

3 Material und Methoden

3.1 Aufgabenstellung der Arbeit

Ziel der Arbeit war die Klärung der Frage, ob der selektive CCK_B-Rezeptor-Antagonist L365.260 anxiolytisch wirksam ist, ob seine anxiolytische Wirkung über periphere oder zentrale Rezeptoren vermittelt wird, und welche Rolle der Nervus vagus in der Vermittlung dieser Wirkungen spielt. Diese Frage sollte anhand tierexperimenteller Versuchsergebnisse beantwortet werden. In den Tierversuchen wurde der Einfluß verschiedener cholecystokininerger Substanzen in zwei allgemein anerkannten Angstmodellen (Konflikt-Test und Elevated-plus-maze-Test) an Ratten unterschiedlicher Zuchtlinien geprüft.

3.2 Tiermaterial und Haltungsbedingungen

Für die Versuche wurden männliche Wistar-Ratten des Bundesinstituts für gesundheitlichen Verbraucherschutz und Veterinärmedizin (BgVV, Berlin) und der Winkelmann-Versuchstierzuchtanstalt (Borchen), mit einem Gewicht von 225±25 Gramm verwendet. Die Einstellung erfolgte mindestens 14 Tage vor Beginn der Versuche. Die Haltung erfolgte in Gruppen zu 5 Tieren in Makrolonkäfigen (Typ IV) bei einer Raumtemperatur von 21-23 Grad Celsius und einer relativen Luftfeuchte von 50 bis 55 %. Ein Lichtprogramm regelte den Tag-Nacht Zyklus in 12-Stunden-Intervallen. Die Hellphase begann um 6:00 Uhr morgens. Während der gesamten Haltungsperiode stand den Tieren Standardfutter (Altromin 1326, Altromin, Lage) und Wasser zur freien Verfügung.

Nur für die Untersuchungen im Konflikt-Test (siehe Punkt 3.5.2) wurde den Tieren für 17 Stunden vor dem Versuch das Futter entzogen. Wasser stand diesen Tieren weiterhin zur freien Verfügung.

Alle Versuche wurden mit Genehmigung der Senatsverwaltung für Gesundheit und Soziales (Tierversuchsgenehmigungsnummern 170/91 und 0353/94) im Rahmen des BMFT Forschungsschwerpunktes „Beziehungen zwischen Motorik und Psyche: Rolle von neuroaktiven Substanzen“, BMFT (01 ZZ 9101), durchgeführt.

3.3 Verwendete Substanzen

<i>Substanz</i>	<i>chemischer Name</i>	<i>Hersteller / Bezugsquelle</i>
BOC-CCK-4	Tertiärbutyloxycarbonyl-Trp-Met-Asp-Phe-NH ₂	Institut für Pharmakologie und Toxikologie, Dr. Henklein, Humboldt-Universität zu Berlin
CCK-8s	Asp-Tyr(SO ₃ H)-Met-Gly-Trp-Met-Asp-Phe-NH ₂	
Cremophor El	Derivat von Kastoröl und Ethylenoxid	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Diazepam (Faustan®)	7-Chloro-1-methyl-5-phenyl-3H-1,4- benzodiazepin-2[1H]-one	Arzneimittelwerk Dresden, Dresden
Hexobarbital	5-[1-Cyclohexenyl]1,5-Dimethylbarbitur-säure	
L364.718 (Devazepide)	3S(-)-N-(2,3-dihydro-1-methyl-2-oxo-5-phenyl- 1H-1,4-benzodiazepine-3-yl)-1H-indole-2- carboxamid	Merck, Sharp und Dohme, Harlow, Essex, United Kingdom
L365.260	(3R-(+)-2,3-dihydro-1-methyl-2-oxo-5-phenyl- 1H-1,4-benzodiazepin-3yl)-N`-(3-methylphenyl)- harnstoff	
m-CPP	1-(3-Chlorophenyl)piperazindihydrochlorid	Research Biochemicals Inc. Natick, Massachusetts, USA
8-OH-DPAT	(±)-2-Dipropylamino-8-hydroxy-1,2,3,4,- tetraanhydronaphtalinhydrobromid	Schering-AG, Berlin
PD135.158	1S-[1α,2β[S*(S*)],4α]-4-[[2[[3-(1H-Indol-3-yl)- 2-methyl-1-oxo-2-[[[(1,7,7,trimethyl bicclo[2.2.1.]hept-2- yl)oxy]carbonyl]amino]propyl} amino]-1- phenylethyl]amino]-4-oxo-butanylsäure	Research Biochemicals Inc. Natick, Massachusetts, USA
Pentobarbital	5-Ethyl-5-[1-Methylbutyl]-barbitursäure	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Urethan	Carbaminsäureethylester	Berlin Chemie AG, Berlin

3.4 Versuchsvorbereitungen

3.4.1 Narkosen

Für die intraventrikuläre (i.c.v.) und die intrahippokampale (i.h.) Substanzapplikation wurden die Tiere operativ vorbereitet. Dazu erhielten die Tiere eine Hexobarbital-Kurznaarkose in einer Dosierung von 100 mg/kg Körpergewicht.

Für die Vagotomie wurden die Tiere mit Pentobarbital in einer Dosierung von 60 mg/kg narkotisiert, weil dieser Eingriff einen längeren Zeitraum erforderte.

Alle Narkotika wurden intraperitoneal (i.p.) in einem Applikationsvolumen von 5 ml/kg verabreicht.

3.4.2 Operationstechniken

3.4.2.1 Intraventrikuläre Applikation

Für die i.c.v.-Applikation wurden die Tiere einen Tag vor dem Verhaltenstest vorbereitet. Nach dem vollständigen Einsetzen der Narkose wurden die Tiere in einem stereotaktischen Tisch (Eigenbau) mittels Ohrstiften und Schneidezahnhalterung so fixiert, daß die Schädeldecke horizontal ausgerichtet war. Ein ca. 8 mm breiter und ca. 12 mm langer Hautlappen im Bereich zwischen den kranialen Ohransätzen und den lateralen Augenwinkeln wurde in der Medianen entfernt. Der freigelegte Teil der Schädeldecke wurde von Unterhautgewebe befreit und mit isotoner Kochsalzlösung gesäubert. Mittels eines Dentalbohrers mit einem Durchmesser von 1 mm (VEB Dentaltechnik, Potsdam) wurde die Schädelkalotte an einer nach einem stereotaktischen Atlas (Paxinos und Watson, 1986) bestimmten Stelle trepaniert.

Als Bezugspunkt für die Lage der Bohrlöcher diente Bregma, der Kreuzungspunkt der Schädelnähte Sutura sagittalis und Sutura coronalis (siehe Abb. 3-2). Der Mittelpunkt des Bohrloches lag 1,6 mm rechts lateral der Medianen auf der Höhe von Bregma.

Die Dura mater wurde ebenfalls unter Schonung tieferliegender Strukturen penetriert. Anschließend wurde das Operationsfeld mehrfach mit isotoner Kochsalzlösung gesäubert und getrocknet, so daß es bis zum Testbeginn unverschlossen bleiben konnte. Die Tiere wurden bis zum Verhaltenstest am nächsten Tag mehrmals kontrolliert und problemlos in ihren ursprünglichen Gruppen gehalten.

3.4.2.2 Intrahippokampale Applikation

Die i.h.-Applikation der Substanzen erfolgte bilateral, mit Hilfe der Schablonentechnik. Nach Eintritt der Narkose wurden die Tiere in gleicher Weise wie für die i.c.v.-Applikation auf einem

stereotaktischen Tisch fixiert. Im Bereich zwischen den caudalen Ohransätzen und den lateralen Augenwinkeln wurde in der Medianen ein ca. 6 mm breiter und 10 mm langer Hautlappen entfernt. Der darunter sichtbare Bereich der Schädeldecke wurde mit dem spitzen Schenkel einer Augenschere von subkutanem Bindegewebe und Periost befreit. Der nun sichtbare knöcherne Anteil des Schädels wurde mit isotoner Kochsalzlösung gesäubert. Nach Trocknung des Operationsfeldes mittels Gazetupfern wurde eine Schablone auf dem Schädel befestigt.

Die Schablone (Abb. 3-1) bestand aus einer 2,2 mm starken, durchsichtigen Plexiglasplatte, mit einer Länge von 22 mm und einer Breite von 14 mm. Das Gewicht betrug 0,85 Gramm. Das in die Oberfläche der Schablone eingeritzte Achsenkreuz a/b sollte die maßgenaue und damit reproduzierbare Anlage auf dem Schädel ermöglichen.

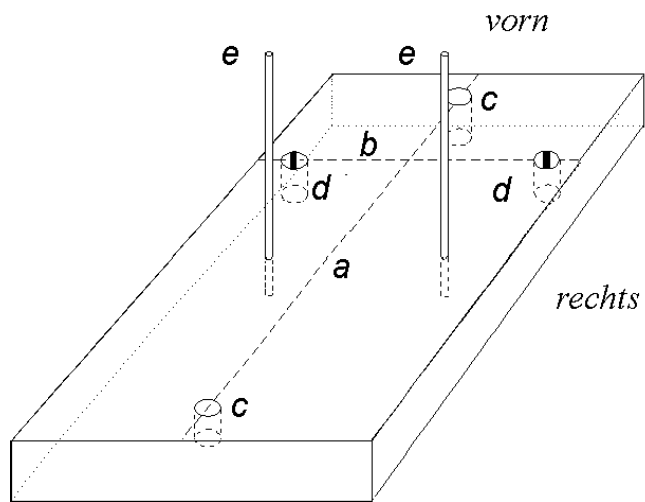


Abb. 3-1 Schematische Darstellung der Schablone für die intrahippokampale Applikation.

Die Hilfslinie a wurde mit der Medianen und die Hilfslinie b mit der

Interaurallinie (siehe Abb. 3-2) zur Deckung gebracht. Die Hilfslinie a befand sich in der Mitte der Längsrichtung der Schablone. Die im rechten Winkel dazu verlaufende Hilfslinie b lag 5,5 mm vom vorderen Schablonenrand entfernt. Auf der Hilfslinie a befanden sich, jeweils 2,5 mm vom vorderen und hinteren Schablonenrand entfernt, die Bohrlöcher c, die zur späteren Aufnahme der Befestigungsschrauben dienten. Zur Befestigung wurden Rundkopf-Holzschrauben 2Ø x 10 mm lang verwendet, über die vor dem Einschrauben Distanzhülsen aus Messingrohr geschoben wurden. Die Länge der Distanzhülsen (6,5 mm) wurde nach der Länge der gewünschten Einschraubtiefe (1,2 mm) festgelegt.

Auf der Hilfslinie b waren zwei Gewinde M 1,6, jeweils drei Millimeter vom rechten und linken Schablonenrand entfernt angebracht, in die jeweils ein Gewindestift M 1,6 x 2,5 mm lang eingeschraubt war. Mit Hilfe dieser Gewindestifte wurde die Schablone nach der Befestigung auf dem Schädel justiert.

Außerdem wurden in die Schablone noch zwei 10 mm lange Führungskanülen e vertikal eingesetzt. Ihre Anordnung war symmetrisch beiderseits der Hilfslinie a, jeweils im Abstand von 4,7 mm von dieser entfernt. Der Lochabstand betrug somit 9,4 mm.

Zur Hilfslinie b betrug der Abstand 3,8 mm. Die aus Standardinjektionskanülen (Rekord 8x50D / S5; 21Gx2'') gefertigten Führungen waren in die kleineren Bohrlöcher am Schablonenboden so eingepreßt, daß die bodenseitigen Enden der Führungen mit dem Schablonenboden genau abschlossen.

Die Lage der Führungen wurde vor Anfertigung der Schablonen mit Hilfe eines stereotaktischen Atlas (Paxinos und Watson, 1986) bestimmt.

Zur Befestigung auf der gesäuberten Schädelkalotte wurde die Schablone so auf das Operationsfeld gelegt, daß der Kreuzungspunkt der Hilfslinien a und b der Schablone mit Lambda (siehe Abb. 3-2) und die Hilfslinie a mit der Sutura saggitalis optisch zur Deckung kamen.

Durch das rostrale und caudale Bohrloch der Schablone wurden die Bohrlöcher auf der Schädeldecke mit einem spitzen Dorn angekörnt und die Schädeldecke mit einem 1 mm starken Handbohrer (Eigenbau) vorsichtig angebohrt. Die Schablone wurde mit 2 Befestigungsschrauben, die nur im

knöchernen Anteil des Schädels zu liegen kamen, durch die Bohrlöcher c auf der Schädeldecke fixiert. Um Kippbewegungen der Schablone auszuschließen, wurden die Nivellierungsschrauben in den Gewindebohrungen d soweit angezogen, bis die Schablone in allen Richtungen optimal in der Waagerechten ausgerichtet und fest auf dem Schädel befestigt war. Mit einem Dentalbohrer (VEB Dentaltechnik, Potsdam; Durchmesser 0,5 mm), wurde durch die vertikalen Führungskanülen e der Schädelknochen inklusive der Dura mater perforiert. Hierbei wurde besonders darauf geachtet, daß die tieferliegenden Hirnstrukturen verschont blieben. Die Führungskanülen wurden anschließend mit eingeeölten (Paraffin) 0,5 mm starken Drainagestiften vollständig verschlossen, die am Versuchstag entfernt wurden.

Nach Beendigung der Narkose wurden die Tiere wieder zu ihren ursprünglichen Gruppen gebracht, in denen alle Tiere am gleichen Tag operiert wurden, und dort bis zum Beginn des Verhaltenstests am übernächsten Tag komplikationslos gehalten.

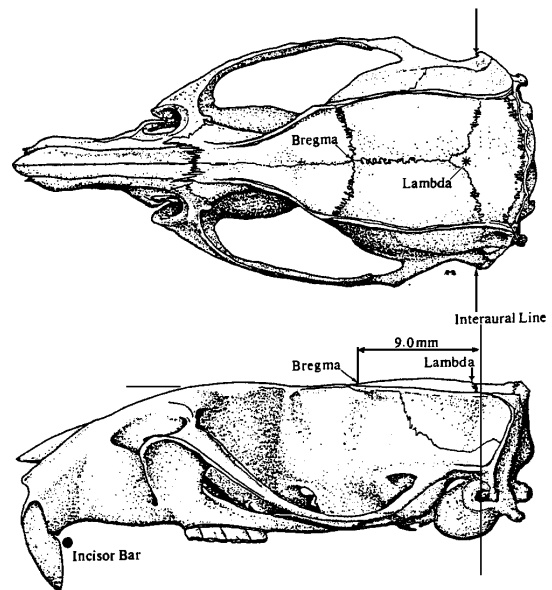


Abb. 3-2 Dorsale und laterale Ansicht des Schädels einer männlichen Wistar-Ratte aus Paxinos und Watson, 1986.

3.4.2.3 Vagotomie

Vor dem operativen Eingriff wurden die Tiere nach dem Zufallsprinzip in zwei Gruppen aufgeteilt. Die Tiere der einen Gruppe wurden vagotomiert, die Tiere der anderen Gruppe wurden demgegenüber nur scheinvagotomiert.

Nach vollständig eingetretener Narkose wurden der thorakale und abdominale Bereich der Tiere großzügig geschoren und rasiert. Die Tiere wurden in Rückenlage auf einem beweglichen Operationstisch mit Hansaplast[®] an den Extremitäten fixiert und der Operationsbereich mit 70 %igem Ethanol desinfiziert. Mit einem Skalpell wurde ein ca. 3-4 cm langer medianer Hautschnitt vom Processus xiphoideus in Richtung Umbilicus vorgenommen. Die Bauchhöhle wurde unter Durchtrennung der Bauchmuskulatur und des Peritoneums mit einer Schere eröffnet. Die Leber wurde unter Schonung aller Strukturen zur linken Bauchwand verlagert. Durch beidseitigen leichten manuellen Druck auf den Bauchbereich, caudal der Rippenbögen, trat der Magen in die Bauchöffnung vor. An der Curvatura major wurde ein ca. 10 cm langer Faden aus vollsynthetischem, chirurgischem und trocken sterilisiertem Nahtmaterial (I. u. E. Hartung, Markersdorf) der Stärke Nr.4/0 als Haltebügel angebracht. Mit Hilfe dieses Haltebügels konnte der Magen so verlagert werden, daß das Gekröse zwischen Magen und Leber gespannt und durchtrennt werden konnte. Unter den nun sichtbar werdenden Teil des Oesophagus wurde magennah ein Spatel geschoben und der Oesophagus vorgelagert. Der Magen wurde in die Bauchhöhle reponiert, so daß in der Bauchöffnung nur noch der vorgelagerte Teil des Oesophagus zu erkennen war. Der restliche Teil der Bauchöffnung wurde mit in isotoner Kochsalzlösung getränkten Gazetupfern bedeckt. Unter größtmöglicher Schonung der Gefäße wurden alle subdiaphragmalen Äste des Nervus vagus unter Lupenkontrolle (Olympus ST-STB1, 9 bis 40fache Vergrößerung) durchtrennt. Der vorgelagerte Teil des Oesophagus wurde anschließend in die Bauchhöhle zurückverlagert. Die Muskelschichten wurden zusammen mit dem Peritoneum mit einer fortlaufenden Naht verschlossen. Die Haut wurde mit Einzelheften verschlossen. Als Nahtmaterial diente für beide Nähte resorbierbarer Vicryl[®] Faden (ETHICON GmbH und CoKG; 2 bzw. 3 metric). Die Wundversorgung erfolgte mit antiseptischem Wundspray (Betadine[®], Napp Laboratories, UK).

Bei scheinvagotomierten Tieren wurden alle bei den vagotomierten Tieren durchgeführten Operationsschritte, mit Ausnahme der Durchtrennung der Äste des Plexus oesophagei, durchgeführt.

Bis zum Beginn der Verhaltenstests wurden die Tiere komplikationslos in ihrer ursprünglichen Gruppe gehalten und erhielten eine vierzehntägige postoperative Erholungsphase.

3.5 Verhaltenstests

Alle Verhaltenstests wurden vormittags zwischen 9:00 und 11:00 Uhr durchgeführt.

Die zur Kontrolle des Verhaltens benutzten Apparaturen befanden sich in einer geräuschgedämmten Verhaltensbox. Diese fensterlose und mit zwei Ventilatoren ausgestattete Kammer hatte eine Grundfläche von 170 cm x 190 cm; sie war 245 cm hoch und durch eine verschließbare Tür begehbar. In einer Höhe von 215 cm über dem Boden war eine Videokamera (Typ Panasonic CCTV WV-BL200/6) befestigt, über die das Verhalten der Tiere auf einem Fernsehmonitor (Panasonic TX-C81DRS) außerhalb der Box beobachtet und mit einem Videorekorder (Panasonic NV-FS90 HQ) aufgezeichnet wurde.

Die Temperatur innerhalb der Verhaltensbox betrug während der Versuchszeit konstant 21-22 Grad Celsius. Die während der Versuche mittels 500 Watt starker direkter Deckenbeleuchtung konstant gehaltenen Lichtverhältnisse wurden nur für die Versuche mit dem Elevated-plus-maze (Abb. 3-4) variiert (siehe Punkt 3.5.3). Desweiteren wurde je nach Versuchsansatz (Va) ein Lüfter als Geräuschkulisse (masking noise) zugeschaltet. Eine Stunde vor Versuchsbeginn wurden die Tiere in das Labor verbracht, gewogen und markiert (Edding 3000, Industrie Marker). Jedes Tier wurde nur einmal in einem der Verhaltenstests untersucht. Nach Abschluß der einzelnen Versuche wurden die Tiere mit einer i.p.-Applikation von 5 ml einer 40 %igen Urethanlösung getötet.

3.5.1 Lichtverhältnisse

Da die Lichtverhältnisse das Verhalten der Tiere, insbesondere angstassoziiertes Verhalten, beeinflussen können, wurde die Beleuchtungsintensität [Lux] vor Beginn der Versuche mit einem Luxmeter erfaßt (Panlux electronic 2, Gossen).

Im Open-field (Abb. 3-3) wurden die Lichtverhältnisse in den Ecken und im Zentrum der quadratischen Grundfläche bestimmt. Sie betragen bei einer Deckenbeleuchtung von 500 Watt im Bereich der Seitenwände 740 Lux und im Zentrum 840 Lux.

Auf dem Elevated-plus-maze (Abb. 3-4) wurde die Beleuchtungsstärke sowohl in den geschlossenen als auch auf den offenen Armen und im Zentrum nacheinander bei direkter Beleuchtung einmal mit 500 Watt und einmal mit 750 Watt gemessen. Bei einer Beleuchtungsstärke von 750 Watt betrug die Lichtintensität in den geschlossenen Armen 2400 Lux, auf den offenen Armen 3400 Lux und im Zentrum 2800 Lux. Bei einer Beleuchtungsstärke von 500 Watt betrug die Lichtintensität in den geschlossenen Armen 1340 Lux, auf den offenen Armen 1540 Lux und im Zentrum 1710 Lux.

3.5.2 Konflikt-Test

Als Konflikt-Test wurde ein Modell nach Bodnoff (1989) verwendet, das auf einer Unterdrückung der Futteraufnahme beruht, die bei Tieren auftritt, wenn sie mit einer neuen Umgebung konfrontiert werden. Dieser Test wurde von unserer Arbeitsgruppe dahingehend modifiziert und validiert, daß der potentielle Streß der Tiere in der Phase vor der eigentlichen Versuchsdauer im Open-field durch eine Verkürzung der Hungerperiode gemindert wurde (Rex et al., 1993,1998).

Naive hungrige Ratten wurden in eine für sie fremde Umgebung (Open-field) verbracht, in deren Zentrum sich Futter befand. Da Ratten es möglichst vermeiden offene Flächen zu betreten, geraten sie hier in einen Konflikt zwischen der „Angst“ vor der neuen Umgebung einerseits und dem Hunger als motivierendem Faktor andererseits.

Das in den Versuchen verwendete Open-field (100 cm x 100 cm x 40 cm) (Abb. 3-3) bestand aus Holz mit weiß lackierten Wänden und einem schwarzen Boden. Es wurde mit 500 Watt weißem Licht direkt beleuchtet. Zur Erfassung der lokomotorischen Aktivität waren 2,5 cm über dem Boden in jeder Wand fünf Infrarot-Lichtschränke installiert, welche die Grundfläche des Open-field in 36 gleich große quadratische Felder unterteilten.

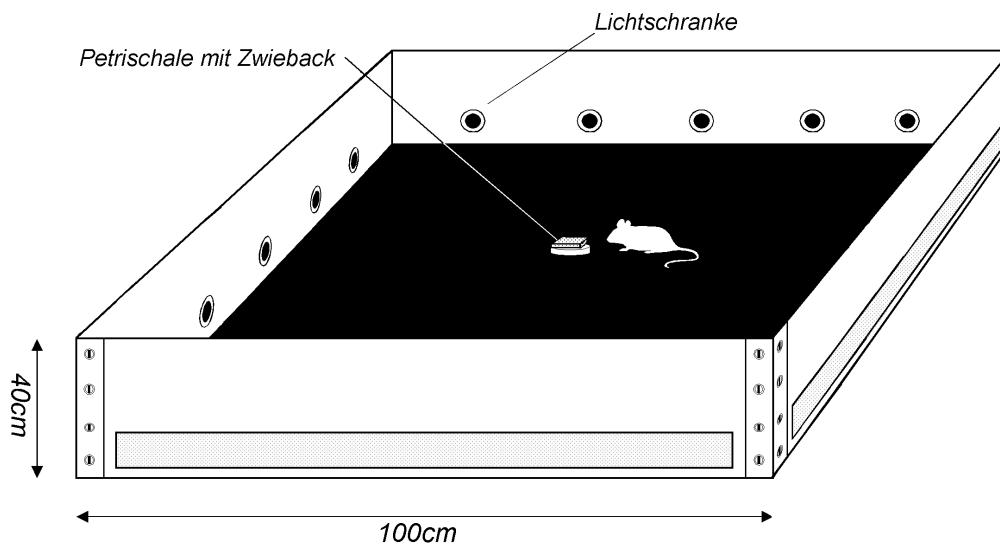


Abb. 3-3 Schematische Darstellung des für den Konflikt-Test verwendeten Open-field.

Die lokomotorische Aktivität der Tiere wurde mit Hilfe des IR-Lichtschränkensystems automatisch erfaßt (WP A 61B/225 736; Pat.-Schr.Nr. 155 033; Fink, F; H. Erdmann; H. Fink und R. Morgenstern). Ein Vorteil dieses Systems ist, daß die Lichtschranken im IR-Spektralbereich arbeiten und die Signale geräuschlos sind, so daß keine Beeinflussung des Verhaltens der Versuchstiere durch die Apparatur während des Meßvorgangs erfolgt. Das System ist derart geschaltet, daß nur translatorische Bewegungen, nicht aber Bewegungen am Platz wie

zum Beispiel das Aufrichten, Putzen, Schwanzbewegungen, Rotationsbewegungen auf der Stelle oder Tremor erfaßt werden.

Zur Motivation der Tiere wurde ihnen nach einer siebzehnstündigen Hungerphase im Zentrum des Open-field als unbekanntes Futter eine Scheibe Zwieback (Firma Brandt, Hagen) auf einer Petrischale angeboten.

Durch Variation der Fastenzeiten und Modifikation der Umgebungsparameter kann das Ausmaß des Konfliktes in seiner Stärke variiert werden. In Vorversuchen wurden die Versuchsbedingungen in der Weise optimiert, so daß die Tiere für die zu bearbeitende Fragestellung einer stark aversiven Versuchssituation ausgesetzt waren.

Für den Test wurden die Tiere nach einer substanzspezifischen Vorbehandlungszeit (VBZ), mit dem Kopf in eine Ecke gerichtet, in das Open-field eingesetzt und mit Hilfe des Videosystems außerhalb der Verhaltensbox über einen Zeitraum von zehn (2 x 5) Minuten beobachtet. Eine Zwischendesinfektion der Testarena mit Meliseptol[®] (B. Braun Melsungen AG, Melsungen) erfolgte vor Einsetzen eines jeden Versuchstieres.

Als Verhaltensparameter wurden erfaßt:

Als Maß für die „Ängstlichkeit“ der Tiere wurde die Latenzzeit in Sekunden zwischen Einsetzen der Tiere in das Open-field (Testbeginn) und erstmaliger Futteraufnahme bestimmt. Angegeben wird die Anzahl der Tiere einer Gruppe in Prozent, die in fünf und zehn Minuten Futter aufnahmen.

Als Maß für die lokomotorische Aktivität der Tiere wurde die Anzahl der Lichtschrankenunterbrechungen in fünf und in zehn Minuten bestimmt.

3.5.3 Elevated-plus-maze-Test

Wir verwendeten das von Handley und Mithani (1984) beschriebene Modell. Dieses Modell ist gut validiert und verläßlich für die Erfassung von anxiolytischen und anxiogenen Substanzwirkungen (Pellow et al., 1985; Pellow und File, 1986).

Das Elevated-plus-maze bestand aus einer kreuzförmigen horizontalen Lauffläche die sich in einer Höhe von 60 cm über dem Boden befand. Zwei gegenüberliegende Arme des Kreuzes hatten Seitenwände und Stirnwand (geschlossene Arme). Die beiden um 90 Grad versetzten Arme hatten keine Wände (offene Arme). Aufgrund der angeborenen Höhenangst von Nagern sowie ihrer Angst vor offenen Flächen vermeiden es die Tiere die offenen Arme für längere Zeiträume zu Betreten.

Das in den Versuchen verwendete Elevated-plus-maze (Abb. 3-4) bestand aus einem 9 mm dicken, mattgrauen Kunststoff. Die Maße der Arme betragen 17 cm x 43 cm, die in ein 17 cm x 17 cm großes, quadratisches Zentrum übergingen. Die Seitenwände der geschlossenen Arme hatten eine Höhe von 25 cm und eine Stärke von 6 mm.

Um die Trittsicherheit der Tiere zu erhöhen, war die Lauffläche des Elevated-plus-maze mit schwarzem, feingerippten Kunststoffbelag von 3,5 mm Dicke belegt.

Für die Versuche mit dem Elevated-plus-maze

wurden die Bedingungen in der geräuschgedämmten Kammer variiert, indem die Beleuchtungsstärke und die Geräuschkulisse verschieden kombiniert wurden, so daß sich folgende Versuchsansätze (Va) ergaben.

Va 1: 500 Watt Beleuchtungsstärke ohne Geräuschkulisse

Va 2: 500 Watt Beleuchtungsstärke mit Geräuschkulisse

Va 3: 750 Watt Beleuchtungsstärke mit Geräuschkulisse

Die Tiere wurden nach einer substanzspezifischen Vorbehandlungszeit (VBZ) einzeln auf das Elevated-plus-maze gesetzt, wobei der Kopf der Tiere auf die Ecke zwischen einem offenen und einem geschlossenen Arm ausgerichtet war. Die Beobachtung der Tiere erfolgte mit Hilfe des Videosystems (vgl. Punkt 3.5.2) außerhalb der Kammer über einen Zeitraum von fünf Minuten. Nach jedem Tier wurde die Testarena mit Meliseptol® (B. Braun Melsungen AG, Melsungen) desinfiziert.

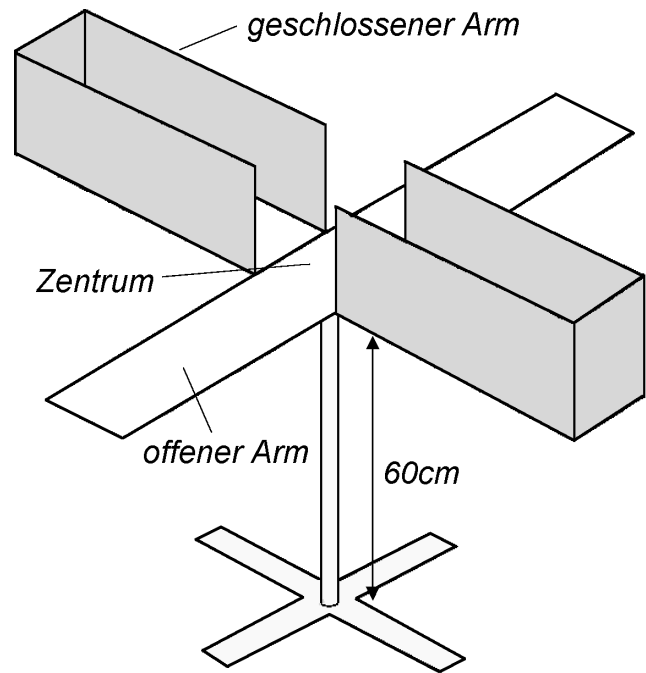


Abb. 3-4 Schematische Darstellung des verwendeten Elevated-plus-maze.

Folgende Versuchsparameter wurden erfaßt:

1. Immobilisationszeit [sec.]
2. Anzahl der Eintritte in die geschlossenen Arme
3. Anzahl der Eintritte in die offenen Arme
4. Anzahl der Eintritte in das Zentrum
5. Aufenthaltsdauer in den geschlossenen Armen [sec.]
6. Aufenthaltsdauer auf den offenen Armen [sec.]
7. Aufenthaltsdauer im Zentrum [sec.]

Die Immobilisationszeit, d.h. das regungslose Verharren der Tiere vom Moment des Einbringens auf das Elevated-plus-maze bis zur ersten Fortbewegung, wurde nur in den Vorversuchen miterfaßt. Sie wurde später vernachlässigt, da die Tiere in diesen Untersuchungen keine Schreckstarre (freezing) zeigten.

Aus den in den Parametern 1-7 erfaßten Daten wurden berechnet:

8. Die Aufenthaltsdauer der Tiere auf den offenen Armen in Prozent zur Gesamtaufenthaltsdauer auf dem Elevated-plus-maze
9. Die durchschnittliche Aufenthaltsdauer der Tiere auf den offenen Armen pro Eintritt [sec.]
10. Die Summe der Eintritte in alle Zonen (Gesamteintritte)
11. Die Eintritte in die offenen Arme prozentual zu den Gesamteintritten

Als Maß für angstassoziiertes Verhalten der Tiere werden die Parameter 3., 6. und 11. betrachtet. Da sich herausstellte, daß Parameter 6. (Aufenthaltsdauer der Tiere auf den offenen Armen) Veränderungen des angstassoziierten Verhaltens in unseren Versuchen am besten widerspiegelt, ist dieser Parameter im Ergebnisteil dargestellt. Andere berechnete Parameter, wie die Aufenthaltsdauer auf den offenen Armen in Prozent der Gesamtversuchsdauer, die Aufenthaltsdauer auf den offenen Armen in Sekunden pro Eintritt auf den offenen Arm, die Eintritte in die offenen Arme als prozentualer Anteil der Gesamteintritte sind in den Tabellen XII bis XV im Anhang D aufgeführt.

Der Parameter 10. diente der Beurteilung der lokomotorischen Aktivität.

3.6 Applikationstechniken

3.6.1 Systemische Applikation

Die systemische Applikation (i.p.) der Substanzen und des Vehikels erfolgte mit Standardinjektionsspritzen (DIN 13098-A-2LN) am wachen fixierten Tier. Das Applikationsvolumen betrug 5 ml/kg.

3.6.2 Zentrale Applikation

Die Mikroinjektion erfolgte am wachen fixierten Tier mittels einer auf einem Stativ befestigten Mikroinjektionsspritze (Hamilton CO. CR-700-20; Reno, Nevada) über einen Zeitraum von 30 Sekunden. Das Injektionsvolumen betrug bei der intracerebro-ventrikulären Applikation (i.c.v.) 1 µl/Tier und bei der intrahippokampalen Applikation (i.h.) 0,5 µl pro Hemisphäre. Nach jeder Flüssigkeitsapplikation verblieb die Kanüle für 30 Sekunden in der Führungskanüle (i.h.) bzw. dem Bohrloch (i.c.v.) um eine ausreichende Diffusion zu gewährleisten.

Nach Beendigung der Versuche wurde der korrekte Sitz der Applikationskanülen histologisch untersucht (siehe Punkt 3.10).

3.6.3 Intraventrikuläre Applikation

Für die Substanzapplikation am Versuchstag wurde das tags zuvor in Narkose gebohrte Loch im Schädel mit isotoner Kochsalzlösung benetzt, um das Blutkoagulat aufzuweichen, das sich als Wundverschluß gebildet hatte.

An der aus einer Injektionskanüle gefertigten Kanüle für die i.c.v.-Injektion (Abb. 3-5) befand sich 5,5 mm von der Injektionsspitze entfernt ein fest angebrachter Metallstopper, bis zu dem die Kanüle in eine definierte Tiefe von 4 mm in den Ventrikel eingeführt wurde. Auf das obere Ende der Kanüle wurde ein 15 cm langer Polyäthylenschlauch (RS Components GmbH, Mörfelden-Walldorf) aufgeschoben, dessen freies Ende mit der Mikroinjektionsspritze (Hamilton CO. CR-20; Reno, Nevada) verbunden wurde.

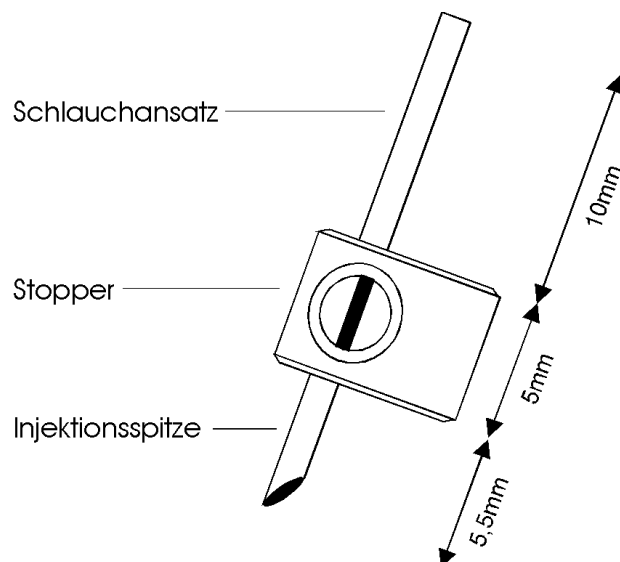


Abb. 3-5 Schematische Darstellung der bei der i.c.v.-Applikation verwendeten Kanüle.

Die Injektionskanüle wurde bis zum Metallstopper (siehe Abb. 3-5) in das Bohrloch eingeführt und bei simultaner Fixation des Tieres mit einer Hand in seiner Lage gehalten. Anschließend wurde die gefüllte Injektionskanüle in das Bohrloch der Schädeldecke eingeführt und ein Mikroliter (eine Umdrehung der Mikrometerschraube) der Substanz über einen Zeitraum von 30 Sekunden in den rechten Ventrikel injiziert. Über eine Luftblase in dem Schlauch konnte der Verlauf der Injektion kontrolliert werden. Nach jeder Injektion wurde das Injektionssystem auf Durchlässigkeit geprüft.

Nach der Applikation wurde das Tier für fünf Minuten in den Heimatkäfig zurückgesetzt.

3.6.4 Intrahippokampale Applikation

Bei der i.h.-Applikation wurde in ähnlicher Weise verfahren wie bei der i.c.v.-Applikation. Die Drainagestifte wurden aus den Führungskanülen der Schablone entfernt und der mit dem Applikationsschlauch verbundene Injektor (Abb. 3-6) in die Führungskanülen eingeführt. Der Durchmesser des Injektors verringerte sich zur Auslaßöffnung hin. Durch den Metallstopper wurde eine Injektionstiefe von 8 mm gewährleistet. Das Applikationsvolumen von 0,5 µl pro Hemisphäre wurde über einen Zeitraum von jeweils 15 Sekunden injiziert. Die Injektion in beide Hemisphären erfolgte unmittelbar

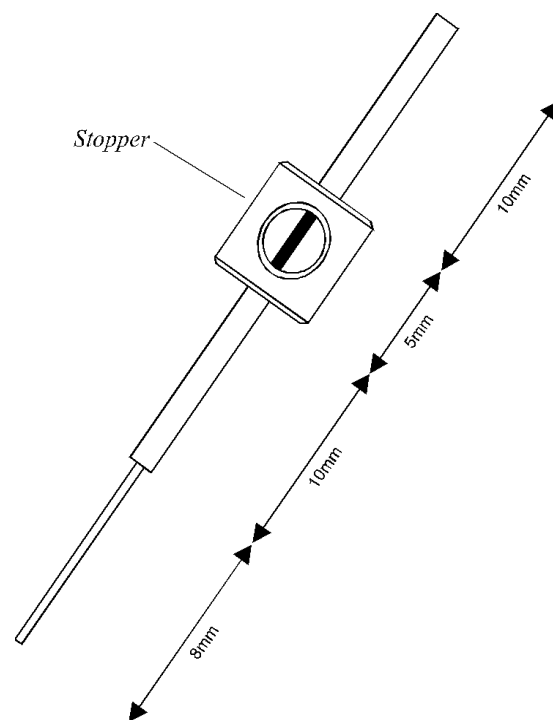


Abb. 3-6 Schematische Darstellung der verwendeten Injektionskanüle bei der i.h.-Applikation.

nacheinander, wobei abwechselnd mit der rechten oder linken Hemisphäre begonnen wurde. Nach der Applikation wurden die Tiere für fünf Minuten in den Heimatkäfig zurückgesetzt.

3.7 Applikationsschema

Alle applizierten Substanzen wurden am Versuchstag in Vehikel in einem Ultraschallbad aufgelöst und entsprechend verdünnt. Das Injektionsvolumen betrug bei den intraperitonealen Applikationen 5 ml/kg und bei den zentralen Applikationen 1 µl/Tier, wobei i.h. jeweils 0,5 µl pro Hemisphäre verabreicht wurden.

3.7.1 Konflikt-Test

3.7.1.1 Systemische Applikation im Konflikt-Test

<i>Substanz</i>	<i>BgVV</i>	<i>Winkelmann</i>	<i>VBZ (Minuten)</i>
<i>Vehikel</i>	✓	✓	20
<i>Diazepam</i> [mg/kg]	0,5 1,25 1,5 2,5		25
<i>8-OH-DPAT</i> [mg/kg]	0,1 0,3		25
<i>m-CPP</i> [mg/kg]		0,3 0,6 1,0 2,0	20
<i>CCK-8s</i> [µg/kg]	2,5 12,5		10
<i>BOC-CCK-4</i> [µg/kg]	5 25	10 100	10
<i>L365.260</i> [µg/kg]	1 10		20
<i>PD135.158</i> [µg/kg]	1 10 100		20
<i>CCK-4</i> [µg/kg]	5		10
<i>u. L365.260</i> [µg/kg]	10		20

Tab. 3-1 Substanzen sowie deren Dosierungen und Vorbehandlungszeiten (VBZ) im Konflikt-Test bei einfacher i.p.-Applikation sowie der kombinierten i.p.-Applikation von CCK-4 und L365.260. Verwendet wurden BgVV- und Winkelmann-Wistar-Ratten.

3.7.1.2 Zentrale Applikation im Konflikt-Test

<i>Substanz</i>	<i>i.c.v.</i>		<i>i.h.</i>		<i>VBZ (Minuten)</i>
<i>Vehikel</i>	✓		✓		5
<i>CCK-8s</i>			10	[ng/Seite]	5
<i>BOC-CCK-4</i>	*1,0	[µg/kg]	100		
			20	[ng/Seite]	5
<i>L365.260</i>	0,1	[µg/kg]	0,01	[µg/Seite]	5
	1,0		0,1		
			1,0		
<i>PD135.158</i>			0,1	[µg/Seite]	5
			1,0		
			10		

Tab. 3-2 Substanzen sowie deren Dosierungen und Vorbehandlungszeiten (VBZ) im Konflikt-Test bei zentraler Applikation (i.c.v. und i.h.). Alle Versuche wurden mit Tieren des BgVV durchgeführt. Für die mit Stern gekennzeichneten Dosierungen (*) wurden Winkelmann-Wistar-Ratten verwendet.

3.7.1.3 Kombinierte Applikation im Konflikt-Test

<i>zentral</i>	<i>Operation (i.p./OP)</i>	<i>Einstich (i.p./Einstich)</i>	<i>Vehikel (i.p./i.h.)</i>	<i>CCK-4 [20 ng/Seite]</i>	<i>VBZ i.p. (Minuten)</i>
<i>peripher</i>					
<i>Vehikel</i>	✓	✓	✓	✓	20
<i>L365.260</i> [µg/kg]	100		1		
			10		20
			100		
<i>PD135.158</i> [µg/kg]			10		20
			100		

Tab. 3-3 Substanzen sowie deren Dosierungen und Vorbehandlungszeiten (VBZ) im Konflikt-Test bei kombinierter zentraler und peripherer Applikation bzw. nur zentraler Manipulation. Die einzelnen Manipulationen wurden wie folgt bezeichnet: i.p./OP für Operation der Tiere ohne weitere Manipulation am Versuchstag; i.p./Einstich für Operation der Tiere mit Einstich der Injektionskanüle ins ZNS-Gewebe ohne Substanzapplikation; i.p./i.h. für Operation der Tiere mit zentraler Applikation von Vehikel oder CCK-4. Die VBZ für die zentrale Applikation betrug fünf Minuten.

Verwendet wurden BgVV-Wistar-Ratten

3.7.2 Elevated-plus-maze-Test

3.7.2.1 Systemische Applikation im Elevated-plus-maze-Test

<i>Substanz</i>	<i>BgVV (Va 1)</i>	<i>BgVV (Va 2)</i>	<i>BgVV (Va 3)</i>	<i>Winkelmann (Va 2)</i>	<i>VBZ (Minuten)</i>
<i>Unbehandelt</i>	✓				keine
<i>Vehikel</i>	✓	✓	✓	✓	20
<i>Diazepam</i> [mg/kg]		1,0 1,5 3,0			25
<i>8-OH-DPAT</i> [µg/kg]		0,03 0,1 0,3			25
<i>m-CPP</i> [mg/kg]			0,3 0,6 1,0		20
<i>BOC-CCK-4</i> [µg/kg]		15 50 100		30 100	10
<i>L365.260</i> [µg/kg]	1,0 10	10 30 100	10 30 100		20
<i>PD135.158</i> [µg/kg]			1 10 100		20
<i>L364.718</i> [µg/kg]			10 100		20

Tab. 3-4 Substanzen sowie deren Dosierungen und Vorbehandlungszeiten (VBZ) im Elevated-plus-maze-Test nach i.p.-Applikation. Die Untersuchungen erfolgten unter drei verschiedenen Versuchsbedingungen: Va 1=500 Watt, ohne Geräuschkulisse; Va 2=500 Watt, mit Geräuschkulisse; Va 3=750 Watt, mit Geräuschkulisse. Verwendet wurden BgVV- und Winkelmann-Wistar-Ratten.

3.7.3 Untersuchungen mit vagotomierten Tieren

<i>Versuch</i>		<i>Konflikt-Test</i>		<i>Elevated-plus-maze</i>		<i>VBZ (Minuten)</i>
<i>Substanz</i>		<i>scheinvagoto mierte</i>	<i>lädierte</i>	<i>scheinvagoto mierte</i>	<i>lädierte</i>	
<i>Vehikel</i>	i.p.	✓	✓	✓	✓	20
<i>L365.260</i>	[mg/kg; s.c.]	0,1				30
		1				
	[µg/kg; i.p.]	1				20
		10	10	10	10	
		100		30	30	
<i>CCK-4</i>	[µg/kg; i.p.]	10	10			10
				10	10	
<i>CCK-4</i>	[µg/kg; i.p.]	10	10			10
<i>u. L365.260</i>	[µg/kg; i.p.]	10	10			20

Tab. 3-5 Substanzen sowie deren Dosierungen und die Applikationsart bei den angegebenen Vorbehandlungszeiten (VBZ). Die Versuche wurden durchgeführt mit vagotomierten (lädiert) und scheinvagotomierten Ratten im Konflikt-Test und auf dem Elevated-plus-maze unter den Versuchsbedingungen Va 3 (750 Watt mit Geräuschkulisse). Verwendet wurden BgVV-Wistar-Ratten.

3.8 Erfassung von Nebenwirkungen

Als Maß sedierender Effekte der Substanzen diente die lokomotorische Aktivität der Tiere in den Tests. Zusätzlich wurde auf Ataxien und Änderungen des Verhaltens (Exploration, Stereotypien etc.) der Tiere geachtet.

Bei Änderungen im Verhalten (taumelnder Gang und/oder Schwanken der Hinterextremitäten) wurden die Tiere nach Herausnahme aus der Versuchsanordnung auf Muskelrelaxation untersucht. Dabei wurden die Tiere mit den Vorderpfoten an einen vom Untersucher waagrecht gehaltenen Stab von etwa 3 mm Durchmesser gehängt und die Muskelrelaxation geprüft (Bild 4-1).

Bewertungskriterien:

Stufe 1: Beim freien Hängen am Stab versucht die Ratte nicht mehr hochzuklettern.

Stufe 2: Die Ratte hat leichte Schwierigkeiten, sich an dem waagrecht gehaltenen Stab festzuhalten.

Stufe 3: An dem waagrecht gehaltenen Stab kann sich die Ratte nicht festzuhalten und rutscht ab.

3.9 Konzentrationsbestimmung von L365.260 in Plasma und Gehirn

Um zu überprüfen zu welchem Zeitpunkt die maximale Konzentration von L365.260 im Plasma erreicht wird und ob es im ZNS nachweisbar ist, wurden orientierende Untersuchungen durchgeführt. Dazu erhielten drei BgVV-Wistar-Ratten systemisch L365.260 in einer Dosierung von 500 µg/kg. Nach einer VBZ von 10, 20 oder 30 Minuten wurde den Tieren durch Orbitalpunktion 2 ml Blut entnommen, welches heparinisiert und anschließend zentrifugiert wurde. Da sich 20 Minuten als die VBZ erwies, in der eine maximale Plasmakonzentration erreicht wurde, wurden 3 Tiere 20 Minuten nach der Applikation von 500 µg/kg L365.260 getötet und dekapitiert. Das Gehirn wurde entnommen und für die weitere Bestimmung aufbereitet, indem es dreimal in isotoner Kochsalzlösung gewaschen wurde.

3.9.1 Bestimmungsmethode

Die Bestimmung der Plasmakonzentrationen von L365.260 erfolgte mittels Hochleistungsflüssigkeitschromatografie (HPLC).

Zur Aufnahme der Eichkurve wurde aus Rattenblut gewonnenes arzneimittelfreies Plasma verwendet, dem L365.260 in ansteigender Konzentration sowie eine gleichbleibende Menge Diazepam (interner Standard) zugegeben wurde. Den Plasmaproben der mit L365.260 behandelten Tiere wurde nur Diazepam zugesetzt.

Zur Probenaufbereitung wurden die Plasmaproben mit Acetonitril extrahiert, der Acetonitrilextrakt unter Stickstoff eingengt und der Rückstand im Eluent rekonstituiert.

Die Proben wurden auf einer HPLC-Säule (Nucleosil 100 C18, 5 µm, 100 x 4 mm, Vorsäule 30 x 4 mm gleiches Material) mit 55 % 10 mM Phosphatpuffer (pH 6,5) und Acetonitril 45 % als Eluent aufgetrennt. L365.260 und der interne Standard wurden nach der Retention mittels UV-Detektor (Knauer Y 76) bei 210 nm detektiert. Die zu untersuchenden Verbindungen und der interne Standard wurden ihren Retentionszeiten zugeordnet. Das Detektorsignal wurde mit einem Integrator (Shimadzu CR6A) ausgewertet. Die Probenkonzentrationen wurden aus den Verhältnissen der Peakhöhen des internen Standards und des L365.260 der Probe im Vergleich zu den Peakhöhenverhältnissen der Standardproben ermittelt.

Zur Bestimmung von L365.260 aus Gehirngewebe wurde wegen des hohen Lipidanteiles eine Festphasenextraktion angewendet. Dazu wurde das Gewebe mit Wasser, dem eine definierte Menge Diazepam (interner Standard) zugegeben wurde, mit einem Ultra-Turrax homogenisiert und zentrifugiert. Der Überstand wurde auf eine konditionierte C18 Festphasenextraktionssäule gegeben und die Säule mit 1 ml Wasser gewaschen. Anschließend wurde das L365.260 sowie der

interne Standard mit 2 x 500 µl Methanol eluiert, das Methanol eingengt und der Rückstand im Eluent rekonstituiert und über das Probenaufgabeeventil in die HPLC injiziert.

3.10 Histologische Kontrolle der zentralen Applikationen

Um die korrekte Lage der Injektionskanülen der zentralen Applikationen (i.c.v. und i.h.) zu überprüfen, wurden nach dem Töten der Tiere die Gehirne frisch entnommen und für die histologische Untersuchung präpariert.

Die Gehirne wurden in 10 %iger Formalinlösung acht Tage fixiert. Auf einem Gefriermikrotom (Eigenbau) wurden die Gehirne nach vollständigem Durchfrieren in 60-90 µm dicke transversale Scheiben geschnitten und die Lage und Tiefe des Einstichkanales und somit der Ort der Substanzapplikation mikroskopisch überprüft. Die Positionen wurden anschließend in einem der Schnittebene entsprechenden Raster von Hirnschnitten gemäß eines stereotaktischen Atlanten (Paxinos und Watson, 1986) dokumentiert.

Tiere, bei denen die Applikation nicht in die gewünschte Struktur erfolgte, wurden von der Auswertung ausgeschlossen.

3.11 Kontrolle der Vagotomie

Da es erst post mortem mit Hilfe der Lupenkontrolle möglich war den Operationserfolg zu beurteilen, wurde geprüft, ob eine Methode entwickelt werden kann, die eine verlässliche in vivo-Beurteilung des Operationserfolges und somit eine fehlerfreie Bestimmung der Gruppeneinteilung und Gruppengröße ermöglicht.

Zur Zeit gibt es mehrere Methoden, um die Läsion des Nervus vagus post mortem festzustellen. Eine Methode, die es ermöglicht, den Operationserfolg bereits am lebenden Tier vor dem Versuch beurteilen zu können, gibt es jedoch zur Zeit nicht. Wir haben deshalb mehrere methodische Ansätze auf ihre Durchführbarkeit und ihren Aussagewert hin überprüft, um eventuell eine Methode der in vivo-Beurteilung etablieren zu können. Die Ergebnisse der Untersuchungen der einzelnen Ansätze wurden mit den Ergebnissen einer gängigen post mortem-Beurteilung verglichen.

Die Kontrolle am lebenden Tier erfolgte 4 Wochen nach der Operation der Tiere (28. und 29. Tag).

3.11.1 Subjektive Beurteilung der lebenden Tiere

Da bei vagotomierten Tieren die Passagezeit der Ingesta verlängert ist, staut sich im Magen Chymus an und führt so zu einer Dilatation des Magens. Diese führt zu einer Asymmetrie der Körperform der Tiere, die bei bloßer Betrachtung wahrnehmbar ist.

Dazu wurde jedes einzelne scheinvagotomierte und vagotomierte Tier subjektiv vom Untersucher beurteilt, die Asymmetrie der Körperform metrisch und fotografisch festgehalten und dokumentiert. Das Ergebnis dieser subjektiven Beurteilung wurde am Tötungstag mit den Magengewichten (siehe Anhang B) verglichen.

3.11.2 Fotografische Beurteilung der lebenden Tiere

Um die Asymmetrie der Tiere metrisch erfassen zu können, wurden einige Tiere stichprobenartig vor einem neutralen Hintergrund fotografiert, wobei unterschiedliche Haltungen der Tiere ausprobiert wurden. Am aussagefähigsten waren die Bilder, auf denen die Tiere mit beiden Vorderpfoten an einem horizontal gehaltenem Stab hängend von ventral zu sehen waren. Die metrische Erfassung der Asymmetrie mit Hilfe eines Auswerterasters und die anschließende Auswertung mit Hilfe eines Computerprogramms (Sigmascan[®], Jandel Scientific Software, USA) führte nicht zu objektiven Ergebnissen.

3.11.3 Vermessung der lebenden Tiere

Desweiteren wurden die Körperparameter: Körpergewicht, Körperlänge (Nasenspitze bis Schwanzansatz), Körperumfang und Körperbreite (jeweils unmittelbar caudal des Processus xiphoideus) der Tiere am Kontrolltag erfaßt und auf ihre Aussagefähigkeit überprüft. Folgende Quotienten wurden berechnet: 1. der Quotient aus Körperumfang und Körpergewicht, 2. der Quotient aus Körperlänge und Körpergewicht und 3. der Quotient aus Körperbreite und Körperlänge. Alle Werte wurden mit dem Faktor 100 multipliziert (siehe Anhang A, Tabellen I und II).

3.11.4 Fütterungsversuch

Zehn Wochen nach dem Operationstag wurde eine etablierte Methode für die Kontrolle des Vagotomieerfolges verwendet. Dazu wurde sowohl den vagotomierten als auch den scheinvagotomierten Tieren für 24 Stunden das Futter, bei freier Verfügung von Wasser, entzogen. Anschließend wurde den Tieren für eine Stunde eine definierte Futtermenge, bestehend aus 4 Gramm feingemahlenem Standardfutter vermischt mit der gleichen Menge Wasser, angeboten.

Die Tiere wurden eine Stunde nach diesem Versuch, in dem sie die angebotene Futtermenge aufgenommen hatten, getötet. Es wurde das Körpergewicht der Tiere festgestellt. Ferner wurde den Tieren der Magen entnommen und dieser in vollem sowie entleertem Zustand gewogen und daraus das Gewicht des Mageninhaltes und das prozentuale Gewicht des gefüllten Magens zum Gesamtkörpergewicht berechnet.

3.11.5 Lupenkontrolle post mortem

Allen vagotomierten und scheinvagotomierten Tieren wurde nach Tötung der abdominale Anteil des Oesophagus (Pars abdominalis oesophagei) herauspräpariert und mit Hilfe einer Lupe (siehe Punkt 3.4.2.3) kontrolliert. Dabei wurde der Bereich des Ösophagus, an dem die Vagotomie durchgeführt worden war, auf nichtlädierte, übersehene bzw. wieder zusammengewachsene Äste des Nervus vagus hin untersucht. Das Ergebnis dieser Standard-post mortem-Beurteilungsmethode wurde als Referenz für die Beurteilung der Ergebnisse der unter Punkt 3.11 beschriebenen in vivo Methode genommen.

Von exemplarisch ausgewählten vagotomierten und scheinvagotomierten Tieren wurde post mortem der Magen in situ fotografiert (siehe Bilder 4-3 und 4-4) und versucht, die Bilder mit Hilfe eines Auswerterastrars auszuwerten. Auch diese Methode eignete sich nicht für eine metrische Erfassung und wurde nicht weiter verfolgt.

3.12 Statistische Methoden

Versuchsergebnisse von Tieren, bei denen die zentrale Struktur, der Ventrikel bzw. der Hippokampus, nicht eindeutig getroffen war, wurden von der Auswertung ausgeschlossen. Tiere, die während der Versuche vom Elevated-plus-maze heruntersprangen, wurden ebenfalls von der Auswertung ausgeschlossen. Da die Werte des Grundantwortverhaltens von Kontrollen, die unter gleichen Bedingungen durchgeführt wurden, stabil waren, wurden sie für mehrere Versuche gepoolt.

Die Anzahl der Tiere, die im Konflikt-Test Futter aufnahmen sind dargestellt als prozentualer Anteil der Tiere der Versuchsgruppe. Die Daten der lokomotorischen Aktivität im Open-field und auf dem Elevated-plus-maze sowie die Aufenthaltsdauern auf den offenen Armen des Elevated-plus-maze, sind dargestellt als Mittelwert und Standardfehler des Mittelwerts (SEM). Vor der weiteren statistischen Auswertung wurden die Werte auf Normalverteilung und gleiche Varianzen hin geprüft.

Beim Konflikt-Test wurden die prozentualen Unterschiede zwischen den Gruppen der Tiere, die Futter aufnahmen, mit dem exakten Verfahren nach Fischer berechnet. Unterschiede in der

lokomotorischen Aktivität wurden mit der ONE-WAY-ANOVA mit anschließendem Dunnetts-Test berechnet.

Für alle Vergleiche im Elevated-plus-maze wurde die ONE-WAY-ANOVA mit anschließendem Dunnetts-Test verwandt.

Unterschiede mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $p < 0,05$ wurden als signifikant angesehen. Das gleiche gilt für die Berechnungen, die mit den in den Versuchen mit vagotomierten und scheinvagotomierten Tieren gewonnenen Ergebnissen durchgeführt wurden.