3. EIGENE UNTERSUCHUNGEN

3.1. Material und Methoden

3.1.1. Versuchstiere

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

Wistar-Ratten	HsdCpd:WU	(Harlan Winkelmann GmbH, Borchen)
	Crl:[WI] BR	(BgVV [Bundesinstitut für gesundheitlichen Verbraucherschutz und Veterinärmedizin], Berlin)
Fischer 344-Ratten	F344/NHsd	(Harlan Winkelmann GmbH, Borchen)

Die Tiere wurden von den jeweiligen Züchtern gekauft und hatten bei der Anlieferung ein Gewicht von 120-150 g. Zur Gewöhnung an die neuen Haltungsbedingungen wurde den Tieren 10-14 Tage Zeit gelassen.
Die Tiere wurden in Makrolon-Standardkäfigen Typ IV (40 x 60 x 25 cm) in Gruppen zu je 5 Tieren unter einem 12 Stunden Hell-Dunkel-Zyklus mit der hellen Phase von 6.00 Uhr bis 18.00 Uhr gehalten. Die Lichtintensität im Tierstall maß im Mittel 170 lx. Die Raumtemperatur betrug 22 ± 2 °C und die relative Luftfeuchte 60 ± 5 %. Die Tiere erhielten Wasser und Standardpellets (Altromin® 1324, Lage, Deutschland) ad libitum.
Zum Zeitpunkt der Untersuchung (Mikrodialyseversuche) waren die Tiere durchschnittlich 8 Wochen alt und wogen 220-280 g.

Die Durchführung der Tierversuche wurde unter der Tierversuchsnummer G 0367/98 des Landesamtes für Arbeitsschutz, Gesundheitsschutz und technischer Sicherheit in Berlin genehmigt.

3.1.2. Verwendete Substanzen

Substanzen	**Hersteller/Bezugsquelle**
Perchlorsäure 70 % (Suprapur®)	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Natriumchlorid (Kochsalz) NaCl- Reinsubstanz	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Ethanol absolut z.A.	Merck KgaA, Darmstadt, Deutschland
Chloralhydrat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deutschland

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

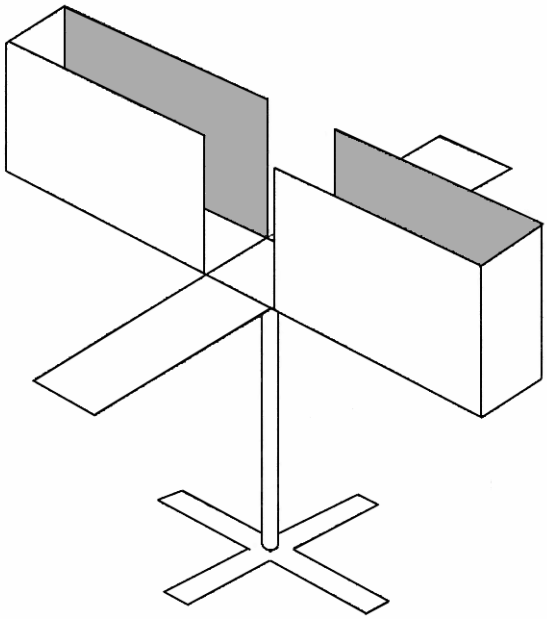
Chloralhydrat wurde in isotonischer Kochsalzlösung gelöst.
Ethanol wurde auf 20 % verdünnt.
Chloralhydrat und Ethanol wurden intraperitoneal (i.p.) appliziert.

Die aufgeführten und sonstigen Chemikalien waren, soweit nicht anders angegeben, von analytischem Reinheitsgrad.

3.1.3. Der Elevated plus maze-Test

Der Elevated plus-maze Test nutzt die natürliche Angst der Ratten vor erhöhten, offenen Flächen aus.
Die Apparatur besteht aus 2 offenen und 2 geschlossenen Armen in Form eines horizontalen Kreuzes, das sich in einer Höhe von 64 cm befindet.
Das Kreuz besteht aus 6 mm dickem, grauem Perspex. Der Boden des Kreuzes ist mit schwarzem, genopptem Linoleum (Noppenhöhe < 0,5 mm) ausgelegt.
Jeder Arm des Kreuzes hat eine Länge von 44 cm und eine Breite von 17 cm.
Die „geschlossenen Arme“ liegen sich gegenüber und sind mit 27 cm hohem, grauen Perspex umrandet. Die zwei anderen Arme besitzen keine Begrenzung und werden als „offene Arme“ bezeichnet. Alle vier Arme umschließen ein 17 x 17 cm großes Zentrum.
Die Untersuchungskammer wurde mit drei 100 Watt – Lampen ausgeleuchtet, dabei wurde in den offenen Armen eine Lichtintensität von 210 Lux, in den geschlossenen Armen 60 Lux und im Zentrum 140 Lux erreicht. Durch die hohe Beleuchtungsintensität wurde die Aversion der Tiere gegenüber den offenen Armen gesteigert.

Abb. 4: Schematische Darstellung des Elevated plus maze



Zu Beginn des Versuches wurde das zu untersuchende Tier diagonal auf das Zentrum des Kreuzes gesetzt, um eine Beeinflussung des Tieres, welchen Arm es zuerst betritt, zu vermeiden.

Um den Versuch zu beurteilen, wurden folgende Parameter erfasst:

1. Die Anzahl der Eintritte in die offenen Arme, sowie die Anzahl der Eintritte in die geschlossenen Arme. Berechnet wurde daraus der prozentuale Anteil der Eintritte in die offenen Arme zu den Gesamteintritten.
2. Die Zeit in Sekunden, die jedes Tier in den offenen Armen verbracht hat.
3. Die Anzahl der Head dips (d.h. das Hinunterbeugen der Tiere in die Tiefe über die Ränder der offenen Arme).
4. Die Anzahl der Stretch Attend Postures (SAPs; d.h. das Strecken vom geschlossenen in den offenen Arm hinein).
5. Die Anzahl der Rearings (d.h. das Aufrichten der Tiere mit beiden Vorderpfoten vom Boden).
6. Die zurückgelegte Gesamtstrecke in Metern.

Als klassische Parameter, die das Angstverhalten beschreiben, gelten der prozentuale Anteil der Eintritte in die offenen Arme an den Gesamteintritten und die Zeit, die in den offenen Armen verbracht wird. Als ethologische Parameter werden die Anzahl der Head dips und die Anzahl der SAPs bezeichnet. Ängstliche Tiere betreten die offenen Arme seltener und verbringen weniger Zeit auf den offenen Armen und zeigen eine niedrigere Zahl von Head dips und eine erhöhte Anzahl von SAPs.

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

3.1.3.1. Versuchsanordnung

Es wurde die Ethanolwirkung auf das Angstverhalten von drei Rattenstämmen, Fischer/Winkelmann-, Wistar/Winkelmann- und Wistar/BgVV-Ratten, untersucht. Ethanol (20%ig) wurde in Dosierungen von 0,5, 1,0 und 2,0 g/kg appliziert.
Die Größe der Versuchsgruppen wurde für jede Dosis auf zehn Tiere festgesetzt. Für jeden Stamm wurde eine Kontrollgruppe von zehn Tieren benötigt. Alle Tiere wurden nur einmal verwendet.
Die Versuchsdauer auf dem Elevated plus maze betrug je Tier 10 Minuten. Während der gesamten Zeit wurde das Verhalten der Tiere registriert.

3.1.3.2. Versuchsdurchführung

Die Versuche wurden vormittags zwischen 8.00 und 12.00 Uhr durchgeführt. Die Tiere wurden 1 Stunde vor dem Versuch zu ihrer Beruhigung in einen Vorraum verbracht.
Die Versuchsapparaturen befanden sich in einer schallgeschützten Untersuchungskammer (1,80 x 1,80 x 2,30 m).
Überwacht wurden die Versuche über eine in der Untersuchungskammer befindliche Videokamera (Panasonic WV-BL200, Japan), die an einen Monitor (Panasonic CTI, Japan) außerhalb der Kammer angeschlossen war. Die Aufzeichnung dieser Versuche erfolgte über einen Videorecorder (Panasonic NV S90 HQ, Japan).
Die Auswertung der Versuche erfolgte mittels eines computergestützten Systems (CPL Systems Video Track, Version 2.16, England).
Zwischen den einzelnen Testdurchläufen wurde das Elevated plus-maze mit 50%igem Propanol (Meliseptol®, B.Braun Melsungen AG, Deutschland) gereinigt und trockengewischt.

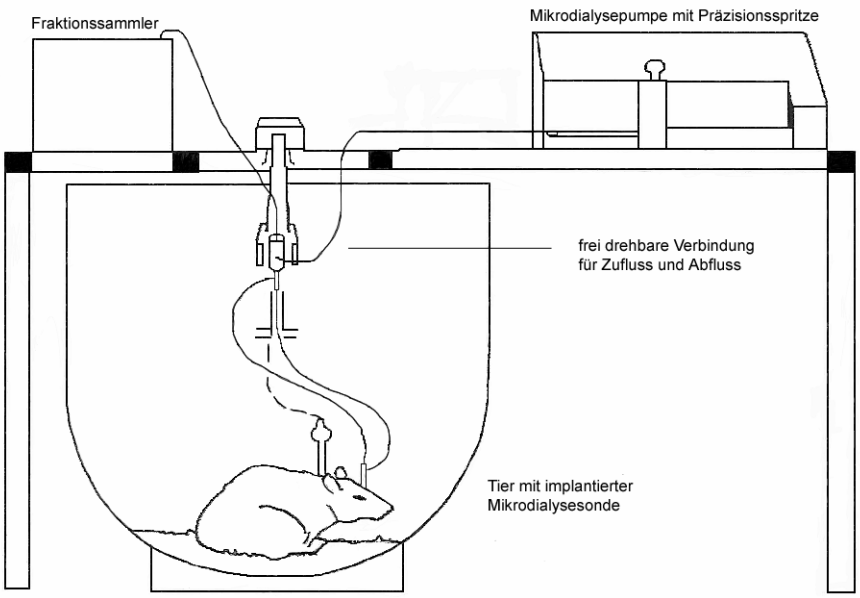
3.1.4. Bestimmung der Ethanolkonzentration im Blutserum

Von den Tieren, die 1,0 g/kg Ethanol erhielten, wurde bei je sechs Ratten von Fischer/Winkelmann, Wistar/Winkelmann und Wistar/BgVV fünf Minuten nach Durchführung des Verhaltenstests Blut aus dem retroorbitalen Plexus entnommen. Die Proben wurden an Prof. Dr. Pragst vom Institut für Gerichtsmedizin der Charité Berlin weitergeleitet. Dort erfolgte ihre Aufbereitung und die Bestimmung der Ethanolkonzentration im Blutserum.

3.1.5. Mikrodialyseuntersuchungen im ZNS

Bei der *in vivo* Mikrodialyse sollte am wachen, freibeweglichen Tier die Veränderung der Konzentration des extrazellulären Serotonin im präfrontalen Kortex nach Applikation einer anxiolytischen Dosis Ethanol auf dem Elevated plus maze bestimmt werden.
Zur Gewinnung des Mikrodialysates wurde eine pulsationsarme Pumpe (CMA/102, Carnegie Medicin, Schweden) mit einer Fördergeschwindigkeit von 1µl/min mit dem Einlass der Mikrodialysesonde verbunden. Die Flüssigkeit, die aus dem Auslass der Mikrodialysesonde austrat, wurde in einem Eppendorfgefäß (Volumen 250 µl) aufgefangen.
Die Konzentrationsbestimmung von Serotonin im Dialysat erfolgte mit einer Hochleistungs - Flüssigchromatographie (High Performance Liquid Chromatography, HPLC) mit elektrochemischer Detektion (ECD).

Abb. 5: Schematische Darstellung des Versuchsaufbaues für die in vivo Mikrodialyse



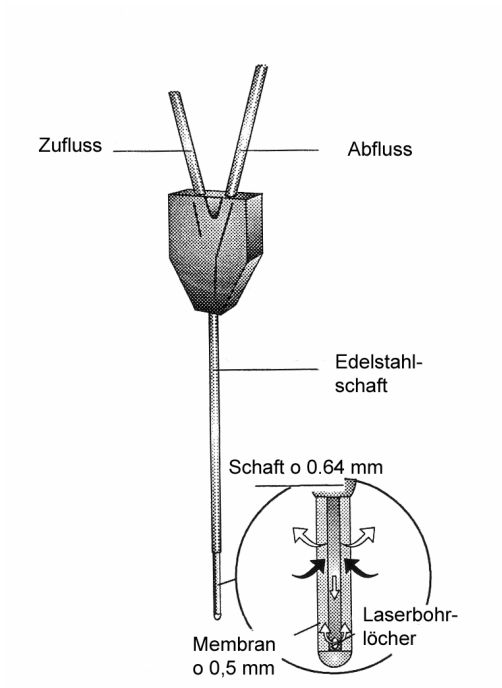
3.1.5.1. Implantation der Führungskanüle

Zur Bestimmung der extrazellulären Serotoninkonzentration im medialen präfrontalen Kortex von Wistar/BgVV-Ratten mittels der *in vivo* Mikrodialyse wurde zunächst eine Führungskanüle implantiert.
Dazu erhielten die Ratten eine Chloralhydrat-Narkose (400 mg/kg i.p.).
Nach Einsetzen der Narkose wurde der Kopf der Tiere in einem stereotaktischen Gerät (David Kopf, USA) mittels Ohrstiften und Schneidezahnhalterung fixiert.
Die Kopfhaut wurde in einer Länge von ca. 2 cm durchtrennt und mit zwei Klemmen zurückgeklappt fixiert. Danach wurde der Schädelknochen freipräpariert.
Die Implantationskoordinaten zum Einbringen der Führungskanüle in den präfrontalen Kortex wurden am stereotaktischen Arm eingestellt (Koordinaten: anterior-posterior 3.2 mm frontal von Bregma, lateral 0.8 mm von der Mittellinie; Paxinos und Watsen, 1986).
Mit einem Handbohrer aus Wolframstahl (Ø 1 mm) wurde entsprechend den Koordinaten ein Loch senkrecht in die Schädeldecke gebohrt. In einem Abstand von 2-3 mm von dieser Bohrung wurden zwei weitere Bohrungen ausgeführt, ohne die Schädeldecke zu perforieren. Hier wurde jeweils eine Vanadiumschraube eingebracht, die zur späteren Verankerung der Führungskanüle mit Dental-Zement (Technovit® 6091, Kulzer, Deutschland) diente.
Die am stereotaktischen Arm befestigte Führungskanüle (Guide Cannula, CMA/12, Carnegie Medicin, Schweden) wurde über dem Bohrloch ausgerichtet und 2,5 mm tief in den präfrontalen Kortex implantiert.
Die Befestigung der Führungskanüle am Schädelknochen erfolgte mit Dental-Zement (Technovit® 6091, Kulzer, Deutschland), der sockelförmig um die Führungskanüle aufgetragen wurde und die Schrauben mit einbezog.
Nach der Aushärtung des Dental-Zementes (ca. 15 Minuten) wurden der stereotaktische Arm und die Klemmen von der Kopfhaut entfernt. Die Wunde wurde mit Knopfheften verschlossen.
Die Tiere wurden in Einzelkäfigen auf eine Wärmplatte (39°C) gestellt und bis zum Aufwachen aus der Narkose beobachtet.

3.1.5.2. Vorbereitung des Dialysematerials

Die Mikrodialysesonde (CMA/12, Carnegie Medicin, Schweden) wurde vor dem ersten Gebrauch mit 70%igem Ethanol für 5 Minuten gespült, um das in der Sonde lieferbedingt vorhandene Glycerol herauszuwaschen. Danach wurde die Sonde mit entgastem, hochreinem Wasser (Aqua bidest) für 30 Minuten gespült, um den Ethanol zu entfernen.

Abb. 6: Schematische Darstellung der Mikrodialysesonde



Vor dem Versuch wurden die Sonde und das Schlauchsystem getrennt voneinander mit künstlichem Liquor gespült.
Nach jedem Versuch wurden die Sonde und das Schlauchsystem für mehrere Stunden mit Aqua bidest gespült.

Wenn die Sonde bzw. das Schlauchsystem über längere Zeit (z.B. während des Wochenendes) nicht benutzt wurden, wurde das Schlauchsystem mit 70%igem Ethanol gefüllt und die Sonde wurde in 70%igem Ethanol so aufbewahrt, dass die Membran der Sonde immer mit Flüssigkeit umgeben war.
Alle Flüssigkeiten, mit denen die Sonde perfundiert wurde, wurden im Ultraschallbad entgast, um mögliche Gasblasenbildung im Schlauchsystem und in der Sonde zu verhindern.

3.1.5.3. Durchführung der Mikrodialyseversuche

Den Tieren wurde nach Implantation der Führungskanüle eine Woche zur Rekonvaleszenz gewährt. In dieser Zeit wurden die Tiere einzeln in runden Käfigen mit einem Durchmesser von 30 cm und einer Höhe von 40 cm, mit Einstreu, sowie Futter und Wasser ad libitum gehalten. Nachfolgend werden diese Käfige auch Heimkäfige genannt.
17 Stunden vor Versuchsbeginn, d.h. am Tag vor dem Versuchsbeginn, wurde den Ratten die Mikrodialysesonde (CMA/12, Carnegie Medicin, Schweden) vorsichtig mit der Hand eingesetzt und mit künstlichen Liquor (CSF-Puffer) gespült. Der CSF-Puffer bestand aus entionisiertem Wasser mit: 125 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 27 mM $NaHCO_3$, 0,5 mM $NaH_2PO_4 \cdot H_2O$, 2,4 mM $Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$, 0,5 mM Na_2SO_4, 1 mM $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ und 1 mM $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ (pH 7,4). Über Nacht betrug die Flussrate der künstlichen CSF 0,6 µl/min.
Am Versuchstag wurde die Perfusion auf 1 µl/min erhöht. Innerhalb einer Stunde waren stabile Serotoninwerte erreicht. Die Fließgeschwindigkeit von 1µl/min sollte das Sammeln ausreichender Probenvolumina gewährleisten und dabei Gewebeschäden und Auswascheffekte gering halten.
Das Schlauchsystem wurde so angepasst, dass sich das Tier damit ungehindert im Heimkäfig und auf dem Elevated plus maze bewegen konnte. Der zuführende Schlauch hatte die Form einer Spirale, am Ende war ein Swivel befestigt, der es ermöglichte, dass sich der Schlauch frei drehen konnte. Auf den Auslass der Dialysesonde wurde ein Polyethylenschlauch (Carnegie Medicin, Schweden) aufgeschoben und ca. 15 cm über dem Tier ein Eppendorfgefäß installiert, in das dieser Schlauch geleitet wurde. Die Dialysate wurden in diesem Eppendorfgefäß, in dem sich 0,5 µl 0,1M Perchlorsäure

(Oxydationsschutz) befand, gesammelt. Es wurden jeweils 20-Minuten- (20µl) Fraktionen gesammelt.
Die ersten drei Fraktionen wurden aufgefangen, während sich die Tiere in ihren gewohnten Käfigen befanden und stellten den Basalwert für das extrazelluläre Serotonin dar.
Während der 4. Probe, nach Sammeln der halben Probe, erhielten die Ratten 1,0 g/kg Ethanol (20 % v/v, i.p.) bzw. 0,9%iges NaCl (0,5 ml/100 g, Kontrolltiere, i.p.). Bei einer Gruppe verblieben die Tiere während der gesamten weiteren Versuchsdauer in ihrem Heimkäfig und die Sammlung der 20 µl Fraktionen wurde für weitere 100 Minuten fortgesetzt.
Die Tiere der anderen Gruppe wurden 10 Minuten nach Substanzapplikation für eine Sammelperiode von 20 Minuten (Gesamtdauer der 5. Probe) auf das Elevated plus maze verbracht. Nachfolgende 20 µl Fraktionen wurden gesammelt, während sich die Tiere wieder in ihrem Heimkäfig befanden.
Das Verhalten der Tiere auf dem Elevated plus maze wurde mit einer Videokamera und einem Videorecorder aufgenommen und nach Versuchsende ausgewertet.
Nach Beendigung des Versuches erfolgte die sofortige Tötung der Tiere durch eine Überdosis Chloralhydrat, die Mikrodialysesonden wurden entfernt und die Gehirne der Tiere wurden entnommen.

3.1.5.4. Analyse der Mikrodialysate

Die Dialysate wurden mit der HPLC-Technik analysiert und dann kontinuierlich in der nachgeschalteten elektrochemischen Detektion quantifiziert.
Die Sammlungen wurden über eine Umkehrphasen-Chromatographie an einer C_{18} Säule (SepStik microbore column, BAS, USA) mit 100 mm Länge, 1 mm Durchmesser und 3 µm Partikelgröße, getrennt.
Die mobile Phase hatte die Zusammensetzung: 0,1 M NaH_2PO_4, 1 mM EDTA-Dinatriumsalz, 0,7 mM Octansulfonsäure-Dinatriumsalz, 5 % Isopropanolol, pH 3,5. Das Laufmittel wurde mit einer Fließgeschwindigkeit von 50 µl/min mit einer pulsationsarmen HPLC-Pumpe (M 480, Gynkotek, Deutschland) gefördert.

Die Probe wurde durch ein Injektionsventil (RH 7125, Rheodyne, USA) mit einer 10 µl Sammelschleife auf die Säule aufgegeben.
Serotonin wurde mit einer elektrochemische Messzelle (LCEC, BAS, USA) bei einem Oxidationspotential von 650 mV und mit einem elektrochemischen Detektor (LC-4C, BAS, USA) detektiert. Die Chromatogramme wurden mit einem Chromatographie-Datensystem (Chrom-A-Dat, Israel) ausgewertet.
Für jede zu bestimmende Substanz wurde eine Eichkurve im Konzentrationsbereich von 10^{-6} bis 10^{-9} M erstellt. Die Peakhöhe und Peakfläche standen in einem linearen Verhältnis zur Konzentration des injizierten Serotonins.
Die Identifikation der gesuchten Substanzen im Dialysat erfolgte über die substanzspezifischen Retentionszeiten, die vorab bei der Analyse von Standardlösungen im künstlichen Liquor bestimmt wurden.

3.1.5.5. Histologie

Die histologischen Untersuchungen wurden zur Überprüfung des korrekten Sitzes der Mikrodialysesonde durchgeführt.
Die nach Abschluss der Mikrodialyseversuche entnommenen Gehirne wurden in 4%iger Paraformaldehydlösung für 7 Tage fixiert. Nach einer Spülung der Gehirne in Wasser wurden sie für einige Minuten tiefgefroren. Das Vorderhirn wurde danach mit einem Gefrierschnittmikrotom in 25 µm dünne Scheiben geschnitten. Anhand des Paxinos/Watson-Atlas wurde am Nativpräparat der Sitz der Mikrodialysesonde im präfrontalen Kortex beurteilt.

3.1.6. Versuchsauswertung und Statistik

Für die Daten wurde keine Normalverteilung angenommen. Es sind die Medianwerte mit den 25./75. Perzentilen, in den Grafiken zusätzlich mit 5./95. Perzentile, dargestellt. Beim Vergleich mehrerer Gruppen erfolgte die Berechnung der Signifikanz mit der Kruskal-Wallis-Varianzanalyse und dem Dunn's-Test. Bei einem Vergleich von zwei Gruppen wurde die Signifikanz mit dem Mann-Whitney-Test überprüft.

Die Konzentrationen von Serotonin im Dialysat variierten zwischen den Versuchstieren, deshalb wurde die Serotoninkonzentration prozentual angegeben. Aus den ersten drei Dialysaten eines Tieres wurde jeweils der Mittelwert gebildet und gleich 100 % gesetzt. Die folgenden Werte sind als Prozent des mittleren Basalwertes angegeben.
Tiere, die vom Elevated plus maze gefallen sind, wurden in die statistische Auswertung nicht einbezogen.

Ein statistischer Unterschied lag vor, wenn die Irrtumswahrscheinlichkeit $p < 0{,}05$ betrug. Eine Irrtumswahrscheinlichkeit zwischen $p=0{,}05$ und $p<0{,}10$ wird als Tendenz gewertet. Die statistische Auswertung erfolgte mit SigmaStat Version 2.03 (Jandel Scientific, Deutschland), die Grafiken wurden mit SigmaPlot Version 8.00 (Jandel Scientific, Deutschland) erstellt.

3.2. Ergebnisse

3.2.1. Elevated plus maze-Test

In der vorliegenden Arbeit wurde zuerst das Angstverhalten von Wistar/Winkelmann-, Fischer/Winkelmann- und Wistar/BgVV-Ratten im Elevated plus maze-Test untersucht, um grundlegende Unterschiede im Angstverhalten feststellen zu können. Danach wurde der Einfluss akuter Ethanolgaben auf das Angstverhalten der zwei Rattenstämme und der Zuchtlinie im Elevated plus maze-Test geprüft.

In der Versuchsanordnung des Elevated plus maze-Testes wurde die Größe der Versuchsgruppen für die Kontrollgruppe und für jede Dosis Ethanol auf je zehn Tiere festgesetzt. Tiere, die vom Elevated plus maze gefallen sind, wurden vom Experiment ausgeschlossen. So entstanden Unterschiede in den Gruppengrößen (Tab.1).
Alle Ratten, die mit 2,0 g/kg Ethanol behandelt wurden, konnten in die statistische Untersuchung nicht mit einbezogen werden, da von den insgesamt 30 untersuchten Tieren 14 Tiere durch eine Beeinträchtigung ihrer Motorik von der Apparatur gefallen sind.

Tab. 1. Anzahl der Tiere, die in die statistische Auswertung des Elevated plus maze-Testes einbezogen wurden

	NaCl	0,5 g/kg Ethanol	1,0 g/kg Ethanol
Wistar/Winkelmann-Ratten	10	10	8
Fischer/Winkelmann-Ratten	10	8	6
Wistar/BgVV-Ratten	10	9	10

3.2.1.1. Vergleich der Kontrollgruppen

Die Wistar/Winkelmann-Ratten zeigten im Elevated plus maze-Test ein weniger ängstliches Verhalten gegenüber den Fischer/Winkelmann- und Wistar/BgVV-Ratten (Abb.7, Tab. 2).

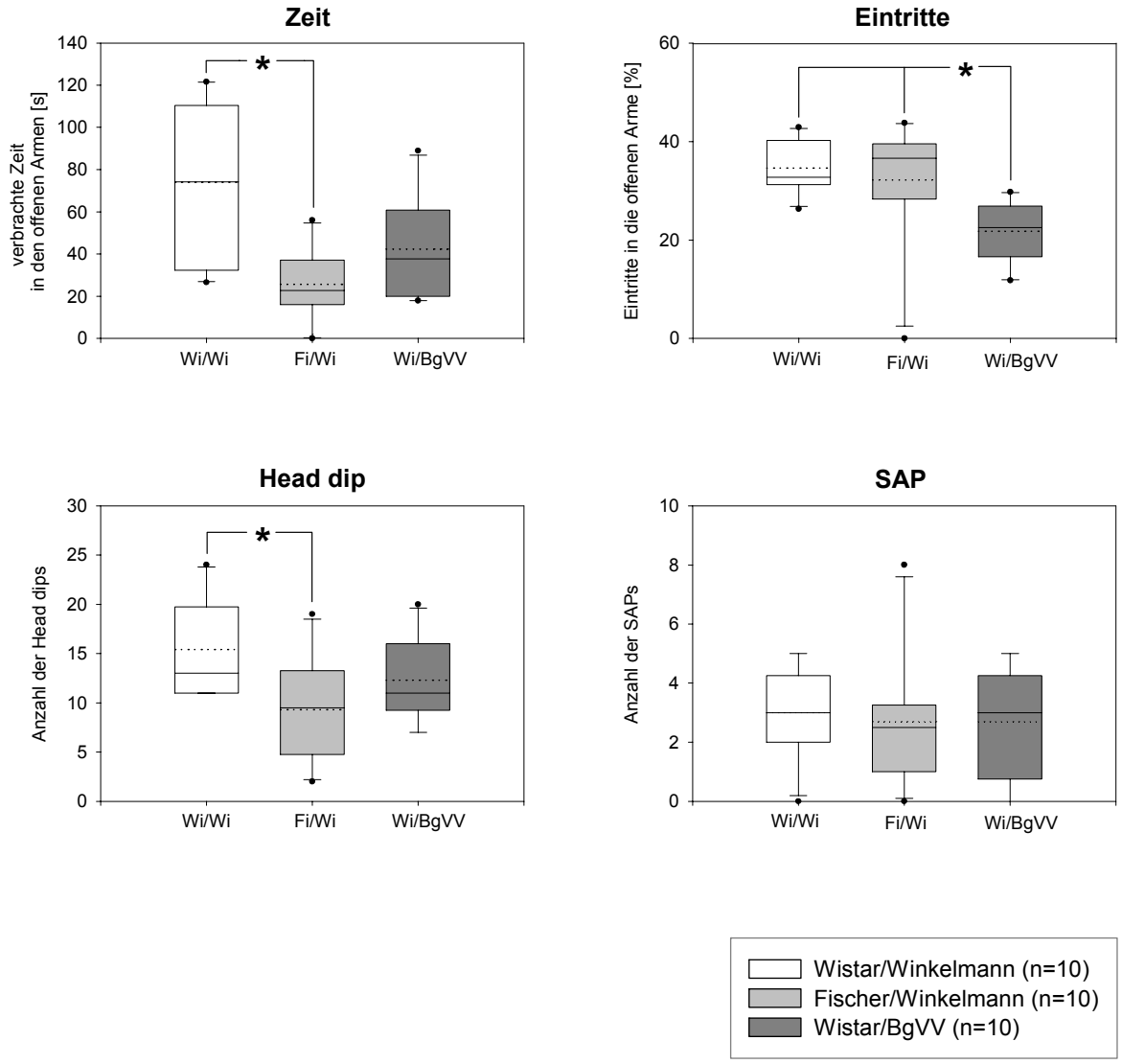
Dabei verbrachten die Wistar/Winkelmann-Ratten signifikant mehr Zeit in den offenen Armen (74,15 [32,90/106,88] s) als die Fischer/Winkelmann-Ratten (22,74 [20,49/34,82] s; p=0,006). Die Wistar/Winkelmann-Ratten (13,00 [11,00/19,00]) zeigten auch eine signifikant höhere Anzahl an Head dips im Vergleich zu den Fischer/Winkelmann-Ratten (9,50 [5,00/13,00]; p=0,023).

Der Parameter Eintritte in die offenen Arme weicht jedoch ab, hier zeigten die Wistar/BgVV-Ratten signifikant weniger Eintritte in die offenen Arme (22,50 [17,65/26,32] %) verglichen mit den Wistar/Winkelmann- (32,74 [31,25/40,00] %; p<0,001) und den Fischer/Winkelmann-Ratten (36,61 [29,41/38,46] %; p=0,010).

Zwischen den drei Gruppen gab es keine signifikanten Unterschiede in der Anzahl der SAPs.

Folgende Unterschiede in den Parametern der lokomotorischen Aktivität konnten festgestellt werden: Die Wistar/Winkelmann-Ratten richteten sich signifikant häufiger auf (21,50 [20,00/29,00]) als die Fischer/Winkelmann-Ratten (17,5 [13,00/19,00]; p=0,008). Eine signifikant längere Wegstrecke legten die Wistar/BgVV-Ratten (18,22 [17,10/19,21] m) gegenüber den Wistar/Winkelmann- (14,32 [11,55/15,51] m; p=0,006) und den Fischer/Winkelmann-Ratten (10,52 [7,49/12,49] m; p<0,001) zurück.

Abb. 7. Vergleich der Rattenstämme und -zuchtlinien im Elevated plus-maze-Test



Aufenthaltsdauer in den offenen Armen (in Sekunden), Prozentuale Anteile der Eintritte in die offenen Arme zu den Gesamteintritten (in Prozent), Anzahl der Head dips und Anzahl der SAPs von Wistar/Winkelmann-, Fischer/Winkelmann- und Wistar/BgVV-Ratten. Die Daten sind als Box plots mit dem Median und der 25./75. Perzentile dargestellt. Die gestrichelte Linie markiert zusätzlich den Mittelwert.
Signifikante Unterschiede zwischen den Rattenstämmen und -zuchtlinien sind durch Sternchen gekennzeichnet: * $p<0,05$.

Tab. 2. Vergleich der Parameter der lokomotorischen Aktivität der Rattenstämme und -zuchtlinien im Elevated plus maze-Test

	Wistar/Winkelmann (n = 10)	Fischer/Winkelmann (n = 10)	Wistar/BgVV (n = 10)
Rearing	21,50 [20,00/29,00]*	17,50 [13,00/19,00]	19,50 [16,00/22,00]
Zurückgelegte Wegstrecke [m]	14,32 [11,55/15,51]	10,52 [7,49/12,49]	18,22[17,10/19,21]*+

Anzahl der Rearings und die zurückgelegte Wegstrecke (in Metern) von Wistar/Winkelmann-, Fischer/Winkelmann- und Wistar/BgVV-Ratten.
Die Daten sind als Median mit der 25./75. Perzentile angegeben.
Signifikante Unterschiede sind mit * $p<0,05$ gegenüber Fischer/Winkelmann -Ratten und mit $^{+}$ $p<0,05$ gegenüber Wistar/Winkelmann-Ratten gekennzeichnet.

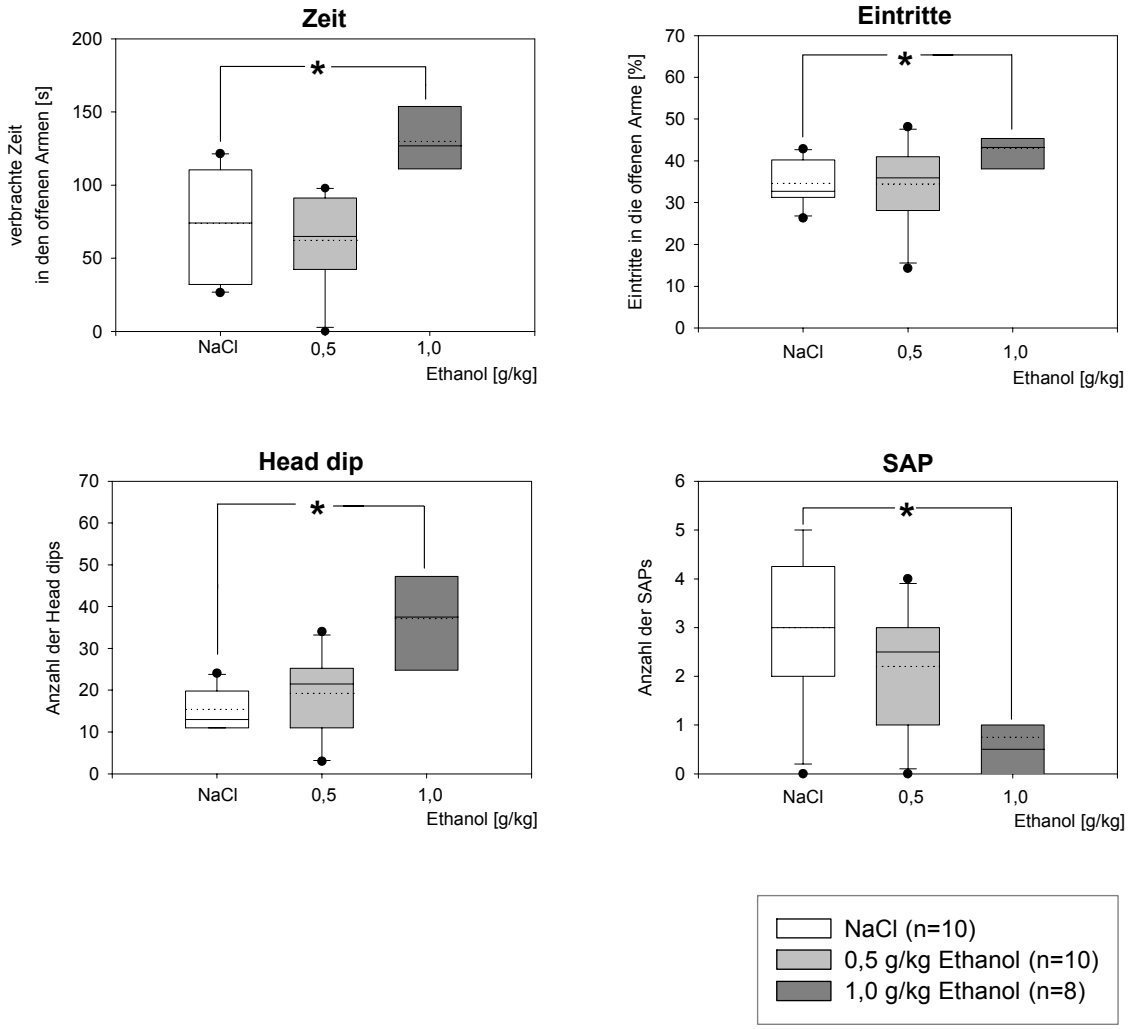
3.2.1.2. Wirkung von Ethanol auf das Angstverhalten von Wistar/Winkelmann-, Fischer/Winkelmann- und Wistar/BgVV-Ratten

Eine Zunahme der in den offenen Armen verbrachten Zeit und eine prozentuale Zunahme der Eintritte in die offenen Arme werden als „anxiolytische“ Wirkungen von Ethanol betrachtet. Als unterstützende ethologische Parameter werden eine erhöhte Anzahl von Head dips und eine Abnahme der SAPs als anxiolytische Wirkung einer Substanz interpretiert.
Die Anzahl der Rearings und die zurückgelegte Distanz in Metern als Parameter der motorischen Aktivität sollen sich dabei nicht verändern.

3.2.1.2.1. Wistar/Winkelmann-Ratten

Ethanol in einer Dosis von 1,0 g/kg löste bei den Wistar/Winkelmann-Ratten einen anxiolytischen Effekt aus (Abb. 8, Tab. 3). Im Vergleich zur Kontrollgruppe erhöhte sich die Aufenthaltszeit in den offenen Armen signifikant von 74,15 [32,90/106,88] s nach Gabe von NaCl auf 126,88 [113,70 /147,72] s nach Gabe von 1,0 mg/kg Ethanol (p=0,007). Der prozentuale Anteil der Eintritte in die offenen Arme stieg von 32,74 [31,25 /40,00] % auf 43,19 [39,03/45,08] % (p=0,021) und die Anzahl der Head dips verdreifachte sich fast von 13,00 [11,00/19,00] auf 37,50 [26,50/46,50] (p=0,002). Zusätzlich sank die Anzahl der SAPs signifikant von 3,00 [2,00/4,00] auf 0,50 [0,00/1,00] (p=0,009).
Während die vertikale Aktivität, d.h. die Anzahl der Rearings unverändert blieb, erhöhte sich die horizontale Bewegung der Tiere. Die Ratten, denen 1,0 g/kg Ethanol appliziert wurde, legten auf dem Elevated plus maze eine Wegstrecke von 22,61 [17,77/25,02] m gegenüber der Kontrollgruppe (14,32 [11,55/15,51] m; p=0,011) zurück.
Nach Gabe von 0,5 g/kg Ethanol kam zu keiner signifikanten Änderung der einzelnen Parameter verglichen mit der Kontrollgruppe (Abb. 8).

Abb. 8. Wirkung von Ethanol auf das Angstverhalten von Wistar/Winkelmann-Ratten im Elevated plus maze-Test



Aufenthaltsdauer in den offenen Armen (in Sekunden), Prozentuale Anteile der Eintritte in die offenen Arme zu den Gesamteintritten (in Prozent), Anzahl der Head dips und Anzahl der SAPs von Wistar/Winkelmann-Ratten nach Gabe von NaCl, sowie 0,5 mg/kg und 1,0 mg/kg Ethanol.
Die Daten sind als Box plots mit dem Median und der 25./75. Perzentile dargestellt. Die gestrichelte Linie markiert zusätzlich den Mittelwert.
Signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen sind durch Sternchen gekennzeichnet: * $p<0,05$.

Tab. 3. Wirkung von Ethanol auf die Parameter der lokomotorischen Aktivität von Wistar/Winkelmann-Ratten im Elevated plus maze-Test

	NaCl (n = 10)	0,5 g/kg Ethanol (n = 10)	1,0 g/kg Ethanol (n = 8)
Rearing	21,50[20,00/29,00]	22,50[17,00/26,00]	21,50[17,50/23,00]
zurückgelegte Wegstrecke [m]	14,32[11,55/15,51]	16,27[12,46/18,87]	22,61[17,77/25,02] *

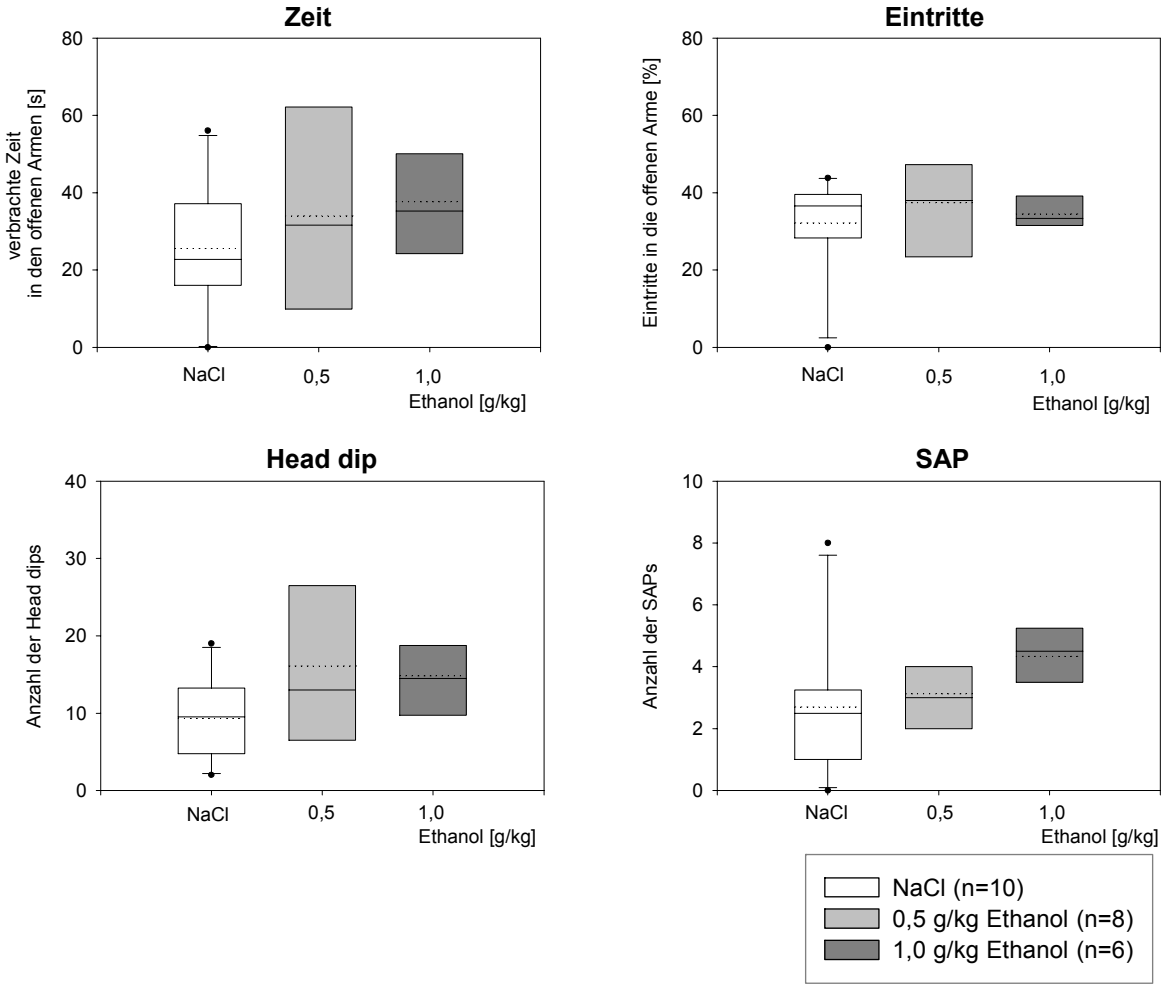
Anzahl der Rearings und die zurückgelegte Wegstrecke (in Metern) von Wistar/Winkelmann-Ratten nach Gabe von NaCl, 0,5 g/kg und 1,0 g/kg Ethanol. Die Daten sind als Median mit der 25./75. Perzentile dargestellt.
Signifikante Unterschiede gegenüber der NaCl-Gruppe sind durch Sternchen gekennzeichnet: * $p<0,05$.

3.2.1.2.2. Fischer/Winkelmann-Ratten

Bei den Fischer/Winkelmann-Ratten wurde einzig die motorische Aktivität von der Ethanolapplikation beeinflusst (Abb. 9, Tab. 4).

Die zurückgelegte Wegstrecke stieg von 10,52 [7,49/12,49] m (Kontrollgruppe) auf 20,31 [13,38/21,15] m nach Gabe von 1,0 g/kg Ethanol an (p=0,020) (Tab. 4).

Abb. 9. Wirkung von Ethanol auf das Angstverhalten von Fischer/Winkelmann-Ratten im Elevated plus maze-Test



Aufenthaltsdauer in den offenen Armen (in Sekunden), Prozentuale Anteile der Eintritte in die offenen Arme zu den Gesamteintritten (in Prozent), Anzahl der Head dips und Anzahl der SAPs von Fischer/Winkelmann-Ratten nach Gabe von NaCl, sowie 0,5 mg/kg und 1,0 mg/kg Ethanol.

Die Daten sind als Box plots mit dem Median und der 25./75. Perzentile dargestellt. Die gestrichelte Linie markiert zusätzlich den Mittelwert.

Tab. 4. Wirkung von Ethanol auf die Parameter der lokomotorischen Aktivität von Fischer/Winkelmann-Ratten im Elevated plus maze-Test

	NaCl (n = 10)	0,5 g/kg Ethanol (n = 8)	1,0 g/kg Ethanol (n = 6)
Rearing	17,50[13,00/19,00]	22,00[13,00/34,00]	16,00[11,00/22,00]
zurückgelegte Wegstrecke [m]	10,52[7,49/12,49]	14,64[7,96/22,43]	20,31[13,38/21,15] *

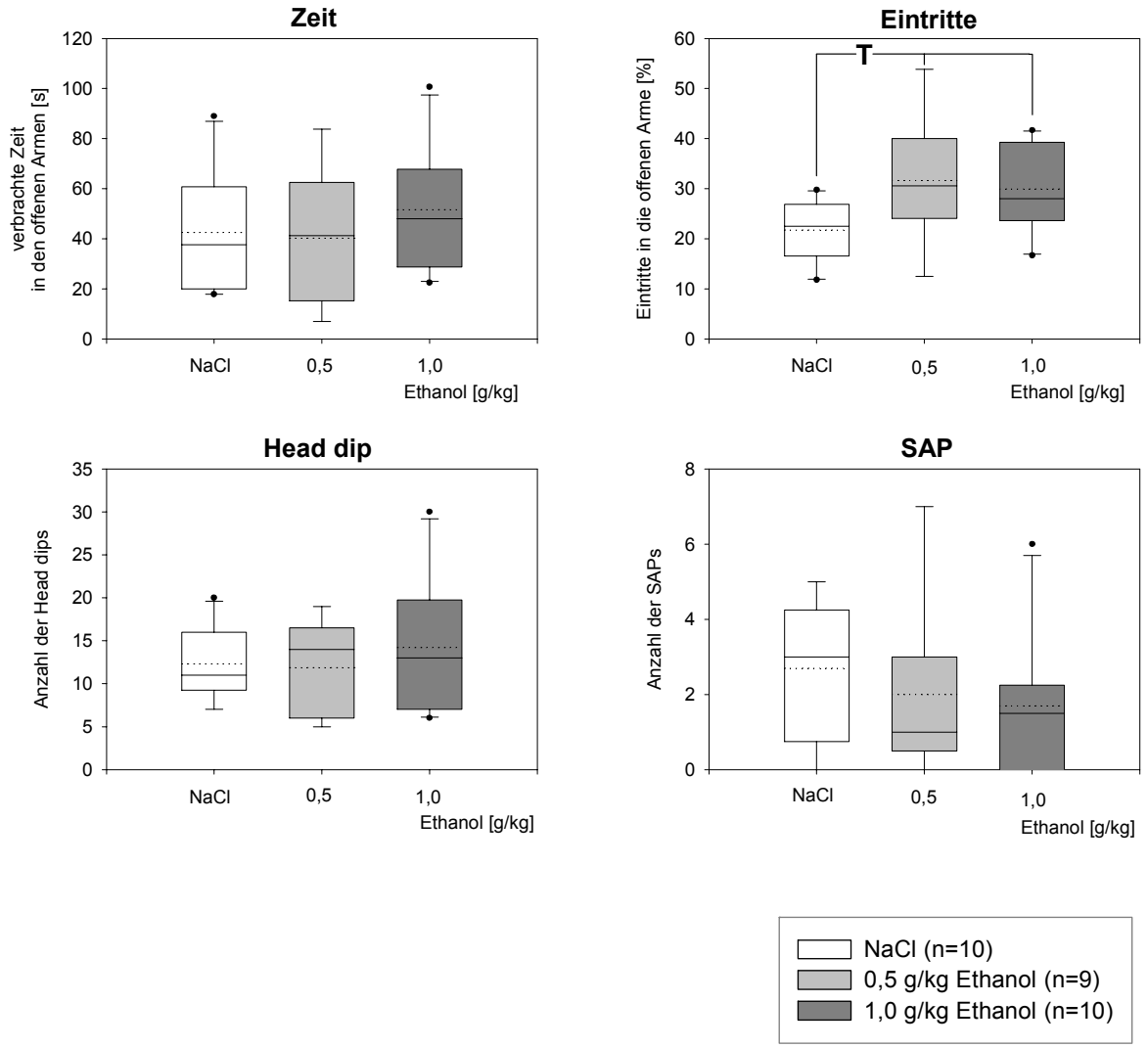
Anzahl der Rearings und die zurückgelegte Wegstrecke (in Metern) von Fischer/Winkelmann-Ratten nach Gabe von NaCl, 0,5 g/kg und 1,0 g/kg Ethanol.
Die Daten sind als Median mit der 25./75. Perzentile angegeben.
Signifikante Unterschiede gegenüber der NaCl-Gruppe sind durch Sternchen gekennzeichnet: * $p<0,05$.

3.2.1.2.3. Wistar/BgVV-Ratten

Bei den Wistar/BgVV-Ratten hatte die Ethanolgabe keinen signifikanten Einfluss auf die untersuchten Parameter (Abb.10, Tab. 5).

Lediglich eine tendenzielle Steigerung des prozentualen Anteils der Eintritte in die offenen Arme nach Gabe von Ethanol in Dosen von 0,5 g/kg (30,56 [24,52/38,57] %; p=0,050) und 1,0 g/kg (28,03 [25,00/39,02] %; p=0,070) konnte, verglichen mit der Kontrollgruppe (22,50 [17,65/26,32] %), beobachtet werden.

Abb.10. Wirkung von Ethanol auf das Angstverhalten von Wistar/BgVV-Ratten im Elevated plus maze-Test



Aufenthaltsdauer in den offenen Armen (in Sekunden), Prozentuale Anteile der Eintritte in die offenen Arme zu den Gesamteintritten (in Prozent), Anzahl der Head dips und Anzahl der SAPs von Wistar/BgVV-Ratten nach Gabe von NaCl, sowie 0,5 mg/kg und 1,0 mg/kg Ethanol.
Die Daten sind als Box plots mit dem Median und der 25./75. Perzentile dargestellt. Die gestrichelte Linie markiert zusätzlich den Mittelwert.
Tendenziell signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen sind mit T gekennzeichnet: ^{T} $p<0,10$.

Tab. 5. Wirkung von Ethanol auf die Parameter der lokomotorischen Aktivität von Wistar/BgVV-Ratten im Elevated plus maze-Test

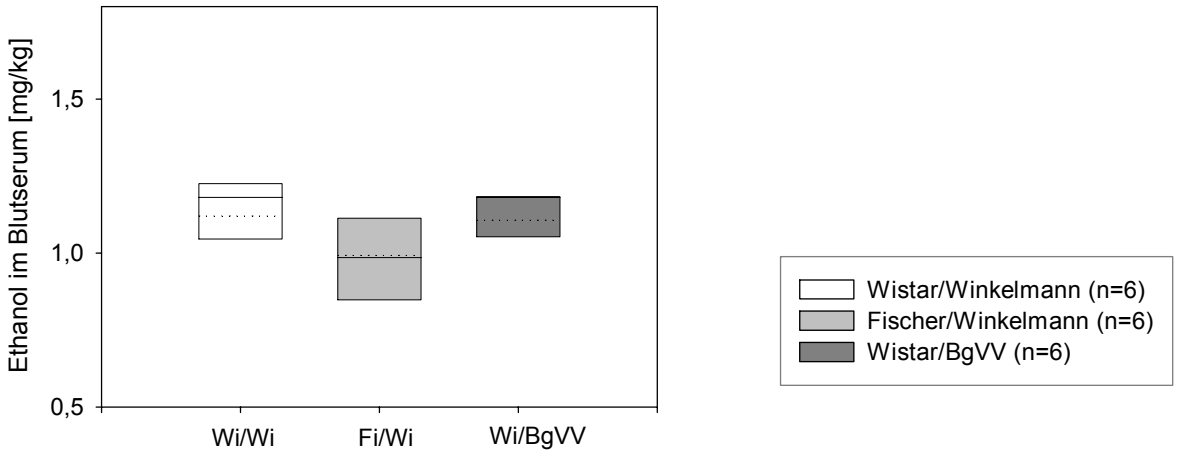
	NaCl (n = 10)	0,5 g/kg Ethanol (n = 9)	1,0 g/kg Ethanol (n =10)
Rearing	19,50[16,00/22,00]	18,00[12,00/24,50]	15,50[13,00/17,00]
Zurückgelegte Wegstrecke [m]	18,22[17,10/19,21]	22,32[14,26/29,34]	30,37[16,78/32,40]

Anzahl der Rearings und die zurückgelegte Wegstrecke (in Metern) von Fischer/Winkelmann-Ratten nach Gabe von NaCl, 0,5 g/kg und 1,0 g/kg Ethanol. Die Daten sind als Median mit der 25./75. Perzentile angegeben.

3.2.2. Konzentration von Ethanol im Blutserum

Es konnte kein Unterschied in der Blutserumkonzentration von Ethanol nach Gabe von 1,0 g/kg Ethanol zwischen den Wistar-Zuchtlinien und den Fischer/Winkelmann-Ratten nachgewiesen werden (Abb.11)

Abb.11. Konzentration von Ethanol im Blutserum



Die Konzentration von Ethanol im Blutserum nach Gabe von 1,0 g/kg Ethanol bei Wistar/Winkelmann-, Fischer/Winkelmann- und Wistar/BgVV-Ratten.
Die Daten sind als Box plots mit dem Median und der 25./75. Perzentile dargestellt. Die gestrichelte Linie markiert zusätzlich den Mittelwert.

3.2.3. Mikrodialyseuntersuchungen im medialen präfrontalen Kortex von Wistar/BgVV-Ratten

3.2.3.1. Wirkung von Ethanol auf das Angstverhalten im Elevated plus maze-Test während der Mikrodialyse

Die Anzahl der Head dips steigerte sich signifikant von 3,50 [0,00/8,00] bei den Tieren, die NaCl erhielten auf 10,50 [8,00/17,00] bei den Ratten, die mit 1,0 g/kg Ethanol behandelt wurden (p=0,041) (Tab. 6). Alle anderen untersuchten Parameter wurden durch die Ethanolgabe nicht signifikant beeinflusst.

Tab. 6. Wirkung von Ethanol auf das Angstverhalten von Wistar-BgVV-Ratten im Elevated plus maze-Test während der Mikrodialyse

	NaCl (n = 6)	1,0 g/kg Ethanol (n = 6)
Zeit o.A. [s]	24,48 [3.60/57,87]	49,87 [40,00/83,34]
Eintritte o.A. [%]	45,88 [36,00/50,00]	41,95 [35,71/50,00]
Head dip	3,50 [0,00/8,00]	10,50 [8,00/17,00] *
SAP	3,50 [2,00/6,00]	2,50 [1,00/4,00]
Rearing	2,50 [2,00/5,00]	7,00 [3,00/10,00]

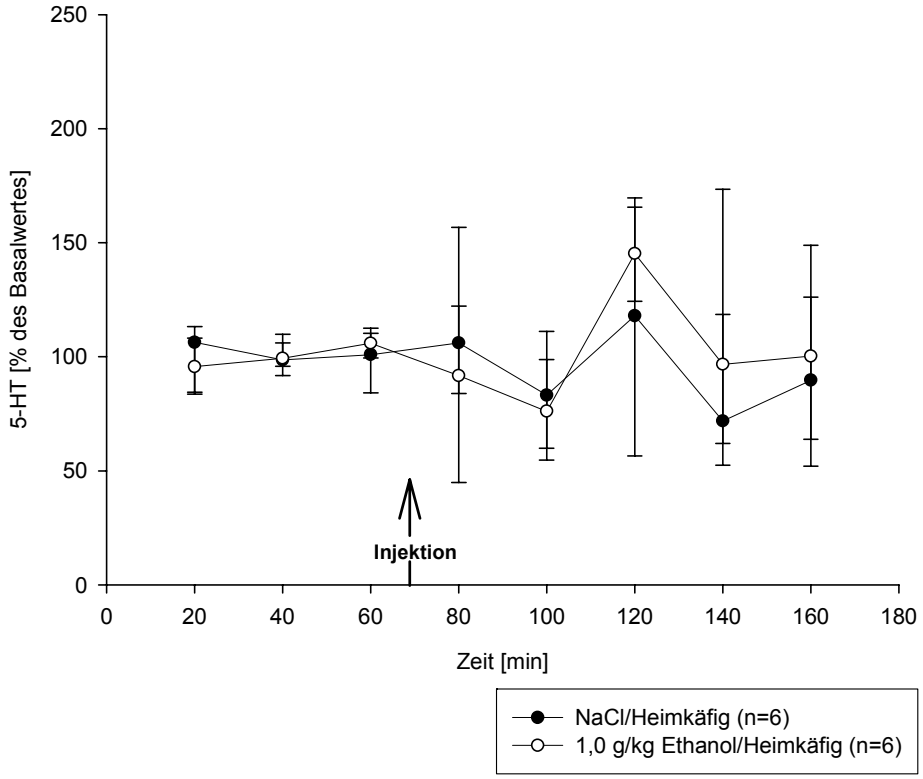
Aufenthaltsdauer in den offenen Armen (in Sekunden), Prozentuale Anteile der Eintritte in die offenen Arme zu den Gesamteintritten (in Prozent), Anzahl der Head dips, Anzahl der SAPs und Anzahl der Rearings von Wistar/BgVV-Ratten nach Gabe von NaCl und 1,0 mg/kg Ethanol.
Die Daten sind als Median mit der 25./75. Perzentile angegeben.
Signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen sind durch Sternchen gekennzeichnet: * $p<0,05$.

3.2.3.2. Serotoninfreisetzung im medialen präfrontalen Kortex

3.2.3.2.1. Mikrodialyse im Heimkäfig

Zunächst wurde der Einfluss von 1,0 g/kg Ethanol auf die Serotoninfreisetzung im medialen präfrontalen Kortex von Wistar/BgVV-Ratten überprüft, wobei sich die Tiere während der gesamten Versuchsdauer in ihren Heimkäfigen befanden.
Verglichen mit der Gabe von NaCl hatte die Applikation von 1,0 g/kg Ethanol keine statistisch nachweisbaren Auswirkungen auf die Serotoninfreisetzung (Abb.12).

Abb.12. Wirkung von Ethanol auf die Freisetzung von Serotonin aus dem medialen präfrontalen Kortex von Wistar/BgVV-Ratten im Heimkäfig



Freisetzung von Serotonin (in Prozent des Basalwertes) aus dem medialen präfrontalen Kortex von Wistar/BgVV-Ratten nach Gabe von NaCl und 1,0 mg/kg Ethanol während sich die Tiere in ihren Heimkäfigen befanden.
Die Daten sind als Median und der 25./75. Perzentile dargestellt.

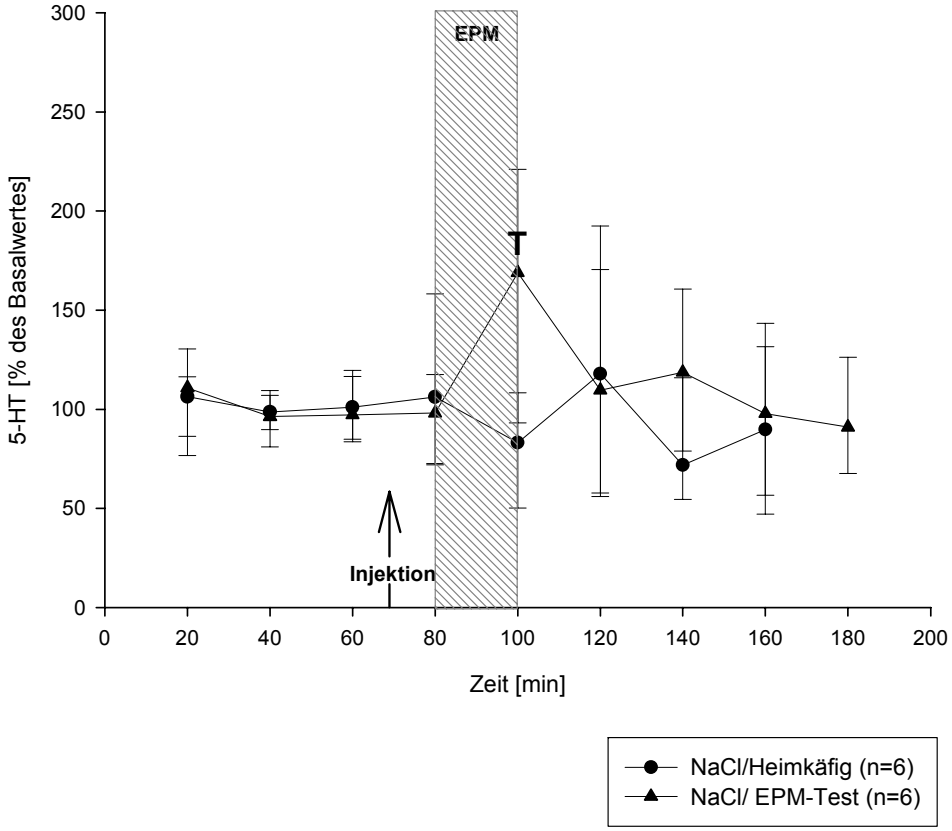
3.2.3.2.2. Mikrodialyse und Elevated plus maze-Test

In dieser Untersuchung wurde nach Bestimmung der Basalwerte den Wistar/BgVV-Ratten in der folgenden Sammelperiode 1,0 g/kg Ethanol bzw. Kochsalzlösung injiziert. Während der nächsten Sammelperiode von 20 Minuten wurden die Tiere auf das Elevated plus maze verbracht und danach wieder in ihre Heimkäfige zurückgesetzt.

Während des Elevated plus maze-Testes ist bei den Ratten, die NaCl erhielten, eine deutliche, aber nicht signifikante Erhöhung der Serotoninkonzentration im medialen präfrontalen Kortex von Wistar/BgVV-Ratten auf 168,89 [85,92/207,34] % festgestellt worden, verglichen mit der Serotoninkonzentration der Tiere, die ebenfalls NaCl erhielten, sich aber zum untersuchten Zeitpunkt in ihren Heimkäfigen befanden (83,14 [60,98/91,25] %; p=0,065) (Abb.13).

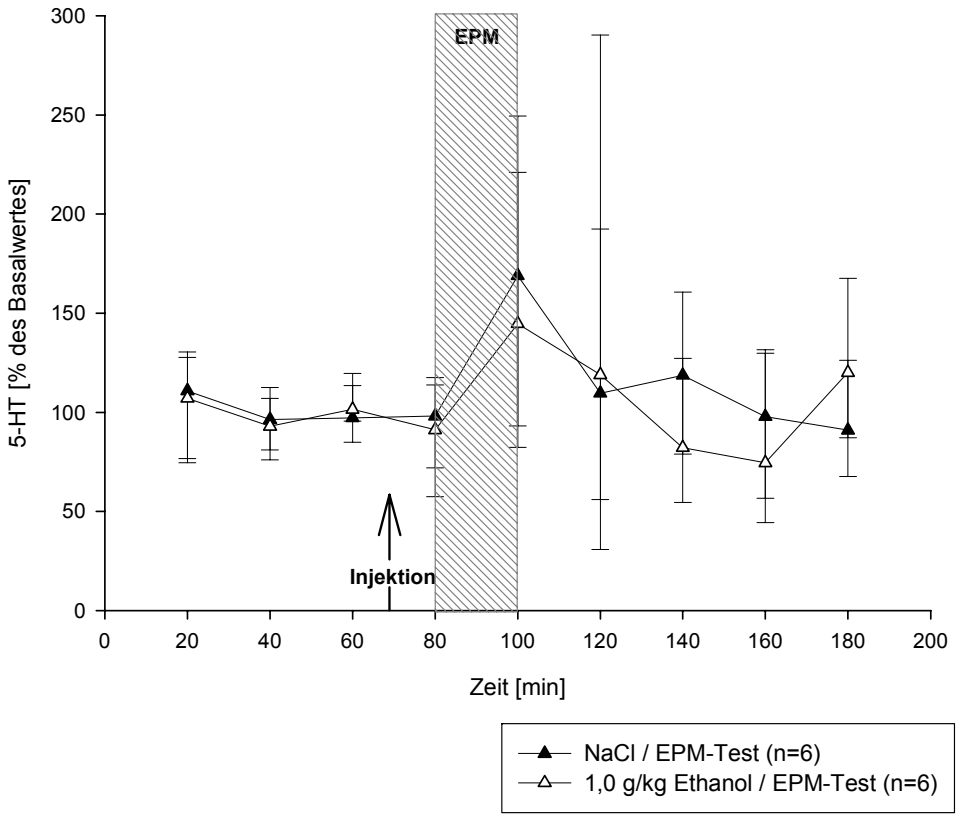
Demgegenüber konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen der Serotoninkonzentration im medialen präfrontalen Kortex von Wistar/BgVV-Ratten nach Gabe von 1,0 mg/kg Ethanol und der Serotoninkonzentration der mit NaCl behandelten Tiere während des Elevated plus maze-Testes festgestellt werden (Abb.14).

Abb.13. Freisetzung von Serotonin aus dem medialen präfrontalen Kortex von Wistar/BgVV-Ratten während des Elevated plus maze-Testes



Freisetzung von Serotonin (in Prozent des Basalwertes) aus dem medialen präfrontalen Kortex von Wistar/BgVV-Ratten nach Gabe von NaCl während sich die Tiere in ihren Heimkäfigen befanden und während des Elevated plus maze-Testes.
Die Daten sind als Median und der 25./75. Perzentile dargestellt.
Tendenziell signifikante Unterschiede in der Serotoninfreisetzung zwischen den Gruppen 30 Minuten nach NaCl-Gabe sind mit T gekennzeichnet: $^{T}p < 0{,}10$.

Abb.14. Wirkung von Ethanol auf die Freisetzung von Serotonin aus dem medialen präfrontalen Kortex von Wistar/BgVV-Ratten während des Elevated plus maze-Testes



Freisetzung von Serotonin (in Prozent des Basalwertes) aus dem medialen präfrontalen Kortex von Wistar/BgVV-Ratten nach Gabe von NaCl und 1,0 mg/kg Ethanol während des Elevated plus maze-Testes.
Die Daten sind als Median und der 25./75. Perzentile dargestellt.