

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

Effekte von nasaler Orexin-Applikation auf Schizophrenie-typisches Verhalten bei Labormäusen

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

zur Erlangung des Doktorgrades

Dr. med.

(doctor medicinae)

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

Vorgelegt von	Anne Rakowsky
aus	Stendal
Magdeburg	2024

Bibliographische Beschreibung:

Rakowsky, Anne: Effekte von nasaler Orexin-Applikation auf Schizophrenie-typisches Verhalten bei Labormäusen - 2024. - 61 Bl., 16 Abb., 1 Tab., 4 Anl.

Kurzreferat

In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss der nasalen Applikation des Neuropeptids Orexin auf verschiedene Endophänotypen der Schizophrenie untersucht. Als Tiermodell der Schizophrenie dienten hierbei subkutane Injektionen des N-methyl-D-Asparaginsäure- (NMDA)-Rezeptor-Antagonisten Dizocilpin (MK801) bei Labormäusen. Mithilfe des modifizierten Tests nach Crawley wurde das Sozialverhalten der Testtiere untersucht. Dabei reduzierte MK801 phasenübergreifend die Erkundungszeit, während Orexin allein keinen Einfluss hatte, aber den MK801-Effekt verstärkte. Beim Test auf Präpulsinhibition reduzierte MK801 die mittlere Präpulsinhibition bei beiden Geschlechtern, wobei Orexin sie bei den MK801-vorbehandelten Männchen zusätzlich reduzierte. Die Schreckreaktionsamplitude wurde bei den Männchen durch MK801 erhöht, Orexin hingegen verringerte sie bei den MK801-vorbehandelten Tieren. Im Offenfeld-Test wurde bei beiden Geschlechtern eine durch MK801 gesteigerte Lokomotion gemessen, Orexin hatte keinen signifikanten Effekt. Zusätzlich wurde hier auch die Aufenthaltszeit im Zentrum und die Anzahl der Aufrichtungen als Maß der Ängstlichkeit bestimmt. MK801 reduzierte beides als Nebeneffekt der Hyperaktivität, während Orexin den Zentrumsaufenthalt erhöhte, jedoch keinen Einfluss auf die Aufrichtungen hatte. c-Fos-Färbungen von Gehirnschnitten der Männchen ergaben, dass MK801 die höchste Aktivität im ventromedialen Cortex und Nucleus accumbens hervorruft, während es bei den Weibchen eher weniger Wirkung zu zeigen schien und nur in Kombination mit Orexin Tendenzen aufwies. Die vorliegende Arbeit zeigt somit einen Einfluss von Orexin auf bestimmte Endophänotypen der Schizophrenie und liefert damit wichtige Daten für die weitere Erforschung dieser Therapiemöglichkeit.

Schlüsselwörter

Orexin – MK801 – Schizophrenie

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis.....	1
1. Einleitung	2
2. Material und Methoden.....	6
2.1. Tiere	6
2.1.1. Mäuse	6
2.1.2. Haltung.....	6
2.1.3. Kennzeichnung.....	7
2.1.4. Rechtliche Grundlage	7
2.2. Versuchsdesign	7
2.3. Pharmaka/Substanzen.....	8
2.4. Verhaltenstests	9
2.4.1. Test auf Sozialverhalten	9
2.4.1.1. Apparatur.....	9
2.4.1.2. Zeitlicher Ablauf.....	9
2.4.1.3. Auswertung	10
2.4.2. Präpulsinhibition der Schreckreaktion und Offenfeld-Test.....	11
2.4.2.1. Apparatur Präpulsinhibition.....	11
2.4.2.2. Zeitlicher Ablauf Präpulsinhibition	11
2.4.2.3. Auswertung Präpulsinhibition.....	12
2.4.2.4. Apparatur Offenfeld-Test	12
2.4.2.5. Zeitlicher Ablauf Offenfeld-Test	12
2.4.2.6. Auswertung Offenfeld-Test	12
2.5. c-Fos-Immunhistochemie	13
2.5.1. Zeitlicher Ablauf und Durchführung c-Fos-Immunhistochemie	13
2.5.2. Auswertung c-Fos-Immunhistochemie	15
2.6. Statistik	16
3. Ergebnisse	17
3.1. Sozialverhalten-Test	17
3.1.1. Sozialverhalten-Test – Phasenübergreifende Betrachtung	17
3.1.2. Sozialverhalten-Test – Habituationsphase.....	19
3.1.3. Sozialverhalten-Test – Sozialverhalten-Phase.....	20
3.1.4. Sozialverhalten-Test – Wiedererkennungsphase.....	22
3.2. Präpulsinhibitions-Test und Offenfeld-Test.....	24
3.2.1. Präpulsinhibitions-Test – Mittlere Präpulsinhibition und Präpulsinhibition bei verschiedenen Präpulsintensitäten	24
3.2.2. Präpulsinhibitions-Test – Basale Schreckreaktion	26

3.2.3. Offenfeld-Test – Lokomotorische Aktivität	28
3.2.4. Offenfeld-Test – Aufenthalt im Zentrum des Offenfeldes	31
3.3. Immunhistochemie mit c-Fos	34
4. Diskussion	38
4.1. Sozialverhalten-Test	38
4.2. Präpulsinhibitions-Test.....	39
4.3. Offenfeld-Test	41
4.4. c-Fos-Immunhistochemie	42
4.5. Experimentübergreifende Betrachtungen	44
4.5.1. Pharmaka	44
4.5.1.1. MK801	44
4.5.1.2. Orexin.....	44
4.5.2. Gruppengröße	46
4.6. Schlussfolgerung	46
5. Zusammenfassung	47
Literaturverzeichnis	48
Danksagungen	52
Ehrenerklärung.....	53
Darstellung des Bildungsweges.....	54
Anlagen	55
Abbildungs- und Tabellenverzeichnis.....	55
Anästhesie-Protokoll Maus – c-Fos-Immunhistochemie	56
Zamboni Fixationslösung – c-Fos-Immunhistochemie.....	56
Protokoll c-Fos-Immunhistochemie	57

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ANOVA	Analysis of variance (Varianzanalyse)
c-Fos	c-Fos (Transkriptionsfaktor aus der Fos Familie)
CSV	Comma-separated values (durch Komma getrennte Werte)
dB	Dezibel
DPX	DPX (DNA-Extraktionspuffer)
F	F-Wert der Varianzanalyse
h1/h2	Erster bzw. zweiter Käfig in der Habituationsphase
MK801	(5S,10R)-(+)-5-Methyl-10,11-dihydro-5H-dibenzo[a,d]cyclohepten-5,10-imin Maleat
NaCl	Natriumchlorid
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
Orexin-Cre	Mauslinie, bei der Orexin-Neurone mit Protein Cre markiert sind
Orexin-KO	Orexin-Knockout
OX1R	Orexin (Hypocretin) - Rezeptor 1
OX2R	Orexin (Hypocretin) - Rezeptor 2
p	p-Wert (Überschreitungswahrscheinlichkeit/Signifikanzwert)
PPI	Präpulsinhibition
r1/r2	Erster bzw. zweiter Käfig in der Wiedererkennungsphase
s.c.	subcutaneous (subkutan)
s1/s2	Erster bzw. zweiter Käfig in der Sozialverhaltensphase
SEM	Standardfehler/Stichprobenfehler
SPL	Sound pressure level (Schalldruckpegel)
t	T-Wert der Teststatistik
Uncorrected Fisher	Uncorrected Fishers Least Significant Difference Test
LSD-Test	

1. Einleitung

Emil Kraepelin, ein richtungsgebender deutscher Psychiater des späten 19. Jahrhunderts beschrieb zum ersten Mal die *Dementia praecox*, die im Jahr 1911 vom Schweizer Psychiater Eugen Bleuler in Schizophrenie umbenannt wurde. Seit den ersten Beschreibungen dieser psychotischen Störung wurde umfangreiche Forschung auf diesem Gebiet betrieben. Bis heute ist die Pathophysiologie der Schizophrenie noch nicht abschließend geklärt und es wird eine multifaktorielle Genese vermutet. Dem Ganzen wird mit einer multifaktoriellen mehrdimensionalen Therapie begegnet, die jedoch nur in wenigen Fällen zu einer Vollremission führt. In der überwiegenden Zahl der Fälle werden episodische bzw. chronisch-progrediente Verläufe beobachtet, weshalb weitere Forschung auf diesem Gebiet notwendig ist.

Die Schizophrenie ist eine Erkrankung des Menschen, die durch vielfältige diagnostische Methoden, wie die Erhebung des psychopathologischen Befundes, des internistischen und neurologischen Status und weitere Untersuchungen festgestellt wird. In diesem Umfang erscheint es schwierig, eine solch komplexe psychiatrische Erkrankung mittels eines Tiermodelles sowohl neuropathologisch als auch symptomatisch nachzuempfinden. Bestimmte menschliche Aspekte wie Halluzinationen, Wahn oder Sprachverarmung, die mittels psychopathologischer Befunde erfragt werden, können in Tieren nur schwer initial festgestellt und im weiteren Verlauf beobachtet werden. Tatsächlich gibt es bezogen auf die Halluzination schon Ansätze, wie sie im Tier modelliert werden könnte (Schmack et al. 2021), welche jedoch noch nicht flächendeckend etabliert worden sind. Nichtsdestotrotz kann das Tiermodell für viele Fragestellungen herangezogen werden (Spitzer und Erk 2006). Dafür werden die komplexen Symptome der Schizophrenie auf grundlegende neurobiologische Gesichtspunkte bzw. deren Dysfunktionen reduziert. Um das zu veranschaulichen, wurden von Gottesman und Shields 1973 sogenannte Endophänotypen eingeführt (Gottesman und Shields 1973), welche später von anderen Wissenschaftlern und Wissenschaftlerinnen, darunter Nancy Andreasen, aufgegriffen wurden (Andreasen 2000). Diese Phänotypen stellen Faktoren dar, welche sich nicht auf die klinische Symptomatik konzentrieren, sondern sich auf die neurobiologischen Phänomene der Krankheit beziehen. Folgende Phänotypen – ein gestörtes Arbeitsgedächtnis, eine verminderte Aufmerksamkeit, gestörte Emotionalität, verminderte Präpulsinhibition, Hyperaktivität, gestörte Verhaltenshemmung sowie eine gestörte sequentielle Informationsverarbeitung – ermöglichen es, die neurobiologischen Phänomene im Versuchstier abzubilden und damit die Ausprägung der Schizophrenie zu objektivieren (Andreasen 2000; Gottesman und Shields 1973).

Für tierexperimentelle Studien haben sich das Dopamin- bzw. Glutamat-Modell in der Schizophrenie-Forschung etabliert. NMDA-Rezeptorantagonisten bringen sowohl positive als auch negative Symptome hervor, während dopaminerge Agonisten bei menschlichen Versuchssper-

sonen hauptsächlich die Positivsymptomatik, beispielsweise in der Ausprägung eine Psychose, auslösen können. Daraus resultierend ist das Glutamat-Modell das umfangreichere Modell und diente als Grundlage dieser Arbeit (Rung et al. 2005).

Der NMDA-Rezeptor, ein ionotroper Glutamat-Rezeptor, ist an mehreren physiologischen Funktionen beteiligt – darunter an der synaptischen Plastizität. Eine Fehlfunktion dieses Rezeptors kann die zelluläre Homöostase aus dem Gleichgewicht bringen und zur Manifestation neuropsychiatrischer Pathologien führen, indem die Neuroplastizität reduziert wird. Schizophrenie ist mit einer solchen Fehlfunktion verknüpft, weshalb es möglich ist, mit NMDA-Rezeptorantagonisten Symptome und kognitive Beeinträchtigungen im Sinne der Endophänotypen im Tiermodell hervorzurufen, die der Schizophrenie sehr ähnlich sind (Hall et al. 2015). In der vorliegenden Arbeit wurde in den Experimenten dafür der NMDA-Rezeptorantagonist MK801, auch Dizocilpin genannt, genutzt. Studien haben ergeben, dass MK801 die motorische Aktivität erhöht und damit eine Positivsymptomatik induziert, während es gleichzeitig soziale Interaktionen hemmt, was eine Negativsymptomatik widerspiegelt (Rung et al. 2005). Ein weiterer Endophänotyp wird ebenfalls durch MK801 beeinflusst, wie Studien an Mäusen zeigen, dass die Präpulsinhibition durch den NMDA-Rezeptorantagonisten reduziert wird (Curzon und Decker 1998).

In der nachfolgenden Arbeit soll es vorrangig um den potentiell therapeutischen Einsatz von physiologischem Orexin (auch Hypocretin genannt) in der Schizophrenie gehen. Ursprünglich wurde Orexin für seine Rolle als Regulator der Nahrungsaufnahme und beim Schlaf-Wach-Rhythmus bekannt (Adamantidis et al. 2007; Lecea et al. 1998; Sakurai et al. 1998), jedoch zeigte weitere Forschung auch eine Beteiligung an der Regulierung von Angst, Stress, Motivation und weiteren Funktionen (Übersichten siehe: (Nevárez und Lecea 2018; Sakurai 2014). Im wachen, aktiven Zustand und bei Hunger haben die Orexin-Neuronen des Tieres eine hohe Aktivität. Im Schlaf hingegen ist ihre Funktion reduziert (Yoshida et al. 2001; Zeitzer et al. 2003).

Die zwei Neuropeptide Orexin A und B (auch Hypocretin 1 und 2 genannt) werden von Orexin-Neuronen freigesetzt und bilden zusammen mit ihren Rezeptoren das Orexin-System. Sie werden im dorsomedialen, lateralen und perifornischen Hypothalamus als Präpro-Orexin synthetisiert und erst später in die aktiven Peptide Orexin A und B proteolytisch aufgespalten ((Lecea et al. 1998); (Peyron et al. 1998); (Sakurai et al. 1998)). Die aktiven Neuropeptide binden an zwei G-protein-gekoppelte Rezeptoren, die Orexin-Typ-1- (OX1R) und Typ-2-Rezeptoren (OX2R). Durch das breit gefächerte Verteilungsmuster dieser Rezeptoren kann Orexin in vielen Bereichen im Gehirn agieren (Ch'ng und Lawrence 2015; Hervieu et al. 2001; Marcus et al. 2001). Unter anderem projiziert das Orexin-System in das limbische System, welches für Funktionen wie Lernen, Gedächtnis, Emotionen und Antrieb verantwortlich ist (Nambu et al.

1999); (Sakurai et al. 2005). Verschiedene Studien belegen den Einfluss von Orexin beim Lernen und Gedächtnis (Dang et al. 2018; Wayner et al. 2004), kognitiver Flexibilität (Durairaja und Fendt 2021), Motivation (Mahler et al. 2014), Stress (Giardino und Lecea 2014), Fortbewegung (James et al. 2017), Stimmung, Angst (Abbas et al. 2015; Khalil und Fendt 2017), Geselligkeit und sozialem Gedächtnis (Faesel et al. 2021; Yang et al. 2013).

Die Beeinflussung dieser kognitiven Fähigkeiten durch Orexin hängt mit seiner Rolle im menschlichen und tierischen Sozialverhalten zusammen. So hat zum Beispiel eine Studie ergeben, dass menschliche Orexin-A-Spiegel bei sozialer Interaktion und positiven Emotionen maximal sind (Blouin et al. 2013). Eine Studie im Jahr 2015 zeigte, dass OX1R-Knock-out-Mäuse eine Verminderung der Geselligkeit, erhöhte Schreckreaktionen und eine verringerte Präpulsinhibition aufwiesen (Abbas et al. 2015). Eine weitere Studie im Jahr 2013 zeigte ein eingeschränktes soziales Gedächtnis bei Mäusen, deren Orexin-Neurone im Alter von drei Monaten degenerierten. Eine nasale Verabreichung von Orexin A verbesserte diesen Gedächtnisdefekt (Yang et al. 2013).

Auch bei neuropsychiatrischen Erkrankungen konnte mittlerweile eine Rolle von Orexin nachgewiesen werden. In klinischen Studien zeigte sich bei schizophrenen Patienten weniger Negativsymptomatik, wenn sie höhere Orexin-A-Level in der Cerebrospinalflüssigkeit aufwiesen (Chien et al. 2015). Andere Studien zu Narkolepsie, ausgelöst durch den Verlust von Orexin-Neuronen, zeigen neben anderen Symptomen auch eine beeinträchtigte Präpulsinhibition (Frauscher et al. 2012). Daraus ergab sich die Hypothese, dass das Orexin-System bei verschiedenen neuropsychiatrischen Störungen, insbesondere bei der Schizophrenie, die Ausprägung der Endophänotypen beeinflussen kann (Perez und Lodge 2021; Deutch und Bubser 2007).

Innerhalb dieser Arbeit stand die Arbeitshypothese im Vordergrund, dass die nasale Applikation von Orexin die Endophänotypen Präpulsinhibition und Bewegungsaktivität sowie das Sozialverhalten im Allgemeinen bei MK801-vorbehandelten Mäusen beeinflussen kann. Um diese Phänotypen experimentell zu adressieren, wurden männliche und weibliche Mäuse nasal entweder mit Orexin oder 9-prozentiger isotonischer Kochsalzlösung (Saline) und anschließend subkutan mit MK801 oder Saline behandelt. Daraufhin folgten Tests auf Präpulsinhibition der Schreckreaktion und eine generelle Messung der Bewegungsaktivität. In einem weiteren Test wurde das Sozialverhalten der Testtiere gegenüber fremden Tieren anderer Zuchtlinien beobachtet.

Schizophrene Patienten zeigen eine defizitäre Aufmerksamkeit und Informationsverarbeitung, sowohl kognitiv als auch sensorisch. Dieses Phänomen kann durch die Präpulsinhibition der akustischen Schreckreaktion gemessen werden. Physiologisch ist die Präpulsinhibition ein Mechanismus, der eine Informationsüberflutung des Gehirns verhindert, indem ein schwacher

Reiz (Präpuls) die Schreckreaktion auf einen nachfolgenden Schreckreiz unterdrückt bzw. vermindert. Somit kann die Präpulshemmung als Maß für die sensomotorische Filterung verstanden werden, die vom zentralen Nervensystem vermittelt wird. Bei gesunden Menschen wird die Aufmerksamkeit reguliert, indem überflüssige sensorische oder motorische Prozesse gefiltert werden. Dieses Verhaltensereignis ist bei Schizophrenie durch eine abnorme Funktion des kortikostriato-thalamokortikalen Schaltkreises verändert. Kumari und Kollegen testeten männliche Patienten auf die Präpulshehmung der akustischen Schreckreaktion. Dabei fanden sie heraus, dass ein früher Krankheitsbeginn bei Männern mit Schizophrenie mit schwerwiegenden Defiziten in der Präpulshehmung der Schreckreaktion verbunden war (Kumari et al. 2000). Die Hypothese der vorliegenden Arbeit war, dass MK801 bei den Versuchstieren ein Defizit in der Präpulsinhibition bewirkt, und dass die Behandlung mit Orexin diesem Defizit entgegenwirken kann.

Beim Open-Field-Test wurde erwartet, dass die Tiere unter dem Einfluss von MK801 aktiver sind als die Kontrollen und dass diese Hyperaktivität durch die nasale Applikation von Orexin abgemildert werden kann. Der Sozialverhalten-Test nach Crawley diente der Überprüfung der Hypothese, dass die Tiere unter MK801 generell weniger sozial sind und über eine geringere soziale Wiedererkennungstendenz verfügen und dieses Phänomen durch Orexin rückgängig gemacht werden kann.

Ein davon unabhängiges Experiment sollte die neuronale Aktivität in bestimmten Gehirnarealen durch die Pharmaka untersuchen. Dafür wurden weitere Testtiere nach den gleichen pharmakologischen Behandlungen, ohne im Verhalten getestet zu werden, perfundiert, ihre Gehirne immunhistochemisch gefärbt und anschließend unter dem Fluoreszenzmikroskop untersucht. Damit sollte die Arbeitshypothese überprüft werden, dass die Pharmaka-Kombinationen Veränderungen in der Aktivität der Neuronen der Gehirngebiete ventromedialer Cortex, Nucleus accumbens (Core und Shell Region) und Amygdala hervorrufen.

2. Material und Methoden

2.1. Tiere

2.1.1. Mäuse

Für die verhaltenspharmakologische Untersuchung der Fragestellung wurden insgesamt 14 Mäuse, davon 7 weibliche Tiere und 7 männliche Tiere, der Zuchtlinie C57BL/6J pharmakologisch behandelt und anschließend in verschiedenen Verhaltenstests (siehe Tabelle 1) beobachtet. 26 Mäuse gleicher Zuchtlinie wurden nicht im Verhalten beobachtet, sondern im Anschluss an die pharmakologische Behandlung perfundiert und immunhistochemisch untersucht (c-Fos als Marker für neuronale Aktivität). Alle Experimente fanden im Jahr 2021 statt.

Das Geschlecht, Gewicht und Alter der Versuchstiere wurden für die bessere Übersichtlichkeit in Tabelle 1 dargestellt (die Angaben Alter und Gewicht beziehen sich jeweils auf den ersten Testtag des jeweiligen Experimentes).

Tabelle 1 - Alter und Gewicht der Versuchstiere

Test	Geschlecht	Anzahl	Alter (in Wochen)	Gewicht (in Gramm)
Verhaltenstests (insg. 14 Tiere)				
Sozialverhalten	m	7	10	23 - 27
	w	7	8	14 - 20
Präpulsinhibition & Offenfeld	m	7	17	28 - 30
	w	7	13	19 - 22
Immunhistochemie (c-Fos) (insg. 26 Tiere)				
	m	13	10	21 - 27
	w	13	11	17 - 21

Für die Tests auf Sozialverhalten wurden außerdem noch 4 männliche Wildtyp-Tiere der Zuchtlinie Orexin-KO, 3 männliche Wildtyp-Tiere der Zuchtlinie SHANK2-KO, 3 weibliche Wildtyp-Tiere der Zuchtlinie Orexin-Cre und 2 weibliche Wildtyp-Tiere der Zuchtlinie Orexin-KO als Partner-Tiere genutzt. Diese Tiere wurden nicht pharmakologisch behandelt. Die Partner-Tiere sollten fremd für die Test-Tiere sein, deswegen wurden andere Zuchtlinien benutzt, die aufgrund der geringeren Verwandtschaft sehr wahrscheinlich auch verschieden im Geruch sind.

2.1.2. Haltung

Die Mäuse wurden in durchsichtigen Typ III-Käfigen (42,5 cm x 27,6 cm x 15,3 cm) in der Tierhaltung des Instituts für Pharmakologie und Toxikologie der Universität Magdeburg gehalten. Die Tiere hatten *ad libitum* Zugriff auf Wasser und Standard-Labornagetierfutter (Ssniff® R/M-H, V1534-0). Maximal 7 Tiere gleichen Geschlechts und gleicher Zuchtlinie wurden in

einem Käfig gehalten, der wöchentlich gesäubert wurde und mit Sägemehleinstreu, Zellstofftüchern zum Nestbau und Papprollen ausgestattet war. Die Temperatur und die Luftfeuchtigkeit wurden im Raum der Tierhaltung durchgehend konstant gehalten ($22\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$; $55\% \pm 5\%$). Zudem wurde ein Tag-Nacht-Rhythmus durch eine automatische Lichtschaltung simuliert. Diese Schaltung hatte einen 12/12-Stunden Hell-Dunkel-Rhythmus, wobei das Licht um 06:00 Uhr morgens angeschaltet wurde. Die Experimente erfolgten ausschließlich während der Licht-Phase.

2.1.3. Kennzeichnung

Die Tiere wurden zur Unterscheidung innerhalb der Käfige eindeutig gekennzeichnet. Dies erfolgte einerseits durch die Ohrlochung unter Isofluran und andererseits durch die Markierung des Schwanzes mit einem für Tiere unschädlichen Stift. Die Kennzeichnung am Schwanz wurde wöchentlich wiederholt, da diese mit der Zeit verblasste. Die Tiere, die nicht mehrfach ein Experiment durchlaufen haben, sondern perfundierte wurden, hatten keine Ohrlochung, sondern wurden lediglich am Schwanz gekennzeichnet.

2.1.4. Rechtliche Grundlage

Die Haltung der Tiere sowie die Durchführung der Experimente erfolgte unter Einhaltung der nationalen und internationalen Richtlinien (Deutsches Tierschutzgesetz, Europäische Richtlinie 2010/63/EU) und mit Genehmigung des Landesverwaltungsamt Sachsen-Anhalt (Az. 42502-3-890 Uni MD und 42502-2-1618 Uni MD).

2.2. Versuchsdesign

Um den Effekt einer nasalen Orexin-Applikation auf MK801-induzierte Verhaltensveränderungen zu testen, wurde in jedem der durchgeführten Verhaltensexperimente 4 Kombinationen von Behandlungen durchgeführt, wobei jedes Tier nach Einhaltung einer Wash-Out-Periode (mind. 1 Woche) jede der Behandlungen in einer pseudo-randomisierten Reihenfolge erhielt: (1) Kontrollbehandlung, d. h. die Kombination aus einer nasalen Applikation und einer subkutanen Injektion von Saline, (2) Kombination einer nasal applizierten isotonischen Saline und einer subkutanen Injektion von MK801, (3) Kombination einer nasalen Applikation von Orexin und einer subkutanen Injektion von Saline, (4) Kombination beider Pharmaka, d. h. die Tiere erhielten nasal Orexin und subkutan eine MK801-Injektion.

Vor Beginn der jeweiligen Experimente wurden die Tiere an die Handhabung gewöhnt. Das umfasste sowohl die Gewöhnung an die Experimentatorin selbst als auch an die nasale Applikation von Flüssigkeiten sowie die Fixation des Tieres, die dafür nötig war. Zur Gewöhnung an die nasale Applikation von Flüssigkeiten wurde isotonische Saline genutzt. Dieses Prozedere wurde bei jedem Tier jeweils zweimal vor dem Experiment durchgeführt, umfasste einen

Zeitraumen von circa 10 Minuten pro Tier pro Tag und diente der Stressreduktion des Tieres am Testtag.

Vier Wochen lang durchliefen die 14 Versuchstiere alle 7 Tage den gleichen Verhaltenstest (Sozialverhalten) mit einer anderen pharmakologischen Behandlung. Die Reihenfolge der Behandlung jedes Tieres erfolgte pseudorandomisiert nach dem Schema eines lateinischen Quadrates.

Im Anschluss daran erfolgten 2 weitere kombinierte Verhaltenstests (Präpulsinhibition & Offenfeld) mit denselben 14 Tieren, ebenfalls in 4 aufeinanderfolgenden Wochen, wobei wieder jedes Tier jede Behandlung durchlief.

Davon unabhängig wurden 26 weitere Tiere einmalig mit jeweils einer der 4 Medikamentenkombinationen behandelt. Diese Tiere wurden nach einer Stunde, noch unter Pharmaka-Einfluss, perfundiert. Danach wurde das Gehirn entnommen und Schnitte angefertigt. Diese wurden immunhistochemisch gefärbt.

2.3. Pharmaka/Substanzen

Die Pharmaka Dizocilpin (MK801, (5S,10R)-(+)-5-Methyl-10,11-dihydro-5H-dibenzo[a,d]cyclohepten-5,10-imin Maleat – Research Biochemicals International; Natick, Massachusetts, USA) und Orexin (Bachem; Bubendorf, Schweiz) wurden in Saline gelöst. Ihre Konzentrationen basierten auf publizierten Experimenten und betrugen bei Orexin 0,1 mM (Yang et al. 2013) und bei MK801 0,15 mg/kg in einem Applikationsvolumen von 10 ml/kg (Moy et al. 2013).

Während MK801 immer unmittelbar vor dem Experiment in Saline gelöst wurde, erfolgte die Lösung von Orexin einmalig vor Beginn des gesamten Versuches in Saline und wurde bis zum jeweiligen Experiment in kleinen Portionen im Gefrierschrank (bei -20 °C) gelagert und kurz vor dem jeweiligen Experiment aufgetaut.

Orexin wurde den Mäusen gewichtsunabhängig verabreicht – jedes Tier erhielt 10 µl 0,1 mM Orexin nasal, d. h. auf den Nasenspiegel, mittels einer Pipette verabreicht. Die MK801-Dosis war hingegen gewichtsabhängig - pro Gramm Körpergewicht wurde 0,01ml 0,15 mg/kg MK801 subkutan injiziert.

Die nasale Applikation wurde experimentübergreifend 30 Minuten und die subkutane Injektion 20 Minuten vor dem Beginn des jeweiligen Verhaltensexperimentes durchgeführt.

2.4. Verhaltenstests

2.4.1. Test auf Sozialverhalten

2.4.1.1. Apparatur

Das Sozialverhalten der Tiere wurde mit einer modifizierten Version des Sozialverhalten-Tests von Crawleys untersucht (Faesel et al. 2021). Innerhalb dieses Experimentes wurden die 14 Mäuse alle 7 Tage über 4 Wochen, jeweils unter einer anderen pharmakologischen Behandlung, beobachtet, wie sie mit fremden Mäusen anderer Zuchtlinien (sogenannten „Strangers“) interagierten. Dafür wurden 2 Boxen (23 cm x 33 cm x 45 cm) genutzt, welche undurchsichtige Wände und keine Deckenplatten hatten. Pro Durchgang konnten in jeder Box 1 Testtier und daher parallel 2 Testtiere getestet werden. In jeder Box gab es 2 kleine, runde geschlossene Drahtkäfige (8,5 cm Durchmesser, 10 cm Höhe), die in gegenüberliegenden Ecken der Box standen. Diese Drahtkäfige waren, je nach Phase des Experimentes, entweder leer oder beinhalteten 1 oder 2 *Strangers*. Über den Boxen war eine Kamera angebracht, welche das Experiment filmte und eine Lampe, welche die Boxen indirekt ausleuchtete (ca. 30 Lux). Die Boxen, die Kamera und die Lampe befanden sich in einer lichtundurchlässigen Kammer (74 cm x 71 cm x 74 cm), die während des Experimentes geschlossen waren.

2.4.1.2. Zeitlicher Ablauf

Der Test auf Sozialverhalten war in 3 Phasen unterteilt (Abb. 1), die jeweils 10 Minuten lang waren. Vor der ersten Phase erfolgte die pharmakologische Behandlung – 30 Minuten vor dem Experiment wurde entweder Saline oder Orexin nasal appliziert, 10 Minuten später erfolgte die subkutane Injektion mit MK801 oder Saline.

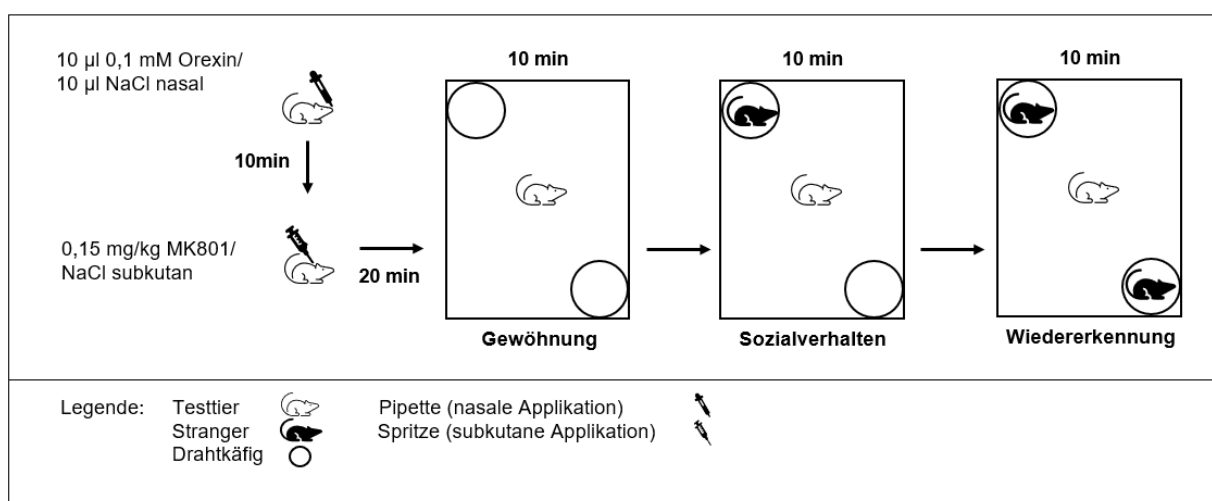


Abbildung 1 - Schematischer Ablauf des Tests auf Sozialverhalten

Die Testtiere wurden nasal mit Saline oder Orexin behandelt, gefolgt von einer subkutanen Injektion von MK801 oder Saline 10 Minuten später, bevor sie nach weiteren 20 Minuten die drei 10-minütigen Experiment-Phasen (Gewöhnung, Sozialverhalten und Wiedererkennung) durchliefen.

Die erste Phase des Sozialverhaltens-Tests nannte sich die Gewöhnungs-Phase (engl. *Habituation*), in welcher sich das Versuchstier an die Umgebung gewöhnen sollte. In dieser Phase waren die Drahtkäfige bereits in der Apparatur platziert, jedoch befanden sich keine *Strangers* in ihnen. Als nächstes folgte die Phase, in der auf Soziabilität (engl. *Sociability*) getestet wurde. Hier befand sich in einem der beiden Drahtkäfige ein *Stranger*. In der letzten Phase, der Wiedererkennungsphase (engl. *Recognition*) wurde in den zweiten, bislang leeren, Käfig ein weiterer gleichgeschlechtlicher *Stranger*, aus einer anderen Zuchtlinie als der erste *Stranger*, gesetzt. Der erste *Stranger* blieb in seinem Käfig. In welchem der beiden Käfige in der „Sozialverhalten“-Phase der erste *Stranger* saß, wurde pro Versuchstier jede Woche gewechselt. Nach jeder Phase wurde das Versuchstier kurz aus der Apparatur herausgenommen, während die *Strangers* in die Drahtkäfige gesetzt wurden. Nach Ende der dritten Phase wurden alle Tiere in die jeweiligen Haltungskäfige zurückgesetzt und die Apparatur gereinigt.

2.4.1.3. Auswertung

Die Verhaltensweisen der Versuchstiere wurden mithilfe eines Video-Tracking Programmes (EthoVision XL Version 12) quantifiziert. Die Tracking-Software war in der Lage, die Nasenspitze und das Zentrum des Tieres mit einer hohen zeitlichen und räumlichen Auflösung zu detektieren. Zudem wurde die Apparatur in virtuelle Zonen eingeteilt, wobei Zonen mit einem Abstand von 2 cm um die *Stranger*-Käfige dafür benutzt wurden, Erkundungsverhalten der Testmäuse gegenüber der leeren und mit *Stranger* besetzten kleinen Käfige zu quantifizieren. Erkundungsverhalten wurde dabei mit dem Aufenthalt der Nasenspitze des Testtieres in den Zonen um die kleinen Käfige definiert. Das Programm berechnete die Aufenthaltszeit des Versuchstieres in den einzelnen Zonen.

2.4.2. Präpulsinhibition der Schreckreaktion und Offenfeld-Test

2.4.2.1. Apparatur Präpulsinhibition

Nach Abschluss des Tests auf Sozialverhalten wurden dieselben 14 Versuchstiere in 4 Durchgängen auf die Präpulsinhibition (PPI) der Schreckreaktion und direkt im Anschluss im Offenfeld getestet (Abb. 2), jeweils unter den 4 verschiedenen pharmakologischen Behandlungen.

Die Präpulsinhibition wurde in der Apparatur SR-LAB, hergestellt von San Diego Instruments in den USA, getestet. Diese Apparatur bestand aus mehreren undurchsichtigen schalldichten Boxen (35 cm x 35 cm x 38 cm), welche jeweils einen durchsichtigen Zylinder aus Plexiglas enthielt. Dieser Zylinder (4 cm x 10 cm) befand sich auf einer Platte, die mit einem Bewegungssensor versehen war.

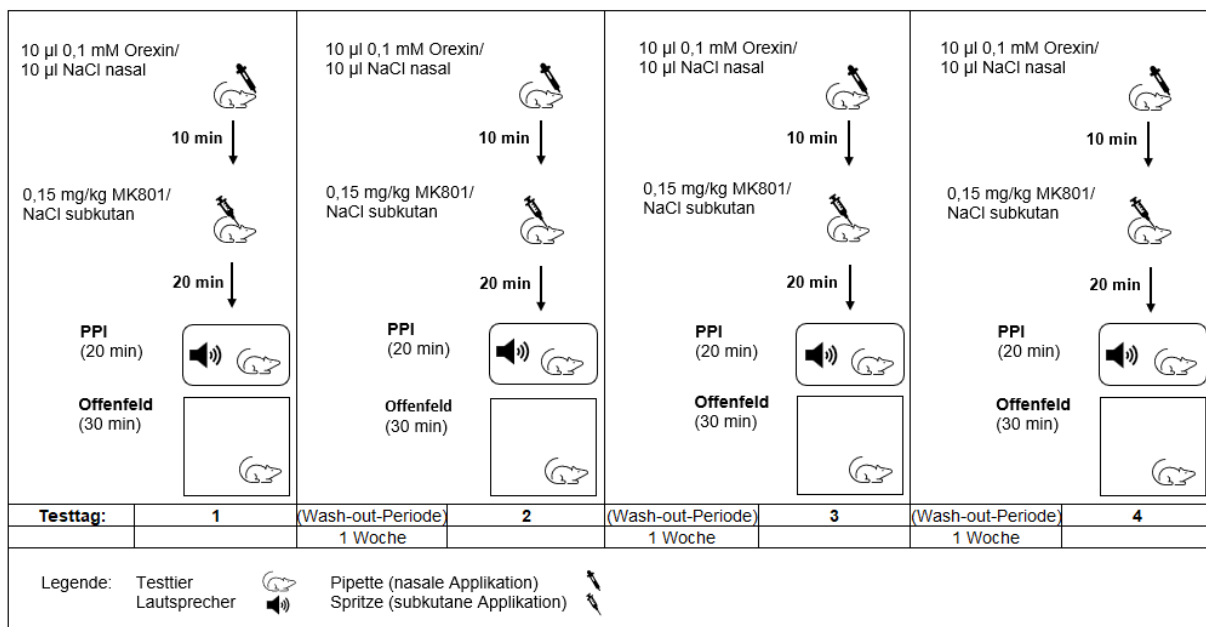


Abbildung 2 - Schematischer Ablauf des kombinierten Präpulsinhibitions- und Offenfeld-Tests

Das Testtier wurde zuerst nasal mit Orexin oder Saline behandelt, gefolgt von einer subkutanen Injektion von MK801 oder Saline 10 Minuten später. Nach einer 20-minütigen Wartezeit wurde das Tier in der verschlossenen Präpulsinhibitions-Apparatur platziert und eingewöhnt, bevor ihm verschiedene Blöcke an Schreckreizen präsentiert wurden. Im Anschluss daran wurde das Tier unverzüglich für weitere 30 Minuten in der Offenfeld-Apparatur platziert.

2.4.2.2. Zeitlicher Ablauf Präpulsinhibition

Für das Experiment wurde das Versuchstier, wie auch beim Test auf Sozialverhalten als erstes nasal mit Orexin oder Saline behandelt. 10 Minuten später erfolgte die subkutane Injektion mit MK801 oder Saline. Nach weiteren 20 Minuten wurde das Tier im Zylinder der Apparatur platziert, welcher daraufhin vorne und hinten verschlossen wurde. Es folgte eine Eingewöhnungszeit von 5 Minuten, in welcher dem Tier außer einem konstanten Hintergrundrauschen mit

einer Lautstärke von 60 dB SPL keinerlei Reize präsentiert wurden. Danach wurde das Versuchstier einem Block von 12 Schreckreizen ausgesetzt – diese waren 108 dB SPL laut und 40 ms lang. Die Zeit zwischen den Schreckreizen betrug 20 s.

Danach folgten 6 Blöcke mit jeweils 6 Reiz-Typen. Entweder wurden dem Versuchstier nur ein Schreckreiz (108 dB SPL, 40 ms) präsentiert oder diesem ging ein sogenannter Präpuls voraus. Die Präpulse hatten 5 verschiedene Lautstärken – 2, 4, 8, 12 oder 16 dB SPL lauter als das Hintergrundrauschen. Die Präpulse waren 20 ms lang und wurden 100 ms vor dem Schreckreiz präsentiert. Jeder der 6 Stimuli-Blöcke beinhaltete also einen Schreckreiz ohne Präpuls und 5 Schreckreize, denen jeweils 5 unterschiedlich laute Präpulse vorangingen. Die Reihenfolge dieser Stimuli war innerhalb eines Blockes pseudorandomisiert, der Interstimulus-Intervall betrug 20 s. Insgesamt dauerte der PPI-Versuch für jedes Tier 20 Minuten. Nach jedem Durchgang wurde der Zylinder gereinigt.

2.4.2.3. Auswertung Präpulsinhibition

Der Bewegungssensor der Platte, auf der die Zylinder mit dem Versuchstier befestigt waren, zeichnete während des Experimentes die Bewegungen (d. h. die Schreckreaktion auf den Schreckreiz) des Tieres auf und wandelte sie in Spannungsschwankungen um. Diese wurden vom Programm für die spätere Auswertung gespeichert.

2.4.2.4. Apparatur Offenfeld-Test

Direkt im Anschluss an den PPI-Test, wurden die Testtiere einzeln und ohne erneute pharmakologische Behandlung in die Offenfeld-Apparatur gesetzt. Dieses bestand aus einer Box (49,5 cm × 49,5 cm × 41,5 cm) mit durchsichtigen Wänden und keiner Deckplatte. In dieser Apparatur konnte sich das Versuchstier frei bewegen. Die Wände der Apparaturen waren mit Infrarot-Lichtschranken (Abstand von 16 mm) ausgestattet (TSE Systems, Bad Homburg, Deutschland). So konnte zu jedem Zeitpunkt bestimmt werden, wo sich das Versuchstier innerhalb der Apparatur aufhält. Die Lichtschranken deckten nicht nur die x- und y-Achse, sondern auch die z-Achse ab, sodass auch das Aufrichte-Verhalten der Tiere quantifiziert werden konnte.

2.4.2.5. Zeitlicher Ablauf Offenfeld-Test

Insgesamt wurde das Verhalten der Tiere 30 Minuten lang im Offenfeld aufgezeichnet.

2.4.2.6. Auswertung Offenfeld-Test

Die TSE Pheno Master Software registrierte die Daten der Infrarotsensoren und errechnete daraus die zurückgelegte Distanz der Maus, die Zeit im Zentrum der Apparatur, sowie die Anzahl der Aufrichtungen (engl. *Rearing*). So konnte mithilfe dieses Experimentes einerseits

die generelle motorische Aktivität des Tieres quantifiziert werden, aber auch die Tendenz des Tieres, sich im Zentrum der Apparatur aufzuhalten. Diese Tendenz ist ein Maß dafür, wie verängstigt bzw. neugierig das Versuchstier ist.

Auch diese Apparatur wurde nach jedem Durchgang gereinigt.

2.5. c-Fos-Immunhistochemie

2.5.1. Zeitlicher Ablauf und Durchführung c-Fos-Immunhistochemie

Von den 26 Testtieren, die behandelt wurden, aber keine Verhaltenstests absolvierten, wurden Gehirnschnitte angefertigt (Abb. 3).

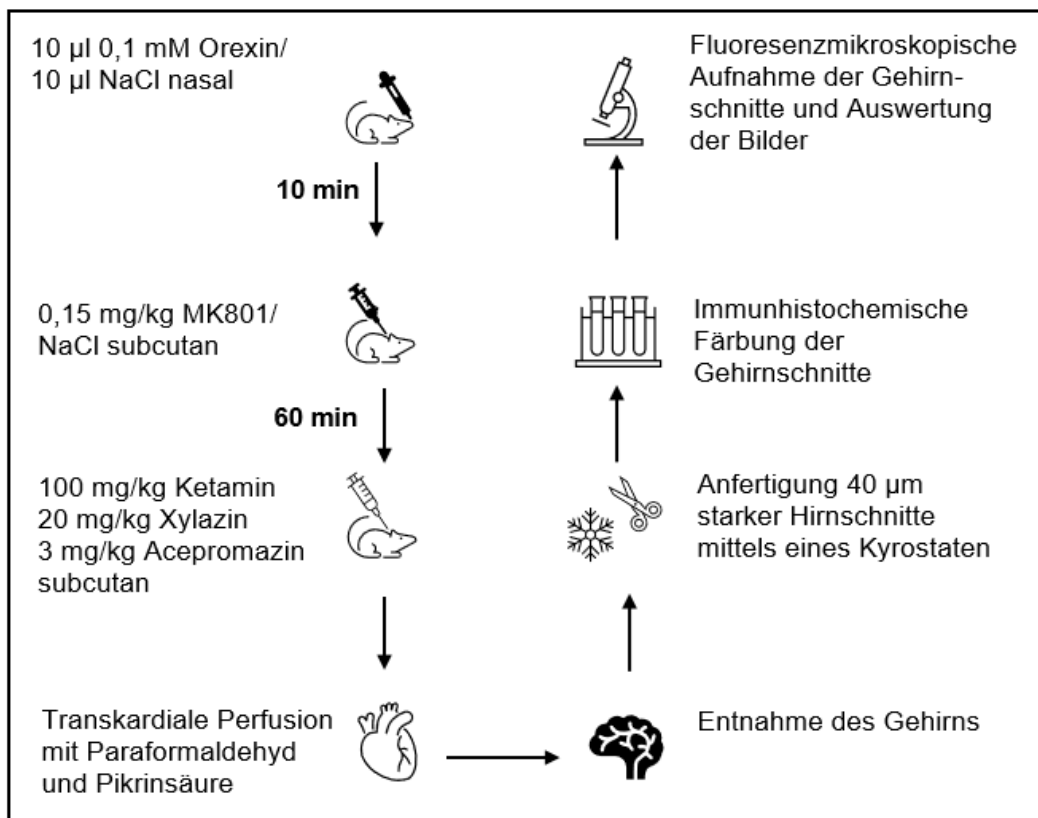


Abbildung 3 - Schematische Darstellung der Anfertigung der Gehirnschnitte

Die Testtiere wurden zuerst nasal mit Orexin oder Saline behandelt, gefolgt von einer subkutanen Injektion mit MK801 oder Saline 10 Minuten später. Nach weiteren 60 Minuten wurden die Tiere mit Ketamin, Xylazin und Acepromazin betäubt, gefolgt von einer transkardialen Perfusion mit Paraformaldehyd und Pikrinsäure. Anschließend wurden die Gehirne entnommen, tiefgefroren und im Kryostaten geschnitten. Daraufhin erfolgte die immunhistochemische Färbung sowie die Mikroskopie der Gehirnschnitte.

Die Tiere wurden analog zu den Verhaltenstests als erstes nasal mit Orexin oder Saline behandelt. 10 Minuten später erfolgte die subkutane Injektion mit MK801 oder Saline.

Nach weiteren 60 Minuten erfolgte die Betäubung mit Ketamin (100 mg/kg) als Injektionsanästhetikum, Xylazin (20 mg/kg) als Sedativum und Muskelrelaxans sowie Acepromazin (3

mg/kg) als Neuroleptikum mit starken sedativen Eigenschaften. Im Anschluss daran wurden die Tiere transkardial perfundiert (Abb. 4) – zuerst mit Saline, bis die Tiere blutleer waren, anschließend mit Zamboni-Fixationslösung (4% Paraformaldehyd, 0,2% 0,1 M Pikrinsäure-Lösung; genauere Informationen siehe Anlagen).

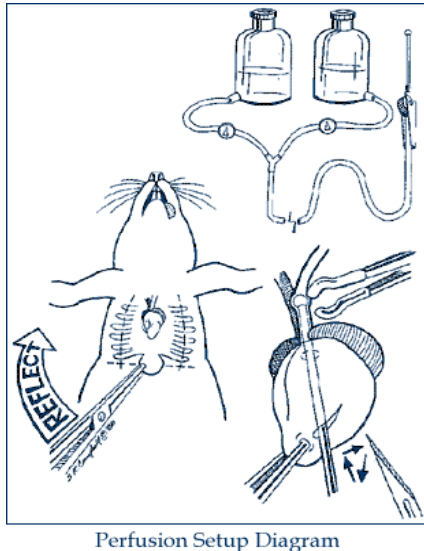


Abbildung 4 - Schematische Darstellung des Perfusionsablaufs

(Quelle: <https://www.neuroscienceassociates.com/instructions/perfusion-protocol/>, zuletzt gesehen 18.02.24 09:46)

Nach erfolgreicher Perfusion wurden die Gehirne der Mäuse entnommen und einzeln für 24 Stunden in Zamboni-Lösung bei Raumtemperatur, anschließend in Sucrose-Lösung im Kühlschrank zwischengelagert. Für die darauffolgenden Schritte wurde das Gehirn tiefgefroren und im Kryostaten (Typ CM1950, Leica; Wetzlar, Deutschland) in 40 µm starke Scheiben geschnitten.

Im Weiteren erfolgte die Immunhistochemie mit c-Fos (Verdünnung 1/2000, Anti-c-Fos Polyclonal Rabbit Affinity Purified, Synaptic Systems GmbH, Göttingen, Deutschland) als Primär-Antikörper, Anti-rabbit Biotin (Verdünnung 1/1000; Dianova, Hamburg, Deutschland) als Sekundär-Antikörper und Streptavidin Cy3 (Verdünnung 1/1000; Invitrogen – Life Technologies, Eugene, Oregon, USA) als Tertiär-Antikörper für die Farbreaktion. Das gesamte Protokoll der Immunhistochemie inklusive der Wasch- und Inkubationsschritte ist den Anlagen zu entnehmen.

Danach wurden die Gehirnschnitte mithilfe einer aufsteigenden Ethanolreihe entwässert und mit Rotihistol entfettet. Anschließend wurden die Schnitte auf gelatinierte Objektträger aufgezogen, in DPX eingebettet, mit einem Deckglas versehen und im Kühlschrank bei 4 °C aufbewahrt. Die Kryostatschnitte wurden im Anschluss mit einem Fluoreszenzmikroskop (Typ DFC7000GT, Leica) bei 10-facher Vergrößerung mikroskopiert und die Aufnahmen als JPG-Datei gespeichert.

2.5.2. Auswertung c-Fos-Immunhistochemie

Für die Auswertung dieser Dateien wurde ein Programm genutzt, welches in Kooperation mit dem Informatiker Jonas Mucke selbst geschrieben wurde. Dieses System war in der Lage, die Farbmarkierungen der Immunhistochemie in einem ausgewählten Bereich des Gehirns zu zählen, sodass die Hirnaktivität bestimmter Areale quantifiziert werden konnte.

Das Programm wurde in der Programmiersprache Python geschrieben und verfügt über eine grafische Benutzeroberfläche, die es dem Anwender ermöglicht, die mikroskopischen Bilder einzulesen und bestimmte Areale im Gehirn zu markieren. Die Areale sind rechteckig, wobei die Abmessungen des Rechtecks pixelgenau eingestellt werden können. Durch die Anwendung von Bildbearbeitungstechniken werden diese markierten Areale analysiert, während die verschiedenen Schritte der Analyse dem Anwender angezeigt werden, um die Transparenz des Zählprozesses zu erhöhen. Am Ende des Prozesses werden dem Anwender die erkannten markierten Zellen, mittels eines lila-farbenen Rahmens um die Zellen, sowie die ermittelte Anzahl der markierten Zellen angezeigt. Der Anwender hat die Möglichkeit, diese Zahl manuell zu korrigieren (ggf. bei vielen überlappenden Zellen in der mikroskopischen Aufnahme, die das Programm als einen zusammenhängenden Komplex erkennt), bevor die Daten in eine CSV-Datei exportiert werden.

Zu Beginn der Verwendung des Programms steht das Einlesen des Bildes. Anschließend wird das Bild bearbeitet, um die Zellen leichter erkennen zu können. Der erste Bearbeitungsschritt ist die Umwandlung des Bildes in Graustufen. Dies geschieht basierend auf den verschiedenen Farbkanälen, da die markierten Zellen eine gelbliche Färbung haben, die sich stark von dem rot-schwarzen Hintergrund unterscheidet. Nach der Umwandlung in Schwarz-Weiß wird das Bild mit verschiedenen Bildfiltern bearbeitet. Um das Rauschen zu reduzieren wird ein Gauß-Filter eingesetzt, während ein Schärfe-Filter die Kanten betont und so die Objekterkennung im nächsten Schritt erleichtert.

Als nächstes wird das Bild ein letztes Mal gefiltert, sodass alle Pixel unter einem bestimmten Farbwert als "nicht markiert" und alle Pixel über diesem Farbwert als "markiert" gekennzeichnet werden. Zuletzt wird ein Inselerkennungsalgorithmus verwendet, der die Anzahl der disjunkten Objekte im Bild erkennt. Dies ist die Anzahl der erkannten Zellen.

Bei allen Filtern werden anpassbare Parameter genutzt, welche der Anwender stets selbstständig einstellen kann, um bessere Ergebnisse zu erzielen. Dabei können die Stärke und Kernelgröße des Gauß-Filters, des Schärfe-Filters und der "nicht markiert"/"markiert"-Schwelle eingestellt werden.

2.6. Statistik

Die statistische Betrachtung der vorliegenden Daten wurde mit GraphPad Prism (Version 8, GraphPad Software Inc., Chicago, IL, USA) und Systat (Systat Software GmbH, Frankfurt am Main, Deutschland) durchgeführt. Bei der Analyse der Experimente fanden vor allem die multifaktoriellen Varianzanalysen und als Post-Hoc-Tests der Uncorrected Fisher LSD Test oder der Tukey's Multiple Comparison Test Anwendung. Die Faktoren der Varianzanalyse sowie die Art des Post-Hoc-Tests werden bei der Auswertung unter jedem Experiment gesondert erläutert. Die Überschreitungswahrscheinlichkeit (p-Wert) wurde durchgehend auf $p < 0,05$ festgelegt.

3. Ergebnisse

3.1. Sozialverhalten-Test

3.1.1. Sozialverhalten-Test – Phasenübergreifende Betrachtung

Dieser Test diente der Beobachtung des Sozialverhaltens der Testtiere unter verschiedenen pharmakologischen Behandlungen. Im Folgenden werden die einzelnen Phasen des Experimentes (Habituationsphase, Sozialverhalten-Phase und Wiedererkennungsphase) nacheinander ausgewertet, jeweils im Hinblick auf die Erkundungszeiten und das Verhältnis der *Stranger*-Käfigbesuche. Die männlichen und weiblichen Tiere werden hier und auch in den nachfolgenden Diagrammen getrennt dargestellt und ausgewertet.

Abbildung 5 zeigt die Habituationsphase des Sozialverhalten-Tests mit den Erkundungszeiten in Abhängigkeit von pharmakologischen Behandlungen (Abb. 5A – männliche Testtiere; Abb. 5C – weibliche Testtiere) und das Verhältnis der Käfigbesuche in Abhängigkeit von den Behandlungen (Abb. 5B - männliche Testtiere; Abb. 5D – weibliche Testtiere).

Die Erkundungszeit (in Sekunden) ist als gesamte Aufenthaltsdauer der Nasenspitze des Testtieres in den Zonen um die kleinen Käfige mit den *Strangers* definiert. Die drei Phasen des Experimentes sind im folgenden Text mit Abkürzungen versehen – die Gewöhnungsphase (h1 und h2), die Sozialverhalten-Phase (s1 und s2) und die Wiedererkennungsphase (r1 und r2). Die Beschriftung mit der Zahl 1 steht für die Daten des Käfigs mit dem ersten *Stranger* (im Diagramm durch einen einfarbigen Balken dargestellt), während die Beschriftung mit der Zahl 2 für die Daten des Käfigs mit den zweiten *Stranger* (im Diagramm durch einen gestrichelten Balken dargestellt) steht.

Eine multifaktorielle Varianzanalyse (engl. analysis of variance, ANOVA) der Erkundungszeiten mit den Faktoren Geschlecht, Phase, Käfig und Behandlung über die Phasen hinweg zeigte einen Haupteffekt für das Geschlecht ($F_{1,7} = 6,38$; $p = 0,04$). Die weiblichen Mäuse erkundeten signifikant mehr als die männlichen Mäuse. Auch die Phase des Experimentes hatte einen signifikanten Effekt auf die Erkundungszeit ($F_{2,14} = 8,56$; $p = 0,004$), welcher jedoch nicht geschlechtsabhängig war ($F_{1,12} = 0,56$; $p = 0,58$). Während die Orexin-Behandlung keinen statistisch relevanten Einfluss auf die Erkundungszeit zeigte ($F_{1,7} = 0,17$; $p = 0,70$), reduzierte die Behandlung mit MK801 geschlechtsunabhängig das Erkundungsverhalten ($F_{1,7} = 23,57$; $p = 0,002$) und zeigte dabei keine Interaktion mit dem Geschlecht ($F_{1,7} = 2,62$; $p = 0,15$). Die Interaktion der Faktoren MK801-Behandlung und Käfige zeigte jedoch einen Trend ($F_{1,7} = 5,25$; $p = 0,056$) zur Interaktion mit den Käfigen, was darauf hinweist, dass MK801 das Sozialverhalten reduzierte.

Eine zusätzliche Möglichkeit, das vorliegende Experiment auszuwerten, greift auf die Verhältnisse der Käfigbesuche zurück. Das Verhältnis der Käfigbesuche ist das Verhältnis der Erkundungszeiten an den beiden Käfigen und stellt ein Maß dar, inwiefern sich das Testtier häufiger am Käfig mit dem ersten *Stranger* oder am Käfig mit dem zweiten *Stranger* aufgehalten hat. Dieses Verhältnis kann Werte von -1 bis 1 annehmen, wobei ein Wert von 1 bedeuten würde, dass sich das Testtier ausschließlich am Käfig, der ab der zweiten Phase mit dem ersten *Stranger* besetzt wird, aufgehalten hat und ein Wert von -1 bedeuten würde, dass das Testtier ausschließlich am Käfig war, der ab der dritten Phase mit dem zweiten *Stranger* besetzt wird. Ein Wert von 0 bedeutet, dass sich das Testtier gleich häufig an beiden Käfigen aufgehalten hat. Unter Kontrollbedingungen wäre in der Habituationsphase einen Wert um 0 erwarten, in der Sozialverhalten-Phase einen deutlich positiven Wert und in der Wiedererkennungsphase einen deutlich negativen Wert.

Eine dreifaktorielle ANOVA der Verhältnisse der Käfigbesuche über die Phasen hinweg zeigte keinen Haupteffekt für das Geschlecht ($F_{1,7} = 0,27$; $p = 0,62$). Jedoch hatte die Phase des Experimentes einen signifikanten Effekt auf das Verhältnis ($F_{2,14} = 7,73$; $p = 0,005$), welcher jedoch nicht geschlechtsabhängig war ($F_{1,12} = 1,39$; $p = 0,28$). Während Orexin, MK801 sowie deren Interaktion keinen statistisch relevanten Einfluss auf die Verhältnisse zeigten, wurde für MK801 phasenabhängig ein Effekt gefunden ($F_{2,14} = 3,76$; $p = 0,049$).

Wurde diese Analyse für die beiden Geschlechter getrennt durchgeführt, zeigte sich, dass die Phasen einen signifikanten Einfluss auf die Verhältnisse der Käfigbesuche der männlichen Testtiere hatten ($F_{1,76; 10,58} = 5,89$; $p = 0,02$). Dieser Einfluss war bei den weiblichen Tieren nicht zu beobachten ($F_{1,96; 11,74} = 0,83$; $p = 0,46$). Der Faktor Behandlung sowie die Interaktion zwischen der Phase und der Behandlung erreichte bei beiden Geschlechtern nicht das Signifikanzniveau ($F_s < 1,33$; $p_s > 0,29$).

Um den genauen Effekt der beiden Behandlungen zu analysieren, wurden im Folgenden Post-hoc-Tests (Uncorrected Fisher LSD) für jede Phase und für die Geschlechter getrennt durchgeführt.

3.1.2. Sozialverhalten-Test – Habituationsphase

In einer ANOVA mit den Faktoren Geschlecht, Orexin-Behandlung und MK801-Behandlung wurden in der Habituationsphase erwartungsgemäß keine Haupteffekte auf das Verhältnis der Käfigbesuche oder Interaktionen nachgewiesen.

Bei den männlichen Testtieren (Abb. 5A) verbrachten in der Habituationsphase die Kontrollgruppe und die Tiere, die nur Orexin bekommen hatten, annähernd gleich viel Zeit an den beiden Käfigen wie nach der Kontrollbehandlung mit Saline ($t(h1) = 0,56$; $p(h1) = 0,59$; $t(h2) = 0,19$; $p(h2) = 0,86$). MK801 verringerte die Explorationszeit gegenüber der Kontrollgruppe ($t(h1) = 1,29$; $p(h1) = 0,24$; $t(h2) = 0,93$; $p(h2) = 0,39$), die Kombination mit Orexin reduzierte sie um ein weiteres, sodass sie eine statistische Signifikanz erreichte ($t(h1) = 2,60$; $p(h1) = 0,04$; $t(h2) = 6,45$; $p(h2) = 0,0007$). Alle Gruppen verbrachten unabhängig von der pharmakologischen Behandlung ähnlich viel Zeit am ersten wie am zweiten Käfig (siehe Verhältnis Käfigbesuche, Abb. 5B).

Auch bei den weiblichen Mäusen (Abb. 5C) zeigte sich in der Habituationsphase kein Unterschied in der Erkundungsdauer zwischen der Kontrollgruppe und der Gruppe mit nasaler Orexin-Behandlung ($t(h1) = 2,19$; $p(h1) = 0,07$; $t(h2) = 0,89$; $p(h2) = 0,43$). Signifikant waren jedoch die Reduktion der Dauer durch MK801 allein ($t(h1) = 2,91$; $p(h1) = 0,03$; $t(h2) = 2,89$; $p(h2) = 0,03$) und Orexin und MK801 zusammen ($t(h1) = 2,86$; $p(h1) = 0,03$; $t(h2) = 3,42$; $p(h2) = 0,01$) im Vergleich zur Kontrollgruppe, sowie die Reduktion der Dauer durch MK801 allein ($t(h1) = 2,89$; $p(h1) = 0,03$; $t(h2) = 1,72$; $p(h2) = 0,14$) und Orexin und MK801 zusammen ($t(h1) = 2,48$; $p(h1) = 0,048$; $t(h2) = 1,66$; $p(h2) = 0,15$) im Vergleich zur Gruppe unter nasalem Orexin allein. Wie bei den männlichen Testtieren verbrachten die weiblichen Testtiere unabhängig von der pharmakologischen Behandlung ähnlich viel Zeit am ersten wie am zweiten Käfig (siehe Verhältnis Käfigbesuche, Abb. 5D), allerdings waren die Tiere unter dem Einfluss von MK801 signifikant weniger insgesamt an den Käfigen als die Tiere, die kein MK801 bekommen hatten ($t_s > 2,48$; $p_s < 0,05$).

Zusammenfassend spiegeln sich diese Ergebnisse in den Verhältnissen der Käfigbesuche wider. In der Habituationsphase der männlichen Testtiere (Abb. 5B) war bei allen 4 pharmakologischen Behandlungen ein ausgeglichenes Erkundungsverhalten zu beobachten ($t_s < 1,41$; $p_s > 0,21$; Vergleich mit Kontrollgruppe).

Äquivalent zeigte sich das Erkundungsverhalten der weiblichen Testtiere (Abb. 5D) ($t_s < 1,08$; $p_s > 0,32$; Vergleich mit Kontrollgruppe).

Habituationsphase (Sozialverhalten-Test)

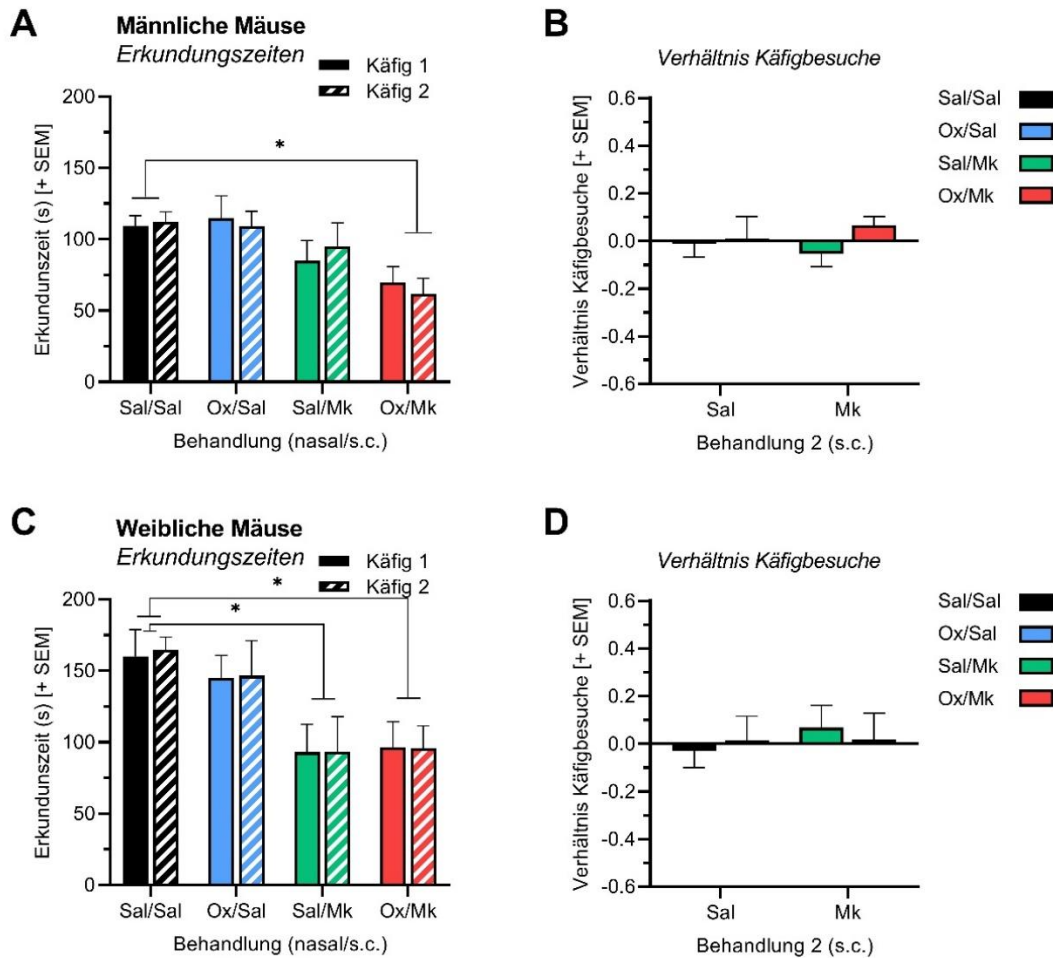


Abbildung 5 – Diagramm Habituationsphase (Sozialverhalten-Test).

Die Erkundungszeiten wurden bei beiden Geschlechtern (Abb. 5A, 5C) vor allem durch die MK801-Behandlung bei Orexin-vorbehandelten Tieren reduziert ($t > 2,60$; $p < 0,04$; Vgl. zur Kontrolle). Ebenfalls war bei beiden Geschlechtern unter allen 4 pharmakologischen Behandlungen ein ausgeglichenes Erkundungsverhalten (Abb. 5B, 5C) zu beobachten ($t_s < 1,41$; $p_s > 0,21$; Vergleich mit Kontrollgruppe) - keiner der beiden leeren Käfige wurde bevorzugt.

3.1.3. Sozialverhalten-Test – Sozialverhalten-Phase

Abbildung 6 zeigt die Sozialverhalten-Phase des Sozialverhalten-Tests mit den Erkundungszeiten in Abhängigkeit von den 4 pharmakologischen Behandlungen (Abb. 6A – männliche Testtiere; Abb. 6C – weibliche Testtiere) und das Verhältnis der Käfigbesuche in Abhängigkeit von den beiden Behandlungen (Abb. 6B - männliche Testtiere; Abb. 6D – weibliche Testtiere).

Die Analyse der Erkundungszeiten der männlichen Testtiere zeigte, dass die Kontrollgruppe und die Tiere, die nur Orexin bekommen hatten, annähernd gleich viel Zeit am ersten Käfig verbrachten ($t(s1) = 0,18$; $p(s1) = 0,86$). MK801 verringerte die Explorationszeit gegenüber der Kontrollgruppe ($t(s1) = 2,38$; $p(s1) = 0,05$), die Kombination mit Orexin reduzierte sie um

ein weiteres ($t(s1) = 5,45$; $p(s1) = 0,002$). Der zweite *Stranger*-Käfig wurde von den Tieren in der Sozialverhalten-Phase unter allen pharmakologischen Behandlungen recht gleichmäßig erkundet ($t(s2) < 1,44$; $p(s2) > 0,20$), jedoch erwartungsgemäß insgesamt weniger als der erste *Stranger*-Käfig.

Sozialverhalten-Phase (Sozialverhalten-Test)

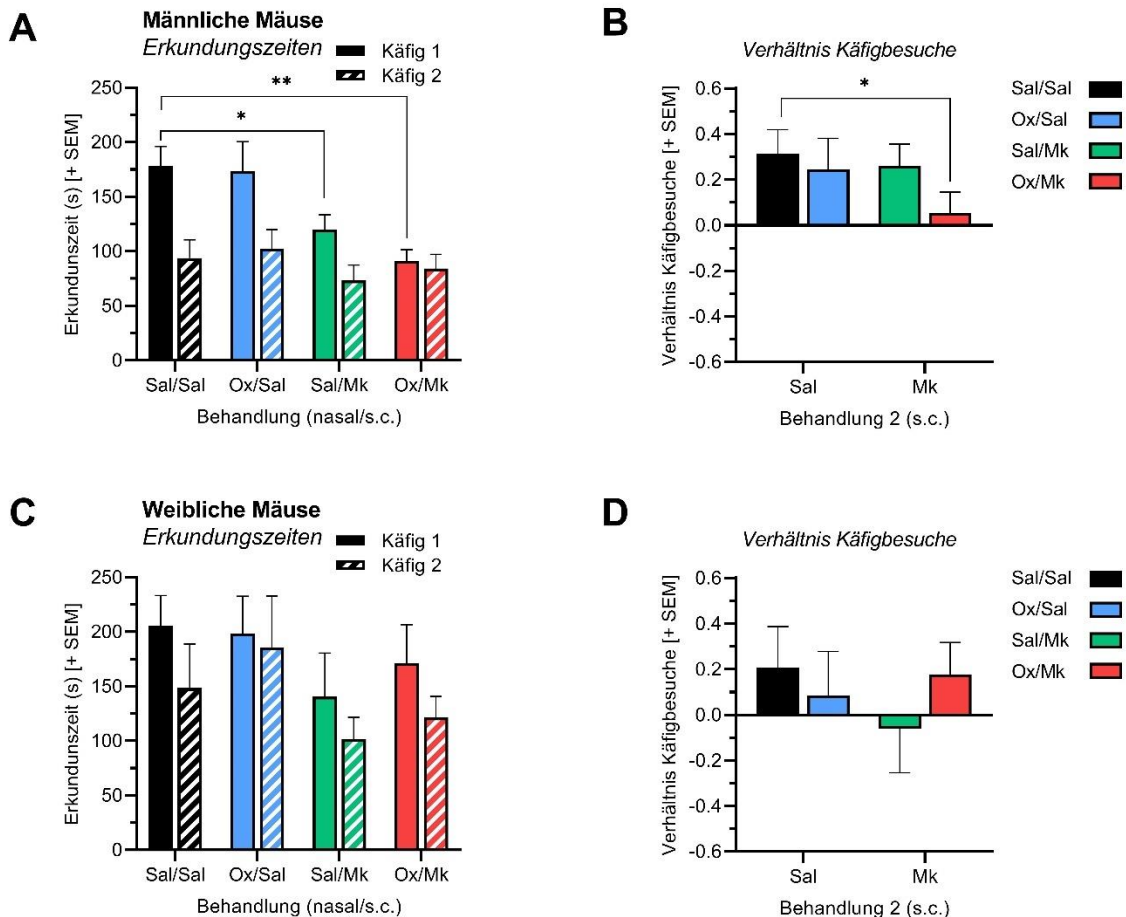


Abbildung 6 – Diagramm Sozialverhalten-Phase (Sozialverhalten-Test)

Bei den Männchen reduzierte MK801 die Erkundungszeit (Abb. 6A) am ersten *Stranger*-Käfig ($p(s1) = 0,05$; $t(s1) = 2,38$), die Vorbehandlung mit Orexin verstärkte diesen Effekt um ein weiteres ($p(s1) = 0,002$; $t(s1) = 5,45$). Das spiegelte sich auch im Verhältnis der Käfigbesuche wider (Abb. 6B) ($t = 2,48$; $p = 0,048$; Ox/Mk vs. Sal/Sal).

Bei den weiblichen Testtieren waren ähnliche Tendenzen zu sehen, jedoch nicht statistisch signifikant. Interessant war, dass die Aufenthaltsdauer der Tiere unter MK801 durch die Kombination mit Orexin geringfügig an beiden Käfigen erhöht und nicht weiter reduziert wurde.

Die Verhältnisse der Käfigbesuche wurden wieder mit einer multifaktoriellen ANOVA mit den Faktoren Geschlecht und den beiden Behandlungen ausgewertet. Für den Faktor Geschlecht wurde ein Trend gefunden ($F_{1,7} = 4,20$; $p = 0,08$), d. h. die Männchen hielten sich im Verhältnis

öfter am ersten Käfig (mit *Stranger*) als am zweiten Käfig (leer) auf, zeigten also mehr soziales Erkunden. Orexin hatte keinen Haupteffekt ($F_{1,7} = 2,49$; $p = 0,16$), auch nicht geschlechtsabhängig ($F_{1,7} = 0,20$; $p = 0,53$). MK801 bewirkte erwartungsgemäß ein signifikantes Defizit ($F_{1,7} = 8,00$; $p = 0,03$). Dieser Effekt war nicht geschlechtsabhängig und interagierte auch nicht mit Orexin ($F_s < 1,27$; $p_s > 0,29$).

Im Uncorrected Fisher LSD Post-Hoc-Test der Sozialverhalten-Phase produzierte MK801 ($t = 0,41$; $p = 0,70$) und Orexin ($t = 0,54$; $p = 0,61$) allein keine robusten Defizite bei den Männchen, die Kombination beider Pharmaka zusammen führte jedoch zu einer signifikanten Reduktion des Verhältnisses der Käfigbesuche ($t = 2,48$; $p = 0,048$).

In der Sozialverhalten-Phase der Weibchen war mit MK801 ein reduziertes Verhältnis zu erkennen, das jedoch klar über dem Signifikanz-Niveau blieb ($t = 1,04$; $p = 0,34$). Für die Orexin-Behandlung und die Kombination aus Orexin und MK801 wurden wieder höhere, jedoch nicht signifikante Verhältnisse beobachtet ($t_s < 0,44$; $p_s > 0,68$).

3.1.4. Sozialverhalten-Test – Wiedererkennungphase

Abbildung 7 zeigt die Wiedererkennungphase des Sozialverhalten-Tests mit den Erkundungszeiten (Abb. 7A – männliche Testtiere; Abb. 7C – weibliche Testtiere) und das Verhältnis der Käfigbesuche in Abhängigkeit von den beiden Behandlungen (Abb. 7B - männliche Testtiere; Abb. 7D – weibliche Testtiere).

Der Uncorrected Fisher LSD-Test zeigte bei den Erkundungszeiten der männlichen und weiblichen Testtiere bei allen Behandlungskombinationen keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Käfigen ($t_s (r1/r2) < 1,82$; $p_s (r1/r2) > 0,11$), außer der Gruppe, die Orexin und MK801 bekommen hat ($t (r2) = 2,65$; $p (r2) = 0,04$) – die Männchen erkundeten den zweiten Käfig signifikant weniger als die Kontrollgruppe. Bei den Weibchen zeigte sich hingegen eine Tendenz, dass die Behandlung mit Orexin die Erkundungszeit des zweiten Käfigs gegenüber der Kontrollgruppe und auch bei vorbehandelten MK801-Tieren erhöhte.

In der Auswertung der Verhältnisse der Käfigbesuche mit einer multifaktoriellen ANOVA wurden keine Effekte vom Geschlecht, der Behandlung mit MK801 oder Interaktionen zwischen diesen beiden Faktoren gefunden ($F_s < 1,20$; $p_s > 0,31$). Ebenso war die Behandlung mit Orexin nicht signifikant ($F_{1,7} = 1,71$; $p = 0,23$), jedoch war ein Trend für die Interaktion Orexin-Behandlung und Geschlecht zu beobachten ($F_{1,7} = 4,11$; $p = 0,08$).

Wiedererkennungsphase (Sozialverhalten-Test)

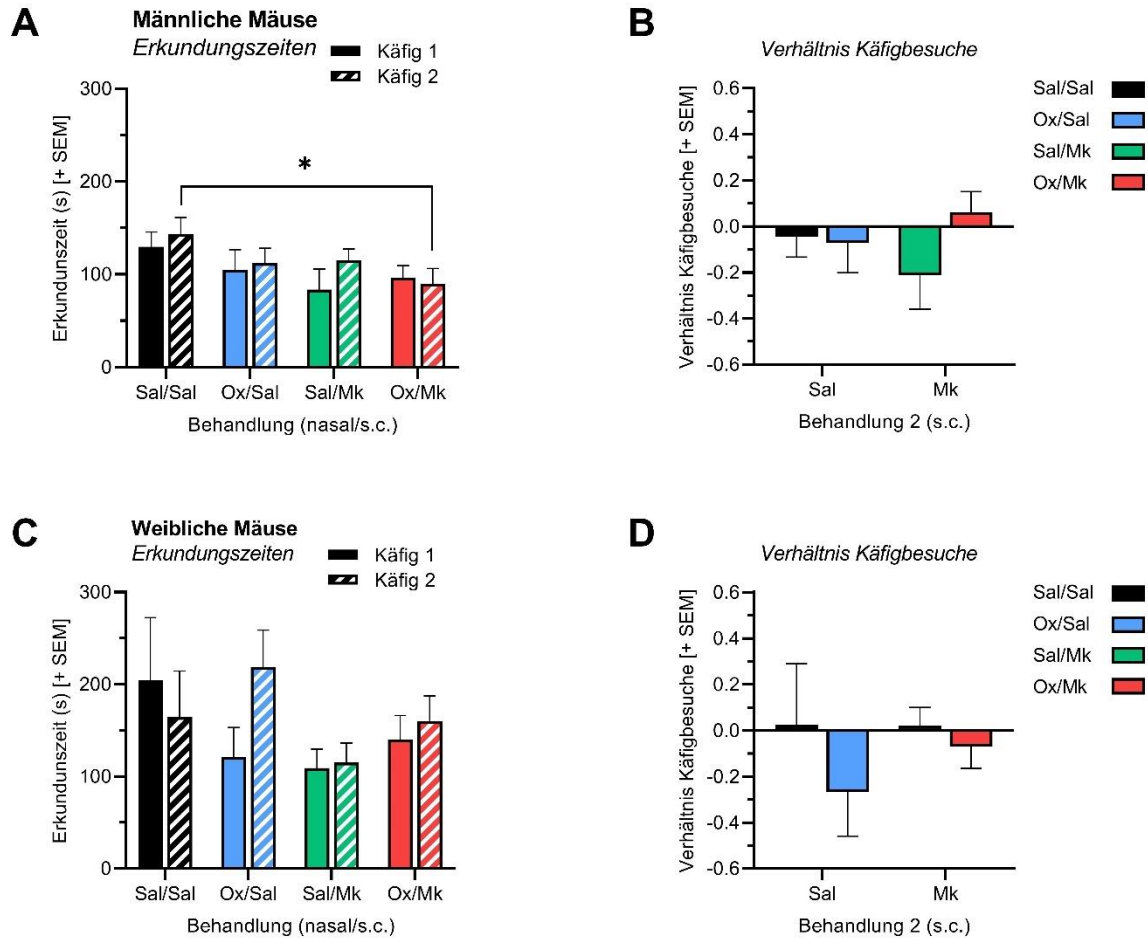


Abbildung 7 – Diagramm Wiedererkennungsphase (Sozialverhalten-Test)

Die Tiere erkundeten behandlungsunabhängig die beiden Käfige ähnlich lange ($t_s (r1/r2) < 1,82$; $p_s (r1/r2) > 0,11$) – eine signifikante Reduktion der Erkundungszeit durch eine Behandlung war nur bei den Männchen (Abb. 7A) mit der Kombination aus MK801 und Orexin gegenüber den Kontrollbedingungen nachzuweisen ($t (r2) = 2,65$; $p (r2) = 0,04$). Das spiegelte sich im Verhältnis der Käfigbesuche wider – bei beiden Geschlechtern (Abb. 7B und 7D) waren keine Behandlungsunterschiede detektierbar ($t_s < 0,93$; $p_s > 0,39$).

Im Uncorrected Fisher LSD Post-Hoc-Test der Verhältnisse in der Wiedererkennungsphase waren bei beiden Geschlechtern keine Behandlungsunterschiede detektierbar ($t_s < 0,93$; $p_s > 0,39$). Generell war jedoch in der Wiedererkennungsphase kaum zu erkennen, dass die Mäuse den Käfig mit dem zweiten *Stranger* bevorzugten. Am ehesten war eine Wiedererkennungstendenz unter Orexin ($t_s = 0,93$; $p_s = 0,39$) bei den Weibchen und unter MK801 ($t = 0,93$; $p = 0,39$) bei den Männchen zu erkennen.

3.2. Präpulsinhibitions-Test und Offenfeld-Test

3.2.1. Präpulsinhibitions-Test – Mittlere Präpulsinhibition und Präpulsinhibition bei verschiedenen Präpulsintensitäten

Bei den Tests auf Präpulsinhibition der Schreckreaktion wurde den Versuchstieren verschiedene Präpulsintensitäten präsentiert. Um den Effekt der pharmakologischen Behandlungen auf die Präpulsinhibition besser zu visualisieren, wurde die prozentuale Präpulsinhibition über alle Intensitäten gemittelt und gegen die pharmakologischen Behandlungen aufgetragen (Abb. 8A (männliche Testtiere) und 8B (weibliche Testtiere)). Abbildung 8C (männliche Testtiere) und 8D (weibliche Testtiere) zeigen die Präpulsinhibition in Abhängigkeit von der Präpulsintensität (in dB SPL über dem Hintergrundrauschen).

Eine dreifaktorielle ANOVA mit den beiden Behandlungen (Saline bzw. Orexin; Saline bzw. MK801) und dem Geschlecht als Faktoren zeigte keinen generellen Effekt des Geschlechts ($F_{1,12} = 3,26$; $p = 0,10$) auf die mittleren Präpulsinhibitionen. Orexin hatte unabhängig vom Geschlecht einen Haupteffekt auf die mittlere Präpulsinhibition ($F_{1,12} = 5,22$; $p = 0,04$). Die signifikante Interaktion zwischen Geschlecht und Orexin-Behandlung ($F_{1,12} = 8,71$; $p = 0,01$) wies darauf hin, dass bei den Männchen die mittlere Präpulsinhibition stärker durch Orexin reduziert wurde als bei den Weibchen. Die Behandlung mit MK801 reduzierte generell die mittlere Präpulsinhibition ($F_{1,12} = 33,31$; $p < 0,0001$), wobei es keine signifikante Interaktion mit dem Geschlecht gab ($F_{1,12} = 1,50$, $p = 0,24$). Ebenso wurden keine Interaktionen zwischen Orexin- und MK801-Behandlung ($F_{1,12} = 2,56$; $p = 0,14$) und beiden Behandlungen mit dem Geschlecht ($F_{1,12} = 0,09$; $p = 0,78$) gefunden.

Diese Befunde wurden durch zweifaktorielle ANOVAs, die separat für männliche und weibliche Mäuse durchgeführt wurden, bestätigt. Bei den Männchen wurden sowohl für die Orexin- als auch für die MK801-Behandlung Haupteffekte detektiert ($F_{1,6} = 8,73$, $p = 0,03$ bzw. $F_{1,6} = 195,80$, $p < 0,0001$; Abb. 8A), während bei den Weibchen die Orexin-Behandlung keinen Haupteffekt hatte ($F_{1,6} = 0,52$, $p = 0,50$) und die MK801-Behandlung nur knapp über dem Signifikanzniveau war ($F_{1,6} = 5,51$, $p = 0,057$). Bei beiden Geschlechtern interagierten die Behandlungen nicht miteinander ($F_s < 3,17$, $p_s > 0,12$).

Präpulsinhibition

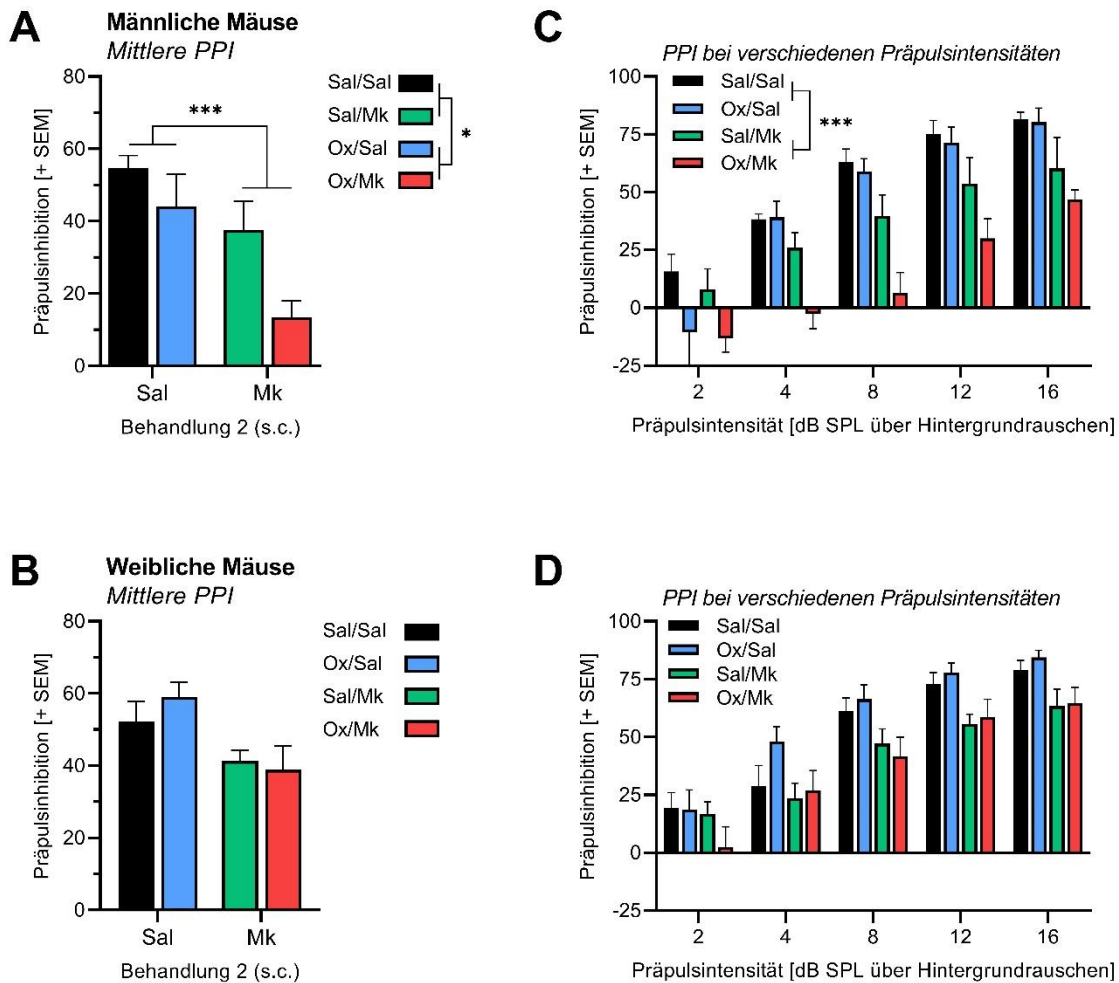


Abbildung 8 – Diagramm Präpulsinhibition – Mittlere Präpulsinhibition (A, B) und Präpulsinhibition bei verschiedenen Präpulsintensitäten (C, D)

Sowohl die Orexin- als auch die MK801-Behandlung reduzieren die Präpulsinhibition geschlechtsabhängig. Bei den Männchen waren beide Behandlungen effektiv (Orexin: $F_{1,6} = 6,81$, $p = 0,04$; MK801: $F_{1,6} = 171,80$, $p < 0,0001$), während es bei den Weibchen nur einen Trend für die MK801-Behandlung ($F_{1,6} = 5,51$, $p = 0,057$) gab und Orexin keine Effekte hatte.

Um zu untersuchen, ob die beobachteten Orexin- bzw. MK801-Effekte von den verschiedenen Präpulsintensitäten abhängig sind, wurde eine weitere ANOVA durchgeführt. Die multifaktorielle ANOVA mit den beiden Behandlungen (Saline bzw. Orexin; Saline bzw. MK801), der Präpulsintensität und dem Geschlecht als Faktoren zeigte ebenfalls keinen generellen Effekt des Geschlechts ($F_{1,12} = 3,34$; $p = 0,09$). Orexin hatte unabhängig vom Geschlecht keinen generellen Haupteffekt auf die mittlere Präpulsinhibition ($F_{1,12} = 3,95$; $p = 0,07$). Jedoch erreichte die Interaktion zwischen Geschlecht und Orexin-Behandlung das statistische Kriterium ($F_{1,12} = 7,01$; $p = 0,02$) und zeigte, dass bei den Männchen die Präpulsinhibition stärker durch

Orexin reduziert wurde als bei den Weibchen. MK801 reduzierte generell die mittlere Präpulsinhibition ($F_{1,12} = 35,79$; $p \leq 0,0001$), wobei es keine signifikante Interaktion mit dem Geschlecht gab. Die Orexin- und MK801-Behandlung interagierten ($F_{1,12} = 5,26$; $p = 0,04$), indem Orexin den MK801-Effekt verstärkte. Die Behandlungen interagierten jedoch nicht mit dem Geschlecht ($F_{1,12} = 0,46$; $p = 0,51$). Die Präpulsintensität hatte als einzelner Faktor einen signifikanten Haupteffekt ($F_{4,48} = 134,31$; $p \leq 0,0001$), zeigte aber keine statistische Interaktion mit dem Geschlecht. Jedoch erreichten die Interaktionen von Präpulsintensität und Orexin ($F_{4,48} = 2,55$; $p = 0,51$) wie auch Präpulsintensität und MK801 ($F_{4,48} = 5,07$; $p = 0,002$) das statistische Kriterium. Orexin- und MK801-Effekte waren bei höheren Präpulsintensitäten stärker ausgeprägt.

Um diese Effekte besser verstehen zu können, wurden beide Geschlechter in 2 weiteren Varianzanalysen getrennt ausgewertet. Die beiden Behandlungen und die Präpulsintensität stellten die Faktoren dieser zweifaktoriellen ANOVA dar. Wie erwartet hatte die Präpulsintensität bei den Männchen einen stark signifikanten Haupteffekt auf die Präpulsinhibition ($F_{4,30} = 53,02$; $p < 0,0001$), ebenso wie die beiden Behandlungen (Orexin: $F_{1,6} = 6,81$; $p = 0,04$; MK801: $F_{1,6} = 171,80$; $p < 0,0001$). Während die Orexin-Behandlung nicht mit der Präpulsintensität interagierte ($F_{4,24} = 1,11$; $p = 0,38$), war für MK801 eine solche Interaktion zu beobachten ($F_{4,24} = 7,17$; $p = 0,0006$), d. h. MK801-Effekte waren bei höheren Präpulsintensitäten stärker ausgeprägt.

Bei Weibchen wurde mit dieser Analyse auch ein genereller Effekt der Präpulsintensität beobachtet ($F_{4,24} = 100,50$; $p < 0,0001$) sowie ein Trend für die MK801-Behandlung ($F_{1,6} = 5,51$; $p = 0,057$). Weder die Orexin-Behandlungen noch die verschiedenen Interaktionen erreichten das Signifikanzniveau ($F_s < 3,17$; $p_s > 0,10$).

Zusammengefasst reduzierte sowohl die Orexin- als auch die MK801-Behandlung die Präpulsinhibition. Diese Behandlungseffekte waren geschlechtsabhängig. Bei Männchen waren beide Behandlungen effektiv, während es bei Weibchen nur einen Trend für die MK801-Behandlung gab und Orexin keine Effekte hatte.

3.2.2. Präpulsinhibitions-Test – Basale Schreckreaktion

Da während des Präpulsinhibitions-Tests auch die basale Schreckreaktion gemessen wurde, lassen sich auch Aussagen über die Effekte der Orexin- und MK801-Behandlungen auf die generelle Schreckhaftigkeit der Versuchstiere treffen. In Abbildung 9 sind die mittleren Schreckreaktionsamplituden der männlichen (Abb. 9A) und weiblichen (Abb. 9B) Versuchstiere in Abhängigkeit von den beiden Behandlungen dargestellt.

Schreckreaktionsamplitude

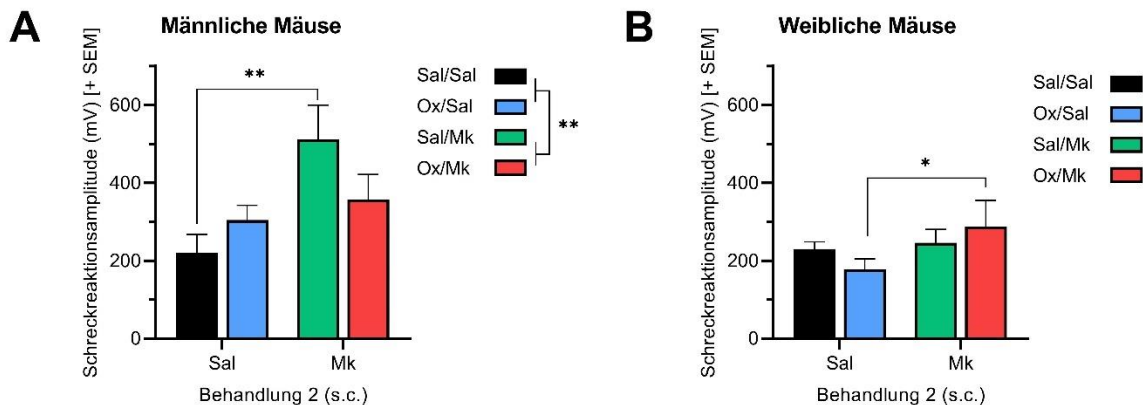


Abbildung 9 – Diagramm Schreckreaktionsamplitude

Bei den männlichen Mäusen (A) reduzierte die Orexin-Behandlung die Erhöhung der Schreckreaktion durch MK801 ($F_{1,6} = 7,36$; $p = 0,04$), während bei den weiblichen Mäusen (B) sowohl die Orexin- als auch die MK801-Behandlung keinen signifikanten Einfluss auf die Schreckreaktionsamplitude hatten.

Eine dreifaktorielle ANOVA mit den beiden Behandlungen und dem Geschlecht als Faktoren zeigte einen Trend für das Geschlecht ($F_{1,12} = 3,58$; $p = 0,08$), d. h. die männlichen Testtiere zeigten generell eine intensivere Schreckreaktion.

Orexin hatte keinen generellen Effekt und auch keine Interaktion mit dem Geschlecht ($F_s < 1,02$; $p_s > 0,33$). MK801 hingegen erhöhte generell die Schreckreaktion ($F_{1,12} = 13,31$; $p = 0,003$), wobei es keine signifikante Interaktion mit dem Geschlecht gab ($F_{1,12} = 2,82$; $p = 0,12$). Ebenso wurden keine Interaktionen zwischen Orexin- und MK801-Behandlung ($F_{1,12} = 2,05$; $p = 0,18$) gefunden. Es gab jedoch eine Interaktion zwischen den beiden Behandlungen und dem Geschlecht ($F_{1,12} = 11,31$; $p = 0,006$).

Um die Ursache dieser Interaktion zu verstehen, wurden die beiden Geschlechter auch getrennt ausgewertet. Zweifaktorielle Varianzanalysen zeigten bei den Männchen einen deutlichen Effekt von MK801 ($F_{1,6} = 18,03$, $p = 0,005$), bei den Weibchen jedoch nicht ($F_{1,6} = 1,60$; $p = 0,25$). Die Orexin-Behandlung war weder bei Männchen noch bei Weibchen signifikant ($F_s < 1,16$; $p_s > 0,32$). Interessanterweise gab es bei Männchen eine signifikante Interaktion zwischen der Orexin- und MK801-Behandlung ($F_{1,6} = 7,36$; $p = 0,04$), die bei Weibchen nur als Trend vorhanden war ($F_{1,6} = 4,26$; $p = 0,08$).

Post-hoc-Vergleiche (Sidak's Multiple Comparisons) zeigten, dass bei den Männchen ein deutlicher MK801-Effekt bei Saline-vorbehandelten Tieren zu beobachten war ($t = 4,69$; $p = 0,007$), jedoch nicht bei Orexin-vorbehandelten Tieren ($t = 0,85$; $p = 0,67$). Im Gegensatz dazu war bei Saline-vorbehandelten Weibchen kein MK801-Effekt zu detektieren ($t = 0,48$; $p = 0,88$), aber dafür bei Orexin-vorbehandelten Weibchen ($t = 3,39$; $p = 0,03$).

Zusammengefasst reduzierte bei männlichen Mäusen die Orexin-Behandlung die Erhöhung der Schreckreaktion durch MK801, während bei den weiblichen Mäusen sowohl die Orexin- als auch die MK801-Behandlung keinen Einfluss auf die Schreckreaktionsamplitude hatten.

3.2.3. Offenfeld-Test – Lokomotorische Aktivität

Die lokomotorische Aktivität der Mäuse wurde mithilfe des Offenfeld-Tests quantifiziert. Die gesammelten Daten umfassten die Bewegungsaktivität über die Zeit, die gesamte zurückgelegte Strecke, das Aufrichte-Verhalten und die Aufenthaltsdauer im Zentrum des Offenfelds.

Abbildung 10 zeigt die gesamte zurückgelegte Strecke der männlichen (Abb. 10A) und weiblichen (Abb. 10C) Testtiere sowie das Zeit-Strecken-Profil der männlichen (Abb. 10B) und weiblichen (Abb. 10D) Testtiere im Offenfeld-Test in Abhängigkeit von den beiden pharmakologischen Behandlungen.

Lokomotorische Aktivität im Offenfeld-Test

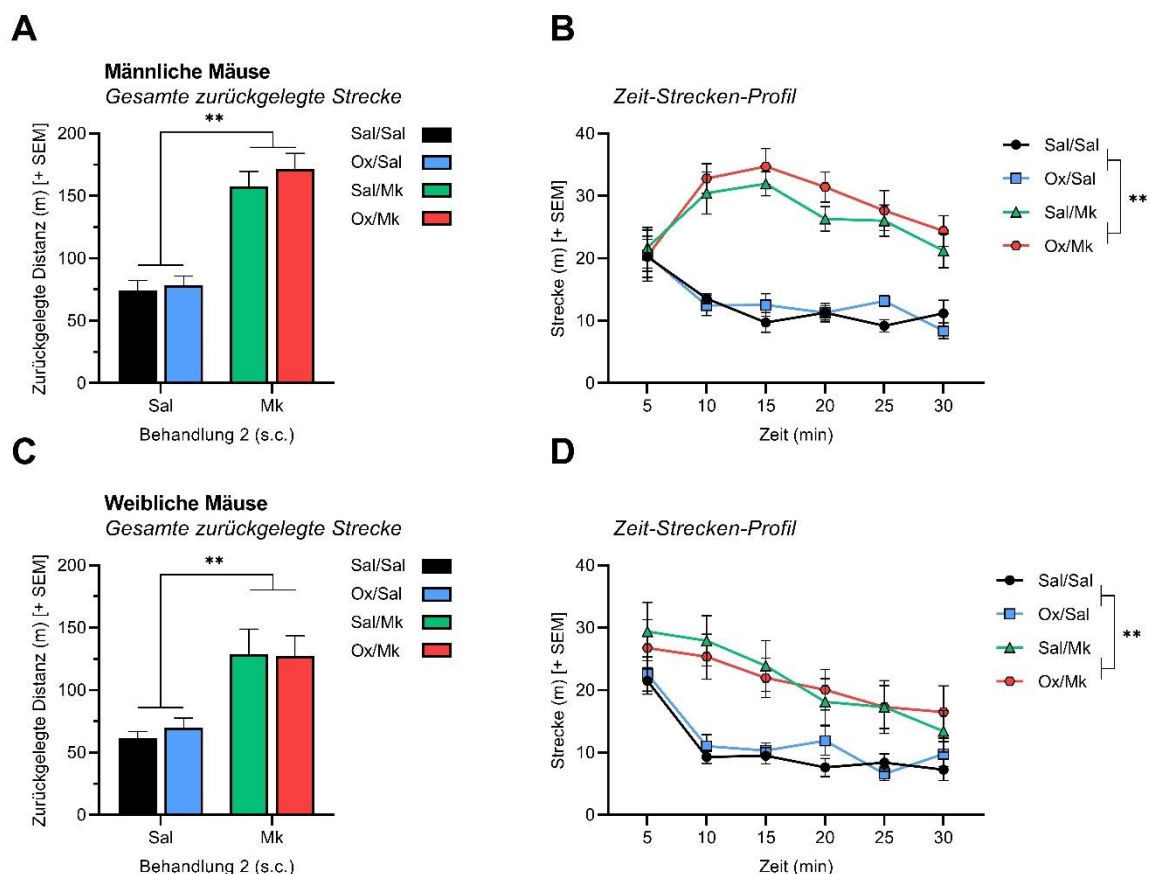


Abbildung 10 – Diagramm Lokomotorische Aktivität im Offenfeld-Test

Die lokomotorische Aktivität (A, C) wurde bei beiden Geschlechtern durch die MK801-Behandlung deutlich gesteigert ($F_s > 15,70$; $p_s < 0,008$), während die Orexin-Behandlung selbst keine Effekte hatte und auch nicht mit den MK801-Effekten interagierte ($F_s < 0,80$; $p_s > 0,40$). Das Zeit-Strecken-Profil wies Geschlechtsunterschiede auf – die Aktivität der Männchen (B) steigerte sich bei MK801-Behandlung im

Laufe des Tests ($F_{5,30} = 11,65$; $p < 0,0001$) und wurde erst in der zweiten Hälfte weniger, während bei Weibchen (D) ab Beginn unter MK801-Behandlung ein Trend zur Reduktion der Aktivität ($F_{5,30} = 1,97$; $p = 0,11$) im Zeitverlauf zu beobachten war.

Eine dreifaktorielle ANOVA mit Geschlecht und den beiden Behandlungen als Faktoren zeigte einen Trend für das Geschlecht ($F_{1,12} = 4,17$; $p = 0,06$). Die männlichen Testtiere waren durchschnittlich etwas aktiver als die weiblichen. Orexin hatte keinen Haupteffekt auf die Gesamtaktivität der Tiere ($F_{1,12} = 0,88$; $p = 0,37$) und es gab keine Interaktion von Orexin und dem Geschlecht ($F_{1,12} = 0,18$; $p = 0,68$). Die Gesamtaktivität wurde erheblich durch MK801 gesteigert ($F_{1,12} = 73,49$; $p < 0,0001$), wobei es keine signifikante Interaktion mit dem Geschlecht gab ($F_{1,12} = 2,15$; $p = 0,17$). Zudem wurden keine Interaktionen zwischen Orexin- und MK801-Behandlung ($F_{1,12} = 0,001$; $p = 0,98$) und den beiden Behandlungen mit dem Geschlecht ($F_{1,12} = 0,58$; $p = 0,46$) gefunden.

Diese Ergebnisse wurden durch getrennte zweifaktorielle Varianzanalysen für die beiden Geschlechter bestätigt. Die MK801-Behandlung hatte einen hochsignifikanten Effekt bei beiden Geschlechtern ($F_s > 15,70$; $p_s < 0,008$), während die Orexin-Behandlung keinen Effekt hatte ($F_s < 0,80$; $p_s > 0,40$) und es auch keine Interaktionen zwischen Orexin- und MK801-Behandlung gab ($F_s < 0,39$; $p_s > 0,55$).

In Abbildung 10B und D ist der Zeitverlauf der lokomotorischen Aktivität (Zeit-Strecken-Profil) der männlichen und weiblichen Testtiere dargestellt. Ausgewertet wurde die zurückgelegte Strecke in Abhängigkeit von der Zeit und den beiden pharmakologischen Behandlungen. Eine multifaktorielle ANOVA mit den Faktoren Geschlecht, Orexin-Behandlung, MK801-Behandlung und Zeit zeigte einen Trend für das Geschlecht ($F_{1,12} = 3,68$; $p = 0,08$). Die männlichen Testtiere waren durchschnittlich aktiver als die weiblichen. Orexin hatte keinen Haupteffekt ($F_{1,12} = 0,86$; $p = 0,37$) und es gab keine Interaktion von Orexin und dem Geschlecht der Tiere ($F_{1,12} = 0,17$; $p = 0,69$). MK801 zeigte einen starken Haupteffekt ($F_{1,12} = 70,27$; $p < 0,0001$), wobei es keine signifikante Interaktion mit dem Geschlecht gab ($F_{1,12} = 2,26$; $p = 0,16$). Der Faktor Zeit hatte einen signifikanten Haupteffekt ($F_{1,12} = 20,92$; $p < 0,0001$) und eine Interaktion mit dem Geschlecht ($F_{1,12} = 8,19$; $p < 0,0001$), d. h. der zeitliche Verlauf der Lokomotion zeigte Geschlechtsunterschiede. Die Behandlung mit MK801 interagierte stark mit dem Zeitverlauf der Motorik ($F_{1,12} = 8,90$; $p < 0,0001$), mit einem Trend bezüglich der Geschlechtsunterschiede ($F_{1,12} = 2,24$; $p = 0,06$). Orexin zeigte keine Interaktion mit dem Zeitverlauf ($F_{1,12} = 0,97$; $p = 0,44$) und auch keine geschlechtsabhängige Interaktion ($F_{1,12} = 0,97$; $p = 0,44$). Es wurden keine Interaktionen zwischen Orexin- und MK801-Behandlung ($F_{1,12} = 0,0001$; $p = 0,99$), den beiden Behandlungen mit der Zeit ($F_{1,12} = 1,06$; $p = 0,39$) und jeweils mit dem Geschlecht gefunden ($F_s < 0,34$; $p_s > 0,32$).

Getrennte dreifaktorielle Varianzanalysen für die beiden Geschlechter zeigten, dass sowohl der Faktor Zeit ($F_s > 5,29$; $p_s < 0,001$) als auch die MK801-Behandlung ($F_s > 14,75$; $p_s < 0,009$) einen hochsignifikanten Haupteffekt bei beiden Geschlechtern hatte, während die Orexin-Behandlung keinen Haupteffekt hatte ($F_s < 0,71$; $p_s > 0,43$). Die Interaktion von MK801-Behandlung und Zeit war nur bei den männlichen Testtieren signifikant ($F_{5,30} = 11,65$; $p < 0,0001$), bei den weiblichen Tieren nicht ($F_{5,30} = 1,97$; $p = 0,11$). Für die Orexin-Behandlung gab es bei beiden Geschlechtern keine Interaktionen mit der Zeit, ebenso keine Interaktionen zwischen den beiden Behandlungen ($F_s < 1,08$; $p_s > 0,39$). Bei den Männchen konnte jedoch ein Trend für eine Interaktion zwischen den Behandlungen und der Zeit festgestellt werden ($F_{5,30} = 2,18$; $p = 0,08$; Weibchen: $F_{5,30} = 0,55$; $p = 0,73$).

Mit Tukey's Multiple Comparisons Post-Hoc-Tests wurde im Folgenden geprüft, wie sich die beiden pharmakologischen Behandlungen genau auf das Zeit-Strecken-Profil der Testtiere auswirkten.

Bei den Männchen waren in den ersten 5 Minuten keine Substanzeffekte zu erkennen, d. h. bei allen pharmakologischen Behandlungen bewegten sich die Tiere gleich viel ($p_s > 0,97$). Nach 10 Minuten erhöhte sich dann jedoch die Aktivität der mit MK801 behandelten Testtiere, sowohl unter der Behandlung mit MK801 allein als auch unter der Kombination von Orexin mit MK801. Nach 15 Minuten wurde ein Maximum erreicht, danach fielen die 2 Kurven bis Minute 30 stetig ab, waren aber immer signifikant über der Aktivität nach Saline/Saline- oder Orexin/Saline-Behandlung ($p_s \leq 0,016$). Die Aktivität der Kontrollgruppe und der Testtiere, die nur Orexin nasal bekamen, war nicht unterschiedlich ($p_s > 0,63$). Die Tiere bewegten sich ab Minute 5 stetig weniger, ab Minute 15 blieb die Aktivität auf konstantem Level.

Die weiblichen Testtiere hatten unter jeder pharmakologischen Behandlung ihren Peak bei 5 Minuten. Danach fielen alle Kurven bis zur Minute 30 ab. Gegenüber der Saline/Saline-Behandlung und der Orexin/Saline-Behandlung hatten die Weibchen unter MK801 allein und unter MK801/Orexin von Minute 10 bis Minute 15 eine signifikant erhöhte Lokomotion ($p_s \leq 0,035$), für die MK801/Orexin-Behandlung auch in Minute 20 ($p = 0,02$), danach näherten sich die Kurven wieder an ($0,07 > p_s > 0,47$). Äquivalent zu den Männchen waren die Lokomotionskurven für Saline/Saline- und Saline/Orexin-Behandlung nicht verschieden ($p_s > 0,74$).

Zusammengefasst induzierte die MK801-Behandlung eine deutliche Steigerung der lokomotorischen Aktivität, während die Orexin-Behandlung selbst keine Effekte hatte und auch nicht auf die MK801-Effekte wirkte. Bezüglich des Zeitverlaufs des MK801-Effektes konnten Geschlechtsunterschiede festgestellt werden. Bei Männchen steigerte sich bei MK801-Behandlung die Aktivität im Laufe des Tests und wurde erst in der zweiten Hälfte weniger, während bei Weibchen von Anfang an – auch mit MK801-Behandlung – eine Reduktion der Aktivität im Laufe der Zeit zu beobachten war.

3.2.4. Offenfeld-Test – Aufenthalt im Zentrum des Offenfeldes

Abbildung 11 zeigt die prozentuale Aufenthaltszeit der männlichen (Abb. 11A) und weiblichen (Abb. 11B) Testtiere im Zentrum des Offenfeldes in Abhängigkeit von den 4 pharmakologischen Behandlungen.

Aufenthalt im Zentrum des Offenfeldes

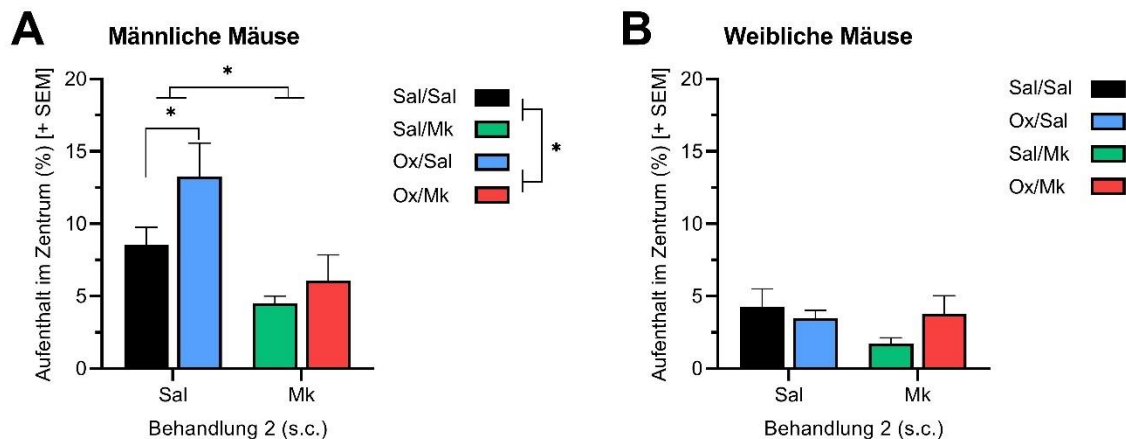


Abbildung 11 – Diagramm Zentrum-Aufenthaltszeit im Offenfeld-Test

Die Orexin- oder MK801-Behandlung beeinflusste nur bei den Männchen (A) die Aufenthaltszeit im Zentrum des Offenfeldes. Orexin erhöhte die Aufenthaltsdauer im Zentrum ($t = 2,71$; $p = 0,04$). MK801 tendierte dazu, sie zu reduzieren ($t = 2,33$; $p = 0,06$). Bei den weiblichen Testtieren (B) hatten die beiden Behandlungen keinen signifikanten Einfluss ($F_{1,6} < 3,26$; $p > 0,12$).

Eine dreifaktorielle ANOVA mit dem Geschlecht und den beiden Behandlungen als Faktoren zeigte einen Haupteffekt für das Geschlecht ($F_{1,12} = 23,61$; $p = 0,0004$), d. h. die männlichen Testtiere verbrachten unabhängig von den Behandlungen prozentual mehr Zeit im Zentrum als die weiblichen Testtiere.

Orexin erhöhte unabhängig vom Geschlecht die Aufenthaltszeit im Zentrum ($F_{1,12} = 13,18$; $p = 0,003$). Die signifikante Interaktion zwischen Geschlecht und Orexin-Behandlung ($F_{1,12} = 5,81$; $p = 0,033$) zeigt, dass dieser Effekt bei Männchen stärker ausgeprägt ist als bei den Weibchen. MK801 senkte generell die Aufenthaltszeit im Zentrum ($F_{1,12} = 8,38$; $p = 0,01$), wobei es einen Trend für eine Interaktion mit dem Geschlecht gab ($F_{1,12} = 3,74$; $p = 0,08$). Die Interaktionen zwischen Orexin- und MK801-Behandlung ($F_{1,12} = 0,01$; $p = 0,94$) und den beiden Behandlungen mit dem Geschlecht ($F_{1,12} = 2,72$; $p = 0,13$) waren nicht signifikant.

Die Geschlechtsunterschiede wurden durch eine getrennte zweifaktorielle Varianzanalyse für jedes Geschlecht bestätigt. Bei den Männchen hat sowohl die Orexin- ($F_{1,6} = 11,82$; $p = 0,01$) als auch die MK801-Behandlung ($F_{1,6} = 6,27$; $p = 0,05$) jeweils einen signifikanten Haupteffekt, die beiden Behandlungen interagieren jedoch nicht ($F_{1,6} = 1,62$; $p = 0,25$). Bei den Weibchen

erreichte weder die Orexin- noch die MK801-Behandlungen noch deren Interaktion das statistische Kriterium ($F_{1,6} < 3,26$; $p > 0,12$).

Die anschließenden Post-hoc-Tests (Two-stage linear-step procedure) zeigen, dass Orexin bei den männlichen Mäusen die Aufenthaltszeit im Zentrum gegenüber der Kontrollgruppe erhöht ($t = 2,71$; $p = 0,04$). Im Gegensatz dazu war mit MK801 ein Trend für eine reduzierte Aufenthaltszeit zu beobachten ($t = 2,33$; $p = 0,06$) und die zusätzliche Gabe von Orexin verringerte diesen Effekt nur geringfügig ($t = 0,91$; $p = 0,39$).

Zusammengefasst waren der Aufenthalt im Zentrum des Offenfeldes nur bei Männchen durch Orexin- oder MK801-Behandlung beeinflusst. Orexin erhöhte die Aufenthaltsdauer im Zentrum, MK801 reduzierte sie.

Abbildung 12 zeigt das Aufrichte-Verhalten der männlichen (Abb. 12A) und weiblichen (Abb. 12B) Testtiere im Offenfeld-Test in Abhängigkeit von den beiden pharmakologischen Behandlungen.

Aufrichtungen im Offenfeld-Test

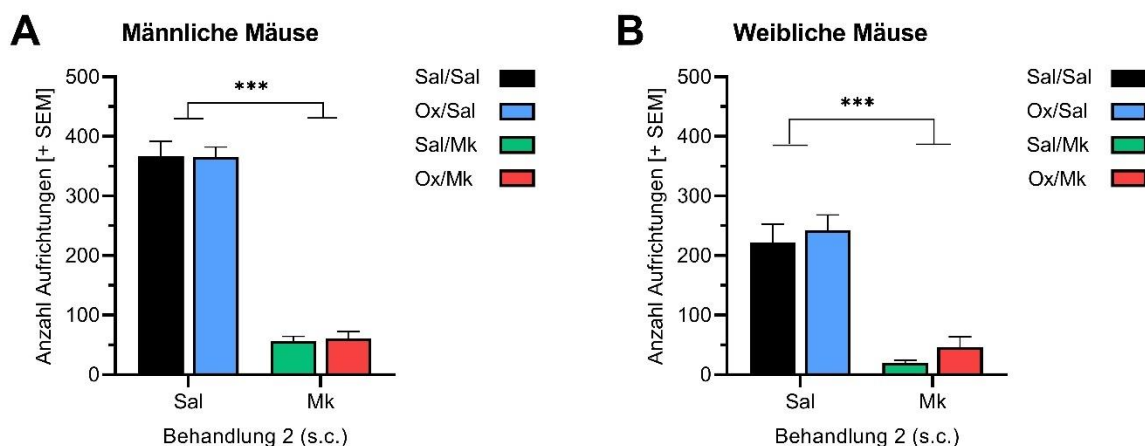


Abbildung 12 – Diagramm Aufrichtungen im Offenfeld-Test

Das Aufrichte-Verhalten im Offenfeld wurde stark von MK801 reduziert ($F_{1,12} = 335,63$; $p < 0,0001$). Dieser Effekt war bei Männchen (A) stärker ausgeprägt ($F_{1,12} = 15,33$; $p = 0,002$) als bei den Weibchen (B). Orexin hatte keine Effekte auf das Aufrichte-Verhalten ($F_{1,12} = 1,31$; $p = 0,27$).

Eine dreifaktorielle ANOVA mit Geschlecht und den beiden pharmakologischen Behandlungen zeigte einen Haupteffekt für das Geschlecht ($F_{1,12} = 22,99$; $p = 0,0004$). Die männlichen Testtiere richteten sich unabhängig von der Behandlung häufiger auf als die weiblichen Testtiere.

Orexin hatte keinen Haupteffekt auf das Aufrichte-Verhalten der Testtiere ($F_{1,12} = 1,31$; $p = 0,27$). Ebenso wurde keine Interaktion zwischen Orexin und dem Geschlecht gefunden ($F_{1,12} = 0,96$; $p = 0,35$). MK801 hingegen zeigte einen starken Haupteffekt ($F_{1,12} = 335,63$; $p < 0,0001$), der mit dem Geschlecht interagierte ($F_{1,12} = 15,33$; $p = 0,002$), d. h. besonders bei

den Männchen reduzierte MK801 die Aufrichtungen im Offenfeld. Es wurden keine Interaktionen zwischen Orexin- und MK801-Behandlung ($F_{1,12} = 0,06$; $p = 0,81$) und den beiden Behandlungen mit dem Geschlecht ($F_{1,12} = 0,0002$; $p = 0,99$) gefunden.

Zweifaktorielle Varianzanalysen für jedes Geschlecht zeigten bei beiden Geschlechtern einen signifikanten Effekt der MK801-Behandlung ($F_s > 161,30$; $p_s < 0,0001$), jedoch nicht für die Orexin-Behandlung ($F_s < 2,09$; $p_s > 0,19$) oder der Interaktion zwischen beiden Behandlungen ($F_s < 0,06$; $p_s > 0,82$).

Zusammengefasst wurde das Aufrichte-Verhalten im Offenfeld stark von MK801 reduziert. Dieser Effekt war bei Männchen stärker ausgeprägt. Orexin hatte keine Effekte auf das Aufrichte-Verhalten.

3.3. Immunhistochemie mit c-Fos

In einem separaten Experiment sollte nach den pharmakologischen Behandlungen gemessen werden, inwiefern Neurone in den Kerngebieten ventromedialer Cortex, Nucleus accumbens (Core und Shell Region) und der Amygdala aktiviert werden. Dieser Versuch stellte ein Pilot-experiment dar und wurde nur mit wenigen Versuchstieren durchgeführt, um erste Daten zu sammeln. Aufgrund der niedrigen Gruppengröße erfolgte die Auswertung nicht statistisch, sondern rein visuell bzw. deskriptiv. In den nachfolgenden Diagrammen ist die Anzahl c-Fos positiver Zellen (als Maß für die Aktivität des Kerngebiets) in Abhängigkeit von den pharmakologischen Behandlungen zu sehen. Die Kerngebiete sowie die männlichen und weiblichen Tiere werden in getrennten Diagrammen visualisiert. Aufgrund der niedrigen Versuchstierzahlen in den einzelnen Gruppen sind in den Diagrammen nicht die Mittelwerte, sondern die Einzeltierdaten eingetragen.

Im ventromedialen Cortex (Abb. 13) zeigten die männlichen Testtiere (Abb. 13A) die niedrigste Aktivität unter Kontrollbedingungen. Die alleinige Gabe von Orexin schien keine Auswirkung auf die Aktivität des Hirnareals zu haben, während die alleinige Gabe von MK801 die höchste Aktivierung in den Einzeldaten zeigte. Die Kombination aus nasalem Orexin und subkutanen MK801 schien das hohe Aktivitätsniveau unter MK801 allein zu senken.

Bei den weiblichen Testtieren (Abb. 13B) schienen die Behandlungen mit jeweils nur MK801 oder Orexin keine wesentliche Auswirkung auf die Aktivität des ventromedialen Cortex zu haben. Orexin zeigte eine reduzierende Wirkung auf die Hirnaktivität. Die Kombination aus MK801 und Orexin neigte aber dazu, eine erhöhte Aktivität der Hirnregion hervorzurufen.

Ventromedialer Cortex

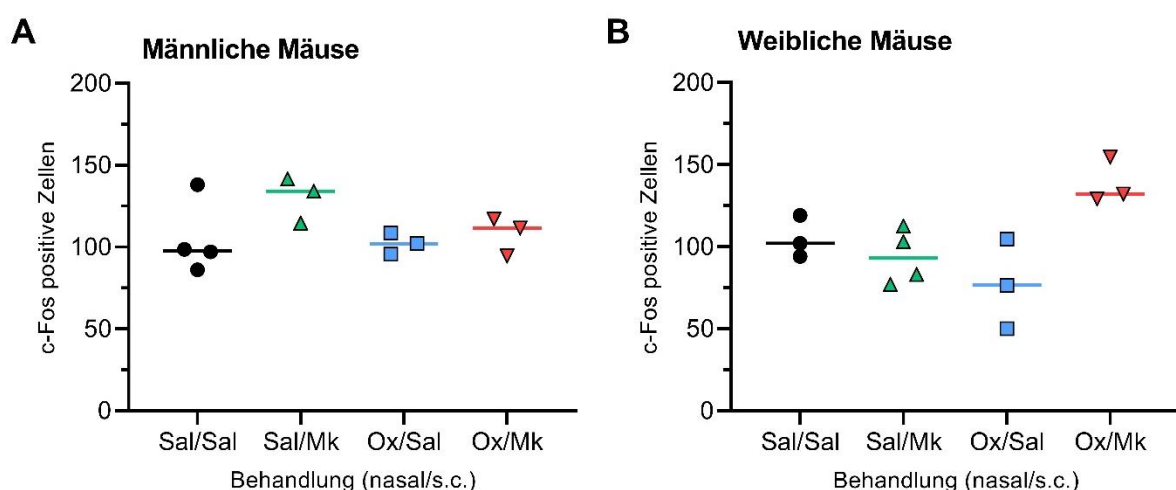


Abbildung 13 – Diagramm c-Fos positive Zellen im ventromedialen Cortex

Bei den männlichen Testtieren schien die Behandlung mit MK801 das Hirnareal am meisten zu aktivieren, während ein ähnliches Aktivitätsniveau bei den Weibchen unter der Kombination aus MK801 und Orexin zu sehen war, und MK801 allein keine Auswirkung hatte.

Im Nucleus accumbens wurden die Shell- und Core-Region getrennt ausgewertet. Dabei fiel auf, dass die Core-Region sowohl bei den männlichen als auch bei den weiblichen Testtieren generell weniger aktiv war als die Shell-Region. Des Weiteren war eine große Streuung der Einzeltierdaten in der Core-Region zu beobachten.

Die Core-Region (Abb. 14) war bei den Männchen (Abb. 14A) vor allem unter der alleinigen Gabe von MK801 aktiver. Orexin schien allein wenig Einfluss auf die neuronale Aktivität zu haben, aber in Kombination mit MK801 eine erhöhte Aktivität zu bewirken. Die niedrigste Aktivität dieser Hirnregion war unter Kontrollbedingungen zu beobachten. Die getroffenen Aussagen lassen sich für die Core-Region auch auf die weiblichen Testtiere (Abb. 14B) übertragen.

Nucleus Accumbens (Core)

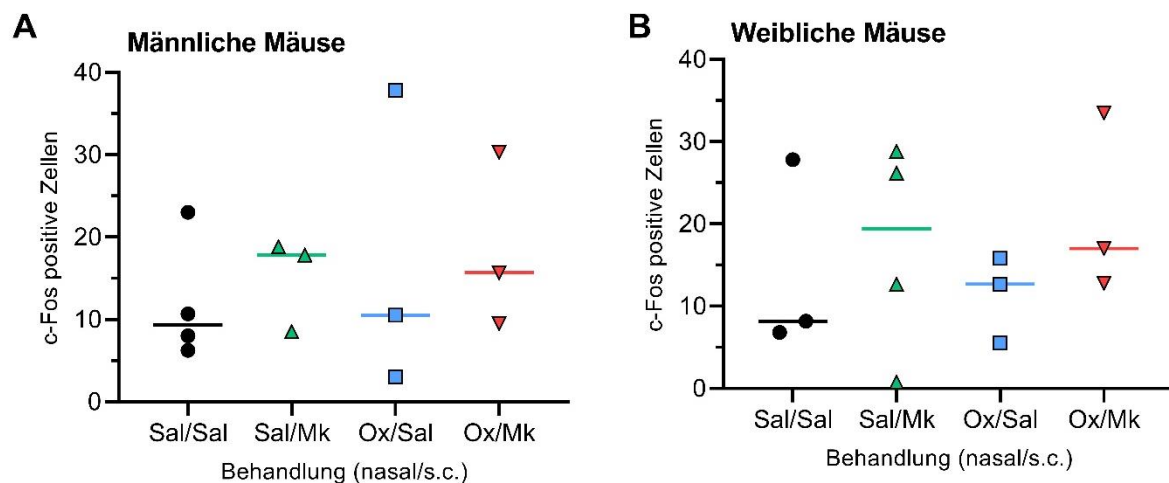


Abbildung 14 – Diagramm c-Fos positive Zellen in der Core-Region des Nucleus accumbens

Bei beiden Geschlechtern schien MK801, gefolgt von der Kombination beider Pharmaka, eine erhöhte Aktivität dieses Hirngebietes hervorzurufen.

Die Shell-Region (Abb. 15) war bei den männlichen Testtieren (Abb. 15A) unter Kontrollbedingungen am wenigsten aktiv und unter der alleinigen Gabe von MK801 am aktivsten. Orexin allein, sowie die Kombination beider Pharmaka schienen keinen Einfluss auf die neuronale Aktivität zu haben. Bei den weiblichen Testtieren (Abb. 15B) war es umgekehrt – die Hirnregion war unter Kontrollbedingungen am aktivsten und unter der alleinigen Gabe von MK801 am wenigsten aktiv. Die alleinige Behandlung der weiblichen Tiere mit Orexin zeigte eine niedrigere Aktivität des Hirnabschnittes als unter Kontrollbedingungen. In Kombination mit MK801 schien die Hirnaktivität wieder das Kontrollniveau zu erreichen.

Nucleus Accumbens (Shell)

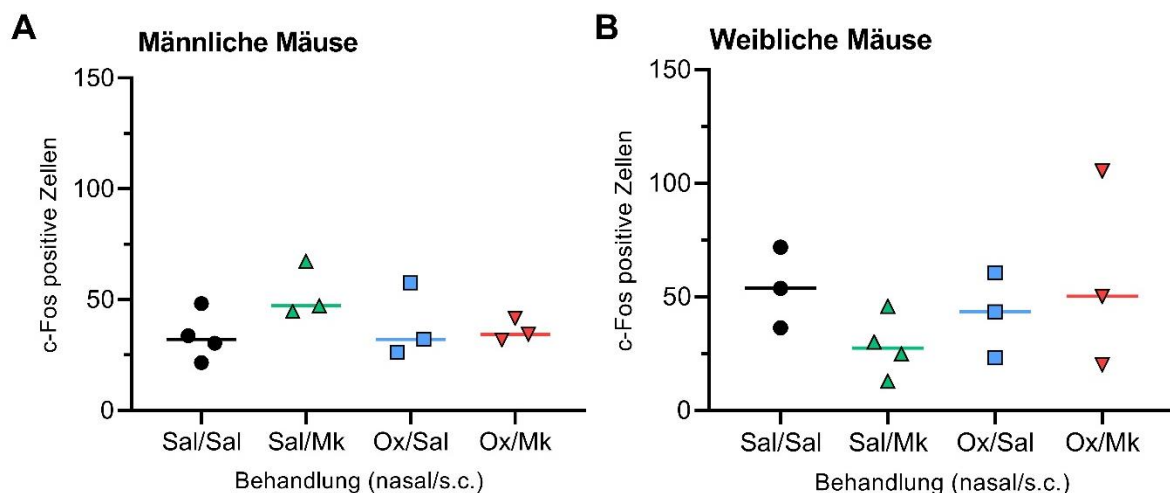


Abbildung 15 – Diagramm c-Fos positive Zellen in der Shell Region des Nucleus accumbens

MK801 schien bei den männlichen Tieren eine Erhöhung, bei den weiblichen Tieren eine Erniedrigung der neuronalen Aktivität zu bewirken. Orexin sowie die Kombination beider Pharmaka zeigten bei beiden Geschlechtern eher weniger Einfluss.

Die Amygdala (Abb. 16) war bei den Männchen (Abb. 16A) unter Kontrollbedingungen am aktivsten, während sie unter der alleinigen Gabe von MK801 am wenigsten aktiv war. Orexin allein tendierte dazu diesen Effekt nicht zu beeinflussen, bewirkte aber in Kombination mit MK801 eine Steigerung der neuronalen Aktivität, wie es auch in der Shell-Region bei den Weibchen zu beobachten war. Die Hirnaktivität der Amygdala war bei den Weibchen (Abb. 16B) unter Kontrollbedingungen und unter den alleinigen Gaben von MK801 und Orexin ähnlich hoch, während sie bei Kombination beider Pharmaka anstieg.

Amygdala

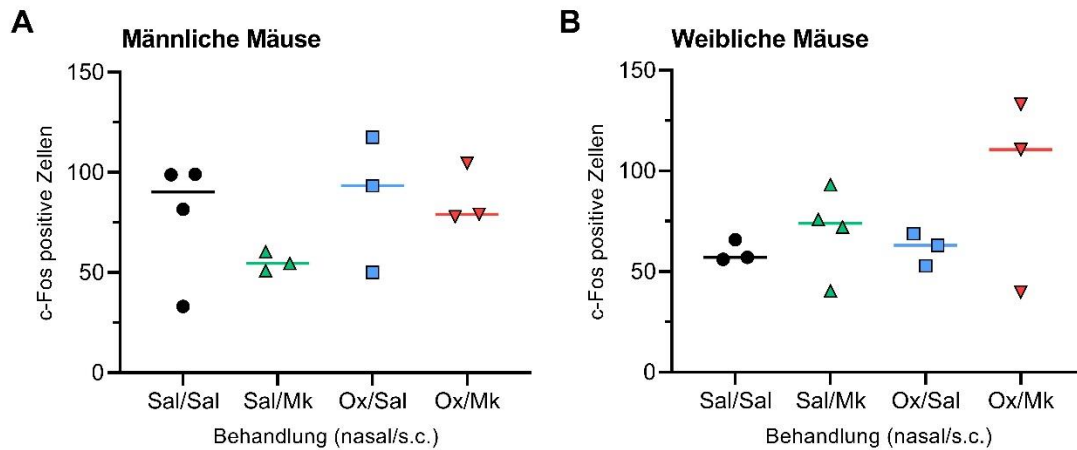


Abbildung 16 – Diagramm c-Fos positive Zellen in der Amygdala

Unter Kontrollbedingungen war die Hirnaktivität bei den Männchen am höchsten und bei den Weibchen am niedrigsten. Die Gabe von Orexin bei MK801-vorbehandelten Tieren tendierte bei beiden Geschlechtern dazu, die Aktivität zu erhöhen.

Zusammenfassend war ein Geschlechtsunterschied bei der Aktivierung der Hirnregionen festzustellen. Bei den Männchen schien MK801 die höchste Aktivität im ventromedialen Cortex und im Nucleus accumbens bzw. die geringste Aktivität in der Amygdala hervorzurufen. Orexin könnte diese Effekte antagonisieren. Bei den Weibchen hatte MK801 allein regionsübergreifend eher weniger Wirkung, aber in Kombination mit Orexin rief es eine erhöhte Aktivität hervor. In der Core Region des Nucleus accumbens war bei beiden Geschlechtern und über alle pharmakologischen Behandlungen hinweg die geringste Aktivität, im ventromedialen Cortex die höchste Aktivität zu beobachten.

4. Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurde die Hypothese überprüft, ob die subkutane Gabe von MK801 Verhaltensendophänotypen der neuropsychiatrischen Erkrankung Schizophrenie hervorrufen kann und ob diese von der nasalen Gabe von Orexin beeinflusst werden kann. Von dieser Arbeitshypothese ausgehend wurden die Mäuse verschiedenen Tests ausgesetzt, welche besagte Endophänotypen messen können.

4.1. Sozialverhalten-Test

Mit der modifizierten Version des Sozialverhalten-Tests von Crawley wurde das Sozialverhalten der Tiere untersucht (Faesel et al. 2021).

In der Habituationsphase war bei beiden Geschlechtern unter allen 4 pharmakologischen Behandlungen ein ausgeglichenes Erkundungsverhalten zwischen den beiden leeren Käfigen zu beobachten. Wie erwartet wurde keiner der beiden leeren Käfige bevorzugt erkundet. Jedoch erkundeten die Tiere geschlechtsunabhängig unter MK801 die beiden Käfige weniger als die Kontrollgruppe. Dies könnte unter anderem ein Nebenprodukt der Hyperaktivität sein, die MK801 auslöst (Rung et al. 2005). Die Tiere schienen sich nicht per se von den Käfigen fernzuhalten, sondern willkürlich durch die Apparatur zu laufen. Orexin schien diesen Effekt zu beeinflussen, jedoch nicht wie erwartet, indem es die Erkundungszeit erhöhte, sondern sie bei den Männchen weiter reduzierte. Das könnte durch eine verstärkte Hyperaktivität ausgelöst werden, wodurch die Tiere noch willkürlicher handeln.

In der Sozialverhalten-Phase reduzierte MK801 erwartungsgemäß die Erkundungszeit der Männchen am ersten *Stranger*-Käfig, die Vorbehandlung mit Orexin verstärkte diesen Effekt jedoch um ein weiteres. Dieser Orexin-Effekt war auch in dieser Phase gegenteilig zu der Vermutung, dass Orexin die durch MK801 hervorgerufene Ausprägung des Endophänotyps abmildern kann. Bei den Weibchen gab es keine signifikanten Effekte, jedoch tendierte die Vorbehandlung mit Orexin dazu, den Aufenthalt am ersten *Stranger*-Käfig bei MK801-behandelten Tieren zu erhöhen, was ein Gegensatz zu den Männchen darstellt. Diese Tendenz sollte in zukünftigen Experimenten durch mehr Testtiere exploriert werden. In vorherigen Studien wie beispielsweise bei der Untersuchung der Morphologie von Orexin-Neuronen (Grafe et al. 2019), der Exploration des Orexin-Systems bei stressbedingten Veränderungen der kognitiven Flexibilität (Grafe et al. 2017) und bei der Regulierung der Nahrungsaufnahme (Freeman et al. 2021) wurden bereits ähnliche Geschlechtsunterschiede festgestellt. Die geschlechtsdimorphe Expression von Orexin könnte der Grund für diese vorliegenden Geschlechtsunterschiede sein (Grafe et al. 2019).

In der Wiedererkennungsphase erkundeten beide Geschlechter behandlungsunabhängig die beiden Käfige ähnlich lange – eine signifikante Reduktion der Erkundungszeit des zweiten Käfigs war nur bei den Männchen mit der Behandlungskombination aus MK801 und Orexin

gegenüber den Kontrollbedingungen nachzuweisen. Bei den Weibchen hingegen schien die Behandlung mit Orexin die Erkundungszeit des zweiten Käfigs gegenüber der Kontrollgruppe und auch bei vorbehandelten MK801-Tieren zu erhöhen. Die Phase sollte zeigen, ob die Tiere unter Kontrollbedingungen den zweiten Käfig bevorzugen, da sich in diesem ein Artgenosse anderer Zuchtlinie mit fremdem Geruch befand. Folglich sollten die Testtiere gegenüber dem neuen Tier eine größere Neugier zur Schau stellen als dem Artgenossen im ersten Käfig (mit ebenfalls fremdem Geruch), der vom Testtier bereits in der Sozialverhalten-Phase zuvor erkundet werden sollte. Bereits unter Kontrollbedingungen konnte diese Hypothese bei den männlichen Testtieren nicht signifikant bestätigt werden, während bei den weiblichen Tieren die gegenteilige Tendenz zu sehen war. Da sie keinen erwartungsgemäßen Kontrollbedingungen gegenübergestellt werden können, sind die Ergebnisse der pharmakologischen Behandlungen mit Orexin und MK801 als fragwürdig zu beurteilen. Bei ähnlichen Studien des Instituts für Pharmakologie und Toxikologie (Universitätsklinikum Magdeburg), in dem diese Arbeit durchgeführt wurde, wurden vergleichbare Phänomene beobachtet (Kolodziejczyk et al. 2020). In weiterführenden Studien könnte versucht werden, eine Signifikanz durch Erhöhung der Gruppengröße zu erreichen. Des Weiteren könnte das Testen verschiedener Zuchtlinien als potentielle *Strangers* erfolgsversprechend sein – wenn sich die *Stranger* im Geruch stärker voneinander unterscheiden, könnte das Testtier die beiden Käfige vermutlich leichter auseinanderhalten.

4.2. Präpulsinhibitions-Test

Kennzeichnend für die Schizophrenie ist eine defizitäre Aufmerksamkeit und Informationsverarbeitung. Als messbare Größe der sensomotorischen Filterung ist die Präpulsinhibition der akustischen Schreckreaktion sowohl bei Patienten mit diagnostizierter Schizophrenie (Braff et al. 1978) als auch in den korrelierenden Nagetiermodellen (Geyer et al. 2001) reduziert.

Für die Objektivierung dieses Endophänotyps wurde den Testtieren Schreckreize mit unterschiedlich lauten vorausgehenden Präpulsen präsentiert und die Schreckreaktion des Tieres gemessen. Bei den Kontrolltieren mit intakter Präpulsinhibition wurde erwartet, dass die Informationsüberflutung des Gehirns verhindert wird und der schwache Reiz (Präpuls) die Schreckreaktion auf den nachfolgenden Schreckreiz unterdrückt bzw. reduziert. Dieser Mechanismus ist bei der Schizophrenie durch eine abnorme Funktion des kortikostriato-thalamokortikalen Schaltkreises verändert und die Schreckreaktion der Tiere wäre dementsprechend höher zu erwarten (Geyer et al. 2001).

Auf die mittlere Präpulsinhibition hatte bei den Männchen sowohl die Orexin- als auch die MK801-Behandlung einen Haupteffekt, während bei den Weibchen die Orexin-Behandlung keinen Haupteffekt hatte und die MK801-Behandlung nur knapp über dem Signifikanzniveau war. Die Behandlung der Tiere mit MK801 reduzierte die Präpulsinhibition wie erwartet. Orexin

hingegen reduzierte, entgegen der Erwartung, die Präpulsinhibition ebenfalls und verstärkte in Kombination mit MK801 diesen Effekt bei den Männchen.

Ein Blick auf die Präpulsinhibitionen bei verschiedenen Intensitäten zeigt erwartungsgemäß geschlechter- und behandlungsübergreifend eine Zunahme der Präpulsinhibition bei steigender Präpulsintensität. Die zusammengefassten Ergebnisse und Effekte, die bereits bei der mittleren Präpulsinhibition erläutert wurden, sind hier für jede Präpulsintensität detailliert zu sehen. Bei 8 dB SPL über dem Hintergrundrauschen ist sowohl bei den männlichen als auch bei den weiblichen Tieren die größte Reduktion der Präpulsinhibition durch die Kombination von MK801 und Orexin gegenüber den Kontrollbedingungen zu sehen. Zusammengefasst waren bei den Männchen beide Behandlungen effektiv, während es bei den Weibchen nur einen Trend für die MK801-Behandlung gab und Orexin keine Effekte hatte.

Die akustisch evozierte Schreckreaktion wurde durch die Apparatur als Spannungsschwankung gemessen und als Schreckreaktionsamplitude ausgegeben. Bei den männlichen Mäusen war die Schreckreaktion unter Kontrollbedingungen minimal und unter MK801 maximal. Die Orexin-Behandlung tendierte die Erhöhung der Schreckreaktion durch MK801 zu reduzieren und zeigte an dieser Stelle erstmalig den erwünschten Effekt. Bei den weiblichen Mäusen hingegen hatte sowohl die Orexin- als auch die MK801-Behandlung keinen signifikanten Einfluss auf die Schreckreaktionsamplitude. Da verschiedene externe Einflussfaktoren bei der Amplitude der Schreckreaktion eine Rolle spielen, lassen sich durch bestimmte Modulationen in zukünftigen Experimenten gegebenenfalls auch bei den weiblichen Tieren signifikante Ergebnisse erzielen. Zum Beispiel spielt die circadiane Rhythmik eine Rolle, wobei höhere Amplituden während der Dunkelphasen erzielt werden können (Davis und Sollberger 1971). Da die Experimente für diese Studie strikt zur Hellphase stattfanden, wäre ein zukünftiger Durchgang unter gleichen Bedingungen zur Dunkelphase durchzuführen und zu überprüfen, ob die Daten aussagekräftiger werden. Auch die sensorische Umgebung ließe sich in nachfolgenden Experimenten optimieren. Hintergrundgeräusche wirken sich neben der Tonintensität des Schreckreizes ebenfalls auf die Schreckamplitude aus und sind insbesondere bei fehlender Gewöhnung einflussreich (Davis 1974). Obwohl die Tür des Testraumes während der Studie stets geschlossen war und die Apparatur prinzipiell schalldicht sein sollte, ist nicht vollständig auszuschließen, dass Störungen, beispielsweise Geräusche innerhalb des Raumes (durch das Vorbereiten nächster Experimente oder den Computer) auftraten und das Experiment beeinträchtigten. Durch eine verstärkt schallisolierte Atmosphäre der Apparaturen oder des Raumes könnten sich signifikantere Schreckamplituden erzielen lassen. Zudem wurde in einer anderen Studie gezeigt, dass auch die Beleuchtung einen Einfluss auf die Schreckreaktion hat. Wird die Schreckreaktion in der Gegenwart von hellem Licht ausgelöst, so erhöht sich die Schreckreaktionsamplitude (Walker und Davis 1997). Die Apparatur der vorliegenden Studie

war eine grundsätzlich lichtundurchlässige Box. Möglicherweise sind aber einige Boxen lichtdurchlässiger, wenn sie während des Experimentes nicht richtig geschlossen waren oder durch einen Konstruktionsfehler, was eine mögliche Fehlerquelle der Daten darstellt. Diese Fehlerquelle wäre vor zukünftigen Experimenten zu überprüfen oder mit gezielter Nutzung einer Lichtquelle für eine weitere Signifikanzsteigerung einzusetzen.

4.3. Offenfeld-Test

Ein weiterer Verhaltensendophänotyp, die Hyperaktivität, wurde mit dem Offenfeld-Test adressiert. Als objektivierbare Messwerte der Lokomotion wurde für diese Studie die gesamte zurückgelegte Strecke („lokomotorische Aktivität“) über die Zeit, die Aufenthaltszeit im Zentrum und die Anzahl der Aufrichtungen quantifiziert.

Die lokomotorische Aktivität wurde bei beiden Geschlechtern durch die MK801-Behandlung erwartungsgemäß deutlich gesteigert, während die Orexin-Behandlung entgegen der Erwartung selbst keine Effekte hatte und auch nicht mit den MK801-Effekten interagierte. Das Zeit-Strecken-Profil wies Geschlechtsunterschiede auf – die Aktivität der Männchen steigerte sich bei MK801-Behandlung im Laufe des Tests und wurde erst in der zweiten Hälfte weniger, während bei Weibchen ab Beginn unter MK801-Behandlung ein Trend zur Reduktion der Aktivität im Zeitverlauf zu beobachten war. Eine Studie aus dem Jahr 2013 untersuchte bereits die Wirkung von MK801 auf beide Geschlechter im Tiermodell und fand komplexe Unterschiede zwischen Männchen und Weibchen. Als präklinisches Modell der Schizophrenie sollten diese Unterschiede weiter untersucht werden, da sie eine Vorhersagekraft für die therapeutische Wirksamkeit von Medikamenten bieten (Feinstein und Kritzer 2013).

Die Orexin- oder MK801-Behandlung beeinflusste nur bei den Männchen die Aufenthaltszeit im Zentrum des Offenfeldes. Orexin erhöhte die Aufenthaltsdauer im Zentrum, während MK801 dazu tendierte, sie zu reduzieren. Die nasale Applikation von Orexin zeigte bei MK801-vorbehandelten Tieren eine Tendenz der Erhöhung des Aufenthalts im Zentrum. Gegebenenfalls lässt sich durch die Testung einer größeren Gruppe an Versuchstieren zukünftig eine Signifikanz erreichen. Bei den weiblichen Testtieren hatten die beiden Behandlungen keinen signifikanten Einfluss.

Das Aufrichte-Verhalten im Offenfeld wurde stark von MK801 reduziert. Dieser Effekt war bei Männchen stärker ausgeprägt als bei den Weibchen. Orexin hatte keine Effekte auf das Aufrichte-Verhalten. Dieser stark gespiegelte Effekt von MK801 auf die lokomotorische Aktivität gegenüber dem Effekt auf die Aufenthaltszeit im Zentrum und das Aufrichte-Verhalten lässt sich durch die von MK801 ausgelöste Hyperaktivität erklären und spricht nicht automatisch für einen angstauss lösenden Effekt von MK801. Die Tiere liefen vermehrt im Kreis entlang der Wände der Apparatur und stoppten nicht, um sich aufzurichten. Dieses Phänomen wurde in

dem Institut, in dem diese Arbeit durchgeführt wurde, bereits im Rahmen eines anderen Experimentes unter der Verabreichung von dem Medikament Amphetamin gesehen (Demidova et al. 2022), welches wie MK801 ebenfalls eine Möglichkeit der Modellierung der Schizophrenie bei Mäusen darstellt.

4.4. c-Fos-Immunhistochemie

Im c-Fos-Experiment wurden Testtiere im Anschluss an die pharmakologische Behandlung perfundiert und immunhistochemisch untersucht. c-Fos diente dabei als Marker für die neuronale Aktivität verschiedener Gehirnareale. Da dieser Versuch ein Pilotexperiment darstellte und daher nur mit wenigen Versuchstieren für erste Daten durchgeführt wurde, wurde auf eine Statistik verzichtet und die Auswertung erfolgte rein deskriptiv. Bei den Männchen schien MK801 die höchste Aktivität im ventromedialen Cortex und im Nucleus accumbens bzw. die geringste Aktivität in der Amygdala hervorzurufen, was eventuell durch Orexin antagonisiert wird. Bei den Weibchen hatte MK801 regionsübergreifend weniger Wirkung, wohingegen MK801 in Kombination mit Orexin eine erhöhte Aktivität hervorrief. In der Core Region des Nucleus accumbens war bei beiden Geschlechtern und über alle pharmakologischen Behandlungen hinweg die geringste Aktivität, im ventromedialen Cortex die höchste Aktivität zu beobachten. Im weiteren Verlauf sollte dieses Experiment mit weiteren Testtieren durchgeführt werden, um die gesammelten Daten zu erweitern und so möglicherweise signifikante Effekte zu erhalten. Dann könnten auch vermutete Geschlechtsunterschiede weiter untersucht werden. In fernerer Zukunft könnten diese Daten die Grundlage für humane Bildstudien bilden, indem im Vorhinein die, beispielsweise für die Therapie relevanten, Gehirnareale herausgearbeitet sein werden.

Eine Fehlerquelle in der Auswertung der fluoreszenzmikroskopischen Bilder ist das Auszählen der farbmarkierten Bereiche. Dieses Auszählen findet entweder manuell oder mithilfe eines Programmes statt. Im Institut für Pharmakologie und Toxikologie wurden in der Vergangenheit eher suboptimale Erfahrungen mit Programmen für diesen Auswertungsprozess gemacht, da die einzelnen Analyseschritte oft nicht eingesehen werden können und keine weiteren Möglichkeiten der Überprüfung des vorliegenden Ergebnisses existieren. Dazu kommt, dass sich die mit dem Fluoreszenzmikroskop aufgenommenen Bilder häufig in Helligkeit und Kontrast leicht voneinander unterscheiden und auch die Zellen teilweise überlappen. Wird ein Bild mit niedrigerem Kontrast mit gleichen Parametern ausgewertet wie ein Bild mit höherem Kontrast, erkennt das Programm gegebenenfalls einige Zellen nicht, die sonst manuell mitgezählt werden würden, und klassifiziert zusammenhängende Zellen nur als eine. Das manuelle Auszählen hingegen ist auch fehlerbehaftet, was jedoch bei sorgfältiger Aufteilung des Bildes in Quadranten zu vernachlässigen ist. Von Nachteil bei diesem Verfahren ist vor allem der Zeitaufwand, der bei vielen Versuchstieren und mehreren Hirnregionen pro Tier enorm ist.

Um die Vorteile dieser beiden Methoden zu vereinen, wurde für die Auswertung der Bilddateien der vorliegenden Studie ein Programm genutzt, welches in Kooperation mit dem Informatiker Jonas Mucke selbst geschrieben wurde und ein weiteres Ergebnis dieser Arbeit darstellt. Besagtes Programm ist in der Lage, die Farb-Markierungen der Immunhistochemie in einem ausgewählten Bereich des Gehirnes zu zählen, sodass die Hirnaktivität bestimmter Areale quantifiziert werden können. Die verschiedenen Schritte der Analyse werden dem Anwender angezeigt, um die Transparenz des Zählprozesses zu erhöhen. Bei allen Filtern werden anpassbare Parameter (Stärke und Kernelgröße des Gauß-Filters, des Schärfe-Filters und der "nicht markiert"/"markiert"-Schwelle) genutzt, welche der Anwender selbstständig für jedes Bild einzeln einstellen kann, um besseren Ergebnissen zu erzielen. Am Ende des Prozesses werden dem Anwender die erkannten markierten Zellen mittels eines farbigen Rahmens um die Zellen sowie die ermittelte Anzahl der markierten Zellen angezeigt. Der Anwender hat die Möglichkeit, diese Zahl manuell zu korrigieren (ggf. bei vielen überlappenden Zellen in der mikroskopischen Aufnahme, die das Programm als einen zusammenhängenden Komplex erkennt).

Python ist eine sehr beliebte Programmiersprache, die von einer großen Community von Entwicklern unterstützt wird und daher in diesem Kontext verwendet wurde. Es gibt viele verfügbare Bibliotheken und Tools, die für die Entwicklung von Anwendungen wie dem beschriebenen Programm nützlich sein können. So wurden zum Beispiel die Tools OpenCv und Pillow für die Bildbearbeitung, Tkinter für die plattformübergreifende Benutzeroberflächen und Pandas für die Arbeit mit CSV/tabellarischen Daten für die jeweiligen Aufgaben genutzt. Im weiteren Verlauf wären so, falls notwendig, leichter zusätzliche Features zum Programm hinzufügbare. Zudem hat Python eine sehr leserliche und einfache Syntax, die es Entwicklern erleichtert, den Code zu verstehen und zu bearbeiten. Dies kann die Wartung und Erweiterbarkeit des Programms verbessern. Ein weiterer Vorteil ist, dass Python eine große Anzahl von Bibliotheken für die Verarbeitung von Bildern und die Erstellung von grafischen Benutzeroberflächen hat, die für dieses Anwendungsgebiet sehr nützlich sind. Python ermöglicht es außerdem, das Programm plattformübergreifend zu entwickeln und auszuführen, was bedeutet, dass es sowohl unter Windows, Linux als auch MacOS genutzt werden kann. Darüber hinaus hat Python eine große Anzahl von Bibliotheken für die Datenanalyse, die es ermöglicht, die erfassten Daten einfach zu verarbeiten und zu analysieren und die Ergebnisse in einer CSV-Datei zu speichern. All diese Merkmale von Python machen es zu einer geeigneten Wahl für die Entwicklung einer Anwendung wie dem beschriebenen Programm.

Wie bei jeder Programmiersprache und jeder Entwicklungsumgebung gibt es auch bei der Verwendung von Python einige mögliche Nachteile, die je nach Kontext und Anwendungsfall variieren können. Der wohl größte Nachteil von Python ist, dass es eine interpretierte Sprache ist, was bedeutet, dass der Code erst bei der Ausführung interpretiert wird. Dies kann dazu

führen, dass die Ausführungsgeschwindigkeit langsamer ist als bei kompilierten Sprachen. In Anwendungen, in denen die Ausführungsgeschwindigkeit von entscheidender Bedeutung ist, kann dies ein Nachteil sein. Sollte das Programm also erweitert werden, um viele Bilder gleichzeitig zu analysieren, könnte der Prozess lange dauern. Da in diesem Fall die Bilder sequenziell von einem Anwender ausgewählt und markiert werden müssen, entfällt dieser Nachteil. Aufgrund der stark überwiegenden Vorteile in diesem Szenario ist Python eine sinnvolle Wahl gewesen. Das Programm verbindet die Rechenleistung eines Computers mit der Möglichkeit Schritte individuell anzupassen und ist damit ein nützliches, akkurates und zeiteffizientes Werkzeug für die Untersuchung der Zellstrukturen im Gehirn. In dem Institut, in dem diese Arbeit angefertigt wurde, kann und wird besagtes Programm bereits für weiterführende Studien zur Erforschung von neurobiologischen Prozessen auf diesem Gebiet angewendet.

4.5. Experimentübergreifende Betrachtungen

4.5.1. Pharmaka

4.5.1.1. MK801

Experimentübergreifend gibt es einige Limitationen und Ansätze für zukünftige Studien, die es an dieser Stelle zu diskutieren gilt.

Zum Beispiel könnten die Dosierungen der Pharmaka angepasst werden. MK801 löste hinreichend signifikante Defizite in den Experimenten aus, führte jedoch auch zu einer ausgeprägten Hyperaktivität. Auch niedrigere Dosierungen zeigen in anderen Studien des Magdeburger Instituts für Pharmakologie und Toxikologie bereits einen Einfluss auf bestimmte Verhaltensendophänotypen (Durairaja et al. 2023), sodass anzunehmen ist, dass auch in der vorliegenden Studie eine niedrigere Dosierung von MK801 ausreichen würde, um die erwünschten Defizite zu produzieren. MK801 ist kein vollständiges Modell, mit dem die menschliche Schizophrenie im Tier modelliert werden kann, jedoch war es experimentell klar in der Lage Störungen der sensomotorischen Filterung (Braff et al. 1978) und weitere Endophänotypen wie Hyperaktivität und reduziertes Explorationsverhalten, sowie eine erhöhte neuronale Aktivität im Nucleus accumbens hervorzurufen und hatte in diesem Experiment somit eine Abbild- und Konstrukt-Validität.

4.5.1.2. Orexin

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Rolle des Orexin-Systems bei Schizophrenie deutlich komplexer zu sein scheint als ursprünglich gedacht. Das könnte daran liegen, dass verschiedene Symptome der Schizophrenie über verschiedene Gehirnareale vermittelt werden. Zum Beispiel wird die Positiv-Symptomatik über das Striatum (N. accumbens) und die

Negativ-Symptomatik (und kognitive Symptome) vermehrt über den präfrontalen Cortex vermittelt. Die vorliegenden Ergebnisse deuten darauf hin, dass Orexin verschieden auf die MK801-Wirkung in diesen Gehirnregionen wirkt. Insgesamt scheint die Positiv-Symptomatik, wie das Präpulsinhibitions-Defizit und die Hyperaktivität, durch Orexin verstärkt zu werden. Auf die Negativ-Symptomatik hingegen, wie beispielsweise Defizite im Sozialverhalten, Angst oder geringeres Explorationsverhalten, scheint Orexin geschlechtsabhängig positive Effekte zu haben. Eine Studie des Instituts, wo diese Arbeit durchgeführt wurde, zeigte ebenfalls, dass die durch MK801-ausgelöste kognitive Symptomatik durch Orexin reduziert werden kann (Durairaja et al. 2023). In diese Richtung sind weitere Studien geplant. Beispielsweise kann ein Neuroleptikum mit Orexin kombiniert werden. Das Neuroleptikum, welches erfahrungsgemäß effektiv die Positiv-Symptomatik blockiert, wirkt jedoch eher schlecht bis gar nicht auf die negativen und kognitiven Symptome. Diese bisher nur spärliche Wirkung könnte durch die zusätzliche Nutzung von Orexin kompensiert beziehungsweise ergänzt werden.

Orexin könnte zukünftig zusätzlich sowohl in der Dosierung als auch in der Applikationsform variiert werden. In den zugrunde liegenden Experimenten zeigte Orexin an mehreren Stellen Effekte beziehungsweise Tendenzen, jedoch nicht ausschließlich wie erwartet. Bei der Schreckreaktionsamplitude und beim Zentrumsaufenthalt der Männchen wirkte Orexin erwartungsgemäß beziehungsweise zeigte die erwarteten Tendenzen. Auf die lokomotorische Aktivität und das Aufrichte-Verhalten hatte Orexin keinen Effekt. Im Sozialverhaltens-Test zeigte Orexin in der Sozialverhaltens-Phase bei den Männchen sogar den gegenteiligen Effekt. Die Tatsache, dass Orexin generell Effekte zeigt, spricht für die Wirkung der nasalen Applikationsform. Nichtsdestotrotz sind andere, teils invasivere Formen, wie die invasive Applikation durch Kanülen in die Hirnventrikel oder die chemogenetische Stimulation des Orexin-Systems möglich und sollten in Bezug auf die Wirksamkeit zukünftig auch miteinander verglichen werden. Diesbezüglich gibt es im Institut für Pharmakologie und Toxikologie bereits laufende Studien, deren bisher nur vorläufige und nicht publizierte Ergebnisse ähnliche Tendenzen zeigen. Für die benutzerfreundliche, auf den Menschen übertragbare nicht-invasive Applikationsform, bietet die nasale Verabreichung jedoch Potential und könnte zunächst mit unterschiedlichen Dosierungen getestet werden. Eine stärkere Dosis könnte die Ergebnisse, die bisher nur als Tendenzen vorliegen, bestärken. Auf der anderen Seite wäre als zukünftiger Ansatz die Testung von Orexin-Antagonisten bei den Experimenten denkbar, wo Orexin entgegen der Erwartung gewirkt hat. Mögliche duale Orexin-Rezeptorantagonisten, welche an beiden Orexinrezeptoren wirken und sedierende und hypnotische Wirkungen haben, sind beispielsweise Daridorexant, Lemborexant und Suvorexant, während Seltorexant ein selektiver Orexin-Typ-2-Rezeptor-Antagonist in der Entwicklung ist. Zusätzlich könnten die Experimente mit heterozygoten Orexin-Knockout Mäusen wiederholt werden, um zu überprüfen, ob die nasale Gabe von

Orexin andere Effekte hervorruft, wenn die Tiere initial ein Orexindefizit aufweisen. Prinzipiell könnten auch spezifische Agonisten getestet werden.

4.5.2. Gruppengröße

Generell bietet es sich an, Teile dieser Studie, insbesondere die c-Fos-Immunhistochemie, mit einer größeren Anzahl an Testtieren weiterzuführen, da die Daten von so wenigen Tieren nur bedingt aussagekräftig und übertragbar sind. So ließen sich auch bisher detektierte oder vermutete Geschlechtsunterschiede noch detaillierter betrachten.

4.6. Schlussfolgerung

Zusammenfassend lässt sich die Arbeitshypothese klar bestätigen – die subkutane Gabe von MK801 kann Verhaltensendophänotypen der neuropsychiatrischen Erkrankung Schizophrenie hervorrufen und diese können von der nasalen Gabe von Orexin, zum Teil positiv aber auch zum Teil negativ, beeinflusst werden. Es zeigten sich Effekte und Tendenzen, die teilweise schon in ähnlichen Studien beobachtet wurden, aber auch neue Erkenntnisse, die in weiterführenden Studien näher adressiert werden müssen. Die Daten der vorliegenden Arbeit sprechen dafür, dass die Rolle des Orexin-Systems bei Schizophrenie deutlich komplexer als anfangs vermutet ist. Insbesondere auch Geschlechtsunterschiede sollten zukünftig weiter exploriert werden, da geschlechterspezifische Medizin und damit auch therapeutische Möglichkeiten genau durch diese Studien eine Chance haben.

5. Zusammenfassung

Orexin, ursprünglich bekannt für seine Rolle bei der Nahrungsaufnahme und beim Schlaf-Wach-Rhythmus (Adamantidis et al. 2007; Lecea et al. 1998; Sakurai et al. 1998), wurde in den letzten Jahren immer interessanter in Bezug auf seine beeinflussende Rolle beim Lernen und Gedächtnis (Dang et al. 2018; Wayner et al. 2004), kognitiver Flexibilität (Durairaja und Fendt 2021), Motivation (Mahler et al. 2014), Stress (Giardino und Lecea 2014), Stimmung, Angst (Abbas et al. 2015; Khalil und Fendt 2017), Geselligkeit und sozialem Gedächtnis (Faesel et al. 2021; Yang et al. 2013). In der Zusammenschau mit anderen Studien entstand die Hypothese, dass das Orexin-System insbesondere bei der Schizophrenie die Ausprägung bestimmter Endophänotypen beeinflussen kann (Perez und Lodge 2021; Deutch und Bubser 2007). Konkret wurde in dieser Arbeit der Einfluss der nasalen Applikation von Orexin auf die Endophänotypen Hyperaktivität, verminderte Präpulsinhibition und Störungen im Sozialverhalten untersucht. Dafür wurde Wildtyp-Mäuse subkutan MK801 injiziert, was ein bewährtes Tiermodell der Schizophrenie darstellt (Rung et al. 2005). Mithilfe des modifizierten Sozialverhaltens-Test nach Crawley (Faesel et al. 2021) wurde das Sozialverhalten der Testtiere untersucht. Dabei reduzierte MK801 phasenübergreifend die Erkundungszeit, während Orexin keinen Einfluss hatte oder diesen Effekt bei den Männchen in der Habituations- und Sozialverhaltensphase verstärkte. Beim Test auf Präpulsinhibition reduzierte MK801 die mittlere Präpulsinhibition erwartungsgemäß bei beiden Geschlechtern, während Orexin sie entgegen der Erwartung bei den MK801-vorbehandelten Männchen ebenfalls reduzierte. Die Schreckreaktionsamplitude wurde bei den Männchen durch MK801 erhöht, Orexin hingegen verringerte sie bei den MK801-vorbehandelten Tieren. Der Offenfeld-Test adressierte einen weiteren Endophänotyp, die Hyperaktivität, und zeigte bei beiden Geschlechtern eine durch MK801 gesteigerte lokomotorische Aktivität. Für Orexin konnte an dieser Stelle kein signifikanter Effekt nachgewiesen werden. Als Indikator der Ängstlichkeit wurde im Offenfeld-Test auch die Aufenthaltszeit im Zentrum und die Anzahl der Aufrichtungen bestimmt. MK801 reduzierte den Zentrumsaufenthalt und die Aufrichtungen, was jedoch nicht zwingend für eine angstausslösende Wirkung von MK801 spricht, sondern eher als Nebeneffekt der Hyperaktivität interpretiert werden kann. Orexin erhöhte den Zentrumsaufenthalt, zeigte jedoch keinen Einfluss auf die Aufrichtungen. Bei den c-Fos-Färbungen der Gehirnschnitte schien MK801 bei den Männchen die höchste Aktivität im ventromedialen Cortex und Nucleus Accumbens hervorzurufen, während es bei den Weibchen weniger Wirkung und nur in Kombination mit Orexin Tendenzen zeigte. Die Ergebnisse der Experimente zeigen einen klaren Einfluss von Orexin auf bestimmte Endophänotypen. In weiterführenden Studien könnten durch höhere Tierzahlen signifikantere Ergebnisse erzielt und die Geschlechtsunterschiede weiter herausgearbeitet werden. Somit kann ein wichtiger Beitrag zur Therapieforschung der Schizophrenie geleistet werden.

Literaturverzeichnis

1. Abbas, Md G.; Shoji, Hirotaka; Soya, Shingo; Hondo, Mari; Miyakawa, Tsuyoshi; Sakurai, Takeshi (2015): Comprehensive Behavioral Analysis of Male Ox1r (-/-) Mice Showed Implication of Orexin Receptor-1 in Mood, Anxiety, and Social Behavior. In: *Frontiers in behavioral neuroscience* 9, S. 324. DOI: 10.3389/fnbeh.2015.00324.
2. Adamantidis, Antoine R.; Zhang, Feng; Aravanis, Alexander M.; Deisseroth, Karl; Lecea, Luis de (2007): Neural substrates of awakening probed with optogenetic control of hypocretin neurons. In: *Nature* 450 (7168), S. 420–424. DOI: 10.1038/nature06310.
3. Andreasen, N. C. (2000): Schizophrenia: the fundamental questions. In: *Brain research. Brain research reviews* 31 (2-3), S. 106–112. DOI: 10.1016/s0165-0173(99)00027-2.
4. Blouin, Ashley M.; Fried, Itzhak; Wilson, Charles L.; Staba, Richard J.; Behnke, Eric J.; Lam, Hoa A. et al. (2013): Human hypocretin and melanin-concentrating hormone levels are linked to emotion and social interaction. In: *Nature communications* 4, S. 1547. DOI: 10.1038/ncomms2461.
5. Braff, D.; Stone, C.; Callaway, E.; Geyer, M.; Glick, I.; Bali, L. (1978): Prestimulus effects on human startle reflex in normals and schizophrenics. In: *Psychophysiology* 15 (4), S. 339–343. DOI: 10.1111/j.1469-8986.1978.tb01390.x.
6. Chien, Yi-Ling; Liu, Chih-Min; Shan, Jia-Chi; Lee, Hsin-Jung; Hsieh, Ming H.; Hwu, Hai-Gwo; Chiou, Lih-Chu (2015): Elevated plasma orexin A levels in a subgroup of patients with schizophrenia associated with fewer negative and disorganized symptoms. In: *Psychoneuroendocrinology* 53, S. 1–9. DOI: 10.1016/j.psyneuen.2014.12.012.
7. Ch'ng, Sarah Sulaiman; Lawrence, Andrew J. (2015): Distribution of the orexin-1 receptor (OX1R) in the mouse forebrain and rostral brainstem: A characterisation of OX1R-eGFP mice. In: *Journal of chemical neuroanatomy* 66-67, S. 1–9. DOI: 10.1016/j.jchemneu.2015.03.002.
8. Curzon, P.; Decker, M. W. (1998): Effects of phencyclidine (PCP) and (+)MK-801 on sensorimotor gating in CD-1 mice. In: *Progress in neuro-psychopharmacology & biological psychiatry* 22 (1), S. 129–146. DOI: 10.1016/S0278-5846(97)00184-X.
9. Dang, Ruozhi; Chen, Qiuhan; Song, Jie; He, Chao; Zhang, Jun; Xia, Jianxia; Hu, Zhian (2018): Orexin knockout mice exhibit impaired spatial working memory. In: *Neuroscience letters* 668, S. 92–97. DOI: 10.1016/j.neulet.2018.01.013.
10. Davis, M. (1974): Signal-to-noise ratio as a predictor of startle amplitude and habituation in the rat. In: *Journal of comparative and physiological psychology* 86 (5), S. 812–825. DOI: 10.1037/h0036417.
11. Davis, Michael; Sollberger, Arne (1971): Twenty-four-hour periodicity of the startle response in rats. In: *Psychon Sci* 25 (1), S. 37–39. DOI: 10.3758/BF03335842.
12. Demidova, Alexandrina; Kahl, Evelyn; Fendt, Markus (2022): Orexin deficiency affects sensorimotor gating and its amphetamine-induced impairment. In: *Progress in neuro-psychopharmacology & biological psychiatry* 116, S. 110517. DOI: 10.1016/j.pnpbp.2022.110517.
13. Deutch, Ariel Y.; Bubser, Michael (2007): The orexins/hypocretins and schizophrenia. In: *Schizophrenia Bulletin* 33 (6), S. 1277–1283. DOI: 10.1093/schbul/sbm096.
14. Durairaja, Archana; Fendt, Markus (2021): Orexin deficiency modulates cognitive flexibility in a sex-dependent manner. In: *Genes, brain, and behavior* 20 (3), e12707. DOI: 10.1111/gbb.12707.
15. Durairaja, Archana; Pandey, Samiksha; Kahl, Evelyn; Fendt, Markus (2023): Nasal administration of orexin A partially rescues dizocilpine-induced cognitive impairments in

- female C57BL/6 J mice. In: *Behavioural brain research* 450, S. 114491. DOI: 10.1016/j.bbr.2023.114491.
16. Faesel, Nadine; Kolodziejczyk, Malgorzata H.; Koch, Michael; Fendt, Markus (2021): Orexin deficiency affects sociability and the acquisition, expression, and extinction of conditioned social fear. In: *Brain research* 1751, S. 147199. DOI: 10.1016/j.brainres.2020.147199.
 17. Feinstein, I.; Kritzer, M. F. (2013): Acute N-methyl-D-aspartate receptor hypofunction induced by MK801 evokes sex-specific changes in behaviors observed in open-field testing in adult male and proestrus female rats. In: *Neuroscience* 228, S. 200–214. DOI: 10.1016/j.neuroscience.2012.10.026.
 18. Frauscher, Birgit; Löscher, Wolfgang N.; Ehrmann, Laura; Gschliesser, Viola; Brandauer, Elisabeth; Högl, Birgit; Kofler, Markus (2012): Narcolepsy-cataplexy: deficient prepulse inhibition of blink reflex suggests pedunculopontine involvement. In: *Journal of sleep research* 21 (5), S. 495–501. DOI: 10.1111/j.1365-2869.2012.01016.x.
 19. Freeman, Linnea R.; Bentzley, Brandon S.; James, Morgan H.; Aston-Jones, Gary (2021): Sex Differences in Demand for Highly Palatable Foods: Role of the Orexin System. In: *The international journal of neuropsychopharmacology* 24 (1), S. 54–63. DOI: 10.1093/ijnp/pyaa040.
 20. Geyer, M. A.; Krebs-Thomson, K.; Braff, D. L.; Swerdlow, N. R. (2001): Pharmacological studies of prepulse inhibition models of sensorimotor gating deficits in schizophrenia: a decade in review. In: *Psychopharmacology* 156 (2-3), S. 117–154. DOI: 10.1007/s002130100811.
 21. Giardino, William J.; Lecea, Luis de (2014): Hypocretin (orexin) neuromodulation of stress and reward pathways. In: *Current opinion in neurobiology* 29, S. 103–108. DOI: 10.1016/j.conb.2014.07.006.
 22. Gottesman, I. I.; Shields, J. (1973): Genetic theorizing and schizophrenia. In: *The British journal of psychiatry : the journal of mental science* 122 (566), S. 15–30. DOI: 10.1192/bjp.122.1.15.
 23. Grafe, Laura A.; Cornfeld, Amanda; Luz, Sandra; Valentino, Rita; Bhatnagar, Seema (2017): Orexins Mediate Sex Differences in the Stress Response and in Cognitive Flexibility. In: *Biological psychiatry* 81 (8), S. 683–692. DOI: 10.1016/j.biopsych.2016.10.013.
 24. Grafe, Laura A.; Geng, Eric; Corbett, Brian; Urban, Kimberly; Bhatnagar, Seema (2019): Sex- and Stress-Dependent Effects on Dendritic Morphology and Spine Densities in Putative Orexin Neurons. In: *Neuroscience* 418, S. 266–278. DOI: 10.1016/j.neuroscience.2019.08.026.
 25. Hall, Jeremy; Trent, Simon; Thomas, Kerrie L.; O'Donovan, Michael C.; Owen, Michael J. (2015): Genetic risk for schizophrenia: convergence on synaptic pathways involved in plasticity. In: *Biological psychiatry* 77 (1), S. 52–58. DOI: 10.1016/j.biopsych.2014.07.011.
 26. Hervieu, G. J.; Cluderay, J. E.; Harrison, D. C.; Roberts, J. C.; Leslie, R. A. (2001): Gene expression and protein distribution of the orexin-1 receptor in the rat brain and spinal cord. In: *Neuroscience* 103 (3), S. 777–797. DOI: 10.1016/s0306-4522(01)00033-1.
 27. James, Morgan H.; Mahler, Stephen V.; Moorman, David E.; Aston-Jones, Gary (2017): A Decade of Orexin/Hypocretin and Addiction: Where Are We Now? In: *Current topics in behavioral neurosciences* 33, S. 247–281. DOI: 10.1007/7854_2016_57.

28. Khalil, Radwa; Fendt, Markus (2017): Increased anxiety but normal fear and safety learning in orexin-deficient mice. In: *Behavioural brain research* 320, S. 210–218. DOI: 10.1016/j.bbr.2016.12.007.
29. Kolodziejczyk, Malgorzata H.; Faesel, Nadine; Koch, Michael; Fendt, Markus (2020): Sociability and extinction of conditioned social fear is affected in neuropeptide S receptor-deficient mice. In: *Behavioural brain research* 393, S. 112782. DOI: 10.1016/j.bbr.2020.112782.
30. Kumari, V.; Soni, W.; Mathew, V. M.; Sharma, T. (2000): Prepulse inhibition of the startle response in men with schizophrenia: effects of age of onset of illness, symptoms, and medication. In: *Archives of general psychiatry* 57 (6), S. 609–614. DOI: 10.1001/archpsyc.57.6.609.
31. Lecea, L. de; Kilduff, T. S.; Peyron, C.; Gao, X.; Foye, P. E.; Danielson, P. E. et al. (1998): The hypocretins: hypothalamus-specific peptides with neuroexcitatory activity. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95 (1), S. 322–327. DOI: 10.1073/pnas.95.1.322.
32. Mahler, Stephen V.; Moorman, David E.; Smith, Rachel J.; James, Morgan H.; Aston-Jones, Gary (2014): Motivational activation: a unifying hypothesis of orexin/hypocretin function. In: *Nature neuroscience* 17 (10), S. 1298–1303. DOI: 10.1038/nn.3810.
33. Marcus, J. N.; Aschkenasi, C. J.; Lee, C. E.; Chemelli, R. M.; Saper, C. B.; Yanagisawa, M.; Elmquist, J. K. (2001): Differential expression of orexin receptors 1 and 2 in the rat brain. In: *The Journal of comparative neurology* 435 (1), S. 6–25. DOI: 10.1002/cne.1190.
34. Moy, Sheryl S.; Nonneman, Randal J.; Shafer, Geoffrey O.; Nikolova, Viktoriya D.; Riddick, Natallia V.; Agster, Kara L. et al. (2013): Disruption of social approach by MK-801, amphetamine, and fluoxetine in adolescent C57BL/6J mice. In: *Neurotoxicology and teratology* 36, S. 36–46. DOI: 10.1016/j.ntt.2012.07.007.
35. Nambu, T.; Sakurai, T.; Mizukami, K.; Hosoya, Y.; Yanagisawa, M.; Goto, K. (1999): Distribution of orexin neurons in the adult rat brain. In: *Brain research* 827 (1-2), S. 243–260. DOI: 10.1016/S0006-8993(99)01336-0.
36. Nevárez, Natalie; Lecea, Luis de (2018): Recent advances in understanding the roles of hypocretin/orexin in arousal, affect, and motivation. In: *F1000Research* 7. DOI: 10.12688/f1000research.15097.1.
37. Perez, Stephanie M.; Lodge, Daniel J. (2021): Orexin Modulation of VTA Dopamine Neuron Activity: Relevance to Schizophrenia. In: *The international journal of neuropsychopharmacology* 24 (4), S. 344–353. DOI: 10.1093/ijnp/pyaa080.
38. Peyron, C.; Tighe, D. K.; van den Pol, A. N.; Lecea, L. de; Heller, H. C.; Sutcliffe, J. G.; Kilduff, T. S. (1998): Neurons containing hypocretin (orexin) project to multiple neuronal systems. In: *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 18 (23), S. 9996–10015. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.18-23-09996.1998.
39. Rung, Johan P.; Carlsson, Arvid; Rydén Markinhuhta, Katarina; Carlsson, Maria L. (2005): (+)-MK-801 induced social withdrawal in rats; a model for negative symptoms of schizophrenia. In: *Progress in neuro-psychopharmacology & biological psychiatry* 29 (5), S. 827–832. DOI: 10.1016/j.pnpbp.2005.03.004.
40. Sakurai, T.; Amemiya, A.; Ishii, M.; Matsuzaki, I.; Chemelli, R. M.; Tanaka, H. et al. (1998): Orexins and orexin receptors: a family of hypothalamic neuropeptides and G protein-coupled receptors that regulate feeding behavior. In: *Cell* 92 (4), S. 573–585. DOI: 10.1016/S0092-8674(00)80949-6.
41. Sakurai, Takeshi (2014): The role of orexin in motivated behaviours. In: *Nature reviews. Neuroscience* 15 (11), S. 719–731. DOI: 10.1038/nrn3837.

42. Sakurai, Takeshi; Nagata, Ruby; Yamanaka, Akihiro; Kawamura, Hiroko; Tsujino, Natsuko; Muraki, Yo et al. (2005): Input of orexin/hypocretin neurons revealed by a genetically encoded tracer in mice. In: *Neuron* 46 (2), S. 297–308. DOI: 10.1016/j.neuron.2005.03.010.
43. Schmack, K.; Bosc, M.; Ott, T.; Sturgill, J. F.; Kepecs, A. (2021): Striatal dopamine mediates hallucination-like perception in mice. In: *Science (New York, N.Y.)* 372 (6537). DOI: 10.1126/science.abf4740.
44. Spitzer, Manfred; Erk, Susanne (2006): Forum Neuroscience Schizophrenie. Stuttgart: Georg Thieme Verlag KG.
45. Walker, D. L.; Davis, M. (1997): 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. In: *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 17 (23), S. 9375–9383. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.17-23-09375.1997.
46. Wayner, M. J.; Armstrong, D. L.; Phelix, C. F.; Oomura, Y. (2004): Orexin-A (Hypocretin-1) and leptin enhance LTP in the dentate gyrus of rats in vivo. In: *Peptides* 25 (6), S. 991–996. DOI: 10.1016/j.peptides.2004.03.018.
47. Yang, Liya; Zou, Bende; Xiong, Xiaoxing; Pascual, Conrado; Xie, James; Malik, Adam et al. (2013): Hypocretin/orexin neurons contribute to hippocampus-dependent social memory and synaptic plasticity in mice. In: *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 33 (12), S. 5275–5284. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.3200-12.2013.
48. Yoshida, Y.; Fujiki, N.; Nakajima, T.; Ripley, B.; Matsumura, H.; Yoneda, H. et al. (2001): Fluctuation of extracellular hypocretin-1 (orexin A) levels in the rat in relation to the light-dark cycle and sleep-wake activities. In: *The European journal of neuroscience* 14 (7), S. 1075–1081. DOI: 10.1046/j.0953-816x.2001.01725.x.
49. Zeitzer, Jamie M.; Buckmaster, Christine L.; Parker, Karen J.; Hauck, Craig M.; Lyons, David M.; Mignot, Emmanuel (2003): Circadian and homeostatic regulation of hypocretin in a primate model: implications for the consolidation of wakefulness. In: *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 23 (8), S. 3555–3560. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.23-08-03555.2003.

Danksagungen

Die Danksagung ist in der Version aus Datenschutzgründen nicht enthalten.

Ehrenerklärung

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

Effekte von nasaler Orexin-Applikation auf Schizophrenie-typisches Verhalten bei Labormäusen

im Institut für Pharmakologie und Toxikologie mit Unterstützung durch Prof. Dr. 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 25.11.2024

Anne Rakowsky

Darstellung des Bildungsweges

Persönliche Daten:

Vorname:	Anne
Nachname:	Rakowsky
Geburtsdatum:	23.04.2001
Geburtsort:	Stendal

Schulbildung:

2006-2010	Bilinguale Grundschule Stendal
2010-2014	Internationales Gymnasium Pierre Trudeau Barleben (Erweiterter Fremdsprachenunterricht)
2014-2018	Internatsgymnasium Landesschule Pforta Naumburg (Begabtenförderung im Naturwissenschaftlichen Profil)
06/2018	Abiturprüfung

Studium:

10/2018-11/2024	Otto-von Guericke Universität Magdeburg – Medizinische Fakultät
09/2020	1. Abschnitt der ärztlichen Prüfung
10/2023	2. Abschnitt der ärztlichen Prüfung
11/2023-10/2024	Praktisches Jahr
1. Tertial	Chirurgie, Ameos Klinikum Aschersleben
2. Tertial	Innere Medizin, Ameos Klinikum Aschersleben
3. Tertial	Urologie, Ameos Klinikum Aschersleben
11/2024	3. Abschnitt der ärztlichen Prüfung
12/2020-11/2024	Doktorarbeit in der Arbeitsgruppe Neuropharmakologie des Instituts für Pharmakologie und Toxikologie an der Otto-von-Guericke Universität Magdeburg

Arbeitsverhältnis:

04/2021-01/2022	Chirurgie-Tutorin im Ausbildungszentrum für Medizinische Basisfertigkeiten in Magdeburg
12/2021-08/2024	Studentischer Nebenjob in der Radiologie im Altstadtquartier in Magdeburg und Stendal

Anlagen

Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Abb. 1	Schematischer Ablauf des Tests auf Sozialverhalten	S. 9
Abb. 2	Schematischer Ablauf des kombinierten Präpulsinhibitions- und Offenfeld-Tests	S. 11
Abb. 3	Schematische Darstellung der Anfertigung der Gehirnschnitte	S. 13
Abb. 4	Schematische Darstellung des Perfusionsablaufs	S. 14
Abb. 5	Diagramm Habituationsphase (Sozialverhalten-Test)	S. 20
Abb. 6	Diagramm Sozialverhalten-Phase (Sozialverhalten-Test)	S. 21
Abb. 7	Diagramm Wiedererkennungsphase (Sozialverhalten-Test)	S. 23
Abb. 8	Diagramm Präpulsinhibition – Mittlere Präpulsinhibition und Präpulsinhibition bei verschiedenen Präpulsintensitäten	S. 25
Abb. 9	Diagramm Schreckreaktionsamplitude	S. 27
Abb. 10	Diagramm Lokomotorische Aktivität im Offenfeld-Test	S. 28
Abb. 11	Diagramm Zentrum-Aufenthaltszeit im Offenfeld-Test	S. 31
Abb. 12	Diagramm Aufrichtungen im Offenfeld-Test	S. 32
Abb. 13	Diagramm c-Fos positive Zellen im ventromedialen Cortex	S. 34
Abb. 14	Diagramm c-Fos positive Zellen in der Core Region des Nucleus Accumbens	S. 35
Abb. 15	Diagramm c-Fos positive Zellen in der Shell Region des Nucleus Accumbens.	S. 36
Abb. 16	Diagramm c-Fos positive Zellen in der Amygdala	S. 37
Tab. 1	Alter und Gewicht der Versuchstiere	S. 6

Anästhesie-Protokoll Maus – c-Fos-Immunhistochemie

Ketamin (100 mg/kg) + Xylazin (20 mg/ kg) + Acepromazine (3 mg/kg)

Menge	Artikelbezeichnung	Bestell-Nr.
1x	(±)-Ketamin-hydrochlorid	K2753-5G
1x	Xylazin-hydrochlorid	X1251-1g
1x	Acepromazinemaleat	A7110- 10mg

Injektionsvolumen: in Abhängigkeit des Körpergewichts, z. B. 0,3 ml bei 30 g Maus

Zamboni Fixationslösung – c-Fos-Immunhistochemie

Inhaltsstoffe:

- 350 ml doppelt gefilterte gesättigte Pikrinsäure
- 80 g Paraformaldehyd

Achtung: Mundschutz und Handschuhe verwenden!

Vorgehensweise:

- 1) Inhaltsstoffe in einer 500 ml Flasche auf 60 Grad erhitzen.
- 2) 2,52 % NaOH tropfenweise zugeben bis sich das Paraformaldehyd gelöst hat.
- 3) In eine 2l Flasche filtrieren und mit Phosphatpuffer auffüllen.

Phosphatpuffer 2l:

- 6,62 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$
- 44,8 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$

Protokoll c-Fos-Immunhistochemie

1.Tag

- 1.** Schnitte (40 µm) 1x mit PBS waschen
- 2.** 30 min. in 50 % Ethanol inkubieren
- 3.** 3x mit PBS + 0,3 % Triton waschen
- 4.** 1x mit Working Buffer (PBS + 0,3 % Triton + 1 % NGS) inkubieren
- 5.** 1 Stunde in Blocking Solution (PBS + 0,3 % Triton + 3 % NGS) inkubieren.
- 6.** Primär antibody c-FOS 1/2000 (Anti-c-Fos Polyclonal Rabbit Affinity Purified, Synaptic Systems GmbH) in Working Buffer für 96 Stunden bei Raumtemperatur (RT)

2.Tag

- 7.** 4x mit PBS + 0,3 % Triton waschen
- 8.** 1,5 Stunden in anti-rabbit Biotin (Verdünnung 1/1000 in PBS + 0,3 % Triton + 1 % NGS) inkubieren.
- 9.** 3x mit PBS + 0,3 % Triton waschen
- 10.** 1 Stunde bei RT in ABC Elite Lösung inkubieren
(Ansatz: 25 µl von Reagenz A und Reagenz B pro 10 ml PBS + 0,3 % Triton)
- 11.** 3x mit PBS + 0,3 % Triton waschen
- 12.** 20 min. bei RT mit Biotin-Tyramin-Lösung inkubieren
(Ansatz: 24 µl BT, 20 µl H₂O₂ pro 10 ml PBS + 0,3 % Triton)
- 13.** 3x mit PBS + 0,3 % Triton waschen
- 14.** Streptavidin Cy3 1/1000 in Working Buffer bei RT inkubieren.

3. Tag

- 15.** 3x mit PBS waschen
- 16.** Schnitte auf Gelatine beschichtete Objektträger aufziehen, trocknen lassen, entwässern und mittels DPX einbetten.