

3.1.7. Mikrodialyse - Untersuchungen im ZNS

Bei der *in vivo* Mikrodialyse sollte am wachen, freibeweglichen Tier die Konzentration des extrazellulären 5-HT im Hippokampus während des Aufenthaltes auf dem Elevated plus maze oder nach Applikation von Fenfluramin bestimmt werden.

Die Versuchsdurchführung der intrazerebralen Mikrodialyse gliederte sich in zwei Hauptabschnitte: Die Gewinnung des Mikrodialysates und die Analyse des gesammelten Dialysates (Abb. 10 und 12).

Zur Gewinnung des Dialysates wurde eine pulsationsarme Pumpe mit geringer Fördergeschwindigkeit (CMA 100, Carnegie Medicin, Schweden) (1 μ l/min) über einen biologisch inerten Schlauch mit dem Einlaß der Mikrodialysetsonde verbunden. Die Flüssigkeit, die aus dem Ausfluß der Mikrodialysetsonde austrat, wurde in einem Eppendorfröhrchen aufgefangen (Abb. 10).

Die Konzentrationsbestimmung von 5-HT im Dialysat erfolgte mit der Hochleistungs-Flüssigchromatographie (High Performance Liquid Chromatography, HPLC) mit elektrochemischer Detektion (ECD) (Abb. 12).

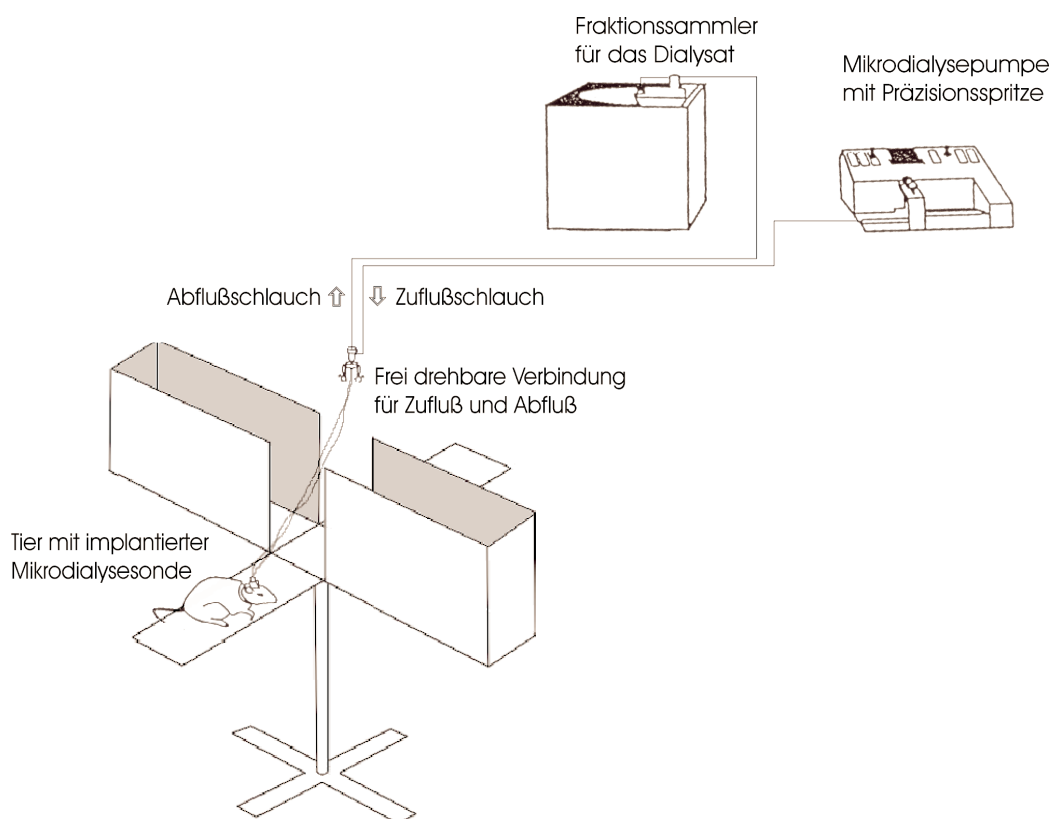


Abbildung 10

Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus für die *in vivo* Mikrodialyse

3.1.7.1. Vorbereitung der Mikrodialysesonde

Vor dem Gebrauch der Mikrodialysesonde (CMA/12, Carnegie Medicin, Schweden) wurde diese mit entgastem Wasser (Aqua bidest) für 24 Stunden gespült, um darin befindliches, lieferbedingtes Glycerol, zum Schutz der Poren, auszuwaschen.

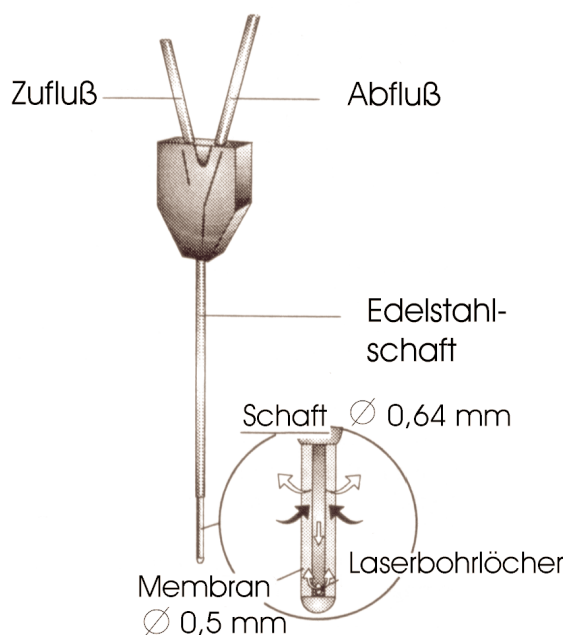


Abbildung 11

Schematische Darstellung der Mikrodialysesonde

Die Mikrodialysesonde wurde vor dem Implantieren mit einer Fließgeschwindigkeit von 1 μ l/min mit künstlichem Liquor perfundiert.

Der künstliche Liquor bestand aus entionisiertem Wasser mit: 125 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 27 mM NaHCO₃, 0,5 mM NaH₂PO₄ H₂O, 2,4 mM Na₂HPO₄ 2H₂O, 0,5 mM Na₂SO₄, 1,0 mM MgCl₂ 6H₂O und 1 mM CaCl₂ 2H₂O (pH 7,4).

Stichprobenartig wurden die Mikrodialysetenden in ein Eppendorfgefäß mit Standardlösungen von 10⁻⁶ M 5-HT und 10⁻⁶ M 5-HIAA in künstlichem Liquor getaucht. Nach einer Äquilibrierungszeit von 30 min erfolgte die Sammlung von drei aufeinanderfolgenden Dialysaten zu jeweils 20 μ l, die auf ihren Gehalt an 5-HT und 5-HIAA untersucht wurden. Das Verhältnis der Konzentrationen von 5-HT und 5-HIAA in den gesammelten Dialysaten zu denen der Außenlösung liefert die relative Wiederfindungsrate, die einen Anhaltspunkt für

die Durchlässigkeit der Sonden gab. Die Wiederfindungsrate war unabhängig von der Konzentration der Standardlösungen im Bereich von 10^{-6} M für 5-HT und 5-HIAA.

Die verwendeten Mikrodialysesonden hatten eine Wiederfindungsrate zwischen 21 und 24 % für Serotonin und 5-HIAA.

3.1.7.2. Implantation der Führungskanüle

Als zu untersuchendes Hirngebiet wurde der Hippokampus gewählt, weil von ihm angenommen wird, daß er in Angstprozesse involviert ist und weil er überwiegend vom MRN, aber auch vom DRN innerviert wird. Dazu mußte den Tieren eine Mikrodialysesonde eingesetzt werden bzw. zunächst eine Führungskanüle implantiert werden. Dies erfolgte in der Narkose, in der auch die MRN-Läsion bzw. Scheinläsion durchgeführt wurde. Unbehandelte Tiere wurden bei Erreichen des entsprechenden Körpergewichts, der gleichen Narkose unterzogen (Pentobarbital 50 mg/kg i.p.).

Der Kopf des narkotisierten Tieres wurde in einem stereotaktischen Gerät (David Kopf, USA) mittels Ohrstiften und Schneidezahnhalterung fixiert und die bereits inzisierte Kopfhaut mit Klemmen fixiert bzw. in einer Länge von ca. 2 cm durchtrennt und das Schädeldach freipräpariert. Die Implantationskoordinaten für den Hippokampus (Koordinaten anterior-posterior 5,8 mm caudal von Bregma, lateral 4,6 mm von der Mittellinie; Paxinos und Watson, 1986) wurden am stereotaktischen Arm eingestellt.

Mit einem Handbohrer aus Wolframstahl (\varnothing 1 mm) wurden 3 Löcher senkrecht in die Schädeldecke gebohrt, ohne die Dura mater zu verletzen. Die mittlere Bohrung erfolgte direkt über der Implantationsstelle, während die anderen jeweils 2-3 mm entfernt eingebracht wurden. In diese beiden äußeren Bohrungen wurde jeweils eine Vanadiumstahlschraube eingebracht, die zur späteren Verankerung der Führungskanüle mit Dental-Zement (Technovit, Kulzer, Deutschland) dienen.

Die Dura mater im mittleren Bohrloch über der Implantationsstelle wurde mittels einer Kanüle eröffnet. Die an einem stereotaktischen Arm befestigte Führungskanüle wurde über dem mittleren Bohrloch ausgerichtet und 4,5 mm tief in den Hippokampus abgesenkt.

Die Befestigung der Führungskanüle an der Schädelkalotte erfolgte mit zähflüssig-pastösem Dental-Zement, der die Führungskanüle und die Schrauben umschloß. Dieser Dental-Zement wurde vorsichtig und in kleinen Portionen aufgetragen, um eine durch die Aushärtung

bedingte Wärmeentwicklung zu mindern. Nach dem Aushärten des Dental-Zementes (ca. 15 Minuten) wurden der stereotaktische Arm und die Klemmen von der Kopfhaut entfernt. Die Wunde wurde mit Knopfheften verschlossen.

Nach der Operation kamen die Tiere in Einzelkäfige, die keine scharfen Ecken und kein Gitter aufwiesen. Die Käfige standen auf einer Wärmeplatte (Präzitherm, Storck-Tronic, Deutschland), die auf 39°C erwärmt war, und wurden bis zum Aufwachen aus der Narkose beobachtet.

Danach wurden die Tiere zurück in den Tierstall verbracht, weiter beobachtet und verblieben dort für 8 bis 10 Tage der Rekonvaleszenz.

3.1.7.3. Durchführung der Mikrodialyseversuche

Am Tag vor dem Versuchsbeginn wurden die Tiere einzeln in ihren gewohnten Käfigen in den Raum verbracht, in dem der Versuch stattfand.

Die Mikrodialyse-sonde wurde ihnen 17 Stunden vor Versuchsbeginn unter einer leichten Narkose (180-200 mg/kg Chloralhydrat i. p.) eingesetzt. Dafür wurde die Sonde schon vor dem Einsetzen konstant mit künstlichem Liquor perfundiert (1 µl/min). In der darauffolgenden Nacht wurde die Flußrate auf 0,7 µl/min reduziert. Am Versuchstag wurde die Perfusion auf 1 µl/min erhöht. Auf den Auslaß der Dialyse-sonde wurde ein Polyethylenschlauch der Firma Carnegie Medicin (Schweden) aufgeschoben, mit Blue Tack (Bostik) gesichert und ca. 15 cm über dem Tier ein Auffanggefäß installiert, in das dieser Plastikschauch geleitet wurde. Der zuführende Schlauch hatte die Form einer Spirale. Am Ende war ein Swivel befestigt, der es ermöglichte, daß sich der Schlauch frei drehen konnte. Stabile 5-HT-Konzentrationen waren innerhalb einer Stunde erreicht. Diese Perfusate wurden verworfen. Anschließend wurden drei 20 µl-Frak-tionen gesammelt, die Werte wurden gemittelt und stellten den Basalwert dar.

Mikrodialyse – Elevated plus maze

Bei dem ersten Mikrodialyseversuch wurden unbehandelte, scheinlädierte und MRN-lädierte Tiere nach der Bestimmung der Basalwerte im Heimatkäfig für eine Sammelperiode (20 Minuten) auf das Elevated plus maze gesetzt, um die neurochemischen Korrelate während des Aufenthalts in einer aversiven Umgebung zu erfassen. Das hinleitende Schlauchsystem

war so angepaßt, daß das Tier sich damit ungehindert auf dem Elevated plus maze bewegen konnten.

Danach kehrten die Tiere in ihre gewohnten Käfige zurück und die Sammlung der 20 µl-Fractionen (alle 20 Minuten) wurde noch für 100 Minuten fortgesetzt.

Das Verhalten der Tiere auf dem Elevated plus maze wurde mit der Videokamera und dem Videorekorder aufgenommen und ausgewertet.

Mikrodialyse – Fenfluramin

Bei dem zweiten Mikrodialyseversuch erhielten scheinlädierte und MRN-lädierte Tiere nach der Bestimmung der Basalwerte eine i.p. Injektion mit 10 mg/kg KGW Fenfluramin (ein Serotonin-Freisetzer und Wiederaufnahmehemmer). Die Sammlung der 20 µl-Fractionen erfolgte über einen Zeitraum von 180 Minuten. Die Tiere verblieben während der gesamten Versuchsdauer in ihren gewohnten Käfigen.

Nach der Beendigung der Versuche erfolgte die sofortige Tötung der Tiere durch eine Überdosis Chloralhydrat, die Mikrodialysesonden wurden vorsichtig entfernt, die Gehirne der Tiere wurden entnommen und eine histologische Untersuchung durchgeführt (siehe Kapitel 3.1.8.2.).

3.1.7.4. Analyse der Mikro dialysate

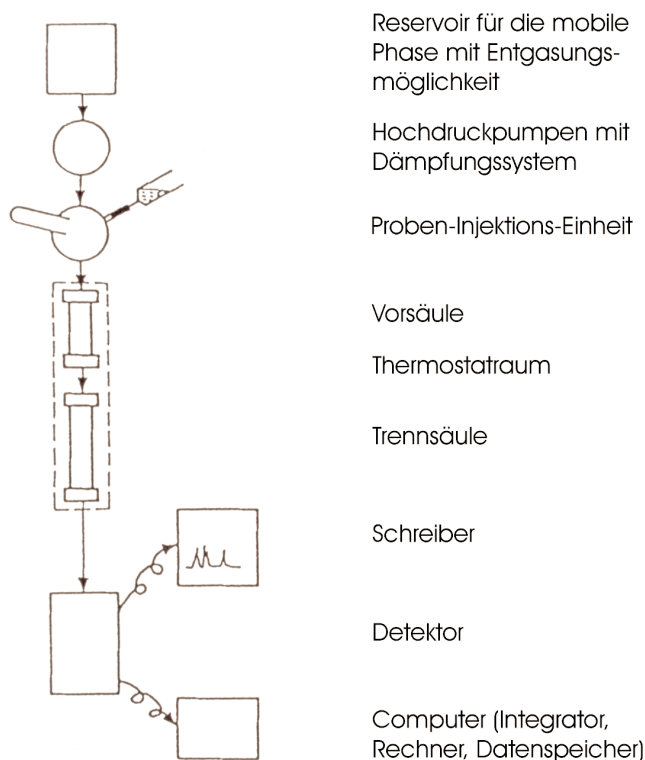


Abbildung 12

Schematische Darstellung des Methodenbaus für die Analyse des Mikro dialysats mit der HPLC

Die Trennung von 5-HT und 5-HIAA wurde durch eine Umkehrphasen-Chromatographie an einer 100 mm langen HPLC-Säule (SepStik microbore column MF-8949, 3 μ m C 18, Innendurchmesser 1 mm; BAS, USA) vorgenommen.

Als mobile Phase der Chromatographie wurde hochreines Wasser mit 0,15 mM NaH_2PO_4 , 1,0 mM EDTA und 0,5 mM SOS verwendet. Diese Lösung wurde mit konzentrierter Phosphorsäure auf einen pH-Wert von 3,7 eingestellt, dann gefiltert (Millipore, USA, Porendurchmesser 0,45 μ m), und es wurde nachfolgend 3 % Isopropanol zugefügt. Abschließend wurde die mobile Phase mit einer Heliumspülung und durch Ultraschall entgast.

Die mobile Phase wurde mit einer Fließgeschwindigkeit von 50 μ l/min mit einer pulsationsarmen HPLC-Pumpe (LC 10 AD, Shimadzu Europa, Deutschland) gefördert.

Die Probe wurde durch ein Rheodyne-Injektionsventil (RH 8125) mit einer 5µl-Probeschleife auf die Säule aufgegeben.

Die Substanzen wurden nach der Trennung auf der analytischen Säule amperometrisch an einer Glaskarbonelektrode (UniJet CC5 electrochemical cell, BAS, USA) bei einem Gleichspannungspotential von +0,65 V gegenüber einer Ag/AgCl-Referenzelektrode mit Hilfe eines elektrochemischen Detektors (DECADE electrochemical detector, Antec, Netherland) oxidiert. Der Oxidationsstrom wurde mit einem Chromatographiedatensystem (Chrom-A-Dat, Barspec Systems Inc., Israel) aufgezeichnet und ausgewertet.

Das Detektionslimit betrug $2 \cdot 10^{-11}$ M 5-HT in künstlichem Liquor. Als Detektionsgrenze wurde ein Signalrauschverhältnis von 3:1 festgelegt.

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 5-HT und 5-HIAA.

Die Identifikation der gesuchten Substanzen im Dialysat erfolgte über die substanzspezifischen Retentionszeiten, die vorab bei der Analyse von Standardlösungen im künstlichen Liquor bestimmt wurden.

3.1.8. Überprüfung der Läsionstechnik

Zur Überprüfung der Läsionstechnik wurden die lädierten Tiere entweder der Gehaltsbestimmung von Serotonin in verschiedenen Gehirnstrukturen oder einer histologischen Untersuchung unterzogen.

3.1.8.1. Gehaltsbestimmungen von Serotonin in verschiedenen Gehirnstrukturen

Tiere mit Läsionen des medianen, des dorsalen oder beider Raphekerne wurden nach 14, 17-19 bzw. 16-18 Tagen dekapitiert, die Gehirne entnommen und augenblicklich bei -80°C eingefroren. Auf einer gekühlten Fläche (-10°C) wurden in Anlehnung an den Atlas von König und Klippel (1963) die Gehirne präpariert und Hippokampus, Hypothalamus, frontaler Kortex und Septum isoliert. Diese Strukturen wurden ausgewählt, da der Hippokampus in emotionalen Prozessen eine wichtige Rolle spielt und hauptsächlich vom MRN, aber auch vom DRN innerviert wird, der Hypothalamus ein Kontrollzentrum für das Nahrungsaufnahmeverhalten darstellt und der Kortex hauptsächlich vom DRN, aber auch vom MRN innerviert wird. Das Septum war, als dem Hippokampus nachgeschaltete Struktur ebenfalls von Interesse. Die Hirnareale wurden sofort gewogen, auf Trockeneis eingefroren und bis zur biochemischen Analyse bei -80°C gelagert.

Für die Analyse wurden die Gewebeproben mittels Ultraschall in 30-40fachem Volumen N_2 -gesättigten, entionisierten Wassers bei 4°C homogenisiert. Direkt anschließend wurde ein Aliquot des Homogenats (200-300 μl) zu einem entsprechenden Volumen 0,2 M Perchlorsäure, die 0,8 mM NaHSO_3 enthielt, gegeben und bei 25,000 g für 15 Minuten bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde für die Messung von 5-HT benutzt. Er wurde in einem Speed vac concentrator (Savant, Farmingdale, NY, USA) lyophilisiert und Aliquots zur Bestimmung von jedem Amin wurden in separate Eppendorfgefäße gegeben und bei -80°C gelagert. Die Konzentrationsbestimmung von 5-HT erfolgte mit der HPLC mit elektrochemischer Detektion (ECD). Das HPLC-System bestand aus einer pulsationsarmen Waters Pumpe (Nr. 45), einer 30 cm langen Säule ($\mu\text{Bondapak C-18}$, 3,9 mm, Waters Ass., Milford, MA, USA), einem 6-Wege-Injektionsventil mit einer 100 μl Sammelschleife (Rheodyne, Berkeley, CA) und einem Zwei-Kanal-Rekorder (Houston Instruments, Houston, TX), der mit jedem Kanal einen bestimmten Verstärkungsbereich abdeckt (0,1 und 1 V). Die

Substanzen wurden nach der Trennung auf der analytischen Säule an einer Glaskarbonelektrode (TL-3) bei einem Gleichspannungspotential von 0,55 oder 0,8 V gegenüber einer Ag/AgCl-Referenzelektrode mit Hilfe eines amperometrischen Detektors (LC-3; beide von Bioanalytical Systems, West Lafayette, IN) oxidiert. Als mobile Phase der Chromatographie wurden entgaster 0,1 M Natriumacetat/Essigsäure-Puffer, pH 4,5 mit 1,0 mM EDTA und 5 % Methanol verwendet und mit einer Fließgeschwindigkeit von 3,0 ml/min gefördert.

3.1.8.2. Histologie

Histologische Untersuchungen wurden zur Überprüfung des korrekten Sitzes der Läsionskanüle und der Mikrodialysesonde durchgeführt.

Sofort nach der Tötung der Tiere wurden die Gehirne entnommen und in 4 %iger Paraformaldehydlösung mindestens 7 Tage fixiert. Nach einer 3-4 stündigen Spülung der Gehirne in 5 %iger Saccharoselösung, wurden sie über Nacht in 17 %ige Saccharoselösung (Gefrierschutz) verbracht.

Am Tag darauf wurden die Gehirne in Isopentan eingefroren, das in flüssigem Stickstoff auf -80° C gekühlt wurde.

Läsionskanüle

Das Mittelhirn wurde nach Erwärmung auf -22° C mit einem Gefrierschnittmikrotom (Cryocut 1800, Reichert-Jung, Deutschland) geschnitten; Schnittdicke 25 µm. Die Schnitte wurden auf Objektträger (Super Frost Plus, Menzel-Gläser, USA) aufgezogen und 24 Stunden in Galloxyanin-Chromalaun (Färbemethode nach Einarson) gefärbt, mit Schnelleindeckmittel (Entellan, Merck, Darmstadt) eingedeckt und anschließend unter dem Mikroskop, anhand der Lage des Endpunktes des Stichkanals der Läsionskanüle, ausgewertet.

Mikrodialysesonde

Das Vorderhirn wurde in 60 µm dicke Scheiben geschnitten und der Sitz der Mikrodialysesonde im Hippokampus beurteilt.

3.1.9. Versuchsauswertung und Statistik

Es wurden nur solche Tiere in die Versuchsauswertung einbezogen, bei denen die Spitze der Läsionskanüle im Gebiet des medianen bzw. des dorsalen Raphekerns (Abb. 13) und die Mikrodialyse sonde im Hippokampus lag.

Für die Daten des RotaRod-Versuchs und des Nahrungsaufnahmeverhaltens wurde eine Normalverteilung angenommen, und es wurden die arithmetischen Mittelwerte der Gruppen und die Standardfehler des Mittelwertes (SEM) dargestellt. Die Berechnung der Signifikanz mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit $p < 0,05$ erfolgte für die Werte des Nahrungsaufnahmeverhaltens mit dem gepaarten t-Test. Die Unterschiede zwischen mehreren Gruppen im RotaRod-Test wurden mit Hilfe einer Varianzanalyse und einem multiplen Vergleichstest (Student-Newman-Keuls-Test) auf Signifikanz überprüft.

Für die Daten des Elevated plus maze-Test, des Hole Board-Tests, der 5-HT-Gehalte und der Mikrodialyseuntersuchung wurde keine Normalverteilung angenommen. Es sind die Medianwerte mit den 25./75. Perzentilen dargestellt. Die Berechnung der Signifikanz mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit $p < 0,05$ erfolgte mit dem Mann-Whitney-Test. Unterschiede zwischen mehreren Gruppen wurden mit Hilfe der Kruskal-Wallis-Varianzanalyse und dem Dunn's-Test statistisch ausgewertet. Da dabei der Vergleich von jeweils nur unbehandelten gegen scheinladierte und nur scheinladierten gegen ladierte Tiere von Interesse war, wurden diese anschließend mit Hilfe des Mann-Whitney-Tests mit adjustiertem Alpha ($p < 0,025$) ausgewertet.

Alle statistischen Berechnungen mit Ausnahme der statistischen Auswertung des Hole Board-Tests, erfolgten mit Hilfe von SigmaStat Statistical Analysis System Version 1.01 (Jandel).

Bei den Daten des Hole Board-Tests wurden die Unterschiede zwischen mehreren Gruppen an zwei aufeinanderfolgenden Zeitpunkten nach einer Methode von Brunner und Langer (1999) vom Institut für Biometrie und Informationsverarbeitung am Fachbereich Veterinärmedizin der FU Berlin ausgewertet. Die statistische Berechnung erfolgte mit Hilfe eines SAS Makros der Verfasser.