

**Lichtmikroskopische und ultrastrukturelle  
morphologische Veränderungen in  
der Hippocampusformation von Tupaia (*Tupaia belangeri*)  
als Folge von chronisch psychosozialem Streß**

DISSERTATION

zur Erlangung des akademischen Grades  
eines Doktors der Naturwissenschaften  
- Dr. rer. nat. -

an der  
Fakultät für Biologie  
Universität Bielefeld

von  
Gesa Vollmann-Honsdorf  
aus Osterode am Harz

2001

# INHALT

<b>1. EINLEITUNG.....</b>	<b>1</b>
1.1. Streß und Streßreaktion.....	1
1.2. Corticosteroidrezeptoren.....	3
1.3. Chronischer Streß.....	5
1.4. Hippocampusformation und chronischer Streß.....	6
1.5. Tupaia als Streßmodell.....	8
1.6. Zielsetzung und Fragestellung.....	9
<b>2. MATERIAL UND METHODE.....</b>	<b>11</b>
2.1. Tiere und Tierhaltung.....	11
2.2. Induktion von psychosozialem Streß.....	11
2.3. Cortisol-Behandlung.....	12
2.4. Physiologische Parameter.....	13
2.4.1. Gewichtsbestimmung und Urinabnahme.....	13
2.4.2. Cortisolbestimmung.....	14
2.4.3. Noradrenalinbestimmung.....	14
2.4.4. Statistik .....	15
2.5. Perfusion und Präparation des Gewebes.....	16
2.6. Hippocampus-Histologie und Glucocorticoide.....	16
2.6.1. Präparation und Einbettung in Epoxyharz.....	16
2.6.2. Anfertigung und Färben von Semi-Dünn-Schnitten.....	17
2.6.3. Anfertigung und Kontrastieren von Ultra-Dünn-Schnitten.....	18
2.6.4. Lichtmikroskopische Auswertung und computergestützte Analyse ..	19
2.6.5. Elektronenmikroskopische Auswertung und computergestützte... ...Analyse des Heterochromatins.....	19
2.6.6. Statistik.....	20
2.7. Zellzahl des Hippocampus.....	21
2.7.1. Präparation.....	21
2.7.1.1. Einbettung in Glycolmethacrylat.....	21
2.7.1.2. Schneiden und Färben.....	21
2.7.2. "optical fractionator".....	22
2.7.3. Zählschema .....	24
2.7.4. Computergestützte Auswertung.....	25
2.7.5. Fehlerrechnung und Statistik.....	26
2.8. "in situ end labeling (ISEL) .....	27
2.8.1. Präparation und Einbettung in Paraffin.....	27
2.8.2. ISEL.....	28
2.8.3. Semiquantitative Auswertung ISEL positiver Zellen und Statistik..	28

<b>3. ERGEBNISSE.....</b>	<b>30</b>
3.1. Physiologische Parameter.....	30
3.1.1. Körpergewicht.....	30
3.1.2. Cortisol im Urin.....	32
3.1.3. Noradrenalin im Urin.....	33
3.2. Anatomie des Hippocampus von Tupaia.....	34
3.3. Streßeffekte auf lichtmikroskopischer Ebene.....	37
3.4. Ultrastruktur der Pyramidenneurone und deren Zellkerne.....	38
3.5. Einfluß von Streß und Cortisol auf die Ultrastruktur.....	41
3.6. Zellzahl des Hippocampus.....	46
3.7. ISEL.....	52
<b>4. DISKUSSION.....</b>	<b>54</b>
4.1. Das psychosoziale Streßmodell von Tupaia.....	54
4.2. Physiologische Veränderungen bei chronischem Streß.....	55
4.3. Strukturelle Veränderungen bei chronischem Streß.....	59
4.3.1. Heterochromatin.....	61
4.3.2. Cortisol.....	63
4.3.3. Corticoidrezeptoren.....	65
4.3.4. Modulierende Faktoren anderer Transmittersysteme.....	67
4.3.4.1. Glutamat.....	68
4.3.4.2. Noradrenalin.....	70
4.3.4.3. Serotonin.....	71
4.3.4.4. Dopamin und Neuropeptide.....	72
4.3.4.5. Hormone.....	73
4.3.5. Streß und Zelltod .....	73
4.3.5.1. Zellzahl.....	73
4.3.5.2. Apoptose.....	78
4.4. Schlußfolgerung.....	81
<b>5. ZUSAMMENFASSUNG.....</b>	<b>83</b>
<b>6. LITERATUR.....</b>	<b>85</b>
<b>7. ANHANG.....</b>	<b>107</b>
7.1. Chemikalienliste.....	107
7.2. Lösungen und Puffer.....	109
7.3. Verwendete Abkürzungen und Symbole.....	111
7.4. Danksagung und Anmerkung.....	112
7.5. Veröffentlichungen.....	113
7.6. Eidesstattliche Versicherung und Erklärung über frühere Promotionsversuche.....	115

Für meine Mutter und meine Tochter

## 1. EINLEITUNG

### 1.1. Streß und Streßreaktion

Streß ist eine unter allen Organismen verbreitete Erfahrung des täglichen Lebens. Die Fähigkeit auf die unterschiedlichsten physikalisch-chemischen, physischen oder psychischen streßauslösenden Faktoren (Stressoren) adäquat zu reagieren ist eine fundamentale Voraussetzung des Überlebens. Werden bei der Aufrechterhaltung der Homöostase jedoch maladaptive Prozesse induziert, kann dies beim Menschen beispielsweise in Krankheiten des Herz-Kreislaufsystems, des Immunsystems, Krebs und neuropsychiatrischen Krankheiten wie z.B. der Depression resultieren. Nach Angaben der Weltgesundheitsorganisation (Brundtland, 1999) stellen insbesondere psychiatrische Störungen und neurologische Krankheiten in Zukunft ein nicht zu unterschätzendes sozioökonomisches Problem für alle Nationen dar. Die Neurobiologie chronisch psychosozialen Stresses ist jedoch in ihrer Vielschichtigkeit weitgehend unbekannt.

Die medizinisch-biologische Definition von Streß geht auf Walter B. Cannon (1915) zurück, der die Streßreaktion als eine Kampf- oder Fluchtreaktion verstand. Seit Selye 1936 zum ersten Mal darauf hingewiesen hat, daß eine Streßreaktion in Form einer chronischen Belastung pathologische Folgen haben kann, wurde die Möglichkeit einer psychologischen Komponente der Streßreaktion erst von Mason et al. im Jahre 1968 diskutiert. Dies begründet sich unter anderem darin, daß es sehr unterschiedlich ist, welche internen oder externen Faktoren von einem Individuum als Stressor empfunden werden. Externe Faktoren sind die Wahrnehmung und Verarbeitung von Sinneseindrücken. Interne Faktoren sind beispielsweise der Kontext der Sinneseindrücke, die individuelle prae- und postnatale Vorerfahrung, der hormonelle Status des Individuums sowie dessen genetische Prädisposition (Chrousos und Gold, 1992; McCormick et al. 1995; Liu et al., 1997; Bahatnagar und Dallman 1998). Die Perzeption und Verarbeitung belastender Stimuli rufen ein breites Spektrum physiologischer Reaktionen hervor, die aus einer Vielzahl interagierender hormoneller und neuronaler Antworten auf den Reiz resultieren.

Die Streßreaktion wird nach der klassischen Betrachtungsweise vornehmlich über zwei interagierende Achsen vermittelt, die sympathoadrenale und die Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenrinden Achse (von Holst et al., 1983;

Minton, 1994; von Holst, 1993; de Kloet et al. 1998). Bei akutem Streß, vor allem wenn eine aktive Verhaltensantwort gezeigt wird, wird überwiegend das sympathoadrenale System angeregt (Cannon, 1915; Frankenhaeuser, 1982; de Boer et al., 1990). Über das periphere sympathische Nervensystem werden innerhalb von Sekunden die Katecholamine Adrenalin und Noradrenalin ausgeschüttet, die aus den Nervenendigungen des Sympathicus und aus dem Nebennierenmark in die Blutbahn gelangen. Die in der Blutbahn zirkulierenden Katecholamine entfalten daraufhin über  $\alpha$ - und  $\beta$ -adrenerge Rezeptoren ihre Wirkung auf die verschiedenen Organe. So erhöhen sie z.B. den Blutdruck und die Herzkontraktionsfrequenz, stimulieren die Atmung, erweitern die Pupillen, vermindern die Darmperistaltik und führen vor allem zur Mobilisierung oxidabler Substanzen wie Glucose (Norman und Litwack, 1997). Das zentrale Nervensystem schüttet als Reaktion auf Streß ebenso Adrenalin und Noradrenalin aus, deren synthetisierende Neurone primär im Hirnstamm, in Pons und Medulla oblongata, zu finden sind (Dahlström und Fuxe, 1964; Nieuwenhuis, 1985; Flügge, 2000). In diesem Zusammenhang ist insbesondere der Locus coeruleus (LC) zu erwähnen (Thierry et al., 1968; Valentino und Aston-Jones, 1995; Flügge, 2000), dessen Aktivierung jedoch nicht zwangsläufig zeitgleich mit einer Aktivierung des sympathoadrenalen Systems korreliert ist (Flügge, 2000). Die Neurone des LC projizieren in nahezu alle Teile des Gehirns und setzen Noradrenalin an ihren Terminalien frei. In einige Gehirnregionen, wie z.B. in den Hippocampus und den Cortex gelangt Noradrenalin ausschließlich über Neurone des LC (Valentino et al.; 1993), während andere Gehirnregionen wie z.B. der hypothalamische Nucleus paraventricularis (PVN) nur zu einem geringen Teil über den LC und mehr über medulläre, katecholaminerge Zellgruppen innerviert werden (Pacak et al., 1995; Herman und Cullinan, 1997).

Eine Aktivierung der Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenrinden (HHN) Achse ist dauerhafter und führt zu einer vermehrten Ausschüttung von Glucocorticoiden aus der Nebennierenrinde (Zusammenfassung: de Kloet et al., 1998). Die zentrale Kontrolle der Glucocorticoidsekretion wird vorwiegend von parvozellulären neurosekretorischen Neuronen aus dem PVN gesteuert. Das von diesen Neuronen sekretierte Corticotropin-Releasing-Hormon (CRH) wiederum stimuliert die Bildung und Ausschüttung des adrenocorticotropen Hormons (ACTH) aus der Adenohypophyse (Dallman, 1993; Herman und Cullinan, 1997). Auch wenn für die

Regulation der HHN-Achse CRH der maßgebliche Faktor ist (Richie und Nemeroff, 1991), werden weitere neuromodulatorisch wirksame Substanzen wie z.B. Arginin-Vasopressin und Oxytocin ausgeschüttet (Holsboer et al., 1992), die ebenso die Freisetzung von ACTH beeinflussen. ACTH seinerseits stimuliert die Nebennierenrinde zur Ausschüttung der Glucocorticoide Cortisol (Primaten, einschließlich Mensch) und Corticosteron (Nagetiere). Über den Blutkreislauf gelangen die adrenalen Steroidhormone an die Hypophyse und hemmen dort in Folge einer schnellen negativen Rückkopplung ihre eigene Ausschüttung. Eine weitere zeitverzögerte negative Rückkopplung verläuft zentralnervös gesteuert über den Hypothalamus und Hippocampus ausgehend von einem Durchtritt der zirkulierenden Glucocorticoide über die Blut-Hirn-Schranke in das Gehirn (Holsboer et al., 1992; Dallman, 1993; de Kloet et al., 1998).

## 1.2. Corticosteroidrezeptoren

Corticosteroide binden an zwei intrazelluläre Rezeptoren: den Glucocorticoid-Rezeptor (GR) und den Mineralocorticoid-Rezeptor (MR; Reul und de Kloet, 1985; Joels und de Kloet, 1994; de Kloet et al., 1998). Zusammen mit anderen Steroid-Rezeptoren gehören sie zur Familie der ligandenabhängigen Transkriptionsfaktoren (Zusammenfassung: Kawata, 1995). Für einen in diesem Rahmen nicht zu leistenden detaillierten Überblick der Regulation der Gen-Transkription durch GRs und MRs sei auf die Zusammenfassungen von Beato und Sanchez-Pacheco, 1996 und de Kloet et al., 1998 verwiesen.

Drei mögliche Wege der Transkriptionsregulation sind bisher beschrieben und werden im folgenden kurz aufgeführt: 1. Die *Transaktivierung* geschieht durch eine Bindung der Corticosteroide an den GR oder MR mit anschließender Homodimerisierung und Translokation in den Zellkern. Eine Wirkung auf die Transkriptionsrate von Corticosteroid-sensitiven Genen wird daraufhin über eine Bindung an die DNA, den sogenannten "hormone-responsive-elements" erreicht. 2. Eine *Transrepression* geschieht durch eine Blockade anderer Transkriptionsfaktoren, wie z.B. bei AP-1, CREB und NF $\kappa$ -B direkt oder indirekt über eine Protein-Protein Interaktion. 3. Eine *Heterodimerisation* von GR und MR ist eine erst kürzlich beschriebene weitere Möglichkeit der Beeinflussung der Transkriptionsrate Corticosteroid sensitiver Gene, insbesondere durch die nachgewiesene Colokalisation in Pyramidenneuronen des Hippocampus (Trapp et

al., 1994; van Steensel et al., 1996). Da die an der Heterodimerisation beteiligten stark konservierten Aminosäuresequenzen auch in andern nucleären Rezeptoren vorkommen, scheint eine Heterodimerisation nicht auf den GR und MR beschränkt zu sein (Chen et al., 1997). Die Aktivierung der GRs und MRs ist stark vom zellulären Zustand abhängig, welcher wiederum zum Teil von anderen Neurotransmittern, Hormonen, Peptiden, Cytokinen etc. beeinflusst wird. Dies ermöglicht eine große Mannigfaltigkeit und Komplexität der Transkriptionsregulation, die bis heute nur zu einem kleinen Teil verstanden wird.

Mit Hilfe der Autoradiographie, Immunocytochemie und In situ-Hybridisierung konnten GRs in einer Vielzahl von Gehirnregionen in Neuronen und Gliazellen nachgewiesen werden, darunter fallen der Hypothalamus, Neocortex, Kerngebiete des limbischen Systems wie z.B. Hippocampus, Amygdala, Septum und in den aufsteigenden monoaminergen Neuronen der Hirnstammnuclei, z.B. Nucleus tractus solitarii und LC (Reul und de Kloet, 1985; Vielkind et al., 1990; Joels und de Kloet 1994; de Kloet et al., 1998; Meyer et al., 1998). Im Gegensatz dazu ist der MR auf wenige Regionen beschränkt und am stärksten im Hippocampus zu lokalisieren (Reul und de Kloet, 1985; Vielkind et al., 1990; Joels und de Kloet 1994; de Kloet et al., 1998; Meyer et al., 1998). Wegen der hohen Zahl und Dichte an Corticosteroid-Rezeptoren wird dem Hippocampus bei der Regulation der HHN-Achse eine entscheidende Bedeutung beigemessen (Feldman und Conforti, 1980; Dunn und Orr, 1984; Herman et al., 1989; Jacobson und Sapolsky, 1991; Holsboer et al., 1992; Herman und Cullinan 1997; van Haarst et al., 1997).

Auch pharmakologisch unterscheiden sich der GR und der MR. Dexamethason und RU 28362 binden selektiv agonistisch und RU 38486 antagonistisch an den GR. Aldosteron bindet dagegen selektiv agonistisch und RU 26752 und Spironolacton antagonistisch an den MR (deKloet et al., 1998).

GRs und MRs haben zudem eine unterschiedlich hohe Affinität zu Corticosteroiden, die eine sich im Tagesrhythmus ändernde Besetzung der Rezeptoren zur Folge haben. MRs im Gehirn haben eine 6-10fach höhere Affinität zu Corticosteron, sind bei geringeren Mengen zirkulierender Corticosteroide im Plasma bis zu 90% gesättigt und regulieren die basale Aktivität der HHN-Achse. GRs sind dagegen lediglich während des täglichen Maximums an Plasma-Corticosteron oder während akutem Streß zu etwa 50% besetzt (Reul und de Kloet, 1985; Dallman, 1993). Eine Besetzung der GRs kann z.B. eine reduzierte zelluläre Erregbarkeit (Joels und



deKloet, 1992) bzw. eine veränderte Signalverarbeitung im Hippocampus zur Folge haben (Lupien und McEwen, 1997). In diesem Zusammenhang ist zudem zu erwähnen, daß eine veränderte Expression von Genen bei Streß nachgewiesen wurde (Beispiele s. 4.3.3. und 4.3.4.1.).

### 1.3. Chronischer Streß

Wie in den vorhergehenden Abschnitten beschrieben, bewirkt eine kurzzeitige Aktivierung der limbisch gesteuerten HHN-Achse eine adaptive Rolle bei der Streßreaktion, bei denen die adrenalen Glucocorticoide durch eine direkte oder indirekte Beeinflussung der Genexpression sowie auch der neuronalen elektrischen Aktivität eine entscheidende Rolle spielen (Munck et al., 1984; Joels und de Kloet, 1992). Unter langanhaltenden, chronischen Bedingungen jedoch kann Streß von einer adaptiven Reaktion zu einer maladaptiven Belastung mit einer schädigenden Wirkung auf viele Körperfunktionen wie z.B. dem Immunsystem werden (Munck et al., 1984; Cohen et al., 1991). Charakteristisch für eine langandauernde Streßreaktion ist eine chronische Hyperaktivität der HHN-Achse mit daraus resultierenden erhöhten Glucocorticoidspiegeln (Dallman, 1993; Dinan, 1994). Chronisch erhöhte Glucocorticoid Konzentrationen haben schädigende Effekte, wie bei Patienten mit Cushing's Syndrom und als Ergebnis lang anhaltender Steroidbehandlung mehrfach nachgewiesen wurde (Starkman et al., 1992; Dubrovsky, 1993; Kupersmith et al., 1994; Seckl und Olsson, 1995; Lupien und McEwen, 1997). So werden sie auch ursächlich in Verbindung gebracht mit depressiven Erkrankungen oder der Alzheimer-Krankheit (Sachar et al., 1973; Gold et al., 1988; Checkley, 1992; Martignoni et al., 1992; Dinan, 1994; Sheline, 1996; Plotzky et al., 1998; Lupien et al., 1999).

Bei der Betrachtung der physiologischen Streßreaktion und resultierenden Verhaltensänderungen sind jedoch die verschiedenen Qualitäten von Stressoren zu berücksichtigen. So ist nachgewiesen worden, daß physischer und psychischer Streß oder ein sozialer Kontext des Stressors Unterschiede in der zentralnervösen Streßreaktion der Tiere zur Folge haben (Herman und Cullinan, 1997; Sgoifo et al., 1997).

#### 1.4. Hippocampusformation und chronischer Streß

Die Hippocampusformation ist eine entwicklungsgeschichtlich alte Struktur des Telencephalon und besteht aus der Cornu ammonis (CA1-4), dem Gyrus dentatus (GD) und dem Subiculum. Neben der bereits beschriebenen regulatorischen Rolle bei der neuroendokrinen Aktivität ist der Hippocampus stark involviert in die Verarbeitung kognitiver Prozesse wie Lernen und Gedächtnisfunktionen (Squire, 1992; Eichenbaum et al., 1999). Die Verbindung der Störung von Lern- und Gedächtnisprozessen sowie den zugrundeliegenden zellulären Mechanismen (z.B. LTP; Miller und Mayford, 1999) mit chronisch erhöhten Glucocorticoid-Konzentrationen, chronischem und psychischem Streß wurde mehrfach nachgewiesen (Martignoni et al., 1992; Starkman et al., 1992; Dachir et al., 1993; Pavlides, 1993; Luine et al., 1994; Bodnoff et al., 1995; Kirschbaum et al., 1996; Lupien und McEwen, 1997; de Kloet et al., 1998; Ohl und Fuchs, 1999; Ohl et al., 2000).

Auf Grund der beobachteten Defizite in der exekutiven Funktion des Hippocampus bei Streß gibt es seit kürzerem ein stärkeres Interesse an der Möglichkeit, daß eine andauernde, extensive Glucocorticoidsekretion strukturelle Veränderungen im Hippocampus bewirkt. Im Zusammenhang erhöhter Cortisol-Konzentration mit kognitiven Defiziten beim Menschen scheinen strukturelle Veränderungen der Hippocampusformation zu bestehen, die sich in Form signifikanter Volumenreduktion manifestieren (Lupien et al., 1998). Bei Ratten wurde mit Hilfe stereologischer Methoden eine Volumenreduktion von nicht somatischen Schichten des Hippocampus, im Gyrus dentatus und in der Region CA3, nach chronischer Corticosteron Behandlung festgestellt (Sousa et al., 1998b).

Pyramidenneurone, insbesondere in der Region CA3, werden als besonders sensitiv für strukturelle Veränderungen angesehen (Fuchs et al., 1995; Gould et al., 1997; Sousa et al., 1998b). So verändert sich nach chronisch psychosozialem Streß die nukleäre Farbintensität von Pyramidenneuronen mit Nisselfarbstoffen, die eine Änderung der Chromatinstruktur vermuten läßt (Fuchs et al., 1995). Desweiteren verursachen drei Wochen täglicher Immobilisationsstreß bzw. Corticosteron Behandlung bei Ratten oder vier Wochen psychosozialer Streß bei Tupaia eine Regression der apikalen Dendriten von Pyramidenneuronen der Region CA3 (Woolley et al., 1990; Magariños und McEwen, 1995b; Magariños et al., 1996; McKittrick et al., 2000). Diese Atrophie ist reversibel und kann durch eine

zusätzliche Behandlung mit Phenytoin, einem Antiepileptikum, welches u.a. die Freisetzung exzitatorischer Aminosäuren modifiziert, oder CGP 43487, einem kompetitiven N-methyl-D-asparat Antagonisten, verhindert werden (Watanabe et al., 1992; Magariños und McEwen, 1995a; Magariños et al., 1996). Dies gibt den Hinweis auf eine Beteiligung von exzitatorischen Aminosäureneurotransmittern bzw. eines Ungleichgewichtes zwischen exzitatorischem und inhibitorischem Einfluß auf die Pyramidenneurone, bei dem andere Transmittersysteme wie Glutamat, GABA, Serotonin oder intrazelluläres Calcium als modulierend diskutiert werden (Zusammenfassung: de Kloet et al., 1998; McEwen, 1999). Die genauen Mechanismen, die zu einer dendritischen Atrophie führen, sind jedoch unbekannt.

Weiterhin wurde auf Grund einiger Untersuchungen an Ratten und nichthumanen Primaten postuliert, daß chronisch erhöhte GC-Konzentrationen und Streß korreliert sind mit einem Verlust von Neuronen. Dabei wird angenommen, daß über herunterregulierte Glucocorticoid-Rezeptoren eine Kaskade der Degeneration in Gang gesetzt wird, die in einem Zelltod von Pyramidenneuronen resultiert (Sapolsky et al., 1985; Sapolsky et al., 1986; Uno et al., 1989; Sapolsky et al., 1990; McEwen, 1992; O'Brien, 1997). Dieser GC-induzierte Zelltod wird, auch wenn dies weiterhin diskutiert wird, im allgemeinen als apoptotisch angesehen (Reagan und McEwen, 1997). Mit dieser sogenannten "Glucocorticoid-Kaskaden" Hypothese wurden die beobachteten corticalen Dysfunktionen in Zusammenhang gesetzt und teilweise erklärt (McEwen und Sapolsky, 1995). Der postulierte irreversible Verlust von Neuronen im Hippocampus wird jedoch in den letzten Jahren in Frage gestellt (Wickelgreen, 1996; Vollmann-Honsdorf et al., 1997; Sousa et al., 1998a+b; Leverenz et al., 1999).

Zudem sind bei einer Betrachtung der Hippocampusformation im Zusammenhang mit chronischem Streß vielfältige strukturelle Veränderungen auf der Rezeptorebene verschiedener Transmittersysteme zu erwähnen, da diese als Effektoren und/oder Modulatoren einer Streßreaktion anzusehen sind (Liberzon und Young, 1997; Flügge; 2000). Dies ist insbesondere von Bedeutung wenn es sich um Prozesse handelt, die emotional gefärbt sind, Erwartungshaltungen oder kognitiv integrative Funktionen betreffen, wie dies bei psychosozialem Streß der Fall ist. Dabei spielen u.a. die Neurotransmittersysteme des noradrenergen, serotonergen und dopaminergen Systems eine Rolle (Flügge, 1995, 1996; Flügge et al., 1997; Lopez et al., 1998; Flügge, 2000; Isovich et al., 1999, Mijster et al., 1999a)

### 1.5. Tupaia als Streßmodell

In der biomedizinischen grundlagenorientierten Streß-Forschung wird vorwiegend das Versuchstier Ratte in Verbindung mit physischen Stressoren, wie z.B. Etherexposition, Immobilisation, Fuß- oder Kälteschock, eingesetzt. Bei der Betrachtung der physiologischen Streßreaktion und resultierenden Veränderungen im Gehirn oder des Verhaltens sind jedoch die verschiedenen Qualitäten von Stressoren zu berücksichtigen. Physischer und psychischer Streß oder ein veränderter sozialer Kontext haben nachweislich Unterschiede in der zentralnervösen Streßreaktion zur Folge (Herman und Cullinan, 1997; Sgoifo et al., 1997). Da jedoch physische Stressoren wenig bis keine Relevanz zur Biologie der Tiere haben und vermutlich andere neuronale Systeme aktivieren (Sgoifo et al., 1997; Herman and Cullinan, 1997), sind auf physischem Streß basierende Untersuchungen in ihrer Aussagekraft als Modell für Auswirkungen psychischen Stresses beim Menschen als kritisch zu betrachten. Neben einzelnen Tiermodellen der Ratte, wie z.B. dem „resident-intruder“-Modell des „visible-burrow-system“ (Blanchard et al., 1995), die die genannten Punkte verstärkt berücksichtigen, hat sich das chronisch psychosoziale Streßmodell männlicher Tupaia als Tiermodell für chronischen sozialen Streß etabliert.



Abb. 1.1: *Tupaia belangeri*

*Tupaia belangeri* (Abb.1.1) ist ein vornehmlich in den Regenwäldern Südostasiens verbreitetes, tagaktives Säugetier. Mit weiteren 17 Arten wird die Gattung nach dem gegenwärtigen Stand der Forschung in der Ordnung *Scandentia* geführt (Martin, 1990). Diese wird nach herrschender Meinung stammesgeschichtlich als getrennte Stammlinie eines gemeinsamen Vorfahren mit den Primaten betrachtet. (Starck, 1965; Martin 1990).

Vor allem in einer Konkurrenzsituation gegenüber gleichgeschlechtlichen Artgenossen zeigen männliche *Tupaia* ein ausgeprägtes Territorialverhalten. Diese aus dem natürlichen Verhaltensrepertoire der Tiere abgeleitete Konfliktsituation macht man sich in dem artspezifischen Streßparadigma (Raab, 1971; von Holst, 1993; von Holst et al., 1983; Fuchs und Flügge, 1998) zu nutze: Die Koexistenz zweier Männchen führt zu einer stabilen dominanten-subordinaten Beziehung, bei der der Unterlegene allein durch visuellen und geruchlichen Kontakt streßinduzierte Veränderungen des Verhaltens, der Physiologie und des zentralen Nervensystems aufweist (für Details s. 4.1.). Diese Veränderungen sind den Symptomen chronisch psychosozialen Stresses beim Menschen ähnlich (s. 4.1.; Aue, 1988; Fuchs et al., 1996; Fuchs und Flügge, 1998; Kramer et al., 1999) und lassen sich zum Teil durch die Behandlung mit Clomipramin, einem Antidepressivum, aber nicht mit dem prototypischen Anxiolytikum Diazepam aufheben (Fuchs et al., 1996; vanKampen et al., 2000).

#### 1.6. Zielsetzung und Fragestellung

Ziel der im folgenden beschriebenen Untersuchungen war es, mit Hilfe histologischer Techniken die Auswirkungen von chronischem psychosozialen Streß und einer Behandlung mit Cortisol auf die Morphologie der Pyramidenneurone und der Körnerzellen der Hippocampusformation zu untersuchen. Es sollte überprüft werden, ob sich Zelltod und ein daraus resultierender Neuronen-Verlust unter diesen Streßbedingungen nachweisen läßt. Darum wurde *Tupaia belangeri* als Tiermodell ausgewählt, um eine Induktion und Dauer von chronisch psychosozialen Streß bei kontrolliertem Einsatz eines rein psychosozialen Stressors unter Laborbedingungen durchführen zu können.

In den im nächsten Abschnitt beschriebenen Versuchen sollte

- überprüft werden, ob durch chronisch psychosozialen Streß morphologische Änderungen im Zellkern von Pyramidenneuronen induziert werden und in welchen Gebieten der Hippocampusformation die Effekte zu beobachten sind,
- untersucht werden, ob die strukturellen Veränderungen im Zellkern allein auf die Wirkung von Cortisol zurückgeführt werden kann,
- die durchschnittliche Zahl der Pyramidenneurone in der Cornu ammonis und der Körnerzellen im Gyrus dentatus von Tupaia ermittelt werden und untersucht werden, ob durch chronisch psychosozialen Streß die Anzahl verändert wird
- untersucht werden, ob als Folge von chronisch psychosozialem Streß in der Hippocampusformation vermehrt apoptotische Zellen nachzuweisen sind.

## 2. MATERIAL UND METHODE

Zur besseren Übersichtlichkeit werden die Herkunftsangaben der Chemikalien und die Zusammensetzungen der Lösungen separat im Anhang unter 7.1. und 7.2. aufgeführt.

### 2.1. Tiere und Tierhaltung

Alle für die Untersuchungen verwendeten Tupaias (*Tupaia belangeri*; Abb.1.1) stammen aus der Zuchtkolonie des Deutschen Primatenzentrums in Göttingen. Die adulten, männlichen Tiere wurden einzeln in mit Kletterästen ausgestatteten Edelstahlkäfigen (50x130x80cm; Ebeco, Castrop-Rauxel) gehalten. An der Käfigaußenseite waren ein Schlafkasten und eine Wasserflasche angebracht. Unter den Käfigen lagen zum Auffangen von Kot, Urin und Futterresten Papierbahnen, die täglich gewechselt wurden. Um Störungen so kurz wie möglich zu halten, sowie zur Erhaltung der geruchlichen Umwelt wurden die Käfige nur einmal wöchentlich gereinigt. Die Haltungsräume waren vollklimatisiert mit einer Temperatur von  $27^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$  und  $60\%\pm 7\%$  Luftfeuchtigkeit. Die gesamte Raumluft wurde pro Stunde mindestens 10 mal ausgetauscht. Der Hell-Dunkelwechsel von 12:12 Stunden begann mit der Lichtphase um 8:00 Uhr. Wasser und Futter, eine standartisierte pelettierte Zucht- und Haltungsdiät für Tupaias (Altromin, Lage) bekamen die Tiere *ad libitum*. Alle Tiere waren bezüglich der Konfrontation mit einem Artgenossen oder einer anderen außer der Haltung betreffenden Behandlung naiv und sind die Prozedur des Wiegens und das damit verbundene Herausnehmen aus den Schlafkästen von Geburt an gewöhnt, so daß dies keinen zusätzlichen Streßfaktor für die Tiere darstellt.

### 2.2. Induktion von psychosozialem Streß

Nach einer Kontrollphase von 10-12 Tagen, in der das durchschnittliche Körpergewicht und die basalen Cortisol- und Noradrenalin-Konzentrationen im Urin ermittelt wurden, wurde der psychosoziale Streß über eine Dauer von 28 Tagen wie folgt induziert. Zwei einander unbekannte Tupaias wurden in benachbarten Käfigen untergebracht, deren blickdichte Trennwand entfernt wurde. Dies führte zu einer aktiven Konkurrenz beider Männchen um das vergrößerte Territorium und resultierte bereits nach 1-2 Stunden in einer stabilen dominanten/subordinaten Rangordnung.

Darauf folgend wurden die Käfige durch ein Drahtgitter voneinander getrennt, welches den Sichtkontakt ermöglicht, eine dauerhafte physische Interaktion jedoch vermeidet. Dieser fortgesetzte visuelle Kontakt zu dem dominanten Artgenossen induziert bei dem unterlegenen Tier physiologische, neuroendokrine und das Verhalten betreffende Änderungen, die ausschließlich auf der kognitiven Interpretation des Unterlegenen basieren und somit als chronischer psychosozialer Streß bezeichnet werden können (Raab, 1971; von Holst et al., 1983; Fuchs et al., 1996; Fuchs und Flügge, 1998). Um Adaptationsprozesse zu umgehen, wurde das Gitter täglich für 1-1,5 Stunden zwischen 8:00 und 12:00 Uhr entfernt, welches einen physischen Kontakt zwischen den Männchen ermöglichte.

Eine chronische Streßbelastung von 28 Tagen hat sich in früheren Versuchen als ausreichend erwiesen, um morphologische Änderungen im Gehirn von *Tupaia belangeri* zu induzieren (Fuchs et al., 1995; Magariños et al., 1996). Während des gesamten Versuchs waren Kontrolltiere in einem separaten Raum der Tierhaltung untergebracht. Anschließend wurden alle Tiere perfundiert (s. 2.5.).

### 2.3. Cortisol-Behandlung

Nach der Kontrollphase von 10-12 Tagen wurde den Tieren für 28 Tage Cortisol-Hemisuccinat über das Trinkwasser verabreicht. Dies hat den Vorteil, daß physische Stressoren wie z.B. die einer Injektion, welche die Ergebnisse beeinflussen könnten, vermieden werden (Gannon und McEwen, 1990; Magariños et al., 1998). 120mg Cortisol-Hemisuccinat (4-pregnen-11 $\beta$ , 17, 21-triol-3, 20-dione 21 hemisuccinate; Steraloids Inc., Wilton, USA) wurden in einem Liter Leitungswasser gelöst, täglich neu in Trinkwasserflaschen gefüllt und der Verbrauch über das Gewicht der Lösung gemessen. Dies führte pro Individuum zu einer täglichen, durchschnittlichen Cortisol-Aufnahme von 5 mg/100g Körpergewicht. In früheren und parallel laufenden Untersuchungen wurde gezeigt, daß diese Cortisoldosis im Schnitt zu einer 10fach gesteigerten Cortisolexkretion führt (Flügge, 1999; Isovich et al., 1999). Cortisol-Hemisuccinat hat gegenüber Cortisol den Vorteil, daß es in der angegebenen Menge wasserlöslich ist und nicht in Ethanol angelöst werden muß. Die Wasseraufnahme der Tiere wurde, wie in Vorversuchen ermittelt, durch das gelöste Cortisol nicht beeinträchtigt. Alle Flaschen wurden mindestens jeden dritten Tag detergenzfrei gespült und gewechselt und waren durch eine Alufolie vor starkem Lichteinfall geschützt.



## 2.4. Physiologische Parameter

Zur Bestimmung des Körpergewichtes und der urinären Cortisol- und Noradrenalin-Konzentration während der Kontrollphase (basale Konzentrationen; 10-12 Tage) und der anschließenden Versuchsphase (28 Tage) wurden die Tiere täglich zwischen 7.45 und 8.00 Uhr gewogen und ihnen Urin abgenommen (s. 2.4.1.). So ist es möglich bei einzelnen Tieren die versuchsbedingt induzierten Veränderungen der physiologischen Parameter mit dem Mittelwert der Kontrollphase desselben Tieres zu vergleichen.

Das Körpergewicht wurde bei allen Tieren (n=25) ermittelt. Bei 14 Tieren wurde die Cortisol-Konzentration und bei 6 Tieren zusätzlich die Noradrenalin-Konzentration im Urin bestimmt und zur Berücksichtigung der physiologischen Verdünnung in Relation zur Kreatinin-Konzentration des Urins gesetzt.

### 2.4.1. Gewichtsbestimmung und Urinabnahme

Vor Beginn der Licht- und Aktivitätsphase wurden die Tiere in ihren Schlafkästen abgesperrt, herausgenommen, gewogen und durch eine leichte manuelle Massage des Unterbauchs zur Urinabgabe angeregt. Da in der Regel während der Nacht kein Urin freigesetzt wird (Aue, 1988), war die Blase gut gefüllt. Urinabnahme und Wiegen dauerten maximal 2 Minuten pro Tier.

Das Körpergewicht ist ein guter Indikator für den Allgemeinzustand der Tiere (von Holst et al., 1983). Bei einer Unterschreitung der Toleranzgrenze von mehr als 15% Gewichtsabnahme während der Versuchsphase, wurde nach den Vorgaben durch die Tierversuchsgenehmigung die Behandlung für 24 h ausgesetzt. Chronisch psychosozial belastete Tupaias wurden daraufhin anstatt des Gitters durch eine PVC-Sichtblende vom Nachbarkäfig getrennt. Cortisol-behandelte Tupaias bekamen in diesem Fall für 24 h reines Leitungswasser.

Von dem in Glasröhrchen aufgefangenen Urin wurden sofort für die Bestimmung des Kreatinins 10µl Urin abgenommen und mit 190µl 0,9% NaCl gemischt. Des Weiteren wurden zur Bestimmung von Noradrenalin bei 6 Tieren zusätzlich 385µl Urin abgenommen und in ein mit 15µl 6N HCl gefülltes und gekühltes Eppendorfgefäß gegeben und gemischt. Alle Proben wurden direkt bei -20°C eingefroren und bis zur Analyse bei -20°C gelagert.

#### 2.4.2. Cortisolbestimmung

Zur Aufreinigung der Urinproben wurden 500µl des bei 4°C aufgetauten Urins in eine mit 230 mg Kunstharz (Extrelut, Merck, Darmstadt) auf 0,5mm gestopfter Glaswolle gefüllten Pasteur-Pipette gegeben und nach 10 Minuten mit 4ml Dichlormethan ausgewaschen. Das Eluat wurde anschließend unter einem Stickstoffstrom eingeengt, in 1ml 0,5 M Tris-HCl-Puffer (pH 8) gelöst und bei -20°C gelagert.

Für den Radioimmunoassay (RIA; Udenfried et al., 1985) wurden je 100µl dieser Lösung, sowie parallel je 100µl Cortisol-Standards (0,075ng Cortisol gefriergetrocknet, Sigma, St. Louis, USA) in einem Scintillationsgefäß mit 100µl anti-rabbit Cortisol Antiserum (Paesel-Lorei, Frankfurt/Main), 100µl anti-rabbit IgG-coated Fluormicrospheres (scintillation proximity assay anti-rabbit reagent type 1, Amersham, Braunschweig) und 100µl <sup>3</sup>H-Cortisol als radioaktivem Tracer (Amersham) versetzt und auf einem Schüttler für 20h bei 4°C und anschließend für 24h bei Raumtemperatur inkubiert. Mit Hilfe eines β-Scintillationszählers (LKB Wallac 1209 Rackbeta, Berthold GmbH, Hannover) wurde die Aktivität über die Zerfälle pro Minute ermittelt und die Cortisol-Konzentration über die Standardkurven ermittelt. Die "Inter-assay-varianz" lag durchschnittlich bei 12,9% und die "Intra-assay-varianz" bei 2,6%.

Die ermittelten Cortisol-Konzentrationen wurden in Relation zur jeweiligen Kreatinin-Konzentration gesetzt, so daß die Urinproben unabhängig von der physiologischen Verdünnung des Urins waren. Die Kreatininkonzentration wurde mit Hilfe des Beckman Creatinine Analysers 2 in den mit 10µl Urin und 190µl 0,9% NaCl versetzten Eppendorfgläsern (s. 2.4.1.) photometrisch bestimmt.

#### 2.4.3. Noradrenalinbestimmung

350 µl Urin wurden direkt nach der Probenentnahme zu 15 µl 6N HCl pipettiert, kühl gelagert und unter Lichtausschluß bei -20°C aufbewahrt. Die Urinproben wurden bei 4°C aufgetaut und zentrifugiert (10000 upm; Eppendorf). Zur Aufreinigung wurden 350µl des Überstands zusammen mit 100 µl 0,5 M HCl (pH 6,5) und 7 ml 0,1 % EDTA auf mit 0,8ml schwachem Kationen-Austauscher-Gel (BioRex 70; BioRad, München) gefüllte Poly-Prep-Säulen pipettiert, nach Einsickern der Probenansätze mit 2 x 4 ml H<sub>2</sub>O gewaschen und die Katecholamine zweimal mit 4 ml 4% Borsäure eluiert. Die Borsäurefraktionen wurden bei - 20 °C aufbewahrt.

Zur Trennung und Quantifizierung des Noradrenalins wurden 20µl Aliquots dieser Borsäurefraktionen und eine Kontrolle mit Borsäure zur Überprüfung der Wiederfindungsrate über einen automatischen Probenaufgeber (LKB 2157) auf die High-pressure-liquid-chromatography Anlage (HPLC; Vorzelle, +0,4V, esa 5020; HPLC-Säule Chrompack C8 mit Chromsper 5 C8, Chrompack GmbH, Frankfurt; HPLC-Pumpe LKB 2150 mit Controller LKB 2152) injiziert und nach Schleicher et al., 1983 elektrochemisch über eine "reversed-phase"-Chromatographie mit einem coulometrischen Detektor (Colochem 5100A, high-sensitivity-cell 5011, esa, Bischof, Leonberg) bei 40°C und 150 bar in einem Redox-Potential (Elektrode 1: -0,15V; Elektrode 2: +0,25 V) detektiert. Der an der zweiten Elektrode – bei der Oxidation – fließende elektrische Strom wurde mit Hilfe eines daran gekoppelten Integrators (C-R3A, Shimadzu) gespeichert und automatisch ausgewertet. Dabei wurde die Höhe der gemessenen Peaks der Standards in Relation gesetzt zu dem bei der Oxidation fließenden elektrischen Strom. Die so errechneten Konzentrationen (pmol/20µl) wurden daraufhin in Relation gesetzt zur Kreatinin-Konzentration (s.2.4.2.), so daß die unterschiedlichen Urinproben unabhängig von der physiologischen Verdünnung des Urins waren (Fuchs et al., 1992).

#### 2.4.4. Statistik

Zur Vermeidung von interindividuellen Einflüssen vor der Versuchsphase wurden alle Werte pro Individuum in Prozent des Mittelwertes der Kontrollphase transformiert. Statistische Analysen wurden an einem PC mit der Software "SPSS 8.0" (SPSS, Inc., Chicago, Illinois, USA) durchgeführt. Alle physiologischen Daten wurden einer zweifaktoriellen Varianzanalyse mit Meßwiederholungen (ANOVA) unterzogen. Als unabhängige Variable war die Tiergruppe, d.h. Kontrollgruppe vs. Streßgruppe und für das Gewicht auch die Cortisolgruppe, anzusehen, als abhängige Variable die Zeit, d.h., der Mittelwert der Kontrollphase und die Versuchstage bzw. -wochen während der psychosozialen Streß-Phase. Zum intraindividuellen Vergleich der einzelnen Versuchstage mit der Kontrollphase wurde der Mittelwert der Kontrollphase herangezogen. Da für Noradrenalin wegen der geringen Gruppengröße und „missing values“ insbesondere bei einem Tier eine ANOVA der einzelnen Tage zu einer verfälschten Interpretation der Ergebnisse geführt hätte, wurden pro Tier die Mittelwerte der Wochen (Kontrollphase von 8 Tagen und vier Streßwochen von je 7 Tagen) verglichen. Die Gruppenvergleiche wurden mittels eines Games-Howell post Hoc-Tests mit Bonferroni-Korrektur der  $\alpha$ -

Level vorgenommen. Als signifikant wurde jeweils  $p \leq 0,05$  angesehen. Soweit nicht anders angegeben, werden alle graphisch dargestellten Daten als Mittelwert  $\pm$  SEM aufgeführt.

## 2.5. Perfusion und Präparation des Gewebes

Vor der Perfusion wurden die Tiere mit einer intramuskulären Injektion von 0,6 ml des Narkosemittels Göttinger Mischung II (50mg/ml Ketamin, 10mg/ml Xylazin und 0,1mg/ml Atropin), verstärkt durch eine zusätzliche Inhalation von Diethylether, euthanasiert. Alle Tiere wurden zur Standardisierung in einem Zeitfenster von 8.30 Uhr - 11.30 Uhr transcardial perfundiert. Das Gewebe wurde entblutet, indem intracardial durch den Aortenbogen 2-3 min ca. 100ml des Blutersatzmittels Onkovertin (Braun, Melsungen) infundiert wurden. Da nur das Gehirn vollständig perfundiert werden sollte, wurde zur darauf folgenden Perfusion die Aorta descendens abgeklemmt. Die für die elektronenmikroskopischen Untersuchungen benötigten Tiere wurden für 10-20 min mit 200ml Karnovsky-Fixationslösung (3% Paraformaldehyd + 2,5% Glutardialdehyd in 0,1M Phosphatpuffer, pH 7,2; nach Karnovsky, 1965) perfundiert. Bei allen anderen Tieren wurde mit 200ml 2% Paraformaldehyd (PFA) und 2% Glutardialdehyd in 0,1M Phosphatpuffer (pH 7,3) bzw. 4%iger phosphatgepufferter PFA-Lösung (pH 7,2) fixiert. Zur Vermeidung von Gewebedeformationen und Postfixationsartefakten (Cammermeyer, 1978) wurden die Köpfe der Tiere vom Korpus getrennt und für 24 Stunden bei 4°C in demselben Fixativ nachfixiert. Danach wurden die Gehirne vorsichtig freipräpariert und der Hippocampus je nach Versuch mit umgebenden Hirnarealen oder isoliert entnommen (s. 2.6., 2.7. und 2.8.).

## 2.6. Hippocampus-Histologie und Glucocorticoide

### 2.6.1. Präparation und Einbettung in Epoxyharz

Der Hippocampus wurde vollständig herauspräpariert und mit einem Skalpell in 10 mm<sup>3</sup> große Blöcke geteilt. Um nach der Einbettung die entsprechenden Teile des Hippocampus in einer bestimmten Orientierung schneiden zu können, wurden sie präzise gezeichnet und wie folgt eingebettet:

- 2x je 30 min in 0,1M Phosphatpuffer (pH 7,3) bei 4°C
- 2h postfixieren in 1%igem 0,1M phosphatgepuffertem Osmiumtetroxyd (OsO<sub>4</sub>; pH 7,3; Paesel-Lorey, Frankfurt) bei 4°C

- 2x je 30 min in 0,1M Phosphatpuffer (pH 7,3) bei 4°C
- je 30 min in 30%, 50%, 70%, 90%, 100% und 100% Ethanol bei 4°C
- 30 min in Isopropanol (Fluka, Buchs, Schweiz) bei 4°C
- 2x je 15 min in 1-2Propylenoxyd (Merck-Schuchardt, Hohenbrunn) bei 4°C
- 1 h in Propylenoxyd und Epon (2:1) bei 10°C
- 1 h in Propylenoxyd und Epon (1:1) bei 10°C
- 1 h in Propylenoxyd und Epon (1:2) bei 10°C
- 36 h in reinem, 3x gewechseltem Epon bei 20°C
- fronto-occipitale Ausrichtung der Gewebeblöcke an Hand der Zeichnungen und gerichtete Einbettung in eine mit Epon gefüllte Gelatinekapsel
- 24-27 h Polymerisation bei 60°C im Trockenschrank
- Entfernen der Gelatinekapsel in 40-45°C warmen H<sub>2</sub>O

#### 2.6.2. Anfertigung und Färben von Semi-Dünn-Schnitten

Von allen Hippocampus-Blöcken wurden je 2-3 0,5µm und 1µm dicke Semi-Dünn-Schnitte auf einem Ultramikrotom (OMU-3, Reichert, Wien, Österreich) mit einem zuvor selbst hergestellten Glasmesser geschnitten. Dabei wurden die Blöcke so ausgerichtet, daß die dendritischen Schäfte der Neuronen zu erkennen waren (Abb. 2.1).

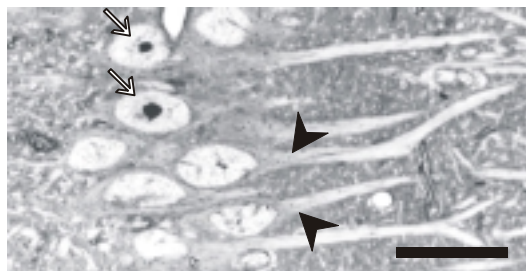


Abbildung 2.1: Dieser Ausschnitt aus den Schichten der Stratum pyramidale (linke Bildhälfte) und der Stratum radiatum (rechte Bildhälfte) der Hippocampusregion CA1 von *Tupaia belangeri* verdeutlicht die Trimmrichtung der Epon-eingebetteten Gewebeblöcke. Die dendritischen Schäfte (schwarze Pfeilspitzen) der Pyramidenneurone sind längs angeschnitten. Die medial angeschnittenen Zellkerne (Pfeile) der Pyramidenneurone haben eine ovale Form mit einem zentral gelegenen, großflächigen Nucleolus.

Anschließend wurden die Schnitte direkt aus dem Wasserbad des Glasmessers auf unbeschichtete Glasobjektträger aufgezogen und sofort bei 60°C auf einer Heizplatte gestreckt und getrocknet.

Zum Färben wurden die Schnitte auf der 60°C warmen Heizplatte mit 1%iger Methylenblau-Azur II für 1 min gefärbt, die Färbelösung mit aqua bidest entfernt und die Schnitte bei 60°C getrocknet. Vor dem Einbetten wurde Eukitt unter das Deckglas gegeben.

### 2.6.3. Anfertigung und Kontrastieren von Ultra-Dünn-Schnitten

Zur besseren Vergleichbarkeit mit vorhergehenden Untersuchungen (Fuchs et al., 1995; Magariños et al., 1996) wurde eine korrespondierende Region in der Ebene A2,5 (nach Tigges und Shanta, 1969) des Hippocampus in CA1 und CA3 ausgewählt und getrimmt. Dabei wurde darauf geachtet, daß die apicalen dendritischen Schäfte der Neurone zu erkennen waren (Abb 2.1). Eine Beschränkung auf einen Teil des Hippocampus ist trotz nachgewiesener anterior-posteriorer anatomischer Gradienten (Moser und Moser, 1998; Meyer et al., 2001) in diesem Fall möglich, da zuvor festgestellt wurde, daß eine Änderung der optischen Dichte des Nucleoplasmas nicht auf einen bestimmten Abschnitt der CA1 und CA3 Region begrenzt war (Fuchs et al., 1995; Risold und Swanson, 1996). Von den getrimmten und geschliffenen Blöcken wurden je 70-80nm dicke Ultra-Dünn-Schnitte auf einem Ultramikrotom (OMU-3, Reichert) mit einem zuvor selbst hergestellten Glasmesser in ein Wasserbad (Ampuwa, Fresenius, Bad Homburg) geschnitten und zu je 2-3 Schnitten auf mit Formvar (Merck, Darmstadt) befilmte Lochgrids aufgezogen. Abschließend wurden die Schnitte mit je einem Tropfen pro Grid von 5% Uranylacetat für 20-30 min und Bleicitrat für 7min kontrastiert (für Details s. Reynolds, 1963).

### 2.6.4. Lichtmikroskopische Auswertung und computergestützte Analyse

Die systematische, morphometrische Auswertung erfolgte mit Hilfe eines computergestützten Bildanalysesystems (Imaging Research Inc., Ontario, Canada), bei dem eine Kamera (CCD-72; Dage-MIT Inc., Michigan City, Indiana, USA) die optische Dichte der durch ein Lichtmikroskop (Axioskop, Zeiss, Oberkochen) 100fach (100er Öl-Immersionsobjektiv) vorvergrößerten Schnitte aufnimmt und mit Hilfe eines Computers auf einem Monitor abbildet. Unter Anwendung des

Auswertprogramm MCID M1 (Version 4.2; Imaging Research) wurde die Fläche des Cytoplasmas, des Nucleoplasmas (ohne Nucleolus) und des Nucleolus markiert und deren jeweilige optische Dichte gemessen.

Eine lineare Standardkurve für densitometrische Messungen wurde erstellt, deren dunkelste Referenz der Nucleolus und deren hellste Referenz der Hintergrund ohne Schnitt war. Zur Kontrolle der optisch dichteren Strukturen wurde zusätzlich die optische Dichte von Mikroglia erfaßt.

Aus zwei Gruppen (Kontrollgruppe n=3; Streßgruppe n=3) wurden pro Tier 100 Pyramidenneuronen von CA1 und CA3 des Hippocampus von mindestens 2 unterschiedlichen 1µm dicken Schnitten quantifiziert. Zufällig und systematisch nach dem Prinzip des "fractionators" (s.2.7.2.) wurden mit Hilfe eines "random number table" 25 Zellen pro Tier und Region selektiert und analysiert. Dazu wurden die densitometrischen Daten des Cytoplasmas und des Nucleoplasmas in Relation gesetzt zur mittleren optischen Dichte der Nucleoli desselben Schnittes, um eventuelle Variabilitäten in Farbintensität oder Schnittdicke zu minimieren. Alle Schnitte waren bezüglich ihrer Versuchszuordnung für die Messung und Analyse kodiert.

#### 2.6.5. Elektronenmikroskopische Auswertung und computergestützte Analyse des Heterochromatins

Für die Auswertung der Ultra-Dünn-Schnitte und zum Photographieren derselben wurde ein Elektronenmikroskop "EM 10" von Zeiss (Oberkochen, Deutschland) verwendet. Ausschließlich Neurone gut kontrastierter Schnitte von gleichmäßiger Dicke, die keinerlei Bleiniederschlag, Staubpartikel o. ä. aufwiesen, wurden in die Analyse einbezogen. 15-30 Pyramidenneurone des Hippocampus wurden pro Tier von mindestens zwei unterschiedlichen Schnitten in einer Vergrößerung von x3150 photographiert. Alle Zellen eines Schnittes wurden ausgewählt, deren Nucleus einen ausgeprägten Nucleolus aufwies und deren dendritischer Schaft deutlich zu erkennen war (s. Pfeile Abb.2.1.). Da die Pyramidenneurone in CA1 und CA3 und in der Regel auch deren meist ovoide Nuclei medio-apical orientiert sind und zudem der ausgeprägte Nucleolus zentral im Nucleus plaziert ist, kann davon ausgegangen werden, daß somit die maximale Fläche des Querschnitts eines Nucleus erfaßt wurde. Die im Hippocampus

vorkommenden Interneurone z.B. Korbzellen sind anatomisch leicht zu unterscheiden (Freund und Buzsáki, 1996) und wurden nicht mit analysiert.

Je 15 Fotos von gestreßten, Cortisol-behandelten und von Kontrolltieren wurden vor der Auswertung durch eine Nummer kodiert und gemischt. Für die Analyse der Nuclei wurde ein IBAS 20 Computersystem in Zusammenarbeit mit Dr. S. Eins der Abteilung für Klinische Anatomie der Universität Göttingen modifiziert. Die Fotos wurden gleichmäßig beleuchtet und mit Hilfe einer Kamera (Newvicon, Bosch) auf einen Computerbildschirm projiziert. Bei der Analyse wurden über eine Schattenkorrektur zum Abgleich von photographisch-technisch erzeugten graduellen Helligkeitsunterschieden, über einen Graufilter zur Unterscheidung von Heterochromatin und Euchromatin und über einen Größenfilter Heterochromatinaggregate herausgefiltert. Da der Nucleus neben Heterochromatin ebenso kleinere dunkle Strukturen wie z.B. interchromatine und perichromatine Körnchen im Größenbereich von 25-100nm aufweist (Bouteille, 1972; Ghadially, 1988), wurde zur Bestimmung des Heterochromatins das Minimum des Größenfilters auf  $1\mu\text{m}^2$  festgelegt. Das Maximum des Filters lag bei  $35\mu\text{m}^2$  und war somit kleiner als die Fläche der Nucleoli der analysierten Pyramidenneurone. Gemessen wurde innerhalb einer Referenzfläche von  $143\mu\text{m}^2$ , welches für CA1 in der Regel den gesamten Nucleusquerschnitt und für CA3 70-100% des Nucleusquerschnitts umfaßte, wobei cytoplasmatische, perinucleare Bereiche interaktiv ausgeschlossen wurden. Die Anzahl der Heterochromatinaggregationen wurde pro Referenzfläche ermittelt und als numerische Flächendichte dargestellt. Ebenso wurde die Summe der Flächen aller Heterochromatinaggregate gemessen und pro Referenzfläche als Objektflächendichte bestimmt. Membranassoziertes und nucleolusassoziertes Chromatin wurde in allen Gruppen beobachtet, jedoch nicht in die quantitative Messung mit einbezogen, d.h. über die Nucleusmembran und den Nucleolus automatisch als nicht zu quantifizierendes Objekt detektiert.

#### 2.6.6. Statistik

Die statistischen Analysen wurden an einem PC mit der Software "SPSS 8.0" und für den Kolmogorov-Smirnov Test mit der Software "Statistika 5.0" (Statsoft, 1984-1996, Tulsa, OK, USA) durchgeführt. Die auf lichtmikroskopischer Ebene gewonnenen densitometrischen Daten (2.6.4.) wurden mit Hilfe des Mann-Whitney U-Tests auf Signifikanz getestet. Die elektronenmikroskopischen Daten (2.6.5.) der



numerischen Flächendichte und der Objektfächendichte wurden für CA1 und CA3 einer ein-faktoriellen Varianzanalyse mit Meßwiederholungen (ANOVA) und zum paarweisen Gruppenvergleich dem Kolmogorov-Smirnov Test für nicht-parametrische Statistik unterzogen. Als statistisch signifikant wurde jeweils  $p \leq 0,05$  angesehen. Alle in Graphiken dargestellten Daten werden als Mittelwert  $\pm$  SEM angegeben.

## 2.7. Zellzahl des Hippocampus

### 2.7.1. Präparation

#### 2.7.1.1. Einbettung in Glycolmethacrylate

Der Hippocampus wurde in toto isoliert, das Fixativ durch mehrstündige Wässerung in aqua bidest entfernt, und wie folgt bei Raumtemperatur (RT) entwässert und infiltriert.

- 8h in 70% Ethanol
- über Nacht in 96% Ethanol
- 8h in 96% Ethanol 1:1 gemischt mit Glycolmethacrylat (Hydroxyethylmethacrylat Basislösung, Technovit 7100; Kulzer, Wehrheim)
- über Nacht in Gebrauchslösung (1g Härter 1 gelöst in 100ml Basislösung Technovit 7100)

Zur anschließenden Polymerisierung wurden 1ml Härter 2 mit 15ml Gebrauchslösung gemischt, in der Histoform (Kulzer) verteilt und die Hippocampi in toto darin positioniert. Nach Abschluß des Polymerisationsprozesses innerhalb von 2h, wurden die Plastikblöcke aus der Histoform entfernt und zum Schneiden an eine Halterung mit Hartplastik (Technovit 3040; Kulzer) befestigt.

#### 2.7.1.2. Schneiden und Färben

Der komplette Gewebeplastikblock wurde auf einem Rotationsmikrotom (RM 2065, Leika, Nussloch) in 30 $\mu$ m nominaler Dicke vollständig geschnitten. Ein leichtes Anfeuchten des Blockes machte Serienschritte möglich, wodurch die Standardabweichung in der Schnittdicke gering gehalten wurde. Parallel wurden die Schnitte aus einem kalten Wasserbad auf unbeschichtete Objektträger aufgezogen, auf einer 60°C Wärmeplatte getrocknet und über Nacht in einen 60°C Trockenschrank gestellt. Daraufhin wurden alle Schnitte bei 37°C für 1 min mit einer Mischung aus Kresylviolett-Methylenblau (s. 7.2.) gefärbt, kurz in 1%iger Essigsäure

differenziert, getrocknet und in Eukitt unter einem Deckglas eingebettet. Während der Trocknung des Eukitts wurde das Deckglas mit einem Gewicht von 20g beschwert.

### 2.7.2. "optical fractionator"

Um eine absolute Zahl an Neuronen in den Gebieten der Hippocampusformation unbeeinflusst von ihrer Größe, Form und Orientierung oder einer jedweden Schrumpfung oder Schwellung des Gewebes schätzen zu können, wurden die Pyramidenneurone in CA1 und CA3 und die Körnerzellen des Gyrus dentatus mit Hilfe des „optical fractionator“ gezählt (s. Abb.2.2 und s.a. 4.3.5.1.).

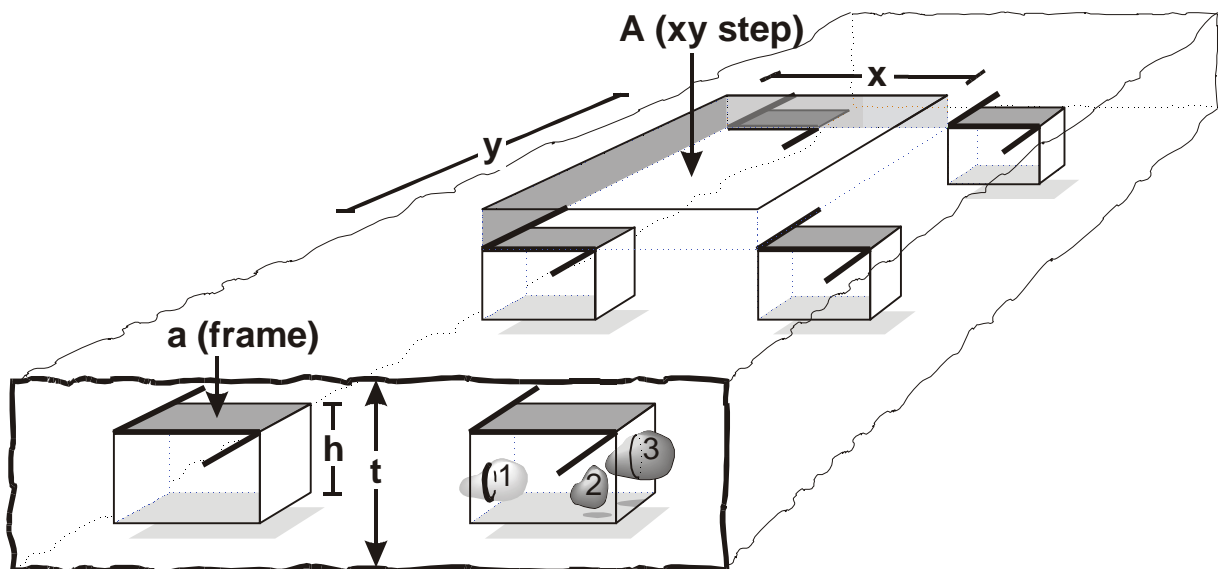


Abb. 2.2: Schematische Darstellung eines Schnittes der Höhe  $t$  in dem sechs Optical disector wie in einem „optical fractionator“ systematisch verteilt sind. Das Verhältnis der dunkelgrau dargestellten Oberfläche eines Optical disector  $a$  (frame) zu dem Abstand  $x$  und  $y$  der am nächsten gelegenen Optical disector, der wellig dargestellten Fläche  $A$  ( $xy$  step) bilden die Fraktion der Schnittfläche. Das Verhältnis der Schrittdicke  $t$  zu der Höhe  $h$  des Optical disector bilden die Fraktion der Schrittdicke.

Zu beachten ist die leicht unregelmäßig dargestellte Oberfläche des Schnittes, die verdeutlicht, daß zur Gewährleistung einer unbeeinflussten Zellzählung  $h$  nicht identisch mit  $t$  sein darf und der Optical disector deshalb bildlich dargestellt im Volumen des Schnittes schwebt. Die unten angegebenen, die Fläche  $a$  (frame) begrenzenden und darüber hinausgehenden schwarzen, dicken Linien sind die so bezeichneten "exclusion lines", die ein Zählen eines Neurons bei "visueller" Berührung derselben ausschließen (s. Abb. 2.3.).

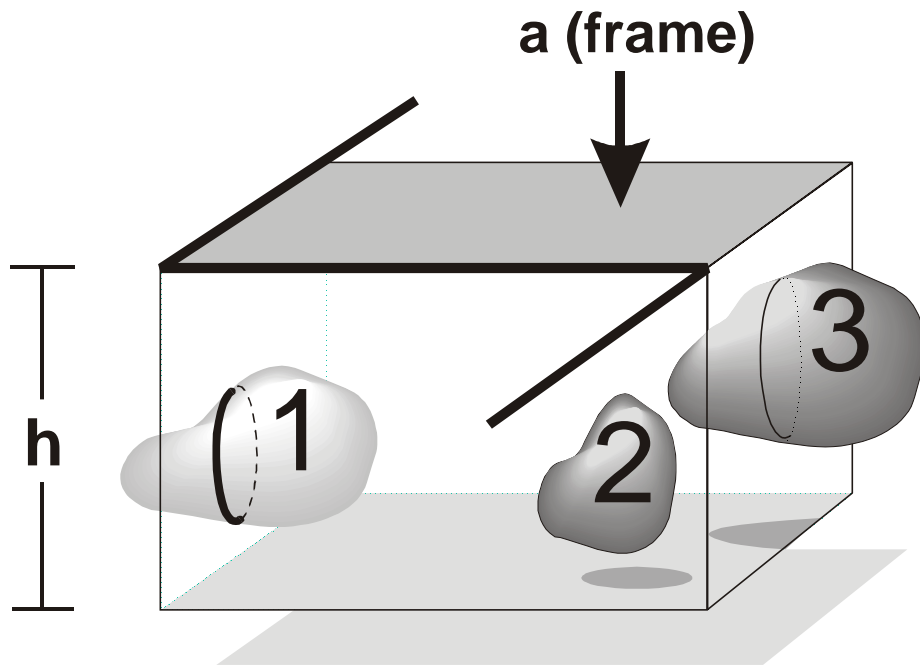


Abb 2.3: Vergrößerte, schematische Darstellung eines "optical disector" (aus Abb. 2.2) mit einer grau dargestellten Oberfläche a (frame). Zuzüglich der Höhe des Disectors h betrachtet man den dargestellten Kubus, dessen obere (grau), frontale und linke Seite als die zum Zählen verbotenen Seiten gelten, während der imaginäre Boden (hellgrau) sowie die rechte und hintere Seitenfläche als beim Zählen eingeschlossene Seiten gelten. In der Aufsicht sind die verbotenen Seiten gekennzeichnet durch dicke, schwarze Linien, die außerhalb der Fläche erweitert sind.

Praktisch bedeutet dies für das Quantifizieren mit dem "optical disector" folgendes: Fällt wie hier zur Verdeutlichung der Zählregeln des "optical disector" beispielhaft dargestellt ein "optical disector" bei der systematischen Verteilung in den Bereich der Neurone 1,2 und 3, so wird das Neuron 1 nicht gezählt, da es von der zum Zählen verbotenen linken Seite (und entsprechend der Linie in der Aufsicht) durchschnitten wird. Neuron 2 liegt vollständig innerhalb des Kubus und wird eindeutig gezählt. Neuron 3 liegt zwar nicht vollständig im Kubus und wird von der rechten Seite durchschnitten. Weil aber diese Seite als beim Zählen eingeschlossen gilt, wird das Neuron 3 ebenfalls gezählt.

Die stereologische Methode des "optical fractionator" (West et al., 1991) ist eine Kombination aus dem "fractionator" (Gundersen, 1986) und dem "optical disector" (Abb. 2.3.; Sterio, 1984; West et al., 1991). Wie in der Regel bei einer Schätzung von großen Zellzahlen eines Gehirngbietes mit üblicherweise angewendeten Methoden wurden aus der Gesamtheit der Zellen Proben genommen, deren Zellzahl gezählt wurde. Diese wurden daraufhin auf das gesamte Gebiet extrapoliert. Im Unterschied zu den herkömmlichen Methoden ist jedoch beim

"optical fractionator" die zu zählende Probe dreidimensional nicht zweidimensional wie z.B. die Teilfläche eines Schnittes. Dies ist insbesondere wichtig, da die Zahl im Gegensatz zu einer Linie, Fläche oder Volumen eine dimensionslose Größe ist. Diese dreidimensionale Probe innerhalb derer nach festgelegten Regeln quantifiziert wird, ist der "optical disector" (Abb 2.2 xystep und Abb. 2.3 disector).

Der "fractionator" gewährleistet eine systematische Verteilung der "optical disector" Proben in dem zu quantifizierenden Gehirngbiet, dem Hippocampus, indem dieses in Fragmente unterteilt wird (Gundersen, 1986; Cruz-Orive und Weibel, 1990). Dies ist kombiniert auf mehreren Ebenen möglich (Howard und Reed, 1998). Um die Summe der Zellen zu ermitteln, wurde dazu der Hippocampus in toto in drei Fraktionen unterteilt, die Fraktion des Schnittes (ssf), die Fraktion der Schnittfläche (asf) und die Fraktion der Schnittdicke (tsf; s.a. West et al., 1991). Eine Multiplikation des reziproken Produkts der Fraktionen mit der Summe der pro Struktur mit dem "optical disector" gezählten Zellen ( $\Sigma Q^-$ ), ergibt eine Schätzung der Gesamtzellzahl des Gehirngbietes (N):

$$N = \sum Q^- * \frac{1}{ssf} * \frac{1}{asf} * \frac{1}{tsf}$$

### 2.7.3. Zählschema

Bei der Einteilung in Fraktionen zur Erstellung eines effizienten Zählschemas im Hippocampus von Tupaia wurde sich an dem optimierten "optical fractionator" Schema der Ratte orientiert (West et al., 1991), da die Hippocampi beider Arten sich in Größe und Struktur ähneln.

Um möglichst 15-20 Schnitte in Abständen von gleichmäßigen Intervallen in der gesamten Ausdehnung des Gehirngbietes zu selektieren, wurde jeder 5. Schnitt in die Auswertung einbezogen. Somit ist die Fraktion des Schnittes (ssf) 1/5. Alle folgenden Berechnungen änderten sich entsprechend und waren unabhängig von der Behandlung. Die Auswahl des ersten Schnittes im ersten Intervall von 1-5 wurde zufällig mit einem "random number table" bestimmt. Alle Schnitte wurden zur Auswertung von einer unbeteiligten Person kodiert.

Wie in Abbildung 2.2 dargestellt, ist die Fraktion der Schnittfläche (2-D) definiert als das Verhältnis der Fläche des "optical disector" [a(frame)] zu dem Abstand der "optical disector" Positionen zueinander in der x und y Richtung [A (xy step)]:

$a(\text{frame}) / A(\text{xy Step})$ . Die Fläche des "optical disector" wurde so gewählt, daß bei einer Höhe desselben von  $15 \mu\text{m}$  im Durchschnitt je ein Neuron gezählt wurde. Dies ist für Tupaia bei CA1  $361 \mu\text{m}^2$ , CA3  $506 \mu\text{m}^2$  und im Gyrus dentatus (GD)  $110 \mu\text{m}^2$ . Wie bei Gundersen und Jensen (1987) gezeigt, ist es für eine Minimierung des intraindividuellen Fehlerkoeffizienten von unter 0,10 ausreichend 100-200 Zellen auf 15-20 Schnitten zu quantifizieren. Bei einer durchschnittlichen Zählquote von einem Neuron pro "optical disector" führt das im Hippocampus von Tupaia für CA1 zu einem Abstand zwischen den Disektoren (xy step) von  $250 \mu\text{m} \times 250 \mu\text{m}$ , für CA3 von  $300 \mu\text{m} \times 300 \mu\text{m}$  und für den GD von  $320 \mu\text{m} \times 320 \mu\text{m}$ . Die Position des ersten "optical disector" ist zufällig bestimmt.

Die Fraktion der Schnittdicke ist definiert als das Verhältnis der Höhe des "optical disector"  $h$  von  $15 \mu\text{m}$  zu der realen Schnittdicke  $t$  (Abb.2.2.). Die reale Schnittdicke wurde mindestens fünf mal an unterschiedlichen, zufällig ausgewählten Positionen des Schnittes mit einem an das Mikroskop gekoppelten Microcater gemessen. Dazu wurde mit Hilfe eines  $100\times$  Öl-Immersions-Objektivs von der Oberkante des Schnittes bis zur Unterkante des Schnittes fokussiert.

#### 2.7.4. Computergestützte Auswertung

Zur vereinfachten Anwendung des "optical fractionator" wurden zwei unterschiedliche computergestützte Systeme genutzt. Dies erfolgte in Zusammenarbeit mit Dr. Mark J. West am Anatomischen Institut der Universität Århus, Århus, Dänemark und Prof. Dr. Dietrich Meyer (†) vom Anatomischen Institut der Universität Göttingen. In Århus standen ein Mikroskop (Leika, Nussloch), ein Microcator (MT-2; Heidenhain GmbH, Traunreut), eine Videokamera, eine Kontrollstation mit gekoppeltem Schrittmotor (MAC 4000; LUDL Electronic Products, Hawthorne N.Y., USA), einem Videobildschirm (Sony) und ein in Zusammenarbeit mit dem Stereologie Research Laboratory von HJG Gundersen in Århus speziell für die Anwendung des "optical disector" entwickeltes und modifiziertes Computersystem zur Verfügung. In Göttingen wurden die Zellen mit Hilfe des StereoInvestigator (Version 3.16, MicroBrightField, Colchester, VT, USA), einer Kamera (Kappa CF15/2, opto-electronics GmbH, Gleichen), einem Video Bildschirm (Sony triniton KX-14 CP1 und CPD-200GS; video frame grabber, Flaschpoint Intrigue 32, Integral Technologies Inc., Indianapolis, USA), einem an das Durchlicht-Photomikroskop III (Zeiss, Oberkochen) gekoppelten Microcators (MT-12;

Heidenhahn) und einem über eine Kontrollstation (MAC 2000 Communicator Interface; LUDL Electronic Products) für das jeweilige Objektiv geeichten xy step Motor (LUDL Electronic Products) gezählt.

Die Neurone wurden nach den in 3.2. beschriebenen histologischen Kriterien und Regionsgrenzen nach Größe und Position den quantifizierten Regionen, CA1, CA3 und GD zugeordnet, welche zur Vereinfachung des Meßvorgangs vorher abgegrenzt wurden. Die Grenze von CA1 zum Subiculum wurde definiert als das Ende der dicht gepackten Pyramidenzellschicht, bei der die Pyramidenneurone nicht mehr direkt nebeneinander liegen (s. a. Abb. 3.4). Ein Neuron wurde beim Focussieren durch den Schnitt dann gezählt, wenn der Nucleus nach den Kriterien des "optical disector" (s. Legende Abb. 2.3) innerhalb dessen gegebenen Grenzen lag, und wenn der Nucleolus von der Oberfläche des Schnittes gesehen erstmals - bei Gebrauch eines 100x Öl-Immersion-Objektivs - in den Focusbereich kam. Für die Körnerzellen des Gyrus dentatus, die teilweise mehrere Nucleoli aufweisen, gilt dies entsprechend für den ersten scharf sichtbaren Nucleolus.

#### 2.7.5. Fehlerrechnung und Statistik

Um ein optimales und effizientes Zählschema zu erzielen, muß gewährleistet sein, daß die intraindividuelle Varianz, ausgedrückt durch den CE, nur minimal zur Gruppenvarianz beiträgt. Unter Berücksichtigung der Gleichung  $CV^2 = BCV^2 + CE^2$ , muß der quadrierte durchschnittliche CE ( $CE^2$ ) kleiner sein als die tatsächliche biologische Varianz ( $BCV^2$ ) und insofern kleiner als 50% der versuchsbedingten interindividuellen Varianz ( $CV^2$ ; Gundersen und Jensen, 1987). Der CE errechnet sich für systematische Proben nach Gundersen et al. 1999 anhand folgender Formel:

$$CE = \frac{\sqrt{[3 * [\sum (q_k^-)^2 - \sum q_k^-] + (\sum q_k^- * q_{k+1}^-) - 4 * (\sum q_k^- * q_{k+2}^-)] / 240 + \sum q_k^-}}{\sum q_k^-}$$

Mit  $\sum q_k^-$  = Summe der gezählten Nuclei der Serie  $k_1, k_2, \dots, k_n$

Zur statistischen Evaluierung wurde ein Zweistichproben-t-Test für unabhängige Zufallsstichproben verwendet und nach Sachs (1972) berechnet. Eine Irrtumswahrscheinlichkeit von  $p \leq 0,05$  wurde festgelegt, um statistisch signifikante

Unterschiede zwischen den Gruppen festzustellen. Mit Hilfe der statistischen Formel des t-Tests besteht dann die Möglichkeit zu ermitteln, welche theoretisch anzunehmenden prozentualen Unterschiede zwischen den Gruppen bei denselben Versuchsbedingungen und Varianzen etc. hätten detektiert werden können. Ebenso wurde abgeschätzt, welche Tierzahl unter der Voraussetzung gleicher Bedingungen benötigt würden, um eine Signifikanz bei einem prozentualen Unterschied von beispielsweise 10% detektieren zu können.

## 2.8. in situ end labeling

Das "in situ end labeling" (ISEL) wurde in Zusammenarbeit mit Dr. Paul J. Lucassen der Abteilung für Medizinische Pharmacologie, LACDR, der Universität Leiden, Leiden, Niederlande, in jeweils 8 Schnittebenen von je drei chronisch psychosozial gestreßten und drei ungestreßten Tupaia durchgeföhrt. In Abschnitt 2.8.2. wird eine Kurzfassung des von ihm für Tupaia geringfügig veränderten ISEL-Standardprotokolls (Gavrieli et al., 1992; Wijsman et al., 1993; Lucassen et al., 1995 u. 2000) beschrieben. Das Auftreten ISEL positiver, apoptotischer Zellen wurde unbeeinflusst von der Behandlung des jeweiligen Tieres ebenfalls an der Universität Leiden je von Dr. Paul J. Lucassen und Mira Gleisberg - wie unter 2.8.3. beschrieben - quantifiziert.

### 2.8.1. Präparation und Einbettung in Paraffin

Von der linken Hemisphäre des Tupaiahirns wurde eine 6mm breite frontale Scheibe zwischen der Ebene AP 0.0 und AP 6.0 nach Tigges und Shanta, 1969 präpariert und für 3 Stunden gewässert. Die Einbettung erfolgte in einem Hypercenter (XP, Shanon, Life Sci. International GmbH, Frankfurt) wie folgt:

- 45 min in 50% Ethanol bei 35°C
- je 45 min in 70%, 80%, 90%, 96%, 100% und 100% Ethanol bei 35°C unter Vakuum
- 2x45 min in Chloroform unter Vakuum
- 45 min in Paraffin bei 60°C unter Vakuum
- ca. 6h in Paraffin bei 60°C

Nach der Einbettung in einen Paraffinblock wurden 10µm dicke Schnitte in 4 Serien auf einem Schlittenmikrotom geschnitten, im 39°C warmen Wasserbad gestreckt und aus dem Wasser auf Histobond und Superfrost plus Objektträger aufgezogen.

Je zwei Schnitte derselben Schnittebene wurden von jeweils einem Kontrolltier und einem gestreßten Tier auf einen Objektträger nebeneinander aufgezogen und vor der quantitativen Analyse kodiert.

### 2.8.2. ISEL

Zuerst wurden die Schnitte in Xylol entparaffiniert und in Ethanol und aqua bidest gewässert. Daraufhin wurden sie in 10 mM Tris-HCl Puffer mit 2,6 mM  $\text{CaCl}_2$  (PK-Puffer; pH 7,0) preinkubiert und 15 min bei Raumtemperatur (RT) mit 20  $\mu\text{g/ml}$  Proteinase K (Sigma) in PK-Puffer inkubiert. Nach kurzem Waschen in aqua bidest wurde 15 min in Terminal-Transferase (TdT; Böhlinger, Mannheim) Puffer (0,2 M Natriumcacodylat, 0,025 M Tris-HCl in 0,25 mg/ml BSA; pH 6,6) bei RT und folgend 60 min bei 37°C in der Reaktionslösung mit 0,2% TdT, 1% Biotin-16-dUTP (Böhlinger) und 5% Cobaldchlorid inkubiert. Diese Inkorporierung der gebundenen Oligonucleotide wurde durch kurzes Waschen in aqua bidest und PBS (pH 7,4) gestoppt. Endogene Peroxidase Aktivität wurde geblockt durch eine 20 minütige Inkubation mit 0,01%  $\text{H}_2\text{O}_2$  in PBS bei RT. Nach Waschen in PBS wurden die Schnitte für 15 min in 1% Rinderserumalbumin (BSA) in PBS preinkubiert, mit dem peroxidasekonjugierten Avidin (ABC elite kit, Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) 1:1000 in PBS/1% BSA für 30 min bei RT und folgend über Nacht bei 4°C inkubiert. Dann wurde mehrfach in PBS gewaschen. Die DNA Fragmente wurden mit Hilfe einer Inkubation von 0,5 mg/ml Diaminobenzidin (DAB; Sigma) in 0,05 M Tris-HCl (pH 7,5) mit 0,02%  $\text{H}_2\text{O}_2$  sichtbar gemacht und diese Farbreaktion nach etwa 15 min mit Waschen in aqua bidest gestoppt. Vor dem Einbetten wurden die Schnitte mit Methylgrün leicht gefärbt. Positive Kontrollen bestehend aus Schnitten der Prostata von drei Tage zuvor kastrierten Ratten wurden jedem Versuchsdurchlauf beigefügt (Wijsman et al., 1993).

### 2.8.3. Semiquantitative Auswertung ISEL positiver Zellen und Statistik

Das Auftreten ISEL positiver, apoptotischer Zellen wurde im Alveus, im Subiculum sowie im entorhinalen Cortex und in folgenden Substrukturen des Hippocampus von *Tupaia* ermittelt: im Gyrus dentatus (Körnerzellschicht und Stratum molekulare), im Hilus und in CA1 und CA3 (Pyramidenzellschicht, Stratum oriens, Stratum lucidum und Stratum radiatum; s. a. Abb. 7.1 im Anhang). Ausschließlich ISEL positive Zellen mit klarer apoptotischer Morphologie wurden



gezählt. Dabei wurden folgende Kriterien zu Grunde gelegt: Vorhandensein von braunem DAB-Prezipitat, isoliertes Auftreten, auffällige Chromatin Reorganisation, zelluläre Schrumpfung, kondensierter oder deutlich pyknotischer Nucleus und/oder das Auftreten von "apoptotic bodies" (Kerr et al., 1972; Wyllie , 1997; Cohen, 1993; Lucassen et al., 1995; Majno und Joris, 1995). ISEL positive Zellen mit DAB-Prezipitat wurden als nekrotisch definiert, wenn keine der beschriebenen apoptotischen Merkmale erkennbar waren, oder sich der gefärbte Nucleus nicht in Form und Größe von den ihn umgebenden Zellen unterschied, oder die Nucleus- oder Zellmembran deutlich zerstört waren, oder wenn sie in großer Anzahl nahe beieinander lagen (Cohen 1993; Raff, 1998).

Die so ermittelten apoptotischen Zellen wurden in den beschriebenen Regionen in 8 unterschiedlichen interindividuell korrespondierenden Ebenen gezählt und pro Subregion gemittelt. Auf signifikante Unterschiede der mittleren Anzahl apoptotischer Zellen pro Substruktur zwischen gestreßten und ungestreßten Tieren wurde mit Hilfe eines Mann-Witney U-Tests und anschließend eines Kolmogorov-Smirnov Testes getestet. Als statistisch signifikant wurde jeweils  $p \leq 0,05$  angesehen.

### 3. ERGEBNISSE

#### 3.1. Physiologische Parameter

Das Körpergewicht sowie die Cortisol- und Noradrenalin-Konzentration im Urin sind bei gestreßten Tieren vom ersten Streßtag an deutlich und dauerhaft verändert. Auch bei den Cortisol-behandelten Tieren ist ein dauerhaft verändertes Körpergewicht und eine erhöhte urinaire Cortisol-Konzentration nachzuweisen. Im Gegensatz dazu sind bei den Tieren der Kontrollgruppe über den gesamten Versuchszeitraum keine wesentlichen Veränderungen in den ermittelten Parametern des physiologischen Zustandes zu erkennen. Die einzelnen Parameter werden im folgenden näher erläutert.

##### 3.1.1. Körpergewicht

Das mittlere Körpergewicht aller Tiere in der Kontrollphase lag bei durchschnittlich  $233 \pm 5$  g. Abb. 3.1 zeigt das tägliche, durchschnittliche Körpergewicht in % der Kontrollphase von gestreßten, Cortisol-behandelten und ungestreßten Tupaia. Die zweifaktorielle Varianzanalyse zeigte für das Körpergewicht einen signifikanten Effekt des Faktors Gruppe ( $F_{2,22} = 30,91$ ;  $p \leq 0,0001$ ), des Faktors Zeit ( $F_{1,22} = 9,53$ ;  $p \leq 0,005$ ) und der Interaktion der Faktoren Gruppe und Zeit (Abb. 3.1.);  $F_{2,22} = 5,39$ ,  $p \leq 0,012$ . Ein Gruppenvergleich zeigt, daß bereits nach einem Tag psychosozialen Stresses eine deutliche Gewichtsreduktion bei den psychosozial gestreßten Tupaia (n=11) verglichen mit der Kontrollgruppe (n=10) zu erkennen war, die ab diesem zweiten Tag der Streßexposition für alle 28 Tage signifikant verschieden war (Abb. 3.1). Auch die Cortisolgruppe (n=4) ließ ab dem ersten Tag der Behandlung eine Gewichtsreduktion erkennen, die sich von der Kontrollgruppe bis auf die Tage 1, 2, 3 und 5 signifikant unterschied (Abb. 3.1). Die Cortisolgruppe und die Streßgruppe unterschieden sich nicht signifikant. Eine signifikante Differenz zwischen allen drei Gruppen während der Kontrollphase bestand nicht.

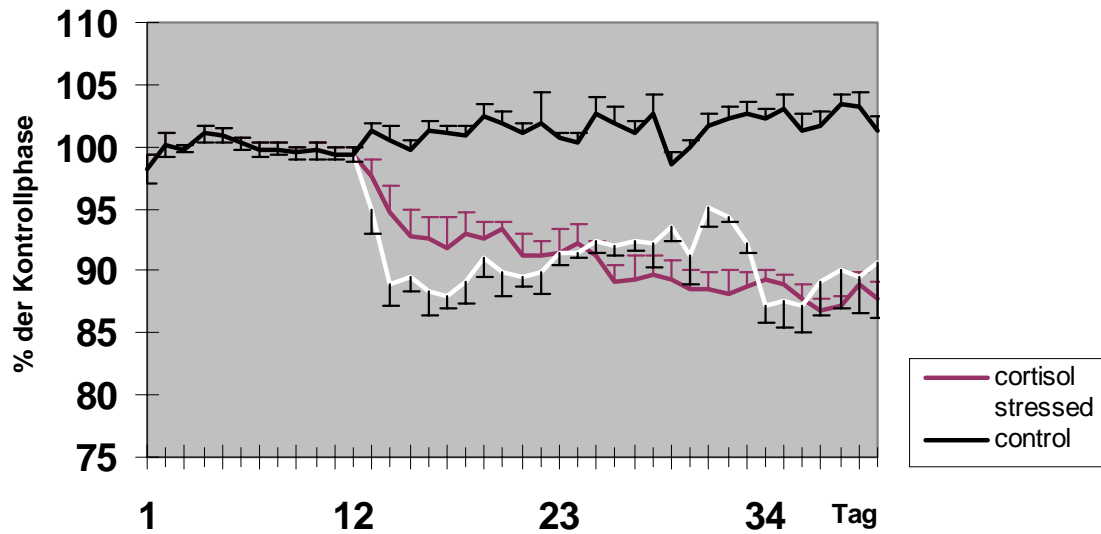


Abbildung 3.1: Mittleres Körpergewicht in Prozent der Kontrollphase von Tupaia während der Kontroll- (n=21; 12d) und der Streßperiode (28d). Für die Streßperiode sind die Daten (Mittelwert  $\pm$  SEM) der chronisch psychosozial gestreßten Tiere (n=11) weiß, der Cortisol behandelten Tiere rot (n=4) und die der ungestreßten Kontrolltiere (n=10) schwarz gekennzeichnet.

Betrachtet man den Faktor Zeit innerhalb einer Gruppe, so war in der Kontrollgruppe das mittlere Körpergewicht an keinem Tag signifikant unterschiedlich von dem der Kontrollwoche mit  $F_{28} = 0,95$ ;  $p = 0,539$ . Eine Ausnahme davon ist Tag 17 ( $p=0,033$ ). In der Streßgruppe unterschieden sich das Körpergewicht an allen 28 Tage signifikant von dem der Kontrollwoche, d.h. für alle Tage zusammen ist  $F_{28} = 2,14$ ;  $p = 0,001$ . In der Cortisolgruppe war  $F_{28} = 7,226$ ;  $p \leq 0,0001$ . Das Körpergewicht der ersten zwei Tage der Cortisol-Behandlung war nicht signifikant unterschiedlich von der Kontrollwoche ( $p = 0,177$  für Tag 1 und  $p = 0,087$  für Tag 2), an allen folgenden Tagen unterschied es sich jedoch signifikant.

### 3.1.2. Cortisol im Urin

Die mittlere Cortisol-Konzentration der Tiere während der Kontrollphase lag bei durchschnittlich  $103 \pm 30$  pg/ $\mu$ mol Creatinin. Abb. 3.2 zeigt die tägliche, durchschnittliche Cortisol-Konzentration in % der Kontrollphase im Morgenurin von gestreßten und ungestreßten Tupaia. Die zweifaktorielle Varianzanalyse ergab einen signifikanten Effekt des Faktors Gruppe  $F_{1,12} = 28,31$ ;  $p < 0,0001$ .

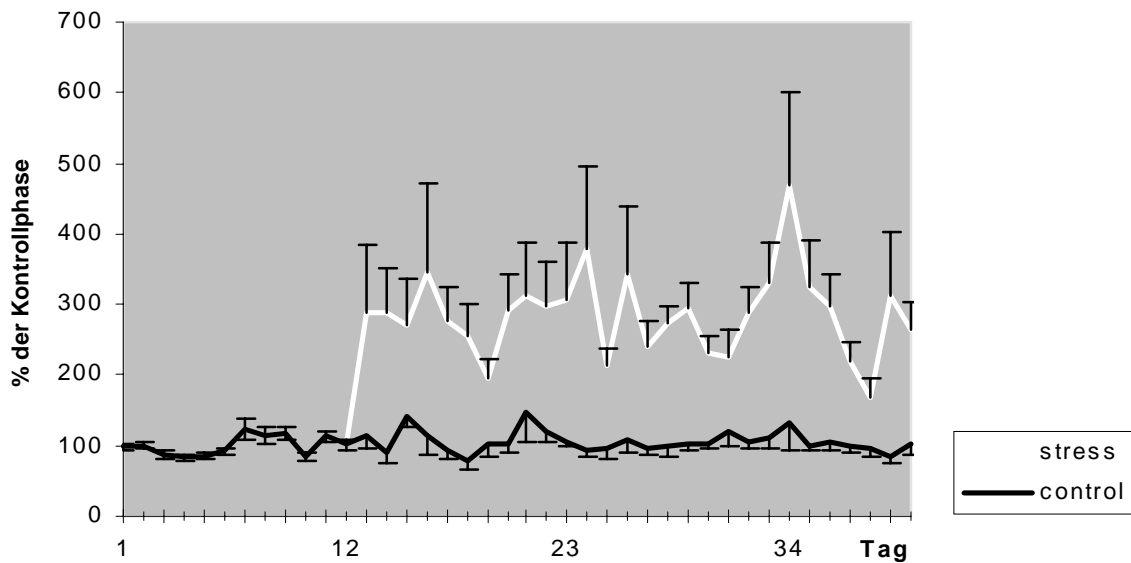


Abbildung 3.2: Mittlere Cortisolkonzentration in % der Kontrollphase im Morgenurin von Tupaia während der Kontroll- (n=14; 12d) und der Streßperiode (28d). Für die Streßperiode sind die Daten (Mittelwert  $\pm$  SEM) der chronisch psychosozial gestreßten Tiere (n=7) weiß und die der ungestreßten Kontrolltiere (n=7) schwarz gekennzeichnet.

Bei der Berechnung des Faktors Zeit war in der Kontrollgruppe die mittlere Cortisolkonzentration an den Tagen 3 ( $p = 0,033$  und 4 ( $p = 0,02$ ) und 9 ( $p = 0,025$ ) signifikant verschieden von denen der Kontrollwoche. An allen anderen Tagen war sie nicht signifikant verschieden von der Kontrollwoche. In der Streßgruppe unterschieden sich alle Tage signifikant von der Kontrollwoche ( $p \leq 0,05$ ). Davon ausgenommen sind Tag 1 ( $p = 0,098$ ) der Streßexposition, Tag 4 ( $p = 0,07$ ) und Tag 12 ( $p = 0,06$ ).

## 3.1.3. Noradrenalin im Urin

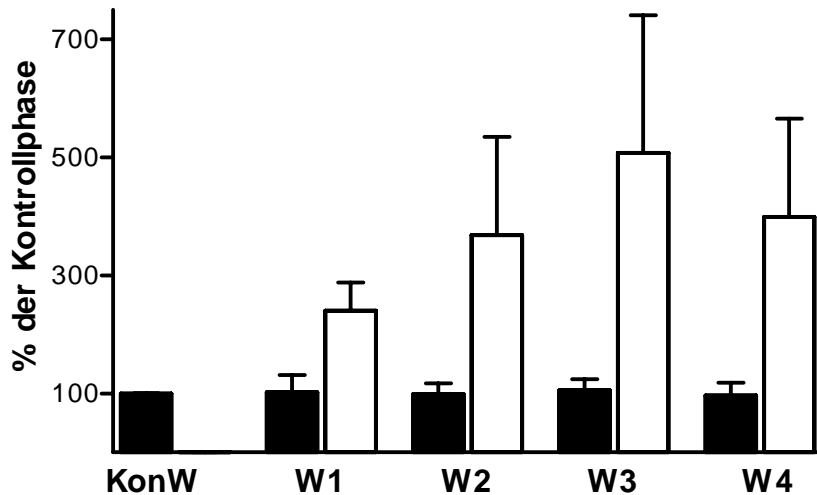


Abbildung 3.3: Mittlere Noradrenalin-Konzentration in % der Kontrollphase im Morgenurin von Tupaia während der Kontrollwoche (KonW; n=6; 8d) und den vier Streßwochen (W; je 7d). Für die Streßperiode sind die Daten (Mittelwert  $\pm$  SD) der chronisch psychosozial gestreßten Tiere (n=3) schwarz und die der ungestreßten Kontrolltiere (n=3) weiß gekennzeichnet.

Die mittlere Noradrenalin-Konzentration der Tiere während der Kontrollphase lag bei durchschnittlich  $106 \pm 36$  pg/ $\mu$ mol Creatinin. Abb. 3.3 zeigt die durchschnittliche Noradrenalin-Konzentration in % der Kontrollphase im Morgenurin von gestreßten und ungestreßten Tupaia (Auf eine tagesgenaue Darstellung der Werte wie in 3.1.1. und 3.1.2. wurde aus den in Kapitel 2.4.4. angegebenen Gründen verzichtet). Über eine zweifaktorielle Varianzanalyse der Noradrenalin-Konzentrationen der Kontrollwoche (8d) und der vier Streßwochen (je 7d) konnte ein signifikanter Effekt des Faktors Gruppe ( $F_{1,4} = 10,56$ ;  $p \leq 0,031$ ), des Faktors Zeit ( $F_{1,4} = 14,42$ ;  $p \leq 0,019$ ) und der Interaktion der Faktoren Gruppe und Zeit (Abb. 3.1);  $F_{1,4} = 13,09$ ,  $p \leq 0,022$  festgestellt werden (Abb. 3.3).

Im Zeitverlauf ist die erste Streßwoche signifikant unterschiedlich von der Kontrollphase ( $p = 0,037$ ). Für die anderen Streßwochen gilt dies nicht ( $p = 0,108$ ;  $p = 0,094$ ;  $p = 0,09$ ). Die einzelnen Streßwochen sind voneinander nicht signifikant verschieden ( $p > 0,145$ ). Innerhalb der Kontrollgruppe unterscheiden sich die einzelnen Wochen nicht signifikant voneinander und von der Kontrollwoche ( $F_{4,8} = 0,24$ ;  $p > 0,91$ ).

### 3.2. Anatomie des Hippocampus von Tupaia

Im Gehirn von *Tupaia belangeri* liegt die hippocampale Formation medio-rostral bis ventro-caudal zum temporalen Cortex eingebettet zwischen dem lateralen Ventrikel, dem Tractus opticus und dem entorhinalen Cortex in den Ebenen AP 0.0 bis AP 6.0 nach Tigges und Shanta, 1969. Anders als bei Ratten ist die elongierte hippocampale Formation im mediorostralen Teil am Übergang von Fimbria und Fornix flach-kegelförmig zulaufend. Im Vergleich mit nichthumanen Primaten beinhaltet sie außerdem bei *Tupaia* einen großen Teil des Gesamt-Cortex-Volumen mit einem durchschnittlichen unilateralen Hippocampusformation-Volumen von  $86,3 \text{ mm}^3$ , berechnet nach MRI Messungen von Ohi et al. (1999). Angrenzend an das Subiculum ist der begrifflich enger umgrenzte Hippocampus unterteilt in den Gyrus dentatus und die Cornu ammonis (CA; Abb.3.4).

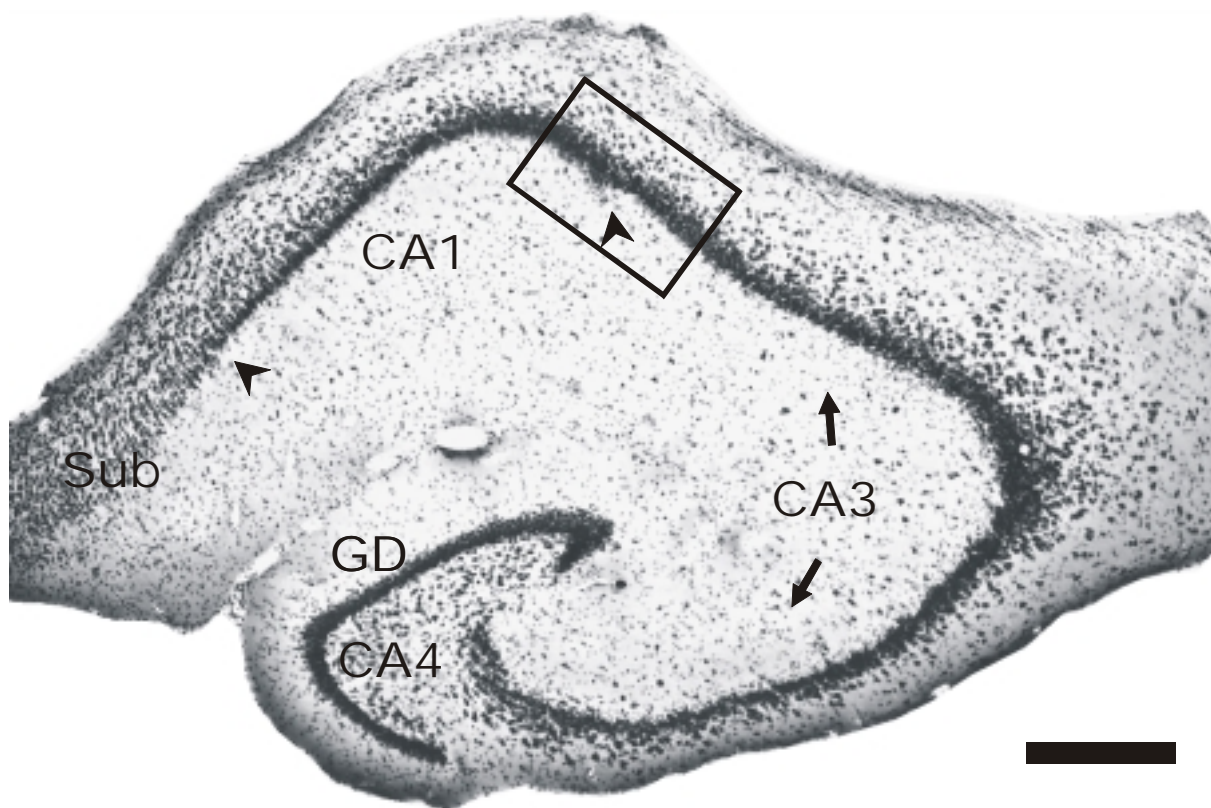


Abb. 3.4: Frontaler Querschnitt (30µm Glycolmethacrylat-Schnitt) eines *Tupaia* Hippocampus in der Ebene AP 5.0 nach Tigges und Shanta (1969) gefärbt mit Methylenblau-Kresylviolett. Charakteristisch sind die stark angefärbten Zellkörper der Pyramidenneurone der Regionen CA1 und CA3 und der Körnerzellen des Gyrus dentatus (GD). Letzterer umhakt die Region CA4. Die Grenzen der CA1 zum Subiculum (Sub) und zu CA3 sind mit Pfeilspitzen gekennzeichnet. Eichstrich 0,5mm

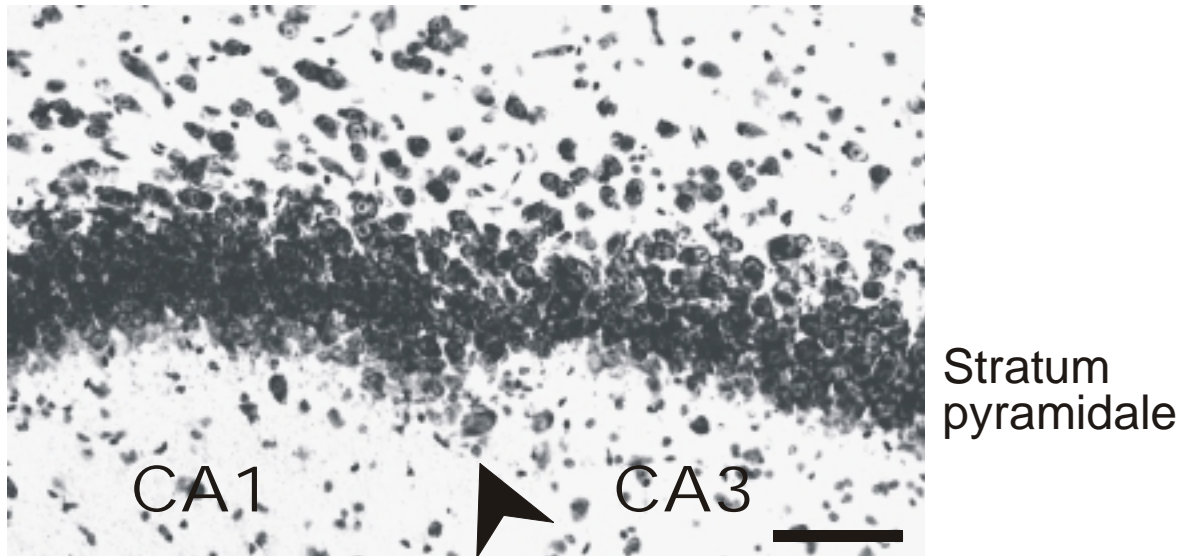
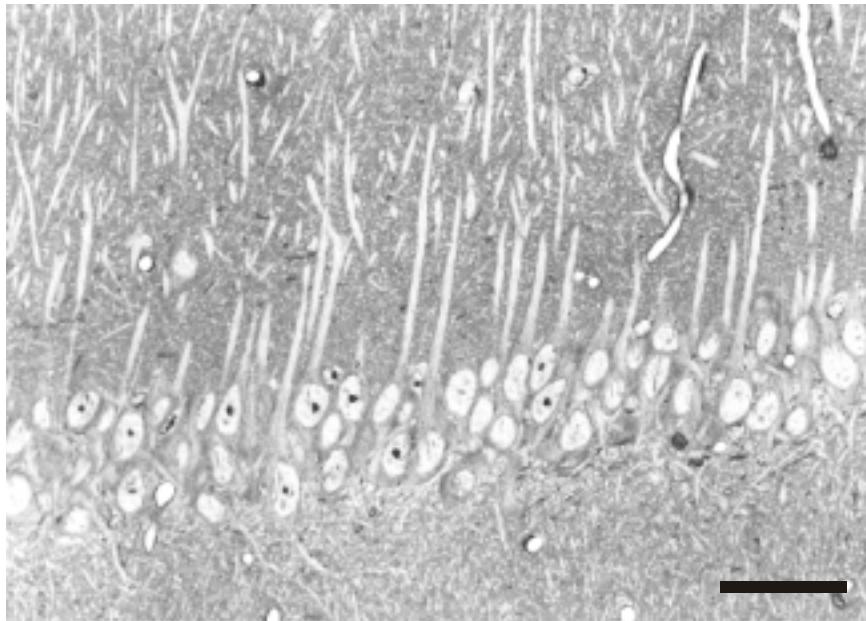


Abb. 3.5: Vergrößerter Ausschnitt der Abbildung 3.4. der Übergangszone (siehe Pfeilspitze) von CA1 zu CA3. Zu beachten sind die kleineren und dichter gepackten Pyramidenzellen der Pyramidenzellschicht (Str. pyramidale) von CA1 und die im Vergleich größeren und nicht so dicht gepackten Pyramidenzellen in CA3. Eichstrich 0,1 mm

Die transversale Einteilung der Cornu ammonis besteht nach der Definition von Lorente de Nó (1934) aus den Regionen CA1-CA4, wobei letztere den Hilus des Gyrus dentatus füllt und keine eindeutige Schichtung aufweist. Da in den in dieser Untersuchung verwendeten Schnitten von Tupaia die Region CA2 nicht deutlich abzugrenzen war (Abb.3.5; s. a. West und Schwertfeger, 1985) besteht die Regio superior somit aus CA1 und die Regio inferior vorwiegend aus CA3. Beide bestehen aus mehreren Schichten, der Pyramidenzellschicht (Stratum pyramidale), distal davon der Stratum oriens und proximal der Pyramidenzellschicht der Stratum radiatum und Stratum lacunosum-molekulare (Abb 3.4; 3.6; 3.7).

In der Pyramidenzellschicht in CA1 (Abb 3.6) haben die Pyramidenneurone dicht gepackte Zellkörper, die kleiner sind als diejenigen in CA3 (Abb. 3.7). Es ist zudem möglich sie streng linear zur Stratum radiatum abzugrenzen. Die Somata der Pyramidenneurone in der Pyramidenzellschicht in CA3 (Abb. 3.7) sind weniger dicht gepackt und haben in Nissl-gefärbten Schnitten proximal angrenzend eine schmale, im Durchlichtmikroskop leicht schimmernde, hellere Subschicht, das Stratum lucidum, in der die Moosfaserafferenzen aus dem Gyrus dentatus enden (Lorente de Nó, 1934).



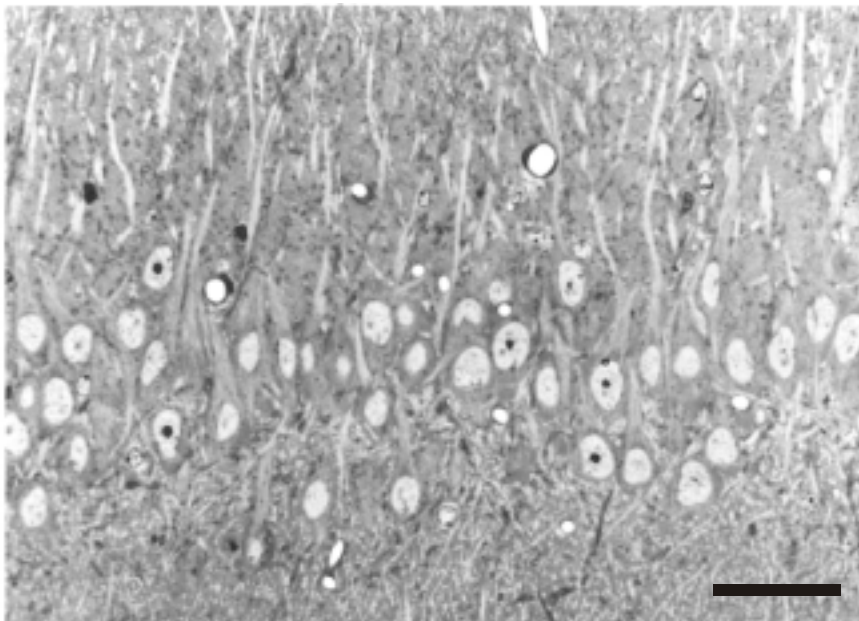


Stratum  
radiatum

Stratum  
pyramidale

Stratum  
oriens

Abb. 3.6: Der semi-dünn Schnitt der Hippocampusregion CA1 von *Tupaia belangeri* mit den Schichten Stratum pyramidale, radiatum und oriens stellt den Übergang der Stratum pyramidale zur Stratum radiatum dar. Dieser ist durch die klare Grenze der längs angeschnittenen apicalen dendritischen Schäfte der Pyramidenneurone deutlich. Die Zellkerne der Pyramidenzellen haben eine ovale Form mit bei einigen Zellen einem zentral gelegenen, großflächigen Nucleolus. Zu beachten ist zusätzlich ein längs angeschnittenes Blutgefäß in der rechten oberen Ecke des Bildes. Eichstrich 50  $\mu$ m



Stratum  
radiatum

(Stratum  
lucidum)

Stratum  
pyramidale

Stratum  
oriens

Abb.3.7: Dieser semi-dünn Schnitt zeigt die Hippocampusregion CA3 von *Tupaia belangeri* mit den Schichten Stratum pyramidale, radiatum und oriens. Stratum lucidum ist nur im Durchlicht zu erkennen. Die Pyramidenneurone liegen weiter verstreut als in CA1 (s. Abb. 3.6.) Im gleichen Anschnitt der längs angeschnittenen apicalen dendritischen Schäfte der Pyramidenneurone erscheint die Stratum pyramidale breiter während wegen der größeren Somata und Abstände zwischen den Zellen weniger Zellkerne eine ovale Form mit einem zentral gelegenen, großflächigen Nucleolus aufweisen. Eichstrich 50  $\mu$ m



### 3.3. Streßeffekte auf lichtmikroskopischer Ebene

Im Bereich lichtmikroskopischer Vergrößerung stellen sich alle Schnitte von gestreßten und ungestreßten Tieren als gleichmäßig und in der selben Intensität mit Methyleneblau-Azur II gefärbt dar. Eine Analyse der Farbtintensität mit Hilfe der gemessenen optischen Dichte von Nucleoli, Cytoplasma und vereinzelter Mikroglia zeigte für  $p \leq 0,05$  keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen von Kontroll- und Streßtieren.

Nach 28 Tagen psychosozialem Streß konnte jedoch für die Pyramidenneurone in CA3 ein signifikanter Unterschied ( $p < 0,001$ ) in dem Verhältnis der optischen Dichte des Nucleoplasma zum Cytoplasma festgestellt werden (Abb 3.8). In Pyramidenneuronen der Region CA1 waren nach vier Wochen chronisch psychosozialem Streß keine signifikanten Unterschiede in dem Verhältnis der optischen Dichte des Nucleoplasma zum Cytoplasma detektierbar ( $p = 0,307$ ; Abb. 3.8).

Bei einem Individuum der Kontrollgruppe wurde in der Region CA1 ein hyperchromatisches Pyramideneuron ("dark neuron") beobachtet, welches in Cyto- und Nucleoplasma sehr stark Nissl gefärbt war.

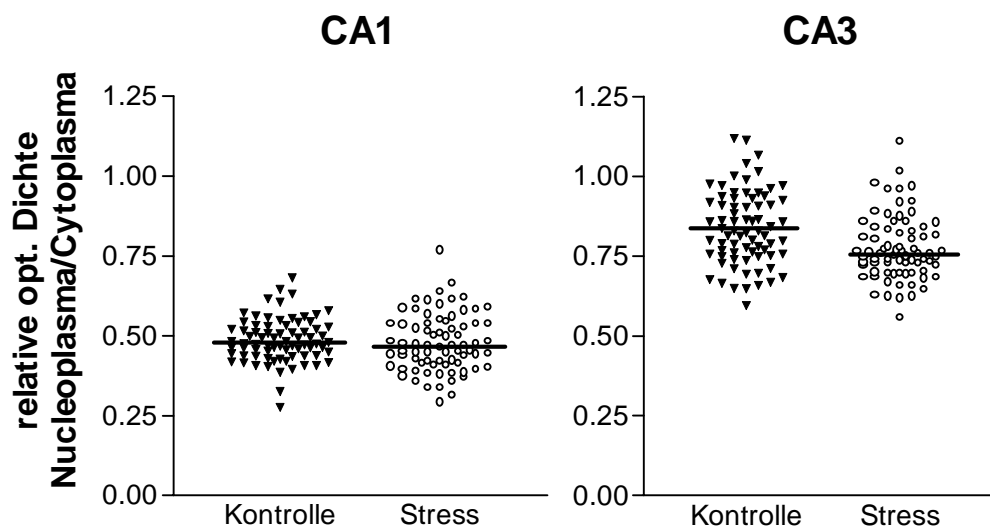


Abb 3.8: Graphische Darstellung der relativen optischen Dichte des Nucleoplasma im Verhältnis zum Cytoplasma von Pyramidenzellen des Hippocampus. Die linke Graphik zeigt die Einzelwerte der Kontrollgruppe (n=3; schwarze Dreiecke) und der Streßgruppe (n=3; helle Kreise) aus der Region CA1, die rechte Graphik entsprechend aus der Region CA3. Der Median ist mit einem Querstrich gekennzeichnet.

## 3.4. Ultrastruktur der Pyramidenneurone und deren Zellkerne

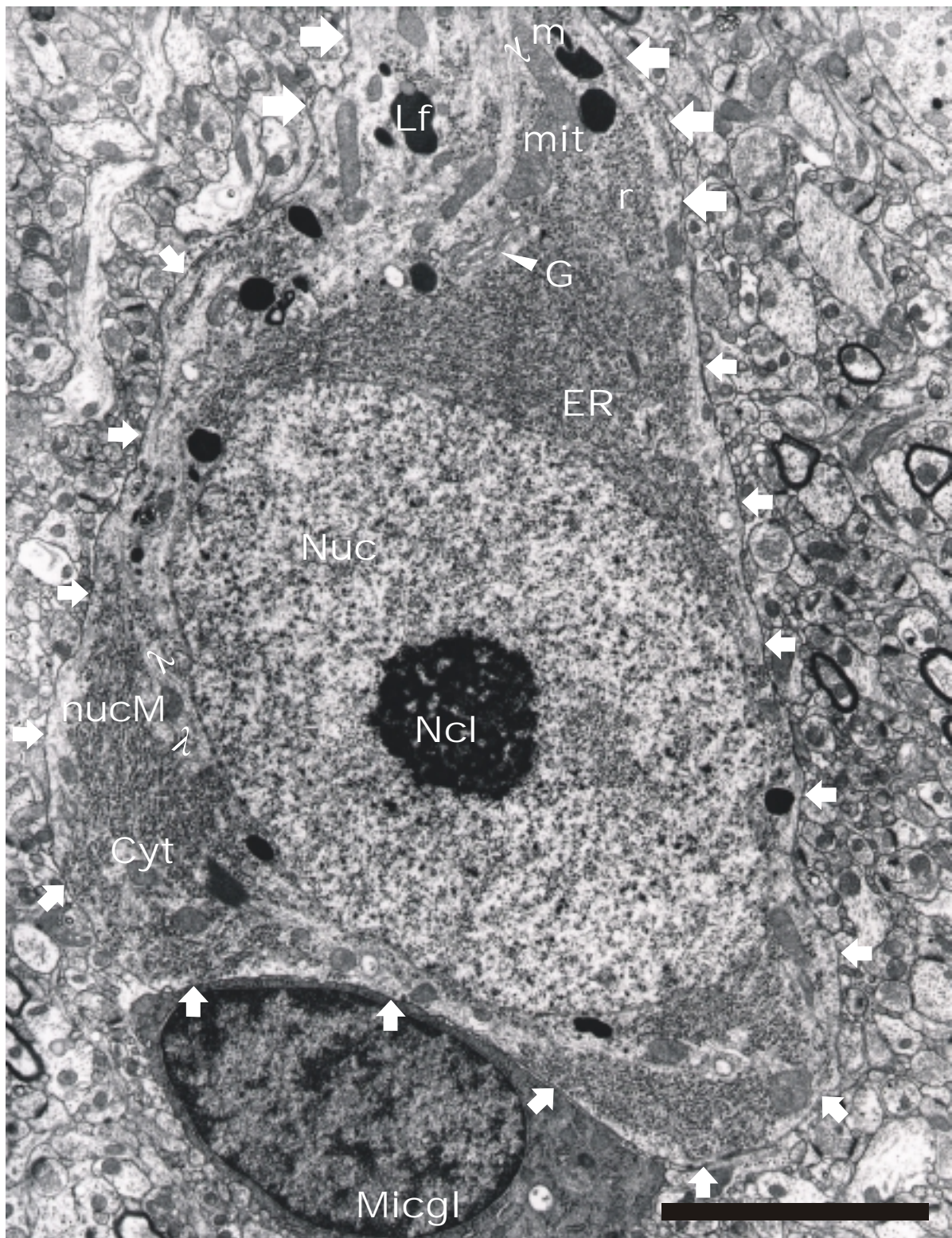


Abb.3.9: Elektronenmikroskopische Photographie eines Perikaryon einer Pyramidenzelle der Region CA1 eines unbehandelten Kontrolltieres. Die Zellmembran ist durch Pfeile gekennzeichnet. Der durch die Nucleusmembran (nucM) zum Cytoplasma (Cyt) abgegrenzte Nucleus (Nuc) füllt den Großteil des Perikaryon. Der Nucleus enthält eine relativ>

Die der Pyramidenzellschicht namensgebenden großen Pyramidenneurone (Abb.3.9) zeichnen sich durch einen besonders voluminösen Zellkern aus, der von vergleichsweise wenig Cytoplasma umgeben ist. Im Cytoplasma sind u.a. leicht rauhes endoplasmatisches Retikulum, freie Ribosomen, Mitochondrien, Golgi-apparate und Lipofuscingranulae deutlich erkennbar. Der meist ovioide, zentrale Nucleus enthält gleichmäßig strukturiertes, klares und wenig elektronendichtes Chromatin, welches vorwiegend aus Euchromatin besteht und lediglich bei einigen Zellen kleine Aggregationen von Heterochromatin aufweist. Zusammengenommen mit einem zentral im Nucleus plazierten großen und komplexen Nucleolus kennzeichnet dies typischerweise Nervenzellen, die sehr aktiv in der Ribosomenproduktion sind (Schwarzacher und Wachtler, 1993). Außerdem sind im Euchromatin der Neurone kleinere dunkle Strukturen der nuklearen Protein Matrix zu erkennen, z.B. interchromatine und perichromatine Körnchen im Größenbereich von nm. Diese enthalten nach allgemeiner Erkenntnis phosphorylierte Proteine bzw. wahrscheinlich stabile RNA (Ghadially, 1988).

Wie es typisch ist für voluminöse Zellkerne haben viele Pyramidenneurone aus CA1 und CA3 Invaginationen der Zellkernmembran (Abb.3.10), die angesichts der Dünne der Schnitte jedoch nicht in jeder Schnittebene erkennbar sind.

---

> gleichmäßige, helle Dispersion an Chromatinfilamenten und einen großen dichten Nucleolus (Ncl). Vom Zellkörper ausgehend sind dendritische Schafte (s. vergrößerte Pfeile) sichtbar, an deren Basis im Cytoplasma viel rauhes Endoplasmatisches Retikulum (ER), Elemente des Golgiapparates (G), Mitochondria (mit), geclusterte freie Ribosomen (r; Polysomen), Microtubuli (m) und Lipofuscin Granulae (Lf) zu erkennen sind. Im unteren Teil des Bildes liegt eine elektronendichte, d.h. dunkel erscheinende Microgliazelle (Micgl) mit ihrem vom Cytoplasma umgebenen Zellkern perineuronal an der Pyramidenzelle. x 9450; Eichstrich 5µm



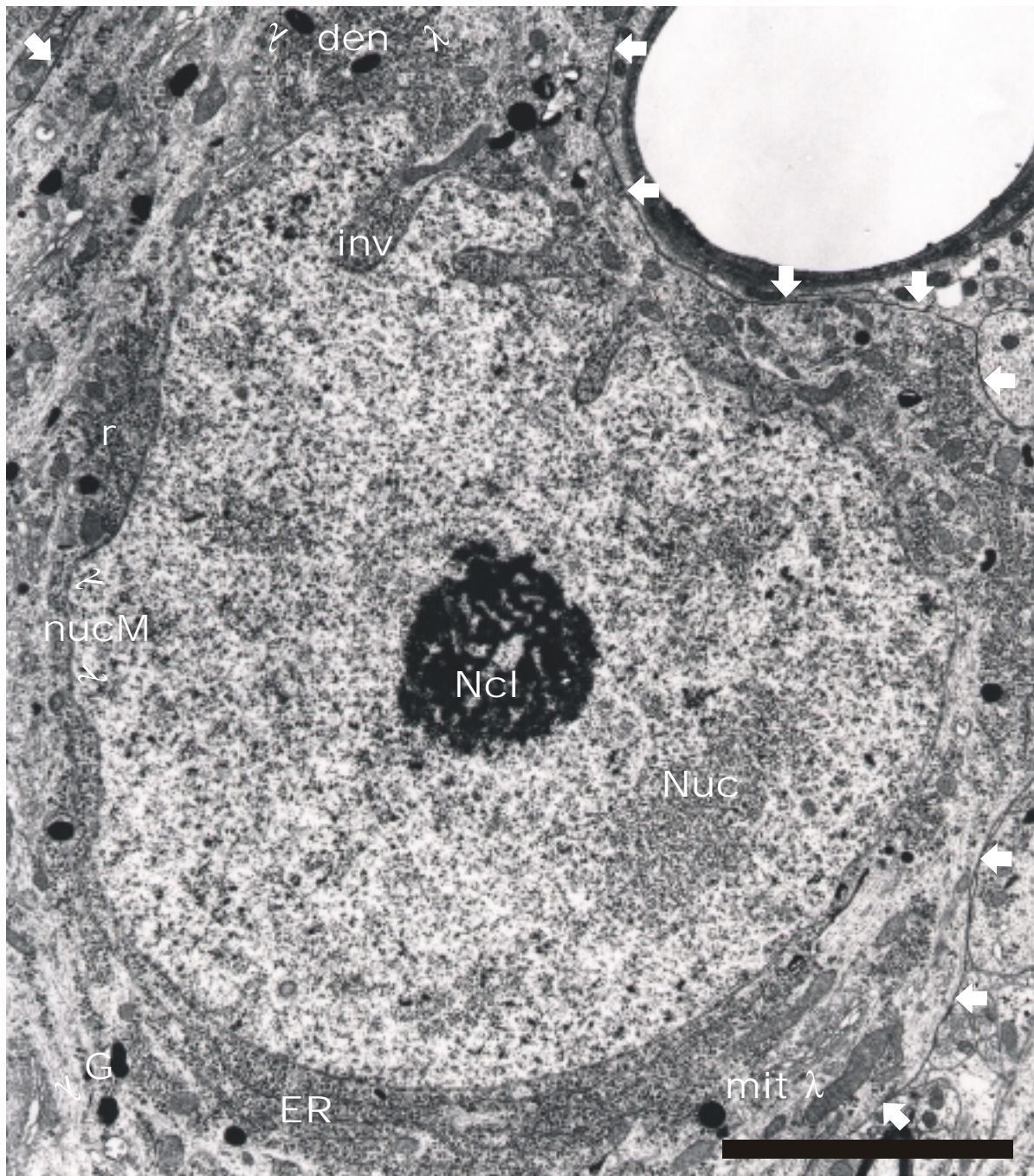


Abb.3.10: Elektronenmikroskopische Photographie eines Pyramidenneuron der Region CA3 eines unbehandelten Kontrolltieres. Die Zellmembran des Perikaryons, welches zum überwiegenden Teil aus dem Nucleus (Nuc) besteht, ist mit Pfeilen gekennzeichnet. Die Nucleusmembran (nucM) ist vorwiegend gleichmäßig, zeigt aber an der Basis des apicalen Dendriten (den) die für große Nuclei mit einem zentral gelegenen großen Nucleolus (Ncl) typischen Invaginationen (inv). Um den gleichmäßig hellen euchromatinergen Nucleus (Nuc) liegt vorwiegend rauhes Endoplasmatisches Reticulum (ER) und zu Polysomen angeordnete freie Ribosomen (r), die zusätzlich die Invaginationen füllen. In der rechten oberen Bildecke ist ein von einer Endothelialzelle umgebenes Blutgefäß zu erkennen. Golgi Apparat (G), Mitochondrium (mit) x 9450; Eichstrich 5µm



## 3.5. Einfluß von Streß und Cortisol auf die Ultrastruktur

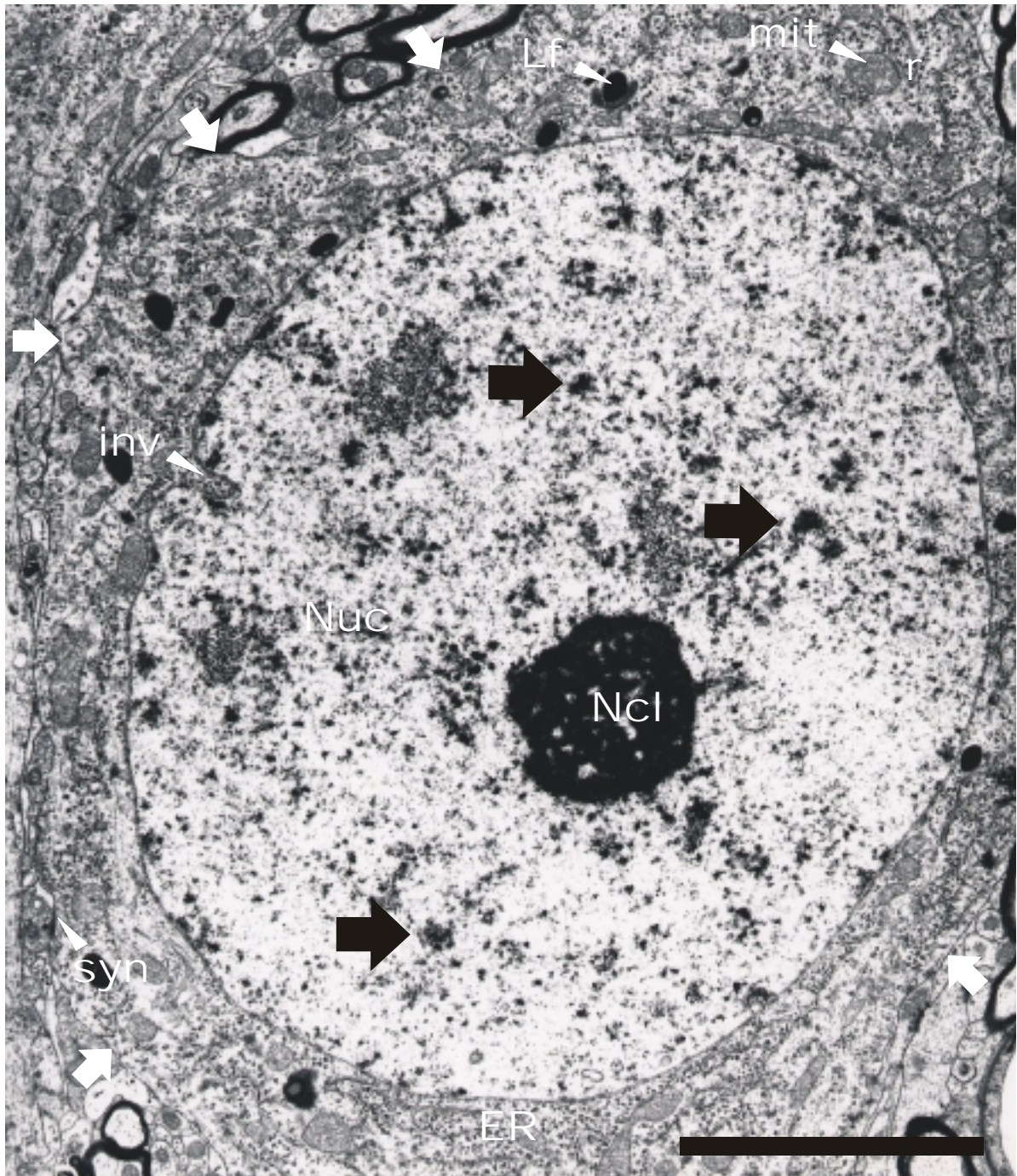


Abb. 3.11: Elektronenmikroskopische Photographie eines Pyramidenneuronperikaryon der Region CA3 eines 28 Tage psychosozial gestreßten Tupaia. Die Nucleusmembran (NucM) ist teilweise invaginiert (inv). Der größte Teil des Zellkörpers ist eingenommen vom Nucleus (Nuc), der vermehrt Aggregationen von Heterochromatin (s. schwarze Pfeile) zeigt. Zu beachten wäre weiterhin der synaptische Kontakt (syn) mit der Zellmembran der Pyramidenzelle am linken unteren Bildrand. Lipofuscin Granulum (Lf), Mitochondrium (mit); x 9450; Eichstrich 5µm

Nach 28 Tagen psychosozialen Streß verändert sich die Ultrastruktur der Nuclei der Pyramidenneurone in CA3. Anstatt des gleichmäßig verteilten, blassen Chromatins der Pyramidenneurone der Kontrolltiere (Abb 3.10 u. 3.12a) zeigt sich bei den gestreßten Tieren in CA3 eine heterogene Chromatinstruktur mit vermehrten kleineren ( $>1\mu\text{m}^2$ ) Heterochromatinaggregationen, die im Querschnitt über den gesamten Nucleus verteilt waren (Abb.3.11 u. 3.12b). Die Varianzanalyse ergab einen signifikanten Effekt für die relative Anzahl ( $F_{2,12}=4,02$ ;  $p=0,046$ ) und die relative Gesamtfläche ( $F_{2,12}=4,28$ ;  $p=0,039$ ) der Heterochromatinaggregate in CA3. Zwischen den Gruppen der gestreßten Tiere und der Kontrolltiere in CA3 zeigte sich in der relativen Anzahl und der relativen Gesamtfläche der Heterochromatinaggregate ein signifikanter Unterschied ( $p<0,001$ ; Abb.3.14 u. 3.15).

In Nuclei der CA3 Pyramidenneurone von 28 Tage lang mit Cortisol-behandelten Tieren wurde ebenso ein nicht-homogenes Chromatin mit einer Tendenz zu mehr Heterochromatinaggregaten festgestellt (Abb.3.12c). Eine quantitative Analyse der Anzahl und Fläche der Heterochromatinaggregate ergab jedoch keine signifikanten Unterschiede zu den Kontrollen (Abb 3.14 u. 3.15).



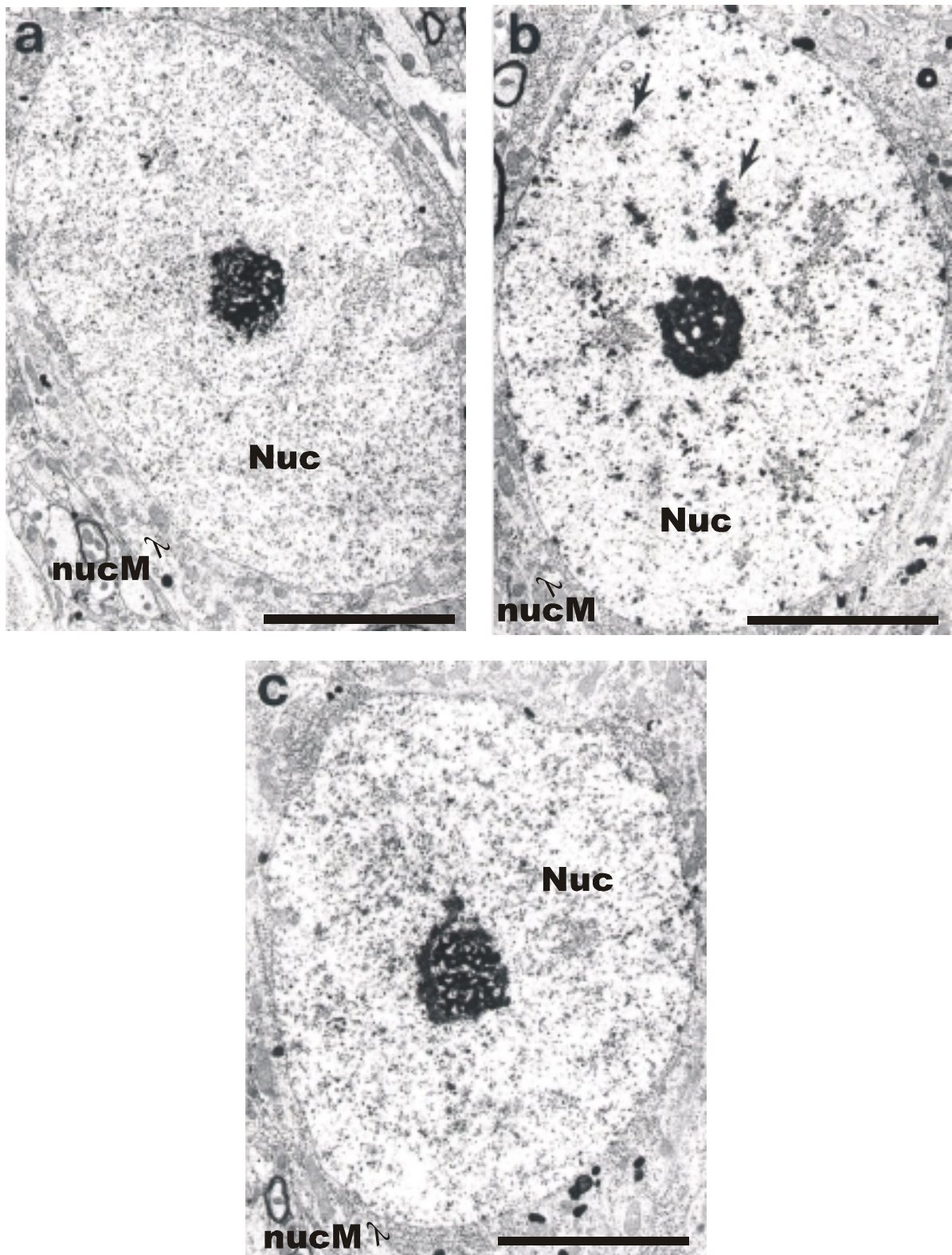


Abb. 3.12: Elektronenmikroskopische Bilder von Pyramidenzellnuclei der Hippocampusregion CA3 eines Kontrolltieres (a), eines psychosozial gestreßten (b) und eines Cortisol behandelten Tupaia (c). Pfeile kennzeichnen Heterochromatinaggregationen, Nucleusmembran (nucM), Nucleus (Nuc). Zu beachten ist das homogene Chromatin in Nuclei von Kontrolltieren und die größere Anzahl an Heterochromatinaggregaten in Nuclei von gestreßten Tieren. x 7250, Eichstrich 5 $\mu$ m

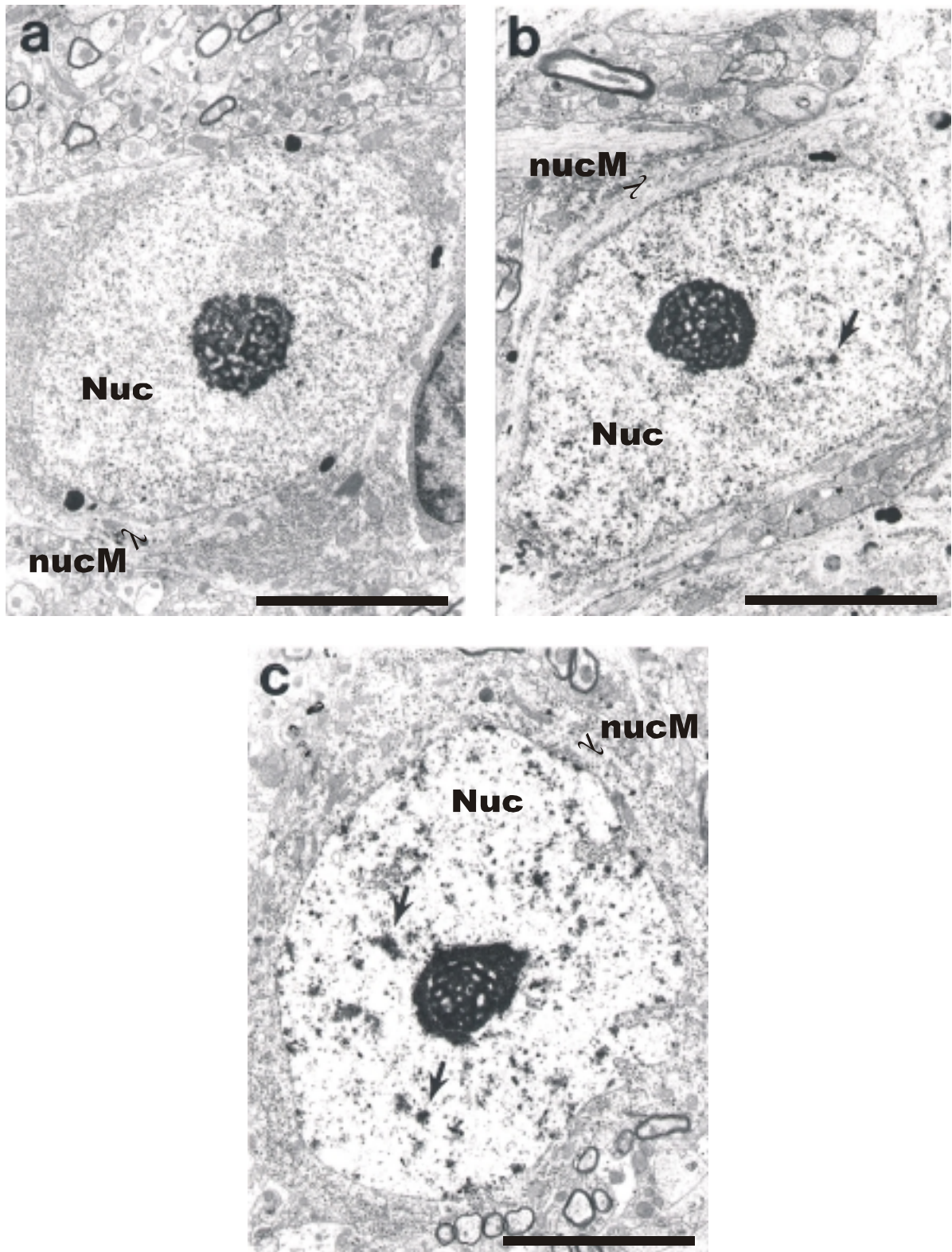


Abb. 3.13: Elektronenmikroskopische Bilder von Pyramidenzellnuclei der Hippocampusregion CA1 eines Kontrolltieres (a), eines psychosozial gestreßten (b) und eines Cortisol behandelten Tupaia (c). Pfeile kennzeichnen Heterochromatinaggregationen, Nucleusmembran (nucM), Nucleus (Nuc). Zu beachten ist das homogene Chromatin in Nuclei von Kontrolltieren und die größere Anzahl an Heterochromatinaggregaten in Nuclei von Cortisol behandelten Tupaia. x 7250, Eichstrich 5µm



Die Varianzanalyse für CA1 ergab einen signifikanten Effekt für die relative Anzahl ( $F_{2,12} = 3,98$ ;  $p = 0,047$ ) und die relative Gesamtfläche ( $F_{2,12} = 3,95$ ;  $p = 0,048$ ) der Heterochromatinaggregate. In Pyramidenneuronen der Hippocampusregion CA1 (Abb.3.13abc) ist nach 28 Tagen psychosozialem Streß im Vergleich zur Kontrollgruppe keine signifikante Änderung in der relativen Anzahl und Fläche von Heterochromatinaggregaten, die größer als  $1\mu\text{m}^2$  sind, festzustellen (Abb 3.14 u. 3.15 ). Jedoch wurde in Cortisol-behandelten Tieren eine signifikant größere Anzahl und Fläche von Heterochromatinaggregaten im Vergleich zu Kontrolltieren und Streßtieren ermittelt ( $p < 0,001$ ; Abb 3.14 u. 3.15).

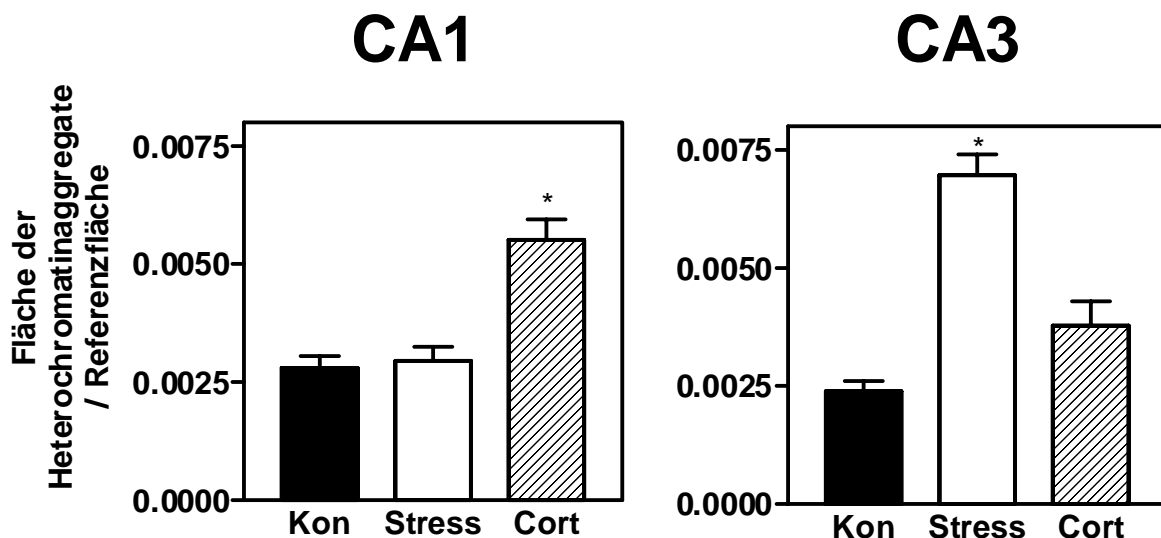


Abb. 3.14: Gesamtfläche aller Heterochromatinaggregationen pro Pyramidenzellnucleus der Hippocampusregionen CA1 und CA3. Die Daten sind angegeben in Mittelwert  $\pm$  SEM ( $p \leq 0,001$ ) in Fläche pro Referenzfläche. Zu beachten ist, daß bei Cortisol (Cort) behandelten Tupaia die Fläche der Heterochromatinaggregate signifikant größer ist als bei gestreßten und ungestreßten Tieren (Kon), wohingegen in CA3 die gestreßten Tupaia eine größeren relative Fläche belegen. (\*  $p \leq 0,001$ )

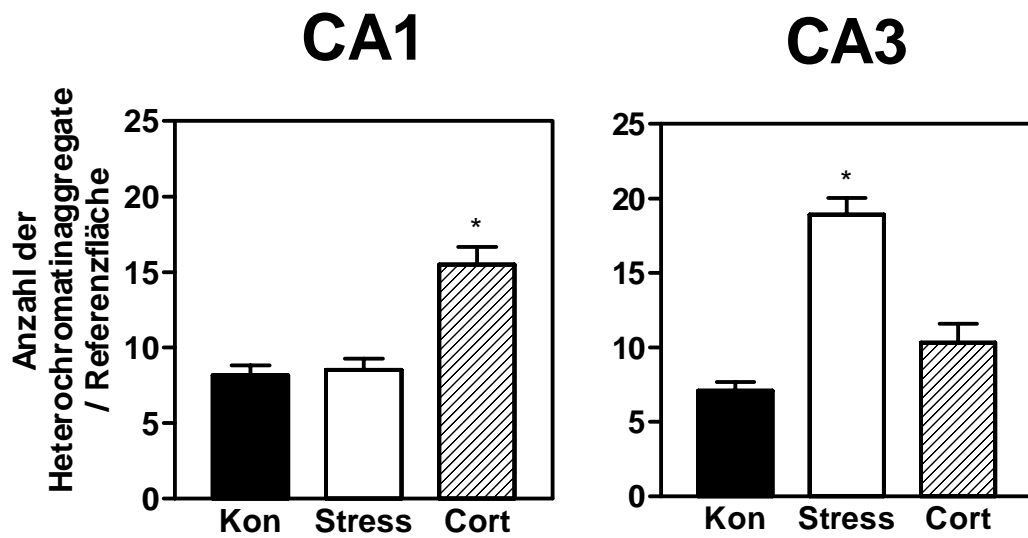


Abb. 3.15: Relative Anzahl der Heterochromatinaggregationen in Nuclei von Pyramidenzellen der Hippocampusregionen CA1 und CA3 (in Zahl pro Referenzfläche). Zu beachten ist in CA1, daß die Cortisol (Cort) behandelten Tiere signifikant mehr Heterochromatinaggregate als Kontrollen (Kon) und gestreßte Tiere haben, wohingegen in CA3 die gestreßten Tupaia mehr Heterochromatinaggregate vorweisen. Die Daten sind angegeben in Mittelwert  $\pm$  SEM (\*  $p \leq 0,001$ )

### 3.6. Zellzahl des Hippocampus

Durch die Einbettung in Glycolmethacrylat blieb die dreidimensionale Struktur aller Schnitte sehr gut erhalten und führte somit zu einer geringen Schwankung in der Schnittdicke von  $23,7 \pm 2,0 \mu\text{m}$  (Mittelwert  $\pm$  SD). Für das Zählschema mit dem "optical fractionator" wurden im Hippocampus von adulten Tupaia folgende Parameter als optimiert angesehen (s.a. Abb. 2.2 und 2.3):

Die Fläche des "optical disector" [a(frame)] ist in CA1 mit  $361 \mu\text{m}^2$ , in CA3 mit  $506 \mu\text{m}^2$  und im Gyrus dentatus (GD) mit  $110 \mu\text{m}^2$  optimiert. Der Abstand der "optical disector" Positionen zueinander in der x und y Richtung [A (xy step)] betragen dabei  $250 \times 250 \mu\text{m}$  für CA1,  $300 \times 300 \mu\text{m}$  für Ca3 und  $320 \times 320 \mu\text{m}$  für den GD. Damit wurden z.B. in CA3 im Schnitt 175 Zellen gezählt. Im GD wurden wegen der schon anatomisch sichtbaren relativ hohen intraindividuellen Variabilität der Schnitte in der Regel über 200 Zellen gezählt, was zu einem durchschnittlichen intra-individuellem Fehlerkoeffizienten (CE) von 0,064 führte.

Eine Beispielkalkulation der Zellzahl und des CE für eine Subregion eines Individuums verdeutlicht die Tabelle 1.

Tabelle 1:

Beispielkalkulation der Summe der gezählten Neurone ( $\Sigma Q^-$ ), der Schätzung der unilateralen Gesamtzellzahl pro Tier (N) und des intraindividuellen Fehlerkoeffizienten (CE = Fehlerkoeffizient) in der Region CA3 eines Kontrolltieres. h = 15 $\mu$ m, x und y Schritte: 230x230 $\mu$ m, a(frame): 520 $\mu$ m<sup>2</sup>, mittlere Schnittdicke (bei diesem Tier): 25,1475 $\mu$ m, auf jedem 6. Schnitt wurde gezählt.

k	Schnitt Nr.	$Q^-$	Anzahl per Disector	$(Q^-)^2$	$Q^- \times Q^-_{k+1}$	$Q^- \times Q^-_{k+2}$
1	4	0	0	0	0	0
2	10	3	1, 2	9	39	30
3	16	13	2, 1, 1, 1, 2, 3, 2, 1	169	130	247
4	22	10	1, 1, 1, 2, 1, 2, 1, 1	100	190	450
5	28	19	1, 1, 3, 1, 0, 1, etc.	361	855	741
6	34	45		2025	1755	1395
7	40	39		1521	1209	1638
8	46	31		961	1302	775
9	52	42		1764	1050	756
10	58	25		625	450	475
11	64	18		324	342	234
12	70	19		361	247	228
13	76	13		169	156	156
14	82	12		144	144	48
15	88	12		144	48	72
16	94	4		16	24	8
17	100	6		36	12	-
18	106	2		4	-	-
$\Sigma$		313		8733	7953	7253

$$N = \Sigma Q^- \times \frac{1}{\text{ssf}} \times \frac{1}{\text{asf}} \times \frac{1}{\text{tsf}} \Rightarrow N = 313 \times \frac{1}{1/6} \times \frac{1}{520/230 \times 230} \times \frac{1}{15/25.1475} = 320296$$

Der CE errechnet sich nach Gundersen et al., 1999 anhand folgender Formel:

$$CE = \frac{\sqrt{[3 * [\Sigma (Q^-)^2 - \Sigma Q^-] + (\Sigma Q^- * Q^-_{k+1}) - 4 * (\Sigma Q^- * Q^-_{k+2})]} / 240 + \Sigma Q^-}{\Sigma Q^-}$$

So ist für dieses Beispiel der CE:

$$CE = \frac{\sqrt{[3 \times (8733 - 313) + 7953 - 4 \times 7253]/240 + 313}}{313} = 0.058$$

Die geschätzte Anzahl an Pyramidenneuronen im linken Hippocampus der Subregion CA1 der einzelnen Tiere ist in Tabelle 2 aufgeführt und betrug durchschnittlich 345369 Neurone in der Kontrollgruppe (n=8) und 370783 Neurone in der Streßgruppe (n=7). Der CE war entsprechend 0,064 und 0,062. Die Region CA3 umfaßte etwas weniger Zellen (Tabelle 3), durchschnittlich 243547 Neurone bei Kontrolltieren und 237340 Neurone bei gestreßten Tupaias. Der CE war mit 0,071 und 0,068 leicht höher. Im GD wurden 2010705 Neurone als Durchschnittswert in der Kontrollgruppe und 2121036 Neurone in der Streßgruppe ermittelt (Tabelle 4). Daraus resultierte ein CE von 0,063 bzw. 0,065.

Eine statistische Analyse der Daten zeigte für eine Irrtumswahrscheinlichkeit von  $p \leq 0.05$  keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen in CA1 ( $p = 0,507$ ), CA3 ( $p = 0,373$ ) und im GD ( $p = 0,728$ ). Der CV betrug 0,20 für CA1 und 0,16 in CA3. Im GD lag er in der Gruppe der Kontrolltiere bei 0,15 und war in der Gruppe der gestreßten Tiere mit 0,38 vergleichsweise hoch. Bei einer theoretischen Annahme von Unterschieden zwischen den Gruppen wäre unter den gegebenen Versuchsbedingungen, Varianzen etc. und unter Zugrundelegung des Zweistichproben-t-Tests für unabhängige Zufallsstichproben ein prozentualer Unterschied von 22,5% in CA1, 18,7% in CA3 und 32,4% im GD detektierbar gewesen.

Tabelle 2:

Zahl der Pyramidenneurone (unilateral links) in der hippocampalen Subregion CA1 von chronisch psychosozial gestreßten Tieren und Kontrolltieren: Neuronenzahl (N) und Mittelwert der Gruppen, Standardabweichung (SD) und individueller und mittlerer CE. Der  $BCV^2$  errechnet sich aus dem  $CE^2$  und  $CV^2$  ( $CE$  = Fehlerkoeffizient;  $CV$  = Koeffizient der interindividuellen Varianz;  $BCV$  = biologischer Koeffizient der interindividuellen Varianz).  $p = 0,507$  (t-Test,  $p \leq 0,05$ ). Die kursiv geschriebenen Zahlen wurden vorab veröffentlicht (Vollmann-Honsdorf et al. 1997).

<b>Kontrolle</b>	<b>N (CA1)</b>	<b>CE</b>	<b>Streß</b>	<b>N (CA1)</b>	<b>CE</b>
1	313221	0.063	1	242602	0.073
2	296999	0.068	2	330136	0.064
3	329268	0.063	3	344070	0.061
4	262622	0.071	4	390937	0.063
5	412470	0.061	5	402570	0.052
6	324973	0.069	6	423360	0.061
7	488943	0.061	7	461806	0.058
8	334455	0.056			
<b>Mittelwert</b>	<b>345369</b>	<b>0.064*</b>		<b>370783</b>	<b>0.062*</b>
<b>SD</b>	<b>71844</b>			<b>72183</b>	
CV (=SD/Mittelwert)	0.20802			0.19468	
$CV^2 =$	0.04327			0.03790	
$CE^2 =$	0.00410			0.00384	
$BCV^2 =$	0.03917			0.03406	
<b><math>BCV^2</math> (in % of <math>CV^2</math>) <math>\approx</math></b>	<b>90.52%</b>			<b>89.87%</b>	
<b><math>CE^2</math> (in % of <math>CV^2</math>) <math>\approx</math></b>	<b>9.48%</b>			<b>10.13%</b>	

\* Der mittlere CE errechnet sich aus  $\sqrt{\text{Mittelwert} \sum CE^2}$

Tabelle 3:

Zahl der Pyramidenneurone (unilateral links) in der hippocampalen Subregion CA3 von chronisch psychosozial gestreßten Tieren und Kontrolltieren; Einzelheiten der Beschriftung siehe Tabelle 2;  $p = 0,373$  (t-Test,  $p \leq 0,05$ ).

	<b>Kontrolle</b>	<b>N (CA3)</b>	<b>CE</b>		<b>Streß</b>	<b>N (CA3)</b>	<b>CE</b>
	1	202974	0.081		1	211649	0.082
	2	242265	0.078		2	193064	0.084
	3	192201	0.082		3	228802	0.061
	4	223396	0.066		4	245807	0.067
	5	223156	0.067		5	274764	0.052
	6	320296	0.058		6	232950	0.067
	7	310022	0.064		7	274342	0.063
	8	234063	0.072				
	<b>Mittelwert</b>	<b>243547</b>	<b>0.071*</b>		<b>237340</b>	<b>0.068*</b>	
	<b>SD</b>	<b>47064</b>			<b>30425</b>		
	CV (=SD/Mittelwert)	0.19324			0.12819		
	CV <sup>2</sup> =	0.03734			0.01643		
	CE <sup>2</sup> =	0.00504			0.00462		
	BCV <sup>2</sup> =	0.03230			0.01181		
	<b>BCV<sup>2</sup> ≈</b>	<b>86.50%</b>			<b>71.88%</b>		
	<b>CE<sup>2</sup> ≈</b>	<b>13.50%</b>			<b>28.12%</b>		

\* Der mittlere CE errechnet sich aus  $\sqrt{\text{Mittelwert} \sum \text{CE}^2}$

Tabelle 4:

Zahl der Körnerzellen (unilateral links) des Gyrus dentatus von psychosozial gestreßten Tieren und Kontrolltieren; Details der Legende siehe Tabelle 2;  $p = 0,7276$  (t-Test,  $p \leq 0,05$ ).

	<b>Kontrolle</b>	<b>N (GD)</b>	<b>CE</b>		<b>Streß</b>	<b>N (GD)</b>	<b>CE</b>
	1	1844720	0.063		1	1026173	0.083
	2	1420288	0.069		2	1761280	0.063
	3	2064384	0.058		3	1440427	0.07
	4	1746479	0.064		4	1867385	0.066
	5	2324393	0.061		5	3188069	0.058
	6	2114192	0.05		6	2981888	0.055
	7	2233995	0.07		7	2582031	0.059
	8	2337185	0.066				
<b>Mittelwert</b>		<b>2010705</b>	<b>0.063*</b>			<b>2121036</b>	<b>0.065*</b>
<b>SD</b>		<b>31943</b>				<b>81117</b>	
CV (=SD/Mittelwert)		0.15888				0.38243	
CV <sup>2</sup> =		0.03734				0.14626	
CE <sup>2</sup> =		0.00397				0.00423	
BCV <sup>2</sup> =		0.03337				0.14203	
<b>BCV<sup>2</sup> ≈</b>		<b>86.50%</b>				<b>97,1%</b>	
<b>CE<sup>2</sup> ≈</b>		<b>13.50%</b>				<b>2,89%</b>	

\* Der mittlere CE errechnet sich aus  $\sqrt{\text{Mittelwert} \sum \text{CE}^2}$

### 3.7. "in situ-end labeling" (ISEL)

Isolierte, ISEL positive Zellen mit deutlichen apoptotischen Merkmalen wurden in den in 2.8.3. aufgeführten quantifizierten Substrukturen bei jedem der gestreßten und ungestreßten Tupaia detektiert (s.a. Abb. 3.6 u. 3.7). Keine nekrotischen oder unspezifisch gefärbten Zellen konnten beobachtet werden. Alle ISEL positiven Zellen zeigten die Charakteristika apoptotischen Zelltods, wie eine Zell-Schrumpfung im Vergleich zu benachbarten, intakten Zellen (Abb 3.16). Chromatin-Kondensation zu einer dichten, runden Masse und/oder das Auftreten von "apoptotic bodies" (Abb. 3.16). Insgesamt wurden nur 2 gliähnliche ISEL positive Strukturen detektiert. Eine DAB-Färbung der Gehirnschnitte von Tupaia oder der positiven Kontrollen war nicht sichtbar, wenn das TdT Enzym weggelassen wurde.

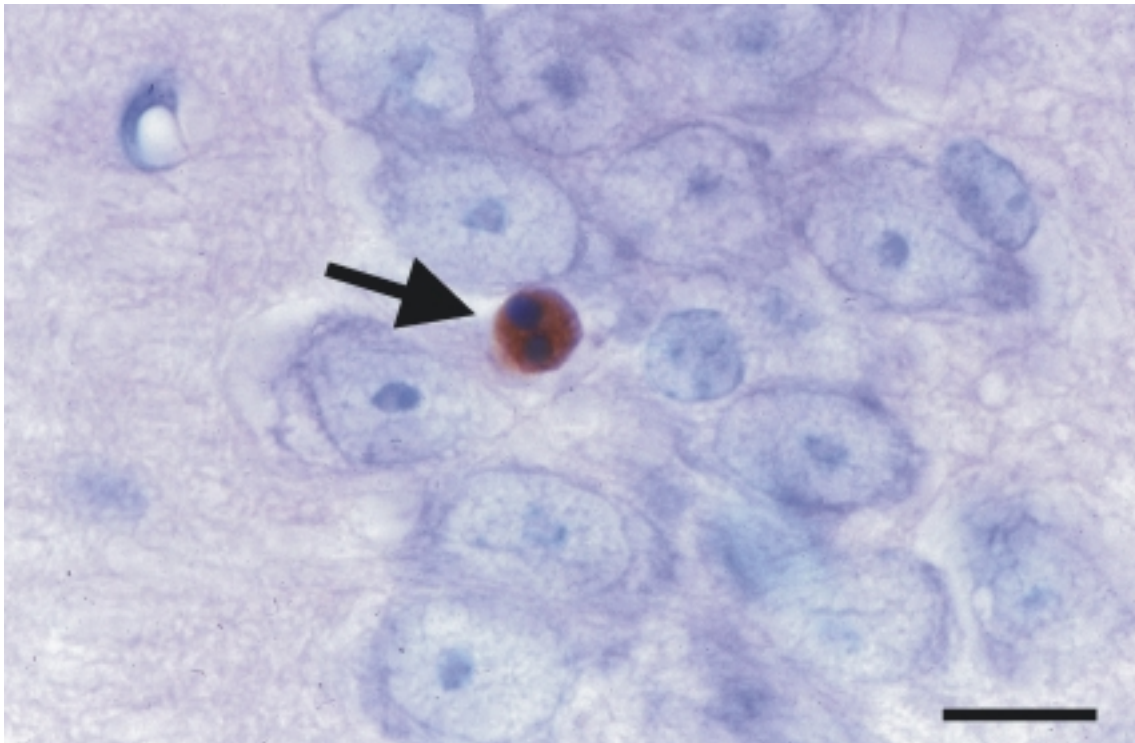


Abb. 3.16: Photographie einer repräsentativen ISEL-positiven apoptotischen Zelle (s. Pfeil), wie sie in den verschiedenen Subregionen des Hippocampus und Cortex gefunden wurde. Zu beachten ist das klar braune DAB-Prezipitat zusammen mit den charakteristischen apoptotischen, morphologischen Merkmalen der Zell-Schrumpfung (s. Größe und Form der benachbarten Zellen) und des Auftretens von "apoptotic bodies"; Eichstrich 15µm.

Pro gesamten Hippocampus wurden durchschnittlich 3-4 ISEL positive Zellen gezählt, höchstens jedoch 16. Auch in Schichten des Hippocampus in denen nicht



viele Somata lokalisiert sind, wie z.B. der Stratum radiatum, waren ISEL positive Zellen sichtbar. Die durchschnittliche Anzahl ISEL positiver Zellen pro Tier in einzelnen Schichten und Regionen sowie im entorhinalen Cortex und in der gesamten Hippocampusformation sind in Abbildung 3.17 aufgeführt.

Der entorhinale Cortex zeigt eine signifikante Erhöhung in der mittleren Anzahl ISEL positiver Zellen bei chronisch psychosozial gestressten Tupaia im Vergleich zu den Tieren der Kontrollgruppe ( $p < 0,04$ ; Abb. 3.17B). In der Schnittebene A 2.0-3.0 (Tigges und Shanta, 1969) waren apoptotische Zellen im Vergleich zum Hippocampus generell häufiger sichtbar. In CA1 Stratum radiatum wurde eine signifikante Verminderung an ISEL positiven Zellen festgestellt, während im Hilus ein signifikanter Anstieg zu verzeichnen war ( $p < 0,04$ ; Abb. 3.17C). In den anderen Teilen des Hippocampus waren keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen festzustellen. Nimmt man alle hippocampalen Subregionen zusammen, so waren signifikant weniger ISEL positive Zellen in der chronisch gestressten Gruppe im Vergleich zu der Kontrollgruppe zu finden ( $p < 0,04$ ; Abb. 3.17A).

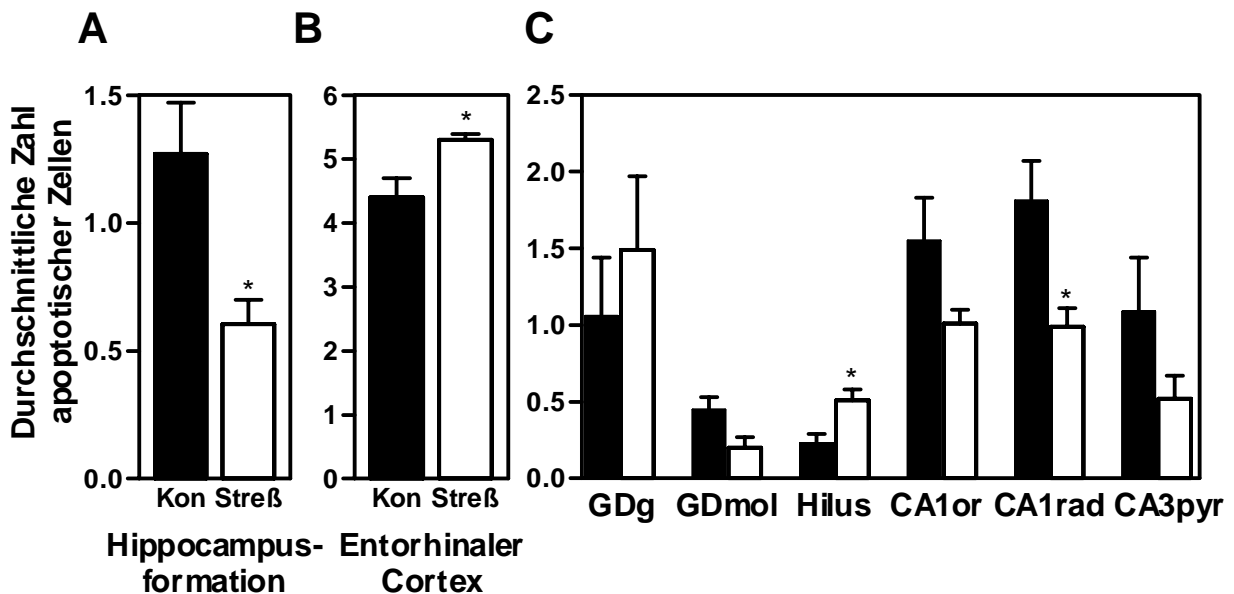


Abb.3.17: Durchschnittliche Anzahl apoptotischer Zellen im gesamten Hippocampus (A), im entorhinalen Cortex (B) und in den verschiedenen Subregionen des Hippocampus (C) von Kontrolltieren (schwarz; Kon) und von chronisch psychosozial gestressten Tieren (weiß; Streß). GDg: Körnerzellschicht des Gyrus dentatus; Gdmol: Stratum molekulare des Gyrus dentatus; CA: Cornu ammonis; or: Stratum oriens; rad: Stratum radiatum; Pyr: Stratum pyramidale. \*  $p < 0,04$

## 4. DISKUSSION

### 4.1. Das psychosoziale Streßmodell von Tupaia

Psychischer Streß beim Menschen ist gekennzeichnet durch eine Mehrzahl wiederkehrender bzw. chronischer Symptome. Dazu gehören Veränderungen der circadianen Aktivitätsmuster, Schlaf- und Eßstörungen oder psychomotorische Auffälligkeiten des Verhaltens, sowie bei einer Mehrzahl der Patienten eine chronisch erhöhte Glucocorticoidausschüttung oder eine gestörte Herzschlagfrequenz (Sachar et al., 1973; Dubrovsky, 1993, Kolb and Wishaw, 1993). Verschiedene Tiermodelle bei Ratten und Mäusen haben in der Vergangenheit zu wichtigen Erkenntnissen bei chronischem und/oder sozialem Streß geführt. Sie berücksichtigen jedoch häufig nur einen Teil der Symptomatik psychischen Stresses beim Menschen. So haben einige der im Tier-Versuch verwendeten Stressoren, wie eine Vielzahl physischer Stressoren, wenig bis keine Relevanz zur Biologie der Tiere und aktivieren vermutlich andere neuronale Systeme (Sgoifo et al., 1997; Herman und Cullinan, 1997). Einige Stressoren verursachen z.B. vorwiegend Schmerz und aktivieren das Opioid-System (McEwen and Sapolsky, 1995). Demnach sind auf physischen Streß basierende Untersuchungen in ihrer Aussagekraft als Modell für Auswirkungen psychischen Stresses beim Menschen kritisch zu betrachten.

Ein Modell für psychosozialen Streß ist das männlicher *Tupaia belangeri*, deren ausgeprägte Territorialität auch unter kontrollierten Laborbedingungen über einen längeren Zeitraum für das artspezifische Streßparadigma genutzt werden kann: Die Koexistenz zweier Männchen führt zu einer stabilen dominanten-subordinaten Beziehung, bei der der Unterlegene allein durch visuellen und geruchlichen Kontakt streßinduzierte Veränderungen des Verhaltens, der Physiologie und des zentralen Nervensystems zeigt. Diese Veränderungen sind den Symptomen der Depression beim Menschen ähnlich (Aue, 1988; Fuchs et al., 1996; Fuchs und Flügge, 1998; Kramer et al., 1999). Bei dominanten Tieren können im Gegensatz dazu keine nennenswerten Änderungen des Verhaltens oder der Physiologie beobachtet werden (Aue, 1988). Zum Vergleich werden in dieser und anderen Untersuchungen beobachtete Auffälligkeiten bei subordinaten Tupaia folgend aufgeführt:

Reduziertes Markier- und Fellpflegeverhalten, eine reduzierte lokomotorische Aktivität, ein gesteigertes Ausweichverhalten gegenüber dem Artgenossen und eine leicht reduzierte Futter- und Wasseraufnahme (Fuchs et al., 1996; Kramer et al.,

1999), Defizite des vom Hippocampus vermittelten Gedächtnissystems (Ohl und Fuchs, 1999; Ohl et al., 2000), ein durch eine erhöhte Anzahl an Wachepisoden in der zweiten Nachthälfte gestörter Schlafrythmus (Aue, 1988), ein gestörter circadianer Rhythmus (Fuchs und Schumacher, 1990), ein gesteigerter Herzschlag (Stöhr, 1986), eine erhöhte Metabolismusrate (Fuchs und Kleinknecht, 1986; Jöhren et al., 1991), eine reduzierte Aktivität der Gonaden (von Holst et al., 1983; Fischer et al., 1985), ein erhöhtes Gewicht der Nebenniere (Fuchs et al., 1993; Isovich et al., 1999), konstant erhöhte Ausschüttung von adrenomedullären und adrenocorticalen Hormonen (s. 4.2.; Fuchs et al., 1993), sowie strukturelle Veränderungen besonders in der Hippocampusformation auf die in Kapitel 4.3. näher eingegangen wird. Ein Teil der vorab aufgeführten Veränderungen läßt sich durch die Behandlung mit Colomipramin, einem Antidepressivum, aber nicht mit Diazepam, einem Anxiolytikum, weitgehend aufheben (Fuchs et al., 1996; vanKampen et al., 2000). Schlußfolgernd hat sich Tupaia mit seinen verhaltensphysiologischen und neurobiologischen Auswirkungen als ein phenomenologisch und prädiktiv aussagekräftiges Tiermodell für das Studium psychosozialen Stresses und depressiver Erkrankungen etabliert.

#### 4.2. Physiologische Veränderungen bei chronischem Streß

Physiologische Vorgänge des Körpers unterliegen in Folge einer Vielzahl endogener und exogener Stimuli einer ständigen dynamischen Anpassung (Kolb and Wishaw, 1993). Im vorliegenden Versuch zeigten alle psychosozial gestreßten und mit Cortisol-behandelten Tiere im Vergleich zu den Kontrolltieren bereits nach einem bzw. zwei Tagen des Behandlungsbeginns eine signifikante, anhaltende Gewichtsreduktion um im Mittel 10%. Dies steht im Einklang mit früheren Untersuchungen an chronisch psychosozial gestreßten bzw. Cortisol-behandelten Tupaia, die ebenfalls eine Gewichtsreduktion festgestellt haben (Flügge, 1995; Magariños et al., 1996; Jamieson et al., 1997; Isovich et al., 1999). So hat sich das Körpergewicht mehrfach als ein geeigneter Parameter für chronischen Streß erwiesen (Fuchs et al., 1996; Kramer et al., 1999).

Bei einem Vergleich des jeweiligen in der Kontrollwoche ermittelten durchschnittlichen Normalgewichts mit den einzelnen Tagen während des Versuchszeitraumes war innerhalb der Kontrollgruppe das ermittelte Körpergewicht bis auf einen Tag des Versuchs nicht signifikant unterschiedlich. Insgesamt zeigten

alle Kontrolltiere ein stabiles Gewicht. In der Streßgruppe unterschied sich das Körpergewicht an allen Tagen signifikant von dem der Kontrollwoche und in der Cortisolgruppe an allen außer den ersten zwei Behandlungstagen. Bereits nach einem Tag führt psychosozialer Streß zu einer anhaltenden signifikanten Gewichtsreduktion der gestreßten Tiere, während eine Behandlung mit Cortisol erst nach 2-4 Tagen das Körpergewicht signifikant reduziert (3.1.1; Mijster, pers. Mitteilung). Auch ein Vergleich zwischen der Streß-, Cortisol- und Kontrollgruppe bestätigt eine zeitliche Verzögerung der Gewichtsreduktion bei Cortisol-behandelten Tieren. Diese Verzögerung läßt einen unterschiedlichen Verlauf physiologischer und zentralnervöser Prozesse vermuten, die zeigen, daß die Gewichtsreduktion nicht ausschließlich von einer erhöhten Cortisol-Dosis abhängt (s.a. 4.3.2.).

Ebenso wie Tupaias, zeigen chronisch gestreßte Ratten eine Gewichtsabnahme (Blanchard et al., 1995). Während bei Ratten jedoch das verringerte Körpergewicht vor allem auf eine reduzierte Futteraufnahme zurückzuführen ist (Rybkin et al., 1997), wird bei Tupaias eine Reduktion des Körpergewichtes während chronisch psychosozialen Streß zudem über eine erhöhte metabolische Aktivität erklärt (Fuchs et al., 1993; Kramer et al., 1999). Wie bereits in anderen Untersuchungen gezeigt, reduzieren die dominanten Tiere ihr Gewicht dagegen nicht (Fuchs et al., 1993; Magariños et al., 1996). Somit ist die reine Interaktion während des sozialen Konfliktes zwischen dem dominanten und subordinaten Tier als Auslöser der Gewichtsreduktion auszuschließen.

Die im Vergleich zur Kontrollgruppe während der Streßperiode signifikant erhöhte Cortisol-Konzentration im Morgenurin von *Tupaia* ist kennzeichnend für eine konstante, nicht adaptierende Hyperaktivität der HHN-Achse (Fuchs et al. 1993). Im Allgemeinen zeigen Ratten unter chronischem Streß eine Habituation der HHN-Achsen Aktivität (Magariños and McEwen, 1995b; Dhabhar et al., 1997). Für Tupaias trifft dies nicht zu (3.1.2.). Chronisch erhöhte Cortisol-Konzentrationen im Urin sind auch in anderen Untersuchungen an gestreßten Tupaias nachgewiesen worden (Fuchs und Flüge, 1995; Fuchs et al., 1995; Magariños et al., 1996; Fuchs et al., 1996; Vollmann-Honsdorf et al., 1997; Kramer et al., 1999; Isovich et al., 1999; Mijster et al., 1999a; Ohl und Fuchs, 1999). Dominante Tiere zeigen dagegen im Vergleich zu den Kontrolltieren keine Erhöhung der Cortisol-Konzentration im Urin (Fuchs et al., 1995; Magariños et al., 1996).

Durch Untersuchungen am Menschen ist bekannt, daß die Cortisol-Konzentration im Urin stark mit der Cortisol-Konzentration im Plasma korreliert (Maeda et al., 1991). Die durch eine Aktivierung der HHN-Achse induzierte Erhöhung der Glucocorticoidkonzentration im Blutplasma ist ein zentrales Charakteristikum der Streßantwort (Munck et al., 1984). Der Anteil an freien Corticosteroiden im Plasma gestreßter Tupaia unter den gegebenen Versuchsbedingungen ist jedoch nicht bekannt (s.a. 4.3.2.) und abhängig von der Bindung an Plasmaproteine, wie Corticosteroid-bindendem Globulin oder anderen unspezifischen Proteinen (Spencer et al., 1996; Deuschle et al., 1998), die durch eine Bindung der Corticosteroide den Durchtritt aus den Kapillaren und somit die Verfügbarkeit an den Zielzellen im Gehirn regulieren. Wie u.a. bei Ratten und Pferden nachgewiesen wurde, reduziert Streß die Konzentration von Corticosteroid-bindendem Globulin im Blutplasma (Spencer et al., 1996; Alexander und Irvine, 1998; Stefanski, 2000). So ist es bei chronisch psychosozial gestreßten Tupaia wahrscheinlich, daß die freie Cortisol-Konzentration im Blutplasma und somit in Folge eines gesteigerten Übergangs durch die Blut-Hirn-Schranke auch im Hippocampus erhöht ist.

Die freie Cortisol-Konzentration im Urin kann mit der angewandten Methodik auch während des Versuchesverlaufes innerhalb der einzelnen Gruppen kontrolliert werden: Innerhalb der Kontrollgruppe sind abgesehen von drei an allen anderen Tagen keine signifikanten Unterschiede im Cortisolspiegel der Tiere im Vergleich zum Mittelwert der Kontrollphase festzustellen. Vergleicht man innerhalb der Streßgruppe die Cortisol-Konzentrationen der 28 Streßtage mit dem Mittelwert der Kontrollphase, so sind bis auf drei, alle Tage der Streßphase signifikant verschieden. Die Meßwerte der Individuen der Streßgruppe erhöhen sich im Mittel um das 2-3fache der basalen Cortisol-Konzentration. Verglichen mit anderen Untersuchungen ist dies die durchschnittliche Erhöhung bei psychosozial gestreßten Tupaia (Fuchs und Flügge, 1995; Fuchs et al., 1996; Vollmann-Honsdorf et al., 1997; Kramer et al., 1999; Ohl und Fuchs, 1999; Mijster et al., 1999a). Jedoch war dreimal bei unterschiedlichen Individuen die Cortisol-Konzentration im Vergleich zum individuellen Mittelwert der Kontrollphase um das 8,5-10,5fache erhöht, welches die Standardabweichung und somit die Varianz in Bezug auf eine Prüfung der Varianzhomogenität an diesen Tagen deutlich beeinflußt. Eine für ein bis zwei Tage wesentlich über dem Durchschnitt liegende Cortisol-Konzentration im Urin sind bei einzelnen gestreßten Tieren im Laufe der

Jahre in unserem Labor beobachtet worden. Die erhöhte Cortisol-Konzentration im Morgenurin von gestreßten Tupaias ist jedoch hoch signifikant korreliert mit der reduzierten lokomotorischen Aktivität sowie dem gesteigerten Vermeidungsverhalten von chronisch psychosozial gestreßten Tupaias am Vortag der Streßexposition (Kramer et al., 1999).

Während der gesamten Streßperiode war der Noradrenalinpiegel der psychosozial gestreßten Tupaias im Vergleich zu den Kontrolltieren signifikant erhöht und läßt einen im Mittel leichten Anstieg bis zur 3. Woche erkennen. Dies steht im Einklang mit einer Vielzahl anderer Untersuchungen des Noradrenalinpiegels im Urin von Tupaia, die ebenfalls eine anhaltende Erhöhung des Noradrenalins verzeichnen (Fuchs et al., 1992, 1993, 1995, 1996; Fuchs und Flügge, 1995; Flügge et al., 1997; Kramer et al., 1999; Mijster et al., 1999a). Auch im Zeitverlauf der Streßexposition ist der Unterschied zwischen der Kontrollwoche und der ersten Streßwoche signifikant. Die für die folgenden Wochen zu verzeichnende fehlende Signifikanz des an allen Tagen um 40% bis zum 7,3fachen des Mittelwertes der Kontrollwoche erhöhten urinären Noradrenalins ist auf die extrem hohen Standardabweichungen (für  $n=3$ ) in der 2.-4. Streßwoche zurückzuführen.

Die Konzentration des Noradrenalins im Urin ist das Endprodukt aller Ausschüttungs- und Wiederaufnahmeprozesse des Körpers, jedweder metabolischer Veränderungen und der Verteilung in verschiedene physiologische Kompartimente. So ermöglicht die Analyse von Noradrenalin im Morgenurin einen verlässlichen Einblick in die zeitabhängige Antwort des Organismus auf sich verändernde Situationen (Moleman et al., 1992; Kramer et al., 1999). Die erhöhte Noradrenalin-Konzentration im Morgenurin von gestreßten Tupaias korreliert hoch signifikant mit der reduzierten lokomotorischen Aktivität sowie dem verminderten Markierungsverhalten chronisch psychosozial gestreßter Tupaias am Vortag der Streßexposition (Kramer et al., 1999). Somit ist die anhaltende, erhöhte freie Noradrenalin-Konzentration im Urin ein zuverlässiger Marker für eine nicht adaptierte Aktivität des adrenomedullaren Systems (Moleman et al. 1992; Fuchs et al., 1992, 1993). Dies ist eine Folge des psychosozialen Stresses und nicht wie beispielsweise zu vermuten wäre der täglichen Konfrontation mit dem Artgenossen, da bei dominanten Tupaia keine erhöhte Noradrenalin-Konzentration nachweisbar ist (Aue, 1988; Fuchs et al., 1993).

Auf Grund früherer Untersuchungen wurden die Folgen des psychosozialen Stresses bei Tupaia in zwei unterschiedliche endokrine Streßreaktionen unterteilt (von Holst et al., 1983; von Holst, 1993). An Hand dieses Modells unterschieden sich sogenannte "submissive" Tupaia mit einer Aktivierung der HHN-Achse und reaktivem Verhalten von der durch "Resignation" und "Hilflosigkeit" gekennzeichneten "subdominanten" Tupaia, welche durch eine Aktivierung des adrenomedullaren Systems mit aktiven Bewältigungsstrategien in Streßsituationen charakterisiert worden sind (von Holst, 1993). Ein direkter Vergleich mit den vorliegenden Ergebnissen ist nicht zu ziehen, da sich diese Versuche in einigen Punkten von den hier vorliegenden unterscheiden: So wurden anders als in der vorliegenden Arbeit (s. 2.1., 2.2. u. 2.4.) 1. die Versuchstiere Wildtierpopulationen entnommen, deren Vorerfahrungen keinen kontrollierten Bedingungen unterlagen, 2. verschiedene physiologische Parameter, wie auch die Cortisol- und Noradrenalin-Konzentration über das Blutplasma ermittelt und 3. die Gewichtsverluste nicht auf 15% des Körpergewichts der Kontrollwoche limitiert (s. 2.4.1.; von Holst et al., 1983).

Im Gegensatz dazu erschließt sich auf Grund der vorliegenden Ergebnisse und anderer Untersuchungen mit einer gleichzeitig chronisch erhöhten Cortisol- und Noradrenalin-Konzentration im Urin von Tupaia eine deutliche Korrelation beider endokriner Streßreaktionen (Fuchs et al., 1995; Flügge, 1996; Kramer et al., 1999; Isovich et al., 1999; Mijster et al., 1999a). Dies ist für eine parallele Aktivierung der HHN-Achse und des sympathoadrenomedullaren Systems kennzeichnend. Wenn somit in der vorliegenden Arbeit gestreßte Tiere als "subordinat" bezeichnet werden, ist dies zu berücksichtigen.

#### 4.3. Strukturelle hippocampale Veränderungen bei chronischem Streß

Chronischer Streß verursacht verschiedene zentralnervöse, histologisch sichtbare Veränderungen, die vor allem auf die Belastung durch die chronisch erhöhten Konzentrationen an Glucocorticoiden zurückgeführt werden. Auf Grund seiner besonders hohen Dichte an Corticosteroidrezeptoren konzentrieren sich viele Studien auf den Hippocampus (deKloet et al., 1998). Neben Veränderungen auf der Rezeptorebene heben sich einige morphologische Änderungen besonders hervor. So ist nachgewiesen worden, daß drei Wochen Immobilisations-Streß, vier Wochen

unvorhersehbarer physischer Streßexposition mit unterschiedlichen Stressoren oder Corticosteronbehandlung bei männlichen Ratten oder vier Wochen psychosozialer Streß bei Tupaia eine Regression der apikalen Dendriten von Pyramidenneuronen der Region CA3 verursachen (Woolley et al., 1990; Magariños und McEwen, 1995b; Magariños et al., 1996; Galea et al., 1997; Sousa et al., 2000; McKittrick et al., 2000). Pyramidenneurone, insbesondere in der Region CA3, werden als besonders sensitiv für strukturelle Veränderungen angesehen, auch wenn verschiedene Effekte in anderen Teilen des Hippocampus nachgewiesen sind (Fuchs et al., 1995; Gould et al., 1997; Sousa et al., 1998a, Sousa et al., 2000). Der nach der Glucocorticoid-Kaskaden-Hypothese auf die dendritische Atrophie folgender Zelltod wird in Kapitel 4.3.5. diskutiert.

Die Streß- und Corticosteroninduzierte Atrophie der apicalen Dendriten ist jedoch nicht allein von chronisch erhöhten Glucocorticoidkonzentrationen abhängig, da sie sowohl durch eine Behandlung mit Tianeptin, einem Antidepressivum, das durch die Wiederaufnahme von Serotonin, dessen extrazelluläre Verfügbarkeit reduziert, und auch Phenytoin, einem Antiepileptikum, welches u. a. die Freisetzung exzitatorischer Aminosäuren modifiziert, sowie CGP 43487, einem competitiven N-methyl-D-asparat Antagonisten verhindert werden kann (Watanabe et al., 1992; Magariños und McEwen, 1995a; Magariños et al., 1996). Die exzitatorische synaptische Verbindung über die Moosfasern aus dem Gyrus dentatus scheint eine wichtige Rolle bei der dentritische Atrophie in der Subregion CA3 zu haben (Sousa et al., 2000) und sollte dennoch nicht isoliert betrachtet werden (McEwen, 1999). So gibt es nachweislich auch geschlechtsspezifische Unterschiede, die nicht allein abhängig sind von unterschiedlichen Konzentrationen freier Corticosteroide im Blutplasma männlicher und weiblicher Ratten (Galea et al., 1997): Bei chronisch gestreßten männlichen Ratten reduzieren sich die Länge und die Anzahl der Verzweigungspunkte der apikalen Dendriten, während bei weiblichen Ratten die Anzahl der Verzweigungen der basalen aber nicht der apikalen Dendriten verringert ist. Erstaunlich ist ebenso, daß bei einer Kombination von Streß und Corticosteronbehandlung ebenfalls keine dendritische Atrophie nachweisbar ist (Magariños et al., 1998).

Insbesondere interessant für die hier vorliegende Studie an Tupaia ist jedoch der Unterschied in Qualität und Quantität der dendritischen Atrophie in CA3 nach chronischem Streß und chronischer Corticosteron-Behandlung in Ratten (Sousa et



al., 2000). So zeigen Corticosteron-behandelte Ratten im Gegensatz zu gestreßten keine reduzierte Dichte in der Verästelung der apikalen Dendriten in CA3. Die geringere Quantität der degenerativen Veränderungen der Dendriten (Länge der apikalen Dendriten und deren terminalen Segmente), wie auch der untersuchten Moosfaser-Synapsen (s.a. 4.3.4.1.; Anzahl und Oberfläche der Synapsen und Volumen und Oberfläche der Moosfaser-Terminalien) spiegelt sich zudem in milderer Störungen des getesteten räumlichen Lernverhaltens und Gedächtnis der Tiere wieder (Sousa et al., 2000). Ein erhöhter Glucocorticoidspiegel allein macht somit nicht die vielfältigen Reaktionen des Gehirns auf Streß erklärbar. Wie die vorliegende Studie an Pyramidenneuronen des Hippocampus zeigt, reagiert nicht nur die Subregion CA3, sondern in der Ultrastruktur der Zellkerne der Pyramidenneurone auch die Subregion CA1 unterschiedlich auf Streß und Cortisol-Behandlung (3.5.): Während sich in der als sensibel geltenden Subregion CA3 nach chronisch psychosozialen Streß die Ultrastruktur der Nuclei der Pyramidenneurone ändert, ist dies für die Pyramidenneurone der Subregion CA1 bei gestreßten Tupaia nicht der Fall. Im Gegensatz dazu sind vermehrt Heterochromatinaggregate nach 28 Tagen Cortisol-Behandlung in CA1 Pyramidenneuronen sichtbar, wohingegen die Cortisol-behandelten Tupaia keine Änderung der Chromatinstruktur in Pyramidenneuronen in CA3 erkennen lassen. Neben der Plasmagluocorticoidkonzentration (4.3.2.) und möglichen Einflüssen auf der Rezeptorebene (4.3.3.) als Ursachen für die region- und behandlungsspezifischen Heterochromatinänderungen müssen vor allem bei integrativen Neuronen wie den Pyramidenneuronen des Hippocampus beeinflussende Faktoren wie die anderer Transmittersysteme und Hormone (4.3.4.) diskutiert werden.

#### 4.3.1. Heterochromatin

Nach vorherrschender Meinung repräsentiert Heterochromatin einen spezifischen funktionalen Status chromosomaler Regionen, da verschiedene Untersuchungen darauf hinweisen, daß ein heterochromatisches Aussehen und transkriptionale Inaktivität chromosomaler Regionen auf den selben Mechanismen basieren (Zusammenfassung s. Wallrath 1998; Hennig, 1999). Als ein Beispiel der Genunterdrückung ("gene silencing") durch die starke Kondensierung zu Heterochromatin sei in diesem Rahmen die Inaktivierung eines X-Chromosoms in weiblichen Säugetier-Embryonen genannt. Faßt man die bisherigen Erkenntnisse

zur Genabschaltung zusammen, so ergibt sich ein kombiniertes Modell verschiedener molekularer Mechanismen der Genunterdrückung. Diese beinhaltet eine Assoziation der DNA mit multimerischen Proteinkomplexen, welche mit modifizierten Histonen interagieren (Tsukiyama and Wu, 1997; Robyr and Wolffe, 1998; Taddei et al., 1999). Dabei ist z.B. für den GR nachgewiesen, daß insbesondere die Rotationsposition der DNA Sequenz in Beziehung zur Oberfläche der Histone für Zugang des GR an dessen DNA Bindungsstelle ("recognition element") von Bedeutung ist (Robyr and Wolffe, 1998). Als Folge dieser Konformatinsänderung in bestimmten genomischen Regionen werden vermutlich angrenzende bzw. ausgedehntere Abschnitte der DNA in den Zusammenschluß dieser transkriptionsunterdrückenden Protein-Histon-Komplexe einbezogen. Die Transkription der Gene dieses angrenzenden Euchromatins wird dann in der Konsequenz ebenso unterdrückt wie die direkt durch die Konformationsänderung betroffenen genomischen Abschnitte ("position effect"; Wallrath, 1998; Hennig, 1999; Sun und Elgin, 1999). Strukturelle Charakteristika manifestieren sich dabei in einem generellen Verlust der Zugänglichkeit der DNA zu Nucleasen, einer veränderten Nucleosomanordnung, der beschriebenen Assoziation bestimmter Proteine und einer Tendenz der Hypoacidität von Histonen des Zellkerns (Wallrath, 1998; Sun und Elgin, 1999; Hennig, 1999). Dies verändert u.a. die Färbeintensität basischer Farbstoffe, wie z.B. die der Nissel-Farbstoffe (3.3.). Zudem ist Heterochromatin in eine Reihe weiterer Funktionen im Nucleus involviert, wie der nucleären Architektur oder der Trennung von Chromosomen, was z.B. auch den Transport von RNA oder andere intranucleare Proteine beeinflussen könnte. Darüber kann jedoch nur spekuliert werden.

Das ultrastrukturell zu identifizierende heterochromatische Aussehen repräsentiert somit eher einen inaktiven Status des Chromatins als eine spezifische genetische Qualität des jeweiligen Genomteils (Hennig, 1999). So kann man für die vorliegenden Ergebnisse folgern, daß Streß bzw. Cortisol das Abschalten von verschiedenen Genen in Pyramidenneuronen des Hippocampus zur Folge hat. Diese Abschaltung erfolgt behandlungs-selektiv und regionspezifisch.

#### 4.3.2. Cortisol

Die hier gezeigten Ergebnisse zeigen einen Unterschied in den Auswirkungen von chronischem Streß versus chronischer Cortisol-Behandlung (3.1.1. u. 3.5.). Dies ist möglicherweise auf unterschiedlich hohe Konzentrationen an Glucocorticoiden im Blut-Kreislauf der Tiere zurückzuführen. Von Untersuchungen an Ratten weiß man, daß normalerweise der Rhythmus der Corticoidkonzentration einen täglichen Höhepunkt der adrenalen Glucocorticoidausschüttung kurz vor bzw. zu Beginn der aktiven Phase aufweist (Dallman, 1993). Bei exogener Glucocorticoidgabe steigt die Plasmahormonkonzentration auf 0,4-1,0 µg/ml (Dallman, 1993; Sousa et al., 1998a) und führt zu einer verkleinerten Amplitude der täglichen Corticosteronsekretion (Dallman, 1993). Die Glucocorticoidkonzentration im Plasma der Cortisol-behandelten oder gestreßten Tupaia ist nicht bekannt. Da insbesondere bei Tupaia die Blutabnahme belastend und somit ein zusätzlicher physikalischer Stressor ist, wurde darauf verzichtet (Fuchs et al., 1993). Wir haben jedoch die Cortisol-Konzentration im Morgenurin bestimmt (2.4.). Streß erhöht die morgentliche Cortisol-Konzentration im Urin im Mittel um das 2-3fache (3.1.2.; Fuchs und Flügge, 1995; Fuchs et al., 1996; Vollmann-Honsdorf et al., 1997; Kramer et al., 1999; Ohl und Fuchs, 1999; Mijster et al., 1999a, Isovich et al., 1999). Tupaia, die 28 Tage Cortisol über das Trinkwasser bekommen, zeigen einen im Schnitt um das 10fache erhöhten Cortisolspiegel im Morgenurin (Isovich et al., 1999; Mijster et al., 1999a). Da in Ratten eine um das 6-7fach erhöhte Plasmakonzentration an Corticosteron zu einer parallel hohen Besetzung der Mineralocorticoid- und Glucocorticoidrezeptoren (GR) führt (Dallman, 1993), folgern wir, daß in Cortisol-behandelten Tieren auch der GR konstant stimuliert ist (s. 4.3.3.). Im Gegensatz dazu sind während chronischem Streß in Ratten Fluktuationen der Plasmaglucocorticoidkonzentration nachgewiesen worden (Dallman, 1993; Sousa et al., 2000). Auch wenn die täglichen Schwankungen abgeflacht sind, so ist in Folge sich wiederholender belastender Reize die limbisch gesteuerte HCN-Achse hyperaktiv (Dallman, 1993). Deshalb ist anzunehmen, daß auch bei chronisch psychosozial gestreßten Tupaia die GR erheblich öfter als unter normalen Umständen besetzt sind. Die physiologischen Effekte von chronischem Streß und chronischer exogener Cortisolbehandlung sind demnach unterschiedlich. Dies steht im Einklang mit Befunden in chronisch gestreßten Tupaia, deren Nebennierengewicht im Vergleich zu dem von Kontrolltieren erhöht ist, während es

bei Tupaia, die 5 Tage mit Corticosteron behandelt wurden, reduziert war (Flügge, 1999).

Die in diesem Experiment verwendete Cortisoldosis, die zu einer durchschnittlichen täglichen oralen Cortisolaufnahme von 5mg/100g Körpergewicht führte, ist im Vergleich mit denen beim Menschen oder bei nichthumanen Primaten verwendeten Dosierungen (zum Vergleich s. Leverenz et al., 1999) sehr hoch. Nach Reul und deKloet, 1985, ist eine subcutan injizierte Corticosteron-Dosis von 1mg/100g Körpergewicht in Ratten für eine 95%ige Besetzung von GR und MR erforderlich. Die in dieser Studie bei Tupaia oral verabreichte Dosierung wurde gewählt, um eine möglichst vollständige, gleichzeitige Besetzung der Mineralocorticoid- und Glucocorticoidrezeptoren zu gewährleisten (s. 4.3.3.). Das Verhältnis von gebundenem zu freiem Cortisol im Blutplasma von gestreßten oder Cortisol-behandelten Tupaia ist nicht bekannt (s. 4.2.). Es ist ebenfalls unklar, welcher Anteil des ungebundenen lipophilen Cortisols durch die Blut-Hirn-Schranke bis in den Hippocampus gelangt. Auf Grund der um das 10fache erhöhten Cortisol-Konzentration im Morgenurin von mit der gleichen Cortisol-Dosierung behandelten Tupaia (Isovich et al., 1999; Mijster et al., 1999a) ist es möglich, daß ein Teil des Hormons direkt wieder ausgeschieden wird. Insbesondere war es im vorliegenden Versuch zudem wichtig, die Vergleichbarkeit mit Studien an Ratten (Sousa et al., 1998a+b; Sousa et al., 2000) und Tupaia zu gewährleisten (Jamieson et al., 1997; Mijster et al., 1999a; Isovich et al., 1999; Ohl et al., 2000).

In Bezug auf die unterschiedlichen strukturellen Auswirkungen von Streß und Cortisol-Behandlung ist auch eine gewebsspezifische, unterschiedlich regulierte Verfügbarkeit endogener Glucocorticoide interessant. 11 $\beta$ -hydroxysteroid Dehydrogenase 1 (11 $\beta$ -HSD-1) katalysiert die Umwandlung von Cortisol und Corticosteron in Cortison und 11-dehydrocorticosteron und reguliert dadurch indirekt die Bindung von Glucocorticoiden an die intrazellulären Rezeptoren. Chronisch psychosozialer Streß in Tupaia vermindert 11 $\beta$ -HSD-1 im Hippocampus, Cortisol alleine zeigt jedoch keinen Effekt (Jamieson et al., 1997).

Schließlich sind auch beim Menschen unterschiedliche Effekte von Streß und Glucocorticoiden nachgewiesen worden. Eine chronische orale Einnahme von Glucocorticoiden inhibiert das sympathische Nervensystem, wohingegen chronischer Streß charakterisiert ist durch eine anhaltende Aktivierung des sympathischen Nervensystems (Lenders et al., 1995). Als Fazit hat eine 28 Tage

dauernde orale Applikation von Cortisol bei Tupaia nicht die selben Auswirkungen auf hippocampale Neurone wie chronisch psychosozialer Streß, weil die physiologische Situation beider Behandlungs-Gruppen unterschiedlich ist.

#### 4.3.3. Corticoidrezeptoren

Streß führt über eine Stimulation der HNN-Achsen Aktivität zu erhöhten Konzentrationen von freiem Cortisol bzw. Corticosteron im Blutplasma (s. 4.2.). Beide Hormone binden an zwei Typen intrazellulärer Steroidrezeptoren, den Mineralocorticoidrezeptor (MR) und den Glucocorticoidrezeptor (GR; Zusammenfassung: deKloet et al., 1998). Da beide Rezeptoren eine unterschiedlich hohe Affinität zu Cortisol und Corticosteron haben, sind bei basalen Plasmaglucocorticoidkonzentrationen vorwiegend die MR besetzt und bei höheren Konzentrationen, wie unter Streß oder während des täglichen Maximums der Freisetzung aus der Nebennierenrinde, ebenso der GR (Reul and deKloet, 1985; Dallman, 1993). MR scheinen nach dem heutigen Stand des Wissens eine positiv aktivierende Rolle in der Aufrechterhaltung der Homöostase zu spielen, während Corticosteroide durch den GR eher in einer reaktiven Weise auf eine Wiederherstellung der Homöostase einwirken (deKloet et al., 1998). Streßeffekte werden, so die Theorie, insbesondere durch eine Aktivierung des GR vermittelt, die durch die hohen Konzentrationen an Glucocorticoiden zu einem überwiegenden Teil besetzt sind (s. 4.3.2.). Besetzte GR bilden Dimere und binden an spezifische "response elements" in Promotor Regionen verschiedener Gene, welche dann die Gentranskription initiieren können (Robyr and Wolffe, 1998). GR und MR bilden jedoch nicht nur Homodimere, sondern können wie in Zellkultur nachgewiesen auch Heterodimere miteinander und mit anderen ligandenabhängigen Transkriptionsfaktoren bilden (erweiterte Diskussion s. 4.3.3.5.; Trapp et al., 1994; Chen et al., 1997). Ausgehend von einer genetischen Prädisposition besagt die MR/GR-Gleichgewichts-Hypothese, daß vor allem das Verhältnis der antagonistischen Wirkung des MR und GR mit von entscheidender Bedeutung für eine Störung der Homöostase ist, die dann zu einer Entstehung verschiedener Krankheiten führen kann (deKloet et al., 1998). Eine unterschiedliche evtl. sogar subregionsspezifische Regulation der Corticosteroidrezeptorzahl in Tupaia wäre eine einfache Erklärung der vorliegenden lichtmikroskopischen und ultrastrukturellen Ergebnisse, die eine reduzierte Transkription vermuten lassen (3.3.; 3.5.; s.a. 4.3.1.)

Die Zahl der Corticosteroidrezeptoren bei *Tupaia* ist nicht bekannt. Wir wissen aber, daß nach 28 Tagen psychosozialem Streß die Expression von GR mRNA in CA1 und CA3 sowie im Gyrus dentatus statistisch signifikant herunterreguliert ist (Jöhren et al., 1994; Meyer et al., 2001). Dieser Effekt ist vermutlich von längerer Dauer, da nach chronischem Streß bei Ratten die Expression von GR mRNA ebenfalls erniedrigt ist und derselbe Effekt auch 8 Tage nach der letzten Streßexposition nachgewiesen werden kann (Kitraki et al., 1999). Eine Subregionspezifität der reduzierten GR Expression ist jedoch bei *Tupaia* nicht zu erkennen und deshalb vermutlich nicht die - alleinige - Ursache für die Heterochromatinaggregation. Auch die MR mRNA Expression ist im Hippocampus von *Tupaia* Streß-reguliert (Meyer et al., 2001). Eine subregionsspezifische Regulation ist jedoch auch hier nicht festzustellen. Es zeigt sich vielmehr ein anterior-posteriorer Unterschied in der Expressionsregulation. In der Ebene A2.5 nach Tigges und Shanta, 1969, die mit der Ebene in der die ultrastrukturellen Untersuchungen durchgeführt wurden korrespondiert, konnte jedoch keine signifikante Änderung der MR mRNA Expression in CA1 und CA3 nachgewiesen werden (Meyer et al., 2001).

Die Repression der mRNA Expression eines Rezeptorgens hat jedoch nicht zwangsläufig eine Reduktion aktiver Rezeptormoleküle zur Folge, da viele verschiedene Prozesse - wie z.B. die Translation oder eine Wechselwirkung mit anderen Molekülen oder Ionen - die Anzahl aktiver Rezeptormoleküle beeinflusst. Bereits eine kurzfristige Streßbelastung kann z.B. zu lang andauernden Veränderungen der Rezeptorbindungskapazität der GC-Rezeptoren im Hippocampus führen (vanDijken et al., 1993; Koolhaas et al., 1997). Summarisch gehen wir jedoch davon aus, daß die Anzahl und das Verhältnis von GR und MR im Hippocampus durch chronischen Streß nachhaltig verändert wird und sich u.a. auf Grund der unterschiedlichen physiologischen Situation von dem ebenso wahrscheinlich veränderten Verhältnis von GR und MR chronisch Cortisol-behandelter Tiere unterscheidet (s. 4.3.2.). Dies beeinflusst vermutlich auch die Transkription verschiedener Gene, was durch eine veränderte Heterochromatinstruktur des Nucleus ultrastrukturell sichtbar ist.

In diesem Zusammenhang ist es interessant, daß ein CA1 Pyramidenneuron ca. 1000 GR und MR enthält, die in Clustern im Nucleus konzentriert sind (vanSteensel et al., 1996). 90% der CA1 Pyramidenneurone produzieren davon beide Rezeptoren. Vermutlich sind auch die am meisten geclusterten Rezeptormoleküle

nicht direkt in die Stimulation der Genexpression involviert (vanSteensel et al., 1996). Ein Zusammenhang dieser Cluster und Heterochromatin ist bislang nicht nachgewiesen. Weitere Untersuchungen könnten zeigen, ob sich die Clusterung nach Streß oder Cortisol-Behandlung ändert und mit einer veränderten Heterochromatinaggregation zu korrelieren ist. Eine Studie über den Einfluß einer Cortisol-Behandlung auf die Corticosteroidrezeptoren im Hippocampus von Tupaia könnte ebenso weitere Erkenntnisse für die ursächlichen Zusammenhänge der Heterochromatinaggregation liefern.

Das Verhältnis von MR und GR ist jedoch nicht allein entscheidend, eine weitere Möglichkeit der Gentranskription und somit auch in deren Reduktion besteht in der Transaktivierung. GR interagieren nachweislich auch mit nicht ligandenabhängigen Transkriptionsfaktoren, wie AP1, CREB und NF $\kappa$ B (deKloet et al., 1998). Da GR normalerweise deren positive Effekte auf die Transkription unterdrücken, bedeutet Streß eine inadäquate funktionale Ausbeute betroffener Gene, die – legt man die erhöhten Cortisolkonzentrationen zugrunde – in einer noch stärkeren Unterdrückung des positiven Transkriptions-Effekts resultieren würde.

#### 4.3.4. Modulierende Faktoren anderer Transmittersysteme

Corticosteroide beeinflussen eine Vielzahl von Funktionen im Nervensystem, im endokrinen System sowie auch im Immunsystem. Sie regulieren u.a. den Kohlenwasserstoff-, Protein- und Lipid-Stoffwechsel und die Aufrechterhaltung des Flüssigkeits- und Elektrolytgleichgewichtes (Norman und Litwack, 1997). Eine Störung des neuronalen Energiehaushaltes sollte somit nicht außer Acht gelassen werden. So ist es z.B. interessant, daß in Cortisol-behandelten Tieren vor allem die Region CA1 betroffen ist, eine Region, die auf Grund ihrer spezifischen arteriellen Versorgung sehr empfindlich ist gegen Sauerstoffmangel (Lindenberg, 1957).

Die vorliegenden Untersuchungen haben gezeigt, daß hohe Cortisolkonzentrationen eine entscheidende Rolle bei Veränderungen der neuronalen Morphologie im Hippocampus spielen. Die Unterschiede in den ultrastrukturellen Ergebnissen können jedoch nicht allein mit erhöhten Cortisolkonzentrationen korreliert werden. Der chronische Hypercortisolismus ist nur ein Bestandteil der komplexen physiologischen Streßreaktion und kann daher nicht isoliert betrachtet werden. Wir vermuten, daß andere Faktoren die Streßeffekte direkt oder auch sekundär über

eine Modulation der Glucocorticoidausschüttung oder der Corticosteroidrezeptormoleküle beeinflussen.

Neben physiologischen Änderungen in der Peripherie oder im hormonellen Gleichgewicht aller Hormone des Organismus (4.3.4.5.) werden andere Transmittersysteme als Mediatoren diskutiert (4.3.4.1-4.3.4.4). Einige interessante Zusammenhänge werden in den folgenden Abschnitten insbesondere auch im Hinblick auf die subareaspezifischen Unterschiede angesprochen.

#### 4.3.4.1. Glutamat

Eine verstärkte Aggregation von Heterochromatin nach Streß ist in CA3 am deutlichsten präsent. Diese Subregion gilt als empfindlich für strukturelle Änderungen nach chronischem Streß, welcher die Atrophie der apicalen Dendriten der Pyramidenneurone induziert (Magariños et al., 1996). Da diese Atrophie jedoch von Phenytoin, welches die Glutamatauscheidung modifiziert und  $Ca^{2+}$ -Kanäle blockiert, sowie CGP 43487, einem kompetitiven N-methyl-D-asparat (NMDA) Antagonisten verhindert werden kann, ist ein sekundärer Einfluß excitatorischer Neurotransmitter bei chronischem Streß wahrscheinlich (Watanabe et al., 1992; Magariños und McEwen, 1995a; Magariños et al., 1996).

Der wichtigste excitatorische Transmitter des Hippocampus ist Glutamat, welcher nach Streß vermehrt im Hippocampus ausgeschüttet wird (Moghaddam, 1993; Lowy et al, 1993). Zwei Glutamatrezeptortypen und deren Regulation nach Streß sind beschrieben worden: ionotrophe und metabotrophe Rezeptoren (Zusammenfassung z.B.: Ozawa et al., 1998). Ionotrophe Glutamatrezeptoren setzen sich in unterschiedlicher Zusammensetzung (auch auf ein und derselben Zelle) aus spezifischen Untereinheiten zusammen, deren Eigenschaften die Rezeptoreigenschaften bestimmen (Bettler and Mülle, 1995; Ottersen and Landsend, 1997). Eine Regulation der Expression der Rezeptoruntereinheiten ist sowohl behandlungs- als auch subregionsspezifisch. So wird die mRNA von NMDA-Rezeptor-Untereinheiten nach Streß und Corticosteron-Behandlung in Ratten unterschiedlich reguliert. Während nach einer Corticosteron-Behandlung NR2A und NR2B mRNA in CA1 und CA3 ansteigt und für NR1 mRNA kein Effekt nachzuweisen ist, steigt nach Streß NR1 mRNA in CA1 und CA3, NR2B mRNA nur in CA3 und NR2A mRNA zeigt keinen Effekt (Bartanusz et al., 1995; Weiland et al., 1997). Auf Grund einer veränderten Rezeptor-Zusammensetzung nach Streß und



Corticosteronbehandlung werden somit die Rezeptoreigenschaften moduliert, indem z.B. die Permeabilität für Kationen ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ) erhöht bzw. erniedrigt wird (Leist und Nicotera, 1998). Ein sekundärer Einfluß der NMDA Rezeptoren könnte sich somit regionsspezifisch manifestieren. Auf die in diesem Zusammenhang oft diskutierte Exotoxizität wird in Kapitel 4.3.5. eingegangen.

Andere Glutamaterezeptoruntereinheiten von AMPA- und Kainaterezeptoren werden dagegen nach Streß und Corticosteronbehandlung herunterreguliert (Krugers et al., 1993; Bartanusz et al., 1995; Joels et al., 1996). Dies spiegelt sich möglicherweise eher in einer veränderten Genexpression als in veränderten pharmakologischen Eigenschaften wieder (Watanabe et al., 1995). Die verschiedenen Glutamaterezeptoren sind jedoch an unterschiedlichen Stellen des Dendritenbaumes von Pyramidenneuronen mit einer veränderten Verteilung und Entfernung zu synaptischen Kontakten lokalisiert (Ottersen and Landsend, 1997).

Ein wichtiger glutamaterger synaptischer Kontakt der Moosfasern aus den Körnerzellen des Gyrus dentatus mit den Pyramidenneuronen in CA3 im proximalen Teil deren apikalen Dendriten zeigt ebenso Veränderungen nach chronischem Streß oder Corticosteroidbehandlung in Ratten (Magariños et al., 1997; Sousa et al., 2000). Die Änderungen der Vesikelverteilung in den Moosfaserterminalien erscheinen nach chronischem aber nicht nach akutem Streß (Magariños et al., 1997). Auch die Gesamtzahl der Moosfaser-CA3 Synapsen und deren Oberfläche sowie die Oberfläche und das Volumen der Moosfaserterminalien verringern sich nach chronischem Streß und nach chronischer Corticosteronbehandlung (Sousa et al., 2000). Da die Effekte nach einer chronischen Corticosteronbehandlung weniger deutlich ausgeprägt sind, wird vermutet, daß die Leistungsfähigkeit der Moosfaser-CA3 Synapsen nach chronischem Streß eingeschränkt ist, dies aber nicht ausschließlich auf eine erhöhte Glucocorticoidkonzentration zurückzuführen ist (Sousa et al., 2000). Ein Rückschluß auf eine veränderte Erregbarkeit der Pyramidenneurone in CA3 ist jedoch nicht möglich, da die Mehrzahl der synaptischen Kontakte von Moosfasern in CA3 nicht mit Pyramidenneuronen sondern mit Interneuronen gebildet werden, die wiederum einen vorwiegend inhibitorischen Einfluß auf die CA3 Pyramidenneurone haben (Henze et al., 2000). Dabei ist insbesondere bei Neuronen wie den Pyramidenneuronen, die wegen ihrer ausgeprägten Dendritenbäume eine stark integrative Funktion haben, zu beachten, daß ein terminaler im Gegensatz zu einem proximalen synaptischen Kontakt

vorwiegend einen modulatorischen bzw. verstärkenden (facilitation) Effekt beinhaltet. Diese Beziehung steht in einem nicht-linearen Zusammenhang und beinhaltet die Summationseffekte mehrerer Synapsen (Andersen, 1990).

Der Einfluß von Glutamat auf strukturelle Veränderungen infolge chronischen Streßes ist auf Grund der Komplexität der Glutamatrezeptorlokalisierung, -wirkung und -variabilität bislang nicht hinreichend untersucht worden. Weiterführende Untersuchungen müssen zeigen, ob selektive Unterschiede zwischen Streß und Corticosteronbehandlung bestehen, die sich auch langfristig in einer veränderten Genexpression manifestieren.

#### 4.3.4.2. Noradrenalin

Noradrenalin (NA) beeinflusst die Streßreaktion auf unterschiedliche Weise: über den direkten noradrenergen Input des Hippocampus durch Neurone des Locus coeruleus (LC; Valentino et al.; 1993) und über eine veränderte Ausschüttung von Katecholaminen aus dem Nebennierenmark. Eine Aktivierung beider NA Ausschüttungsprozesse ist jedoch nicht zwangsläufig miteinander korreliert (Valentino et al., 1993; Flügge, 2000). Für die vorliegenden Ergebnisse ist dabei mehreres zu beachten: 1. Unter Streß führt die anhaltende sympathoadrenomedullare Aktivität zu einer erhöhten freien Noradrenalin-Konzentration im Urin (3.1.3./4.2.), was bei chronischer Cortisolbehandlung nicht nachzuweisen ist (Isovich et al., 1999; Mijster et al., 1999a). Der physiologische Effekt bei Streß und Cortisolbehandlung ist demnach unterschiedlich. Das Verhältnis von Glucocorticoiden und NA im Blutplasma von gestreßten und Cortisol-behandelten Tupaia ist somit vermutlich konträr. Dies wiederum hat Auswirkungen auf das Gehirn, da sich die HHN-Achse und die sympathische Streßachse gegenseitig beeinflussen (Maccari et al., 1992; Lenders et al., 1995; Flügge, 2000). Die Reaktionen von Tupaia ähneln denen beim Menschen, wo eine chronische orale Glucocorticoidbehandlung das sympathische Nervensystem inhibiert, während im Gegensatz dazu chronischer Streß gekennzeichnet ist durch eine anhaltende sympathische Aktivität (Lenders et al., 1995) 2. Ein gegenteiliger Effekt von Streß und Cortisol ist auch für die Regulation von  $\alpha_2$ -Adrenoceptoren im LC von Tupaia mit Hilfe von in vitro Rezeptorautoradiographie nachgewiesen (Flügge, 1996; Flügge, 1999).  $\alpha_2$ -Adrenoceptoren haben Autorezeptorfunktion im LC und regulieren somit auch die Ausschüttung von NA an den Terminalien im Hippocampus (Flügge,

1999; Flügge, 2000). Eine veränderte Freisetzung von NA wiederum wirkt sich direkt auf die Rezeptorbindungsstellen und die Affinität von MR und GR im Hippocampus aus (Maccari et al., 1992). Letztere Bindungsstudie beruht jedoch auf Ergebnissen an homogenisiertem Hippocampusgewebe. Es wäre in zukünftigen Untersuchungen auf Grund der hier gewonnenen Erkenntnisse jedoch wichtig, eine subregionsspezifische Unterscheidung vorzunehmen. 3.  $\beta_1$ -Adrenozeptoren werden nach 28 Tagen psychosozialem Streß regionsspezifisch in CA1 herunterreguliert. Über eine second messenger Kaskade dieses G-Protein gekoppelten Rezeptors ist somit ein Einfluß auf die Gentranskription möglich (Flügge et al., 1997; Flügge, 2000). 4. Auch elektrische Eigenschaften, wie eine durch Katecholamine herabgesetzte Elektronegativität des Zellkerns kann korreliert sein mit einer erhöhten Quantität an Heterochromatin "chromocenter" (Shkorbatov et al., 1999). Ob dies auch in hippocampalen Pyramidenneuronen der Fall ist, müßte überprüft werden, insbesondere, da NA und Corticosteron gegenteilige Effekte auf die verschiedenen elektrischen Eigenschaften von CA1 Pyramidenneuronen zeigen (Joels and deKloet, 1989; Joels and deKloet, 1992).

#### 4.3.4.3. Serotonin

Ein Zusammenhang zwischen Streß, erhöhten Glucocorticoidkonzentrationen und dem serotonergen System ist mehrfach nachgewiesen worden und es gibt Hinweise, daß eine Regulation stressor- und regionsspezifisch ist (Flügge, 2000; Chaouloff, 2000). So werden 5-HT<sub>1A</sub> Rezeptoren im Hippocampus in CA1 nach Streß herunterreguliert, ein Effekt, der nach chronischem Streß nicht aber nach akutem Streß nachzuweisen ist (Flügge, 1995; McKittrick et al., 1995; Steciuk et al., 2000). Diese mit Hilfe der Rezeptorautoradiographie gewonnenen Ergebnisse sind auf Grund fehlender [<sup>3</sup>H]-8-OH-DPAT Bindungsstellen in der Region CA3 von *Tupaia* nicht nachweisbar (Flügge, 1995). Die 5-HT<sub>1A</sub> Rezeptorreduktion in der Region CA1 ist vermutlich transkriptionsreguliert (s.a. 4.3.4.5), da eine adrenalectomie-induzierte Überexpression der Rezeptor mRNA durch eine Gabe von Corticosteron in Ratten rückgängig gemacht werden kann (Chalmers et al., 1993; Meijer und deKloet, 1995). Über eine Beeinflussung der HNN-Achse durch serotonerge Rezeptoren, die zu einer sekundär erhöhten Ausschüttung von Corticosteron in Ratten führt, ist ein Einfluß auf die nucleäre Transkriptionsregulation möglich (Matheson et al., 1997).

#### 4.3.4.4. Dopamin und Neuropeptide

Glucocorticoiden wird eine modulierende Rolle auf das dopaminerge System zugeschrieben, welches nach langanhaltend erhöhter Glucocorticoidkonzentration wiederum die HHN-Achse beeinflusst (Gilad et al., 1987, Gilad, 1987). Der bis auf die Pyramidenzellschicht bzw. Körnerzellschicht in allen Bereichen des Hippocampus nachgewiesene D<sub>2</sub>-Rezeptor wird in seiner Anzahl der Bindungsstellen nach chronisch psychosozialem Streß hochreguliert, während eine chronische Cortisol-Behandlung die Anzahl der Bindungsstellen im Hippocampus reduziert (Mijnster et al., 1999a+b und pers. Mitteilung). Auch wenn die detektierten Unterschiede klein sind, sind sie in der Summation der Effekte verschiedener Transmittersysteme im Zusammenhang der integrativen Funktion der Pyramidenneurone möglicherweise entscheidend. Ein direkter Einfluß von Glucocorticoiden auf die D<sub>2</sub>-Rezeptorexpression ist jedoch nach Lammers et al. (1999) nicht zu vermuten. Über das "second messenger" System ist ein Einfluß auf die Transkription jedoch denkbar.

Eine Wechselwirkung von chronischem Streß und Neuropeptiden in *Tupaia* ist bislang nur für den "Corticotropin-Releasing-Faktor" (CRF) untersucht (Fuchs und Flügge, 1995). Mit Hilfe der *in vitro*-Rezeptorautoradiographie konnte festgestellt werden, daß chronisch psychosozialer Streß die Anzahl der <sup>125</sup>I-CRF Bindungsstellen im Hippocampus in CA1-CA3 und im Gyrus dentatus reduziert. In Ratten ist die CRF-Rezeptor1 mRNA Expression im Hippocampus nach chronischem Streß gesteigert, während eine chronische Corticosteron Behandlung keinen Effekt zeigt (Iredale et al., 1996). Parallel durchgeführte Zellkulturexperimente haben gezeigt, daß die beobachteten Veränderungen auf eine veränderte Gentranskription zurückzuführen sind (Iredale et al., 1996).

Auch verschiedene andere Neuropeptide beeinflussen nach neuesten Erkenntnissen die HHN-Achse und die Streßantwort in Ratten (Nussdorfer et al., 2000). Zudem ist vor kurzem nachgewiesen worden, daß ein "Substance P"-Antagonist therapeutisch wirksam bei Depression ist (Hokfeld et al., 2000). Ein Charakteristikum von Neuropeptiden ist ihre Plastizität in der Expression, welche die Tatsache reflektiert (Hokfeld et al., 2000), daß eine Ausschüttung durch eine neue Synthese kompensiert werden muß. Eine reduzierte Synthese könnte so über eine veränderte Chromatinstruktur, wie eine vermehrte Heterochromatinaggregation sichtbar sein.

#### 4.3.4.5. Hormone

Da Testosteron die Herunterregulierung der 5-HT<sub>1A</sub> Rezeptoren im Hippocampus bei chronischem Streß renormalisiert, ist insbesondere eine Interaktion von Corticoid- und Androgenrezeptoren auf der Transkriptionsebene zu diskutieren (Chen et al., 1997, Flügge et al., 1998). Eine Wechselwirkung beider ligandenabhängigen Transkriptionsfaktoren ist in vitro nachgewiesen (Chen et al., 1997). Das Gleichgewicht aller Hormone ist zudem entscheidend für den physiologischen Status eines Tieres (Dubrovsky, 1993). Im Gegensatz zu chronisch psychosozial gestreßten Tieren, die zusätzlich zu einer verminderten Testosteronkonzentration im Blutplasma ein signifikant geringeres Testikelgewicht als Kontrolltiere aufweisen (Fischer et al., 1985; Isovich et al., 2000; Mijster 2001, eingereicht), ist in Cortisol-behandelten Tupaia die Testosteronkonzentration im Blutplasma nicht vermindert (Mijster et al., 1999; Isovich, pers. Mitteilung). So ist möglicherweise das fehlende Testosteron für die verstärkte Aggregation von Heterochromatin in CA3 in gestreßten Tieren verantwortlich. Dies ist einmal über eine direkte Interaktion auf der Rezeptorebene denkbar sowie auch über eine mögliche Reduktion des inhibitorischen Einflusses von Testosteron auf die HHN-Achse (Handa et al., 1994). Geht man davon aus, daß im Gegensatz zu Cortisol-behandelten Tieren die GR von chronisch psychosozial gestreßten Tupaia nicht dauerhaft hoch aber wesentlich öfter als in Kontrolltieren besetzt sind (4.3.2.), könnte eine durch die verminderte Testosteronkonzentration im Blutplasma reduzierte Möglichkeit der Heterodimerisation von GR mit Androgenrezeptoren einen entscheidenden Einfluss auf die Transkriptionsrate verschiedener Gene haben. Ähnliche steroid-induzierte ultrastrukturelle Effekte des Nucleoplasmas in hypothalamischen Neuronen wurden in weiblichen Ratten beschrieben. Ovariectomie und damit das Entfernen der gonadalen Steroide erhöhte die Formation von Heterochromatin, während eine gleichzeitige Östrogenbehandlung diesen Effekt aufhob (Jones et al., 1985).

#### 4.3.5. Streß und Zelltod

##### 4.3.5.1. Zellzahl

Die Anzahl von Pyramidenneuronen und Körnerzellen im Hippocampus von Ratten und nichthumanen Primaten wurde in Relation zu erhöhten Corticosteroidspiegeln und Streß in den vergangenen Jahren mehrfach quantifiziert

(Sapolsky et al., 1985; Uno et al., 1989; Issa et al., 1990; Sapolsky et al., 1990; Bodnoff et al., 1995; Sousa et al., 1998a+b; Leverenz et al., 1999). Zellzählungen im Gehirn von *Tupaia belangeri* lagen bislang nicht vor. Auf Grund der älteren Studien wurde angenommen, daß sowohl eine hohe Corticosteroid-Konzentration als auch Streß korreliert sind mit einer Zerstörung und dem darauf folgenden Verlust von Pyramidenneuronen in der Region CA3 (Sapolsky et al., 1985; Uno et al., 1989; Issa et al., 1990; Sapolsky et al., 1990), sowie in einigen Fällen auch in CA1 (Sapolsky et al., 1985; Kerr et al., 1991). Anhand dieser Ergebnisse wurden daraufhin auch einige der streß-induzierten Beeinträchtigungen von Lern- und Gedächtnisleistungen erklärt (Issa et al., 1990; McEwen und Sapolsky, 1995).

Der postulierte irreversible Verlust von Neuronen im Hippocampus nach Streß und chronischer Corticosteroidgabe wird jedoch in den letzten Jahren verstärkt in Frage gestellt (Wickelgren, 1996; Vollmann-Honsdorf et al., 1997; Sousa et al., 1998a+b; Leverenz et al., 1999). Bei *Tupaia belangeri* sind trotz der nachgewiesenen erhöhten Corticoidspiegel während der 28 Tage dauernden Streßperiode keine signifikanten Unterschiede in der Zahl der Pyramidenneuronen in CA1 und CA3 und der Körnerzellen im Gyrus dentatus festzustellen (3.6.). Im Vergleich zu früheren Studien sind dabei mehrere Punkte zu beachten:

1. Es muß deutlich unterschieden werden, welchen Behandlungen die Versuchstiere unterzogen wurden. Die Auswirkungen von psychosozialen Streß und chronischer Corticosteroidbehandlung auf den Hippocampus unterscheiden sich biochemisch wie auch anatomisch voneinander (s. 4.3.). Wie in Kapitel 3.5. beschrieben und im vorangegangenen Teil der Diskussion bereits erwähnt, unterscheidet sich auch die nukleäre Ultrastruktur hippocampaler Pyramidenneurone von chronisch psychosozial gestreßten und chronisch Cortisol-behandelten Tupaias. Diese Unterschiede sind ein Hinweis auf unterschiedliche bzw. additive oder einfach komplexere Prozesse, die durch chronisch psychosozialen Streß induziert werden im Vergleich zu einer ausschließlichen Cortisolgabe. In der Vergangenheit sind die Effekte von Streß, chronisch erhöhten Glucocorticoidkonzentrationen und Corticosteroidgabe häufig interpretativ vermischt bzw. gleichgesetzt worden. Dies muß jedoch getrennt betrachtet werden.
2. Die meisten Untersuchungen im Hippocampus, die Stellung nehmen zu einem Neuronenverlust in Verbindung mit hohen Glucocorticoidkonzentrationen, beziehen sich auf die Folgen einer höher dosierten chronischen Corticosteroidgabe. Eine in

diesem Zusammenhang sehr häufig zitierte Studie beschreibt einen Pyramidenzellverlust bei Ratten, vorwiegend in CA3 von 20-25% nach einer täglichen Corticosteron-Injektion für 3 Monate (Sapolsky et al., 1985). Dabei muß erwähnt werden, daß nach 3 Monaten nur 50% der mit Corticosteron behandelten Tiere überlebten, die Dosis also längerfristig zunehmend letal wirkte. Ausgehend von diesen Ergebnissen bestätigten einige frühere Untersuchungen einen Zelltod (Sapolsky et al., 1990; Issa et al., 1990), während andere bei teilweise vergleichbaren Versuchsbedingungen keine so offensichtliche Zelldegeneration nach Corticosteroidbehandlung in Ratten und nichthumanen Primaten feststellen konnten (Bardegett et al., 1994; Bodnoff et al., 1995; Sousa et al., 1998a; Leverenz et al., 1999). Da sich die Untersuchungen widersprechen, sollte ein Rückschluß auf die Prozesse bei chronischem Streß auch wegen der in Kapitel 4.3.2. etc. diskutierten Ansätze vermieden werden.

3. Daß chronischer Streß zu einem Pyramidenzellverlust im Hippocampus führt, wie mehrere Veröffentlichungen rezensieren (Reagan and McEwen, 1997; McEwen, 1999; Schwendt and Jezova, 2000), wurde nur in wenigen Studien untersucht: Während Kerr et al. (1991) einen Neuronenverlust in CA1 bei alten aber nicht bei jungen und mittelalten F344-Ratten nach 3 Monaten Fußschockstreß zeigen konnte, wurde in einer Studie an freilebenden Primaten, der grünen Meerkatze (*Cercopithecus aethiops*), auf Grund von anhaltendem sozialen Streß in der Gefangenschaft ein Zellverlust in CA1 und CA3 festgestellt (Uno et al., 1989). Es ist dabei wichtig zu bemerken, daß alle Primaten, bei denen eine geringere Neuronanzahl festgestellt wurde, an extremem Streß sowie z.T. daraus resultierenden Magengeschwüren spontan starben. Dahingegen wurden die Kontrolltiere euthanasiert. In einer neueren Studie an chronisch gestreßten Wistar-Ratten sowie in der vorliegenden Arbeit konnte jedoch kein signifikanter Zellverlust detektiert werden (Vollmann-Honsdorf et al., 1997; Sousa et al., 1998a). Bei einem interartspezifischen Vergleich und sogar bei einem intraartspezifischen Vergleich (z.B. verschiedene Rattenstämme) neuroanatomischer Parameter sollte während eines Streßversuches immer der physiologische Zustand der Tiere mit beachtet werden. Diese Daten liegen für einen Vergleich aus der Primatenstudie nicht vor (Uno et al., 1989). Eine unterschiedliche Reaktivität der HHN-Achse kann die Ergebnisse beeinflussen. So habituierten die meisten Rattenstämme an wiederholten Streß während z.B. Fischer 344 Ratten wenig bis keine Adaptation

oder Habituation der HHN-Achsen Antwort auf wiederholten Streß zeigen (Dhabhar et al., 1997). Tupaia zeigt bei chronischem psychosozialen Streß eine anhaltende Hyperaktivität der HHN-Achse (s. 4.2.), eine starke Abnahme der Zellzahl in den CA Regionen konnte jedoch nicht festgestellt werden (3.6.; Vollmann-Honsdorf et al., 1997).

4. In der Studie von Sousa et al. (1998a) sowie in der vorliegenden Arbeit, die nach Streß keinen Zellverlust feststellen konnten, wurden im Gegensatz zu den vorhergehenden Arbeiten stereologische Methoden der Zell-Quantifizierung verwendet. Frühere Studien haben Zelldegenerationsprozesse nach Streß und Corticoidgabe dagegen mit Hilfe von densitometrischen Messungen der Zellzahl untersucht (Sapolsky et al., 1985; Uno et al., 1989; Issa et al., 1990; Sapolsky et al., 1990; Bodnoff et al., 1995). Eine Reduktion der numerischen Dichte kann jedoch nicht unvoreingenommen als ein Beweis für einen Zellverlust interpretiert werden, da sie von Faktoren wie einer Schrumpfung oder Schwellung des Gewebes, der Schnittdicke, sowie der Zellgröße, -form und -orientierung beeinflusst wird (Landfield, 1981; Swaab und Uylings, 1987). Im Gegensatz dazu ist die Schätzung absoluter Werte mit z.B. dem "optical fractinator" unabhängig von Volumenänderungen oder den erwähnten Zellparametern (Gundersen et al., 1988). Dies ist insbesondere deshalb von Bedeutung, da Volumenänderungen des Hippocampus im Zusammenhang mit chronisch erhöhten Glucocorticoiden und Streß bei Menschen und Ratten festgestellt wurden (Sheline, 1996; Lupien et al., 1998). Auch bei Tupaia ist mit Hilfe von MRI-Messungen ein Trend zur Volumenreduktion der Hippocampusformation während und nach Streß und Cortisol-Behandlung beobachtet worden (Ohl et al., 2000). Dieser Trend des verringerten Hippocampusvolumens ist auch post mortem im Vergleich von ungestressten Kontrolltieren mit 5 Wochen lang psychosozial gestreßten Tieren sichtbar - aber wie die MRI-Meßergebnisse nicht signifikant ( $t_{10} = 2,219$ ,  $p = 0,051$ ; Lucassen et al., 2001). Eine Zellquantifizierung mit dem "optical fractinator" schließt jedoch eine Beeinflussung derselben durch Volumenänderungen aus.

Akuter und chronischer psychosozialer Streß bei Tupaia reduziert die Proliferationsrate von Zellen im Gyrus dentatus (Gould et al., 1997, Fuchs et al., 1997). Chronischer psychosozialer Streß erhöht in der polymorphen Schicht des Gyrus dentatus die Anzahl apoptotischer Zellen (3.7.). Nach chronischem Streß ist jedoch kein signifikanter Unterschied in der Anzahl der Körnerzellen im Vergleich



zur Gruppe der Kontrolltiere festzustellen. Die akut reduzierte Proliferationsrate und die am 27./28. Streßtag erhöhte Zahl apoptotischer Zellen läßt somit keinen Rückschluß auf eine langfristige Änderung der Zellzahl im Gyrus dentatus zu. Wie auch auf der Rezeptorebene für verschiedene monoamine Rezeptoren nachgewiesen, könnte eine Chronifizierung des psychosozialen Stresses beispielsweise einen Umkehrprozeß bewirken (Flügge, 2000). Die folglich gesteigerte Proliferationsrate wäre daraufhin ein kompensatorischer Mechanismus der erhöhten Apoptoserate. Da exzitatorische Transmitter die Proliferationsrate im Gyrus dentatus von Tupaia über Glutamatrezeptoren inhibieren (Gould et al., 1997), ist auch über eine langfristige Glutamatrezeptormodifikation eine Stabilisierung der Gesamtzellzahl möglich. Neben den in Kapitel 4.3.4.1. angeschnittenen Diskussionspunkten ionotroper Glutamatrezeptoren zeigen auch aktivierte metabotrophe Glutamatrezeptoren neuroprotektive Eigenschaften (Nicoletti et al., 1999).

Da die Zahl der Pyramiden- und Körnerzellen im Hippocampus erstmals in Tupaia quantifiziert wurden, folgt ein kurzer interartspezifischer Vergleich. Mit durchschnittlich 358076 Neuronen in CA1 und 240444 Neuronen in CA3 liegt die mit Hilfe stereologischer Methoden errechnete Zahl der Pyramidenneurone von Tupaia in der Größenordnung von Ratten. Während bei Ratten jedoch konsistent 1,2 Millionen höchstens jedoch 1,5 Millionen Körnerzellen im Gyrus dentatus gezählt wurden, waren es bei Tupaia im Schnitt 2 Millionen Körnerzellen (West et al., 1991; Rapp und Gallagher, 1996; Rasmussen et al., 1996; Sousa et al., 1998a+b). So ist trotz einer Ausnahme und der großen inter-individuellen Variabilität in der Tupaia-Streßgruppe davon auszugehen, daß Tupaia in der Regel 15% mehr Körnerzellen als Ratten aufweisen. Daraus läßt sich bei adulten Tupaia im Vergleich zu Laborratten eine möglicherweise potentiell größere Verarbeitungskapazität des Gyrus dentatus ableiten (Kempermann et al., 1997).

Der Koeffizient der interindividuellen Varianz (CV) liegt im interartspezifischen Vergleich bei Tupaia mit 0,18 für beispielsweise die CA Regionen zwischen denen der durch Inzucht evolvierten Rattenstämme mit 0,12 und des Menschen mit 0,25 (West und Gundersen, 1990; West et al., 1991; West, 1993; Rasmussen et al., 1996; Sousa et al., 1998b). Es ist jedoch nicht auszuschließen, daß auch die Tatsache, das die vorliegende Studie in zwei Teilen ausgewertet wurde, zu der

errechneten Höhe des CV beiträgt. Der CV von CA1 und CA3 lag im ersten Auswertungsteil mit je durchschnittlich 0,14 niedriger, wenn auch nach wie vor zwischen dem von Ratte und Mensch (s. 3.6.; Vollmann-Honsdorf et al., 1997).

Die zweiteilige Auswertung hat jedoch den Vorteil, daß die angewandte Methodik in dem selben Versuch nochmals intern überprüft werden konnte. Divergenzen der Ergebnisse wurden nicht erkannt. Beide Teile zeigen dasselbe in Abschnitt 3.6. zusammengefasst dargestellte Ergebnis eines nicht nachweisbaren Verlustes von Pyramidenneuronen des Hippocampus in chronisch psychosozial gestreßten Tupaias (s.a. Vollmann-Honsdorf et al., 1997)

#### 4.3.5.2. Apoptose

Folgt man der Glucocorticoid-Kaskaden-Hypothese, so atrophieren die apicalen Dendriten in CA3 Pyramidenneuronen auf Grund chronisch erhöhter Glucocorticoid- Konzentration, welches in Kombination mit einer verstärkten Aktivierung von NMDA Rezeptoren und einem resultierenden, erhöhten  $Ca^{2+}$  Einstrom apoptotische, exotoxische Prozesse nach sich zieht (Sapolsky et al., 1986; Reagan and McEwen, 1997). In Tupaia konnte jedoch in keinem der histologischen, nisslgefärbten Schnitte von Streßtieren deutlich apoptotische oder nekrotische Neurone detektiert werden (s. 3.3. und 3.6.). Lediglich in einem semi-dünn Schnitt eines Kontrolltieres war eine hyperchromatische Zelle zu erkennen. Auf der ultrastrukturellen Ebene hatten ebenfalls keine der untersuchten Pyramidenneurone apoptotische oder nekrotische Merkmale.

Durch die Methode des "in situ-end labeling" (ISEL), die durch eine Bindung an DNA-Bruchstücke eine Fragmentierung der DNA sichtbar macht, waren jedoch einzelne apoptotische Zellen in geringer Anzahl im Gewebe von Kontrolltieren und gestreßten Tupaias zu finden (s.3.7.). Obwohl nicht alle Zellen, die mehrere DNA-Bruchstücke enthalten, zwangsläufig sterben, sondern diese auch von der Zelle repariert werden können, ist DNA-Fragmentierung eines der deutlichsten Kennzeichen von Apoptose. Zudem zeigten alle ISEL-positiven Zellen in der vorliegenden Untersuchung zusätzlich klare apoptotische Charakteristika. Nekrotische bzw. so genannte Typ II apoptotischen Merkmale (Conti et al., 1998) wurden nicht detektiert.

Nach Hu et al. (1997) ist im Gehirngewebe eine steroid-abhängige Apoptose von Neuronen nach ungefähr 72 h beendet. Das in der Hippocampusformation und im

entorhinalen Cortex von Tupaia geringe Auftreten apoptotischer Zellen steht somit im Einklang mit dem nur über diesen kurzen Zeitraum zu detektierenden apoptotischen Prozesses. Dabei ist zu beachten, daß im Gegensatz zu einer induzierten Apoptose zu einem festgelegten Zeitpunkt in einem eng umgrenzten Gebiet, die Chance eine voranschreitende Apoptose in einer heterogenen Gehirnstruktur bei einer chronischen Störung zu detektieren, sehr gering ist (Lucassen et al., 1997; Perry et al., 1998a, 1998b ; Raff, 1998). So representieren die detektierten Zellen dieses Versuches eher eine turn-over Rate, als festgelegte Grenzen, wie dies bei einer Schätzung der Gesamt-Zellzahl der Fall ist (s. 4.3.5.1.; Manjo und Joris, 1995; Hu et al., 1997; Raff, 1998). Somit ist festzustellen, daß bei Berücksichtigung der Kinetik der Apoptose nur die Fraktion eines fortschreitenden Zelltodes des 27./28. Tages der Streßperiode detektiert worden ist. Das gilt im Grundsatz ebenso für die Kontrolltiere und läßt vermuten, daß die strukturellen Veränderungen über einen längern Zeitraum wesentlich größer sind. Zudem muß der zeitliche Verlauf bei der Interpretation der Ergebnisse berücksichtigt werden. So ist es theoretisch möglich, daß unter Berücksichtigung der synaptischen Verbindungen im Hippocampus die zu einem früheren Zeitpunkt z.B. in CA3 induzierte Apoptose als Folge von retrograder oder anterograder Projektionen als Apoptose in anderen Subregionen zu einem späteren Zeitpunkt sichtbar ist. Die Apoptose in CA1 Stratum radiatum könnte ein Beispiel dafür sein.

Der Gyrus dentatus ist wegen der adulten Neurogenese und Synaptogenese eine sehr plastische Gehirnregion (Gould et al., 1997; Teuchert-Noodt, 2000). Die gesteigerte Anzahl apoptotischer Zellen könnte somit einen stärkeren Zelltod adulter oder neu gebildeter Zellen bedeuten. Ob insbesondere neugebildete Neurone in Folge von Streß sterben, muß noch untersucht werden.

In CA3 konnte keine signifikante Änderung der Apoptose nach Streß festgestellt werden. Folgt man der Theorie der Glucocorticoid-Kaskade, die besagt, daß eine Zelldegeneration bei anhaltend erhöhten Glucocorticoid-Konzentrationen vorwiegend in CA3 zu finden ist, so trifft dies für das psychosoziale Streßparadigma von Tupaia nicht zu. Das Fehlen einer signifikanten Änderung der Apoptoserate in CA3 stimmt jedoch überein mit früheren Ergebnissen an Tupaia, die eine Atrophie der apikalen Dendriten ohne einen detektierbaren Zellverlust in CA3 aufweisen (s. 4.3.5.1.; Magariños et al., 1996; Vollmann-Honsdorf et al., 1997). Additiv zu der Tatsache, daß die dendritische Atrophie reversibel ist, wäre somit zu folgern, daß es

sich bei dem atrophischen Prozeß eher um morphologische als um degenerative Veränderungen handelt. Einen Hinweis auf verstärkten Zelltod im Hippocampus von *Tupaia* nach Streß gibt es auf Grund dieser Befunde und der nicht signifikant unterschiedlichen Zellzahl nicht.

Die Gesamtzahl apoptotischer Zellen in allen untersuchten Teilen des Hippocampus unterschied sich signifikant bei gestreßten Tieren im Vergleich zu den Kontrolltieren. Dabei wiesen die Kontrolltiere mehr apoptotische Zellen auf. Es ist unwahrscheinlich, daß diese Unterschiede auf ein verändertes Volumen zurückzuführen sind, da in einer vergleichbaren Studie nach 35 Tagen Streß das Volumen des Hippocampus von *Tupaia* nicht signifikant verändert war (Lucassen et al., 2001).

Die nach Streß reduzierte Apoptose ist vorwiegend auf eine geringere Anzahl ISEL-positiver Zellen in faserreichen Schichten zurückzuführen. Schichten mit einer großen Neuronendichte wie Stratum pyramidale und Stratum granulosum weisen dagegen keinerlei signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen auf. Unter Berücksichtigung der – dreidimensionalen - Position in Schichten und Substrukturen des Hippocampus mit vielen bzw. wenigen Perikarya ist somit zu vermuten, daß es sich bei den markierten apoptotischen Zellen nicht um einen Verlust von Pyramiden- und Körnerzellen sondern um Interneurone oder Glia handelt. Nach Conti et al. (1998) ist es unwahrscheinlich, daß der Phenotyp neuronaler Apoptose sich deutlich von der bei Gliazellen unterscheidet. Wegen der starken Fixierung und Kondensierung ISEL-positiver Zellen konnten diese nicht zusätzlich mit einem Antikörper gegen Gliazellen markiert werden. Somit ist jedoch nicht klar festzustellen, welcher Zelltyp von der Apoptose betroffen ist.

Apoptose wird über Proteine der bcl-2 Familie reguliert. Einigen, wie bcl-2 selbst, wird bei der Regulation von Zelltod eine antagonistische Rolle zugewiesen (Yin et al., 1994; Korsmeyer, 1995; Kroemer, 1997). Ein Einfluß von Steroiden auf die Expression von bcl-2 in adulten Neuronen im Gehirn wurde bereits nachgewiesen (Garcia-Segura et al., 1998). Andere Proteine, wie bax, wirken agonistisch auf den apoptotischen Prozeß und bilden u.a. Heterodimere mit bcl-2 (Yin et al., 1994). Da eine kompetitiv regulatorische Funktion im apoptotischen Prozeß dieser Genprodukte in Abhängigkeit von Steroiden vermutet wird, ist auch eine indirekte glucocorticoidabhängige Regulation der Apoptose in *Tupaia* denkbar.

#### 4.4. Schlußfolgerung

Chronisch psychosozialer Streß in *Tupaia* führt zu einer nicht adaptierten Hyperaktivität der HHN-Achse sowie einer nicht adaptierten Aktivität des sympathoarenomedullaren Systems. Ein durch chronischen Streß oder Cortisolgabe chronisch erhöhter Corticoidspiegel führt zu einer verstärkten Bildung von Heterochromatin in Pyramidenneuronen des Hippocampus. Streß erhöht die Heterochromatinaggregation in CA3 Pyramidenneuronen und Cortisol in CA1. Eine Korrelation mit der dendritischen Atrophie in CA3 besteht nicht, da nach einer chronischen Cortisolgabe keine signifikanten Änderungen der Heterochromatinaggregation in CA3 nachgewiesen werden konnte. Da Heterochromatin als hoch kondensiertes und transkriptionsinaktives Chromatin beschrieben ist, folgern wir, daß chronischer Streß und Cortisol verschiedene Gene regionsspezifisch in Pyramidenneuronen des Hippocampus mit bisher unbekanntem Ausmaß inaktiviert. Als modulatorische Faktoren der Transkriptionsregulation sind zum Teil bereits nachgewiesene Gleichgewichtsverschiebungen in exzitatorischen oder monoaminergen Transmittersystemen oder bei anderen Steroidhormonen zu vermuten. Inwieweit diese Einfluß auf glucocorticoidinduzierte morphologische Veränderungen nehmen, ist bislang unklar und bedarf einer Reihe weiterer Untersuchungen.

Anders als bisher postuliert, hat chronisch psychosozialer Streß in *Tupaia* keine verstärkten apoptotischen Prozesse und keine Änderung der Zahl der Pyramidenneurone zur Folge. Einen Hinweis auf verstärkten Zelltod nach chronisch psychosozialer Streß im Hippocampus von *Tupaia* gibt es auf Grund der vorliegenden Ergebnisse nicht. Chronisch psychosozialer Streß in *Tupaia* hat somit eher morphologische als degenerative Veränderungen zur Folge.

Dies bedeutet für die Auswirkungen von chronischem Streß auf die exekutiven Funktionen des Hippocampus, daß kein Zellverlust für veränderte Gedächtnisleistungen als Ursache zu nennen ist. Wie bereits von Xu et al. (1998) postuliert, ist eher eine Kontrolle der synaptischen Plastizität durch eine veränderte Transkription und Translation für streßabhängige Lern- und Gedächtnisleistungen verantwortlich. Unterstützend kommt hinzu, daß die nachgewiesenen zeitlich dynamischen Auswirkungen auf die kognitiven Fähigkeiten von *Tupaia* nicht direkt und ausschließlich durch Glucocorticoide moduliert werden (Ohl und Fuchs, 1999).

Bei der Erforschung emotional gefärbter Streßreaktionen, die psychische Faktoren wie Erwartungshaltungen oder kognitiv integrative Funktionen betreffen, muß eine Vielzahl interagierender hormoneller und neuronaler Gleichgewichtsverschiebungen berücksichtigt werden. Dies ist unerlässlich, um langfristig Ansätze entwickeln zu können, mit denen streßbedingte zentralnervöse Veränderungen beim Menschen therapiert werden können.

## 5. ZUSAMMENFASSUNG

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Auswirkungen von chronisch psychosozialen Stress auf die Morphologie und belastungsinduzierte Degeneration der Pyramidenneurone und Körnerzellen im Hippocampus zu untersuchen. Die Theorie eines glucocorticoidabhängigen Zelltodes und einem daraus resultierenden massiven Pyramidenneuron-Verlust sollte mit Hilfe kontrollierter, natürlicher Stressbedingungen überprüft werden. *Tupaia belangeri* wurde als Tiermodell ausgewählt, um eine Induktion und Dauer chronisch psychosozialen Stress bei kontrolliertem Einsatz eines rein psychosozialen Stressors unter Laborbedingungen durchführen zu können.

Als Parameter zur Objektivierung der Intensität des Stresszustandes wurde das Körpergewicht, die Cortisol- und bei einem Teil der Tiere die Noradrenalin-Konzentration im Morgenurin gemessen. Pyramidenneurone des Hippocampus wurden auf eine stressabhängig unterschiedliche Färbereaktion mit Nissl-Farbstoff getestet, die Ultrastruktur der Zellkerne beschrieben und deren Anteil an Heterochromatin quantifiziert. Weiterhin wurde überprüft, ob mögliche ultrastrukturelle Veränderungen allein auf eine gesteigerte Cortisol-Einwirkung zurückzuführen sind. Außerdem wurde eine neue stereologische Methode der Zellquantifizierung für *Tupaia* etabliert und die Anzahl der Neurone des Hippocampus von gestressten und ungestressten Tieren quantifiziert. Mit Hilfe des "in situ-end labeling" konnten in Kooperation mit Dr. P. Lucassen zudem apoptotische Zellen im Hippocampus beider Gruppen detektiert werden.

Chronisch psychosozial gestresste *Tupaia*s reduzieren ihr Gewicht und haben eine nicht adaptierende Hyperaktivität der HPA-Achse und des sympathoadrenomedularen Systems. Die verstärkte Färbereaktion von Pyramidenneuronen in der Subregion CA3 gestresster *Tupaia*s ist ultrastrukturell als eine erhöhte relative Anzahl und Gesamtfläche von Heterochromatinaggregaten erkennbar. Bei Cortisol-behandelten Tieren ist diese Veränderung der Färbereaktion oder Heterochromatinaggregation nicht nachweisbar. Im Gegensatz dazu ist die Anzahl der Heterochromatinaggregate in der Subregion CA1 nach einer Cortisol-Behandlung größer, während Stress keinen Effekt erkennen läßt. Da Heterochromatin als hoch kondensiertes und transkriptionsinaktives Chromatin

beschrieben ist, inhibieren chronischer Streß und Cortisol offenbar verschiedene Gene regionsspezifisch in Pyramidenneuronen des Hippocampus.

Die Gesamtzahl der Pyramidenneurone in CA1 und CA3 sowie im Gyrus dentatus von gestreßten Tupaias ist im Vergleich mit ungestreßten Kontrollen nicht signifikant verändert. Im gesamten Hippocampus gestreßter Tupaias sowie in dessen Subregion Stratum radiatum von CA1 aber nicht in der als sensitiv geltenden Subregion CA3 reduziert sich die Anzahl apoptotischer Zellen. Im entorhinalen Cortex steigt sie dagegen. Einen Hinweis auf verstärkten Zelltod nach chronisch psychosozialem Streß im Hippocampus von Tupaia gibt es auf Grund dieser Ergebnisse nicht. Chronisch psychosozialer Streß in Tupaia hat eher morphologische als degenerative Veränderungen zur Folge, die nicht allein durch Cortisol gesteuert, sondern vermutlich auch von anderen Faktoren wie Neurotransmittern und Hormonen beeinflusst sind.

Dies bedeutet für die Auswirkungen von chronischem Streß auf die exekutiven Funktionen des Hippocampus, daß kein Zellverlust sondern vermutlich eine Kontrolle der synaptischen Plastizität durch eine veränderte Transkription und Translation für streßabhängige modifizierte Lern- und Gedächtnisleistungen verantwortlich ist.



## 6. LITERATUR

- ALEXANDER SL AND IRVINE CH (1998) The effect of social stress on adrenal axis activity in horses: the importance of monitoring corticosteroid-binding globulin capacity, *J Endocrinol* (157), 425-432.
- ANDERSEN P (1990) Synaptic integration in hippocampal CA1 pyramids, *Progress Brain Res* (83), 215-222.
- AUE D (1988) Konfrontationen zwischen männlichen Spitzhörnchen (*Tupaia belangeri*): Konsequenzen der Sozialkontakte für Verhalten und Physiologie sowie der Einfluß individueller und äußerer Faktoren auf die Dominanzentscheidungen, Dissertation, Universität Göttingen.
- BAJKOWSKA M, BRANSKI P, SMIALOWSKA M AND PILC A (1999) Effect of chronic antidepressant od electroconvulsive shock treatment on mGluR1a immunoreactivity expression in the rat hippocampus, *Pol J Pharmacol (nur Abstract)* (51), 539.
- BARDGETT ME, TAYLOR GT, CSERNANSKY JG, NEWCOMER JW AND NOCK B (1994) Chronic corticosterone treatment impairs spontaneous alternation behavior in rats, *Behav Neural Biol* (61), 186-190.
- BARTANUSZ V, AUBRY J-M, PAGLIUSI S, JEZOVA D, BAFFI J AND KISS JZ (1995) Stress-induced changes in messenger RNA levels of N-Methyl-D-Aspartate and AMPA receptor subunits in selected regions of the rat hippocampus and hypothalamus, *Neuroscience* (66), 247-252.
- BEATO M AND SÁNCHEZ-PACHECO A (1996) Interaction of steroid hormone receptors with the transcription initiation complex, *Endocr Rev* (17), 587-609.
- BETTLER B AND MULLE C (1995) Neurotransmitter receptors II: AMPA and Kainate receptors, *Neuropharmacology* (34), 123-139.
- BHATNAGAR S AND DALLMAN M (1998) Neuroanatomical basis for facilitation of hypothalamic-pituitary-adrenal responses to a novel stressor after chronic stress, *Neuroscience* (84), 1025-1039.
- BLANCHARD DC, SPENCER RL, WEISS SM, BLANCHARD RJ, MCEWEN BS AND SAKAI RR (1995) Visible burrow system as a model of chronic social stress: behavioral and neuroendocrine correlates, *Psychoneuroendocrinology* (20), 117-134.

- BODNOFF SR, HUMPHREYS AG, LEHMAN JC, DIAMOND DM, ROSE GM, AND MEANEY MJ (1995) Enduring effects of chronic Corticosterone treatment on spatial learning, synaptic plasticity, and hippocampal neuropathology in young and mid-aged rats, *J Neurosci* (15), 61-69.
- BOUTEILLE M (1972) Ultrastructural localisation of proteins and nucleoproteins in the interphase nucleus, *Acta Endocrinol Suppl (Copenh)*. 1972;168:11-34.
- BRUNDTLAND GH (1999) Raising awareness, fighting stigma, improving care, Press Release WHO/67.
- CAMMERMEYER J (1978) Is the solitary dark neuron a manifestation of postmortem trauma to the brain inadequately fixed by perfusion?, *Histochem* (56), 97-115.
- CANNON WB (1915) Bodily changes in pain, hunger, fear, and rage. Bradford, Boston.
- CHALMERS DT, KWAK SP, MANSOUR A, AKIL H AND WATSON SJ (1993) Corticosteroids regulate brain hippocampal 5-HT<sub>1A</sub> receptor mRNA expression, *J Neurosci* (13), 914-923.
- CHAOULOFF F (2000) Serotonin, stress and corticoids, *J Psychopharmacol* (14), 139-151.
- CHECKLEY S (1992) Neuroendocrine mechanisms and the precipitation of depression by life events, *Br J Psychiatry* (160), 7-17.
- CHEN S-Y, WANG J, YU G-Q, LIU W AND PEARCE D (1997) Androgen and glucocorticoid receptor heterodimer formation. A possible mechanism for mutual inhibition of transcriptional activity, *J Biol Chem* (272), 14087-14092.
- CHROUSOS GP AND GOLD PW (1992) The concepts of stress and stress system disorders. Overview of Physical and behavioral Homeostasis, *J Am Med Ass* (267), 1244-1252.
- COHEN JJ (1993) Apoptosis, *Immunol Today* (14), 126-130.
- COHEN S, TYRRELL DAJ AND SMITH AP (1991) Psychological stress and susceptibility to the common cold, *N Engl J Med* (325), 606-612.
- CONTI AC, RAGHUPATHI R, TROJANOWSKY JQ AND MCINTOSH TK (1998) Experimental brain injury induces regionally distinct apoptosis during the acute and post-traumatic period, *J Neurosci* (18), 5663-5672.

- CRUZ-ORIVE LM AND WEIBEL ER (1990) Recent stereological methods for cell biology: a brief survey, *Am J Physiol* (258), L148-L156.
- DACHIR S, KADAR T, ROBINZON B AND LEVY A (1993) Cognitive deficits induced in young rats by long-term Corticosterone administration, *Behav Neural Biol* (60), 103-109.
- DAHLSTRÖM A AND FUXE K (1964) Evidence for the existence of monoamine-containing neurons in the central nervous system. I. Demonstration of monoamines in the cell bodies of brain stem neurons, *Acta Physiol Scand* (suppl. 232), 1-55.
- DALLMAN MF (1993) Stress update. Adaptation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis to chronic stress, *TEM* (4), 62-69.
- DEBOER SF, KOOPMANS SJ, SLANGEN JL AND VAN DER GUGTEN J (1990) Plasma catecholamine, corticosterone and glucose responses to repeated stress in rats: effect of interstressor interval length, *Physiol Behav* (47), 1117-1124.
- DEKLOET ER, VREUGDENHIL E, OITZL MS AND JOELS M (1998) Brain corticosteroid receptor balance in health and disease, *Endoc Rev* (19), 269-301.
- DEUSCHLE M, WEBER B, COLLA M, DEPNER M AND HEUSER I (1998) Effects of major depression, aging and gender upon calculated diurnal free plasma cortisol concentration: a re-evaluation study, *Stress* (2), 281-287.
- DHABHAR FS, MCEWEN BS AND SPENCER RL (1997) Adaptation to prolonged or repeated stress - comparison between rat strains showing intrinsic differences in reactivity to acute stress, *Neuroendocrinol* (65), 360-368.
- DINAN TG (1994) Glucocorticoids and the genesis of depressive illness. A psychobiological model, *Br J Psych* (164), 365-371.
- DUBROVSKY B (1993) Effects of adrenal cortex hormones on limbic structures: Some experimental and clinical correlations related to depression, *J Psychiatr Neurosci* (18), 4-16.
- DUNN JD AND ORR SE (1984) Differential plasma corticosterone responses to hippocampal stimulation, *Exp Brain Res* (54), 1-6.

- EICHENBAUM H, DUDCHENKO P, WOOD E, SHAPIRO M AND TANILA H (1999) The hippocampus, memory and place cells: Is it spacial memory or a memory space?, *Neuron* (23), 209-226.
- FELDMAN S AND CONFORTI N (1980) Participation of the dorsal hippocampus in the glucocorticoid feedback effect on adrenocortical activity, *Neuroendocrinol* (30), 52-55.
- FISCHER HD, HEINZELLER T AND RAAB A (1985) Gonadal responses to psychosocial stress in male tree shrews (*Tupaia belangeri*). Morphometry of testis, epididymis and prostate, *Andrologia* (17), 262-275.
- FLÜGGE G (1995) Dynamics of central nervous 5-HT<sub>1A</sub>-receptors under psychosocial stress, *J Neurosci* (15), 7132-7140.
- FLÜGGE G (1996) Alterations in the central nervous  $\alpha_2$ -adrenoceptor system under chronic psychosocial stress, *Neuroscience* (75), 187-196.
- FLÜGGE G (1999) Effects of cortisol on brain  $\alpha_2$ -adrenoceptors: potential role in stress, *Neurosci Biobehav Rev* (23), 949-956.
- FLÜGGE G (2000) Regulation of monoamine receptors in the brain: Dynamic changes during stress, *Int Rev Cytol* (195), 145-213.
- FLÜGGE G, AHRENS O AND FUCHS E (1997)  $\beta$ -adrenoceptors in the tree shrew brain. II. Time-dependent effects of chronic psychosocial stress on (<sup>125</sup>I)iodocyanopindolol binding sites, *Cell Mol Neurobiol* (17), 417-432.
- FLÜGGE G, KRAMER M, RENSING S AND FUCHS E (1998) 5HT<sub>1A</sub>-receptors and behaviour under chronic stress: selective counteraction by testosterone, *Eur J Neurosci* (10), 101-109.
- FOLIN O (1905) A theory of protein metabolism, *Am J Physiol* (13), 117-138.
- FRANKENHAEUSER M (1982) Challenge-control interaction as reflected in sympathetic-adrenal and pituitary-adrenal activity: comparison between the sexes, *Scan J Psychol* (Suppl. 1), 158-164.
- FREUND TF AND BUZSÁKI G (1996) Interneurons of the hippocampus, *Hippocampus* (6), 347-470.

- FUCHS E (1999) Tree shrews, in: Poole T (ed.) UFAW Handbook on the care and management of laboratory animals, 7th ed., pp. 235-245, Blackwell.
- FUCHS E, FLÜGGE G, MCEWEN BS, TANAPAT P AND GOULD E (1997) Chronic subordination stress inhibits neurogenesis and decreases the volume of the granule cell layer. *27th Annual Meeting, SFN, New Orleans, USA*, Poster 130.10
- FUCHS E, JÖHREN O AND FLÜGGE G (1993) Psychosocial conflict in the tree shrew: effects on sympathoadrenal activity and blood pressure, *Psychoneuroendocrinol* (18), 557-565.
- FUCHS E, JÖHREN O AND GOLDBERG M (1992) Psychosocial stress affects urinary pteridines in tree shrews, *Naturwissenschaften* (79), 379-381.
- FUCHS E, KRAMER M, HERMES B, NETTER P AND HIEMKE C (1996) Psychosocial stress in tree shrews: Clomipramine counteracts behavioral and endocrine changes, *Pharmacol Biochem Behav* (54), 219-228.
- FUCHS E, UNO H AND FLÜGGE G (1995) Chronic psychosocial stress induces morphological alteration in hippocampal neurons of the tree shrew, *Brain Res* (673), 275-282.
- FUCHS E AND FLÜGGE G (1995) Modulation of binding sites for corticotropin-releasing hormone by chronic psychosocial stress, *Psychoneuroendocrinol* (20), 33-51.
- FUCHS E AND FLÜGGE G (1998) Stress, glucocorticoids and structural plasticity of the hippocampus, *Neurosci Biobehav Rev* (23), 295-300.
- FUCHS E AND KLEINKNECHT S (1986) The influence of chronic social confrontation on oxygen consumption of *Tupaia belangeri* under resting conditions, *Z Säugetierkunde* (51), 55-57.
- FUCHS E AND SCHUMACHER M (1990) Psychosocial stress affects pineal function in the tree shrew (*Tupaia belangeri*), *Physiol Behav* (47), 713-717.
- GALEA LAM, MCEWEN BS, TANAPAT P, DEAK T, SPENCER RL AND DHABHAR FS (1997) Sex differences in dendritic atrophy of CA3 pyramidal neurons in response to chronic restraint stress, *Neuroscience* (81), 689-697.
- GANNON MN AND MCEWEN BS (1990) Calmodulin involvement in stress- and corticosterone-induced down-regulation of cyclic AMP-generating systems in brain, *J Neurochem* (55), 276-284.

- GARCIA-SEGURA LM, CARDONA-GOMEZ P, NAFTOLIN F AND CHOWEN JA (1998) Estradiol upregulates Bcl-2 expression in adult brain neurons, *Neuro Report* (9), 593-597.
- GAVRIELI Y, SHERMAN Y AND BEN-SASSON SA (1992) Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation, *J Cell Biol* (119), 493-501.
- GHADIALLY FN (1988) Ultrastructural pathology of the cell and matrix, Vol. 1 u.2, Butterworth-Heinemann Int. Publ.
- GILAD GM (1987) The stress-induced response of the septo-hippocampal cholinergic system. A vectorial outcome of psychoneuroendocrinological interactions, *Psychoneuroendocrinol* (12), 167-184.
- GILAD GM, RABEY JM AND GILAD VH (1987) Presynaptic effects of glucocorticoids on dopaminergic and cholinergic synaptosomes. Implications for rapid endocrine-neural interactions in stress, *Life Sci* (40), 2401-2408.
- GOLD PW, GOODWIN FK AND CHROUSOS GP (1988) Clinical and biochemical manifestations of depression. Relation of neurobiology of stress, *New England J Med* (319), 413-420.
- GOULD E, MCEWEN BS, TANAPAT P, GALEA LAM AND FUCHS E (1997) Neurogenesis in the dentate gyrus of the adult tree shrew is regulated by psychosocial stress and NMDA receptor activation, *J Neurosci* (17), 2492-2498.
- GUNDERSEN HJG (1986) Stereology of arbitrary particles. A review of unbiased number and size estimators and the presentation of some new ones, in memory of William R. Thompson, *J Microsc* (143), 3-45.
- GUNDERSEN HJG, BAGGER P, BENDTSEN TF, EVANS SM, KORBO L, MARCUSSEN N, MØLLER A, NIELSEN K, NYENGAARD JR, PAKKENBERG B, SØRENSEN FB, VESTERBY A AND WEST MJ (1988) The new stereological tools: disector, fractionator, nucleator and point sampled intercepts and their use in pathological research and diagnosis, *APMIS* (96), 857-881.
- GUNDERSEN HJG, JENSEN EBV, KIÊU K AND NIELSEN J (1999) The efficiency of systematic sampling in stereology - reconsidered, *J Microsc* (193), 199-211.
- GUNDERSEN HJG AND JENSEN EB (1987) The efficiency of systematic sampling in stereology and its prediction, *J Microsc* (147), 229-263.

- HANDA RJ, BURGESS LH, KERR JE AND O'KEEFE JA (1994) Gonadal steroid hormone receptors and sex differences in the hypothalamo-pituitary-adrenal axis, *Horm Behav* (28), 464-476.
- HENNIG W (1999) Heterochromatin, *Chromosoma* (108), 1-9.
- HENZE DA, URBAN NN AND BARRIONUEVO G (2000) The multifarious hippocampal mossy fiber pathway: A review, *Neuroscience* (98), 407-427.
- HERMAN JP, SCHÄFER M K-H, YOUNG EA, THOMPSON R, DOUGLASS J, AKIL H AND WATSON SJ (1989) Evidence for the hippocampal regulation of neuroendocrine neurons of the hypothalamo-pituitary-adrenocortical axis, *J Neurosci* (9), 3072-3082.
- HERMAN JP AND CULLINAN WE (1997) Neurocircuitry of stress: central control of the hypothalamus-pituitary-adrenocortical axis, *Trends Neurosci* (20), 78-84.
- HÖKFELD T, BROBERGER C, XU Z-QD, SERGEYEV V, UBINK R AND DIEZ M (2000) Neuropeptides - an overview, *Neuropharmacol* (39), 1337-1356.
- HOLSBOER F, SPENGLER D AND HEUSER I (1992) The role of corticotropin-releasing hormone in the pathogenesis of Cushing's disease, anorexia nervosa, alcoholism, affective disorders and dementis, *Prog Brain Res* (93), 385-417.
- HOWARD CV and REED MG (1998) Unbiased Stereology. Tree-dimensional measurement in microscopy, in: Goldby P (ed.), *Microscopy Handbooks* 41, p. 246ff, BIOS Scientific Publ. Ltd., Oxford, UK.
- HU Z, YURI K, OZAWA H, LU H, KAWATA M (1997) The in vivo time course for elimination of adrenalectomy-induced apoptotic profiles from the granule cell layer of the rat hippocampus, *J Neurosci* (17), 3981-3989.
- IREDALE PA AND TERWILLIGER R, WIDNELL KL, NESTLER EJ AND DUMAN RS (1996) Differential regulation of corticotropin-releasing factor 1 receptor expression by stress and agonist treatments in brain and cultured cells, *Mol Pharmacol* (50), 1103-1110.
- ISOVICH E, MIJNSTER MJ, FLÜGGE G and FUCHS E (1999) Stress-induced alterations of the dopamine transporter may not be mediated by cortisol, in: Elsner N and Eysel U (ed.), *Göttingen Neurobiology Report* 1999, Vol. II, p. 741, Thieme, Stuttgart.

- ISOVICH E, MIJNSTER MJ, FLÜGGE G and FUCHS E (2000) Chronic psychosocial stress reduces the density of dopamine transporters, *Eur J Neurosci* (12), 1071-1078
- ISSA AM, ROWE W, GAUTHIER S AND MEANEY MJ (1990) Hypothalamic-pituitary-adrenal activity in aged, cognitively impaired and cognitively unimpaired rats, *J Neurosci* (10), 3247-3254.
- JACOBSON L AND SAPOLSKY R (1991) The role of the hippocampus in the feedback regulation of the hypothalamo-pituitary-adrenocortical axis, *Endocr Rev* (12), 118-134.
- JAMIESON PM, FUCHS E, FLÜGGE G AND SECKL JR (1997) Attenuation of hippocampal 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 by chronic psychosocial stress in the tree shrew, *Stress* (2), 123-132.
- JOELS M, BOSMA A, HENDRIKSEN H, DIEGENBACH P AND KAMPHUIS W (1996) Corticosteroid actions on the expression of kainate receptor subunit mRNAs in the rat hippocampus, *Mol Brain Res* (37), 15-20.
- JOELS M AND DEKLOET ER (1989) Effects of glucocorticoids and norepinephrine on the excitability in the hippocampus, *Science* (245), 1502-1505.
- JOELS M AND DEKLOET ER (1992) Control of neuronal excitability by corticosteroid hormones, *TINS* (15), 25-30.
- JOELS M AND DEKLOET ER (1994) Mineralocorticoid and glucocorticoid receptors in the brain. Implications for ion permeability and transmitter systems, *Prog Neurobiol* (43), 1-36.
- JÖHREN O, FLÜGGE G AND FUCHS E (1994) Hippocampal glucocorticoid receptor expression in the tree shrew: Regulation by psychosocial conflict, *Cell Mol Neurobiol* (14), 281-196.
- JÖHREN O, TOPP H, SANDER G, SCHÖCH G AND FUCHS E (1991) Social stress in tree shrews increase the whole-body RNA degeneration rates, *Naturwissenschaften* (78), 36-38.
- JONES KJ, PFAFF DW AND MCEWEN BS (1985) Early estrogen-induced nuclear changes in rat hypothalamic ventromedial neurons: An ultrastructural and morphometric analysis, *J Comp Neurol* (239), 255-266.
- KARNOVSKY MJ (1965) A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolality for use in electron microscopy, *J Cell Biol* (27), 137A-138A.



- KAWATA M (1995) Roles of steroid hormones and their receptors in structural organisation in the nervous system, *Neurosci Res* (24), 1-46.
- KEMPERMANN G, KUHN HG AND GAGE FH (1997) More hippocampal neurons in adult mice living in an enriched environment, *Nature* (386), 493-495.
- KERR DS, CAMPBELL LW, APPLGATE MD, BRODISH A AND LANDFIELD PW (1991) Chronic stress-induced acceleration of electrophysiologic and morphometric biomarkers of hippocampal aging, *J Neurosci* (11), 1316-1324.
- KERR JFR, WYLLIE AH AND CURRIE AR (1972) Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics, *Br J Cancer* (26), 239-257.
- KIRSCHBAUM C, WOLF OT, MAY M, WIPPICH W AND HELLHAMMER DH (1996) Stress- and treatment-induced elevations of cortisol levels associated with impaired declarative memory in healthy adults, *Life Sci* (58), 1475-1483.
- KITRAKI E, KARANDREA D AND KITTAS C (1999) Long-lasting effects on glucocorticoid receptor gene expression in the rat brain, *Neuroendocrinol* (69), 331-338.
- KOLB B UND WHISHAW IQ (1993) Neuropsychologie, *Spektrum Akademischer Verlag*, Heidelberg.
- KOOLHAAS JM, MEERLO P, DEBOER SF, STRUBBE JH AND BOHUS B (1997) The temporal dynamics of the stress response, *Neurosci Biobehav Rev* (21), 775-782.
- KORSMEYER SJ (1995) Regulators of cell death, *Trends Genet* (11), 101-105.
- KRAMER M, HIEMKE C AND FUCHS E (1999) Chronic psychosocial stress and antidepressant treatment in tree shrews: time-dependent behavioral and endocrine effects, *Neurosci Biobehav Rev* (23), 937-947.
- KROEMER G (1997) The proto-oncogene Bcl-2 and its role in regulating apoptosis, *Nature Med* (3), 614-620.
- KRUGERS HJ, KOOLHAAS JM, BOHUS B AND KORF J (1993) A single social stress-experience alters glutamate receptor-binding in rat hippocampal CA3 area, *Neurosci Lett* (154), 73-77.

- KUPERSMITH MJ, KAUFMAN D, PATY DW, EBERS G, MCFARLAND H, JOHNSON K, REINGOLD S AND WHITAKER J (1994) Megadose corticosteroids in multiple sclerosis, *Neurology* (44), 1-4.
- LAMMERS C-H, D´SOUZA UM, QIN Z-H, LEE S-H, YAJIMA S AND MOURADIAN MM (1999) Regulation of striatal dopamine receptors by corticosterone: an in vivo and in vitro study, *Brain Res Mol* (69), 281-285.
- LANDFIELD PW, BRAUN LD, PITLER TA, LINDSEY JD AND LYNCH G (1981) dopamine receptorsHippocampal aging in rats: A morphometric study of multiple variables in semithin sections, *Neurobiol Aging* (2), 265-275.
- LEIST M AND NICOTERA P (1998) Calcium and neuronal death, *Rev Physiol Biochem Pharmacol* (132), 79-125.
- LENDERS JWM, GOLCZYNSKA A AND GOLDSTEIN DS (1995) Glucocorticoids, sympathetic activity, and presynaptic  $\alpha_2$ -adrenoceptor function in humans, *J Clin Endocrinol Metab* (80), 1804-1808.
- LEVERENZ JB, WILKINSON CW, WAMBLE M, CORBIN S, GRABBER JE, RASKIND MA AND PESKIND ER (1999) Effect of chronic high-dose exogenous cortisol on hippocampal neuronal number in aged nonhuman primates, *J Neurosci* (19), 2356-2361.
- LIBERZON I AND YOUNG EA (1997) Effects of stress and glucocorticoids on CNS oxytocin receptor binding, *Psychoneuroendocrinol* (22), 411-422.
- LINDENBERG R (1957) Die Gefäßversorgung und ihre Bedeutung für Art und Ort von kreislaufbedingten Gewebsschäden und Gefäßprozessen, in: Lubrasch O et al. (ed.), *Handbuch der speziellen pathologischen Anatomie und Histologie*, Vol. 13/1 B, pp. 1071-1164, Springer Verlag, Berlin.
- LIU D, DIORIO J, TANNENBAUM B, CALDJI C, FRANCIS D, FREEDMAN A, SHARMA S, PEARSON D, PLOTZKY PM AND MEANEY MJ (1997) Maternal care, hippocampal glucocorticoid receptors, and hypothalamic-pituitary-adrenal responses to stress, *Science* (277), 1659-1662.

- LÓPEZ JF, CHALMERS DT, LITTLE KY AND WATSON SJ (1998) Regulation of serotonin<sub>(1A)</sub>, glucocorticoid, and mineralocorticoid receptor in rat and human hippocampus: Implication for the neurobiology of depression, *Biol Psych* (43), 547-573.
- LORENTE DE NÓ R(1934) Studies on the structure of the cerebral cortex II. Continuation of the study of the ammonic system, *J Psychol und Neurol, Leipzig* (46), 113-177.
- LOWY MT, GAULT L AND YAMAMOTO BK (1993) Adrenalectomy attenuates stress-induced elevations in extracellular glutamate concentrations in the hippocampus, *J Neurochem* (61), 1957-1960.
- LUCASSEN PJ, CHUNG WCJ, KAMPHORST W AND SWAAB DF (1997) DNA damage distribution in the human brain as shown by in situ end labeling; Area-specific differences in aging and Alzheimer disease in the absence of apoptotic morphology, *J Neuropathol Exp Neurol* (56), 887-900.
- LUCASSEN PJ, CHUNG WCJ, VERMEULEN JP, VAN LOOKEREN CAMPAGNE M, VAN DIERENDONCK JH AND SWAAB DF (1995) Microwave-enhanced in situ end-labeling of fragmented DNA: Parametric studies in relation to postmortem delay and fixation of rat and human brain, *J Histochem Cytochem* (43), 1163-1171.
- LUCASSEN PJ, NEGOESCU A and LABAT-MOLEUR F and VANLOOKEREN CAMPAGNE M (2000) Microwave application for in situ end-labeling; pitfalls and limitations, in: SHI SR, GU J AND TAYLOR CR (ed.), *Biotechniques; Antigen retrieval techniques*, p. in Druck, Eaton Publishing.
- LUCASSEN PJ, VOLLMANN-HONSDORF GK, GLEISBERG M, CZÉH B, DEKLOET ER AND FUCHS E (2001) Chronic psychosocial stress differentially affects apoptosis in hippocampal subregions and cortex of the adult tree shrew, *European J Neurosci* (14), 1-7
- LUFT JH (1961) Improvements in epoxy resin embedding methods, *J Biophys Biochem Cytol* (9), 409-414.
- LUINE V, VILLEGAS M, MARTINEZ C AND MCEWEN BS (1994) Repeated stress causes reversible impairments of spatial memory performance, *Brain Res* (639), 167-170.

- LUPIEN SJ, DE LEON M, DE SANTI S, CONVIT A, TARSHISH C, NAIR NPV, THAKUR M, MCEWEN BS, HAUGER RL AND MEANEY MJ (1998) Cortisol levels during human aging predict hippocampal atrophy and memory deficits, *Nature Neurosci* (1), 69-73.
- LUPIEN SJ, NAIR NPV, BRIÈRE S, MAHEU F, TU MT, LEMAY M, MCEWEN BS AND MEANY MJ (1999) Increased cortisol levels and impaired cognition in human aging: Implication for depression and dementia in later life, *Rev Neurosci* (10), 117-139.
- LUPIEN SJ AND MCEWEN BS (1997) The acute effects of corticosteroids on cognition: integration of animal and human model studies, *Brain Res Rev* (24), 1-27.
- MACCARI S, MORMÈDE P, PIAZZA PV, SIMON H, ANGELUCCI L AND LEMOAL M (1992) Hippocampal Type I and Type II corticosteroid receptors are modulated by central noradrenergic systems, *Psychoneuroendocrinology* (17), 103-112.
- MAEDA K, TANIMOTO K, TERADA T, SHINTANI T AND KAKIGI T (1991) Elevated urinary free cortisol in patients with dementia, *Neurobiol Aging* (12), 161-163.
- MAGARIÑOS AM, MCEWEN BS, FLÜGGE G AND FUCHS E (1996) Chronic psychosocial stress causes apical dendritic atrophy of hippocampal CA3 pyramidal neurons in subordinate tree shrews, *J Neurosci* (16), 3534-3540.
- MAGARIÑOS AM, GARCIA VERDUGO JM AND MCEWEN BS (1997) Chronic stress alters synaptic terminal structure in hippocampus, *Proc Natl Acad Sci USA* (94), 14002-14008.
- MAGARIÑOS AM, ORCHINIK M AND MCEWEN BS (1998) Morphological changes in the hippocampal CA3 region induced by non-invasive glucocorticoid administration: a paradox, *Brain Res* (809), 314-318.
- MAGARIÑOS AM AND MCEWEN BS (1995a) Stress-induced atrophy of apical dendrites of hippocampal CA3c neurons: comparison of stressors, *Neuroscience* (69), 83-88.
- MAGARIÑOS AM AND MCEWEN BS (1995b) Stress-induced atrophy of apical dendrites of hippocampal CA3c neurons: Involvement of glucocorticoid secretion and excitatory amino acid receptors, *Neuroscience* (69), 89-98.
- MAJNO G AND JORIS I (1995) Apoptosis, oncosis and necrosis. An overview of cell death, *Am J Pathol* (146), 3-15.

- MARTIGNONI E, COSTA A, SINFORIANI E, LIUZZI A, CHIODINI P, MAURI M, BONO G AND NAPPI G (1992) The brain as a target for adrenocortical steroids: cognitive implications, *Psychoneuroendocrinol* (17), 343-354.
- MARTIN RD (1990) Primate origins and evolution, Chapman and Hall, London.
- MASON JW (1968) A review of psychoendocrine research on the pituitary-adrenal cortical system, *Psychosom Med* (30), 576-607.
- MATHESON GK, KNOWLES A, GAGE D, MICHEL C, GUTHRIE D, BAUER C, BLACKBOURNE J AND WEINZAPFEL D (1997) Modification of hypothalamic-pituitary-adrenocortical activity by serotonergic agents in the rat, *Pharmacology* (55), 59-65.
- MCCORMICK CM, SMYTHE JW, SHARMA S AND MEANEY MJ (1995) Sex-specific effects of prenatal stress on hypothalamic-pituitary-adrenal responses to stress and brain glucocorticoid receptor density in adult rats, *Dev Brain Res* (84), 55-61.
- MCEWEN BS (1992) Re-examination of the glucocorticoid hypothesis of stress and aging, *Prog Brain Res* (93), 365-383.
- MCEWEN BS (1997) Possible mechanisms for atrophy of the human hippocampus, *Mol Psychiatry* (2), 255-262.
- MCEWEN BS (1999) Stress and hippocampal plasticity, *Annu Rev Neurosci* (22), 105-122.
- MCEWEN BS AND SAPOLSKY RM (1995) Stress and cognitive function, *Curr Opin Neurobiol* (5), 205-216.
- MCKITTRICK CR, BLANCHARD DC, BLANCHARD RJ, MCEWEN BS AND SAKAI RR (1995) Serotonin receptor binding in a colony model of chronic social stress, *Biol Psychiatry* (37), 383-393.
- MCKITTRICK CR, MAGARIÑOS AM, BLANCHARD DC, BLANCHARD RJ, MCEWEN BS AND SAKAI RR (2000) Chronic social stress reduces dendritic arbors in CA3 of hippocampus and decreases binding to serotonin transporter sites, *Synapse* (36), 85-94.
- MEIJER OC AND DEKLOET ER (1995) A role for the mineralocorticoid receptor in a rapid and transient suppression of hippocampal 5-HT<sub>1A</sub> receptor mRNA by corticosterone, *J Neuroendocrinology* (7), 653-657.

- MEYER U, KRUHØFFER, FLÜGGE G AND FUCHS E (1998) Cloning of glucocorticoid receptor and mineralocorticoid receptor cDNA and gene expression in the central nervous system of the tree shrew (*Tupaia belangeri*), *Mol Brain Res* (55), 243-253.
- MEYER U, VANKAMPEN M, FLÜGGE G AND FUCHS E (2001) Chronic psychosocial stress regulates the expression of both GR and MR mRNA in the hippocampal formation of tree shrews, *Hippocampus*, in press
- MIJNSTER MJ, ISOVICH E AND FUCHS E (1999a) How chronic cortisol treatment affects dopamine D1-like and D2-like receptors, *29th Annual Meeting, SFN, Florida, USA*, Poster 589.2
- MIJNSTER MJ, ISOVICH E, FLÜGGE G AND FUCHS E (1999b) Localization of dopamine receptors in the tree shrew brain using (<sup>3</sup>H)-SCH23390 and (<sup>125</sup>I)-epidepride, *Brain Res* (841), 101-113.
- MILLER S AND MAYFORD M (1999) Cellular and molecular mechanisms of memory: the LTP connection, *Curr Opin Genet Dev* (9), 333-337.
- MINTON JE (1994) Function of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis and the sympathetic nervous system in models of acute stress in domestic farm animals, *J Anim Sci* (72), 1891-1898.
- MOGHADDAM B (1993) Stress preferentially increases extraneuronal levels of excitatory amino acids in the prefrontal cortex: Comparison to hippocampus and basal ganglia, *J Neurochem* (60), 1650-1657.
- MOLEMAN P, TULEN JHM, BLANKESTIJN PJ, MAN IN'T VELD AJ AND BOOMSMA F (1992) Urinary excretion of catecholamines and their metabolites in relation to circulating catecholamines. Six-hour infusion of epinephrine and norepinephrine in healthy volunteers, *Arch Gen Psychiatry* (49), 568-572.
- MOSER M-B AND MOSER EI (1998) Functional differentiation in the hippocampus, *Hippocampus* (8), 608-619.
- MUNCK A, GUYRE PM AND HOLBROOK NJ (1984) Physiological functions of glucocorticoids in stress and their reaction to pharmacological actions, *Endocr Rev* (5), 25-44.

- NICOLETTI F, BRUNO V, CATANIA MV, BATTAGLIA G, COPANI A, BARBAGALLO G, CEÑA V, SANCHEZ-PRIETO J, SPANO PF AND PIZZI M (1999) Group-I metabotropic glutamate receptors: hypotheses to explain their dual role in neurotoxicity and neuroprotection, *Neuropharmacology* (38), 1477-1484.
- NIEUWENHUIS R (1985) Chemoarchitecture of the brain, pp. 33-41, Springer Verlag.
- Norman AW and Litwack G (1997) Hormones, 2<sup>nd</sup> edition, Academic Press Orlando, USA.
- NUSSDORFER GG, BAHÇELIOĞLU M, NERI G AND MALENDOWICZ LK (2000) Secretin, glucagon, gastric inhibitory polypeptide, parathyroid hormone, and related peptides in the regulation of the hypothalamus-pituitary-adrenal axis, *Peptides* (21), 309-324.
- O'BRIEN JT (1997) The 'glucocorticoid cascade' hypothesis in man, *Br J Psych* (170), 199-201.
- OHL F, MICHAELIS T, FUJIMORI H, FRAHM J, RENSING S AND FUCHS E (1999) Volumetric MRI measurements of the tree shrew hippocampus, *J Neurosci Methods* (88), 189-193.
- OHL F, MICHAELIS T, VOLLMANN-HONSDORF GK, KIRSCHBAUM C AND FUCHS E (2000) Effect of chronic psychosocial stress and long-term cortisol treatment on hippocampus-mediated memory and hippocampal volume: a pilot-study in tree shrews, *Psychoneuroendocrinology* (25), 357-363.
- OHL F AND FUCHS E (1999) Differential effects of chronic stress on memory processes in the tree shrew, *Cogn Brain Res* (7), 379-387.
- OTTERSEN OP AND LANDSEND AS (1997) Organisation of glutamate receptors at the synapse, *Europ J Neurosci* (9), 2219-2224.
- OZAWA S, KAMIYA H AND TSUZUKI K (1998) Glutamate receptors in the mammalian central nervous system, *Prog Neurobiol* (54), 581-618.
- PACAK K, PALKOVITS M, KOPIN IJ AND GOLDSTEIN DS (1995) Stress-induced norepinephrine release in the hypothalamic paraventricular nucleus and pituitary-adrenocortical and sympathoadrenal activity: in vivo microdialysis studies, *Front Neuroendocrinol* (16), 89-150.
- PAVLIDES C, WATANABE Y AND MCEWEN BS (1993) Effects of glucocorticoids on hippocampal long-term potentiation, *Hippocampus* (3), 183-192.

- PERRY G, NUNOMURA A, LUCASSEN P, LASSMANN H, SMITH MA (1998a) Apoptosis and alzheimer's disease, *Science* (282), 1268.
- PERRY G, NUNOMURA A, SMITH MA (1998) A suicide note from Alzheimer disease neurons? , *Nat Med* (4), 897-898.
- PETERS A, PALAY SL, WEBSTER H (1991) The fine structure of the nervous system: neurons and their supporting cells, 3rd ed., Oxford University Press, New York.
- PLOTZKY PM, OWENS MJ AND NEMEROFF CB (1998) Psychoneuroendocrinology of depression. Hypothalamic-pituitary-adrenal axis, *Psychiatr Clin North Am* (21), 293-307.
- RAAB A (1971) Der Serotoninstoffwechsel in einzelnen Hirnteilen von *Tupaia (Tupaia belangeri)* bei psychosozialem Stress, *Z Vergl Pysiologie* (72), 54-66.
- RAFF M (1998) Cell suicide for beginners, *Nature* (396), 119-122.
- RAPP PR AND GALLAGHER M (1996) Preserved neuron number in the hippocampus of aged rats with spatial learning deficits, *Proc Natl Acad Sci USA* (93), 9926-9930.
- RASMUSSEN T, SCHLIEMANN T, SØRENSEN JC, ZIMMER J AND WEST MJ (1996) Memory impaired aged rats: No loss of principal hippocampal and subicular neurons, *Neurobiol Aging* (17), 143-147.
- REAGAN LP AND MCEWEN BS (1997) Controversies surrounding glucocorticoid-mediated cell death in the hippocampus, *J Chem Neuroanatomy* (13), 149-167.
- REUL JMHM AND DE KLOET ER (1985) Two receptor systems for corticosterone in rat brain: Microdistribution and differential occupation, *Endocrinology* (117), 2505-2511.
- REYNOLDS ES (1963) The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy, *J Cell Biol* (17), 208-212.
- RICHIE JC and NEMEROFF CB (1991) Stress, the hypothalamic-pituitary-adrenal axis and depression. In: McCubbin JA, Kaufmann PG, Nemeroff CB (ed.) Stress, neuropeptides and systemic disease, pp. 181-192, Academic Press, San Diego.
- RISOLD PY AND SWANSON LW (1996) Structural evidence for functional domains in the rat hippocampus, *Science* (272), 1484-1486.
- ROBYR D AND WOLFFE AP (1998) Hormone action and chromatin remodelling, *Cell Mol Life Sci* (54), 113-124.



- RYBKIN II, ZHOU Y, VOLAUFOVA A, SMAGIN GN, RYAN DH AND HARRIS RBS (1997) Effect of restraint stress on food intake and body weight is determined by time of day, *Am J Physiol* (273), R1612-1622.
- SACHAR EJ, HELLMAN L, ROFFWARG HP, HALPERN FS, FUKUSHIMA DK AND GALLAGHER TF (1973) Disrupted 24-hour patterns of cortisol secretion in psychotic depression, *Arch Gen Psychiatry* (28), 19-24.
- SACHS L (1972) *Statistische Auswertungsmethoden*, 3rd ed., p. 209, Springer Verlag, Berlin.
- SAPOLSKY RM, KREY LC AND MCEWEN BS (1985) Prolonged glucocorticoid exposure reduces hippocampal neuron number: Implications of aging, *J Neurosci* (5), 1222-1227.
- SAPOLSKY RM, KREY LC AND MCEWEN BS (1986) The neuroendocrinology of stress and aging. The glucocorticoid cascade hypothesis, *Endocr Rev* (7), 284-301.
- SAPOLSKY RM, UNO H, REBERT CS AND FINCH CE (1990) Hippocampal damage associated with prolonged glucocorticoid exposure in primates, *J Neurosci* (10), 2897-2902.
- SCHLEICHER ED, KEES FK AND WIELAND OH (1983) Analysis of total urinary catecholamines by liquid chromatography: methodology, routine experience and clinical interpretations of results, *Clin Chim Acta* (129), 295-302.
- SCHWARZACHER HG AND WACHTLER F (1993) The nucleolus, *Anat Embryol* (188), 515-536.
- SCHWENDT M AND JE OVÁ D (2000) Gene expression of two glutamate receptor subunits in response to repeated stress exposure in rat hippocampus, *Cell Mol Neurobiol* (20), 319-329.
- SECKL JR AND OLSSON T (1995) Glucocorticoid hypersecretion and the age impaired hippocampus: cause or effect?, *J Endocrinol* (145), 201-211.
- SELYE H (1936) A syndrome produced by diverse nocuous agents, *Nature* (138), 32.
- SGOIFO A, DE BOER SF, WESTENBROEK C, MAES FW, BELDHUIS H, SUZUKI T AND KOOLHAAS JM (1997) Incidence of arrhythmias and heart rate variability in wild-type rats exposed to social stress, *Am J Physiol* (273), H1754-H1760.
- SHELINE YI, WANG PW, GADO MH, CSERNANSKY JG AND VANNIER MW (1996) Hippocampal atrophy in recurrent major depression, *Proc Natl Acad Sci USA* (93), 3908-3913.

- SHKORBATOV IUG, SHAKHBAZOV VG, GORENSKAIA OV, DMITRUK TV AND MONTVID PLU (1999) Changes in the funktion of the nucleus and chromatin of human cells under the action of hormonal factors in vitro, *Tsitol Genet (nur Abstract)* (33), 64.
- SHORS TJ, FOY MR, LEVINE S AND THOMPSON RF (1990) Unpredictable and uncontrollable stress impairs neuronal plasticity in the rat hippocampus, *Brain Res Bull* (24), 663-667.
- SOUSA N, ALMEIDA OFX, HOLLSBOER F, PAULA-BARBOSA MM AND MADEIRA MD (1998a) Maintenance of hippocampal cell numbers in young and aged rats submitted to chronic unpredictable stress. Comparison with the effects of corticosterone treatment, *Stress* (2), 237-249.
- SOUSA N, MADEIRA MD AND PAULA-BARBOSA MM (1998b) Effects of corticosterone treatment and rehabilitation on the hippocampal formation of neonatal and adult rats. An unbiased stereological study, *Brain Res* (794), 199-210.
- SOUSA N, LUKOYANOV NV, MADEIRA MD, ALMEIDA OFX AND PAULA-BARBOSA MM (2000) Reorganisation of the morphology of hippocampal neurites and synapses after stress-induced damage correlates with behavioral improvement, *Neuroscience* (97), 253-266.
- SPENCER RL, MILLER AH, MODAY H, MCEWEN BS, BLANCHARD RJ, BLANCHARD DC AND SAKAI RR (1996) Chronic social stress produces reductions in available splenic type II corticosteroid receptor binding and plasma corticosteroid binding globulin levels, *Psychoneuroendocrinology* (21), 95-109.
- SQUIRE LR (1992) Memory and the hippocampus: A synthesis from findings with rats, monkeys and humans, *Psychol Rev* (99), 195-231.
- STARCK D (1965) Die Neencephalisation, in: Heberer (ed.) *Menschliche Abstammungslehre*, pp. 103-144, Fischer, Stuttgart.
- STARKMAN MN, GEBARSKY SS, BERENT S AND SCHEINGART DE (1992) Hippocampal formation volume, memory dysfunction, and cortisol levels in patients with Cushing's Syndrome, *Biol Psychiatry* (32), 756-765.
- STECIUK M, KRAM M, KRAMER GL AND PETTY F (2000) Acute stress does not alter 5-HT<sub>1A</sub> receptor density, *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* (24), 155-161.

- STEFANSKI V (2000) Social stress in laboratory rats: hormonal responses and immune cell distribution, *Psychoneuroendocrinology* (25), 389-406.
- STERIO DC (1984) The unbiased estimation of number and sizes of arbitrary particles using the disector, *J Microsc* (134), 127-136.
- STÖHR W (1986) Heart rate of tree shrews and its persistent modification by social contact. In: Schmidt TH, Dembroski TM and Blümchen G (ed.) Biological factors in cardiovascular disease, pp. 492-499, Springer Verlag, Berlin.
- SUN F-L AND ELGIN SCR (1999) Putting boundaries on silence, *Cell* (99), 459-462.
- SWAAB AND UYLINGS (1987) Density measures: parameters to avoid, *Neurobiol Aging* (8), 574-576.
- TADDEI A, ROCHE D AND SIBARITA JB, TURNER BM AND ALMOUZNI G (1999) Duplication and maintenance of heterochromatin domains, *J Cell Biol* (147), 1153-1166.
- TEUCHERT-NOODT G (2000) Neuronal degeneration and reorganisation: a mutual principle in pathological and in healthy interactions of limbic and prefrontal circuits, *J Neural Transm* (60), 315-333
- THIERRY A-M, JAVOY F, GLOWINSKI J AND KETY S (1968) Effects of stress on the metabolism of norepinephrine, dopamine and serotonin in the central nervous system of the rat. I. Modifications of norepinephrine turnover, *J Pharmacol Exp Ther* (163), 163-171.
- TIGGES J und SHANTA TR (1969) A stereotaxic brain atlas of the tree shrew (*Tupaia glis*), Williams and Wilkins Company, Baltimore.
- TRAPP T, RUPPRECHT R, CASTRÉN M, REUL JMHM AND HOLSBOER F (1994) Heterodimerisation between mineralocorticoid and glucocorticoid receptor: A new principle of glucocorticoid action in the CNS, *Neuron* (13), 1457-1462.
- TSUKIYAMA T AND WU C (1997) Chromatin remodeling and transcription, *Curr Opin Genet Dev* (7), 182-191.
- UDENFRIEND S, GERBER LD, BRINK L AND SPECTOR S (1985) Scintillation proximity radioimmunoassay utilizing <sup>125</sup>I-labeled ligands, *Proc Natl Acad Sci USA* (82), 8672-8676.

- UNO H, TARARA R, ELSE JG, SULEMAN MA AND SAPOLSKY RM (1989) Hippocampal damage associated with prolonged and fatal stress in primates, *J Neurosci* (9), 1705-1711.
- VALENTINO RJ, FOOTE SL AND PAGE ME (1993) The locus coeruleus as a site for integrating corticotropin-releasing factor and noradrenergic mediation of stress responses, *Ann NY Acad Sci* (697), 173-188.
- VALENTINO RJ and ASTON-JONES G (1995) Physiological and anatomical determinants of the locus coeruleus discharge, in: Bloom FE and Kupfer DJ (ed.) *Psychopharmacology: The fourth generation of progress*, pp. 373-385, Raven Press, New York.
- VAN DIJKEN HH, DE GOEIJ DCE, SUTANTO W, MOS J, DE KLOET ER AND TILDERS FJH (1993) Short inescapable stress produces long-lasting changes in the brain-pituitary-adrenal axis of adult male rats, *Neuroendocrinol* (58), 57-64.
- VAN HAARST AD, OITZL MS DE KLOET ER (1997) Facilitation of feedback inhibition through blockade of glucocorticoid receptors in the hippocampus, *Neurochem Res* (22), 1323-1328.
- VAN KAMPEN M, SCHMITT U, HIEMKE C AND FUCHS E (2000) Diazepam has no beneficial effects on stress-induced behavioral and endocrine changes in male tree shrews, *Pharmacol Biochem Behav* (65), 539-546.
- VAN STEENSEL, VAN BINNENDIJK EP, HORNSBY CD, VAN DER VOORT HTM, KROZOWSKI ZS, DE KLOET ER AND VANDRIEL R (1996) Partial colocalisation of glucocorticoid and mineralocorticoid receptors in discrete compartments in nuclei of rat hippocampus neurons, *J Cell Sci* (109), 787-792.
- VIELKIND U, WALENCEWICZ A, LEVINE JM AND BOHN MC (1990) Type II glucocorticoid receptors are expressed in oligodendrocytes and astrocytes, *J Neurosci Res* (27), 360-373.
- VOLLMANN-HONSDORF GK, FLÜGGE G AND FUCHS E (1997) Chronic psychosocial stress does not affect the number of pyramidal neurons in tree shrew hippocampus, *Neurosci Lett* (233), 121-124.
- VON HOLST D (1993) Zoologische Stressforschung - ein Bindeglied zwischen Psychologie und Medizin, *Spektrum der Wissenschaft* (5), 92-96.

- VONHOLST D, FUCHS E and STÖHR W (1983) Physiological changes in male *Tupaia belangeri* under different types of social stress. In: Dembrosky TM, Schmidt TH and Blümchen G (ed.) Biobehavioural bases of coronary heart disease, pp. 383-390, Springer Verlag, Berlin.
- WALLRATH LL (1998) Unfolding the mysteries of heterochromatin, *Curr Opin Genet Dev* (8), 147-153.
- WATANABE, Y GOULD E, CAMERON HA, DANIELS DC AND MCEWEN BS (1992) Phenytoin prevents stress-and corticosteron-induced atrophy of CA3 pyramidal neurons, *Hippocampus* (2), 431-436.
- WATANABE Y, WEILAND NG AND MC EWEN BS (1995) Effects of adrenal steroid manipulations and repeated restraint stress on dynorphin mRNA levels and excitatory amino acid receptor binding in hippocampus, *Brain Res* (680), 217-225.
- WEILAND NG, ORCHINIK M AND TANAPAT P (1997) Chronic corticosterone treatment induces parallel changes in *N*-methyl-D-aspartate receptor subunit messenger RNA levels and antagonist binding sites in the hippocampus, *Neurosci* (78), 653-662.
- WEST MJ (1993) Regionally specific loss of neurons in the aging human hippocampus, *Neurobiol Aging* (14), 287-293.
- WEST MJ, SLOMIANKA L AND GUNDERSEN HJG (1991) Unbiased stereological estimation of the total number of neurons in the subdivisions of the rat hippocampus using the optical fractionator, *Anat Rec* (231), 482-497.
- WEST MJ AND GUNDERSEN HJG (1990) Unbiased stereological estimation of the number of neurons in the human hippocampus, *J Com Neurol* (296), 1-22.
- WEST MJ UND SCHWERDTFEGGER WK (1985) An allometric study of hippocampal components, *Brain Behav Evol* (27), 93-105.
- WICKELGREN I (1996) Is hippocampal cell death a myth?, *Science* (271), 1229-1230.
- WIJSMAN JH, JONKER RR, KREIJZER R, VAN DE VELDE CJH, CORNELISSE CJ AND VAN DIERENDONCK JH (1993) A new method to detect apoptosis in paraffin sections: in situ end-labeling of fragmented DNA, *J Histchem Cytochem* (41), 7-12.

WOOLLEY CS, GOULD E AND McEWEN BS (1990) Exposure to excess glucocorticoids alters dendritic morphology of adult hippocampal pyramidal neurons, *Brain Res* (531), 225-231.

WYLLIE AH (1997) Apoptosis: an overview, *Br Med Bull* (53), 451-465.

XU L, HOLSCHER C, ANWYL R AND ROWAN MJ (1998) Glucocorticoid receptor and protein/RNA synthesis-dependent mechanisms underlie the control of synaptic plasticity by stress, *Proc Nat Acad Sci USA* (95), 3204-3208.

YIN X-M, OLTVAL ZN AND KORSMEYER SJ (1994) BH1 and BH2 domains of Bcl-2 are required for inhibition of apoptosis and heterodimerization with Bax, *Nature* (369), 321-323.

## 7. ANHANG

### 7.1. Chemikalienliste

- 1-2Propylenoxyd, Merck-Schuchardt, Hohenbrunn
- 2,4,6-tri(dimethyl-aminomethyl)phenol, Serva, Heidelberg
- Anti-rabbit Cortisol Antiserum, Paesel-Lorei, Frankfurt
- anti-rabbit IgG-coated Fluormicrospheres (scintillation proximity assay anti-rabbit reagent type 1), Amersham, Braunschweig
- Azur II, Merck, Darmstadt
- Biotin-16-dUTP, Böhringer, Mannheim
- Bleinitrat  $Pb(NO_3)_2$ , Merck, Darmstadt
- Borsäure, Sigma, St. Luis, MO, USA
- Bromdeoxyuridin (BrdU), Sigma, St. Luis, MO, USA
- Chloroform, Merck, Darmstadt
- Cobald Chlorid, Sigma, St. Luis, MO, USA
- Cortisol-Hemisuccinat (4-pregnen-11 $\beta$ ,17, 21-triol-3, 20-dione 21 hemisuccinate) Steraloids Inc., Wilton, USA
- DDSA (2-dodecenyly succinic anhydrid), Serva, Heidelberg
- Diaminobenzidin (DAB), Sigma, St. Louis, USA
- Dichlormethan, Merck, Darmstadt
- Diethylether, Baker, Deventer, Holland
- Ethanol 96%, Zander, Göttingen
- Eukitt, Kindler, Freiburg i. Br.
- Extrelut, Merck, Darmstadt
- Formvar, Merck, Darmstadt
- Gelantine (Blum 60), Sigma, St Luis, USA
- Glutardialdehyd (EM Grad), Merck, Darmstadt
- Glycidether (EM Grad), Serva, Heidelberg
- Härter I und Härter II, Technovit 7100, Kulzer, Weinheim
- $^3H$ -Cortisol, Amersham, Braunschweig
- $^3H$ -Cortisol-Standards, Amersham, Braunschweig
- $H_2O_2$ , Merck, Darmstadt
- Isopropanol, Fluka, Buchs, Schweiz
- Kationen-Austauscher-Gel (BioRex 70), Biorad, München
- Kresylviolettacetat, Aldrich, Milwaukee, Wis, USA

- Methylenblau (for microscopy), Merck, Darmstadt
- Methylgrün, Merck, Darmstadt
- MNA (Methyl nadic anhydrid), Serva, Heidelberg
- Natriumcitrat  $\text{Na}_3(\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7) \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  Sigma, St. Louis, USA
- Onkovertin<sup>®</sup>, Braun, Melsungen
- Osmiumtetroxyd ( $\text{OsO}_4$ ), Paesel-Lorey, Frankfurt
- Paraffin, Shanon, Life Sci. Int. GmbH, Frankfurt
- Paraformaldehyd, Merck, Darmstadt
- Proteinase K, Sigma, St. Louis, USA
- R(-)ARTERENOL Standards, Sigma A-7381, St. Louis, USA
- Rinderserumalbumin (BSA), Sigma, St. Louis, USA
- Scintillationsflüssigkeit (analytic Quickszint 2000), Zinsser, Maldenhead, UK
- Technovit 7100 Hydroxyethylmethacrylat Basislösung, Kulzer, Weinheim
- Technovit 3040, Kulzer, Weinheim
- Terminaltransferase (TdT), Böhringer, Mannheim
- Tris(hydroxymethyl)aminomethan, Baker, Deventer, Holland
- Uranylacetat, Merck, Darmstadt
- Xylol, Baker, Deventer, Holland



## 7.2. Lösungen und Puffer

### Bleicitrat (nach Reynolds 1963)

- 1,33g Bleinitrat  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$
- 1,76g Natriumcitrat  $\text{Na}_3(\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7) \cdot 2\text{H}_2\text{O}$
- 30 ml  $\text{H}_2\text{O}$  bidest
- 30 min wiederholtes Schütteln beschleunigt und komplettiert die Umwandlung zu Bleicitrat
- Zugabe von 8ml 1N NaOH auf 50ml aufgefüllt.

### Epon (nach Luft, 1961)

- Ansatz A: 71,3g Glycidether (EM Grad) mischen mit 115g DDSA (2-dodecenylnsuccinic anhydrid)
- Ansatz B: 100g Glycidether mischen mit MNA (Methyl nadic anhydrid)
- Ansatz A und B vor Gebrauch 1:1 mischen und anschließend mit 1,8 % 2,4,6-tri(dimethyl-aminomethyl)phenol als Reaktionsbeschleuniger versetzen.

### Tris-HCl-Puffer (RIA)

6,0g Tris werden mit 5,87g NaCl, 1g Gelatine und 1g Natriumcitrat in 1l  $\text{H}_2\text{O}$  bidest gelöst (pH 8)

### Kresylviolett-Methylenblau (2:1)

1 g Kresylviolettacetat wird in ca. 400ml  $\text{H}_2\text{O}$  bidest. mit Hilfe von 9,6 ml Eisessig gelöst, mit  $\text{H}_2\text{O}$  bidest. auf 500 ml aufgefüllt.

1 g Methylenblau werden in 100 ml Tetraboratlösung gelöst.

Beide Lösungen werden kurz vor Gebrauch im Verhältnis 2:1 gemischt und filtriert.

### Perfusionslösungen

- Perfusionslösung nach Karnovsky, 1965 in 0,1M Phosphatpuffer (pH 7,2):  
Für 1l werden in 60°C heißem  $\text{H}_2\text{O}$  bidest. unter ständigem Rühren 30g Paraformaldehyd mit wenigen Tropfen 1 N NaOH gelöst und mit 100ml Glutardialdehyd (25%ig, EM Grade) und 500 ml 0,2 M Phosphatpuffer gemischt. Dann wird der pH auf 7,2 eingestellt und mit  $\text{H}_2\text{O}$  bidest. auf 1 l aufgefüllt.

- 2%ige phosphatgepufferte PFA/Glutardialdehyd-Lösung (pH 7,3):  
20g Paraformaldehyd und 80 ml Glutardialdehyd (25%ig, EM Grade), Beschreibung s.o. bei Perfusionslösung nach Karnovsky
- 4%ige phosphatgepufferte PFA-Lösung (pH 7,2):  
Für 1l werden in 60°C heißem H<sub>2</sub>O bidest. unter ständigem Rühren 40g Paraformaldehyd mit einigen Tropfen 1 N NaOH gelöst und die Lösung gefiltert. Nach Zugabe von 500 ml 0,2 M Phosphatpuffer (pH 7,3) wird der pH auf 7,2 eingestellt und mit H<sub>2</sub>O bidest. auf 1 l aufgefüllt.

Phosphatpuffer (nach Sørensen, 1920)

Stammlösungen:

A: 0,2 M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1 H<sub>2</sub>O (55,2 g / 2l H<sub>2</sub>O bidest.)

B: 0,2 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 12H<sub>2</sub>O (143,3g / 2l H<sub>2</sub>O bidest.)

für 1l 0,2 M Phosphatpuffer (pH 7,3) werden

190 ml Lösung A mit

810 ml Lösung B gemischt.

## 7.3. Verwendete Abkürzungen und Symbole

<b>2-D</b>	zweidimensional
<b><math>\Sigma Q</math></b>	Summe der gezählten Zellen
<b>ACTH</b>	Adrenocorticotropin
<b>asf</b>	Fraktion der Schnittfläche
<b>BCV</b>	biologische Varianz
<b>BrdU</b>	Bromdeoxyuridin
<b>BSA</b>	Rinderserumalbumin
<b>CA1-CA4</b>	Regionen der Cornu ammonis nach Lorente de Nó, 1934
<b>CE</b>	intraindividuelle Varianz
<b>Chr</b>	Chromatin
<b>CRH</b>	Corticotropin-Releasing-Hormon
<b>CV</b>	interindividuelle Varianz
<b>Cyt</b>	Cytoplasma
<b>d</b>	Tag
<b>DAB</b>	Diaminobenzidin
<b>den</b>	dentritische Schäfte
<b>DNA</b>	Desoxyribonucleinsäure
<b>EDTA</b>	Ethyl diamintetraessigsäure
<b>ER</b>	Endoplasmatisches Reticulum
<b>G</b>	Golgi Apparat
<b>GC</b>	Glucocorticoid
<b>GD</b>	Gyrus dentatus
<b>GR</b>	Glucocorticoid Rezeptor
<b>h</b>	Höhe des "optical disector"
<b>HHN-Achse</b>	Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenrinden-Achse
<b>inv</b>	Invagination
<b>ISEL</b>	in situ end labeling
<b>Lf</b>	Lipofuscin Granulum
<b>m</b>	Microtubuli
<b>Micgl</b>	Microglia
<b>min</b>	Minute
<b>mit</b>	Miochondria
<b>MR</b>	Mineralocorticoid Rezeptor
<b>N</b>	extrapolierte, geschätzte Gesamtzellzahl
<b>Ncl</b>	Nucleolus
<b>Nuc</b>	Nucleus
<b>nucM</b>	Nucleusmembran
<b>PBS</b>	Phosphat gepufferte NaCl-Lösung
<b>PFA</b>	Paraformaldehyd
<b>PK</b>	Proteinase K
<b>PTSD</b>	Post Traumatic Streß Disorder
<b>PVN</b>	Nucleus paraventricularis
<b>r</b>	freie Ribosomen
<b>RNA</b>	Ribonucleinsäure
<b>RT</b>	Raumtemperatur
<b>SD</b>	Standardabweichung
<b>SE</b>	Standardfehler
<b>ssf</b>	Fraktion des Schnittes
<b>Sub</b>	Subiculum
<b>Syn</b>	synaptischer Kontakt
<b>t</b>	Schnittdicke
<b>TdT</b>	Terminaltransferase
<b>tsf</b>	Fraktion der Schnittdicke

#### 7.4. Danksagung und Anmerkung

An erster Stelle gilt mein Dank Prof. Dr. Eberhard Fuchs, der mir das Thema dieser Arbeit zur Verfügung gestellt und eine Durchführung ermöglicht hat.

Dr. Gabriele Flügge danke ich für ihre Unterstützung insbesondere auch nach der Geburt meiner Tochter.

Prof. Dr. Ha-Jo Bischof danke ich für die freundliche und unkomplizierte Übernahme der externen Betreuung dieser Arbeit.

Prof. J. Kaup und seiner gesamten Arbeitsgruppe danke ich für ihre freundliche Aufnahme in ihren Laborbereich. Eva Nicksch und Karin Kaiser-Jarry haben mich qualifiziert und mit Engagement in die Elektronenmikroskopie eingeführt. Dafür herzlichen Dank.

Dr. S. Eins möchte ich für seine Hilfe bei der Auswertung mit dem IBAS Computersystem und Prof. J.R. Wolf für die Möglichkeit daran zu arbeiten danken.

Dr. Mark J. West stand mir mit Rat und Tat beim Erlernen und Durchführen der Stereologie zur Seite. Für eine Kooperation im zweiten Teil der Stereologie-Auswertung danke ich Prof. Dr. D. Meyer, der leider vor Beendigung dieser Arbeit verstorben ist. Dr. Paul Lucassen hat dankenswerterweise die ISEL Durchführung und Auswertung übernommen.

Weiterhin danke ich allen jetzigen und ehemaligen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe für das gute Arbeitsklima. Insbesondere Dank an Andre Arand, Stefanie Gleisberg, Heino Hartung, Andreas Heutz, Eleonora Isovich, Jeannine Keuker, Maarten Kole, Marian Kramer, Simone Lüert, Heiko Meyer, Ute Meyer; Janneke Mijster, Frauke Ohl und Miriam Vorwald.

Meinen Eltern danke ich für ihren Rückhalt, ihren Glauben an mich, das Korrekturlesen und für die unzählbaren Stunden der Betreuung meiner Tochter. Auch meinem Mann besten Dank für alles, was er für mich getan hat.

Diese Arbeit wurde unterstützt von der Deutschen Forschungsgemeinschaft.

Um meinem Engagement für die Gleichberechtigung von Mann und Frau praktisch Rechnung zu tragen, sei folgendes angemerkt:

Erscheint in dieser Ausarbeitung eine direkte Anrede, so wurde der Einfachheit halber die maskuline Form derselben gewählt. Selbstverständlich sind beide Geschlechter angesprochen.

### 7.5. Veröffentlichungen

Teile dieser Dissertation wurden bereits vorab veröffentlicht oder sind zur Veröffentlichung eingereicht.

#### **Artikel in referierten Fachzeitschriften:**

Vollmann-Honsdorf GK, Flüge G and Fuchs E, Chronic psychosocial stress does not affect the number of pyramidal neurons in tree shrew hippocampus; *Neuroscience Letters* (1997) 233: 121-124

Ohl F, Michaelis T, G.K. Vollmann-Honsdorf, C. Kirschbaum and Fuchs E, Effect of chronic psychosocial stress and long-term cortisol treatment on hippocampus-mediated memory and hippocampal volume: a pilot-study in tree shrews. *Psychoneuroendocrinology* (2000) 25: 357-363

Lucassen PJ, Vollmann-Honsdorf GK, Gleisberg M, Czeh B, de Kloet R and Fuchs E, Chronic psychosocial stress differentially affects apoptosis in hippocampal subregions and cortex of the adult tree shrew. *European J Neurosci* (2001) 14: 1-7

Keuker JIH, Vollmann-Honsdorf GK, Fuchs E and West MJ, How to use the optical fractionator: an example based on the estimation of neurons in the hippocampal CA1 and CA3 regions of tree shrews. *Brain Res Protocol* (2001) 7: 211-221

Vollmann-Honsdorf GK, Flüge G and Fuchs E, Chronic psychosocial stress and cortisol treatment: effects on nuclear ultrastructure of hippocampal pyramidal neurons. eingereicht

#### **Kurzfassungen und Kongreßbeiträge:**

Vollmann G and Flüge G, Serotonergic neurons and 5HT1A - receptors in the brainstem of tree shrew (*Tupaia belangeri*); *Brain and Evolution*, Elsner N., Schnitzler H.-U. (eds.), Proc. 24th Göttingen Neurobiology Conference 1996: 513

Vollmann G, Flügge G and Fuchs E; Chronic psychosocial stress in tree shrews (*Tupaia belangeri*) alters the nuclear ultrastructure of CA3 hippocampal pyramidal neurons; From Membrane to Mind, Elsner N., Wässle H. (eds.), Proc. 25th Göttingen Neurobiology Conference 1997: 985

Vollmann-Honsdorf GK, West MJ and Fuchs E, Preserved neuron number in the hippocampus of chronic psychosocially stressed tree shrews; Soc Neurosci Abstr (1997) 23: 239

Vollmann-Honsdorf GK and Fuchs E, Chronic psychosocial stress does not change the number of neurons in the hippocampus: a stereological study; The Neuroethology on the Move, Elsner N., Wehner R. (eds.), Proc. 26th Göttingen Neurobiology Conference 1998

Vollmann-Honsdorf GK, Flügge G and Fuchs E, Cortisol treatment and psychosocial stress differentially alter the nuclear ultrastructure of hippocampal pyramidal neurons; Proceedings of the 1<sup>st</sup> Göttingen Conference of the German Neuroscience Society ; Vol II; 27<sup>th</sup> Göttingen Neurobiology Conference 1999: 524

Ohl F, Michaelis T, Vollmann-Honsdorf GK, Frahm J and Fuchs E, Temporal dynamic effects of stress and cortisol treatment on the hippocampus and its executive functions; Proceedings of the 1<sup>st</sup> Göttingen Conference of the German Neuroscience Society ; Vol II; 27<sup>th</sup> Göttingen Neurobiology Conference 1999: 523

Lucassen PJ, Vollmann-Honsdorf G, Gleisberg M, De Kloet ER and Fuchs E, Chronic social stress differentially influences apoptosis in subareas of the adult tree shrew hippocampus. FENS meeting, Brighton, 2000

Lucassen PJ, Vollmann-Honsdorf G, Gleisberg M, Czeh B, De Kloet ER and Fuchs E, Chronic psychosocial stress differentially influences apoptosis in hippocampal subregions of the adult tree shrew. Dutch EndoNeuro meeting, Doorwerth, NL, 2001

#### 7.6. Eidesstattliche Versicherung und Erklärung über frühere Promotionsversuche

Hiermit versichere ich, daß ich diese Dissertation selbständig verfaßt habe. Alle verwendeten Hilfsmittel und Quellen wurden an den entsprechenden Stellen oder im Anhang angegeben.

Paderborn, den

Hiermit erkläre ich, daß ich keine früheren Promotionsversuche unternommen habe

Paderborn, den

