

3. EIGENE UNTERSUCHUNGEN

3.1. Material und Methoden

3.1.1. Versuchstiere

Für die Vorversuche und verhaltenspharmakologischen Untersuchungen wurden insgesamt 134 männliche Ratten aus drei unterschiedlichen Stämmen bzw. Zuchtlinien verwendet:

69 Wistar-Ratten - HsdCpd: WU (Harlan Winkelmann GmbH, Borchten)

55 Wistar-Ratten - CrI [WI] BR (BgVV, Berlin)

10 Fischer-Ratten - F344/NHsd (Harlan Winkelmann GmbH, Borchten)

Die Ratten wurden in Gruppen zu jeweils 4-5 Tieren in Makrolon- Standardkäfigen Typ IV (40 cm x 60 cm x 25 cm) gehalten. Die Tierhaltung erfolgte unter einem künstlichen Lichtregime mit einer zwölfstündigen Hellphase von 6.00 bis 18.00 Uhr, bei einer Lichtintensität von ca. 170 lx. Die Raumtemperatur betrug 23 +/- 2° C und die relative Luftfeuchtigkeit 68 +/- 5 %. An den versuchsfreien Tagen standen den Tieren Wasser und Standardpellets von Altromin 1320, Altromin Lage, Deutschland ad libitum zur Verfügung. Während der Versuchsperiode erhielten die Tiere nur 80% der normalerweise aufgenommenen Futtermenge pro Tag. Die Tiere wurden wöchentlich zur Kontrolle der Gewichtszunahme gewogen. Von dem Zeitpunkt der Anlieferung bis zum Versuchsbeginn hatten die Tiere 8 Tage lang Zeit, sich an die neue Umgebung bzw. neuen Haltungsbedingungen zu gewöhnen. Zum Zeitpunkt des Versuchsbeginns waren die Tiere durchschnittlich sechs Wochen alt und hatten ein Gewicht von 166,4 +/- 1,5g. Alle Tiere wurden in den Verhaltensversuchen nur einmal verwendet.

Die Durchführung der in dieser Arbeit vorgestellten Tierversuche wurde unter der Tierversuchsnummer 0250/00 des Landesamtes für Arbeitsschutz, Gesundheitsschutz und technischer Sicherheit in Berlin genehmigt.

3.1.2. Verwendete Substanzen

Für die verhaltenspharmakologischen Untersuchungen wurden folgende Substanzen verwendet:

Tab.1: Verwendete Substanzen

Stoffe	Hersteller/ Bezugsquelle
Clomipramin 3-Chloro-10,11-dihydro-N,N-dimethyl-5H-dibenzazepin-5-propanamin hydrochlorid Reinsubstanz	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Selegilin (R(-)-Deprenyl) R(-)-N- α -Dimethyl-N-2-propynylbenzenethanamin hydrochlorid Reinsubstanz	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Diazepam Diazepam-Ratiopharm [®] 10- Injektionslösung	Ratiopharm GmbH, Ulm
Natriumchlorid (Kochsalz) NaCl Reinsubstanz	Merck KGaA (Darmstadt, Deutschland)

Natriumchlorid wurde zu 0,9% in zweifach destilliertem Wasser gelöst. Clomipramin, Selegilin und Diazepam wurden in 0,9% Kochsalzlösung gelöst bzw. verdünnt. Sowohl bei der Behandlung mit 0,9 %iger Kochsalzlösung als auch bei der Behandlung mit den jeweiligen Testsubstanzen betrug das Injektionsvolumen jeweils 1ml/kg Körpergewicht. Die Injektionen erfolgten stets intraperitoneal (i.p.).

3.1.3. Versuchsapparatur

Für die Versuche wurden 8 Skinner Boxen von TSE Systems, Bad Homburg, Deutschland, verwendet. Die Skinner Box ist ein 25cm x 26cm x 24cm großer, nach allen Seiten hin geschlossener Experimentierkäfig, der durch das Herunterklappen der Frontseite geöffnet werden kann. Auf diese Weise kann das Versuchstier in die Skinner Box gesetzt werden (siehe Abb.5).

Abb.5: Die Skinner Box



Die Frontseite besteht aus durchsichtigem, leicht getöntem Plexiglas und ermöglicht so die ungestörte Beobachtung des Tieres. Die umgebenden Wände sowie die Decke sind aus

Aluminium angefertigt. An der Decke ist eine 5 Watt Glühbirne angebracht, die die einzige Lichtquelle während des Versuchs darstellt. Der Boden wird von parallelverlaufenden, 0,5cm im Durchmesser dicken Metallstäben gebildet, die im Abstand von 1cm angebracht sind. Unter diesem Rost befindet sich eine flache, quadratische Form aus Aluminium, die den Kot der Tiere auffängt und durch einfaches Herausziehen gereinigt werden kann. Eine Seite der Box weist eine 5cm x 5cm große Öffnung auf, an die sich von außen eine 5cm x 4cm große Futterschale anschließt. Diese Futterschale ist über einen im Durchmesser 1,5cm großen durchsichtigen Plastikschauch mit einem außerhalb der Box angebrachten Futterautomaten verbunden. Der Futterautomat besteht aus einem zylinderförmigen Behälter aus Plexiglas, in den die Futterpellets (Dustless Precision Pellets, 45 mg, Bio-Serv, USA) eingefüllt werden. Dessen Boden bildet eine automatisch betriebene, runde Drehscheibe mit 20 im Kreis angeordneten ausgestanzten Löchern. Beim Rotieren der Drehscheibe fallen die Futterpellets in die ausgestanzten Löcher und werden so lange weitertransportiert, bis sie durch die Öffnung und den Plastikschauch in die Futterschale fallen. So wird jedes Futterpellet einzeln vom Futterautomaten abgegeben. In der Box befinden sich jeweils links und rechts der Eingangsöffnung zur Futterschale eine Taste, die in einer Höhe von 5cm angebracht und elektronisch mit dem Futterautomaten verbunden ist. Über den Tastendruck löst das Tier die Futterausgabe aus. Die Anzahl der abzugebenden Futterpellets sowie auch die Zeitverzögerung ,nach der die Futterpellets ausgegeben werden, kann über das mit dem Futterautomaten vernetzte Computerprogramm („Operant Behavior“ von TSE Systems, Bad Homburg, Deutschland) variabel eingerichtet werden. Das Computerprogramm registriert die Anzahl und den Zeitpunkt der jeweiligen Tastendrucke und gibt die Anzahl und den Zeitpunkt der ausgegebenen Futterpellets an. Um die Tiere vor Lärm abzuschirmen, stehen die Skinner Boxen in jeweils 8 verschließbaren 37cm x 57cm x 38cm großen Kästen, bei denen die Vorderseite ebenfalls aus durchsichtigem Plexiglas besteht und auch darüber geöffnet werden kann.

3.1.4. Versuche

Die Versuche umfassen zum einen die Vorversuche und zum anderen die verhaltenspharmakologische Untersuchung der Substanzen auf die Impulsivität.

Das Modell für die Impulsivität bei Ratten soll erstmals an unserem Institut etabliert werden. Der Versuchsaufbau ist an die Methode von EVENDEN (1996) angelehnt. Das Heranführen der Tiere an die Apparatur bzw. das Erlernen des Tastendrückens ist in der Literatur nicht detailliert beschrieben. Daher werden zuerst Vorversuche durchgeführt, die sich zum einen mit dem Lerntraining der Tiere und zum anderen mit der Erfassung versuchsrelevanter Parameter befassen.

Erst nachdem ein geeignetes Trainingsprogramm entwickelt und die relevanten Parameter in das Versuchsdesign integriert wurden, konnte mit den verhaltenspharmakologischen Untersuchungen begonnen werden.

Die Tiere wurden 1h vor Versuchsbeginn aus dem Tierstall in den Untersuchungsraum gebracht, um sich an die neue Umgebung zu adaptieren. Die Versuche wurden stets vormittags zwischen 8.00 und 12.00 Uhr durchgeführt.

3.1.4.1. Vorversuche

Die Vorversuche dienten dazu, eine Methode zur Messung der Impulsivität, d.h. ein geeignetes Trainingsprogramm zu entwickeln. Zudem mußten die für den Versuchsaufbau relevanten Parameter, wie die Anzahl der notwendigen Versuchstage bis die Tiere das Tastendücken erlernt haben (**Parameter I**), die Dauer der täglichen Versuchszeit (**Parameter II**), die Anzahl der Futterpellets der großen Belohnung (**Parameter III**) und die maximale Zeitverzögerung vor Ausgabe der großen Belohnung (**Parameter IV**) ermittelt werden.

3.1.4.1.1. Methodenentwicklung zur Messung der Impulsivität

Der erste Schritt des Trainings befaßt sich mit dem Heranführen der Tiere, das Drücken der Tasten zu erlernen. Dazu wurden die Ratten erstmals für eine bestimmte Zeit in die Skinner Box gesetzt, die mit zwei Tasten (Taste A und Taste B) ausgestattet war. Bei Druck auf die Taste A erhielt die Ratte sofort eine kleine Belohnung in Form von 1 Futterpellet. Bei Druck auf Taste B wurde eine größere Belohnung in Form von 5 Futterpellets nach einer Zeitverzögerung von 3 sec. ausgegeben. Aufgrund des Explorationsverhaltens der Ratten werden die Tasten anfangs rein zufällig gedrückt. Erst wenn die Tiere den kausalen Zusammenhang zwischen dem Tastendruck und der Futterausgabe verstanden haben, welches sich durch eine zielgerichtete Handlungskette ausdrückt, wird dies als Lernerfolg gewertet.

Anhand von insgesamt 30 männlichen Ratten aus jeweils drei unterschiedlichen Stämmen bzw. Zuchtlinien: -10 Fischer-Ratten von Harlan-Winkelmann GmbH, Borchten

-10 Wistar-Ratten von Harlan-Winkelmann GmbH, Borchten

-10 Wistar-Ratten vom BgVV, Berlin

wurde die Anzahl der Versuchstage ermittelt, die eine Ratte braucht, um das Tastendrücken zu erlernen (**Parameter I**). Daraus ergibt sich die Mindest- bzw. Maximaldauer der **Lernphase I** des später angewendeten Trainingsprogramms (siehe Ergebnisse).

Nachdem alle Ratten das Tastendrücken erlernt hatten, konnte die maximale tägliche Versuchsdauer ermittelt werden (**Parameter II**). Es wurde die Zeit gemessen, in der die meisten Tastendrucke erfolgten. Der Zeitpunkt, an dem fast alle Tiere das Interesse an den Tasten verloren, war bestimmend für die tägliche Versuchszeit der anschließenden Trainingsversuche (siehe Ergebnisse).

Da die Tiere das Tastendrücken zwar prinzipiell gelernt haben, allerdings nur eine der Tasten „benutzten“ und die andere jeweils ignorierten, beinhaltet der nächste Entwicklungsschritt des Trainingsprogramms, daß die Tiere darauf konditioniert werden, beide Tasten zu drücken, um damit den funktionellen Unterschied zwischen Taste A (1 Futterpellet sofort) und Taste B (5 Futterpellets nach 3 sec.) lernen. Dafür sind sieben unterschiedliche Trainingsmethoden entwickelt und an einer Gruppe von 14 männlichen Wistar-Ratten von Harlan-Winkelmann GmbH getestet worden. Jeweils zwei Tiere durchliefen eine der sieben Trainingsmethoden.

Jeder Trainingsversuch wurde an 9 aufeinanderfolgenden Tagen durchgeführt, die tägliche Versuchsdauer betrug jeweils 30 Minuten.

1. Methode: Am ersten Trainingstag wurden die Ratten in die Skinner Box gesetzt, in der nur Taste A vorhanden war. Am zweiten Trainingstag erfolgte ein Wechsel. Taste A wurde herausgenommen und Taste B installiert. Am dritten Trainingstag waren Taste A und Taste B in der Skinner Box vorhanden, welches bis zum neunten Trainingstag aufrecht erhalten wurde.

2. Methode: Diese Methode erfolgte in umgekehrter Weise zur ersten Methode. Am ersten Trainingstag war nur Taste B und am zweiten Trainingstag nur Taste A in der Skinner Box vorhanden. Vom dritten bis zum neunten Trainingstag waren sowohl Taste A als auch Taste B vorhanden.

3. Methode: Am ersten Trainingstag wurden die Ratten mit beiden Tasten nacheinander konfrontiert und die Versuchsdauer von 30 Minuten geteilt. In den ersten 15 Minuten wurden die Ratten in eine Skinner Box gesetzt, welche nur mit Taste A ausgestattet war. Danach wurden die Ratten für weitere 15 Minuten in eine Skinner Box, die nur Taste B enthielt, umgesetzt. Am zweiten Trainingstag wurden die Ratten mit beiden Tasten gleichzeitig konfrontiert. Dies wurde bis zum neunten Trainingstag fortgesetzt.

4. Methode: Die vierte Methode ist eine erweiterte bzw. modifizierte Form. Der erste Trainingstag erfolgte in der gleichen Art und Weise wie bei der dritten Methode und wurde bis zum achten Trainingstag wiederholt. Erst am neunten Trainingstag wurden die Ratten mit Taste A und Taste B gleichzeitig konfrontiert.

5. Methode: In den ersten vier Trainingstagen wurden die Ratten in eine Skinner Box gesetzt, die nur mit Taste A ausgestattet war. Anschließend erfolgte ein Wechsel und an den weiteren vier Trainingstagen war nur Taste B in der Skinner Box vorhanden. Am neunten Trainingstag wurden die Ratten in eine Skinner Box, die sowohl mit Taste A als auch mit Taste B ausgestattet war, hineingesetzt.

6. Methode: Die sechste Methode ist die umgekehrte Form der fünften Methode. In den ersten vier Trainingstagen war in der Skinner Box nur Taste B präsent und in den darauffolgenden vier Trainingstagen nur die Taste A. Am neunten Trainingstag waren wieder Taste A und Taste B gleichzeitig vorhanden.

7. Methode: Bei dieser Methode erfolgte ein täglicher Wechsel zwischen Taste A und Taste B. Am ersten Trainingstag war in der Skinner Box nur die Taste A und am zweiten Trainingstag nur die Taste B vorhanden. Dieses Schema wurde für insgesamt acht Trainingstage fortgesetzt. Am neunten Trainingstag hatten die Ratten wieder beide Tasten gleichzeitig zur „Auswahl“.

Die nachfolgende Tabelle gibt einen Überblick der verschiedenen Trainingsmethoden:

Tab. 2: Trainingsmethoden

Trainingstag	1.	2.	3.	4.	5.	6.	7.	8.	9.
1.Methode	A	B	A+B						
2.Methode	B	A	A+B						
3.Methode	A→B	A+B							
4.Methode	A→B	A+B							
5.Methode	A	A	A	A	B	B	B	B	A+B
6.Methode	B	B	B	B	A	A	A	A	A+B
7.Methode	A	B	A	B	A	B	A	B	A+B

A=Taste A

B=Taste B

Die 7. Methode erwies sich als die geeignetste Methode, den Tieren die unterschiedlichen Funktionen der Taste A und Taste B zu vermitteln. Diese Methode wird im anschließenden Trainingsprogramm bei den verhaltenspharmakologischen Untersuchungen als **Lernphase II** verwendet.

Während der Entwicklung des Trainingsprogramms zeigte sich heraus, daß die Anzahl der Futterpellets, die nach Druck auf Taste B als große Belohnung ausgegeben wird, eine entscheidene Rolle spielt. Die Trainingsversuche mit 5 Pellets als große Belohnung ergaben, daß Taste A mit der kleinen sofortigen Belohnung von den meisten Tieren bevorzugt gewählt wurde, auch wenn die Zeitverzögerung bei Taste B nur 3 sec. beträgt. Daraufhin wurde die Anzahl der Futterpellets als große Belohnung auf 12 Stück erhöht und die Wahl zwischen Taste A und Taste B war infolgedessen nahezu ausgeglichen (siehe Ergebnisse). So konnte die geeignete Futtermenge, die als große Belohnung ausgegeben wird, ermittelt werden (*Parameter III*).

Im letzten Entwicklungsschritt des Trainingsprogramms wurden die Tiere an die maximale Zeitverzögerung, die zwischen dem Druck auf Taste B und der Ausgabe der großen Belohnung eingeschaltet wird, herangeführt. Hierfür mußte zunächst ermittelt werden, welche maximale Zeitverzögerung die Tiere vor Ausgabe der großen Belohnung tolerieren, ohne ausschließlich Taste A mit der sofortigen Futterausgabe zu wählen (*Parameter IV*). Die Zeitverzögerung wurde täglich schrittweise von 3 auf 5,8,9,10,12,14,16,18 bis 20 Sekunden erhöht. Die Zeitverzögerung, bevor die Anzahl der Tastendrucke auf Taste B zugunsten der Taste A deutlich abnahm, war maßgeblich für die maximale Zeitverzögerung bei Taste B für die nachfolgenden Versuche (siehe Ergebnisse). Das Heranführen der Tiere an die Zeitverzögerungen umfaßt die **Lernphase III** des in den verhaltenspharmakologischen Untersuchungen angewendeten Trainingsprogramms.

Letztendlich wurde aus den Vorversuchen das Trainingsprogramm für die anschließenden verhaltenspharmakologischen Untersuchungen entwickelt.

3.1.4.2. Pharmakologische Untersuchungen

Die verhaltenspharmakologischen Untersuchungen beinhalten das zuvor entwickelte Trainingsprogramm und eine anschließende Versuchsreihe, in der die Testsubstanzen geprüft werden. Es wurden dafür 90 männliche Ratten aus zwei unterschiedlichen Stämmen bzw. Zuchtlinien verwendet:

- 45 Wistar-Ratten von Harlan-Winkelmann GmbH, Borcheln
- 45 Wistar-Ratten von BgVV, Berlin

3.1.4.2.1. Trainingsprogramm

Das Trainingsprogramm beinhaltet insgesamt drei aufeinanderfolgende Lernphasen. Damit wird bei den Versuchstieren zunächst prinzipiell das Erlernen des Tastendrückens (Lernphase I), daraufhin das zwangsläufige „Benutzen“ beider Tasten und damit das Erlernen der unterschiedlichen Funktionen zwischen Taste A und Taste B (Lernphase II) erzielt. Im Anschluß werden die Ratten vor die „Wahl“ gestellt zwischen einer kleinen sofortigen Belohnung und einer großen verzögerten Belohnung (Lernphase III).

Lernphase I

Die Versuchstiere werden erstmals in die Skinner Box gesetzt, die zunächst mit den beiden Tasten ausgestattet ist. Bei Druck auf Taste A erhält die Ratte eine kleine Belohnung in Form von 1 Futterpellet sofort, bei Druck auf Taste B wird eine große Belohnung in Form von 12 Futterpellets nach einer Zeitverzögerung von 3 sek. ausgegeben. Diese Sitzung von 30 Minuten wird täglich solange wiederholt, bis alle Versuchstiere prinzipiell den kausalen Zusammenhang zwischen dem Tastendruck und der darauffolgenden Ausgabe der Belohnung in Form von Futterpellets erlernt haben. Der Abschluß der Lernphase I wird nicht individuell auf das einzelne Tier abgestimmt, sondern endet erst, wenn alle Versuchstiere das Tastendrücken erlernt haben. Die gesamte Versuchsdauer der Lernphase I betrug damit maximal zwölf Tage.

Lernphase II

Die Lernphase II beinhaltet das Erlernen des funktionellen Unterschieds zwischen Taste A und Taste B. Dafür wird die zuvor in den Vorversuchen getestete siebte Trainingsmethode angewendet. Aus der Skinner Box wird je nach Trainingstag abwechselnd eine der beiden Tasten herausgenommen. Das bedeutet für das Versuchstier, daß am ersten Trainingstag nur Taste A und am zweiten Trainingstag nur Taste B zur Verfügung steht. So findet ein täglicher Wechsel der beiden Tasten an insgesamt acht aufeinanderfolgenden Tagen statt. Am neunten Trainingstag werden die Ratten wieder mit beiden Tasten gleichzeitig konfrontiert und haben damit die „Wahl“ zwischen Taste A oder Taste B.

Lernphase III

In der Lernphase III sind in der Skinner Box wieder beide Tasten vorhanden. Zusätzlich wird die bei Taste B bereits eingeschaltete Zeitverzögerung von 3 sek. täglich auf 5, 8, 10, 12 und 14 Sekunden erhöht. Die gesamte Versuchsdauer beträgt damit sechs Tage.

Bevor die Ratten in die Versuchsreihe gehen, müssen alle Tiere das gleiche Trainingsprogramm absolviert haben.

3.1.4.2.2. Versuchsreihen:

In den Versuchsreihen wird die Wirkung von Clomipramin, Selegilin und Diazepam auf das erlernte Verhalten bzw. auf die Impulsivität der Wistar/ Winkelmann- und der Wistar/ BgVV - Ratten getestet. Die Testsubstanzen werden in drei unterschiedlichen Dosierungen jeweils im Abstand von sieben Tagen den Versuchstieren i.p. injiziert. Als Kontrollsubstanz wird eine Natriumchlorid- Lösung verwendet. Zur Einhaltung des Injektionsschemas wird den Versuchstieren die Natriumchlorid- Lösung sieben Tage vor Injektion der Testsubstanzen verabreicht. Für jede in dieser Versuchsreihe zu prüfende Testsubstanz werden stets neue Versuchstiere, jeweils fünfzehn Wistar/ Winkelmann- und Wistar/ BgVV- Ratten, verwendet.

Die nachfolgende Tabelle (Tab.3) gibt einen Überblick über die verwendeten Substanzen, Dosierungen, Vorbehandlungszeit und verwendeten Versuchstiere:

Tab.3: Versuchsreihen

Substanz	Vorbehandlungszeit	Dosierung	Versuchstiere
NaCl	60 min.	1 ml/ kg KGW	
Clomipramin	60 min.	1,0/ 3,0/ 10,0 mg/ kg KGW	Wi/Wi ; Wi/ BgVV
NaCl	30 min.	1 ml/ kg KGW	
Selegilin	30 min.	0,3/ 1,0/ 3,0 mg/ kg KGW	Wi/ Wi ; Wi/ BgVV
NaCl	30 min.	1 ml/ kg KGW	
Diazepam	30 min.	1,0/ 2,0/ 3,0 mg/ kg KGW	Wi/ Wi ; Wi/ BgVV

Wi/ Wi = Wistar/ Winkelmann

Wi/ BgVV = Wistar/ BgVV

Das Injektionsvolumen sowohl der 0,9% NaCl-Lösung als auch der Testsubstanzen betrug jeweils 1ml/ kg/ KGW.

Es wurden folgende Verhaltensparameter in den einzelnen Untersuchungen erfasst:

- Anzahl der Tastendrucke auf Taste A (kleine Belohnung)
- Anzahl der Tastendrucke auf Taste B (große Belohnung)

Daraus wurden folgende Parameter berechnet:

- Gesamtanzahl der Tastendrucke von Taste A und Taste B
- Prozentualer Anteil der Tastendrucke auf Taste B an der Gesamtzahl der Tastendrucke

3.1.5. Versuchsauswertung und Statistik

Es wurden nur solche Tiere in die Versuchsauswertung einbezogen, die das Lernprogramm erfolgreich absolviert haben. Tiere, die vor den Versuchen Verhaltensauffälligkeiten oder während des Lernprogramms kein Explorationsverhalten zeigten, wurden von den Versuchen ausgeschlossen.

Für die Daten der verhaltenspharmakologischen Untersuchungen wurde keine Normalverteilung angenommen. Die Daten wurden als Mittelwerte der Gruppen und Standardfehler des Mittelwertes (SEM) dargestellt. Beim Vergleich mehrerer Gruppen erfolgte die Berechnung der Signifikanz mit der Rangvarianzanalyse nach Friedman und anschließendem Dunn`s Test.

Ein statistischer Unterschied lag bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $p < 0,05$ vor.

Die statistische Auswertung erfolgte mit Hilfe von SigmaStat Version 2.03 (Jandel Scientific, Deutschland), die Graphiken wurden mit SigmaPlot Version 4.00 (Jandel Scientific, Deutschland) erstellt.