

3. Eigene Untersuchungen

3.1. Material und Methoden

3.1.1. Tiermaterial

Für die Versuche wurden männliche Sprague-Dawley-Auszuchttratten der Firma Tierzucht Schönwalde GmbH mit einem Liefergewicht von 100-130g verwendet.

Die Unterbringung erfolgte in Fünfergruppen in Makrolon-Käfigen (Typ IV). Für die Fütterungsversuche wurden die Tiere einzeln gesetzt (Typ III-Käfige). Ein Lichtprogramm regelte in Zwölfstundenintervallen von jeweils 6.00 bis 18.00 Uhr den Tag-Nacht-Zyklus. Die Umgebungstemperatur betrug $21^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}$ und die Luftfeuchtigkeit $50\% \pm 2\%$. Elevated plus maze-, Hole Board- und RotaRod-Versuche wurden während der Lichtphase, die Versuche zum Nahrungsaufnahmeverhalten zu Beginn der Dunkelphase durchgeführt. Die Tiere erhielten Altromin-1324-Standardfutter (Altromin, Lage, Deutschland) und Wasser *ad libitum*.

Die Durchführung der in dieser Arbeit dargestellten Tierversuche wurde nach § 8 Absatz 1 des Tierschutzgesetzes der Bundesrepublik Deutschland unter der Tierversuchsnummer 390/95 der Senatsverwaltung für Gesundheit in Berlin genehmigt.

3.1.2. Verwendete Substanzen

Substanz	Hersteller/Bezugsquelle
• 5,7-Dihydroxytryptamin-Kreatininsulfat	RBI, Natick; MA, USA
• Chloralhydrat	Sigma-Chemie, Deisenhofen, Deutschland
• Cholezystokinin Oktapeptid (sulfatiert)	synthetisiert von Dr. Henklein, Institut für Biochemie, Humboldt-Universität Berlin
• Desipramin-Hydrochlorid	RBI, Natick; MA, USA
• Fenfluramin-Hydrochlorid	Sigma-Chemie, Deisenhofen, Deutschland
• Pentobarbital-Natrium	Sigma-Chemie, Deisenhofen, Deutschland

Alle weiteren Substanzen, die für die Mikrodialyse und die Histologie verwendet wurden, stammten von Merck, Darmstadt.

Die Substanzen 5,7-DHT, Chloralhydrat, Pentobarbital und Desipramin wurden in isotoner Kochsalzlösung gelöst.

Das sulfatierte Oktapeptid Cholezystokinin (CCK-8S) wurde nach ‚Anlösen‘ mit Cremophor EL (Sigma-Chemie, Deisenhofen, Deutschland) in isotoner Kochsalzlösung gelöst.

Die Applikation von 5,7-DHT erfolgte intrazerebral, Chloralhydrat, CCK-8S, Desipramin, Fenfluramin und Pentobarbital wurden intraperitoneal appliziert.

Die im Text angegebenen Dosierungen der Wirkstoffe beziehen sich auf die oben aufgeführten Salze der verwendeten Substanzen.

3.1.3. Technik der neurotoxischen Läsion

Die Tiere wurden nach der Anlieferung eine Woche in ihren Käfigen belassen, damit sie sich vom Transportstreß erholen und an eine neue Umgebung gewöhnen konnten. Nach einer Woche lag ihr Gewicht zwischen 150 und 180 g.

Die Ratten erhielten 30 Minuten vor dem Eingriff eine Injektion von 25 mg/kg Desipramin (5 ml/kg) i.p., um eine Aufnahme des 5,7-DHT in noradrenerge Nervenendigungen zu verhindern. Als Narkotikum wurde Pentobarbital in einer Dosierung von 50 mg/kg (10 ml/kg) i.p. verwendet. Nach vollständigem Einsetzen der Narkose wurden die Tiere mittels Ohrstiften und Schneidezahnhalterung in einem stereotaktischen Tisch fixiert. Die Kopfhaut wurde in einer Länge von ca. 2 cm durchtrennt und das Schädeldach freipräpariert. Auf den Schädel wurde ein transparenter Balken aus Plexiglas aufgelegt, der mit Hilfe der Schädelnaht Sutura sagittalis ausgerichtet und mittels Schrauben am stereotaktischen Tisch so befestigt wurde, daß er keinen Druck auf die Schädelkalotte ausübte. Durch ein vorgefertigtes Bohrloch im Balken wurde die Schädeldecke mit einem Dentalbohrer (Durchmesser 0,3 mm) trepaniert und die Dura mater mit einer scharfen Kanüle perforiert. Eine Kanüle (Durchmesser 0,22 mm) wurde durch den Balken in eine definierte Tiefe abgesenkt. Als Bezugspunkt für die Koordinaten diente der Schnittpunkt der Sutura sagittalis mit der Interaurallinie. Bohrloch und Länge der Kanüle waren hierbei so ausgerichtet, daß sie bei der Läsion des medianen Raphekerns folgende Koordinaten traf: 0,4 mm anterior, 4,5 mm lateral, 8,08 mm ventral, bei einem Winkel von 31° (linke Körperseite). Bei der Läsion des dorsalen Raphekerns war die Kanüle auf die Koordinaten 0,7 mm anterior, 4,65 mm lateral, 6,05 mm ventral, bei einem Winkel von 35° ausgerichtet (rechte Körperseite).

Nach Absenken der Kanüle wurden 10 µg 5,7-DHT in einem Volumen von 0,5 µl 0,9 %iger Kochsalzlösung (Läsion) bzw. nur 0,5 µl 0,9 %ige Kochsalzlösung (Scheinläsion) über einen Zeitraum von zwei Minuten injiziert. Nach weiteren zwei Minuten wurden die Kanüle und der Plexiglasbalken entfernt und die Kopfhaut mit Knopfheften verschlossen.

Die Tiere wurden auf eine Wärmeplatte (Präzitherm, Storck-Tronic, Deutschland) gelegt, die auf 39° C erwärmt war, und bis zum Aufwachen aus der Narkose beobachtet.

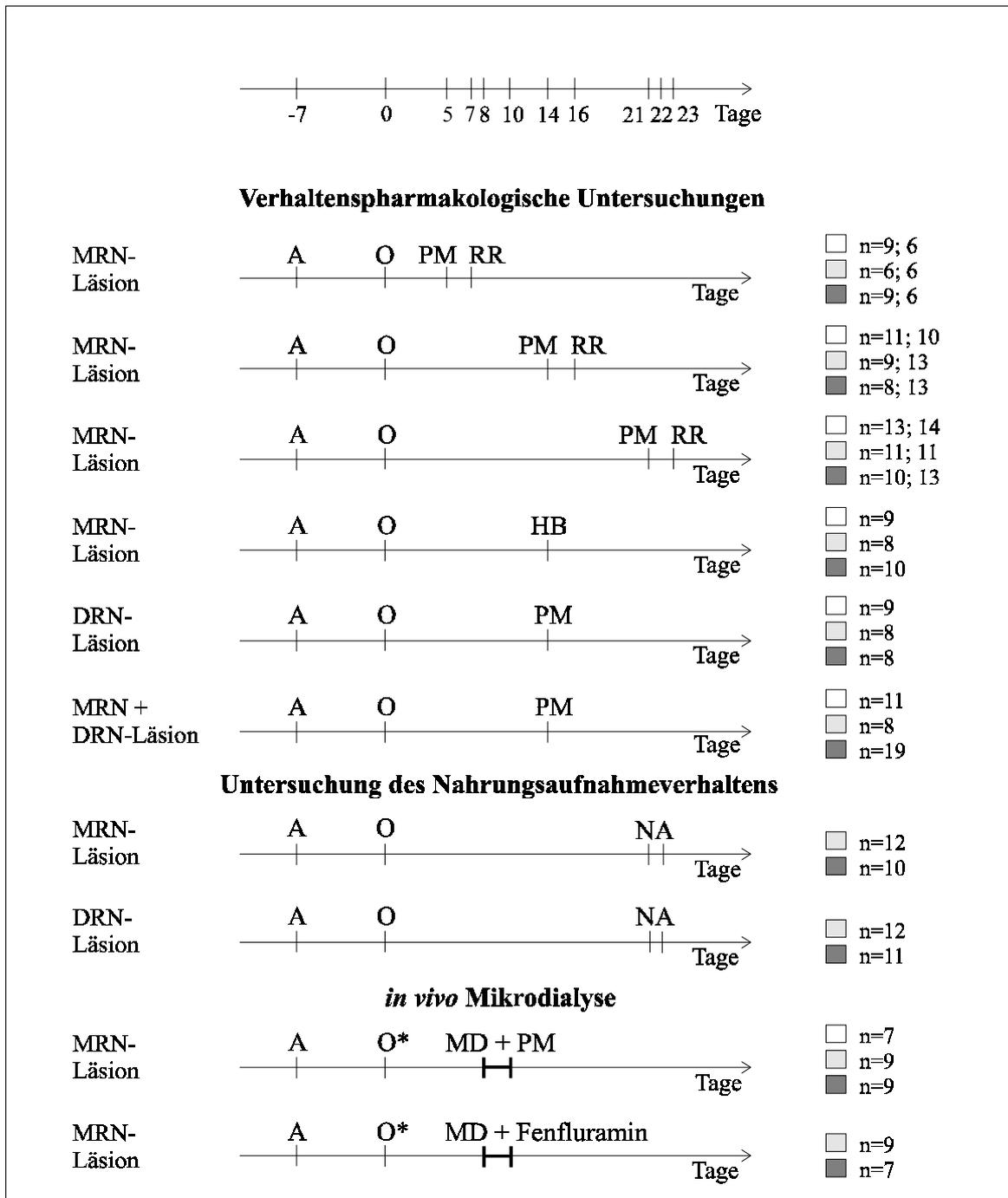
Danach wurden die Tiere zurück in den Tierstall verbracht, weiter beobachtet und verblieben dort für fünf bis 21 Tage der Rekonvaleszenz.

3.1.4. Tiergruppen und Versuchsdurchführung

Alle verwendeten Tiere wurden nach der Anlieferung eine Woche in ihren Käfigen belassen bis sie ein Gewicht zwischen 150 und 180 g erreicht hatten. Bei allen scheinlädierten und lädierten Tieren erfolgte nach dieser Woche die Läsions-Operation. Erst danach erfolgte eine Aufteilung in Gruppen, die nach unterschiedlicher Wartezeit in den verschiedenen verhaltenspharmakologischen, Nahrungsaufnahme- oder Mikrodialyseuntersuchungen getestet wurden (s. Abb. 6).

Um eine Veränderung des Verhaltens im Elevated plus maze durch regenerative Mechanismen der lädierten 5-HT-Neurone aufzudecken, wurden in der vorliegenden Studie drei Zeitpunkte der Verhaltensuntersuchung nach der MRN-Läsion gewählt. Der früheste Zeitpunkt von fünf Tagen wurde dabei als minimale Regenerationszeit der Tiere nach dem Operationsstreß angenommen.

Unterschiede in der Anzahl der Tiergruppen im Elevated plus maze-Test und später im RotaRod-Test ergaben sich daraus, daß Tiere, die vom Elevated plus maze gefallen waren, noch im RotaRod-Test verwendet werden konnten. Generelle Unterschiede in der Anzahl der Tiergruppen ergaben sich durch Ausfälle während der Narkose, das Herabfallen der Tiere von der Versuchsaapparatur und Ausschluß von der Auswertung nach 5-HT-Gehaltsbestimmung oder histologischer Untersuchung.

**Abbildung 6**

Schematische Darstellung der Tiergruppen und Versuchsdurchführung

□ = Unbehandelte Tiere

▒ = Scheinlädierte Tiere

■ = Lädierte Tiere

PM = Elevated plus maze-Test

HB = Hole Board-Test

MD = Mikrodialyseversuch

A = Ankunft

O = Operation (Läsion bzw. Scheinläsion)

O* = Operation (Läsion/Scheinläsion u. Mikrodialysekanüle)

RR = RotaRod-Test

NA = Nahrungsaufnahme-Test

3.1.5. Verhaltenspharmakologische Untersuchung

3.1.5.1. Elevated plus maze

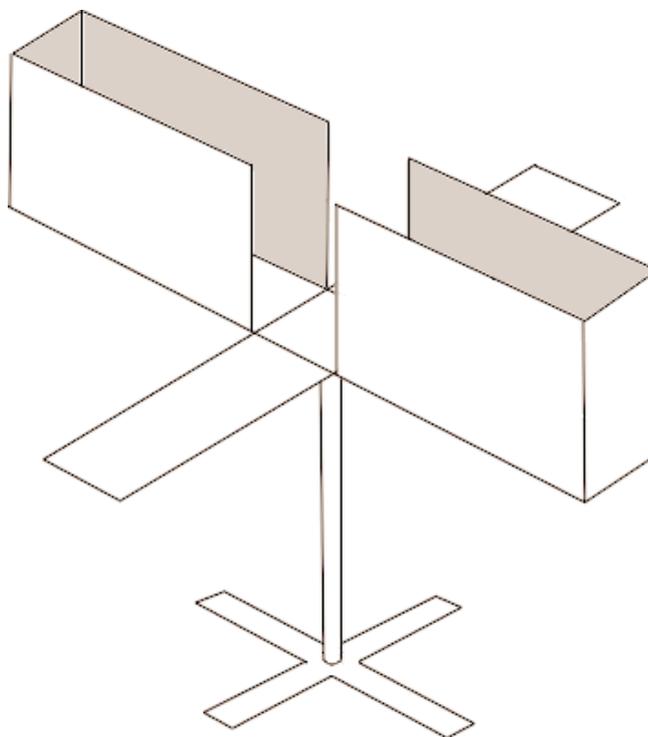


Abbildung 7

Schematische Darstellung des Elevated plus maze

Das Elevated plus maze (aus grauem Perspex, Höhe 60 cm) bestand aus vier Armen (43 x 17 cm), die über ein Zentrum verbunden waren (17 x 17 cm). Zwei gegenüberliegende Arme waren offen, die anderen zwei gegenüberliegenden Arme waren von Seitenwänden (Höhe 25 cm) umschlossen.

Das Elevated plus maze wurde indirekt mit 150 lux auf den offenen und 53 lux in den geschlossenen Armen beleuchtet.

In einer schallgeschützten Verhaltensbox wurden die Tiere in das Zentrum des Elevated plus maze gesetzt und verblieben dort für einen Zeitraum von 10 Minuten. Das Verhalten der Tiere wurde über eine Kamera (Computar, Japan) auf einem angeschlossenen Monitor (Panasonic, Matsushita, UK) außerhalb der Kammer beobachtet und mit einem Videorekorder (Panasonic, Matsushita, Japan) aufgezeichnet. Das Elevated plus maze wurde zwischen den einzelnen Versuchsdurchläufen mit Meliseptol (Merck, Darmstadt) gereinigt, um Duftmarken des

Vorgängertieres zu entfernen. Eine Auswertung erfolgte nach dem Versuchsende mit einem computergestützten System (CPL Video Track Systems, UK), um eine objektive Auswertung zu gewährleisten.

Folgende Verhaltensparameter wurden festgehalten:

- Anzahl der Eintritte in die offenen Arme
- Aufenthaltsdauer in den offenen Armen
- Anzahl der Eintritte in die geschlossenen Arme
- Aufenthaltsdauer in den geschlossenen Armen
- Zurückgelegte Gesamtdistanz

Daraus wurden folgende Parameter berechnet:

- Anzahl aller Eintritte
- Prozentualer Anteil der Eintritte in die offenen Arme an der Anzahl aller Eintritte
- Prozentualer Anteil der Zeit in den offenen Armen an der Gesamtzeit

Zur Beurteilung der ‘anxiolytischen’ Wirkung wurden als wichtigste Parameter der Anteil der Eintritte in die offenen Arme an allen Eintritten und der Anteil der Zeit in den offenen Armen an der Gesamtzeit verwendet (Pellow et al., 1985).

Als Maß für die lokomotorische Aktivität diente die zurückgelegte Gesamtdistanz und die Anzahl aller Eintritte in die offenen und geschlossenen Arme.

3.1.5.2. Hole Board

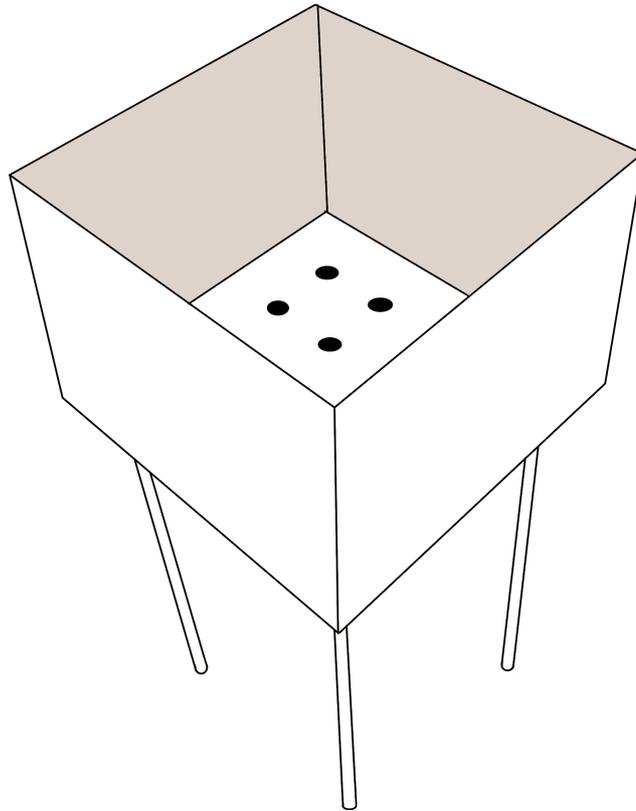


Abbildung 8

Schematische Darstellung des Hole Boards

Das Hole Board bestand aus einer Plattform (50 x 50 cm, Höhe 78 cm), in die 16 Löcher (\varnothing 2,6 cm) eingelassen waren und die von Seitenwänden umschlossen war (Höhe 35 cm). Es wurde mit 100 lux indirekt beleuchtet.

In einer schallgeschützten Verhaltensbox wurden die Tiere an zwei aufeinanderfolgenden Tagen in die Mitte der Plattform gesetzt und über einen Zeitraum von jeweils 10 Minuten überwacht. Die restliche Vorgehensweise entspricht der des Elevated plus maze-Tests. Die Holepokes (Kopf durch ein Loch im Boden stecken) wurden über ein Lichtschrankensystem an der Apparatur automatisch gemessen.

Folgende Parameter wurden computergestützt festgehalten:

- Anzahl der Holepokes in alle Löcher
- Zurückgelegte Gesamtdistanz

3.1.5.3. RotaRod

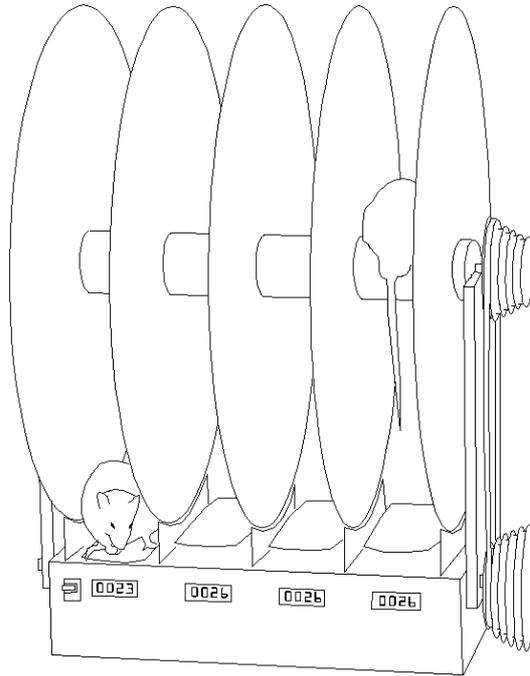


Abbildung 9

Schematische Darstellung des RotaRods

Das RotaRod bestand aus einer aufgehängten Walze, die durch fünf Scheiben (\varnothing 49 cm) in vier Abteilungen unterteilt war, so daß die Tiere keinen Sichtkontakt zum Nachbartier hatten. Der Umfang der Walze betrug 9 cm.

Am ersten Tag wurden die Tiere konditioniert. Sie wurden dreimal im Abstand von jeweils zwei Stunden für einen Zeitraum von zwei Minuten in eine der Abteilungen auf die Walze gesetzt. Die Walze drehte sich dabei mit gleichbleibender Geschwindigkeit von vier Umdrehungen/Minute. Fiel das Tier vor Ablauf der zwei Minuten von der Walze, wurde es wieder aufgesetzt.

Am darauffolgenden Tag fand der Versuch statt. Die Tiere wurden auf die Walze aufgesetzt, die sich zunächst mit einer Geschwindigkeit von vier Umdrehungen/Minute drehte. Gleichzeitig wurde ein Hebel, der sich unter der Walze befand, manuell umgelegt und damit eine Stoppuhr in Gang gesetzt. Alle dreißig Sekunden erhöhte sich die Geschwindigkeit automatisch um vier Umdrehungen/Minute. Wenn die Tiere sich nicht mehr auf der Walze halten konnten und herabfielen, wurde der Hebel darunter herabgedrückt und stoppte die Zeit, die sich die Tiere auf der Walze halten konnten.

3.1.6. Untersuchung des Nahrungsaufnahmeverhaltens

Für die Untersuchung des Nahrungsaufnahmeverhaltens wurden die Tiere zwei Tage vor Versuchsbeginn in einem separaten Tierstallraum in Makrolonkäfigen Typ III einzeln gesetzt. Sie erhielten bis zum Versuchsbeginn Wasser und Futter ad libitum. Zu Beginn der Dunkelphase wurde den Tieren 2 ml/kg KGW 0,9 %ige Kochsalzlösung i.p. appliziert und jedem Tier ca. 10 Minuten später eine abgewogene Menge Altromin Standardpellets in die dafür vorgesehenen Futterbehälter gegeben. Nach einer Stunde wurde die übriggebliebene Futtermenge abgewogen und aus der Differenz die verzehrte Futtermenge errechnet. Am darauffolgenden Tag wurde diesen Tieren wiederum zu Beginn der Dunkelphase 2 ml/kg KGW 0,9 %ige Kochsalzlösung, in der nun 8 µg CCK-8S gelöst war, i.p. appliziert und ansonsten so verfahren wie am Vortag.

Nach der Beendigung der Verhaltensversuche erfolgte die Tötung der Tiere durch i.p. Applikation einer Überdosis Chloralhydrat.