

3. EIGENE UNTERSUCHUNGEN

3.1. Material und Methoden

3.1.1. Versuchstiere

Für die Experimente wurden männliche Ratten der folgenden Stämme bzw. Zuchtlinien verwendet:

Fischer-Ratten	- F344/NHsd	(Harlan Winkelmann GmbH, Borchon)
	- F344/Mol	(Tierzucht Schönwalde GmbH, Schönwalde)
	- CDF [®] [F-344]/Crl BR	(Charles River Wiga GmbH, Sulzfeld)
Wistar-Ratten	- HsdCpd:WU	(Harlan Winkelmann GmbH, Borchon)
	- Crl:[WI] BR	(BgVV, Berlin).

Die Tiere wurden vom Züchter gekauft und hatten 10 bis 14 Tage nach Anlieferung Zeit, sich an die neuen Haltungsbedingungen zu gewöhnen, bevor mit den Verhaltenstests begonnen wurde. Für die Untersuchung über den Einfluß der Aufzuchtbedingungen wurden zusätzlich trächtige Muttertiere der drei Fischer-Zuchtlinien (Winkelmann, Schönwalde, Charles River) gekauft. Die Nachzucht wurde im institutseigenen Tierstall geboren und aufgezogen.

Je fünf Tiere wurden in Makrolon-Standardkäfigen Typ IV (40 cm x 60 cm x 25 cm) unter einem künstlichen Lichtregime mit der hellen Phase von 6.00 bis 18.00 Uhr gehalten. Die Lichtintensität im Tierstall maß im Mittel 170 lx. Die Raumtemperatur betrug 22 ± 2 °C und die relative Luftfeuchtigkeit 60 ± 5 %. Wasser und Standardpellets von Altromin[®] 1324 (Lage, Deutschland) standen ad libitum zur Verfügung.

Zum Zeitpunkt der Untersuchung waren die Tiere durchschnittlich 8 Wochen alt, wobei die Fischer-Ratten $228,2 \pm 1,0$ g, die Wistar/Winkelmann-Ratten $258,2 \pm 2,8$ g und die Wistar/BgVV-Ratten $264,8 \pm 3,6$ g wogen. Alle Tiere wurden in den Verhaltensversuchen nur einmal verwendet.

Die Durchführung der in dieser Arbeit vorgestellten Tierversuche wurde unter der Tierversuchsnummer G 0423/96 des Landesamtes für Arbeitsschutz, Gesundheitsschutz und technischer Sicherheit in Berlin genehmigt.

3.1.2. Verwendete Substanzen

Tab. 2: Verwendete Substanzen

Substanz	Hersteller/Bezugsquelle
<i>Diazepam</i> Diazepam-Ratiopharm [®] 10 - Injektionslösung	Ratiopharm GmbH (Ulm, Deutschland)
<i>8-OH-DPAT</i> ¹⁾ 8-Hydroxy-2-(Di-N-Propylamino)Tetralin HBr - Reinsubstanz	Research Biochemicals International (Natick, USA)
<i>Ritanserlin</i> ^{1) 2)} 6-(2-[4-(bis[4-Fluorophenyl]methylen)-1-piperidinyl]-ethyl)-7-methyl-5H-thiazolo(3,2-a)pyrimidin-5-on - Reinsubstanz	Research Biochemicals International (Natick, USA)
<i>Natriumchlorid (Kochsalz)</i> ¹⁾ NaCl - Reinsubstanz	Merck KGaA (Darmstadt, Deutschland)

Verwendete Substanzen und deren Hersteller. Das Natriumchlorid wurde 0,9 % in zweifach destilliertem Wasser gelöst. 8-OH-DPAT und Ritanserlin sowie die DiazepamLösung wurden in physiologischer Kochsalzlösung gelöst bzw. suspendiert.

¹⁾ Es wurde ein Tropfen CremophorEL (BASF Generics GmbH, Ismaring, Deutschland) zur besseren Suspension hinzugefügt.

²⁾ Die Lösung wurde im Wasserbad bei 60 °C erwärmt.

Sowohl bei den Kontrolltieren, die mit 0,9 %iger Kochsalzlösung vorbehandelt wurden, als auch bei den Testtieren betrug das Injektionsvolumen 1 ml/kg Körpergewicht. Alle Injektionen erfolgten intraperitoneal (i.p.).

Die in den analytischen Untersuchungen verwendeten Substanzen wurden, wenn nicht anders vermerkt, von den Firmen Merck KGaA (Darmstadt, Deutschland) oder Sigma (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen, Deutschland) bezogen.

In Vorversuchen konnte gezeigt werden, daß das Lösungsmittel von Diazepam, bestehend aus Benzoesäure, Benzylalkohol, Natriumbenzoat, Propylenglykol, Ethanol (13,12 Vol.-%) und Wasser für Injektionszwecke, keine Eigenwirkung hatte und somit auf 0,9 % Kochsalzlösung als Kontrollsubstanz zurückgegriffen werden konnte (Rex, persönliche Mitteilung).

3.1.3. Verhaltenspharmakologische Untersuchungen

3.1.3.1. Versuchsdurchführung

Die Versuche wurden vormittags zwischen 8.00 und 12.00 Uhr durchgeführt. Nach dem Transport vom Tierstall in einen stillen Vorraum hatten die Tiere eine Stunde bis zum Versuchsbeginn Zeit, sich zu beruhigen. Die Versuchsaapparaturen befanden sich in einer schallgeschützten Untersuchungskammer (1,70 m x 1,90 m x 2,40 m). Die Versuche konnten vom Versuchsdurchführenden über eine in der Untersuchungskammer befindlichen Videokamera (Panasonic WV-BL200, Japan), die an einen außerhalb der Kammer angebrachten Monitor (Panasonic CTI, Japan) angeschlossen war, überwacht werden. Gleichzeitig wurden die Versuche mittels eines Videorecorders (Panasonic NV S90 HQ, Japan) aufgezeichnet.

Um die Ergebnisse der Untersuchungen zu objektivieren, erfolgte die Auswertung des Verhaltens mit Hilfe eines Computer-gestützten Systems (CPL Systems Video Track, Version 2.16, England).

Die Versuchsdauer betrug in allen Verhaltenstests 5 min. Zwischen den einzelnen Testdurchläufen wurden die Apparaturen mit 50 %igem Propanol (Meliseptol[®], B. Braun Melsungen AG, Deutschland) gereinigt und anschließend trockengewischt.

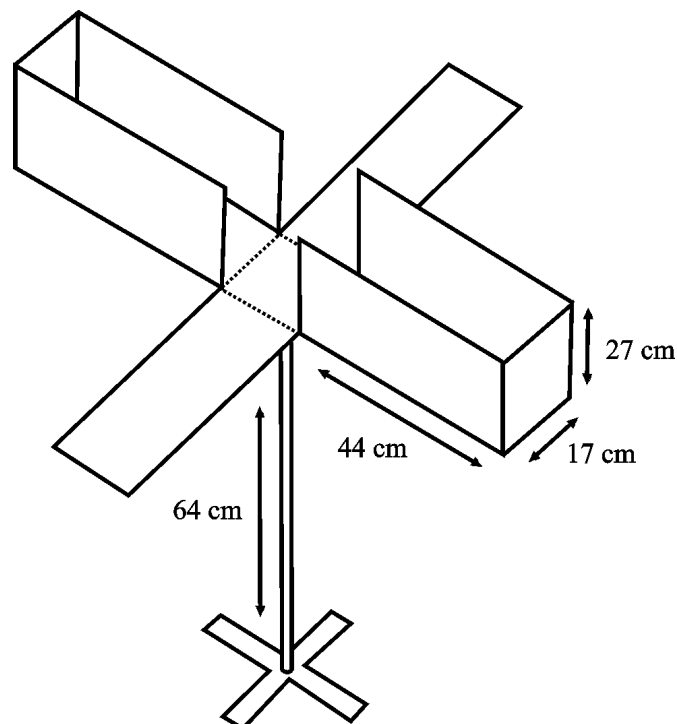
3.1.3.2. Verwendete Verhaltenstests

Der Elevated plus maze-Test

Der Elevated plus maze-Test nutzt die natürliche Angst der Ratten vor erhöhten, offenen Flächen aus. Das Elevated plus maze (Abb. 4) ist ein 64 cm erhöht gelagertes, horizontales Kreuz aus braunem, 6 mm dickem Perspex. Zur besseren Trittsicherheit der Tiere wurde der Boden mit schwarzem, genopptem (Noppenhöhe < 0,5 mm) Linoleum ausgelegt. Jeder Arm des Kreuzes ist 44 cm lang und 17 cm breit. Zwei der gegenüberliegenden Arme sind von einer 27 cm hohen Umrandung aus grauem Perspex begrenzt und werden im weiteren Text als ‚geschlossene Arme‘ bezeichnet. Die übrigen beiden Arme besitzen keine Begrenzung und werden im folgenden ‚offene Arme‘ genannt. Die vier Arme umschließen ein 17 cm x 17 cm großes Zentrum.

Die Untersuchungskammer, in der sich die Apparatur befand, wurde mit drei 100 Watt-Lampen so ausgeleuchtet, daß in den offenen Armen eine Lichtintensität von 210 lx, in den geschlossenen Armen von 60 lx und im Zentrum eine Lichtstärke von 140 lx erreicht wurde. Durch die hohe Beleuchtungsintensität wurde die Aversion der Tiere gegenüber den offenen Armen gesteigert.

Abb. 4: Das Elevated plus maze



Zu Beginn des Versuches wurde das zu untersuchende Tier diagonal auf das Zentrum des Kreuzes gesetzt, somit sollte eine Manipulation des Tieres, welchen Arm es zuerst betritt, vermieden werden.

Folgende Parameter wurden erfaßt:

1. Die Anzahl der Eintritte sowohl in die offenen Arme als auch in die geschlossenen Arme. Daraus wurde der prozentuale Anteil der Eintritte in die offenen Arme zu den Gesamteintritten berechnet. Als Eintritt in einen Arm wurde nur der gewertet, bei dem sich das Tier mit allen vier Pfoten auf dem Arm befand.
2. Die verbrachte Zeit auf den offenen Armen in Sekunden.

3. Die Anzahl der Head dips (d.h. das Hinunterbeugen in die Tiefe über die Ränder der offenen Arme).
4. Die Anzahl der SAPs (= Stretch Attend Postures; d.h. das Strecken vom sicheren geschlossenen Arm in den aversiven offenen Arm).
5. Die Anzahl der Rearings (d.h. das Aufrichten der Tiere, wobei beide Vorderpfoten vom Boden abgehoben sein müssen).
6. Die zurückgelegte Distanz in Metern.

Die Eintritte in die offenen Arme in Prozent zu den Gesamteintritten sowie die Zeit in den offenen Armen gehören zu den klassischen Parametern, die das Angstverhalten beschreiben. Zu den ethologischen Parametern werden die Anzahl der Head dips und die Anzahl der SAPs gezählt. Das bedeutet, daß ängstliche Tiere die offenen Arme seltener betreten und weniger Zeit auf den offenen Armen verbringen. Dieses Verhalten wird von einer niedrigen Anzahl an Head dips und einer erhöhten Anzahl an SAPs verdeutlicht. Angstlose Tiere dagegen betreten die offenen Arme häufiger und für eine längere Zeit.

Die Anzahl der Rearings und die zurückgelegte Distanz beschreiben die vertikale bzw. horizontale Bewegungsweise. Die motorische Aktivität ist unabhängig vom Angstverhalten zu werten.

Der Black and white Box-Test

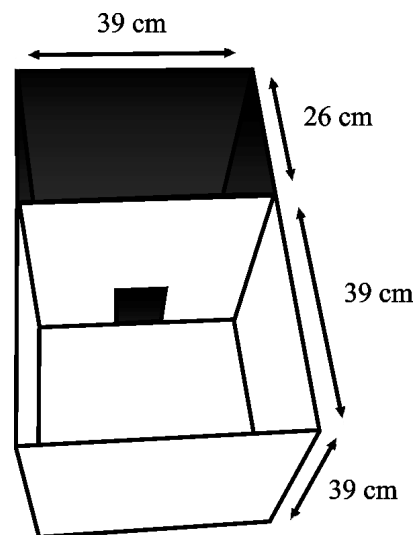
Der Black and white box-Test nutzt die natürliche Angst der Ratten vor offenen, hell ausgeleuchteten Räumen aus. Die Apparatur (Abb. 5) besteht aus einem kleineren (39 cm x 26 cm x 39 cm), schwarzen und aus einem größeren (39 cm x 39 cm x 39 cm), weißen Kompartiment (Material Perspex), verbunden durch eine 12 cm x 8 cm große Öffnung.

Um den aversiven Effekt des weißen Kompartimentes zu erhöhen, wurde dieses mit einer 60 Watt-Lampe direkt ausgeleuchtet (270 lx). Das schwarze Kompartiment dagegen wurde nur durch eine Rotlichtlampe erhellt (30 lx). Beide Lampen waren mittels eines Metallgestänges 10 cm oberhalb der Apparatur angebracht. Beide Kompartimente sind nach oben hin offen, so daß das Verhalten der Ratte über eine Videokamera außerhalb der Untersuchungskammer beobachtet werden konnte.

Zu Beginn des Tests wurde das Versuchstier in eine der Durchtrittsöffnung entfernten Ecke des weißen Kompartimentes gesetzt; der Kopf des Tieres zeigte dabei in Richtung der Ecke. Folgende Parameter wurden gemessen:

1. Die Zeit bis zum ersten Wiedereintritt in das weiße Kompartiment in Sekunden.
2. Die verbrachte Zeit im weißen Kompartiment in Sekunden.
3. Die Anzahl der Wechsel zwischen dem weißen und dem schwarzen Kompartiment.
4. Die Anzahl der SAPs (hier: Das Strecken vom geschützten schwarzen Kompartiment in das hell erleuchtete weiße Kompartiment).
5. Die Anzahl der Rearings.
6. Die zurückgelegte Distanz in Metern.

Abb. 5: Die Black and white box



Die Zeit bis zum ersten Wiedereintritt in das weiße Kompartiment und die verbrachte Zeit in dem weißen Kompartiment werden in diesem Test als die klassischen Parameter des Angstverhaltens bewertet. Dabei werden Tiere als weniger ängstlich angesehen, wenn die Zeit bis zum Wiedereintritt verkürzt und die verbrachte Zeit im weißen Kompartiment verlängert ist. Die Wechsel zwischen den Kompartimenten und die Anzahl der SAPs gehören wiederum zu den ethologischen Parametern. Häufige Wechsel zwischen den Kompartimenten und eine niedrige Anzahl der SAPs bestätigen ein wenig ängstliches Verhalten.

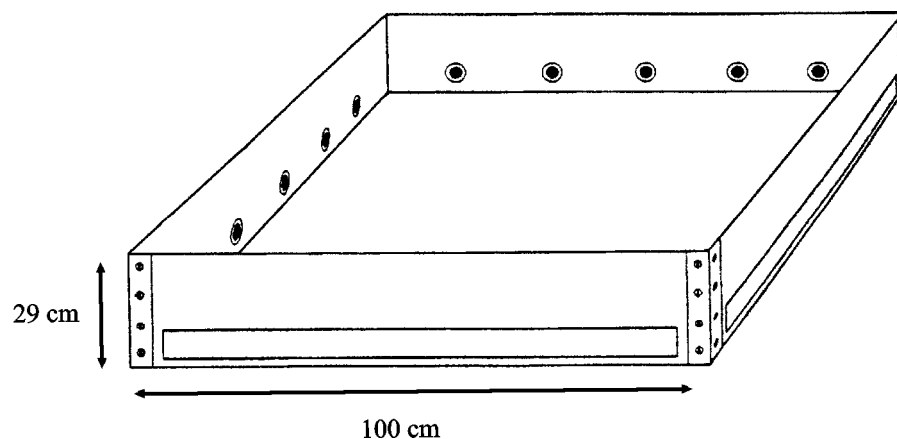
Wie auch im Elevated plus maze-Test zählen die Anzahl der Rearings und die zurückgelegte Distanz zu den Parametern zur Beurteilung der motorischen Aktivität.

Der modifizierte Open field-Test

Für diesen Test wurde den Ratten 16 Stunden vor Versuchsbeginn das Futter entzogen, Wasser stand ihnen weiterhin ad libitum zur Verfügung. Im modifizierten Open field-Test wurde den Tieren in der Mitte der Apparatur Futter dargereicht. Damit erzeugte man bei den hungrigen Ratten einen Konflikt zwischen dem Verlangen, Futter aufzunehmen und der natürlichen Angst der Tiere, die ungeschützte Mitte der Apparatur zu betreten.

Das Open field (Abb. 6) hat eine quadratische Grundfläche von 100 cm x 100 cm, ist von vier 29 cm hohen Wänden umgeben und besteht aus weiß gestrichenem Holz. Um die Abneigung der Tiere gegen die offene Fläche zu erhöhen, wurde das Open field mit Hilfe mehrerer indirekter Lichtquellen hell ausgeleuchtet, so daß eine Lichtintensität von 400 lx erreicht wurde. In der Mitte des Open field wurde eine Petrischale (Durchmesser 8 cm) gestellt, die mit dem gewohnten Standardfutter gefüllt war. Um die Lokomotion zu messen, sind an den Wänden jeweils fünf Infrarot-Lichtschranken in einem Abstand von 16,5 cm und 5 cm über dem Boden angebracht worden. Eine mehrfache Unterbrechung der Lichtschranken durch Dreh- oder Putzbewegungen wurde durch eine Blockierschaltung verhindert.

Abb. 6: Das Open field



Zu Versuchsbeginn wurden die Tiere in eine dem Versuchsdurchführenden zugewandten Ecke des Open field gesetzt. Es wurden folgende Parameter erfaßt:

1. Die Zeit in Sekunden, die die Tiere bis zur ersten Futteraufnahme benötigten.
2. Die Anzahl der Rearings.
3. Die Anzahl der Unterbrechungen der Infrarot-Lichtschranken.

Die Zeit bis zur ersten Futteraufnahme ist der beste Parameter, mit dem das Angstverhalten beurteilt werden kann. Tiere, die schneller in das Innere des Open field treten, um das dargereichte Futter aufzunehmen (die Verweildauer an der Petrischale mußte mindestens drei Sekunden betragen), werden als weniger ängstlich angesehen. Die motorische Aktivität wurde anhand der Anzahl der Rearings und der Unterbrechungen der Lichtschranken gemessen.

3.1.3.3. Versuchsanordnung

1. Versuchsreihe

In der ersten Versuchsreihe wurde der Einfluß der unterschiedlichen Aufzuchtbedingungen auf das Angstverhalten von Ratten untersucht. Dazu wurde das Verhalten von gekauften Fischer-Ratten der Zuchtlinien Winkelmann, Schönwalde und Charles River mit dem Verhalten von im institutseigenen Tierstall aufgezogenen Fischer-Ratten der oben genannten Zuchtlinien verglichen. Die Tiere wurden unbehandelt im Elevated plus maze-, im Black and white box- und im modifizierten Open field-Test untersucht. Die Gruppengröße schwankte aufgrund der unterschiedlichen Wurfgrößen zwischen 6 und 15 Tieren.

2. Versuchsreihe

In der zweiten Versuchsreihe wurde die Wirkung von Diazepam, 8-OH-DPAT und Ritanserin auf das Angstverhalten unterschiedlicher Rattenstämme bzw. Zuchtlinien überprüft. Diese Untersuchungen wurden an Fischer/Winkelmann-, Wistar/Winkelmann- und Wistar/BgVV-Ratten durchgeführt (Tab. 3).

Die Wirkungen von Diazepam (0,5-4,0 mg/kg) und 8-OH-DPAT (10-100 µg/kg) wurden an den drei Versuchsgruppen in den unter 3.1.3.2. beschriebenen Verhaltenstests untersucht. Die Wirkung von Ritanserin (0,3-3,0 mg/kg) wurde dagegen nur im Elevated plus maze-Test überprüft (Tab. 3). Die Größe der Versuchsgruppen wurde für jede Dosis auf zehn Tiere festgesetzt. Die Behandlung und der Tiereinsatz wurden randomisiert. Da die Durchführung der Versuche mit Diazepam und 8-OH-DPAT mehrere Tage in Anspruch nahm, wurden insgesamt 20 Kontrolltiere je Verhaltenstest und Rattenstamm bzw. -zuchtlinie mitgeführt. Die Versuche mit Ritanserin fanden zu einem späteren Zeitpunkt statt, so daß eine weitere Kontrollgruppe von 10 Tieren je Rattenstamm bzw. -zuchtlinie benötigt wurde.

Die nachfolgende Tabelle (Tab. 3) gibt einen Überblick über die verwendeten Substanzen, die Vorbehandlungszeiten und Dosierungen sowie die jeweils verwendeten Versuchstiere und Verhaltenstests.

Tab. 3: Versuchsanordnung

Behandlung	VZ	Dosierung	Versuchstiere	Verhaltenstest
Diazepam	30 min	0,5/1,0/2,0 mg/kg	Fi/Wi	PM, BWB, mOF
		1,0/2,0/3,0/4,0 mg/kg	Wi/Wi	PM, BWB, mOF
		1,0/2,0/3,0 mg/kg	Wi/BgVV	PM, BWB, mOF
8-OH-DPAT	25 min	10/30/100 µg/kg	Fi/Wi, Wi/Wi, Wi/BgVV	PM, BWB, mOF
Ritanserin	30 min	0,3/1,0/3,0 mg/kg	Fi/Wi, Wi/Wi, Wi/BgVV	PM

Verwendete Substanzen, Vorbehandlungszeit (VZ), Dosierung, Versuchstiere und verwendete Verhaltenstests.

Fi/Wi = Fischer/Winkelmann, Wi/Wi = Wistar Winkelmann, Wi/BgVV = Wistar/BgVV, PM = Elevated plus maze, BWB = Black and white box, mOF = modifiziertes Open field.

3.1.4. Analytische Untersuchungen

3.1.4.1. Bestimmung der Konzentration von Diazepam und drei seiner Metaboliten im Blutplasma

Es wurden je zehn Ratten von Fischer/Winkelmann, Wistar/Winkelmann und Wistar/BgVV untersucht. Den Tieren wurde Diazepam in einer Dosis von 2,0 mg/kg i.p. appliziert und nach 30 min intrakardial Blut entnommen; dieser Zeitraum entspricht der Vorbehandlungszeit, nach deren Ablauf die Tiere in den Verhaltenstests untersucht wurden. Zuvor wurden die Tiere mit Isofluran (Forene[®], Abbott GmbH, Deutschland) narkotisiert. Der Brustkorb wurde entlang des Brustbeins eröffnet, damit das Blut unter Sichtkontrolle mit einem Blutentnahmesystem aus der linken Herzkammer entnommen werden konnte. Das Blutentnahmesystem bestand aus einer 2,7 ml s-Monovette[®] KE mit Kalium-EDTA (1,6 mg/ml) und einer Kanüle mit einer Stärke von 0,9 mm x 38 mm, (beides Sarstedt AG&Co., Deutschland). Das Blut wurde zur Gewinnung von Plasma in einer Tischzentrifuge (BR4 i, Rotor S40, Jouan GmbH,

Deutschland) bei 4 °C und 4100 rpm für 30 min zentrifugiert. Das überständige Blutplasma wurde in 0,5 ml Portionen in 2 ml-Eppendorf-Röhrchen überführt und bei –22 °C gelagert.

Probenaufbereitung des Blutplasmas

Für die Extraktion von Diazepam und drei seiner Metaboliten (N-Desmethyldiazepam, Temazepam und Oxazepam) wurden die Plasmaproben aufgetaut, mit 50 µl einer Lösung von 100 ng Chlordiazepoxid in Methanol/Wasser (50/50) als interner Standard versetzt und 50 µl 0,125 M Natriumtetraborat-Lösung (pH = 9,5) zugefügt. Nach Zugabe von 1 ml Dichlormethan wurden die Röhrchen auf einem Vortex VF 2 (IKA-Labortechnik, Staufen, Deutschland) für 30 s geschüttelt und anschließend zur Phasentrennung bei 4 °C und 17000 rpm 10 min zentrifugiert. Waren die Phasen infolge von Gelbildung beim Schütteln nicht ausreichend getrennt, wurden die Röhrchen in einer Eis-Kochsalz-Kältemischung eingefroren und nochmals zentrifugiert. Während der Zentrifugation tauten die Proben auf und die Phasen trennten sich. Die Oberphase (Plasma) und die weiße Zwischenschicht wurden mit einer Wasserstrahlpumpe abgesaugt und verworfen. Das verbleibende Dichlormethan mit dem gelösten Diazepam und seinen Metaboliten wurde in ein neues Eppendorf-Gefäß umgefüllt. Anschließend wurden die Extrakte im Stickstoffstrom bei Raumtemperatur eingedampft und bei –22 °C im Tiefkühlschrank (nicht länger als 6 h) gelagert.

HPLC (High Performance Liquid Chromatography)-Methode zur Bestimmung von Diazepam, N-Desmethyldiazepam, Temazepam und Oxazepam im Blutplasma

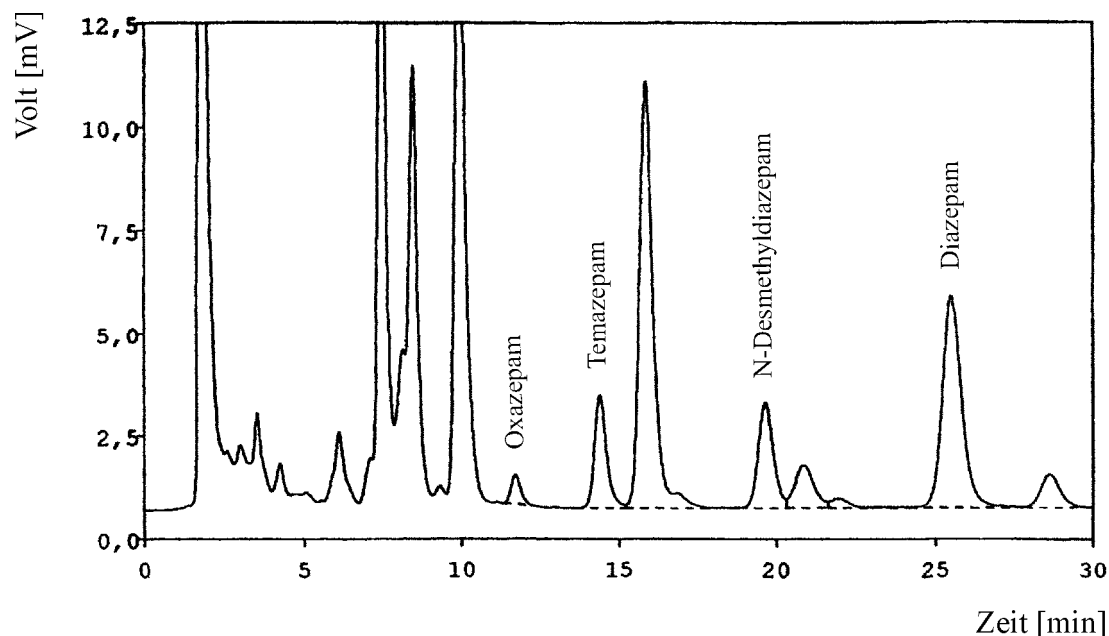
Die Bestimmung der Konzentration von Diazepam und seiner Metaboliten im Blutplasma erfolgte mit der HPLC und UV-Detektion (in Anlehnung an Azzam et al., 1998).

Unmittelbar vor der HPLC-Analyse wurden die getrockneten Extrakte in 50 µl Laufmittel aufgenommen, kurz auf dem Vortex VF 2 (IKA-Labortechnik, Staufen, Deutschland) geschüttelt und 225 µl mit einem Injektionsventil RH 8125 (Rheodyne, USA) in das HPLC-System eingespritzt. Die Trennung erfolgte auf einer Inertsil ODS-2-Säule (VDS-Optilab, Deutschland): Partikelgröße 5 µm, 200 mm Länge, 4 mm Durchmesser, mit einer Vorsäule von 10 mm Länge und einem Durchmesser von 2 mm, sowie mit einer Fließgeschwindigkeit von 0,25 ml/min. Die mobile Phase bestand aus 20 mM Natriumphosphat (pH = 4,6), Azetonitril und Isopropanol (Volumenverteilung: 680/170/150 ml). Die Temperatur wurde auf 40 °C gehalten. Zur Förderung des Laufmittels wurde eine Pumpe RHEOS 4000 (Flux, Deutschland) bei einem Druck von 135 bar verwendet. Die Detektion von Diazepam und den

drei Metaboliten erfolgte mit einem Detektor L-4250 (Merck-Hitachi, Deutschland) bei einer Wellenlänge von 232 nm. Oxazepam wurde bei einer Retentionszeit von 11,70 min, Temazepam bei 14,47 min, N-Desmethyldiazepam bei 19,71 min und Diazepam bei 25,64 min gemessen (siehe Abb. 7). Zur Auswertung des Chromatogramms wurde ein Chromatographie-Datensystem CSW (Data Apex, Tschechien) verwendet. Die Bestimmung der Konzentrationen der Komponenten wurde nach der Methode des internen Standards aus den Peakflächenverhältnissen berechnet. Die Konzentrationen wurden in ng/ml Blutplasma angegeben.

Nach der Blutentnahme wurde den Tieren mittels einer selbst konstruierten Guillotine der Kopf abgetrennt. Die Gehirne wurden im Gesamten entnommen und sofort in flüssigem Stickstoff tiefgefroren. Zu einem späteren Zeitpunkt wurden diese Proben für die Untersuchung zum Einfluß von Diazepam auf die zentralen Serotoningehalte weiterverarbeitet (siehe 3.1.4.2.).

Abb. 7: Beispiel eines typischen Chromatogramms



Typisches HPLC-Chromatogramm von einem Plasmaextrakt einer Ratte. Abgebildet sind die Peaks von Diazepam, N-Desmethyldiazepam, Temazepam und Oxazepam.

3.1.4.2. Bestimmung der Gehalte von Serotonin in drei Gehirngebieten

In der ersten Untersuchung wurden die Serotoningehalte in den drei Gehirngebieten, präfrontaler Kortex, Hippokampus und mediane/dorsale Raphe, von jeweils zehn unbehandelten Wistar/Winkelmann-, Fischer/Winkelmann- und Wistar/BgVV-Ratten bestimmt. Zur Einsparung von Versuchstieren wurden Ratten verwendet, die zuvor als Kontrolltiere in den Verhaltenstests dienten. Zwischen dem Verhaltenstest und der Tötung der Tiere lagen mindestens sieben Tage. Am Tag der Tötung waren die Tiere durchschnittlich zehn Wochen alt.

Für die zweite Untersuchung zum Einfluß von Diazepam auf die 5-HT-Gehalte in den drei obengenannten Gehirngebieten wurden die Tiere der Diazepam-Plasmakonzentrationsbestimmung (2,0 mg/kg) verwendet (siehe 3.1.4.1.).

Aufbereitung der Gehirne

Die Gehalte von 5-HT wurden in drei ausgewählten Gehirngebieten (präfrontaler Kortex, Hippokampus und mediane/dorsale Raphe) mittels HPLC bestimmt. Die Gehalte wurden als [nmol] Serotonin/[mg] Protein angegeben. Die Aufbereitung der Gehirne erfolgte in Anlehnung an die Methoden von Palkovits (1973) und Orosco und Mitarbeitern (1990).

Nachdem die Tiere eine einminütige Isofluran-Narkose (Forene[®], Abbott GmbH, Deutschland) erhalten hatten, wurde ihnen anschließend mit einer Guillotine der Kopf abgetrennt. Die Schädeldecke wurde zügig mit einer Schere aufgeschnitten und das Gehirn vorsichtig im Ganzen entnommen. Teile der Medulla oblongata wurden mit dem Skalpell entfernt und anschließend das gesamte Gehirn in einem verschließbaren Plastikbehälter in flüssigem Stickstoff sofort schockgefroren. Die so tiefgefrorenen Gehirne wurden über Nacht in einem Gefrierschrank bei -80 °C aufbewahrt.

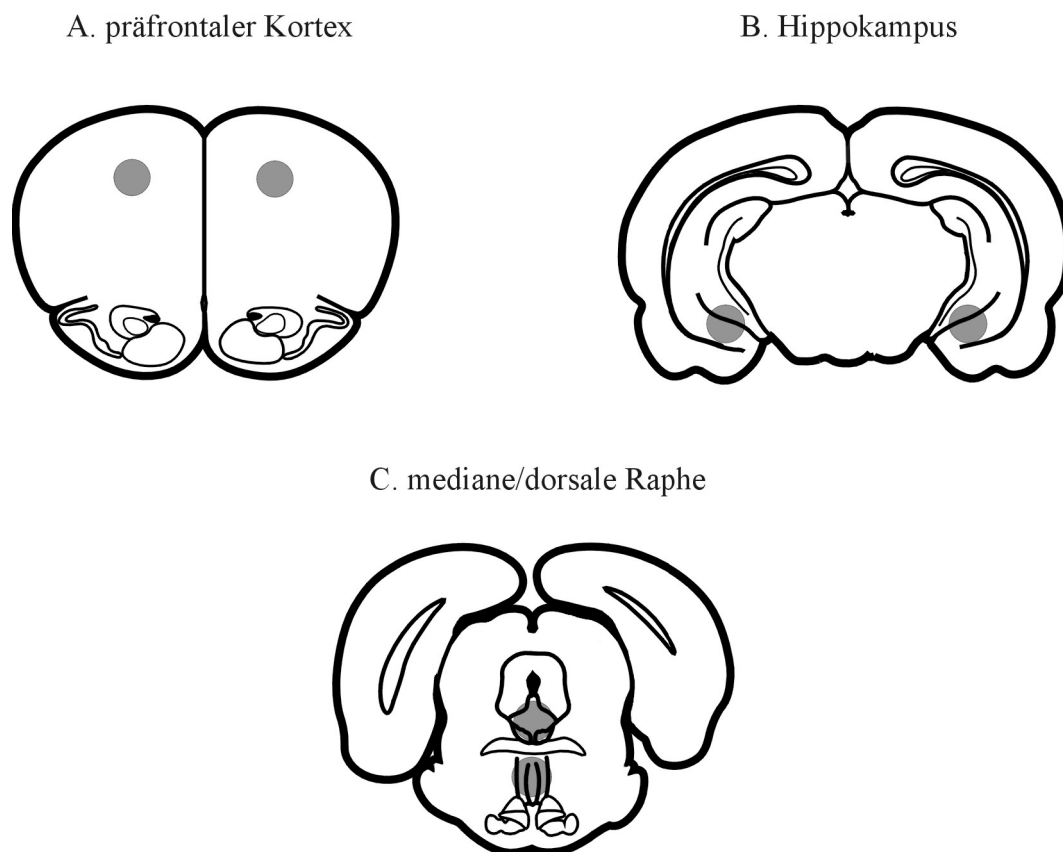
Am darauffolgenden Tag wurden die tiefgefrorenen Gehirnteile den Plastikbehältern entnommen und mit einem Mikrotom (Eigenbau des Institutes), gekühlt mit einem Wasserkühlsystem, von rostral nach kaudal in 1,0 mm dünne Sagittalscheiben geschnitten. In Höhe des präfrontalen Kortex (Interaural 12,2 mm, Bregma 3,2 mm), des Hippokampus (Interaural 3,2 mm, Bregma -5,8 mm) und der medianen/dorsalen Raphe (Interaural 1,2 mm, Bregma -7,8 mm), siehe Paxinos und Watson (1997), wurde jeweils ein 1 mm dicker Schnitt angelegt. Wie in der Abbildung 8 dargestellt, wurden pro Schnitt je zwei Stanzlinge mit Hilfe eines Trokars (Hauptner, Solingen, Deutschland) von 1 mm Durchmesser entnommen.

Die jeweiligen zwei Stanzlinge wurden in ein mit 600 μl eisgekühlter 0,1 M Perchlorsäure (PCA) gefülltes Glasröhrchen gegeben und mit einem Hochleistungs-Ultraschall-Desintegrator (Vibra Cell, Modell VC 50, Sonics & Materials Inc., Danbury, USA) dreimal zwei Sekunden lang homogenisiert.

Von den Homogenaten wurden 200 μl für die Gesamt-Eiweiß-Bestimmung entnommen, in ein 2 ml-Eppendorf-Röhrchen gegeben und bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ tiefgefroren.

Die verbliebenen 400 μl der Homogenate wurden in 2 ml-Eppendorf-Röhrchen umgefüllt und für 10 min bei $5\text{ }^{\circ}\text{C}$ und 14000 rpm in einer Tischzentrifuge (MR 1822, Rotor 74, Jouan GmbH, Deutschland) zentrifugiert. Anschließend wurden die Überstände für die quantitative Serotoninbestimmung abpipettiert (ca. 350 μl) und ebenfalls bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ in 0,5 ml-Eppendorf-Röhrchen tiefgefroren.

Abb. 8: Die untersuchten Gehirnregionen (abgewandelt nach Paxinos und Watson, 1997)



Dargestellt sind die Sagittalschnitte im Bereich des (A) präfrontalen Kortex, (B) Hippokampus und (C) der mediane/dorsalen Raphe. Die grauen Kreise lokalisieren die Gebiete der jeweiligen Stanzungen.

HPLC-Methode zur Bestimmung von Serotonin in Gewebehomogenaten

Die Bestimmung des Gehaltes von 5-HT in den PCA-Extrakten erfolgte mit der HPLC und elektrochemischer Detektion.

Die Überstände nach der Zentrifugation wurden unmittelbar vor der Analyse aufgetaut und ein Volumen von 100 µl mit einem Probeaufgabenventil RH 7125 (Rheodyne, USA) in die HPLC injiziert. Die chromatographische Trennung erfolgte auf einer Säule GROM-Symbasic C18 (GROM, Deutschland), 125 mm lang, 4 mm Durchmesser, 5 µm Partikelgröße, bei einer Fließgeschwindigkeit von 1 ml/min. Die mobile Phase hatte die Zusammensetzung: 0,1 M NaH₂PO₄, 1 mM EDTA-Dinatriumsalz, 0,73 mM Octansulfonsäure-Natriumsalz. Der pH-Wert wurde mit 1 M NaOH auf 5,35 eingestellt. Dieser Pufferlösung wurden 3 Gewichtsprozent 2-Propanol zugefügt.

Zur Förderung des Laufmittels wurde eine Pumpe M 480 (Gynkotec, Deutschland) mit zusätzlichem Pulsationsdämpfer verwendet. Serotonin wurde mit einer amperometrischen Meßzelle (Chromsystems, Deutschland) bei einem Potential von 0,7 V und einem Detektor EP 30 (Gynkotec, Deutschland) detektiert; die Elution von 5-HT erfolgte bei 7,5 min. Die Eichung wurde mit Stammlösungen von 10⁻⁸ M in 0,1 M PCA durchgeführt.

Zur Auswertung der Chromatogramme wurde ein Chromatographie-Datensystem (Chrom-A-Dat, Israel) benutzt. Die Gehalte von 5-HT wurden aus der Peakfläche in µmol/l berechnet.

Methode zur Bestimmung von Gesamt-Eiweiß nach Folin-Ciocalteu, modifiziert nach Lowry

Die Konzentration des Gesamt-Eiweißes in den Homogenaten wurde nach der von Lowry modifizierten Methode von Folin-Ciocalteu bestimmt.

Die tiefgefrorenen Proben wurden vor der Analyse aufgetaut und die gesamten 200 µl Homogenat wurden mit 600 µl 0,9 %iger NaCl-Lösung verdünnt. Je 400 µl der so hergestellten Verdünnung wurden für einen doppelten Probenansatz in ein 5,0 ml Cryoröhrchen (Roth, Karlsruhe, Deutschland) überführt und mit 2 ml Folin-Gebrauchslösung versetzt. Dieser Ansatz wurde mit einem Vortex VF 2 (IKA-Labortechnik, Staufen, Deutschland) homogenisiert und für 10 min Reaktionszeit stengelassen. Die Gebrauchslösung wurde am Tag der Analyse aus 2 %iger 0,189 M Natrium-Sulfat-Lösung, 1 %iger 0,04 M Kupfer-Sulfat-Lösung und 2 %iger 0,071 M Kalium-Natrium-Tartrat-Lösung frisch angesetzt.

Nach der Reaktionszeit wurden 200 µl 1 N Phenol-Reagenz nach Folin-Ciocalteu hinzugefügt und durch Schwenken gut gemischt. Nach 45 min wurde die Extinktion mit einem

Spektrophotometer UV-160 A (Shimadzu, Japan) bei 770 nm gegen Wasser gemessen. Für die Überprüfung der Extinktionsmessungen wurde ein doppelter Vergleichsansatz mit einer 0,1 %igen Eiweiß-Standard-Lösung mitbestimmt. Die Extinktion eines mitgeführten Leerwertes wurde von den Extinktionen der Probenansätze und des Vergleichsansatzes abgezogen.

Die Berechnung des Proteingehaltes in den PCA-Homogenaten erfolgte nach folgender Formel:

$C(P) \text{ in } \mu\text{g/ml} = E(P) \times F \times VF$	C	Konzentration
	P	Probe
	E	Extinktion
wobei: $F = \frac{C(S)}{E(S)}$	VF	Verdünnungsfaktor (in diesem Fall: 4)
	S	Standard

Die Eichung erfolgte mit humanem Serumalbumin, mit Lösungen in den Konzentrationen 100, 75, 50 und 25 $\mu\text{g/ml}$. Die Gehaltsangaben von 5-HT in den drei Hirnregionen, präfrontaler Kortex, Hippokampus und mediane/dorsale Raphe wurde in nmol/mg Protein ausgedrückt.

3.1.5. Versuchsauswertung und Statistik

Bei den in den verhaltenspharmakologischen Untersuchungen gemessenen Parametern wurde insgesamt von einer nicht parametrischen Verteilung der Werte ausgegangen. Daher wurden die Werte generell als Median und 25./75. Perzentile, in den Graphiken zusätzlich mit 5./95. Perzentile, dargestellt. Die einzelnen Versuche wurden nur lokal betrachtet.

Beim Vergleich mehrerer Gruppen erfolgte die Berechnung der Signifikanz mit der Rangvarianz-Analyse nach Kruskal-Wallis und dem Dunn`s-Test. Bei einem Vergleich von zwei Gruppen wurde die Signifikanz mit dem Mann-Whitney-U-Test überprüft.

Tiere, die vor den Experimenten Verhaltensauffälligkeiten, wie Drehbewegungen, oder physische Erkrankungen, wie Kopfdeformationen oder Erblindung, zeigten, wurden von den Versuchen ausgeschlossen.

Tiere, die vom Elevated plus maze gefallen sind, wurden in die statistische Auswertung nicht einbezogen. Einzelne Tiere, die im Black and white box-Test die vorgegebene Versuchszeit nur starr im weißen Kompartiment saßen, wurden ebenfalls nicht ausgewertet, da dies als ein abnormes Verhalten anzusehen ist und zu falschen Ergebnissen führen würde.

Bei den Daten der analytischen Untersuchungen lag eine Normalverteilung der Werte vor. Daher wurden hier der Mittelwert der Gruppen und der Standardfehler des arithmetischen Mittels angegeben. Die Berechnung der Signifikanz erfolgte beim Vergleich von zwei Gruppen mit dem Student's t-Test. Unterschiede zwischen mehreren Gruppen wurde mit Hilfe einer Varianzanalyse und einem multiplen Vergleichstest (Tukey Test) auf Signifikanz berechnet.

Sowohl bei der Bestimmung der Konzentrationen von Diazepam und seiner Metaboliten als auch bei der Bestimmung der 5-HT-Gehalte sind einzelne Proben aufgrund technischer Fehler, wie z.B. zu geringer Volumina oder durch Fehler in der Aufbereitung, verloren gegangen.

Ein statistischer 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 2.03 (Jandel Scientific, Deutschland) und die Graphiken wurden mit SigmaPlot Version 4.00 (Jandel Scientific, Deutschland) erstellt.