

Aus dem Institut für Pharmakologie und Toxikologie
der Medizinischen Fakultät
der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg

**Die Rolle des Interstitialkerns der Stria terminalis bei
Alarmpheromon-ausgelöstem Defensivverhalten**

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
Dr. med.
(doctor medicinae)

an der Medizinischen Fakultät
der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg

vorgelegt von
aus
Magdeburg

Tino Breinfeld
Burg
2016

Dokumentationsblatt

Bibliographische Beschreibung

Breitfeld, Tino

Die Rolle des Interstitialkerns der Stria terminalis bei Alarmpheromon-ausgelöstem Defensivverhalten.

2016. 63 Bl.: 19 Abb., 1 Tab., 1 Anl.

Kurzreferat

Alarmpheromone (AP) sind biologische Stoffe, die verschiedensten Lebewesen eine intraspezifische Kommunikation ermöglichen. Bislang wurden Alarmpheromone bei Ratten, aber auch bei größeren Säugetieren, wie Schweinen und sogar beim Menschen, nachgewiesen. Ratten geben ihr Alarmpheromon über perianale Drüsen ab und können so verschiedene Defensivverhalten bei Artgenossen auslösen.

C-Fos-Studien zeigten, dass unterschiedliche Hirngebiete, wie zum Beispiel der Interstitialkern der Stria terminalis (BNST), bei der sensorischen Verarbeitung von Alarmpheromon und der Auslösung der defensiven Verhaltensweisen aktiviert sind. Offen bleibt jedoch die Frage, ob die beobachteten Aktivierungen in einem korrelativen oder kausalen Zusammenhang mit Alarmpheromon bzw. dem dadurch ausgelösten Verhalten stehen. Ziel der vorliegenden Arbeit war es, zu untersuchen, ob der anteriore BNST (aBNST) für durch Alarmpheromon ausgelöstes Defensivverhalten notwendig ist.

Im ersten Teil der Studie wurde ein Verhaltensparadigma etabliert, mit dem Alarmpheromon-induziertes Defensivverhalten bei Ratten untersucht werden kann.

Im zweiten Teil der Studie wurde der aBNST durch eine lokale pharmakologische Manipulation temporär inaktiviert. Bei den so behandelten Ratten löste Alarmpheromon kein defensives Verhalten mehr aus. Damit wurde erstmals gezeigt, dass der aBNST ein zentrales Schlüsselement im neuronalen Schaltkreis, der Alarmpheromon-ausgelöstes Defensivverhalten prozessiert, ist.

Schlüsselwörter: Alarmpheromon, BNST, Muskimol, Geruchs-induzierte Angst, Risikoabwägungsverhalten, neuronaler olfaktorischer Schaltkreis, Ratten

Inhaltsverzeichnis

Dokumentationsblatt	2
Inhaltsverzeichnis	3
Abkürzungsverzeichnis.....	6
Abbildungsverzeichnis	8
Tabellenverzeichnis	8
Erklärung zum Eigenanteil.....	9
1. Einleitung	10
1.1. Pheromone	10
1.2. Alarmpheromon der Ratten	11
1.3. Neuronaler Schaltkreis der Alarmpheromon-Verarbeitung	11
1.4. Interstitialkern der Stria Terminalis	13
1.5. Zielsetzung – Hypothese	13
2. Material und Methoden	15
2.1. Tiere	15
2.2. Herstellung der Geruchsproben.....	16
2.2.1. Alarmpheromon	16
2.2.2. Nackengeruch.....	18
2.2.3. Wasserprobe.....	18
2.2.4. Weiblicher Urin.....	18
2.2.5. Fuchsurin	19
2.3. Operative Kanülenimplantation.....	20
2.4. Mikroinjektionen.....	23
2.5. Apparatur und Verhaltensparadigma	23
2.6. Histologie.....	28
2.7. Beschreibende und analytische Statistik	29
3. Resultate.....	30

3.1. Experiment 1: Etablierung des Verhaltensparadigmas bei männlichen Sprague-Dawley Ratten	30
3.2. Experiment 2: Inaktivierung des aBNST durch Muskimol-Injektionen	32
3.2.1. Histologische Auswertung.....	32
3.2.2. Lokomotorische Aktivität.....	34
3.2.3. <i>Head out</i> Verhalten	35
3.2.4. Beobachterübereinstimmung	37
3.2.5. <i>Conceal</i> – Verstecken in der Hütte	37
3.2.6. Vermeidung des Zentrums im open field.....	39
3.2.7. Autonome Furchtreaktion der Tiere	41
4. Diskussion.....	42
4.1. Etablierung des Verhaltensparadigmas.....	42
4.2. Der neuronale Schaltkreis der Alarmpheromonverarbeitung – aBNST als Schaltrelais.....	43
4.3. Temporäre Blockade des aBNST	44
4.4. Erweiterung des Geruchspektrums	45
4.5. Mögliche Auswirkungen durch die Methodik der Mikroinjektionen.....	45
4.6. Einfluss des aBNST in der Verarbeitung des nicht-pheromonischen Fuchsurins.....	46
4.7. Aufenthalt im Zentrum eines open field	47
4.8. Kausaler Zusammenhang zwischen Alarmpheromon, aBNST und Defensivverhalten.....	48
4.9. Verschaltung des aBNST	48
4.10. Autonome Furchtreaktion der Tiere	50
4.11. Bezug zur Humanmedizin.....	50
4.12. Schlussfolgerung.....	51
Zusammenfassung	52
Literaturverzeichnis.....	53
Danksagungen	59

Ehrenerklärung	60
Lebenslauf	61
Anlagen	63

Abkürzungsverzeichnis

µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
Abb.	Abbildung
aBNST	anteriorer Interstitialkern der Stria terminalis (anterior bed nucleus of the stria terminalis)
Alarm (in Abb.)	Alarmpheromon
ANOVA	Variance-Analyse (analysis of variance)
AOB	akzessorischer olfaktorischer Bulbus (accessory olfactory bulb)
ap	anterior-posterior
AP	Alarmpheromon
Aqua dest.	destilliertes Wasser
ASR	Akustisch ausgelöste Schreckreaktion (acoustic startle response)
AZ	Aktenzeichen
BNST	Interstitialkern der Stria terminalis (bed nucleus of the stria terminalis)
ca.	circa
CPu	Putamen caudatus (caudate putamen)
dB	Dezibel
f	Fornix
Fuchs (in Abb.)	Fuchsurin
G	Gauge (Maßeinheit des Kanüledurchmessers)
GABA	γ-Aminobuttersäure
i.p.	intraperitoneal
lat	lateral
LPO	laterales präoptisches Areal
lx	Lux
mA	Milliampere
MeA	Mediale Amygdala
min	Minuten
mm	Millimeter
MnPo	mediales präoptisches Areal

MOB	hauptolfaktorischer Bulbus (main olfactory bulb)
MOE	hauptolfaktorisches Epithel (main olfactory epithelium)
MS	medialer septaler Kern
n	Anzahl
Nacken (in Abb.)	Nackengeruch
NaCl	Natriumchlorid
nmol	nanomol
pBNST	posteriorer Interstitialkern der Stria terminalis
s	Sekunde
SIH	stress-induced hyperthermia
SPL	Schalldruckpegel (sound pressure level)
Tab.	Tabelle
UniMD	Universität Magdeburg
VON	Vomeronasalorgan
VP	ventrales Pallidum
vs	versus
Weiblich (in Abb.)	weiblicher Urin
z.B.	zum Beispiel

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Möglicher neuronaler Schaltkreis der AP-Verarbeitung.....	12
Abb. 2: AP-Herstellung	16
Abb. 3: Versuchsaufbau zur AP-Gewinnung	17
Abb. 4: Metabolischer Käfig.....	19
Abb. 5: Operationsapparatur	21
Abb. 6: Implantation der Kanülen für Mikroinjektionen.....	22
Abb. 7: Experimentelles Setup	24
Abb. 8: Head out Verhalten	27
Abb. 9: Near the stimulus	27
Abb. 10: Aufenthalt im Zentrum	27
Abb. 11: Verhaltensauswirkungen von Alarmpheromon auf Ratten	31
Abb. 12: Histologische Auswertung	33
Abb. 13: Lokomotorische Aktivität	34
Abb. 14: Dauer des Head out Verhaltens	36
Abb. 15: Beobachterkorrelation	37
Abb. 16: Verbrachte Zeit im Versteck (= Conceal).....	38
Abb. 17: Prozentueller Anteil des Aufenthalts im Zentrum.....	40
Abb. 18: Anzahl der Kotkugeln	41
Abb. 19: Neuronaler Schaltkreis des olfaktorischen Systems bei Ratten	49

Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Beobachtete Verhalten im Modified Open-Field Test	39
---	----

Erklärung zum Eigenanteil

Die folgende Arbeit wurde unter dem Titel „*Temporary inactivation of the anterior part of the bed nucleus of the stria terminalis blocks alarm pheromone-induced defensive behavior in rats*“ von Tino Breitfeld, Johann E. A. Bruning, Hideaki Inagaki, Yukari Takeuchi, Yasushi Kiyokawa und Markus Fendt in *Frontiers in Neuroscience* (September 2015, Volume 9, Artikel 321) veröffentlicht.

Dabei wirkten die einzelnen Autoren wie folgt an dieser Arbeit mit:

- Die Studie wurde von mir geplant, durchgeführt und ausgewertet.
- Johann E.A. Bruning unterstützte mich bei der Durchführung der Experimente.
- Hideaki Inagaki brachte mir die Methodik zur Herstellung des Alarmpheromons sowie des Nackengeruchs bei.
- Yukari Takeuchi und Yasushi Kiyokawa waren an der Konzeption der vorliegenden Arbeit und beim Schreiben des publizierten Manuskripts beteiligt.
- Markus Fendt ist der direkte Betreuer der vorliegenden Arbeit.

1. Einleitung

Gerüche spielen eine wichtige Rolle in der Verständigung zwischen Individuen einer Art, aber auch zwischen Individuen unterschiedlicher Arten¹. Gerüche können zum Beispiel verschiedene Verhaltensänderungen auslösen (z.B. Annäherung, Vermeidung, Sexualverhalten). Die neuronalen Grundlagen dieser Geruchs-induzierten Verhaltensänderungen wurden vor allem bei Tieren zum Teil schon gut untersucht²⁻⁴. Verschiedene Arbeitsgruppen fanden dabei heraus, dass unterschiedliche Gehirnsysteme für die Detektion und Verarbeitung intra- und interspezifischer Gerüche verantwortlich sind. So wurde lange postuliert, dass für die intraspezifische Kommunikation eher Pheromone sowie das akzessorische olfaktorische System und für interspezifische Kommunikation und Umweltdüfte eher nicht-pheromonische Geruchsstoffe sowie das hauptolfaktorische System zuständig sind⁵⁻⁸. Diese Erkenntnisse sind heute nicht mehr ganz aktuell, da mittlerweile eher von einem komplexen Zusammenspiel der beiden Systeme ausgegangen wird.

1.1. Pheromone

Pheromone sind Geruchsstoffe für die intraspezifische Kommunikation, die verschiedene Informationen über das Individuum, welches es abgibt, vermitteln können. Geschlecht, Alter und Fortpflanzungsstatus⁹ sind einige dieser Informationen. Zudem werden Pheromone aber auch für die Markierung bestimmter Territorien, um potentielle paarungswillige Partner anzulocken, oder auch zur Organisation der Tierfamilie und zum Warnen der Artgenossen vor Gefahr genutzt¹⁰. Pheromone, die genutzt werden um Artgenossen zu warnen, werden Alarmpheromone genannt und wurden erstmals 1959 von Karlson und Lüscher¹¹ beschrieben. Seither wurde die Definition von Alarmpheromonen mehrmals überarbeitet und spezifiziert. Basierend auf einer Arbeitsdefinition in einer Studie von Inagaki und Kollegen¹² werden Alarmpheromone am besten wie folgt definiert:

Alarmpheromone werden von einem lebenden Individuum an die Umwelt abgegeben und dort von einem anderen Individuum der gleichen Art wahrgenommen, in welchem sie spezifische Verhaltensweisen wie Defensivverhalten auslösen. In minima-

len Konzentrationen wirkend, kommunizieren sie Informationen, die einen Überlebensvorteil erbringen.

1.2. Alarmpheromon der Ratten

Alarmpheromone sind bei vielen verschiedenen Tierarten bekannt, so zum Beispiel bei Ratten¹, Mäusen¹³, Hamstern und Wüstenrennmäusen¹⁴, Schweinen¹⁵, Rehen¹⁶, Rindern¹⁷, Zebrafischen und auch beim Menschen¹⁹. Ratten geben Alarmpheromone über Drüsen am anokutanen Übergang ab. Durch elektrische Stimulation dieser Drüsen kann man Alarmpheromon für Verhaltensversuche gewinnen²⁰. Ratten, die dem Alarmpheromon der Artgenossen ausgesetzt sind, zeigen deutlich gesteigertes Defensivverhalten, wie beispielsweise einen erhöhten akustischen Schreckreflex (ASR)²¹, eine Stress-induzierte Erhöhung der Körpertemperatur (SIH)⁷ sowie vermehrtes *Freezing*- und Schnüffelverhalten⁸. Außerdem zeigen Ratten, die Alarmpheromon ausgesetzt sind, einen längeren Aufenthalt in einem Versteck und vermehrtes Risikoabwägungsverhalten (*Head out*), wohingegen die Aufenthaltszeit in ungeschützten Bereichen einer Versuchsanordnung reduziert wird.

Das Alarmpheromon der Ratten erfüllt also die oben formulierte Definition. So wird dieses von lebenden Ratten abgegeben und vermittelt bei Ratten der gleichen Art verschiedene Defensivverhalten. Da dadurch letztendlich eine potentielle Gefahrenquelle vermieden wird, resultiert ein Überlebensvorteil für die Ratten.

1.3. Neuronaler Schaltkreis der Alarmpheromon-Verarbeitung

Aufgrund aktueller Studien wird angenommen, dass Alarmpheromon bei Ratten eher Furcht-assoziierte Verhaltensänderungen als autonome Furchtreaktionen auslöst¹. Zudem zeigte eine c-Fos-Studie, dass es zu einer vermehrten Aktivierung von Neuronen ganz bestimmter Hirnareale kommt, wenn Ratten Alarmpheromonen ausgesetzt sind²⁰. C-Fos - ein indirekter Aktivitätsmarker - wird verstärkt exprimiert, wenn Neuronen Aktionspotentiale generieren, also aktiv sind²²⁻²⁵. Daher korreliert eine erhöhte c-Fos-Expression in einem Hirnareal mit erhöhter Aktivität in diesem. Die c-

Fos-Methode ermöglichte erste Einblicke in den neuronalen Schaltkreis, welcher für die Wahrnehmung und Verarbeitung von Alarmpheromon und die durch Alarmpheromon ausgelösten Verhaltensweisen zuständig ist. Inagaki und Kollegen zeigten 2014¹², dass das Alarmpheromon der Ratten aus zwei effektiven Hauptbestandteilen besteht, die zusammen detektiert werden müssen, um eine Reaktion auszulösen. Zum einen Hexanal, welches über das hauptolfaktorische System wahrgenommen wird und zum anderen 4-Methylpentanal, welches eher über das akzessorische olfaktorische System verarbeitet wird. Hier zeigt sich, dass akzessorisches und hauptolfaktorisches System - wie zuvor erwähnt - komplex zusammenspielen. Das frühere Postulat, welches besagt, dass das hauptolfaktorische System für nicht-pheromonische interspezifische und das akzessorische System für pheromonische intraspezifische Kommunikation zuständig ist, ist damit überholt. Inagaki und Kollegen publizierten in dieser Studie einen hypothetischen neuronalen Schaltkreis (siehe Abbildung 1), der den aktuellen Wissensstand zusammenfasst¹².

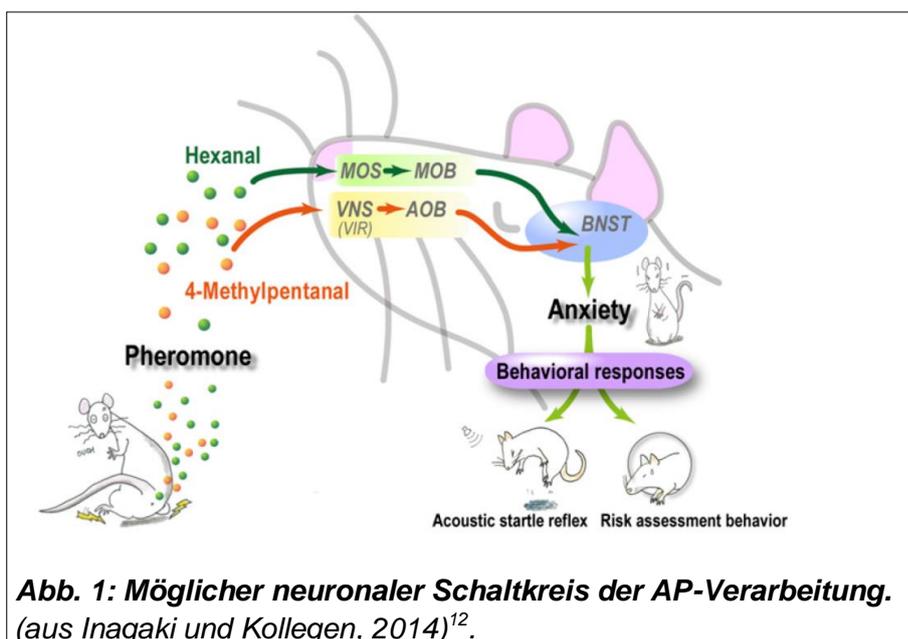


Abb. 1: Möglicher neuronaler Schaltkreis der AP-Verarbeitung.
(aus Inagaki und Kollegen, 2014)¹².

1.4. Interstitialkern der Stria Terminalis

Zentrum dieses Schaltkreises ist der Interstitialkern der Stria terminalis (BNST). Diese Struktur wurde schon 2005 in einer c-Fos-Studie identifiziert²⁰ und es ist bekannt, dass diese Struktur bei anderen Geruchs-induzierten Furchtverhalten eine wichtige Rolle spielt^{26,27}. Ob der BNST wirklich neben dem akzessorischen olfaktorischen System auch Verbindung zum hauptolfaktorischen System hat, ist nach aktueller Studienlage nicht klar. Auch wenn Ingaki und Kollegen dies postulieren¹², gibt es auch Autoren, die der Meinung sind, dass der BNST nur Eingang vom akzessorischen olfaktorischen System bekommt²⁸. Das akzessorische System ist mit dem Vomeronasalorgan verbunden, welches eine wichtige Rolle in der Wahrnehmung und Verarbeitung von Pheromonen spielt^{5,8,9}. So zeigten sich keine Effekte des Alarmpheromons bezüglich SIH²⁹, ASR⁷ und anderer Defensivverhalten⁷ bei Tieren, bei denen das Vomeronasalorgan läsiert wurde. Da der BNST ein Teil des Gehirns ist, der ganz generell bei der Verarbeitung von Angst und Furcht eine wichtige Rolle spielt^{2,30}, wurde vermutet, dass diese Gehirnregion eine bedeutende Schaltstation im neuronalen Schaltkreis ist, der Alarmpheromon-induzierte Verhaltensänderungen vermittelt. In der Tat wurde im anterioren Abschnitt des BNST (aBNST) wiederholt verstärkte c-Fos Expression beim Riechen von Alarmpheromon oder seinen aktiven Bestandteilen beschrieben^{12,20,31,32}. Allerdings lässt sich auf Grund von c-Fos Expression nicht sagen, ob die Aktivität korrelativ oder kausal für etwas wie zum Beispiel Alarmpheromon-induziertes Verhalten ist. Daher ist die Inaktivierung des Gebiets ein wichtiger zweiter Schritt bei der Analyse.

1.5. Zielsetzung – Hypothese

Die folgende Studie wurde durchgeführt, um die Hypothese zu testen, dass der aBNST Alarmpheromon-induzierte Verhaltensänderungen vermittelt. Im ersten Teil wurde ein Verhaltensparadigma zur Untersuchung von Alarmpheromon-induzierten Verhaltensänderungen, welches von Kiyokawa und Kollegen entwickelt wurde (*Modified Open-Field Test*)³³, leicht modifiziert und in unserem Labor etabliert. Im zweiten Teil wurde der aBNST durch lokale Muskimolinjektionen inaktiviert und beobachtet,

ob dadurch die durch Alarmpheromon hervorgerufenen Verhaltensänderungen beeinflusst werden. Hierbei wurde vor allem *Head out* Verhalten als robustestes Defensivverhalten analysiert. Zusätzlich zu Alarmpheromon wurde Nackenduft und Urin von weiblichen Ratten als neutraler beziehungsweise attraktiver Geruch und Fuchsurin als weiterer aversiver Geruch benutzt.

2. Material und Methoden

2.1. Tiere

Alle Experimente wurden mit experimentell naiven männlichen Sprague-Dawley Ratten (in einem Alter zwischen 8 und 11 Wochen zu Beginn der Studie) durchgeführt. Die Tiere wurden in Gruppen zu 4 bis 6 Tieren pro Laborkäfig unter standardisierten Bedingungen (20 - 22 °C; Verhältnis Licht- zu Dunkelphase 12:12 h; Beginn der Lichtphase um 06:00 Uhr; Luftfeuchtigkeit 50 – 65 %) gehalten. Alle Experimente wurden während der Lichtphase durchgeführt. Futter und Wasser standen zur freien Verfügung.

Die Experimente wurden nach internationalen Richtlinien zum Schutz der für wissenschaftliche Zwecke verwendeten Tiere (2010/63/EU) durchgeführt und wurden durch die lokalen Behörden genehmigt (Landesverwaltungsamt Sachsen-Anhalt, AZ 42502-2-1238 UniMD). Der operative Eingriff wurde vom Tierschutzbeauftragten der Universität abgenommen.

2.2. Herstellung der Geruchsproben

2.2.1. Alarmpheromon

Zur Herstellung des Alarmpheromons richteten wir uns nach der Methode von Kiyokawa und Kollegen^{33,34}. Tiere, die hierfür verwendet wurden (= Donor-Ratten), kamen nicht mehr in einen Verhaltensversuch. Es wurden 15 männliche Sprague-Dawley Ratten eingesetzt, die mindestens das gleiche Alter der Ratten hatten, die dem Alarmpheromon ausgesetzt wurden.

Nach Anästhesie mit 40 mg/kg Nembutal i.p. wurde der Analbereich von Kotresten gesäubert. Anschließend wurden zwei intradermale Kanülen (27G) an beiden Seiten des Analkanals, am anokutanen Übergang, platziert (siehe Abbildung 2). Beim Einführen der Kanülen wurde sehr genau darauf geachtet, dass es zu keinerlei Blutungen in diesem Bereich kommt. An diesen Kanülen wurde dann jeweils ein Stromkabel mittels Krokodilklemme befestigt.



Abb. 2: AP-Herstellung
Kanülen am anokutanen Übergang zur Stimulation der Analdrüsen

Anschließend wurde die Pheromon-Box (20 x 20 x 10 cm) vorbereitet. Hierfür wurde sie mit speziellem Reinigungsmittel (X7, MP Biomedicals) gründlich gereinigt und

danach getrocknet. Dann wurden Decke und Wände mit 5 ml Aqua dest. besprüht. Anschließend wurde die anästhesierte Donor-Ratte auf ein Stück geruchlosem Papier in die vorbereitete Pheromon-Box gelegt und die Kabel mit einem Impulsgenerator (Modell 2100, A-M Systems, Sequim, USA) verbunden (Versuchsaufbau siehe Abbildung 3). Zuletzt wurde die Box durch eine Plastikwand, welche mit Klebestreifen fixiert wurde, verschlossen.

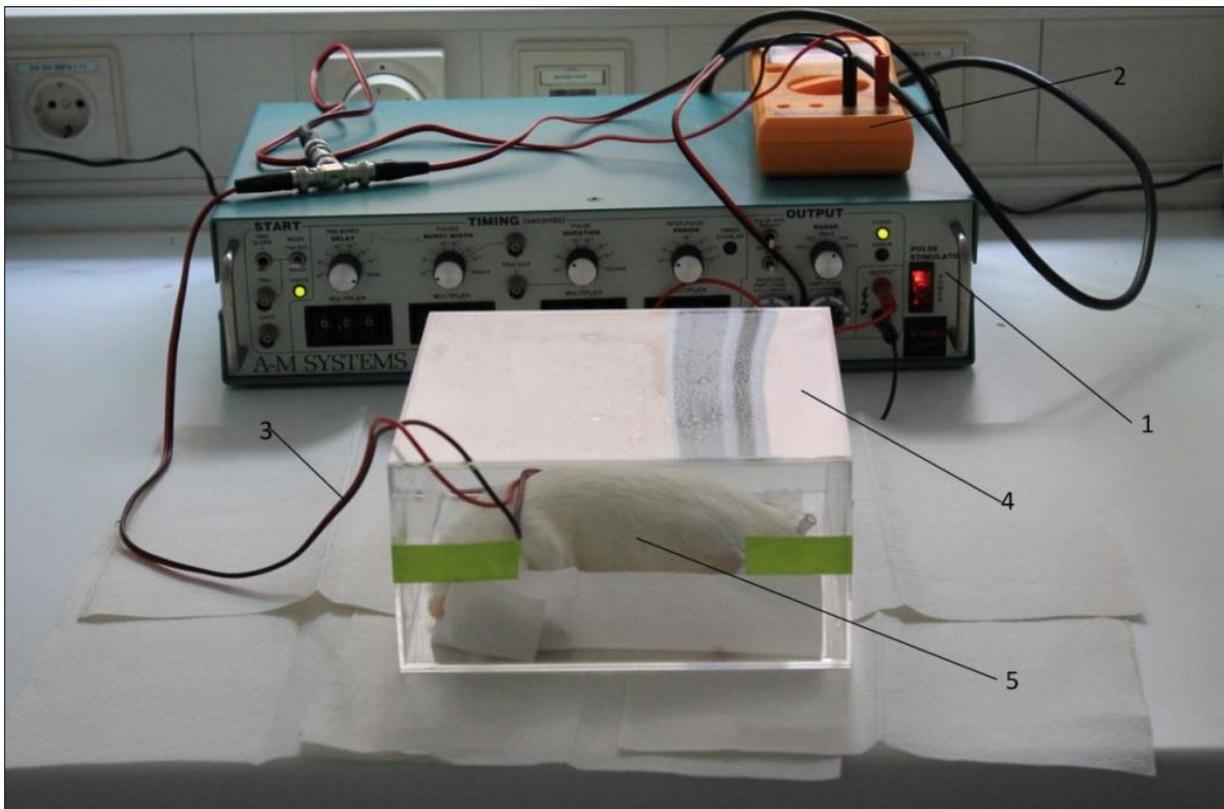


Abb. 3: Versuchsaufbau zur AP-Gewinnung

1 – Impulsgenerator, 2 – Voltmeter, 3 – Verbindungsstromkabel, 4 – Pheromon-Box (mit Aqua dest. besprüht), 5 - Ratte

Nun wurden 15 elektrische Stimuli (10 mA, Dauer 1 s, 20 s Intervall zwischen den Stimuli) abgegeben und somit die Anldrüsen, welche das Alarmpheromon abgeben, stimuliert. Anschließend wurde das Tier noch für eine weitere Minute in der Box belassen, um das Lösen des freigesetzten Alarmpheromons im Aqua dest. zu ermöglichen. Nach dem Entfernen der Ratte aus der Box, wurde das alarmpheromonhaltige Wasser aufgesammelt und bis zum sich anschließenden Verhaltensversuch (1-2 Stunden später) im Kühlschrank (4 °C) aufbewahrt. Die Donor-Ratte wurde bis zum Erwachen aus der Narkose überwacht. Die komplette Prozedur wurde unter dem Ab-

zug durchgeführt, um eine Kontamination des Labors und damit eine Verfälschung der nachfolgenden Verhaltensversuche zu vermeiden.

2.2.2. Nackengeruch

Zur Herstellung des Nackengeruchs wurde das gleiche experimentelle Design wie zur Herstellung des Alarmpheromons genutzt. Lediglich die Position der Kanülen wurde verändert. Diese wurden intradermal im Bereich der Nackenfalte positioniert, da hier keine Drüsen zu erwarten sind, welche Alarmpheromon freisetzen. Nach der Stimulation wurde dann der in Wasser gelöste neutrale Nackengeruch aufgesammelt und für weitere Verhaltensversuche im Kühlschrank aufbewahrt.

2.2.3. Wasserprobe

Aqua dest. wurde vor dem Experiment vorbereitet und als Kontrollgeruch im ersten Experiment verwendet.

2.2.4. Weiblicher Urin

Zur Gewinnung weiblichen Urins wurden 5 weibliche Sprague-Dawley Ratten in einen metabolischen Käfig (Tecniplast, Hohenpeißenberg, Deutschland) für 30 Minuten platziert (siehe Abbildung 4). In dieser Zeit wurde der Urin, welcher von den Tieren abgegeben wurde, in einem Gefäß gesammelt. Tiere wurden mehrmals zum Sammeln benutzt, sodass Urin aus verschiedenen Zyklusphasen der Tiere gewonnen wurde. Die einzelnen Proben wurden zusammengeführt, sodass letztendlich ein Gemisch aus allen Zyklusphasen der Ratten benutzt wurde.



Abb. 4: Metabolischer Käfig
 Mit dieser Apparatur wurde weiblicher Urin aufgefangen.
 1 = Tier im Käfig auf Gitter,
 2 = Urinauffangbehälter.

2.2.5. Fuchsurin

Es wurde kommerziell erhältlicher Fuchsurin benutzt (Main Odor Solutions, Maine, USA).

Fuchsurin ist in der Lage, defensives Verhalten auszulösen³⁵⁻³⁷. Er wurde daher als zusätzlicher Geruch benutzt, um defensives Verhalten zu testen, das durch den Geruch einer anderen Spezies ausgelöst wird. Nackenduft und weiblicher Urin hingegen sind Gerüche, die von der gleichen Spezies stammen. Diese sollten bezüglich defensiven Verhaltens neutrale Gerüche sein^{20,33}. Zusätzlich kann weiblicher Urin auch anziehend für männliche Tiere wirken. In dieser Studie wurde dies nicht unbedingt erwartet, da vor allem weiblicher Urin aus der Östrus-Phase bei sexuell erfahrenen männliche Ratten diese Wirkung hat, hier jedoch sexuell naive Ratten sowie gemischter Urin aus verschiedenen Zyklusphasen benutzt wurden³⁸.

2.3. Operative Kanülenimplantation

Für die Mikroinjektionen im zweiten Experiment wurden Führungskanülen implantiert. Für die Anästhesie kamen die Tiere in eine kleine Induktionskammer (Rothacher Medical GmbH, Spisi, Schweiz), welche mit dem Narkosegerät (Isofluranvernebler, Rothacher Medical GmbH, Spisi, Schweiz) verbunden war. Die Tiere wurden mit einem Isofluran-Sauerstoff-Gemisch [5% Isofluran (Baxter) für Narkoseeinleitung] narkotisiert und anschließend in einen stereotaktischen Apparat (David Kopf Instruments, Tujunga, USA) eingespannt (siehe Abbildung 5). Dabei musste darauf geachtet werden, dass die Trommelfelle nicht beschädigt werden und das Tier symmetrisch eingespannt ist. Letzteres wurde später stereotaktisch überprüft. Die Inhalationsnarkose wurde in dieser Apparatur über eine Maske mit einem Gasfluss von 2,5 l/min (kontrolliert durch digiflow, Carbamed, Liebfeld, Schweiz) aufrechterhalten (2-2,5% Isofluran). Beim eingespannten Tier wurden dann Korneal- und Schmerzreflexe getestet, bevor die Operation begann, um eine ausreichende Narkosetiefe zu gewährleisten. Um die Augen der Tiere bei erloschenem Kornealreflex vor dem Austrocknen zu schützen, wurde Bepanthen Augensalbe aufgetragen.

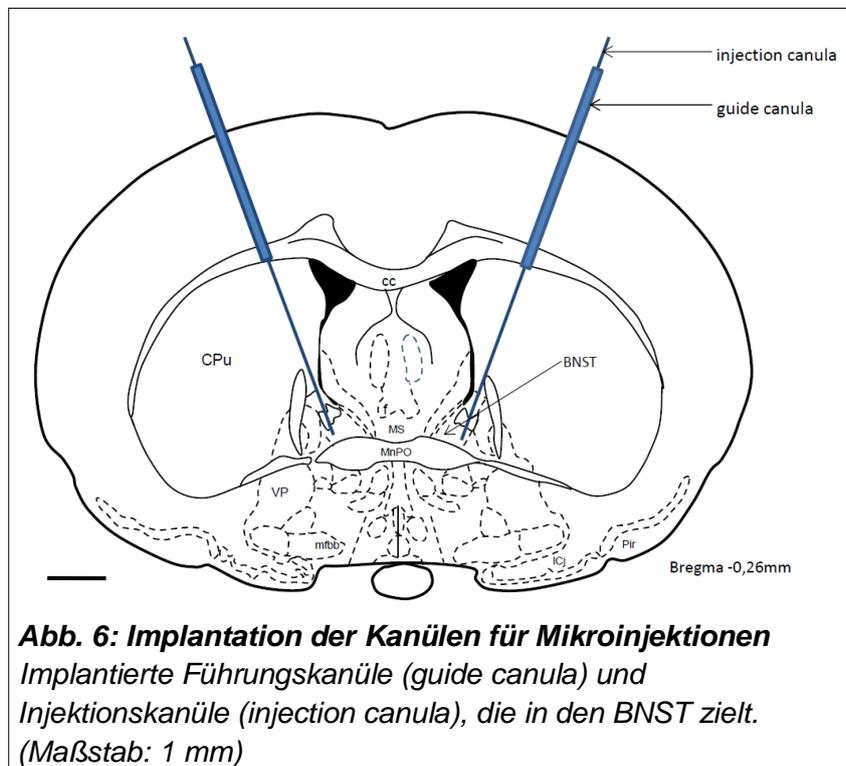


Abb. 5: Operationsapparatur

1 = Anästhesiegerät (Isofluranvernebler rechts, digiflow links), 2 = Beleuchtung, 3 = Stereotaktischer Apparat, 4 = Heizplatte, 5 = Temperaturregler, 6 = Bohrer, 7 = Tier in Induktionskammer, 8 = Operationsmikroskop, 9 = Filter

Beim suffizient anästhesierten Tier wurde schließlich der Kopf rasiert und die Haut aufgeschnitten. Dann erfolgte eine Säuberung der Schädelkalotte mittels 10%igem Wasserstoffperoxid, was gleichzeitig auch Blutungen an den Wundrändern stoppte. Nun wurde die korrekte Lage des Tiers in allen Ebenen überprüft und Bregma (vordere Schnittstelle der Schädelnähte) mittels Operationsmikroskop (Leica WILD M3Z, Heerbrugg, Schweiz) aufgesucht und seine Position im Koordinatensystem des stereotaktischen Apparats gemessen. Von hier aus wurden dann die Koordinaten bezüglich Bregma (anterior +0,1 mm, lateral \pm 3,9 mm) aufgesucht und markiert. Anschließend wurden die markierten Punkte aufgebohrt (Bohrer Nr. 1050, Nouvag, Goldach, Schweiz) und zusätzlich drei Schrauben im Schädeldach verankert, welche als Befestigung für den Zement dienten. Nun wurden zunächst Führungskanüle (*guide canula*, handgemacht, Innendurchmesser: 0,35 mm, Außendurchmesser: 0,65 mm, Länge: 8,0 mm) und Injektionskanüle (*injection canula*, handgemacht, Innendurchmesser: 0,15 mm, Außendurchmesser: 0,3 mm, Länge: 30,0 mm) gemeinsam in das Gehirn eingeführt (siehe Abbildung 6). Ziel der Injektionskanüle war der aBNST (dorsoventrale Koordinate bezüglich Bregma: -6,8 mm). Jedoch wurde die

Injektionskanüle nach Befestigung der Führungskanüle mittels Zahnzement Paladur® (Heraeus Kulzer Laboratory Products Division) wieder entfernt, sodass lediglich die Führungskanüle im Schädel verblieb.



Zusätzlich zu den genannten Koordinaten wurde ein Winkel von 20° benutzt, um eine Penetration der Ventrikel und damit systemische Muskelwirkungen zu vermeiden. Dies war ein Problem, welches in früheren Studien angemerkt wurde²⁶. Nachdem der Zement getrocknet war, wurden noch 1 ml 0,9% NaCl i.p. injiziert, um den Kreislauf etwas zu unterstützen und die Wunde genäht. Während der gesamten Operationsdauer wurde das Tier mittels Heizplatte auf 37,5°C gewärmt (Temperature controller CMA/150 Schmidlin Labor & Service AG, Neuheim, Schweiz).

Schließlich wurde die Isofluranzufuhr gestoppt, das Tier aus dem stereotaktischen Apparat entfernt und noch für wenige Minuten mit reinem Sauerstoff versorgt. Nach Rückkehr der Schutzreflexe und Erlangung des Bewusstseins wurde das Tier zurück zur Gruppe gegeben und noch in regelmäßigen Abständen überwacht. Bevor das operierte Tier in den Verhaltensversuch genommen wurde, hatte es 5 – 8 Tage Zeit zur Erholung.

2.4. Mikroinjektionen

Für die Mikroinjektionen (Experiment 2) wurden zwei Injektionskanülen mit jeweils einer Mikroliterspritze (10 μ l, Hamilton, Schweiz) verbunden. Injektionsgeschwindigkeit und -volumen wurden von einer Spritzenpumpe (CMA 100, Schmidlin Labor + Service AG, Neuheim, Schweiz) kontrolliert. Das zu injizierende Tier wurde in einen kleineren Einzelkäfig gesetzt und so wenig wie möglich mit der Hand fixiert. Die Injektionskanülen wurden durch die Führungskanülen in den aBNST vorgeschoben und 0,3 μ l Muskimol (0,15 nmol, Muskimolhydrobromid, Sigma) oder Saline wurden innerhalb von 30 Sekunden injiziert. Danach wurden die Kanülen noch eine weitere Minute im Gehirn belassen, um die Diffusion des Muskimols in das Gehirn zu verbessern. Schließlich wurden die Injektionskanülen wieder entfernt und das Tier für 10 – 15 Minuten zurück in den Heimatkäfig gesetzt, bevor das Verhaltensexperiment begann.

Lokale Injektionen des GABA_A-Rezeptor-Agonisten Muskimol sind eine weit verbreitete Methode, um Hirnareale zeitweise auszuschalten^{26,39,40}. Sie haben den Vorteil, dass angrenzende Fasertrakte nicht inaktiviert werden, da Axone keine GABA-Rezeptoren besitzen. Diese Injektionen inhibieren suffizient die neuronale Aktivität in den entsprechenden Hirnarealen, was in elektrophysiologischen Untersuchungen gezeigt wurde⁴¹⁻⁴⁴.

2.5. Apparatur und Verhaltensparadigma

Es wurde der „*Modified Open-Field Test*“ benutzt, welcher zur Beobachtung defensiven Verhaltens gegenüber Alarmpheromon entwickelt wurde¹. Alle Verhaltensexperimente wurden in einer rechteckigen Arena (70 x 47 x 50 cm) durchgeführt. In einer der vier Ecken befand sich ein Glasschälchen (Durchmesser 4 cm) für die Geruchsproben und in der schräg gegenüberliegenden Ecke eine *hiding box* (24,5 x 17,5 x 12,5 cm) als Versteck für die Tiere mit einem Eingang in Richtung des Glasschälchens (Durchmesser 10 cm; siehe Abbildung 7).

Die Experimente wurden in einem schwach beleuchteten und ruhigen Raum durchgeführt. Das Zentrum der Arena war mit durchschnittlich 68 lx beleuchtet und es herrschte ein Hintergrundgeräuschpegel von durchschnittlich 47 dB SPL.

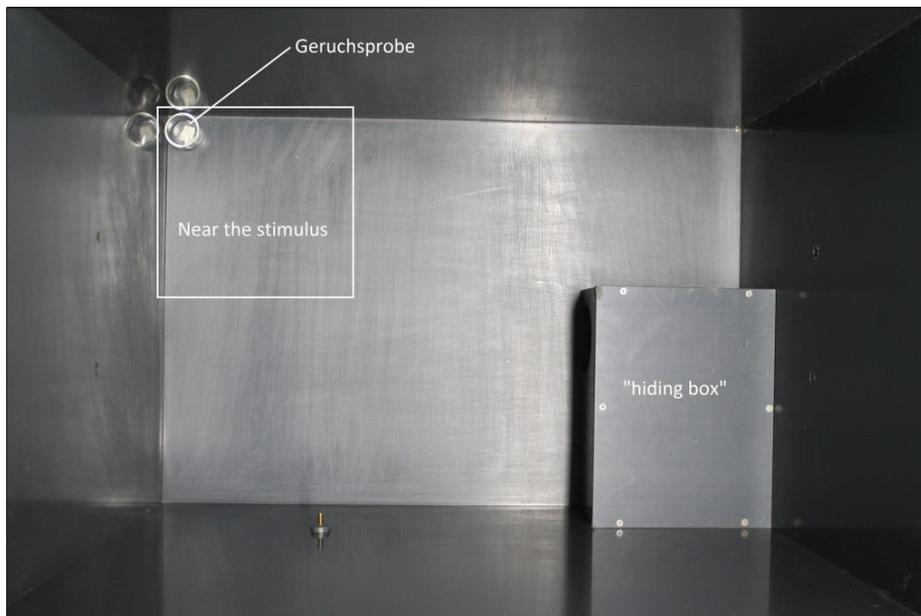


Abb. 7: Experimentelles Setup

Versteck (*hiding box*) und in der schräg gegenüberliegenden Ecke ein Glasschälchen mit Geruchsprobe und zusätzlich einem eingegrenztem Nahbereich um den Geruch herum (*near the stimulus*) für die Auswertung.

An den ersten drei Tagen des Experiments wurden die Ratten täglich für 10 Minuten an die Versuchsarena gewöhnt. Diese enthielt zu dieser Zeit weder *hiding box* noch Geruch. Am Vortag des Verhaltensversuchs wurde die *hiding box* für 24 Stunden in den Heimatkäfig der Tiere gestellt, sodass sich die Ratten daran gewöhnen konnten und sie als sicheren Ort kennenlernten. Am Tag des Verhaltensversuchs wurde zunächst die Versuchsarena mit der Geruchsschale und einem Milliliter der Geruchsprobe darin präpariert. Die Tiere bekamen dann fünf Minuten Zeit, diese zu erkunden (= Gewöhnungsphase), bevor die *hiding box* hinzugesetzt wurde und das eigentliche Verhaltensexperiment begann.

Nach dem Test wurden untersuchte Tiere in einen separaten Käfig gesetzt. Anschließend wurden die abgegebenen Kotkugeln gezählt, die Arena mit warmem Wasser geputzt und etwa für fünf Minuten mit frischer Luft gelüftet.

Im ersten Experiment wurden 13 Tiere getestet. Dabei wurde jedes Tier jeweils Wasser und Alarmpheromon an zwei aufeinanderfolgenden Tagen in einer pseudorandomisierten Reihenfolge ausgesetzt.

Im zweiten Experiment wurden dann Muskimol ($n = 9$) beziehungsweise Saline (Kontrollgruppe; $n = 10$) in den aBNST injiziert. Die injizierten Tiere wurden dann den vier verschiedenen Gerüchen (Alarmpheromon, Fuchsurin, Nackenduft, weiblicher Urin) an vier aufeinanderfolgenden Tagen in einer pseudorandomisierten Reihenfolge ausgesetzt (lateinisches Quadrat). Die Injektion wurde vor jedem dieser Tests, wie beschrieben, durchgeführt.

Das Verhalten der Tiere wurde mittels Kamera (Panasonic WV-CL930, Panasonic, Kadoma, Präfektur Osaka, Japan), welche 30 cm über der Arena befestigt war, aufgenommen. Zur Beobachtung, Aufnahme und späteren Analyse wurde ein Videotracking-System (EthoVision XL, Noldus Information Technology, Version 8, Wageningen, NL) benutzt. *Head out* Verhalten, Putzverhalten, *stretched attend* Verhalten sowie die Kotkugelanzahl wurde von zwei erfahrenen, aber bezüglich der getesteten Gerüche und Injektionen blinden Beobachtern manuell ausgewertet (Übereinstimmung der Beobachter: $r^2 = 0,99$; $p < 0,0001$).

Für die Auswertung des zu beobachtenden Verhaltens wurden folgende Definitionen verwendet^{7,8}: *Head out Verhalten* ist ein Angstverhalten, bei dem sich die Ratte im Versteck befindet und ihren Kopf oder Kopf und Schultern aus dem Eingangsloch streckt, wobei die Hinterfüße im Versteck bleiben müssen (siehe Abbildung 8). *Stretched attend* Verhalten ist eine Annäherung an einen Stimulus mit einem gestreckten, an den Boden gepressten Körper, wobei der Kopf Richtung Stimulus ausgerichtet ist. *Grooming* ist definiert als Gesicht und Körper putzen, lecken und kratzen. Diese Verhalten wurden nur außerhalb des Verstecks registriert.

Outside ist definiert als Zeit, in der die Ratte komplett außerhalb des Verstecks ist. *Conceal* hingegen ist die Zeit im Versteck. Des Weiteren wurde noch eine Zone von 400 cm² in der Ecke des Glasschälchens mit der Geruchsprobe als Zone *near the stimulus* definiert (siehe Abbildung 7 und 9). Ein weiterer analysierter Parameter war die Zeit im Zentrum der Arena, welche als prozentualer Anteil an der Gesamtzeit *Outside* angegeben wurde (prozentualer Anteil im Zentrum der Arena). Hierfür wurde das Zentrum als Bereich mit 10 cm Abstand von jeder Wand definiert (auch von der

hiding box, siehe Abbildung 10). So ergab sich ein Areal von ca. 1000 cm², was etwas weniger als einem Drittel der Gesamtfläche der Arena (= 3500 cm²) entspricht. Dieser Bereich ist hinsichtlich des Defensivverhaltens besonders beachtenswert, da die Ratten hier am wenigsten geschützt sind.

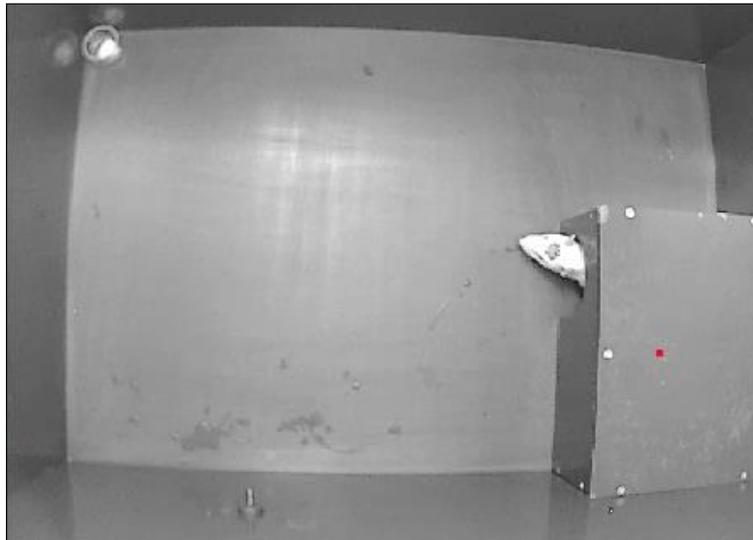


Abb. 8 Head out Verhalten

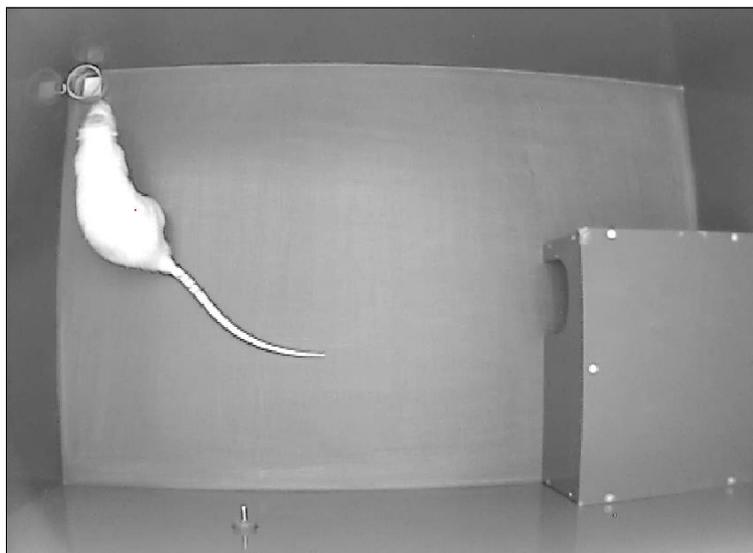


Abb. 9 Near the stimulus

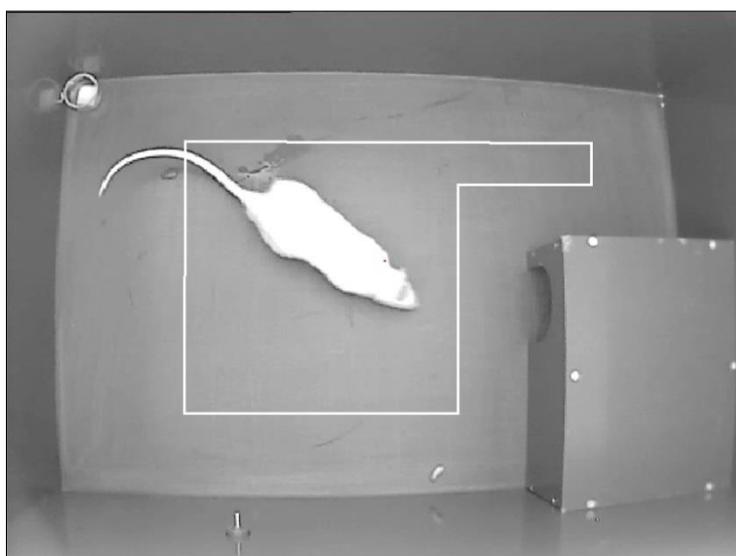


Abb. 10 Aufenthalt im Zentrum

2.6. Histologie

Nach den Verhaltensexperimenten mussten die Gehirne auf richtige Injektionsstellen überprüft werden. Hierfür wurden die Tiere mittels Kohlenstoffdioxid getötet und danach mit Hilfe einer Guillotine dekapiert. Anschließend wurden die Gehirne aus dem knöchernen Schädel herauspräpariert und in einem Gemisch aus Formaldehyd (4%) und Sucrose (10%) fixiert. Alle 24 Stunden wurde die Konzentration der Sucrose um zehn Prozent gesteigert (bis maximal 30%). Nachdem die Gehirne auf den Boden des Gefäßes gesunken und damit vollständig fixiert waren, wurden mittels eines Kryostats (Leica CM 3050, -22°C) histologische Schnitte der Zielregion mit einer Schnittdicke von 60 µm angefertigt. Zum leichteren Auffinden des Zielgebiets wurde vor dem Schneiden, kurz nach dem Töten des Tieres, Methylblau über die Injektionskanülen injiziert. Zur Anfertigung der Schnitte wurden die Gehirne auf Trägern mittels Gewebekleber (Leica tissue freezing medium) befestigt und mit Hilfe von Trockeneis gefroren. Die Schnitte wurden auf gelantinierten Objektträgern aufgenommen und mehrere Tage getrocknet, bevor eine Nissl-Färbung durchgeführt wurde (1% Cresylviolett; Färbeprotokoll siehe Anlage 1).

Dabei wurden die Schnitte zunächst mittels absteigender Alkoholreihe gewässert und schließlich für etwa fünf Minuten mit Cresylviolett gefärbt. Anschließend wurde mittels ansteigender Alkoholreihe entwässert (und evtl. bei übermäßiger Färbung entfärbt), zum Schluss mit Rotihistol fixiert und eingedeckelt.

Nach einer weiteren Trocknungszeit wurden die Schnitte dann durch ein Mikroskop (Leica MZ 125) analysiert und entschieden, ob die Zielregion (aBNST) getroffen wurde. Außerdem wurden eventuelle Läsionen bewertet. Die Injektionsstellen wurden in Frontalschnittdiagrammen des „*The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*“⁴⁵ eingetragen.

2.7. Beschreibende und analytische Statistik

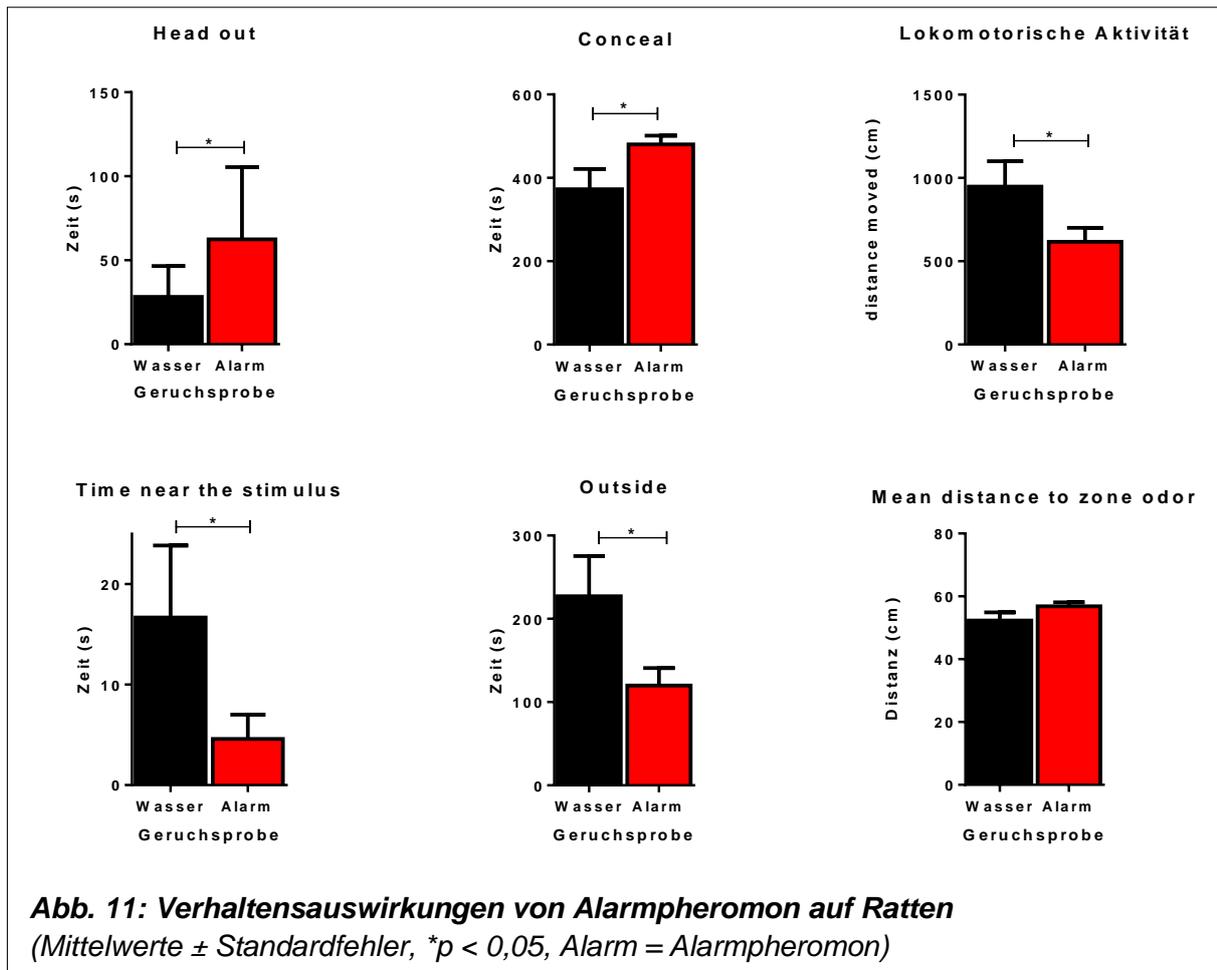
Alle Daten werden dargestellt als Mittelwerte \pm Standardfehler. Zunächst wurden die Daten auf Gaußsche Normalverteilung überprüft (D'Agostino & Pearson omnibus Test). Nicht normalverteilte Werte wurden entweder mittels nichtparametrischer Statistik analysiert (Wilcoxon matched-pairs signed rank test, Mann-Whitney Test) oder es wurde, sofern möglich, eine log-Transformation angewendet, um die Werte zu normieren und so parametrisch analysieren zu können. Normalverteilte Werte wurden mittels t-Tests oder ANOVAs (Varianzanalysen) ausgewertet. In Fällen, in denen wiederholte Messungen durchgeführt wurden, wurde eine ANOVA mit Messwiederholungen benutzt. Das Signifikanzlevel wurde für alle Tests auf $p < 0,05$ gesetzt.

3. Resultate

3.1. Experiment 1: Etablierung des Verhaltensparadigmas bei männlichen Sprague-Dawley Ratten

Ziel war es, das von Kiyokawa und Kollegen mit Wistar-Ratten entwickelte Verhaltensparadigma¹ in unserem Labor mit Sprague-Dawley Ratten zu etablieren. Ratten, welche Alarmpheromon ausgesetzt waren, zeigten verschiedene Verhaltensveränderungen (siehe Abbildung 11). Die Tiere zögerten nicht, die *hiding box* zu betreten und verschwanden nahezu immer in ihr, wenn der Experimentator das Tier nach abgeschlossenem Verhaltensversuch aus der Arena nehmen wollte. Dies ist ein Hinweis dafür, dass die *hiding box* als Versteck und sicherer Ort angenommen wurde und eine Voraussetzung für das Auftreten von *Head out* Verhalten.

Das Vorhandensein von Alarmpheromon in der Arena steigerte, im Vergleich zur Kontrollbedingung Wasser, die Zeit des *Head out* Verhaltens (gepaarter t-Test: $t_{(12)} = 2,53$, $p = 0,03$). Außerdem verbrachten die Tiere eine statistisch signifikant längere Zeit in der *hiding box* (*Conceal*: $t_{(12)} = 2,44$, $p = 0,03$). Dementsprechend verringerte sich die Zeit im Bereich Outside signifikant ($t_{(12)} = 2,44$, $p = 0,03$). Des Weiteren wurde der Bereich des Geruchsstimulus gemieden, was sich in einer statistisch signifikant verringerten Zeit *near the stimulus* äußerte ($W_{12} = -51,00$, $p = 0,04$). Allerdings war insgesamt der durchschnittliche Abstand des Tieres von der Geruchssprobe nicht signifikant verändert ($t = 1,52$, $p = 0,15$). Insgesamt zeigte sich eine verringerte lokomotorische Aktivität, was durch die signifikant verringerte zurückgelegte Strecke (*distance moved*) erhoben wurde ($t_{(12)} = 2,29$, $p = 0,04$). *Stretched attend* Verhalten wurde lediglich in drei kurzen Phasen, *grooming* nur bei zwei Tieren in sehr kurzen Phasen beobachtet, weswegen diese beiden Verhalten von der statistischen Auswertung ausgeschlossen wurden.

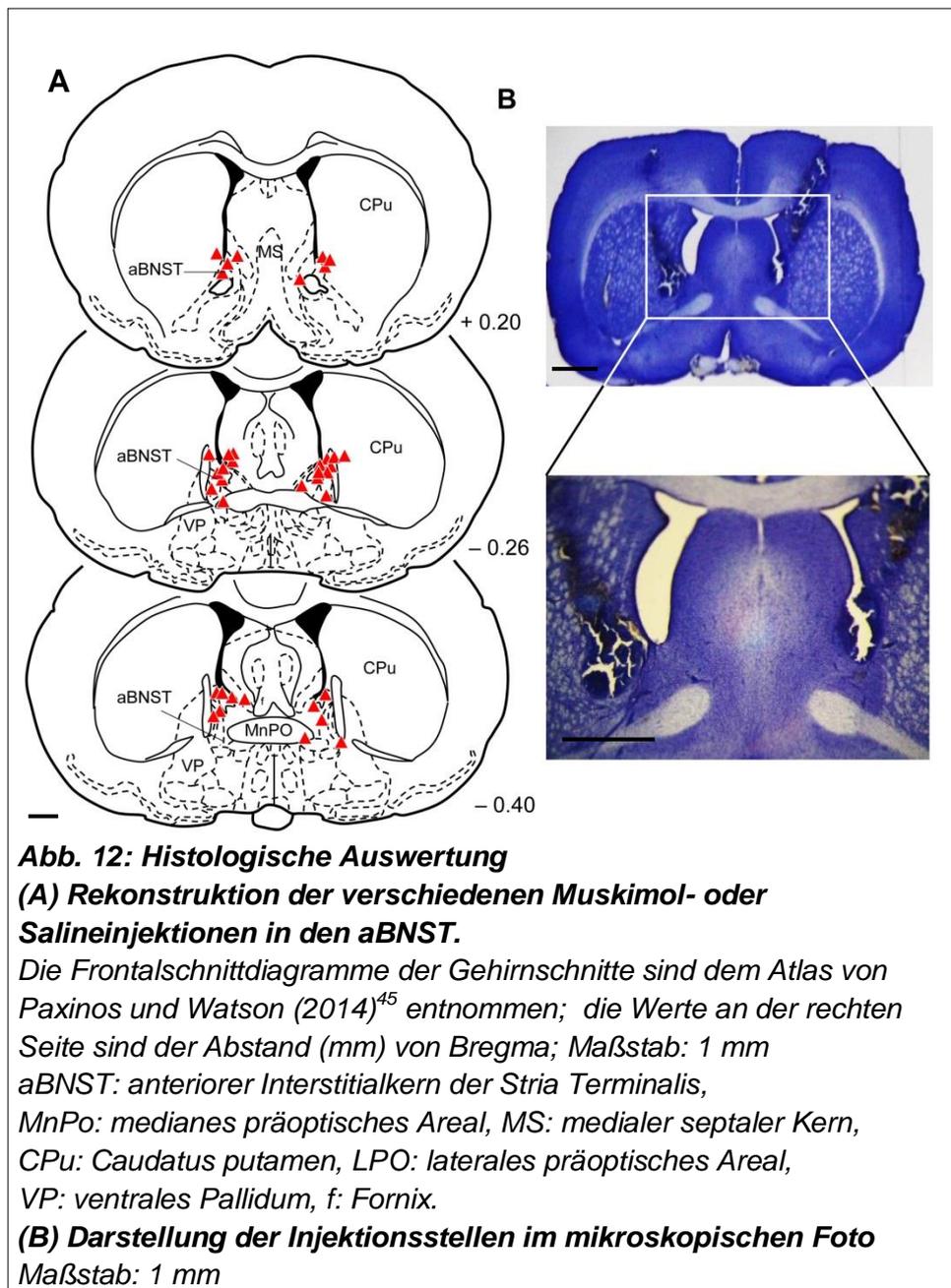


3.2. Experiment 2: Inaktivierung des aBNST durch Muskimol-Injektionen

Im zweiten Experiment wurde dann entweder Saline oder Muskimol in den aBNST injiziert, um so die Rolle des aBNST bei Verhaltensveränderungen, ausgelöst durch Alarmpheromon, zu untersuchen. Zusätzlich wurde das Geruchsspektrum um weitere Gerüche erweitert. So wurde Wasser durch den neutralen Nackengeruch ersetzt und weiblicher Urin als weiterer neutraler beziehungsweise attraktiver Geruch hinzugenommen. Neben Alarmpheromon diente Fuchsurin als weiterer aversiver Geruch.

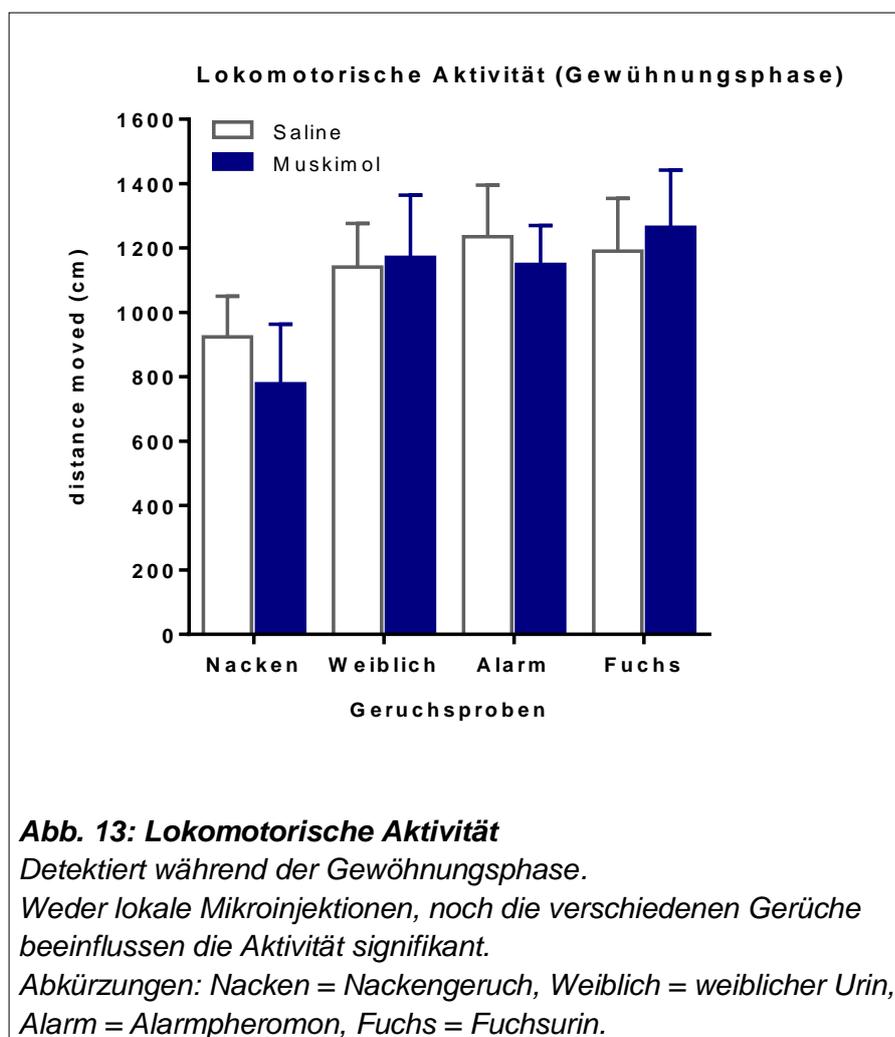
3.2.1. Histologische Auswertung

Insgesamt wurden 53 Tiere für diesen Versuch verwendet. Die Auswertung der histologischen Schnitte ergab, dass von diesen 53 Tieren 23 wegen falscher Injektionsstellen auf mindestens einer Gehirnseite (in den lateralen Ventrikel, das laterale präoptische Areal, den parastriale Nucleus, den intermediär lateral septalen Nucleus, den medialen präoptischen Nucleus oder dem ventrolateralen präoptischen Nucleus) ausgeschlossen werden mussten. Das Verhalten der Tiere mit bilateralen Fehlinjektionen wurde in einer separaten Gruppe als Kontrollbedingung analysiert. Allerdings konnten hier lediglich fünf Tiere in die Analyse eingeschlossen werden, da die meisten Tiere entweder in den Ventrikel oder unilateral fehlinjiziert wurden. Weitere fünf Tiere wurden wegen starker Läsionen entlang der Injektionsspur oder am Injektionsort ausgeschlossen. Zudem wurden sechs weitere Ratten wegen pathologischen Verhaltens ausgeschlossen (diese Tiere drehten sich während des gesamten Verhaltensversuchs im Kreis). Somit wurden insgesamt 34 Tiere von der statistischen Analyse ausgeschlossen, sodass 19 Tiere bilateral in den aBNST injiziert und ausgewertet wurden. Der aBNST besteht aus anteriorem, dorsalem und lateralem Anteilen des BNST. Die Injektionsstellen werden in Abbildung 12 gezeigt.



3.2.2. Lokomotorische Aktivität

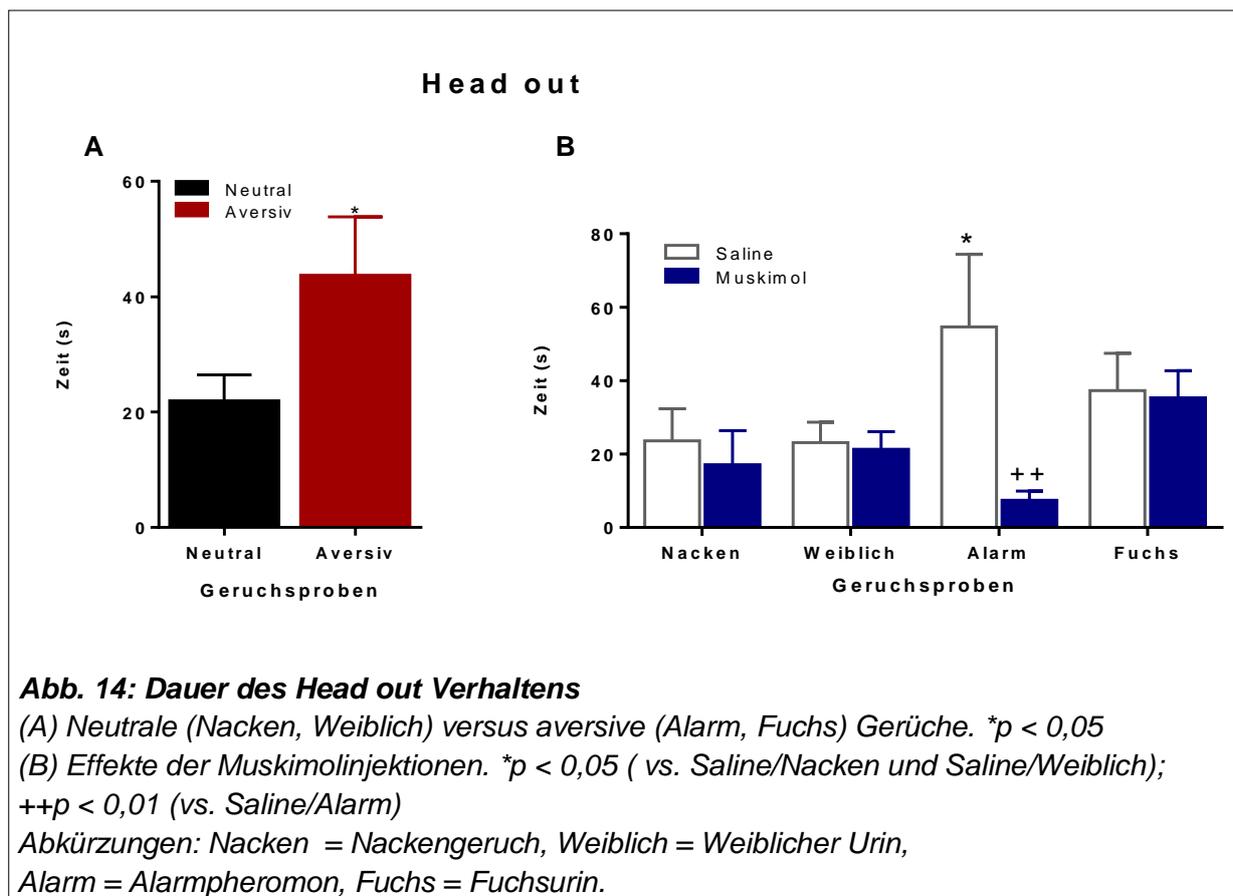
Als erstes wurde die zurückgelegte Strecke (*distance moved*) als Indikator für die lokomotorische Aktivität in den fünf Minuten der Gewöhnungsphase, also der Zeit mit Geruch, aber ohne *hiding box*, analysiert. Damit sollten potentielle Effekte der Injektionen in den aBNST auf die lokomotorische Aktivität ausgeschlossen werden, welche nachfolgendes Defensivverhalten beeinflussen könnte (siehe Abbildung 13). Die statistische Analyse der lokomotorischen Aktivität zeigte jedoch, dass eindeutig keine Einschränkung der lokomotorischen Aktivität zu verzeichnen war (ANOVA: $F_{(1,68)} = 0,08$, $p = 0,78$). Die lokomotorische Aktivität wurde zudem in dieser Phase auch nicht statistisch signifikant von den verschiedenen Gerüchen beeinflusst ($F_{(3,68)} = 2,27$, $p = 0,09$). Es gab keine Interaktion zwischen den Faktoren Behandlung und Geruch ($F_{(3,68)} = 0,19$, $p = 0,89$).



3.2.3. *Head out* Verhalten

Während der zehnminütigen Testphase zeigte *Head out* Verhalten die stärksten Veränderungen und als einziger Faktor signifikante Verhaltensveränderungen gegenüber den verschiedenen Gerüchen [unter Kontrollbedingungen mit Saline-Injektionen; ANOVA: Faktor Geruch: $F(3,68) = 2,27$, $p = 0,09$]. In einem ersten Vergleich innerhalb der Kontrollgruppe wurden die Gerüche in aversive und neutrale Gerüche zusammengefasst und gegenübergestellt. Es zeigte sich eine statistisch signifikante Erhöhung der *Head out* Zeit gegenüber den aversiven Gerüchen Alarmpheromon und Fuchsurin, im Vergleich zu den neutralen Gerüchen Nackengeruch und weiblicher Urin (Mann-Whitney Test: $p = 0,04$, siehe Abbildung 14 A). Im weiteren Vergleich zeigte sich dann, dass vor allem Alarmpheromon diesen Effekt hervorrief. Ratten, welche Alarmpheromon ausgesetzt waren, zeigten eine statistisch signifikante Erhöhung der *Head out* Zeit, sowohl im Vergleich zur Exposition gegenüber Nackengeruch ($t = 3,23$, $p = 0,01$) als auch im Vergleich zur Exposition gegenüber weiblichem Urin ($t = 2,54$, $p = 0,03$; siehe Abbildung 14 B).

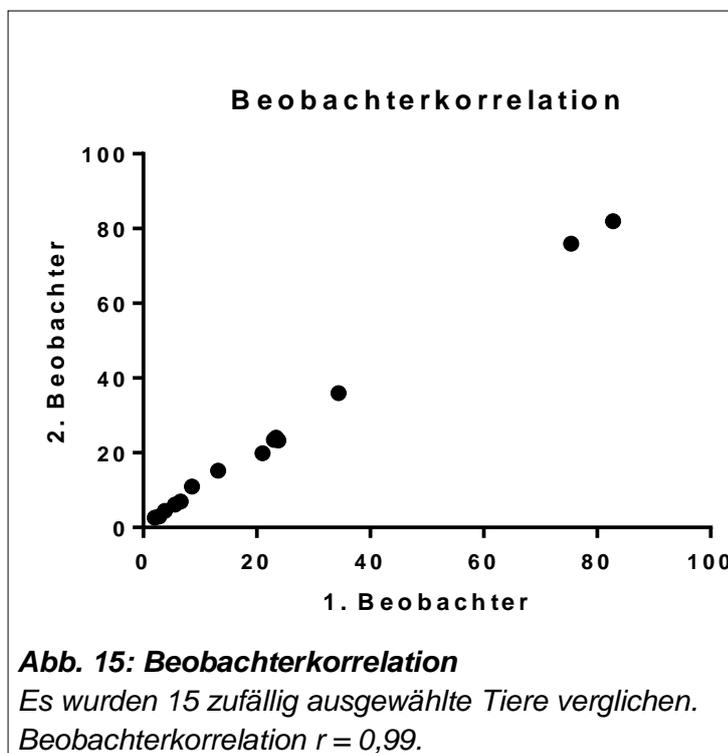
Injektionen von Muskimol in den aBNST reduzierten das *Head out* Verhalten gegenüber Alarmpheromon (siehe Abbildung 14 B). Die dazu durchgeführte ANOVA ermittelte einen statistisch signifikanten Haupteffekt des Faktors Geruch ($F_{(3,65)} = 2,87$, $p = 0,04$) sowie eine signifikante Interaktion zwischen beiden Faktoren Geruch und Behandlung ($F_{(3,65)} = 3,22$, $p = 0,03$), wohingegen nur eine Tendenz des Faktors Behandlung zu sehen war ($F_{(1,65)} = 3,35$, $p = 0,07$). Bemerkenswerterweise konnte lediglich *Head out* Verhalten gegenüber Alarmpheromonexposition durch die aBNST-Injektionen verringert werden (post-hoc Dunnett Test: $t = 3,41$, $p = 0,005$), wohingegen dieses Verhalten gegenüber den anderen Gerüchen nicht beeinflusst wurde (t -Werte $< 1,04$, p -Werte $> 0,76$).



Erwähnenswert ist zudem, dass bilaterale Fehlinjektionen, bei denen der aBNST nicht temporär deaktiviert wurde, keinerlei statistisch signifikante Auswirkungen auf Alarmpheromon-induziertes *Head out* Verhalten hatten (Saline/Nacken: $17,0 \pm 3,1s$; Saline/Alarmpheromon: $32,9 \pm 15,3s$; Muskimol/Nacken: $17,7 \pm 3,7s$; Muskimol/Alarmpheromon: $28,3 \pm 14,3s$). Allerdings muss man sagen, dass nur eine sehr kleine Anzahl an Tieren in dieser Versuchsgruppe war ($n = 5$), was keine verlässliche statistische Auswertung zulässt. Hinzu kommt dann noch, dass die Verhaltensausprägung der einzelnen Tiere eine sehr große Streubreite zeigte.

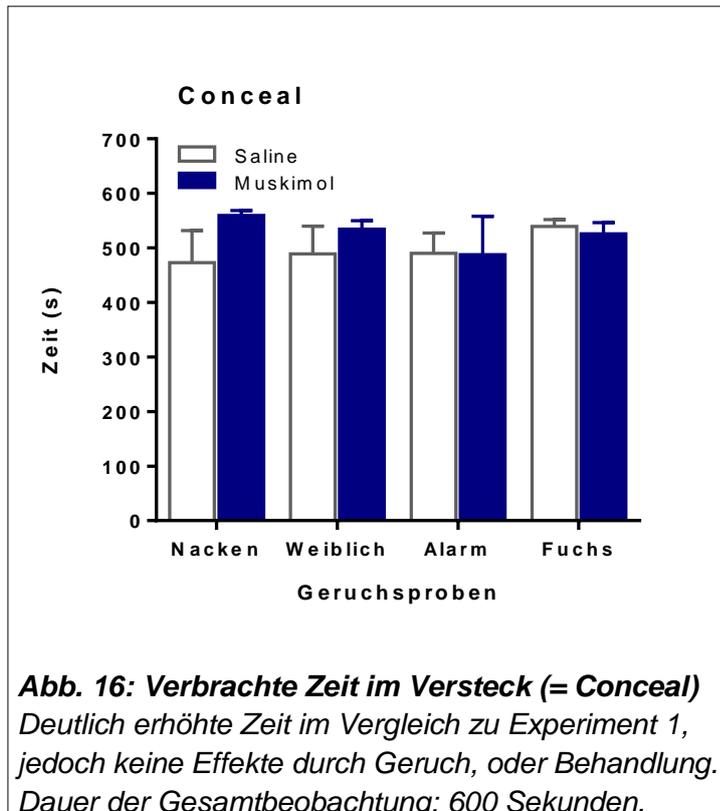
3.2.4. Beobachterübereinstimmung

Anhand von 15 zufällig ausgewählten Tieren wurde die Übereinstimmung der beiden, bezüglich der Experimentierbedingungen, blinden Beobachter in Bezug auf das Head out Verhalten überprüft. Hier zeigte sich eine hoch signifikante Übereinstimmung (Spearman Korrelationsfaktor $r = 0,99$; $p < 0,0001$; siehe Abbildung 15).



3.2.5. Conceal – Verstecken in der Hütte

Auffällig war, dass im zweiten Experiment insgesamt ein Großteil der Zeit im Versteck (*Conceal*) verbracht wurde (siehe Abbildung 16). Dieser Anteil war insgesamt, im Vergleich zum ersten Experiment, deutlich länger. Jedoch gab es bezüglich der Aufenthaltsdauer im zweiten Experiment weder Geruchs- ($F_{(3,68)} = 0,35$, $p = 0,79$), noch Behandlungseffekte ($F_{(1,68)} = 0,91$, $p = 0,34$). Des Weiteren konnte durch die ANOVA auch keine Interaktion zwischen beiden Faktoren nachgewiesen werden ($F_{(3,68)} = 0,56$, $p = 0,64$).



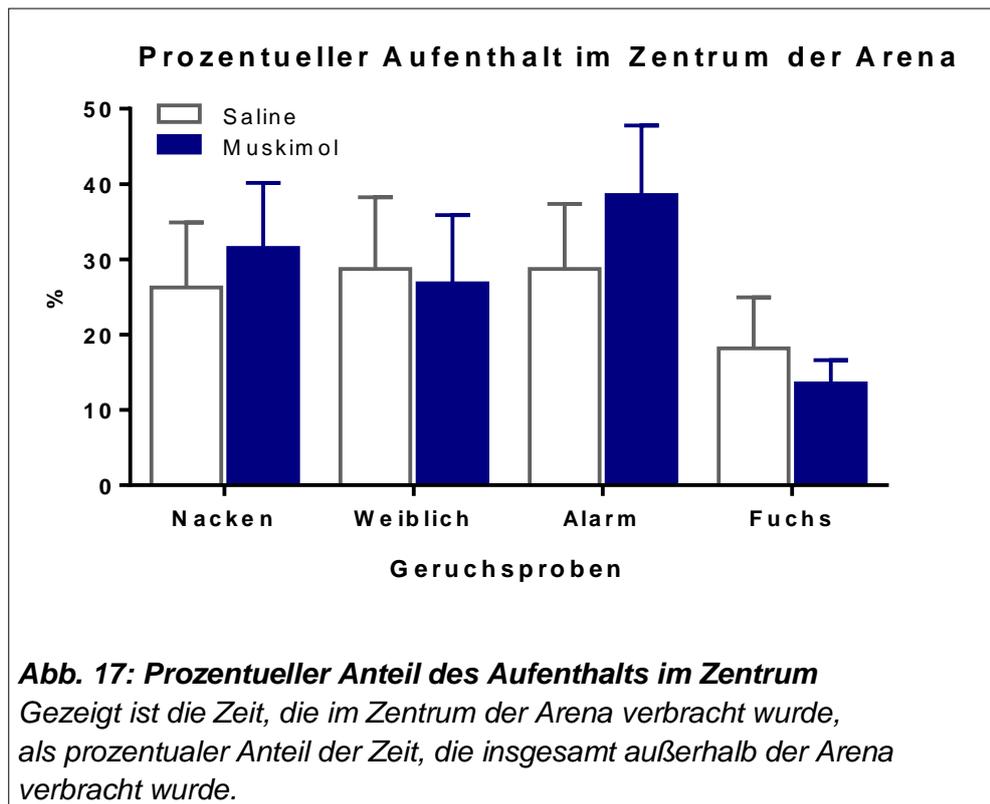
Die Analyse weiterer Verhaltensweisen, die in Experiment 1 sowie in der Studie von Kiyokawa und Kollegen¹ gegenüber Alarmpheromonexposition signifikant verändert waren, ergab in diesem Experiment keine statistisch signifikanten Veränderungen (Tabelle 2, Faktor Geruch: $F_s < 0,61$; $p_s > 0,61$).

Verhalten	Behandlung	Geruch				ANOVA-Ergebnis		
		Nacken	Weiblicher Urin	Alarmpheromon	Fuchsurin	Geruch	Behandlung	Interaktion
Conceal (s)	Saline	463 ± 64	470 ± 61	484 ± 41	537 ± 14	p = 0,79	p = 0,23	p = 0,59
	Muskimol	559 ± 9	534 ± 16	488 ± 70	526 ± 20			
Lokomotorische Aktivität (cm)	Saline	423 ± 164	277 ± 77	424 ± 159	241 ± 41	p = 0,95	p = 0,39	p = 0,37
	Muskimol	172 ± 31	343 ± 91	263 ± 56	314 ± 141			
Time near stimulus (s)	Saline	2,7 ± 1,8	2,4 ± 1,9	3,4 ± 2,3	0,9 ± 0,4	p = 0,69	p = 0,08	p = 0,91
	Muskimol	0,2 ± 0,2	1,2 ± 0,8	1,1 ± 0,6	0,2 ± 0,2			
Outside (s)	Saline	100 ± 60	98 ± 64	49 ± 21	19 ± 4	p = 0,61	p = 0,21	p = 0,57
	Muskimol	13 ± 7	42 ± 23	56 ± 32	23 ± 11			
Kotkugelanzahl	Saline	0,8 ± 0,5	1,6 ± 0,6	1,8 ± 0,4	0,7 ± 0,3	p = 0,63	p = 0,41	p = 0,51
	Muskimol	0,8 ± 0,4	1,1 ± 0,8	0,8 ± 0,3	1,0 ± 0,5			

Tab. 1: Beobachtete Verhalten im Modified Open-Field Test

3.2.6. Vermeidung des Zentrums im open field

Ein weiteres Verhalten, das untersucht wurde, war die Zeit im Zentrum der Arena als prozentueller Anteil der Zeit, die insgesamt außerhalb der *hiding box* verbracht wurde. Hier scheint es, als käme es zu einer leichten, nicht signifikanten Vermeidung des Zentrums bei Exposition gegenüber Fuchsurin (siehe Abbildung 17). Dieser Effekt kann durch Muskimolinjektionen nicht geblockt werden. Eine durchgeführte ANOVA zeigte keine Signifikanzen bezüglich Haupteffekt des Faktors Behandlung ($F_{(1,68)} = 0,12$; $p = 0,73$). Allerdings konnte auch kein statistisch signifikanter Hauptgeruchseffekt nachgewiesen werden ($F_{(3,68)} = 1,46$; $p = 0,23$). Des Weiteren gab es keine Interaktion zwischen beiden Faktoren ($F_{(3,68)} = 0,29$; $p = 0,83$).



3.2.7. Autonome Furchtreaktion der Tiere

Zur Untersuchung des Stresslevels wurde schließlich noch die Kotkugelanzahl, ein Indikator für eine autonome Reaktion¹, analysiert (siehe Abbildung 18). Hier zeigte die durchgeführte ANOVA keine statistische Signifikanz bezüglich eines Hauptgeruchseffekts ($F_{(3,68)} = 0,4$; $p = 0,76$) und eines Haupteffekts der Behandlung ($F_{(1,68)} = 0,27$; $p = 0,60$). Auch eine Interaktion zwischen beiden Faktoren konnte nicht nachgewiesen werden ($F_{(3,68)} = 0,5$; $p = 0,68$). Somit lässt sich sagen, dass die verschiedenen Gerüche keinerlei Auswirkungen auf die Defäkation haben und auch eine Inaktivierung des aBNST diese nicht beeinflusst.

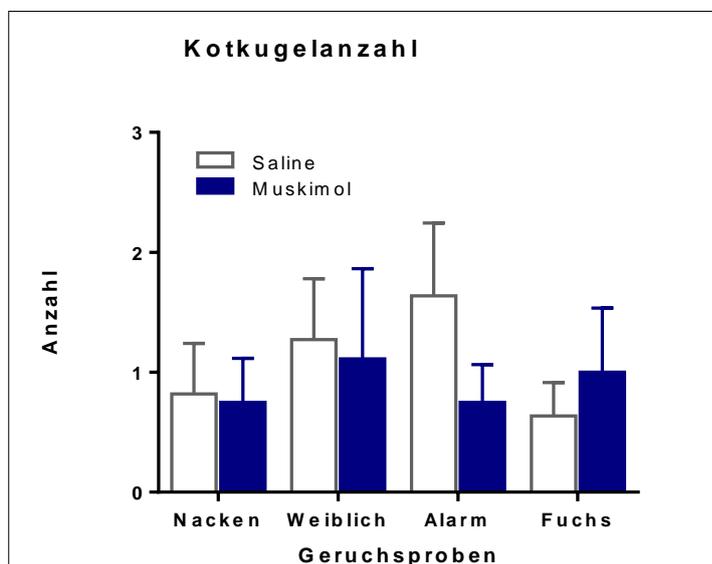


Abb. 18: Anzahl der Kotkugeln

Die Kotkugelanzahl gilt als ein Indikator einer autonomen Reaktion.

Es konnten keine Unterschiede sowohl bezüglich der unterschiedlichen Gerüche als auch der Behandlung nachgewiesen werden.

4. Diskussion

In dieser Studie sollte die Rolle des aBNST bei Alarmpheromon-induziertem Verhalten untersucht werden. Dafür wurde zunächst ein Verhaltensparadigma etabliert, welches im Labor von Kiyokawa und Kollegen entwickelt wurde¹. In einem zweiten Experiment konnte gezeigt werden, dass lokale Mikroinjektionen von Muskimol in den aBNST eine spezifische Blockade von *Head out* Verhalten bei Ratten, die Alarmpheromon ausgesetzt wurden, bewirkt.

4.1. Etablierung des Verhaltensparadigmas

Kiyokawa und Kollegen entwickelten eine Methode, um das Alarmpheromon von Ratten aus der perianalen Region zu gewinnen³³. Verschiedene Verhaltensprotokolle zeigten, dass es bei Ratten, die diesem Alarmpheromon ausgesetzt waren, zu diversen Verhaltensveränderungen kommt. So zeigten Ratten in diesen Protokollen eine stressbedingte Erhöhung der Körpertemperatur (SIH)^{20,33}, gesteigertes Defensiv- und Risikoabwägungsverhalten sowie weniger Erkundungs- und Putzverhalten¹. Außerdem konnte eine Erhöhung der Schreckreaktion²¹ beobachtet werden. In der vorliegenden Studie wurde in Anlehnung an Kiyokawa und Kollegen (2006) ein Verhaltensprotokoll mit einer Arena und einer *hiding box* verwendet¹, allerdings wurden Sprague-Dawley Ratten anstelle von Wistar-Ratten benutzt und damit das Verhaltensparadigma erstmals in einem anderen Stamm etabliert.

Eine weitere Abweichung vom publizierten Protokoll war, dass anstelle von 1,5 ml Geruch, verteilt auf zwei Filterpapierstreifen, 1 ml Geruch in einem Glasschälchen benutzt wurde. Diese Veränderung wurde durchgeführt, da es in Vorversuchen dazu kam, dass Tiere die Filterpapierstreifen von der Wand rissen und damit spielten. Außerdem veränderte sich subjektiv der Geruch der Probe, wenn sie auf das Filterpapier aufgetragen wurde. Um diese mögliche Geruchsverfälschung zu umgehen, wurde die Variante mit dem Glasschälchen verwendet.

Nichtsdestotrotz konnten mit unserem leicht modifiziertem Verhaltensprotokoll Effekte beobachtet werden, wie sie auch schon vorher beschrieben wurden¹:

So zeigte sich sowohl ein vermehrtes *Head out* Verhalten, als auch eine längere Zeit in der *hiding box* (*Conceal*) bei Ratten, die Alarmpheromon ausgesetzt waren. Sowohl *Head out* Verhalten als auch *Conceal* sind bekannte defensive Verhaltensweisen, die verängstigte Ratten zeigen¹. Außerdem nahmen auch die Zeit in der Arena sowie die zurückgelegte Strecke ab. Zudem zeigte sich eine signifikant verringerte Aufenthaltszeit in der Nähe des Stimulus (siehe Abbildung 11), wobei Kiyokawa und Kollegen (2006) hier lediglich eine Tendenz zeigen konnten. Eine mögliche Erklärung hierfür wäre, dass Sprague-Dawley Ratten sensitiver auf das Alarmpheromon reagieren. Es ist bekannt, dass sich die Ausprägung von Furcht- und Angst-Verhalten zwischen den unterschiedlichen Rattenstämmen unterscheidet⁴⁶. Unterstützt wird diese Hypothese durch publizierte Erkenntnisse aus dem *forced swimming* Test. Wenn Ratten gezwungen werden, im Wasser zu schwimmen, hinterlassen sie eine Alarmsubstanz im Wasser, welche die Immobilität nachfolgender Ratten vermindert⁴⁷. Dieser Effekt ist bei Sprague-Dawley-Ratten größer als bei Wistar-Ratten. Daher ist es möglich, dass diese unterschiedliche Sensitivität Unterschiede im Vermeidungsverhalten (speziell *time near stimulus*) im *Modified Open-Field* Test bewirken.

Es scheint jedoch offensichtlich keine grundsätzlichen Unterschiede zwischen männlichen Wistar- und Sprague-Dawley-Ratten bezüglich Alarmpheromon-induziertem defensiven Verhalten zu geben, auch wenn sich beide bezüglich der Sensitivität der Reaktion zu unterscheiden scheinen.

Alles in allem konnte also ein Verhaltensparadigma etabliert werden, mit dessen Hilfe Alarmpheromon-induziertes defensives Verhalten von Sprague-Dawley-Ratten untersucht werden kann.

4.2. Der neuronale Schaltkreis der Alarmpheromonverarbeitung – aBNST als Schaltrelais

Es ist bekannt, dass Pheromone hauptsächlich über das Vomeronasalorgan und das akzessorische olfaktorische System verarbeitet werden^{3,5-8,12,48,49}. So zeigen beispielsweise Tiere, bei denen das Vomeronasalorgan entfernt wurde, keine Verhal-

tenseffekte während der Konfrontation mit Alarmpheromon^{7,29}. In c-Fos Studien wurde nachgewiesen, dass der aBNST, welcher Input aus dem akzessorischen olfaktorischen System bekommt^{50,51}, eine der Gehirnstrukturen darstellt, die aktiv ist, wenn das Tier Alarmpheromon ausgesetzt wurde²⁰. Der BNST wiederum projiziert zum einen in verschiedene Mittelhirn- und Hirnstammregionen, welche bekannt dafür sind, dass sie defensives Verhalten vermitteln und ist zum anderen selbst eine Struktur, die in der Verarbeitung von Angst und Furcht eine wichtige Rolle spielt^{4,26,52-56}. Dieses Wissen führte zur Arbeitshypothese der vorliegenden Studie, dass der aBNST eine entscheidende Rolle in der Auslösung von Alarmpheromon-induziertem defensiven Verhalten spielt. Es wurde der aBNST als Subregion des BNST gewählt, da er in c-Fos Studien aktiviert war, wenn das Tier Alarmpheromon ausgesetzt wurde²⁰. Zwar ist bekannt, dass das olfaktorische System, speziell der akzessorische olfaktorische Bulbus (AOB), in den posterioren BNST projiziert⁵⁷, jedoch gibt es Verbindungen innerhalb des BNST zwischen den posterioren und anterioren Unterkernen des BNST⁵⁸. Zusätzlich wäre auch die mediale Amygdala (MeA) ein weiterer Kandidat für die Verbindung zwischen AOB und aBNST. Es ist bekannt, dass die MeA direkten Input vom AOB bekommt⁵⁷ und selbst direkt in den BNST projiziert⁵⁹. Damit gibt es einen anatomischen Beweis, dass auch die MeA ein Verbindungskandidat ist (vgl. Abbildung 19).

4.3. Temporäre Blockade des aBNST

Eine Möglichkeit, bestimmte Gehirnstrukturen zeitweise zu inaktivieren, ist die lokale Injektion des GABA_A-Agonisten Muskimol^{26,39,40}. Dabei werden, im Vergleich zu elektrolytischen Läsionen, keine Fasertrakte zerstört, was ein klarer Vorteil des Muskimols gegenüber der elektrolytischen Methode ist. Der BNST besteht hauptsächlich aus GABAergen Neuronen⁶⁰ und hat vor allem eine hohe Expression von GABA_A-Rezeptoren^{52,55,56,61-63}. Lediglich eine kleine Minderheit sind glutamaterge⁶² oder noradrenerge⁵² Neuronen und nur an den Grenzen einzelner Unterkerne des BNST wurden cholinerge Neuronen gefunden⁵⁵. Dabei ist zu beachten, dass gerade der anteriore Bereich des BNST, insbesondere der anterolaterale, ausschließlich GABAerg verschaltet ist⁵⁶. Muskimol blockt die neuronale Aktivität der Neurone, indem es über eine Aktivierung der GABA_A-Rezeptoren zu einer Hyperpolarisation kommt⁴¹⁻⁴⁴.

In Übereinstimmung mit elektrophysiologischen Untersuchungen blocken Muskimolinjektionen in den BNST ungelernete Furcht^{26,64}, wohingegen eine Blockade der GABAergen Transmission einen Anstieg von ungelernerter Furcht bewirkt⁶⁵. Daher wurde in dieser Studie eine temporäre Blockade des aBNST mit Muskimol durchgeführt.

4.4. Erweiterung des Geruchspektrums

Im zweiten Experiment wurden zudem noch weitere Gerüche benutzt. Anstelle von Wasser wurden Nackengeruch und weiblicher Urin als Geruchsproben eingesetzt. Beide Gerüche sollten bezüglich defensiven Verhaltens neutral sein²⁰. Außerdem wurde Fuchsurin als weiterer aversiver Geruch benutzt, mit der Idee, dass dieser einen Geruch repräsentiert, der hauptsächlich durch das hauptolfaktorische System verarbeitet wird³⁵.

Die Daten zeigen, dass beide aversiven Gerüche in dieser Studie *Head out* Verhalten im Vergleich zu den beiden neutralen Gerüchen verstärken. Dies stimmt mit anderen Studien überein, die zeigen, dass das defensive Verhalten bei Tieren, die Gerüchen von Fressfeinden ausgesetzt sind, verstärkt wird^{66,67}. Die wichtigste Erkenntnis ist, dass *Head out* Verhalten gegenüber Alarmpheromon durch zeitweise Inaktivierung des aBNST per Muskimolinjektion geblockt wird. Das weist in großem Maße darauf hin, dass der aBNST eine Schlüsselrelaisstation bei der Verarbeitung von Alarmpheromon-induzierten Gefahrenvermeidungsstrategien ist, in diesem Fall vor allem *Head out* Verhalten.

4.5. Mögliche Auswirkungen durch die Methodik der Mikroinjektionen

Bemerkenswert ist, dass *Head out* Verhalten das einzige Verhalten im zweiten Experiment ist, welches deutlich erhöht ist, wenn die Tiere Alarmpheromon ausgesetzt sind. Dies steht im Widerspruch sowohl zu den Ergebnissen des ersten Experiments als auch zu den Ergebnissen von Kiyokawa und Kollegen¹. Dort wurden deutlich mehr Verhaltensweisen beeinflusst. Allerdings muss man beachten, dass im zweiten

Experiment lokale Mikroinjektionen vor dem Verhaltensversuch durchgeführt wurden. Hierfür mussten die Tiere mit der Hand fixiert und an ihnen manipuliert werden. Natürlich wurde versucht, dies so schnell und wenig belastend wie möglich durchzuführen und die Ratten wurden auch vor dem Versuch an diese Manipulationen gewöhnt. Nichtsdestotrotz war diese Prozedur mit Sicherheit für die Tiere mit Stress verbunden, vor allem besonders dann, wenn die Führungskanülen verstopft waren und zunächst gesäubert werden mussten. Insgesamt ist der Einfluss der Injektionsmanipulation auch am generellen Verhalten der Tiere zu erkennen: So war die Zeit außerhalb der *hiding box* im Experiment 2 gegenüber Experiment 1 deutlich verringert (durchschnittlich 60 ± 19 s Experiment 2 vs. 227 ± 48 s Experiment 1). Dementsprechend war die Zeit innerhalb der *hiding box* verlängert, was sehr wahrscheinlich der Grund dafür ist, dass v.a. *Head out* Verhalten, aber nicht die Verhaltensweisen außerhalb der *hiding box* beeinflusst waren. Denn die Zeit, in der Verhaltensweisen außerhalb der *hiding box* geschahen, war einfach zu kurz, um Effekte zu zeigen. Hinzu kommt noch, dass die Tiere im Vergleich zu Experiment 1 doppelt so oft getestet wurden, was ebenso dazu führen kann, dass lediglich das robusteste Defensivverhalten beeinflusst wurde.

4.6. Einfluss des aBNST in der Verarbeitung des nicht-pheromonischen Fuchsurins

Andere aktuelle Studien zeigen, dass es zu einer signifikanten Reduktion an *freezing* Verhalten (eines der prominentesten Angstverhalten^{26,27}) bei Ratten kommt, die Muskimolinjektionen in den BNST bekommen haben und Katzenurin ausgesetzt wurden⁶⁴. Im Gegensatz zu Katzenfellgeruch, welcher als pheromonartiger Geruch eingeordnet wird, ist Katzenurin eher nicht-pheromonartig^{3,64} und hat damit ähnliche Eigenschaften wie der Fuchsurin in dieser Studie. Bezugnehmend auf diese Studie, wäre zunächst ein Anstieg des Defensivverhaltens gegenüber Fuchsurin und anschließend eine Reduktion des Defensivverhaltens durch Muskimolinjektionen zu erwarten gewesen. Allerdings kam es in der vorliegenden Studie gar nicht erst zu einer Zunahme des Defensivverhaltens, sodass sich auch keine Aussage zu möglichen Blockaden durch Muskimol tätigen lässt. Dementsprechend lässt sich auch nicht sagen, welchen Einfluss der aBNST auf die neuronale Verarbeitung des nicht-

pheromonischen Geruchs Fuchsurin hat. Allerdings ist zu bemerken, dass Xu und Kollegen⁶⁴ deutlich höhere Mengen von Muskimol injiziert haben. So benutzten sie 1,1 und 2,2 nmol, wohingegen hier 0,15 nmol benutzt wurden, also nur rund ein Zehntel. Daher bleibt nur zu vermuten, ob überhaupt ein Muskimoleffekt zu erwarten gewesen wäre.

4.7. Aufenthalt im Zentrum eines *open field*

Ein anderer interessanter Parameter ist die prozentuelle Zeit im Zentrum der Arena. Dieses Verhalten scheint relativ spezifisch von Fuchsurin beeinflusst zu sein. Denn Ratten, die Fuchsurin ausgesetzt waren, zeigten weniger Aufenthalt im Zentrum der Arena, gemessen an der gesamten Zeit, die sie außerhalb der *hiding box* verbracht haben. Auch wenn dieser Effekt nicht statistisch signifikant war, war er auch nach Muskimolinjektionen in den aBNST zu beobachten, was der Studie von Xu und Kollegen⁶⁴ widersprechen würde. Ursachen für diesen scheinbaren Widerspruch könnte zum einen die weitaus niedrigere Konzentration des Muskimols sein. Zum anderen wurde in der vorliegenden Studie ausschließlich in den anterioren BNST injiziert. Auch wenn bekannt ist, dass Muskimol im Gehirn noch ca. 1 cm diffundiert⁶⁸, sind sehr wahrscheinlich nicht alle Bereiche des BNST ausgeschaltet. Demnach wäre es möglich, dass das für dieses Verhalten kritische Areal einfach nicht ausgeschaltet wurde. Auch wenn das möglicherweise relevante Gebiet durch Diffusion erreicht worden wäre, so wäre die Konzentration dort dennoch deutlich geringer als direkt am Injektionsort. Es wäre also notwendig, Muskimol in andere Unterkerne des BNST zu injizieren, um so deren Rolle bei der Verarbeitung von Fuchsgeruch zu untersuchen.

Des Weiteren ist von Bedeutung, dass Ratten eine natürliche Vorliebe für dunkle, sichere Plätze haben. Das heißt, dass sie nur aufgrund eines starken Anreizes in das unsicherere Zentrum gehen. Dies wäre der Fall, wenn dort beispielsweise ein interessantes Objekt wäre⁴⁶. Im vorliegenden Verhaltensparadigma befindet sich jedoch im Zentrum nichts. Es wäre zum Beispiel möglich ein Laufrad, Futter oder Ähnliches in das Zentrum zu legen, um so mehr Aufenthalt im Zentrum unter Kontrollbedingungen zu erreichen und damit eine bessere Chance zu haben, mit Fuchsgeruch (oder auch Alarmpheromon) signifikante Effekte zu erzielen. Das bedeutet, dass in dieser

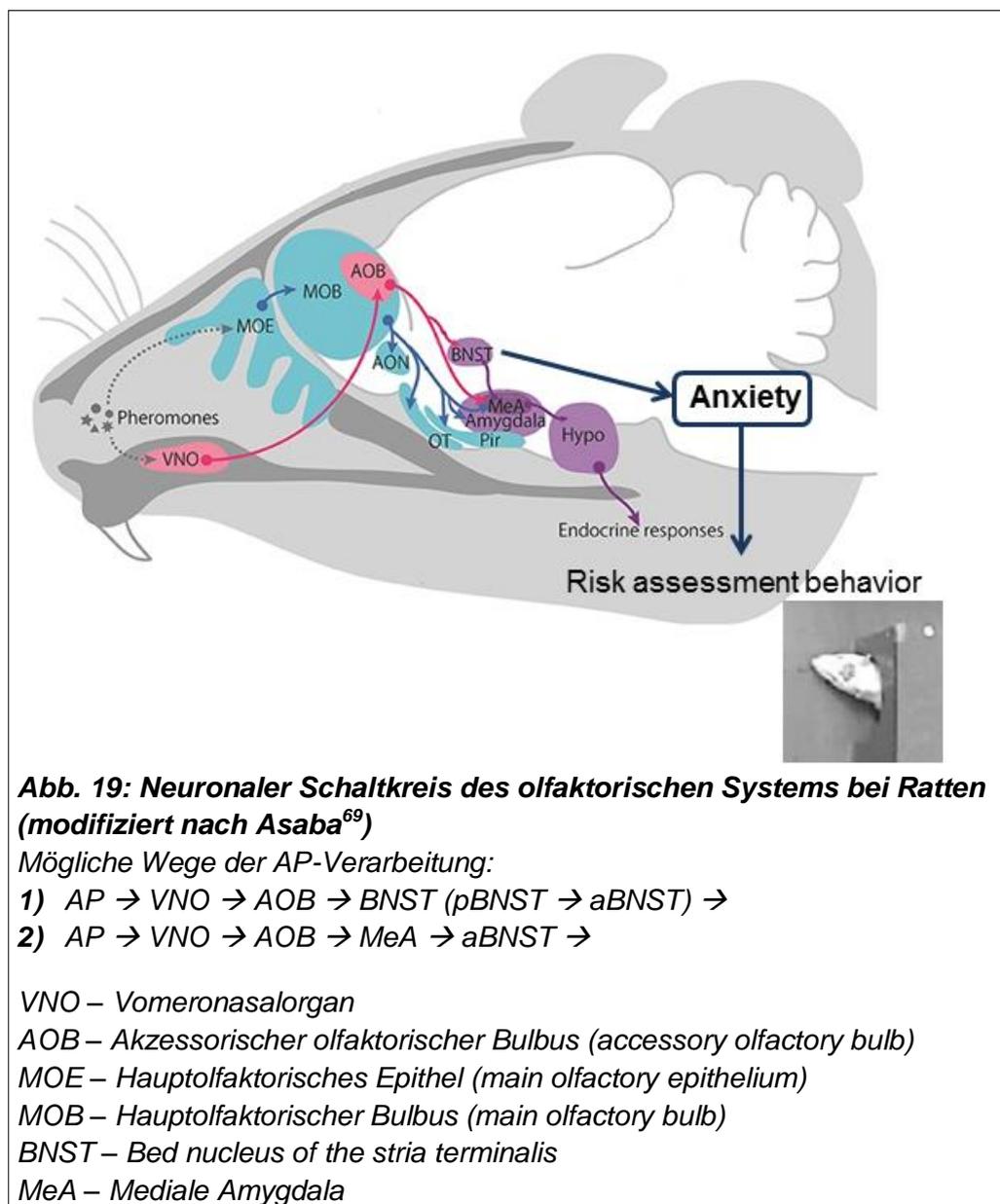
Studie möglicherweise ein Fuchsgeruchseffekt durch zu große Angst vor dem unsicheren Zentrum überlagert wurde.

4.8. Kausaler Zusammenhang zwischen Alarmpheromon, aBNST und Defensivverhalten

Frühere Studien zeigten, dass der aBNST durch Alarmpheromonexposition stark aktiviert war^{12,20}. Allerdings muss diese Aktivierung nicht zwangsmäßig in einem kausalen Zusammenhang zum gezeigten Defensivverhalten stehen. In der vorliegenden Studie konnte gezeigt werden, dass der aBNST für Alarmpheromon-induziertes *Head out* Verhalten notwendig ist, also ein kausaler Zusammenhang zwischen aBNST-Funktion und Alarmpheromon-induziertem Risikoabwägungsverhalten besteht. Demnach ist der aBNST eine wichtige Hauptrelaisstation im neuronalen Schaltkreis des Alarmpheromon-induziertem *Head out* Verhaltens (siehe Abbildung 19).

4.9. Verschaltung des aBNST

Die Frage ist nun, wie der aBNST in diesem Schaltkreis, der das Verhalten in Bezug auf Alarmpheromonexposition reguliert, involviert ist. Alarmpheromon besteht aus zwei aktiven Hauptbestandteilen: 4-Methylpentanal und Hexanal¹². Es gibt verschiedene Projektionen des BNST, welche Verhaltens- und autonome Veränderungen bei Exposition gegenüber Alarmpheromon vermitteln. Autonome Veränderungen werden höchstwahrscheinlich über Projektionen in den paraventriculären Kern des Thalamus reguliert³², wohingegen Verhaltensveränderungen vermutlich über direkte und indirekte Projektionen zum medialen hypothalamischen Abwehrsystem reguliert werden. Weitere Studien sollten diese Projektionen des aBNST bei Tieren, die Alarmpheromon ausgesetzt sind, untersuchen.



4.10. Autonome Furchtreaktion der Tiere

In der vorliegenden Studie spricht die unbeeinflusste Kotkugelanzahl dafür, dass es keine stark ausgeprägte autonome Reaktion gegenüber den benutzten Gerüchen gab. Als Indikator dafür wurde die Defäkation der Tiere während dem Verhaltensversuch erfasst. Ähnliches hatten auch schon Kiyokawa und Kollegen (2006) festgestellt¹. Eine Erklärung für diese geringe autonome Furchtreaktion könnte sein, dass die Tiere durch ihr Verschwinden in die *hiding box* den ausgelösten Stress erfolgreich reduzieren konnten.

4.11. Bezug zur Humanmedizin

Auch in Hinblick auf die Humanmedizin könnten die vorliegenden Ergebnisse von Bedeutung sein, da die Charakteristika von stressbedingten Gerüchen bei Ratten und Menschen ähnlich sind¹². Die Analyse der neuronalen Mechanismen der neuronalen Prozessierung von Alarmpheromon könnte also auch wichtig sein, um ähnliche Vorgänge im Menschen besser zu verstehen.

Zudem ist es generell notwendig, die Neurobiologie der Angst zu untersuchen, um so Angst-assoziierte psychische Erkrankungen (Generalisierte Angststörungen, Panikstörungen, Phobien, Post-Traumatische Belastungsstörung) besser verstehen zu können⁴. Speziell der BNST ist ein Schaltrelais zwischen limbischen Zentren und Hirnkernen, die bei Belohnung, Stress und Angst eine Rolle spielen⁵². Somerville⁷⁰ beschreibt, dass beim Menschen eine Region, die dem BNST bei Ratten gleichzusetzen ist, bei Angst Aktivität zeigt. Auch wenn die aktuellen Verhaltenstests bezüglich der Angst in Tieren, nach Meinung einiger Autoren, inadäquate Modelle für den Menschen zu sein scheinen⁴⁶, so sind Parallelen eindeutig zu erkennen, sowohl neuroanatomischer als auch neurobiologischer Natur.

Auch wenn nicht sicher ist, ob es beim Menschen nach dem Embryonalstadium noch ein Vomeronasalorgan gibt, so können neu entschlüsselte neuronale Schaltkreise Rückschlüsse im Menschen zulassen und damit helfen, gerade psychiatrische Er-

krankungen im Bereich Angst besser zu verstehen und letztendlich in Zukunft besser zu behandeln.

4.12. Schlussfolgerung

In dieser Studie wurde zunächst das *Modified Open-Field* Test Paradigma erstmals bei Sprague-Dawley Ratten etabliert. In einem zweiten Experiment wurde gezeigt, dass eine temporäre Inaktivierung des aBNST Alarmpheromon-induziertes *Head out* Verhalten blockiert. Dies zeigt, dass der aBNST eine relevante Schaltstelle im neuronalen Schaltkreis ist, welcher defensives Verhalten gegenüber Alarmpheromonen auslöst. Weiterführende Studien sollten die neuronalen Mechanismen, die hinter dieser Verarbeitung im aBNST stehen, untersuchen.

Zusammenfassung

Alarmpheromone sind biologische Botenstoffe, welche von Tieren unterschiedlichster Art in angstfüllenden Situationen abgegeben werden. Sie dienen der intraspezifischen Kommunikation. Es ist bekannt, dass Alarmpheromone in Ratten defensives Verhalten auslösen, wie beispielsweise *Head out* Verhalten. C-Fos Experimente zeigen, dass verschiedene Hirngebiete, welche defensives Verhalten verarbeiten, eine höhere Aktivität bei Ratten zeigen, welche Alarmpheromon ausgesetzt waren. Eine dieser Regionen ist der Interstitialkern der Stria terminalis (BNST).

Ziel der vorliegenden Studie war es, das *Modified Open-Field* Paradigma bei Sprague-Dawley Ratten zu etablieren und die Alarmpheromon-induzierten Verhaltensveränderungen bei Ratten zu überprüfen, bei denen der BNST pharmakologisch temporär inaktiviert wurde. Dies geschah mittels der lokalen Applikation des GABA_A-Rezeptor-Agonisten Muskimol.

In einem ersten Experiment konnte erfolgreich ein Testparadigma für Sprague-Dawley Ratten etabliert werden. Exposition gegenüber Alarmpheromon verstärkte das *Head out* Verhalten ($p = 0,03$) und verlängerte die Zeit in der *hiding box* (*Conceal*: $p = 0,03$), wohingegen sich die Zeit außerhalb der *hiding box* ($p = 0,03$), die allgemeine lokomotorische Aktivität ($p = 0,04$) und die Zeit *near the stimulus* ($p = 0,04$) verminderten.

In einem zweiten Experiment wurde dann der anteriore BNST mittels Muskimol temporär inaktiviert. Anschließend wurde das Verhalten der Tiere im etablierten Testparadigma gegenüber vier verschiedenen Gerüchen (Nackengeruch, weiblicher Urin, Fuchsurin, Alarmpheromon) getestet. Dabei wurden die Effekte der aBNST-Inaktivierung auf das durch die Gerüche ausgelöste Verhalten untersucht. Im Experiment zeigte sich, dass die temporäre Inaktivierung das defensive Verhalten gegenüber Alarmpheromon blockiert ($p = 0,03$). Das zeigt, dass der aBNST eine wichtige Rolle im neuronalen Schaltkreis spielt, der Alarmpheromon-induziertes defensives Verhalten moduliert.

Literaturverzeichnis

1. Kiyokawa,Y., Shimozuru,M., Kikusui,T., Takeuchi,Y., & Mori,Y. Alarm pheromone increases defensive and risk assessment behaviors in male rats. *Physiol. Behav.* **87**, 383-387 (2006).
2. Fendt,M., Endres,T., Lowry,C.A., Apfelbach,R., & McGregor,I.S. TMT-induced autonomic and behavioral changes and the neural basis of its processing. *Neurosci. Biobehav. R.* **29**, 1145-1156 (2005).
3. McGregor,I.S., Hargreaves,G.A., Apfelbach,R., & Hunt,G.E. Neural correlates of cat odor-induced anxiety in rats: region-specific effects of the benzodiazepine midazolam. *J. Neurosci.* **24**, 4134-4144 (2004).
4. Takahashi,L.K., Nakashima,B.R., Hong,H.C., & Watanabe,K. The smell of danger: a behavioral and neural analysis of predator odor-induced fear. *Neurosci. Biobehav. Rev.* **29**, 1157-1167 (2005).
5. Grus,W.E. & Zhang,J.Z. Distinct evolutionary patterns between chemoreceptors of 2 vertebrate olfactory systems and the differential tuning hypothesis. *Mol. Biol. Evol.* **25**, 1593-1601 (2008).
6. Thompson,J.A., Salcedo,E., Restrepo,D., & Finger,T.E. Second-order input to the medial amygdala from olfactory sensory neurons expressing the transduction channel TRPM5. *J. Comp. Neurol.* **520**, 1819-1830 (2012).
7. Kiyokawa,Y., Kodama,Y., Kubota,T., Takeuchi,Y., & Mori,Y. Alarm pheromone is detected by the vomeronasal organ in male rats. *Chem. Senses* **38**, 661-668 (2013).
8. Kikusui,T., Takigami,S., Takeuchi,Y., & Mori,Y. Alarm pheromone enhances stress-induced hyperthermia in rats. *Physiol. Behav.* **72**, 45-50 (2001).
9. Beny,Y. & Kimchi,T. Innate and learned aspects of pheromone-mediated social behaviours. *Anim. Behav.* **97**, 301-311 (2014).
10. Hauser,R., Wiergowski,M., Kaliszan,M., Gos,T., Kernbach-Wighton,G., Studniarek,M., Jankowski,Z., & Namiesnik,J. Olfactory and tissue markers of fear in mammals including humans. *Med. Hypotheses* **77**, 1062-1067 (2011).
11. Karlson,P. & Lüscher,M. Pheromones': a new term for a class of biologically active substances. *Nature* **183**, 55-56 (1959).
12. Inagaki,H., Kiyokawa,Y., Tamogami,S., Watanabe,H., Takeuchi,Y., & Mori,Y. Identification of a pheromone that increases anxiety in rats. *P. Natl. Acad. Sci. USA.* **111**, 18751-18756 (2014).
13. Brechuhl,J., Moine,F., Klaey,M., Nenniger-Tosato,M., Hurni,N., Sporkert,F., Giroud,C., & Broillet,M.C. Mouse alarm pheromone shares structural similarity with predator scents. *P. Natl. Acad. Sci. USA.* **110**, 4762-4767 (2013).

14. Brechbuhl,J., Klaey,M., Moine,F., Bovay,E., Hurni,N., Nenniger-Tosato,M., & Broillet,M.C. Morphological and physiological species-dependent characteristics of the rodent Grueneberg ganglion. *Front. Neuroanat.* **8**, (2014).
15. Vieuille-Thomas,C. & Signoret,J.P. Pheromonal transmission of an aversive experience in domestic pig. *J. Chem. Ecol.* **18**, 1551-1557 (1992).
16. Müller-Schwarze,D., Altieri,R., & Porter,N. Alert odor from skin gland in deer. *J. Chem. Ecol.* **10**, 1707-1729 (1984).
17. Boissy,A., Terlouw,C., & Le Neindre,P. Presence of cues from stressed conspecifics increases reactivity to aversive events in cattle: Evidence for the existence of alarm substances in urine. *Physiol. Behav.* **63**, 489-495 (1998).
18. Speedie,N. & Gerlai,R. Alarm substance induced behavioral responses in zebrafish (*Danio rerio*). *Behav. Brain Res.* **188**, 168-177 (2008).
19. Radulescu,A.R. & Mujica-Parodi,L.R. Human gender differences in the perception of conspecific alarm chemosensory cues. *Plos One* **8**, (2013).
20. Kiyokawa,Y., Kikusui,T., Takeuchi,Y., & Mori,Y. Mapping the neural circuit activated by alarm pheromone perception by c-Fos immunohistochemistry. *Brain Res.* **1043**, 145-154 (2005).
21. Inagaki,H., Nakamura,K., Kiyokawa,Y., Kikusui,T., Takeuchi,Y., & Mori,Y. The volatility of an alarm pheromone in male rats. *Physiol. Behav.* **96**, 749-752 (2009).
22. Dragunow,M. & Robertson,H.A. Seizure-inducible c-fos protein(s) in mammalian neurons. *Trends Pharmacol. Sci.* **9**, 5-6 (1988).
23. Morgan,J.I. & Curran,T. Stimulus-transcription coupling in neurons: role of cellular immediate-early genes. *Trends Neurosci.* **12**, 459-462 (1989).
24. Meyer,R.E. Physiologic measures of animal stress during transitional states of consciousness. *Animals* **5**, 702-716 (2015).
25. Janitzky,K., Stork,O., Lux,A., Yanagawa,Y., Schwegler,H., & Linke,R. Behavioral effects and pattern of brain c-fos mRNA induced by 2,5-dihydro-2,4,5-trimethylthiazoline, a component of fox feces odor in GAD67-GFP knock-in C57BL/6 mice. *Behav. Brain Res.* **202**, 218-224 (2009).
26. Fendt,M., Endres,T., & Apfelbach,R. Temporary inactivation of the bed nucleus of the stria terminalis but not of the amygdala blocks freezing induced by trimethylthiazoline, a component of fox feces. *J. Neurosci.* **23**, 23-28 (2003).
27. Fendt,M., Siegl,S., & Steiniger-Brach,B. Noradrenaline transmission within the ventral bed nucleus of the stria terminalis is critical for fear behavior induced by trimethylthiazoline, a component of fox odor. *J. Neurosci.* **25**, 5998-6004 (2005).

28. Brennan,P.A. & Kendrick,K.M. Mammalian social odours: attraction and individual recognition. *Philos. T. Roy. Soc. B.* **361**, 2061-2078 (2006).
29. Kiyokawa,Y., Kikusui,T., Takeuchi,Y., & Mori,Y. Removal of the vomeronasal organ blocks the stress-induced hyperthermia response to alarm pheromone in male rats. *Chem. Senses* **32**, 57-64 (2007).
30. Walker,D.L., Toufexis,D.J., & Davis,M. Role of the bed nucleus of the stria tenninalis versus the amygdala in fear, stress, and anxiety. *Eur. J. Pharmacol.* **463**, 199-216 (2003).
31. Kobayashi,T., Kiyokawa,Y., Arata,S., Takeuchi,Y., & Mori,Y. c-Fos expression during the modulation of sexual behavior by an alarm pheromone. *Behav. Brain Res.* **237**, 230-237 (2013).
32. Kobayashi,T., Kiyokawa,Y., Takeuchi,Y., & Mori,Y. Neural correlates underlying naloxone-induced amelioration of sexual behavior deterioration due to an alarm pheromone. *Front. Neurosci.* **9**, 52 (2015).
33. Kiyokawa,Y., Kikusui,T., Takeuchi,Y., & Mori,Y. Alarm pheromones with different functions are released from different regions of the body surface of male rats. *Chem. Senses* **29**, 35-40 (2004).
34. Kiyokawa,Y., Kikusui,T., Takeuchi,Y., & Mori,Y. Alarm pheromone that aggravates stress-induced hyperthermia is soluble in water. *Chem. Senses* **30**, 513-519 (2005).
35. Funk,D. & Amir,S. Circadian modulation of fos responses to odor of the red fox, a rodent predator, in the rat olfactory system. *Brain Res.* **866**, 262-267 (2000).
36. Fendt,M. Exposure to urine of canids and felids, but not of herbivores, induces defensive behavior in laboratory rats. *J. Chem. Ecol.* **32**, 2617-2627 (2006).
37. Wernecke,K.E.A., Vincenz,D., Storsberg,S., D'Hanis,W., Goldschmidt,J., & Fendt,M. Fox urine exposure induces avoidance behavior in rats and activates the amygdalar olfactory cortex. *Behav. Brain Res.* **279**, 76-81 (2015).
38. Lydell,K. & Doty,R.L. Male rat of odor preferences for female urine as a function of sexual experience, urine age, and urine source. *Horm Behav.* **3**, 205-212 (1972).
39. Moser,M.B. & Moser,E.I. Distributed encoding and retrieval of spatial memory in the hippocampus. *J. Neurosci.* **18**, 7535-7542 (1998).
40. Wilensky,A.E., Schafe,G.E., & Ledoux,J.E. Functional inactivation of the amygdala before but not after auditory fear conditioning prevents memory formation. *J. Neurosci.* **19**, (1999).

41. Krupa,D.J., Ghazanfar,A.A., & Nicolelis,M.A.L. Immediate thalamic sensory plasticity depends on corticothalamic feedback. *P. Natl. Acad. Sci. USA.* **96**, 8200-8205 (1999).
42. Edeline,J.M., Hars,B., Hennevin,E., & Cotillon,N. Muscimol diffusion after intracerebral microinjections: a reevaluation based on electrophysiological and autoradiographic quantifications. *Neurobiol. Learn. Mem.* **78**, 100-124 (2002).
43. van Duuren,E., van der Plasse,G., van der Blom,R., Joosten,R.N.J.M., Mulder,A.B., Pennartz,C.M.A., & Feenstra,M.G.P. Pharmacological manipulation of neuronal ensemble activity by reverse microdialysis in freely moving rats: a comparative study of the effects of tetrodotoxin, lidocaine, and muscimol. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **323**, 61-69 (2007).
44. Larson,T.A., Wang,T.W., Gale,S.D., Miller,K.E., Thatra,N.M., Caras,M.L., Perkel,D.J., & Brenowitz,E.A. Postsynaptic neural activity regulates neuronal addition in the adult avian song control system. *P. Natl. Acad. Sci. USA.* **110**, 16640-16644 (2013).
45. George Paxinos & Charles Watson. *The Rat Brain in stereotaxic coordinates*. London: Elsevier (2014).
46. Ennaceur,A. Tests of unconditioned anxiety - pitfalls and disappointments. *Physiol. Behav.* **135**, 55-71 (2014).
47. Abel,E.L. & Bilitzke,P.J. A possible alarm substance in the forced swimming test. *Physiol. Behav.* **48**, 233-239 (1990).
48. Liberles,S.D. Mammalian pheromones. *Ann. Rev. Physiol.* **76**, 151-175 (2014).
49. Ferrero,D.M. & Liberles,S.D. The secret codes of mammalian scents. *Wiley Interdiscip. Rev. Syst. Biol. Med.* **2**, 23-33 (2010).
50. Schwaber,J.S., Kapp,B.S., & Higgins,G. The origin and extent of direct amygdala projections to the region of the dorsal motor nucleus of the vagus and the nucleus of the solitary tract. *Neurosci. Lett.* **20**, 15-20 (1980).
51. Schwaber,J.S., Kapp,B.S., Higgins,G.A., & Rapp,P.R. Amygdaloid and basal forebrain direct connections with the nucleus of the solitary tract and the dorsal motor nucleus. *J. Neurosci.* **2**, 1424-1438 (1982).
52. Crestani,C.C., Alves,F.H., Gomes,F.V., Resstel,L.B., Correa,F.M., & Herman,J.P. Mechanisms in the bed nucleus of the stria terminalis involved in control of autonomic and neuroendocrine functions: a review. *Curr. Neuropharmacol.* **11**, 141-159 (2013).
53. Walker,D.L. & Davis,M. Double dissociation between the involvement of the bed nucleus of the stria terminalis and the central nucleus of the amygdala in startle increases produced by conditioned versus unconditioned fear. *J. Neurosci.* **17**, 9375-9383 (1997).

54. Davis, M. & Shi, C.J. The extended amygdala: are the central nucleus of the amygdala and the bed nucleus of the stria terminalis differentially involved in fear versus anxiety? *Ann. NY Acad. Sci.* **877**, 281-291 (1999).
55. Bota, M., Sporns, O., & Swanson, L.W. Neuroinformatics analysis of molecular expression patterns and neuron populations in gray matter regions: The rat BST as a rich exemplar. *Brain Res.* **1450**, 174-193 (2012).
56. Poulin, J.F., Arbour, D., Laforest, S., & Drolet, G. Neuroanatomical characterization of endogenous opioids in the bed nucleus of the stria terminalis. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry* **33**, 1356-1365 (2009).
57. von Campenhausen, H. & Mori, K. Convergence of segregated pheromonal pathways from the accessory olfactory bulb to the cortex in the mouse. *Eur. J. Neurosci.* **12**, 33-46 (2000).
58. Dong, H.W. & Swanson, L.W. Projections from bed nuclei of the stria terminalis, posterior division: Implications for cerebral hemisphere regulation of defensive and reproductive behaviors. *J. Comp. Neurol.* **471**, 396-433 (2004).
59. Meurisse, M., Chaillou, E., & Levy, F. Afferent and efferent connections of the cortical and medial nuclei of the amygdala in sheep. *J. Chem. Neuroanat.* **37**, 87-97 (2009).
60. Sun, N. & Cassell, M.D. Intrinsic GABAergic neurons in the rat central extended amygdala. *J. Comp. Neurol.* **330**, 381-404 (1993).
61. Gungor, N.Z. & Paré, D. CGRP inhibits neurons of the bed nucleus of the stria terminalis: implications for the regulation of fear and anxiety. *J. Neurosci.* **34**, 60-65 (2014).
62. Turesson, H.K., Rodriguez-Sierra, O.E., & Paré, D. Intrinsic connections in the anterior part of the bed nucleus of the stria terminalis. *J. Neurophysiol.* **109**, 2438-2450 (2013).
63. Miller, S.M. & Lonstein, J.S. Autoradiographic analysis of GABA(A) receptor binding in the neural anxiety network of postpartum and non-postpartum laboratory rats. *Brain Res. Bull.* **86**, 60-64 (2011).
64. Xu, H.Y., Liu, Y.J., Xu, M.Y., Zhang, Y.H., Zhang, J.X., & Wu, Y.J. Inactivation of the bed nucleus of the stria terminalis suppresses the innate fear responses of rats induced by the odor of cat urine. *Neuroscience* **221**, 21-27 (2012).
65. Sajdyk, T.J., Johnson, P.L., Fitz, S.D., & Shekhar, A. Chronic inhibition of GABA synthesis in the bed nucleus of the stria terminalis elicits anxiety-like behavior. *J. Psychopharmacol.* **22**, 633-641 (2008).
66. Dielenberg, R.A., Carrive, P., & McGregor, I.S. The cardiovascular and behavioral response to cat odor in rats: unconditioned and conditioned effects. *Brain Res.* **897**, 228-237 (2001).

67. Blanchard,R.J. & Blanchard,D.C. Antipredator defensive behaviors in a visible burrow system. *J. Comp. Psychol.* **103**, 70-82 (1989).
68. Miserendino,M.J., Sananes,C.B., Melia,K.R., & Davis,M. Blocking of acquisition but not expression of conditioned fear-potentiated startle by NMDA antagonists in the amygdala. *Nature* **345**, 716-718 (1990).
69. Asaba,A., Hattori,T., Mogi,K., & Kikusui,T. Sexual attractiveness of male chemicals and vocalizations in mice. *Front. Neurosci.* **8**, (2014).
70. Somerville,L.H., Whalen,P.J., & Kelley,W.M. Human bed nucleus of the stria terminalis indexes hypervigilant threat monitoring. *Biol. Psychiatry* **68**, 416-424 (2010).

Danksagungen

Insbesondere danke ich meinem Betreuer Herrn Prof. Dr. rer. nat. Markus Fendt für die Vergabe dieses interessanten Themas. Ich danke Dir vor allem für die hervorragende fachliche Betreuung, die zahlreichen konstruktiven Gespräche und die ständige Motivation.

Außerdem gebührt dem Team von Herrn Prof. Dr. Dr. Yasushi Kiyokawa der Universität Tokio Dank für die anregenden Diskussionen. Insbesondere danke ich hier auch Herrn Dr. Hideaki Inagaki dafür, dass er mir beibrachte, wie ich Alarmpheromon gewinnen kann.

Des Weiteren danke ich dem gesamten Team des Instituts für Pharmakologie und Toxikologie des Universitätsklinikums Magdeburg, insbesondere Herrn Dr. Jorge Bergado-Acosta, Frau Dr. Kerstin Wernicke und Frau Evelyn Kahl für die Unterstützung während meiner Arbeit im Labor.

Vielen Dank auch an meinen guten Freund und Kommilitonen Johann Bruning, der mir stets bei experimentellen Problemen zur Seite stand.

Schließlich möchte ich mich auch noch ganz herzlich bei meinen Eltern für die stetige Motivation und ihre Begleitung während meines bisherigen Werdeganges bedanken.

Besonders möchte ich mich noch bei meiner Freundin Jessica, die mir stets zur Seite stand, mich unermüdlich motivierte und immer an mich glaubte, von ganzem Herzen bedanken.

Ehrenerklärung

Ich erkläre, dass ich die in der Medizinischen Fakultät der Otto-von-Guericke-Universität zur Promotion eingereichte Dissertation mit dem Titel

Die Rolle des Interstitialkerns der Stria terminalis bei Alarmpheromon-ausgelöstem Defensivverhalten

im Institut für Pharmakologie und Toxikologie

mit Unterstützung von Prof. Dr. rer. nat. Markus Fendt

ohne sonstige Hilfe durchgeführt und bei der Abfassung der Dissertation keine anderen als die dort aufgeführten Hilfsmittel benutzt habe.

Bei der Abfassung der Dissertation sind Rechte Dritter nicht verletzt worden.

Ich habe diese Dissertation bisher an keiner in- oder ausländischen Hochschule zur Promotion eingereicht. Ich übertrage der Medizinischen Fakultät das Recht, weitere Kopien meiner Dissertation herzustellen und zu vertreiben.

Magdeburg, den 15.11.2016

Tino Breitfeld

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name	Tino Breitfeld
Geburtsdatum	01.08.1991
Geburtsort	Burg
Staatsangehörigkeit	deutsch
Familienstand	ledig

Schulbildung

1998 – 2000	Grundschule Ferchland
2000 – 2002	Grundschule Güsen
2002 – 2004	Sekundarschule Parey
2004 – 2010	Bismarck-Gymnasium Genthin

Studium

10/2010 – 12/2016	Studium der Humanmedizin, Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg
09/2012	Erstes Staatsexamen „Physikum“
10/2015	Zweites Staatsexamen (M2)
11/2016	Staatsexamen M3

Promotion

seit 11/2013	Experimentelle Doktorarbeit am Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Medizinischen Fakultät der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg
--------------	--

Publikationen und Poster

Poster

Fischer, K., **Breitfeld, T.** *Multiple variations of muscles in the fourth compartment.* Poster anlässlich des 108th Annual Meeting of the Anatomical Society 2013 in Magdeburg.

Breitfeld, T., Bruning, J.E.A., Kiyokawa, Y., Fendt, M. *Alarmpheromon-induced defensive behavior in rats: Role of the bed nucleus of the stria terminalis.* Poster anlässlich des 11th Göttingen Meeting of the German Neuroscience Society 2014.

Publikationen

Breitfeld, T., Bruning, J. E. A., Ingaki, H., Takeuchi, Y., Kiyokawa, Y., Fendt, M. Temporary inactivation of the anterior part of the bed nucleus of the stria terminalis blocks alarm pheromone-induced defensive behavior in rats. *Front Neuroci.* **9**, 321 (2015)

Bruning, J. E. A., **Breitfeld, T.**, Kahl, E., Bergado-Acosta, J. R., Fendt, M. Relief memory consolidation requires protein synthesis within the nucleus accumbens. *Neuropharmacology* **105**, 10-14 (2016)

Fischer, K., **Breitfeld, T.**, Damert, H-G., Rothkötter, H-J. Multiple variations of extensor muscles in a single hand. *Int. J. Anat. Var. (IJAV)* **9**, 1000-1002 (2016)

Anlagen

Nissl-Färbung mit Cresylviolett

Material/Geräte:

- Deckgläser
- Präpariernadel
- Flache Pinzette

Chemikalien:

- 1%ige Cresylviolett-Lösung (pro 2,5g/250ml H₂O)
- Ethanol
- Essigsäure
- Rotihistol

Durchführung:

- | | |
|-----------------------------|--------------------------------|
| 1. 70% Alkohol | ca. 2 h |
| 2. 50% Alkohol | 15 Min |
| 3. Cresylviolett | 4-20 Min (Farbe kontrollieren) |
| 4. 50% Alkohol | 1-2 Min |
| 5. 70% Alkohol | 2 Min |
| 6. 96% Alkohol + Essigsäure | 2 Min (Farbe kontrollieren) |
| 7. 96% Alkohol | 2 Min |
| 8. Alkohol Absolut | 2 Min |
| 9. Alkohol Absolut | 2 Min |
| 10. Rotihistol | 10 Min |
| 11. Rotihistol | 15 Min |

- Deckglas anbringen und horizontal liegen lassen
- Möglichst für 1 Woche horizontal liegen lassen