

Zum Einfluss epigenetischer Faktoren
auf die Reifung aminerg Neurotransmitter
im Corpus amygdaloideum und zum Verhalten.
Eine quantitative Studie an *Meriones unguiculatus*.

Dissertation

zur Erlangung des Grades

Doktor rer. nat.

Fakultät für Biologie

Universität Bielefeld

vorgelegt von

Dierk Polascheck

Bielefeld

im August 2004

Zusammenfassung

Frühere Studien unserer Arbeitsgruppe haben gezeigt, dass die restriktive Käfigaufzucht von *Gerbils* zu einer verminderten Reifung dopaminerger Fasern in den präfrontalen Kortex (PFC) führt. Es gilt nun zu untersuchen, wie sich eine restriktive Aufzucht auf die Innervationsdichte limbischer Areale auswirkt. Dies soll in der vorliegenden Studie an der Amygdala untersucht werden. Hierzu wurde die dopaminerge und serotoninerge Innervationsdichte des lateralen, basolateralen und zentralen Kerns der Amygdala quantifiziert. Als weiterer Faktor wurde die Auswirkung einer einmaligen Methamphetamin-Intoxikation am Tag 14 auf die Innervationsdichte der Amygdala untersucht. Um einen möglichen Einfluss der restriktive Käfigaufzucht auf das Verhalten der Tiere zu überprüfen, wurde das Verhalten mit Hilfe des open fields, des elevated plus-maze und der Vermeidungskonditionierung quantitativ untersucht.

- Die restriktive Käfigaufzucht führt zu einem Anstieg der dopaminergen und serotoninergen Faserdichte im basolateralen Kern der Amygdala. Im zentralen Kern sinkt die dopaminergen Faserdichte jedoch ab, die serotoninergen Faserdichte steigt hingegen an. Im lateralen Kern treten keine signifikanten Unterschiede auf.
- Die Methamphetamin-Intoxikation hat keinen signifikanten Einfluss auf die serotoninerge Faserdichte der untersuchten Bereiche. Hingegen führt Methamphetamin zu einem Anstieg der dopaminergen Faserdichte. Bei den Tieren aus restriktiver Käfigaufzucht tritt dieser Effekt deutlicher zu Tage als bei reichlich aufgezogenen Tieren. Signifikante Unterschiede treten nur im lateralen und basolateralen Kern der Amygdala auf.
- In den Verhaltenstests zeigte sich, dass Tiere aus isolierter Käfigaufzucht ängstlicher reagieren und eine erhöhte Lokomotion aufweisen so wie Defizite bei der Furchtbewältigung besitzen.

Die Befunde werden im Kontext mit früheren Studien der Arbeitsgruppe diskutiert. Dabei wird besonderer Wert auf die Einbindung der Amygdala in das limbopräfrontale System gelegt. Das Zusammenspiel des PFC mit der Amygdala bei der Generierung und Bewältigung von Furcht wird beschrieben. Das Verhalten der Tiere wird auf der Grundlage des veränderten Innervationsmusters der Amygdala diskutiert.

Inhalt

1	Einleitung	2
1.1	Die Amygdala.....	3
1.1.1	Der laterale Kern.....	5
1.1.2	Der basolaterale Kern	5
1.1.3	Der zentrale Kern.....	6
1.1.4	Die Rolle der Amygdala bei der Furchtkonditionierung	7
1.2	Die Einbindung der Amygdala in das limbopräfrontale System	10
1.3	Das dopaminerge System	12
1.4	Das serotoninerge System	13
1.5	Der Einfluss der Umwelt.....	14
1.6	Zielsetzung der Arbeit.....	17
2	Material und Methode	18
2.1	Versuchstiere	18
2.2	Aufzuchtbedingungen.....	18
2.3	Pharmakologische Behandlung.....	19
2.4	Immunhistochemische Aufarbeitung der Gehirne.....	20
2.4.1	Dopamin.....	20
2.4.2	Serotonin.....	20
2.5	Versuchsauswertung	21
2.5.1	Computerbasierte Bildanalyse	21
2.5.2	Messfelder.....	22
2.5.3	Datenanalyse.....	23
2.6	Verhaltenstest.....	24
2.6.1	Versuchstiere	24
2.6.2	Elevated plus-maze	25
2.6.3	Open field	25
2.6.4	Vermeidungskonditionierung	26
3	Ergebnisse	29
3.1	Qualitative Ergebnisse	29
3.1.1	Dopamininnervation	29
3.1.2	Serotonininnervation.....	30
3.2	Quantitative Ergebnisse	31
3.2.1	DA Innervation	31
3.2.2	5-HT Innervation	38
3.3	Verhaltenstests.....	44
4	Diskussion	50
4.1	Zur katecholaminergen Innervation der Amygdala.....	50
4.1.1	Zur dopaminergen Innervation der Amygdala.....	51
4.1.2	Zur serotoninerge Innervation der Amygdala.....	54
4.2	Zum Einfluss auf das Verhalten.....	56
4.2.1	Zum elevated plus-maze und open field	56
4.2.2	Zur Konditionierung und deren Löschung.....	60
5	Fazit	63
6	Literatur	64

1 Einleitung

Die wissenschaftliche Erforschung der Emotionen, als biologische Funktionen des Nervensystems, ist gegenwärtig ein bedeutender Teil der Hirnforschung. Dabei spielt die Untersuchung der physiologischen und anatomischen Grundlagen von Angst und Furcht eine zentrale Rolle. Die Fähigkeit des Gehirns Angst hervorzubringen, hat sich als ein entscheidender Vorteil in der Evolution erwiesen, denn die Vermeidung von Gefahren und Furcht auslösenden Reizen sichert das Überleben und erhöht so langfristig den Fortpflanzungserfolg.

Aber das Vermögen Angst zu empfinden, kann auch zu einer schweren Bürde werden. Angsterkrankungen gehören mit einer Lebenszeitprävalenz von insgesamt 15% zu den häufigsten psychischen Störungen (Berger, 1999). Generalisierte Angst, das Paniksyndrom und die Phobie sind einige der am häufigsten auftretenden Störungen in Zusammenhang mit der Angst. Sie alle führen zu erheblichen Einbußen in der Lebensqualität der Betroffenen und stellen eine große Belastung des familiären und sozialen Umfeldes dar. Da Angststörungen in unserer Gesellschaft zu einem häufigen Krankheitssymptom geworden sind, verursacht die hohe Inanspruchnahme von medizinischer Versorgung und Arbeitsausfallzeiten auch beträchtliche sozialwirtschaftliche Kosten (Berger, 1999).

Der neurobiologischen Grundlagenforschung kommt eine tragende Rolle für das Verständnis der gesunden und pathologischen Angstreaktion zu, da nur das Verständnis der hirnpfysiologischen Vorgänge und anatomischen Zusammenhänge die Entwicklung von effektiven Psychopharmaka und Therapiemaßnahmen ermöglicht. Eine zentrale Frage ist, welche Umweltfaktoren die Entstehung von Angsterkrankungen veranlassen und fördern.

Die Erforschung von affektiven Erkrankungen und die Entwicklung entsprechender Pharmaka findet in unserem wie in anderen neurobiologischen Laboratorien am Tiermodell statt. Die Frage, inwieweit Tiere zu emotionalen Erfahrungen fähig sind, kann heute von Ethologen und Neurophysiologen schon relativ konkret beantwortet werden. Es ist bekannt, dass beengte Haltungsbedingungen zu Stereotypen, Reduktion von Komfort- und Explorationsverhalten bis hin zur Apathie führen. Diese

Verhaltensauffälligkeiten werden als ethologische Kriterien für erhebliches Leiden angeführt, die das Tierschutzgesetz nach § 2 Nr. 1 und § 2 Nr. 2 verbietet (Baum et al., 1998; Teuchert-Noodt and Lehmann, 2004). Aus der Emotionsforschung ergeben sich somit auch Konsequenzen für Transport, Haltung sowie Aufzucht von Labor- und Nutztieren. Betrachtet man die neuronalen Grundlagen von Emotionen, sollte auch die Unfähigkeit Ängste abzubauen, erhebliches Leiden verursachen (Buchholtz et al., 2000).

Auf der Suche nach dem neuronalen Korrelat von Furcht und Angst hat man schon früh Regionen im Temporallappen in Betracht gezogen. Die Bedeutung des Temporallappens für das emotionale Verhalten geht auf die Experimente von Klüver und Bucy im Jahre 1939 zurück. Sie beobachteten bei Primaten nach einer Temporallappenektomie den Verlust der Furcht vor angeborenen furchtauslösenden Reizen (Klüver and Bucy, 1939). Die Unfähigkeit der Tiere, trotz intaktem visuellen System, emotional auf gefährliche Reize zu reagieren, wurde von den Autoren als „Seelenblindheit“ bezeichnet und sollte später als „Klüver-Bucy-Syndrom“ in die Literatur Einzug halten. In den darauffolgenden Jahren wurde näher untersucht, welche Teile des Temporallappens essentiell für die Auslösung des Klüver-Bucy-Syndroms sind. Weiskrantz gelang es 1956 mit Hilfe der Vermeidungskonditionierung den Nachweis zu erbringen, dass die Amygdala entscheidend dafür ist, furchtauslösenden Reizen eine emotionale Bedeutung zu verleihen (Weisenkranz, 1956).

Aufbauend auf diesen Studien haben wir heute durch eine umfangreiche Forschung und neue Techniken die Möglichkeit, einen tieferen Einblick in den Aufbau und die Reizverarbeitung in der Amygdala zu erlangen. Als zentraler Aspekt der hier vorliegenden Studie, wird die Amygdala nun näher beschrieben. Dabei soll vor allem auf die Interaktion der Amygdala mit anderen Hirngebieten eingegangen werden. Denn erst das komplexe Zusammenspiel von Hirnstrukturen vermag Emotionen hervorzubringen.

1.1 Die Amygdala

Die Amygdala (Corpus amygdaloideum = Mandelkern) ist eine phylogenetisch „alte Struktur“ des Gehirns. Ihr Name leitet sich von der mandelförmigen Gestalt einer grauen Substanz ab, die im Frontalschnitt durch den Temporallappen des menschlichen

Gehirns sichtbar wird. Heute fasst man unter dem Begriff Amygdala einen Kernkomplex zusammen, der aus 13 Kernen besteht und im dorsomedialen Pol des Temporallappen vor dem Unterhorn des Seitenventrikels liegt (Akert, 1994; Pitkanen, 2000). Die einzelnen Kerne lassen sich nach ihrem cytoarchitektonischem Aufbau drei Gruppen zuordnen: den tiefen Kernen (deep nuclei), den oberflächen/äußeren Kernen (superficial nuclei) und den übrigen Kernen (other nuclei) (Pitkanen, 2000; Swanson and Petrovich, 1998). Von diesen 13 Kernen der Amygdala spielen bei der Furchtverarbeitung und Verhaltenssteuerung drei Kerne eine besondere Rolle (LeDoux, 1996). Dies sind: der laterale Kern (LA), der basolaterale Kern (BLA) und der zentrale Kern (CEA) der Amygdala (siehe Abb.1.1). Der LA und der BLA werden auch unter dem Begriff basolateraler Komplex zusammengefasst und gehören zur Gruppe der tiefen Kerne. Der CEA wird hingegen zu der Gruppe der übrigen Kerne gezählt. In ihrem cytoarchitektonischem Aufbau ähneln der LA und der BLA dem Klastrum und der CEA dem angrenzenden Striatum (Swanson and Petrovich, 1998). Im weiteren soll auf die anatomischen Eigenschaften und die Funktion der einzelnen Kerne eingegangen werden, hierbei erfolgt die strukturelle Einteilung der Kerne nach der Nomenklatur von Swanson (Swanson and Petrovich, 1998).

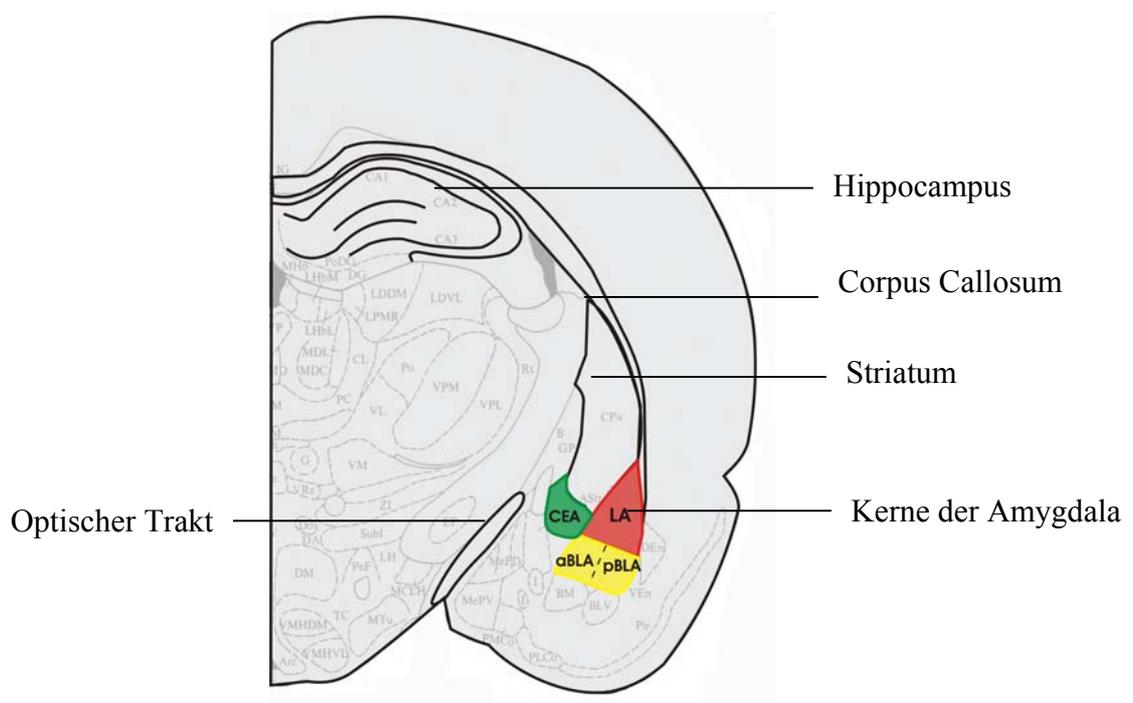


Abb.1.1: Frontalschnitt auf der Höhe der Amygdala. Die untersuchten Kerne sind farbig markiert: lateraler Kern (LA) rot, basolateraler Kern (BLA) gelb und zentraler Kern (CEA) grün. Verändert nach Paxinos & Watson 1986.

1.1.1 Der laterale Kern

Der laterale Kern (LA) liegt im dorsalen Teil der Amygdala, medial zur Capsula externa und lateral zum zentralen Kern. Ventral grenzt er an den basolateralen Kern (Pitkanen, 2000). Der LA lässt sich in drei Gebiete einteilen: dem dorsolateralen, ventrolateralen und medialen Teil. Die einzelnen Gebiete sind unidirektional miteinander verbunden, so dass der Informationsfluss in nur eine Richtung läuft (Pitkanen et al., 1997). Innerhalb der Amygdala erhält der LA reziproke Afferenzen vom basalen, akzessorisch basalen und medialen Kern so wie vom periamygdaloiden Kortex. Diese Projektionen terminieren hauptsächlich im ventrolateralen und medialen Teil. Unidirektional projiziert der LA auf den CEA. Er erhält keine Fasern aus der kontralateralen Amygdala, noch projiziert er zu dieser.

Der LA erhält die stärksten Eingänge aus sensorischen Kortexarealen. Diese gustatorischen, viszeralen, somatosensorischen (rostral) so wie auditiven und visuellen (caudal) Afferenzen sind somatotopisch organisiert (Pitkanen, 2000). Die Hippocampusformation, vor allem der entorhinale Kortex und das Subiculum, besitzen dichte, reziproke Faserzüge zum LA (Pikkarainen et al., 1999; Pitkanen et al., 2000).

Thalamus und Hypothalamus sowie die dorsale Raphe, Produktionsstätte für Serotonin, senden prominente Afferenzen, moderate Eingänge stammen hingegen aus der VTA und der Substantia nigra, Produktionsstätte für Dopamin (Fallon and Ciofi, 1992; Pitkanen, 2000).

Der LA unterhält auch reziproke Verbindungen zum Präfrontalkortex (PFC), jedoch sind diese nicht so ausgeprägt wie zwischen PFC und BLA (McDonald et al., 1996; Pitkanen, 2000).

1.1.2 Der basolaterale Kern

Der basolaterale Kern (BLA) liegt rostral zum LA und medial zur externen Kapsel. Er wird in drei Bereiche unterteilt, die anteriore BLA (aBLA) mit großen Zellkörpern, die posteriore BLA (pBLA) mit kleinen Zellkörpern und den intermediären Bereich (Pitkanen, 2000). Im Gegensatz zum LA ist der Informationsfluss nicht unidirektional, innerhalb eines Gebietes bestehen über die rostrocaudale Achse und zwischen den Gebieten zahlreiche Verbindungen (Pitkanen et al., 1997). Innerhalb der Amygdala schickt der BLA Afferenzen zum ipsilateralen LA und CEA, so wie zum kontralateralen BLA und CEA. Der BLA erhält die stärksten Afferenzen von dem LA.

Die Afferenzen aus den kortikalen Gebieten stammen annähernd aus den selben Kortexarealen wie die Afferenzen zum LA, nur ist die Innervationsdichte geringer (Pitkanen, 2000). Im Gegensatz dazu stehen die prominenten, reziproken Verbindungen mit dem PFC, welche die dichtesten in der Amygdala sind (McDonald et al., 1996; Pitkanen, 2000). Gleiches trifft auf die Projektionen aus der Hippocampusformation zu, hier liefern der entorhinale Kortex und das Subiculum die prominentesten Eingänge zum BLA (Pitkanen et al., 2000). Der Thalamus schickt ebenfalls starke Efferenzen in den BLA. Neben den reziproken Verbindungen zum PFC, der Hippocampusformation und dem Thalamus liefert der BLA den größten Output zum Nucleus accumbens und Caudatus-Putamen (Pitkanen, 2000), zwei Strukturen, die mit der motorischen Reizverarbeitung in engstem Zusammenhang stehen.

1.1.3 Der zentrale Kern

Der zentrale Kern der Amygdala (CEA) befindet sich im dorsomedialen Teil der rostralen Amygdala. Er liegt medial zum LA und BLA, so wie lateral zur Stria terminalis und endet kaudal mit dem Auftauchen des Seitenventrikels. Wie der LA und BLA erhält der CEA Afferenzen aus sensiblen Kortexarealen, der Hippocampusformation, dem PFC und dem Thalamus (Pitkanen, 2000). Im Vergleich zu den anderen beiden Kernen sind diese Eingänge aber von geringerer Anzahl und es ist zu beachten, dass der CEA nicht in die kortikalen Gebiete zurück projiziert (Pitkanen et al., 1997). Hingegen liefert der „Hypothalamus“ und vor allem der Hirnstamm starke Eingänge. Im Gegenzug schickt der CEA starke Efferenzen zu diesen Gebieten. Anhand dieser Verbindungen ist der CEA befähigt autonome Verhaltensreaktionen auszulösen (Pitkanen et al., 1997; Pitkanen, 2000).

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass LA und BLA die Eingangsinstanzen der Amygdala bilden. Der CEA ist hingegen als die Ausgangsinstantz der Amygdala zu betrachten, welche die verarbeiteten Informationen aus LA und BLA erhält, und über seine Projektionen in den Hirnstamm Verhaltensreaktionen auslöst. Die folgende Abbildung (Abb.1.1.3) gibt einen vereinfachten Überblick über die Afferenzen und Efferenzen so wie den Weg des Signalflusses zwischen den beschriebenen Kernen der Amygdala.

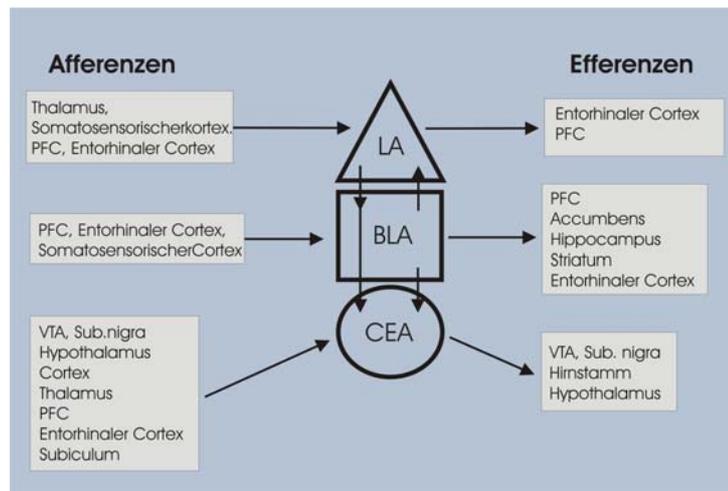


Abb.1.1.3: Vereinfachte Darstellung der Afferenzen und Efferenzen des LA, BLA und CEA.

Am Beispiel der Furchtkonditionierung soll das Zusammenspiel von LA, BLA und CEA verdeutlicht werden.

1.1.4 Die Rolle der Amygdala bei der Furchtkonditionierung

Die Furchtkonditionierung spielt heute bei der Erforschung von emotionalen Prozessen im Gehirn eine bedeutende Rolle (LeDoux, 1996). Man unterscheidet die klassische Konditionierung nach Iwan Pawlow (1849-1936) und die instrumentelle Konditionierung. Bei der *Pawlovschen Furchtkonditionierung* wird ein neutraler Reiz (conditional stimulus, CS), z.B. ein Ton, mit einem aversiven Reiz (unconditional stimulus, UCS), meist ein Elektroschock, gekoppelt. Wichtig hierbei ist die Kontingenz der Reizabfolge. Bereits nach wenigen Kopplungen von Ton und Schock, zeigt das Tier ein angeborenes Furchtverhalten allein auf den Ton (conditional response, CR) (LeDoux, 1996). Dieses Verhalten ist nicht erlernt, sondern ein Spezies typisches automatisches Antwortverhalten, das auf eine

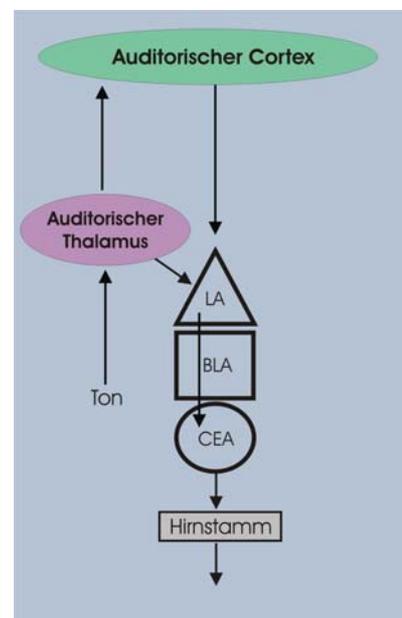


Abb.1.1.4.1: Thalamischer und corticaler Weg akustischer Reize in die Amygdala

Gefahr hingerrichtet ist (Pellow et al., 2004). Der Weg der Reizleitung konnte von Le Doux und Mitarbeitern weitgehend aufgedeckt werden. Die akustischen Signale laufen über das Mittelhirn zum auditorischen Thalamus und von dort in den Kortex.

Der LA erhält Efferenzen aus dem auditorischen Thalamus und dem auditorischen Kortex (siehe Abb.1.1.4.1) (LeDoux et al., 1990; LeDoux, Farb et al., 1990; Romanski and LeDoux, 1992). Das heißt, es gibt zwei Wege der akustischen Informationsleitung in die Amygdala. Der thalamische Weg liefert einen ungenaueren dafür aber schnelleren Informationsfluss als der polysynaptische Weg über den Kortex. Dieser zeitliche Vorsprung ist ein entscheidender Vorteil für das Überleben, da er dem Organismus in Gefahrensituationen eine schnelle Reaktion ermöglicht (LeDoux, 1996). In entsprechender Weise verlaufen die über den Elektroschock vermittelten sensorischen Reize über den Thalamus und den Kortex zur Amygdala. Im LA konvergieren beide Modalitäten (siehe Abb.1.1.4.2) auf spezifischen Neuronen (Romanski et al., 2004).

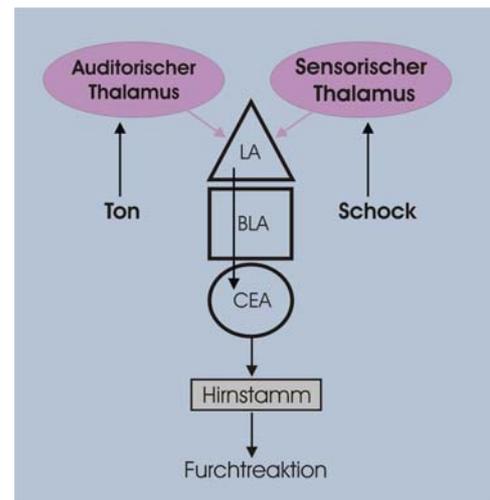


Abb.1.1.4.2: Reizleitung in der Amygdala bei der klassischen Konditionierung

Diese Neuronenpopulation im LA bildet die neuronale Grundlage für die assoziative Verknüpfung von Ton und Schock, bei der die Langzeitpotenzierung (LTP) eine wichtige Rolle spielt (Walker and Davis, 2002). Durch Efferenzen vom LA über CEA werden Hirnstammzentren erreicht und aktiviert, welche die Angstreaktion auslösen (Davis, 1992; LeDoux, 1995). Der BLA ist an der klassischen Konditionierung nicht beteiligt, denn eine Läsion in diesem Kern hat keine Auswirkung auf die Konditionierung (Amorapanth et al., 2000).

Bei der instrumentellen Konditionierung lernt das Tier beim Auftreten des neutralen Reizes (Ton) ein Verhalten auszuführen, dass das Erscheinen des unconditionierten Stimulus (Schock) unterbindet. Ein oft verwendeter Versuchsaufbau besteht darin, dass das Tier beim Hören des Tons einen Hebel drücken muss, um dem drohenden Stromschlag zu entgehen. Der Unterschied zur klassischen Konditionierung besteht also darin, dass ein aktives Verhalten des Tieres notwendig ist. Es stellt sich die Frage, ob die Verarbeitung in der Amygdala bei der instrumentellen Konditionierung auf dem

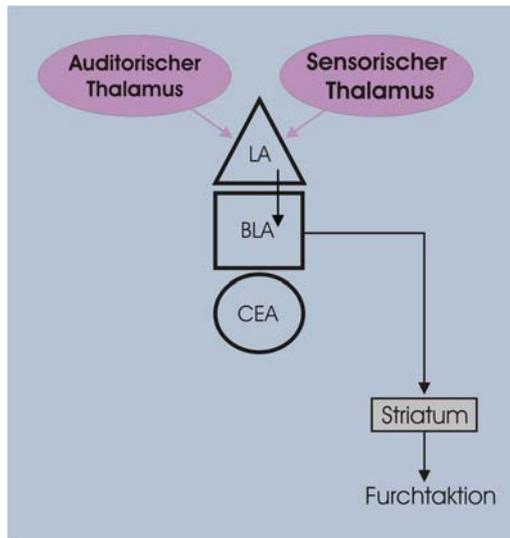


Abb.1.1.4.3: Reizleitung in der Amygdala bei der instrumentellen Konditionierung.

selben Wege stattfindet wie bei der klassischen Konditionierung, ist doch der CS und der UCS bei beiden Varianten der Konditionierung identisch. Amorapanth und Mitarbeiter konnten in einem eleganten Versuch nachweisen, dass instrumentelle und klassische Konditionierung über verschiedene Kerne der Amygdala (siehe Abb.1.1.4.3) vermittelt werden (Amorapanth et al., 2000). Die instrumentelle Konditionierung wird auch nach der Zerstörung des CEA gelernt (Amorapanth et al., 2000)! Der für die klassische Konditionierung essentielle Kern

spielt bei der instrumentellen Konditionierung also keine entscheidende Rolle. Wird aber der BLA geschädigt, ist die instrumentelle Konditionierung gestört (Amorapanth et al., 2000). Nur eine Läsion des LA unterbindet beide Formen der Konditionierung, was noch einmal die Funktion des LA als generelle Eingangsinstanz der Amygdala unterstreicht (Amorapanth et al., 2000).

Klassische und instrumentelle Konditionierung zeigen, wie differenziert die Verarbeitung in der Amygdala stattfindet. Nun lernt ein Tier bei der Furchtkonditionierung nicht nur auf den konditionierten Stimulus zu reagieren. Vielmehr zeigt das Versuchstier nach einigen Wiederholungen bereits furchtsames Verhalten bevor der konditionierte Reiz auftritt. Das Tier lernt somit auch den Kontext, in dem es den unkonditionierten Reiz erfahren hat. Bei wiederholter Darbietung ohne folgenden UCS verschwindet hingegen die Reaktion auf den Kontext und den CS. Man spricht in diesem Fall von der Löschung der Konditionierung.

Mit den bisher beschriebenen Strukturen der Amygdala lässt sich die Reaktion auf den Kontext und die Löschung der Konditionierung nicht hinreichend erklären. Das gezeigte Verhalten wird erst verständlich, wenn die Amygdala zusammen mit den Hirngebieten betrachtet wird, mit denen sie prominente Verbindungen unterhält. Dies sind vor allem der präfrontale Kortex und der Hippocampus, die zusammen mit der Amygdala das limbopräfrontale System bilden.

1.2 Die Einbindung der Amygdala in das limbopräfrontale System

Das limbopräfrontale System (Bachevalier, 1990; Benes et al., 1992) besteht aus dem präfrontalen Kortex (PFC), dem Hippocampus und der Amygdala. Der PFC wird als das höchste assoziative und integrative Zentrum des Gehirns angesehen (Kolb and Whishaw, 1990). Er spielt eine zentrale Rolle für die Bildung von Arbeitsgedächtnis und Sozialverhalten (Tucker et al., 1995) sowie die Verarbeitung von Emotionen (Bertolucci-D'Angio et al., 1990; Groenewegen and Uylings, 2000). Der PFC liegt rostral des Motorkortex und ist als Bereich definiert, in dem sich die Projektionen aus dem mediodorsalen Thalamus und der VTA überlappen (Divac et al., 1993; Ray and Price, 1992). Besondere Bedeutung kommt der prolongierten Reifung des PFC zu, dessen neuronale Strukturen, bei der Ratte wie beim Menschen, erst im Erwachsenenalter ausgereift sind (Huttenlocher, 1979; Kaslsbeek 1988). Verursacht wird dies durch die verzögerte Reifung der aufsteigenden mesopräfrontalen Dopaminbahn (Kaslsbeek 1988, Dawirs et al., 1993). Eine lange Reifungsphase bedeutet eine anhaltend hohe plastische Potenz der präfrontalen Nervennetze, adaptiv auf Umweltreize zu reagieren (Dawirs et al., 1994; Winterfeld et al., 1998).

Die Amygdala, vor allem der BLA, erhält glutamaterge Afferenzen aus dem medialen PFC (McDonald et al., 1996) und schickt glutamaterge Efferenzen an diesen zurück (Pitkanen, 2000). Die Interaktion von PFC und Amygdala ist von entscheidender Bedeutung für die Bildung emotionalen Verhaltens (Bertolucci-D'Angio et al. 1990; Morgan et al., 1993; Rosenkranz and Grace, 2001). Dabei übernimmt der PFC die übergeordnete Kontrollfunktion, fehlt diese Kontrolle, kann der Organismus nicht mehr adäquat auf ungefährliche Reize reagieren (Morgan et al., 1993; Zahrt et al., 1997).

Der Hippocampus liegt im Schläfenlappen des Großhirns am Boden des Seitenventrikelunterhorns. Der Hippocampus wird dem Telencephalon zugeordnet, unterscheidet sich aber von diesem dadurch, dass er phylogenetisch älter ist und nur eine dreischichtige Struktur besitzt (Trepel, 1999). Makroskopisch erkennt man die *Formatio Hippocampi* als eine C-förmige Struktur, die sich in ihrer Längsachse vom Nucleus septalis des basalen Vorderhirns über das Diencephalon hinweg nach caudoventral in den Temporallappen erstreckt (Amaral and Witter, 1995). Das hippocampale System lässt sich in drei Strukturen einteilen, den Hippocampus proper,

auch als Cornu ammonis (Ammonshorn) bezeichnet, den Gyrus dentatus (Fascia dentata) sowie das Subiculum (Akert, 1994). Aufgrund der funktionalen Verbindungen zwischen dem entorhinalen Cortex (Area entorhinalis), dem Prä- und Parasubiculum und dem Hippocampus werden diese zusammen als Hippocampusformation bezeichnet (Amaral and Witter, 1995). Als zentrale Struktur des limbischen Systems besitzt der Hippocampus eine Schlüsselstellung im Kontext von Verhalten, Lernen, Motivation und Gedächtnis (Akert, 1994; Kandel et al., 1996; Sinz, 1979). Die Amygdala unterhält zahlreiche reziproke und topografisch geordnete Verbindungen zur Hippocampusformation (Pikkarainen et al., 1999; Pitkanen et al., 2000; Pitkanen, 2000). Vor allem der LA und der BLA projizieren zur Hippocampusformation (Pikkarainen et al., 1999; Pitkanen et al., 2000) und erhalten ihrerseits die stärksten Efferenzen aus dem Hippocampus (Pikkarainen et al., 1999; Pitkanen et al. 2000). Allein der Gyrus Dentatus, welcher eine prominente Substruktur im Hippocampus bildet, erhält keine Efferenzen aus der Amygdala (Pikkarainen et al., 1999).

Der Hippocampus ist von Bedeutung für die Einbindung des Kontextes in die von der Amygdala gesteuerten Furchtreaktion. Bei Experimenten zur Furchtkonditionierung konnte nachgewiesen werden, dass das Tier nach erfolgreicher Konditionierung schon allein auf den Käfig, in dem es den Stromschlag erhalten hat, mit Furcht reagiert (Phillips and LeDoux, 1992). Eine Läsion des Hippocampus verhindert die Konditionierung auf den Kontext (Phillips and LeDoux, 1992). Die Amygdala ihrerseits kann durch ihre Efferenzen Einfluss auf die Informationsverarbeitung im Hippocampus nehmen und so die Langzeitgedächtnisbildung beeinflussen (Pikkarainen et al., 1999; Cahill and McGaugh, 1998). In der folgenden Abbildung ist die Einbindung der Amygdala in das limbopräfrontale System vereinfacht dargestellt (Abb.1.2).

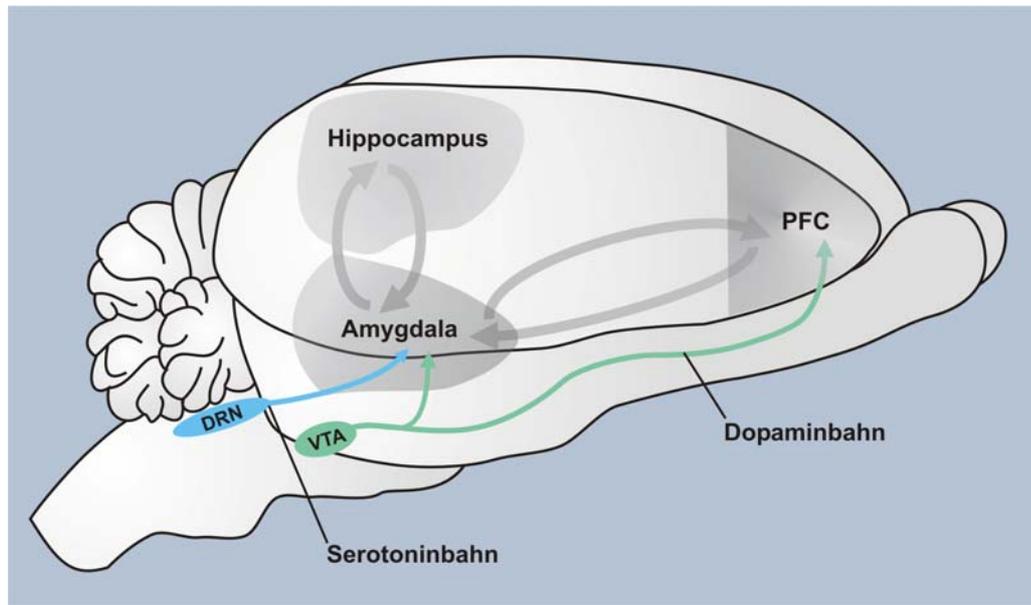


Abb.1.2: Vereinfachte Darstellung der Interaktion der Amygdala mit dem PFC und dem Hippocampus so wie die Innervation der Amygdala durch die mesolimbische Dopaminbahn (grün) und Serotoninbahn (blau).

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass PFC, Hippocampus und Amygdala die drei zentralen Strukturen des limbopräfrontalen Systems sind, welche über reziproke Verbindungen die Furchtreaktion und Furchtkontrolle steuern und die darauf gerichtete Gedächtnisbildung veranlassen. Diese ganzheitliche Betrachtung soll der Diskussion über die hier vorgestellten Befunde zur adaptiven Reifung von Transmittern unter dem Einfluss von Umweltfaktoren zugrunde gelegt werden. Untersucht wurden die Katecholamine Dopamin (DA) und Serotonin (5-HT), die eine Schlüsselrolle im limbopräfrontalen System einnehmen. Die Bedeutung von DA und 5-HT soll im Folgenden näher erläutert werden.

1.3 Das dopaminerge System

Die Dopamin (DA) Innervation des Gehirns unterscheidet sich von der anderer Neurotransmitter durch die spezifische und eng abgegrenzte Innervation einzelner Hirngebiete. Sie hat ihren Ursprung in der ventralen tegmentalen area (VTA) und der Substantia nigra (SN). Von dort ziehen die DAergen Axone in definierten Bahnen zu ihren Zielgebieten. Die Amygdala ist eines der Hauptzielgebiete der mesolimbischen Dopaminbahn (Fallon and Ciofi, 1992). Die DA Innervation der Amygdala stammt aus der Substantia nigra (A9 und A8) und besonders aus der VTA (A10) (Fallon and Ciofi, 1992). Die DAergen Axone ziehen über das ventrale Vorderhirnbündel und die amygdalofugale Bahn zur Amygdala. Dort terminieren sie vor allem in dem lateralen

Teil des CEA und den intercalated cell masses (Asan, 1998). Eine moderate Innervation weist der BLA auf, gefolgt vom LA (Asan, 1998; Brinley-Reed and McDonald, 1999; Fallon and Ciofi, 1992). Ultrastrukturelle immunohistochemische Studien des BLA haben gezeigt, dass die Hauptziele der DAergen Fasern die Schäfte von Dendriten und Spines sind (Asan, 1998). Bei einer geringen Zahl von Neuronen konnte überdies ein dichter dopaminerges Plexus an den Perikarien und proximalen Dendriten nachgewiesen werden (Asan, 1998; Brinley-Reed and McDonald, 1999; Fallon et al., 1978). Diesen dicht innervierten Neuronen sollte eine besondere Rolle bei der dopamingesteuerten Aktivität der Amygdala zukommen (Brinley-Reed and McDonald, 1999). Weitere Studien ergaben, dass es sich bei diesen dicht innervierten Neuronen vor allem um GABAerge Interneurone um Pyramidenzellen handelt (Brinley-Reed and McDonald, 1999). Das heißt, im BLA wird die DAerge Wirkung zum Teil über hemmende Interneurone vermittelt, die ihrerseits perisomatische Synapsen an den benachbarten Pyramidenzellen unterhalten (Sorvari et al., 1996). Somit erhält DA eine modulierende Rolle, vergleichbar mit seiner Funktion im Kortex (Pikkarainen et al., 1999; Rosenkranz and Grace, 1999).

1.4 Das serotonerge System

Ähnlich dem DAergen System bilden nur relativ wenige Neurone den Ursprung der Serotonin (5-HT) Fasern. Die serotoninergen Somata befinden sich in den Raphekernen im Hirnstamm und werden in neun (B1-B9) Gruppen unterteilt (Jacobs and Azmitia, 1992). Ein wesentlicher Unterschied zum zuvor beschriebenen DAergen System ist die ubiquitäre Verteilung von 5-HT im Gehirn, so dass davon ausgegangen wird, dass fast jede Zelle im Kortex mit 5-HTergen Fasern in Kontakt steht (Lidov et al., 1980).

Von den neun Raphekernen senden zwei Gruppen Axone in die höheren Hirngebiete, dies sind der Nucleus raphe dorsalis (DRN, B7+B9) und der Nucleus raphe medialis (MRN, B5+B8) (Jacobs and Azmitia, 1992). Die Fasern der DRN und MRN unterscheiden sich in ihrer Morphologie, so sind Efferenzen aus der DRN sehr dünn mit kleinen Varikositäten, die Fasern aus der MRN hingegen von variabler Dicke mit großen, kugelförmigen Varikositäten (Kosofsky and Molliver, 1987). Die Amygdala wird zum größten Teil von Fasern der dorsalen Raphe innerviert (Ma et al., 1991; Sadikot and Parent, 1990; Fallon and Ciofi, 1992). Die gesamte Amygdala der Ratte ist

5-HTerg innerviert, die höchste Innervationsdichte in der Amygdala findet sich im BLA (Fallon and Ciofi, 1992).

5-HT entfaltet seine modulatorische Wirkung über eine Vielzahl von Rezeptoren, wobei in der Amygdala hauptsächlich 5-HT Rezeptoren der Klassen 5-HT_{1A}, 5-HT₂, 5-HT₃, 5-HT₄ und 5-HT₆ zu finden sind (Pralong et al., 2002). Jedoch sind in den einzelnen Kernen die verschiedenen Rezeptoren nicht gleich vertreten. In dem BLA sind vor allem 5-HT₂, 5-HT₃ und 5-HT₆ anzutreffen, hingegen sind in der zentralen Amygdala fast nur 5-HT_{1A} Rezeptoren nachweisbar (Rainnie, 1999). Die Aktivierung von 5-HT₂ Rezeptoren in dem BLA bewirkt eine Depolarisation von GABAergen Interneuronen, die einen hemmenden Einfluss auf die benachbarten Pyramidenzellen ausüben (Rainnie, 1999). 5-HT Ausschüttung führt im LA und BLA zu einer verminderten Reizbarkeit der Projektionsneurone durch glutamaterge kortikale Efferenzen (Rainnie, 1999; Stutzmann et al., 1998).

1.5 Der Einfluss der Umwelt

Die Umwelt nimmt entscheidend Einfluss auf die Reifung des Gehirns. Die grundlegenden Arbeiten von Hubel und Wiesel an jungen Katzen und Primaten zeigten, dass eine visuelle Deprivation der Tiere Anomalien im visuellen Kortex verursacht (zusammengefasst in Wiesel 1983). Hierfür ist das Alter der Versuchstiere von entscheidender Bedeutung, denn je früher die Deprivation einsetzte, desto ausgeprägter waren die Veränderungen im Kortex. Setzte die Deprivation erst im Erwachsenenalter der Tiere ein, traten keine Anomalien im Kortex auf. Hubel und Wiesel schlossen daraus, dass es kritische Phasen für die Reifung des visuellen Systems gibt, in denen die Umwelt Einfluss auf die Hirnentwicklung nehmen kann (Wiesel 1983). Im frühkindlichen Alter genügen bereits wenige Stunden visueller Deprivation, um Veränderungen in der Zellaktivität im visuellen Kortex zu bewirken (Blakemore and Mitchell 1973).

In unserem Labor hat sich zur Erforschung der Umwelteinflüsse am Tiermodell ein Ansatz mit zwei Aufzuchtbedingungen etabliert. *Gerbils* eignen sich dafür besonders gut, da sie in ihrer Domestikation noch nicht weit fortgeschritten sind. Sie werden erst seit den fünfziger Jahren gezüchtet und zeigen daher mehr Merkmale der Wildform als

Mäuse oder Ratten (Rosenzweig and Bennett, 1969). Die restriktive Isolationsaufzucht ist dadurch gekennzeichnet, dass die Tiere einzeln ohne Versteck- oder Spielmöglichkeiten in Standard Laborkäfigen gehalten werden. Dem steht die reizreiche Aufzucht gleichgeschlechtlicher Gruppen in Gehegen mit zahlreichen Versteck- und Spielangeboten gegenüber.

Die isolierte Haltung führt bei Ratten und Mäusen zur Ausbildung des „Social isolation syndrome“ (Heidbreder et al., 2000). Dieses Syndrom ist durch eine Reihe von Veränderungen im Verhalten und im Hirnstoffwechsel der Tiere gekennzeichnet. Sozial isoliert aufgewachsene Tiere sind hyperaktiv, dies gilt besonders, wenn sie einer neuen Umgebung ausgesetzt werden. Unter isolierten Bedingungen entwickeln die Tiere Stereotypien, für *Gerbils* sind dies vor allem das Stangenbeißen an den Gitterstäben und das Scharren mit den Vorderbeinen an den Ecken des Käfigs (Wiedenmayer, 1997). Diese motorischen Auffälligkeiten sind nur der äußere Ausdruck einer umfassenden psychoneuralen Störung, die verschiedene Systeme des Gehirns betrifft (Lehmann, 2001).

Neben diesen Auffälligkeiten im Verhalten restriktiv aufzogener Tiere, wurden bei Ratten auch tiefgreifende Veränderungen in der Kortexarchitektur nachgewiesen (Hall, 1998; Rosenzweig and Bennett, 1996; Heidbreder, et al., 2000; Lapiz et al., 2003).

In unserer Arbeitsgruppe konnte erstmals für *Gerbils* gezeigt werden, dass besonders der PFC durch restriktive Isolationsaufzucht geschädigt wird (Winterfeld et al., 1998). Als Folge dieser adaptiven Veränderungen zeigen Tiere aus restriktiver Käfigaufzucht in stirnhirnabhängigen Verhaltenstests signifikante Defizite (Winterfeld et al., 1998). Die Veränderungen beschränken sich aber nicht nur auf den PFC. Untersuchungen von dorsalem Striatum und Nucleus accumbens haben gezeigt, dass auch diese Gebiete bei restriktiver Aufzucht Umgestaltungen in der Innervationsdichte dopaminerger und serotoninerger Fasern zeigen (Lehmann et al., 2003), was sich ebenfalls im Verhalten niederschlagen sollte.

Transmittersysteme reagieren auf restriktive Umweltbedingungen auch mit ihrer Aktivität. So ist bei isolierten Tieren die Umsatzrate von Dopamin im PFC vermindert, aber in der Amygdala erhöht (Heidbreder et al., 2000; Blanc, et al., 1980; Robbins, et al., 1996). Das serotoninerge System hingegen weist eine Absenkung der Umsatzrate in

der Amygdala auf (Hall, 1998). Generell zeigen reizarm gehaltene Tiere eine erhöhte Furchtsamkeit (Wiedenmayer, 1997) und einen erhöhten Stresshormonspiegel (Lapiz et al., 2003). Aufgrund dieser Veränderungen und deren Übereinstimmung mit Ergebnissen aus der Humanmedizin, hat sich die isolierte Aufzucht von Versuchstieren als Tiermodell für affektive Erkrankungen etabliert (Lapiz, et al., 2003).

Als ein weiterer Umweltfaktor, der auf die Hirnentwicklung Einfluss nimmt, hat sich in unserem Labor die einmalige Gabe des Psychostimulantiums Methamphetamin (MA) etabliert. Die frühkindliche Gabe von MA wirkt wie eine traumatische Belastung. Die neurochemische Wirkung von MA liegt in einer überstarken Aktivierung des dopaminergen und serotonergen Systems begründet. MA erzwingt die Ausschüttung von großen Mengen Transmitter aus der Präsynapse und hemmt zusätzlich deren Wiederaufnahme (Seiden and Sabol, 1996); durch nicht enzymatische Abbauprozesse der Transmitter kommt es zur Bildung von Hydroxyradikalen, die zu einer Zerstörung der Nervenendigungen führen (Seiden and Sabol, 1996). Bereits die einmalige Gabe von MA verursacht im Gehirn des Tieres Schädigungen (Dawirs et al., 1991), die bei chronischer Vergabe als Amphetamin-Pschose beschrieben werden (Dawirs et al. 1991; Robinson and Becker, 1986; Vanderschuren et al., 1999). In unserer Abteilung konnte gezeigt werden, dass auch eine MA-Intoxikation zu suppressiver Anpassung der dopaminergen Innervationsdichte im PFC und im Nucleus accumbens führt (Neddens et al. 2002; Dawirs et al., 1994).

Aus den bisherigen Studien wird deutlich, dass frontale Gebiete sensibel auf Umwelteinflüsse reagieren. Es stellt sich nun die Frage, wie sich eine restriktive Aufzucht und die einmalige MA-Intoxikation auf die dopaminerge und serotonerge Innervationsdichte limbischer Areale auswirkt. Dies soll in der vorliegenden Arbeit am Beispiel der Amygdala untersucht werden.

1.6 Zielsetzung der Arbeit

Die vorliegende Arbeit untersucht den Einfluss einer reizreichen bzw. reizarmen Aufzuchtbedingung sowie einer frühkindlichen MA-Intoxikation auf die Reifung der dopaminergen und serotoninergen Innervation im lateralen, basolateralen und zentralen Kern der Amygdala.

Im Detail sind folgende Fragen zu stellen:

1. Gibt es einen signifikanten Einfluss der Aufzuchtbedingungen auf die dopaminerge und serotoninerge Innervation der Amygdala?
2. Gibt es einen signifikanten Einfluss einer einmaligen MA Applikation auf die dopaminerge und serotoninerge Innervation der Amygdala unter einer oder beiden Aufzuchtbedingungen?
3. Sind diese Effekte lateralisiert?

Diese Fragen werden auf der Grundlage einer quantitativen Bildauswertung von immunhistochemischen Serienschnitten durch die Amygdala untersucht.

4. Wird das Verhalten der Tiere durch eine restriktive Aufzucht beeinflusst? Dieser Frage soll mit Hilfe des open fields, dem elevated plus-maze und der aktiven Vermeidungskonditionierung nachgegangen werden.

2 Material und Methode

2.1 Versuchstiere

Die vorliegende Studie wurde ausschließlich an männlichen *Gerbils* der Art *Meriones unguiculatus*, der Mongolischen Wüstenrennmaus, durchgeführt. *Meriones unguiculatus* gehört zu der Säugetierordnung der Rodentia (Nagetiere) und lässt sich der Unterordnung Myomorpha (Mäuseverwandte), der Familie Cricetidae (Wühler) und der Unterfamilie Gerbillinae (Rennmäuse) zuordnen (Petzsch, 1992; Remane et al., 1980). Die Rennmäuse stehen verwandtschaftlich den Hamstern am nächsten. *Meriones unguiculatus* lebt im Familienverband in den Steppen der Mongolei (Agren et al., 1989a). Die Tiere graben ein Tunnelsystem, welches bis zu einem Meter in den Boden reicht und Schlaf sowie Vorratskammern enthält. Die erwachsenen Tiere sind territorial und verteidigen ihr Gebiet gegen Eindringlinge (Agren et al., 1989b). Unter natürlichen Lichtbedingungen zeigt *Meriones unguiculatus*, einen bimodalen, crepuskulären Aktivitätsrhythmus, mit einer Hauptaktivität in der Dämmerungszeit (Pietrewicz et al., 1982).

2.2 Aufzuchtbedingungen

Die in dieser Studie verwendeten Wüstenrennmäuse wurden unter zwei unterschiedlichen Haltungsbedingungen aufgezogen. Die als *Käfigtiere* bezeichnete Gruppe wurde in Makrolonkäfigen des Typ 2 (30 x 40 cm Bodenfläche) geboren. Die Tiere blieben bis zur Entwöhnung am Tag 30 im Familienverband und wurden dann einzeln in Makrolonkäfige mit einer Bodenfläche von 20 x 30 cm umgesetzt. Die Käfige enthielten keine Versteckmöglichkeiten oder Spielobjekte (siehe Abb.2.2.b). Dem gegenüber wurden die *Gehegetiere* in Gehegen von 100 x 100 cm Größe geboren. Die Gehege waren mit Ästen und Röhren ausgestattet, die den Tieren Versteckmöglichkeiten boten (siehe Abb.2.2.a). Nach der Entwöhnung wurden die männlichen Geschwistertiere zusammen in ein neues Gehege mit gleicher Ausstattung umgesetzt. Die Tiere beider Versuchsgruppen wurden auf Kleintiereinstreu unter natürlichen Tag/Nachtbedingungen gehalten, Futter und Wasser stand ihnen ad libitum zur Verfügung.



Abb.2.2.a: Gehegeaufzucht



Abb.2.2.b: Käfigaufzucht

2.3 Pharmakologische Behandlung

Am 14. Lebenstag erhielten die Tiere beider Versuchsgruppen je eine interperitoneale Injektion von 50 mg/kg MA oder 0,9%iger Kochsalzlösung. MA behandelte Käfigtiere werden im Folgenden als Käfig-MA-Tiere und dementsprechend behandelte Gehegetiere als Gehege-MA-Tiere bezeichnet. Die MA Applikation wurde von einem Mitarbeiter mit Tierversuchsgenehmigung durchgeführt.

Für die vorliegende Untersuchung der Dopamin (DA) und Serotonin (5-HT) Faserdichte standen somit vier Versuchsgruppen zur Verfügung, deren Anzahl in der nachfolgenden Tabelle aufgeführt wird:

Tabelle 2.3: Anzahl der Tiere für die immunhistochemische Untersuchung

	Gehegetiere	Gehege-MA-Tiere	Käfigtiere	Käfig-MA-Tiere
DA	6	6	8	8
5-HT	11	17	10	9

2.4 Immunhistochemische Aufarbeitung der Gehirne

2.4.1 Dopamin

Die Tiere wurden mit einer intraperitonealen Injektion von 1,7 g/kg Chloralhydrat in physiologischer Kochsalzlösung betäubt und mit einem Vorspülpuffer (pH 6,2: 0,05 mol Phosphatpuffer in A. dest.) und der Fixanz (pH 7,5: 0,1 mol Phosphatpuffer, 5% Glutardialdehyd in A. dest.) perfundiert. Anschließend wurde das fixierte Gehirn herauspräpariert. Am Vibratom wurden Frontalschnitte von 50 µm erstellt und in Waschpuffer (pH 7,5: 0,05 mol Trispuffer, 0,9 % NaCl, 1% Natriummetabisulfit in A. dest.) aufgefangen. Nach dreimaligen Waschen in Waschpuffer folgte die Absättigung unspezifischer Bindungsstellen mittels NGS (Normal Goat Serum, Sigma, Deisenhofen; Verdünnung 1:10 in Waschpuffer mit 0,3% Triton X 100 (Sigma)) für 30 Minuten bei Raumtemperatur. Anschließend erfolgte über 40 Stunden die Inkubation im ersten Antiserum (polyclonal rabbit-antidopamine, DiaSorin, Stillwater, USA, Verdünnung 1:600 in Waschpuffer mit 0,3% Triton X 100 und 1% NGS) bei 4 °C. Wiederum folgte ein Waschgang von 30 Minuten. Darauf erfolgte bei Raumtemperatur die 30 minütige Inkubation im biotinylierten 2. Antikörper (goat-antirabbit, Sigma; Verdünnung 1:20 in TBS (0,05 mol Trispuffer, 0,9% NaCl, pH 7,6) mit 1% NGS). Nach dreimaligen Waschen für je 10 Minuten in Waschpuffer wurden die Schnitte für 30 Minuten der Avidin-Peroxidase (Sigma) ausgesetzt, Verdünnung 1:20 in TBS mit 1% NGS. Gefärbt wurde mit einer Lösung von 0,05% Diaminobenzidin (DAB, Sigma) in TBS mit 0,01% H₂O₂. Nach viermaligem waschen wurden die Schnitte in rostro-kaudaler Reihenfolge auf gelatinebeschichtete Objektträger aufgezogen und bei 30°C über Nacht getrocknet. Am nächsten Tag folgte die Entwässerung mit Hilfe einer Alkoholreihe 40%, 70%, 80%, 90%, 96%,100% (Ethanol) für je 10 Minuten und abschließend dreimal 10 Minuten in reinem Xylol. Zu letzt wurden die Präparate mit DePeX (Serva, Heidelberg) eingedeckelt.

2.4.2 Serotonin

Die Perfusion erfolgte entsprechend der Dopamindarstellung mit folgend abgewandelten Zusammensetzung:

Vorspülpuffer 60 ml (pH 7,2: 0,1 mol Phosphatpuffer in A. dest.).

Fixanz 500 ml (pH 7,4: 0,1 mol Phosphatpuffer, 4% Paraformaldehyd in A. dest.).

Mit einem Gefriermikrotom (Frigocut 2700, Reichert-Jung, Wien) wurden 20 µm dicke Frontalschnitte angefertigt und in eisgekühltem Waschpuffer (pH 7,4: 0,1 mol Phosphatpuffer, 0,9 % NaCl in A. dest.) aufgefangen. Es folgten drei Waschgänge je 10 Minuten bei 4°C in frischem Waschpuffer. Anschließend wurden die Schnitte einer Behandlung mit 1% H₂O₂ in Waschpuffer unterzogen und darauf wiederum dreimal gewaschen. Im Anschluss erfolgte bei Raumtemperatur für 30 Minuten die Präinkubation in NGS (Sigma), Verdünnung 1:10 in Waschpuffer mit 0,3% Triton X100 (Sigma). Sofort danach wurden die Schnitte in das 1. Antiserum (polyclonal rabbit-antiserotonin, DiaSorin, Stillwater, USA; Verdünnung 1:20.000 in Waschpuffer mit 0,3% Triton X100 und 1% NGS) überführt und bei 4°C für 18 Stunden inkubiert. Die weiteren Arbeitsschritte der immunhistochemischen Darstellung entsprechen der Dopamindarstellung.

2.5 Versuchsauswertung

2.5.1 Computerbasierte Bildanalyse

Die Erhebung der Daten erfolgte mit dem Bildanalyseprogramm KS 300 der Firma Zeiss. Über eine am Mikroskop (Polyvar, Reichert-Jung, Wien) angeschlossene Farbvideokamera (ProgRes 3008, JenOptik Jena) wurden die Bilder bei einer 200fachen Vergrößerung mit einer Auflösung von 700x600 Pixel an das Bildanalyseprogramm übertragen. Aufgrund der unterschiedlichen Innervationsdichte der Amygdalakerne erfolgte die Quantifizierung der serotonergen und dopaminergen Fasern mit zwei unterschiedlichen Messmethoden. In den leicht bis moderat innervierten Kernen wurde die Faserdichte mit Hilfe der „direkten“ Faserdetektion erfasst, in den dicht innervierten Kernen wurde mit der densitometrischen Messmethode gearbeitet. Beide Methoden wurden automatisch von einem Makro, welches von Herrn Dr. Konrad Lehmann programmiert wurde, ausgeführt. Im Folgenden sollen kurz die Prinzipien der beiden Messmethoden dargestellt werden. Die Auswertung der Fälle erfolgte in zufallsgenerierter Reihenfolge und ohne die Kenntnis der Versuchsgruppe.

Nach der Bildaufnahme folgte die Erfassung der Fasern mittels der Valleys-Funktion, die eine Kombination aus Gauss-Filter und Gerig-Operator ist. Der Gauss-Filter glättet, bei einstellbarer Filtermatrix, vor allem Grauwertschwankungen des Hintergrundes. Der

Gerig-Operator ist geeignet, schmale linienförmige Bereiche mit dunklen Grauwerten zu erfassen. Die Valleys-Funktion detektiert also im übertragenen Sinne Grauwerttäler vor hellerem Hintergrund. Der Grenzwert für die notwendige Krümmung an der Talsohle kann interaktiv reguliert werden. Die Einstellung der Glättung und der Krümmung erlauben die Anpassung dieser Funktion an die Besonderheiten der jeweiligen Färbung.

Blutgefäße und Risse in den Schnitten wurden durch die Funktion Region Growing markiert und von der Messfläche subtrahiert, so dass schließlich der prozentuale Flächenanteil der DAergen und 5-HTergen Fasern errechnet werden konnte:

$$\text{Faserdichte [\%]} = \text{Faserfläche} \times 100 / \text{Messfläche}$$

Da in den sehr dicht innervierten Kernen mittels der Valleys-Funktion keine verlässliche Fasererkennung durchgeführt werden konnte, wurde für die Auswertung des CEA (bei DA) sowie für den BLA (bei 5-HT) die Innervationsdichte über den mittleren Grauwert der Gewebefläche erfasst (densitometrische Messung). Hierzu wurde ein Referenzbild ohne die bereits erkannten Fasern erstellt und ein automatischer Helligkeitsabgleich durchgeführt, um Unterschiede in der Färbung und der Schnittdicke zu berücksichtigen. Der für jeden Schnitt neu bestimmte Referenzgrauwert des Gewebes wurde von dem Grauwert des jeweiligen Messfeldes subtrahiert:

$$\text{Faserdichte [Grauwert]} = \text{Grauwert des Messfeldes} - \text{Referenzgrau}$$

Die so gewonnenen Daten wurden in eine Datenbank geschrieben und anschließend statistisch ausgewertet.

2.5.2 Messfelder

Begonnen wurde mit der Auswertung, wenn der optische Trakt von ventral in das Vorderhirn hineinzieht und der CEA sich deutlich vom Striatum abgrenzen lässt.

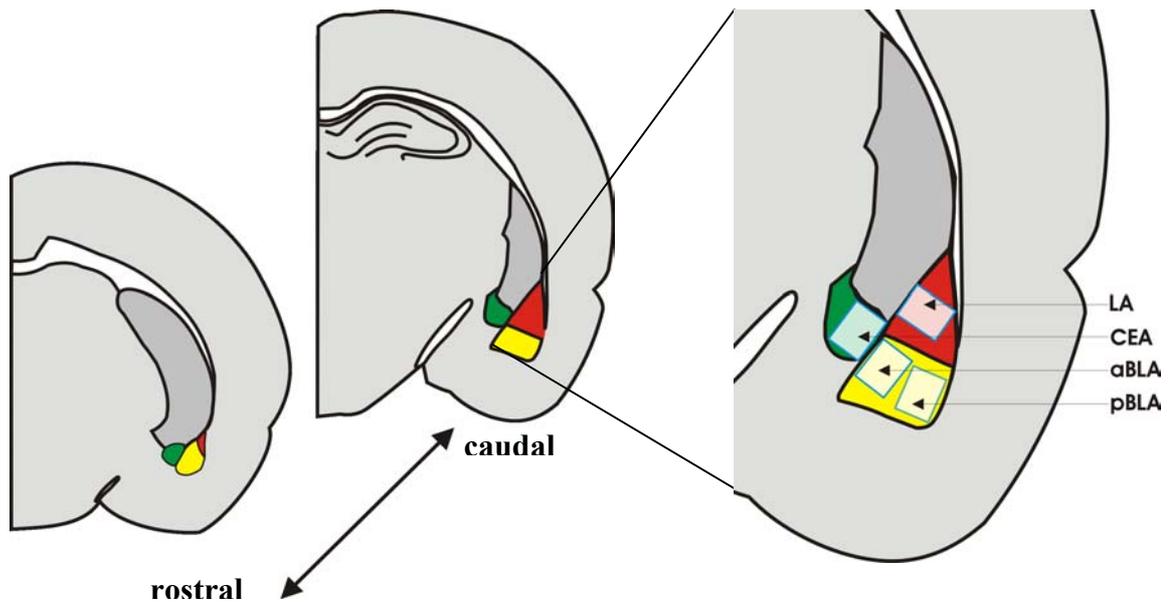


Abb.2.5.2: rostrocaudale Ausdehnung der Amygdala und Lage der Messfelder. LA rot; BLA gelb; CEA grün

Caudal reicht der optische Trakt bis auf die Höhe des CEA. Ausgewertet wurden 7 Schnitte in Folge bei 200facher Vergrößerung (Polyvar, Reichert-Jung, Wien). In den CEA und den LA wurde je ein Messfeld gelegt, in den BLA eins in die aBLA und eins in die pBLA. Bei der 5-HT Studie wurde nur die aBLA quantifiziert (siehe Abb.2.5.2).

2.5.3 Datenanalyse

Ziel der Analyse war es festzustellen, ob es einen signifikanten Unterschied in der dopaminergen und serotonergen Innervationsdichte der Amygdala zwischen den vier untersuchten Gruppen gibt. Dazu wurden aus den Daten innerhalb einer Tiergruppe die arithmetischen Mittelwerte berechnet. Mit dem F-Test nach Fisher wurden die normalverteilten Messwerte auf die Homogenität ihrer Varianzen überprüft. Der anschließende t-Test prüft die Mittelwerte der gesammelten Daten auf einen signifikanten Unterschied (Bortz, 1999).

Die Datenanalyse erfolgte mit Hilfe des Computerprogramms „Statistica 5/97“. Alle Diagramme wurden mit dem Programm „Excel 2000“ der Firma Microsoft erstellt. Die einzelnen Signifikanzniveaus sind wie folgt definiert:

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

Schwach signifikant: $p < 0,05$ (*)

Signifikant: $p < 0,01$ (**)

Hoch signifikant: $p < 0,001$ (***)

2.6 Verhaltenstest

2.6.1 Versuchstiere

Für die Verhaltensversuche wurden wiederum nur männliche Wüstenrennmäuse aus der Gehege bzw. Käfigaufzucht verwendet. Mit den Versuchen wurde begonnen, wenn die Versuchstiere das Alter von 90 Tagen erreicht hatten. Alle Tiere wurden vor Versuchsbeginn an drei Tagen für je 5 Minuten gehändelt. Es wurden zwei Gruppen von Tieren für die Verhaltensversuche benutzt. Die erste Gruppe absolvierte ausschließlich den elevated plus-maze Test. Die Tiere der zweiten Gruppe durchliefen den open field Test und wurden nach einer Ruhezeit von zwei Tagen der Vermeidungskonditionierung unterzogen. Die Anzahl der Versuchstiere wird in der nachfolgenden Tabelle aufgeführt:

Tabelle 2.6.1: Anzahl der Tiere für die Verhaltensstudie

	Gehegeaufzucht	Käfigaufzucht
Elevated plus-maze	9	8
Open field	8	8
Konditionierung	8	8

Die Tiere wurden nach einer zufallsgenerierten Reihenfolge getestet. Nach jedem Durchgang wurde die jeweilige Versuchsanlage mit Alkohol (90%) gesäubert. Die Versuche fanden in einem abgedunkelten Raum statt und begannen jeweils um 10:00 morgens.

2.6.2 Elevated plus-maze

Versuchsanlage:

Das elevated plus-maze (EPM) ist ein + förmiges Labyrinth mit zwei offenen und zwei an den Seiten geschlossenen Armen. Die Arme sind je 65 cm lang und 10 cm breit. Die offenen Arme besitzen eine Stolperkante von 2 cm Höhe. Die Seitenwände der geschlossenen Arme sind 24 cm hoch. Die gesamte Apparatur ruht auf einem Ständer 40 cm über dem Boden. Das Tier wurde einmal für 5 Minuten in das Labyrinth gesetzt und sein Verhalten mit dem „VideoMot“-System der Firma TSE-Systems (Bad Homburg) erfasst.

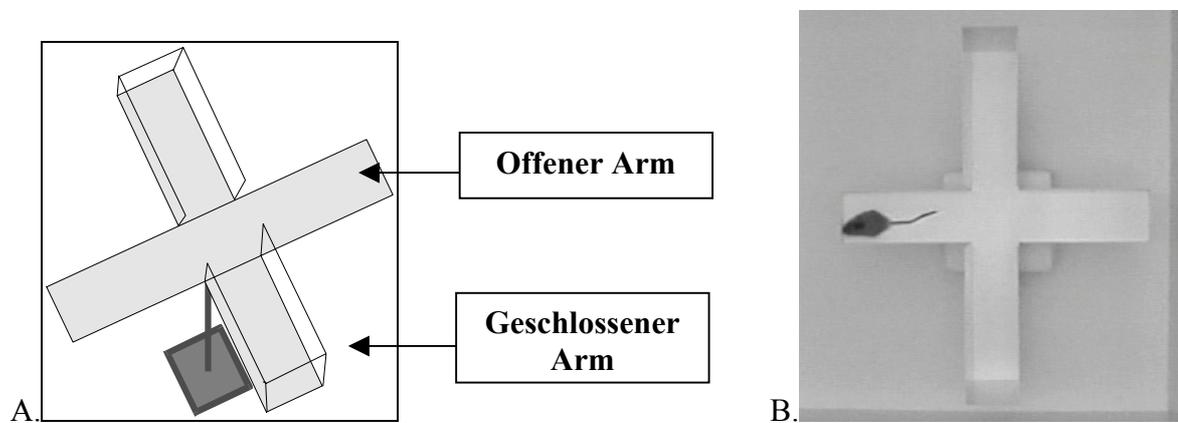


Abb.2.6.2: (A) Schematische Darstellung der Versuchsanlage und (B) Sicht der Videokamera zur Erfassung der Messparameter .

Es wurden folgende Parameter gemessen:

1. Das Verhältnis von offenen zu geschlossenen Armbesuchen.
2. Die Aufenthaltszeit auf den offenen Armen.
3. Die gesamte Laufstrecke des Tieres.

2.6.3 Open field

Versuchsanlage:

Die open field Arena besteht aus einem 100B x 100T x 50H cm großen PVC beschichteten Sperrholz Rechteck. Mittels einer über der Arena angebrachten CCD Videokamera (ca. 170cm) wurde das Verhalten der Tiere wiederum mit dem „VideoMot“-System der Firma TSE-Systems ausgewertet. Dazu wurde die Bodenfläche der open field Arena am Computer in ein Gitter aus 9 gleich großen Rechtecken

aufgeteilt. Die Randbereiche gelten als äußere Felder, das mittlere Rechteck wurde als inneres Feld definiert. Als Besuch eines Feldes wurde gewertet, wenn der Schwerpunkt des Versuchstieres die Begrenzungslinien des jeweiligen Rechtecks überschreitet.

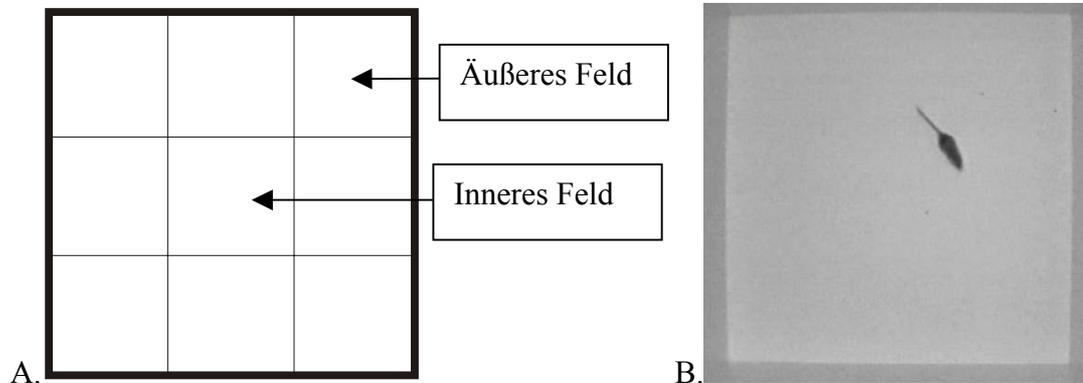


Abb.2.6.3: (A) Schematische Darstellung der Versuchsanlage und (B) Sicht der Videokamera zur Erfassung der Messparameter

Verhalten im open-field:

Die Tiere wurden für je zehn Minuten in der Versuchsarena getestet. Hierzu wurden die Tiere in die Mitte der Arena gesetzt und nach drei Sekunden die computergestützte Aufzeichnung des Verhaltens gestartet. Die aufgezeichneten Aktivitäten wurden nach folgenden Kriterien ausgewertet:

1. Die gesamte Laufstrecke des Tieres.
2. Anzahl der Besuche des inneren Feldes.
3. Aufenthaltszeit im inneren Feld

2.6.4 Vermeidungskonditionierung

Die Tiere aus dem open field Test wurden nach einer Ruhezeit von zwei Tagen für den Konditionierungsversuch verwendet. Hierbei wurde die Reihenfolge aus dem open field Versuch beibehalten. Die Apparatur besteht aus einer schallisolierten Box mit den Maßen 25cm Länge, 27cm Breite und 41cm Höhe. Die Grundfläche bildet ein Gitter (Stäbe 4mm Durchmesser, 4mm Abstand) über die ein Stromschlag von 0,6mA verabreicht werden kann. Auf dem Gitterboden steht eine Bank aus nicht leitenden Kunststoff (25cm Länge, 7cm Breite, 5cm Höhe). Ein in die Apparatur integrierter

Lautsprecher lieferte den konditionierten Reiz (Ton von -30dB, 3150 Hz). Das Verhalten des Tieres wurde mit einer Videokamera aufgezeichnet und ausgewertet.

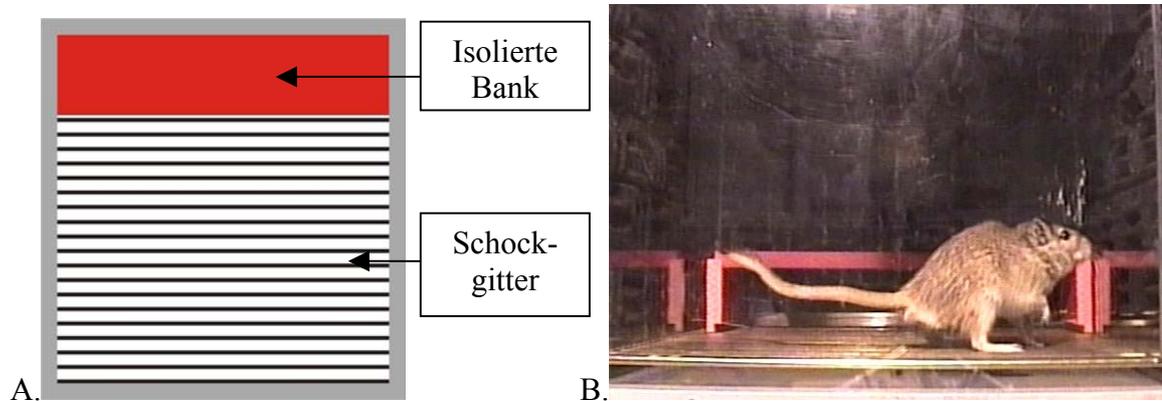


Abb.2.6.4: (A) Schematische Darstellung der Versuchsanlage und (B) Sicht der Videokamera zur Erfassung der Messparameter

Konditionierung:

Die Konditionierung auf den Ton fand nach folgendem Schema statt:

Das Tier wurde in die Apparatur gesetzt und konnte diese für zwei Minuten frei erkunden. Nach dieser Zeit wurde für die maximale Dauer von 15 Sekunden der Ton eingeschaltet, nach 5 Sekunden erfolgte der Stromschlag bis zu einer Dauer von 10 Sekunden, d.h. Ton und Schock liefen 10 sekundenlang parallel. Sowohl Ton als auch Schock wurden sofort beendet, wenn die Maus auf die isolierte Bank sprang. Bis zur nächsten Ton/Stromschlag Gabe erfolgt eine Pause von 60 Sekunden. Als Fehler wurde gewertet, wenn das Tier nach Einsetzen des Tons nicht auf die Bank sprang.

Zeitlicher Verlauf der Konditionierung:

Die Konditionierung erfolgte an drei Tagen. Am ersten Tag wurden zwei Durchgänge mit je fünf Kopplungen von Ton und Schock in einem Abstand von 4 Stunden durchgeführt. Am zweiten und dritten Tag erfolgte jeweils ein Versuchsdurchgang.

Tag 1: Trial 1: Ton – Schock 5 Kopplungen; Trial 2: Ton – Schock je 5 Kopplungen

Tag 2: Trial 3: Ton – Schock je 5 Kopplungen

Tag 3: Pause

Tag 4: Trial 4: Ton – Schock je 5 Kopplungen

Ausgewertet wurde die Anzahl der Fehler

Löschungsphase:

Am vierten Tag folgte vier Stunden nach Trial vier die Löschung der Konditionierung. Hierzu wurde die isolierte Bank aus der Apparatur entfernt. Nach einer zweiminütigen Habituationsphase wurde dem Tier in einem Abstand von je 60 Sekunden für zehnmal fünf sekundenlang der Ton vorgespielt. Während dieser Versuchsphase erfolgte kein Stromschlag.

Überprüfung der Löschung:

Hierzu wurde am fünften Tag das Tier in die Apparatur gesetzt, die nun wieder mit der isolierten Bank ausgestattet war. Nach zwei Minuten wurde dem Tier entsprechend den Abständen der Konditionierungsphase der Ton je zehnmal vorgespielt. Als Fehler wurde gewertet, wenn das Tier nach Einsetzen des Tons auf die isolierte Bank sprang. Ausgewertet wurden die Anzahl der Fehler.

3 Ergebnisse

3.1 Qualitative Ergebnisse

3.1.1 Dopamininnervation

Die DA Innervation der Amygdala bei *Meriones unguiculatus* ähnelt der für die Ratte beschriebenen Innervation (Asan, 1998). In der Amygdala zeigt der CEA das dichteste Fasernetz (Abb.3.1.1.E), eine moderate Faserdichte findet sich in dem BLA (Abb.3.1.1.D) und das geringste Innervationsmuster weist der LA auf (Abb.3.1.1.C).

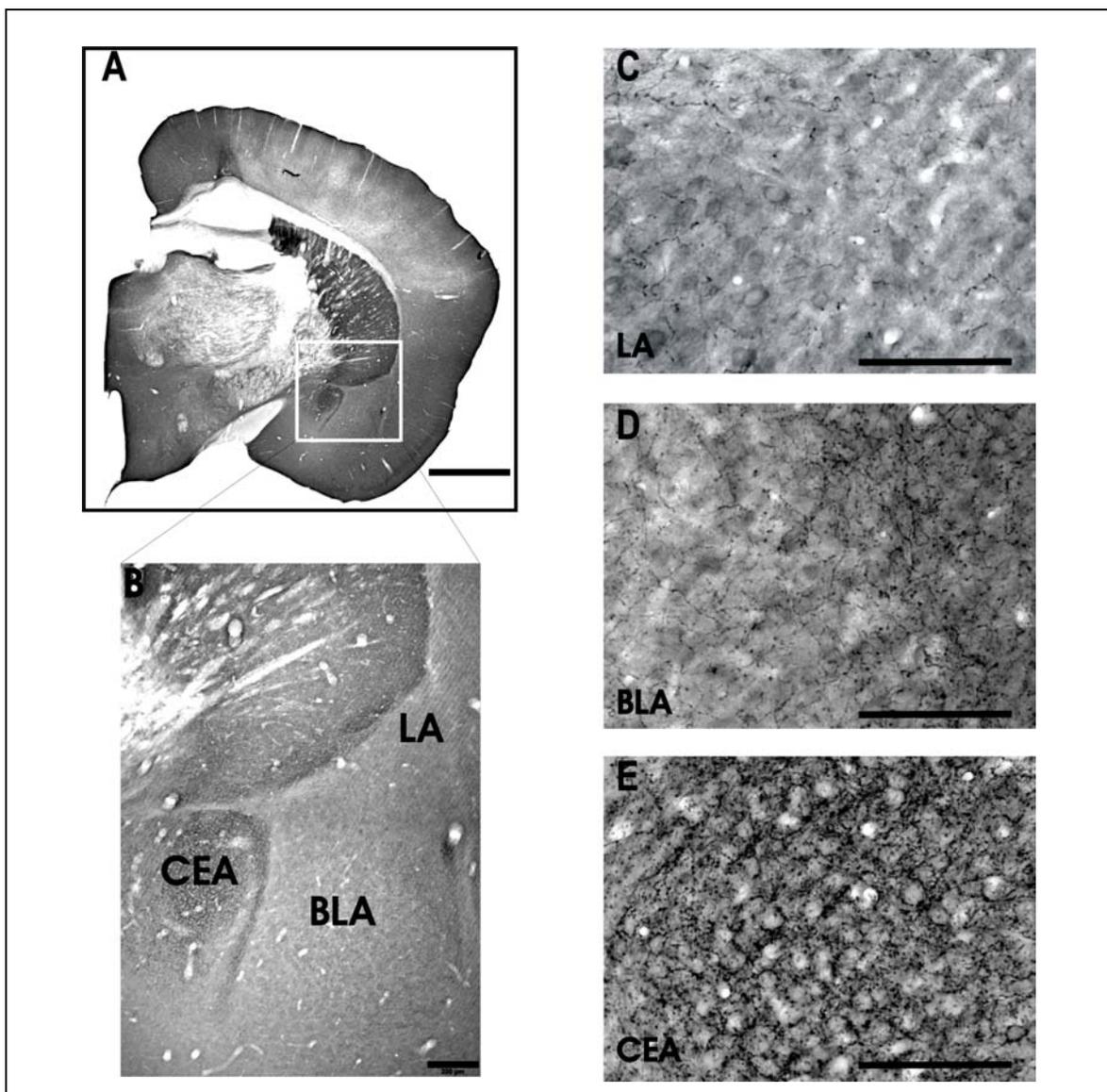


Abb.3.1.1: (A) zeigt einen Frontalschnitt auf der Höhe der Amygdala (x2; Balken = 2mm). In (B) sind die drei untersuchten Kerne vergrößert dargestellt (x10; Balken = 200µm). Detailaufnahmen der Kerne (C): LA, (D): BLA und (E): CEA (x200; Balken = 100µm).

3.1.2 Serotonininnervation

Die 5-HT Innervation des CEA ist sehr gering ausgeprägt (Abb.3.1.2.E). Hingegen ist der BLA so dicht innerviert, dass man ihn bereits mit bloßem Auge erkennen kann (Abb.3.1.2.A+D). Der LA besitzt eine moderate Innervationsdichte (Abb.3.1.2.C).

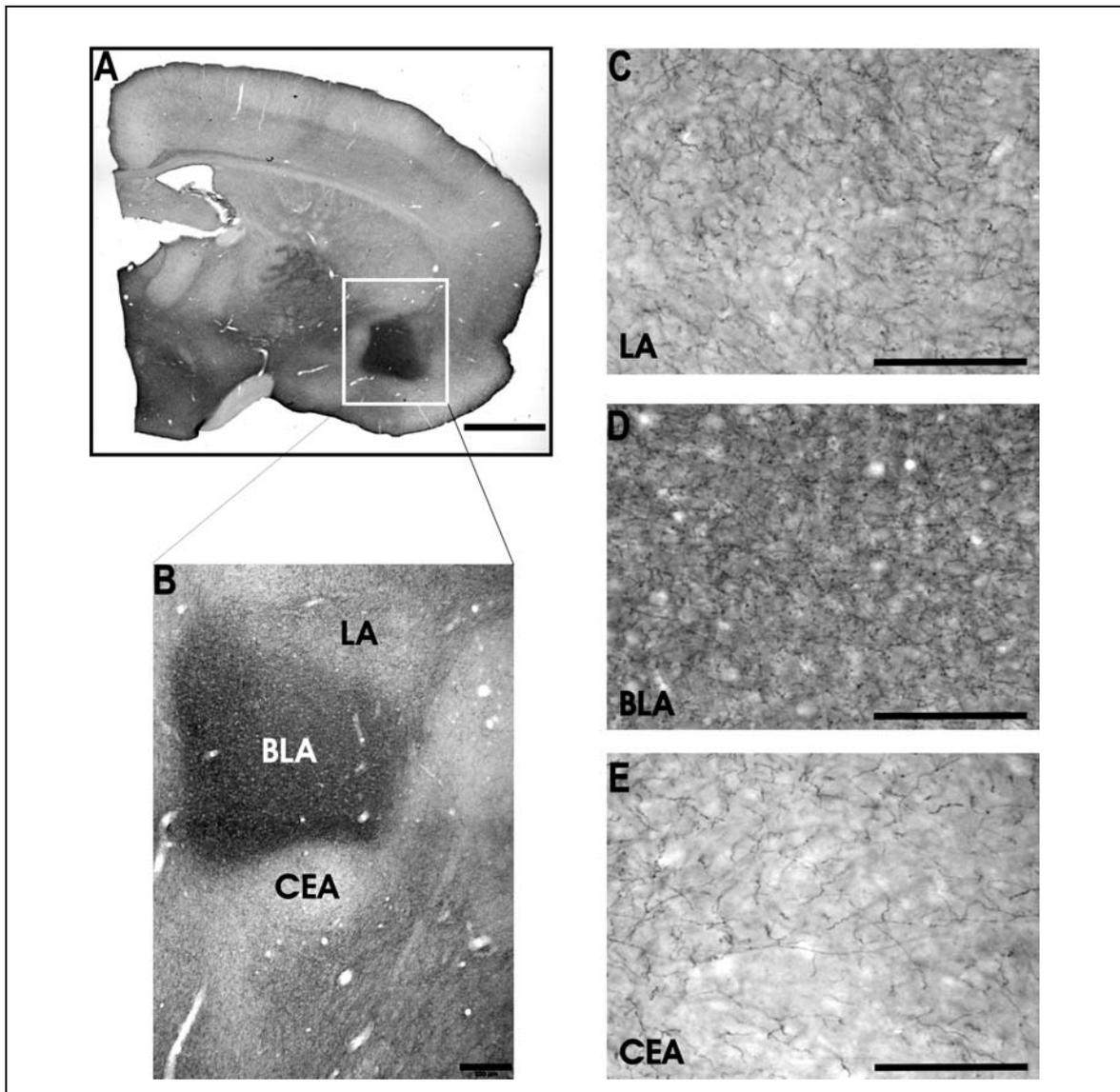


Abb.3.1.2: Bild (A) zeigt einen Frontalschnitt auf der Höhe der Amygdala (x2; Balken = 2mm). In (B) sind die drei untersuchten Kerne vergrößert dargestellt (x10; Balken = 200µm). Detailaufnahmen der Kerne (C): LA, (D): BLA und (E): CEA (x200; Balken = 100 µm).

3.2 Quantitative Ergebnisse

3.2.1 DA Innervation

Die Ergebnisse der Faserquantifizierung werden zusammengefasst dargestellt. Die Darstellung der einzelnen Ergebnisse in grafischer und tabellarischer Form erfolgt jeweils auf den anschließenden Seiten.

1. Lateralisierung:

Im Vergleich von linker und rechter Amygdala konnte bei keiner Versuchsgruppe ein signifikanter Unterschied in der DA Innervation gefunden werden (Abb.3.2.1.1; Tabelle 3.2.1.1- 3.2.1.4) Somit ist die DA Innervation der untersuchten Amygdalakerne nicht lateralisiert. Jedoch treten bei der Bewertung zwischen den Gruppen Gehege-/ Käfigaufzucht / MA-Intoxikation Unterschiede in der Innervationsdichte der rechten und linken Amygdala auf (siehe unten).

2. Einfluss der Aufzuchtbedingungen:

Die restriktive Käfigaufzucht führt zu einem Anstieg ($p < 0,01$) der DA Faserdichte in der linken pBLA um +31,58% und rechten pBLA um +36,74% ($p < 0,001$) (Abb.3.2.1.2.C und Abb.3.2.1.3.C; Tabelle 3.2.1.7 und Tabelle 3.2.1.11). In der linken CEA verringert sich die Faserdichte der restriktiv aufgezogenen Tiere um -13,62% ($p < 0,5$) (Abb.3.2.1.2.D; Tabelle 3.2.1.8) Die LA zeigt keine signifikanten Veränderungen (Abb.3.2.1.2.A und Abb.3.2.1.3.A; Tabelle 3.2.1.5 und Tabelle 3.2.1.9).

3. Einfluss von Methamphetamin:

Die Intoxikation mit dem Pharmakon Methamphetamin führt bei *Meriones unguiculatus* generell zu einem Anstieg der DA Faserdichte. Bei den Tieren aus restriktiver Käfigaufzucht tritt dieser Effekt deutlicher zu Tage als bei reichlich aufgezogenen Tieren. Ein signifikanter Unterschied tritt in der LA und BLA auf. Die LA zeigt bei MA behandelten Käfigtieren auf der linken Seite einen Faserzuwachs von +21,73% ($p < 0,5$) (Abb.3.2.1.2.A; Tabelle 3.2.1.5) und rechts von +25,82% ($p < 0,01$) (Abb.3.2.1.3.A; Tabelle 3.2.1.9);, so wie in der linken aBLA eine um +35,26% ($p < 0,001$) (Abb.3.2.1.2.B; Tabelle 3.2.1.6) und in der rechten aBLA um +25,87% ($p < 0,05$) (Abb.3.2.1.3.B; Tabelle 3.2.1.10) erhöhte DA Innervation. Bei reichlich aufgezogenen Tieren verursacht die MA Intoxikation nur in der rechten pBLA einen Anstieg der Faserdichte um +42,94% ($p < 0,05$) (Abb.3.2.1.3.C; Tabelle 3.2.1.11).

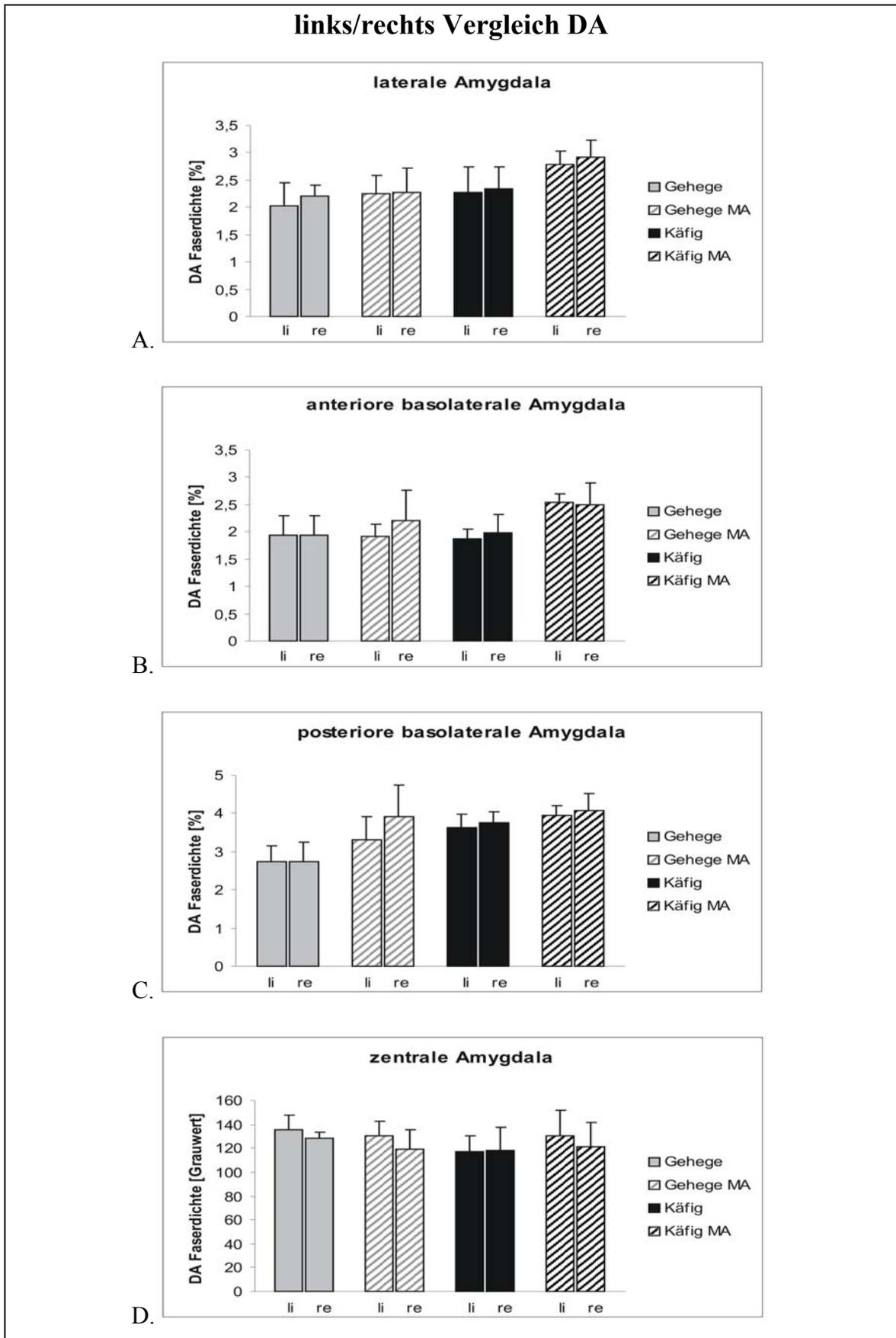


Abb.3.2.1.1: Die dopaminerge Faserdichte im links/rechts Vergleich A, B, C, D zeigen die gepoolten Mittelwerte der Tiere einer Gruppe für linke (li) und rechte (re) Amygdala und die Standardabweichung. Der Mittelwertvergleich zeigt in keinem der Amygdalakerne einen signifikanten Unterschied.

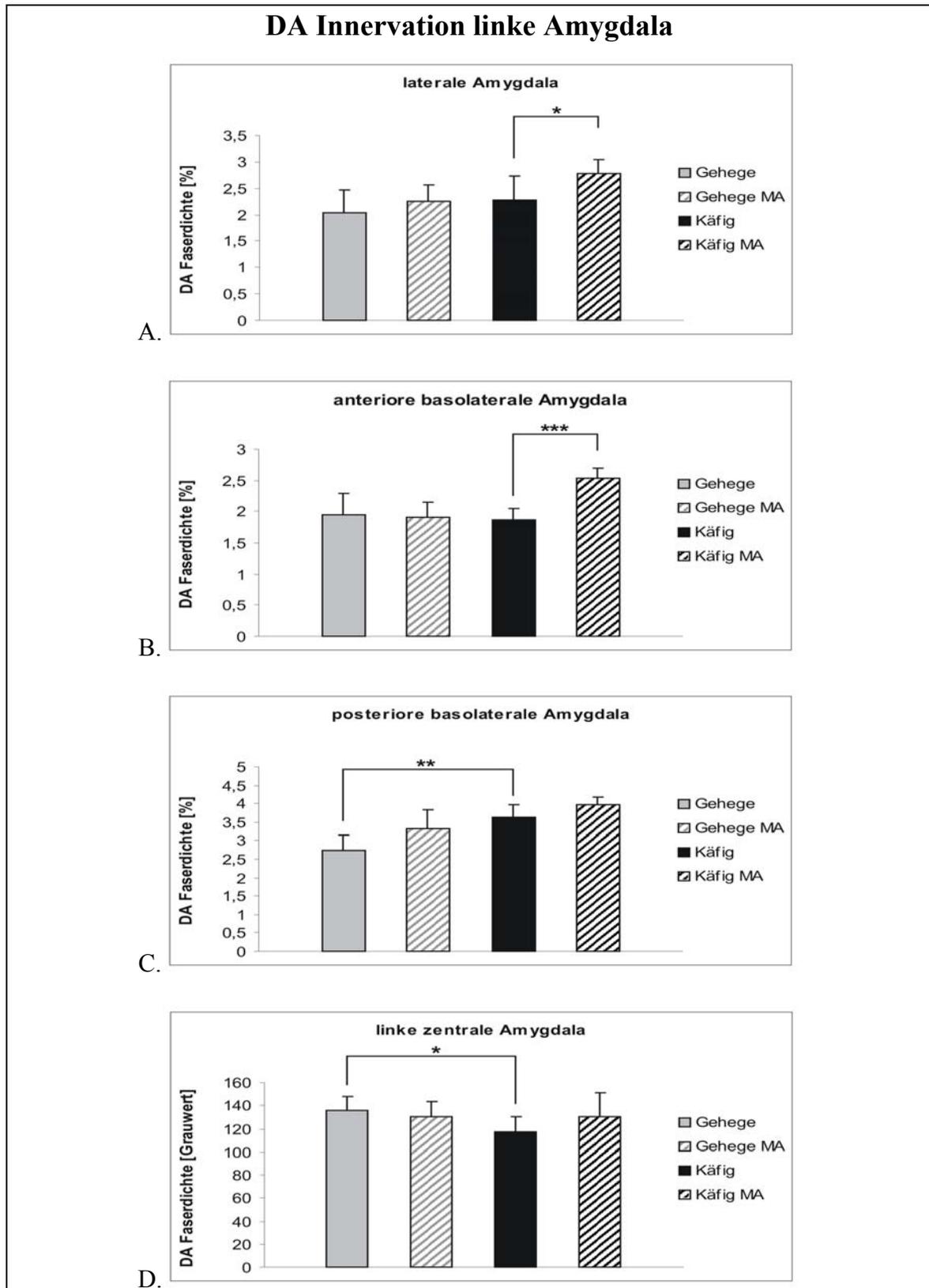


Abb.3.2.1.2.: Die dopaminerge Faserdichte im Vergleich A, B, C, D zeigen die gepoolten Mittelwerte der Tiere je Gruppe und die Standardabweichung. Der Mittelwertvergleich zeigt signifikante Unterschiede in (A) der LA zwischen Käfig- / Käfig-MA-Tieren ($p < 0,5$); in (B) der aBLA zwischen Käfig- / Käfig-MA-Tieren ($p < 0,001$); in (C) der pBLA zwischen Gehege- / Käfigaufzuchten ($p < 0,01$); und in (D) der CEA zwischen Gehege- / Käfigaufzuchten ($p < 0,5$).

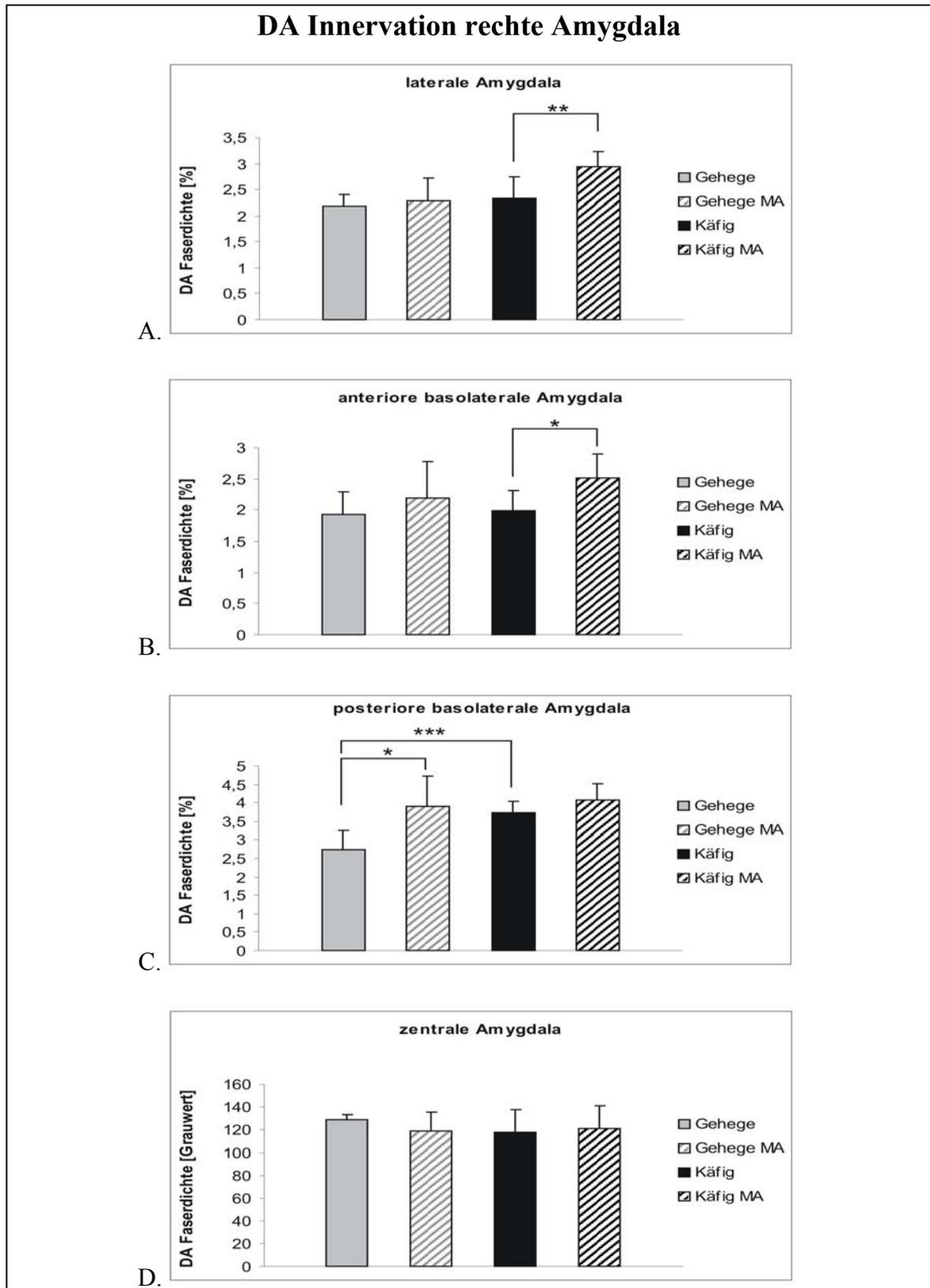


Abb.3.2.1.3: Die dopaminerge Faserdichte im Vergleich A, B, C, D zeigen die gepoolten Mittelwerte der Tiere je Gruppe und die Standardabweichung. Der Mittelwertvergleich zeigt signifikante Unterschiede in (A) der LA zwischen Käfig- / Käfig-MA-Tieren ($p < 0,01$); in (B) der aBLA zwischen Käfig- / Käfig-MA-Tieren ($p < 0,05$); in (C) der pBLA zwischen Gehege- / Käfigaufzuchten ($p < 0,001$) und Gehege- / Gehege-MA-Tieren ($p < 0,5$).

Links/rechts Vergleich

Tabelle 3.2.1.1: laterale Amygdala

	Gehege		Gehege MA		Käfig		Käfig MA	
	links	rechts	links	rechts	links	rechts	links	rechts
x	2,0293	2,1959	2,2445	2,2799	2,2804	2,3302	2,7755	2,9315
s	0,4301	0,2178	0,332	0,4390	0,4543	0,4145	0,2618	0,3015
n	6	6	6	6	8	8	7	7
F-Test	0,0819		0,2774		0,4075		0,3704	
t-Test	0,4169		0,87808		0,8221		0,3218	

Tabelle 3.2.1.2: anteriore basolaterale Amygdala

	Gehege		Gehege MA		Käfig		Käfig MA	
	links	rechts	links	rechts	links	rechts	links	rechts
x	1,9431	1,9300	1,9090	2,1964	1,8741	1,991	2,5347	2,506
s	0,3441	0,3574	0,2306	0,5721	0,1831	0,3190	0,1579	0,3823
n	6	6	6	6	8	8	7	8
F-Test	0,4679		0,0339		0,0831		0,0308	
t-Test	0,9497		0,2913		0,3829		0,8367	

Tabelle 3.2.1.3: posteriore basolaterale Amygdala

	Gehege		Gehege MA		Käfig		Käfig MA	
	links	rechts	links	rechts	links	rechts	links	rechts
x	2,7483	2,7414	3,3262	3,9182	3,6159	3,7489	3,9612	4,0723
s	0,4092	0,4964	0,5760	0,8123	0,3620	0,3049	0,2334	0,4461
n	6	6	6	6	8	8	7	8
F-Test	0,3410		0,2340		0,3311		0,0681	
t-Test	0,9795		0,1760		0,43994		0,5651	

Tabelle 3.2.1.4: zentrale Amygdala

	Gehege		Gehege MA		Käfig		Käfig MA	
	links	rechts	links	rechts	links	rechts	links	rechts
x	135,7371	128,3783	130,5112	119,1139	117,2543	117,9748	130,8423	120,9967
s	11,6989	4,6431	12,5243	16,3433	13,4093	19,3892	20,5068	20,4538
n	6	6	6	6	8	8	8	8
F-Test	0,0318		0,2867		0,1758		0,4974	
t-Test	0,1952		0,2050		0,9323		0,3526	

Vergleich der DAergen Innervation zwischen den Gruppen:

a. Linke Amygdala:

Tabelle 3.2.1.5: linke laterale Amygdala

	Gehege	Käfig	Gehege	Gehege MA	Käfig	Käfig MA
x	2,0293	2,2804	2,0293	2,2445	2,2804	2,7755
s	0,4301	0,4543	0,4301	0,332	0,4543	0,2618
n	6	8	6	6	8	7
F-Test	0,4683		0,2920		0,1003	
t-Test	0,3161		0,3547		0,0250 *	

Tabelle 3.2.1.6: linke anteriore basolaterale Amygdala

	Gehege	Käfig	Gehege	Gehege MA	Käfig	Käfig MA
x	1,9431	1,8741	1,9431	1,9090	1,8741	2,5347
s	0,3441	0,1831	0,3441	0,2306	0,1831	0,1579
n	6	8	6	6	8	7
F-Test	0,0652		0,2002		0,3669	
t-Test	0,6353		0,8445		5,02265E-06 ***	

Tabelle 3.2.1.7: linke posteriore basolaterale Amygdala

	Gehege	Käfig	Gehege	Gehege MA	Käfig	Käfig MA
x	2,7483	3,6159	2,7483	3,3262	3,6159	3,9612
s	0,4092	0,3620	0,4092	0,5760	0,3620	0,2334
n	6	8	6	6	8	7
F-Test	0,3699		0,2356		0,1532	
t-Test	0,00123 **		0,0730		0,0504	

Tabelle 3.2.1.8: linke zentrale Amygdala

	Gehege	Käfig	Gehege	Gehege MA	Käfig	Käfig MA
x	135,7371	117,2543	135,7371	130,5112	117,2543	130,8423
s	11,6989	13,4093	11,6989	12,5243	13,4093	20,5068
n	6	8	6	6	8	8
F-Test	0,3950		0,4424		0,1424	
t-Test	0,0197 *		0,4723		0,1391	

b. Rechte Amygdala:**Tabelle 3.2.1.9: rechte laterale Amygdala**

	Gehege	Käfig	Gehege	Gehege MA	Käfig	Käfig MA
x	2,1959	2,3302	2,1959	2,2799	2,3302	2,9315
s	0,2178	0,4145	0,2178	0,4390	0,4145	0,3015
n	6	8	6	6	8	7
F-Test	0,0879		0,0751		0,2779	
t-Test	0,4868		0,6836		0,0074 **	

Tabelle 3.2.1.10: rechte anteriore basolaterale Amygdala

	Gehege	Käfig	Gehege	Gehege MA	Käfig	Käfig MA
x	1,9300	1,991	1,9300	2,1964	1,991	2,506
s	0,3574	0,3190	0,3574	0,5721	0,3190	0,3823
n	6	8	6	6	8	8
F-Test	0,3777		0,1625		0,3222	
t-Test	0,7412		0,3561		0,0110 *	

Tabelle 3.2.1.11: rechte posteriore basolaterale Amygdala

	Gehege	Käfig	Gehege	Gehege MA	Käfig	Käfig MA
x	2,7414	3,748	2,7414	3,9182	3,7489	4,0723
s	0,4964	0,304	0,4964	0,8123	0,3049	0,4461
n	6	8	6	6	8	8
F-Test	0,1182		0,1517		0,1684	
t-Test	0,0005 ***		0,0127 *		0,1126	

Tabelle 3.2.1.12: rechte zentrale Amygdala

	Gehege	Käfig	Gehege	Gehege MA	Käfig	Käfig MA
x	128,3783	117,9748	128,3783	119,1139	117,9748	120,9967
s	4,6431	19,3892	4,6431	16,3433	19,3892	20,4538
n	6	8	6	6	8	8
F-Test	0,0031		0,0076		0,4458	
t-Test	0,1817		0,2301		0,7661	

3.2.2 5-HT Innervation

Die Ergebnisse der Faserquantifizierung werden zusammengefasst dargestellt. Die Darstellung der einzelnen Ergebnisse in grafischer und tabellarischer Form erfolgt jeweils auf den anschließenden Seiten.

1. Lateralisierung:

Im Vergleich von linker und rechter Amygdala konnte bei keiner Versuchsgruppe ein signifikanter Unterschied in der 5-HT Innervation gefunden werden (Abb.3.2.2.1; Tabelle 3.2.2.1.-3.2.2.3). Somit ist die 5-HT Innervation der untersuchten Amygdalakerne nicht lateralisiert. Jedoch treten bei der Bewertung zwischen den Gruppen Gehege-/ Käfigaufzucht Unterschiede in der Innervationsdichte der rechten und linken Amygdala auf (siehe unten).

2. Einfluss der Aufzuchtbedingungen:

Die Tiere aus restriktiver Käfigaufzucht weisen gegenüber den reichlich aufgezogenen Tieren eine signifikant höhere 5-HT Faserdichte auf. In der rechten Amygdala zeigt die aBLA einen Anstieg der Faserdichte um +10,67% ($p < 0,05$) (Abb.3.2.2.3.B; Tabelle 3.2.2.8) und in der CEA um +30,51% ($p < 0,01$) (Abb.3.2.2.3.C; Tabelle 3.2.2.9). Die linke aBLA weist eine Erhöhung der 5-HT Innervation um +15,9% ($p < 0,001$) auf (Abb.3.2.2.2.B; Tabelle 3.2.2.5). In der LA konnte kein Einfluss der Haltungsbedingungen auf die 5-HT Faserdichte beobachtet werden (Abb.3.2.2.2.A und Abb.3.2.2.3.A; Tabelle 3.2.2.4 und 3.2.2.7).

3. Einfluss von Methamphetamin:

Die MA Intoxikation zeigte keinen signifikanten Einfluss auf die untersuchten Kerne der Amygdala (Tabelle 3.2.2.4 - 3.2.2.9; Abb. 3.2.2.2 und Abb. 3.2.2.3).

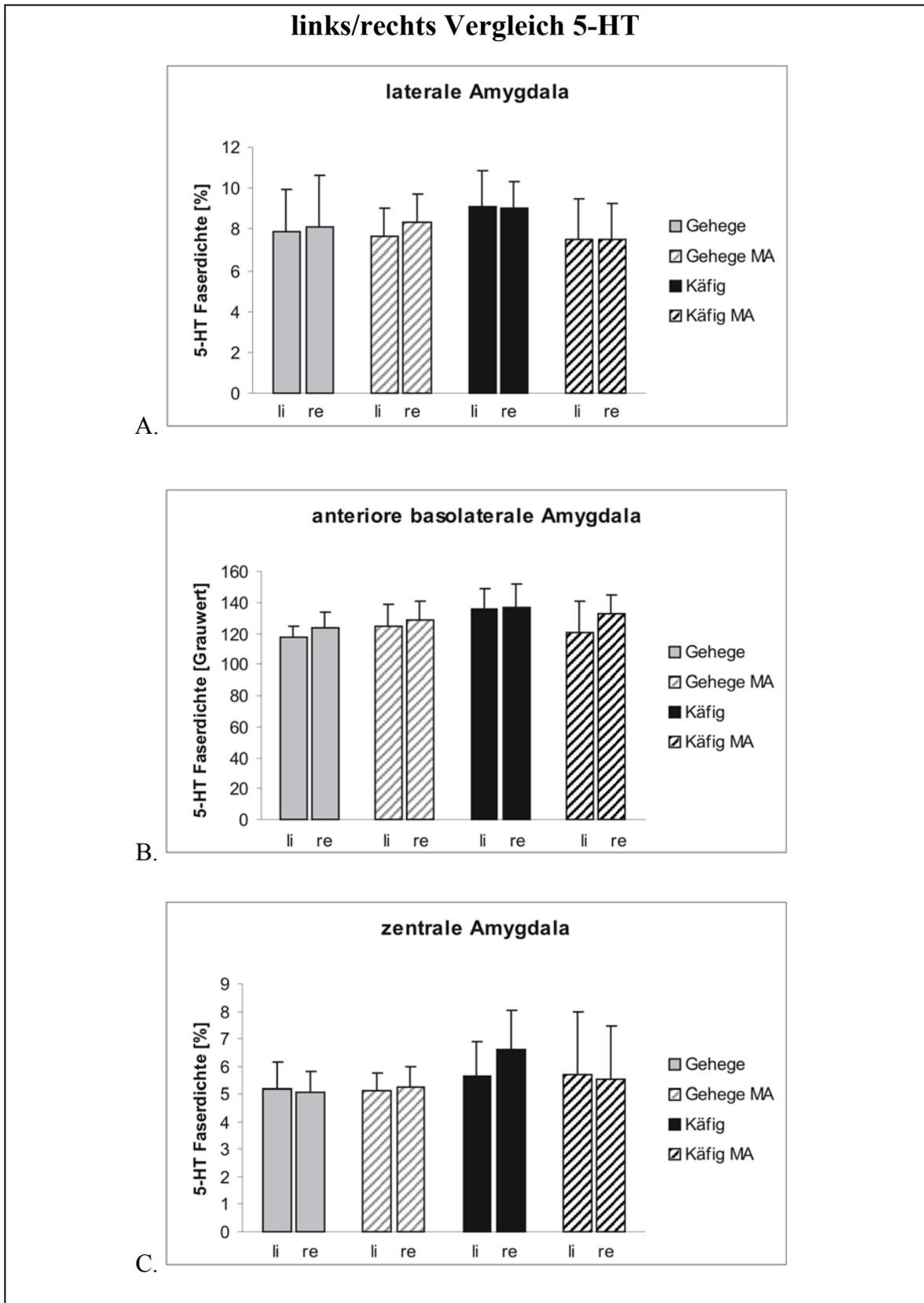


Abb.3.2.2.1: Die 5-HT Faserdichte im links/rechts Vergleich A, B, C, D zeigen die gepoolten Mittelwerte der Tiere einer Gruppe für linke (li) und rechte (re) Amygdala und die Standardabweichung. Der Mittelwertvergleich zeigt in keinem der Amygdalakerne einen signifikanten Unterschied.

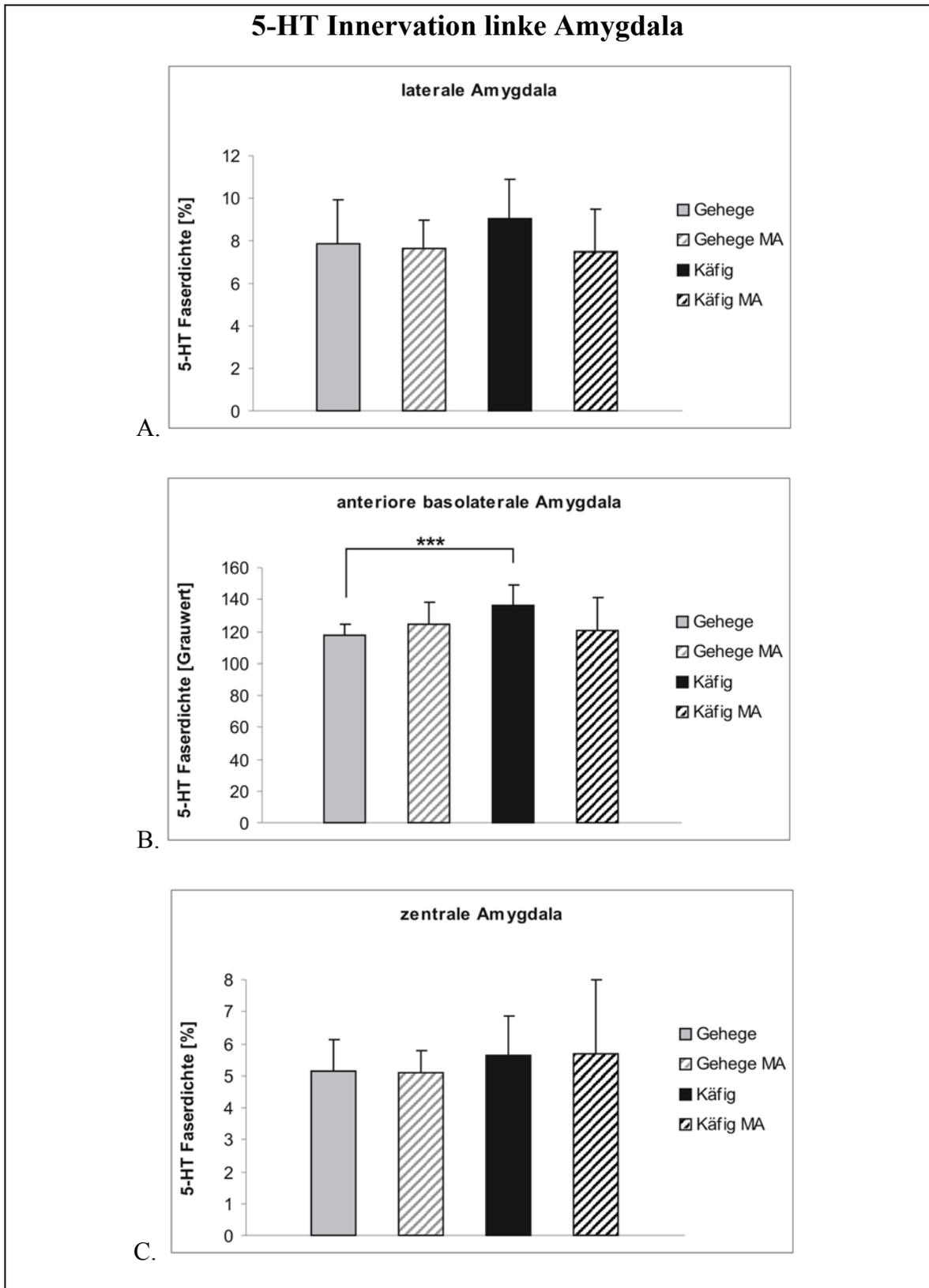


Abb.3.2.2.2: A, B, C zeigen die gepoolten Mittelwerte der Tiere pro Gruppe und die Standardabweichung. Der Mittelwertvergleich ergibt einen hochsignifikanten Unterschied zwischen Gehege- und Käfigaufzuchten in der aBLA ($p < 0,001$).

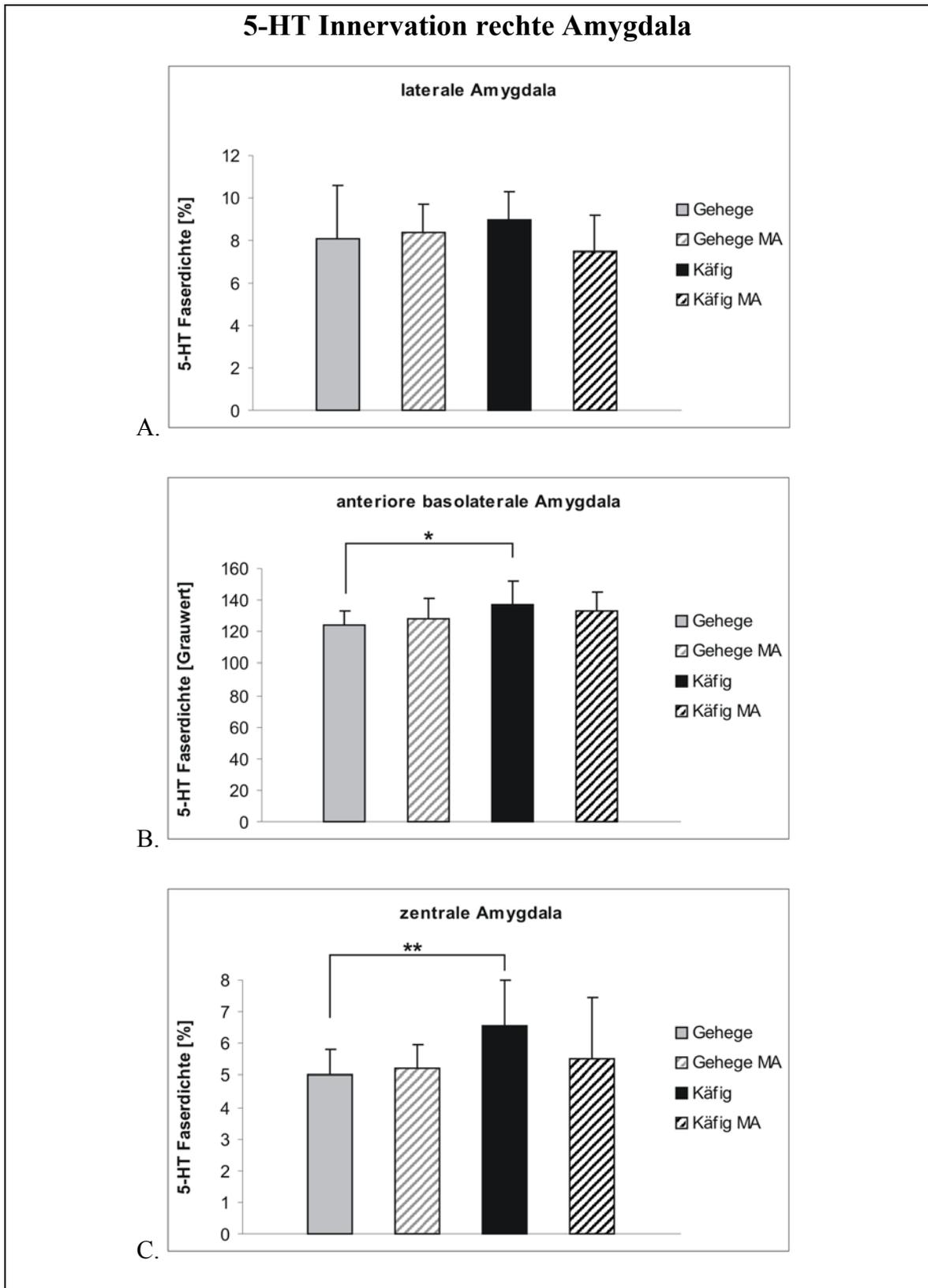


Abb.3.2.2.3: A, B, C zeigen die gepoolten Mittelwerte der Tiere pro Gruppe und die Standardabweichung. Der Mittelwertvergleich ergibt einen schwach signifikanten Unterschied zwischen Gehege- und Käfig Tieren in der aBLA ($p < 0,05$) und einen signifikanten Unterschied in der zentralen Amygdala ($p < 0,01$).

1. Serotonin links/rechts Vergleich:

Tabelle 3.2.2.1: laterale Amygdala

	Gehege		Gehege MA		Käfig		Käfig MA	
	links	rechts	links	rechts	links	rechts	links	rechts
x	7,8730	8,090	7,6123	8,3492	9,0726	8,9931	7,5058	7,4576
s	2,0692	2,5256	1,3862	1,3227	1,8189	1,3059	1,9701	1,7537
n	11	10	15	17	9	9	8	8
F-Test	0,2712		0,4247		0,1839		0,3833	
t-Test	0,8311		0,1346		0,9165		0,9592	

Tabelle 3.2.2.2: anteriore basolaterale Amygdala

	Gehege		Gehege MA		Käfig		Käfig MA	
	links	rechts	links	rechts	links	rechts	links	rechts
x	117,3303	123,7927	124,2011	128,5351	136,0026	137,0150	120,5031	132,8135
s	7,3808	9,730	14,3605	12,3396	12,8324	14,6315	20,7012	12,1521
n	11	10	16	17	9	10	9	9
F-Test	0,2008		0,2767		0,3610		0,0765	
t-Test	0,1007		0,3587		0,8751		0,1435	

Tabelle 3.2.2.3: zentrale Amygdala

	Gehege		Gehege MA		Käfig		Käfig MA	
	links	rechts	links	rechts	links	rechts	links	rechts
x	5,1584	5,0419	5,1100	5,2316	5,6528	6,5803	5,6840	5,5173
s	0,9712	0,7650	0,6703	0,7229	1,2207	1,4370	2,2971	1,9267
n	11	10	16	17	9	10	9	9
F-Test	0,2420		0,3872		0,3282		0,3153	
t-Test	0,7650		0,6206		0,1502		0,8696	

2. Vergleich der serotoninerger Innervation zwischen den Gruppen:

a. Linke Amygdala:

Tabelle 3.2.2.4: linke laterale Amygdala

	Gehege	Käfig	Gehege	Gehege MA	Käfig	Käfig MA
x	7,8730	9,0726	7,8730	7,6123	9,0726	7,5058
s	2,0692	1,8189	2,0692	1,3862	1,8189	1,9701
n	11	9	11	15	9	8
F-Test	0,3645		0,0830		0,4099	
t-Test	0,1905		0,7034		0,1088	

Tabelle 3.2.2.5: linke anteriore basolaterale Amygdala

	Gehege	Käfig	Gehege	Gehege MA	Käfig	Käfig MA
x	117,3303	136,0026	117,3303	124,2011	136,0026	120,5031
s	7,3808	12,8324	7,3808	14,3605	12,8324	20,7012
n	11	9	11	16	9	9
F-Test	0,0523		0,0195		0,0989	
t-Test	0,00069 ***		0,1169		0,0743	

Tabelle 3.2.2.6: linke zentrale Amygdala

	Gehege	Käfig	Gehege	Gehege MA	Käfig	Käfig MA
x	5,1584	5,6528	5,1584	5,1100	5,6528	5,6840
s	0,9712	1,2207	0,9712	0,6703	1,2207	2,2971
n	11	9	11	16	9	9
F-Test	0,2449		0,0942		0,0463	
t-Test	0,3260		0,8791		0,9718	

b. Rechte Amygdala:

Tabelle 3.2.2.7: rechte laterale Amygdala

	Gehege	Käfig	Gehege	Gehege MA	Käfig	Käfig MA
x	8,090	8,9931	8,090	8,3492	8,9931	7,4576
s	2,5256	1,3059	2,5256	1,3227	1,3059	1,7537
n	10	9	10	17	9	8
F-Test	0,0384		0,0118		0,2132	
t-Test	0,3377		0,7685		0,0568	

Tabelle 3.2.2.8: rechte anteriore basolaterale Amygdala

	Gehege	Käfig	Gehege	Gehege MA	Käfig	Käfig MA
x	123,7927	137,0150	123,7927	128,5351	137,0150	132,8135
s	9,730	14,6315	9,730	12,3396	14,6315	12,1521
n	10	10	10	17	10	9
F-Test	0,1200		0,2374		0,3060	
t-Test	0,0286 *		0,3094		0,5080	

Tabelle 3.2.2.9: rechte zentrale Amygdala

	Gehege	Käfig	Gehege	Gehege MA	Käfig	Käfig MA
x	5,0419	6,5803	5,0419	5,2316	6,5803	5,5173
s	0,7650	1,4370	0,7650	0,7229	1,4370	1,9267
n	10	10	10	17	10	9
F-Test	0,0370		0,4041		0,2001	
t-Test	0,0098 **		0,5249		0,1876	

3.3 Verhaltenstests

Tiere aus restriktiver Käfigaufzucht zeigen sowohl im open field (+26,82%, $p < 0,5$) als auch im elevated plus-maze (+41,54%, $p < 0,05$) eine signifikant erhöhte Laufstrecke (Abb.3.3.1.C und Abb.3.3.2.C; Tabelle 3.3.1.3 und 3.3.2.1) Zudem halten sich die Tiere kürzere Zeit in den offenen Bereichen der Versuchsapparaturen auf (-12,22%, $p < 0,05$) (Abb.3.3.1.B; Tabelle 3.3.1.2). Bei der Konditionierung zeigen beide Versuchsgruppen einen Lernerfolg (Abb.3.3.3.1; Tabelle 3.3.3.1), dabei haben die Aufzuchtbedingungen keinen signifikanten Einfluss auf die Konditionierbarkeit der Tiere (Tabelle 3.3.3.1). Nach der versuchten Löschung der Konditionierung zeigt sich allerdings ein hochsignifikanten Unterschied ($p < 0,001$) zwischen Gehege- und Käfigaufzuchten, die Fehlerzahl der Käfigaufzuchten ist um +320% erhöht (Abb.3.3.4.1; Tabelle 3.3.4.1). Auf den folgenden Seiten werden die Ergebnisse in grafischer und tabellarischer Form dargestellt.

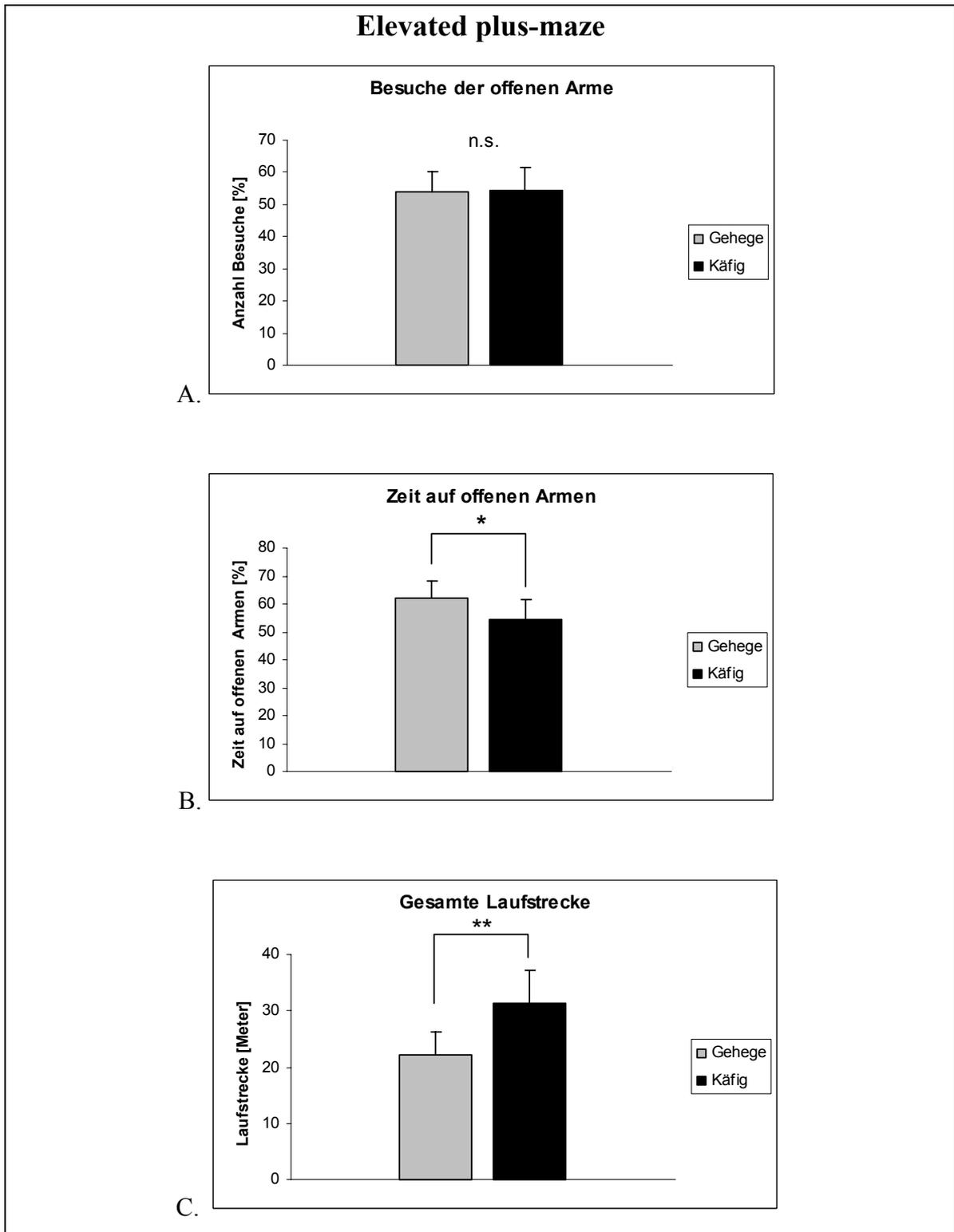


Abb.3.3.1: A, B, C zeigen die gepoolten Mittelwerte der Tiere pro Gruppe und die Standardabweichung. Der Mittelwertvergleich (A) ergibt keinen signifikanten Unterschied zwischen den Gehege- und Käfigaufzuchten bezüglich der Besuche der offenen Arme. Abbildung (B) zeigt einen schwach signifikanten Unterschied in der Zeit, die auf den offenen Armen verbracht wurde ($p < 0,05$). Abbildung (C) zeigt einen signifikanten Unterschied in der gesamten Laufstrecke ($p < 0,01$).

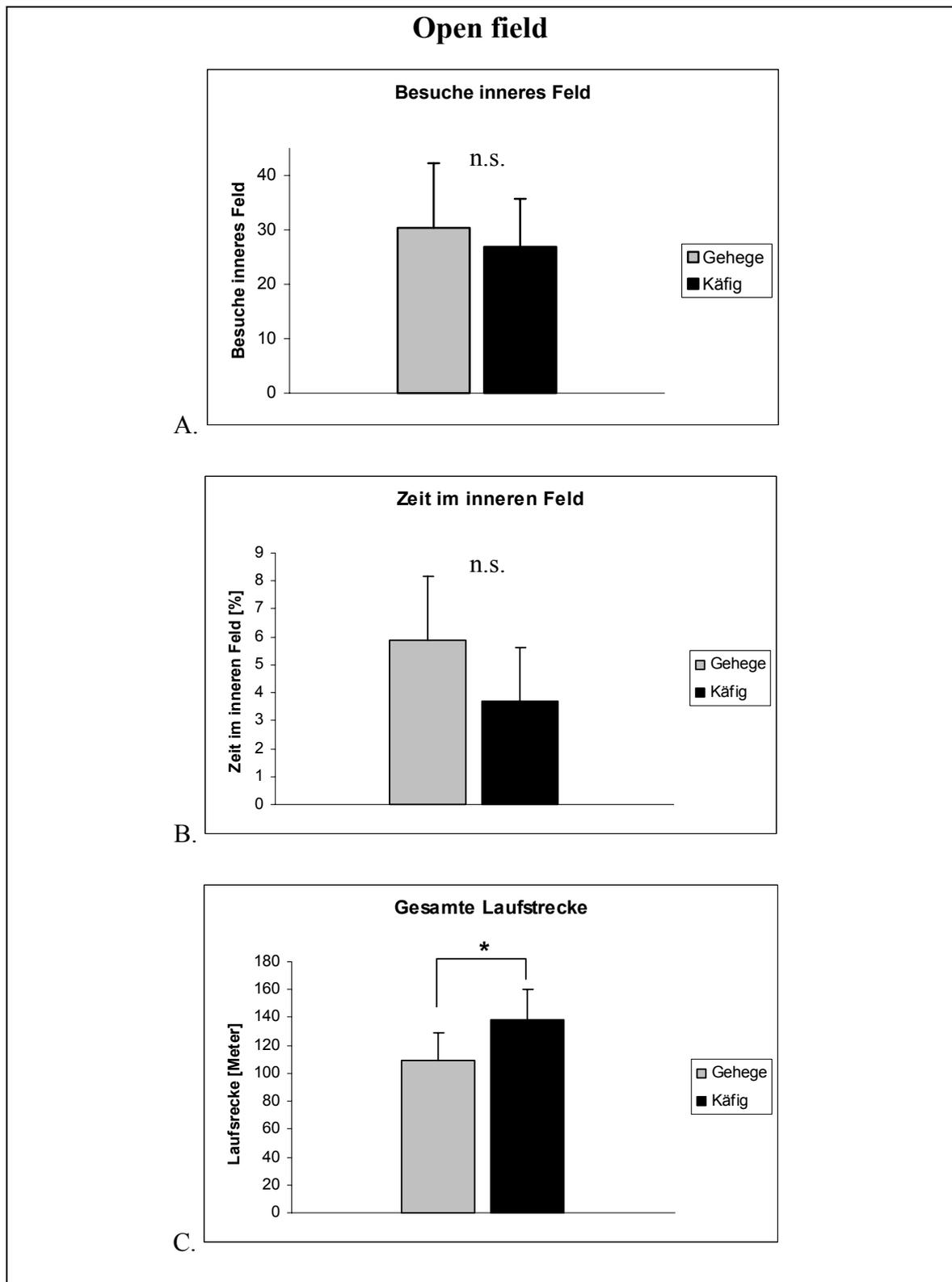


Abb.3.3.2: A, B, C zeigen die gepoolten Mittelwerte der Tiere pro Gruppe und die Standardabweichung. Der Mittelwertvergleich (A) ergibt keinen signifikanten Unterschied zwischen den Gehege- und Käfigaufzuchten bezüglich der Besuche des inneren Feldes. Abbildung (B) zeigt keinen Unterschied in der Zeit, die auf den offenen Armen verbracht wurde. Abbildung (C) zeigt einen schwach signifikanten Unterschied in der gesamten Laufstrecke ($p < 0,05$).

1. Elevated plus-maze:

In den folgenden Tabellen sind die statistischen Daten des elevated plus-maze Tests zusammengefasst dargestellt.

Tab. 3.3.1.1: Besuche der offenen Arme:

	Gehege	Käfig
x	53,7310	54,5913
s	6,5145	7,0733
n	9	8
F-Test	0,4074	
t-Test	0,7976 n.s.	

Tab. 3.3.1.2: Zeit auf offenen Armen:

	Gehege	Käfig
x	61,9020	54,335
s	6,2634	7,0235
n	9	8
F-Test	0,3745	
t-Test	0,0329 *	

Tabelle 3.3.1.3: Gesamte Laufstrecke:

	Gehege	Käfig
x	22,1322	31,3262
s	4,1519	5,9748
n	9	8
F-Test	0,1645	
t-Test	0,0020 **	

2. Open field:

In den folgenden Tabellen sind die statistischen Daten des open field Tests zusammengefasst dargestellt.

Tabelle 3.3.2.1: Gesamte Laufstrecke:

	Gehege	Käfig
x	10951,8930	13889,6725
s	1973,5820	2160,9269
n	8	8
F-Test	0,4085	
t-Test	0,0131 *	

Tab. 3.3.2.2: Zeit im inneren Feld

	Gehege	Käfig
x	5,860	3,7075
s	2,3024	1,9019
n	8	8
F-Test	0,3133	
t-Test	0,0608 n.s.	

Tabelle 3.3.2.3: Anzahl der Besuche des inneren Feldes:

	Gehege	Käfig
x	30,3750	26,8750
s	11,8796	8,8388
n	8	8
F-Test	0,2267	
t-Test	0,5146 n.s.	

3. Konditionierung:

Die zweifaktorielle Varianzanalyse (ANOVA) zeigt keinen signifikanten Unterschied zwischen den Versuchsgruppen (Streuungsursache Stichprobe A: $p > 0,5$). Ein hochsignifikanter Unterschied zeigt sich über die Versuchstage (Streuungsursache Spalte (B): $p < 0,001$), d.h. beide Gruppen zeigen einen Lernerfolg.

Tabelle 3.3.3.1: Statistische Daten zur Konditionierung

Konditionierung	
Mittelwerte und Standardabweichungen	
Gehege $\bar{x} = 0,5417$	$s = 0,5882$
Käfig $\bar{x} = 0,6667$	$s = 0,8165$
Zweifaktorielle Varianzanalyse	
Streuungsursache Stichprobe (A): 0,1069 n.s.	
Streuungsursache Spalte (B): 2,27206E-14 ***	
Streuungsursache Wechselwirkung (AxB): 0,5478 n.s.	

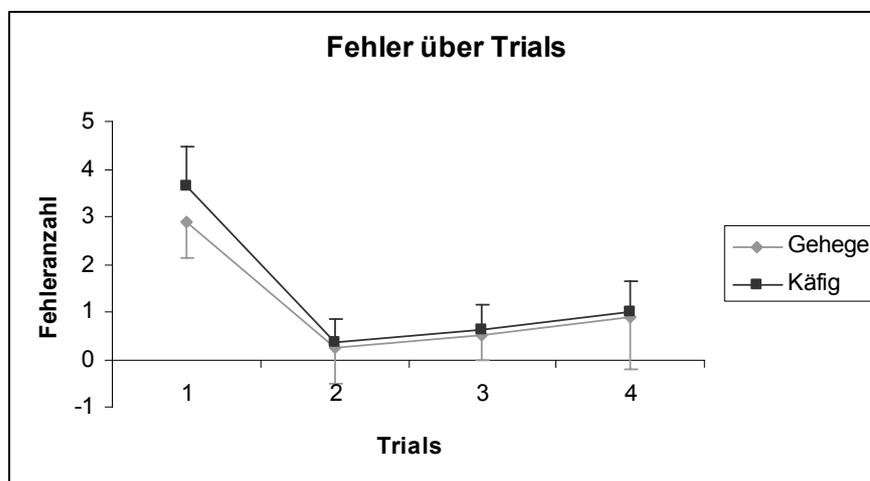


Abb.3.3.3.1: Dargestellt sind die gepoolten Mittelwerte der Tiere pro Gruppe und die Standardabweichung. Die Abbildung zeigt die Fehlerzahl über die Trials.

4. Lösungsüberprüfung:

Tabelle 3.3.4.1: Statistische Daten
der Lösungsüberprüfung

	Gehege	Käfig
x	1,25	5,25
s	1,2817	2,1213
n	8	8
F-Test	0,1035	
t-Test	0,00044 ***	

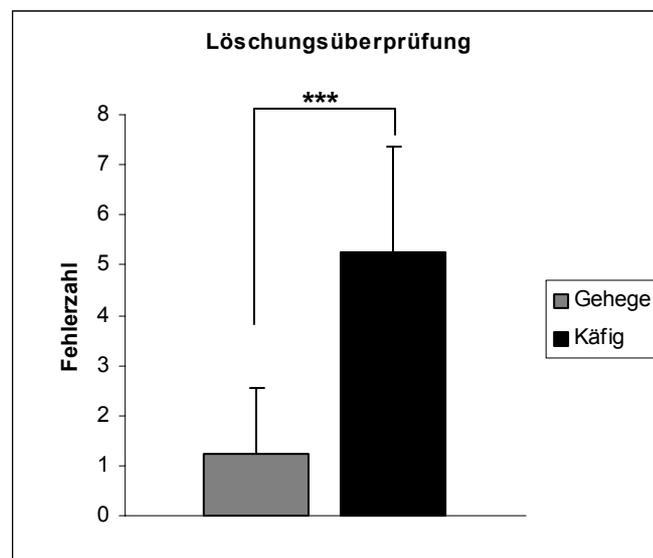


Abb.3.3.4.1: Dargestellt sind die gepoolten Mittelwerte der Tiere pro Gruppe und die Standardabweichung. Die Abbildung zeigt die Fehlerzahl der Tiere.

4 Diskussion

4.1 Zur katecholaminergen Innervation der Amygdala

Ziel der Untersuchung war es herauszufinden, welchen Einfluss restriktive Isolationsaufzucht und die frühkindliche Intoxikation mittels Methamphetamin (MA) auf die Reifung der dopaminergen (DA) und serotoninergen (5-HT) Innervation der Amygdala ausübt. Damit sollte geprüft werden, inwiefern die beiden Katecholamine zu den schwerwiegenden Verhaltensstörungen beitragen, die durch solche Interventionen auslösbar sind und in welchem Maße die Amygdala daran beteiligt ist.

Durch den immunhistochemischen Nachweis und die quantitative computergestützte Auswertung konnte belegt werden, dass die DA Innervation der Amygdala sowohl durch die Aufzuchtbedingungen als auch durch die MA-Intoxikation signifikant beeinflusst wird, die 5-HT Innervation durch die Aufzuchtbedingungen eine signifikante Veränderung erfährt, jedoch nicht durch MA-Intoxikation beeinflusst wird. Es zeigte sich ferner, dass die untersuchten Kerne der Amygdala nicht gleichförmig auf die experimentellen Bedingungen reagieren:

In dem lateralen Kern (LA) der Amygdala traten nur nach MA-Intoxikation signifikante Unterschiede in der DA Faserdichte auf. In dem basolateralen Kern (BLA) der Amygdala zeigte sich bei Käfigaufzuchten eine erhöhte DA und 5-HT Faserdichte. Im zentralen Kern (CEA) nahm bei Käfigaufzuchten die DA Faserdichte ab, die 5-HT Innervation stieg jedoch an.

Die Heterogenität der Ergebnisse spiegelt den komplexen Aufbau der Amygdala wieder und zeigt, dass nicht von der DA und 5-HT Innervation „der Amygdala“ gesprochen werden kann. Vielmehr müssen die Kerne einzeln und in ihrem funktionellen Gefüge betrachtet werden (Swanson and Petrovich, 1998). Deswegen soll in der folgenden Diskussion besonderer Wert auf die funktionalen Besonderheiten der einzelnen Kerne sowie auf ihre Einbindung in übergeordnete Funktionsbezüge gelegt werden.

4.1.1 Zur dopaminergen Innervation der Amygdala

Es steht heute außer Frage, dass Umweltbedingungen die Entwicklung von Transmittern im Gehirn maßgeblich beeinflussen. Besonders sensibel reagiert das DAerge System auf exogene Faktoren. Ein wesentlicher Grund hierfür ist die prolongierte Reifung der den PFC innervierenden mesopräfrontalen Dopaminbahn, die erst nach der Geschlechtsreife der Tiere vollständig ausgebildet ist (Kalsbeek et al., 1988). In unserer Labor wurde dies für *Gerbils* ebenfalls belegt: *Meriones unguiculatus* erreicht bereits am Tag 60 die Geschlechtsreife, die Reifung der mesopräfrontalen Dopaminbahn dauert hingegen bis zum Tag 90 an (Dawirs et al. 1993). Die Umwelt kann in diesem Zeitfenster besonders auf das sich entwickelnde DAerge Innervationsmuster Einfluss nehmen: Die restriktive Aufzucht von *Meriones unguiculatus* führte zu einer um 56% verminderten Reifung der mesopräfrontalen Dopaminfasern im medialen PFC (Winterfeld et al., 1998) und zu einer um 38% verringerten Reifung im orbitalen PFC (Neddens et al., 2001).

Die den PFC innervierenden Fasern haben ihren Ursprung in der VTA, das ist dieselbe Region im Mesencephalon, aus der auch die Amygdala ihre stärksten DAergen Afferenzen erhält (Fallon and Ciofi, 1992). Der PFC wiederum ist mit der VTA und mit der Amygdala reziprok verbunden (McDonald et al. 1996). Eine veränderte Aktivität des PFC, hervorgerufen durch restriktive Bedingungen bzw. Applikation von MA, sollte sich auch auf die Zielgebiete der PFC-Efferenzen auswirken. Es ist bekannt, dass bei einer Läsion von DAergen Fasern im PFC eine verstärkte Aktivität in limbischen Gebieten beobachtet werden kann (Carter and Pycock, 1978). Es stellt sich nunmehr die Frage, wie eine Reduktion der DAergen Faserdichte in frontalen Gebieten zum Anstieg der Faserdichte in limbischen Gebieten, speziell der Amygdala, führt. Für dieses Problem bieten sich zwei Erklärungsansätze an:

1. Das DAerge System sollte in ähnlicher Weise reagieren wie das 5-HT System, denn MA wirkt ebenfalls neurotoxisch auf DAerge Synapsen und führt zu einem Verlust der Terminalien (Seiden and Sabol, 1996). Für die Neurotransmitter 5-HT und Noradrenalin (NA) konnte gezeigt werden, dass ein frühkindlicher, neurotoxischer Eingriff eine dauerhafte Veränderung der Transmittersysteme im Erwachsenenalter bewirkt; die Faserdichte in Gebieten die distal zu den 5-HT / NA-Kerngebieten liegen nimmt ab, hingegen tritt in proximalen Regionen eine Hyperinnervation auf (Jonsson and Hallman, 1982). Als Erklärung hierfür wird der „pruning effekt“ angeführt, der zu einem verstärkten aussprossen der intakten axonalen Verzweigungen führt (Jonsson and

Hallman, 1982). In unserer Arbeitsgruppe konnte für *Meriones unguiculatus* gezeigt werden, dass die einmalige Gabe von MA am Tag 14 eine selektive Zerstörung der Dopaminfasern im PFC verursacht und eine suppressive Reifung der mesopräfrontalen Dopaminprojektion bewirkt (Dawirs et al., 1994). Aber auch die restriktive Umwelt allein führt zu einer verminderten DAergen innervation des PFC (Winterfeld et al., 1998; Neddens et al., 2001). Eine reduzierte Faserdichte im PFC könnte demnach eine erhöhte Faserdichte in der Amygdala durch einen „pruning effect“ nach sich ziehen, d.h. die ungeschädigten Fasern reifen verstärkt in DA Somata nahe Gebiete wie die Amygdala. Diese These wird dadurch bestärkt, dass durch die MA-Inoxikation bei Gehege wie Käfigtieren die DAerge Innervation in dem BLA signifikant erhöht ist und im Gehege/Käfig Vergleich die Käfigtiere eine höhere DA-Faserdichte in der Amygdala aufweisen.

Es muss jedoch festgehalten werden, dass diese Effekte nur in dem BLA auftreten. Im CEA zeigt sich hingegen ein gegenläufiges Ergebnis. Dort ist bei Käfigtieren die DAerge Innervation geringer als bei Gehegetieren. Dies steht in Einklang mit den Ergebnissen der Arbeitsgruppe Thoa, die bei isolierten Tieren eine erniedrigte Dopaminkonzentration im CEA gefunden haben (Thoa et al., 1977), was auf eine spezifische DAerge Innervation der einzelnen Amygdalakerne schließen lässt, die nicht gleichförmig auf die experimentellen Bedingungen reagiert (Kilts et al., 1988). So unterscheiden sich die einzelnen Amygdalakerne nicht nur in der Innervationsdichte, sondern auch in der Umsatzrate und Impulsaktivität. Der am dichtesten innervierte CEA besitzt die langsamste Umsatzrate und geringste Impulsaktivität in der Amygdala (Kilts et al., 1988). Dies mag auch die unterschiedliche Einbindung des CEA gegenüber dem basolateralen Komplexes widerspiegeln, ist der CEA funktional doch eng mit dem Hirnstamm verknüpft, LA und BLA hingegen mit kortikalen Arealen.

Ein weiteres Indiz für die spezifische Innervation ist die unterschiedliche Dopaminrezeptorverteilung in den einzelnen Kernen der Amygdala. D₂ Rezeptoren finden sich hauptsächlich im LA und CEA, D₁ Rezeptoren in dem BLA. Über die genauen Wirkungsmechanismus von DA in der Amygdala ist bis heute nur sehr wenig bekannt (Pralong et al., 2002).

2. Unter funktionellen Gesichtspunkten gesehen ist es auffällig, dass BLA und PFC am stärksten auf Umwelteinflüsse und Methamphetamin reagieren. Ein wesentlicher Punkt

mag in der hohen reziproken Konnektivität der beiden Strukturen liegen. Betrachtet man den Reifungsverlauf der DAergen Fasern in frontale und limbische Gebiete, so fällt auf, dass sie zu unterschiedlichen Zeiten ausgereift sind. Die Amygdala innervierende mesolimbische Dopaminbahn erreicht bereits am postnatalen Tag 14 ihre Zielgebiete und bildet innerhalb der nächsten 60 Tage durch Reduktion der Fasern das adulte Innervationsmuster aus (Verney et al., 1985). Die mesopräfrontale Dopaminbahn hingegen reift über das Alter der Geschlechtsreife der Tiere hinaus (Dawirs et al., 1993; Kalsbeek et al., 1988; Winterfeld et al. 1998; Neddens et al 2001). Da sowohl restriktive Aufzuchtbedingungen und MA-Intoxikation eine dysfunktionale Entwicklung des PFC verursachen (Dawirs et al., 1991; Dawirs et al., 1994), liegt es nahe, dass mit dem PFC verbundene limbische Gebiete sensibel auf den veränderten Output des PFC reagieren. Weil die Reifung von Neurotransmittern aktivitätsabhängig ist (Mattson, 1988), könnte die Hyperinnervation der BLA auch auf einer ungenügenden Reduktion der DA-Fasern während der Entwicklung beruhen, die durch einen veränderten Output des PFC hervorgerufen wird (Busche et al., 2004). In der folgenden Abbildung sind diese Gedanken zusammenfassend dargestellt (Abb.4.1.1).

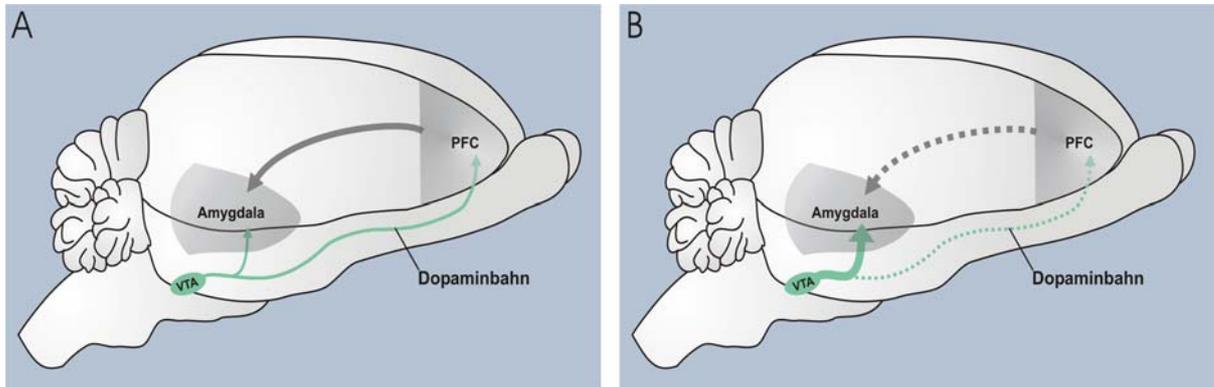


Abb.4.1.1: Strukturelle Folgen der isolierten Aufzucht. (A) zeigt die Situation bei Gehegeaufzucht, (B) bei isolierter Käfigaufzucht. In (B) ist die DAerge Innervation der Amygdala erhöht, die mesopräfrontale DA Bahn (grün) hingegen suprimiert gereift. Der PFC zeigt einen veränderten Output zur Amygdala.

Eine gegenseitige Beeinflussung zwischen PFC, Amygdala und der VTA kann nicht ausgeschlossen werden, da alle Strukturen untereinander reziprok verbunden sind (Kalivas, 1993; McDonald et al., 1996; Pitkanen, 2000; Sesack and Pickel, 1992). So belegen neueste Untersuchungen, dass die den medialen PFC innervierenden glutamatergen Fasern aus der pBLA bis ins jungerwachsene Alter in den medialen PFC

einwachsen (Cunningham et al., 2002). Da diese Fasern wiederum den Output des PFC zur Amygdala und VTA modulieren, ergibt sich ein komplexes Netzwerk von Interaktionen.

4.1.2 Zur serotoninerger Innervation der Amygdala

Die restriktive Käfigaufzucht führt zu einer 5-HT Hyperinnervation in dem BLA und dem CEA. Die einmalige MA-Intoxikation am Tag 14 zeigt dagegen keinen signifikanten Einfluss auf die Faserdichte. Dies ist insofern interessant, als dass die 5-HTergen Fasern aus der dorsalen Raphe eine besonders hohe Anfälligkeit für die toxische Wirkung von MA besitzen sollen (Zhou, 1996). Man würde also eher einen Rückgang der 5-HTergen Faserdichte vermuten. Nun ist jedoch auch bekannt, dass gerade das 5-HT System in der Lage ist, hochplastisch auf Störungen zu reagieren. 5-HT ist in der Lage, sein eigenes Wachstum anzuregen. Eine Verringerung der 5-HTergen Faserdichte, z.B. hervorgerufen durch MA-Intoxikation, bewirkt eine Steigerung der Aktivität der verbliebenen Neurone (Kempf et al., 1984). Die hohe Aktivität verursacht die Freisetzung des Wachstumsfaktors S-100 β aus der Astroglia, der selektiv das Wachstum von 5-HTergen Fasern fördert (Whitaker-Azmitia et al., 1990; Azmitia et al., 1990). Die Reinnervation geschädigter Gebiete geht sogar so weit, dass eine Hyperinnervation auftreten kann (Frankfurt and Azmitia, 1984; Sotelo, 1991; Zhou and Azmitia, 1986). Es ist also durchaus möglich, dass die MA-Intoxikation durch die plastischen Potenzen des 5-HT Systems ausgeglichen werden konnte. Hierfür spricht auch, dass zum Zeitpunkt der Applikation von MA (Tag 14) das 5-HTerge Innervationsmuster der Amygdala bereits ausgereift war, denn die Amygdala ist bereits am postnatalen Tag 3 vollständig innerviert (Lidov and Molliver, 1982). So trifft die MA-Intoxikation auf ein ausgereiftes System, welches generell weniger anfällig für Störungen ist als ein noch reifendes (Jacobson M, 1991). Um diese Überlegung zu bestätigen, sind allerdings Verlaufstudien über die 5-HT Reifung nötig, die in unserm Labor gerade begonnen werden.

Die MA-Intoxikation stellt eine einmalige Belastung für das Versuchstier dar. Die restriktive Isolationsaufzucht ist hingegen als chronische Belastung zu sehen. Auch die chronische Belastung durch die restriktive Isolationsaufzucht führt in dieser Studie zu einer Erhöhung der 5-HT Faserdichte in der Amygdala. Über welchen Mechanismus

könnte eine restriktive Aufzucht die Erhöhung der 5-HT Faserdichte in der Amygdala verursachen?

Es ist aus der Literatur bekannt, dass Ratten aus sozial isolierter Aufzucht eine stärkere Stressantwort und einen erhöhten Stresshormonspiegel als in Gruppen aufgezogene Artgenossen besitzen (Heidbreder et al., 2000). Messungen an gestressten Tieren haben ergeben, dass es gerade in der Amygdala bei Stress zu einer erhöhten 5-HT Ausschüttung kommt (Kawahara et al., 1993). Wie bereits erwähnt, bewirkt eine hohe Aktivität 5-HTerger Neurone die Freisetzung des Wachstumsfaktors S-100 β aus der Astroglia, der wiederum selektiv das Wachstum von 5-HTergen Fasern fördert (Whitaker-Azmitia, et al., 1990). Eine chronische Belastung durch restriktive Isolationsaufzucht könnte somit eine erhöhte 5-HT Ausschüttung zur Folge haben, welche ein verstärktes Einwachsen von 5-HT Fasern in die Amygdala bewirkt.

Restriktiv gehaltene Tiere haben einen geringeren 5-HT Umsatz als reichhaltig gehaltene Tiere (Hall, 1998). Wie passt nun die beobachtete erhöhte Faserdichte bei restriktiv aufgezogenen Rennmäusen zu diesen Ergebnissen? Jonsson fand nach chemischer Läsion eine 5-HT Hyperinnervation bei gleichzeitig geringerer Umsatzrate (Jonsson and Hallman, 1982). Das bedeutet, dass die beobachtete Hyperinnervation bei Käfigtieren ebenfalls mit einem geringeren 5-HT Umsatz einhergehen sollte. Dies würde den geringen 5-HT turnover bei adulten isolierten Tieren erklären (Kempf et al., 1984). Endgültige Klarheit auch zu diesen Problem wird erst eine Studie ergeben, die Umsatzrate und Faserdichte für *Meriones unguiculatus* gemeinsam untersucht (unsere Abteilung hat dies in Kooperation mit der Universität Dresden gerade begonnen.)

5-HT übernimmt in der Amygdala eine Filter- und Modulatorfunktion. Eine erhöhte 5-HT Ausschüttung bei Stress führt zu einer Dämpfung der Eingänge in die Amygdala (Kawahara et al., 1993), so dass nur noch starke Reize weitergeleitet werden (Stutzmann et al., 1998). Dies wird dadurch erreicht, dass 5-HT die glutamatergen Efferenzen aus dem Kortex über Interneurone schwächt (Stutzmann et al. 1998). Verstärkt wird dieser Effekt dadurch, dass 5-HT in dem BLA auch GABAerge Interneurone über 5-HT₂ Rezeptoren aktiviert, die benachbarte Projektionsneurone hemmen (Rainnie, 1999). Es wird vermutet, dass Anxiolytika wie die selektiven 5-HT re-uptake Hemmer (SSRI) an dieser Stelle ihre angst mildernde Wirkung entfalten, da sie den Serotoninspiegel erhöhen und so die Aktivität der hemmenden Interneurone

steigern (Gorman et al., 2000). Die Folge dieser verstärkten Hemmung ist letztendlich, dass der CEA weniger erregenden Input aus dem basolateralen Komplex erhält und so seinerseits in geringerem Umfang Furchtreaktionen auslösen kann (Cheng et al., 1998). 5-HT ist auch in der Lage, im CEA selbst über 5-HT_{1A} Rezeptoren die Projektionsneurone zu hemmen. Bei Käfigtieren sollte weniger 5-HT zu einer verminderten Hemmung des Outputs der CEA führen und so ein ängstlicheres Verhalten nach sich ziehen. Hier erhebt sich die Frage, ob sich furchtmotiviertes Verhalten bei den Tieren dieser Studie nachweisen lässt?

4.2 Zum Einfluss auf das Verhalten

Um den Einfluss einer restriktiven Aufzucht auf das Verhalten der Tiere quantitativ zu erfassen, wurden drei Verhaltensversuche durchgeführt. Dies sind das elevated plus-maze, das open field und die aktive Vermeidungskonditionierung. Alle drei Versuche überprüfen die Emotionalität der Tiere, besonders deren furchtmotiviertes Verhalten. Die einzelnen Tests sollen nun kurz zur Diskussion gestellt werden.

4.2.1 Zum elevated plus-maze und open field

Als ethologischer Test zur Erforschung von furchtmotiviertem Verhalten hat sich die Kombination von elevated plus-maze (EPM) und open field (OF) bewährt (Schmitt and Hiemke, 1998; Lister, 1990; Paylor, 2001). Beide Tests sind explorationsbasiert und beruhen auf dem aktiven Verhalten des Versuchstieres. Im OF wird das Verhalten durch den Konflikt zwischen Exploration und der Aversion vor offenen Flächen bestimmt (Schmitt and Hiemke, 1998). Im EPM kommt zusätzlich die Abneigung der Tiere vor der Höhe hinzu (Lister, 1987; Pellow et al., 2004).

Im EPM konnte zwischen Gehegetieren und restriktiv aufgezogenen Tieren kein signifikanter Unterschied in der Häufigkeit der Besuche der offenen Arme festgestellt werden. Die Gehegetiere verbrachten jedoch signifikant mehr Zeit auf den offenen Armen des Labyrinths. Ein längerer Aufenthalt auf den offenen Armen des EPM deutet auf eine geringere Furcht des Tieres hin (Lister, 1987; Pellow et al., 2004). Vergleicht man die insgesamt zurückgelegte Laufstrecke der beiden Gruppen, so wird deutlich, dass die Käfigtiere eine signifikant erhöhte motorische Aktivität besitzen. Trotz erhöhter Lokomotion liegt die Aufenthaltszeit der Käfigtiere auf den offenen Armen

aber unter den Gehegetieren. Das heißt, die Käfigtiere bewegen sich mehr in den geschlossenen Armen der Versuchsapparatur.

Im OF zeigten die Käfigtiere ebenfalls eine signifikant höhere Laufstrecke. Eine gesteigerte Lokomotion wird als furchtmotiviertes Verhalten gedeutet (Halliday, 1967; Welker, 1957; Vallee et al., 1997). Es konnte jedoch kein signifikanter Unterschied in der Anzahl der Besuche des zentralen Feldes gefunden werden. Allerdings zeigt die Aufenthaltszeit im zentralen Feld ($p=0,06$) im Trend eine längere Aufenthaltsdauer für die Gehegetiere, was auf eine geringere Furcht der Tiere vor offenen Flächen hindeutet.

Betrachtet man das Verhalten der Tiere im EPM und OF gemeinsam, so fällt auf, dass in beiden Tests die Käfigtiere eine erhöhte motorische Aktivität zeigen und die ungeschützten Bereiche der Versuchsapparaturen meiden. Hieraus lässt sich ableiten, dass restriktiv aufgezogene Wüstenrennmäuse in einer für sie fremden Umgebung ein stärker furchtmotiviertes Verhalten zeigen als reichhaltig aufgezogene Artgenossen.

Die Ergebnisse der Verhaltensversuche stehen im Einklang mit der Literatur zu isoliert aufgezogene Ratten und Mäusen, welche gleichfalls die ungeschützte Flächen des EPM meiden (Prior and Sachser, 1994; Wright et al., 1990) und eine höhere motorische Aktivität zeigen (Heidbreder et al., 2000; Lapis et al., 2003). Die restriktiv gehaltenen Tiere dieser Studie zeigen also die typischen Verhaltensweisen des „social isolation syndrome“.

Die Faserquantifizierung hat uns gezeigt, dass bei restriktiv aufgezogenen *Gerbils* die DAerge und 5-HTerge Innervation der Amygdala signifikante Veränderungen erfährt. Es liegt also bei diesen Tieren ein anderes neuronales Nervennetz-Korrelat vor. Da Verhalten immer auf neuronalen Prozessen im Gehirn beruht, sollte das ängstliche Verhalten der Käfigtiere mit der DA- und 5-HT Faserdichte in einem Zusammenhang stehen.

Betrachtet man die Wirkung von Barbituraten auf das Verhalten im EPM, so zeigt sich, dass behandelte Tiere mehr Zeit auf den offenen Armen verbringen (Lister, 1987; Pellow et al., 2004). Dieser anxiolytische Effekt mag in der verstärkten Ansprache von GABAergen Neuronen in der Amygdala begründet sein, denn die verstärkte Ansprache GABAerger Interneurone in dem LA bewirkt eine höhere Exploration der offenen Arme

des EPM (Yilmazer-Hanke et al., 2002; Pesold and Treit, 1995; Davis, 1997; Pesold and Treit, 1995). Nun ist bekannt, dass auch Serotonin GABAerge Interneurone in der Amygdala aktivieren kann (Rainnie, 1999). Das dichtere Netz 5-HTerger Fasern bei den Käfigtieren sollte mit einer verminderten Umsatzrate einhergehen (Jonsson and Hallman, 1982), so dass weniger Transmitter ausgeschüttet wird und hemmende Interneurone in geringerem Umfang aktiviert werden sollten. Dies hätte zur Folge, dass die thalamischen und kortikalen Eingänge weniger gedämpft werden und Furcht auslösende Reize stärkere Aktivität im CEA auslösen, über den die Angstreaktionen letztlich vermittelt werden (Stutzmann et al., 1998; Stutzmann and LeDoux, 1999).

Eine besondere Rolle bei der Verarbeitung von stress- und furchtauslösenden Reizen besitzen die Corticotropin-Releasing-Faktor (CRF) produzierenden Neurone. Sie finden sich vor allem in dem CEA (Gray and Bingaman, 1996) und projizieren in den Hirnstamm und den Hypothalamus (Gray 1991; Koegler-Muly et al., 1993). CRF ist ein wichtiger Neuromodulator, der selbst über DA moduliert wird (Gray and Bingaman, 1996). In dem CEA werden die CRF produzierenden Neurone von einem dichten Fasernetz DAerger Axone umspinnen, die Synapsen mit CRF Somata ausbilden (Eliava et al., 2003). Damit sind die DAergen Afferenzen in der Lage, signifikanten Einfluss auf das CRF System in der Amygdala zu nehmen (Eliava et al., 2003). Im EPM ruft die Gabe von CRF Antagonisten eine längere Exploration der offenen Arme des Labyrinths hervor, hingegen verursacht die Injektion von CRF eine verringerte Exploration der offenen Arme (Rassnick et al., 1993; Yilmazer-Hanke et al., 2002). Im OF bewirkt die Administration von CRF ebenfalls ein ängstliches Verhalten der Tiere (Owens and Nemeroff 1993). Die geringere DA Innervation des CEA bei *Gerbils* aus der Käfigaufzucht sollte daher zu einer Enthemmung der CRF Neurone im CEA führen und damit eine geringere Exploration im EPM und OF bewirken.

Bei Ratten, die eine geringe Emotionalität zeigen, konnte eine um 50% verminderte CRF Neuronenzahl in dem CEA nachgewiesen werden (Yilmazer-Hanke et al., 2002). In weiteren Studien sollte an unserem Tiermodell untersucht werden, ob sich die CRF Neuronenzahl in der Amygdala zwischen Gehege- und Käfigaufzuchten unterscheidet, denn auch eine geringere Anzahl an CRF Neuronen sollte eine verminderte Emotionalität nach sich ziehen.

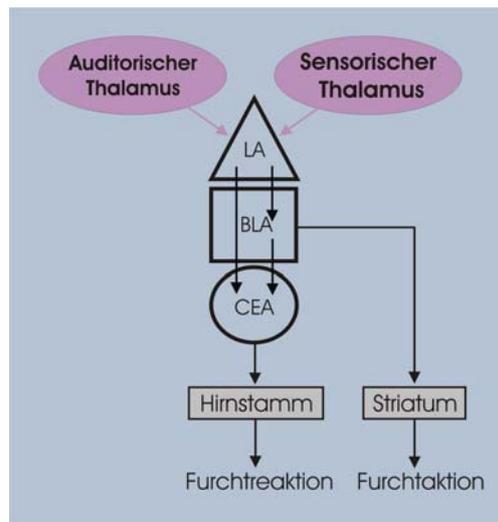
Wie entscheidend der frühkindliche Einfluss der Umwelt auf die Reifung des Gehirns und gleichzeitig auf das spätere Verhalten des Tieres ist, konnte Wright und Mitarbeiter

für die Ratte zeigen (Wright et al., 1991). Werden Ratten, die sozial isoliert aufwachsen, in eine reizreiche Umgebung transferiert, so bleibt trotzdem das ängstliche Verhalten im EPM erhalten. Die Tiere meiden weiterhin die offenen Arme der Apparatur (Wright et al., 1991). Werden die Tiere hingegen von Geburt an in der Gruppe aufgezogen, verhalten sie sich auch nach einer Isolierung im EPM „mutig“, sie halten sich längere Zeit auf den offenen Armen des Labyrinths auf (Wright et al., 1991). Zudem zeigen Läsionen der Amygdala eine stärkere Auswirkung auf das Sozial- und Explorationsverhalten im erwachsenen Alter, je früher sie induziert werden (Wolterink et al., 2001). Auch hier äußert sich dies im OF mit einer gesteigerten Lokomotion und einer Präferenz für die äußeren Bereiche der Arena (Wolterink et al., 2001).

Aber nicht erst im frühkindlichen Alter nimmt die Umwelt Einfluss auf das Gehirn. Immer mehr Studien belegen, dass bereits vor der Geburt die Hirnentwicklung in Abhängigkeit von der Umwelt stattfindet (Avishai-Eliner et al., 2002). So verändert der vorgeburtliche Einfluss von Stress die Aktivität der Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenrinden-Achse (hypothalamo-pituitary-adrenal axis, HPA) und damit die Corticosteron Sekretion mit andauernder Wirkung bis ins Erwachsenenalter (Vallee et al., 1997). Adulte, pränatal gestresste Ratten zeigen ängstliches Verhalten im EPM, eine gesteigerte Lokomotion im OF und einen erhöhten Corticosteronspiegel (Vallee et al., 1997). Die restriktiv aufgezogenen Tiere dieser Studie zeigen ein ähnliches Verhaltensprofil. Da die HPA-Achse über die Amygdala aktiviert wird, sollte eine geringere Hemmung der Amygdala, hervorgerufen durch eine veränderte DAerge und 5-HTerge Innervationsdichte, zu einer stärkeren Aktivierung der HPA-Achse führen und so eine erhöhte Corticosteron Ausschüttung verursachen, wie sie bei isoliert aufgezogenen Ratten zu finden ist (Gamallo et al., 1986; Heidbreder et al., 2000).

4.2.2 Zur Konditionierung und deren Löschung

Das Meiden von akuten Gefahrensituationen beruht auf einem Lernvorgang, bei dem die Amygdala eine prominente Stellung einnimmt. Das aktive Vermeidungslernen in der Schockbox setzt sich aus zwei Komponenten zusammen. Zuerst findet eine klassische Konditionierung statt, bei der das Tier lernt, den Ton (CS) mit dem Schock (UCS) zu assoziieren (Amorapanth et al., 2000). Danach lernt das Tier beim Auftreten



des CS ein Verhalten, welches den UCS unterbindet. In unserem Fall ist dies der

Abb.4.2.2: Signalfluss beim Konditionierungslernen in der Schockbox

Sprung auf die isolierte Bank, um dem Elektroschock durch den Gitterboden zu entgehen. Dieser Teil ist eine instrumentelle Konditionierung. Demnach sind bei der aktiven Vermeidungs-konditionierung LA, BLA und CEA beteiligt (siehe Abb.4.2.2). Der Ton wird über thalamische und kortikale Afferenzen der LA vermittelt und konvergiert dort mit somatosensiblen Inputs des Schocks (Romanski et al. 2004). Der LA leitet diese Information an den BLA und an den CEA. Der BLA steuert über Verbindungen zum Striatum das Verhalten, um dem Schock zu entgehen. Der CEA ist für die Merkmale der Furchtreaktion wie erstarren und Blutdrucksteigerung zuständig.

Trotz der Unterschiede in der DA- und 5-HT Innervation gibt es keinen signifikanten Unterschied zwischen Gehege- und Käfigaufzuchten in der Konditionierungsphase. Das ist erstaunlich, denn DA spielt in der Amygdala bei der Konditionierung eine wichtige Rolle. Die DA Ausschüttung steigt beim Erlernen der Konditionierung stark an, daher könnten die Käfigaufzuchten auf Grund ihrer höheren DA Faserdichte hier sogar besser Lernen als Tiere aus Gehegeaufzucht (Phillips et al., 2002).

Beide Gruppen machen über die Wiederholungen signifikant weniger Fehler. Dieses Ergebnis steht in Einklang mit früheren Ergebnissen unserer Arbeitsgruppe (Winterfeld et al., 1998). In der Trainingsphase zum Zeitverzögerungstest, die ebenso wie die Trainingsphase im Schockboxversuches eine Konditionierung darstellt, schnitten Käfig- wie Gehegetiere gleich gut ab (Winterfeld et al., 1998). Bei der stirnhirnabhängigen Löschung der Konditionierung zeigt sich hingegen ein hochsignifikanter Unterschied

zwischen den Gruppen. Die Käfigtiere springen beim Ertönen des CS weiterhin auf die isolierte Bank. Sie können nicht adäquat auf die veränderten Bedingungen reagieren. Wie beim Zeitverzögerungstest sind die Käfigtiere bei stirnhirnabhängigen Leistungen schlechter (Winterfeld et al., 1998).

Der PFC ist als höchstes assoziatives Zentrum wesentlich an der Kontrolle über die Amygdala und im besonderen an der Furchtbewältigung beteiligt (Morgan et al., 1993). Wie der PFC seine Kontrolle über die Amygdala ausübt, erklärt sich folgendermaßen: Durch die Erregung GABAerger Interneurone in der Amygdala ist der PFC in der Lage, die kortikalen und thalamischen Eingänge in die Amygdala zu hemmen und so die Aktivität der Amygdala zu dämpfen (Morgan et al., 1993; Rosenkranz and Grace, 1999; Rosenkranz and Grace, 2001; Rosenkranz and Grace, 2002). Der Gegenspieler des PFC stellt die aus der VTA stammende DAerge Innervation des basolateralen Komplexes da. Durch die DA Ausschüttung in dem BLA werden die glutamatergen Efferenzen des PFC präsynaptisch gehemmt (Rosenkranz and Grace, 2001), d.h. der hemmende und kontrollierende Einfluss des PFC gemindert.

Die bei Käfigaufzuchten erhöhte DA Faserdichte in der Amygdala sollte mit einer verstärkten DA Ausschüttung einhergehen, wie sie auch bei sozial isolierten Ratten gefunden wurde (Lapiz et al., 2003). Eine starke DA Ausschüttung dürfte eine stärkere Hemmung der präfrontalen Efferenzen bewirken. Dies bedeutet, dass bei den Käfigaufzuchten die für die Dämpfung der Eingänge notwendigen hemmenden Interneurone in geringerem Umfang aktiviert werden und dadurch die Löschung der Konditionierung gestört ist. Da gerade bei Furcht und Stress die DA Ausschüttung in der Amygdala stark ansteigt (Inglis and Moghaddam, 1999), wird bei der akuten Stresssituation in der Schockbox der kontrollierende Einfluss des PFC am stärksten geschwächt. Ein weiterer Grund für die gestörte Löschung ist im PFC selbst zu suchen, denn bei Käfigtieren ist die DA Faserdichte im medialen PFC um über 50% verringert (Winterfeld et al., 1998). Es liegt nahe, dass dadurch auch der Output des PFC verändert sein sollte. Dies sollte zu einer verminderten Kontrolle des PFC über die Amygdala führen, was wiederum die Löschung der Konditionierung beeinträchtigen müsste (siehe Abb.4.2.2).

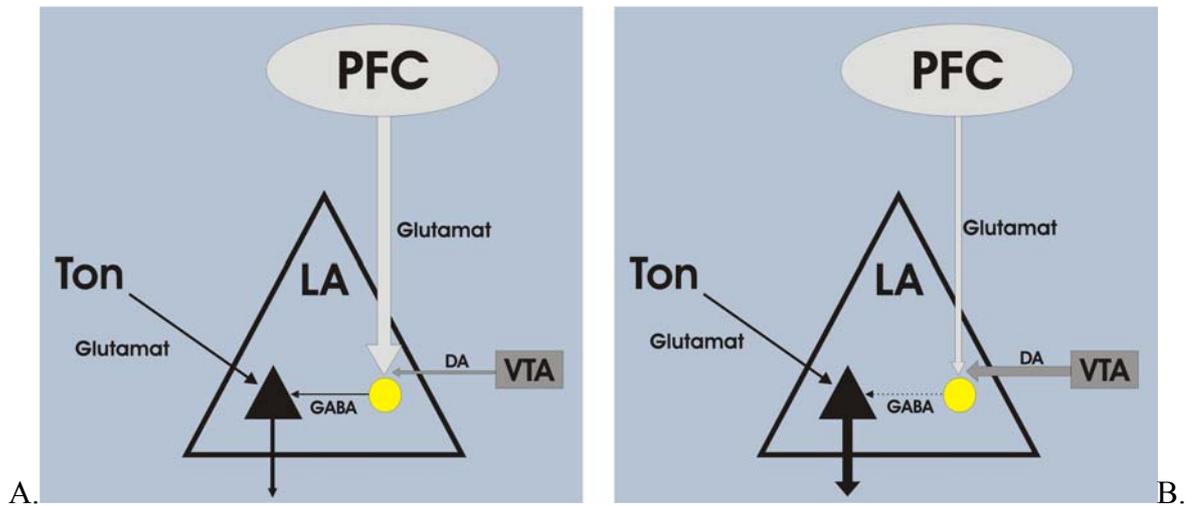


Abb.4.2.2: Vereinfachte Darstellung der Interaktion PFC und VTA in der LA. Bild (A) zeigt die Situation bei Gehegeaufzucht und (B) bei Käfigaufzucht. In (B) sind glutamaterge PFC Efferenzen reduziert und DAerge VTA Efferenzen erhöht. Dies führt zu einer verminderten Ansprache der GABAergen Interneurone (gelb) und so zur Enthemmung der Pyramidenzellen (schwarz).

Zusammengefasst bedeutet dies, dass Tiere aus restriktiver Isolationsaufzucht eine mangelhafte Inhibition der Amygdala besitzen. Restriktiv aufgezogene Tiere haben demnach nicht nur eine Störung präfrontaler kognitiver Funktionen (Arbeitsgedächtnis, Vermeidungsstrategiebildung), sondern gleichzeitig auch eine strukturelle und funktionelle Störung limbischer Aspekte, was sich in einer gestörten Angstbewältigung äußert.

5 Fazit

Der Einfluss der Umwelt stellt einen nicht zu unterschätzenden Faktor in der Reifung des Gehirns dar. Die vorliegende Studie zeigt, dass gerade solche Hirnstrukturen besonders sensibel auf Umweltfaktoren reagieren, die entscheidend an der Emotionsverarbeitung beteiligt sind. So wirkt sich eine restriktive Aufzucht, wie frühere Studien unserer Arbeitsgruppe gezeigt haben, nicht nur auf den präfrontalen Kortex, sondern auch auf subkortikale limbische Strukturen aus. Da für die Verarbeitung von Furcht und Angst das Zusammenspiel des präfrontalen Kortex mit den spezifischen Kernen der Amygdala entscheidende Bedeutung hat, sollten diese Strukturen des Gehirns im Rahmen einer funktionellen Bewertung von emotionalen Verhalten stets einer ganzheitlichen Betrachtung unterliegen. Sieht man die Ergebnisse der vorliegenden Studie vor dem Hintergrund der klinischen Relevanz für Angsterkrankungen, so ergeben sich konkrete Forderungen. Die psychotherapeutische- und pharmakologische Behandlung von Angsterkrankungen können als eine Verstärkung der Hemmung auf die Amygdala erklärt werden (Gorman et al., 2000). Wie die vorliegende Studie zeigt, sollten neben einer genetischen Prädisposition die Umwelteinflüsse während der Entwicklung einen erheblichen Beitrag zur Ausbildung einer Vulnerabilität leisten. Hier ist vor allem die extrem langsame Dopaminreifung im Kindesalter als eine kritische Phase zu betrachten, da in dieser Zeit die betreffenden Hirngebiete auf Grund ihrer hoch plastischen Potenzen besonders störanfällig sind.

Da sich die Aufzuchtbedingungen so gravierend auf Gehirn und Verhalten auswirken, müssen die Ergebnisse dieser Studie auch vor dem Hintergrund der Tierhaltung kritisch betrachtet werden. Vor allem die Labor- und Nutztierhaltung findet meist unter restriktiven Bedingungen statt. Das Tierschutzgesetz verbietet eine Haltung, die dem Tier „erhebliches Leiden“ zufügt. Unser Tiermodell läßt die Schlußfolgerung zu, dass restriktiv aufgezogene Tiere unfähig sein sollten, ihre Ängste zu bewältigen. Diese Tiere sollten einem erheblichen Leiden ausgesetzt sein. Es darf nicht mehr davon ausgegangen werden, dass in eine restriktive Umwelt geboren werden Tiere nicht leiden, sondern sie gerade deswegen zeitlebens einem erheblichen Leiden ausgesetzt sein sollten.

6 Literatur

Agren G, Zhou Q, Zhong W. Ecology and social-behavior of mongolian gerbils, *Meriones-Unguiculatus*, at Xilinhote, inner-mongolia, China. *Animal Behaviour*, 1989a; 37: 11-27.

Agren G, Zhou Q, Zhong W. territoriality, cooperation and resource priority - hoarding in the mongolian gerbil, *Meriones-Unguiculatus*. *Animal Behaviour*, 1989b; 37: 28-32.

Akert K. Limbisches System. In Drenckhahn D, Zenker W, editors. Benninghoff Anatomie - Makroskopische Anatomie, Embryologie und Histologie des Menschen (Bd. 2). Urban & Schwarzenberg: München - Wien - Baltimore, 1994; 603-627.

Amaral DG, Witter MP. Hippocampal Formation. In *The rat nervous system*. Academic Press Inc.: 1995; 443-493.

Amorapanth P, LeDoux JE, Nader K. Different lateral amygdala outputs mediate reactions and actions elicited by a fear-arousing stimulus. *Nature Neuroscience*, 2000; 3: 74-79.

Asan E. The catecholaminergic innervation of the rat amygdala. *Advances in Anatomy, Embryology & Cell Biology*, 1998; 142: 1-118.

Avishai-Eliner S, Brunson KL, Sandman CA, Baram TZ. Stressed-out, or in (utero)? *Trends in Neurosciences*, 2002; 25: 518-524.

Azmitia EC, Dolan K, Whitaker-Azmitia PM. S-100B but not NGF, EGF, insulin or calmodulin is a CNS serotonergic growth factor. *Brain Research*, 1990; 516: 354-356.

Bachevalier J. Ontogenetic development of habit and memory formation in primates. [Review]. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1990; 608: 457-477.

Baum S, Bernauer-Münz H, Buchholtz C, Cronjaeger C, Ebel M, Feulner A, Fink AA, Fedders -, tersen D, aisack C, Martin G, Müller H, Persch A, Quandt C, chmitz S, Korff J, Teuche, -Noodt G, Wi, erfeld T, Wolff M, Zi. Workshop der Internationalen

Gesellschaft für Nutztierhaltung (IGN) zum Thema "Leiden" vom 30.01./01.02. 1998 in Marburg. Der Tierschutzbeauftragte, 1998; 2: 3-8.

Benes FM, Vincent SL, Alsterberg G, Bird ED, SanGiovanni JP. Increased GABAA receptor binding in superficial layers of cingulate cortex in schizophrenics. *J.Neurosci.*, 1992; 12: 924-929.

Berger M, Stieglitz RD. *Psychiatrie und Psychotherapie*. Urban & Schwarzenberg, München-Wien-Baltimore, 1999

Bertolucci-D'Angio M, Serrano A, Driscoll P, Scatton B. Involvement of mesocorticolimbic dopaminergic systems in emotional states. [Review] [35 refs]. *Progress in Brain Research*, 1990; 85: 405-416.

Blakemore C, Mitchell DE. Environmental modification of visual cortex and the neural basis of learning and memory. *Nature*, 1973; 241: 467-468

Blanc G, Herve D, Simon H, Lisoprawski A, Glowinski J, Tassin JP. Response to stress of mesocortico-frontal dopaminergic neurones in rats after long-term isolation. *Nature*, 1980; 284: 265-267.

Bortz J. *Statistik für Sozialwissenschaftler*. Springer-Verlag: Berlin - Heidelberg - New York, 1999.

Brinley-Reed M, McDonald AJ. Evidence that dopaminergic axons provide a dense innervation of specific neuronal subpopulations in the rat basolateral amygdala. *Brain Research*, 1999; 850: 127-135.

Buchholtz, C., Lambooi, E., Maisack, C., Martin, G., Van Putten, G., Schmitz, S., and Teuchert-Noodt, G. Ethologische und neurophysiologische Kriterien für Leiden unter besonderer Berücksichtigung des Hausschweins. Workshop der Internationalen Gesellschaft für Nutztierhaltung (IGN) am 27.-29.1.2000 in Bielefeld. Sonderdruck aus "Der Tierschutzbeauftragte 2/01" . 2000.

- Busche, A.; Polascheck, D., Lesting, J., Neddens, J., Teuchet-Noodt, G. Developmentally induced imbalance of dopaminergic fibre densities in limbic brain regions of gerbils (*Meriones unguiculatus*). J. Neural Transm., 2004, 111 (4): 451-463
- Cahill L, McGaugh JL. Mechanisms of emotional arousal and lasting declarative memory. [Review]. Trends in Neurosciences, 1998; 21: 294-299.
- Carter CJ, Pycock CJ. Lesions of the frontal cortex of the rat: changes in neurotransmitter systems in sub-cortical regions [proceedings]. British Journal of Pharmacology, 1978; 64: 430P.
- Cheng LL, Wang SJ, Gean PW. Serotonin depresses excitatory synaptic transmission and depolarization-evoked Ca²⁺ influx in rat basolateral amygdala via 5-HT_{1A} receptors. European Journal of Neuroscience, 1998; 10: 2163-2172.
- Cunningham MG, Bhattacharyya S, Benes FM. Amygdalo-cortical sprouting continues into early adulthood: implications for the development of normal and abnormal function during adolescence. Journal of Comparative Neurology, 2002; 453: 116-130.
- Davis M. The role of the amygdala in conditioned fear. In Aggleton JP, editor. The Amygdala: Neurobiological Aspects of Emotion, Memory, and Mental Dysfunction. Wiley-Liss: New York, 1992; 255-306.
- Davis M. Neurobiology of fear responses: The role of the amygdala. Neuropsychiat.Clin.Neurosci., 1997; 9: 382-402.
- Dawirs RR, Teuchert-Noodt G, Busse M. Single doses of methamphetamine cause changes in the density of dendritic spines in the prefrontal cortex of gerbils (*Meriones unguiculatus*). Neuropharmacology, 1991; 30: 275-282.
- Dawirs RR, Teuchert-Noodt G, Czaniara R. Maturation of the dopamine innervation during postnatal development of the prefrontal cortex in gerbils (*Meriones unguiculatus*). A quantitative immunocytochemical study. Journal für Hirnforschung, 1993; 34: 281-290.

Dawirs RR, Teuchert-Noodt G, Czaniera R. The postnatal maturation of dopamine innervation in the prefrontal cortex of gerbils (*Meriones unguiculatus*) is sensitive to an early single dose of methamphetamine. A quantitative immunocytochemical study. *Journal für Hirnforschung*, 1994; 35: 195-204.

Divac I, Mogensen J, Petrovic-Minic B, Zilles K, Regidor J. Cortical projections of the thalamic mediodorsal nucleus in the rat. Definition of the prefrontal cortex. *Acta Neurobiologiae Experimentalis*, 1993; 53: 425-429.

Eliava M, Yilmazer-Hanke D, Asan E. Interrelations between monoaminergic afferents and corticotropin-releasing factor-immunoreactive neurons in the rat central amygdaloid nucleus: ultrastructural evidence for dopaminergic control of amygdaloid stress systems. *Histochemistry & Cell Biology*, 2003; 120 (3): 183-197

Fallon JH, Ciofi P. Distribution of monoamines within the amygdala. In Aggleton JP, editor. *The amygdala: Neurobiological aspects of emotion, memory, and mental dysfunction*. Wiley-Liss, Inc.: New York, 1992; 97-114.

Fallon JH, Koziell DA, Moore RY. Catecholamine innervation of the basal forebrain. II. Amygdala, suprarhinal cortex and entorhinal cortex. *Journal of Comparative Neurology*, 1978; 180: 509-532.

Frankfurt M, Azmitia E. Regeneration of serotonergic fibers in the rat hypothalamus following unilateral 5,7-dihydroxytryptamine injection. *Brain Research*, 1984; 298: 273-282.

Gamallo A, Villanua A, Trancho G, Fraile A. Stress adaptation and adrenal activity in isolated and crowded rats. *Physiology & Behavior*, 1986; 36: 217-221.

Gorman JM, Kent JM, Sullivan GM, Coplan JD. Neuroanatomical hypothesis of panic disorder, revised. *American Journal of Psychiatry*, 2000; 157: 493-505.

Gray TS. Limbic pathways and neurotransmitters as mediators of autonomic and neuroendocrine responses to stress: the amygdala. In *Stress: Neurobiology and*

Neuroendocrinology, Brown MR, Koob GF, River C. Eds., Marcel Dekker, Inc., New York 1991

Gray TS, Bingaman EW. The amygdala: corticotropin-releasing factor, steroids, and stress. [Review]. *Critical Reviews in Neurobiology*, 1996; 10: 155-168.

Groenewegen HJ, Uylings HB. The prefrontal cortex and the integration of sensory, limbic and autonomic information. [Review]. *Progress in Brain Research*, 2000; 126: 3-28.

Hall FS. Social deprivation of neonatal, adolescent, and adult rats has distinct neurochemical and behavioral consequences. *Critical Reviews in Neurobiology*, 1998; 12: 129-162.

Halliday MS. Exploratory behaviour in elevated mazes. *Jl exp.Psychol.*, 1967; 19: 254-263.

Heidbreder CA, Weiss IC, Domeney AM, Pryce C, Homberg J, Hedou G, Feldon J, Moran MC, Nelson P. Behavioral, neurochemical and endocrinological characterization of the early social isolation syndrome. *Neuroscience*, 2000; 100: 749-768.

Huttenlocher PR. Synaptic density in human frontal cortex-developmental changes and effects of aging. *Brain Research*, 1979; 163: 195-205

Inglis FM, Moghaddam B. Dopaminergic innervation of the amygdala is highly responsive to stress. *Journal of Neurochemistry*, 1999; 72: 1088-1094.

Jacobs BL, Azmitia EC. Structure and function of the brain serotonin system. [Review]. *Physiological Reviews*, 1992; 72: 165-229.

Jacobson M. *Developmental neurobiology*. Plenum Press: New York, London, 1991.

Jonsson G, Hallman H. Response of central monoamine neurons following an early neurotoxic lesion. [Review]. *Bibliotheca Anatomica*, 1982; 76-92.

Kalivas PW. Neurotransmitter regulation of dopamine neurons in the ventral tegmental area. [Review]. *Brain Research - Brain Research Reviews*, 1993; 18: 75-113.

Kalsbeek A, Voorn P, Buijs RM, Pool CW, Uylings HB. Development of the dopaminergic innervation in the prefrontal cortex of the rat. *Journal of Comparative Neurology*, 1988; 269: 58-72.

Kandel ER, Schwartz JH, Jessell TM. *Neurowissenschaften*. Spektrum Akademischer Verlag: Heidelberg - Berlin - Oxford, 1996.

Kawahara H, Yoshida M, Yokoo H, Nishi M, Tanaka M. Psychological stress increases serotonin release in the rat amygdala and prefrontal cortex assessed by in-vivo microdialysis. *Neuroscience Letters*, 1993; 162: 81-84.

Kempf E, Puglisi-Allegra S, Cabib S, Schleef C, Mandel P. Serotonin levels and turnover in different brain areas of isolated aggressive or non-aggressive strains of mice. *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry*, 1984; 8: 365-371.

Kilts CD, Anderson CM, Ely TD, Mailman RB. The biochemistry and pharmacology of mesoamygdaloid dopamine neurons. [Review]. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1988; 537: 173-187.

Klüver H, Bucy PC. Preliminary analysis of functions of the temporal lobes in monkeys. *Arch Neurol Psychiatry*, 1939; 42: 979-997.

Kolb B, Whishaw I. *Fundamentals of human neuropsychology.*, 3 ed. New York, 1990.

Koegler-Muly SM, Owens MJ, Ervin GN, Kilts CD, Nemeroff CB. Potential corticotropin-releasing factor pathways in the rat brain as determined by bilateral electrolytic lesions of the central amygdaloid nucleus and the paraventricular nucleus of the hypothalamus. *J. Neuroendocrinol.*, 1993; 5: 95

Kosofsky BE, Molliver ME. The serotonergic innervation of cerebral cortex: different classes of axon terminals arise from dorsal and median raphe nuclei. *Synapse*, 1987; 1: 153-168.

Lapiz MD, Fulford A, Muchimapura S, Mason R, Parker T, Marsden CA. Influence of postweaning social isolation in the rat on brain development, conditioned behavior, and neurotransmission. *Neuroscience & Behavioral Physiology*, 2003; 33: 13-29.

LeDoux J. Emotional networks and motor control: A fearful view. *Emotional Motor System*, 1996; 107: 437-446.

LeDoux JE. Emotion: clues from the brain. *Rev.Psychol.*, 1995; 46: 209-235.

LeDoux JE, Cicchetti P, Xagoraris A, Romanski LM. The lateral amygdaloid nucleus: sensory interface of the amygdala in fear conditioning. *J.Neurosci.*, 1990; 10: 1062-1069.

LeDoux JE, Farb CF, Ruggiero DA. Topographic organization of neurons in the acoustic thalamus that project to the amygdala. *J.Neurosci.*, 1990; 10: 1043-1054.

Lehmann K, Lesting J, Polascheck D, Teuchert-Noodt G. Serotonin fibre densities in subcortical areas: differential effects of isolated rearing and methamphetamine. *Developmental Brain Research*, 2003; 147: 143– 152

Lehmann K. Zur Entstehung psychomotorischer Störungen aus der Wechselwirkung von präfrontalen Afferenzen, Dopamin und Serotonin im Caudatus-Putamen. Dissertation, Bielefeld 2001.

Lidov HG, Grzanna R, Molliver ME. The serotonin innervation of the cerebral cortex in the rat--an immunohistochemical analysis. *Neuroscience*, 1980; 5: 207-227.

Lidov HG, Molliver ME. An immunohistochemical study of serotonin neuron development in the rat: ascending pathways and terminal fields. *Brain Research Bulletin*, 1982; 8: 389-430.

Lister RG. The use of a plus-maze to measure anxiety in the mouse. *Psychopharmacology*, 1987; 92: 180-185.

Lister RG. Ethologically-based animal models of anxiety disorders. *Pharmac.Ther.*, 1990; 46: 321-340.

Ma QP, Yin GF, Ai MK, Han JS. Serotonergic projections from the nucleus raphe dorsalis to the amygdala in the rat. *Neuroscience Letters*, 1991; 134: 21-24.

Mattson MP. Neurotransmitters in the regulation of neuronal cytoarchitecture. [Review]. *Brain Research*, 1988; 472: 179-212.

McDonald AJ, Mascagni F, Guo L. Projections of the medial and lateral prefrontal cortices to the amygdala: a Phaseolus vulgaris leucoagglutinin study in the rat. *Neuroscience*, 1996; 71: 55-75.

Morgan MA, Romanski LM, LeDoux JE. Extinction of emotional learning - contribution of medial prefrontal cortex. *Neuroscience Letters*, 1993; 163: 109-113.

Neddens J, Lesting J, Dawirs RR, Teuchert-Noodt G. An early methamphetamine challenge suppresses the maturation of dopamine fibres in the nucleus accumbens of gerbils: on the significance of rearing conditions. *Journal of Neural Transmission*, 2002; 109: 141-155

Neddens J, Brandenburg K, Teuchert-Noodt G, Dawirs RR. Differential environment alters ontogeny of dopamine innervation of the orbital prefrontal cortex in gerbils. *Journal of Neuroscience Research*, 2001; 63: 209-213.

Nossoll M, Teuchert-Noodt G, Dawirs RR. A single dose of methamphetamine in neonatal gerbils affects adult prefrontal gamma-aminobutyric acid innervation. *European Journal of Pharmacology*, 1997; 340: R3-R5.

Owens MJ, Nemeroff CB. The role of corticotropin-releasing factor in the pathophysiology of affective and anxiety disorders: laboratory and clinical studies. [Review] *Ciba Foundation Symposium*, 1993; 172: 296-308

Paylor R. The use of behavioral test batteries: Effects of training history. *Physiology & Behavior*, 2001; 73: 705-717.

Paxinos G, Watson C: *The rat brain in stereotaxic coordinates*. 1986, Academic Press, New York.

Pellow S, Chopin P, File S, Briley M. Validation of open : closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. *Journal of Neuroscience Methods*, 2004; 14: 149-167.

Pesold C, Treit D. The central and basolateral amygdala differentially mediate the anxiolytic effect of benzodiazepines. *Brain Research*, 1995; 671: 213-221.

Petzsch H. *Urania-Tierreich, Säugetiere*. 1. Auflage. Urania-Verlag: Leipzig-Jena-Berlin, 1992.

Phillips GD, Harmer CJ, Hitchcott PK. Isolation rearing-induced facilitation of Pavlovian learning: abolition by postsession intra-amygdala nafadotride. *Physiology & Behavior*, 2002; 76: 677-684.

Phillips RG, LeDoux JE. Differential contribution of amygdala and hippocampus to cued and contextual fear conditioning. *Behavioral Neuroscience*, 1992; 106: 274-285.

Pich EM, Koob GF, Sattler SC, Menzaghi F, Heilig M, Heinrichs SC, Vale W, Weiss F. Stress-induced release of corticotropin releasing factor in the amygdala measure by in vivo microdialysis. *Soc. Neurosci. Abstr.*, 1992; 18: 535

Pietrewicz At, Hoff Mp, Higgins Sa. Activity rhythms in the mongolian gerbil under natural light conditions. *Physiology & Behavior*, 1982; 29: 377-380.

Pikkarainen M, Ronkko S, Savander V, Insausti R, Pitkanen A. Projections from the lateral, basal, and accessory basal nuclei of the amygdala to the hippocampal formation in rat. *Journal of Comparative Neurology*, 1999; 403: 229-260.

Pitkanen A. Connectivity of the rat amygdaloid complex. In Aggleton JP, editor. *The amygdala second edition a functional analysis*. Oxford University Press Inc.: New York, 2000; 31-115.

Pitkanen A, Pikkarainen M, Nurminen N, Ylinen A. Reciprocal connections between the amygdala and the hippocampal formation, perirhinal cortex, and postrhinal cortex in rat - A review. *Parahippocampal Region*, 2000; 911: 369-391.

Pitkanen A, Savander V, LeDoux JE. Organization of intra-amygdaloid circuitries in the rat: an emerging framework for understanding functions of the amygdala. *Trends in Neurosciences*, 1997; 20: 517-523.

Pralong E, Magistretti P, Stoop R. Cellular perspectives on the glutamate-monoamine interactions in limbic lobe structures and their relevance for some psychiatric disorders. [Review]. *Progress in Neurobiology*, 2002; 67: 173-202.

Prior H, Sachser N. Effects of enriched housing environment on behaviour of young male and female mice in four exploratory tasks. *Journal of Experimental Animal Science*, 1994; 37: 57-68.

Rainnie DG. Serotonergic modulation of neurotransmission in the rat basolateral amygdala. *Journal of Neurophysiology*, 1999; 82: 69-85.

Rassnick S, Heinrichs SC, Britton KT, Koob GF. Microinjection of a corticotropin-releasing factor antagonist into the central nucleus of the amygdala reverses anxiogenic-like effects of ethanol withdrawal. *Brain Research*, 1993; 605: 25-32

Ray JP, Price JL. The organization of the thalamocortical connections of the mediodorsal thalamic nucleus in the rat, related to the ventral forebrain-prefrontal cortex topography. *Journal of Comparative Neurology*, 1992; 323: 167-197.

Remane A, Storch V, Welsch M, . *Systematische Zoologie*. 2. Auflage. Gustav Fischer Verlag: Stuttgart-New York, 1980.

Robbins TW, Jones GH, Wilkinson LS. Behavioural and neurochemical effects of early social deprivation in the rat. *Journal of Psychopharmacology*, 1996; 10: 39-47.

Robinson TE, Becker JB. Enduring changes in brain and behavior produced by chronic amphetamine administration: A review and evaluation of animal models of amphetamine psychosis. *Brain Res.Rev.*, 1986; 11: 157-198.

Romanski LM, Clugnet MC, Bordi F, LeDoux JE. Somatosensory and auditory convergence in the lateral nucleus of the amygdala. *Behavioral Neuroscience*, 2004; 107: 444-450.

Romanski LM, LeDoux JE. Equipotentiality of thalamo-amygdala and thalamo-cortico-amygdala projections as auditory conditioned stimulus pathways. *J.Neurosci.*, 1992; 12: 4501-4509.

Rosenkranz JA, Grace AA. Modulation of basolateral amygdala neuronal firing and afferent drive by dopamine receptor activation in vivo. *J.Neurosci.*, 1999; 19: 11027-11039.

Rosenkranz JA, Grace AA. Dopamine attenuates prefrontal cortical suppression of sensory inputs to the basolateral amygdala of rats. *J.Neurosci.*, 2001; 21: 4090-4103.

Rosenkranz JA, Grace AA. Cellular Mechanisms of Infralimbic and Prelimbic Prefrontal Cortical Inhibition and Dopaminergic Modulation of Basolateral Amygdala Neurons In Vivo. *J.Neurosci.*, 2002; 22: 324-337.

Rosenzweig MR, Bennett EL. Effects of differential environments on brain weights and enzyme activities in gerbils, rats and mice. *Dev. Psychobiol.*, 1969; 2 (2): 82-95.

Rosenzweig MR, Bennett EL. Psychobiology of plasticity: effects of training and experience on brain and behavior. [Review]. *Behavioural Brain Research*, 1996; 78: 57-65.

Sadikot AF, Parent A. The monoaminergic innervation of the amygdala in the squirrel-monkey - an immunohistochemical study. *Neuroscience*, 1990; 36: 431-447.

Schmitt U, Hiemke C. Combination of open field and elevated plus-maze: a suitable test battery to assess strain as well as treatment differences in rat behavior. *Prog.Neuro-Psychopharmacol.& Biol.Psychiat.*, 1998; 22: 1197-1215.

Seiden LS, Sabol KE. Methamphetamine and methylenedioxyamphetamine neurotoxicity: possible mechanisms of cell destruction. [Review]. *NIDA Research Monograph*, 1996; 163: 251-276.

Sesack SR, Pickel VM. Prefrontal cortical efferents in the rat synapse on unlabeled neuronal targets of catecholamine terminals in the nucleus accumbens septi and on dopamine neurons in the ventral tegmental area. *Journal of Comparative Neurology*, 1992; 320: 145-160.

Sinz R. Neurobiologie und Gedächtnis; Neuronennetzwerke und Informationsspeicherung im menschlichen Gehirn. Gustav Fischer Verlag: Stuttgart - New York, 1979.

Sorvari H, Miettinen R, Soininen H, Pitkanen A. Parvalbumin-immunoreactive neurons make inhibitory synapses on pyramidal cells in the human amygdala: A light and electron microscopic study. *Neuroscience Letters*, 1996; 217: 93-96.

Sotelo C. Immunohistochemical study of short- and long-term effects of DL-fluoxetine on the serotonergic innervation of the rat hippocampal formation. *Brain Research*, 1991; 541: 309-326.

Stutzmann GE, LeDoux JE. GABAergic antagonists block the inhibitory effects of serotonin in the lateral amygdala: a mechanism for modulation of sensory inputs related to fear conditioning. *J.Neurosci.*, 1999; 19: RC8.

Stutzmann GE, McEwen BS, LeDoux JE. Serotonin modulation of sensory inputs to the lateral amygdala: Dependency on corticosterone. *J.Neurosci.*, 1998; 18: 9529-9538.

Swanson LW, Petrovich GD. What is the amygdala? *Trends in Neurosciences*, 1998; 21: 323-331.

Teuchert-Noodt G, Lehmann K. Neurobiologie zum Leiden bei Tieren / On the neurobiology of suffering in animals. In: Martin, G. & Steiger, A. "Welfare of laying hens in Europe - reports, analysis & conclusions." / "Legehennenhaltung in Europa - Berichte, Analysen und Schlussfolgerungen." Kassel: Verlag Universität/Gesamthochschule, 2004 (in press)

Thoa NB, Tizabi Y, Jacobowitz DM. The effect of isolation on catecholamine concentration and turnover in discrete areas of the rat brain. *Brain Research*, 1977; 131: 259-269.

Trepel M. *Neuroanatomie; Struktur und Funktion*. Urban & Fischer: München - Stuttgart - Jena - Lübeck - Ulm, 1999.

Tucker DM, Luu P, Pribram KH. Social and emotional self-regulation. [Review]. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1995; 769: 213-239.

Vallee M, Mayo W, Dellu F, Le Moal M, Simon H, Maccari S. Prenatal Stress Induces High Anxiety and Postnatal Handling Induces Low Anxiety in Adult Offspring: Correlation with Stress-Induced Corticosterone Secretion. *J.Neurosci.*, 1997; 17: 2626-2636.

Vanderschuren LJ, Schmidt ED, De Vries TJ, Van Moorsel CA, Tilders FJ, Schoffelmeer.A.N. A single exposure to amphetamine is sufficient to induce long-term behavioral, neuroendocrine, and neurochemical sensitization in rats. *J.Neurosci.*, 1999; 19: 9579-9588.

Verney C, Baulac M, Berger B, Alvarez C, Vigny A, Helle KB. Morphological evidence for a dopaminergic terminal field in the hippocampal formation of young and adult rat. *Neuroscience*, 1985; 14: 1039-1052.

Walker DL, Davis M. The role of amygdala glutamate receptors in fear learning, fear-potentiated startle, and extinction. [Review]. *Pharmacology, Biochemistry & Behavior*, 2002; 71: 379-392.

Weisenkranz L. Behavioral changes associated with ablation of the amygdaloid complex in monkeys. *JCPP*, 1956; 49: 381-391.

Welker WL. Free versus forced exploration of a novel situation by rats. *Psychol.Rep.*, 1957; 3: 95-108.

Whitaker-Azmitia PM, Murphy R, Azmitia EC. Stimulation of astroglial 5-HT_{1A} receptors releases the serotonergic growth factor, protein S-100, and alters astroglial morphology. *Brain Research*, 1990; 528: 155-158.

Wiedenmayer C. Causation of the ontogenetic development of stereotypic digging in gerbils. *Animal Behaviour*, 1997; 53: 461-470.

Wiesel TN. Postnatal development of the visual cortex and the influence of environment. [Review]. *Nature*, 1982; 299: 583-591

Winterfeld, K. T. Zum Einfluß von Haltungsbedingungen auf die strukturelle und funktionale Reifung des präfrontalen Cortex bei der Wüstenrennmaus (*Meriones unguiculatus*). 1998. Bielefeld, Dissertation

Winterfeld KT, Teuchert-Noodt G, Dawirs RR. Social environment alters both ontogeny of dopamine innervation of the medial prefrontal cortex and maturation of working memory in gerbils (*Meriones unguiculatus*). *Journal of Neuroscience Research*, 1998; 52: 201-209.

Wolterink G, Daenen Lewp, Dubbeldam S, Gerrits MAFM, van Rijn R, Kruse CG, Van Der Heijden JAM, Van Ree JM. Early amygdala damage in the rat as a model for neurodevelopmental psychopathological disorders. *European Neuropsychopharmacology*, 2001; 11: 51-59.

Wright IK, Ismail H, Upton N, Marsden CA. Effect of isolation-rearing on performance in the elevated plus-maze and open field behaviour. *British Journal of Pharmacology*, 1990; 100: 357.

Wright IK, Upton N, Marsden CA. Resocialisation of isolation-reared rats does not alter their anxiogenic profile on the elevated x-maze model of anxiety. *Physiology & Behavior*, 1991; 50: 1129-1132.

Yilmazer-Hanke DM, Faber-Zuschratter H, Linke R, Schwegler H. Contribution of amygdala neurons containing peptides and calcium-binding proteins to fear-potentiated

startle and exploration-related anxiety in inbred Roman high- and low-avoidance rats. *European Journal of Neuroscience*, 2002; 15: 1206-1218.

Zahrt J, Taylor JR, Mathew RG, Arnsten AF. Supranormal stimulation of D1 dopamine receptors in the rodent prefrontal cortex impairs spatial working memory performance. *J.Neurosci.*, 1997; 17: 8528-8535.

Zhou FC, Azmitia EC. Induced homotypic sprouting of serotonergic fibers in hippocampus. II. An immunocytochemistry study. *Brain Research*, 1986; 373: 337-348.

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig angefertigt habe und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet wurden. Ferner erkläre ich, dass es sich um meinen ersten Promotionsversuch handelt.

Bielefeld, im Juli 2004

Dierk Polascheck