

3. EIGENE UNTERSUCHUNGEN

3.1. Zielstellungen

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war, das angstassoziierte Verhalten bei zwei Rattenstämmen und insgesamt vier Zuchtlinien mit verschiedener Herkunft zu untersuchen. Im Laufe der Arbeit sollten die Tiere unter gleichen Bedingungen tierexperimentellen Studien unterzogen werden.

Dabei wurden folgende Aufgaben gestellt:

- Erforschung des Nahrungsaufnahmeverhaltens und der körperlichen Entwicklung der Versuchsratten unter gleichen Zucht- und Haltungsbedingungen,
- Untersuchung der Versuchstiere in allgemein anerkannten Angsttests,
- Analyse der Serotoninkonzentration in angstrelevanten Hirngebieten. Dabei wird eine mögliche Korrelation zwischen dem angstassoziierten Verhalten der Tiere und der Serotoninkonzentration im Hirngewebe untersucht.

3.2. Wissenschaftliche Novität und praktische Bedeutung

Das Thema ist von wissenschaftlicher und praktischer Bedeutung sowohl für Deutschland als auch für Russland, da die Arbeit neue Grundkenntnisse auf dem Gebiet der Neuropharmakologie bringen sollte. Untersuchungen zum Angstverhalten von Laborratten sind perspektivisch wichtig, da sie neue Erkenntnisse über Entstehung und Ablauf pathologischer Angstzustände liefern können. Besonders waren diese Forschungen bezüglich der unterschiedlichen Abstammung der Laborratten von Interesse, da die russischen Ratten im Vergleich zu den europäischen mehr als 16 Jahre lang in strenger Isolation gezüchtet wurden und infolge dessen eventuelle genetische Abweichungen besitzen könnten. Die praktische Bedeutung der Untersuchungen lag in ihrem Modellcharakter für andere Laborstudien, die die gezielte Auswahl von Laborratten für die Grundlagenforschungen und für die Entwicklung von therapeutischen Mitteln in der Zukunft erleichtern sowie den Umfang der Untersuchungen verringern und die Ergebnisse verbessern sollen.

3.3. Material und Methoden

3.3.1. Versuchstiere

3.3.1.1. Zucht

Alle Versuchstiere, die in den Untersuchungen verwendet wurden, wurden von spezialisierten Zuchtfirmen gekauft und im Institut für Pharmakologie und Toxikologie (Fachbereich Veterinärmedizin, Koserstr. 20, 14195 Berlin) der Freien Universität selbst nachgezüchtet und aufgezogen.

Somit wurden bei den Untersuchungen folgende Stämme bzw. Zuchtlinie eingesetzt:

1. Deutsche Wistar Ratten, von der Tierzucht Schönwalde GmbH, Schönwalde; Deutschland.
2. Deutsche Sprague Dawley Ratten, von der Tierzucht Schönwalde GmbH, Schönwalde; Deutschland.
3. Russische Wistar Ratten, von der Akademie der Wissenschaften, Institut für Zytologie und Genetik; Novosibirsk, Russland.
4. Russische Sprague Dawley Ratten, von der Akademie der Wissenschaften, Institut für Zytologie und Genetik; Novosibirsk, Russland.

Zur Zucht wurden gesunde und geschlechtsreife weibliche und männliche Tiere eingesetzt, um gesunde Nachkommen von ausreichender Anzahl zu bekommen. Die weiblichen Tiere hatten einen 4-tägigen Zyklus. Für die Paarung wurde ein Männchen mit einem oder maximal mit zwei Weibchen in einem sauberen Käfig zusammengesetzt. So wurde eine lange Gewöhnung der Tiere an das Revier vermieden. Die erfolgreiche Paarung erfolgte im frühen Östrus. Die Männchen saßen mit den Weibchen 10-12 Tage zusammen und wurden danach getrennt. Eine erfolgreiche Deckung und eine normal verlaufende Gravidität konnte spätestens nach 16 Tagen durch eine ausgeprägte Rundung des Bauches deutlich erkannt werden. Der Tag der Paarung wurde als -22 Tag der Trächtigkeit bezeichnet und konnte zur Berechnung des voraussichtlichen Geburtstermins verwendet werden (± 1 Tag).

Die Geburt erfolgte in der Regel in den ersten Stunden nach Beginn der Lichtphase am 22. Tag der Gravidität und wurde als Tag 0 bezeichnet. Als "errechneter Geburtszeitpunkt" wurde deshalb der Beginn der Lichtphase des 22. Tages definiert. Alle verwendeten Würfe waren zum regulären Geburtszeitpunkt am 22. Tag der Gravidität geboren worden.

Die Dauer der Austreibungsphase der Geburt variierte stark und lag normalerweise zwischen ca. 1 ½ und 4 h. War das Weibchen zu Beginn der Austreibungsphase gestört (z.B. Licht oder Lärm), konnte sich diese Phase erheblich verlängern. Die Wurfgrösse betrug bei den verschiedenen Stämmen 3-20 Welpen pro Wurf, und das durchschnittliche Geburtsgewicht lag bei 6 bis 8 g.

3.3.1.2. Tierhaltung

Die Tiere befanden sich in einem Raum bei $22 \pm 2^\circ\text{C}$ Umgebungstemperatur und 60 % relativer Luftfeuchtigkeit mit einem 12:12 Licht/Dunkel Zyklus (von 6:00 bis 18:00 Uhr). Adulte Tiere wurden in Gruppen bis zu fünf Tieren in Makrolon-Standardkäfigen (Größe M IV 40 x 60 x 25 cm, Ebeco, Castrop-Rauxel) auf Holzgranulateinstreu (Altromin, Lage) gehalten. Die aufwachsenden Tiere erhielten pelletiertes Haltungsfutter (Altromin 1324, Altromin, Lage) und Wasser *ad libitum*. Die trächtigen Weibchen wurden nach Trennung von den Männchen, ab dem 12. Tag der Trächtigkeit, in Einzelkäfigen (dieselbe Größe M IV, Ebeco, Castrop-Rauxel) gehalten, in denen sie 30 Tage bis zum Absetzen der Welpen verblieben. In diesem Zeitraum erhielten sie spezielles Zuchtfutter (Altromin 1314, Altromin, Lage). Alle aufgezogenen Welpen wurden im Alter von 30 Tagen vom Muttertier abgesetzt. Gleichzeitig wurden die Weibchen von den Männchen getrennt. Alle Käfige mit abgesetzten Tieren wurden entsprechend und eindeutig gekennzeichnet.

3.4. Praktische Untersuchungen

3.4.1. Versuchsanordnung und Tiergruppenbildung

In der ersten Versuchsreihe wurden das Fress- und Trinkverhalten sowie die Veränderungen des Körpergewichts der Ratten untersucht.

In der zweiten Versuchsreihe wurden die Verhaltenstests durchgeführt, um Unterschiede im Angstverhalten zwischen den „deutschen“ Ratten und den „russischen“ Ratten aus dem Novosibirsker Institut für Zytologie und Genetik festzustellen.

In der dritten Versuchsreihe wurden neurochemische Untersuchungen durchgeführt, um die Serotoninkonzentrationen in verschiedenen Hirnstrukturen zu bestimmen.

Für die Untersuchungen wurden männliche und weibliche Tiere gleichen Alters verwendet. Alle Ratten einer Linie wurden immer (gleichmässig Männchen und Weibchen) in zwei Gruppen aufgeteilt. Die Gruppengröße betrug mindestens 20 Tiere; darunter waren 10 Männchen und 10 Weibchen. Die Schwankungen der Tierzahl pro Gruppe betragen 20 bis 30 Tiere, sie hing von der Welpenanzahl in den Würfen ab. Das Versuchsschema ist in Abb. 3 zu sehen.

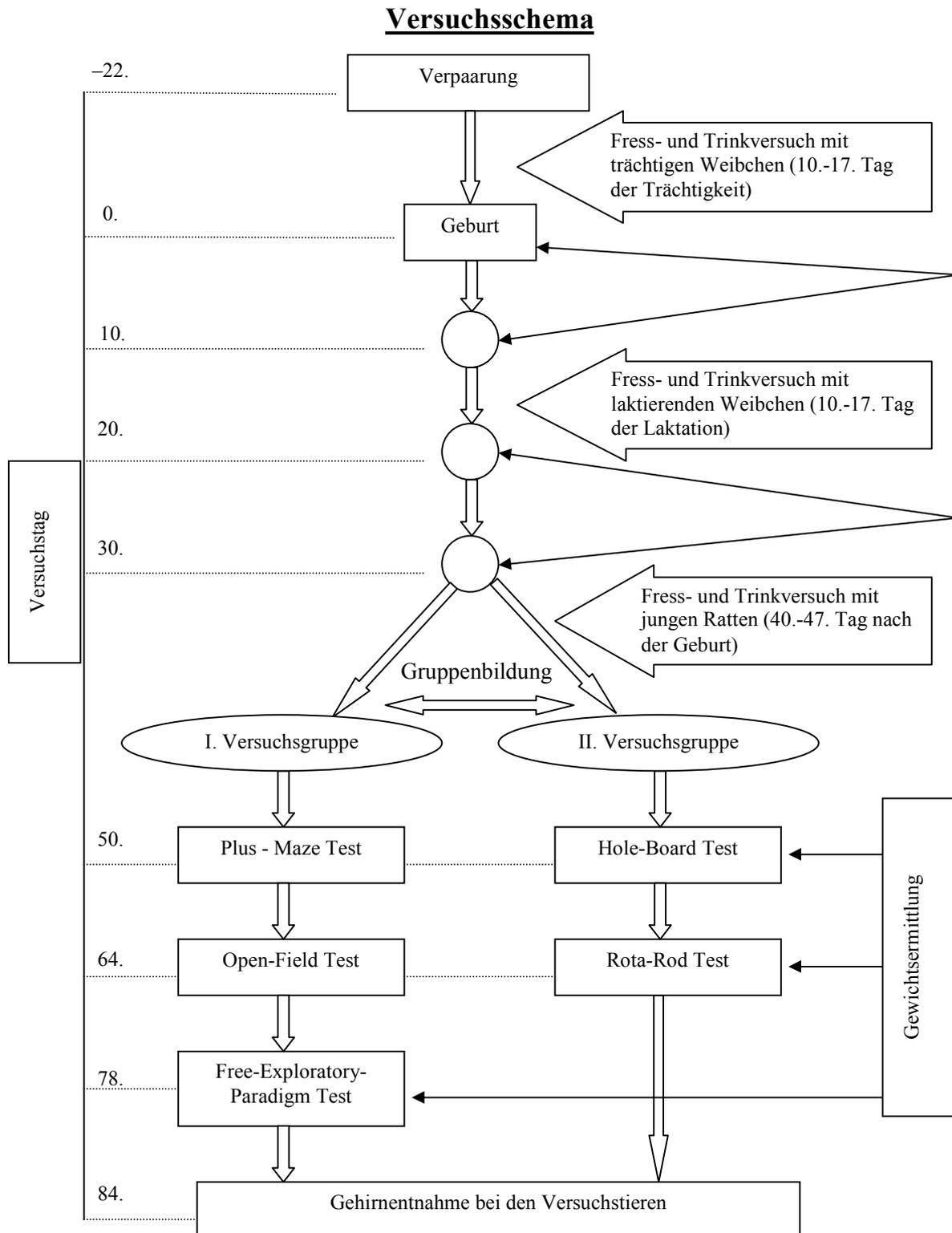


Abb. 3: Versuchsanordnung und Bildung experimenteller Gruppen

3.4.2. Versuchsdurchführung

3.4.2.1. Fress- und Trinkverhalten

Die Fress- und Trinkuntersuchungen wurden im Tierstall durchgeführt. Dabei wurde der Wasser- und Futterbedarf bei den Ratten in drei verschiedenen Lebensphasen ermittelt:

1.- Bei den weiblichen Tieren in der II. Trächtigkeitsphase (vom 10. bis 17. Tag der Trächtigkeit);

Diese Zeitspanne wurde ausgewählt, weil die wachsenden Feten zu diesem Zeitpunkt im Leib des Muttertiers schon ziemlich gross waren und die trächtigen Tiere deshalb einen hohen Nahrungsbedarf hatten.

2.- Bei den weiblichen Tieren in der II. Laktationsphase (vom 10. bis 17. Tag nach der Geburt);

Diese Zeitspanne wurde ausgewählt, weil die geborenen Jungtiere im Alter vom 10. bis 17. Tag nach der Geburt einen stabilen und hohen Milchbedarf hatten. Ab dem 20. Tag begannen sie schon das grobe Futter aus der Futterraufe und Wasser aufzunehmen.

3.- Bei den heranwachsenden Jungtieren (vom 40. bis 47. Tag nach der Geburt);

Diese Frist wurde gewählt, damit sich die Jungtiere, die im Alter von 30 Tagen vom Muttertier abgesetzt wurden, an die neuen Lebensbedingungen anpassen konnten. Eine 10-tägige Phase wurde zur Adaptation an grobes Futter, reines Wasser und an den totalen Verzicht auf Muttermilch gegeben. Danach fanden die Untersuchungen statt.

In den Versuchen wurden 4 bis 5 Weibchen von jeder Rattenlinie eingesetzt. Dabei sass jedes Weibchen (zuerst alleine und später mit dem Nachwuchs) in einem Einzelkäfig (Größe M IV, Ebeco, Castrop-Rauxel). Es wurden auch alle Jungtiere untersucht, die zur Verfügung standen. Sie wurden zu 4 bis 6 Stück je Käfig untergebracht. Zu Beginn des Versuches wurde den Ratten eine bekannte Wasser- und Futtermenge (Standardfutter) in die Futterraufen gegeben. Alle 24 Stunden jeweils um 14.00 Uhr wurde die übrig gebliebene Futter- und Wassermenge durch Wiegen ermittelt (Waage, Sartorius, MC1, Laboratory LC2200) und aus der Differenz die verzehrte Menge festgestellt. In den Käfigen, in denen mehrere Tiere untergebracht waren, wurde diese Differenz als Durchschnitt für ein Einzeltier ermittelt. Diese Untersuchungen dauerten 7 Tage lang. Das Versuchsschema war bei allen Rattenlinien gleich.

3.4.2.2. Veränderung des Körpergewichts

Neben den Untersuchungen des Fress- und Trinkverhaltens wurden auch die Veränderungen des Körpergewichts der Ratten ermittelt. Die Gewichte der Ratten wurden bei den Jungtieren in bestimmten Altersabschnitten mittels erwähnter Laborwaage gemessen. Die erste Gewichtsbestimmung fand unmittelbar nach der Geburt statt. Die zweite Gewichtsbestimmung wurde im Alter von 10 Tagen durchgeführt. In diesen beiden Fällen wurde zuerst das gesamte Wurfgewicht erfasst und ein Durchschnitt auf das Einzeltier umgerechnet. Die nächsten Gewichtsbestimmungen wurden im Alter von 20, danach von 30, 50, 64 und 78 Tagen durchgeführt. Ab dem 20. Tag nach der Geburt war es schon möglich, das Geschlecht zu bestimmen. Die Rattengewichte wurden für jedes einzelne Jungtier separat ermittelt und für männliche sowie weibliche Tiere getrennt ausgewertet. Da die Tiere dabei keinen starken Reizen oder Stress ausgesetzt waren, wurden sie nach bestimmten Zeitabständen in den weiteren Verhaltensversuchen verwendet.

3.5. Verhaltenstests

Alle Verhaltensstudien, mit Ausnahme der in den Tierstallräumen durchgeführten, wurden vormittags zwischen 8:00 und 12:00 Uhr durchgeführt. Eine Stunde vor Versuchsbeginn wurden die Käfige mit den Tieren in den Raum gebracht, wo die Verhaltenstests stattfanden. Dies war notwendig, um einen möglichen Einfluss des Transportstresses auf die bevorstehenden Verhaltenstests zu vermeiden.

Die für die Untersuchungen benutzten Apparate befanden sich in einer geräuschgedämmten Verhaltensbox. Diese fensterlose Kammer hatte eine Grösse von 1,80 x 1,80 x 2,30 m. In einer Höhe von 2,00 m über dem Boden war eine Videokamera (Typ: Panasonic WV-F15E, Matsushita Communication, Japan) installiert. Diese Kamera wurde ausserhalb der Untersuchungsboxen an einen Monitor (Dell, D1428-HS, Dell Computer Corporation, Thailand), und an einen Videorecorder (Panasonic NV-EG-FS88 HQ) angeschlossen. Die Versuche wurden beobachtet und gleichzeitig mit dem Videorecorder aufgezeichnet.

Die Ergebnisse der Untersuchungen wurden im Laufe des Versuchs oder nach Versuchende mit Hilfe eines computergestützten Programms (CPL Systems Video Track, Verion 2.16, England) ausgewertet. Die Versuchsdauer betrug je nach Verhaltenstest 5 oder 10 min. Nach jedem Durchgang wurde die Testfläche mit 50 %-igem Propanol (Meliseptol, B. Braun Medical AG, Deutschland) gereinigt, um Duftmarken vom Vorgängertier zu entfernen. Die Temperatur innerhalb der Verhaltensbox betrug während der Versuchszeit $21 \pm 2^{\circ}\text{C}$.

3.5.1. Lichtintensität

Da die Lichtintensität auf das Angstverhalten der Tiere Einfluss hat, wurde darauf geachtet, wie stark die Versuchsapparatur ausgeleuchtet war. Die Untersuchungskammer mit der Apparatur wurde indirekt mit vier oben angebrachten 100 Watt Tageslichtlampen beleuchtet. Immer vor Versuchsbeginn wurde die Beleuchtungsintensität mit einem Luxmeter (Panlux Electronic 2, Gossen) gemessen und gegebenenfalls korrigiert. Die Korrektur wurde durch veränderte Ausrichtung und Dämpfung der Lampen vorgenommen, wodurch in verschiedenen Teilen der Labyrinth eine bestimmte Lichtintensität geschaffen wurde.

3.5.2. Alter der Versuchstiere

Die ersten Verhaltensversuche wurden begonnen, wenn die Tiere das Alter von 50 Tagen erreichten. Die nächste Versuchsreihe folgte im Alter von 64 Tagen. Die letzten Verhaltenstests fanden mit den Ratten im Alter von 78 Tagen statt (Abb. 7). Um die Anzahl der verwendeten Tiere gering zu halten, wurde die Versuchsreihe so angeordnet, dass der nachfolgende Verhaltensversuch jeweils mit denselben Ratten durchgeführt werden konnte. Die Abstände zwischen den einzelnen Experimenten betrugen dabei immer 14 Tage. Diese Zeitspanne diente den Tieren zum Ausruhen, damit die gemachten Versuchserfahrungen verloren gingen. Die Tiere aller Gruppen wurden unbehandelt bei allen Tests eingesetzt.

3.5.3. Der Elevated-plus-maze-Test

Im *Elevated-plus-maze*-Test bringt man das Tier in eine Konfliktsituation zwischen dem Trieb zur Exploration einer neuen Umgebung einerseits und seiner angeborenen Angst vor offenen, erhöhten Flächen andererseits.

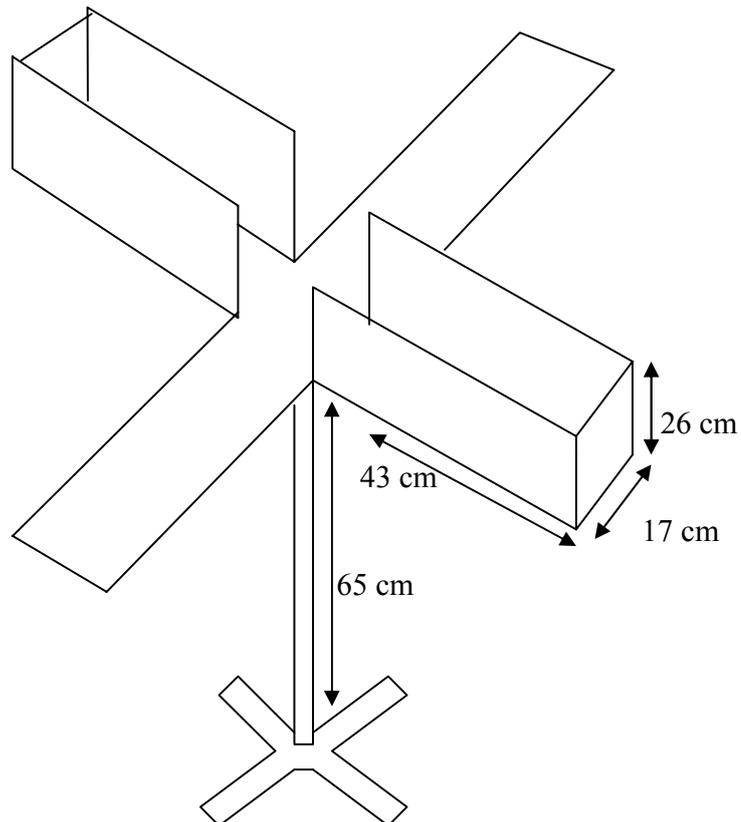


Abb.4: Das Elevated-plus-maze

Die Versuchsanordnung (Abb. 4) bestand aus einem plusförmigen Kreuz aus grauem Kunststoff, das 65 cm über dem Boden horizontal angebracht war. An ihm waren zwei gegenüberliegende Plattformen, so genannte "Arme", jeweils von 26 cm hohen Seitenwänden umgeben („geschlossene Arme“), angebracht, während die beiden anderen Plattformen keine Wände besaßen („offene Arme“). Die 43 cm langen und 17 cm breiten Arme waren durch eine 17 x 17 cm große Fläche, dem so genannten "Zentrum" miteinander verbunden. Der Boden der gesamten Plattform war zur besseren Trittsicherheit mit rauem, schwarzem und spiegelungsfreiem Linoleum belegt. Die Apparatur war durch zwei Tageslichtlampen indirekt so ausgeleuchtet, dass

die durchschnittliche Lichtintensität in den offenen Armen 210 lx, in den geschlossenen Armen 60 lx, und im Zentrum 140 lx betrug.

In diesem Test wurden 11♂/14♀ deutschen Wistar-, 11♂/15♀ russischen Wistar-, 18♂/12♀ deutschen SD- und 11♂/10♀ russischen SD-Ratten untersucht. Er dauerte jeweils 5 Minuten lang und wurde mit gleichen Parametern und Einstellungen für alle Versuchstiere durchgeführt. Zu Beginn eines Testdurchganges wurde eine Ratte diagonal auf das Zentrum gesetzt. So konnte das Tier selbst auswählen, welchen der Arme es als ersten betreten wollte. Während der Versuchsdauer von zehn Minuten wurden die gewonnenen Daten von einer senkrecht über der Plattform montierten Videokamera erfasst, auf einen Monitor und Videorecorder übertragen und direkt oder nachfolgend mit Hilfe des Computerprogramms (CPL Systems Video Track, Version 2.16, England) ausgewertet. Dabei wurden folgende Parameter berücksichtigt.

a) angstassoziierte Parameter:

1. die Anzahl der Eintritte in die offenen und geschlossenen Arme, wobei ein Eintritt als das Setzen aller vier Pfoten auf den betreffenden Arm definiert war. Daraus wurde der prozentuale Anteil der Eintritte in die offenen Arme zur Gesamteintrittszahl berechnet
2. die auf den offenen sowie geschlossenen Armen verbrachte Zeit (in Sekunden)
3. die Latenz bis zum ersten Eintritt in einen offenen Arm (in Sekunden)
4. die Anzahl der Head dips (Hinunterbeugen des Kopfes in die Tiefe über die Ränder der offenen Arme)
5. die aktive Zeit (in Sekunden)
6. sowie die Anzahl der SAPs (Ausstrecken der Tiere von den geschlossenen zu den offenen Armen)

b) Parameter für lokomotorische Aktivität:

1. die zurückgelegte Strecke (in Metern)
2. die Anzahl der Rearings (Erhebung der Tiere mit beiden vorderen Pfoten über dem Boden)
3. die Gesamtzeit Grooming (Körperpflege, in Sekunden)

Durch die unterschiedliche Beleuchtungsintensität wurde die Aversion der Tiere gegenüber den offenen Armen erhöht. Eine verringerte Exploration in den offenen Armen des Apparates wird als eine erhöhte Ängstlichkeit interpretiert. Eine erhöhte Anzahl an Head dips und eine verringerte Anzahl von SAPs wurden als weniger ängstliches Verhalten der Tiere beurteilt. Als

Maß für die vertikale und horizontale lokomotorische Aktivität dienten die zurückgelegte Strecke, die Anzahl der Rearings und die Zeit, die die Tiere aktiv verbrachten.

3.5.4. Der klassische Open-field-Test

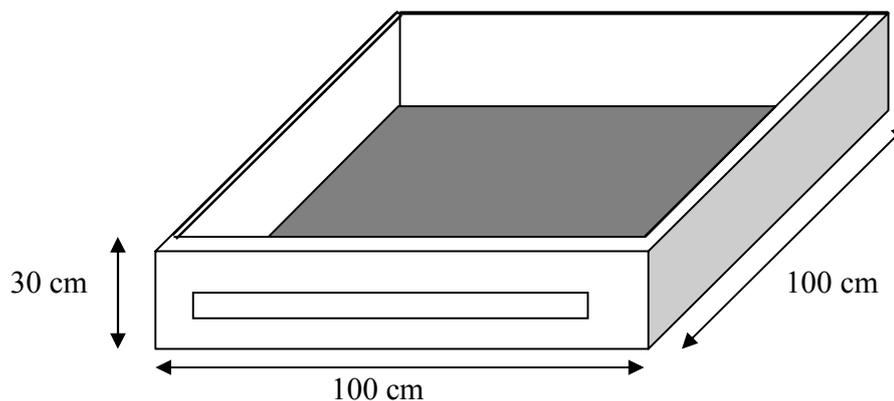


Abb. 5: Das Open-field

Der *klassische Open-field-Test* beruht auf der natürlichen Angst der Ratten vor offenen, hell beleuchteten Flächen. Das Tier befindet sich in einem Konflikt zwischen dem Drang zur Erkundung der neuen Umgebung und der Aversion gegen eine exponierte Fläche. Im Gegensatz zum *Elevated-plus-maze-Test* handelt es sich dabei jedoch nicht um eine erhöhte Plattform, sondern um ein hell beleuchtetes, weiträumiges Areal. Erhöhte Ängstlichkeit zeigt sich durch eine geringere Exploration dieser hellen Fläche.

Die Apparatur (Abb. 5) bestand aus einer schwarzen quadratischen Kunststoffgrundfläche umrandet von 100 x 100 cm mit 29 cm hohen weiß gestrichenen Begrenzungswänden. Um die Aversion der Tiere gegenüber der offenen Fläche zu verstärken, wurde diese direkt mit zwei Tageslichtlampen mit einer Lichtintensität von 400 lx ausgeleuchtet. Die Fläche des Open-Fields wurde im Computerprogramm in eine Außen- und eine Innenzone (50 x 50 cm) aufgeteilt. Ein Versuchsdurchlauf dauerte 5 Minuten wobei die Tiere einzeln in der Mitte des Feldes ausgesetzt wurden. Die Ergebnisse wurden zeitgleich oder nachträglich mit einem computergestützten Programm (CPL Systems Video Track, Verion 2.16, England) ausgewertet. Im Laufe des

Versuches wurde exakt ähnliche Anzahl der Tiere wie auch im Elevated-plus-maze-Test mit Erfassung folgender Parameter untersucht.

a) angstassoziierte Parameter:

1. die Zeit, die die Tiere in verschiedenen Zonen des Feldes verbrachten (in Sekunden)
2. die Anzahl der Eintritte in die verschiedenen Zonen des Feldes
3. die Anzahl der Tiere in Zonen des Feldes
4. die Zeit bis zum ersten Verlassen der Aussenzone (in Sekunden)
5. die aktive Zeit (in Sekunden)
6. die Häufigkeit des Auftretens und Gesamtzeit von Groomingverhalten (die Zeit, in der die Tiere sich geputzt hatten)

b) Parameter für lokomotorische Aktivität:

1. die Anzahl der Rearings (Erhebung der Tiere mit beiden vorderen Pfoten über dem Boden)
2. die zurückgelegte Strecke (in Metern)

Die zurückgelegte Strecke und die Anzahl an Rearings wurden mit Hilfe des Computerprogramms (CPL Systems Video Track, Version 2.16, England) ausgewertet und charakterisierten die horizontale und vertikale Lokomotion. Ein längerer Aufenthalt der Tiere im Zentrum des Feldes und eine erhöhte Eintrittszahl in die verschiedenen Zonen wurden als verringerte Ängstlichkeit interpretiert.

Die Anzahl von Groomings wurde als ethologischer Faktor gewertet. Eine erhöhte Anzahl von Groomings wies auf eine verstärkte „Ängstlichkeit“ hin.

3.5.4. Der Hole-Board-Test

Im *Hole-Board-Test* wurde Explorations- und Habitationsverhalten an insgesamt 17♂/17♀ deutschen Wistar-, 10♂/14♀ russischen Wistar-, 19♂/11♀ deutschen SD- und 10♂/10♀ russischen SD-Ratten untersucht. Es bestand aus einer Plattform (Abb. 6) aus schwarzem Perspex mit einer Grundfläche von 50 x 50 cm. Diese Plattform wurde mit 35cm hohen Wänden umrandet und enthielt im Boden 16 Löcher (2,5 cm Durchmesser) in gleich grossen Abständen (Trennweite 10 cm).

Die Apparatur wurde indirekt mit zwei Tageslichtlampen so ausgeleuchtet, dass die Lichtintensität in der Mitte 100 lx betrug. Die Tiere wurden einzeln am Rande des Hole-Boards eingesetzt und über einen Zeitraum von jeweils 10 min beobachtet. Der Versuch wurde an 2 aufeinander folgenden Tagen durchgeführt. Am ersten Tag erkundeten die Tiere die Versuchsapparatur und zeigten exploratorisches Verhalten, am folgenden Tag demonstrierten sie Habitationsverhalten. Die Daten wurden entweder automatisch mit dem bereits oben genannten Überwachungssystem (Kamera, Monitor, Videorecorder, Computer) oder manuell erfasst. Die Auswertung der Ergebnisse erfolgte entweder zeitgleich oder nachträglich mittels des CPL-Computerprogrammes (CPL Systems Video Track, Version 2.16, England).

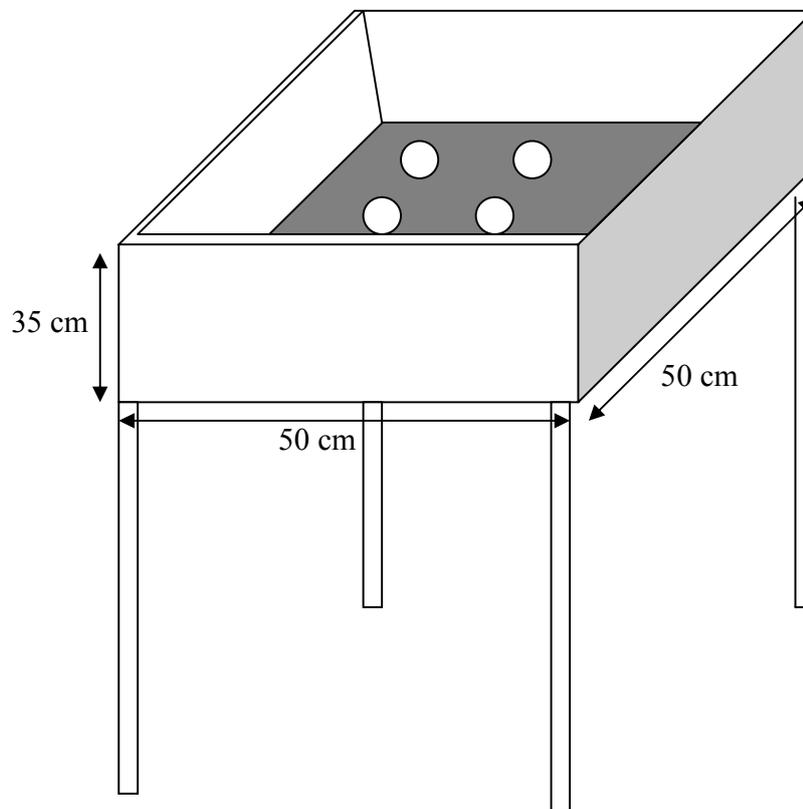


Abb. 6: Das Hole-Board

Im Laufe des Versuchs wurden folgende Parameter festgehalten:

1. Anzahl der Head dips (Anzahl der untersuchten Löcher)
2. Latenzzeit bis zur ersten Erkundungstour (in Sekunden)
3. Gesamtzeit Grooming (Körperpflege, in Sekunden)

4. aktive Zeit (in Sekunden)
5. Anzahl der Rearings (Erheben der Tiere mit beiden vorderen Pfoten über dem Boden)
6. zurückgelegte Gesamtstrecke (in Metern)

3.5.6. Der Rota-Rod-Test

Das Rota-Rod (Abb. 7) (Ugo Basile, Model 7750 4) bestand aus einer drehenden Walze aus Perspex mit einer rauhen Oberfläche, um ausreichenden Halt für die Tiere sicherzustellen. Der Durchmesser der Walze betrug 5,5 cm. Diese Walze wurde durch 5 Perspexscheiben ($\text{\O} 44 \text{ cm}$), in vier je 9 cm breite Abteilungen aufgeteilt, damit vier Ratten ohne Sichtkontakt gleichzeitig untersucht werden konnten. Diese drehende Welle mit den Trennscheiben war 25 cm über einer Plattform installiert.

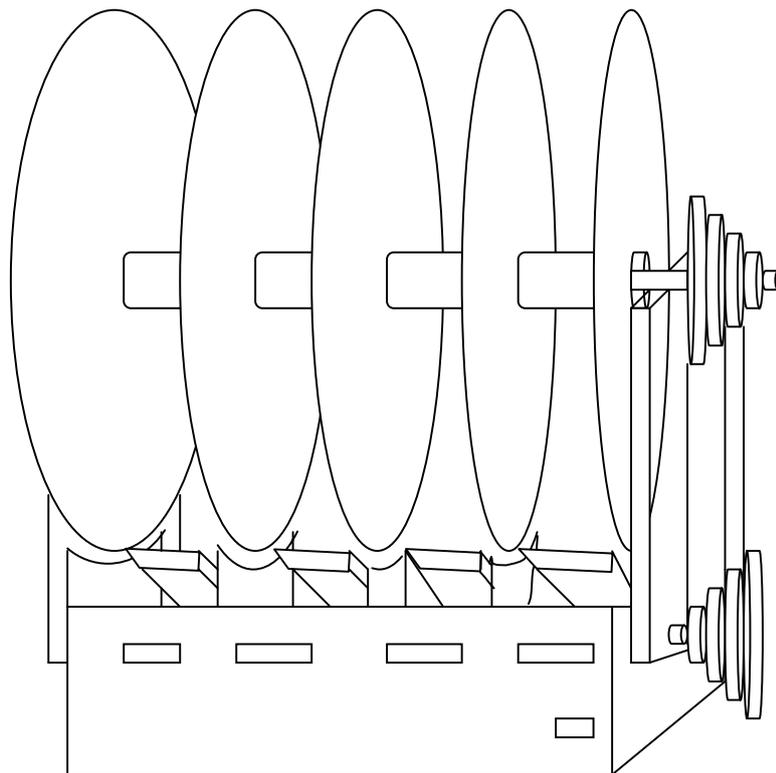


Abb. 7: Das Rota-Rod

Der Apparat hatte einen Schalter, mit dem man eine konstante Geschwindigkeit sowie Teststart und Teststopp Funktionen einstellen konnte. Ausserdem verfügte der Apparat für jede der Abteilungen über eine LCD Stoppuhr, die sekundengenau anzeigte, wie lange sich die Tiere auf der Walze halten konnten.

Die Tiere in der exakt ähnlichen Anzahl, wie auch im Hole-Board-Test, wurden Zuerst konditioniert. Sie wurden dreimal im Abstand von jeweils zwei Stunden für einen Zeitraum von zwei Minuten in eine der Abteilungen der Walze gesetzt. Die Walze drehte sich dabei mit einer gleich bleibenden Geschwindigkeit von vier Umdrehungen pro Minute. Fiel das Tier vor Ablauf der zwei Minuten von der Walze, wurde es wieder aufgesetzt.

Noch am selben Tag, zwei Stunden nach dem letzten Training, fand der Versuch statt. Die Tiere wurden auf die Walze gesetzt, die sich zunächst mit einer Geschwindigkeit von vier Umdrehungen pro Minute drehte. Zur gleichen Zeit wurde ein Hebel, der sich unter der Walze befand, manuell umgelegt und damit eine Stoppuhr in Gang gesetzt.

Ausserdem wurde der Schalter in Position "Teststart" (Geschwindigkeitserhöhung) umgeschaltet. Alle dreißig Sekunden erhöhte sich nun die Geschwindigkeit automatisch um drei Umdrehungen pro Minute. Wenn die Ratten sich nicht mehr auf der Walze halten konnten und herabfielen, wurde der Hebel durch das Gewicht der Tiere herabgedrückt und stoppte so die LCD-Timer. Damit wurde die Zeit erfasst, in der sich die Tiere auf der Walze gehalten hatten.

3.5.7. Der Free-exploratory-paradigm-Test

Dieser Test wurde als letzter durchgeführt. Dabei wurden, wie auch im Elevated-plus-maze-Test, 11♂/14♀ deutschen Wistar-, 11♂/15♀ russischen Wistar-, 18♂/12♀ deutschen SD- und 11♂/10♀ russischen SD-Ratten untersucht. Er dauerte 10 min und wurde an drei aufeinander folgenden Versuchstagen durchgeführt. Der Versuch fand in der vertrauten Umgebung der Ratten, im Tierstall, statt. Vor Versuchsbeginn wurde den Tieren zwei Wochen Zeit gegeben, um sich von den letzten Versuchen auszuruhen, und somit "frisch" in den nächsten Test zu kommen. Vor dem Versuch wurden die Tiere wie gewöhnlich in ihren Heimatkäfigen im Tierstall gehalten. Ausserdem wurde die Zahl der Ratten in den Käfigen nicht geändert.

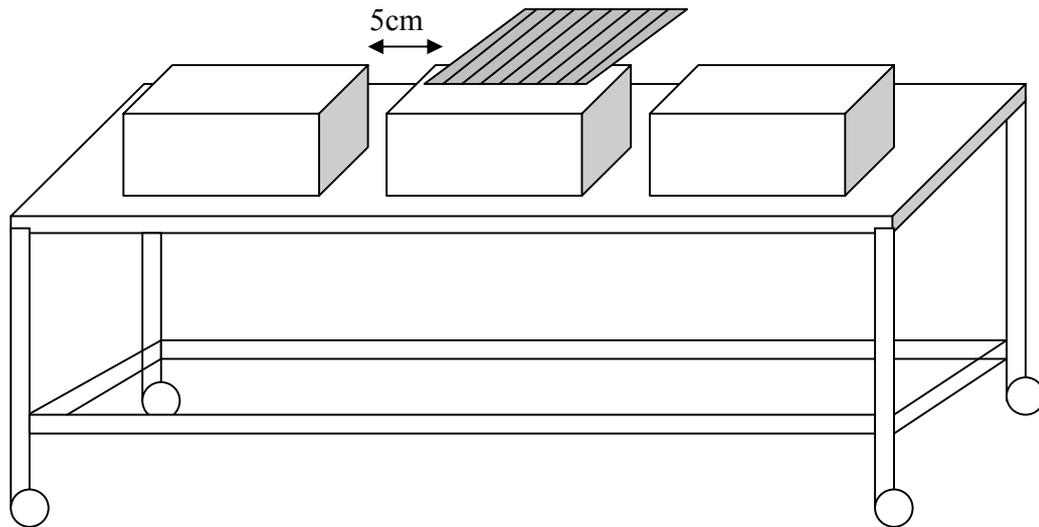


Abb. 8: Versuchsaufbau im Free-exploratory-paradigm-Test

Jeder Käfig war mit maximal 6 Ratten besetzt. Wasser und Futter standen den Tieren ad libitum zur Verfügung. Um mögliche Einwirkungen von Stressfaktoren auszuschließen, wurden die Ratten eine Stunde vor Versuchsbeginn markiert. Die Markierung wurde mit verschiedenen Farben mittels Marker (Edding 3000, Deutschland) am Kopf oder dem hinteren Körperteil angebracht. Vor dem Test wurden die Käfige separat im Abstand von 5 cm nebeneinander auf den Tisch gestellt. Der Deckel eines der Tierkäfige wurde abgenommen und als Art Treppe an der Stirnseite der Box eingehängt (Abb. 8). Die Tiere konnten aus ihren Käfigen herauskommen, zehn Minuten lang ihre Umgebung erkunden und ihre bekannten „Nachbarn“ kontaktieren. Dabei wurden folgende Parameter erfasst:

1. Zeit bis zum ersten Austritt aus dem Käfig (in Sekunden)
2. Aufenthaltszeit der Ratten außerhalb ihrer Box (in Sekunden)
3. Zeit bis zur Rückkehr der Tiere in den Heimatkäfig (in Sekunden)
4. Anzahl herausgekommener männlicher und weiblicher Ratten an den jeweiligen 3 Versuchstagen

3.6. Bestimmung von Serotoninkonzentrationen in verschiedenen Hirnregionen

Im nächsten Teil der Untersuchungen wurden die Serotoningehalte in wichtigen Hirnregionen, die für das Angstverhalten relevant sind, untersucht. Die vorliegende Studie sollte dazu dienen, Unterschiede im Angstverhalten zwischen den deutschen und russischen Zuchtlinien differenten Serotoninkonzentrationen zuzuordnen.

3.6.1. Narkose und Tötung der Tiere

Alle Tiere, die für diese Untersuchungen verwendet wurden, wurden im gleichen Alter von 84 Tagen getötet. Davor wurden die Tiere mit Isofluran (Forene, Abbot GmbH, Deutschland) in eine Kurznarkose versetzt und mit einer Guillotine dekapitiert.

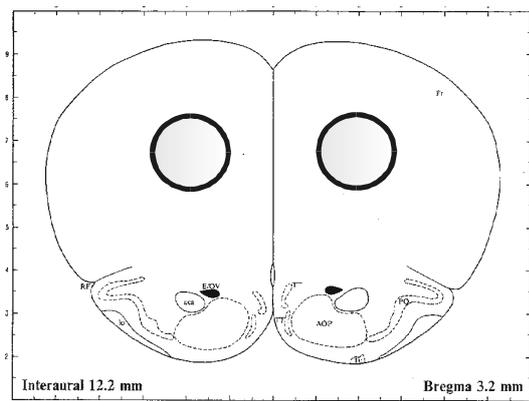
3.6.2. Entnahme und Aufbereitung des Hirnmaterials

Der Schädel wurde mit einer Schere geöffnet und das Hirn unverzüglich im Ganzen herauspräpariert. Die entnommenen Gehirne wurden sofort in einen verschliessbaren Plastikbehälter überführt und anschliessend in flüssigem Stickstoff augenblicklich eingefroren. Nach ca. 1 Stunde wurden die Gehirne dem Stickstoff entnommen und bei -87°C bis zur histologischen Aufbereitung in der zweiten Untersuchungsphase aufbewahrt. Unmittelbar am Versuchstag wurden die Gehirne aus dem Tiefkühler entnommen und entsprechend für die Untersuchungen vorbereitet.

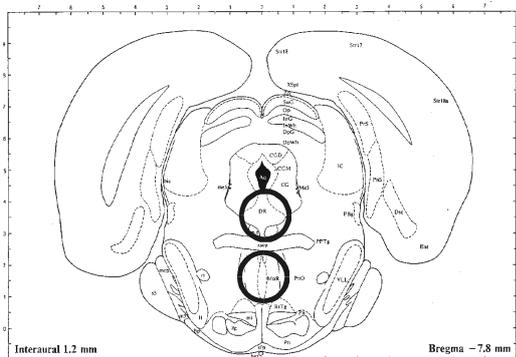
Die Serotoninkonzentrationen wurden in drei folgenden Gehirnregionen mittels einer HPLC Methode analysiert (Abb. 9):

- präfrontaler Cortex
- Hippocampus
- mediane und dorsale Raphe

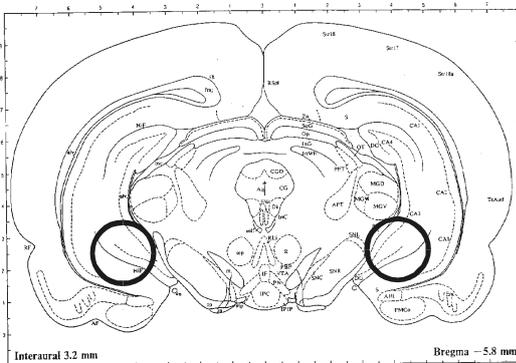
Das Gehirn wurde aus dem Behälter entnommen und mittels eines Gefriermikrotoms entsprechend geschnitten. Die Schnittstärke betrug dabei 1 mm. Aus jedem Schnitt wurden 2 Gewebeprobe mittels eines Trokars entnommen und in ein mit 597 μ l eisgekühlter 0,1 M Perchlorsäure (PCA) und 3,0 μ l (50 ng/ml) interner Standard (5-HICA) gefülltes Eppendorfröhrchen gegeben. Danach wurden die Proben mit einem Hochleistungs-Ultraschall-Desintegrator (Sonopuls Ultraschall-Homogenisator, Modell HD2070, Bandelin Electronic, Berlin, Deutschland) dreimal je zwei Sekunden lang homogenisiert.



Präfrontaler Cortex



Mediale und dorsale Raphe



Hippocampus

Von den Homogenaten wurden 200 μ l für die nachfolgende Gesamt-Eiweiss-Bestimmung entnommen, in ein 2 ml Eppendorfröhrchen gegeben und bei -87°C tiefgefroren. Die übrigen 400 μ l der Homogenate wurden, um die Membranproteine abzutrennen, in denselben Eppendorfröhrchen 10 Minuten lang bei 4°C bei 14000 rpm in einer Tischzentrifuge (Jouan, Modell MR 18.22, Rotor 74, Jouan S.A., „Saint Herblain“, Frankreich) zentrifugiert. Zur weiteren Analyse der Serotoninkonzentration in den Gewebeprobe wurden von dem Homogenat ca. 100 μ l abpipetiert und sofort in die Testapparatur (HPLC) injiziert.

Abb. 9: Schematische Darstellung der Zielgebiete (modifiziert nach Paxinos und Watson, 1986; die Millimeterangaben von Interaural und Bregma entsprechen der Schnittebene) für die Gewebeprobeentnahme.

3.6.3. HPLC (Hochleistungsflüssigkeitschromatografie) – das System und die Methode zur Bestimmung von Serotoninkonzentration in Gewebehomogenaten

Die Bestimmung der Serotoningehalte erfolgte unter Verwendung eines HPLC-Systems mit elektrochemischer Detektion (ECD). Das ist eine universale Methode, die sich für die quantitative Bestimmung nahezu sämtlicher Stoffgruppen eignet und dessen Ergebnisse sich durch hohe Präzision und Reproduzierbarkeit auszeichnen.

Das HPLC-System bestand aus einer pulsationsarmen Pumpe M 480 (Gynkotec, Deutschland), einem Entgaser (Degasys, DG-1210, VDS Optilab, Deutschland), einer 125 mm langen Hauptsäule (OmniChrom, MP-GelODS, Deutschland) mit 2mm Durchmesser und 5 µm Partikelgröße, einer 10 mm langen Vorsäule mit 2 mm Durchmesser (OmniChrom, MP-GelODS, Deutschland), einem 6-Wege-Injektionsventil RH 2197 (Rheodyne, Cotati, California, USA) mit einer 10 µl Sammelschleife (Rheodyne, Berkley, CA) und einem Detektor ECD (BAS LC-4C, England).

Die Analyse fand unmittelbar nach der Probenaufbereitung statt. Das Zentrifugat mit einem Volumen von 25 µl wurde durch ein Probenaufgabenventil in die HPLC injiziert, wo es im System zuerst durch die Vorsäule filtriert wurde. Die chromatographische Trennung erfolgte in der Hauptsäule, bei einer Fließgeschwindigkeit von 200 µl/min. Die mobile Phase hatte folgende Zusammensetzung: 0,1 M NaH₂PO₄, 1 mM EDTA-Dinatriumsalz und 0,35 mM Oktansulfonsäure-Natriumsalz. Bevor die Lösung auf 1 Liter aufgefüllt wurde, war sie auf den pH-Wert überprüft und mit 1 M NaOH auf 4,5 pH eingestellt. Anschliessend wurde die auf solche Weise vorbereitete Lösung zusätzlich mit 30 g Isopropanol vermischt.

Zur gleichmäßigen Förderung des Laufmittels wurde eine Pumpe mit zusätzlichem Pulsationsdämpfer verwendet. Das Serotonin in den Proben wurde mittels einer amperometrischen Messzelle bei einem Potential von +0,7 V und bei einer Elutionsdauer von 9 min detektiert. Die Eichung wurde mit einem Kalibrationsstandard durchgeführt. Die Standardlösung im Volumen von 200 µl setzte sich aus folgenden Komponenten zusammen: 1 µl 5-HICA (50 ng/ml), 50 µl 5-HIAA (125 ng/ml), 50 µl 5-HAT (62,5 ng/ml) und 99 µl Laufmittel. Zur Auswertung der Chromatogramme wurde ein Computerprogramm (Chromatography-Datensystem, CSW, Data APEX, Tschechien) benutzt. Unter Verwendung von Eichkurven und

dem Gewicht der Gewebeproben wurden die Konzentrationen von Serotonin in $\mu\text{g/ml}$ Feuchtgewebe angegeben.

3.7. Versuchsauswertung und Statistik

Die Untersuchungen der verschiedenen Rattenstämme wurden nach einem einheitlichen Schema durchgeführt. Es wurden für jeden Versuch mindestens 10 männliche und 10 weibliche gesunde Tiere verwendet.

Bei der Bestimmung der Serotoningehalte sind einzelne Proben aufgrund technischer Fehler in der Aufbereitung verloren gegangen.

Für alle gewonnenen Daten konnte eine Normalverteilung der Werte angenommen werden. Die Daten werden als arithmetische Mittelwerte der Gruppen mit Standardfehler des Mittelwertes (SEM) dargestellt. Unterschiede zwischen den Rattenlinien wurden mit Hilfe einer Varianzanalyse und einem multiplen Vergleichstest (Holm-Sidak-Test) auf Signifikanz geprüft.

Ein statistisch signifikanter Unterschied lag vor, wenn die Irrtumswahrscheinlichkeit $p < 0,05$ betrug. Als eine Tendenz wurde bezeichnet, wenn eine Irrtumswahrscheinlichkeit von $p < 0,10$ gegeben war. Die statistische Auswertung erfolgte mit Hilfe von SigmaStat Version 3.0 (Systat Software GmbH, Deutschland). Die Graphiken wurden mit SigmaPlot Version 8.0 (Systat Software GmbH, Deutschland) erstellt.