

3 Eigene Untersuchungen

3.1 Material und Methode

3.1.1 Versuchstiere

Bei den Versuchstieren handelt es sich ausschließlich um männliche Mongolische Wüstenrennmäuse (*Meriones unguiculatus*). Diese Art gehört zu der Säugetierordnung der Nagetiere (*Rodentia*), der Unterordnung der Mäuseverwandte (*Myomorpha*), der Familie der Wühler (*Cricetidae*) und der Unterfamilie der Rennmäuse (*Gerbillinae*) (Remane et al., 1980).

3.1.2 Haltungsbedingungen

Den Anforderungen der einzelnen Studien entsprechend werden die Versuchstiergruppen nach Aufzuchtbedingungen unterteilt. Als Käfigtiere werden solche Rennmäuse bezeichnet, die ab dem 30. postnatalen Tag in Einzelhaltung in Standardmakrolonkäfigen Typ III (825 cm² Bodenfläche) ohne jegliche Ausstattung gehalten wurden. Im Fortlauf der Arbeit wird diese Art der Aufzucht als reizarm, restriktiv oder depriviert bezeichnet. Die Tiere aus der Versuchstiergruppe der Gehegetiere wurden dagegen in einem Gehege mit 10 000 cm² aufgezogen. Den in Geschwistergruppen von 2 - 4 Tieren lebenden Rennmäusen standen Äste, Rohre, Steine und Nestboxen als Versteck-, Nage- und Klettermöglichkeit zur Verfügung. Als Bodenbedeckung dienten in Gehegen und Käfigen Holzspäne. Futter und Wasser standen den Tieren ad libitum zur Verfügung.

3.1.3 Versuchsdurchführung

3.1.3.1 Magnetfeldbehandlung

Ab dem 75. postnatalen Tag wurden die Tiere täglich 30 Minuten einem Magnetfeld ausgesetzt. Die Behandlung wurde über 15 Tage um 10:00 Uhr durchgeführt.



Abb. 3.1.3.1
Dargestellt ist die Helmholtzdoppelspule mit Generator (Biomedical Systems; Model MDMS 2000, Wiesbaden) und zwei Versuchstieren in Standardmakrolonkäfigen Typ III.

Die Rennmäuse aus restriktiver Aufzucht wurden in ihren Käfigen in die Versuchsapparatur gesetzt, wobei pro Behandlung jeweils 2 Käfige, mit je einem Tier in der Spule Platz fanden (Abb. 3.1.3.1). Die Position der Tiere (unten oder oben in der Spule) wurde mit jedem Behandlungstag gewechselt. Für die Dauer der Behandlung wurden die Edelstahlgitterdeckel der Käfige durch eine weiße Hartplastikabdeckung ersetzt. Die Luftzirkulation innerhalb der Käfige war für alle Versuchstiergruppen identisch und gewährleistet durch einen Spalt von 2 mm zwischen Abdeckung und Käfig. Die mit 12 Hz behandelten Gehegetiere wurden täglich für die Dauer der Magnetfeldbehandlung in einen Standardmakrolonkäfig Typ III, ohne Versteckmöglichkeit umgesetzt. Die 1 Hz-Gehegetiere wurden ab dem ersten Tag der Behandlung bis zu ihrem letzten Lebenstag in Standardmakrolonkäfige Typ IV (1815 cm² Bodenfläche) mitsamt ihren Nestbau- und Versteckmöglichkeiten transferiert. Entsprechend wurde diese Gruppe und die Käfigtiere in ihren eigenen Boxen, ohne umgesetzt worden zu sein, dem Magnetfeld ausgesetzt. Für die drei verschiedenen Versuchsansätze, 1 und 12 Hz-Gehegetiere und die magnetfeldbehandelten Käfigtiere wurden jeweils Kontrollen angefertigt, die dasselbe Handling erfuhren, jedoch ohne Inbetriebnahme der Magnetfeldspule. In den folgenden Tabellen (Tab. 3.1.3.1a-c, Seite 18) wird ein Überblick über die Anzahl der Versuchstiere unter Berücksichtigung ihrer Behandlung und Haltung gegeben.

Tab. 3.1.3.1a

Behandlung	Haltung	Anzahl
1 Hz	Käfig	n = 10
8 Hz	Käfig	n = 8
12 Hz	Käfig	n = 12
29 Hz	Käfig	n = 10
50 Hz	Käfig	n = 10
Kontrolle	Käfig	n = 10

Tab. 3.1.3.1b

Behandlung	Haltung	Anzahl
1 Hz	Wechsel von Gehege in Käfig mit Nest	n = 6
Kontrolle	Wechsel von Gehege in Käfig mit Nest	n = 10

Tab. 3.1.3.1c

Behandlung	Haltung	Anzahl
12 Hz	tägliches Umsetzen von Gehege in Käfig ohne Nest	n = 11
Kontrolle	tägliches Umsetzen von Gehege in Käfig ohne Nest	n = 5

3.1.3.2 Verhaltensbeobachtungen magnetfeldbehandelter Käfigtiere

Die mit 29 und 50 Hz behandelten Tiere wurden während der 30-minütigen Magnetfeldbehandlung und weitere 30 Minuten nach der Exposition außerhalb der Spule beobachtet. Über dieselbe Zeitspanne wurde das Verhalten der Kontrollgruppe in der Magnetfeldspule und außerhalb des Gerätes erfasst. Bei der Beobachtung wurde das Augenmerk auf 5 verschiedene, häufig bei den Tieren auftretende Verhaltensweisen gerichtet. In 5-Minuten-Abschnitten wurde in einem Ethogramm dokumentiert, ob das Tier in erster Linie an der Wand des Käfigs scharrt, in der Einstreu wühlt, läuft, sitzt oder schläft (Zur Definition dieser Verhaltensweisen siehe Tab. 3.1.3.2a, Seite 19).

Tab. 3.1.3.2a

Scharren:	Das Tier steht auf seinen Hinterbeinen und scharrt mit den Vorderpfoten an der Wand seines Käfigs.
Wühlen:	Die Wüstenrennmaus stößt mit dem Kopf in die Einstreu und wirft Holzspäne zur Seite, die es dann mit den Vorderpfoten weiter hinter sich transportiert.
Laufen:	Das Tier läuft durch seinen Käfig.
Sitzen:	Das Tier hockt auf seinen Hinterbeinen, die Vorderbeine berühren den Boden nicht.
Schlafen:	Das sitzende Tier hat die Augen geschlossen.

So entstand für jedes Tier und jeden Versuchstag eine Liste, in der die Häufigkeit der 5 verschiedenen Verhaltensweisen, subjektiv beurteilt dargestellt wurde. Dabei wurde festgehalten, welche Verhaltensweise überwiegend innerhalb von 5 Minuten Beobachtungszeitraum auftrat. Die Anzahl der Versuchstiere und die Dauer des Beobachtungszeitraums sind in der Tab. 3.1.3.2b, c für die magnetfeldbehandelten Tiere und die entsprechenden Kontrollen dargestellt.

Tab. 3.1.3.2b

Behandlung	Beobachtungszeitraum	Anzahl
29 Hz im MF	5-6 d	n = 10
50 Hz im MF	5 d	n = 2
Kontrolle	15 d	n = 2

Tab. 3.1.3.2c

Behandlung	Beobachtungszeitraum	Anzahl
29 Hz nach MF	3-6 d	n = 8
29 Hz nach MF	13 d	n = 2
50 Hz nach MF	13 d	n = 2
Kontrolle	15 d	n = 2

3.1.4 Technische Daten

Das in der vorliegenden Studie eingesetzte Magnetfeld wurde durch eine Helmholtzdoppelspule mit angeschlossenem Generator erzeugt (Biomedical Systems; Model MDMS 2000, Wiesbaden, Deutschland) (Abb. 3.1.3.1; Seite 17). Der Vollständigkeit halber sei hier erwähnt, dass beim Betrieb der Apparatur auch ein elektrisches Feld entsteht, dieses aber vernachlässigt werden kann, weil es in der Größe nicht in einen Körper einzudringen vermag.

Alle für diese Studie genutzten Geräteeinstellungen wurden im April 2000 im Institut für Umweltmedizin in Lübeck durch Dr. v. Klitzing mit einem Spektrumanalysator (Advantest R3131, Rohde & Schwarz, München, Deutschland) geprüft. Bei dem erzeugten Signal handelt es sich um ein Hochfrequenzsignal (35,53 kHz), das manuell variierbar niedrigfrequent modulierbar ist. Bei den eingesetzten Geräteeinstellungen 1, 8, 12, 29 und 50 Hz wird jeweils ein doppelt moduliertes Signal im Bereich der gewählten Frequenz produziert. Zwischen den niederfrequenten Pulsen besteht ein nicht identischer, aber konstanter zeitlicher Unterschied. Die Abbildung 3.1.4 zeigt exemplarisch das mit dem Spektrumanalysator (Advantest R3131, Rohde & Schwarz, München) ermittelte Magnetfeld bei der Generatoreinstellung von 50 Hz.

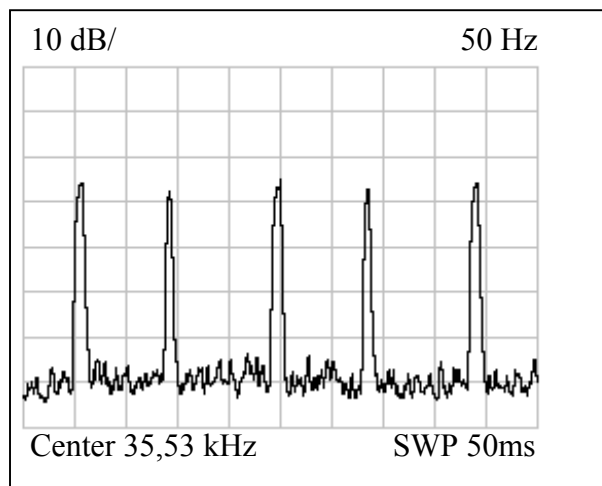


Abb. 3.1.4
Logarithmische Darstellung des
Signals bei der
Generatoreinstellung von 50
Hz.

3.1.5 Methode zum Nachweis mitotischer Zellen

Mit Hilfe des immunhistochemischen Nachweises ist es möglich, sich replizierende DNA, also einzelne mitotisch aktive Zellen, im lebenden Organismus sichtbar zu machen (Gratzner, 1982; Gonchoroff et al., 1986). Voraussetzung für den immunhistochemischen Nachweis ist die Injektion von BrdU (Lösung aus 5-Bromo-2'-Deoxyuridin und 5-Fluoro-2'-Deoxyuridin, im Verhältnis 10:1; Cell Proliferation Kit, code RPN20, Amersham, Braunschweig, Deutschland). Den Wüstenrennmäusen wurde am 90. postnatalen Tag intraperitoneal BrdU in einer Dosierung von 1,0 ml/100 g Körpergewicht injiziert. Das Basenanalogen BrdU wird in die DNA von sich in der S-Phase des Zellzyklus befindenden Stammzellen an Stelle von Thymidin eingebaut (Gonchoroff et al., 1986). Das

Markierungsagens wird entsprechend der Länge der S-Phase etwa 4 Stunden inkorporiert (Miller und Nowakowski, 1988). Nach der BrdU-Injektion leben die Versuchstiere weitere 7 Tage. Während dieser Zeit wandern die markierten Zellen auseinander, wodurch eine genauere Quantifizierung möglich wird.

Nach den 7 Tagen Überlebenszeit werden den Versuchstieren unter Äthernarkose die Gehirne entnommen und sofort bei -20°C eingefroren. Im Folgenden werden die gefrorenen Gehirne mit einem Gefriermikrotom (Frigo-Cut, Mod. 2700, Reichert-Jung, Wien) in $12\ \mu\text{m}$ Horizontalschnitte geschnitten. Jeder dritte Schnitt des Gyrus dentatus wird auf Adhäsionsobjektträgern aufgefangen, so dass insgesamt 38 Gehirnschnitte (rechte und linke Hemisphäre) zur immunhistochemischen Aufarbeitung zur Verfügung stehen.

Als erster Schritt zur immunhistochemischen Sichtbarmachung der BrdU-markierten Zellen im Dentatus werden die Schnitte mit monoklonalen Antikörper „Anti-5-Bromo-2'-Deoxyuridin“ in Kombination mit Nuklease behandelt. Das Enzym dient der Denaturierung der DNA, um die Bindung des Antikörpers an BrdU zu optimieren. An diesen Antikörper bindet sich im zweiten Schritt Peroxidase Anti-Maus IgG2a. Die weitere Behandlung der Präparate mit Diaminobenzidin (DAB) und einer Lösung aus H_2O_2 , Kobalt- und Nickelchlorid bewirkt eine durch die Peroxidase induzierte Konformationsänderung des DAB's zu einem schwarzen Farbpolymer, welches lichtmikroskopisch erfassbar ist. Um die Farbkomplexe deutlich den Zellen des Dentatus zuordnen zu können, wurden die Schnitte mit Toluidinblau gefärbt.

Die Versuchsleiter und Mitarbeiter sind in der Tierversuchsgenehmigung der Bezirksregierung Detmold vom 25.10.1999 Aktenzeichen 23.05 03.1.1 (III/99) aufgeführt.

Detaillierte Darstellung des Versuchsablauf:

1. 5–10 Minuten Lufttrocknen
2. 15 Minuten in Aceton fixieren => Aufbrechen der Zellmembran
3. 3 x 5 Minuten in Phosphatpuffersaline (PBS; aus $11,5\ \text{g Na}_2\text{HPO}_4$; $2,96\ \text{g Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\ \text{H}_2\text{O}$; $5,84\ \text{g NaCl}$; in $1\ \text{l Aqua dest.}$ gelöst)
4. 15 Minuten in 2N HCl => Aufbrechen der Kernmembran, Aufspalten der DNA-Helices
5. 3 x 10 Minuten in PBS waschen
6. 20 Minuten in $2\ \%$ H_2O_2 in Ethanol
7. 3 x 10 Minuten in PBS waschen

8. 20 Minuten Inkubation in 10 % Ziegenserum (Sigma, Deisenhofen) mit PBS, bei Raumtemperatur => Absättigung aller unspezifischen Bindungsstellen
9. Abspülen der Präparate mit PBS
10. 75 Minuten Inkubation mit je 20 µl AK (gefriergetrocknete Nuclease, 4 ml Aqua dest., 40 µl Anti-BrdU) bei Raumtemperatur => Denaturierung der DNA, spezifische Bindung des Anti-BrdU an das BrdU
11. 3 x 10 Minuten Waschen in PBS
12. 40 Minuten Inkubation mit je 20 µl AK (22,5 µl Peroxidase Anti-Maus, 1,5 ml Verdüner) bei Raumtemperatur => Bindung der Peroxidase an den BrdU- AK 1-Komplex
13. 3 x 10 Minuten Waschen in PBS
14. 5 Minuten Inkubation in DAB-Färbelösung (0,33 ml DAB, 50 ml PB (Phosphatpuffer: 5,75 g Na₂HPO₄; 1,48 g Na₂HPO₄ x 2 H₂O in 1 l Aqua dest. gelöst), 5 Tropfen eines H₂O₂, Kobalt- und Nickelchlorid enthaltenden Reagenz) => Bindung des Substrates an die Peroxidase zur Bildung eines Farbkomplexes
15. 3 x 10 Minuten Waschen in Aqua dest.
16. 5 Sekunden Färbung in 1% Toluidinblau (Richardson-Färbung: 1 % Methylenblau in 1 % Borax in Aqua dest., 1 % Azur II in Aqua dest.) (Richardson et al., 1960) => Sichtbarmachung der Zellen des Gyrus dentatus
17. jeweils 15 Minuten in 80, 96 und 100 %-igem Alkohol => Entwässerung
18. 3 x 5 Minuten Waschen in Xylol
19. Eindeckeln mit Eukitt

3.1.6 Quantitative Auswertung

Die Auswertung erfolgt an einem Zeiss-Mikroskop (Typ 4730, Zeiss Wetzlar, Deutschland) im Hellfeld bei 250-facher Vergrößerung. Gezählt werden Farbkomplexe, die sich einer gefärbten Zelle zuordnen ließen oder eine solche gänzlich ausfüllten. Die Anzahl der mitotischen Zellen in der subgranulären Zone sowie in der Körnerzellschicht des Dentatus gehen in die statistische Auswertung ein.

3.1.7 Photographische Dokumentation

Die im Ergebnisteil 3 dargestellten Aufnahmen der Körnerzellschicht des Dentatus wurden an einem Polyvar Fotolichtmikroskop (Reichert-Jung, Wien, Österreich) im Hellfeld erstellt und digital abgespeichert.

3.1.8 Statistische Analyse

Die Datenanalyse erfolgt mit Hilfe der Computerprogramme Excel 97 und Statistika. In die Berechnungen eingegangen sind die gepoolten Werte des rechten und linken Dentatus, nachdem sich keine signifikanten Unterschiede bei allen Versuchstiergruppen zwischen den beiden Wertepaaren zeigen. Die statistische Analyse wird mit Hilfe eines Mittelwertevergleichs durchgeführt, mit anschließender Prüfung durch eine zweifaktorielle Varianzanalyse (Statistika). Dem Vergleich der Mittelwerte wird der F-Test nach Fisher vorgeschaltet (Bärlocher, 1999). So wird geprüft, ob sich die Verteilungen hinsichtlich ihrer Streuungen unterscheiden. Bei gleichen Varianzen wird der doppelte t-Test eingesetzt, bei ungleichen Varianzen der Welsh-Test (Bärlocher, 1999). Mit der anschließenden zweifaktoriellen Varianzanalyse mit Messwiederholung (Statistika) wird die Abhängigkeiten der Datenreihen in ihrem Verlauf über die septo-temporale Achse untersucht.

Im Einzelnen gibt diese Analyse Auskunft über:

- Streuungsursache der Stichprobe A: Untersucht wird, ob sich die beiden zu vergleichenden Gruppen signifikant unterscheiden.
- Streuungsursache Spalte B: Geprüft wird, ob die beiden Datenreihen dem gleichen Verlauf über die septo-temporale Achse folgen.
- Streuungsursache Wechselwirkungen A x B: Untersucht wird, ob es eine Interaktion zwischen der Intervention und der Verteilung der Daten über die septo-temporale Achse gibt.

Im Weiteren wird eine Regressionsanalyse zur Berechnung der Regressionsgeraden und damit weiterer Beurteilung des Gradienten angefertigt.

Gleichermaßen gilt für alle Prüfverfahren:

$p > 0,05$ nicht signifikant (n.s.)

$p \leq 0,05$ schwach signifikant (*)

$p \leq 0,01$ signifikant (**)

$p \leq 0,001$ hoch signifikant (***)