

**Opiatmodulation der Monoamine im Vorderhirn des Haushuhnkükens  
(*Gallus gallus domesticus*): Eine mögliche Rolle in der emotionalen  
Regulation?**

D i s s e r t a t i o n

zur Erlangung des akademischen Grades

doctor rerum naturalium

(Dr. rer. nat.)

genehmigt durch

die Fakultät für Naturwissenschaften

der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg

von Diplom-Biochemikerin Kathrin Baldauf (geb. Pohl)

geb. am 25.07.1971 in Torgau

Gutachter: Prof. Dr. Anna Katharina Braun

Prof. Dr. Volker Höllt

Prof. Dr. Hans-Joachim Bischof

Eingereicht am: 24.11.2004

Verteidigung am: 10.10.2005

An dieser Stelle möchte ich Frau Prof. Dr. Katharina Braun dafür danken, dass sie mir das Thema dieser Arbeit zur weitgehend selbständiger Bearbeitung überlassen hat sowie für ihre Diskussionsbereitschaft.

Danken möchte ich auch allen Kollegen aus dem „6. Stock“ für ihre Hilfs- und Diskussionsbereitschaft. Mein besonderer Dank gilt Frau Petra Kremz, die mich bei der Anfertigung der histologischen Arbeiten sehr unterstützt hat.

Für die sehr hilfreichen Anmerkungen beim Korrekturlesen dieser Arbeit bedanke ich mich bei Herrn Dr. Michael Gruß und bei Frau Prof. Dr. Katharina Braun.

## Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b> .....	6
1.1	Das Opiatsystem.....	7
1.1.1	Opiatrezeptoren.....	9
1.1.2	Wirkungsweise der Opiate.....	12
1.1.3	Das Opiatsystem des Haushuhnkükens.....	14
1.1.4	Untersuchungen zu sozial-/emotionalem Verhalten, Lernen und Gedächtnis.....	17
1.2	Die Filialprägung.....	19
1.2.1	Akustische Filialprägung beim Haushuhnkükens und das prägerelevante Vorderhirngebiet MNH .....	21
1.2.1.1	Verschaltungsmuster des MNH.....	23
1.3	Die Mikrodialyse.....	27
1.3.1	Funktionsprinzip der Mikrodialyse.....	27
1.3.2	Merkmale der Mikrodialyse.....	29
1.4	Fragestellung.....	30
<b>2</b>	<b>Materialien und Methoden</b> .....	32
2.1	Pharmakologische Untersuchungen.....	32
2.1.1	Tierhaltung.....	32
2.1.2	Implantation der Mikrodialysesonde.....	32
2.1.3	Versuchsdurchführung.....	34
2.1.4	Experimentelle Ansätze.....	35
2.1.4.1	Experiment 1.....	35
2.1.4.2	Experiment 2.....	35
2.1.4.3	Experiment 3.....	36
2.1.4.4	Experiment 4.....	36
2.1.4.5	Experiment 5.....	36
2.1.4.6	Experiment 6.....	36
2.1.5	Chromatographische Analytik.....	37
2.1.5.1	Monoamin-Analytik.....	37
2.1.5.2	Aminosäure-Analytik.....	38
2.1.6	Histologie.....	40

2.1.7	Statistische Auswertung.....	40
2.2	Prägung.....	41
2.2.1	Tierhaltung.....	41
2.2.2	Akustische Filialprägung.....	41
2.2.2.1	Prägereiz und Diskriminierungsreiz.....	41
2.2.2.2	Versuchsaufbau.....	42
2.2.2.3	Prägung.....	43
2.2.2.4	Annäherungstest.....	43
2.2.2.5	Diskriminationstest.....	44
2.2.2.6	Auswertung.....	44
2.2.3	Injektion des $\mu$ -Opiatrezeptor Antagonisten.....	45
2.2.4	Statistische Auswertung.....	45
2.3	Vokalisation.....	46
2.3.1	Statistische Auswertung.....	47
<b>3</b>	<b>Ergebnisse.....</b>	<b>48</b>
3.1.	Pharmakologische Untersuchungen.....	48
3.1.1	Basislinienkonzentrationen.....	50
3.1.2	Injektion des Opiatantagonisten Naloxon.....	51
3.1.2.1	Naloxon und TTX.....	52
3.1.2.2	Injektion von Naloxon in verschiedenen Altersstadien.....	56
3.1.3	Injektion und Infusion des Opiatagonisten DAGO.....	60
3.1.3.1	Injektion (i.p.) des Agonisten DAGO.....	60
3.1.3.2	Infusion des Agonisten DAGO in das MNH.....	60
3.1.3.3	DAGO und TTX.....	63
3.1.4	Infusion von DAGO und Naloxon.....	65
3.1.4.1	Gleichzeitige Injektion von DAGO und Naloxon i.p.....	65
3.1.4.2	Infusion von DAGO in das MNH und Injektion von Naloxon i.p.....	68
3.1.5	Zusammenfassung der pharmakologischen Ergebnisse.....	70
3.2	Prägung.....	72
3.2.1	Injektion in das MNH.....	72
3.2.2	Intraperitoneale Injektion.....	72
3.2.3	Gewicht der Tiere in den Versuchsgruppen.....	73
3.3	Vokalisation.....	77

<b>4</b>	<b>Diskussion</b> .....	79
4.1	Pharmakologie.....	79
4.1.1.	Opiatmodulation der kognitiven, anregenden und emotionalen Funktionen.....	81
4.1.2	Opiatmodulation des serotonergen Systems.....	81
4.1.2.1	Injektion von Naloxon in verschiedenen Altersstadien.....	85
4.1.3	Opiatmodulation des dopaminergen Systems.....	85
4.1.4	Opiatmodulation des glutamatergen Systems.....	89
4.1.5	Opiatmodulation des Taurins.....	91
4.1.6	Inhibitorische und exzitatorische Wirkung der $\mu$ -Opiatrezeptor Bindung.....	92
4.2	Prägung.....	93
4.2.1	Opiate, Prägung und soziale Motivation.....	93
4.2.2	Gewicht.....	95
4.3	Vokalisation.....	97
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung</b> .....	101
<b>6</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis</b> .....	102
<b>7</b>	<b>Literaturverzeichnis</b> .....	105

## 1 EINLEITUNG

Die Entwicklung der Erforschung des Opiatsystems ist in den drei Jahrzehnten des letzten Jahrhunderts rasant vorangeschritten. Die Anzahl der Veröffentlichungen hat sich in dieser Zeit mehr als vervierfacht (PubMed) und ganze Bücher wurden diesem Gebiet gewidmet (z.B. „Opioids“, Herz, 1993).

Einen grossen Raum nimmt dabei die Untersuchung des Opiatsystems bei verschiedenen Lernvorgängen ein. Es wurden die unterschiedlichsten Tiermodelle untersucht, wobei ein großer Anteil der Erforschung von Schmerzreizen, Stress und Lernen und Gedächtnis an Haushuhnküken galt. Es wurde unter anderem eine modulatorische Rolle der Opiate über die  $\mu$ -,  $\delta$ -, und  $\kappa$ - Rezeptoren bei Lernvorgängen an Küken nachgewiesen (Csillag et al., 1993). Einen großen Einfluss haben die Opiatagonisten und -antagonisten auf die Stressvokalisation verschiedener Spezies, u.a. des Huhns, die als Kriterium für den internen emotionalen Status gilt (Panksepp et al., 1988; 1980a; 1978a). Die anatomische Verteilung der Opiatrezeptoren im Gehirn des Haushuhnkükens ist ebenfalls bekannt, wobei eine hohe Dichte an  $\mu$ - und  $\kappa$ - Rezeptoren im prägungsrelevanten Vorderhirngebiet medio-rostrales Neostriatum und Hyperstriatum ventrale (MNH, gemäß einer neuen Terminologie für das Vogelgehirn nun als medio-rostrales Nidopallium/Mesopallium bezeichnet, siehe Reiner et al., 2004) nachgewiesen wurde (Csillag et al., 1990).

Der funktionelle Aspekt, der sich aus der speziellen Verteilung der Rezeptoren ergibt, sollte in dieser Arbeit untersucht werden. Erste Versuche zeigten, dass bei der Prägung von Haushuhnküken die Prägungsrate nachließ, wenn sie mit dem Antagonisten Naltrexon behandelt wurden (Wolf, 1992).

Es sollte geklärt werden, ob der  $\mu$ -Opiatrezeptor Antagonist Naloxon die frühkindliche Prägung auf einen auditorischen Stimulus und die Stressvokalisation als Zeichen des internen emotionalen Status beeinflusst. Da die monoaminergen Systeme als „Stimmungsmodulatoren“ wirken, sollte in dieser Arbeit der neurochemische Einfluss eines  $\mu$ -Opiatrezeptor-Antagonisten und eines -agonisten auf das serotonerge, dopaminerge und glutamaterge System des 1-tägigen Haushuhnkükens mit Hilfe der Mikrodialyse untersucht werden.

Zuerst soll ein kurzer Überblick über das Opiatsystem im Allgemeinen und speziell im Huhn gegeben werden.

## 1.1 Das Opiatsystem

Die Auszüge des Schlafmohns (*Papaver somniferum*) werden schon seit Jahrhunderten genutzt, um Schmerzen zu lindern. Sertürner isolierte 1803 das Hauptalkaloid Morphin, das sich später als allein verantwortlich für die schmerzlindernde Wirkung des Rohopiums erwies (Corbett et al., 1999).

Der Begriff Opiat umfasst heute im engeren Sinne Morphin und andere Alkaloide des Opiums. Natürlich vorkommende Opiate sind zum Beispiel Morphin, Codein, Papaverin und Thebain. Opioide sind halb- und vollsynthetische Pharmaka bzw. körpereigene Substanzen mit morphinartiger Wirkung. Beide Begriffe werden fälschlicherweise oft synonym gebraucht.

Jede körpereigene Substanz mit opiatähnlicher Wirkung wird als Endorphin oder endogenes Opiat bezeichnet. Zu dieser Gruppe gehören Enkephaline, Dynorphin, Dermorphin, Deltorphin, Neoendorphin sowie die Endomorphine 1 und 2. Enkephaline im engeren Sinne sind nur die von Hughes und Kosterlitz isolierten Pentapeptide Leu- und Met-Enkephalin (Hughes et al., 1975).

Neben den Endorphinen gibt es Exorphine (Simon, 1991), oder auch atypische natürliche Opiate. Die Unterscheidung wird aufgrund des folgenden Unterschieds getroffen: körpereigene Opiate leiten sich von Vorläuferpeptiden ab und haben alle dieselbe N-terminale Aminosäuresequenz, Tyr-Gly-Gly-Phe; wogegen Exorphine von verschiedenen Proteinen abstammen und nur ein Tyr-Rest für die N-terminale Aminosäuresequenz obligatorisch ist (Herz et al., 1993). Beispiele für diese Exorphine sind die Casomorphine in der Milch von Rindern und Schafen.  $\beta$ -Casomorphin kommt ebenfalls in der menschlichen Muttermilch vor, wobei noch nicht geklärt ist, ob die Substanz das Hirn des Säuglings im intakten Zustand erreicht. Wird allerdings  $\beta$ -Casomorphin in das Hirn von jungen Ratten injiziert, wird, ähnlich wie bei anderen Opiaten, die Schmerzempfindlichkeit gesenkt (Eliot, 2001). Weitere Exorphine sind Opiopeptide im Weizengluten sowie Dermorphine ( $\mu$ -Rezeptor-selektiv; Amiche et al., 1988) und Deltorphine ( $\delta$ -Rezeptor-selektiv; Erspamer et al., 1989), beide aus Amphibien (*Phyllomedusa sauvagei* und *Phyllomedusa bicolor*).

In den Säugetieren sind drei Vorläuferpeptide für die endogenen Opiate bekannt. Pro-opiomelanocortin (POMC), Proenkephalin und Prodynorphin. Für Endomorphin 1 und 2 wird ein Vorläuferpeptid angenommen, das aber noch nicht identifiziert ist. Dieses angenommene Peptid wurde Proendomorphin genannt (Zadina et al., 1997).

In Tabelle 1 sind die Vorläuferpeptide der endogenen Opiate, die daraus resultierenden Verbindungen und die Rezeptoren, an die die Peptide hauptsächlich binden, aufgeführt.

Tab. 1: Vorläuferpeptide der endogenen Opiate, die daraus resultierenden Verbindungen und die Rezeptoren, an die die Peptide hauptsächlich binden

<b>Vorläuferpeptid</b>	<b>Endogene Opiate</b>	<b>Rezeptoren</b>
Proopiomelanocortin (POMC)	$\alpha$ -, $\beta$ -, $\gamma$ -Endorphin	$\mu$ -, $\delta$ -Rezeptor
Proenkephalin	Met-Enkephalin, Leu-Enkephalin, Heptapeptid, Octapeptid, Metorphamid	$\delta$ -, $\mu$ -Rezeptor
Prodynorphin	$\alpha$ -, $\beta$ -Neoendorphin Dynorphin A (1-17) und B (Rimorphin) Dynorphin 1-8	$\kappa$ -Rezeptor ( $\mu$ -, $\delta$ -Rezeptor)
Proendormorphin*	Endomorphin 1 und 2	$\mu$ -Rezeptor

\* vermutlicher, unidentifizierter Vorläufer (Zadina et al., 1997)

Die Wirkorte der endogenen Opiate liegen vor allem im Rückenmark und in allen Bereichen des zentralen Nervensystems (ZNS; Strand, 1999), sie wurden aber auch in verschiedenen anderen Organsystemen gefunden, z.B. Met-Enkephalin im Magen-Darm-Trakt und Leu-Enkephalin im Nebennierenmark (Skov Olsen et al., 1981; Polak et al., 1977). Das Peptid Endomorphin 1 ist z.B. im Gehirn weiter verbreitet als Endomorphin 2, das in höherer Dichte in primär sensorischen Neuronen und dem Hinterhorn des Rückenmarks gefunden wurde (Martin-Schild et al., 1999; 1997).

Ein bekanntes endogenes Cannabinoid ist Anandamid (Arachidonyl-Ethanol-Amid), das seine Wirkung am Tetrahydrocannabinol-Rezeptor (THC-Rezeptor) ausübt und nicht von einem der Vorläuferpeptide abstammt. Es ist vor allem in den Basalganglien, im Kleinhirn und in der Hirnrinde lokalisiert (Nahas et al., 1999).



### 1.1.1 Opiatrezeptoren

Opiatrezeptoren sind phylogenetisch sehr alt und schon in Invertebraten nachzuweisen (Stefano et al., 1980). Sie wurden in  $\delta$ -,  $\kappa$ - und  $\mu$ -Rezeptoren eingeteilt. Ein weiterer Rezeptor, der eine hohe Homologie zu anderen Opiatrezeptoren aufweist, ist der ORL-Rezeptor. Nach neuerer Nomenklatur werden die Rezeptoren auch als  $OP_1$ ,  $OP_2$ ,  $OP_3$  und  $OP_4$  bezeichnet (Dhawan et al., 1996). Die Opiatrezeptoren gehören zur G-Protein-bindenden Rezeptorfamilie, die 7 transmembranale  $\alpha$ -Helices aufweist. Diese verschiedenen Rezeptoren haben alle eine ähnliche Struktur, der N-Terminus ist extrazellulär und der C-Terminus intrazellulär lokalisiert (Abbildung 1). Die 7 transmembranalen  $\alpha$ -Helices sind kreisförmig in der Membran angeordnet und bilden eine Liganden-bindende Tasche. Die intrazellulären Schleifen, besonders die zweite und dritte Schleife, interagieren, zusammen mit dem C-Terminus, mit dem G-Protein. Die N-terminale Domäne und die extrazellulären Schleifen spielen, zusammen mit den transmembranalen  $\alpha$ -Helices 3, 5, 6 und 7, eine Rolle bei der Bindung der Liganden (Strahs und Weinstein, 1997). Die Unterschiede zwischen den einzelnen Rezeptoren sind in der Aminosäuresequenz der N- und C-Termini, der transmembranalen Domänen und in den extrazellulären Schleifen zu finden (Strahs und Weinstein, 1997; Herz et al., 1993).

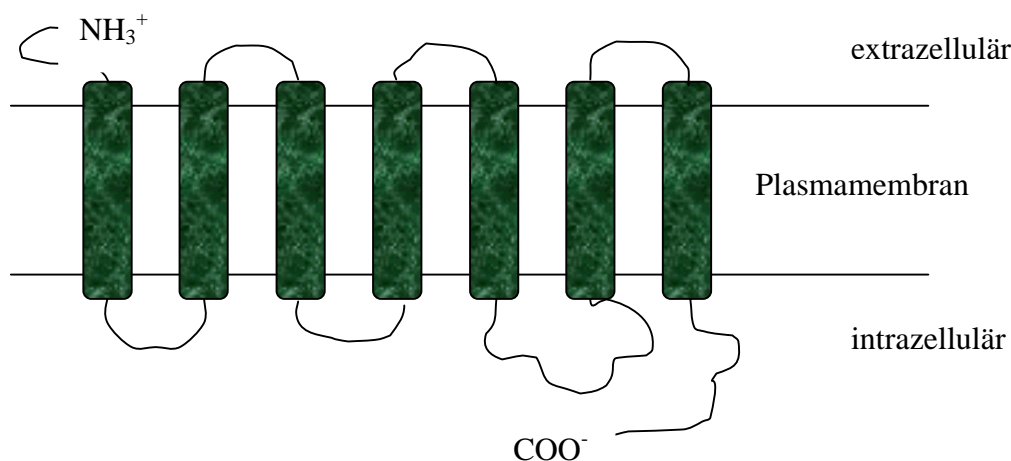


Abb. 1: Schematische Darstellung des Aufbaus der Opiatrezeptoren. 7 hydrophobe Domänen erstrecken sich durch die Plasmamembran. Der N-Terminus befindet sich extrazellulär und der C-Terminus intrazellulär.

Zwischen den Spezies sind die  $\delta$ -Rezeptoren, speziell in den Basalganglien, homogener als die  $\mu$ - und  $\kappa$ -Rezeptoren verteilt. Es gibt allerdings für die Spezies Maus, Ratte, Mensch keine extremen Unterschiede in der Verteilung der  $\mu$ - und der  $\delta$ -Rezeptoren (Mansour et al., 1991). Generell ist die höchste Dichte an Opiatrezeptoren im Hinterhorn des Rückenmarks, im medialen Thalamus, im Hirnstamm und im limbischen System zu finden (Snyder und Pasternak, 2003; Julien, 1997a).

Die Einteilung in  $\delta$ -,  $\kappa$ -,  $\mu$  und ORL-Rezeptoren geht entweder auf den Hauptliganden zurück, der an den jeweiligen Rezeptor bindet, oder auf den Ort, wo sie gefunden wurden (Gilbert und Martin, 1976; Martin et al., 1976), siehe Tabelle 2.

Die Liganden, die heute für die Untersuchung des Opiatsystems, d.h. für die Untersuchungen der Rezeptorverteilungen, die Wirkung der Rezeptoraktivierung und -blockade, eingesetzt werden, sind entweder natürlich, d.h. den endogenen Opiaten entsprechend, oder synthetisch (Tabelle 2).

Tab. 2: Opiatrezeptoren, ORL-Rezeptoren und ihre natürlichen (endogene Liganden) sowie einige synthetische (Agonisten und Antagonisten) Liganden. Die endogenen Liganden binden mit unterschiedlicher Affinität an die Rezeptoren. Es sind nur die Liganden aufgeführt, die eine starke Bindung aufweisen.

Rezeptortyp	Bezeichnung	Endogene Liganden	Antagonisten	Agonisten	Lokalisation
μ-Rezeptor	Morphintyp	Enkephalin β-Endorphin Morphin Endomorphin	CTOP D-Phe-Cys-Thr-D-Trp-Arg-Thr-Pen-Thr-NH <sub>2</sub> Naloxonazin Naloxon	DA(M)GO Thr-Pro-N-MePhe-D-Pro-NH <sub>2</sub> Morphin Dermorphine	moderat – dicht in den Basalganglien und im Caudate putamen; in Regionen, die dem Rückenmark übergeordnet sind (Areale des medialen Thalamus und des Hirnstamms); Locus coeruleus, periaquäduktales Grau des Mittelhirns und im Nucleus raphe magnus der Medulla (*)
κ-Rezeptor	Ketocyclazocine	Dynorphin A/B Neoendorphine	nor-Binaltorphimin	U 50,488H U 69,593 PD 117302	im Hinterhorn des Rückenmarks, in den tieferen Schichten des zerebralen und piriformen Kortex, im Hippocampus, in der Substantia nigra, im Hirnstamm und in weiteren supraspinalen Strukturen (*)
δ-Rezeptor	Enkephalin (Maus vas deferens)	Enkephalin Endorphin	Naltrindole Benzofuran (NTB) BNTX, ICI 174,864	DPDPE Deltorphine DSLET	am dichtesten im Vorderhirn und kaum im Mittelhirn und Hirnstamm (*)
THC-Rezeptor	Delta-9-Tetrahydrocannabinol	Anandamid (AEA)		Tetrahydrocannabinol (THC)	in den Basalganglien, im Hippocampus, im Kleinhirn und Neokortex (**)
ORL-Rezeptor	Orphan Rezeptor			Nociceptin / OFQ Ac-RYYRIK-NH <sub>2</sub>	
ε-Rezeptor	β-Endorphin (Ratte vas deferens)				im Vorderhirn von Meerschweinchen, Kuh, Huhn, Schwein und Ratte (***)
σ-Rezeptor	SKF 10047				ist vermutlich kein Opiatrezeptor, sondern Ziel für eine weitere Klasse suchterzeugender Substanzen, des Phencyclidins (Angel dust) und seiner Analogen (****).

## Erläuterungen zur Tab.2

Ac-RYYRIK-NH <sub>2</sub>	Ac-Arg-Tyr-Tyr-Arg-Ile-Lys-NH <sub>2</sub>
AEA	Arachidonyl-Ethanol-Amid
DA(M)GO	[D-Ala <sup>2</sup> , MePhe <sup>4</sup> -Gly-ol <sup>51</sup> -Enkephalin
DPDPE	[D-Pen <sup>2</sup> ,D-Pen <sup>5</sup> ]-Enkephalin
DSLET	[D-Ser <sup>2</sup> ,D-Leu <sup>5</sup> ]-Enkephalyl-Thr
CTOP	D-Phe-Cys-Tyr-D-Trp-Orn-Pen-Thr-NH <sub>2</sub>
BNTX	7-Benzyliden-7-dehydronaltrexon
ICI 174,864	N,N-diallyl-Tyr-Aib-Phe-Leu-OH

*	Lutz und Pfister, 1992
**	Nahas et al., 1999
***	Nock et al., 1993
****	Zukin und Zukin, 1981

Weiterhin gibt es irreversibel bindende, selektive und unselektive Liganden, z.B.

μ-Rezeptor	β-Funaltrexamin (Portoghese et al., 1980)
	Etonitazinderivat BIT (Rice et al., 1983)
	Naloxonazin (Pasternak und Hahn, 1980)
κ-Rezeptor	DIPPA(2-(3,4-Dichlorophenyl)-N-methyl-N-[(1S)-1-(3-isothiocyanatophenyl)-2-(1-pyrrolidiny)ethyl]acetamide) (Chang et al., 1994)
δ-Rezeptor	Fentanylisothiocyanat (Simonds et al., 1985)
unselektiv	β-Chlornaltrexamin (Portoghese et al., 1979)

Weitere, wenig charakterisierte Opiatrezeptoren sind der ε- (Wuster et al., 1979), λ- (Grevel und Sadee, 1983), ι- (Oka, 1980) und der ζ-Rezeptor (Zagon et al., 1989). Verschiedene Liganden zeigen Affinitäten für diese Rezeptoren, aber eine Ähnlichkeit mit anderen Opiatrezeptoren ist noch nicht bewiesen.

Außerhalb des ZNS befinden sich Opiatrezeptoren im Magen-Darm-Trakt und in anderen Teilen des vegetativen Nervensystems. Periphere Rezeptoren sind u.a. an der analgetischen Wirkung beteiligt (Julien, 1997b). Ein Überblick über die Geschichte der Opiatrezeptoren wird bei Snyder und Pasternak (2003) gegeben.

### 1.1.2 Wirkungsweise der Opiate

Opiate haben zwei direkte Effekte auf Neuronen. Der erste ist eine Hemmung der Feuerungsrate, besonders bei Neuronen, die eine Rolle bei der Aufnahme der

Schmerzwahrnehmung spielen. Die Bindung der Opiate an die Rezeptoren bewirkt eine Membranhyperpolarisierung und reduziert die Amplitude des synaptischen Potentials. Opiate wurden auch in Nervenendigungen gefunden, aus denen sie durch eine Depolarisation  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängig freigesetzt wurden (Strand, 1999).

Der zweite Effekt ist die Hemmung der Neurotransmitterfreisetzung. Die Transmitter, die u.a. moduliert werden, sind Adrenalin, Dopamin, Acetylcholin und Substanz P (Strand, 1999).

Opiatrezeptoren sind G-Protein-gekoppelt und eine Bindung des Liganden bewirkt eine Beeinflussung der *second messenger*. Nach der Bindung des Peptids an den extrazellulären N-Terminus des Rezeptors wird intrazellulär Guanosintriphosphat (GTP) an die  $\alpha$ -Untereinheit ( $\alpha$ -UE) des trimeren G-Proteins gebunden, die  $\beta\gamma$ -UE dissoziiert von der  $\alpha$ -UE und diese diffundiert im intrazellulären Kompartiment zur Adenylatcyclase, deren Aktivität vermindert werden kann (Attali et al., 1989; Sharma et al., 1975; Collier und Roy, 1974).

Die Aktivierung der  $\mu$ - und  $\delta$ -Rezeptoren, über die Kopplung an  $G_i$ - oder  $G_o$ -Proteine (i: inhibitorisch, o: andere (engl. *other*); benannt nach den Eigenschaften der  $\alpha$ -UE; Hoffmann, 1991), führt zu einer Steigerung der nach innen gerichteten  $\text{K}^+$ -Ströme und so zu einer Reduktion der spannungsabhängigen  $\text{Ca}^{2+}$ -Ströme. Die Aktivierung von  $\kappa$ -Rezeptoren führt direkt zu einer Reduktion der  $\text{Ca}^{2+}$ -Ströme (Gross und MacDonald, 1987; Cherubini und North, 1985), wobei in einigen Zelltypen der  $\kappa$ -Rezeptor ebenfalls an die Aktivierung der nach innen gerichteten  $\text{K}^+$ -Ströme gekoppelt ist (Grudt und Williams, 1993). Es scheint so, dass alle Opiatrezeptoren gemeinsame Effektormechanismen aufweisen und die Unterschiede in den Signalwegen durch die Heterogenität der Untereinheiten, die die trimeren G-Proteine bilden, zustande kommen. Letztendlich führt die Aktivierung der Opiatrezeptoren zu einer großen Anzahl zellulärer Antworten (u.a. Aktivierung der Phospholipase A2 (PLA2), der Phospholipase C $\beta$  (PLC $\beta$ ) und der MAP-Kinase und der Inhibition der Adenylatcyclase; Corbett et al., 1999).

Die unterschiedliche Wirkung der Liganden hängt auch von der Bindungsdauer an den Rezeptor ab. DAGO z.B. ( $\mu$ -Rezeptor-Agonist) hat eine Halbwertszeit von 1,5 min und DTLET und DADLE ( $\delta$ -Rezeptoren) von 21 bzw. 70 min. Das könnte darin resultieren, dass die  $\mu$ -Rezeptoren für kurzzeitige und die  $\delta$ -Rezeptoren für länger anhaltende Effekte verantwortlich sind (Kelly et al., 1990).

### 1.1.3 Das Opiatsystem des Haushuhnkükens

In dieser Arbeit wurde das Opiatsystem des Haushuhnkükens untersucht. Es ist hinsichtlich der Rezeptorverteilung und der Lokalisation der endogenen Opiatpeptide gut charakterisiert (Csillag et al., 1990; 1989; de Lanerolle et al., 1981). Die Opiatrezeptoren im Haushuhnküken sind schon in einem sehr frühen embryonalen Stadium vorhanden (Gibson und Vernadakis, 1982), die  $\mu$ - und  $\delta$ -Rezeptoren sind ab dem fünften Embryonaltag nachzuweisen (Geladopoulos et al., 1987).

Bei sehr jungen Tieren ist eine hohe Dichte der Opiatrezeptoren vorhanden (Pert et al., 1974). Studien zur Entwicklung der Rezeptoren im Vorder- und Mittelhirn, unter Verwendung des Antagonisten [ $^3$ H]-Naloxon als Ligand (Bardo et al., 1982), zeigten, dass nach dem Schlupf der Küken vom Tag 1 bis zum Tag 14 eine 25-%ige Reduktion der Bindung der Liganden im Mittelhirn und keine signifikanten Unterschiede im Vorderhirn gefunden wurden. Von Tag 14 bis zum Tag 28 nahm die Bindung der Liganden in beiden Hirnfraktionen weiter ab, was nicht durch eine Affinitätsänderung, sondern durch eine Abnahme der Bindungsstellen erklärt wurde. Auch bei der Konzentration der Enkephaline gibt es entwicklungsbedingte Unterschiede, im erwachsenen Vogel ist die Dichte der enkephalinpositiven Neurone viel geringer als in den embryonalen Stadien (Reiner et al., 1984).

Werden die Konzentrationen von Leu- und Met-Enkephalin in verschiedenen Hirngebieten der Säugetiere mit denen der Vögel verglichen, ist zu sehen, dass sie der gleichen Ordnung entsprechen, d.h. eine ähnliche Reihenfolge der Konzentrationen in korrespondierenden Hirnregionen aufweisen.

Säugetiere:

Striatum > Hirnstamm > cerebraler Kortex > Kleinhirn.

Huhn:

ventrales Vorderhirn > Hirnstamm > dorsales Vorderhirn > Kleinhirn.

Der in dieser Arbeit verwendete Antagonist Naloxon bindet im Gehirn der Vögel hauptsächlich an die  $\mu$ -Rezeptoren, wie durch vergleichende Bindungsstudien gezeigt wurde (Csillag et al., 1990; 1989).

Diese Bindungsstudien an 1-tägigen Küken wurden mit je einem Liganden für den  $\mu$ -,  $\kappa$ - und  $\delta$ - Rezeptor durchgeführt. Für den  $\mu$ -Rezeptor wurde DAGO ([D-Ala<sup>2</sup>,Gly-ol]-Enkephalin),

für den  $\delta$ -Rezeptor [D-Pen<sup>2</sup>, D-Pen<sup>5</sup>]-Enkephalin und für den  $\kappa$ -Rezeptor U-69593 eingesetzt. Die Verteilung der Opiatrezeptoren ist sehr heterogen, mit einigen Besonderheiten in verschiedenen Vorderhirngebieten: im optischen Tectum des Mittelhirns war die Bindung von DAGO und [D-Pen<sup>2</sup>, D-Pen<sup>5</sup>]-Enkephalin sehr hoch, im Vorderhirn ist ein hohes Niveau der  $\mu$ - und  $\kappa$ -Rezeptor selektiven Liganden im Hyperstriatum (H) und für den  $\mu$ -Rezeptor selektiven Liganden im Hyperstriatum accessorium (HA), intercalatum supremum (HIS), dorsale (HD) und ventrale (HV) zu finden (vergleiche Abbildung 2). Die Bindung der  $\mu$ - und  $\kappa$ -Rezeptor selektiven Liganden ist im Nucleus basalis und im Neostriatum (N) (nur  $\mu$ ) ebenfalls hoch. Die Studie mit [<sup>3</sup>H] Naloxon als Ligand zeigte eine starke Bindung des Liganden im Hyperstriatum dorsale und ventrale, Hyperstriatum intercalatum und im Neostriatum. Mittlere Bindungsaffinitäten wurden in den paleostriatalen Regionen, im Septum, im Thalamus, im Archistriatum, im Hyperstriatum accessorium und in der Area parahippocampalis gefunden, während der Hippocampus und das Ectostriatum eine geringe Ligandenbindung aufwiesen (Csillag et al., 1989).

Die Verteilung der Opiatrezeptoren im Gebiet des MNH ist in Abbildung 2 und Abbildung 3 dargestellt (aus Csillag et al., 1990; 1989). Es ist deutlich zu sehen, dass im MNH (rot eingezeichnetes Areal) eine hohe Bindung des Opiatantagonisten Naloxon zu finden ist. (Abbildung 2). Die Bindungsstudien für die einzelnen Liganden zeigen eine hohe Konzentration an  $\mu$ - und  $\kappa$ -Rezeptoren, jedoch wenige  $\delta$ -Rezeptoren im MNH (Abbildung 3). Unterschiede in der Bindung der Liganden treten auch innerhalb des MNH auf, der hyperstriatale Teil weist gegenüber dem neostriatalen Teil eine höhere Bindung des  $\mu$ - und des  $\kappa$ -selektiven Liganden auf.

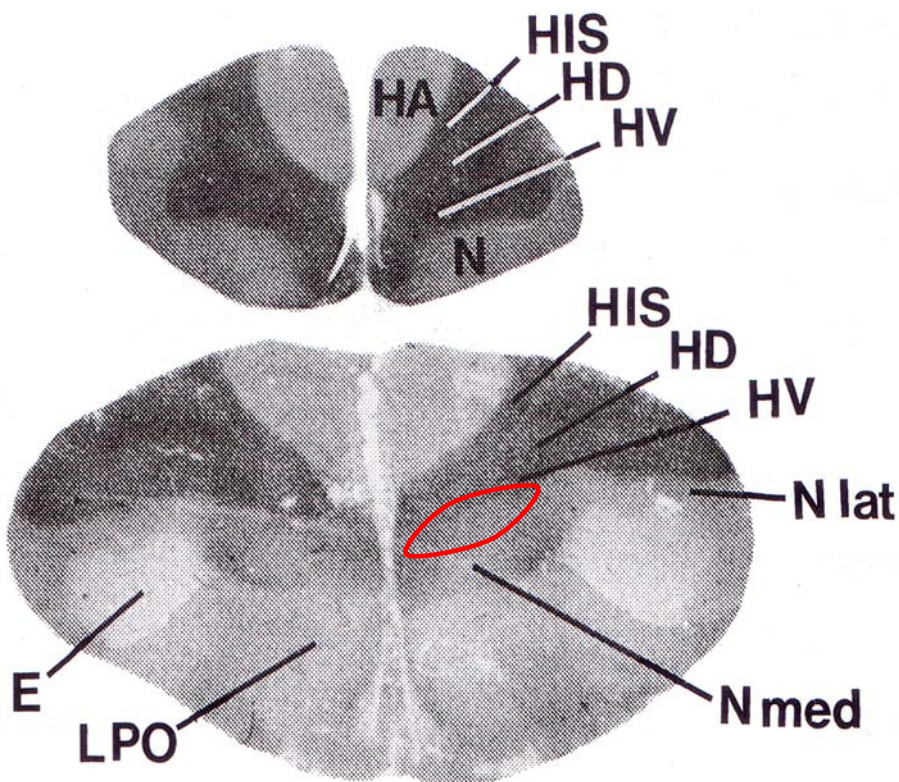


Abb. 2 Autoradiogramme repräsentativer Coronalschnitte des Kükengehirns nach [ $^3\text{H}$ ]-Naloxon Bindung in vitro im anterioren (oben) und intermedialen (unten) Vorderhirn (aus Csillag et al., 1989). E: Ectostriatum, HA: Hyperstriatum accessorium, HD: Hyperstriatum dorsale, HIS: Hyperstriatum intercalatum supremum, HV: Hyperstriatum ventrale, LPO: Lobus parolfactorius, N: Neostriatum, N med: Neostriatum mediale, N lat: Neostriatum laterale, MNH: rot umrandetes Areal

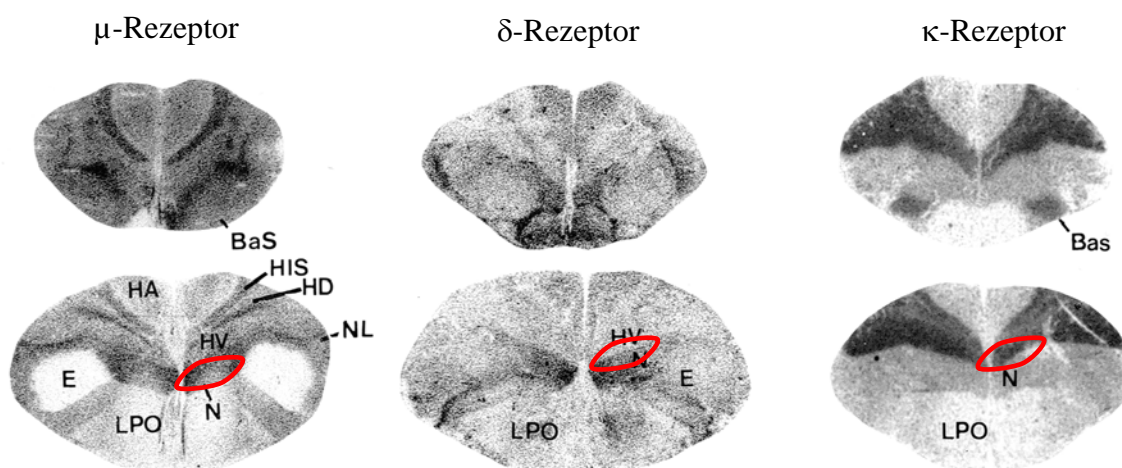


Abb. 3 Autoradiogramme repräsentativer Coronalschnitte des Kükengehirns nach [ $^3\text{H}$ ]-DAGO ( $\mu$ -Rezeptor), [ $^3\text{H}$ ]-DPDPE ( $\delta$ -Rezeptor) und [ $^3\text{H}$ ]-U69593 ( $\kappa$ -Rezeptor) Bindung in vitro im anterioren (obere Reihe) und intermediären (untere Reihe) Vorderhirn (aus Csillag et al., 1990).

BaS: Nucleus basalis, E: Ectostriatum, HA: Hyperstriatum accessorium, HD: Hyperstriatum dorsale, HIS: Hyperstriatum intercalatum supremum, HV: Hyperstriatum ventrale, LPO: Lobus parolfactorius, N: Neostriatum, NL: Neostriatum laterale, MNH: rot umrandetes Areal



Das frühe Erscheinen der Opiatrezeptoren in der Entwicklung deutet auf eine trophische Rolle des Opiatsystems hinsichtlich des frühen Wachstums und der Differenzierung des Gehirns hin (Geladopoulos et al., 1987; Hauser et al., 1987; Zagon und McLaughlin, 1986). Die Gabe des  $\mu$ -Rezeptor Antagonisten Naloxon während dieser Phase bewirkt ein verstärktes Wachstum (Sakellaridis und Vernadakis, 1986; Sakellaridis et al., 1986; Gibson und Vernadakis, 1983a; 1983b; Zagon und McLaughlin, 1983), das verzweigtere Neurone hervorbringt. Morphin hingegen hemmt in dieser Entwicklungsphase die Zellproliferation, wobei  $\text{Ca}^{2+}$  eine entscheidende Rolle spielt (Hauser et al., 1996).

#### **1.1.4 Untersuchungen zu sozial-/emotionalem Verhalten, Lernen und Gedächtnis**

Das Opiatsystem des Haushuhnkükens ist hinsichtlich sozialer Interaktionen (Panksepp et al., 1997; 1986; 1980a; 1978a; Panksepp und DeEskinazi, 1980) und Reaktionen auf Schmerzreize (Formalintest; Hong und Abbott, 1995) gut untersucht.

Ein Kriterium, das soziale Interaktionen und interne emotionale Zustände der Tiere gut widerspiegelt, ist die Distressvokalisation (*distress vocalisation* (DV) oder *distress calls*, (DC)), die geäußert wird, wenn Küken z.B. sozial isoliert werden (Gruss und Braun, 1997; Müller und Scheich, 1986; Vilberg et al., 1977). Diese DV wird nicht nur von Vögeln, sondern auch von Meerschweinchen (Herman und Panksepp, 1978), Ratten (Winslow und Insel, 1991), Hundewelpen (Panksepp et al., 1978a), Affen (Lyons et al., 1999) und Neugeborenen (Michelsson et al., 1996) geäußert.

Das Opiatsystem wurde schon in vielen verschiedenen Zusammenhängen untersucht, z.B. der motorischen Beeinflussung (Dauge et al., 1988), der Wechselwirkung des Opiatsystems mit anderen Transmittersystemen (Roesler et al., 1999; Quirarte et al., 1998), Wachstumsveränderungen von Dendriten und Spines im Gehirn (Sakellaridis und Vernadakis, 1986; Sakellaridis et al., 1986; Gibson und Vernadakis, 1983a; 1983b; Zagon und McLaughlin, 1983), zur Immunmodulation (Perez und Lysle, 1997) und zu den Mechanismen der Abhängigkeit und Toleranz von Opiaten (Koch et al., 2004a; Koch et al., 2004b; Pfeiffer et al., 2002; Koch et al., 2001; Heyne et al., 2000; Leshner und Koob, 1999; May et al., 1999; Bechara et al., 1998; Bardo, 1998).

Auch die Anzahl der Studien, in denen der Einfluss des Opiatsystems auf Lernen und Gedächtnis, Erlernen von Aufgaben und das Erinnern an erlernte Aufgaben (Bruins Slot und Colpaert, 1999; Hernández et al., 1997; Izquierdo, 1979) untersucht wurde, ist beachtlich und

variabel hinsichtlich der Tiermodelle: Ratten (Lett et al., 2001; Vivian und Miczek, 1999; Bruins Slot und Colpaert, 1999; Izquierdo und Dias, 1983; Panksepp und DeEskinazi, 1980; Messing et al., 1979), Mäuse (Castellano und McGaugh, 1989; Torre et al., 1986) und Haushuhnküken (Freeman und Young, 2001; Freeman und Young, 2000a; 2000b; Colombo et al., 1997; Csillag et al., 1993; Colombo et al., 1992; Patterson et al., 1989; Flood et al., 1987).

Immunhistochemische Studien haben gezeigt, dass in vielen Gebieten, die beim Lernen eine Rolle spielen, enkephalin- oder endorphin-positive Neurone zu finden sind, z.B. im Nucleus accumbens, Globus pallidus, dem amygdaloiden Komplex, im Hippocampus, Hypothalamus, dem Nucleus caudatus u.a. Die meisten dieser Neurone sind Interneurone mit kurzen Axonen (Shen und Li, 1995). Sie kommunizieren mit monoaminergen Neuronen, wie den dopaminergen in der Substantia nigra und dem ventralen tegmental Areal, den noradrenergen im Locus coeruleus und den serotonergen in den dorsalen Raphe-Kernen. Die Haupteffekte der Endorphine und Enkephaline sind bei der Gedächtnisbildung und dem Abruf von gespeicherten Inhalten zu finden. Die Applikation von  $\beta$ -Endorphin,  $\alpha$ -Endorphin und Met-Enkephalin fördern z. B. die Gedächtnisbildung,  $\beta$ -Endorphin unterstützt des Weiteren den Abruf der Information. Durch  $\gamma$ -Endorphin und Leu-Enkephalin kann eine retrograde Amnesie und eine Beeinträchtigung der Gedächtnisbildung hervorgerufen werden (Stein und Belluzzi, 1978). In den meisten Untersuchungen, die an Küken stattfanden, wurde die Wirkung von Opiatagonisten und -antagonisten beim passiven Vermeidungslernen untersucht (Freeman und Young, 2000a; 2000b; Colombo et al., 1997; Patterson et al., 1989). Der Lernerfolg ist dabei von der Dosierung, dem Ort der Applikation und dem Zeitpunkt der Applikation abhängig (Colombo et al., 1997; Patterson et al., 1989).

## 1.2 Die Filialprägung

Die Prägung ist ein Phänomen, das schon sehr lange untersucht wird. Frühe Beobachtungen zur Entwicklung frühkindlicher und sexueller Präferenzen bei Vögeln und Säugetieren (Bolhuis, 1991) wurden bereits in der Mitte des 19. Jahrhunderts (Spalding, 1873) gemacht. Die meisten dieser Arbeiten beschäftigten sich mit Vögeln und wurden von Konrad Lorenz der breiten Öffentlichkeit vorgestellt (Lorenz, 1935). Später wurde die frühkindliche Prägung, die emotionale Bindung zwischen dem Neugeborenen und den Eltern, bei Vögeln (van Kampen und Bolhuis, 1993; Scheich, 1987), Nagern (Braun und Scheich, 1997; Poeggel und Braun, 1996; Hudson und Distel, 1983) und Menschen (DeCasper und Fifer, 1980; Gray, 1958) untersucht.

Die Untersuchungen am Huhn als neurobiologisches Tiermodell im Zusammenhang mit Lern- und Gedächtnisprozessen begannen Mitte des 20. Jahrhunderts und konzentrierten sich auf die Mechanismen, die beim juvenilen Lernprozess der Prägung eine Rolle spielen. Aufgrund der fortgeschrittenen Entwicklung, die Nestflüchter nach dem Schlupf/der Geburt aufweisen (offene Augen und Ohren, Nestflucht kurz nach der Geburt), eignet sich das Haushuhn gut als Modell für Untersuchungen der sensitiven Phase.

Die sensitive Phase, in der die frühkindliche Prägung des Tieres stattfindet, umfasst einen Zeitraum kurz vor und kurz nach dem Schlupf und ist durch eine erhöhte Sensibilität und Lernfähigkeit gekennzeichnet. Schon im Ei, am 19. bis 20. Bruttag, geben Küken Laute von sich, die vom Muttertier beantwortet werden (Hess, 1972). So erkennt das Küken direkt nach dem Schlupf die Mutter u.a. an der Art der Vokalisation. Der sensibelste Zeitraum für die Prägung ist der bis zur 36. Stunde nach dem Schlupf, mit einem Höhepunkt zwischen der 13. und der 16. Stunde (Hess, 1959). Dabei werden angeborene Bewegungsfolgen und Verhaltensmuster, z.B. die Nachlaufreaktion, aktiviert. Diese Nachlaufreaktion erstreckt sich bei Hühnerküken normalerweise über die ersten 4 Lebenstage (Graves, 1973), konnte aber unter künstlichen Bedingungen auch bis zum 10. oder 28. Lebenstag aufrecht erhalten werden (Smith und Nott, 1970). Danach erlischt diese Reaktion. Fehlt das natürliche Objekt (Muttertier), folgen die Vogelküken auch künstlichen Objekten und halten sich bevorzugt in ihrer Nähe auf, wobei ebenfalls gewisse Prädispositionen, die ungefähre Größe, Farbe und Form des Objekts betreffend, vorliegen (Bolhuis und Honey, 1998; Bolhuis, 1991). Eine Kombination von visuellen und akustischen Stimuli verstärkt die Nachfolgereaktion (Wallhäusser und Scheich, 1987).

Ist die Prägung reversibel? Die Irreversibilität, die Lorenz 1935 postulierte, kann verschieden interpretiert werden. Zum Einen kann es bedeuten, dass ein Küken, wenn es einmal eine Beziehung zu einem Prägeobjekt hat, seine sozialen Kontakte nie auf ein neues Objekt richtet. Zum Anderen kann das Küken durchaus soziale Kontakte zu neuen Objekten aufbauen, aber es wird das ursprüngliche Prägeobjekt nie vergessen (Jaynes, 1956), d.h. spätere Erfahrungen können zwar den geprägten Reiz ersetzen, hat das Individuum aber die Wahl, wird die Präferenz für den ersten Reiz wiederhergestellt.

Die Beantwortung der Frage der Reversibilität erfordert des Weiteren die Betrachtung des Prägeobjekts und der Dauer der Exposition. Im natürlichen Umfeld ist die Prägung infolge des Vorhandenseins artspezifischer Reize dauerhaft. Eine lebende Henne ist aufgrund ihres auf das Küken gerichteten Verhaltens das beste Prägeobjekt und es findet keine Umprägung statt (Boakes und Panter, 1985). Wenn das Prägeobjekt eine ausgestopfte Henne ist, bevorzugt das Küken diese im Vergleich zu Gegenständen. Wurde die initiale Prägung mit anderen Objekten wie einer sich bewegenden Windmühle oder einer rotierenden Box durchgeführt, kann eine Umprägung auf ein weiteres Objekt (Boakes und Panter, 1985) oder auf die Henne erfolgen (Bolhuis und Trooster, 1988; Johnson et al., 1985).

Allerdings ist der Lernerfolg unter Laborbedingungen nicht so stark ausgeprägt, und die Prägung kann in Abhängigkeit vom Prägeobjekt reversibel sein.

Die akustische Filialprägung kann als ein assoziativer Lernprozess aufgefasst werden, da der angebotene Ton als Stimulus mit einer emotionalen Belohnungssituation, z.B. dem Aufenthalt bei einer Mutterattrappe, assoziiert wird (Immelmann und Großmann, 1981).

Weitere Formen der Prägung sind die sexuelle Prägung, bei der es zur Ausbildung von Präferenzen für die Wahl der Sexualpartner kommt (Rollenhagen und Bischof, 2000; Bischof und Rollenhagen, 1999; Bateson, 1978), und das Gesangslernen (Clayton und Bischof, 1990; Immelmann, 1972).

Besonders in den ersten drei Lebensjahren werden beim Menschen die Grundlagen für Denken, Sprache, Gesichtssinn, Begabungen und weitere Verhaltensmuster festgelegt.

Störungen während dieser sensitiven Phase können zur Fehlentwicklung der intellektuellen und sozialen Fähigkeiten führen (Skeels 1966; Goldfarb 1943).

Eine Ursache für eine Fehlentwicklung kann Stress in frühen Lebensphasen sein, der diejenigen Teile des Gehirns schädigen kann, die für Lernen und Gedächtnis von

entscheidender Bedeutung sind, z.B. ein Verlust von hippokampalen CA3 Neuronen, der im gesamten Leben zu einer reduzierten Gedächtnisfunktion, z.B. Defizite beim räumlichen Lernen und beim Referenzgedächtnis, führt (Brunson et al., 2001; Mizoguchi et al., 2001). Stress führt des Weiteren bei Affen zu einer Degeneration von Gebieten des Hippocampus, die Zielregion für Glucocorticoide (Stresshormone) sind (Uno et al., 1989).

Auch bei Kindern depressiver Mütter zeigt sich häufig eine verminderte Aktivität in den Hirnregionen, die positive Empfindungen wie Freude, Glück, Neugier und dergleichen regeln. Bei diesen Kindern ist des Weiteren ein hoher Stresshormonspiegel (Lupien et al., 2000) und ein geringeres interaktives Verhalten (Field et al., 2000) zu beobachten.

Diese Fehlentwicklung des Nervensystems (unvollständige oder ungeordnete Synapsenverminderung, Veränderung neuronaler Verschaltungsmuster) kann eine Ursache für bestimmte psychische Erkrankungen wie z. B. Neurosen und Psychosen (Bogerts, 1996; Braun, 1996) sein. Eine geringe intellektuelle Stimulation und traumatische sozio-emotionale Erfahrungen während der frühen Kindheit können die Bildung funktioneller Hirnbahnen, speziell der limbischen Bahnen, die eine wichtige Rolle im emotionalen Verhalten und Lernen spielen, verhindern (Braun und Bogerts, 2001; 2000).

### **1.2.1 Akustische Filialprägung beim Haushuhnküken und das prägerelevante Vorderhirngebiet MNH**

Für Untersuchungen der neuronalen Plastizität während der Filialprägung wurde die akustische (Scheich et al., 1991; Wallhäusser und Scheich, 1987) und visuelle Filialprägung (Horn, 1991; 1985) am Haushuhnküken unter Laborbedingungen etabliert. Der bei der akustischen Filialprägung verwendete Reiz ist ein einfacher, rhythmisch wiederholter akustischer Stimulus (400 Hz). Dennoch gelingt es, die Tiere auf diesen reduzierten Reiz zu prägen. Maier und Scheich (1983), Wallhäusser und Scheich (1987) und Bock et al. (1996) konnten zeigen, dass bei der Beschallung von Küken mit einem rein akustischen Reiz, der aus rhythmischen Tonpulsen besteht, die optimal zur Auslösung der Nachfolgereaktion geeignet sind (Fischer, 1972), eine Prägung auf diesen Ton erzielt wird. Die Tiere können diesen Prägeton in einem Diskriminierungstest von einem in Rhythmus und Frequenz ähnlichen Reiz (700 Hz) unterscheiden. Diese Versuchsanordnung zugrundelegend ist es möglich, morphologische, biochemische und elektrophysiologische Mechanismen der plastischen Veränderungen im Gehirn zu untersuchen.

Mit der von Sokoloff et al. (1977) entwickelten [ $^{14}\text{C}$ ]-2-Deoxy-D-Glukose-Methode (2-DG-Methode) können Hirngebiete lokalisiert werden, die eine verstärkte intrazelluläre Akkumulation metabolisch nicht umsetzbarer [ $^{14}\text{C}$ ]-2-Deoxy-D-Glukose aufweisen. Nach der Filialprägung auf einen akustischen Reiz ist bei geprägten Tieren während der Präsentation des akustischen Stimulus eine erhöhte metabolische Aktivität (Abbildung 4) in folgenden Hirnregionen zu beobachten (Scheich et al., 1991; Scheich, 1987; Wallhäusser und Scheich, 1987; Maier und Scheich, 1983):

MNH: medio-rostrales Neostriatum und Hyperstriatum ventrale

HAD: Hyperstriatum accessorium und laterales Hyperstriatum dorsale im rostralen Wulst

LNH: rostro-laterales Neostriatum und Hyperstriatum ventrale

LPO: Lobus parolfactorius

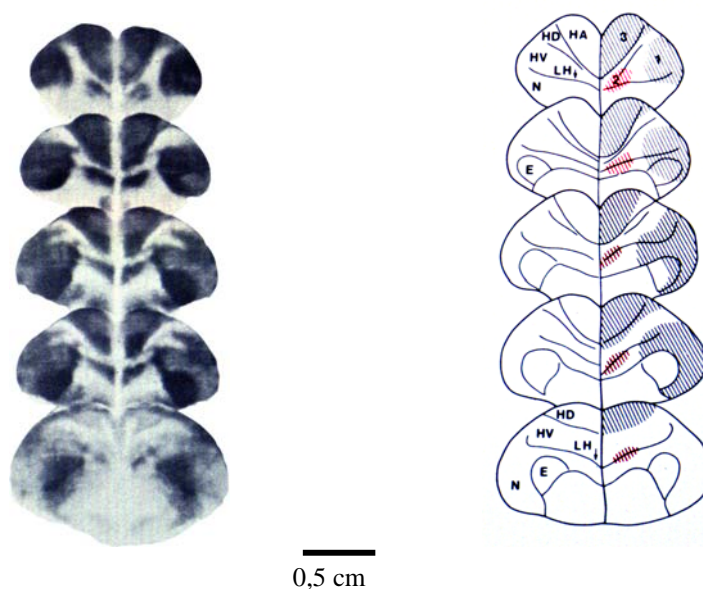


Abb. 4 Autoradiographische Aufnahmen der [ $^{14}\text{C}$ ]-2-Deoxy-D-Glukose-Markierung in 3 rostralen Vorderhirngebieten eines geprägten Haushühnküken (aus Maier und Scheich, 1983).

HA: Hyperstriatum accessorium; HD: Hyperstriatum dorsale; LH: Lamina hyperstriatica. In der schematischen Darstellung sind die [ $^{14}\text{C}$ ]-2-DG markierten Gebiete gestreift dargestellt. 1: laterales Neostriatum/Hyperstriatum ventrale; 2: mediales Neostriatum/Hyperstriatum ventrale (MNH: rot markiert); 3: Hyperstriatum accessorium

Das HAD und das LNH dienen vorwiegend der visuellen Reizverarbeitung (Scheich, 1987), das LPO ist an der Verarbeitung von Stress und Erregung beteiligt (Scheich et al., 1991; Müller, 1987; Müller und Scheich, 1986). Das MNH hingegen scheint spezifisch in die Verarbeitung des akustischen Prägestimulus involviert zu sein (Scheich, 1987), obwohl es kein primär auditorisches Areal ist. Es spielt allerdings auch eine Rolle bei verschiedenen

Stresssituationen wie „*handling*“ und Separation (Gruss und Braun, 1997; Müller, 1987; Müller und Scheich, 1986). Das ist insofern von Bedeutung, als das eine Entnahme der Tiere aus ihrer Haltungsbox und eine Überführung in die Prägearena ein „*handling*“ und eine Separation bedeuten.

#### 1.2.1.1 Verschaltungsmuster des MNH

Das Verschaltungsmuster des Vogelhirns weist einige Ähnlichkeiten mit Verschaltungen in Singvögeln und Säugern auf, die für Lernen relevant sind. Die funktionelle Rolle des MNH wurde durch anatomische Untersuchungen der Verschaltungen (Abbildung 5) dieses Gebietes mit anderen Hirngebieten untersucht. Es wurde festgestellt, dass es eine große Ähnlichkeit mit dem meso-limbo-kortikalen System des Säuger aufweist (Metzger et al., 1996). Die vermutlich glutamatergen Afferenzen (Endepols, 1996; Wang X. et al., 1994) aus den Kerngebieten des dorsomedialen Thalamus (DMA/DMP) in den neostriatalen Teil des MNH (Metzger et al., 1996) und die dopaminergen Afferenzen aus der Area ventralis Tsai (AVT) entsprechen den klassischen „Definitionseingängen“ des präfrontalen Kortex (PFC) beim Säuger. Daraus schlussfolgernd wird das MNH als Analog des PFC beim Säuger betrachtet (Metzger et al., 1996; 2002a; 2002b; Scheich et al., 1991), der eine entscheidende Rolle bei verschiedenen Lernvorgängen spielt (Iidaka et al., 2001; Auclair et al., 2000; Diekamp et al., 2000; Iwano et al., 1997; Poeggel und Braun, 1996; Fuster, 1989).

Weitere Ergebnisse stützen die Hypothese, dass dem MNH eine Schlüsselrolle bei der akustischen Filialprägung zukommt.

Im MNH findet während der akustischen Filialprägung ein Prozess der synaptischen Reorganisation auf der Ebene der Spines statt. Mit der Golgi-Cox-Methode konnte nachgewiesen werden, dass auf den als Typ 1-Neurone klassifizierten Zellen (Scheich et al., 1991; Wallhäuser-Franke, 1989) ein Spineverlust zu verzeichnen ist (Wallhäuser und Scheich, 1987). Basierend auf diesen Befunden wurde eine Synapsenselektionshypothese abgeleitet, die besagt, dass „während der akustischen Filialprägung aus der Vielzahl bzw. einem Überschuss vorhandener synaptischer Verknüpfungen nur eine bestimmte Auswahl dieser Synapsen durch den Präge stimulus bzw. den stattfindenden assoziativen Lernprozess aktiviert und stabilisiert wird. Andere, durch den präsentierten Prägereiz nicht aktivierte Synapsen bleiben inaktiv und werden schließlich eliminiert“ (Scheich et al., 1991; Scheich und Braun, 1988; Scheich, 1987). Die Aktivierung der als N-Methyl-D-Aspartat-Rezeptoren

(NMDA-Rezeptoren) bezeichneten Glutamatrezeptoren im MNH scheint für die mit der akustischen Filialprägung einhergehende Synapsenselektion in diesem Gebiet von entscheidender Bedeutung zu sein. Werden Küken während der Prägung mit dem selektiven NMDA-Antagonisten D,L-2-Amino-5-Phosphonovaleriansäure (APV) behandelt, entwickeln sie keine Präferenzen für den Prägereiz und weisen die gleiche Spinefrequenz an Typ 1-Neuronen auf wie naive, unbehandelte Kontrolltiere (Bock et al., 1996). Die Aktivierung des NMDA Rezeptors ist notwendig für die lerninduzierte selektive Reduktion der Spinesynapsen und könnte einen Mechanismus für die Speicherung der Information beim Prägungslernen darstellen (Bock und Braun, 1999).

Elektrophysiologische Untersuchungen in vivo zeigten, dass akustisch geprägte Tiere, im Gegensatz zu nichtgeprägten Tieren, eine erhöhte Aktivität im MNH aufweisen, wenn der Prägestimulus präsentiert wird (Bredenkötter und Braun, 2000; 1997).



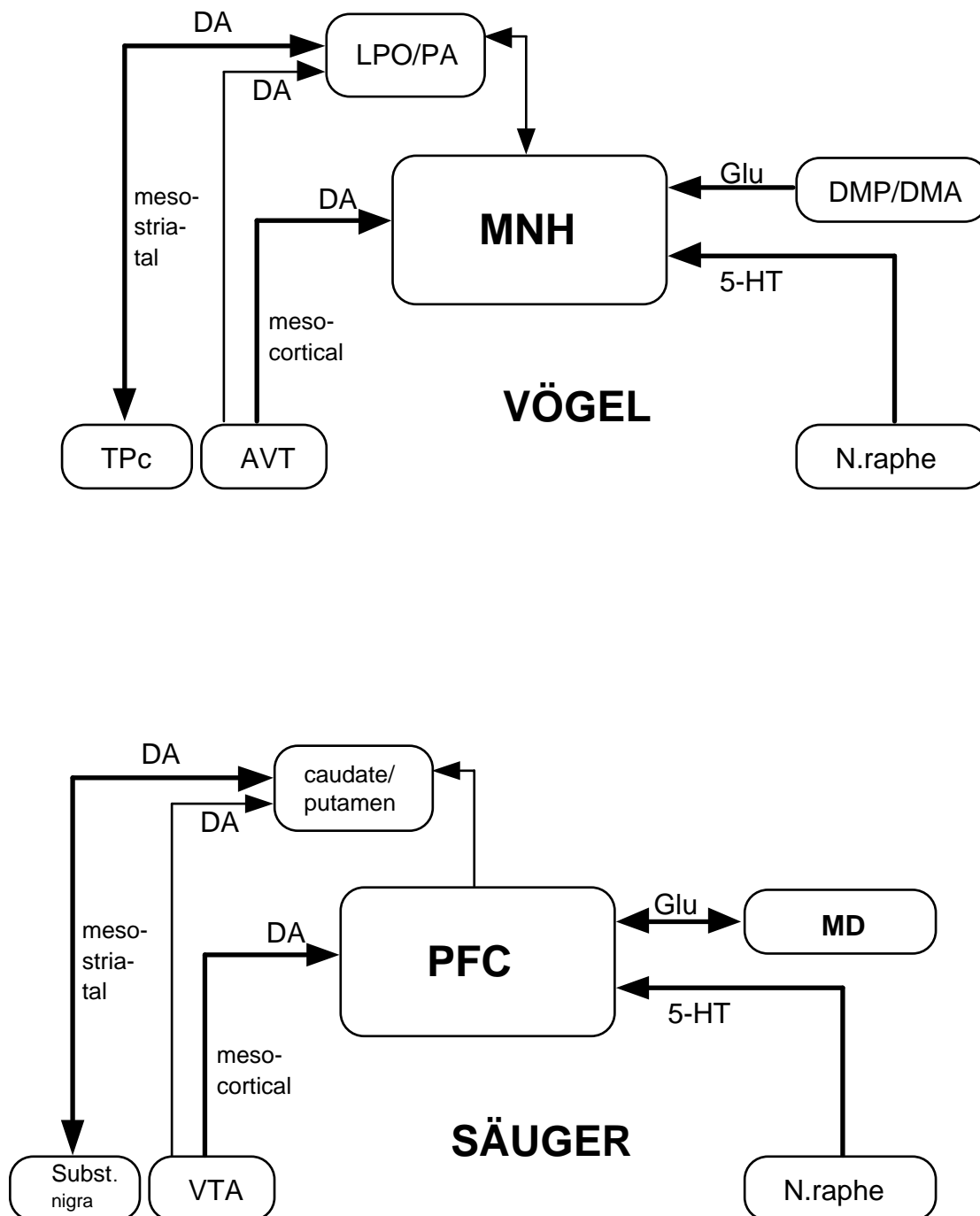


Abb. 5 Vergleichende Darstellung der glutamatergen, dopaminergen und serotonergen Verbindungen des medio-rostralen Neostriatum/Hyperstriatum ventrale (MNH) der Vögel und des präfrontalen Kortex (PFC) der Säuger (schematisiert).

DA: Dopamin, Glu: Glutamat, 5-HT: Serotonin,

AVT: Area ventralis (Tsai); DMP/DMA: Nucleus dorsomedialis posterior thalami/N. dorsomedialis anterior thalami; LPO/PA: Lobus parolfactorius/Paleostriatum augmentatum; MD: Nucleus mediodorsalis thalami; N.raphe: Nucleus raphe; TPc: Nucleus tegmenti pedunculo-pontinus, pars compacta (Substantia nigra); Subst. nigra: Substantia nigra; VTA: ventrales Tegmentum

Von Wang (1992) und Wang X. et al. (1994) konnte eine LTP-ähnliche Potenzierung an Typ 1-Neuronen nach einer hochfrequenten Stimulation afferenter thalamischer Fasern oder einer Applikation von NMDA in *in vitro*-Akutschchnittpräparaten des MNH's nachgewiesen werden. Diese Potenzierung konnte durch APV blockiert werden.

Untersuchungen mit der *in vivo* Mikrodialyse am wachen Tier zeigten, dass die glutamaterge und die monoaminerge Neurotransmission im MNH nach der auditorischen Prägung verändert ist (Gruss et al., 2003). Die Präsentation des Prägetons führte zu einer erhöhten Glutamatkonzentration im Dialysat (Gruss und Braun, 1996). Die Applikation des Glutamat-Rezeptor Agonisten NMDA in das MNH führte zu einer konzentrationsabhängigen, durch APV blockierbaren Zunahme der Dialysatkonzentration von Glutamat. Die Konzentration der Homovanillinsäure (HVA) als Metabolit des Dopamins, nahm während der Präsentation des Prägereizes in geprägten Tieren und der Applikation von NMDA in das MNH ab (Gruss, 1998).

In Kombinationsexperimenten von Mikrodialyse und Elektrophysiologie wurden NMDA-Rezeptor vermittelte modulatorische Interaktionen zwischen glutamaterger und monoaminergem Neurotransmission nachgewiesen (Gruss et al., 1999). Für die Untersuchung des dopaminergen Systems wurde der Dopaminrezeptor-Antagonist Haloperidol eingesetzt. Die Applikation von Haloperidol reduzierte die Prägungsrate um 59 %. Die extrazelluläre Konzentration des Dopaminmetaboliten HVA stieg nach der systemischen Injektion von Haloperidol an, während die Konzentrationen von 5-HIAA, Glutamat und Taurin unverändert blieben. Eine lokale Infusion in das MNH steigerte die Konzentration von Glutamat, Taurin und 5-HIAA, während die HVA-Konzentration unverändert blieb. Die systemische Haloperidolinfusion verstärkte die NMDA-Rezeptor vermittelte inhibitorische Modulation der dopaminergen Neurotransmission im MNH.

Mit diesen Ergebnissen konnte der Nachweis für einer glutamaterge und dopaminerge Neurotransmission und deren Wechselwirkung während der akustischen Filialprägung in einer höheren assoziativen Vorderhirnregion, die ähnliche neurochemische Charakteristiken wie der präfrontale Kortex im Gehirn der Säuger aufweist, erbracht werden.

### 1.3 Mikrodialyse

Die Mikrodialyse ist eine Technik, die es ermöglicht, neurochemische Vorgänge im Extrazellulärraum des lebenden Gewebes zu messen. Bis zur Entwicklung dieser Technik war es nur möglich, post mortem Untersuchungen durchzuführen oder sich auf die „*push-pull perfusion*“ oder „*cortical cup perfusion*“ zu beschränken. Aufgrund ihrer Limitationen wurden Letztere nicht sehr häufig benutzt. Die Idee, sich das Dialyseprinzip für die Messung der Extrazellulärflüssigkeit des Gehirns zunutze zu machen, ist schon rund 35 Jahre alt (Delgado et al., 1972; Bito et al., 1966), scheiterte aber am Fehlen einer sensitiven Analysetechnik und an der Größe der Dialysefasern.

Seit des Erscheinens des ersten Artikels über die Dialyse von Hirngewebe (Ungerstedt und Pycock, 1974), erlebte die Technik einen rasanten Aufschwung und hat heute eine breite Anwendungspalette in der Grundlagenforschung, z. B. der Untersuchung der Neurotransmission (Fried et al., 2001), der Epilepsie (Düring und Spencer, 1993) und dem Schlaganfall (Enblad et al., 1996; Bullock et al., 1995), in der klinischen Anwendung (Review: Müller, 2000) insbesondere dem Metabolismus in verschiedenen Organen wie Muskel und Haut sowie der Adipositasforschung (Cline et al., 1999; MacLean et al., 1998; Lafontan und Arner, 1996; Jansson et al., 1993), Untersuchungen in Tumorgewebe (Jain, 1994), und vielen anderen Gebieten.

#### 1.3.1 Funktionsprinzip der Mikrodialyse

Das einfache Prinzip der Dialyse zugrundelegend ist die Mikrodialyse in ihrer Anwendung sehr komplex, was sich aus dem Zusammenwirken der Dialysemembran, der Perfusionsflüssigkeit und des Gewebes, in diesem Falle des Hirngewebes, ergibt.

Die Dialysemembran, eine Hohlfaser, wird in das Gehirn implantiert und von einer Flüssigkeit, der artifiziellen Cerebrospinalflüssigkeit (aCSF), durchflossen. Nach dem Diffusionsprinzip stellt sich mit der Flüssigkeit an der Außenseite der Membran ein Gleichgewicht ein (Abbildung 6).

Nach dem Einsetzen der Sonde in das Gewebe wird eine schnelle Abnahme der Konzentrationen der meisten Substanzen beobachtet (Benveniste et al., 1989; Amberg und Lindfors, 1989) und weiterhin ein Zeitraum mit gesteigertem Glucosemetabolismus, gesenktem Blutfluss und gestörter Transmitterfreisetzung. Dieser Zeitraum kann in

Abhängigkeit von der zu untersuchenden Substanz und der Art des Experiments 30 min bis 24 Stunden dauern, danach haben sich Basiswerte eingestellt.

Die Dauer der Messung von Transmittern nach der Einstellung des Basiswertes ist von der Bildung einer Gliaschicht um die Sonde abhängig. Diese tritt in verschiedenen Geweben in unterschiedlicher Ausprägung auf und ist mit histochemischen Techniken studiert worden (Wang J. et al., 1994; Georgieva et al., 1993; Benveniste und Diemer, 1987; Hamberger und Nystrom, 1984).

Welche Menge der zu messenden Substanz in der aCSF nachzuweisen ist, hängt u.a. von der Länge der Dialysemembran, der Flussgeschwindigkeit der Perfusionsflüssigkeit, der Geschwindigkeit der Diffusion der Substanzen durch die extrazelluläre Flüssigkeit und von der Beschaffenheit der Membran ab.

Ein weiteres Untersuchungsfeld stellt die Beziehung zwischen der Konzentration im Dialysat und im Extrazellulärraum dar. Einige mathematische und experimentelle Modelle wie die „*No-net-flux* Methode“, die „*Zero-flow* Methode“ und die „*near-equilibrium* Dialyse“ werden angewandt. Da die zur Berechnung benötigten Variablen unter experimentellen Bedingungen schwer zu kontrollieren sind, wurden in dieser Arbeit nur die Dialysatkonzentrationen angegeben, die den in den Dialysaten gemessenen Konzentrationen der Substanzen entsprachen.

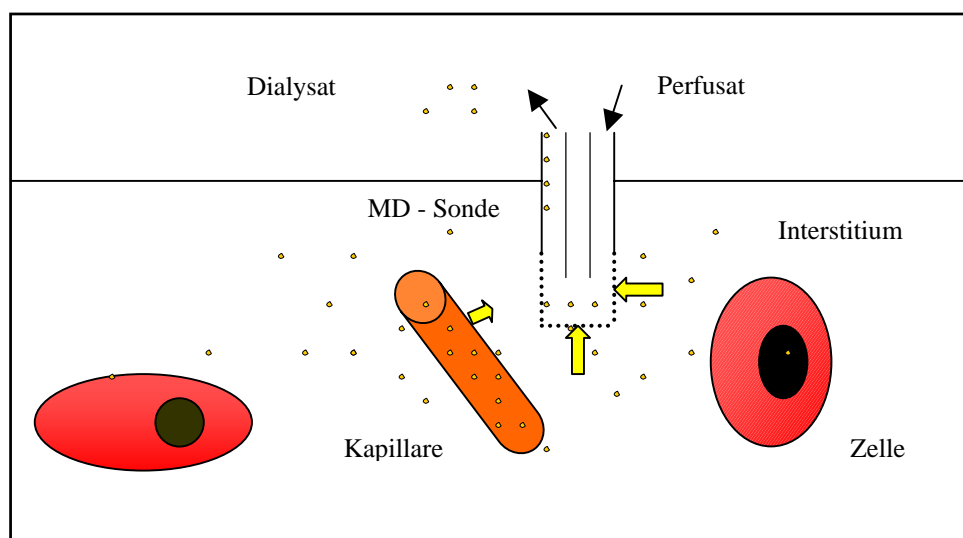


Abb. 6 Funktionsprinzip einer Mikrodialysesonde. Die semipermeable Membran an der Spitze der Sonde ermöglicht den Austausch löslicher Moleküle zwischen der Sonde und dem umgebenden Gewebe. Nachdem die Sonde in das Gewebe implantiert wurde, diffundieren die Moleküle der Interstitiumsflüssigkeit kontinuierlich in das Perfusionsmedium. Proben werden kontinuierlich gesammelt und mit Hilfe der HPLC analysiert.

### 1.3.2 Merkmale der Mikro dialyse

Die Hauptmerkmale und Vorteile der Mikro dialyse lassen sich wie folgt zusammenfassen:

- es wird aCSF gesammelt, die einer sofortigen Analyse zugeführt werden kann
- sie kann in fast jedem Organ und Gewebe des Körpers durchgeführt werden
- sie wird in Geweben des lebenden, wachen und frei beweglichen Tieres durchgeführt
- es kann kontinuierlich für Stunden und Tage in einem Tier gemessen werden
- es können Veränderungen der Neurotransmission auf physiologische und verhaltensrelevante Beeinflussungen festgestellt werden
- Substanzen können ohne zusätzliche Injektion lokal appliziert werden
- es werden alle Substanzen der extrazellulären Flüssigkeit gesammelt, die die Membran passieren können
- die Sensitivität und zeitliche Auflösung der zu messenden Substanzen ist von der Analysetechnik abhängig
- es wird keine langanhaltende Schädigung der Blut-Hirn-Schranke verursacht (Tossmann und Ungerstedt, 1986; Benveniste et al., 1984)

Die Methode schien aufgrund dieser Merkmale geeignet, um am wachen, sich bewegenden Haushuhnküken neurochemische Untersuchungen des Opiatsystems durchzuführen.

Mikrodialytische Untersuchungen am Haushuhnküken werden von wenigen Arbeitsgruppen durchgeführt. Es gibt Arbeiten von M. Grüss (Grüss et al., 2003; 1999; Grüss und Braun, 1997; 1996), Tsukada et al. (1999), die die visuelle und akustische Filialprägung untersuchten sowie von Tachibana et al. (2001) und Daisley et al. (1998).

#### 1.4. Fragestellung

Aus vorangegangenen Arbeiten (siehe Einleitung) ist bekannt, dass das glutamaterge und das dopaminerge System eine wichtige Rolle bei der frühkindlichen Filialprägung der Haushuhnküken spielen (Gruss und Braun, 2003; 1997; 1996; Bredenkötter und Braun, 2000; 1997; Bock und Braun, 1999; Gruss et al., 1999; Bock et al., 1996). Unsere Arbeitshypothese besagt, dass die emotionale und die sensorische Stimulation, die vom Prägeobjekt („Mutter“) ausgeht, auf das Küken wirkt und Veränderungen in verschiedenen Hirngebieten induziert. Ein Gebiet, in dem eine hohe metabolische Aktivierung (dargestellt mit der 2-Deoxyglucose Methode, Müller und Scheich, 1986) sowie eine Änderung der Morphologie der Zellen (Bock und Braun, 1999) und ihrer Aktivität nach der Prägung (Bredenkötter und Braun, 1997) stattfindet, ist das MNH. Die Änderungen unter anderem im MNH können über das Zusammenwirken der emotionalen, motivationalen (Dopamin und Serotonin) und kognitiven (Glutamat) Komponente zur Bindung an das Prägeobjekt („Mutter“) führen. Eine weitere Komponente, die in diesem Kontext von Bedeutung ist, ist Stress, der mit der Konzentration von Serotonin und seiner Metabolite korreliert (Gruss und Braun, 1997). Ebenfalls gut mit Stress korrelierbar ist das Opiatsystem (Sufka et al., 1994; Panksepp et al., 1978b). Aufgrund der hohen Konzentration von  $\mu$ -Opiatrezeptoren im MNH (Csillag et al., 1990; 1989) und der dargestellten Zusammenhänge ergeben sich Fragen hinsichtlich der Beteiligung des Opiatsystems an der Filialprägung von Haushuhnküken. Können  $\mu$ -Opiatrezeptoragonisten oder -antagonisten die Konzentrationen der dopaminergen, serotonergen Metabolite und die von Glutamat beeinflussen und welche Auswirkungen hat diese Veränderung des Zusammenspiels auf die emotionale Situation des Kükens und somit auf die akustische Filialprägung (Abbildung 7)?

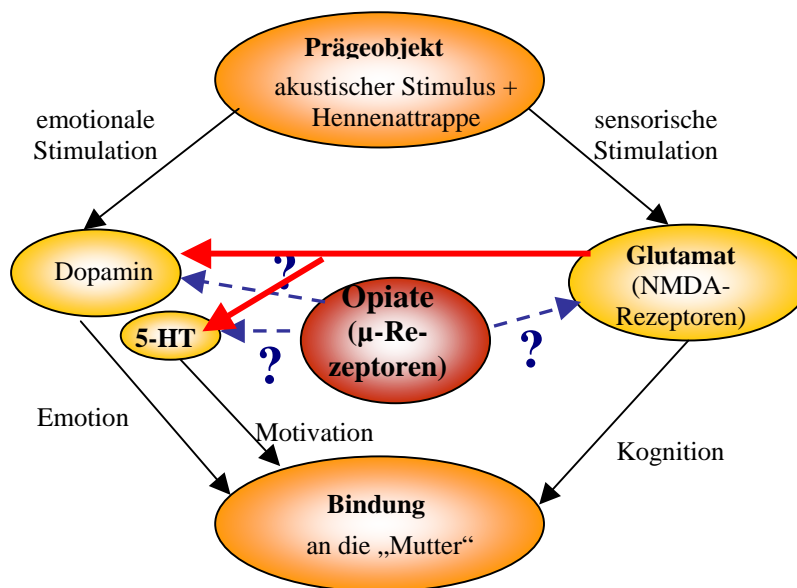


Abb. 7 Hypothetisches Modell der Interaktion verschiedener Aspekte eines emotionalen Lernprozesses, z.B. der auditorischen Filialprägung in Haushuhnküken, ihre neurochemischen Mediatoren und ihre mögliche Modulation durch  $\mu$ -Opiatrezeptor-vermittelte Prozesse. (rot = inhibitorisch).

Die Fragen, die sich aus diesen Ansätzen ergeben, sind folgende:

- I. **Beeinflussen Antagonisten und Agonisten des  $\mu$ -Opiatrezeptors die serotonerge, dopaminerge und/oder glutamaterge Neurotransmission?**
- II. **Ist der Lernprozess der Filialprägung abhängig von der Aktivität der Opiatrezeptoren? Lässt sich die akustische Filialprägung durch die Blockade der  $\mu$ -Opiatrezeptoren verhindern?**
- III. **Ist die Vokalisation von Haushuhnküken, als Zeichen von Stress und somit als Indikator für den internen emotionalen Status, durch die Applikation eines  $\mu$ -Opiatrezeptor Antagonisten modulierbar?**

## **2 MATERIALIEN UND METHODEN**

### **2.1 Pharmakologische Untersuchungen**

#### **2.1.1 Tierhaltung**

Als Versuchstiere dienten Haushuhnküken (*Gallus gallus domesticus*) beiderlei Geschlechts der Rasse Brown Leghorn. Befruchtete Eier wurden aus dem Institut für Kleintierkunde Nauendorf/Merbitz und später von der Lohmann Tierzucht GmbH in Cuxhaven geliefert und in einem Brutschrank unter täglichem Wenden bebrütet (Temperatur:  $37,5 \pm 0,3^{\circ}\text{C}$ , Luftfeuchtigkeit: 70-80%).

Die Tiere, die bei den Mikrodialyseexperimenten verwendet wurden, blieben bis zum Schlupf im Brutschrank und wurden danach gemeinsam in einen separaten Haltungsraum gebracht, der einen 12 Stunden Tag/Nacht Rhythmus und eine Temperatur von  $32 \pm 1^{\circ}\text{C}$  hatte.

Dort lebten sie in einer Haltungsbox (100 x 100 x 30 cm) in einer Kükengruppe von 10 bis 20 Tieren mit freiem Zugang zu Futter und Wasser.

#### **2.1.2 Implantation der Mikrodialysesonde**

Am Tag des Schlupfes (postnataler Tag 0 (PND 0)) wurde eine CMA/11-Mikrodialysesonde (CMA Schweden), mit einer Membranlänge von 1 mm (Membranmaterial Cuprophan) in das Gehirn der Tiere implantiert. Der Aufbau der Sonde ist in Abbildung 8 dargestellt.



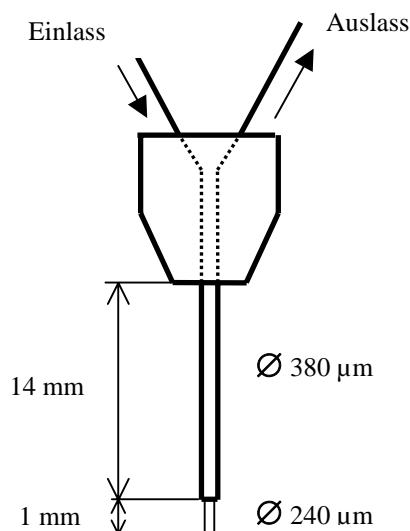


Abb. 8 Schematischer Aufbau einer CMA/11 Mikrodialysesonde.

Die Tiere wurden am Tag des Schlupfes bzw. am PND 6 aus der Haltungsbox entnommen und in ein mit 4%igem Halothan-Luft-Gemisch (Hoechst) gefülltes Gefäß gesetzt. In diesem Halothan-Luft-Gemisch blieben die Tiere ca. 15 min. Nach dieser Zeit wurden die Küken in einer Stereotaxis (Stoelting, USA) fixiert, die Körpertemperatur mit einer Heizmatte konstant gehalten, und mit einem selbst konstruierten Aufsatz weiterhin anästhesiert (1-2 %iges Halothan-Luft-Gemisch). Die Kopffedern und die Kopfhaut wurden entfernt. Mit Hilfe eines Operationsmikroskops (Leica/Wild) wurde der Y-Punkt bestimmt und die Sonde unter Verwendung folgender Koordinaten (bezugnehmend auf den stereotaktischen Atlas von Kuenzel und Masson, 1988) implantiert:

anterior-posterior ausgehend vom Y-Punkt:	+5,3 mm
lateral ausgehend von der Mittellinie:	-0,5 mm
dorsal-ventral ausgehend von der Hirnoberfläche:	-3,4 mm (PND 0)
	-3,6 mm (PND 6)

Um die Sonde in das Gehirn zu implantieren, wurde mit einer feinen Kanüle ein kleiner Teil des Schädeldaches (ca. 0,5 x 0,5 mm) entfernt, die Sonde auf die Hirnoberfläche aufgesetzt und mit sehr geringer Geschwindigkeit eingeführt. Nach 5 min wurde die Sonde mit Zahnzement (Harvard Dental GmbH, Berlin) fixiert. Danach wurde das Tier zurück in die Versuchsbox gelegt, in den Kükenhaltungsraum gebracht und mit Wasser versorgt.

Innerhalb von 10-15 min nach der Operation erwachte das Tier und ca. 2 Stunden später wurde ein zweites Küken dazu gesetzt, um eine soziale Separation zu verhindern. Beide Tiere blieben über Nacht in der Versuchsbox.

Die Operationen wurden immer zur gleichen Tageszeit (12:00 Uhr) durchgeführt.

### 2.1.3 Versuchsdurchführung

Für die Versuche wurde eine Mikrodialyseapparatur verwendet, die aus folgenden Komponenten bestand: eine 3-Kanal-Mikroinjektionspumpe CMA/100 (CMA Schweden), ein Mikrofraktionssammler CMA/140 (CMA Schweden), 1 ml Glasspritzen und eine totvolumenarme Schlauchverbindung (FEB-Tubing, Totvolumen 12µl/m).

Vor Beginn des Experiments wurde die Schlauchverbindung mit einer auch im Experiment verwendeten aCSF (artifizielle Cerebrospinalflüssigkeit) gespült. Die aCSF setzte sich wie folgt zusammen: 120 mM NaCl, 6 mM KCl, 2 mM CaCl<sub>2</sub>, 1,25 mM MgCl<sub>2</sub>, 1,25 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 21 mM NaHCO<sub>3</sub>, pH 7,4 (eingestellt durch Begasung mit Carbogen (95% O<sub>2</sub>, 5 % CO<sub>2</sub>; Linde)).

Die Zusammensetzung entspricht der von Gruß (Gruss et al., 1999) verwendeten aCSF, die sich an die von Babinsky (1990) dargestellten Daten zur Zusammensetzung der Cerebrospinalflüssigkeit von Hühnern anlehnt.

Nach der Spülung der Schlauchverbindung wurde die Sonde an die Pumpe und den Mikrofraktionssammler angeschlossen. In diesem befanden sich 250 µl-Röhrchen, in denen die Proben gesammelt und sofort der Analyse zugeführt (Monoamine) oder bei -20°C (Aminosäuren) bis zu chromatographischen Trennung gelagert wurden.

Die aCSF wurde im Experiment mit einer Geschwindigkeit von 1,1 µl/min durch die im Gehirn befindliche Sonde gepumpt und am Auslass wieder gesammelt. Ein Sammelintervall betrug 20 min. Musste während des Experiments die aCSF gewechselt werden, erfolgte dies manuell, wobei darauf geachtet wurde, dass keine Luftblasen in die Schlauchverbindung gelangten.

Das mikrodialytische Experiment gliedert sich in verschiedene Abschnitte. Abschnitt 1 ist die Äquilibrationsphase. Diese Phase dient zur Beruhigung der Tiere, die zum Anschließen an das System in die Hand genommen wurden, und der Einstellung eines Gleichgewichts zwischen der aCSF, die durch die Sonde fließt, und der körpereigenen CSF. Die Dauer dieser Phase betrug 2-3 Stunden; das dabei gesammelte Dialysat wurde verworfen.

Im zweiten Abschnitt wurde die Basislinie aufgenommen. Es wurden 5-6 Proben gesammelt (in einem Zeitraum von ca. 2 Stunden) und analysiert. Diese Werte bildeten die Basislinie, auf die alle nachfolgenden Werte bezogen wurden. Waren die Werte der Basislinie stabil, d.h. die Konzentrationen von 5-HIAA und HVA in 3 aufeinanderfolgenden Proben wiesen eine Abweichung von < 10% auf, konnte mit dem dritten Abschnitt fortgefahren werden.

Dieser dritte Abschnitt umfasste alle pharmakologischen Manipulationen. In dieser Phase wurden die Konzentrationen der Monoamine und Aminosäuren während und nach einer pharmakologischen Beeinflussung dokumentiert.

Die Gesamtdauer eines Experiments betrug somit im Durchschnitt 7-8 Stunden.

## **2.1.4 Experimentelle Ansätze**

### 2.1.4.1 Experiment 1

In diesem Experiment wurde die Wirkung von 500 µl systemisch appliziertem Naloxon in 2 verschiedenen Konzentrationen, 5 und 50 mg/kg, getestet. Nach Aufnahme der Basislinie wurde den Tieren Naloxon oder als Kontrollsubstanz Saline intraperitoneal appliziert und die Änderungen von 5-HIAA, HVA, Glutamat und Taurin weitere 180 min beobachtet.

Naloxon wurde ebenfalls über die Sonde in das MNH appliziert, um eine lokale Wirkung der Substanz auf die Transmitter im MNH zu testen. Aufgrund analytischer Probleme, ein sehr hohes Signal, das weitere Messungen unmöglich machte, konnte dieser Ansatz nicht weiter verfolgt werden.

### 2.1.4.2 Experiment 2

Mit diesem Experiment wurde charakterisiert, inwieweit eine Blockade der neuronalen Aktivität einen Einfluss auf die Dialysatkonzentrationen von 5-HIAA, HVA, Glutamat und Taurin im MNH hat. Durch die Blockade spannungsabhängiger Na<sup>+</sup>-Kanäle führt die lokale Applikation von Tetrodotoxin (TTX) durch Verhinderung der Entstehung und Weiterleitung von Aktionspotentialen zu einer Abnahme der neuronalen Aktivität, die eine Abnahme der synaptischen Freisetzung und damit eine Abnahme der Dialysatkonzentrationen von Neurotransmittern und -modulatoren zur Folge hat (Westerink et al., 1987a, 1987b).

In dieser Versuchsreihe wurde den Tieren nach Stabilisierung der Basislinie eine aCSF, die 1 µM TTX enthielt, über die Sonde in das MNH appliziert. Diese TTX Applikation wurde während des restlichen Experiments beibehalten.

In einem weiteren Teilexperiment wurden den Tieren 40 min nach Beginn der TTX Applikation 5 mg/kg Naloxon systemisch injiziert und im weiteren Verlauf aller 20 min Proben zur Analyse gesammelt.

#### 2.1.4.3 Experiment 3

Dieses Experiment diente zur Überprüfung der Frage, ob die Transmittersysteme nach Beendigung der sensitiven Phase anders auf die Applikation von Naloxon reagieren und somit auf eine spezielle Rolle der Modulation während der sensitiven Phase hinweisen.

In diesem Versuch wurden Tiere untersucht, die eine Woche alt waren (PND 7) und diese Zeit in einer Gruppe von 10-15 Tieren verbracht hatten. In diesem Alter ist die sensitive Phase abgeschlossen. Der experimentelle Verlauf ist der in Experiment 1 beschriebene.

#### 2.1.4.4. Experiment 4

In den vorangegangenen Experimenten wurde der Einfluss eines Opiatantagonisten untersucht. Dieses Experiment sollte zur Charakterisierung der Transmitterfreisetzung nach der Applikation eines Opiatagonisten dienen.

Experiment 4 wurde in Teilexperiment a und Teilexperiment b gegliedert. Im ersteren sollten die Konzentrationen der 5-HIAA, HVA, von Glutamat und Taurin nach der intraperitonealen Injektion von DAGO untersucht werden. Dazu wurde nach Aufnahme einer stabilen Basislinie DAGO in einer Konzentration von 5 mg/kg injiziert und die Änderungen der Transmitter weitere 180 min analysiert. Im Teilexperiment b wurde nach Aufnahme der Basislinie die aCSF gegen eine aCSF mit 1 mM DAGO ausgetauscht. Diese aCSF wurde 20 min infundiert und danach wieder gegen eine DAGO-freie aCSF getauscht. Die Änderungen der Transmitter wurden in 20 min Intervallen analysiert.

#### 2.1.4.5 Experiment 5

Ähnlich dem Experiment 2 wurde in diesem Versuch TTX (1  $\mu$ M) eingesetzt. Nach Aufnahme der Basislinie wurde die aCSF gegen eine DAGO (1 mM) und TTX-haltige (1  $\mu$ M) aCSF ausgetauscht. Diese wurde 20 min infundiert und danach wieder gegen eine DAGO/TTX-freie aCSF getauscht und die Proben in 20 min Intervallen untersucht.

#### 2.1.4.6 Experiment 6

In diesem Experiment sollte untersucht werden, welche Änderungen der 5-HIAA, HVA, von Glutamat und Taurin zu messen sind, wenn der  $\mu$ -Opiatrezeptor Antagonist und der  $\mu$ -

Rezeptor Agonist gleichzeitig gegeben wurden. Es gliederte sich in Telexperiment a und Telexperiment b. In Telexperiment a wurden beide Substanzen intraperitoneal (5 mg/kg) gegeben. In Telexperiment b wurde Naloxon i.p. (5 mg/kg) und DAGO (1 mM) 20 min über die Sonde in das MNH appliziert und danach die Änderungen der Transmitter in 20 min Intervallen analysiert.

## 2.1.5 Chromatographische Analytik

### 2.1.5.1 Monoamin-Analytik

Die Analyse der Monoamine erfolgte direkt nach Entnahme des Dialysats. Es wurde ein HPLC-System (**H**igh **P**ressure (**P**erformance) **L**iquid **C**hromatography) mit folgenden Komponenten verwendet:

- thermostatischer Autosampler CMA/200 (CMA Schweden),
- Entgaser (Degasys DG 1310)
- HPLC-Doppelkolbenpumpe LC-10AD (Shimadzu),
- elektrochemischer Detektor LC-4C (BAS, USA),
- Interface D 6000 (MERCK-Hitachi)
- computergestütztes Datenaufnahme und –auswertsystem (D-7000 HSM, MERCK-Hitachi)

Nach der automatischen Injektion der Probe (10 bzw. 7 µl) erfolgte die Trennung der Substanzen nach dem Umkehrphasen-Prinzip mit einer Umkehrphasensäule (RP 18, 5 µm, 100 x 2 mm, Packungsmaterial: LiChospher<sup>®</sup>, MERCK). Die Zusammensetzung des verwendeten Laufmittels blieb während der gesamten Zeit konstant (isokratische Trennung).

Zusammensetzung:

50 mM Natrium-Citrat H<sub>2</sub>O (SIGMA)

50 mM Natrium-Acetat 3 H<sub>2</sub>O (MERCK)

2 mM Ethylendiamintetraessigsäure 2 H<sub>2</sub>O, Dinatriumsalz (SIGMA)

1 mM Octan-1-sulfonsäure, Natriumsalz (SIGMA)

+ 7,5 % Methanol „gradient grade“ (KMF)

Der pH Wert des Laufmittels wurde mit NaOH auf 4,1 eingestellt.

Die Trennung der Substanzen erfolgte in der Reihenfolge Dihydroxyphenylelessigsäure (DOPAC), 5-Hydroxyindolessigsäure (5-HIAA), Dopamin (DA), Homovanillinsäure (HVA)

und Serotonin (5-HT). Die Datenerfassung und Auswertung erfolgte mit einem HPLC-Manager (MERCK).

Für die Identifizierung der Peaks und die Berechnung der Dialysatkonzentrationen der einzelnen Substanzen wurden extern Eichkurven mittels Standardsubstanzen von DOPAC, 5-HIAA, DA, HVA und 5-HT erstellt. Der Konzentrationsbereich lag zwischen 1-100 nM.

#### 2.1.5.2 Aminosäure-Analytik

Für die Analyse der Aminosäuren wurde die modifizierte Methode nach Lindroth und Mopper (1979) angewandt.

Für diese Analyse wurde ein HPLC-System genutzt, das aus folgenden Komponenten bestand:

- thermostatischer Autosampler CMA/200 (CMA Schweden),
- HPLC-Pumpe AS-6000 (MERCK)
- Fluoreszenzdetektor RF-535 (Shimadzu, Japan)
- Integrator AS 2000 (MERCK)

Bei dieser Trennung wurde eine Umkehrphasensäule verwendet (RP 18, 5  $\mu$ m, 100 x 4 mm, Packungsmaterial: LiChospher<sup>®</sup>, MERCK). Um die Aminosäuren detektierbar zu machen, wurde vor der Trennung automatisch eine Derivatisierung mit o-Phtaldialdehyd (oPA) + 2-Mercaptoethanol (gebrauchsfertige Lösung, Sigma) durchgeführt. Dabei wurde nach folgendem Programm verfahren: 10  $\mu$ l Dialysat + 10  $\mu$ l oPA-Lösung, Reaktionszeit 2 Minuten bei 11°C, Injektion von 18  $\mu$ l auf die Säule. Zur Eluierung wurde ein nichtlinearer Gradient verwendet (Tabelle 3). Das Laufmittel bestand aus zwei Komponenten: Laufmittel A (LM A) und Laufmittel B (LM B).

Tab. 3 HPLC-Gradient zur Quantifizierung der Aminosäuren

Zeit (min)	LM A (%)	LM B (%)	Flußrate (ml/min)
0	95	5	1,5
3	90	10	1,5
4	80	20	1,5
12	77	23	1,5
13	72	28	1,5
14	70	30	1,5
15	63	37	1,5
16,5	60	40	1,5
17	25	75	1,5
19,5	25	75	1,5
20	95	5	1,5

Zusammensetzung der Laufmittel:

Laufmittel A: 15 mM Phosphatpuffer pH 7,0 (1 ml 85% Phosphorsäure (Roth)/ 1 l aqua dest.)  
mit 10% Methanol „gradient grade“ (KMF)

Laufmittel B: Methanol „gradient grade“ (KMF) mit 10% Phosphatpuffer (siehe LM A)

Der pH-Wert der Laufmittel wurde mit einer 5 M NaOH-Lösung (Merck) auf pH 7,0 eingestellt.

Die Laufmittel wurde vor und während des Gebrauchs mit Helium (LINDE AG) entgast.

Die Daten wurden von einem Integrator aufgenommen, mit dem Programms D25 (MERCK-Hitachi) konvertiert und mit Hilfe des HPLC Managers ausgewertet.

Für die Identifizierung der Peaks und die Berechnung der Dialysatkonzentrationen der einzelnen Substanzen wurden extern Eichkurven mittels Standardsubstanzen von Glutamat und Taurin erstellt. Diese Eichkurven umfassten einen Konzentrationsbereich von 0,01 – 3 µM.

### 2.1.6 Histologie

Zur Überprüfung der Lage der Sonde wurden die Tiere nach dem Experiment dekapitiert, das Gehirn präpariert und bei  $-80^{\circ}\text{C}$  eingefroren. Die Lagerung bis zum Schneiden erfolgte bei  $-20^{\circ}\text{C}$ . Mit einem Kryostaten (MICRON) wurden  $40\ \mu\text{m}$  Serienschnitte angefertigt, diese mit Kresylviolett gefärbt (Nissl-Färbung) und die Lage der Sonde überprüft. Konnte die Lage der Sondenmembran nicht im MNH lokalisiert werden, wurden die Ergebnisse des Experiment nicht in die Auswertung einbezogen.

### 2.1.7 Statistische Auswertung

Die Konzentrationen der Substanzen im Dialysat wiesen interindividuell große Schwankungen auf. Um die Auswertung zu erleichtern, wurde eine in der Mikrodialyse oft verwendete und anerkannte Form der Darstellung, die Angabe in % der Basislinie, gewählt. Dabei wird der Mittelwert der Konzentrationen der vor der pharmakologischen Manipulation genommenen Proben berechnet und auf 100% gesetzt. Alle Werte, einschließlich die Basiswerte, werden als Änderung zu diesem Mittelwert berechnet und in % angegeben.

Für die statistische Auswertung wurde das Programm Sigma Stat 2.0 (Jandel Scientific) verwendet.

Da es sich bei den gewonnenen Ergebnissen nicht um normalverteilte Daten handelt, wurde die statistische Auswertung unter Verwendung nicht-parametrischer Testverfahren durchgeführt.

*Area-under-curves* (AUC's) wurden für jede Behandlung berechnet und eine statistische Auswertung erfolgte separat für die 1. ( $t_{0-60}$ ), 2. ( $t_{60-120}$ ) und 3. ( $t_{120-180}$ ) Stunde des Experiments. Für den Vergleich zur Basislinie wurde eine Friedman Repeated Measures ANOVA on Ranks, gefolgt von einem Dunnett's Test, durchgeführt (Signifikanzniveau:  $p < 0,05$ ). Für den Vergleich zwischen den experimentellen Gruppen wurde eine Kruskal-Wallis ANOVA on Ranks, gefolgt von einem Dunn's Test, durchgeführt (Signifikanzniveau:  $p < 0,05$ ). Waren nur 2 Gruppen zu vergleichen, wurde für Vergleiche zur Basislinie ein Wilcoxon- Test und für Vergleiche zwischen den Gruppen ein Mann-Whitney Rank Sum Test durchgeführt (Signifikanzniveau:  $p < 0,05$ ).



## **2.2 Prägung**

### **2.2.1 Tierhaltung**

Die Tiere in diesen Experimenten wurden, je nach Versuchsplanung, unterschiedlich gehalten. Gruppe A: Die Tiere dieser Gruppe schlüpften im Brutschrank und wurden danach getrennt in einen separaten Haltungsraum (12 Stunden Tag / Nacht – Rhythmus) gebracht und einzeln gehalten. Die einzelnen Tiere lebten in einer Separationsbox (50 x 30 x 30 cm), mit freiem Zugang zu Futter und Wasser, ohne visuellen und sozialen Kontakt zu anderen Küken. Sie wurden nur für die Prägungsversuche, zum Wiegen und Injizieren aus den Separationsboxen entnommen.

Gruppe B: Die Tiere dieser Gruppe wurden in totaler Isolation aufgezogen, um den Einfluss verschiedener Stimuli möglichst gering zu halten. Hierzu dienten speziell angefertigte verschließbare Boxen (60 x 60 x 50 cm), die mit Schaumstoff ausgekleidet waren. Die Boxen waren mit einer Beleuchtung ausgestattet und über eine Zeitschaltuhr wurde ein 12 Stunden Tag/Nacht Rhythmus eingestellt. Belüftet wurden die Boxen durch außen angebrachte Ventilatoren. Angebrütete Eier aus den Brutschänken wurden 2-3 Tage vor dem Schlupftermin einzeln in spezielle Styroporbrutkästen eingelegt und dort bei  $37,5 \pm 0,3^\circ\text{C}$  und einer Luftfeuchtigkeit von 70-80 % ausgebrütet. Nach dem Schlupf wurden die Küken in den Isolationsboxen in Styroporbehältern gehalten. Die Temperatur betrug 28-30°C. Wasser und Futter stand zur freien Verfügung. Die Küken wurden über den gesamten Versuchszeitraum in totaler Isolation gehalten und nur zu den Verhaltensversuchen und zum Injizieren aus den Boxen entnommen.

### **2.2.2 Akustische Filialprägung**

#### **2.2.2.1 Prägereiz und Diskriminierungsreiz**

Zur akustischen Filialprägung wurde als Prägungsreiz ein synthetisch hergestellter rhythmischer Tonpuls angeboten. Dieser Tonpuls war mit einer mittleren Tonfrequenz von 400 Hz amplituden- und frequenzmoduliert (P-Ton) (Bredenkötter und Braun, 1997). Als Diskriminierungsreiz für die spätere Überprüfung der Präferenz für den Prägeton wurde ein ebenfalls rhythmischer amplituden- und frequenzmodulierter Tonpuls mit einer mittleren Frequenz von 700 Hz (D-Ton) verwendet. Die Lautstärke betrug jeweils 70 dB. Zur

Reizübertragung in der Versuchsarena und zum Abspielen von Alternativ- und Prägereiz diente ein handelsüblicher Kassettenrecorder (Tascam), der mit zwei Lautsprecherboxen verbunden war.

### 2.2.2.2 Versuchsaufbau

Die Durchführung der gesamten Versuchsreihe erfolgte in einem abgedunkelten, schallisolierten Raum, in dem eine V-förmige Versuchsarena aufgebaut war (Abbildung 9). Am Ende der Seitenflügel der Arena im Bereich der Zielboxen waren jeweils eine Beleuchtung (60 Watt) und eine Wärmelampe angebracht. Während der Versuche waren die beiden Lampen über der Prägearena die einzigen Lichtquellen, so dass die Versuchstiere in der Arena nicht durch äußere Einflüsse abgelenkt wurden.

Alle Tiere waren vor der akustischen Filialprägung pharmakologisch behandelt worden (vgl. 2.2.3)

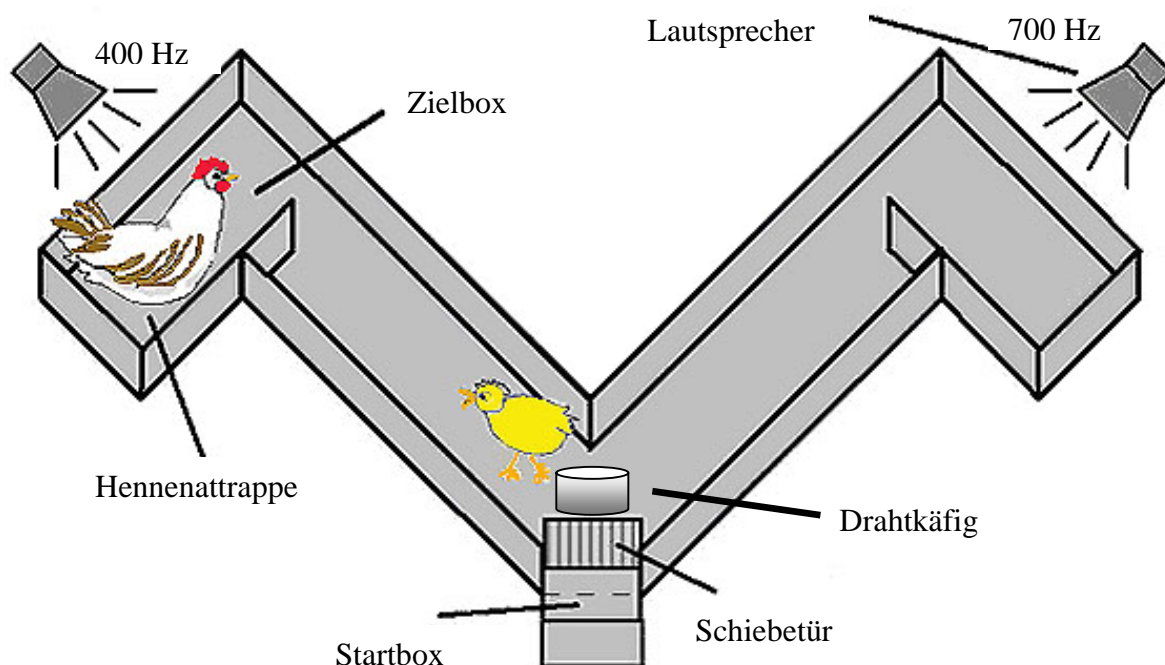


Abb. 9 Schematische Darstellung der Versuchsarena zur Durchführung der akustischen und visuellen Prägeversuche

### 2.2.2.3 Prägung

Die Prägung (P) begann am jeweiligen Schlupftag (Tag 0) der Küken.

Die Küken waren zu Beginn der Prägesitzung etwa 6-12 Stunden alt. Während der Prägesitzung wurde eine Haushuhnattrappe, für die Küken sichtbar, an das Ende eines Seitenflügels gesetzt. Aus dieser Richtung ertönte der 400 Hz Prägeton (P-Ton) mit einer Dauer von 10 Sekunden und 20 Sekunden Pause bis zum nächsten Tonpuls. Die Küken wurden einzeln vor die Startbox der Arena gesetzt und mussten innerhalb von 5 Minuten zu der Haushuhnattrappe laufen. Küken, die innerhalb der 5 Minuten die Attrappe erreichten, wurden für weitere 10 Minuten auf die Attrappe gesetzt und mit dem Prägeton beschallt. Küken, die ihr Ziel nicht erreichten oder am Startpunkt sitzen blieben, wurden von Hand zur Attrappe gebracht, auf diese gesetzt und ebenfalls 10 Minuten mit dem Prägeton beschallt. Nach Ablauf der 10 Minuten erfolgte ein Umschalten des Tones und ein Umsetzen der Attrappe auf die gegenüberliegende Seite und die Prägung wurde unter den oben genannten Bedingungen wiederholt. Nach diesen beiden Prägesitzungen kamen die Versuchstiere zurück in ihre Haltungsboxen.

### 2.2.2.4 Annäherungstest

Am darauffolgenden Tag (Tag 1 nach dem Schlupf) erfolgte zunächst mit jedem Versuchstier ein Annäherungstest, bestehend aus zwei Durchläufen (A1/A2), bei denen die Reizdarbietung auf die akustische Komponente beschränkt wurde.

Die Küken konnten den Prägeton hören, die Attrappe aber nicht sehen. Sie wurden erneut in die Mitte der Arena gesetzt und von der Seite, auf der sich die für das Küken nicht sichtbare Hennenattrappe befand, mit dem Prägeton beschallt. Die Küken mussten innerhalb von 3 Minuten in die Zielbox laufen. Anschließend bleiben die Küken 5 Minuten bei der Attrappe und wurden mit dem Ton beschallt. Tiere, die nicht in die richtige Zielbox liefen bzw. am Startpunkt sitzen blieben, wurden wieder von Hand auf die Attrappe gesetzt und ebenfalls 5 Minuten mit dem Prägeton beschallt. Direkt im Anschluss daran erfolgte der zweite Annäherungslauf, wobei Prägeton und Haushuhnattrappe auf der gegenüberliegenden Seite platziert wurden. Im Unterschied zum ersten Lauf wurden den Küken am Start in einen dafür konstruierten Drahtkäfig gesetzt, um die Tiere am sofortigen Loslaufen zu hindern. Der Drahtkäfig wurde angehoben, nachdem der Prägeton einmal ertönt war. Nach den beiden Annäherungsläufen kamen die Tiere zurück in die Haltungsboxen, um ihnen bis zu den Diskriminationstests eine Erholungspause zu gewähren.

#### 2.2.2.5 Diskriminationstests

Es wurden insgesamt 8 Diskriminationstests durchgeführt, jeweils 4 am Tag 1 (D1-D4) bzw. am Tag 2 (D5-D8) nach dem Schlupf. Die ersten beiden Diskriminationstests fanden etwa eine halbe Stunde nach den Annäherungstests statt. Zwei weitere Tests erfolgen am gleichen Tag, allerdings erst nach einigen Stunden Pause. Die Tests 5-8 fanden am dritten Versuchstag statt. Es wurden niemals zwei Läufe unmittelbar nacheinander durchgeführt, sondern darauf geachtet, dass einige Minuten zwischen den Durchgängen lagen. Die Diskriminationstests dienten zur Überprüfung und Verifizierung des Prägungserfolges und waren allein ausschlaggebend für dessen Bewertung. Der Versuchsaufbau entsprach dem des Annäherungstests, das heißt, die Haushuhnattrappe war auf der Seite, auf der der Prägeton ertönte, verborgen und somit für die Küken erst sichtbar, wenn sie in die entsprechende Zielbox liefen. Im Gegensatz zum Annäherungstest wurden die Küken jetzt alternierend mit dem 400 Hz Prägeton und dem 700 Hz Alternativton (Diskriminationston, D-Ton) beschallt, der aus der entgegengesetzten Zielbox erklang. Diesmal mussten die Küken aus den beiden angebotenen Tönen den Prägeton auswählen und in die Zielbox laufen, aus der der Prägeton kam. Dazu wurden die Küken in die Startbox in der Mitte der Arena im Drahtkäfig positioniert und mit beiden Tönen alternierend beschallt. Nachdem die Küken jeden Ton mindestens einmal hören konnten, wurde der Drahtkäfig angehoben und die Küken mussten innerhalb von 3 Minuten zur richtigen Zielbox laufen. Um eine Präferenz der Küken für eine Seite auszuschließen, wurde die Seite, auf der der Prägeton ertönte, zufällig bestimmt, und es wurde abwechselnd der Prägungs- bzw. der Diskriminationston als Anfangston gewählt.

#### 2.2.2.6 Auswertung

Für die Beurteilung des Prägeerfolges waren nur die Ergebnisse der Diskriminierungstests ausschlaggebend. Die Daten der einzelnen Tests wurden in speziellen Protokollzetteln erfasst. Notiert wurden jeweils die für den Test benötigte Zeit, die Bewertung, ob ein Test negativ oder positiv absolviert wurde, die schematische Skizzierung des jeweiligen Laufes in der Arena sowie Beobachtungen zum Verhalten und zur Vokalisation der Tiere.

Hatte das Tier innerhalb von 3 Minuten die Zielbox erreicht und verblieb mindestens 20 Sekunden dort, wurde der Durchlauf als positiv gewertet. Als negativ wurde ein Durchlauf gewertet, wenn das Tier in die falsche Zielbox lief, keine 20 Sekunden in der richtigen Zielbox verweilte, keine Aufmerksamkeit gegenüber den angebotenen Reizen zeigte und am

Startpunkt sitzen blieb oder innerhalb der vorgegebenen 3 Minuten in keine der beiden Zielboxen lief. Nach einem positiven Versuch wurden die Küken, auf der Attrappe sitzend, noch etwa 1 Minute mit dem Prägeton beschallt. Bei Fehlversuchen wurde sofort abgebrochen und die Küken in die Haltungsboxen zurückgebracht. Für eine erfolgreich gewertete Prägung mussten mindestens 6 der 8 Durchläufe positiv absolviert werden und die erlaubten 2 Fehler müssen an verschiedenen Tagen auftreten.

### 2.2.3 Injektion des $\mu$ -Opiatrezeptor Antagonisten

Ein Teil der Tiere erhielt Injektionen mit Hilfe einer stereotaktischen Maske direkt in das MNH (je 0,5  $\mu$ l Saline oder Naloxon in einer Konzentration von 2 mg/kg, je Hemisphäre), der andere Teil erhielt intraperitoneale (i.p.) Injektionen (Saline oder 5 mg/kg Naloxon, 1 ml). Es erfolgten insgesamt fünf Injektionen (siehe Abbildung 10, dargestellt durch Pfeile), eine am Tag 0 vor der Prägung, eine vor den Annäherungstests A1/A2, eine weitere vor den D-Tests D 3/D 4 am Tag 1 und jeweils vor den D-Tests D 5/D 6 sowie D 7/D 8 am Tag 2.

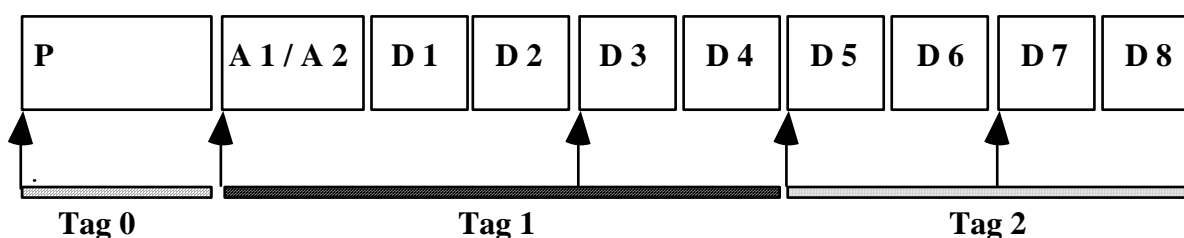


Abb. 10 Injektionsschema, nach dem die Küken injiziert wurden.

P = Prägung

A = Annäherungstest 1 und 2

D = Diskriminationstest 1 bis 8

Um den Einfluss der intraperitonealen Injektionen auf die Entwicklung der Tiere zu überprüfen, wurde einigen Tiere Saline oder Naloxon injiziert, ohne dass eine Prägung durchgeführt wurde. Sie wurden ebenfalls in Einzelhaltungsboxen gehalten und nur zum Wiegen und zur Injektion entnommen.

### 2.2.4 Statistische Auswertung

Die Auswertung der Prägeexperimente erfolgte nach dem  $\chi^2$ -Test. Die Formel, nach der gerechnet wurde, lautet:

$$\chi^2 = \frac{[(a \cdot d) - (b \cdot c)]^2 \cdot N}{S_1 \cdot S_2 \cdot S_3 \cdot S_4}$$

Dabei werden die Variablen wie folgt zugewiesen:

Gruppe	geprägt	ungeprägt	
A	a	b	S <sub>1</sub>
B	c	d	S <sub>2</sub>
	S <sub>3</sub>	S <sub>4</sub>	N

a, b, c, d ist die Anzahl der geprägten bzw. ungeprägten Tiere in der jeweiligen Gruppe (A oder B). S<sub>1</sub> ist die Summe aus a + b, S<sub>2</sub> aus c + d, S<sub>3</sub> aus a + c und S<sub>4</sub> aus b + d, N ist die Gesamtzahl der Tiere, die in diesem Experiment verwendet wurden.

Ergibt sich ein  $\chi^2$ -Wert von kleiner als 3,84, ist keine Signifikanz vorhanden. Bei einem  $\chi^2$ -Wert über 3,84 besteht ein signifikanter Unterschied. Dieser Wert wurde für einen Freiheitsgrad (geprägte oder ungeprägte Tiere) berechnet und entspricht einem Wert von p=0,05.

### 2.3 Vokalisation

Um den Einfluss des  $\mu$ -Rezeptor Antagonisten Naloxon auf die Vokalisation zu testen, wurde folgendermaßen vorgegangen: zwei Tiere wurden am Schlupftag aus der Haltungsbox entnommen und gemeinsam in eine Versuchsbox (24x24x23 cm) mit freiem Zugang zu Futter und Wasser gesetzt. In dieser Versuchsbox blieben die Tiere über Nacht im Haltungsraum. Am Tag 1 wurde ein Tier gewogen und in die Versuchsbox zurückgesetzt. Beide Tiere wurden in eine schallisolierte Akustikbox gebracht, in der sie zunächst 30 min zum Eingewöhnen blieben. Nach den 30 min wurde das zuvor gewogene Tier entnommen, 500  $\mu$ l Saline oder Naloxon (5 mg/kg) intraperitoneal injiziert und zurückgesetzt. Ab diesem Zeitpunkt wurde die Zeit gestoppt, in der das injizierte Tier vokalisierte. Die Messintervalle betragen 4 x 10 Minuten. Des Weiteren wurde das Verhalten (Kontaktaufnahme zum zweiten Tier) des Tieres beobachtet.

### 2.3.1 Statistische Auswertung

Für die statistische Auswertung wurde das Programm Sigma Stat 2.0 (Jandel Scientific) verwendet. Die *Area-under-curves* (AUC's) wurden für die mit Saline und für die mit Naloxon behandelten Tiere berechnet. Der statistische Vergleich beider Gruppen erfolgte mit dem Mann-Whitney U-Test, das Signifikanzniveau betrug  $p < 0,05$ .

### 3 ERGEBNISSE

#### 3.1 Pharmakologische Untersuchungen

Am Haushuhnküken wurden pharmakologische Untersuchungen durchgeführt, um die Reaktionen des dopaminergen, des serotonergen und des glutamatergen Transmittersystems auf eine Manipulation des Opiatsystems, speziell des  $\mu$ -Opiatrezeptors, der in hohen Konzentrationen im MNH exprimiert wird (Csillag et al., 1991), zu untersuchen. Für diese Manipulationen wurde der  $\mu$ -Opiatrezeptor Antagonist Naloxon, der im Huhn relativ spezifisch für den  $\mu$ -Rezeptor ist (Csillag et al., 1989; 1991), und der  $\mu$ -Opiatrezeptor spezifische Agonist DAGO gewählt.

Es wurden zwei verschiedene Naloxonkonzentrationen getestet (5 mg/kg und 50 mg/kg) und im weiteren Verlauf die geringere Konzentration eingesetzt, da diese bereits Änderungen der Transmitterkonzentrationen bewirkte. Weiterhin ist dies eine in der Literatur häufig verwendete Konzentration (Sufka et al., 1994; Panksepp et al., 1980b).

Die Konzentration der 5-Hydroxyindolessigsäure (5-HIAA), als Abbauprodukt des Serotonins (über die Monoaminoxidase, MAO), und die Konzentration der Homovanillinsäure (HVA), als Abbauprodukt des Dopamins (über die MAO und über die Catechol-O-Methyltransferase, COMT), im Dialysat wurden mit Hilfe der HPLC bestimmt. Serotonin und Dopamin selbst waren aufgrund des jungen Alters der Tiere und der daraus resultierenden geringen Konzentration im Dialysat nicht nachweisbar (Gruss und Braun, 1997; Gruss et al., 1999; 2003). Diese geringen Konzentrationen von 5-HIAA und HVA in MHN des 1 tägigen Kükens können die Folge geringer Transmitterkonzentrationen (verglichen mit den Konzentrationen im erwachsenen Nagerhirn) sein, und trotzdem, zumindest teilweise, die Änderungen in der synaptischen Aktivität widerspiegeln (Bredenkötter und Braun, 1997; 2000; Gruss und Braun, 1997).

Des Weiteren wurden die Aminosäuren Glutamat, als Transmitter; und Taurin aufgenommen. Diese Aminosäure kann, besonders in jungen Tieren, als Indikator für eventuelle Zellschädigungen dienen (Wade et al., 1988; Law, 1994; Davies et al., 1998) und ist ebenfalls als inhibitorischer Neurotransmitter bekannt (Engelmann et al., 2001). Sie ist im Kükengehirn in sehr hoher Konzentration vorhanden.

Die Darstellung der pharmakologischen Daten erfolgt in Diagrammen, in die jeweils ein zweites Diagramm eingefügt wurde. Das Hauptdiagramm zeigt die einzelnen Mittelwerte der Experimentalgruppen mit ihren Abweichungen (SEM). Das eingefügte Diagramm



repräsentiert die *Areas under curve* (AUC's) für jede Stunde des Experiments. Diese AUC's wurden für die statistischen Berechnungen herangezogen.

### 3.1.1 Basislinienkonzentrationen

Die Basislinienkonzentrationen der 5-HIAA, einem Metabolit des Serotonins, der HVA, einem Metabolit des Dopamins, sowie von Glutamat und Taurin, gemessen in allen Experimenten, sind in Tabelle 4 zusammengefasst. Im Vergleich der Behandlungsgruppen zum Mittelwert, der aus allen Gruppen gebildet wurde, gab es teilweise signifikante Unterschiede in den Basislinienkonzentrationen (\*  $p < 0,05$ ; Kruskal-Wallis ANOVA gefolgt von einem Dunn's Test).

Tab. 4 Basislinienkonzentrationen von 5-HIAA, HVA, Glutamat und Taurin in den einzelnen Experimenten am Tag 1. Die Mittelwerte der Behandlungsgruppen wurden gegen den Gesamtmittelwert verglichen. Signifikante Unterschiede waren bei der 5-HIAA und bei Taurin zu finden (\*  $p < 0,05$ ; Kruskal-Wallis ANOVA gefolgt von einem Dunn's Test).

Experiment		Konzentration der Metabolite		Konzentration der Aminosäuren	
		5-HIAA (nM)	HVA (nM)	Glutamat ( $\mu$ M)	Taurin ( $\mu$ M)
1a	Saline i.p.	22,3 $\pm$ 2,1	18,7 $\pm$ 0,9	0,28 $\pm$ 0,06	2,47 $\pm$ 0,18*
1a	Naloxon i.p. (5 mg/kg)	29,1 $\pm$ 2,7	34,4 $\pm$ 4,4	0,43 $\pm$ 0,06	2,98 $\pm$ 0,41*
1b	Naloxon i.p. (50 mg/kg)	23,7 $\pm$ 7,7	17,4 $\pm$ 2,1	0,20 $\pm$ 0,02	5,35 $\pm$ 0,35
2a	Naloxon i.p.+ TTX (MNH)	40,0 $\pm$ 4,4*	19,9 $\pm$ 2,9	0,22 $\pm$ 0,05	5,66 $\pm$ 0,84
2b	TTX (MNH)	20,6 $\pm$ 1,4	20,8 $\pm$ 1,3	0,36 $\pm$ 0,07	6,50 $\pm$ 0,86
4a	DAGO i.p.	27,5 $\pm$ 1,6	20,1 $\pm$ 1,0	0,53 $\pm$ 0,07	6,19 $\pm$ 0,37*
4b	DAGO (MNH)	25,4 $\pm$ 1,6	26,9 $\pm$ 2,0	0,33 $\pm$ 0,09	3,65 $\pm$ 0,37
5	DAGO (MNH)+ TTX (MNH)	16,5 $\pm$ 0,7	14,2 $\pm$ 0,4	0,64 $\pm$ 0,12	4,89 $\pm$ 0,30
6a	DAGO i.p. + Naloxon i.p.	27,3 $\pm$ 1,9	25,2 $\pm$ 1,8	0,38 $\pm$ 0,05	5,72 $\pm$ 0,22
6b	DAGO (MNH) + Naloxon i.p.	22,9 $\pm$ 2,6	21,4 $\pm$ 1,7	0,38 $\pm$ 0,05	3,93 $\pm$ 0,31
	<b>Mittelwert</b>	<b>25,1 <math>\pm</math> 0,7</b>	<b>22,7 <math>\pm</math> 0,8</b>	<b>0,37 <math>\pm</math> 0,02</b>	<b>4,81 <math>\pm</math> 0,17</b>

### 3.1.2 Injektion des Opiatantagonisten Naloxon

#### Experiment 1

Der Einfluss des Opiatantagonisten Naloxon auf 5-HIAA, HVA, Glutamat und Taurin wurde getestet, indem zwei verschiedene Konzentrationen, 5 mg/kg und 50 mg/kg, intraperitoneal injiziert wurden ( $n = 6$  /Konzentration); der Vergleichsgruppe wurde Saline i.p. injiziert ( $n=5$ ).

5-HIAA zeigte nach der Injektion von 5 mg/kg Naloxon nach 40 min ein Anstieg der Konzentration auf  $127 \pm 11 \%$ , der nach 60 min den höchsten Wert von  $143 \pm 13 \%$  erreichte. Nach der Injektion von 50 mg/kg Naloxon wurde der höchste Wert ( $160 \pm 12 \%$ ) bereits nach 40 min erreicht.

Die Konzentration der HVA stieg nach einer Gabe von 5 mg/kg Naloxon nach 80 min auf  $127 \pm 16 \%$  an. Wurde 50 mg/kg Naloxon injiziert, erreichte die Konzentration der HVA  $147 \pm 15 \%$ . Beide Metabolite hatten nach 180 min das Basislinienniveau wieder erreicht.

Die Glutamatkonzentration fiel bei beiden Naloxonkonzentrationen bis auf  $85 \pm 14 \%$  bzw.  $77 \pm 10 \%$  leicht ab. Die Taurinkonzentration im Dialysat änderte sich bei beiden Konzentrationen nicht (5 mg/kg) bzw. nur gering ( $119 \pm 4 \%$  nach 50 mg/kg).

Nach der Injektion von Saline änderten sich die Konzentrationen von 5-HIAA, HVA und Taurin nicht. Die Glutamatkonzentration zeigte einen leichten Anstieg (auf max. 124 %).

Abbildung 11 fasst dieses Experiment zusammen. Im Vergleich zur Basislinie waren die Konzentrationen der 5-HIAA in den Zeitintervallen  $t_{0-60 \text{ min}}$  und  $t_{60-120 \text{ min}}$  nach der Injektion von 5 mg/kg oder 50 mg/kg Naloxon signifikant erhöht ( $p<0,05$ ).

Die extrazelluläre Konzentration der HVA wurde durch die Injektion von 5 mg/kg Naloxon nicht beeinflusst. Die Applikation von 50 mg/kg Naloxon ( $p<0,05$ ) führte in den Zeitintervallen  $t_{0-60 \text{ min}}$  und  $t_{60-120 \text{ min}}$  im Vergleich zur Basislinie zu einer Erhöhung. Glutamat und Taurin änderten sich nach der Injektion von 5 oder 50 mg/kg Naloxon nicht. Die Injektion von Saline führte zu keinen signifikanten Änderungen. Im Vergleich der 3 Experimentalgruppen wurden signifikante Effekte für 5-HIAA ( $p<0,05$ ) gefunden, während HVA, Glutamat und Taurin keine Unterschiede aufwiesen. Der signifikante Anstieg der 5-HIAA ( $p<0,05$ ) wurde nach der Injektion von 5 bzw. 50 mg/kg Naloxon während des Zeitintervalls  $t_{60-120 \text{ min}}$  im Vergleich zur Saline- behandelten Gruppe gefunden.

Um die Tiere möglichst wenig pharmakologisch zu belasten, wurden alle folgenden Experimente mit einer Naloxonkonzentration von 5 mg/kg durchgeführt.

### 3.1.2.1 Naloxon und TTX

#### Experiment 2

Durch die Applikation von Tetrodotoxin (TTX) wird die Weiterleitung der neuronalen Aktivität durch eine Blockade der Na<sup>+</sup>-Kanäle verhindert (Westerink et al., 1987a; 1987b).

Inwiefern diese Blockade einen Einfluss auf die Konzentrationsänderung der Metabolite und Aminosäuren während einer Naloxoninjektion hat, wurde untersucht, indem die normale aCSF nach Aufnahme der Basislinie gegen eine aCSF mit TTX (1 µM) ausgetauscht und nach 40 min Naloxon, 5 mg/kg, injiziert wurde (n = 6).

Die Wirkung von TTX auf die einzelnen Metabolite und Aminosäuren wurde in einer weiteren Gruppe untersucht, der nur TTX infundiert wurde (n=6).

Eine Darstellung dieser Ergebnisse findet sich in Abbildung 12. Die Änderungen der Transmitterkonzentrationen nach der Applikation von Naloxon wurden im vorhergehenden Abschnitt beschrieben.

Nach dem Wechsel auf eine TTX-haltige aCSF stieg die Konzentration der 5-HIAA kurzzeitig auf  $117 \pm 11$  an, wies in diesem Bereich allerdings eine hohe Variabilität auf, und sank im Weiteren nach 80 min auf  $77 \% \pm 5$  der Basislinie ab und blieb auf diesem Niveau. Die Applikation von TTX in der zweiten Gruppe bewirkte ebenfalls einen kurzen Anstieg auf  $120 \pm 19 \%$ . Nach der Injektion von 5 mg/kg Naloxon erfolgte ein kurzer Anstieg der Konzentration auf  $108 \pm 12 \%$  nach 100 min. Im Folgenden sank die Konzentration und erreichte nach 180 min den tiefsten Wert mit  $72 \pm 7 \%$ .

Die Konzentration der HVA sank während der TTX Infusion und erreichte nach 140 min mit  $72 \pm 7 \%$  den tiefsten Wert. Die Applikation von Naloxon führte zu einem Anstieg der Konzentration der HVA nach 20 min bis auf  $138 \pm 34 \%$  und nach 140 bzw. 180 min zu einer Senkung bis auf 85 % der Basislinie.

Die Glutamatkonzentration stieg in der TTX-Gruppe an und erreichte ihren höchsten Wert nach 140 min ( $252 \pm 67\%$ ), zeigte allerdings sehr hohe Varianzen im weiteren Verlauf. Ein ähnlicher Verlauf war nach der Applikation von Naloxon zu beobachten.

Die Infusion von TTX führte bei Taurin nach 20 min zu einem kurzzeitigen Abfall der Konzentration auf  $89 \pm 3\%$  und stieg wieder auf 100 % der Basislinie. Die folgende Naloxonapplikation bewirkte einen Abfall der Taurinkonzentration, die nach 160 min einen Wert von 60 % erreichte.

Im Vergleich zur Basislinie waren die Konzentrationen der 5-HIAA und der HVA in den Zeitintervallen  $t_{60-120 \text{ min}}$  und  $t_{120-180 \text{ min}}$  nach der Infusion von TTX ( $1 \mu\text{M}$ ) signifikant gesunken ( $p < 0,05$ ). Die Glutamat- und Taurinkonzentrationen änderten sich nach der Infusion von TTX nicht. Die extrazelluläre Konzentration der 5-HIAA wurde durch die gleichzeitige Applikation von 5 mg/kg Naloxon und TTX im Zeitintervall  $t_{120-180 \text{ min}}$  signifikant gesenkt ( $p < 0,05$ ). Die Ko-applikation bewirkte keine Änderung der HVA-, Glutamat- und Taurinkonzentration. Der Vergleich zwischen den Gruppen zeigte nur eine signifikante Änderung der 5-HIAA-Konzentration der Kombination gegen Naloxon allein im Zeitintervall  $t_{120-180 \text{ min}}$  ( $p < 0,05$ ). HVA, Glutamat und Taurin zeigten keine signifikanten Unterschiede zwischen diesen beiden Gruppen.

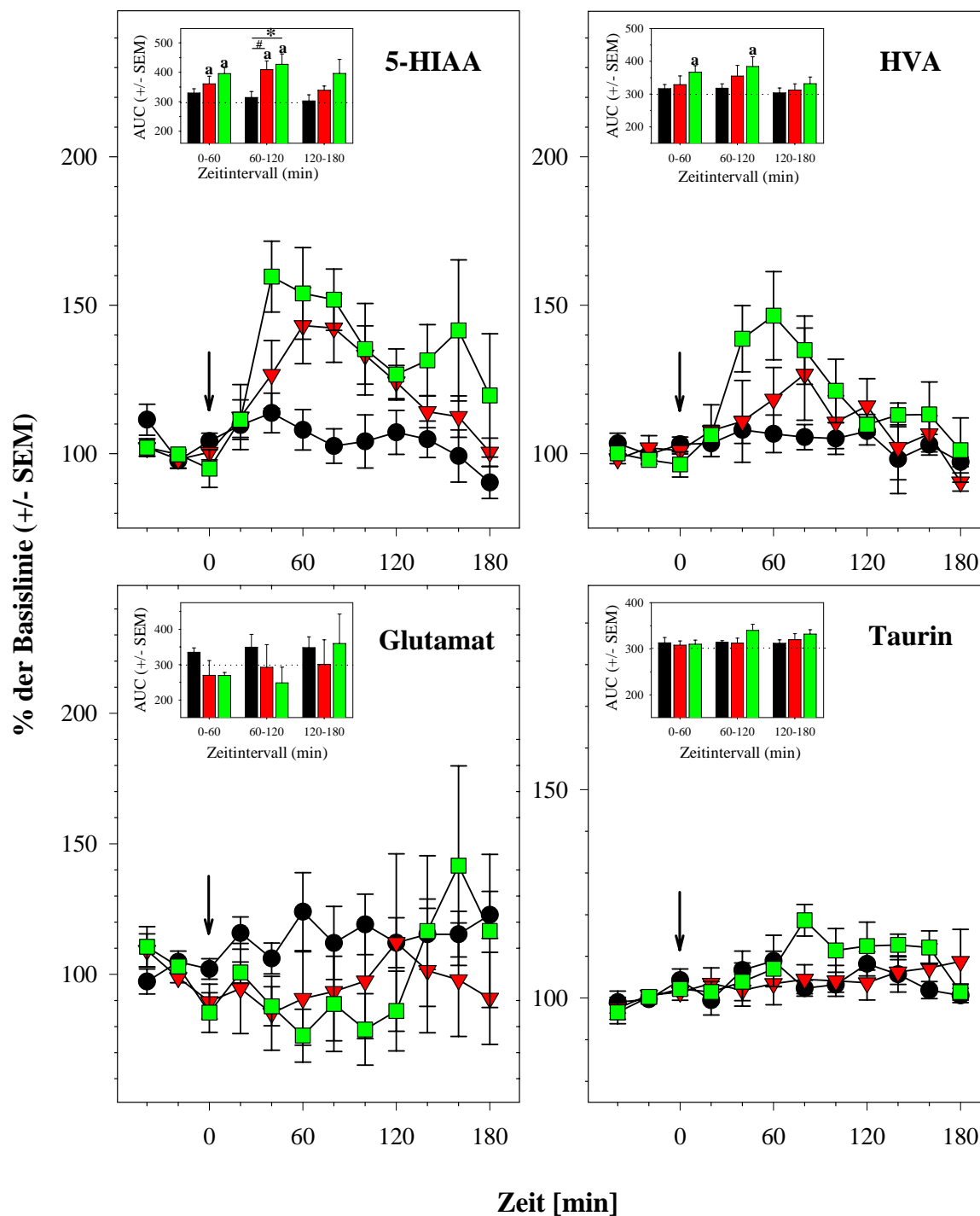


Abb. 11 zeigt den Effekt der systemischen Injektion von Saline (schwarze Kreise) und Naloxon 5 mg/kg (rote Dreiecke) oder 50 mg/kg (grüne Quadrate) auf die Konzentration von 5-HIAA, HVA, Glutamat und Taurin im MNH. Die Daten sind als % der Basislinie +/- SEM angegeben. Die Pfeile zeigen den Zeitpunkt der i.p. Injektion. Die Inserts repräsentieren die kumulierten Änderungen für die Zeitpunkte  $t_{0-60 \text{ min}}$ ,  $t_{60-120 \text{ min}}$  und  $t_{120-180 \text{ min}}$  nach Saline (schwarz), 5 mg/kg Naloxon (rot) oder 50 mg/kg Naloxon (grün) Injektion. a:  $p < 0,05$  vs. BL; #  $p < 0,05$  Saline vs. 5 mg/kg Naloxon; \*  $p < 0,05$  Saline vs. 50 mg/kg Naloxon.

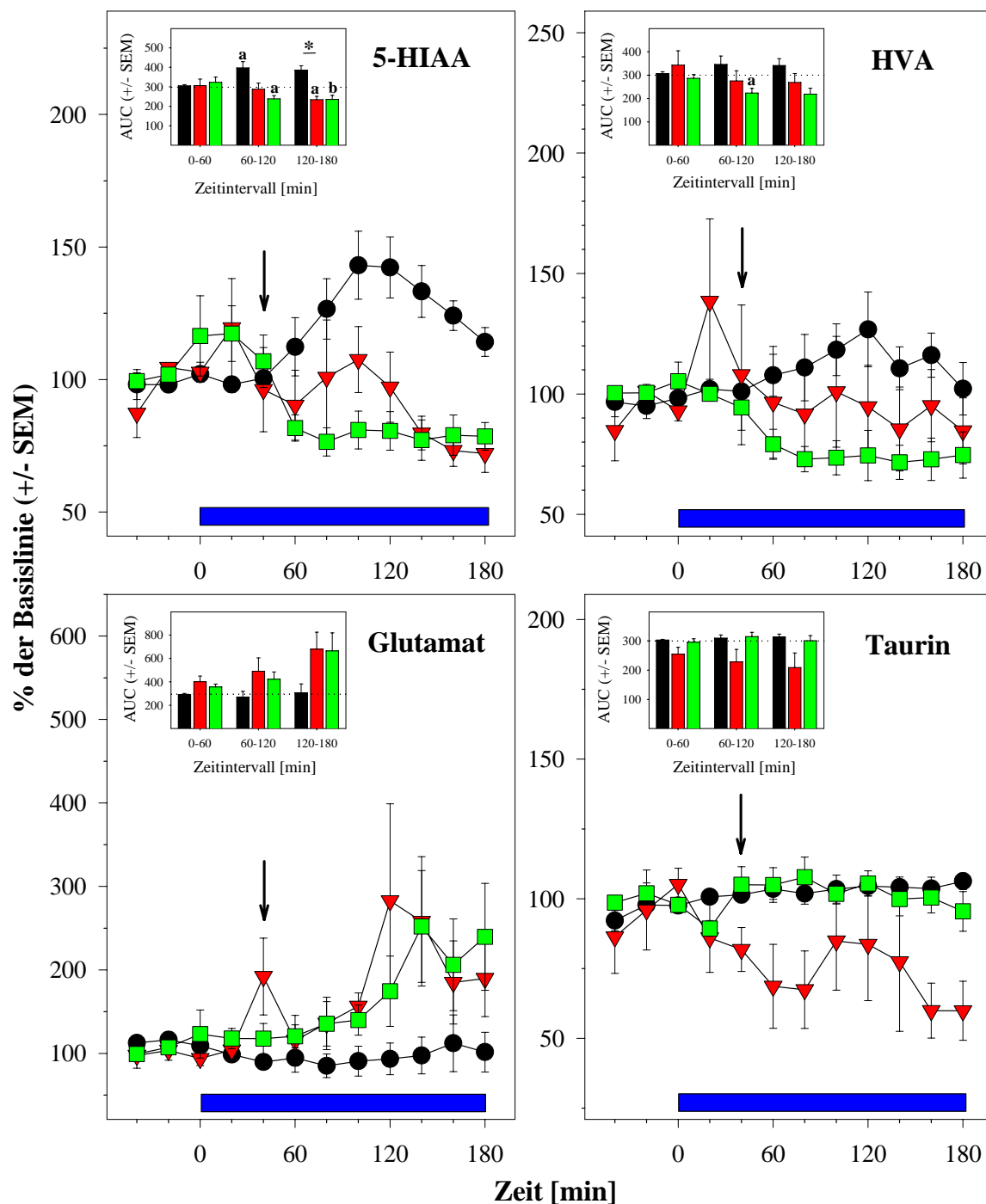


Abb. 12 zeigt den Effekt der systemischen Injektion von Naloxon 5 mg/kg (schwarze Kreise), der Infusion von TTX 1  $\mu$ M (grüne Quadrate) und der simultanen Gabe beider Substanzen (rote Dreiecke) auf die Konzentration von 5-HIAA, HVA, Glutamat und Taurin im MNH. Die Daten sind als % der Basislinie +/- SEM angegeben. Die Pfeile zeigen den Zeitpunkt der i.p. Injektion von Naloxon und die Balken die Dauer der TTX Infusion. Die Inserts repräsentieren die Änderungen für die Zeitpunkte  $t_{0-60}$  min,  $t_{60-120}$  min und  $t_{120-180}$  min nach 5 mg/kg Naloxon (schwarz), Naloxon+TTX (rot) oder 1  $\mu$ M TTX (grün). a  $p < 0,05$  vs. BL; b  $p < 0,06$  vs. BL, \*  $p < 0,05$  5 mg/kg Naloxon vs. 5mg/kg Naloxon+1  $\mu$ M TTX.

### 3.1.2.2 Injektion von Naloxon in verschiedenen Altersstadien

#### Experiment 3

Die Rezeptoren des Opiatsystems im Haushuhnküken weisen während der ersten Lebenstage eine sehr hohe Dichte auf, die später zurückgeht und im adulten Tier geringer ist (Pert et al., 1974; Bardo et al., 1982). Um zu testen, ob in älteren Tieren, d.h. nach Abschluss der sensitiven Phase, eine andere Reaktion auf Naloxon hervorgerufen wird, wurde Tieren im Alter von 7 Tagen nach dem Schlupf (postnataler Tag 7 (PND 7)) 5 mg/kg Naloxon i.p. (n = 6) injiziert, die Konzentrationen von 5-HIAA, HVA, Glutamat und Taurin gemessen und mit denen am Tag 1 (PND 1; vgl. Exp. 1) verglichen.

#### Naloxoninjektion am Tag 1 und am Tag 7

Die Ergebnisse der Injektion von 5 mg/kg Naloxon an beiden Tagen sind in Abbildung 13 dargestellt. Die Basislinienwerte für 5-HIAA, HVA, Glutamat und Taurin am PND 1 und PND 7 werden in Tabelle 5 gezeigt.

5-HIAA zeigte nach der Injektion von 5 mg/kg Naloxon am PND 1 nach 40 min ein Anstieg der Konzentration auf  $127 \pm 11 \%$ , der nach 60 min den höchsten Wert von  $143 \pm 13 \%$  erreichte. Die Konzentration der HVA stieg nach einer Gabe von 5 mg/kg Naloxon nach 80 min auf  $127 \pm 16 \%$  an. Beide Metabolite hatten nach 180 min das Basislinienniveau wieder erreicht. Die Glutamatkonzentration fiel nach der Injektion von Naloxon am Tag 1 bis auf  $77 \pm 10 \%$  ab. Die Taurinkonzentration im Dialysat änderte sich nicht.

Im Vergleich zur Basislinie war die Konzentration der 5-HIAA in den Zeitintervallen  $t_{0-60 \text{ min}}$  und  $t_{60-120 \text{ min}}$  nach der Injektion von 5 mg/kg signifikant erhöht ( $p < 0,05$ ).

Die extrazelluläre Konzentration der HVA, von Glutamat und Taurin änderten sich nach der Injektion von 5 mg/kg Naloxon nicht.

Am PND 7 stieg die Konzentration der 5-HIAA 60 min nach der Injektion auf  $128 \pm 22 \%$  an und wies sehr hohe Variabilitäten auf. Werden die Varianzen verglichen, sind sie am PND 7 höher als am PND 1.

Die HVA-Konzentration stieg ebenfalls gering an und erreichte nach 60 min einen Wert von  $121 \pm 12 \%$ . Wurden die Änderungen am PND 1 und am PND 7 verglichen, zeigten sich keine Unterschiede.



Die Glutamatkonzentration stieg am PND 7 an, und erreichte nach 80 min  $209 \pm 72$  %, wies allerdings ebenfalls eine hohe Variabilität auf. Taurin änderte sich nach der Naloxonapplikation zu beiden Zeitpunkten nicht.

Verglichen zur Basislinie konnte am PND 7 nur bei der Konzentration der 5-HIAA im Zeitintervall  $t_{60-120 \text{ min}}$  ein signifikanter Unterschied festgestellt werden ( $p < 0,05$ ).

Die Vergleiche zwischen den Gruppen zeigten für keine der analysierten Substanzen zu keinem der Zeitpunkte der Untersuchung signifikante Unterschiede.

Werden die 5-HIAA Konzentrationen der einzelnen Tiere betrachtet, lassen sich diese am PND 7 in Bezugnahme auf die Änderungen der 5-HIAA-Konzentration in zwei Gruppen teilen (siehe Abbildung 14). Gruppe 1, in denen nach der Naloxoninjektion keine Änderung der 5-HIAA Konzentration zu beobachten ist, während Gruppe 2 einen starken Anstieg aufweist. Nach 60 min liegt die Konzentration der 5-HIAA in Gruppe 1 bei  $103 \pm 23$  %, während die der 2. Gruppe bei  $178 \pm 26$  % liegt. Die Werte unterscheiden sich um ca. 50 %. Dieser Trend setzt sich auch bei der HVA fort. In Gruppe 1 wird der höchste Wert mit  $115 \pm 12$  % nach 80 min erreicht. Zu diesem Zeitpunkt lag die Konzentration in Gruppe 2 bei  $133 \pm 10$  %. Glutamat und Taurin zeigen diese Unterschiede nicht. Signifikanztests wurden nicht durchgeführt, da die Anzahl der Tiere in den geteilten Gruppen zu klein war.

Tab. 5 Basislinienwerte von 5-HIAA, HVA, Glutamat und Taurin an den PND 1 und 7. (5-HIAA, Glutamat, Taurin:  $p < 0,05$ ; HVA:  $p = 0,052$ ; Mann-Whitney-U-Test). Die Werte für PND 1 wurden aus den Konzentrationen der gemessenen Substanzen aller Experimente berechnet.

	<b>5-HIAA</b> [nM]	<b>HVA</b> [nM]	<b>Glutamat</b> [µM]	<b>Taurin</b> [µM]
<b>PND 1</b>	$25,1 \pm 0,7$	$22,7 \pm 0,8$	$0,4 \pm 0,02$	$4,8 \pm 0,2$
<b>PND 7</b>	$29,0 \pm 6,7$	$29,2 \pm 6,7$	$0,2 \pm 0,04$	$7,3 \pm 1,1$

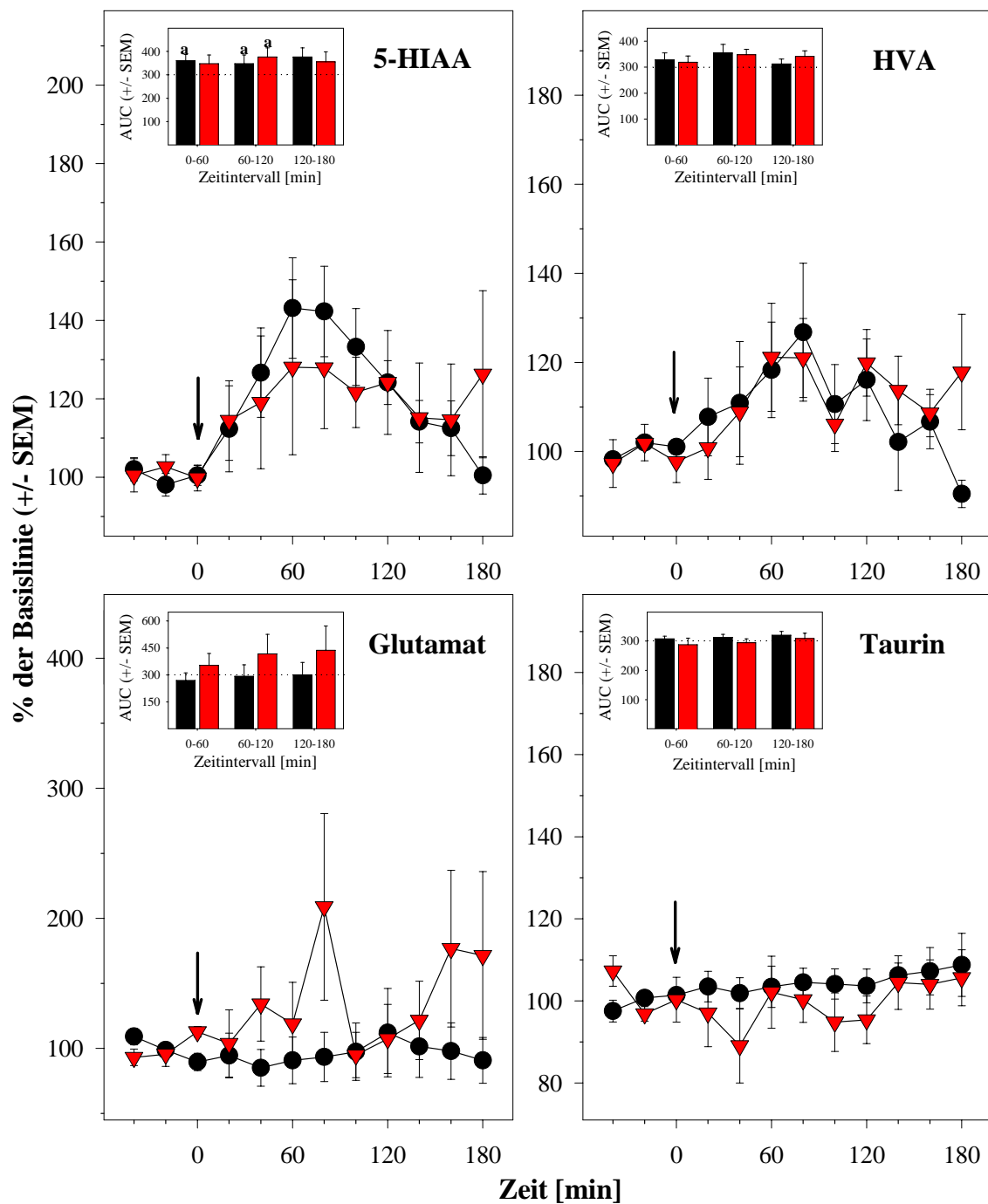


Abb. 13 zeigt den Effekt der systemischen Injektion von Naloxon 5 mg/kg am PND 1 (schwarze Kreise) und am PND 7 (rote Dreiecke) auf die Konzentration von 5-HIAA, HVA, Glutamat und Taurin im MNH. Die Daten sind als % der Basislinie +/- SEM angegeben. Die Pfeile zeigen den Zeitpunkt der i.p. Injektion von Naloxon. Die Inserts repräsentieren die Änderungen für die Zeitpunkte  $t_{0-60 \text{ min}}$ ,  $t_{60-120 \text{ min}}$  und  $t_{120-180 \text{ min}}$  nach 5 mg/kg Naloxon, PND 1 (schwarz) und PND 7 (rot). a  $p < 0,05$  vs. BL

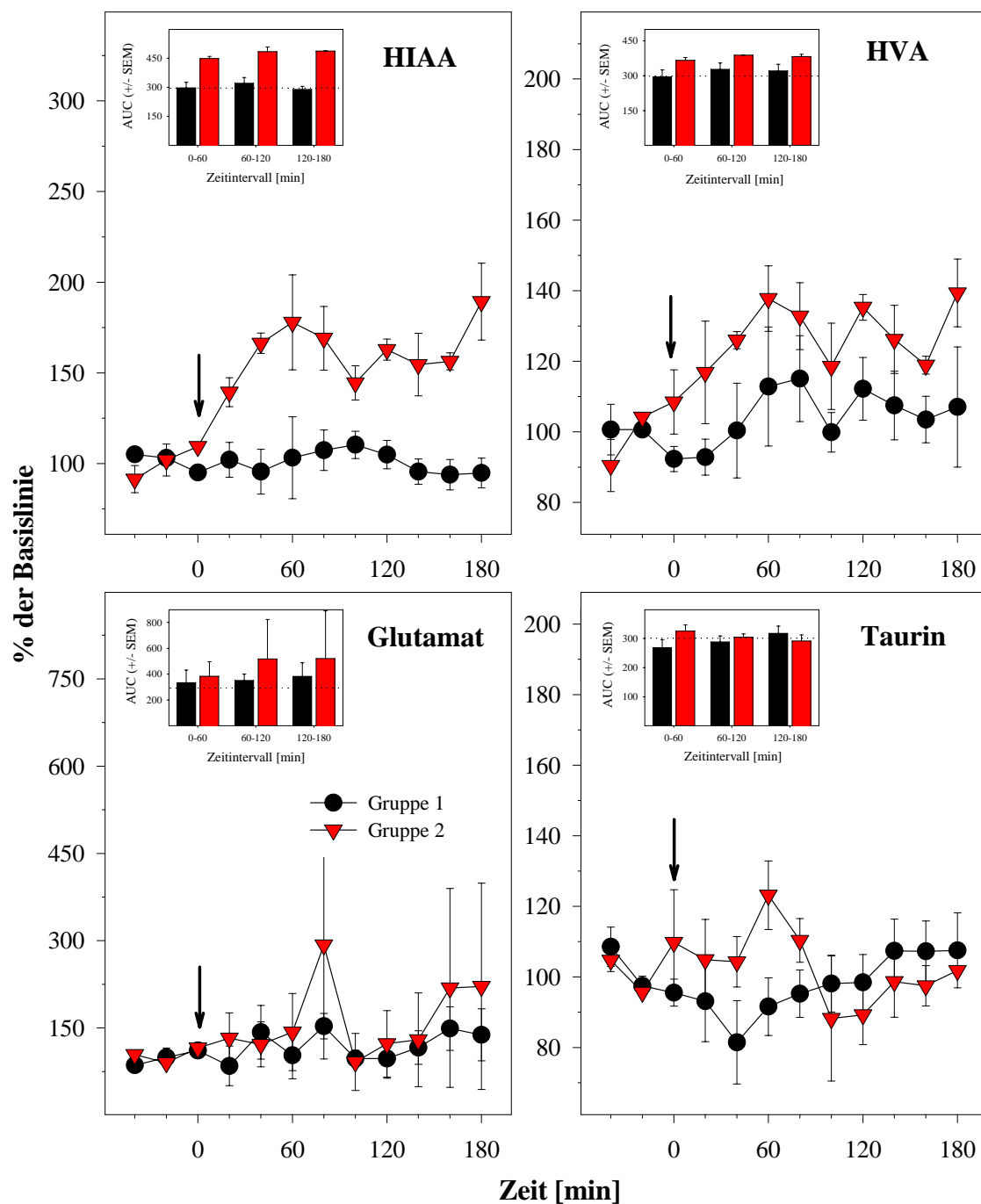


Abb. 14 zeigt den Effekt der systemischen Injektion von Naloxon 5 mg/kg am PND 7 auf die Konzentration von 5-HIAA, HVA, Glutamat und Taurin im MNH. Die Tiere wurden in 2 Gruppen unterteilt, Gruppe 1 (schwarze Kreise) und Gruppe 2 (rote Dreiecke) Die Daten sind als % der Basislinie  $\pm$  SEM angegeben. Die Pfeile zeigen den Zeitpunkt der i.p. Injektion. Die Inserts repräsentieren die Änderungen für die Zeitpunkte  $t_{0-60}$  min,  $t_{60-120}$  min und  $t_{120-180}$  min nach 5 mg/kg Naloxon, Gruppe 1 (schwarz) und Gruppe 1 (rot). Aufgrund der geringen Tierzahl in den geteilten Gruppen wurden keine statistischen Vergleiche durchgeführt.

### 3.1.3 Injektion und Infusion des Opiatagonisten DAGO

#### Experiment 4a

Nachdem die Wirkung des  $\mu$ -Rezeptor Antagonisten Naloxon auf die serotonerge, dopaminerge und glutamaterge Neurotransmission untersucht wurde, sollte in diesem Ansatz die Wirkung des  $\mu$ -Rezeptor Agonisten DAGO betrachtet werden. DAGO wurde intraperitoneal oder direkt in das MNH appliziert.

#### 3.1.3.1 Injektion (i.p.) des Agonisten DAGO

Nach Aufnahme der Basislinie wurde den Tieren dieser Gruppe 500  $\mu$ l DAGO (5 mg/kg) intraperitoneal injiziert (n = 5). Die Änderungen der Metabolite 5-HIAA und HVA sowie von Glutamat und Taurin wurden in den folgenden drei Stunden analysiert. Die Ergebnisse sind in Abbildung 15 dargestellt.

Die intraperitoneale Injektion von DAGO führte zu einer leichten Senkung der 5-HIAA-Konzentration ( $85 \pm 6$  % nach 80 min). Die HVA-Konzentration erreichte nach 100 min einen Höchstwert von  $151 \pm 14$  %.

Die Glutamatkonzentration änderte sich wenig, sie schwankte zwischen 104 % und 79 %. Taurin stieg 40 min nach der Injektion auf  $120 \pm 4$  % an und blieb ungefähr auf diesem Niveau, wies aber ab 80 min nach Injektion eine hohe Variabilität auf.

Im Vergleich zur Basislinie waren die Konzentrationen der 5-HIAA und von Glutamat unverändert. Die extrazelluläre Konzentration der HVA zeigte in allen drei Zeitintervallen  $t_{0-60 \text{ min}} - t_{120-180 \text{ min}}$  und Taurin im Zeitintervall  $t_{0-60 \text{ min}}$  einen signifikanten Anstieg ( $p < 0,05$ ).

#### 3.1.3.2 Infusion des Agonisten DAGO in das MNH

#### Experiment 4b

Nach Aufnahme der Basislinie wurde die aCSF durch eine aCSF, die 1 mM DAGO enthielt, ersetzt (Abbildung 15). Diese aCSF wurde 20 min durch die Sonde infundiert und danach wieder durch die normale aCSF ersetzt (n = 6).

Die Konzentration der 5-HIAA sank nach 100 min auf  $52 \pm 6$  %. Nach 180 min wurden wieder Basislinienwerte erreicht.

Die HVA und die Taurinkonzentration zeigte nach der lokalen DAGO-Infusion keine Änderung. Die Glutamatkonzentration wies hohe Schwankungen auf, mit dem höchsten Wert nach 100 min ( $230 \pm 58 \%$ ).

Im Vergleich zur Basislinie war die Konzentration der 5-HIAA im Zeitintervall  $t_{60-120 \text{ min}}$  und  $t_{120-180 \text{ min}}$  nach Beginn der Infusion von DAGO signifikant vermindert ( $p < 0,05$ ). HVA, Glutamat und Taurin zeigten keine Konzentrationsänderungen nach der DAGO Infusion.

Der Vergleich der beider Injektionsarten und der Salineapplikation ist ebenfalls in Abbildung 15 dargestellt.

Die Konzentration der 5-HIAA sank nach der i.p. Injektion und nach der Infusion in das MNH. Signifikante Änderungen waren nur nach der lokalen Infusion messbar. Die Konzentration der HVA zeigte nach der lokalen Gabe keine Änderungen, wogegen die i.p. Applikation einen signifikanten Anstieg bewirkte. Die Glutamatkonzentration stieg nach der Gabe in das MNH geringfügig an (nicht signifikant und sehr variabel) und änderte sich nach der i.p. Injektion nicht.

Die Unterschiede beim Taurin, Anstieg nach i.p. Gabe und gleichbleibend nach Injektion in das MNH, waren nur im ersten Zeitintervall  $t_{0-60 \text{ min}}$  signifikant, dieses zeigte sich auch beim Vergleich zwischen beiden Gruppen.

Die Applikation von Saline führte zu keinen signifikanten Änderungen. Der Vergleich zwischen den 3 Experimentalgruppen zeigte eine signifikante Senkung der 5-HIAA Konzentration im Vergleich zur Saline während aller 3 Zeitintervalle ( $t_{0-60 \text{ min}} - t_{120-180 \text{ min}}$ ;  $p < 0,05$ ) nach der lokalen Applikation von DAGO. Für HVA, Glutamat und Taurin konnten keine Unterschiede zwischen DAGO Applikation und Saline Applikation festgestellt werden.

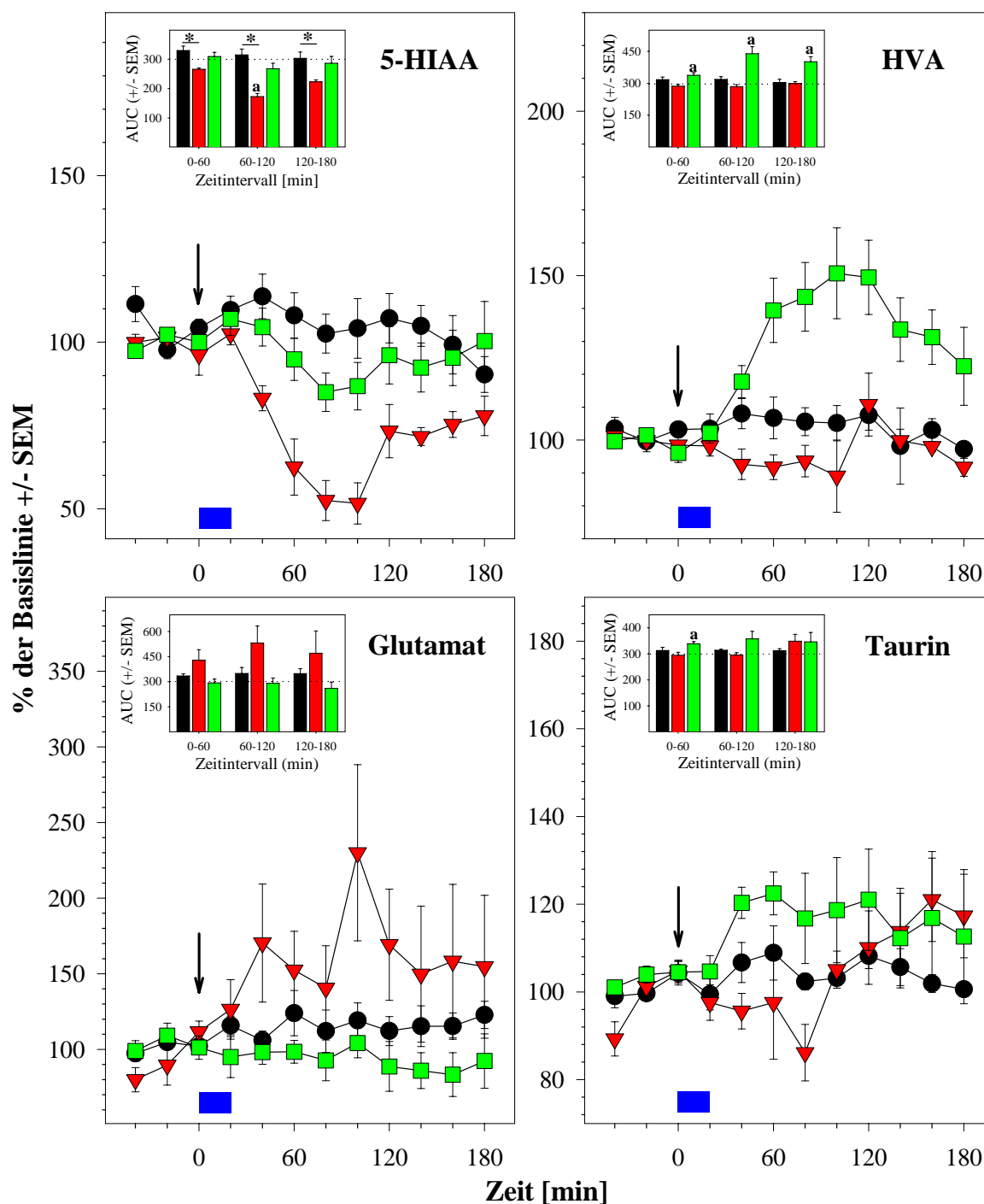


Abb. 15 zeigt den Effekt der systemischen Injektion von Saline (schwarze Kreise) und DAGO 5 mg/kg (grüne Quadrate), sowie der lokalen Applikation von DAGO 1 mM in das MNH (rote Dreiecke) auf die Konzentration von 5-HIAA, HVA, Glutamat und Taurin im MNH. Die Daten sind als % der Basislinie +/- SEM angegeben. Die Pfeile zeigen den Zeitpunkt der i.p. Injektion und die Balken die Dauer der DAGO Infusion. Die Inserts repräsentieren die Änderungen für die Zeitpunkte  $t_0$ ,  $t_{60-120}$  und  $t_{120-180}$  nach Saline (schwarz), 1 mM DAGO (rot) und 5 mg/kg DAGO (grün). a  $p < 0,05$  vs. BL; \*  $p < 0,05$  Saline vs. 1 mM DAGO.

### 3.1.3.3 DAGO und TTX

#### Experiment 5

Der Einfluss einer Blockade der Na<sup>+</sup>-Kanäle durch TTX wurde getestet, indem nach Aufnahme der Basislinie mit einer normalen aCSF, diese gegen eine aCSF ausgetauscht wurde, die 1 mM DAGO und 1 µM TTX enthielt (Abbildung 16). Nachdem diese aCSF 20 min infundiert wurde, erfolgte der Wechsel auf die normale aCSF (n = 7).

Die Daten für die Infusion von DAGO wurden bereits im Abschnitt 3.1.3.1 beschrieben. Werden die Änderungen nach der simultanen Gabe von DAGO und TTX im Vergleich zur Basislinie betrachtet, findet sich bei der Konzentration der 5-HIAA nach 60 und 80 min eine Absenkung auf  $55 \pm 7 \%$  bzw.  $53 \pm 7 \%$ . Das Basislinienniveau wurde auch nach 180 min noch nicht wieder erreicht. Die HVA zeigte nach 60 min eine kurzzeitige Senkung der Konzentration auf  $77 \pm 6 \%$  und stieg danach wieder auf das Basisniveau an.

Die Glutamatkonzentration wies hohe Variabilitäten auf und Taurin stieg nach 40 min bis auf  $124 \pm 12 \%$  an und ging danach wieder auf das Basisniveau zurück.

Im Vergleich zur Basislinie waren die Konzentrationen der 5-HIAA und der HVA in den Zeitintervallen  $t_{60-120 \text{ min}}$  und  $t_{120-180 \text{ min}}$  nach der Infusion von TTX (1 µM) signifikant gesunken ( $p < 0,05$ ). Die Glutamat- und Taurinkonzentrationen änderten sich nach der Infusion von TTX nicht.

Die Basislinienvergleiche in der DAGO + TTX Gruppe zeigte bei allen gemessenen Substanzen keine signifikanten Änderungen.

Im Vergleich der 3 Experimentalgruppen wurden keine signifikanten Änderungen gefunden.

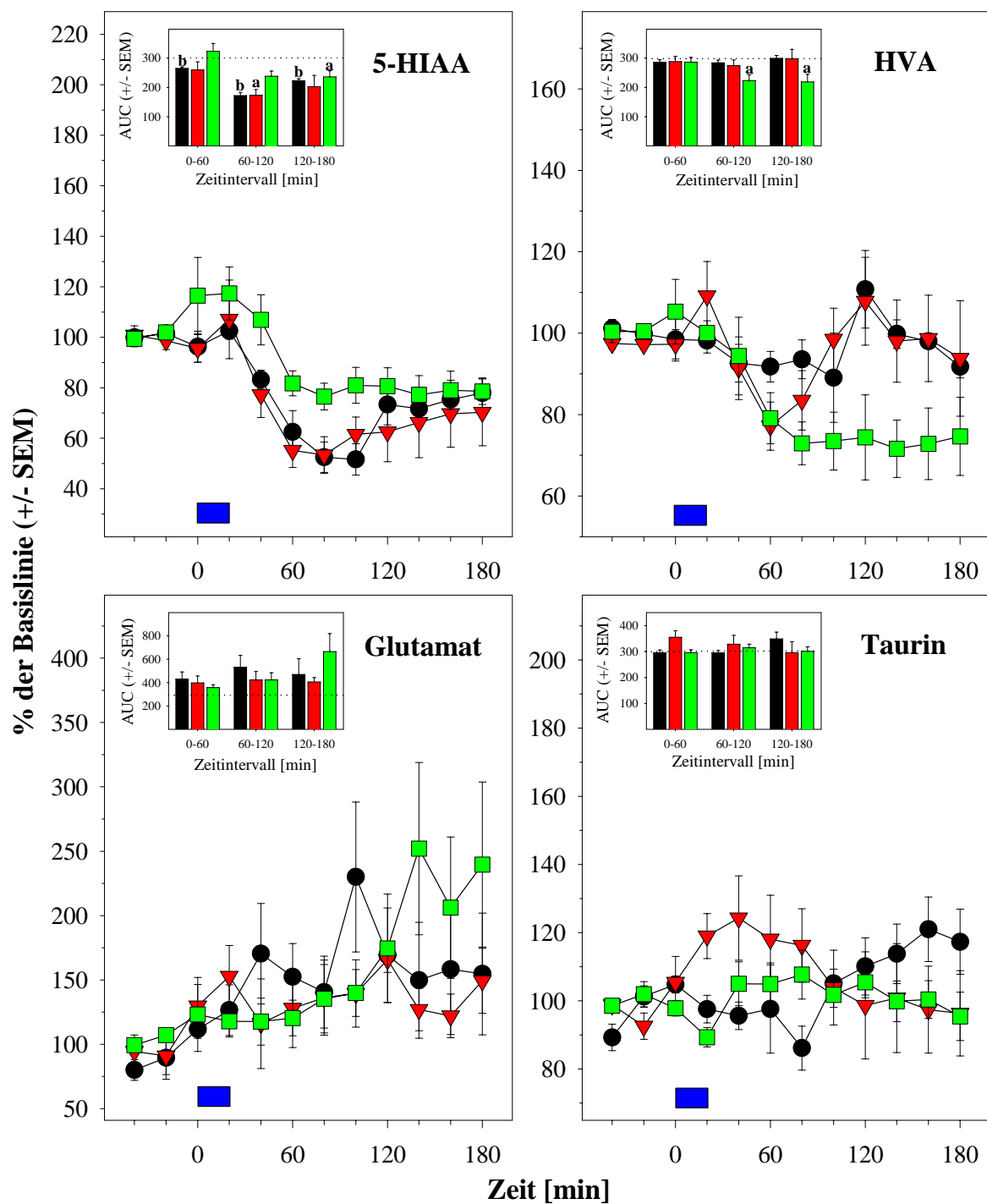


Abb. 16 zeigt den Effekt der lokalen Applikation von DAGO 1 mM (schwarze Kreise), TTX 1  $\mu$ M (grüne Quadrate) und der simultanen Gabe beider Substanzen (rote Dreiecke) in das MNH auf die Konzentration von 5-HIAA, HVA, Glutamat und Taurin. Die Daten sind als % der Basislinie  $\pm$  SEM angegeben. Die Balken zeigen die Dauer der TTX Infusion an. Die Inserts repräsentieren die Änderungen für die Zeitpunkte  $t_{0-60 \text{ min}}$ ,  $t_{60-120 \text{ min}}$  und  $t_{120-180 \text{ min}}$  nach 1 mM DAGO (schwarz), DAGO+TTX (rot) oder 1  $\mu$ M TTX (grün). a  $p < 0,05$  vs. BL; b  $p < 0,06$  vs. BL



### 3.1.4 Infusion von DAGO und Naloxon

Der Opiatantagonist Naloxon und der -agonist DAGO wurden in diesen Experimenten simultan gegeben, wobei dieselben Konzentrationen wie in den vorangegangenen Experimenten gewählt wurden. Es wurde getestet, ob die Änderungen, die durch DAGO erzielt wurden, mit Naloxon blockiert werden konnten. Bezugnehmend auf Experiment 4 wurden zwei Ansätze getestet. 1) Naloxon (5 mg/kg) wurde zusammen mit DAGO (5 mg/kg) intraperitoneal injiziert (n = 6). 2) Naloxon (5 mg/kg) wurde intraperitoneal injiziert und DAGO (1 mM) wurde für 20 min durch die Sonde gegeben (n = 5).

#### 3.1.4.1 Gleichzeitige Injektion von DAGO und Naloxon i.p.

##### Experiment 6a

Die Ergebnisse dieser Experimente sind in Abbildung 17 dargestellt.

5-HIAA zeigte nach der Injektion von 5 mg/kg Naloxon nach 60 min einen Anstieg auf  $143 \pm 13$  %. Die Konzentration der HVA stieg nach einer Gabe von 5 mg/kg Naloxon nach 80 min auf  $127 \pm 16$  % an. Beide Metabolite hatten nach 180 min das Basislinienniveau wieder erreicht. Die Glutamatkonzentration fiel bis auf  $85 \pm 14$  % ab. Die Taurinkonzentration im Dialysat änderte sich nicht.

Die intraperitoneale Injektion von DAGO führte zu einer leichten Senkung der 5-HIAA-Konzentration, d.h.  $85 \pm 6$  % nach 80 min. Die HVA-Konzentration erreichte nach 100 min einen Höchstwert von  $151 \pm 14$  %. Die Glutamatkonzentration veränderte sich wenig, sie schwankte zwischen 104 % und 79 % . Dabei zeigte sie eine relativ geringe Variabilität. Taurin stieg 40 min nach der Injektion auf  $120 \pm 4$  % an und blieb ungefähr auf diesem Niveau, wies aber ab 80 min nach Injektion eine hohe Variabilität auf.

Wurden beide Substanzen gleichzeitig i.p. injiziert, stieg die 5-HIAA nach 40 min auf  $128 \pm 11$  % an, blieb 40 min auf diesem Niveau und ging danach wieder zur Basislinie zurück. Die HVA zeigte keine Änderung, wenn beide Substanzen zusammen gegeben wurden. Die Werte blieben auf Basislinienniveau. Die Glutamatkonzentration zeigte 100 min nach Injektion eine Senkung auf  $65 \pm 13$  %, wies aber eine sehr hohe Variabilität auf. Die Taurinkonzentration änderte sich nicht.

Im Vergleich zur Basislinie waren im Kombinationsexperiment bei der 5-HIAA, der HVA, Glutamat und Taurin keine signifikanten Unterschiede zu finden. Der Vergleich zwischen den 3 Experimentalgruppen zeigte signifikante Änderungen für die HVA in den Zeitintervallen  $t_{60-120 \text{ min}}$  und  $t_{120-180 \text{ min}}$  zwischen Naloxon und Naloxon + DAGO ( $p < 0,05$ ). Taurin zeigte im Zeitintervall  $t_{0-60 \text{ min}}$  ebenfalls einen signifikanten Unterschied zwischen diesen beiden Gruppen ( $p < 0,05$ ). 5-HIAA und Glutamat wiesen keine signifikanten Unterschiede auf.

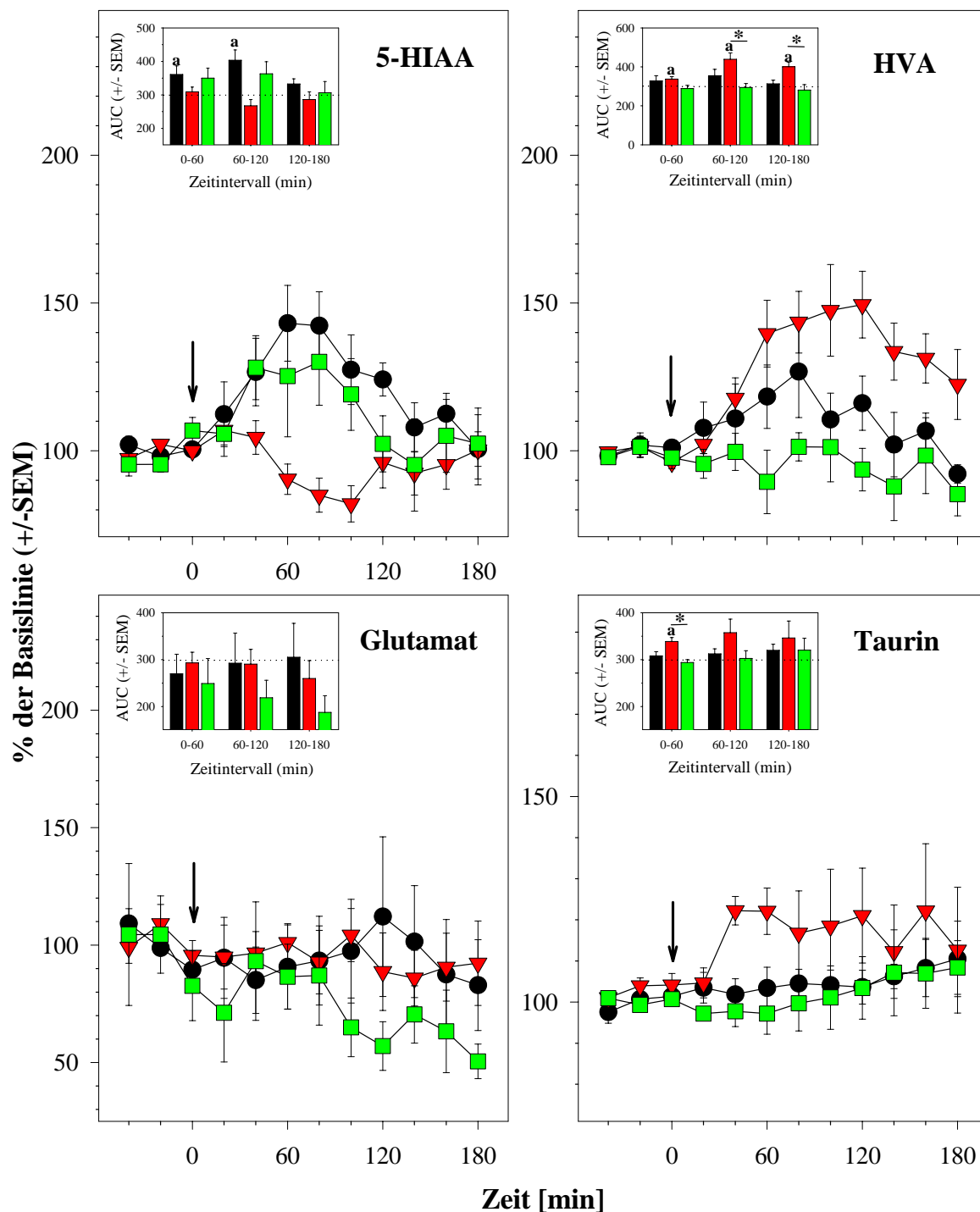


Abb. 17 zeigt den Effekt der systemischen Injektion von Naloxon 5 mg/kg (schwarze Kreise) und von DAGO 5 mg/kg (rote Dreiecke) und der simultanen Applikation beider Substanzen (grüne Quadrate) auf die Konzentration von 5-HIAA, HVA, Glutamat und Taurin. Die Daten sind als % der Basislinie +/- SEM angegeben. Die Pfeile zeigen den Zeitpunkt der i.p. Injektion an. Die Inserts repräsentieren die Änderungen für die Zeitpunkte  $t_{0-60 \text{ min}}$ ,  $t_{60-120 \text{ min}}$  und  $t_{120-180 \text{ min}}$  nach Naloxon (schwarz), DAGO (rot) und Naloxon+DAGO (grün). a  $p < 0,05$  vs. BL; \*  $p < 0,05$  DAGO vs. Naloxon+DAGO.

### 3.1.4.2 Infusion von DAGO in das MNH und Injektion von Naloxon i.p.

#### Experiment 6b

Die Ergebnisse dieser Experimente sind in Abbildung 18 dargestellt.

5-HIAA zeigte nach der Injektion von 5 mg/kg Naloxon nach 40 min einen Anstieg der Konzentration auf  $127 \pm 11$  %, der nach 60 min den höchsten Wert von  $143 \pm 13$  % erreichte. Die Konzentration der HVA stieg nach einer Gabe von 5 mg/kg Naloxon nach 80 min auf  $127 \pm 16$  % an. Beide Metabolite hatten nach 180 min das Basislinienniveau wieder erreicht. Die Glutamatkonzentration fiel bis auf  $85 \pm 14$  % ab. Die Taurinkonzentration im Dialysat änderte sich nicht.

Nach der Infusion von DAGO in das MNH sank die Konzentration der 5-HIAA nach 100 min auf  $52 \pm 6$  %. Nach 180 min wurden wieder Basislinienwerte erreicht.

Die HVA und die Taurinkonzentration zeigten nach der lokalen DAGO-Infusion keine Änderung. Die Glutamatkonzentration wies hohe Schwankungen auf, mit dem höchsten Wert nach 100 min ( $230 \pm 58$  %).

Wurden beide Substanzen gleichzeitig gegeben, war bei der 5-HIAA eine Senkung der Konzentration zu sehen, die nach 140 min mit  $69 \pm 8$  % den tiefsten Wert erreichte. Während der Messzeit wurde der Basislinienwert nicht wieder erreicht. Die HVA zeigte keine Änderung gegenüber der Basislinie. Die Glutamatkonzentration änderte sich in den ersten 120 min nach der Injektion nicht. Danach stieg sie auf  $185 \pm 52$  % und blieb auf einem erhöhten Niveau. Die Taurinkonzentration zeigte nach 80 min einen leichten Abfall auf 88 % und blieb auf diesem Niveau.

Im Vergleich zur Basislinie war die 5-HIAA Konzentration in den Zeitintervallen  $t_{60-120 \text{ min}}$  und  $t_{120-180 \text{ min}}$  signifikant gesunken ( $p < 0,05$ ). HVA, Glutamat und Taurin zeigten keine signifikanten Unterschiede.

Im Vergleich der 3 Experimentalgruppen wurden für die 5-HIAA für  $t_{120-180 \text{ min}}$  und für die HVA für  $t_{60-120 \text{ min}}$  signifikante Unterschiede zwischen Naloxon und Naloxon + DAGO ( $p < 0,05$ ) gefunden. Der Vergleich der Glutamat- und der Taurinkonzentration erbrachte keine signifikanten Unterschiede.

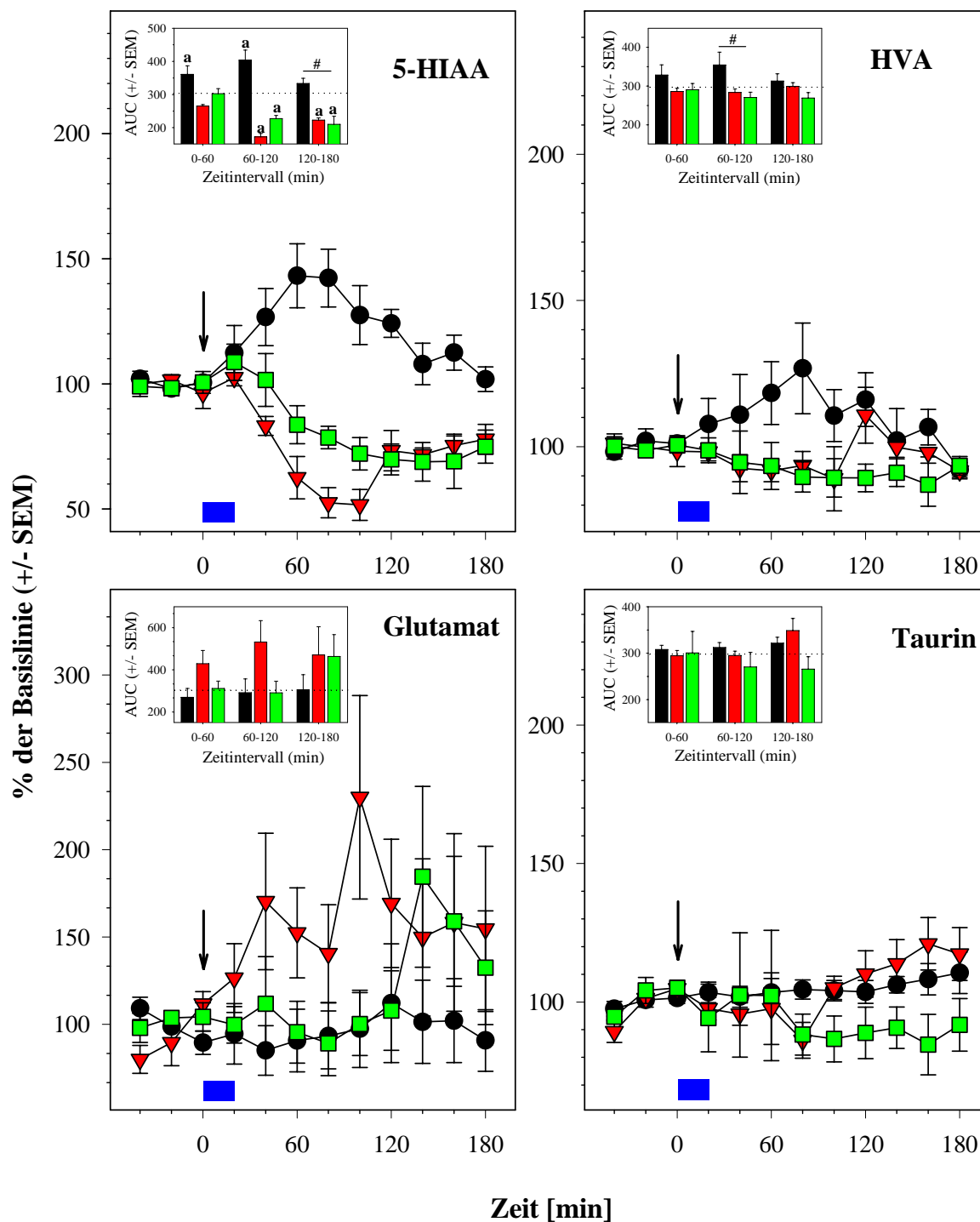


Abb. 18 zeigt den Effekt der systemischen Injektion von Naloxon (schwarze Kreise), der lokalen Infusion von DAGO in das MNH (rote Dreiecke) und der Kombination beider Substanzen (grüne Quadrate) auf die Konzentration von 5-HIAA, HVA, Glutamat und Taurin. Die Daten sind als % der Basislinie  $\pm$  SEM angegeben. Die Pfeile zeigen den Zeitpunkt der i.p. Injektion und die Balken die Dauer der DAGO Infusion. Die Inserts repräsentieren die Änderungen für die Zeitpunkte  $t_{0-60 \text{ min}}$ ,  $t_{60-120 \text{ min}}$  und  $t_{120-180 \text{ min}}$  nach Naloxon (schwarz), 1 mM DAGO (rot) und Naloxon+DAGO (grün). a  $p < 0,05$  vs. BL; \*  $p < 0,05$  Naloxon vs. Naloxon+DAGO.

### 3.1.5 Zusammenfassung der pharmakologischen Ergebnisse

Die Fragestellung für dieses Kapitel lautete:

Beeinflussen Antagonisten und Agonisten des  $\mu$ -Opiatrezeptors die Transmission des serotonergen, des dopaminergen und des glutamatergen Transmittersystems?

Eine Zusammenfassung der Daten der pharmakologischen Versuche ist in Tabelle 6 dargestellt.

Die vorliegenden Daten der Mikrodialyseversuche zeigen, dass Opiate, die über den  $\mu$ -Opiatrezeptor wirken, die serotonerge und dopaminerge Neurotransmission innerhalb des MNH's modulieren.

Im einzelnen konnte folgendes nachgewiesen werden:

- die systemische Applikation des Opiatrezeptor-Antagonisten Naloxon erhöht konzentrationsabhängig die Konzentration des serotonergen Metaboliten 5-HIAA und des dopaminergen Metaboliten HVA im Vergleich zur Basislinie
- die Erhöhung der 5-HIAA ist durch die Applikation von TTX blockierbar
- der Opiatagonist DAGO, (a) systemisch gegeben, bewirkt eine Erhöhung der HVA- und Taurinkonzentration und (b) lokal in das MNH gegeben, eine Senkung der 5-HIAA Konzentration, aber keine Veränderung der HVA Konzentration
- die DAGO-Effekte können teilweise (a) oder vollständig (b) durch die gleichzeitige Gabe von Naloxon blockiert werden
- am PND 7, nach Beendigung der sensitiven Phase, wurde ein Anstieg der 5-HIAA nach der Applikation von 5 mg/kg Naloxon beobachtet

Tab. 6 zeigt eine Zusammenfassung der Daten der pharmakologischen Versuche. In Fällen, in denen sich signifikante Effekte, verglichen zur Basislinie, ergaben, sind diese mit den maximalen prozentualen Änderungen dargestellt. Die Fälle, in denen keine Änderung oder eine nicht signifikante Änderungen zu finden war, sind mit n.s. (nicht signifikant) gekennzeichnet.

Experiment		Änderungen der Metabolite		Änderungen der Aminosäuren	
		<b>5-HIAA</b>	<b>HVA</b>	<b>Glutamat</b>	<b>Taurin</b>
1a	Saline i.p.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
1a	Naloxon i.p. (5 mg/kg, PND 1)	+ <b>43 %</b>	n.s.	n.s.	n.s.
1b	Naloxon i.p. (50 mg/kg)	+ <b>60 %</b>	+ <b>47 %</b>	n.s.	n.s.
2a	Naloxon i.p.+ TTX (MNH)	- <b>28 %</b>	- <b>15 %</b>	n.s.	- <b>40 %</b>
2b	TTX (MNH)	- <b>24 %</b>	- <b>28 %</b>	n.s.	n.s.
3	Naloxon i.p. (5 mg/kg, PND 7)	+ <b>28 %</b>	n.s.	n.s.	n.s.
4a	DAGO i.p.	n.s.	+ <b>50 %</b>	n.s.	+ <b>22 %</b>
4b	DAGO (MNH)	- <b>48 %</b>	n.s.	n.s.	n.s.
5	DAGO (MNH)+ TTX (MNH)	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
6a	DAGO i.p. + Naloxon i.p.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
6b	DAGO (MNH) + Naloxon i.p.	- <b>31 %</b>	n.s.	n.s.	n.s.

## 3.2 Prägung

Die Prägung wurde mit Haushuhnküken unter unterschiedlichen Haltungsbedingungen und mit verschiedenen Arten der Injektion durchgeführt. Die erste Serie, die Injektion in das MNH, wurde in zwei Gruppen geteilt. Ein Teil der Tiere schlüpfte in der Isolationsbox und wurde nur während der Tests herausgenommen, während der andere Teil im Kükenhaltungsraum in Einzelhaltungsboxen lebte. Die Tiere der zweiten Serie, bei denen die Injektion intraperitoneal erfolgte, wurden in den Einzelhaltungsboxen gehalten, um den Bedingungen im Mikrodialyseexperiment, bei dem Tiere aus dem Kükenhaltungsraum entnommen wurden, zu entsprechen.

### 3.2.1 Injektion in das MNH

Den Tieren dieser Serie wurde vor der Prägung entweder eine bilaterale Injektion Saline oder eine bilaterale Injektion Naloxon (2 mg/kg) verabreicht. Die Injektionen und die Prägung erfolgte nach dem in Abbildung 10 angegebenen Schema.

Die Gruppe der Tiere, die in der Isolationsbox lebten, bestand aus 22 Tieren, von denen 11 Saline und 11 Naloxon erhielten. Davon waren 18 % Saline-injizierte Tiere (2 von 11 Tieren) und 45 % Naloxon-injizierte Tiere (5 von 11 Tieren) geprägt. Nach dem  $\chi^2$ -Test ergibt sich  $\chi^2 = 1,88$ , d.h. keine signifikanten Unterschiede.

Die Gruppe, die in Einzelhaltung lebte, bestand aus 31 Tieren, von denen 18 Tiere Saline und 13 Tiere Naloxon erhielten. Die Prägerate betrug im Falle der Saline-injizierten Tiere 17 % (3 von 18 Tieren) und bei den Naloxon-injizierten Tieren 15 % (2 von 13 Tieren). Nach dem  $\chi^2$ -Test ergibt sich ein Wert von  $\chi^2 = 0,009$ , d.h. keine signifikanten Unterschiede. In Tabelle 7 sind die Ergebnisse gegenüber gestellt.

### 3.2.2 Intraperitoneale Injektion

Den Tieren dieser Serie wurde vor der Prägung entweder eine intraperitoneale Saline- oder Naloxoninjektion (5 mg/kg) verabreicht. Die Injektionen und die Prägung erfolgten nach dem in Abbildung 10 angegebenen Schema.

Es wurden insgesamt 23 Tiere verwendet, von denen 12 Saline und 11 Naloxon erhielten. Davon waren 17 % Saline-injizierte Tiere (2 von 12 Tieren) und 18 % Naloxon-injizierte Tiere (2 von 11 Tieren) geprägt. Nach dem  $\chi^2$ -Test ergibt sich für den Vergleich Saline-



Naloxon ein Wert von  $\chi^2 = 0,009$ , d.h. keine signifikanten Unterschiede. In Tabelle 7 sind die Ergebnisse gegenüber gestellt.

Zusätzlich wurde eine Gruppe eingeführt, die ohne Injektion geprägt wurde, um eine mögliche Beeinflussung durch die Injektion selbst zu untersuchen.

Es wurden insgesamt 12 Tiere verwendet. Davon waren 17 % der Tiere (2 von 12 Tieren) geprägt. Nach dem  $\chi^2$ -Test ergibt sich für den Vergleich Saline-injiziert gegen nicht injiziert ein Wert von  $\chi^2 = 0$ . In Tabelle 7 sind die Ergebnisse gegenüber gestellt.

Tab. 7 In der Tabelle sind die einzelnen Tiergruppen, die geprägt wurden, dargestellt. Es ist die Gesamtzahl der pro Gruppe verwendeten Tiere ( $\Sigma_{\text{Tiere}}$ ) und das Ergebnis der Prägung gezeigt.

Haltung+Behandlung	$\Sigma_{\text{Tiere}}$	Saline		Naloxon		$\chi^2$
		geprägt	ungeprägt	geprägt	ungeprägt	
Isolation MNH-Injektion	22	2 (18 %)	9 (82 %)	5 (45 %)	6 (55 %)	1,88
Einzelhaltung MNH-Injektion	31	3 (17 %)	15 (83 %)	2 (15 %)	11 (85 %)	0,009
Einzelhaltung i.p.-Injektion.	23	2 (17 %)	10 (83 %)	2 (18 %)	9 (82 %)	0,009

Haltung+Behandlung	$\Sigma_{\text{Tiere}}$	keine Injektion		$\chi^2$
		geprägt	ungeprägt	
Einzelhaltung	12	2 (17 %)	10 (83 %)	0

In keiner Gruppe wurde ein signifikanter Wert für  $\chi^2$  gefunden.

Die isoliert gehaltenen Tiere, denen Naloxon direkt in das MNH gegeben wurde, zeigten als einzige Gruppe etwas bessere Prägeergebnisse.

### 3.2.3 Gewicht der Tiere in den Versuchsgruppen

Die Tiere, die geprägt wurden, wurden vor den Versuchen gewogen. Dabei war zu beobachten, dass viele Tiere, denen Naloxon injiziert wurde, stark an Gewicht verloren. 29 %

aller Naloxon-injizierten Tiere starben vor der geplanten Beendigung der Versuche. In den Saline-behandelten Gruppen und den unbehandelten Gruppen waren es 19 bzw. 16 %. Um zu überprüfen, ob das Naloxon dabei eine Rolle spielt, wurden Tiere getestet, die unbehandelt blieben, oder denen Saline bzw. Naloxon injiziert wurde.

Die Gewichte in den einzelnen Gruppen werden in Tabelle 8 aufgeführt.

Gruppe A sind die nur injizierten Tiere, Gruppe B sind die Tiere, die im Prägetest waren.

Tab. 8 zeigt die Gewichte der nur injizierten und der geprägten Tiere an 4 aufeinanderfolgenden Tagen. Gruppe A wurde nur injiziert, Gruppe B durchlief zusätzlich einen Prägetest.

	Tag 0	Tag 1	Tag 2	Tag 3
<b>A</b>	Gewicht [g]			
unbehandelt	41 ± 2,0	38 ± 2,3	38 ± 3,2	41 ± 0,1
Saline	39 ± 2,0	37 ± 1,5	37 ± 2,4	40 ± 4,2
Naloxon	40 ± 2,6	36 ± 1,8	34 ± 2,8	33 ± 8,9
<b>B</b>				
unbehandelt	41 ± 3,6	38 ± 3,6	37 ± 1,9	39 ± 2,1
Saline	42 ± 2,8	38 ± 2,9	39 ± 1,3	39 ± 2,0
Naloxon	41 ± 2,7	39 ± 2,3	37 ± 2,2	36 ± 4,2

Die graphische Darstellung der Ergebnisse ist in Abbildung 19 A/B zu sehen. Das Gewicht der einzelnen Tiere am Tag 0 wurde 100 % gesetzt und an den folgenden Tagen die Abweichungen davon berechnet. Die Tiere nahmen alle am Tag 1 um 8 % ( $3,1 \pm 0,5$  g) ab, bedingt dadurch, dass sich die Tiere am ersten Tag vom Dottersack ernähren und erst am zweiten Tag zu fressen beginnen.

(A) Am Tag 2 sind die Gewichte der unbehandelten und der Saline behandelten Gruppe bei  $92 \pm 2,4$  % bzw.  $95 \pm 1,1$  %. Diese beiden Gruppen nahmen am Tag 3 wieder zu,  $98 \pm 0,3$  % und  $102 \pm 10,6$  %. Die mit Naloxon injizierte Gruppe nahm weiter ab und der Durchschnittswert lag bei  $85 \pm 1,6$  %, bezogen auf das Gewicht am Tag 0. Signifikanzvergleiche zeigten, dass die Gewichte der Tiere am Tag 1 in der Saline (b;  $p < 0,05$ ) und am Tag 2 in der Naloxon-Gruppe (c;  $p < 0,05$ ) signifikant verschieden vom Ausgangswert waren. Die Gewichte am Tag 2 zeigten Unterschiede zwischen der Saline und der Naloxon Gruppe ( $p < 0,05$ ; Kruskal-Wallis ANOVA, gefolgt von Dunn's Test)

(B) Die Gewichte der Tiere, die im Prägeversuch waren, wurden ebenfalls in einer Abbildung dargestellt. Dabei zeigt sich ein ähnliches Bild. Am Tag 2 sind die Gewichte der unbehandelten und der Saline behandelten Gruppe bei  $90 \pm 1,2 \%$  bzw.  $91 \pm 2,1 \%$ . Diese beiden Gruppen nahmen am Tag 3 wieder etwas zu,  $92 \pm 1,6 \%$  und  $95 \pm 1,4 \%$ . Die Naloxon-behandelte Gruppe nahm weiter ab und wies am Tag 2 bzw. 3 Werte von  $88 \pm 1,1 \%$  und  $82 \pm 2,5 \%$  auf.

Signifikanzvergleiche zeigten, dass die Gewichte der Tiere am Tag 1 und 2 in der unbehandelten (a;  $p < 0,05$ ), der Saline (b;  $p < 0,05$ ) und der Naloxon-Gruppe (c;  $p < 0,05$ ), und am Tag 3 in der unbehandelten und der mit Naloxon behandelten Gruppe signifikant verschieden vom Ausgangswert waren. Die Gewichte am Tag 1 und am Tag 3 zeigten Unterschiede zwischen der Saline und der Naloxon Gruppe ( $p < 0,05$ ; Kruskal-Wallis ANOVA, gefolgt von Dunn's Test)

Die weitere Abnahme des Gewichts der Tiere, die Naloxon erhielten, tritt in der Gruppe, die geprägt wurde, einen Tag später auf als in der Gruppe, die nur injiziert wurde.

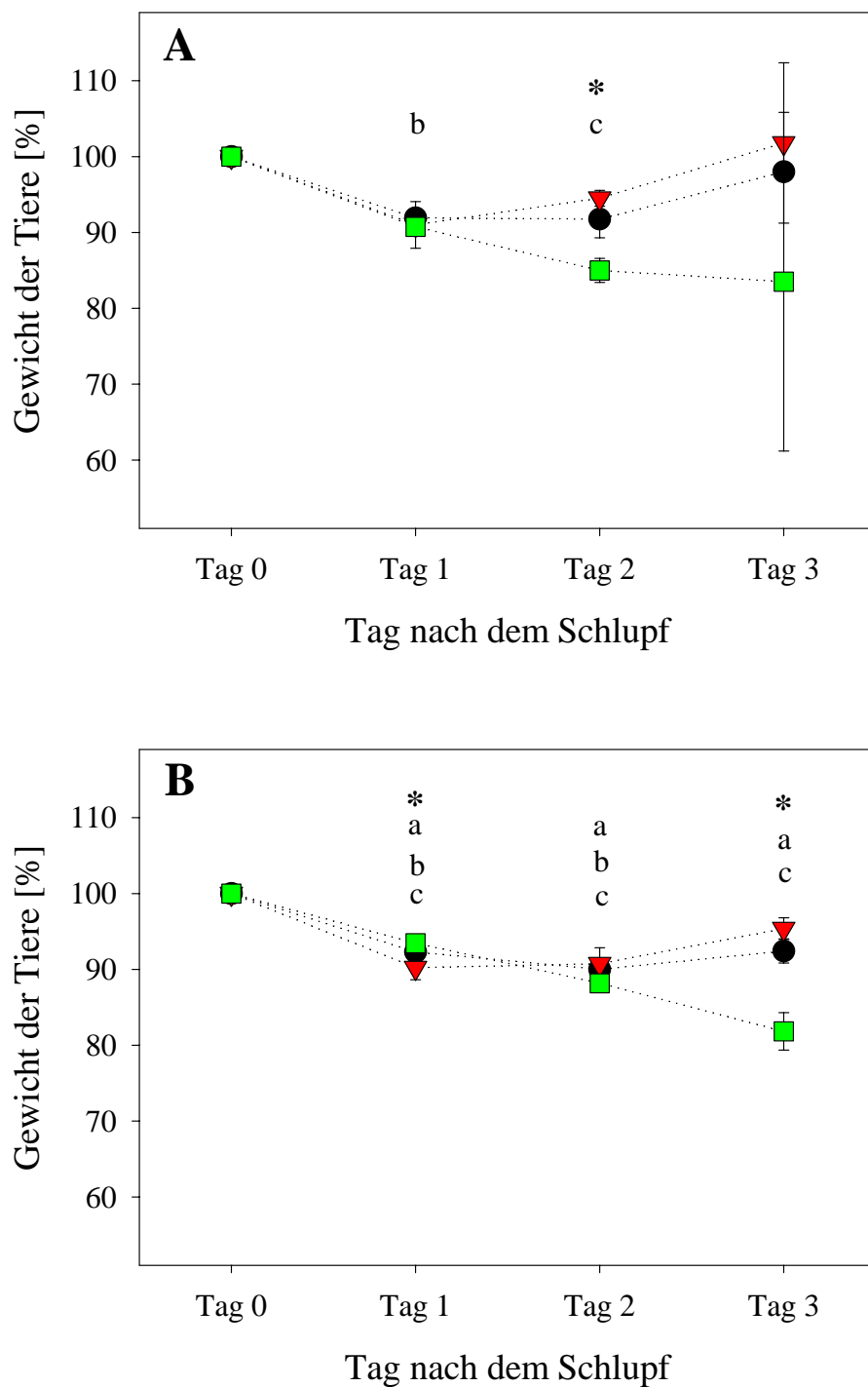


Abb. 19 zeigt die Gewichte der Tiere, die unbehandelt blieben (schwarze Kreise), mit Saline (rote Dreiecke) oder Naloxon (grüne Quadrate) injiziert wurden, an vier aufeinander folgenden Tagen. (A) die Tiere wurden nur injiziert oder (B) durchliefen die gesamte Präsession. Die Daten sind als % der Basislinie (Gewicht am Tag 0)  $\pm$  SEM angegeben. a  $p < 0,05$  Tag 0 vs. Tag 1, Tag 0 vs. Tag 2, Tag 0 vs. Tag 3: unbehandelte Gruppe; b  $p < 0,05$  Tag 0 vs. Tag 1, Tag 0 vs. Tag 2: Saline-Gruppe; c  $p < 0,05$  Tag 0 vs. Tag 1, Tag 0 vs. Tag 2: Naloxon-Gruppe; \*  $p < 0,05$  Saline vs. Naloxon am entsprechenden Versuchstag.

### 3.3 Vokalisation

Die Vokalisation von 12 Tieren wurde nach einer Injektion von Saline oder Naloxon gemessen. Sechs Tiere erhielten eine intraperitoneale Injektion Saline und sechs erhielten 5 mg/kg Naloxon (je 500 µl).

Abbildung 20 fasst die Daten dieses Versuches zusammen. Die individuelle Dauer der Vokalisation während eines 10 Minuten-Intervalls war sehr unterschiedlich. 20 und 30 min nach der Naloxon-Injektion betrug die Vokalisationsdauer  $4,9 \pm 0,8$  min bzw.  $5,1 \pm 0,5$  min pro 10 min. Die Saline-injizierten Tiere vokalisiert in derselben Zeit  $1,2 \pm 0,3$  min bzw.  $1,3 \pm 0,4$  min pro 10 min (Abbildung 20A). Die Gesamtvokalisationsdauer der Saline-Gruppe betrug  $3,8 \pm 0,7$  min und die der Naloxon-Gruppe  $12,8 \pm 1,4$  min (Abbildung 20B). Im statistischen Vergleich zwischen der Gesamtvokalisationsdauer beider Gruppen zeigte sich ein signifikanter Unterschied ( $p < 0,05$ , Mann-Whitney-U-Test).

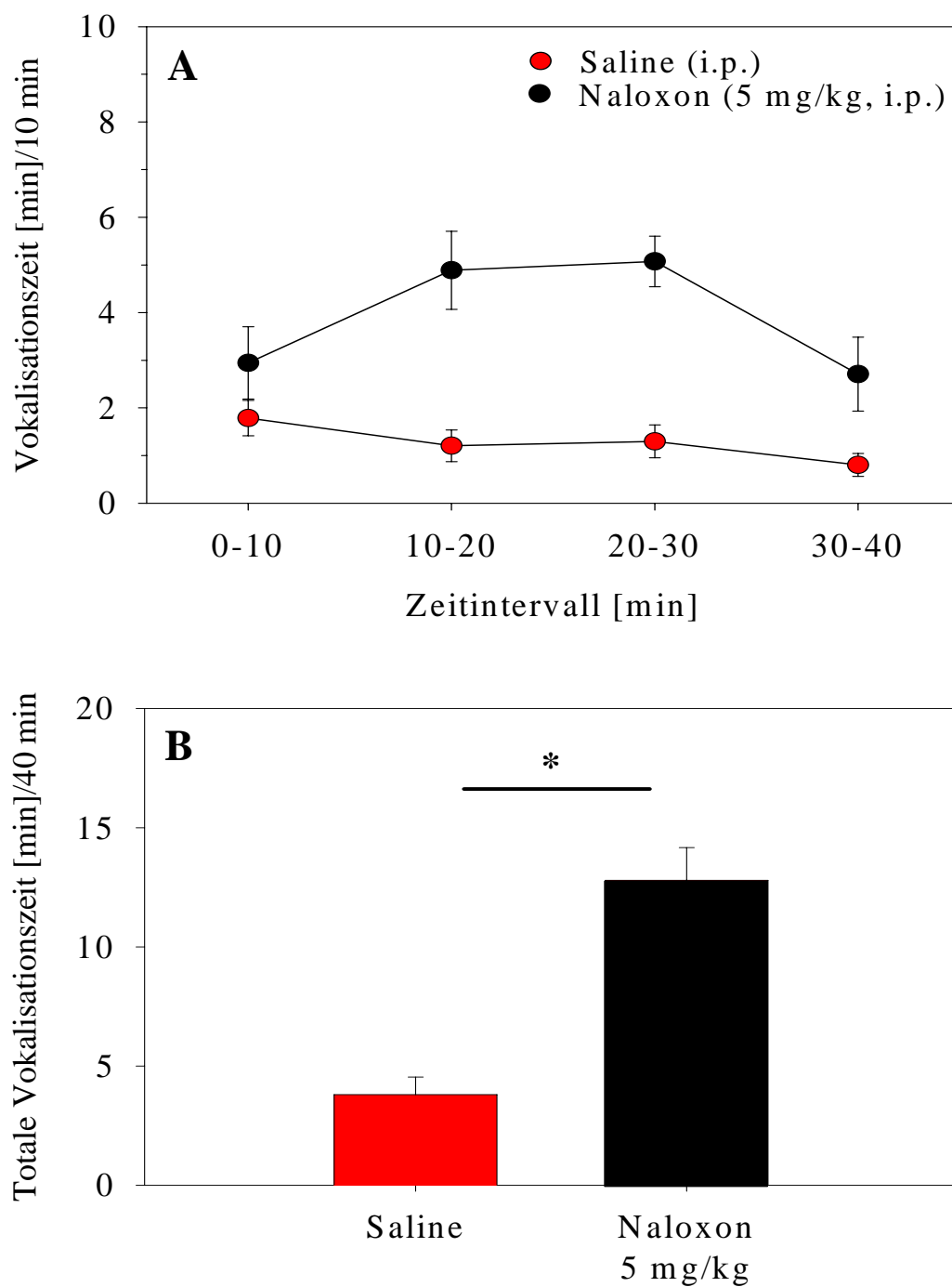


Abb. 20 zeigt die Dauer der Vokalisation innerhalb von 40 min nach der systemischen Injektion von Saline (rot) oder Naloxon 5 mg/kg (schwarz). (A) zeigt die Dauer der Vokalisation in 10 min Intervallen. Die Daten sind als Vokalisationszeit /min in einem 10 min Intervall  $\pm$  SEM dargestellt. (B) Die Injektion von Naloxon induzierte einen signifikanten Anstieg der Gesamtvokalisationszeit in Haushhnhnküken, verglichen mit der Vokalisationszeit Saline-injizierter Tiere. \*  $p < 0,05$  Saline vs. Naloxon.

## 4 DISKUSSION

In der vorliegenden Arbeit wurde an Haushuhnküken gezeigt, dass Substanzen, die über den  $\mu$ -Opiatrezeptor wirken, die Neurotransmission innerhalb des MNH's modulieren und einen Einfluss auf den emotionalen Zustand haben.

Es konnte folgendes gezeigt werden:

- I. Die systemische Applikation des Opiatrezeptor-Antagonisten Naloxon erhöht konzentrationsabhängig die Konzentration des serotonergen Systems, gemessen am Metaboliten 5-HIAA im Vergleich zur Basislinie. Die Erhöhung der 5-HIAA ist durch die Applikation von TTX blockierbar. Der Opiatagonist DAGO, (a) systemisch gegeben, bewirkt eine Erhöhung der HVA- und Taurinkonzentration und (b) lokal in das MNH gegeben, eine Senkung der 5-HIAA Konzentration, aber keine Veränderung der HVA Konzentration. Die DAGO-Effekte können teilweise (a) oder vollständig (b) durch die gleichzeitige Gabe von Naloxon blockiert werden.
- II. Die akustische Filialprägung ist durch die Blockade der  $\mu$ -Opiatrezeptoren mit Naloxon nicht signifikant beeinflussbar.
- III. Die i.p. Injektion von Naloxon induziert die Distressvokalisation, wogegen die Injektion von Saline keinen Einfluss auf die Vokalisation der Küken hat.

### 4.1 Pharmakologie

Über den Einfluss der Opiate auf die Transmitterfreisetzung gibt es einige Übersichtsarbeiten (Castellano et al., 1996; Sarne et al., 1996; Wood, 1983). Bei der Wirkung der Opiatagonisten sind große Unterschiede zu finden, die von verschiedenen Kriterien wie Tierart oder *in vitro*-Kulturbedingungen, der untersuchten Hirnregion, Art der Applikation, Dauer der Anwendung und der eingesetzten Konzentration abhängen.

Generell werden für die Wirkung der Opiate, drei Wirkungsweisen diskutiert: Erstens, eine Regulation über die Adenylatcyclase, die oft zu einer Inhibition, verbunden mit der Reduktion der Ionenkanalaktivität, führt oder auch zu einer Erhöhung der cAMP Produktion führen kann. Welcher der beiden Wege zu beobachten ist, hängt von der Konzentration der Opiate ab. Niedrige Dosen bewirken eine Verstärkung und hohe Dosen eine Inhibition der cAMP Bildung (Grudt und Williams, 1995). Diese Effekte sind allerdings nur bei stimulierter

Adenylatcyclase zu finden, wogegen basale Konzentrationen nicht beeinflusst werden. Die negative Kopplung erfolgt in diesen Fällen über die Gi und /oder die Go Proteine.

Zweitens wird eine Regulation über spannungsabhängige  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle diskutiert. Die Aktivierung der Opiatrezeptoren reduzierte die  $\text{Ca}^{2+}$  Ströme in verschiedenen Präparationen und somit die Transmitterausschüttung. Auch hierbei spielen die Gi (o) Proteine eine Rolle (Lüllmann et al., 2003).

Drittens werden als weitere Kandidaten für die Reduktion der Transmitterfreisetzung die  $\text{K}^{+}$ -Kanäle diskutiert. Dabei bewirkt die Aktivierung von  $\mu$  -und  $\delta$ - Rezeptoren eine Membranhyperpolarisierung durch die Steigerung der  $\text{K}^{+}$ -Ströme; auch hier sind die Gi(o) Proteine involviert (Lüllmann et al., 2003).

Opiatagonisten wirken in vielen Fällen exzitatorisch, wofür ein disinhibitorischer Mechanismus verantwortlich gemacht wird, der über ein GABAerges Neuron gesteuert wird. Es konnte allerdings auch eine direkte Mobilisierung von  $\text{Ca}^{2+}$  aus 1,4,5-triphosphat-sensitiven Speichern in NG108-15 Zellen nachgewiesen werden, die ebenfalls durch Gi und Go Proteine vermittelt wird (Minami und Satoh, 1995).

Die Wirkung der Opiate auf Lernen und Gedächtnis wird im Allgemeinen als nicht direkt eingeschätzt. Es wird eine modulatorische Wirkung auf verschiedene Systeme, die bei Lernen und Gedächtnis eine Rolle spielen, z.B. das nigostriatale und mesocorticolimbische dopaminerge System, das cholinerge System des basalen Vorderhirns, serotonerge Projektionen von den Raphe Kernen, GABAerge Projektionen von magnozellularären Neuronen des Mammilarkörpers des Hypothalamus (Schultheis und Martinez, 1992), postuliert.

Für die Diskussion der Ergebnisse dieser Arbeit wurden vor allem Befunde aus Untersuchungen an Säugern, insbesondere der Ratte, herangezogen. Mikrodialytische Untersuchungen an Vögeln sind sehr wenige zu finden, ebenso Untersuchungen über Opiate in Vögeln. Die meisten der zitierten Arbeiten wurden an erwachsenen Tieren (Nagern) durchgeführt. In dieser Arbeit wurden sehr junge Tiere verwendet und es ist nicht geklärt, ob Transmittersysteme junger Tiere mit denen Erwachsener direkt verglichen werden können. Ein Hinweis für eine unterschiedliche Rezeptordichte der Opiatrezeptoren in jungen und adulten Tieren liefern die Arbeiten von Csillag et al. (1990) und Reiner et al. (1989), die gezeigt haben, dass die Dichte von  $\mu$ -Rezeptoren in jungen Tieren höher ist als in adulten. Bei einigen Fragen konnte ich mich auf die Arbeiten von M. Gruß stützen, der prägungs- und stressrelevante Untersuchungen am 4-tägigen Haushuhnküken durchgeführt hat. In diesen



Arbeiten wurde auch dargestellt, inwieweit die gemessenen Dialysatkonzentrationen von 5-HIAA, HVA, Glutamat und Taurin von der synaptischen Aktivität im MNH abhängen. Trotz des Altersunterschiedes der Küken (4- und 1-tägige Küken), sind die grundlegenden Mechanismen und Unterschiede zum Säuger gleich. Kurz zusammengefasst sind die basalen Dialysatkonzentrationen von 5-HIAA, HVA, Glutamat und Taurin teilweise durch die pharmakologisch induzierte Änderung der synaptischen Aktivität beeinflusst. 5-HIAA und HVA zeigen allerdings sehr gut die Charakteristiken einer aktivitätsabhängigen synaptischen Freisetzung. Für nähere Details verweise ich auf die Dissertation von M. Gruß (Gruß, 1998).

#### **4.1.1 Opiatmodulation der kognitiven, anregenden und emotionalen Funktionen**

Zwei Hauptkomponenten, die kognitive Funktion, vermittelt durch Glutamat und/oder Acetylcholin, und die anregende/emotionale Funktion, vermittelt durch Dopamin und Serotonin, interagieren während der Filialprägung (siehe Abbildung 22). Die Beteiligung des glutamatergen Systems scheint essentiell für die Filialprägung zu sein. Das konnte durch die Blockierung der NMDA-Rezeptoren gezeigt werden (Bock und Braun, 1999; Bock et al., 1996). Die Blockade der dopaminergen Neurotransmission im MNH durch den Antagonisten Haloperidol, verhindert ebenfalls die Prägung (Gruss et al., 2003). Pharmakologische Verhaltensexperimente an frisch geschlüpften Küken zeigten, dass eine bilaterale Injektion von 2,5 mg/kg Naltrexon, ein Opiatrezeptorantagonist, in das MNH, den Lernprozess zwar nicht unterbrechen, aber beeinträchtigen kann (Wolf, 1992). Die Daten der vorliegenden Arbeit zeigen, dass eine Opiat-vermittelte Beeinträchtigung der Prägung die Modulation anderer Transmittersysteme im MNH, besonders das monoaminerge System, beinhaltet.

Im Nachfolgenden werden die Transmittersysteme getrennt betrachtet, wobei das Vokalisationsexperiment teilweise, aufgrund seines Bezuges zum serotonergen System, in dieses Kapitel einfließt.

#### **4.1.2 Opiatmodulation des serotonergen Systems**

Das Opiatsystem, speziell die  $\mu$ -Opiatrezeptor vermittelten Vorgänge, ist signifikant bei der Distressvokalisation in verschiedenen Spezies, das Hühnerküken eingeschlossen, beteiligt (Panksepp et al., 1986; 1980c). Es wurde gezeigt, dass der PFC der Säugetiere bei der Verarbeitung der Stressantwort und der Distressvokalisation sowie bei ihrer Modulation durch das Opiatsystem beteiligt ist (Herman und Panksepp, 1981).

Die vorliegenden Daten zeigen, dass der spezifische  $\mu$ -Rezeptoragonist DAGO und der  $\mu$ -Rezeptorantagonist Naloxon die serotonerge Neurotransmission (als Änderungen der 5-HIAA gemessen) im MNH, dem Analog des Säuger-PFC beim Vogel, modulieren. Bezugnehmend auf Abbildung 22 modulieren Opiate eher die emotionalen als die kognitiven Aspekte.

Die lokale Applikation des  $\mu$ -Opiatrezeptor Agonisten DAGO reguliert die Aktivität des serotonergen Systems im MNH herunter, während die systemische Gabe keine signifikanten Änderungen bewirkt, aber ein leichter Trend für eine geringere Aktivität besteht.

Diese Befunde stimmen mit denen von Passarelli und Costa (1989) und Yoshioka et al (1993) überein, die eine Inhibition der  $K^+$  induzierten Freisetzung von Serotonin durch DAGO bzw. Morphin beschrieben. Des Weiteren gibt es Übereinstimmungen mit Haigler (1978), der eine verlangsamte oder inhibierte spontane neuronale Feuerrate serotonerger Zellen, nach der Behandlung mit Morphin in den Raphe Kernen, dem Ursprung der serotonergen Zellen, in ihren Zielgebieten zeigte. Marek und Aghajanian (1998) beobachteten eine Unterdrückung von Serotonin induzierten EPSPs im PFC, verursacht durch die Aktivierung der  $\mu$ -Opiatrezeptoren durch den selektiven  $\mu$ -Opiatrezeptor Agonisten DA(M)GO. Im Vergleich zum präfrontalen anterioren cingulären Kortex der Ratte (Vogt et al., 2001; Mansur et al., 1987) weist das MNH der Vögel eine hohe Dichte an  $\mu$ -Opiatrezeptoren auf (Csillag et al., 1990). Die beobachtete Agonist-induzierte Herunterregulation der 5-HIAA weist auf das Vorhandensein präsynaptischer  $\mu$ -Rezeptoren auf serotonergen Synapsen hin (Endo und Yawo, 2000), wobei eine negative Stimulation der Adenylatcyclase durch die Bindung eines  $\mu$ -Rezeptor-Liganden die  $Ca^{2+}$ -Ströme und somit die Transmitterfreisetzung reduzieren würde (Carter und Medzihradsky, 1993). Eine andere Möglichkeit, die von Endo und Yawo (2000) diskutiert wird, ist die DAGO-induzierte Unterdrückung des präsynaptischen  $Ca^{2+}$  Einstroms durch die selektive Inhibition von N-Typ  $Ca^{2+}$ -Kanälen.

Um das Verhältnis zwischen den extrazellulären Konzentrationen der Metabolite zur neuronalen Aktivität zu untersuchen, wurde der  $Na^+$ -Kanal Blocker TTX (1  $\mu$ M) über die Sonde in das MNH appliziert. Die Applikation von TTX führte zu einer Senkung der 5-HIAA Konzentration. Die gleichzeitige Gabe von TTX+DAGO führte allerdings zu keiner weiteren Senkung der extrazellulären Konzentration der 5-HIAA.

Ein ungelöstes Problem ist das weithin bekannte Ungleichgewicht zwischen der Opiatrezeptor-Expression und dem Vorkommen ihrer endogenen Liganden in verschiedenen Hirnregionen von Vögeln (Csillag et al., 1989; 1990; Reiner et al., 1984; 1989; de Lanerolle et al., 1981) und Säugern (MacMillan et al., 1998). Interessanterweise wurde das größte Ungleichgewicht innerhalb des Telencephalons des Vogels im Hyperstriatum ventrale (HV)

und im geringeren Ausmaß im Neostriatum (Reiner et al., 1989) gefunden. Eine Interpretation dieses Ungleichgewichts ist aufgrund der Datenlage schwierig. Eine Möglichkeit ist, dass die endogenen Liganden noch nicht identifiziert sind oder die Bindungsstellen im HV andere Aufgaben als die Neurotransmission wahrnehmen. Andererseits könnte die große Menge an Rezeptoren den Neuronen, die besonders sensibel auf eine geringe Menge freigesetzter Liganden, die von den freisetzenen Neuronen kommen, reagieren, helfen. Diese Eigenschaft könnte wichtig für die funktionelle Organisation des HV sein (Reiner et al., 1989).

Zusätzlich unterstützen Daten von MacMillan et al. (1998) an Ratten, die einen Transport von freigesetztem  $\beta$ -Endorphin durch die Zerebrospinalflüssigkeit beschreiben, die Volumentransmission als einen Mechanismus der Opiatwirkung im Gehirn.

Der Opiatrezeptorantagonist Naloxon wird in pharmakologischen Experimenten genutzt, um die Effekte, die durch verschiedene  $\mu$ -Rezeptor Agonisten induziert werden, zu blockieren (Enrico et al., 1998; Huang et al., 1997; Anagnostakis und Spyraiki, 1994; Passarelli und Costa, 1989; Spampinato et al., 1985). In frisch geschlüpften Haushuhnküken ist eine markante Bindung von Naloxon in Regionen wie dem Hyperstriatum und dem Neostriatum zu finden (Csillag et al., 1989; vergl. Abbildung 2). Die hier dargestellten Daten zeigen, dass die systemische Applikation von Naloxon die Effekte des systemisch gegebenen und des intrazerebral applizierten  $\mu$ -Opiatrezeptor-Agonisten DAGO blockieren. Wird DAGO gleichzeitig mit Naloxon i.p. injiziert, ist die Konzentration, die das MNH erreicht, möglicherweise niedriger, als bei einer Injektion in das MNH. Im Einzelexperiment bewirkt DAGO eine geringere Absenkung der 5-HIAA und im Kombinationsexperiment ist die Wirkung ebenfalls etwas moderater und der Effekt des Naloxons überwiegt, was in einem geringeren Anstieg als bei einer Einzelinjektion zum Ausdruck kommt. Für die 5-HIAA kann eine Beeinflussung durch den  $\mu$ -Opiatrezeptor postuliert werden. Welcher Natur diese Beeinflussung ist, muss in weiterführenden Experimenten untersucht werden. Es ist möglich, dass durch die teilweise Blockade der Opiatrezeptoren die tonische Aktivierung durch endogene Opiate nicht aufrecht erhalten werden kann und es dadurch zu einer gesteigerten Freisetzung der 5-HIAA kommt. Wird DAGO hinzugegeben, wird die Regulation in das Gegenteil verkehrt und es wird entsprechend weniger freigesetzt.

Das basalen und Naloxon-induzierten Niveaus der 5-HIAA wurden durch die TTX Infusion gesenkt, d.h. während der Blockade der Neurotransmission. Das bedeutet, dass die Naloxon-induzierten Änderungen der 5-HIAA, zumindest teilweise, mit der Neurotransmission in Beziehung stehen, und Aktivitäten im MNH reflektieren. Es konnte am 1-tägigen Küken

gezeigt werden, dass die Metabolite in einem bestimmten Maße synaptischen Ursprungs sind, und somit die Veränderungen in der Freisetzung von Serotonin und Dopamin repräsentieren. Es ist allerdings nicht auszuschließen, dass die gemessenen Dialysatkonzentrationen an 5-HIAA und HVA zum Teil aus weiter entfernten Gebieten stammen, die von der TTX Blockade nicht betroffen sind. Bei Säugern wurde diskutiert, ob ein Teil der 5-HIAA aus der intraneuronalen Metabolisierung von neu synthetisierten Serotonin stammt (Vahabzadeh und Fillenz, 1994)

Die tonische Inhibition könnte auch dazu dienen, eine niedrige Aktivität des serotonergen Systems aufrecht zu erhalten, um es vor Stressoren zu schützen (Gamaro et al., 2003; Lowry et al., 2003; Noguchi et al., 2001; Kawahara et al., 1993). Einige Befunde auf der Verhaltensebene unterstützen diese Schlussfolgerung: eine Erhöhung der 5-HIAA, die im MNH der Küken während ihrer Trennung von der Gruppe gemessen wurde, korreliert mit der Dauer der gemessenen Distressvokalisation (Gruss und Braun, 1997). Zusätzlich zeigt die hier vorliegende Arbeit eine Steigerung der Distressvokalisation nach der Applikation von Naloxon in einer Konzentration, die das serotonerge System im MNH moduliert. Zusammengefasst lässt sich sagen, dass der Antagonist Naloxon die Inhibition des serotonergen Systems unterbricht und so eine Steigerung der Distressvokalisation induziert. Diese verstärkte Vokalisation reflektiert einen veränderten emotionalen Zustand des Tieres, ähnlich den Befunden aus vorangegangenen Experimenten, in denen  $\mu$ -Opiatrezeptor-Agonisten oder -antagonisten appliziert wurden (Panksepp et al., 1980a; 1978a; 1978b). Auch bei Säugetieren wurde Serotonin als Haupttransmitter in der Vermittlung der Vokalisation, insbesondere vermittelt durch 5-HT<sub>1A</sub> und 5-HT<sub>2</sub> Rezeptoren, bestimmt (Sanchez, 2003). Derartige Änderungen des inneren emotionalen Zustandes können Auswirkungen auf die Motivation haben, einen Prägestimulus zu suchen, und auf die Ausbildung einer emotionalen Bindung an ein Prägeobjekt oder einen Ton (Panksepp et al., 1997; Panksepp and DeEsquinazi, 1980). Geht man hier von einer Beeinflussung des Stresslevels aus, d.h. Naloxon induziert die Symptome von Stress, so kann geschlussfolgert werden, dass die Applikation von DAGO eine Absenkung des Stresslevel bewirkt und somit zur Beruhigung der Tiere führt. Dies stimmt mit der allgemein bekannten beruhigenden Wirkung der Opiate überein.

#### 4.1.2.1. Injektion von Naloxon in verschiedenen Altersstadien

Auffallend ist, dass die Variabilität der 5-HIAA Konzentration nach der Applikation von Naloxon am Tag 7 generell größer ist als am Tag 1 (vgl. Abbildung 13). Obwohl die Behandlung der einzelnen Tiere während dieser Tage gleich war, zeigt sich doch ein Unterschied, der möglicherweise durch eine unterschiedliche Erfahrung hervorgerufen wird. Eine Konzentrationsänderung von Catecholaminen, in Abhängigkeit von der Erfahrung, wurde am Beispiel des Noradrenalins in der Wulst und dem medialem Vorderhirn von visuell erfahreneren im Vergleich zu unerfahreneren Tieren gezeigt (Davies et al., 1983).

Werden die einzelnen Tiere am Tag 7 genau betrachtet, lassen sie sich in zwei Gruppen teilen. Eine Gruppe reagiert mit einem Anstieg der 5-HIAA während sich die Konzentrationen des Metaboliten in der anderen Gruppe nicht ändern (vgl. Abbildung 14). Möglicherweise reagiert das serotonerge System bei einigen Tieren nach Abschluss der sensitiven Phase weniger intensiv auf die Modulation durch endogene Opiate, da die Prägung auf das Muttertier, in dem Falle womöglich mit unterschiedlicher Intensität, abgeschlossen ist. Weiterhin könnten die Erfahrungen der einzelnen Tiere diese mehr oder weniger empfindlich für den durch Naloxon induzierten Stress machen.

#### 4.1.3 Opiatmodulation des dopaminergen Systems

Es wurde gezeigt, dass dopaminerge Mechanismen entscheidend bei der auditorischen Filialprägung beteiligt sind. Die pharmakologische Blockade der dopaminergen Rezeptoren während des Prägeexperiments verhinderte signifikant den Prägeerfolg (Gruss et al., 2003). Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen einen modulatorischen Effekt des  $\mu$ -Opiatrezeptor Agonisten DAGO auf das dopaminerge System (als Änderungen der HVA-Konzentration gemessen) im MNH des Kükens. Dieser modulatorische Effekt von DAGO hing entscheidend von der Art der Applikation ab. Im Gegensatz zur lokalen Applikation, die keinen Effekt hatte, steigerte die systemische Applikation von DAGO die HVA-Konzentration im MNH. Dementsprechend ist eher anzunehmen, dass  $\mu$ -Rezeptoren am Ursprung der dopaminergen Innervation in das MNH, d.h. in der mesencephalen Area ventralis Tsai (AVT), aktiviert wurden, statt lokale Rezeptoren im MNH. Die Applikation von TTX zur Überprüfung der neuronalen Natur führte zu einer Senkung der basalen HVA Konzentration. Die gleichzeitige Gabe von TTX+DAGO führte zu einer kurzzeitigen Senkung der extrazellulären Konzentration der HVA. Das bedeutet, dass die DAGO-induzierten Änderungen der HVA,

zumindest teilweise, mit der Neurotransmission in Beziehung stehen und Aktivitäten im MNH reflektieren.

Es wurde gezeigt, dass die AVT der Hauptursprung des dopaminergen Eingangs in das MNH darstellt (Metzger et al., 2002; 1996), und dass die AVT im Taubengehirn durch eine moderate Dichte an  $\mu$ -Opiatrezeptoren charakterisiert ist (Reiner et al., 1989). Eine elektronenmikroskopische-immunhistochemische Studie zeigte eine ähnliche Organisation des enkephalineren Eingangs in die Gebiete der tegmentalen dopaminergen Zellen bei Vögeln und Säugern (Medina et al., 1995). Bei Säugern wurde nach der Infusion von DA(M)GO in die ventrale tegmentale Area (VTA), dem Hauptursprungsgebiet der dopaminergen Innervation in den PFC, und den Nucleus accumbens eine gesteigerte Freisetzung von Dopamin in beiden Regionen nachgewiesen (Noel und Gratton, 1995). Da die gesteigerte Dopaminfreisetzung nach der Injektion von  $\mu$ -Opiatrezeptor-Agonisten durch Naloxon blockiert wurde (Huang et al., 1997; Anagnostakis und Spyraiki, 1994; Spampinato et al., 1985), wird allgemein angenommen, dass die dopaminergen Neurone unter der Kontrolle der Opiate auf der präsynaptischen Seite stehen (Genç et al., 1987). In anderen Hirngebieten kann Naloxon eine gewisse Agonistwirkung an Dopaminrezeptoren ausüben und es kommt dann zu einer erleichterten Freisetzung von basalem Dopamin (Feigenbaum und Howard, 1996; Feigenbaum et al., 1982).

Eine ähnliche Agonistwirkung könnte eine Erklärung für den etwas überraschenden Anstieg von HVA nach der Applikation des Agonisten DAGO und des Antagonisten Naloxon sein. Dieser Anstieg wurde auch für andere Antagonisten des  $\mu$ -Rezeptors, wie CTOP (D-Pen-Cys-Tyr-D-Trp-Orn-Thr-Pen-Thr-NH<sub>2</sub>) und  $\beta$ -Funaltrexamin gezeigt, wobei aber ein anderer Mechanismus diskutiert wird. In unserem Falle konnte eine unspezifische Erhöhung, bedingt durch die Naloxon-Konzentration, nicht ausgeschlossen werden. CTOP und  $\beta$ -Funaltrexamin, in die VTA injiziert, bewirken eine Steigerung von Dopamin und seiner Metabolite DOPAC und HVA. Diese Wirkungen lassen einen komplexen lokalen Mechanismus vermuten, der die Opiat-Dopamin-Wechselwirkung in der VTA vermittelt. Afferente Fasern können vom Nucleus accumbens und dem ventralen Pallidum in die VTA (siehe Abbildung 21) projizieren, einen GABAergen Eingang einschließen und am Terminal  $\mu$ -Opiatrezeptoren tragen. Durch eine Aktivierung der Rezeptoren wird die GABAerge tonische Inhibition reduziert und somit mehr Dopamin freigesetzt. Weiterhin können die  $\mu$ -Rezeptoren auf GABAergen Interneuronen in der ventralen VTA lokalisiert sein, wie durch Studien an Säugern gezeigt wurde.  $\mu$ -Opiatrezeptor-Agonisten und -Antagonisten könnten an beiden Populationen der  $\mu$ -Opiatrezeptoren wirken, die GABAerge Inhibition der tegmentalen

dopaminergen Neurone blockieren und so eine gesteigerte Dopaminfreisetzung in den Zielgebieten verursachen (vergl. Abbildung 21; Bontempi und Sharp, 1997; Devine et al., 1993). Eine derartige  $\mu$ -Rezeptor vermittelte Inhibition der GABAergen Interneurone wurde auch *in vitro* beschrieben. Die Hyperpolarisation GABAerger Interneurone und eine nachfolgende Freisetzung von Dopamin wurde nach der Behandlung mit einem  $\mu$ -Rezeptoragonisten beobachtet (Bergevin et al., 2002; Johnson und North, 1992). Es kommt indirekt zu einer Steigerung der Dopamin Freisetzung (Dourmap et al., 1997). Des Weiteren besteht ein Zusammenhang zwischen der Häufigkeit der Morphininjektion und der Reaktion der HVA. Nach der ersten Injektion korrelierte die Freisetzung von DOPAC + HVA mit der von Dopamin (Enrico et al., 1997). Die in der Literatur gefundenen Ergebnisse stimmen, was die systemische Injektion von Morphin oder DAGO angeht, gut mit den im Huhn gefundenen überein, so dass ähnliche bzw. gleiche Mechanismen angenommen werden können.

Das basale und Naloxon-induzierte Niveau der HVA wurde durch die TTX Infusion gesenkt, d.h. während der Blockade der Neurotransmission. Das bedeutet, dass die Naloxon-induzierten Änderungen der HVA, zumindest teilweise, mit der Neurotransmission in Beziehung stehen und Aktivitäten im MNH reflektieren. Westerink et al. (1987b) konnten zeigen, dass TTX den Anstieg von Dopamin und seiner Metabolite nach einer Morphininjektion unterdrückten. TTX bewirkte eine vollständige Blockade der Dopaminfreisetzung und nur eine teilweise Blockade des Metaboliten DOPAC. Die Metabolite können im Gehirn erheblich weiter diffundieren als die Transmitter selbst, und somit aus Bereichen stammen, die nicht von der lokalen TTX Applikation betroffen sind (Vahabzadeh und Fillenz, 1994; Westerink et al., 1987b). Es kann also nicht ausgeschlossen werden, dass zumindest ein Teil der HVA von nicht-synaptisch freigesetztem Dopamin stammt.

Eine spezieübergreifende Studie wurde von Wood (1983) veröffentlicht. Die Wirkung von Opiatrezeptoragonisten und -antagonisten auf den Dopaminmetabolismus wurde am nigrostriatalen System der Ratte untersucht. Dabei wurde der Metabolismus an den Nervendigungen (DOPAC (intraneural gebildet), und als Index der Freisetzung, 3-MT (3-Methoxythyramin, extraneural gebildet)) untersucht. Es wurde festgestellt, dass  $\mu$ -Rezeptor- und  $\delta$ -Rezeptor Agonisten eine dosisabhängige Steigerung des Dopamins hervorrufen, die Naloxon-reversibel war. Es konnte keine Regulation durch  $\kappa$ -Rezeptoren beobachtet werden. In der Ratte wurde keine Änderung der 3-MT-Freisetzung beobachtet, wogegen bei der Maus eine Erhöhung der Freisetzung, assoziiert mit einer Verhaltensaktivierung, beschrieben

wurde. Dies ist ebenfalls bei Hamstern und Gerbils zu beobachten. In der Taube konnte allerdings keine Opiataktion im aufsteigenden dopaminergen System gefunden werden. Bei der Ratte existiert eine präsynaptische Opiatkontrolle der dopaminergen Synapsen im Striatum, wogegen die Maus keine präsynaptischen Opiatrezeptoren besitzt. Dort scheint die Regulation des nigrostriatalen Weges ein nigrales System von Opiatrezeptoren auf dopaminergen Neuronen oder affarente Eingängen auf diese Neuronen zu involvieren. Woods vermutete, dass die Opiatregulation der dopaminergen Wege ein Ergebnis der Evolution ist (Wood, 1983).

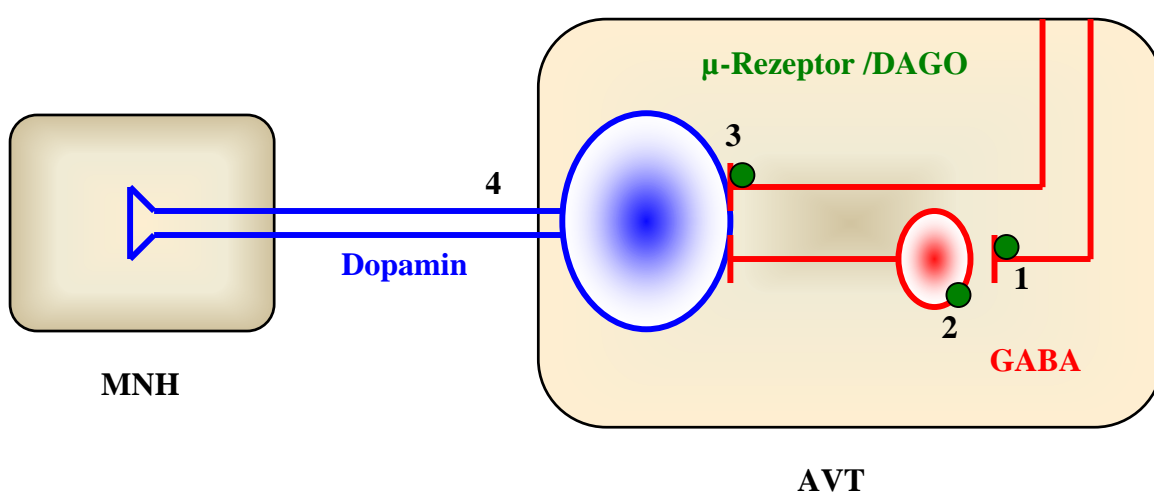


Abb. 21 Hypothetisches Modell für die Modulation der dopaminergen Neurone (modifiziert aus Spanagel et al., 1992; Devine et al., 1993) in der AVT.

**µ-Rezeptor-Agonisten:** Agonisten, die an den µ-Rezeptoren der GABAergen Terminalien (1), präsynaptisch zum GABAergen Interneuron, wirken, würden die GABA-vermittelte Inhibition des GABAergen Interneurons senken. Die Aktivierung µ-Opiatrezeptoren, die auf den GABAergen Interneuronen lokalisiert sind (2) und auf den Terminalien der GABAergen Afferenten präsynaptisch zum dopaminergen Neuron (3), inhibiert diese Neurone, was in einer Disinhibition der dopaminergen Neurone (4) resultiert.

**µ-Rezeptor-Antagonisten:** Antagonisten, die an den µ-Rezeptoren der GABAergen Terminalien (1), präsynaptisch zum GABAergen Interneuron, wirken, würden die GABA-vermittelte Inhibition des GABAergen Interneurons steigern. Antagonisten, die an den µ-Opiatrezeptoren GABAerger Afferenten präsynaptisch zum dopaminergen Neuron (3) wirken, reduzieren die vorhandene Inhibition dieser Neuronen, und steigern so den inhibitorischen GABAergen Eingang auf dopaminerge Neurone.



#### 4.1.4 Opiatmodulation des glutamatergen Systems

Die Modulation der Glutamatkonzentration durch die Applikation von  $\mu$ -Opiatrezeptor-Agonisten und -antagonisten ist in dieser Arbeit gering. Es gibt einige nicht signifikante, kleine Änderungen der Glutamatkonzentration im MNH des Kükens, aber eine sehr große Beeinflussung des kognitiven Aspekts der Filialprägung ist unwahrscheinlich. Aufgrund der Wichtigkeit des Glutamats bei der Prägung, werden diese Änderungen diskutiert und diesbezüglich ein Literaturüberblick gegeben.

Es gibt viele Hinweise, die auf eine Wechselwirkung zwischen dem Opiatsystem und ionotropen Glutamatrezeptoren vom NMDA-Typ deuten. NMDA spielt eine wesentliche Rolle in der auditorischen Filialprägung des Haushuhnkükens, eine Blockade dieser Rezeptoren führte zu einer eingeschränkten bzw. völlig unterdrückten Prägung (Bock und Braun, 1999; Bock et al., 1996). In Lernexperimenten wurde eine ähnliche Wirkung für die Blockade der NMDA-Rezeptoren beschrieben. Diese konnte durch die nachfolgende Gabe von Naloxon, in diesem Lernparadigma (inhibitorisches Vermeidungslernen) leistungssteigernd, nicht aufgehoben werden (Roesler et al., 1999). *In vitro* Befunde deuten ebenfalls in diese Richtung, d.h. auf eine additive hemmenden Wirkung der NMDA-Blockade und eine Wirkung von Opiatagonisten auf die  $\text{Ca}^{2+}$ -Aufnahme (Vlaskovska et al., 1997). Opiate können auch direkt NMDA-Rezeptor vermittelte elektrophysiologische Ereignisse modulieren. Einige Opiatagonisten und NMDA-Antagonisten teilen eine Rezeptorbindungsstelle (*in vitro*-Untersuchungen) und es gibt eine direkte oder indirekte Interaktion der Rezeptoren. DA(M)GO ruft, Naloxon reversibel, eine Inhibition der durch NMDA induzierten Exzitation hervor und auch in diesen Experimenten wurde neben der Inhibition eine Verstärkung der durch NMDA hervorgerufenen Ströme gemessen (Chen und Huang, 1991). DA(M)GO inhibiert präsynaptische NMDA Ströme, verstärkt aber postsynaptische Ströme. Der Nettoeffekt von DA(M)GO ist von der Interaktion zwischen prä- und postsynaptischer Aktion abhängig (Chen und Huang, 1991). Es ist möglich, dass  $\mu$ -Rezeptor vermittelte Opiate eine allgemeine Inhibition der Aktionspotentiale hervorrufen, die extrazellulär gemessen werden, aber eine regionale NMDA-Rezeptor vermittelte Membranexzitation im selben Neuron, die über intrazelluläre Mechanismen stattfindet.

Die NMDA-Rezeptoren im MNH des Haushuhnkükens befinden sich möglicherweise postsynaptisch auf Spines (Bock J., pers. Mitteilung). Da die Applikation von DAGO direkt in das MNH zu einer geringen Freisetzung von Glutamat führte, könnte auch die festgestellte Verstärkung eine Rolle spielen, wenn die gemessene Dialysatkonzentration des Glutamats

zum Teil synaptischen Ursprungs ist. Diese Wechselwirkungen werden zunehmend auch für den klinischen Bereich wichtiger, da Antagonisten für den NMDA-Rezeptor, wie Ketamin, den analgetischen Effekt der Opiate potenzieren. Einer Toleranzentwicklung wird auch nach längerer Anwendung, z.B. in der Schmerzbekämpfung, entgegengewirkt (Wiesenfeld-Hallin, 1998).

Die Wirkung von Naloxon auf die Glutamatfreisetzung ist meist inhibitorisch (Enrico et al., 1998), wie auch in dieser Arbeit beobachtet wurde. Dies wird mit einem hemmenden,  $\mu$ -Rezeptor vermittelter Mechanismus erklärt, der die Freisetzung von Ascorbinsäure kontrolliert, die mit der neuronalen oder glialen Wiederaufnahme von Glutamat gekoppelt ist. Glutamat reagiert unterschiedlich auf die Infusion bzw. Injektion von DAGO. Die i.p. Injektion war ohne Wirkung auf die Glutamatkonzentration, während nach einer Applikation direkt in das MNH eine leicht erhöhte Glutamatkonzentration gemessen wurde.

Trotzdem in den meisten Arbeiten *in vivo* und *in vitro* eine Hemmung der Freisetzung von Glutamat nach der Applikation von  $\mu$ -Opiatrezeptor-Agonisten beobachtet wurde (Hoffman und Lupica, 2001; Nicol et al., 1996), wurden auch Verstärkungen dieser Freisetzung, abhängig von funktionellen NMDA-Rezeptoren und L-Typ  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanälen, gefunden (Przewlocki et al., 1999; Johnson und Napier, 1997).

Die Applikation von TTX bewirkt allerdings keine Veränderung der Dialysatkonzentration des Glutamats, was auch von anderen Autoren gefunden wurde (Timmerman et al., 1999; Miele et al., 1996; Vahabzadeh und Fillenz, 1994; Moghaddam, 1993; Westerink et al., 1988; Westerink et al., 1987b). Es wird angenommen, dass Glutamat auch zum großen Teil nicht-synaptischen Ursprungs sein und aus metabolischen Aminosäurepools stammen kann (Miele et al., 1996; Westerink et al., 1987a). Dafür spricht auch eine unveränderte Freisetzung von Glutamat nach  $\text{K}^+$ -Applikation und der Gabe einer  $\text{Ca}^{2+}$ -freien Ringer (Gruß, 1998).

Die Glutamatkonzentrationen sind im  $\mu\text{M}$ -Bereich zu finden und damit viel höher als die der Metabolite (nM-Bereich). Dass die eingesetzte TTX-Konzentration diesen Transmitter nicht beeinflusst, ist unwahrscheinlich, da auch höhere TTX Konzentrationen (50 und 500  $\mu\text{M}$ ) keine Änderung des Glutamatspiegels induzieren (Shiraishi et al., 1997)

Das Glutamatsystem könnte sich qualitativ in Bezug auf die sensitive Phase unterscheiden. Die NMDA-Blockade wurde an den 3 Tagen der Prägung durchgeführt (Bock und Braun, 1999). Am Tag 1 ist die Glutamatkonzentration durchschnittlich um die Hälfte höher als am Tag 7. Möglicherweise spielt Glutamat am Beginn der sensitiven Phase eine größere Rolle als nach deren Abschluss. Obwohl am Tag 7 weniger Glutamat als am Tag 1 vorhanden ist,

reagiert es mit einer Steigerung der Konzentration auf die Applikation von Naloxon, die allerdings nicht signifikant ist.

#### 4.1.5 Opiatmodulation des Taurins

Taurin reagiert auf Naloxon mit einem leichten, kaum messbaren Anstieg. Es gibt wenig Vergleichsmöglichkeiten aus der Literatur zum Zusammenhang von Taurin und Opiaten. Taurin wird im periaquäduktealen Grau nach der Gabe des Na<sup>+</sup>-Kanal Aktivators Veratridin freigesetzt, aber durch eine systemische Morphinapplikation nicht verändert (Renno et al., 1992). Des Weiteren wurde die Freisetzung von Aminosäuren im Formalintest und mit vorheriger Morphininjektion gemessen. Dabei zeigte Taurin einen Anstieg nach der Injektion von Formalin, der durch die Morphininjektion unterdrückt wurde (Malmberg und Yaksh, 1995).

Taurin kann auch als Maß für die Schädigung einer Zelle gelten. Taurin ist als Osmoregulator und Neuromodulator bekannt, der eine neuroprotektive Wirkung durch die Modulation des Ca<sup>2+</sup> Einstroms in die Zellen und eine Modulation von Cl<sup>-</sup>-Kanälen hat (Gruß, 1998), d.h. infolge einer Schädigung kommt es zu einer erhöhten Freisetzung von Taurin und dadurch zu einem Schutz der Zelle (Saransaari und Oja, 2000). Die extrazelluläre Taurinkonzentration kann als Index für eine zeitige neurotoxische Komponente der Aminosäuren *in vivo* genutzt werden (Menéndez et al., 1989). Da nach der Applikation von Naloxon kaum Änderungen der Taurinkonzentration zu finden sind, sollten die eingesetzten Konzentrationen für die Zellen nicht toxisch sein.

Werden die Konzentrationen von Taurin am Tag 1 und am Tag 7 verglichen, ist zum späteren Zeitpunkt eine signifikant höhere Konzentration messbar. Ein Grund dafür könnte die Rolle des Taurins im Gehirn von Neugeborenen sein, bei denen die Taurinkonzentration doppelt so hoch wie bei Erwachsenen ist. Diese Aminosäure ist wichtig für die Entwicklung, indem es die Erregungsfähigkeit der Nerven dämpft (Huxtable, 1989).

Die Taurinkonzentration wurde durch die Applikation von TTX nicht beeinflusst. Die Ergebnisse in der Literatur sind diesbezüglich kontrovers und zeigen keine Effekte (Biggs et al., 1995), eine Senkung der Konzentration (Singewald et al., 1993) und leichte, nicht signifikante Steigerungen (Girault et al., 1986) und signifikante Änderungen (Gruß, 1998) in verschiedenen Präparationen und Hirnregionen.

#### 4.1.6 Inhibitorische und exzitatorische Wirkung der $\mu$ -Opiatrezeptor Bindung

Wie in der Einleitung schon erwähnt (siehe Kap. 1.1.2), sind für die Wirkung der Opiate verschiedene Mechanismen denkbar. Ein in den vorangegangenen Kapiteln häufig diskutierter Mechanismus ist die Modulation der Dopaminfreisetzung im Zielgebiet über GABAerge Interneurone in der VTA. Die Modulation der Transmitterfreisetzung über  $\mu$ -Opiatrezeptoren kann präsynaptisch über ein GABAerges Interneuron (Shoij et al., 1999) stattfinden, wobei das Interneuron eine tonische Inhibition auf das dopaminerge Neuron ausübt (Abbildung 21).  $\mu$ -Opiatrezeptoren können auch Exzitation hervorrufen, z.B. eine postsynaptische Aktivierung glutamaterger Neurone. Verschiedene Mechanismen sind möglich, die auch in anderen Regionen wie z.B. der Amygdala, diskutiert werden (Meis und Pape, 2001).

1. Nach der Bindung der Opiate an den Rezeptor des GABAergen Neurons (präsynaptisch) reagiert die dissoziierte  $\alpha$ -UE des G-Proteins direkt mit z.B. 4-AP sensitiven, spannungsabhängigen  $K^+$ -Kanälen (Shen und Johnson, 2002; Vaughan, 1997), was zu einem erhöhten  $K^+$ -Strom und nachfolgend einem geringeren Einstrom von  $Ca^{2+}$ -Ionen führt und somit die Transmitterausschüttung hemmt (Tatsumi, 1990; North et al., 1987). Diese Hemmung der GABA Freisetzung führt zu einer gesteigerten Freisetzung der Transmitter aus dem nachgeschalteten Neuron.
2. Die  $Ca^{2+}$ -Kanäle werden direkt gehemmt, was ebenfalls zu einer Reduktion von  $Ca^{2+}$  und der Transmitterfreisetzung am GABAergen Interneuron führt, und der weitere Weg wie in 1. ablaufen würde (Sternweis und Pang, 1990).
3. Die  $\alpha$ -UE des G-Proteins aktiviert die Phospholipase C (PLC), diese wirkt auf Inositolphosphat-4 und spaltet dieses in Diacylglycerol (DAG) und Inositolphosphat-3. DAG aktiviert die PKC, die multiple Phosphorylierungen vornehmen kann, z.B. an Ionenkanälen und so u.a.  $K^+$ -Kanäle öffnet oder schließt. IP-3 mobilisiert die intrazellulären  $Ca^{2+}$ -Speicher und verursacht ebenfalls eine Aktivierung der PKC (Zimprich et al., 1995).

Eine direkte Wirkung an exzitatorischen Neuronen, die zu einer gesteigerten Transmitterfreisetzung, aufgrund der Hemmung der cAMP-Kaskade, führt, wurde an glutamatergen Neuronen nachgewiesen. Dabei bindet der  $\mu$ -Opiatrezeptorligand an den Rezeptor, der an  $G_0$  oder  $G_i$  Proteine gekoppelt ist, es kommt zur Inhibition der cAMP-abhängigen PKA, was dann eine postsynaptische Glutamatfreisetzung bewirkt (Sbrenna et al., 1999; Chen und Huang, 1991).

## 4.2 Prägung

Der Prägungserfolg der Tiere unterschied sich maßgeblich von dem, was vorher bei anderen Studien in der Arbeitsgruppe erreicht wurde (Bock et al., 1996; Gruss et al., 2003). Wurden in diesen Studien 60-70 % der Kontrolltiere erfolgreich geprägt, waren es in dieser Studie nur 17 bzw. 18 % je nach Injektionsart. Ein Grund dafür könnte der Wechsel bei der Zucht in der Brüterei sein, von der wir die Bruteier bezogen. Tiere aus kommerziellen Hühnerzuchten werden ständig für den Legebetrieb (Leghorn) oder für die Mast (Broiler) optimiert. Es könnte also sein, dass es im Zeitraum der Experimente nicht möglich war, die 100 %ig gleiche Abstammung zu erhalten. Die Tiere unterliegen einer fortschreitenden Domestikation, die unter Umständen die natürliche Prägung beeinflusst. Auch Hess beschrieb schon 1959 die relativ schlechte Prägbarkeit von Leghorn Hühnern (Hess, 1959).

Weitere Punkte, die bei der Prägung beachtet werden müssen, sind die saison-bedingten Veränderungen der Prägbarkeit und eine unterschiedliche Reaktion auf z.B. Naloxon, die auch vom Futterstatus des Tieres abhängen kann (Panksepp et al., 1980b)

Die Prägerate unterschied sich etwas hinsichtlich der Haltungsbedingungen, wenn Naloxon gegeben wurde. So ist bei den völlig isoliert gehaltenen Tieren eine bessere Prägung zu verzeichnen, wenn ihnen Naloxon gegeben wurde, wobei die Ergebnisse nicht signifikant sind. Bei den in Einzelhaltung lebenden Tieren ist weder hinsichtlich der Injektionsart, noch der Art der injizierten Substanz ein Unterschied feststellbar.

### 4.2.1 Opiate, Prägung und soziale Motivation

Das Opiatsystem spielt eine wichtige Rolle bei einer Vielzahl von sozialen Interaktionen wie der Mutter-Kind-Beziehung, der Beziehung zwischen Gleichgesinnten im juvenilen Tier und angleichender, sexueller und aggressiver Interaktionen im adulten Tier. Die Freisetzung von Endorphinen erfolgt durch somato-sensorische Stimulation und führt zu sozialer Festigung, indem durch die positive Erfahrung das Selbstbewusstsein und die Unabhängigkeit gefördert wird (Panksepp et al., 1997). Während der ersten Lebensjahre, z.B. des Menschen, werden soziale Beziehungen zu nahestehenden Personen geknüpft. Diese Bindungen werden selektiv ausgewählt und bilden über die Körperwärme, angenehme Berührungen, Bewegungen und den Geruch eine sichere emotionale Basis für die weiteren Aktivitäten des Kindes. Die Bindung an die Mutter wird als endogener, zellulärer Abhängigkeitsprozess verstanden, bei dem ein endogenes Belohnungssystem stimuliert wird und das Kind physiologisch von der Mutter abhängig ist. Eine Trennung führt zu Angst und Stress, was einer endogenen

Entzugssituation gleichkommt. Diese Entzugssituation kann durch Naloxon simuliert werden, d.h. eine Blockade der Opiatrezeptoren führt dazu, dass das endogene Belohnungssystem nicht mehr aktiv ist. Daraufhin suchen Mensch oder Tier verstärkt nach sozialer Interaktion, um durch die Resozialisierung diese Entzugssituation wieder aufzuheben (Panksepp et al., 1997; Panksepp und DeEskinazi, 1980; Herman und Panksepp, 1978).

In Prägungssituationen können durch die endogenen Opiate die unterschiedlichen Aspekte der sozialen Prägung verändert werden. Durch die Applikation hoher Dosen Naloxon konnte die Nachfolgereaktion zwar nicht verhindert werden, aber es könnte ein Einfluss der Opiate auf die Wahl des Prägeobjekts vorhanden sein (Panksepp et al., 1997). Untersuchungen der Prägung auf einen natürlichen Stimulus zeigten, dass sich die Tiere unter Naloxoneinfluss zwar auf den Experimentator prägen ließen, aber ein unbestimmtes Verhältnis zum Experimentator hatten und auch in dessen Nähe Stressvokalisation äußerten (Panksepp und DeEskinazi, 1980; Panksepp et al., 1980). Auch Haushuhnküken zeigten nach der Behandlung mit Naloxon ein vermindertes Wohlbefinden, das normalerweise durch Körperkontakt hervorgerufen wird (Vilberg et al., 1977). Das dabei aktive Belohnungssystem beim Lernen, hat ebenfalls eine starke opioide Komponente. Bei Lernaufgaben führte Morphin dazu, dass eine Aufgabe nicht so schnell vergessen wurde, wogegen Naloxon zu einem schnellen Vergessen der gelernten Inhalte führte. Nach erfolgter Prägung reduzierte Naloxon z.B. den positiven Effekt des Prägestimulus und verursachte interne Konflikte beim Tier (Panksepp und DeEskinazi, 1980). Das mag auch eine Erklärung für den mangelnden Prägeerfolg der Tiere in dieser Arbeit sein. Bei der sexuellen Prägung konnte gezeigt werden, dass deprivierte Tiere eine verlängerte sensitive Phase haben (Bischof et al., 2002). In unserem Modell könnte die Isolierung ebenfalls die sensitive Phase verlängern und einen veränderten internen Status hervorrufen, infolge dessen durch Naloxon eine erhöhte Motivation besteht und die einzige Möglichkeit wahrgenommen wird, soziale Kontakte zu knüpfen, wogegen dies bei Saline injizierten Tieren nicht der Fall ist. So könnte trotz geringer Prägerate der leicht erhöhte Prozentsatz an geprägten Tieren erklärt werden. Hinsichtlich der Einzelhaltung kommt ein größeres Angebot an Umweltreizen zum Tragen. Die Küken erhalten während der Haltung Reize in Form von Tönen, und so scheint der Prägeton, auch in Verbindung mit der Henne, nicht den nötigen Reiz zu bieten.

Im Zusammenhang mit der Stressvokalisation werden bezüglich der Opiate 2 Modelle diskutiert (Sufka et al., 1994; Winslow und Insel, 1991).

1. Das endogene Opiatsystem wird durch soziale Separation (=Stress) stimuliert, nachgewiesen durch eine erhöhte Freisetzung von  $\beta$ -Endorphin bei Stress (Blass et al., 1987; Iny et al., 1987; Kehoe und Blass, 1986).
2. Soziale Beziehungen erhalten tonisch die Funktion des Opiatsystems und eine soziale Isolation führt zu einer Entzugssituation (Panksepp et al., 1986; 1980; 1978).

Die Ergebnisse dieser Arbeit und die gesamten Daten der Vokalisationsexperimente an Haushuhnküken unterstützen das 2. Modell, in dem sowohl soziale Isolation als auch die Applikation von Naloxon eine endogene Entzugssituation darstellt.

Im Gegenzug wurde gefunden, dass Opiat-Agonisten die Funktionen erfüllen, die endogene Opiate bei sozialen Interaktionen haben (Herman und Panksepp, 1978). Das könnte auch ein Grund für Drogenkonsum sein, wobei durch die Opiate die Belohnung ersetzt wird, die normalerweise durch soziale Kontakte hervorgerufen wird.

#### 4.2.2 Gewicht

Bei den Prägeversuchen wurde festgestellt, dass Tiere, die mit Naloxon behandelt wurden, ein geringeres Gewicht aufwiesen als Tiere, die mit Saline behandelt wurden. Die Modulation der Nahrungs- und Wasseraufnahme durch Opiatagonisten und -antagonisten bei Haushuhnküken, Tauben und Ratten ist gut untersucht worden (Denbow and McCormack, 1990; McCormack und Denbow, 1987; Savory et al., 1989; Millan und Morris, 1988; Deviche und Wohland, 1984). Die Applikation von Naloxon (5 mg/kg) führte bei Küken zu einer verminderten Aufnahme von Nahrung und Wasser (McCormack und Denbow, 1987), was mit meinen Beobachtungen übereinstimmt. Die Tiere nahmen aufgrund der täglichen Naloxoninjektion so wenig Nahrung auf, dass 29% der Tiere verstarben. In Tauben hingegen scheint nur die Nahrungsaufnahme und nicht die Wasseraufnahme vermindert zu werden (Deviche und Wohland, 1984)

Als Grund für dieses Verhalten werden zwei Theorien diskutiert:

1. Ein Mechanismus basiert auf der zentralen Belohnungstheorie von Belluzzi und Stein (1977) und wurde durch die Arbeiten von Carr und Simon (1984) unterstützt. In dieser Theorie wird postuliert, dass endogene Opiatpeptide die Antriebsreduktions-Belohnung vermitteln und so den Belohnungswert der Nahrungsaufnahme verstärken. Demzufolge unterbrechen Opiatantagonisten die normale Nahrungsaufnahme durch die Störung dieses Belohnungssystems. Nahrungs- und Wasseraufnahme scheinen weniger befriedigend zu sein

2. Ein zweiter Mechanismus wurde von Cooper (1980) vorgeschlagen, der die Opiatantagonist-induzierten Veränderungen bei der Nahrungsaufnahme auf einen veränderten Schwellenwert der Sättigung zurückführt. Diese Theorie ist auf die Beobachtung zurückzuführen, dass Naloxon weiterhin das Ernährungsverhalten bei Tieren beeinflusst, die schon aufgrund osmotischer Probleme weniger zu sich nahmen. Opiat-Antagonisten scheinen einen Opiat-vermittelten Mechanismus zu unterbrechen, der die Sättigung inhibiert. Diese Theorie wurde von Siviy et al. (1982) und Kirkam und Blundell (1984) unterstützt, die gezeigt haben, dass Naloxon die Beendigung der Nahrungs- und Wasseraufnahme beschleunigt, indem es die Prozesse stört, die dazu dienen, den Genuss aufrecht zu erhalten.
3. Die o.g. Autoren schließen auch die Möglichkeit nicht aus, dass Naloxon auf pharmakologische Art und Weise die motorischen Fähigkeiten verändert oder ein unspezifisches Unwohlsein induziert.

Die endogene Opiate spielen offenbar auch eine wichtige Rolle bei der Regulation der Futter- und Wasseraufnahme im Haushuhnküken.



### 4.3 Vokalisation

In dieser Arbeit führte eine intraperitoneale Gabe von 5 mg/kg Naloxon ohne weitere Beeinflussung der Tiere zu einer Steigerung der Vokalisation. Das kann Ausdruck eines verminderten sozialen Gefühls sein, denn das Tier suchte aktiv die Nähe des anderen Tieres in der Box (Hinlaufen und körperliche Kontaktaufnahme). Tiere, die mit Naloxon injiziert wurden, zeigen dieselben Anzeichen wie akut isolierte Tiere, die versuchen, die Gruppe zu erreichen und äußern die typische Stressvokalisation (*distress vocalisation*, DV; Scheich, 1987).

Laut Panksepp fördert die Blockade der Opiatrezeptoren die sozialen Bedürfnisse eher als das eine direkte Potenzierung der DV stattfindet. Die Potenzierung der DV ist abhängig von der Größe der Gruppe. Zu zweit gehalten, wurde die DV nach einer Naloxoninjektion ebenfalls gesteigert, wogegen das bei größeren Gruppen nicht der Fall war (Panksepp et al., 1986). D.h., der Antagonist Naloxon unterbricht die Inhibition des serotonergen Systems und induziert so eine Steigerung der Distressvokalisation. Diese verstärkte Vokalisation zeigt einen veränderten emotionalen Zustand des Tieres, ähnlich den Befunden aus vorangegangenen Experimenten, in denen  $\mu$ -Opiatrezeptor-Agonisten oder -antagonisten appliziert wurden (Panksepp et al., 1980a; 1978a; 1978b).

Vokalisationsexperimente am Säuger zeigten, dass deren Vokalisation durch eine zusätzliche systemische Gabe von Naloxon weiter erhöht werden konnte, wobei eine endorphinerge Inhibition vermutet wird (Herrmann und Panksepp, 1981). Da bei Küken der neostriatale Teil des MNH's mit den Kerngebieten des dorsomedialen Thalamus (DMA/DMP) verschaltet ist (Metzger et al., 1996) und daraus schlussfolgernd das MNH als Analog des PFC's beim Säuger betrachtet wird (Metzger et al., 1996; Scheich et al., 1991), ist eine ähnliche Kontrolle wie beim Säuger wahrscheinlich.

Die Mehrzahl der Experimente mit Opiatrezeptor Agonisten und Antagonisten erfolgten, indem die Wirkung der Substanzen in einer Isolationssituation getestet wurden.

Durch die Gabe von opiatähnlichen Substanzen direkt in das Gehirn (Morphin, [D-Ala-]- $\beta$ -Endorphin, [D-Ala-]- $\alpha$ -Endorphin, [D-Ala-]- $\gamma$ -Endorphin, [D-Ala-]-Met-Enkephalin-NH<sub>2</sub>) in einer Isolationssituation konnte die DV beim Küken reduziert werden (Panksepp et al., 1978b). Bei einer systemischen Gabe konnte hingegen keine Reduktion festgestellt werden (Vilberg et al., 1984). Im Gegensatz dazu ist bei Hunden, denen subkutan Morphin und Oxymorphin gegeben wurde, eine Reduktion der DV erreicht worden (Panksepp et al.,

1978a). Auch beim Meerschweinchen konnte die Rate der DC während einer Isolation durch Morphingabe verringert und durch Naloxongabe erhöht werden. Die Aktivität der Tiere wurde allerdings nur bei jungen Tieren beeinflusst. Wurde diesen Tieren Morphin gegeben, sank außerdem deren Bestreben, nahe bei der Mutter zu bleiben (Herman und Panksepp, 1978), was dafür spricht, dass durch das Morphin die Bedürfnisse des Tieres zumindest teilweise erfüllt wurden.

Die Befunde der Separationsexperimente sind bei ausgewachsenen Hühnern nicht nachzuweisen. Sie zeigen keine erhöhte Vokalisation, wenn ihnen Naloxon gegeben wird (Panksepp et al., 1986).

Endogene Opiate spielen auch eine Rolle bei angenehmen Erfahrungen. Der beruhigende Effekt durch die Aktivierung der  $\mu$ -Rezeptoren wurde z.B. erreicht, wenn Casomorphin gegeben wurde, das bekanntlich auch in der Milch von Rindern und Schafen vorkommt (Herz et al., 1993).

Wird eine für das Tier angenehme Situation (andere Tiere, Berührung) hergestellt, kann der beruhigender Effekt, der normalerweise davon ausgeht, durch die Gabe von Naloxon gemindert werden (Panksepp et al., 1980a).

Neuere Untersuchungen beschäftigen sich auch mit dem Einfluss von  $\mu$ - und  $\delta$ -Rezeptoren auf die Vokalisation und auf Reflexhandlungen bei aversiven Stimuli (Vivian und Miczek, 1998). Agonisten des  $\mu$ -Rezeptors (DAGO) und des  $\delta$ -Rezeptors (DPDPE) senkten die Vokalisation und steigerten die Reaktionszeit. Die Effekte von Morphin und DAGO ( $\mu$ -Rezeptor) konnten durch Naltrexon aufgehoben werden, wogegen der Effekt von DPDPE ( $\delta$ -Rezeptor) nicht durch Naltrindol aufgehoben wurde, was für eine  $\mu$ -Rezeptor vermittelte Reaktion spricht.

In Lernaufgaben wirken Opiatrezeptor-Antagonisten oft verbessernd auf die Lernleistung (Izquierdo und Diaz, 1983; Gallagher, 1982; Izquierdo, 1979; Messing et al., 1979).

Im Hinblick auf die Vokalisation unter Separationsbedingungen wurden verschiedene Transmittersysteme untersucht und modulatorische Effekte durch das muskarin-cholinerge und das serotonerge System gefunden. Antagonisten dieser Systeme erhöhen die DV und Agonisten verringern die DV. Die Förderung der cholinergen und serotonergen Aktivität wirkt z.B. dem Schmerz entgegen, wobei ähnliche Effekte beim Separationsstress denkbar sind (Panksepp et al., 1986).

In einem weiteren Paradigma wurden Glutamatagonisten und- antagonisten sowie der kortikotropin-freisetzende Faktor (*corticotropin releasing factor*; CRF) untersucht. Dabei wurden zwei verschiedene Gruppen getestet. Die erste befand sich in einfachen Testboxen und die andere in verspiegelten Boxen. Wurde der ionotrope Agonist NMDA den Tieren in den einfachen Boxen gegeben, war kein Effekt zu beobachten. In den verspiegelten Boxen führt eine Gabe von NMDA zu einer gesteigerten DV, ebenso eine Gabe von Kainat. Eine entgegengesetzte Wirkung wurde durch die Gabe von Quisqualat erreicht. Eine Senkung der DV wird durch die Gabe von APV und DGG (Gamma-D-glutamylglycin) einem Quisqualat-Kainat Antagonisten, erreicht. Das Zustandekommen der Unterschiede wird durch die relative Dichte der Rezeptorsubtypen in den untersuchten Hirnregionen hervorgerufen (Panksepp et al., 1980c). Auch aufgrund dieser Ergebnisse wird die Kontrolle der DV durch Glutamat als recht robust eingeschätzt.

CRF wurde ebenfalls in verschiedenen Situationen gegeben. CRF führte zu einer erhöhten Vokalisation und die Tiere suchten, ähnlich wie in den Naloxonexperimenten, aktiv nach sozialer Gesellschaft. In den einfachen Testboxen kam es ebenfalls zu einer moderaten Steigerung der DV und in verspiegelten Boxen, die Gesellschaft suggerieren, war der dramatische Effekt zu beobachten, dass es nicht zur Beruhigung des Tieres kam. Darin ähneln sich die Wirkungen von Naloxon und CRF (Panksepp et al., 1988). Der 5-HT<sub>1A</sub> Rezeptor Agonist Eltoprazin, der als antiaggressives Agens gilt, erhöht ebenfalls die Vokalisation von Haushuhnküken. Dies deutet auf eine Hauptrolle der 5-HT<sub>1A</sub> Rezeptoren bei der Vokalisation (Sanchez, 2003).

Weiterhin spielt das noradrenerge System eine wichtige Rolle in der Kontrolle der DV. Nach einer Noradrenalinrezeptorstimulation mit Clonidin, wurde die DV in Küken signifikant reduziert und es trat eine allgemeine Beruhigung ein, die altersabhängig war (Panksepp et al., 1980c). Ein direkter Einfluss von Naloxon auf die Freisetzung von Noradrenalin wurde in der Amygdala von Ratten nachgewiesen (Quirarte et al., 1998).

Die Hypothese, die am Anfang dieser Arbeit aufgestellt wurde (Abbildung 7), kann folgendermaßen modifiziert werden (Abbildung 22):

Die Filialprägung in jungen Küken kann neurochemisch in zwei Hauptkomponenten unterteilt werden: eine kognitive Komponente, hauptsächlich durch Glutamat vermittelt (für die visuelle Prägung am Beispiel des Acetylcholins gezeigt; Tsukada et al., 1999). Die kognitiven Aspekte der Filialprägung beinhalten die Detektion, sensorische Analyse und räumliche Lokalisierung sensorischer Stimuli (Form, Farbe, Stimme und Geruch), die mit einer emotionalen Situation während des Lernprozesses assoziiert werden. Eine Regulation dieser Komponente über  $\mu$ -Opiatrezeptoren konnte in unserem Modell nicht nachgewiesen werden. Die anregend/emotionale Komponente, die hauptsächlich durch Dopamin und Serotonin vermittelt wird, kann durch  $\mu$ -Opiatrezeptor-Liganden moduliert werden. Der interne emotionale Stress, der während der Separation eines Tieres von der Gruppe und seiner vertrauten Umgebung auftritt, ist ebenfalls Opiat-vermittelt.

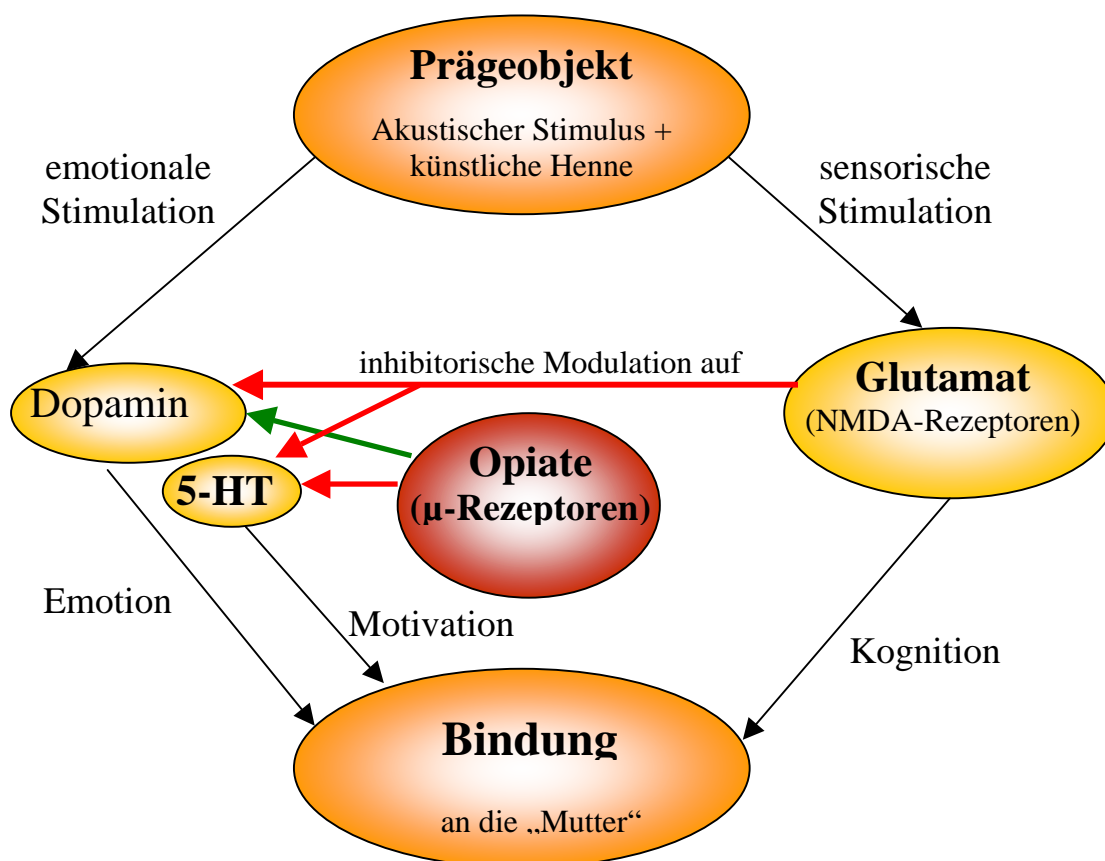


Abb. 22 Hypothetisches Modell der Interaktion verschiedener Aspekte eines emotionalen Lernprozesses, z.B. der auditorischen Filialprägung in Haushuhnküken, ihre neurochemischen Mediatoren und ihre Modulation durch  $\mu$ -Opiatrezeptor-vermittelte Prozesse (rot = inhibitorisch, grün = exzitatorisch; für Details: siehe Diskussion).

## 5 ZUSAMMENFASSUNG

Viele Studien haben gezeigt, dass das Opiatsystem ein äußerst wichtiger Bestandteil des emotional gesteuerten Verhaltens ist. In dieser Arbeit konzentrierte ich mich auf die Vorgänge im medio-rostralen Neostriatum/Hyperstriatum ventrale (MNH) des Haushuhnkükens. Dieses Gebiet, ein Analog des präfrontalen Kortex, spielt eine entscheidende Rolle bei der auditorischen Filialprägung, einem gut charakterisierten frühkindlichen Lernprozess. Die hohe Dichte der  $\mu$ -Opiatrezeptoren im MNH junger Küken führte zu der Hypothese, dass  $\mu$ -Opiatrezeptor-vermittelte Prozesse, die glutamaterge, serotonerge und/oder dopaminerge Neurotransmission im MNH modulieren und ein wichtiger Bestandteil der Filialprägung sind. Mit der Mikrodialysetechnik und pharmakologischen Verhaltensstudien in 1-tägigen Haushuhnküken konnte ich folgendes zeigen:

- I. die systemische Applikation des  $\mu$ -Opiatrezeptor-Antagonisten Naloxon (5, 50 mg/kg) steigert signifikant, TTX reversibel, die extrazelluläre Konzentration der 5-HIAA. Die systemische Applikation des  $\mu$ -Opiatrezeptor-Agonisten DAGO (5 mg/kg) steigerte die Konzentration von HVA und Taurin, eine Effekt der durch die simultane Gabe von DAGO und Naloxon (5 mg/kg) aufgehoben wurde. Die lokale Applikation von DAGO (1 mM) hatte keinen Effekt auf die 5-HIAA, HVA, Glutamat und Taurin, aber die Effekte, die durch die systemische Gabe von Naloxon hervorgerufen wurden, konnten durch diese Applikation von DAGO aufgehoben werden (Baldauf et al., 2005).
- II. Die systemische Applikation von Naloxon (5 mg/kg) hat keinen gravierenden Einfluss auf die akustische Filialprägung.
- III. Die systemische Applikation von Naloxon (5 mg/kg) steigert den endogenen Stress der Küken (gemessen als Dauer der Stressvokalisation nach Naloxonapplikation).

Diese Ergebnisse untermauern unsere Hypothese, dass die  $\mu$ -Opiatrezeptor-vermittelte Modulation der serotonergen und dopaminergen Neurotransmission den emotionalen und motivationalen Status des Tieres verändert und so eine modulatorische Rolle während der Filialprägung in jungen Tieren spielt.

## 6 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Abb.	Abbildung
Ac-RYYRIK-NH <sub>2</sub>	Ac-Arg-Tyr-Tyr-Arg-Ile-Lys-NH <sub>2</sub>
aCSF	artifizielle Cerebrospinalflüssigkeit
AEA	Arachidonyl-Ethanol-Amid
ANOVA	Analysis Of VAriance
APV	D,L-2-Amino-5-phosphonovaleriansäure
AUC	<i>Area under curve</i>
AVT	Area ventralis Tsai
BaS	Nucleus basalis
BL	Basislinie
BNTX	7-Benzyliden-7-dehydronaltrexon
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
COMT	Catechol-O-Methyltransferase
CRF	Corticotropin-freisetzender Faktor ( <i>corticotropin-releasing factor</i> )
CTOP	D-Phe-Cys-Tyr-D-Trp-Orn-Pen-Thr-NH <sub>2</sub>
DA	Dopamin
DAG	Diacylglycerol
DA(M)GO	[D-Ala <sup>2</sup> , MePhe <sup>4</sup> -Gly-ol <sup>5</sup> ]-Enkephalin
DADLE	[D-Ala <sup>2</sup> , D-Leu <sup>5</sup> ]-Enkephalin
DC	Distress calls
2-DG	[ <sup>14</sup> C]-2-deoxy-D-Glukose
DGG	Gamma-D-glutamylglycin
d.h.	das heißt
DIPPA	(2-(3,4-Dichlorophenyl)-N-methyl-N-[(1S)-1-(3-isothiocyanatophenyl)-2-(1-pyrrolidinyl)ethyl]acetamide
DMA	dorsomedial-anteriorer Thalamus
DMP	dorsomedial-posteriorer Thalamus
DOPAC	3,4-Dihydroxyessigsäure (3,4-Dihydroxyphenylacetic acid)
DPDPE	[D-Pen <sup>2</sup> , D-Pen <sup>5</sup> ]enkephalin
DSLET	[D-Ser <sup>2</sup> , D-Leu <sup>5</sup> ]enkephalyl-Thr
DTLET	[D-Tyr <sup>2</sup> , Leu <sup>5</sup> ]enkephalin-Thr
DV	Distress vocalisation
E	Ectostriatum
EPSC	Exzitatorisches postsynaptisches Potential

et al.	et alii
2-FDG	[ <sup>14</sup> C]-2-Fluorodeoxy-D-Glukose
GABA	γ-Aminobuttersäure (γ-amino butyric acid)
GTP	Guanosintriphosphat
GDP	Guanosindiphosphat
H	Hyperstriatum
HA	Hyperstriatum accessorium
HD	Hyperstriatum dorsale
HAD	Hyperstriatum accessorium und laterales Hyperstriatum dorsale im rostralen Wulst
5-HIAA	5-Hydroxyindolessigsäure (5-Hydroxyindoleacetic acid)
HIS	Hyperstriatum intercalatum supremum
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (high performance liquid chromatography)
5-HT	5-Hydroxytryptamin (= Serotonin)
HV	Hyperstriatum ventrale
HVA	Homovanillinsäure
i.p.	intraperitoneal
IP	Inisitolphosphat
IPSC	inhibitorisches postsynaptisches Potential
LM	Laufmittel
LNH	rostrales Neostriatum und Hyperstriatum ventrale
LPO	Lobus parolfactorius
MAO	Monoaminoxidase
MAP	membranassoziiertes Protein
min	Minuten
MNH	medio-rostrales Neostriatum / Hyperstriatum ventrale
3-MT	3-Methoxythyramin
N	Neostriatum
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
ORL	<i>opiate receptor-like</i>
PAG	periaquäduktales Grau
PFC	präfrontaler Kortex
pH	potentia hydrogenii, negativer Logarithmus des Zahlenwertes der molaren H <sup>+</sup> -Konzentration
PKC	Phosphokinase C
PLA	Phospholipase A

PLC	Phospholipase C
PND	Postnataler Tag (postnatal day)
POMC	Pro-opiomelanocortin
SEM	Standardfehler (standard error of mean)
Tab.	Tabelle
THC	Tetrahydrocannabinol
TTX	Tetrodotoxin
UE	Untereinheit
vs.	versus
VTA	ventrale tegmentale Area
ZNS	Zentralnervensystem



## 7 LITERATURVERZEICHNIS

- Amiche M, Sagan S, Mor A, Delfour A, Nicolas P.** (1988) Characterisation of the receptor binding profile of [3H]-dermorphine in the rat brain. *Int J Pept Protein Res.* 32: 506-511
- Amberg G, Lindfors N.** (1989) Intracerebral microdialysis: II Mathematical studies of diffusion kinetics. *J Pharmacol Methods.* 22: 157-183
- Anagnostakis Y, Spyraiki C.** (1994) Effect of morphine applied by intrapallidal microdialysis on the release of dopamine in the nucleus accumbens. *Brain Res Bull.* 34: 275-282
- Attali B, Saya D, Vogel Z.** (1989) Opiate agonist inhibit adenylat cyclase and produce heterologous desensitization in rat spinal cord. *J Neurochem.* 52: 360-369
- Auclair N, Otani S, Soubrie P, Crepel F.** (2000) Cannabinoids modulate synaptic strength and plasticity at glutamatergic synapses of rat prefrontal cortex pyramidal neurons. *J Neurophysiol.* 83: 3287-3293
- Babinsky R.** (1990) Das neuronale Substrat kognitiver Funktionen – Elektrophysiologische und pharmakologische *in vitro*-Untersuchungen an einem gedächtnisrelevanten Vorderhirngebiet von *Gallus domesticus*. Dissertation, TH Darmstadt
- Baldauf K, Gruss M, Braun K.** (2005) Opiate Modulation of monoamines in the chick forebrain: possible role in emotional regulation? *J Neurobiol.* 62: 149-163
- Bardo MT.** (1998) Neuropharmacological mechanisms of drug reward: Beyond dopamine in the nucleus accumbens. *Crit Rev Neurobiol.* 12: 37-67
- Bardo MT, Bhatnagar RK, Gebhart GF, Hughes RA.** (1982) Opiate receptor development in midbrain and forebrain of posthatch chicks. *Dev Brain Res.* 3: 668-673
- Bateson PPG.** (1978) Sexual imprinting and optimal outbreeding. *Nature.* 273: 659-660
- Bechara A, Nader K, van der Kooy D.** (1998) A two-separate-motivational-systems hypothesis of opioid addiction. *Pharmacol Biochem Behav.* 59: 1-17
- Belluzzi JD, Stein L.** (1977) Enkephalin may mediate euphoria and drive-reduction reward. *Nature.* 266: 556-558
- Benveniste H, Diemer NH.** (1987) Cellular reactions to implantation of a microdialysis tube in the rat hippocampus. *Acta Neuropathol (Berl).* 74: 234-238
- Benveniste H, Drejer J, Schousboe A, Diemer NH.** (1984) Elevation of the extracellular concentrations of glutamate and aspartate in rat hippocampus during transient cerebral ischemia monitored by intracerebral microdialysis. *J Neurochem.* 43: 1369-1374
- Benveniste H, Hauser AJ, Ottosen NS.** (1989) Determination of brain interstitial concentrations by microdialysis. *J Neurochem.* 52: 1741-1750
- Bergevin A, Girardot D, Bourque MJ, Trudeau LE.** (2002) Presynaptic mu-opioid receptors regulate a late step of the secretory process in rat ventral tegmental area GABAergic neurons. *Neuropharmacology.* 42: 1065-1078
- Biggs CS, Fowler LJ, Whitton PS, Starr MS.** (1995) Impulse-dependent and tetrodotoxin-sensitive release of GABA in the rat's substantia nigra measured by microdialysis. *Brain Res.* 684: 172-178

- Bischof HJ, Rollenhagen A.** (1999) Behavioural and neurophysiological aspects of sexual imprinting in zebra finches. *Behav Brain Res.* 98: 267-76
- Bischof HJ, Geissler E, Rollenhagen A.** (2002) Limitations of the sensitive period for sexual imprinting: neuroanatomical and behavioural experiments in the zebra finch (*Taeniopygia guttata*). *Behav Brain Res.* 133: 317-322
- Bito L, Davson H, Levin E, Murray M, Snider N.** (1966) The concentration of free amino acids and other electrolytes in cerebrospinal fluid, in vivo dialysates of brain, and blood plasma of the dog. *J Neurochem.* 13: 1057-1067
- Blass E, Fitzgerald E, Kehoe P.** (1987) Interactions between sucrose, pain and isolation distress. *Pharmacol Biochem Behav.* 26: 483-489
- Boakes RA, Panter D.** (1985) Secondary imprinting in the domestic chick blocked by previous exposure to a live hen. *Anim Behav.* 33: 353-365
- Bock J, Wolf A, Braun K.** (1996) Influence of the N-methyl-D-aspartate receptor antagonist DL-2-amino-5-phosphonovaleric acid on auditory imprinting in the domestic chick. *Neurobiol Learn Mem.* 65: 177-188
- Bock J, Braun K.** (1999) Blockade of N-methyl-D-aspartate receptor activation suppresses learning-induced synaptic elimination. *Proc Natl Acad Sci. USA* 96: 2485-2490
- Bogerts B.** (1996) Plastizität von Hirnstruktur und -funktion als neurobiologische Grundlage der Psychotherapie. *Z Klin Psychol Psych Psychother.* 44: 243-252
- Bolhuis JJ.** (1991) Mechanisms of avian imprinting: a review. *Biol Rev.* 66: 303-345
- Bolhuis JJ, Honey RC.** (1998) Imprinting, learning and development: from behaviour to brain and back. *TINS* 21: 306-311
- Bolhuis JJ, Trooster WJ.** (1988) Reversibility revisited: stimulus-dependent stability of filial preferences in the chick. *Anim Behav.* 36: 668-674
- Bontempi B, Sharp FR.** (1997) Systemic morphine-induced Fos protein in the rat striatum and nucleus accumbens is regulated by mu opioid receptors in the substantia nigra and ventral tegmental area. *J Neurosci.* 17: 8596-8612
- Braun K.** (1996) Synaptische Reorganisation bei frühkindlichen Erfahrungs- und Lernprozessen: Relevanz für die Entstehung psychischer Erkrankungen. *Z Klin Psychol Psych Psychother.* 44: 253-266
- Braun K, Bogerts B.** (2000) Einfluss frühkindlicher Erfahrungs- und Lernprozesse auf die funktionelle Reifung des Gehirns: Relevanz für die Entstehung und Therapie psychischer Erkrankungen. *Psychother Psychosom Med Psychol.* 50: 420-427
- Braun K, Bogerts B.** (2001) Erfahrungsgesteuerte neuronale Plastizität: Bedeutung für Pathogenese und Therapie psychischer Erkrankungen. *Der Nervenarzt.* 72: 3-10
- Braun S, Scheich H.** (1997) Behavioral relevance of species-specific vocalisations and their [14C]-2-deoxyglucose pattern in the cortex of a south american rodent, the degu (*Octodon degus*). *J Comp Physiol A.* 181: 697-709
- Bredenkötter M, Braun K.** (1997) Changes of neuronal responsiveness in the mediorostral neostriatum/hyperstriatum after auditory imprinting in the domestic chick. *Neuroscience.* 76: 355-365

**Bredenkötter M, Braun K.** (2000) Development of neuronal responsiveness in the mediorostral neostriatum/hyperstriatum ventrale during auditory filial imprinting in domestic chicks. *Neurobiol Learn Mem.* 73: 114-126

**Bruins Slot LA, Colpaert FC.** (1999) Opiate states of memory: Receptor mechanisms. *J Neurosci.* 19: 10520-10529

**Brunson KL, Eghbal-Ahmadi H, Bender R, Chen Y, Baram TZ.** (2001) Long term, progressive hippocampal cell loss and dysfunction induced by early-life administration of corticotropin-releasing hormone reproduce the effects of early life stress. *Proc Natl Acad Sci. USA* 98: 8856-8861

**Bullock R, Zauner A, Woodward J, Young HF.** (1995) Massive persistent release of excitatory amino acids following human occlusive stroke. *Stroke.* 26: 2178-2189

**Carr KD, Simon EJ.** (1984) Potentiation of reward by hunger is opioid mediated. *Brain Res.* 297: 369-373

**Carter BD, Medzihradsky F.** (1993) Go mediates the coupling of the mu opioid receptor to adenylyl cyclase in cloned neural cells and brain. *Proc Natl Acad Sci. USA* 90: 4062-4066

**Castellano C, Cabib S, Puglisi-Allegra S.** (1996) Psychopharmacology of memory modulation: evidence for multiple interaction among neurotransmitters and hormones. *Behav Brain Res.* 77: 1-21

**Castellano C, McGaugh JL.** (1989) Effect of morphine on one-trial inhibitory avoidance in mice: lack of state-dependency. *Psychobiology.* 17: 89-92

**Chang AC, Takemori AE, Portoghese PS.** (1994) (2-(3,4-Dichlorophenyl)-N-methyl-N-[(1S)-1-(3-isothiocyanatophenyl)-2-(1-pyrrolidinyl)ethyl]acetamide): an opioid receptor affinity label that produces selective and long lasting kappa antagonism in mice. *J Med Chem.* 37: 1547-1549

**Chen L, Huang LM.** (1991) Sustained potentiation of NMDA-receptor mediated glutamate responses through activation of protein kinase C by a  $\mu$ -opioid. *Neuron.* 7: 319-326

**Cherubini E, North RA.** (1985)  $\mu$  and  $\kappa$  opioids inhibit transmitter release by different mechanisms. *Proc Natl Acad Sci. USA* 82: 1860-1863

**Clayton N, Bischof HJ.** (1990) Neurophysiological and behavioural development in birds: song learning as a model system. *Naturwissenschaften.* 77: 123-127

**Cline GW, Petersen KF, Krssak M, Shen J, Hundal RS, Trajanoski Z, Inzucchi S, Dresner A, Rothman DL, Shulman GI.** (1999) Impaired glucose transport as a cause of decreased insulin-stimulated muscle glycogen synthesis in type 2 diabetes. *N Engl J Med.* 341: 240-246

**Collier HOJ, Roy AC.** (1974) Morphine like drugs inhibit the stimulation of E prostaglandins of cyclic AMP formation by rat brain homogenate. *Nature.* 248: 24-27

**Colombo PJ, Martinez Jr. JL, Bennett EL, Rosenzweig MR.** (1992) Kappa opioid receptor activity modulates memory for peck-avoidance training in the 2-day-old chick. *Psychopharmacology.* 1081: 235-240

**Colombo PJ, Rivera DT, Martinez JR, Bennet EL, Rosenzweig MR.** (1997) Evidence for localized and discrete roles for enkephalins during memory formation in the chick. *Behav Neurosci.* 111: 114-122

**Cooper SJ.** (1980) Naloxone: Effects of food and water consumption in the non-deprived and deprived rat. *Psychopharmacology* (Berlin). 71: 1-6

**Corbett A, McKnight S, Henderson G.** (1999) Opioid receptors. TOCRIS Cookson Ltd., UK

**Csillag A, Bourne RC, Kalman M, Boxer MI, Stewart MG.** (1989) [<sup>3</sup>H]Naloxone binding in the brain of the domestic chick (*Gallus domesticus*) by an in vitro quantitative autoradiography. *Brain Res.* 479: 391-396

**Csillag A, Bourne RC, Stewart MG.** (1990) Distribution of mu, delta, and kappa opioid receptor binding sites in the brain of the one-day-old domestic chick (*Gallus domesticus*): an in vitro quantitative autoradiographic study. *J Comp Neurol.* 302: 543-551

**Csillag A, Stewart MG, Szekely AD, Magloczky Z, Bourne RC, Steele RJ.** (1993) Quantitative autoradiographic demonstration of changes in binding to delta-opioid, but not mu or kappa receptors, in chick forebrain 30 minutes after passive-avoidance training. *Brain Res.* 613: 96-105

**Daisley JN, Gruss M, Rose SP, Braun K.** (1998) Passive avoidance training and recall are associated with increased glutamate levels in the intermediate medial hyperstriatum ventrale of the day-old chick. *Neural Plast.* 6: 53-61

**Dauge V, Rossignol P, Roques BP.** (1988) Comparison of the behavioural effects induced by administration in the rat nucleus accumbens or nucleus caudatus of selective mu and delta opioid peptides or ketalorphan an inhibitor of enkephalin-degrading-enzymes. *Psychopharmacology.* 96: 343-352

**Davies DC, Horn G, McCabe BJ.** (1983) Changes in telencephalic catecholamine levels in the domestic chick. Effects of age and visual experience. *Dev Brain Res.* 10: 251-255

**Davies SEC, Gotoh M, Richards DA, Obrenovitch TP.** (1998) Hypoosmolarity induces an increase of extracellular N-acetylaspartate concentration in the rat striatum. *Neurochem Res.* 23: 1021-1025

**De Casper AJ, Fifer WP.** (1980) Of human bonding: Newbornes prefer their mother's voices. *Science.* 208: 1174-1176

**De Lanerolle NC, Elde RP, Sparber SB, Frick M.** (1981) Distribution of methionine-enkephalin immunoreactivity in the chick brain: an immunohistochemical study. *J Comp Neurol.* 199: 513-533

**Delgado JH, De Feudis FV, Roth RH, Ryugo DK, Mitruka BM.** (1972) Dialytrode for long term intracerebral perfusion in awake monkeys. *Arch Int Pharmacodynamic Ther.* 198: 9-21

**Denbow DM, McCormack JF.** (1990) Central versus peripheral opioid regulation of ingestive behavior in the domestic fowl. *Comp Biochem Physiol. C* 96: 211-216

**Deviche P, Wohland A.** (1984) Opiate antagonists stereoselectively attenuates the consumption of food but not water by pigeons. *Pharmacol Biochem Behav.* 21: 507-512

**Devine DP, Leone P, Wise RA.** (1993) Mesolimbic dopamine neurotransmission is increased by administration of  $\mu$ -Receptor antagonists. *Eur J Pharmacol.* 243: 55-64

**Dhawan BN, Cesselin F, Raghbir R.** (1996) International Union of Pharmacology. XII. Classification of opioid receptors. *Pharmacol Rev.* 48: 567-592

**Diekamp B, Kalt T, Ruhm A, Koch M, Güntürkin O.** (2000) Impairment in a discrimination reversal task after D1 receptor blockade in the pigeon "prefrontal cortex". *Behav Neurosci.* 114: 1145-1155

**Dourmap N, Clero E, Costentin J.** (1997) Involvement of cholinergic neurons in the release of dopamine elicited by stimulation of mu-opioid receptors in striatum. *Brain Res.* 749: 2995-300

**During MJ, Spencer DD.** (1993) Extracellular hippocampal glutamate and spontaneous seizure in the conscious human brain. *Lancet.* 341: 1607-1610

**Enblad P, Valtysson J, Andersson J, Lilja A, Valind S, Antoni G, Langstrom B, Hillered L, Persson L.** (1996) Simultaneous intracerebral microdialysis and positron emission tomography in the detection of ischemia in patients with subarachnoid hemorrhage. *J Cereb Blood Flow Metab.* 16: 637-644

**Eliot L.** (2001) Was geht da drinnen vor? Berlin-Verlag, Berlin, 261

**Endepols H.** (1996) Organotypische Cokulturen vom mediorostralen Neostriatum/Hyperstriatum ventrale (MNH) und dem dorsalem Thalamus des Haushuhnükens (*Gallus domesticus*): Ein in vitro-Modell für prägnungsrelevante neuronale Plastizität. Dissertation, Universität Magdeburg

**Endo K, Yawo H.** (2000) mu-Opioid receptor inhibits N-type Ca<sup>2+</sup> channels in the calyx presynaptic terminal of the embryonic chick ciliary ganglion. *J Physiol.* 524: 769-781

**Engelmann M, Ludwig M, Singewald N, Ebner K, Sabatier N, Lubec G, Landgraf R, Wotjak CT.** (2001) Taurine selectively modulates the secretory activity of vasopressin neurons in conscious rats. *Eur J Neurosci.* 147: 1047-55

**Enrico P, Esposito G, Mura MA, Fresu L, de Natale G, Miele E, Desole MS, Miele M.** (1997) Effect of morphine on striatal dopamine metabolism and ascorbic acid and uric acid release in freely moving rats. *Brain Res.* 745: 173-182

**Enrico P, Mura MA, Esposito G, Serra P, Migheli R, de Natale G, Desole MS, Miele M, Miele E.** (1998) Effect of naloxone on morphin-induced changes in striatal dopamine metabolism and glutamate, ascorbic acid and uric acid release in freely moving rats. *Brain Res.* 797: 94-102

**Erspamer V, Melchiorri P, Falconieri-Espamer G, Negri L, Corsi R, Severini C, Barra D, Simmaco M, Kreil G.** (1989) Deltorphine: A family of naturally occurring peptides with high affinity and selectivity for  $\delta$  opioid binding sites. *Proc Natl Acad Sci. USA* 86: 5188-5192

**Feigenbaum JJ, Yanai J, Blass R.** (1982) Possible DA Agonist properties of naloxone. *Int J Neurosci.* 17: 139-144

**Feigenbaum JJ, Howard SG.** (1996) The effect of naloxone on sponataneous and evoked release in the central and peripheral nervous system. *Life Sci.* 59: 2009-2019

**Field T, Pickens J, Prodromidids M, Malphurs J, Fox N, Bendell D, Yando R, Schanberg S, Kuhn C.** (2000) Targeting adolescent mothers with depressive symptoms for early intervention. *Adolescence.* 35: 381-414

**Fischer GJ.** (1972) Sound stimuli and following in a domestic fowl: Frequency, rate and duration. *J Comp Physiol Psychol.* 1981: 183-190

**Flood JF, Cherkin A, Morley JE.** (1987) Antagonism of endogenous opioids modulates memory processing. *Brain Res.* 422: 218-234

**Freeman FM, Young IG.** (2000a) Inhibition of passive-avoidance memory in the day-old chick by the opioid cytochrophin-4. *Learn Mem.* 7: 213-219

- Freeman FM, Young IG.** (2000b) Identification of the opioid receptors involved in passive-avoidance learning in the day-old chick during the second wave of neuronal activity. *Brain Res.* 864: 30-239
- Freeman FM, Young IG.** (2001) Involvement of the sigma receptor in passive-avoidance learning in the day-old chick during the second wave of neuronal activity. *Neurobiol Learn Mem.* 75: 346-352
- Fried I, Wilson CL, Morrow JW, Cameron KA, Behnke ED, Ackerson LC, Maidment NT.** (2001) Increased dopamine release in the human amygdala during performance of cognitive tasks. *Nat Neurosci.* 4: 201-206
- Fuster JM.** (1989) *The prefrontal cortex: Anatomy, physiology, and neuropsychology of the frontal lobe.* Raven Press, New York
- Gallagher M.** (1982) Naloxone enhancement of memory processes: Effects of other opiate antagonists. *Behav Neural Biol.* 35: 375-382
- Gamaro GD, Manoli LP, Torres IL, Silveira R, Dalmaz C.** (2003) Effects of chronic variate stress on feeding behavior and on monoamine levels in different rat brain structures. *Neurochem Int.* 42: 107-114
- Geladopoulos T, Sakellaridis N, Vernadakis A.** (1987) Differential maturation of  $\mu$  and  $\delta$  opioid receptors in the chick embryonic brain. *Neurochem Res.* 12: 279-288
- Genç E, Hizal A, Eroglu L.** (1987) Naloxone and lithium interaction on the levels of homovanillic acid in the rat brain. *Pol J Pharmacol Pharm.* 39: 41-45
- Georgieva J, Luthman J, Mohringe B, Magnusson O.** (1993) Tissue and microdialysate changes after repeated and permanent probe implantation in the striatum of freely moving rats. *Brain Res Bull.* 31: 463-470
- Gibson DA, Vernadakis A.** (1982) [3H]ethorphine binding activity in early chick embryos: Brain and body tissue. *Dev Brain Res.* 4: 23-29
- Gibson DA, Vernadakis A.** (1983a) Effect of N-LAAM on [3H]ethorphine binding in neuronal enriched cell cultures. *Neurochem Res.* 8: 1197-1202
- Gibson DA, Vernadakis A.** (1983b) Critical period for LAAM in the chick embryo: Toxicity and altered opiate receptor binding. *Dev Brain Res.* 8: 161-69
- Gilbert PE, Martin WR.** (1976) The effect of morphine and nalorphine-like drugs in the nondependent, morphine-dependent and cyclazocine-dependent chronic spinal dog. *Pharmacol Exp Ther.* 198: 66-82
- Girault JA, Barbeito L, Spampinato U, Gozlan H, Glowinski J, Besson MJ,** (1986) In vivo release of endogenous amino acids from the rat striatum: further evidence for a role of glutamate and aspartate in corticostriatal neurotransmission. *J Neurochem.* 47: 98-106
- Goldfarb W.** (1943) The effects of early institutional care on adolescent personality. *J Exp Educ.* 12: 106-129
- Graves HB.** (1973) Early social responses in gallus: A funktional analysis. *Science.* 182: 937-939
- Gray PH.** (1958) Theory and evidence of imprinting in human infants. *J Physiol.* 46: 155-166

- Grevel J, Sadee W.** (1983) An opiate binding site in the rat brain is highly selective for 4,5 epoxymorphinans. *Science*. 221: 1198-1201
- Gross RA, MacDonald RL.** (1987) Dynorphin A selectivity reduces a large transient (N-type) calcium current of mouse dorsal root ganglion neurons in cell cultures. *Proc Natl Acad Sci. USA* 84: 5469-5473
- Grudt TJ, Williams JT.** (1993) Kappa opioid receptors also increase potassium conductance. *Proc Natl Acad Sci. USA* 90: 11429-11432
- Grudt TJ, Williams JT.** (1995) Opioid receptors and the regulation of ion conductances. *Rev Neurosci*. 6: 279-286
- Gruss M, Braun K.** (1996) Stimulus-evoked increase of glutamate in the mediorostral neostriatum/hyperstriatum ventrale of domestic chick after auditory filial imprinting: An in vivo microdialysis study. *J Neurochem*. 66: 1167-1173
- Gruss M, Braun K.** (1997) Distinct activation of monoaminergic pathways in chick brain in relation to auditory imprinting and stressful situations: A microdialysis study. *Neuroscience*. 76: 891-899
- Gruss M, Bredenkötter M, Braun K.** (1999) N-methyl-D-aspartate receptor-mediated modulation of monoaminergic metabolites and amino acids in the chick forebrain: an in vivo microdialysis and electrophysiology study. *J Neurobiol*. 40: 116-135
- Gruß M.** (1998) Neurochemische Korrelate des Verhaltens: Mikrodialytische Untersuchungen in medio-rostralen Neostriatum/Hyperstriatum ventrale des Haushuhnkükens (*Gallus gallus domestikus*), Dissertation, Universität Magdeburg
- Gruss M, Bock J, Braun K.** (2003) Haloperidol impairs auditory filial imprinting and modulates monoaminergic neurotransmission in an imprinting-relevant forebrain area of the domestic chick. *J Neurochem*. 87: 686-696
- Haigler HJ.** (1978) Morphine: effects on serotonergic neurons and neurons in areas with a serotonergic input. *Eur J Pharmacol*. 51: 361-376
- Hamberger A, Nystrom B.** (1984) Extra- and intracellular amino acids in the hippocampus during development of hepatic encephalopathy. *Neurochem Res*. 9: 1181-1192
- Hauser KF, McLaughlin PJ, Zagon IS.** (1987) Endogenous opioids regulate dendritic growth and spine formation in developing rat brain. *Brain Res*. 416: 157-161
- Hauser KF, Stiene-Martin A, Mattson MP, Elde RP, Ryan SE, Godleske CC.** (1996) mu-Opioid receptor-induced  $Ca^{2+}$  mobilization and astroglial development: morphine inhibits DNA synthesis and stimulates cellular hypertrophy through a  $Ca(2+)$ -dependent mechanism. *Brain Res*. 720: 191-203
- Herman BH, Panksepp J.** (1978) Effects of morphine and naloxone on separation distress and approach attachment: Evidence for opiate mediation of social affect. *Pharmacol Biochem Behav*. 9: 213-220
- Herrman BH, Panksepp J.** (1981) Ascending Endorphin Inhibition of distress vocalisation. *Science*. 211: 1060-1062
- Hernandez LL, Watson KL, Fowler BM, Bair KD, Singha AK** (1997) Opioid modulation of attention-related responses: peripheral-to-central progression and development of mu influences as learning occurs. *Psychopharmacology*. 132: 50-60

**Herz A, Akil H, Simon EJ**, eds. (1993) Opioids I u. II. (Handbook of Experimental Pharmacology, v. 104, pt. 2), Springer-Verlag, Berlin

**Hess EH.** (1959) The relationship between imprinting and motivation. Nebraska Symposium on Motivation. University of Nebraska Press: 44-77

**Hess EH.** (1972) "Imprinting" in a natural laboratory. *Sci Am., Birds*: 149-157

**Heyne A, May T, Goll P, Wolffgramm J.** (2000) Persisting consequences of drug intake: towards a memory of addiction. *J Neural Transm.* 107: 613-638

**Hofmann E.** (1991) Funktionelle Biochemie des Menschen, Band 2. Akademie Verlag Berlin

**Hoffman AF, Lupica CR.** (2001) Direct actions of cannabinoids on synaptic transmission in the nucleus accumbens: a comparison with opioids. *J Neurophysiol.* 85: 72-83

**Hong Y, Abbott FV.** (1995) Peripheral opioid modulation of pain and inflammation in the foemalin test. *Eur J Pharmacol.* 277: 21-28

**Horn G.** (1985) Memory, imprinting and the brain. Clarendon Press, Oxford

**Horn G.** (1991) Imprinting and recognition memory: a review of neural mechanisms. In: Andrew R.J. (Ed.) Neural and behavioural plasticity: The use of the domestic chick as a model. Oxford University Press, Oxford 219-261

**Huang NK, Tseng CJ, Wong CS, Tung CS.** (1997) Effects of acute and chronic morphine on DOPAC and glutamate at subcortical DA terminals in awake rats. *Pharmacol Biochem Behav.* 56: 363-371

**Hughes J, Smith TW, Kosterlitz HW, Fothergill LA, Morgan BA, Morris HR.** (1975) Identification of two related pentapeptides from the brain with potent opiate agonist activity. *Nature.* 258: 577-579

**Hudson R, Distel H.** (1983) Nipple localisation by newborn rabbits: behavioral evidence for pheromonal guidance. *Behavior.* 85: 260-275

**Huxtable RJ.** (1989) Taurine in the central nervous system and the mammalian actions of taurine. *Progress in Neurobiology* 32: 471-533

**Iidaka T, Sadato N, Yamada H, Murata T, Omori M, Yonekura Y.** (2001) An fMRI study of the functional neuroanatomy of picture encoding in younger and older adults. *Brain Res Cogn Brain Res.* 11: 1-11

**Immelmann K.** (1972) Sexual and other long-term aspects of imprinting in birds and other species. In: Lehrman D.S., Hinde R.A. and Shaw E. (Eds.) *Advances in the study of behavior.* Vol. 4, Academic Press, Oxford, 219-261

**Immelmann K, Großmann KE.** (1981) Phasen kindlicher Entwicklung. In: Wendt H. und Loacker N. (Eds.) *Der Mensch.* Kindler, Zürich, 130-188

**Iny LJ, Gianoulakis C, Palmour RM, Meaney MJ.** (1987) The  $\beta$ -Endorphin response to stress during postnatal development in the rat. *Dev Brain Res.* 31: 177-181



**Iwano H, Yamamuro Y, Hori K, Yamauchi T, Nomura M.** (1997) Effects of discrimination learning on the rat striatal dopaminergic activity: a microdialysis study. *Neuroreport*. 8: 1095-1098

**Izquierdo I.** (1979) Effect of naloxone and morphine on various forms of memory in the rat: possible role of endogenous opiate mechanisms in memory consolidation. *Psychopharmacology*. 66: 199-203

**Izquierdo I, Diaz RD.** (1983) Effect of ACTH, epinephrine,  $\beta$ -endorphin, naloxone, and of the combination of naloxone or  $\beta$ -endorphin with ACTH or epinephrine on memory consolidation. *Psychoneuroendocrinology*. 8: 81-87

**Jain RK.** (1994) Barriers to drug delivery in solid tumors. *Sci Am*. 271: 58-65

**Jansson PA, Fowelin JP, von Schenck HP, Smith UP, Lönnroth PN.** (1993) Measurement by microdialysis of the insulin concentration in subcutaneous interstitial fluid. Importance of the endothelial barrier for insulin. *Diabetes*. 42: 1469-73

**Jaynes J.** (1956) Imprinting: the interaction of learned and innate behaviour. I. Development and generalisation. *J Comp Physiol Psychol*. 49: 200-206

**Johnson MH, Bolhuis JJ, Horn G.** (1985) Interaction between acquired preferences and developing predispositions during imprinting. *Anim Behav*. 33: 1000-1006

**Johnson SW, North RA.** (1992) Opioids excite dopamine neurons by hyperpolarisation of local interneurons. *J Neurosci*. 12: 483-488

**Johnson PI, Napier TC.** (1997) Morphine modulation of GABA- and glutamate-induced changes of ventral pallidal neuronal activity. *Neuroscience*. 77: 187-197

**Julien RM.** (1997a) Schmerzmittel: Opioidartige und nicht-opioidartige Analgetika. In: *Drogen und Psychopharmaka*. Spektrum Akademischer Verlag. 249-253

**Julien RM.** (1997b) Opioidrezeptoren und Einteilung der Opioidanalgetika. In: *Drogen und Psychopharmaka*. Spektrum Akademischer Verlag. 255-257

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

**Kehoe P, Blass EM.** (1986) Opioid-mediation of separation distress in 10-day old rats: Reversal of stress with maternal stimuli. *Dev Psychobiol*. 19: 385-398

**Kelly MJ, Loose MD, Ronneleiv OK.** (1990) Opioids hyperpolarize beta-endorphin neurons via mu-rezeptor activation of a potassium conductance. *Neuroendocrinology*. 52: 268-275

**Kirkam TC, Blundell JE.** (1984) Dual action of naloxone on feeding revealed by behavioral analysis: Separate effects on initiation and termination of eating. *Appetite*. 5: 45-52

**Koch T, Widera A, Bartzsch K, Schulz S, Brandenburg LO, Wundrack N, Beyer A, Grecksch G, Höllt V.** (2004a) Receptor endocytosis counteracts the development of opioid tolerance. *Mol Pharmacol*. (in press)

**Koch T, Brandenburg LO, Liang Y, Schulz S, Beyer A, Schröder H, Höllt V.** (2004b) Phospholipase D2 modulates agonist-induced mu-opioid receptor desensitization and resensitization. *J Neurochem*. 88: 680-688

- Koch T, Schulz S, Pfeiffer M, Klutzny M, Schröder H, Kahl E, Höllt V.** (2001) C-terminal splice variants of the mouse mu-opioid receptor differ in morphine-induced internalization and receptor resensitization. *J Biol Chem.* 276: 31408-31414
- Kuenzel, WJ, Masson M.** (1988) *A Stereotaxic Atlas of the Brain of the chick (Gallus domesticus).* Johns Hopkins University Press, Baltimore, MD
- Lafontan M, Arner P.** (1996) Application of in situ microdialysis to measure metabolic and vascular responses in adipose tissue. *Trends Pharmacol Sci.* 17: 309-313
- Law RO.** (1994) Regulation of mammalian Brain cell volume. *J Exp Zoology.* 268: 90-96
- Leshner AI, Koob GF.** (1999) Drugs of abuse and the brain. *Proc Assoc Am Physicians.* 111: 99-108
- Lett BT, Grant VL, Ming Teng Koh** (2001) Naloxone attenuates the conditioned place preference induced by wheel running in rats. *Physiol Behav.* 72: 355-358
- Lindroth P, Mopper K.** (1979) High performance liquid chromatographic determination of subpicomole amounts of amino acids by precolumn fluorescence derivatisation with o-phthaldialdehyde. *Anal Chem.* 51: 1667-1674
- Lorenz K.** (1935) Der Kumpan in der Umwelt des Vogels. *J Ornithol.* 83: 137-213
- Lowry CA, Plant A, Shanks N, Ingram CD, Lightman SL.** (2003) Anatomical and functional evidence for a stress-responsive, monoamine-accumulating area in the dorsomedial hypothalamus of adult rat brain. *Horm Behav.* 43: 254-262
- Lüllmann H, Mohr K, Wehling M.** (2003) *Pharmakologie und Toxikologie.* Georg Thieme Verlag Stuttgart New York
- Lupien SJ, King S, Meaney MJ, McEwen BS.** (2000) Child's stress hormone levels correlate with mother's socioeconomic status and depressive state. *Biol Psychiatry.* 48: 976-980
- Lutz RA, Pfister HP.** (1992) Opioid receptors and their pharmacological profiles. *J Rec Res.* 12: 267-286
- Lyons DM, Martel FL, Levine S, Risch NJ, Schatzberg AF.** (1999) Postnatal experiences and genetic effects on squirrel monkey social affinities and emotional distress. *Horm Behav.* 36: 266-275
- MacLean JN, Cowley KC, Schmidt BJ** (1998) NMDA receptor-mediated oscillatory activity in the neonatal rat spinal cord is serotonin dependent. *J Neurophysiol.* 79: 2804-2808
- MacMillan SJA, Mark MA, Duggan AW.** (1998) The release of  $\beta$ -endorphin and the neuropeptide-receptor mismatch in the brain. *Brain Res.* 794: 127-136
- Maier V, Scheich H.** (1983) Acoustic imprinting leads to differential 2-deoxy-D-glucose uptake in the chicken forebrain. *Proc Natl Acad Sci. USA* 80: 3860-3864
- Malmberg AB, Yaksh TL.** (1995) The effect of morphine on formalin-evoked behaviour and spinal release of excitatory amino acids and prostaglandin E<sub>2</sub> using microdialysis in conscious rats. *Br J Pharmacol.* 114: 1069-1075

- Mansour A, Khachaturian H, Lewis ME, Akil H, Watson SJ.** (1987) Autoradiographic differentiation of mu, delta, and kappa opioid receptors in the rat forebrain and midbrain. *J Neurosci.* 7: 2445-2464
- Mansour A, Schafer MKH, Newman SW, Watson SJ.** (1991) Central distribution of opioid receptors: A cross-species comparison of the multiple opioid system of the basal ganglia. In: *Neurobiology of opioids* (Almeida OFX, Shippenberg TS, Eds.), Springer Verlag, Berlin
- Marek GJ, Aghajanian GK.** (1998) 5-HT-induced excitatory postsynaptic currents in neocortical layer V pyramidal cells: suppression by  $\mu$ -opiate receptor activation. *Neuroscience.* 86: 485-497
- Martin WR, Eades CG, Thompson JA, Huppler RE, Gilbert PE.** (1976) The effects of morphine- and nalorphine like drugs in the nondependent and morphine-dependent chronic spinal dog. *J Pharmacol Exp Ther.* 197: 517-532
- Martin-Schild S, Zadina JE, Gerall AA, Vigh S, Kastin AJ.** (1997) Localization of endomorphin-2-like immunoreactivity in the rat medulla and spinal cord. *Peptides.* 18: 1641-1649
- Martin-Schild S, Gerall AA, Kastin AJ, Zadina JE.** (1999) Differential distribution of endomorphin 1- and endomorphin 2-like immunoreactivities in the CNS of the rodent. *J Comp Neurol.* 405: 450-471
- May T, Juilfs F, Wofgramm J.** (1999) Effects of etonitazene consumption and abstinence on the signal transmission of mu-opioid receptors in the brain membranes of rats. *Neurosci Lett.* 275: 109-112
- McCormack JF, Denbow DM.** (1987) The effect of opioid antagonists on ingestive behavior in the domestic fowl. *Pharmacol Biochem Behav.* 27: 25-33
- Medina L, Anderson KD, Karle EJ, Reiner A.** (1995) An ultrastructural double-label immunohistochemical study of the enkephalinergic input to dopaminergic neurons of the substantia nigra in pigeons. *J Comp Neurol.* 357: 408-432
- Meis S, Pape HC.** (2001) Control of glutamate and GABA release by nociceptin/orphanin FQ in the rat lateral amygdala. *J Physiol.* 532: 701-712
- Menéndez N, Herreraso O, Solis JM, Herranz AS, del Rio RM.** (1989) Extracellular taurin increase in rat hippocampus evoked by specific glutamate receptor activation is related to the excitatory potency of glutamate agonists. *Neurosci Lett* 102: 64-69
- Messing RB, Jensen RA, Martinez JR, Spiehler VR, Vasquez BJ, Soumireu-Mourat B, Liang KC, McGaugh JL.** (1979) Naloxone enhancement of memory. *Behav Neural Biol.* 27: 266-275
- Metzger M, Jiang S, Wang J, Braun K.** (1996) Organisation of the dopaminergic innervation of forebrain areas relevant to learning: A combined immuno-histochemical/retrograde tracing study in the domestic chick. *J Comp Neurol.* 376: 1-27
- Metzger M, Jiang S, Braun K.** (2002a) A quantitative immuno-electron microscopic study of dopamine terminals in forebrain regions of the domestic chick involved in filial imprinting. *Neuroscience.* 111: 611-623
- Metzger M, Toledo C, Braun K.** (2002b) Serotonergic innervation of the telencephalon in the domestic chick. *Brain Res Bull.* 57: 547-551
- Michelsson K, Christensson K, Rothganger H, Winberg J.** (1996) Crying in separated and non-separated newborns: sound spectrographic analysis. *Acta Paediatr.* 85: 471-475

- Miele M, Boutelle MG, Fillenz M.** (1996) The source of physiological stimulated glutamate efflux from the striatum of conscious rats. *J Physiol.* 497: 745-751
- Millan MJ, Morris BJ.** (1988) Long-term blockade of mu-opioid receptors suggest a role in control of ingestive behavior, body weight and core temperature in the rat. *Brain Res.* 450: 247-258
- Minami M, Satoh M.** (1995) Molecular biology of the opioid receptors: structures, functions and distributions. *Neurosci Res.* 23: 121-145
- Miziguchi K, Yuzurihara M, Ishige A, Sasaki H, Tabira T.** (2001) Effect of chronic stress on cholinergic transmission in rat hippocampus. *Brain Res.* 915: 108-111
- Moghaddam B.** (1993) Stress preferentially increases extraneuronal levels of excitatory amino acids in the prefrontal cortex – comparison to hippocampus and basal ganglia. *J Neurochem.* 60: 1650-1657
- Müller M.** (2000) Microdialysis in clinical drug delivery studies. *Adv Drug Deliv Rev.* 45: 255-269
- Müller SC.** (1987) Neuronale Aktivitätsmuster im Gehirn von Haushühnküken während prägnungsrelevanter Verhaltenssituationen. Dissertation, TH Darmstadt
- Müller SC, Scheich H.** (1986) Social stress increases [14C]-2-deoxyglucose incorporation in three rostral forebrain areas of the young chick. *Behav Brain Res.* 19: 93-98
- Nahas G, Sutin KM, Harvey DJ, Agurell S.** (1999) Marijuana and Medicine. Humana Press Inc.
- Nicol B, Rowbotham DJ, Lambert DG.** (1996) mu- and kappa-opioids inhibit K<sup>+</sup> evoked glutamate release from rat cerebrocortical slices. *Neurosci Lett.* 218: 79-82
- Nock B, Giordano AL, Moore BW, Cicero TJ.** (1993) Properties of the putative epsilon opioid receptor: identification in rat, guinea pig, cow, pig and chicken brain. *J Pharmacol Exp Ther.* 264: 349-359
- Noel MB, Gratton A.** (1995) Electrochemical evidence of increased dopamine. *Synapse.* 21: 110-122
- Noguchi T, Yoshida Y, Chiba S.** (2001) Effects of psychological stress on monoamine systems in subregions of the frontal cortex and nucleus accumbens of the rat. *Brain Res.* 916: 91-100
- North RA, Williams JT, Surprenant A, Christie MJ.** (1987) Mu and delta receptors belong to a family of receptors that are coupled to potassium channels. *Proc Natl Acad Sci. USA* 84: 5487-91
- Oka T.** (1980) Enkephalin receptor in the rabbit ileum. *Br J Pharmacol.* 68: 193-195
- Panksepp J, Bean NJ, Bishop P, Vilberg T, Sahley TL.** (1980b) Opioid blockade and social comfort in chicks. *Pharmacol Biochem Behav.* 13: 673-683
- Panksepp J, DeEsquinazi FG.** (1980) Opiates and Homing. *J Comp Physiol Psychol.* 94: 650-663
- Panksepp J, Herman RC, Bishop P, Scott JP.** (1978a) The biology of social attachments: Opiates alleviate separation distress. *Biol Psychiat.* 13: 607-618
- Panksepp J, Herman B, Vilberg T, Bishop P, DeEsquinazi F.** (1980a) Endogenous opioids and social behavior. *Neurosci Biobehav Rev.* 4: 473-487
- Panksepp J, Meeker R, Bean NJ.** (1980c) The neurochemical control of crying. *Pharmacol Biochem Behav.* 12: 437-443

- Panksepp J, Nelson E, Bekkedal M.** (1997) Brain systems for the mediation of social separation – distress and social reward, Evolutionary antecedents and neuropeptide intermediaries. *Ann N Y Acad Sci.* 807: 78-100
- Panksepp J, Normansell L, Herman B, Bishop P, Crepeau L.** (1988) Neural and neurochemical control of the separation distress call. In: *The physiological control of mammalian vocalisation*, ed. John D. Newman, Plenum Press, New York and London. 263-299
- Panksepp J, Siviy SM, Normansell LA.** (1986) Brain opioids and social emotions. In: Reite M.; Field T.,(Eds.) *The psychobiology of attachment and separation*. New York: Academic Press. 3-59
- Panksepp J, Vilberg T, Bean NJ.** (1978b) Reduction of distress vocalisation in chicks by opiate-like peptides. *Brain Res Bull.* 3: 663-667
- Passarelli F, Costa T.** (1989) Mu and delta opioid receptors inhibit serotonin release in rat hippocampus. *J Pharmacol Exp Ther.* 248: 299-305
- Pasternak GW, Hahn EF.** (1980) Long-acting opiate agonists and antagonists: 14-hydroxydihydromorphinonehydrazone. *J Med Chem.* 23: 674-676
- Patterson TA, Schultheis G, Alvarado MC, Martinez Jr. JL, Bennett EL, Rosenzweig MR, Hruby VJ.** (1989) Influence of opioid peptides on learning and memory processes in the chick. *Behav Neurosci.* 103: 429-437
- Perez L, Lysle DT.** (1997) Conditions immunomodulation: investigations of the role of endogenous activity at  $\mu$ ,  $\kappa$ , and  $\delta$  opioid receptor subtypes. *J Neuroimmunol.* 79: 101-112
- Pert CB, Aposhian D, Snyder SH.** (1974) Phylogenetic distribution of opiate receptor binding. *Brain Res.* 75: 356-361
- Pfeiffer M, Koch T, Schröder H, Laugsch M, Höllt V, Schulz S.** (2002) Heterodimerization of somatostatin and opioid receptors cross-modulates phosphorylation, internalization, and desensitization. *J Biol Chem.* 277: 19762-19772
- Poeggel G, Braun K.** (1996) Early auditory filial learning in degus (*Octodon degus*). *Brain Res.* 743: 162-170
- Polak JM, Bloom SR, Sullivan SN, Facer P, Pearse AG.** (1977) Enkephalin-like immunoreactivity in the human gastrointestinal tract. *Lancet.* 1(8019): 972-974
- Portoghese PS, Larson DL, Jiang JB, Caruso TP, Takemori AE.** (1979) Synthesis and pharmacological characterisation of an alkylating analogue, (chlornaltrexamine) of naltrexone with ultralong-lasting narcotic antagonistic properties. *J Med Chem.* 22: 168-173
- Portoghese PS, Larson DL, Sayre LM, Fries DS, Takemori AE.** (1980) A novel opioid receptor site directed alkylating agent with irreversible narcotic antagonistic and reversible agonistic activities. *J Med Chem.* 23: 233-234
- Przewlocki R, Parson KL, Sweeney DD, Trotter C, Netzeband JG, Siggins GR, Gruol DL.** (1999) Opioid enhancement of calcium oscillation and burst events involving NMDA receptors and L-type calcium channels in cultured hippocampal neurons. *J Neurosci.* 19: 9705-9715
- Quirarte GL, Galvez R, Roozendaal B, McGaugh JL.** (1998) Norepinephrine release in the amygdala in response to footshock and opioid peptidergic drugs. *Brain Res.* 808: 134-140

- Reiner A, Davis BM, Brecha NC, Karten HJ.** (1984) The distribution of enkephalinlike immunoreactivity in the telencephalon of the adult and developing domestic chicken. *J Comp Neurol.* 228: 245-262
- Reiner A, Brauth SE, Kitt CA, Quirion R.** (1989) Distribution of mu, delta, and kappa opiate receptor types in the forebrain and midbrain of pigeons. *J Comp Neurol.* 280: 359-382
- Reiner A, Perkel DJ, Bruce LL, Butler AB, Csillag A, Kuenzel W, Medina L, Paxinos G, Shimizu T, Striedter G, Wild M, Ball GF, Durand S, Güntürkin O, Lee DW, Mello CV, Powers A, White SA, Hough G, Kubikova L, Smulders TV, Wada K, Dugas-Ford J, Husband S, Yamamoto K, Yu J, Siang C, Jarvis ED.** (2004) Revised nomenclature for avian telencephalon and some related brainstem nuclei. *J Comp Neurol.* 473: 377-414
- Renno WM, Mullett MA, Beitz AJ.** (1992) Systemic morphine reduces GABA release in the lateral but not the medial portion of the midbrain periaqueductal gray of the rat. *Brain Res.* 594: 221-232
- Rice KC, Jacobson AE, Burke Jr. TE, Bajwa BS, Streaty RA, Klee WA.** (1983) Irreversible ligands with high selectivity towards delta and mu opiate receptors. *Science.* 229: 314-316
- Roesler R, Vianna MRM, de-Paris F, Quevedo J.** (1999) Memory-enhancing treatments do not reverse the impairment of inhibitory Avoidance retention induced by NMDA receptor blockade. *Neurobiol Learn Mem.* 72: 252-258
- Rollenhagen A, Bischof HJ.** (2000) Evidence for the involvement of two areas of the zebra finch forebrain in sexual imprinting. *Neurobiol Learn Mem.* 73: 101-113
- Sakellaridis N, Vernadakis A.** (1986) An unconventional response of adenylate cyclase to morphine and naloxone in the chick during early development. *Proc Natl Acad Sci. USA* 83: 2738-2742
- Sakellaridis N, Mangoura D, Vernadakis A.** (1986) Effects of opiates on the growth of neuron-enriched cultures from chick embryonic brain. *Int J Dev Neurosci.* 3: 293-302
- Sanchez C.** (2003) Stress-induced vocalisation in adult animals. A valid model of anxiety? *Eur J Pharmacol.* 463: 133-43
- Sarne Y, Fields A, Keren O, Gafni M.** (1996) Stimulatory effects of opioids on transmitter release and possible cellular mechanisms: Overview and original results. *Neurochem Res.* 21: 1353-1361
- Saransaari P, Oja SS.** (2000) Taurine and neural damage. *Amino acids.* 19: 509-26
- Savory CJ, Gentle MJ, Yeomans MR.** (1989) Opioid modulation of feeding and drinking in fowls. *Br Poult Sci.* 30: 379-392
- Sbrenna S, Marti M, Morari M, Calo G, Guerrini R, Beani I, Bianchi C.** (1999) L-glutamate and gamma-aminobutyric acid efflux from rat cerebrocortical synaptosomes: modulation by kappa-and mu – but not delta and opioid receptor like 1 receptors. *J Pharmacol Exp Ther.* 291: 1365-1371
- Scheich H.** (1987) Neural correlates of auditory filial imprinting. *J Comp Physiol. A* 161: 605-619
- Scheich H, Braun K.** (1988) Synaptic selection and calcium regulation; Common mechanisms of auditory filial imprinting and vocal learning in birds? *Verhandlungen der Zoologischen Gesellschaft* 81: 77-95
- Scheich H, Wallhäüßer-Franke E, Braun K.** (1991) Does synaptic selection explain auditory imprinting? In: Squire L.R., Weinberger N.M., Lynch G. und Mc Gaugh J.L. (Eds.) *Memory: Organisation and Locus of change.* Oxford University Press, Oxford, 114-159

- Schulteis G, Martinez Jr JL.** (1992) Peripheral modulation of learning and memory: enkephalines as a model system. *Psychopharmacology*. 109: 347-364
- Sharma JK, Nirenberg M, Klee WA.** (1975) Morphine receptors as regulators of adenylat cyclase activity. *Proc Natl Acad Sci. USA* 72: 590-594
- Shen Y, Li R.** (1995) The role of neuropeptides in learning and memory: Possible mechanisms. *Med Hypothesis*. 45: 529-538
- Shen KZ, Johnson SW.** (2002) Presynaptic modulation of synaptic transmission by opioid receptor in rat subthalamic nucleus in vitro. *J Physiol*. 541: 219-230
- Shiraishi M, Kamiyama Y, Hüttemeier PC, Beneveniste H.** (1997) Extracellular glutamate and dopamine measured by microdialysis in the rat striatum during blockade of synaptic transmission in anesthetized and awake rats. *Brain Res*. 759: 221-227
- Shoji Y, Delfs J, Williams JT.** (1999) Presynaptic inhibition of GABA(B)- mediated synaptic potentials in the ventral tegmental area during morphine withdrawal. *J Neurosci*. 19: 2347-2355
- Simon EJ.** (1991) Opioid Receptors and endogenous opioid peptides. *Med Res Rev*. 11: 357-374
- Simonds WF, Burke Jr. TR, Rice KC, Jacobson AE, Klee WA.** (1985) Purification of the opiate receptor of NG 108-15 neuroblastoma-glioma hybrid cells. *Proc Natl Acad Sci. USA* 82: 4974-4978
- Singewald N, Guo LJ, Philippu A,** (1993) Taurine release in the hypothalamus is altered by blood pressure changes and neuroactive drugs. *Eur J Pharmacol*. 240: 21-27
- Siviy SM, Calcagnetti DJ, Reid LD.** (1982) A temporal analysis of naloxone's suppressant effect on drinking. *Pharmacol Biochem Behav*. 16: 173-175
- Skeels HM.** (1966) Adult status of children with contrasting early life experiences: A follow-up Study. *Monographs of the society for research in child development*. Serial No 105, 31/6, 1-63
- Skov Olsen P, Kirkegaard P, Petersen B, Lendorf A, Christiansen J.** (1981) The effect of a synthetic met-enkephalin analogue (FK 33-824) on gastric acid secretion and serum gastrin in man. *Scand J Gastroenterol*. 16: 531-533
- Smith F, Nott KH.** (1970) The "critical period" in relation to the strength of the stimulus. *Zeitschrift für Tierpsychologie*. 27: 108-115
- Snyder SH, Pasternak GW.** (2003) Historical review: Opioid receptors. *TRENDS in Pharmacol Sci*. 24: 198-205
- Sokoloff L, Reivich M, Kennedy C, Des Rosiers MH, Patlak CS, Pettigrew KD, Sakurada O, Shinohara M.** (1977) The [<sup>14</sup>C]deoxyglucose method for the measurement of local cerebral glucose utilization: Theory, procedure and normal values in the conscious and anaesthetized albino rat. *J Neurochem*. 28: 897-916
- Spalding DA.** (1873) Instinct, with original observations on young animals. *Macmillan's Magazine*. 27: 282-293

- Spampinato U, Esposito E, Romandini S, Samanin R.** (1985) Changes of serotonin and dopamine metabolism in various forebrain areas of rats injected with morphine either systemically or in the raphe nuclei dorsalis and medianus. *Brain Res.* 328: 89-95
- Spanagel R, Herz A, Shippenberg TS.** (1992) Opposing tonically active endogenous opioid systems modulate the mesolimbic dopaminergic pathway. *Proc Natl Acad Sci. USA* 89: 2046-2050
- Stefano GB, Kream RM, Zukin RS.** (1980) Demonstration of stereospecific opiate binding in the nervous tissue of marine mollusc *Mytilus edulis*. *Brain Res.* 180: 440-445
- Stein L, Belluzzi JD.** (1978) Brain endorphins and the sense of well-being: A psychological hypothesis. In: Costa E., Trabucchi M., eds. *The Endorphins: Advances in Biochemical Psychopharmacology*, Vol. 18, New York: Raven
- Sternweis PC, Pang IH** (1990) The G protein-channel connection. *Trends Neurosci.* 13: 122-6
- Strand FL.** (1999) Endogenous Opiate Neuropeptides: Endorphins, Enkephalins, Dynorphins, Tyr-MIF-1, and Nociceptin, in: *Neuropeptides*, MIT Press Cambridge
- Strahs , Weinstein** (1997) Comparative modeling and molecular dynamics studies of the delta, kappa and mu opioid receptors. *Protein Eng* 10: 1019-1038
- Sufka KJ, Hughes RA, McCormick TM, Borland JL.** (1994) Opiate effects on isolation stress in domestic fowl. *Pharmacol Biochem Behav.* 49: 1011-1015
- Tachibana T, Tazawa M, Sugahara K.** (2001) Feeding increases 5-Hydroxytyramine and Norepinephrine within the hypothalamus of chicks. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol.* 130: 15-22
- Tatsumi H, Costa M, Schimerlik M, North RA.** (1990) Potassium conductance increased by noradrenaline, opioids, somatostatin, and G-proteins: whole-cell recording from guinea pig submucous neurons. *J Neurosci.* 10: 1675-82
- Timmerman W, Cisci G, Nap A, de Vries JB, Westerink BH** (1999) Effect of handling on extracellular levels of glutamate and other amino acids in various areas of the brain measured by microdialysis. *Brain Res.* 833: 150-160
- Torre E, Fassino S, Ancona M.** (1986) Non-associative learning in the mouse Effect of morphine and naloxone. *Func Neurol.* 1: 279-284
- Tossman U, Ungerstedt U.** (1986) Microdialysis in the study of extracellular levels of amino acids in the rat brain. *Acta Physiol Scand.* 128: 9-14
- Tsukada J, Kanamatsu T, Takahara H.** (1999) Neurotransmitter release from the medial hyperstriatum ventrale of the chick forebrain accompanying filial imprinting behavior, measured by in vivo microdialysis. *Neurochem Res.* 24: 315-320
- Ungerstedt U, Pycock C.** (1974) Functional correlates of dopamine neurotransmission. *Bull Schweiz Akad Med Wiss.* 30: 44-55
- Uno H, Tarara R, Else JG, Suleman MA, Sapolsky RM.** (1989) Hippocampal damage associated with prolonged and fatal stress in primates. *J Neurosci.* 9: 1705-1711
- Vahabzadeh A, Fillenz M.** (1994) Comparison of stress-induced changes in noradrenergic and serotonergic neurons in the rat hippocampus using microdialysis. *Eur J Neurosci.* 6: 1205-1212



- Van Kampen HS, Bolhuis JJ.** (1993) Interaction between auditory and visual learning during filial imprinting. *Anim Behav.* 45: 623-625
- Vaughan CW, Ingram SL, Connor MA, Christie MJ.** (1997) How opioids inhibit GABA-mediated neurotransmission. *Nature.* 390 (6660): 611-614
- Vilberg TR, Bean N, Bishop P, Porada K, Panksepp J.** (1977) Possible relations between brain opiates and social behaviors. *Neurosci Abst.* 3: 303
- Vilberg TR, Panksepp J, Kastin AJ, Coy DH.** (1984) The pharmacology of endorphin Modulation of chick distress vocalisation. *Peptides.* 5: 823-827
- Vlaskovska M, Schramm M, Nylander I, Kasakov L, You ZB, Herrera-Marschitz M, Terenius L.** (1997) Opioid effects on  $^{45}\text{Ca}^{++}$  uptake and glutamate release in rat cerebral cortex in primary culture. *J Neurochem.* 68: 517-24
- Vivian JA, Miczek KA.** (1998) Effects of  $\mu$ - and  $\delta$ -opioid agonists and antagonists on affective vocal and reflective pain responses during social stress in rats. *Psychopharmacology.* 139: 364-375
- Vivian JA, Miczek KA.** (1999) Interactions between social stress and morphine in the periaqueductal gray: effects on affective vocal and reflexive pain responses in the rat. *Psychopharmacology.* 146: 153-161
- Vogt JL, Sim-Selley LJ, Childers SR, Whiley RG, Vogt BA.** (2001) Colocalisation of mu-opioid receptors and activated G-proteins in rat cingulate cortex. *J Pharmacol Exp Ther.* 299: 840-848
- Wade JV, Olson JP, Samson FE, Nelson SR, Pazdernik TL.** (1988) A possible role for taurine in osmoregulation within the brain. *J Neurochem.* 51: 740-745
- Wallhäußer-Franke E.** (1989) Anatomische Korrelate der akustischen Filialprägung im ZNS von Haushühnküken (*Gallus domestikus*) und die Verbindungen der beteiligten Gebiete. Dissertation, TH Darmstadt
- Wallhäußer E, Scheich H.** (1987) Auditory imprinting leads to differential 2-deoxyglucose uptake and dendritic spine loss in the chick rostral forebrain. *Dev Brain Res.* 31: 29-44
- Wang J, Lieberman D, Tabubo H, Finberg JP, Oldfield EH, Bankiewicz KS.** (1994) Effects of gliosis on dopamine metabolism in rat striatum. *Brain Res.* 663: 199-205
- Wang X.** (1992) Elektrophysiologische Eigenschaften und Langzeitpotenzierung in einem gedächtnisrelevanten Vorderhirngebiet des Haushühnkükens in vitro. Dissertation, TH Darmstadt
- Wang X, Babinsky R, Scheich H.** (1994) Synaptic potentiation and depression in slices of mediorostral neostriatum/hyperstriatum complex, an auditory imprinting-relevant area in chick forebrain. *Neuroscience.* 60: 689-699
- Westerink BHC, Damsma G, Rollema H, DeVries JB, Horn AS.** (1987a) Scope and limitations of in vivo brain dialysis: A comparison of its application to various transmitter systems. *Life Sci.* 41: 1763-1777
- Westerink BHC, Hofstede HM, Damsma G, DeVries JB.** (1988) The significance of extracellular calcium for the release of dopamine, acetylcholine and amino acids in conscious rats, evaluated by brain microdialysis. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol.* 337: 373-378

**Westerink BHC, Tuntler J, Damsma G, Rollema H, DeVries JB.** (1987b) The use of tetrodotoxin for the characterization of drug-enhanced dopamine release in conscious rats studied by brain dialysis. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol.* 336: 502-507

**Wiesenfeld-Hallin Z.** (1998) Combined opioid-NMDA antagonist therapies. What advantages do they offer for the control of pain syndromes? *Drugs.* 55: 1-4

**Winslow JT, Insel TR.** (1991) Endogenous opioids: do they modulate the rat pup's response to social isolation? *Behav Neurosci.* 105: 253-263

**Wolf A.** (1992) Pharmakologische Beeinflussung des Glutamat- und Opiatsystems bei der akustischen Fehlförderung des Haushühnkükens (*Gallus domesticus*). Diplomarbeit, Technische Hochschule Darmstadt

**Wood P.** (1983) Opioid regulation of CNS dopaminergic pathways: A review of methodology, receptor types, regional variation and species differences. *Peptides.* 4: 595-601

**Wuster M, Schulz R, Herz A.** (1979) Specificity of opioids towards the  $\mu$ ,  $\delta$  and  $\epsilon$  opioid receptors. *Neurosci Lett.* 15: 193-198

**Yoshioka M, Matsumoto M, Togashi H, Smith CB, Saito H.** (1993) Opioid receptor regulation of 5-HT release from the rat hippocampus measured by in vivo microdialysis. *Brain Res.* 613: 74-79

**Zadina JE, Hackler L, Ge LJ, Kastin AJ.** (1997) A potent and selective endogenous agonist for the  $\mu$  opiate receptor. *Nature.* 386: 499-502

**Zagon IS, McLaughlin PJ.** (1983) Increased brain size and cellular content in infant rats treated with an opiate antagonist. *Science.* 221: 1179-1180

**Zagon IS, McLaughlin PJ.** (1986) Opioid antagonist (Naltrexone) modulation of cerebellar development: Histological and morphometric studies. *J Neurosci.* 6: 1424-1432

**Zagon IS, Goodman SR, Mc Laughlin PJ.** (1989) Characterisation of zeta: a new opioid receptor involved in growth. *Brain Res.* 482: 297-305

**Zimprich A, Simon T, Höllt V.** (1995) Transfected rat mu opioid receptors (rMOR1 and rMOR1B) stimulate phospholipase C and Ca<sup>2+</sup> mobilisation. *Neuroreport.* 7: 54-56

**Zukin RS, Zukin SR.** (1981) Demonstration of [<sup>3</sup>H]cyclazocine binding to multiple opiate receptor sites. *Mol Pharmacol.* 20: 246-254

**LEBENS LAUF**

Name	Baldauf (geb. Pohl)
Vorname	Kathrin
Geburtsdatum	25.07.1971
Geburtsort	Torgau
Familienstand	verheiratet
Kinder	eine Tochter
Staatsangehörigkeit	deutsch

**Schulbildung**

1978 – 1988	Besuch der Polytechnischen Oberschule in Arzberg
1988 – 1990	Besuch der Erweiterten Oberschule in Torgau

**Berufsausbildung**

1990 – 1995	Studium der Biochemie an der Universität Leipzig
1995	Diplom im Fach Mikrobiologie
1995 - 2000	Promotionsarbeit bei Frau Prof. Dr. K. Braun am Leibniz-Institut für Neurobiologie
seit 2001	Wissenschaftliche Mitarbeiterin der FAN gGmbH

Magdeburg, 22.11.2004