braun, Melsungen, Deutschland
- **Knopfkanüle:** Durchmesser 1,2 mm × Länge 4 cm, aus gebogenem rostfreiem Stahl, Firma Heiland, Hamburg, Deutschland, (Best.-Nr. 370-139)
- **Kohlensäureflasche:** 10 Kg, 60 bar, Firma Air Liquide GmbH, Düsseldorf, Deutschland

- **Mikroplattenschüttler:** Microshaker, AM 69, Hersteller: Denley-Tech LTD, England, Vertrieb: Firma Dynatech AG, Zug, Schweiz
- **Ohrlochstanze:** Lochdurchmesser 2 mm, rostfreies Metall, Firma Lösenbeck, Iserlohn, Deutschland
- **Photometer:** Microelisa[®] Minireader, Firma Dynatech GmbH, Denkendorf, Deutschland
- **Physiologische Kochsalzlösung:** Isotone Natriumchloridlösung, 0,9%ige Lösung zur i. v. Injektion, steril und pyrogenfrei, Firma Braun, Melsungen, Deutschland
- **Pipette:** Eppendorf Multipette 4780, Spitzen mit verschiedenen Volumina, Firma Eppendorf, Hamburg, Deutschland
- **Pipette:** Eppendorf Varipette 4810, 50 - 250 µl, blau Spitze (1000 µl), Firma Eppendorf, Hamburg, Deutschland
- **Reaktionsgefäße:** Polypropylen, 39 x 13 mm, 10,8 mm Ø, Firma Heiland, Hamburg, Deutschland
- **Schlauch:** Gummi Schlauch, Rotilabo[®], Durchmesser innen 8 mm, Wand 2 mm, Durchmesser außen 12 mm, Firma Roth, Karlsruhe, Deutschland, (Best.-Nr. 0676.1)
- **Schlauch:** PVC Schlauch, Rotilabo[®], Durchmesser innen 6 mm, Wand 2 mm, Durchmesser außen 10 mm, Firma Roth, Karlsruhe, Deutschland, (Best.-Nr. 9732.1)
- **Spritze:** Injekt Braun 2 ml, DIN: 13098-A-2 LN, Luer-Ansatz, Firma Braun, Melsungen, Deutschland
- **Spritze:** Omnifix, Tuberkulin SOLO, 1 ml, DIN: 13098-A 1 LN, Luer-Ansatz, Firma Heiland, Hamburg, Deutschland, (Best.-Nr. 370 - 155)
- **Stoppuhr:** Kronen-Stoppuhr, 1/5 Sekundeneinteilung, Firma Heiland, Hamburg, Deutschland, (Best.-Nr. 420 - 470)
- **Testkit Kortikosteron:** Ratten-Corticosteron-RIA, Festphasen-Radioimmunoassay (coated tubes) zur quantitativen Bestimmung von Corticosteron im Serum der Ratte, Coat-A-Count (¹²⁵J), Hersteller: Diagnostic Products Corporation, Los Angeles, USA, Vertrieb: Firma Biermann GmbH, Bad Nauheim, Deutschland, (Art.-Nr. TKRC 1)

- **Testkit Prolaktin:** Prolaktin bei Ratten Milenia[®], Enzymimmunoassay zur quantitativen Bestimmung von Prolaktin im Serum der Ratte, Hersteller: Diagnostic Products Corporation, Los Angeles, USA, Vertrieb: Firma Biermann GmbH, Bad Nauheim, Deutschland, (Art.-Nr. MKVRP 1)
- **Transponder:** Implantierbares Mikro-Identifikationssystem, IMI-1000, Firma Plexx, 6660 AE Elst, Niederlande, (Best.-Nr. 11051)
- **Waage:** Fabrikat Pico 1000, Meßbereich: 1000g / 1g (= Maximum / Einteilung), Hersteller: Firma WEDO, Dieburg, Deutschland, Vertrieb: Firma Schäfer-Shop GmbH, Betzdorf/Sieg, Deutschland
- **Wirbelmischer:** Vortex VF 2, Firma Schmid, Berlin, Deutschland, (Best.-Nr. 444 A 2150)
- **Zentrifuge:** Centrifuge 5412, 12000 U / min, Firma Eppendorf, Hamburg, Deutschland

Danksagung

Herrn Prof. Dr. N.–C. Jühr danke ich für die Überlassung des Themas und die jederzeit gewährte Hilfe.

Frau I. Bethke aus dem Klinikum Benjamin Franklin danke ich für eine konstruktive Zusammenarbeit bei den Analysen der Proben.

Mein Dank gilt auch Herrn J. Franke aus dem Institut für Nuklearmedizin des Klinikums Benjamin Franklin für die Bereitstellung eines Arbeitsplatzes.

Frau Dr. G. Arndt aus dem Institut für Biometrie des Fachbereichs Veterinärmedizin möchte ich für die statistische Beratung recht herzlich danken.

Mein besonderer Dank gilt Frau D. Ciuraj aus dem Institut für Tierschutz, Tierverhalten und Labortierkunde für die praktische Hilfe bei der Durchführung der Blutentnahmen.

Ebenso herzlich danke ich Herrn Dr. L. Dietzel aus der Forschungseinrichtung für experimentelle Medizin für die intensive Unterstützung bei der statistischen Versuchsplanung und Versuchsauswertung, sowie für die kritische Durchsicht der Arbeit.

Lebenslauf

Name	Mende
Vorname	Gerald
Geburtsdatum	27.08.1961
Geburtsort	Darfeld jetzt Rosendahl
Eltern	Christa Mende geb. Hemsing Alfons Mende

Schulbildung

1968 – 1972	Katholische Antonius Volksschule Darfeld
1972 – 1978	Freiherr-vom-Stein-Realschule Coesfeld
1978 – 1980	Höhere Handelsschule Coesfeld
1980 – 1981	Praktikum, Gemeindeverwaltung Rosendahl
1981	Abschluß: Fachhochschulreife
1981 – 1983	Alexander-Hegius-Gymnasium Ahaus
1983	Abschluß: Allgemeine Hochschulreife

Studium

1984 – 1985	Studium der Biologie Westfälische Wilhelms Universität Münster
1985 - 1992	Studium der Veterinärmedizin Freie Universität Berlin
11.03.1992	Approbation als Tierarzt

Berufliche Tätigkeit

1994 – 1999	Wissenschaftlicher Mitarbeiter am Institut für Tierschutz, Tierverhalten und Labortierkunde Fachbereich Veterinärmedizin Freie Universität Berlin
-------------	--

Selbständigkeitserklärung

Hiermit erkläre ich, die vorliegende Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe angefertigt zu haben.

Zur Verwendung kamen ausschließlich die im Inhaltsverzeichnis und im Anhang aufgeführten Materialien und Methoden.

Gerald Mende