

**Einfluss frühkindlicher Sozialerfahrung auf die funktionelle  
Reifung des anterioren cingulären Cortex der Strauchratte  
(*Octodon degus*)**

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

zur Erlangung des akademischen Grades

doctor rerum naturalium  
(Dr. rer. nat.),

genehmigt durch

die Fakultät für Naturwissenschaften

der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg

von Dipl.-Biol. Carina Helmeke

geb. am 3. November 1973 in Eberswalde-Finow

Gutachter: Prof. Dr. Katharina Braun

PD Dr. Bruno Baumann

Prof. Dr. Gerd Poeggel

Eingereicht am: 14. März 2003

Verteidigung am: 24. Juli 2003

## **Erklärung**

Hiermit erkläre ich, dass ich die von mir eingereichte Dissertation mit dem Thema:

### **Einfluss frühkindlicher Sozialerfahrung auf die funktionelle Reifung des anterioren cingulären Cortex der Strauchratte (*Octodon degus*)**

selbstständig verfasst, nicht schon als Dissertation verwendet und die benutzten Quellen und Hilfsmittel vollständig angegeben habe.

Weiterhin erkläre ich, dass ich weder diese noch eine andere Arbeit zur Erlangung des akademischen Grades doctor rerum naturalium an anderen Einrichtungen eingereicht habe.

Magdeburg, den 14. März 2003

Carina Helmeke

### **Danksagung**

Für ihre stetige Hilfs- und Diskussionsbereitschaft danke ich allen Kollegen.

Besonderer Dank gilt Frau Prof. Braun und Herrn Prof. Poeggel für die wissenschaftliche Betreuung dieser Arbeit und ihre vielen wertvollen Ratschläge.

Besonderer Dank gilt weiterhin meiner Familie für ihre moralische und finanzielle Unterstützung.

# Inhaltsverzeichnis

## **I. Einleitung**

<b>1. Der Einfluss des Eltern-Kind Kontaktes auf die Verhaltensentwicklung</b>	<b>1</b>
<b>2. Der Einfluss des Eltern-Kind Kontaktes auf die Entwicklung neuronaler Verbindungen</b>	<b>2</b>
<b>3. Funktion und Plastizität dendritischer Spines</b>	<b>3</b>
<b>4. Der Einfluss des Eltern-Kind Kontaktes auf die Entwicklung modulatorischer Systeme: monoaminerge, GABAerge und Corticotropin-Releasing-Hormon</b>	<b>5</b>
4.1. Funktionen des serotonergen Systems	7
4.2. Funktionen des GABAergen Systems	8
<b>5. Die Regionen des Präfrontalcortex und ihre Verbindungen zum limbischen System</b>	<b>9</b>
5.1. Das limbische System	12
<b>6. Tiermodell</b>	<b>14</b>
<b>7. Fragestellungen</b>	<b>16</b>
<b>A. Postnatale Entwicklung exzitatorischer Systeme und ihre Beeinflussung durch frühkindliche Erfahrungsprozesse</b>	<b>16</b>
<b>B. Einfluss von wiederholtem kurzzeitigem Elternentzug auf die Entwicklung inhibitorischer Systeme</b>	<b>18</b>

## **II. Material und Methoden**

<b>1. Aufzucht und Haltung der Versuchstiere</b>	<b>20</b>
<b>Versuch A - Postnatale Entwicklung exzitatorischer Systeme und ihre Beeinflussung durch frühkindliche Erfahrungsprozesse</b>	<b>20</b>
1.1. Postnatale Entwicklung dendritischer Spines im anterioren cingulären Cortex (ACd)	20
1.2. Einfluss einer reizarmen Umgebung auf die Entwicklung dendritischer Spines im anterioren cingulären Cortex (ACd)	21
1.3. Einfluss von wiederholtem kurzzeitigem Elternentzug auf die Entwicklung dendritischer Spines im anterioren cingulären Cortex (ACd)	22
1.4. Einfluss des Vaters auf die Entwicklung dendritischer Spines im anterioren cingulären Cortex (ACd)	23

1.5. Beteiligung des serotonergen Systems an den separationsinduzierten Veränderungen dendritischer Spines	23
<b>Versuch B - Einfluss von wiederholtem kurzzeitigem Elternentzug auf die Entwicklung inhibitorischer Systeme</b>	<b>25</b>
1.6. Einfluss von wiederholtem kurzzeitigem Elternentzug auf die Entwicklung inhibitorischer Interneurone im medialen Präfrontalcortex (PFC)	25
1.7. Einfluss von wiederholtem kurzzeitigem Elternentzug auf die Entwicklung von CRH exprimierenden Neuronen im medialen Präfrontalcortex (PFC)	26
<b>2. Die Golgi-Methode</b>	<b>26</b>
2.1. Prinzipien der Golgi-Cox-Methode	26
2.2. Durchführung der Golgi-Cox-Färbung	27
2.3. Analyse und Auswertung der Golgi-gefärbten Neurone	27
2.4. Auswahl der Pyramidenzellen	29
2.5. Quantifizierung und statistische Auswertung	30
<b>3. Immunohistochemischer Nachweis von Calretinin, Calbindin, Parvalbumin und CRH</b>	<b>31</b>
3.1. Perfusionsfixierung und Schneiden	31
3.2. Immunohistochemie	32
3.3. Quantitative Auswertung	32
3.4. Statistik	33
<b>4. Hirn- und Körpergewichte</b>	<b>34</b>
<b>5. Untersuchungen zu experimentell induzierten Veränderungen von Cortisol und ACTH im Blut</b>	<b>34</b>

### III. Ergebnisse

<b>Versuch A – Postnatale Entwicklung exzitatorischer Systeme und ihre Beeinflussung durch frühkindliche Erfahrungsprozesse</b>	<b>35</b>
<b>1. Postnatale Entwicklung dendritischer Spines im anterioren cingulären Cortex (ACd)</b>	<b>35</b>
1.1. Apikaldendriten	36
1.2. Basaldendriten	39
<b>2. Einfluss einer reizarmen Umgebung auf die Entwicklung dendritischer Spines im anterioren cingulären Cortex (ACd)</b>	<b>42</b>
2.1. Apikaldendriten	42
2.2. Basaldendriten	44

<b>3. Einfluss von wiederholtem kurzzeitigem Elternentzug auf die Entwicklung dendritischer Spines im anterioren cingulären Cortex (ACd)</b>	<b>46</b>
3.1. Apikaldendriten	46
3.2. Basaldendriten	48
<b>4. Einfluss des Vaters auf die Entwicklung dendritischer Spines im anterioren cingulären Cortex (ACd)</b>	<b>50</b>
4.1. Apikaldendriten	50
4.2. Basaldendriten	52
<b>5. Beteiligung des serotonergen Systems an den separationsinduzierten Veränderungen dendritischer Spines</b>	<b>54</b>
5.1. Apikaldendriten	54
5.2. Basaldendriten	58
<b>6. Hirn- und Körpergewichte</b>	<b>61</b>
6.1. Postnatale Entwicklung der Hirn- und Körpergewichte	61
6.2. Einfluss einer reizarmen Umgebung auf Hirn- und Körpergewichte	61
6.3. Einfluss von wiederholtem kurzzeitigem Elternentzug auf Hirn- und Körpergewichte	62
6.4. Einfluss des Vaters auf Hirn- und Körpergewichte	62
6.5. Einfluss wiederholter intraperitonealer Injektionen auf Hirn- und Körpergewichte	62
<b>7. Untersuchungen zu erfahrungsinduzierten Veränderungen von Cortisol und ACTH im Blut</b>	<b>63</b>
7.1. Einfluss von wiederholtem kurzzeitigem Elternentzug auf Cortisol und ACTH im Blut	63
7.2. Einfluss des Vaters auf Cortisol und ACTH im Blut	64
7.3. Einfluss wiederholter intraperitonealer Injektionen auf Cortisol und ACTH im Blut	64
<b>Versuch B –Einfluss von wiederholtem kurzzeitigem Elternentzug auf die Entwicklung inhibitorischer Systeme</b>	<b>65</b>
<b>1. Einfluss von wiederholtem kurzzeitigem Elternentzug auf die Entwicklung inhibitorischer Interneurone im medialen Präfrontalcortex (PFC)</b>	<b>65</b>
1.1. Deskriptive Beobachtungen Parvalbumin-, Calbindin- und Calretinin-positiver Neurone in den Subregionen des medialen PFC	65
1.2. Prozentuale Verteilung von Parvalbumin-, Calbindin- und Calretinin-positiven Neuronen in den Subregionen des medialen PFC	76
1.3. Veränderungen der Dichten Parvalbumin-, Calbindin- und Calretinin-positiver Interneurone in den Subregionen des medialen PFC	80
<b>2. Einfluss von wiederholtem kurzzeitigem Elternentzug auf die Entwicklung von CRH exprimierenden Neuronen im medialen Präfrontalcortex (PFC)</b>	<b>83</b>
<b>3. Hirn- und Körpergewichte</b>	<b>85</b>

## **IV. Diskussion**

<b>1. Postnatale Entwicklung dendritischer Spines und ihre Beeinflussung durch frühkindliche Erfahrungsprozesse</b>	<b>87</b>
1.1. Postnatale Entwicklung dendritischer Spines im anterioren cingulären Cortex	87
1.2. Einfluss einer reizarmen Umgebung auf die Entwicklung dendritischer Spines im anterioren cingulären Cortex	88
1.3. Einfluss von wiederholtem kurzzeitigem Elternentzug auf die Entwicklung dendritischer Spines im anterioren cingulären Cortex	89
1.3.1. Positive Auswirkungen erfahrungsinduzierter Veränderungen dendritischer Spines	91
1.3.2. Negative Auswirkungen erfahrungsinduzierter Veränderungen dendritischer Spines	93
1.4. Einfluss des Vaters auf die Entwicklung dendritischer Spines im anterioren cingulären Cortex	96
<b>2. Beteiligung des serotonergen Systems an den separationsinduzierten Veränderungen dendritischer Spines</b>	<b>98</b>
<b>3. Einfluss von wiederholtem kurzzeitigem Elternentzug auf die Entwicklung inhibitorischer Systeme</b>	<b>100</b>
3.1. Deskriptive Beobachtungen zu Interneuronen, die calciumbindende Proteine oder CRH im medialen Präfrontalcortex enthalten	100
3.2. Einfluss von wiederholtem kurzzeitigem Elternentzug auf die Entwicklung inhibitorischer Interneurone im medialen Präfrontalcortex	101
<b>4. Mögliche Interaktionen serotonerger und GABAerger Mechanismen bei den separationsinduzierten Spineveränderungen</b>	<b>104</b>
<b>5. Ausblick</b>	<b>105</b>

<b>V. Zusammenfassung</b>	<b>107</b>
---------------------------	------------

<b>VI. Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>109</b>
----------------------------------	------------

<b>VII. Literatur</b>	<b>110</b>
-----------------------	------------

## **VIII. Anhang**

Durchführung der Golgi-Cox-Färbung	<b>121</b>
Immunohistochemie	<b>123</b>
Messung von ACTH und Cortisol im Blutplasma	<b>125</b>
Tabellen	<b>128</b>

## I. Einleitung

### 1. Der Einfluss des Eltern-Kind Kontaktes auf die Verhaltensentwicklung

Umwelteinflüsse während verschiedener sensibler Phasen der frühkindlichen Entwicklung sind von großer Bedeutung für die spätere Entwicklung und das spätere Verhalten (Parker 1993; Parker et al., 1995; 2000). Der bedeutendste Umweltfaktor für neugeborene Individuen, welcher in hohem Maße zum Überleben einer Art beiträgt, ist die Interaktion mit ihren Bezugspersonen, d.h. in der Regel den Eltern oder der Mutter. Die Interaktion mit dieser Bezugsperson beinhaltet den frühesten emotional modulierten Lernprozess in der Entwicklung des Individuums, welcher klassisch als Filialprägung bezeichnet wird (Lorenz 1935; Gray 1958). Eltern bzw. Mutter kontrollieren die Umgebung der jungen Individuen, beeinflussen physiologische Mechanismen ihrer Nachkommen (Hofer 1973; Rosenfeld et al., 1991) und bieten ihnen dadurch die Möglichkeit sich physisch und mental optimal zu entwickeln. Fehlen einem Jungtier oder einem Kind Reize, die für bestimmte soziale oder sensorische Erfahrungen wichtig sind, kann dies irreversible Auswirkungen auf dessen Entwicklung haben. Beispiele für solche Stimuli sind die Konstanzhaltung der Herzrate des Jungtieres durch eine regelmäßige Milchgabe durch die Mutter (Hall 1998) und die taktile Stimulation durch die Mutter, welche die Sekretion von Wachstumshormonen sowie die ACTH-Antwort des Jungtieres auf Stress beeinflusst (Levine 2001).

Eine fehlende Mutter-Kind Beziehung führt beim Menschen zu Fehlentwicklungen bis hin zum Hospitalismus (Spitz 1945) und kann später zu Sprachstörungen (Brodbeck & Irwin, 1946), Störungen der Persönlichkeitsentwicklung (Lowrey 1940; Parker 1993; Parker et al., 1995; 2000) und zu Defiziten der intellektuellen und sozialen Fähigkeiten (Skeels 1966), sowie zu psychischen Erkrankungen wie z.B. Depression und Schizophrenie führen (Furukawa et al., 1998, 1999; Agid et al., 1999). Studien an Tiermodellen – Primaten und Nagern – führten zu vergleichbaren Erkenntnissen im späteren Verhalten von, in früher Kindheit durch Mutterentzug deprivierten Tieren (Joffe & Levine, 1973; Suomi 1997; Anisman et al., 1998; Hall 1998).

Zahlreiche Studien an verschiedenen Tiermodellen untersuchten die Auswirkungen von Mutterentzug auf die Endokrinologie und das Verhalten von Jungtieren (Meaney et al., 1996; Kuhn & Schanberg, 1998; Ladd et al., 2000; Lehmann & Feldon, 2000). Einige wenige

Arbeiten untersuchten das Verhalten während und nach dem Fehlen des Vaters bei der Aufzucht der Jungen (Wilson 1982; Gubernick & Teferi, 2000; Bredy et al., 2002, *Abstract*).

## **2. Der Einfluss des Eltern-Kind Kontaktes auf die Entwicklung neuronaler Verbindungen**

Der hohe Grad an Stabilität von frühkindlichen Lern- und Erfahrungsprozessen („Prägung“) und die spätere Unbeeinflussbarkeit durch gleichartige Umwelteindrücke legen einen Zusammenhang zwischen der Art und dem Ausmaß von Erfahrungen im frühkindlichen Alter und der durch diese Lernvorgänge beeinflussten Hirnentwicklung nahe. Einige wenige Studien beschäftigten sich mit den Auswirkungen verschiedener Deprivations- oder Trainingsformen auf die Morphologie des Gehirns. Insbesondere die Effekte unterschiedlicher sensorischer Erfahrungen (visuelle und olfaktorische), sowie motorischer Deprivation wurden in den entsprechenden sensorischen und motorischen Hirnarealen untersucht. So wurden in sensorischen Regionen bei Ratten, die in einer abwechslungsreichen Umgebung („enriched environment“) aufwuchsen, erhöhte Synapsendichten gefunden. Der occipitale Cortex (Volkmar & Greenough, 1972; Diamond et al., 1975; Turner & Greenough, 1985; Rosenzeig & Bennett, 1996), das mediale präoptische Areal (Sanchez Toscano et al., 1991) und das Striatum (Comery et al., 1995, 1996) bilden Beispiele solcher Befunde. Im motorischen Cortex wurden bei sozialdepriviert aufgewachsenen Affen im Alter von sechs Monaten bei nicht-spinetragenden Neuronen reduzierte dendritische Verzweigungsmuster nachgewiesen (Struble & Riesen, 1978). Bei spinetragenden Pyramidenzellen in Schicht IIIb wurden verminderte Spinedichten in apikalen Dendritenabschnitten gefunden (Bryan & Riesen, 1989).

Analog zu diesen erfahrungsinduzierten Veränderungen sensorischer und motorischer Systeme postulieren wir, dass auch die Reifung limbischer Cortexareale durch Erfahrungen, und zwar durch sozio-emotionale Erfahrungen, z.B. insbesondere durch den Kontakt zwischen Eltern und ihren Jungtieren, beeinflusst wird. So ist bei Nagern bekannt, dass mütterliche Pflege die Hauptquelle taktiler Stimulation für das sich entwickelnde Jungtier bildet und sich sowohl auf das körperliche Wachstum als auch auf die neuronale Reifung auswirkt (Schanberg & Field, 1987; Levine 1994; Suomi 1997). Weiterhin wird postuliert, dass mütterliches Verhalten aktiv die hippocampale Synaptogenese stimuliert (Liu et al., 2000). Bisher ist weitgehend ungeklärt, in welcher Weise eine Störung des Eltern-Kind Kontaktes, welche, wie im 1. Kapitel beschrieben, zu langanhaltenden Verhaltensänderungen

und psychischen Erkrankungen führen kann, die funktionelle Reifung limbischer Cortexareale beeinflusst. Frühkindliche Erfahrungen, wie z.B. das Aufwachsen in einer reizarmen Umgebung, die Separation von den Eltern und Geschwistern oder das Fehlen eines Elternteils bei der Aufzucht der Jungen, könnten ebenso wie sensorische Erfahrungen, Veränderungen des sich entwickelnden neuronalen Netzwerkes synaptischer Verbindungen induzieren. Ein Ziel dieser Arbeit war es daher, erfahrungsinduzierte Veränderungen eines bestimmten Synapsentyps, den dendritischen Spines, im anterioren cingulären Cortex (ACd) genauer zu untersuchen. Dieser limbische Cortexbereich gehört als Subregion des Präfrontalcortex (PFC) zu den Hirnregionen, deren Reifung sich erst relativ spät während der Postnatalentwicklung vollzieht (Diamond 2000). Es ist zu erwarten, dass solche spätentwickelnden Hirnareale besonders vulnerabel gegenüber emotionalen Lern- und Erfahrungsprozessen im frühkindlichen Alter sein sollten.

### **3. Funktion und Plastizität dendritischer Spines**

Alle Bereiche eines Neurons, Axon, Soma und Dendriten, können synaptische Signale empfangen und übertragen. Die häufigsten Typen der Kontaktaufnahme zwischen Nervenzellen sind dabei axoaxonische, axosomatische und axodendritische Synapsen. Axodendritische Synapsen können am Schaft oder an einem Dorn (Spine) des Dendriten lokalisiert sein. Wie der Name besagt, bilden dendritische Spines winzige dornenartige Erhebungen auf den Dendriten von Nervenzellen. Etwa 90% aller exzitatorischen Synapsen des Zentralnervensystems sitzen auf dendritischen Spines (Harris & Kater, 1994), deshalb werden Spines nahezu ausschließlich mit exzitatorischer synaptischer Übertragung assoziiert. Form und Größe von Spines variieren je nach Neuronenpopulation beträchtlich. Es treten aber auch Unterschiede im selben Neuron auf. Im Allgemeinen wird grobmorphologisch zwischen sogenannten „Mushroom-, Stubby- und Thin-“ Spines unterschieden. Alle Formen besitzen einen mehr oder weniger markant ausgebildeten Spinekopf, der die spezialisierte synaptische Kontaktzone trägt und auf dem Spinehals sitzt, welcher wiederum den Kontakt zum Dendriten herstellt. Jeder Spine trägt mindestens ein postsynaptisches Terminal auf seiner Oberfläche.

Biochemisch werden Spines als zelluläre Kompartimente betrachtet, die eine abgegrenzte Umgebung für die Wirkung von Calcium und Second-Messengern schaffen und der Signalverstärkung dienen (Koch & Zador, 1993). Die Konstruktion des engen Spinehalses ist

der entscheidende Parameter, welcher die biochemische Isolation des Spinekopfes bedingt. Dabei ist von besonderer Bedeutung, dass durch die geringe Größe eines dendritischen Spines bereits ein sehr geringer Calciumeinstrom in den Spine ausreicht, um eine deutliche Erhöhung der Calciumkonzentration hervorzurufen. Diese Besonderheit führte zu der inzwischen experimentell bestätigten Annahme, dass Spines eine Rolle bei der Lang-Zeit Potenzierung (LTP) spielen. Die Stimulation von Spinesynapsen führt zu einer anhaltenden Erhöhung der Calciumkonzentration im Spine, die später ebenfalls auftretende Veränderungen im Dendritenschaft lange überdauert (Müller & Connor, 1991). Dendritische Spines können somit gewährleisten, dass die lokale synaptische Konzentration von Calcium und anderen LTP-relevanten Molekülen so lange auf einem hohen Level gehalten wird, dass eine langanhaltende LTP induziert werden kann. Sollte LTP tatsächlich einen signifikanten Beitrag bei Lernen und Gedächtnis und damit für die Plastizität des Gehirns haben, ist es naheliegend, dass auch die Spines dazu beitragen. Entsprechend dieser Annahme wurde im Hippocampus von Ratten eine erhöhte Anzahl exzitatorischer Spinesynapsen nach LTP gefunden (Trommald et al., 1996). Contralaterale LTP-Induktion im sensorimotorischen Cortex von Ratten führte zu qualitativ und quantitativ ähnlichen Veränderungen der Dendritenmorphologie und Spinedichte von Schicht-III Pyramidenzellen (Ivanco et al., 2000) wie der Einfluss einer komplexen Umgebung (Kolb & Wishaw, 1998) und wirft damit die Frage auf, ob an beiden Veränderungen die gleichen zellulären Mechanismen beteiligt sind. Dendritische Spines können in Abhängigkeit von bestimmten externen Faktoren erhebliche Veränderungen ihre Anzahl bzw. Dichte, aber auch ihre Form oder Größe betreffend zeigen (Harris et al., 1992). Letztere Parameter sichern mit ihrer diffizilen Änderung die Feinabstimmung zwischen Dendrit und dem Spine als Calciumspeicher (Korkotian & Segal, 2000). So führt ein hoher Anstieg der Calciumkonzentration im Spine zu seiner Schrumpfung und eine sehr geringe Calciumkonzentration zum gegenteiligen Effekt (Segal et al., 2000). Ultrastrukturelle Veränderungen der Form und Größe von Spines finden sich auch als Folge von LTP (Fifkova et al., 1982; Hosokawa et al., 1995) und wurden nach wiederholter frühkindlicher Sozialdeprivation, analog zu den hier vorliegenden Versuchen, im ACd von *Octodon degus* mithilfe von quantitativer Laserscan-Mikroskopie nachgewiesen (Schnabel et al., 2002, *Abstract*). Dendritische Spines könnten die Funktion einer Nervenzelle über Veränderungen in der Dichte und Morphologie der Spines reflektieren, welche die zelluläre Basis für Lernen und Gedächtnis bilden (Horner 1993). So führt räumliches Lernen im Hippocampus (Moser et al., 1994), eine komplexe Umgebung im Cortex (Globus et al., 1973; Turner & Greenough, 1985) und im Striatum (Comery et al., 1995) von Ratten zu einer

Zunahme der Spinesynapsendichte. Nach akustischer Filialprägung von Haushuhnküken (Wallhäüßer & Scheich, 1987; Bock & Braun, 1998) und nach Gesangs- bzw. Sprachlernen bei Zebrafinken und Beos (Rausch & Scheich, 1982; Rollenhagen & Bischof, 1991, 1994a, 1994b, 1996; Wallhäüßer-Franke et al., 1995) wurden ebenfalls Veränderungen der Spinedichte in lernrelevanten Vorderhirnarealen gefunden.

Die Entscheidung, die morphologischen Untersuchungen der vorliegenden Arbeit an Pyramidenzellen aus Schicht-II/III des ACd vorzunehmen, fiel aufgrund ihrer relativ jungen phylogenetischen und ontogenetischen Stellung innerhalb des Cortex. Nach dem zeitlichen „inside-outside-Gradienten“ der Schichtentwicklung des Cortex (Angevine & Sidman, 1961; Caviness & Sidman, 1973; Volpe 1987) beendet die Schicht-III Pyramidenzelle ihre Migration später als die Schicht-V Pyramidenzelle und gelangt dementsprechend später zur Ausreifung. Das betrifft sowohl Größenzunahme des Somas als auch Fortsatz- und Synapsenbildung (Marin-Padilla 1970; Poljakow 1979). Dieses späte Zeitfenster lässt eine besonders hohe Sensibilität der Lamina-III für umweltinduzierte entwicklungsfördernde oder –hemmende Einflüsse vermuten (Schulz et al., 1992).

#### **4. Der Einfluss des Eltern-Kind Kontaktes auf die Entwicklung modulatorischer Systeme: monoaminerge, GABAerge und Corticotropin-Releasing-Hormon**

Neuere Befunde aus biochemischen Untersuchungen an Nagern weisen darauf hin, dass die funktionelle Reifung der modulatorischen Neurotransmittersysteme, insbesondere der monoaminergen Systeme, durch frühkindliche Sozialdeprivation gestört wird. Isoliert aufgezogene Jungratten weisen massive Erniedrigungen der DOPAC- und HVA-Konzentrationen (Metaboliten des Dopamin) im präfrontalen Cortex auf (Miura et al., 2002). Dies geht einher mit Befunden bei *Octodon degus* (Braun et al., 2000) und Wüstenrennmäusen (Winterfeld et al., 1998), die eine verminderte dopaminerge Innervation im Präfrontalcortex (PFC) zeigen. Hingegen kommt es im serotonergen System zu einer Hochregulation: Sozialdepriviert aufgezogene Ratten zeigen eine vermehrte Serotonin-Ausschüttung im PFC (Bickerdike et al., 1993) und bei *Octodon degus* wurde eine erhöhte Dichte serotonerger Fasern nachgewiesen (Braun et al., 2000). Auf Rezeptorebene führt bei *Octodon degus* bereits eine kurze Separation von Eltern und Geschwistern zu einer dramatischen Erhöhung dopaminergere D1- und serotonerger 5-HT<sub>1A</sub>-Rezeptoren (Ziabreva et al., 2003a). Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass bei frühkindlichen Lern- und

Erfahrungsprozessen die Aktivität der monoaminergen und speziell der dopaminergen und serotonergen Systeme auf ein bestimmtes Niveau einbalanciert wird, so dass die Voraussetzung für eine koordinierte Funktionsweise dieser Systeme im erwachsenen Gehirn geschaffen wird (Braun & Bogerts, 2001). Inwieweit können jedoch Veränderungen dieser Transmittersysteme mit denen der spinesynaptischen Verbindungen im ACd in Zusammenhang gebracht werden? Da Serotonin neben seiner Wirkung als Neurotransmitter vor allem während der frühen Hirnentwicklung trophisch auf die Synapsenentwicklung wirken kann (Lauder & Krebs, 1978; Lipton & Kater, 1989; Vu & Törk, 1992), könnte es u.a. auch die Ausbildung und Stabilisierung von synaptischen Verbindungen innerhalb der limbischen Schaltkreise beeinflussen. Aus diesem Grund lag ein weiteres Ziel dieser Arbeit darin, herauszufinden, ob eine Blockade des serotonergen Systems über 5-HT<sub>1A</sub>-Rezeptoren die Entwicklung der Spinedichte im ACd beeinflusst. Weiterhin sollte geklärt werden, in welcher Weise dieser Einfluss mit den Veränderungen der spinesynaptischen Entwicklung durch die Separation von Eltern und Geschwistern korreliert.

Auch das inhibitorische GABAerge System (GABA:  $\gamma$ -Aminobuttersäure) scheint eine Rolle bei den Auswirkungen von Mutterentzug auf das sich entwickelnde Gehirn zu spielen. So zeigte sich in Experimenten an Rattenjungen, dass bei Applikation von Benzodiazepin-Agonisten während des Mutterentzuges, eine Reduktion der im Ultraschallbereich liegenden Stressvokalisation die Folge ist. Weitere Studien untersuchten bei *Octodon degus* die Auswirkungen von Elternentzug auf GABAerge Rezeptoren: Wiederholte Separation von den Eltern in der zweiten Postnatalwoche führte im limbischen System, i.e. dem präfrontalen Cortex (Ziabreva et al., 2003a), dem Hippocampus und der Amygdala (Ziabreva et al., 2003b) zu einer Reduktion von GABA(A)-Rezeptoren. Die Dichte NADPH-Diaphorase-positiver Neurone, welche teilweise GABAerge Interneurone repräsentieren, war ebenfalls reduziert und zwar in der Core-Region des Nucleus accumbens und im Präfrontalcortex (Braun et al., 2000). Aufgrund dieser Beobachtungen lag ein Ziel der vorliegenden Arbeit darin, langfristige Veränderungen der Dichte GABAerger Interneurone des Präfrontalcortex nach wiederholter Separation von den Eltern und Geschwistern zu analysieren. Anhand der Expression von cytoplasmatischen calciumbindenden Proteinen wurden Interneuron-Subpopulationen identifiziert, um quantitative Veränderungen inhibitorischer Komponenten nachzuweisen.

Ein hormoneller Neuromodulator, Corticotropin-Releasing-Hormon (CRH) sollte in dieser Arbeit hinsichtlich seiner Rolle bei frühkindlichen Lern- und Erfahrungsprozessen ebenfalls untersucht werden. Aus endokrinologischen Untersuchungen ist bekannt, dass die Ausschüttung von CRH aus den hypothalamischen Neuronen unter Stressbedingungen die Bereitstellung von Energiesubstraten durch adrenale Glucocorticoide induziert (Brindley & Rolland, 1989; Francis et al., 1999). CRH enthaltende Neurone sind jedoch auch in corticalen und limbischen Regionen lokal verteilt (Sawchenko et al., 1993), sie exprimieren z.T. calciumbindende Proteine (Yan et al., 1998), und ihre Schaltkreise scheinen sowohl sensitiv bezüglich frühkindlicher Erfahrungen (Ladd et al., 2000) zu sein, als auch in die Verhaltensreaktionen auf Stress und Angst einbezogen zu sein. (Butler et al., 1990; Fisher 1993; Heinrichs et al., 1995; Francis et al., 1999; Yilmazer-Hanke et al., 2002). Somit stellte sich die Frage, welchen Einfluss eine wiederholte sozio-emotionale Separation während der frühkindlichen Entwicklung auf die Dichte von CRH-Neuronen in den Subregionen des medialen Präfrontalcortex hat.

#### **4.1. Funktionen des serotonergen Systems**

Das 5-HT-Neurotransmittersystem (5-HT: Serotonin) der Ratte entwickelt sich hauptsächlich postnatal (Hedner & Lundborg, 1980; Dinopoulos & Dori, 1995). 5-HT-enthaltende Zellkörper sind am Geburtstag nachweisbar, erreichen ihre maximale Dichte am Ende der zweiten Lebenswoche und es kommt bis zum 45. Lebenstag zu einer leichten Verringerung der Dichte. Eine ähnliche Entwicklung serotonerger Fasern konnte bei *Octodon degus* nachgewiesen werden (Braun et al., 2000). Serotonerge Fasern, welche den cerebralen Cortex innervieren, haben ihren Ursprung in zwei mesencephalischen Raphekernen (Azmitia & Segal, 1978; Wilson & Molliver, 1991). Dünne Fasern mit kleinen Varikositäten entspringen der dorsalen Raphe, während dicke Fasern mit großen Varikositäten der medialen Raphe entspringen (Kosofsky & Molliver, 1987) und v.a. limbische Regionen, wie die präfrontalen, cingulären und entorhinalen Cortices, sowie den Hippocampus innervieren (Hornung et al., 1990). Dabei bilden sie um ihre Zielzellen z.T. korbformige Terminalien aus (Mulligan & Törk, 1988; Hornung et al., 1990). Bei Primaten sind diese besonders zahlreich in den anterioren und posterioren cingulären, präfrontalen und sensorimotorischen Gebieten und im Hippocampus vertreten (Hornung & Celio, 1992). Sie innervieren hauptsächlich die Dendriten Calbindin-positiver, aber nicht die Parvalbumin-positiver GABAerger Interneurone

in Schicht I-III des Cortex, sowie den Gyrus dentatus und die Pyramidenschicht des Hippocampus (Freund et al., 1990; Hornung & Celio, 1992; Smiley & Goldman-Rakic, 1996). Bei Nagern sind korb förmige Innervierungen im Hippocampus, jedoch nicht im Neocortex bekannt.

Bisher sind sieben Hauptgruppen von Serotoninrezeptoren nachgewiesen worden: 5-HT<sub>1</sub>, 5-HT<sub>2</sub>, 5-HT<sub>3</sub>, 5-HT<sub>4</sub>, 5-HT<sub>5</sub>, 5-HT<sub>6</sub> und 5-HT<sub>7</sub>. 5HT<sub>1</sub>-Rezeptoren weisen eine hohe Affinität für Serotonin auf und werden in sieben Untereinheiten mit z.T. weiteren Subtypen eingeteilt: 5-HT<sub>1A</sub>, 5-HT<sub>1B</sub>, 5-HT<sub>1D</sub>, 5-HT<sub>1D $\alpha$</sub> , 5-HT<sub>1D $\beta$</sub> , 5-HT<sub>1E</sub>, 5-HT<sub>1E $\beta$</sub> , 5-HT<sub>1F</sub>, 5-HT<sub>1P</sub> und 5-HT<sub>1S</sub>. Werden 5-HT<sub>1A</sub>-Autorezeptoren in der Raphe aktiviert, führt das zu einer Reduktion der Serotoninsynthese (Casanovas et al., 1999), dem Feuern serotonerger Neurone und der terminalen Ausschüttung von 5-HT (Sprouse & Aghajanian, 1987). Die Wirkung von 5-HT über den 5-HT<sub>1A</sub>-Rezeptor beinhaltet das Hyperpolarisieren postsynaptischer Zellen über Kaliumkanäle, die Reduktion der eigenen Ausschüttung durch synaptische Terminalien und die Reduktion der Ausschüttung anderer Neurotransmitter von deren Terminalien (Uphouse 1997).

Zur Zeit ist Way-100635, welcher in dieser Arbeit verwendet wurde, der einzige kommerziell erhältliche 5-HT<sub>1A</sub>-Rezeptor-Antagonist, welcher eine hohe Affinität zu dem Rezeptor aufweist. Systemisch gegeben (1 mg/kg subkutan), in Kombination mit Serotonin Reuptake-Inhibitoren, erhöht er die extrazelluläre Serotoninkonzentration im PFC erwachsener Ratten (Li et al., 1999), und zwar durch Blockade der inhibitorischen somatodendritischen 5-HT<sub>1A</sub>-Autorezeptoren der Raphe. Eine alleinige Administration von Way-100635 induziert keine Veränderung der extrazellulären Serotoninkonzentration, d.h. Way-100635 wirkt nicht agonistisch (Dawson & Nguyen, 1998).

Im Gehirn von *Octodon degus* sind 5-HT<sub>1A</sub>-Rezeptoren weit verbreitet, vergleichbar mit ihrem Vorkommen bei Ratten, Meerschweinchen und Menschen (Ziabreva 2000, *Dissertationsschrift*). Entwicklungsstudien an Ratten haben gezeigt, dass die 5-HT<sub>1A</sub>-Rezeptordichte in der dritten Postnatalwoche die des erwachsenen Tieres erreicht (Daval et al., 1987). Das Zeitfenster, in dem die Einflüsse von Serotonin auf das sich entwickelnde Gehirn kritisch sind, erstreckt sich somit über die ersten drei Lebenswochen.

## **4.2. Funktionen des GABAergen Systems**

GABA ist der bedeutendste inhibitorische Neurotransmitter des Gehirns und wird von mehr als einem Drittel aller Neurone für die synaptische Kommunikationsübertragung genutzt; 30 bis 50% aller zentralen Synapsen sind GABAerg (De Luka, et al., 1998). Andere neuromodulatorische Systeme, wie das serotonerge und das noradrenerge System, stehen unter der hemmenden Kontrolle von GABA, und vice versa (Abellan et al., 2000; Carette et al., 2001).

Inhibitorische GABAerge Interneurone können immunocytochemisch charakterisiert werden durch ihren Gehalt an Glutamatdecarboxylase (GAD). Darüber hinaus enthalten die GABAergen Interneurone mindestens eins der calciumbindenden Proteine Parvalbumin, Calbindin-D28k oder Calretinin. Diese Proteine stellen somit die drei wichtigsten Marker zur Untersuchung und Klassifizierung des GABAergen Systems dar (Kosaka et al., 1987; DeFelipe 1997).

Calciumbindende Proteine erreichen bei Ratten ihr morphologisch und qualitativ adultes Reifestadium am Ende der dritten postnatalen Woche (Hof et al., 1999). Eine Störung der normalen Umgebung während dieser ersten drei Wochen im Leben eines Individuums, könnte daher zu einer veränderten Entwicklung der GABAergen Interneurone und ihrer synaptischen Verschaltungsmuster führen und damit auch Einfluss auf andere Transmittersysteme ausüben, denn GABAergen Interneuronen wird die Kontrolle über die exzitatorische Aktivität von Schicht-III Pyramidenzellen zugesprochen (Keverne 1999; Lewis et al., 1999). Ein Ziel dieser Arbeit war es daher, umweltinduzierte Veränderungen der drei Subpopulationen von GABAergen Interneuronen zu analysieren.

## **5. Die Regionen des Präfrontalcortex und ihre Verbindungen zum limbischen System**

Die bedeutende Rolle des limbischen Systems bei der Verarbeitung emotionaler Umweltreize, sowie für Lernen und Gedächtnis, erstmals von Papez 1937 postuliert, ist bis heute unumstritten. Neben Amygdala, Hippocampus, Mamillarkörper, den vorderen Thalamuskernen und dem cingulären Gyrus bildet der Präfrontalcortex eine Hauptkomponente des limbischen Systems. Er spielt eine wesentliche Rolle sowohl für die Lösung kognitiver Aufgaben als auch für die Regulation des emotionalen Verhaltens (Kolb

1984; Fuster 2001). Klinische Untersuchungen und Läsionsstudien ergaben eine funktionelle Beteiligung des PFC bei der zeitlichen Strukturierung von Verhaltensweisen und Lernvorgängen (Kolb 1984; Fuster 1985). Zudem ist bekannt, dass der präfrontale Cortex relativ spät während der Postnatalentwicklung zur Reifung gelangt (Diamond 2000). Diese Eigenschaften des PFC machen ihn zu einem interessanten Gebiet, um den Einfluss frühkindlicher emotionaler Erfahrungen auf die Synapsenentwicklung, sowie auf die Entwicklung modulatorischer Systeme zu untersuchen.

Der Präfrontalcortex nimmt beim Menschen mehr als ein Viertel der cerebralen Oberfläche ein (Goldman-Rakic 1987). Seine Funktion als Assoziationsregion, die mit vielen corticalen und subcorticalen Gebieten verbunden ist, entspricht seiner Kapazität, multimodale Informationen zu verarbeiten. Der PFC unterliegt innerhalb der Säugetierreihe und hier speziell bei Primaten einer stark progressiven Ausdehnung (Brodmann 1912; Van Eden & Uylings, 1985a). Bei Primaten ist er Hauptziel der dopaminergen Afferenzen des Hirnstamms (Brown et al., 1979). Diese bilden symmetrische, also wahrscheinlich inhibitorische Synapsen an den Spines der Pyramidenzellen (Goldman-Rakic et al., 1992), welche vor allem D1-Rezeptoren besitzen (Smiley et al., 1994). Wie die Dendriten der Pyramidenzellen empfangen auch die Dendriten der Interneurone dopaminerge Afferenzen (Smiley & Goldman-Rakic, 1993; Sesack et al., 1995). Der PFC erhält Input von dopaminergen Neuronen des ventralen Tegmentum (VTA) und der Substantia nigra (SN) (Lindvall et al., 1978). Die dopaminergen Afferenzen des VTA enden an distalen Dendriten und Spines von Pyramidenzellen, welche außerdem noch indirekt über dopaminerge Modulation durch GABAerge Interneurone beeinflusst werden (Goldman-Rakic 1996). Serotonerge Afferenzen enden ebenfalls an den Pyramidenneuronen des PFC (Morilak et al., 1993) und an CaBP-D28k und CaR enthaltenden Interneuronen (Freund et al., 1990; Hornung & Celio, 1992; Smiley & Goldman-Rakic, 1996). Weiterhin innervieren cholinerge Afferenzen Pyramidenzellen und GABAerge Interneurone (McCormick & Prince, 1985; McCormick 1992).

Am dorsolateralen PFC der Katze wurde gezeigt, dass er Ziel der größten insulären, limbischen und neocorticalen sensorischen Assoziationsprojektionen ist, und dass der rostrale PFC Projektionen von allen anderen PFC-Arealen und von den limbischen und insulären Cortices erhält (Cavada & Reinoso-Suarez, 1985). Durch seine direkte Verbindung mit der Amygdala wird der PFC zum limbischen System gezählt (Verwer et al., 1996; Groenewegen et al., 1997). Weitere wichtige Verbindungen sind die des PFC zur CA-1 Region des Hippocampus (Swanson 1981) und zum Nucleus accumbens. Über das sogenannte limbisch-motorische Interface kann das limbische System Einfluss auf die Motorik und somit auf das

Verhalten ausüben (Koob & Swerdlow, 1988). Thalamocorticale Projektionen in neocorticale Areale bilden synaptische Kontakte mit den Apikal- und Basalspines von Schicht-III und V Pyramidenzellen. Pyramidenzellen aus Schicht V und VI senden wiederum Projektionen zum mediodorsalen Nucleus (MD) des Thalamus (Krettek & Price, 1977; Giguere & Goldman-Rakic, 1988). Schließlich hat der PFC Verbindungen mit zahlreichen weiteren Strukturen, wie den Basalganglien, dem Septum und dem Hypothalamus (Beckstead 1979).

Der PFC der Nagetiere wird im Gegensatz zum PFC höherer Säuger nicht aufgrund morphologischer Besonderheiten, wie Cytoarchitektur und Lage, sondern vor allem durch seine spezifischen neuronalen Verbindungen mit subcorticalen Strukturen definiert (Divac & Öberg, 1990). Rose und Woolsey entdeckten 1948, dass in allen untersuchten Säugetieren ein prominenter Thalamuskern, der Nucleus medialis dorsalis (MD), in das Gebiet der Frontallappen projiziert. Das gemeinsame Merkmal des gesamten PFC der Nager äußert sich im Fehlen der inneren Körnerschicht (Schicht IV). Er lässt sich als agranulärer Cortex von allen anderen neocorticalen Arealen, die granulär aufgebaut sind und die Schichten I bis VI besitzen, unterscheiden.

Die Differenzierung der corticalen Schichten des PFC der Ratte ist im Wesentlichen, wie die anderer neocorticaler Gebiete, am Ende der zweiten postnatalen Woche abgeschlossen (Van Eden & Uylings, 1985b). Bei der Ratte besteht der PFC aus zwei räumlich getrennten Hauptabschnitten, einem medialen Anteil und einem orbitalen Anteil im insulären Cortex, etwas oberhalb des Sulcus rhinalis (RF). Ab dem sechsten Lebenstag können bei der Ratte innerhalb dieser beiden Hauptabschnitte, wie in Abbildung 1 dargestellt, weitere Untereinheiten unterschieden werden (Van Eden & Uylings, 1985a).

Medialer Bereich des PFC:

- die mediale präcentrale Area (PrCm),
- die dorsale anteriore cinguläre Area (ACd),
- sowie die prälimbische Area (PL)

Orbitaler Bereich:

- dorsale Insula,
- ventrale Insula

Neben diesen fünf klassischen Untereinheiten des PFC sind mindestens drei weitere Areale des frontalen Cortex:

- die infralimbische Area (IL),
- die mediale orbitale Area (MO),
- sowie die laterale orbitale Area (LO)

durch umfangreiche reziproke Verbindungen mit dem MD des Thalamus gekennzeichnet (Groenewegen 1988) und werden als Anteile des PFC betrachtet (Uylings & Van Eden, 1990).

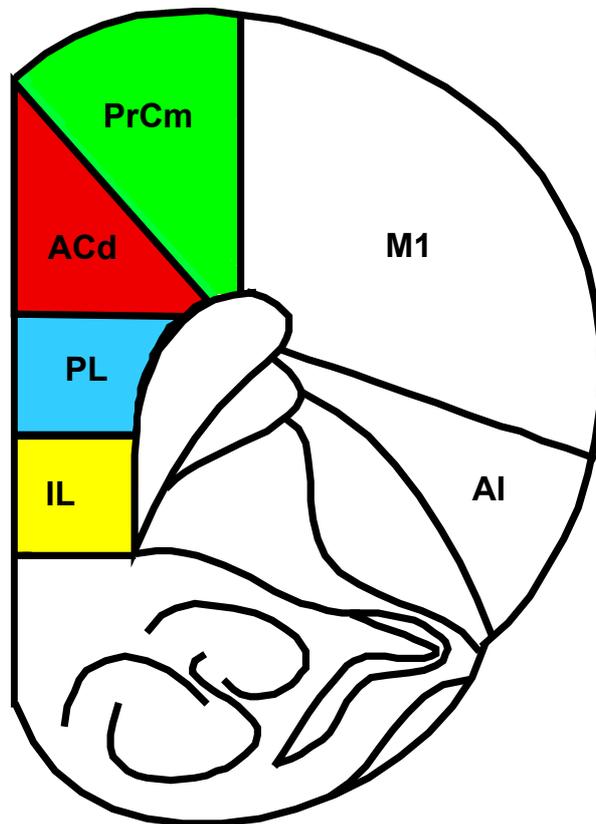


Abb. 1. Schematische Darstellung einer Hemisphäre (Frontalschnitt, rostral vom Corpus Callosum in der prägenualen Ebene): die farbigen Subregionen stellen die Areale dar, welche in dieser Arbeit untersucht wurden. ACd = anteriorer cingulärer Cortex, AI = agranulärer insulärer Cortex, IL = infralimbischer Cortex, M1 = prämotorischer Cortex, PL = prälimbischer Cortex, PrCm = präcentraler medialer Cortex. (Modifiziert nach Groenewegen 1988)

## 5.1. Das limbische System

1939 stellte Papez die neuroanatomische Grundlage von Emotionen im sogenannten Papez-Kreis (kreisartige Geschlossenheit der Strukturen des limbischen Systems) dar (Abb. 2). Die für die emotionalen Komponenten vermutlich wichtigste Struktur ist die Amygdala, während der Hippocampus, die Mamillarkörper und die vorderen Thalamuskern offenbar stärker mit kognitiver Gedächtnisspeicherung betraut sind. Der Nucleus centralis der Amygdala projiziert in den orbitofrontalen Cortex und in den Gyrus cinguli. Diese Bahn ist für die bewusste



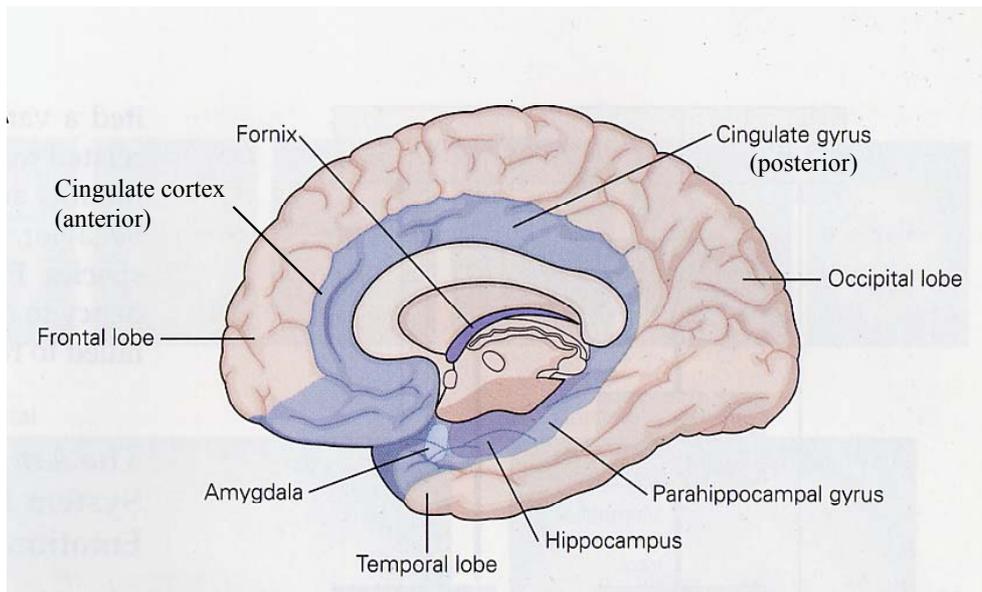


Abb. 3. Medialansicht des menschlichen Gehirns: Präfrontaler Cortex und limbischer Lobus. Der limbische Lobus besteht aus primitivem corticalem Gewebe (blau), welches einen Ring um den oberen Hirnstamm, sowie um Hippocampus und Amygdala bildet. (Modifiziert nach Kandel et al., 2000)

## 6. Tiermodell

Zur Untersuchung von hirnbioologischen Veränderungen bei Jungtieren nach Eltern- bzw. Vaterentzug wurde ein Tiermodell etabliert, bei dem beide Elternteile (Abb. 4) an der Pflege und Aufzucht der Jungen beteiligt sind, und das auch in anderen Eigenschaften dem Menschen „ähnlich“ ist. Bei der südamerikanischen Strauchratte *Octodon degus* sind die Väter intensiv an der Pflege und Aufzucht der Jungen beteiligt (Reynolds & Wright, 1979; Wilson 1982). Die Jungen sind bei der Geburt relativ weit entwickelt, ähnlich wie menschliche Neugeborene kommen sie mit offenen Augen und Ohren zur Welt, d.h. sie besitzen bereits funktionsfähige visuelle, akustische und olfaktorische Systeme. *Octodon degus* sind tagaktiv und leben in großen, familiär strukturierten Kolonien (Fulk 1976). Das stark ausgeprägte Sozialverhalten der Strauchratten wird u.a. getragen über ein gut entwickeltes Vokalisationsverhalten, welches den Sozialkontakt vermittelt (Poeggel & Braun, 1996; Braun & Scheich, 1997). Während der ersten zwei postnatalen Wochen erlernen die Jungen z.B. die Bedeutung eines mütterlichen Lockrufes, mit dem die Mutter die Jungen zum Säugen auffordert. Dieser Lernprozess, welcher durch die Assoziation zwischen dem mütterlichen Laut und einer positiven emotionalen Situation gebildet wird, ist eines der ersten

emotionalen Lernereignisse nach der Geburt. 2-Fluoro-deoxyglucose-Experimente zeigten hohe metabolische Aktivität im auditorischen Cortex, sowie im medialen Präfrontalcortex und hier speziell im anterioren cingulären Cortex, während der Präsentation des mütterlichen Rufes (Poeggel & Braun, 1996). Im ACd war diese Aktivierung bei den Jungen normal vokalisierender Mütter verglichen mit denen verstummter Mütter signifikant höher (Poeggel & Braun, 1996). Diese Beobachtungen implizieren, dass der ACd nicht nur in die Lauterkennung, sondern auch in den damit verknüpften emotionalen Lernprozess einbezogen ist (Poeggel & Braun, 1996; Braun & Scheich, 1997). Ich habe schon zuvor darauf hingewiesen, dass sich die funktionelle Reifung des PFC erst relativ spät in der postnatalen Ontogenese vollzieht. Deshalb kann davon ausgegangen werden, dass diese Region besonders vulnerabel gegenüber emotionalen Einflüssen ist, und dass sich z.B. Eltermentzug, Separation von der Familie u.a. frühkindliche emotionale Lern- und Erfahrungsprozesse auf die funktionelle Reifung dieser limbischen Hirnregion besonders auswirken sollten.



Abb. 4. *Octodon degus*, Eltern mit Jungtier in der Voliere. Digitalaufnahme (SONY Cyber-shot).

## 7. Fragestellungen

### A. Postnatale Entwicklung exzitatorischer Systeme und ihre Beeinflussung durch frühkindliche Erfahrungsprozesse

#### 1. Postnatale Entwicklung dendritischer Spines im anterioren cingulären Cortex (ACd)

Welche Veränderungen zeigen Dendritenlängen und die Dichte der dendritischen Spines der Schicht-II/III Pyramidenzellen im ACd im Verlaufe der frühkindlichen Entwicklung von *Octodon degus*?

Lässt sich, wie bei Primaten einschließlich dem Menschen gezeigt, (Huttenlocher 1979; 1984; Rakic et al., 1986; Zecevic et al., 1989; Bourgeois & Rakic, 1993), ein Maximum der Spinedichten nachweisen und wenn ja, zu welchem Zeitpunkt wird es erreicht?

Zur Beantwortung dieser Fragen wurden diese morphologischen Parameter bei Tieren am Tag der Geburt, sowie dem 14., 21. und 45. Lebenstag miteinander verglichen.

#### 2. Einfluss einer reizarmen Umgebung auf die Entwicklung dendritischer Spines im anterioren cingulären Cortex (ACd)

Basierend auf Studien am sensorischen und motorischen Cortex (z.B. Struble & Riesen, 1978; Rosenzweig & Bennett, 1996) sollte im Rahmen dieser Studie geklärt werden, ob sich die Komplexität der Lebensbedingungen auf die Entwicklung der Spinedichten der Schicht-II/III Pyramidenzellen im ACd auswirkt. Hierzu wurden Tiere, welche in Standardkäfigen (reizarme Umwelt = impoverished environment) aufwuchsen, mit Tieren verglichen, denen Zeit ihres Lebens große, mit Klettermöglichkeiten ausgestattete Volieren (komplexe Umwelt = enriched environment) zur Verfügung standen.

#### 3. Einfluss von wiederholtem kurzzeitigem Elterntzug auf die Entwicklung dendritischer Spines im anterioren cingulären Cortex (ACd)

Wiederholter kurzzeitiger Elterntzug während der ersten drei Lebenswochen führt bei *Octodon degus* zu signifikant höheren Apikal- und Basalspinedichten, welche am 45. Tag, nach drei Wochen ungestörten Familienlebens, noch zu beobachten sind (Helmeke et al., 2001a,b). Sind die Auswirkungen dieser stressvollen Ereignisse auf die Spinedichten der Schicht-II/III Pyramidenzellen im ACd auch schon am 21. Lebenstag, d.h. direkt nach Beendigung der Separationen nachweisbar?

Der Zeitpunkt des 21. Lebenstages wurde einerseits deshalb gewählt, weil er vor dem Zeitpunkt des „weanings“ (Entwöhnung von der Mutter) liegt und vermutet wird, dass während der Entwöhnung ebenfalls Veränderungen der Spinedichten auftreten. Zum anderen wurde dieser Stichtag deshalb gewählt, weil bisher unklar war, ob die am Tag 45 gefundene Spinevermehrung separierter Tiere eine vermehrte Proliferation oder eine unterdrückte Spineeliminierung reflektiert. Die unter Fragestellung 1. durchgeführten Untersuchungen weisen darauf hin, dass zu diesem Zeitpunkt ein Maximum der Spinedichten liegt, d.h. die Spineproliferationsphase dem Ende zugeht. Sollte sich also zu diesem Zeitpunkt bereits eine Spinevermehrung nachweisen lassen, dann wäre sie höchstwahrscheinlich auf eine vermehrte Spinebildung zurückzuführen.

Spinedichten und Dendritenlängen der Schicht-II/III Pyramidenzellen im ACd sozial aufgezogener Kontrolltiere und elternseparierter Tiere wurden zur Beantwortung dieser Frage miteinander verglichen.

#### *4. Einfluss des Vaters auf die Entwicklung dendritischer Spines im anterioren cingulären Cortex (ACd)*

Wenn wiederholter kurzzeitiger Eltermentzug während der ersten drei Lebenswochen zu morphologisch nachweisbaren Veränderungen am 21. Lebenstag führt, wie wirkt sich der chronische Verlust eines Elternteils, des Vaters, auf die Entwicklung der synaptischen Architektur des ACd aus?

Eine Situation wie sie bei Menschen häufig vorzufinden ist, nämlich das Fehlen einer zweiten Bezugsperson, dem Vater, bei der Erziehung des Nachwuchses, ist nur sehr schwer an Tiermodellen zu untersuchen, da bei den meisten Labortieren ausschließlich die Mutter für die Aufzucht der Nachkommen verantwortlich ist. An unserem Tiermodell hingegen lässt sich anhand eines einfachen Experimentes der Einfluss des väterlichen Brutpflegeverhaltens auf die Entwicklung der Hirnfunktion seiner Nachkommen untersuchen. Hierzu wurde die Dichte dendritischer Spines, sowie die Dendritenlängen von Schicht-II/III Pyramidenzellen des ACd bei Jungtieren, welche vom ersten bis zum 21. Lebenstag ohne Vater aufwachsen, ermittelt.

### *5. Beteiligung des serotonergen Systems an den separationsinduzierten Veränderungen dendritischer Spines*

Ein weiterer Schwerpunkt dieser Arbeit bestand darin, eine Beteiligung des serotonergen Systems bei den separationsinduzierten Veränderungen der synaptischen Entwicklung zu überprüfen.

In vivo Mikrodialyse-Studien haben gezeigt, dass bei sozialer Isolation eine vermehrte Ausschüttung von Serotonin im Vorderhirn erfolgt (Gruss & Braun, 1997). Es ist außerdem gezeigt worden, dass Serotonin insbesondere über 5-HT<sub>1A</sub>-Rezeptoren die Ausbildung und Stabilisierung von synaptischen Verbindungen innerhalb der limbischen Schaltkreise beeinflusst (Lauder & Krebs, 1978; Lipton & Kater, 1989; Vu & Törk, 1992). Wir vermuteten daher, dass eine stressinduzierte Serotonausschüttung bei den Veränderungen der Spinesynapsen beteiligt ist und untersuchten, ob sich eine Blockade des serotonergen Systems während der Separation auf die Entwicklung von Spinesynapsen im ACd dieser Tiere auswirkt.

Hierzu wurden die Dichten dendritischer Spines, sowie die Dendritenlängen der Schicht-II/III Pyramidenzellen des ACd bei Jungtieren untersucht, denen während der Trennung von den Eltern ein Antagonist gegen den 5-HT<sub>1A</sub>-Rezeptor injiziert worden war, und mit denen der verschiedenen Kontrollgruppen verglichen.

## **B. Einfluss von wiederholtem kurzzeitigem Elterntzug auf die Entwicklung inhibitorischer Systeme**

### *1. Einfluss von wiederholtem kurzzeitigem Elterntzug auf die Entwicklung inhibitorischer Interneurone im medialen Präfrontalcortex (PFC)*

Beeinflusst eine wiederholte Separation von den Eltern und Geschwistern während der ersten drei Postnatalwochen die Entwicklung inhibitorischer Interneurone im Präfrontalcortex? Separationsinduzierte Veränderungen der Dichte GABAerger Interneurone wurden über die quantitative Erfassung der Dichte von Neuronen analysiert, welche eines der drei calciumbindenden Proteine Calbindin, Parvalbumin und Calretinin exprimieren. Hierzu wurden immunohistochemische Fluoreszenzfärbungen von Hirnschnitten sozial aufgezogener und wiederholtem Elterntzug ausgesetzter Tiere angefertigt und quantitativ ausgewertet.

Ausgewertet wurden zusätzlich zum ACd auch weitere Subregionen des PFC, nämlich der präcentrale mediale Bereich (PrCm), die prälimbische (PL) und die infralimbische (IL) Region.

*2. Einfluss von wiederholtem kurzzeitigem Elternentzug auf die Entwicklung von CRH exprimierenden Neuronen im medialen Präfrontalcortex (PFC)*

Beeinflusst die wiederholte Separation von den Eltern und Geschwistern die Entwicklung von CRH exprimierenden Neuronen im Präfrontalcortex? Wird CRH im PFC von *Octodon degus* von inhibitorischen Interneuronen exprimiert? Über Fluoreszenzdoppelfärbungen wurde die Colokalisation von CRH mit je einem der calciumbindenden Proteine untersucht.

## **II. Material und Methoden**

### **1. Aufzucht und Haltung der Versuchstiere**

Als Versuchstiere dienten männliche Jungtiere der südamerikanischen Strauchratte *Octodon degus*, welche in einer Kolonie am Leibniz Institut für Neurobiologie gezüchtet wurden. Die Familien, bestehend aus den Elterntieren und ihren Nachkommen, lebten in Standardkäfigen (Höhe x Breite x Tiefe: 24 x 53 x 32 cm) bzw. in, dem natürlichen Kletterdrang der Tiere nachkommenden Volieren (Höhe x Breite x Tiefe: 70 x 53 x 43 cm). Frisches Trinkwasser, ausreichend Rattenpellets, Gemüse und Früchte standen als Nahrung zur Verfügung. Die klimatisierten Räume hatten eine durchschnittliche Temperatur von 22°C und einen Licht-Dunkel-Zyklus von 12/12 Stunden.

### **Versuch A - Postnatale Entwicklung exzitatorischer Systeme und ihre Beeinflussung durch frühkindliche Erfahrungsprozesse**

#### **1.1. Postnatale Entwicklung dendritischer Spines im anterioren cingulären Cortex (ACd)**

Vier Versuchsgruppen sozial aufgewachsener Tiere, welche ungestört mit der Familie in Standardkäfigen aufwuchsen, wurden bei dieser Studie miteinander verglichen:

- P0 (Postnataltag 0), Tag der Geburt (n=4)
- P14 (n=4)
- P21, (n=3)
- P45 (n=4)

## 1.2. Einfluss einer reizarmen Umgebung auf die Entwicklung dendritischer Spines im anterioren cingulären Cortex (ACd)

Zwei Versuchsgruppen von Tieren, welche ungestört mit der Familie in

- Standardkäfigen (reizarme Umgebung; Abb. 5A) (n=4) bzw.
- Volieren (komplexe Umgebung; Abb. 5B) (n=4) aufwuchsen, wurden an ihrem 21. Lebensstag miteinander verglichen.

A



**B**



Abb. 5. *Octodon degus* (A) Käfighaltung, (B) Haltung in der Voliere. Digitalaufnahme (SONY Cyber-shot).

### **1.3. Einfluss von wiederholtem kurzzeitigem Elternentzug auf die Entwicklung dendritischer Spines im anterioren cingulären Cortex (ACd)**

Zwei in Volieren aufgezogene Versuchsgruppen wurden am P21 miteinander verglichen:

- Sozial aufgewachsene Tiere, welche bis zum 21. Lebensstag ungestört in der Familie blieben (n=4) und

- Tiere, welche wiederholtem Elternentzug ausgesetzt waren (n=4). Zwischen dem postnatalen Tag 1 (P1) und P21 wurden diese Jungtiere täglich für jeweils eine Stunde von den Eltern und Geschwistern separiert. Alle Jungtiere eines Wurfes wurden hierzu aus dem Elternkäfig entnommen und in einzelne Käfigschalen (Länge x Höhe x Breite: 37 x 11 x 8,5 cm) in einem separaten Raum gesetzt. Jeglicher sensorischer Kontakt zu den Eltern war unterbunden, die Geschwister jedoch konnten sich gegenseitig hören und riechen, aber nicht sehen.

#### 1.4. Einfluss des Vaters auf die Entwicklung dendritischer Spines im anterioren cingulären Cortex (ACd)

Auch bei diesem Versuch wurden die in Volieren aufgewachsenen Versuchstiergruppen am P21 miteinander verglichen:

- Sozial, mit beiden Elternteilen aufgewachsene Tiere (n=4) und
- vaterlos aufgewachsene Tiere (n=4), bei denen der Vater am ersten Tag nach der Geburt der Jungen aus der Familie entfernt wurde.

#### 1.5. Beteiligung des serotonergen Systems an den separationsinduzierten Veränderungen dendritischer Spines

Folgende Gruppen in Volieren aufzogener Jungtiere wurden am Postnataltag 21 analysiert:

Salineinjizierte Kontrollen		Pharmakologisch behandelte Tiere		
1) sozial+Saline	2) Elternentzug (EZ)+Saline	3) EZ+0,1mg/kg Way-100635	4) EZ+1mg/kg Way-100635	5) EZ+5mg/kg Way-100635
N=4	n=4	n=4	n=4	n=4

- 1) Diesen Tieren wurde von Tag 1 bis Tag 21 einmal täglich eine Salineinjektion (0,2 ml) intraperitoneal (ip) verabreicht. Im Anschluss an die Injektion wurden sie in den Elternkäfig zurückgesetzt, nach 15 Minuten und nach einer weiteren Stunde (in Anpassung an die Prozedur bei der Kombination von Elternentzug und Injektion) wurden sie im Käfig kurz in die Hand genommen (gehändelt).
- 2) Diesen Tieren wurde von Tag 1 bis Tag 21 einmal täglich eine Salineinjektion (0,2 ml) ip verabreicht. Im Anschluss daran wurden sie in den Elternkäfig zurückgesetzt und nach 15 Minuten für eine Stunde separiert.

Den Tieren der folgenden drei Versuchsgruppen wurden vor der Separation verschiedene Konzentrationen des 5-HT<sub>1A</sub>-Antagonisten Way-100635, in 0,2 ml Saline gelöst, ip verabreicht:

- 3) 0,1 mg/kg Way-100635 in 0,2ml Saline bekamen diese Tiere von P1 bis P21 einmal pro Tag injiziert. Nach der Injektion wurden sie 15 Minuten im Elternkäfig belassen und im Anschluss eine Stunde separiert.
- 4) 1,0 mg/kg Way-100635
- 5) 5,0 mg/kg Way-100635

Die Tiere der Gruppen 4 und 5 wurden bis auf die Konzentration des verabreichten 5-HT<sub>1A</sub>-Antagonisten ebenso behandelt wie die der Gruppe 3.

Das Aufarbeiten der Hirne begann eine Stunde nach der letzten Separation bzw. dem letzten Händling am 21. Lebenstag.

Auf die Auswertung der Tiere der Gruppe 5 musste wegen ihrer hohen Sterberate (50%) in der ersten postnatalen Woche verzichtet werden. Die übrigen Tiere dieser Konzentrationsgruppe zeigten Zeichen einer Überdosierung: erhöhter Muskeltonus der Gliedmassen, von-sich-Strecken der Gliedmassen, unfähig zu koordinierter Bewegung, wie sie bei erwachsenen Ratten erst bei einer Dosis von 20 mg/kg Way-100635 ip injiziert, beobachtet wurden (Löscher & Hönack, 1993).

## Versuch B - Einfluss von wiederholtem kurzzeitigem Elternentzug auf die Entwicklung inhibitorischer Systeme

### 1.6. Einfluss von wiederholtem kurzzeitigem Elternentzug auf die Entwicklung inhibitorischer Interneurone im medialen Präfrontalcortex (PFC)

Vier Versuchsgruppen, aufgezogen in Standardkäfigen, wurden am P45, sowie am P90 miteinander verglichen:

P45		P90	
1) sozial	2) Elternentzug (EZ)	3) sozial	4) Elternentzug (EZ)
n=6	n=6	n=5	n=5

- 1) Diese Tiere blieben bis zum 45. Lebenstag ungestört in der Familie.
- 2) Tiere, welche wiederholtem Elternentzug ausgesetzt waren: zwischen dem postnatalen Tag 1 (P1) und P21 wurden diese Jungtiere dreimal täglich für jeweils eine Stunde von den Eltern und Geschwistern separiert. Vom 22. Lebenstag bis zum 45. Lebenstag verblieben diese Jungtiere ungestört im Familienverband.
- 3) Diese Tiere blieben bis zum 45. Lebenstag ungestört in der Familie, am 46. Tag wurden jedoch die Eltern und die weiblichen Jungtiere aus dem Käfig entfernt, um Inzucht zu vermeiden. Die männlichen Jungtiere lebten bis zum 90. Postnataltag ungestört im sozialen Verband.
- 4) Tiere, welche wiederholtem Elternentzug ausgesetzt waren: zwischen dem postnatalen Tag 1 (P1) und P21 wurden diese Jungtiere dreimal täglich für jeweils eine Stunde von den Eltern und Geschwistern separiert. Vom 22. Lebenstag bis zum 45. Lebenstag verblieben diese Jungtiere ungestört im Familienverband. Am 46. Tag wurden die Eltern und die weiblichen Jungtiere aus dem Käfig entfernt.

## **1.7. Einfluss von wiederholtem kurzzeitigem Elternentzug auf die Entwicklung von CRH exprimierenden Neuronen im medialen Präfrontalcortex (PFC)**

Folgende Gruppen, in Standardkäfigen aufgezogener Tiere, wurden untersucht:

- 1) Sozial aufgewachsene Tiere (P45), vgl. unter Kapitel 1.6. (n=6)
- 2) Separierte Tiere (P45), vgl. unter Kapitel 1.6. (n=6 )
- 3) Sozial aufgewachsene Tiere (P90), vgl. unter Kapitel 1.6. (n=5)
- 4) Separierte Tiere (P90), vgl. unter Kapitel 1.6. (n=5)

## **2. Die Golgi-Methode**

In den sechziger Jahren des 19. Jahrhunderts entwickelte Camillo Golgi eine Silberfärbungstechnik, die mit Hilfe quecksilberhaltiger Lösung nur einen bestimmten Prozentsatz von Nervenzellen in einem mikroskopischen Feld anfärbt und dadurch die cytologische Untersuchung des Nervensystems wesentlich erleichtert. In der vorliegenden Arbeit wurde die Golgi-Cox-Methode verwendet, eine Methode, die einige Jahre nach Golgis Entdeckung der Silberfärbetechnik von Cox eingeführt wurde (1890, 1891), der eine Mischung aus Kaliumbichromat und Quecksilberchlorid mit Kaliumchromat verwendete.

### **2.1. Prinzipien der Golgi-Cox-Methode**

Die Golgi-Cox-Methode ist dadurch charakterisiert, dass sie einen Niederschlag von metallischem Quecksilber und wahrscheinlich komplexen Oxiden des Quecksilbers produziert. Sie wird durch folgende Merkmale gekennzeichnet:

- nur eine kleine Anzahl der Nervenzellen wird angefärbt,
- in den wenigen angefärbten Zellen ist der metallische Niederschlag sehr massiv und umfasst das Soma, die von ihm abgehenden Dendriten und das Axon,
- die verbleibenden ungefärbten Strukturen bilden einen transparenten Hintergrund, von dem sich die gefärbten Zellen deutlich abheben,

- es gibt keine Färbungsgradienten – Strukturen sind entweder komplett lichtundurchlässig oder vollständig transparent.

## **2.2. Durchführung der Golgi-Cox-Färbung**

Die Versuchstiere wurden entsprechend ihrer Gruppen am letzten Lebenstag gewogen und anschließend dekapitiert. Nach erfolgter Herauspräparierung des Gehirns wurde dieses gewogen und für die Dauer von zwei Wochen in eine modifizierte Golgi-Lösung nach Glaser und Van der Loos (1981) eingelegt (Protokoll im Anhang). Im Anschluss daran wurde das Hirn in Celloidin eingebettet und nach mindestens einwöchiger Aufbewahrung in Alkohol Transversalschnitte angefertigt, an denen eine Reduktion der Färbung vorgenommen wurde (detailliertes Protokoll im Anhang).

## **2.3. Analyse und Auswertung der Golgi-gefärbten Neurone**

Die Anzahl der dendritischen Spines, sowie die Längen der ausgewerteten Dendriten wurden mit Hilfe des computergestützten Bildanalyseprogramms NeuroLucida (MicroBrightField, Inc.) ermittelt, welches die dreidimensionale Analyse mikroskopischer Präparate ermöglicht. Das System ist so konzipiert, dass über einen als „Lucivid<sup>TM</sup>“ bezeichneten Spiegel die Oberfläche des Computerbildschirms in den Strahlengang des Mikroskops projiziert wird. Mit einer Computermaus können so mikroskopische Objekte nachgezeichnet werden (Abb. 6). Die Besonderheit des Systems liegt darin, dass der Mikroskoptisch, auf dem sich das zu analysierende Präparat befindet, in allen drei Achsen ebenfalls über das Programm gesteuert wird, so dass jede Mausbewegung automatisch verrechnet wird, und somit das mikroskopische Präparat dreidimensional analysiert werden kann. Für die Auswertung der in dieser Arbeit untersuchten Golgi-gefärbten Neurone konnten deshalb die Dendritenbäume in ihrer gesamten dreidimensionalen Ausdehnung berücksichtigt werden. Bei Zählung dendritischer Spines errechnet das Bildanalyseprogramm automatisch die durchschnittliche Spinefrequenz/ $\mu\text{m}$  aller ausgewerteten Dendriten eines Neurons, unterteilt nach der jeweiligen Verzweigungsordnung. Der Vorteil dieses Systems gegenüber früher angewandten Methoden, bei denen nur kurze Dendritenabschnitte ausgewertet werden konnten, liegt darin, dass durch die dreidimensionale Berechnung sehr viel genauere Werte erhalten werden und durch die

Analyse ganzer Dendritenbäume das in den Quantifizierungen enthaltene Datenmaterial größer ist (Bock 1998, *Dissertationsschrift*). Mit Hilfe dieses Bildanalyse-Systems wurden die Dichten der dendritischen Spines auf den zur Auswertung ausgesuchten Neuronen und deren Dendritenlängen ausgewertet. Das NeuroLucida-Programm errechnet für eine Pyramidenzelle die durchschnittliche Spinefrequenz bzw. die Dendritenlänge der gesamten Apikal- und Basaldendriten und die jeder Verzweigungsordnung (Abb. 7), so dass man zum Beispiel bei einem Neuron mit vier Dendriten der 2. Ordnung den Mittelwert der Spinefrequenzen dieser vier Dendritenabschnitte erhält. Die durchschnittliche Spinefrequenz bzw. Segmentlänge für jede der ersten fünf Ordnungen und der gesamten Dendritenbäume eines Neurons, unterteilt in Apikal- und Basaldendriten, ging von zehn ausgewerteten Zellen eines Tieres in die statistische Auswertung ein.

Die Berechnung der Spinefrequenzen und Dendritenlängen erfolgte erst, nachdem alle Tiere einer Versuchsgruppe ausgewertet waren.

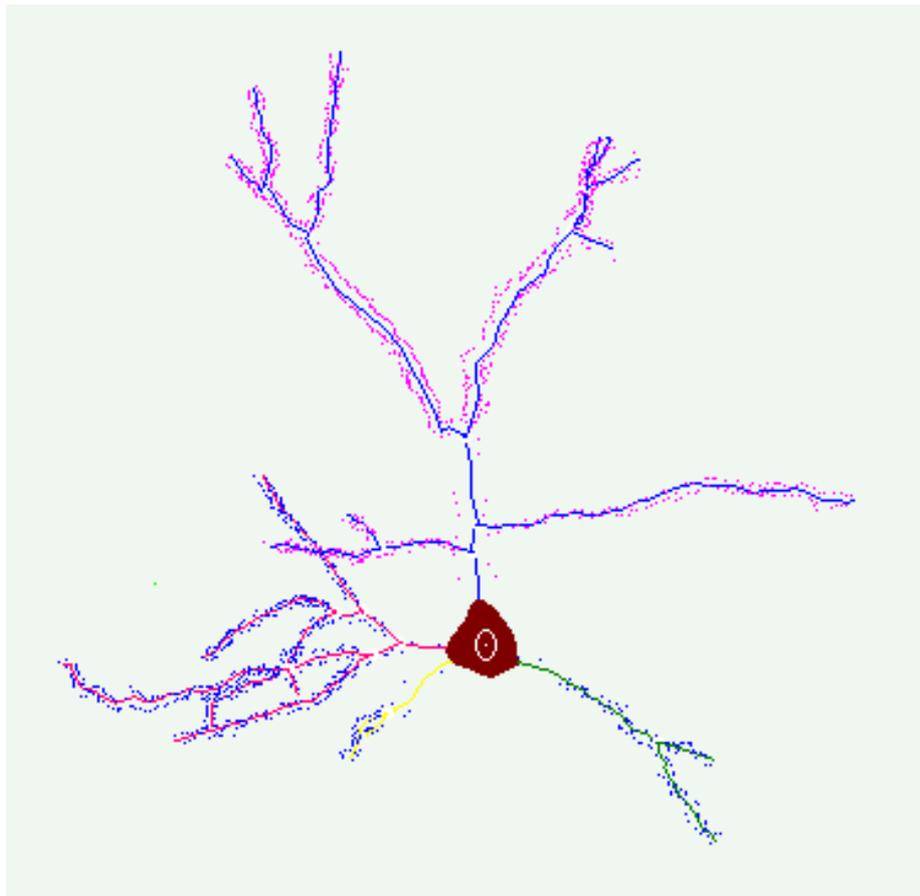


Abb. 6. Nachzeichnung einer Pyramidenzelle mit dem NeuroLucida-System. Spines wurden durch Punkte an den Basaldendriten und dem Apikaldendrit markiert.

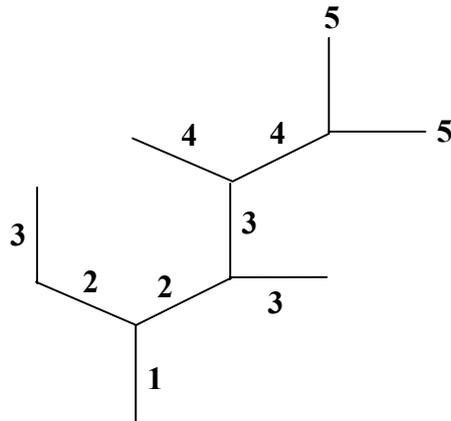


Abb. 7. Modelldendrit mit Verzweigungen bis zur 5. Ordnung.

## 2.4. Auswahl der Pyramidenzellen

Ausgewertet wurden nur gut und vollständig imprägnierte Pyramidenzellen aus Schicht-II/III des ACd mit folgenden qualitativen Merkmalen (Abb. 8):

- ein kegelförmiges Perikaryon, dessen Längsachse nahezu senkrecht zur Hirnoberfläche steht,
- von der Spitze des Zellkörpers entsteht nach apikal der Hauptdendrit (Apikaldendrit), der die größte Kaliberstärke aller Dendriten aufweist und senkrecht zur Hirnoberfläche verläuft,
- bei den für diese Arbeit ausgewählten Zellen teilt sich der Apikaldendrit in zwei gleich starke Äste auf, von denen dann apikale Seitendendriten entspringen,
- die basalen Dendriten und das Axon verlassen das Soma schweifartig in Richtung Mark,
- die Dendritenbäume von Apikal- und Basaldendriten sind gut ausgebildet und nach Möglichkeit vollständig im Schnitt erhalten.

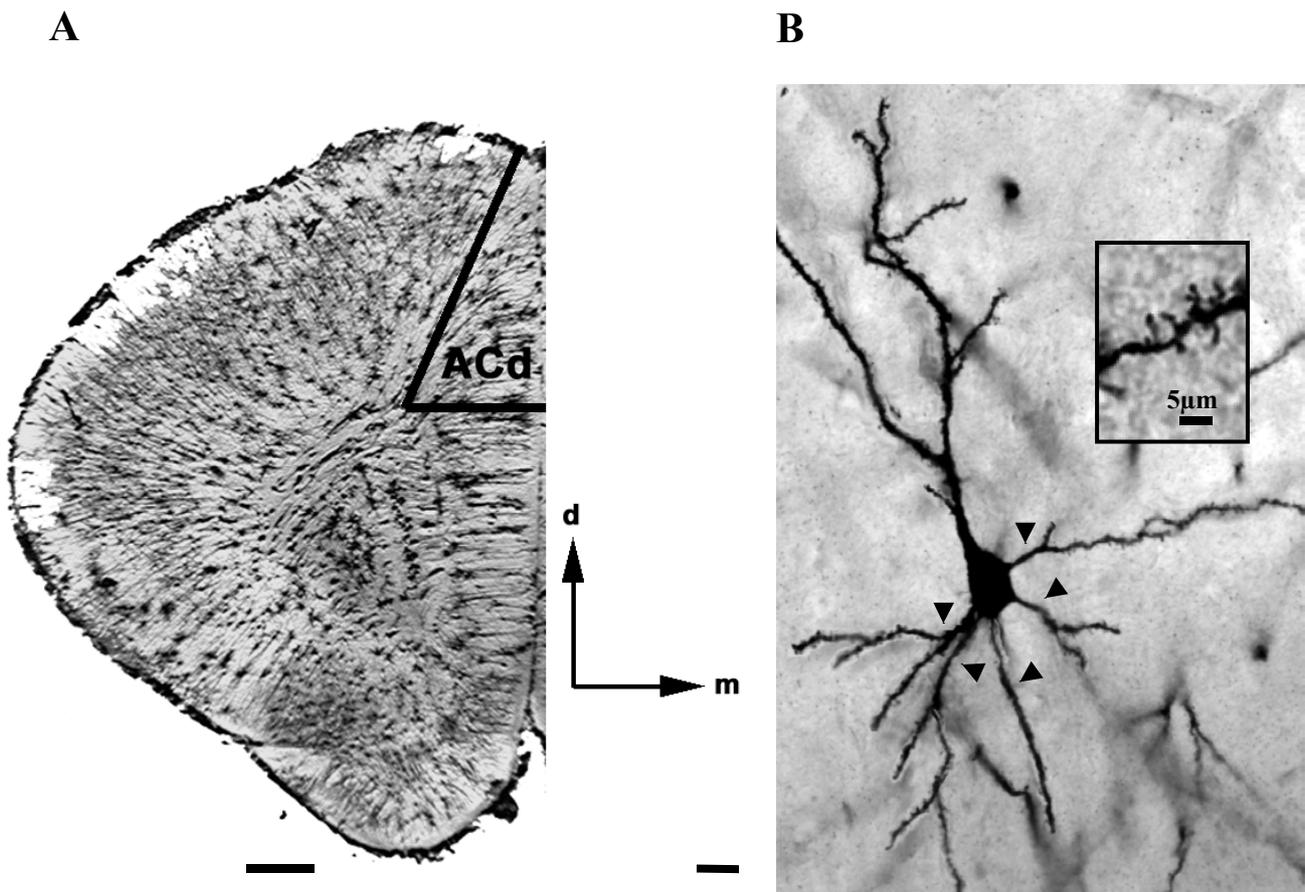


Abb. 8. (A) Golgi-Cox imprägnierte Vorderhirnhemisphäre eines männlichen Tieres der Spezies *Octodon degus*. Schwarz umrandet sind die Grenzen des Bereichs vom ACd, aus dem die Pyramidenzellen zur Analyse ausgewählt wurden. Messbalken = 400 μm, d = dorsal, m = medial. (B) Photomontage einer Golgi-Cox imprägnierten Schicht-II/III Pyramidenzelle des ACd mit ihrem Apikal- und den Basaldendriten (Pfeile), sowie einer Vergrößerung eines Dendritensegmentes. Messbalken = 18 μm. (Aus Helmeke et al., 2001b)

## 2.5. Quantifizierung und statistische Auswertung

Zur Quantifizierung wurden pro Tier fünf Pyramidenzellen aus Schicht-II/III in jeder der beiden Hemisphären untersucht. Die statistische Analyse ergab in keinem der Experimente signifikante Unterschiede zwischen den Hemisphären. Daher wurden die Werte aus rechter und linker Hemisphäre gepoolt. Von jedem Tier gingen somit folgende Werte von zehn Zellen in den statistischen Vergleich zwischen den Versuchsgruppen ein (n = Anzahl der Zellen pro Versuchsgruppe):

- mittlere Apikal- und Basalspinedichte für jede der ersten fünf Verzweigungsgrade,

- mittlere durchschnittliche Apikal- und Basalsegmentlänge für jede der ersten fünf Verzweigungsgrade,
- mittlere Apikal- und Basalspinedichte der gesamten Dendritenbäume,
- mittlere Apikal- und Basaldendritenlänge der gesamten Dendritenbäume.

Der Apikaldendrit und mindestens ein vollständig verfolgbarer Basaldendrit pro Zelle wurden in der Gesamtheit ihrer Verzweigungen bis zum letzten Verzweigungsgrad ausgewertet. In der statistischen Auswertung wurden, aufgrund des seltenen Auftretens höherer Verzweigungsordnungen als der 5. Ordnung, nur die ersten fünf Ordnungen (Abb. 7) und der gesamte Dendritenbaum eines Neurons, unterteilt nach apikal und basal, dargestellt.

Betrug die Anzahl der Versuchsgruppen einer Versuchsreihe mehr als zwei, wurden die Werte dieser Versuchsgruppen zunächst mit einem Kruskal-Wallis One-Way ANOVA auf signifikante Unterschiede hin überprüft. Ergab dieser Test einen signifikanten Unterschied von  $p < 0,05$ , so wurden die einzelnen Versuchsgruppen anschließend untereinander mit dem Mann-Whitney U-Test (SigmaStat) auf signifikante Unterschiede hin überprüft. Bestand eine Versuchsreihe nur aus zwei Versuchsgruppen, so wurden diese gleich mit dem Mann-Whitney U-Test überprüft.

### **3. Immunohistochemischer Nachweis von Calretinin, Calbindin, Parvalbumin und CRH**

#### **3.1. Perfusionsfixierung und Schneiden**

Die Tiere wurden durch eine Injektion von Ketanest/Rompun (1:4; 7 ml/kg intraperitoneal) (Ketanest: Porke-Davis, Berlin, Germany; Rompun: Bayer, Leverkusen, Germany) anästhesiert und anschließend gewogen. Zur Entfernung des Blutes aus den Kapillaren wurde mit 50 ml Tyrode-Puffer (Sigma-Aldrich, Deisenhofen, Germany) transkardial gespült. Dem Tyrode-Puffer wurde zuvor 1% Liquemin (Roche, Grenzach-Wyhlen, Germany) als Anticoagulans zugefügt. Bei der anschließenden Wechselfixierung wurden erst 150 ml einer Lösung von 4% Paraformaldehyd (PFA) in 0,1 M Natriumacetat-Puffer (pH=6,5) und schließlich 300-400 ml einer Lösung von 4% PFA in 0,1 M Natriumborat-Puffer (pH=9,3) zugeführt.

Die Gehirne wurden gewogen, in der letzten Perfusionslösung mindestens eine Stunde im Kühlschrank nachfixiert und anschließend in 0,1 M Phoshat-Puffer (PBS, pH=7,4) überführt.

Mit einem Vibratom (Leica Instruments GmbH, Nußloch, Germany) wurden vier alternierende Serien von 50 µm dicken Horizontalschnitten angefertigt und in mit PBS gefüllten Gewebekulturplatten (Greiner, Frickenhausen, Germany) aufgefangen. Besonderes Augenmerk wurde auf die freie Beweglichkeit der Schnitte in den Kavitäten gerichtet, um eine gleichmäßige Immunreaktion zu gewährleisten.

### **3.2. Immunohistochemie**

Drei Serien wurden für Fluoreszenz doppelgefärbt mit entweder 1) Mouse anti- $\alpha$ -Parvalbumin (PV, Maus-IgG, Sigma-Aldrich, Deisenhofen, Germany), 2) Mouse anti-Calbindin (CaBP-D28k, Maus-IgG, SWANT, Switzerland) oder 3) Mouse anti-Calretinin (CaR, Maus-IgG, Transduction Laboratories, USA) und Rabbit anti-Corticotropin-Releasing-Factor (CRF, Kaninchen-IgG, Peninsula Laboratories, Inc., USA). Die vierte Serie wurde in einer Einfachfärbung gegen Glutamatdecarboxylase (Rabbit anti-GAD, Kaninchen-IgG, Chemicon International, Ltd., Hofheim, Germany) gefärbt (Protokoll im Anhang).

### **3.3. Quantitative Auswertung**

Ausgewertet wurden die Dichten von CRH-, CaR-, PV- und CaBP-D28k-immunoreaktiven Zellen, sowie doppelgefärbte Zellen, welche sowohl immunoreaktiv für CRH als auch für eines der calciumbindenden Proteine waren. Von einer Quantifizierung der GAD-immunoreaktiven Zellen wurde trotz der Spezifität der Färbung (dargestellt mit DAB-Nickel-Färbung), aufgrund großer Farbintensitätsunterschiede zwischen den Zellen, abgesehen.

Für die quantitative Erfassung der Zelldichten war der PFC frontal in rostro-caudaler Richtung in Serie geschnitten worden. Von jedem Tier wurden für jede Färbung fünf definierte Hirnschnitte des prägenualen PFC im Abstand von 200 µm genutzt. Von diesen Hirnschnitten wurden die Subregionen des medialen PFC (ACd, PrCm, PL, IL) mit einem Macintosh-Computer, welcher über eine Video Kamera mit einem Olympus Mikroskop verbunden, sowie mit einer Frame Grabber Karte ausgerüstet war, bei 20facher Vergrößerung mit Hilfe des Bildverarbeitungssystems NIH-Image (Scion-Corp., USA) eingescannt.

Innerhalb der Grenzen der jeweiligen Region (Abb. 1) wurden definierte Messfelder kontinuierlich durch die Cortexschichten gelegt und zwar für jede Hemisphäre der fünf

ausgewählten Hirnschnitte jeder Serie. Im Durchschnitt hatte z.B. der ACd fünf bis sechs Messfelder mit einer Größe von jeweils  $163670 \mu\text{m}^2$  innerhalb der Region. Bei fünf ausgewerteten Schnitten mit je zwei Hemisphären wurde also im ACd in mindestens 50 Messfeldern pro Tier die Anzahl der Zellen einer Färbung ermittelt. Zellen, die über dem linken und unteren Messfeldrand lagen, wurden nicht gezählt. Die Zellen und Flächen aller Messfelder der Schnittebenen eines Versuchstieres, einer Region und einer Färbung wurden addiert und daraus die mittlere Zelldichte in Zellen/ $\text{mm}^2$  berechnet. Für jede der vier ausgewerteten immunohistochemischen Färbungen ergab sich bei jeder der vier Regionen des medialen PFC pro Tier ein Mittelwert für die Zelldichte. CRH-immunoreaktive Zellen wurden bei drei Serien mit und ohne Colokalisation zu den calciumbindenden Proteinen ausgewertet. Parallel mit CaR, PV und CaBP-D28k, welche mit einem Fluoreszenzfilter für Alexa 488 aufgenommen wurden, sind auch CRH-Färbungen mittels einem Filter für Alexa 594 eingescannt worden. Somit wurden dreimal so viele Messfelder für CRH ausgewertet, als für jedes der calciumbindenden Proteine. Doppelt Zählen war bei den CRH-immunoreaktiven Zellen also möglich, es wurden jedoch nicht die absoluten Zellzahlen ermittelt, sondern Zelldichten zwischen verschiedenen experimentellen Tiergruppen verglichen. Eine Colokalisation von CRH mit PV, CaR oder CaBP-D28k wurde nicht anhand der eingescannten Bilder ausgewertet, sondern beim Mikroskopieren notiert. Die doppelte Erfassung von PV-, CaBP-D28k- bzw. CaR-immunogefärbten Zellen wurde durch die Distanz von  $200 \mu\text{m}$  zwischen den Schnitten ausgeschlossen.

### **3.4. Statistik**

Die statistischen Analysen sind unter Verwendung des Statistik-Programms SigmaStat 2.0 (Jandel Scientific) durchgeführt worden.

Zwischen den Tiergruppen dieser Versuchsreihe wurden die Zelldichten der jeweiligen immunohistochemischen Färbungen mit einem Kruskal-Wallis One-Way ANOVA auf signifikante Unterschiede hin überprüft. Anschließend wurden die einzelnen Versuchsgruppen untereinander mit dem Mann-Whitney U-Test auf signifikante Unterschiede hin überprüft.

#### **4. Hirn- und Körpergewichte**

Bei allen Tieren der Versuche A und B wurden Körper- und Hirngewichte vor bzw. nach dem Dekapitieren gemessen. In die statistische Auswertung gingen dabei die Werte aller für die Versuche vorbereiteten Tiere ein. Somit lag die Tierzahl hier höher, als bei dem für die Auswertung der Experimente ausgewählten Tiermaterials. Fixierte und unfixierte Hirne wurden nicht gepoolt.

Die Tiergruppen wurden mittels einem Kruskal-Wallis One-Way ANOVA auf signifikante Unterschiede hin überprüft. Ergab dieser Test einen signifikanten Unterschied von  $p < 0,05$ , so wurden die einzelnen Versuchsgruppen anschließend untereinander mit dem Mann-Whitney U-Test (SigmaStat) auf signifikante Unterschiede hin überprüft.

#### **5. Untersuchungen zu experimentell induzierten Veränderungen von Cortisol und ACTH im Blut**

Den Volieretieren des Versuches A wurde unmittelbar nach dem Dekapitieren Rumpfblood entnommen. Dieses wurde 30 Minuten bei 7500 Umdrehungen pro Minute und 4°C zentrifugiert (RC5C, Sorvall Instruments). Das überstehende Serum wurde abgenommen und bei -80°C eingefroren. In Zusammenarbeit mit Prof. C. Luley und Dr. S. Westphal vom Institut für Klinische Chemie und Biochemie der Medizinischen Fakultät der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg wurden die Konzentrationen von Cortisol und ACTH für jedes der Tiere festgestellt (Protokoll im Anhang).

Die Tiergruppen wurden mittels einem Kruskal-Wallis One-Way ANOVA auf signifikante Unterschiede hin überprüft. Ergab dieser Test einen signifikanten Unterschied von  $p < 0,05$ , so wurden die einzelnen Versuchsgruppen anschließend untereinander mit dem Mann-Whitney U-Test (SigmaStat) auf signifikante Unterschiede hin überprüft.

### III. Ergebnisse

#### Versuch A – Postnatale Entwicklung exzitatorischer Systeme und ihre Beeinflussung durch frühkindliche Erfahrungsprozesse

##### 1. Postnatale Entwicklung dendritischer Spines im anterioren cingulären Cortex (ACd)

Um die Ergebnisse des Einflusses frühkindlicher Erfahrungsprozesse auf die spinesynaptischen Verbindungen der Schicht-II/III Pyramidenzellen des ACd (Abb. 9) interpretieren zu können, war es zunächst notwendig, den normalen Entwicklungsverlauf zu analysieren. Hierzu wurden die Spinedichten und Dendritenlängen von Käfigtieren vier verschiedener Altersstadien ausgewertet. Es zeigt sich, dass sowohl die Dichte der Apikalspines (Abb. 10A) als auch die der Basalspines (Abb. 11A) während der ersten drei Wochen also bis zum 21. Lebenstag zunimmt und während der folgenden drei Wochen bis zum 45. Lebenstag abnimmt.

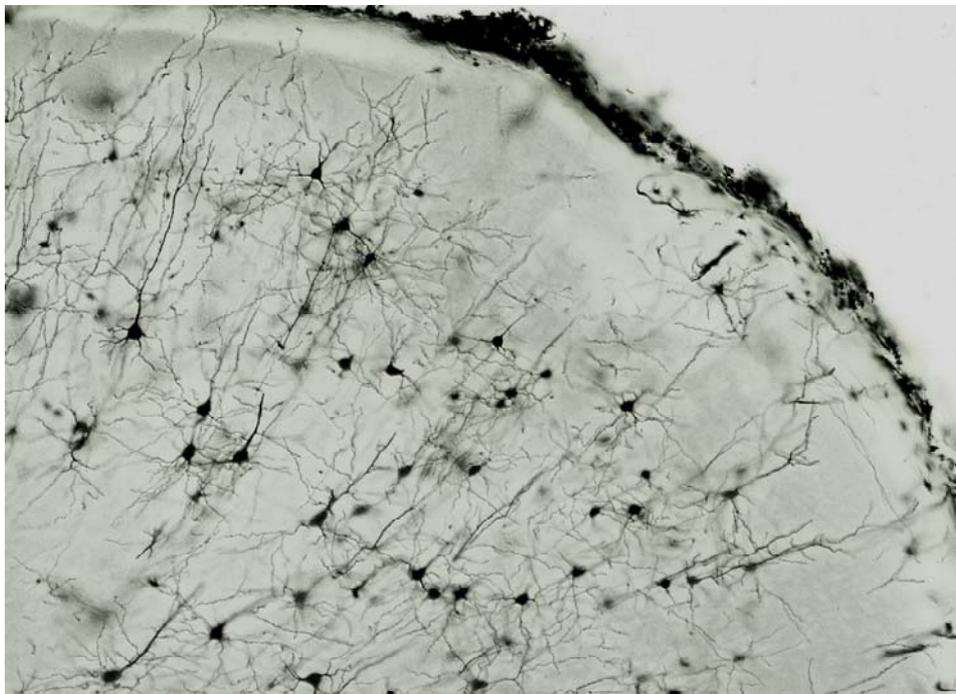


Abb. 9. Virtuell zusammengesetztes Bild (NeuroLucida Executable, Confocal Virtual Slice, MicroBrightField, Inc.), Golgigefärbte Neurone im ACd eines 21tägigen *Octodon degus*.

## 1.1. Apikaldendriten

a) Ein Vergleich der mittleren Spinedichte der gesamten Apikaldendritenbäume über alle ihre Verzweigungsordnungen (Abb. 10A; Tab. 1) zeigt einen signifikanten Anstieg der Spinefrequenz auf 143% von P0 zu P14, auf 168% von P0 zu P21 und auf 134% von P0 zu P45. Von P14 zu P21 gibt es immerhin noch einen signifikanten Anstieg auf 118% und von P21 zu P45 eine signifikante Reduktion der Spinedichte auf 80%. Vergleicht man die Spinefrequenzen der vier Altersgruppen jeweils in den einzelnen Dendritenabschnitten, ergibt sich eine genauere Analyse (Abb. 10B; Tab. 1, 3): In der 1. Verzweigungsordnung sind die Apikalspinedichten in den verschiedenen Altersstadien relativ gleich, lediglich zwischen P14 und P21 lässt sich ein signifikanter Unterschied nachweisen. Die Apikalspinedichte nimmt vom 14. bis zum 21. Lebenstag im 1. Segment signifikant ab und steigt bis zum 45. Tag wieder leicht an. In der 2. Verzweigungsordnung zeigen Tiere am P14, P21 und P45 eine signifikant höhere Apikalspinedichte als Tiere am P0. Eine Abnahme der Spinedichte findet schon nach dem 14. Lebenstag statt. Tiere des Altersstadium P45 haben signifikant geringere Apikalspinedichten im 2. Segment als Tiere an P14. Die Apikalsegmente der 3., 4. und 5. Ordnung spiegeln die Ergebnisse des gesamten Apikaldendritenbaums wieder. Wie bei der 2. Ordnung zeigen Tiere am P14, P21 und P45 eine signifikant höhere Apikalspinedichte als Tiere am P0. Jedoch weisen hier die 21tägigen Tiere die höchste Apikalspinedichte auf. Signifikante Unterschiede zwischen P21 und P45 bestehen entlang der 3. bis zur 5. Verzweigungsordnung. Außerdem ist der Unterschied zwischen P14 und P21 in der 4. und 5. Ordnung signifikant.

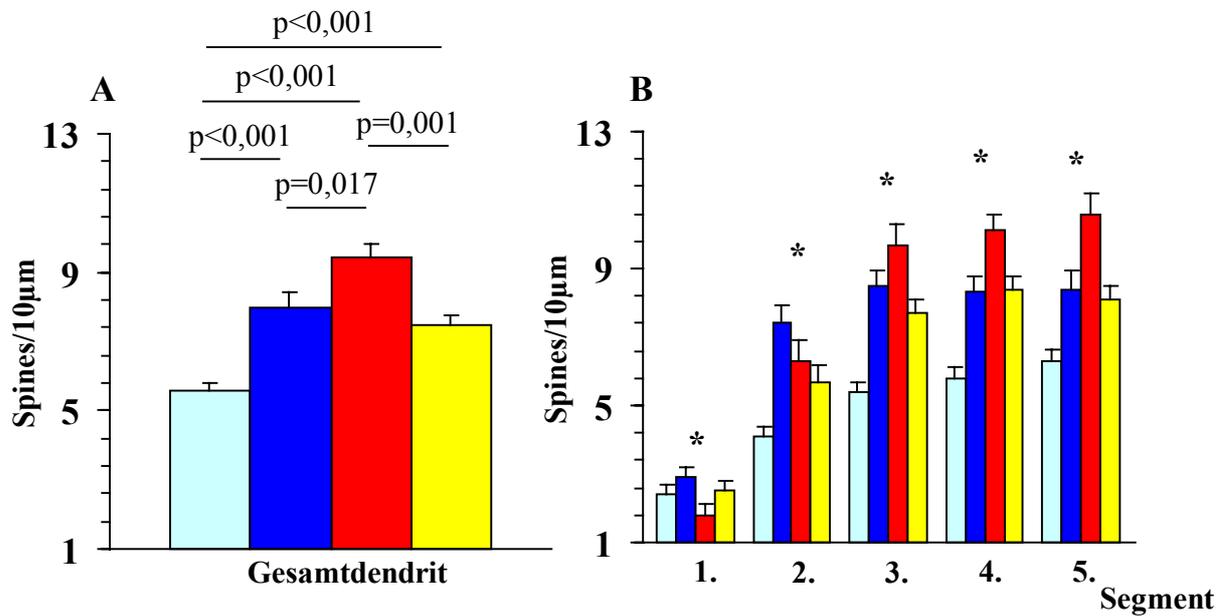
b) Vergleicht man nun die Längen der Apikaldendriten, so stellt sich heraus, dass bei der Betrachtung des gesamten Apikaldendritenbaums (Abb. 10C; Tab. 2) dieser sich von Tag 0 bis Tag 45 signifikant verlängert (zu P14 auf 162%, zu P21 auf 165%, zu P45 auf 212%). Zwischen P14 und P21 findet keine signifikante Verlängerung statt. 45tägige Tiere weisen schließlich jedoch einen signifikant längeren Apikaldendritenbaum (auf 132%) als 14tägige Tiere auf.

Diese Ergebnisse implizieren, dass die signifikant geringere Apikalspinedichte der 45 Tage alten Tiere im Vergleich zu den 21tägigen u.a. auch durch eine Verlängerung des Dendritenbaums bis zum P45 verursacht werden könnte.

Bei der Analyse der Einzelsegmente (Abb. 10D; Tab. 2, 3) zeigt sich ein leichter Anstieg in der Länge des 1. Apikalsegments vom Geburtstag über den 14. und 21. zum 45. Lebenstag.

Dieser Unterschied ist zwischen P0 und P45 signifikant. Auch in der 2., 3. und 4. Verzweigungsordnung sind die Apikalsegmente der 45tägigen Tiere signifikant länger als die der 0tägigen. In der 2., 3. und 5. Ordnung weisen die 21 Tage alten Tiere zudem signifikant kürzere mittlere Apikalsegmente auf als die 14 Tage alten Tiere. Eine signifikante Verlängerung des 3., 4. und 5. Segments ist zwischen P0 und P14 nachzuweisen. In der 2. Verzweigungsordnung sind schließlich die auch in anderen Ordnungen deutlich längeren Apikalsegmente der 45tägigen Tiere im Vergleich zu den 21tägigen signifikant. Die Werte der einzelnen Dendritenabschnitte spiegeln bei keiner Verzweigungsordnung das Bild wieder, das sich beim gesamten Apikaldendritenbaum ergibt. Dies lässt sich u.a. auch durch zwar durchschnittlich längere, jedoch zahlenmäßig weniger Apikalsegmente bei 14tägigen Tieren erklären. Die Anzahl der Verzweigungen erhöht sich von P14 zu P21, so dass die Gesamtdendritenlänge, trotz kürzerer durchschnittlicher Segmentlängen am P21, bei beiden Altersstadien gleich ist.

### Postnataler Entwicklungsverlauf der Apikalspinesfrequenzen



### Postnataler Entwicklungsverlauf der Apikaldendritenlängen

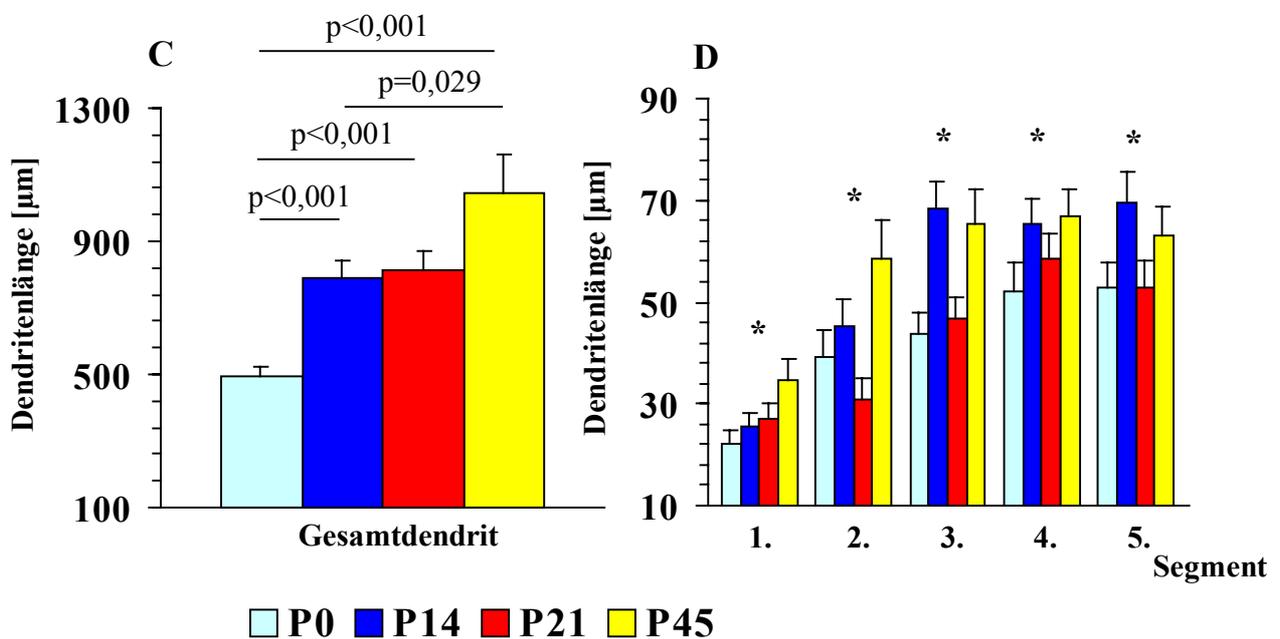


Abb. 10. (A) mittlere Spinedichte der gesamten Apikaldendritenbäume, (B) durchschnittliche Spinedichte der einzelnen Apikalsegmente, (C) mittlere Länge der gesamten Apikaldendritenbäume, (D) durchschnittliche Länge der einzelnen Apikalsegmente.

Angegeben sind Mittelwerte und Standardfehler, sowie die P-Werte des paarweisen Vergleichs mittels Mann-Whitney U-Test. Sternchen zeigen signifikante Unterschiede zwischen mehreren Gruppen (Kruskal Wallis One-Way ANOVA).

## 1.2. Basaldendriten

a) Ein Vergleich der mittleren Spinedichte der gesamten Basaldendritenbäume über alle ihre Verzweigungsordnungen (Abb. 11A; Tab. 4) zeigt einen signifikanten Anstieg der Spinefrequenz auf 150% von P0 zu P14, auf 192% von P0 zu P21 und auf 146% von P0 zu P45. Von P14 zu P21 gibt es einen signifikanten Anstieg auf 128% und von P21 zu P45 eine signifikante Reduktion der Spinedichte auf 76%. Der Vergleich zwischen den Spinefrequenzen der vier Altersgruppen jeweils in den einzelnen Dendritenabschnitten (Abb. 11B; Tab. 4, 6), ergibt folgende Resultate: In der 1. Verzweigungsordnung sind die Basalspinedichten in den verschiedenen Altersstadien relativ gleich, lediglich zwischen P14 und P45 lässt sich ein signifikanter Unterschied nachweisen. Die Basalspinedichte nimmt vom 14. bis zum 45. Lebenstag signifikant ab. In der 2. bis zur 4. Verzweigungsordnung zeigen Tiere am P14, P21 und P45 eine signifikant höhere Basalspinedichte als Tiere am P0. Bei der 5. Segmentordnung weisen nur 21- und 45tägige Tiere eine höhere Basalspinefrequenz als P0 auf. Die Basalsegmente der 2. und 3. Ordnung spiegeln die Resultate des gesamten Basaldendritenbaums wieder. Von Tag 21 zu Tag 45 zeigt sich hier eine signifikante Spinereduktion. Außerdem haben 21tägige Tiere in der 3. und 5. Verzweigungsordnung eine signifikant höhere Basalspinedichte als Tiere an P14.

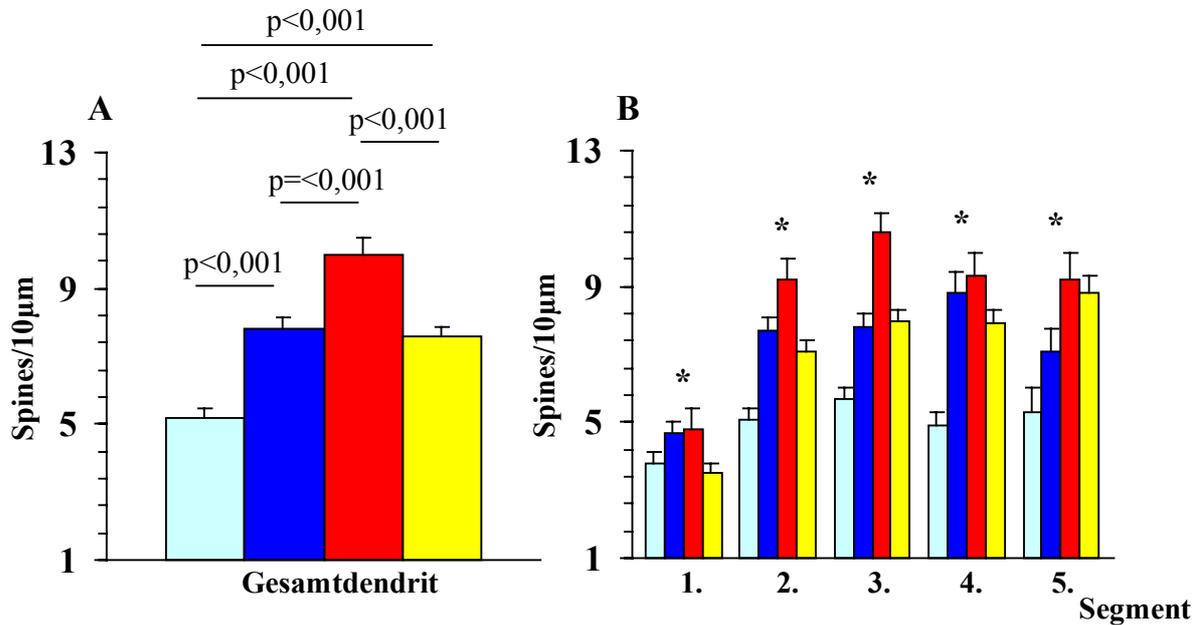
b) Vergleicht man nun die Längen der Basaldendriten, so stellt sich heraus, dass bei der Betrachtung des gesamten Basaldendritenbaums (Abb. 11C; Tab. 5), dieser sich von Tag 0 bis Tag 45 signifikant verlängert (zu P14 auf 276%, zu P21 auf 256%, zu P45 auf 331%). Zwischen P14 und P21 findet keine signifikante Verlängerung statt. 45tägige Tiere weisen jedoch einen signifikant längeren Basaldendritenbaum als 14tägige (auf 120%) und 21tägige (auf 129%) Tiere auf.

Diese Ergebnisse implizieren, dass u.a. auch eine Verlängerung des Dendritenbaums zur signifikant geringeren Spinedichte am 45. Tag beitragen könnte.

Bei der Analyse der Einzelsegmente (Abb. 11D; Tab. 5, 6) zeigt sich zwischen den untersuchten Altersstadien keine Veränderung in der Länge des 1. Basalsegments. In der 2. bis zur 5. Ordnung weisen die 14, 21 und 45 Tage alten Tiere signifikant längere mittlere Basalsegmente auf als die 0 Tage alten Tiere auf. In der 2. Verzweigungsordnung sind zudem die Basalsegmente der 45tägigen Tiere im Vergleich zu denen der 21tägigen signifikant länger. Die Werte der einzelnen Dendritenabschnitte spiegeln bei keiner Verzweigungsordnung das Bild wieder, das sich beim gesamten Basaldendritenbaum ergibt.

Die Ursachen sind in etwa gleich langen durchschnittlichen, jedoch zahlenmäßig weniger Basalsegmenten bei 14tägigen Tieren im Vergleich zu den 45tägigen Tieren begründet. Die Anzahl der basalen Dendritenverzweigungen steigt von P14/P21 zu P45, während sich die durchschnittliche Segmentlänge fast nicht ändert.

**Postnataler Entwicklungsverlauf der Basalspinesfrequenzen**



**Postnataler Entwicklungsverlauf der Basaldendritenlängen**

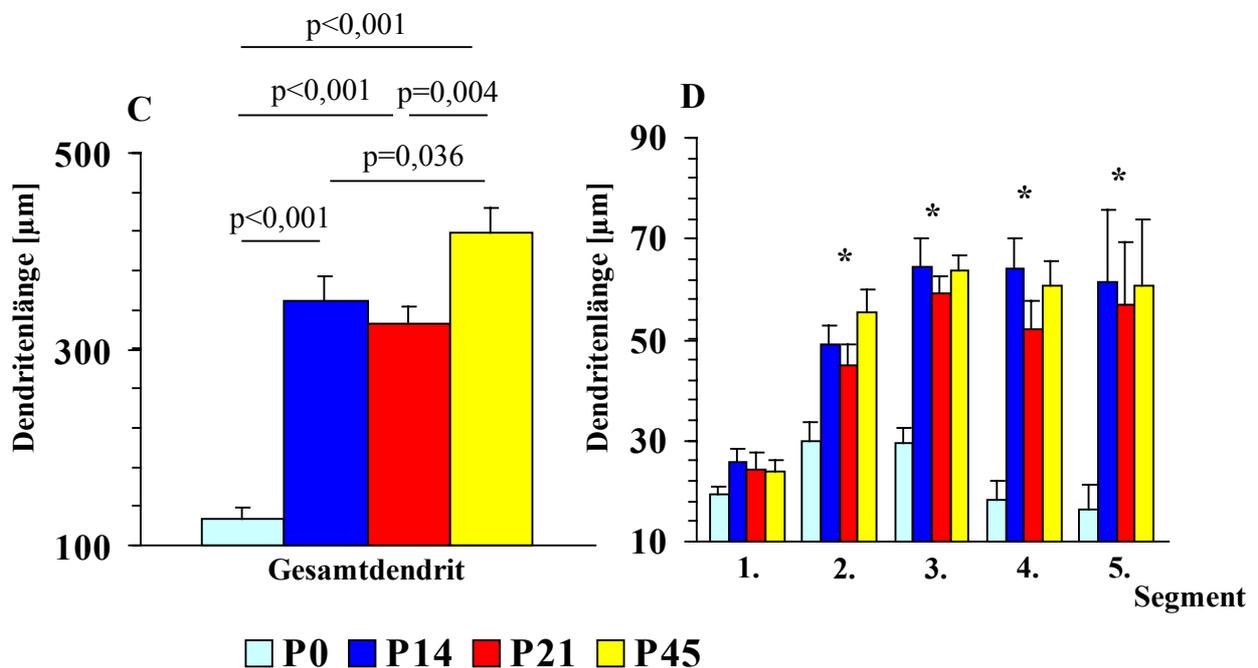


Abb. 11. (A) mittlere Spinedichte der gesamten Basaldendritenbäume, (B) durchschnittliche Spinedichte der einzelnen Basalsegmente, (C) mittlere Länge der gesamten Basaldendritenbäume, (D) durchschnittliche Länge der einzelnen Basalsegmente.

Angegeben sind Mittelwerte und Standardfehler, sowie die P-Werte des paarweisen Vergleichs mittels Mann-Whitney U-Test. Sternchen zeigen signifikante Unterschiede zwischen mehreren Gruppen (Kruskal Wallis One-Way ANOVA).

## **2. Einfluss einer reizarmen Umgebung auf die Entwicklung dendritischer Spines im anterioren cingulären Cortex (ACd)**

In dem Zeitraum, in dem ich diese Arbeit angefertigt habe, wurde die Kolonie der *Octodon degus* in Anpassung an ihre Lebensbedingungen von Standardkäfigen zu Volieren umgesetzt. Aus diesem Grund wurde ein Teil der Versuche an Volieretieren durchgeführt.

An dieser Stelle soll auf den Unterschied zwischen 21-tägigen Tieren, welche mit einer reizarmen Umgebung (Standardkäfigen) vorlieb nehmen mussten und solchen, welche in den größeren mit Klettermöglichkeiten ausgestatteten Volieren (komplexe Umgebung) aufwuchsen, eingegangen werden.

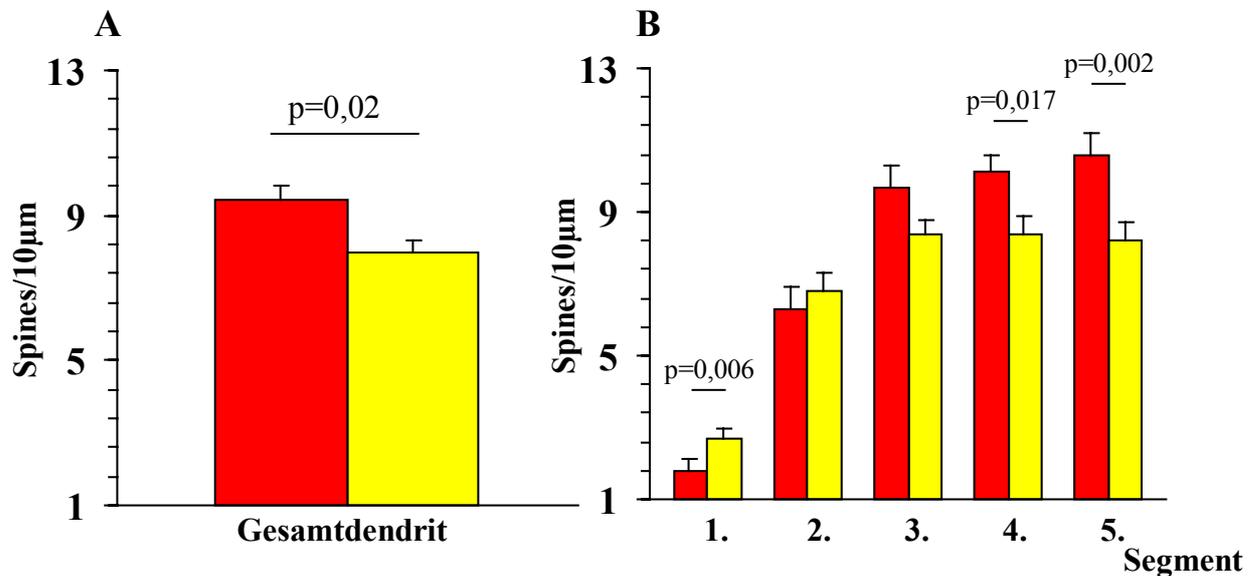
### **2.1. Apikaldendriten**

a) Ein Vergleich der mittleren Apikalspinedichte der Gesamtdendriten (Abb. 12A; Tab. 1, 7) zwischen Käfig- und Volieretieren zeigt signifikant höhere Spinedichten bei den Käfigtieren (18%). Vergleicht man die Spinefrequenzen von sozial aufgewachsenen 21-tägigen Käfig- und Volieretieren jeweils in den einzelnen Dendritenabschnitten (Abb. 12B; Tab. 1, 7), erhält man folgende Resultate: In der 1. Verzweigungsordnung sind die Apikalspinedichten der Volieretiere signifikant höher als die der Käfigtiere. In der 2. und 3. Ordnung lässt sich kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen nachweisen, wiewohl in der 3. Ordnung ein Trend zu höheren Spinedichten der Käfigtiere besteht. In der 4. und 5. Segmentordnung bestätigt eine Signifikanz diesen Trend.

b) Vergleicht man nun die Längen der Apikaldendriten, so stellt sich heraus, dass bei der Betrachtung des gesamten Apikaldendritenbaums (Abb. 12C; Tab. 2, 8) dieser bei den Volieretieren etwas, aber nicht signifikant länger ist als bei den Käfigtieren. Bei der Einzelsegmentanalyse (Abb. 12D; Tab. 2, 8) findet sich nur im 2. Segment ein signifikanter Unterschied in der durchschnittlichen Apikaldendritenlänge zwischen den beiden experimentellen Gruppen.

Die höhere Apikalspinedichte der Käfigtiere könnte demnach u.a. auch durch deren etwas kürzere Apikaldendriten verursacht sein.

## Einfluss einer reizarmen Umgebung auf die Apikalspinesfrequenzen



## Einfluss einer reizarmen Umgebung auf die Apikaldendritenlängen

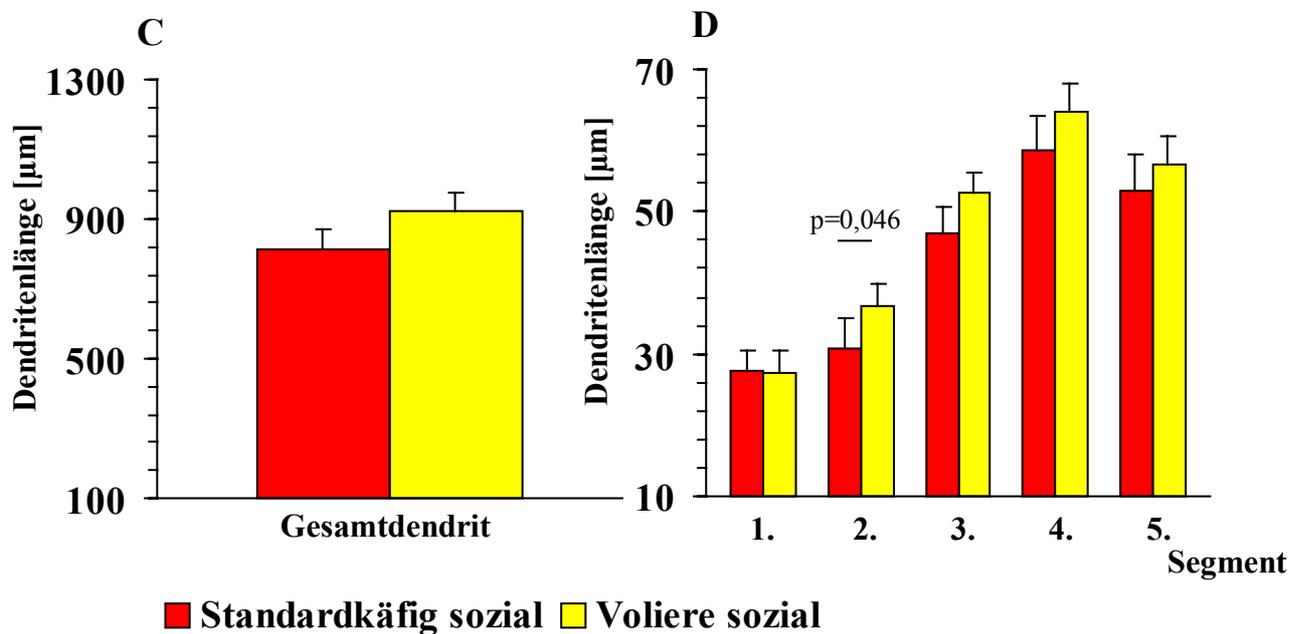


Abb. 12. (A) mittlere Spinedichte der gesamten Apikaldendritenbäume, (B) durchschnittliche Spinedichte der einzelnen Apikalsegmente, (C) mittlere Länge der gesamten Apikaldendritenbäume, (D) durchschnittliche Länge der einzelnen Apikalsegmente.

Angegeben sind Mittelwerte und Standardfehler, sowie die P-Werte des paarweisen Vergleichs mittels Mann-Whitney U-Test.

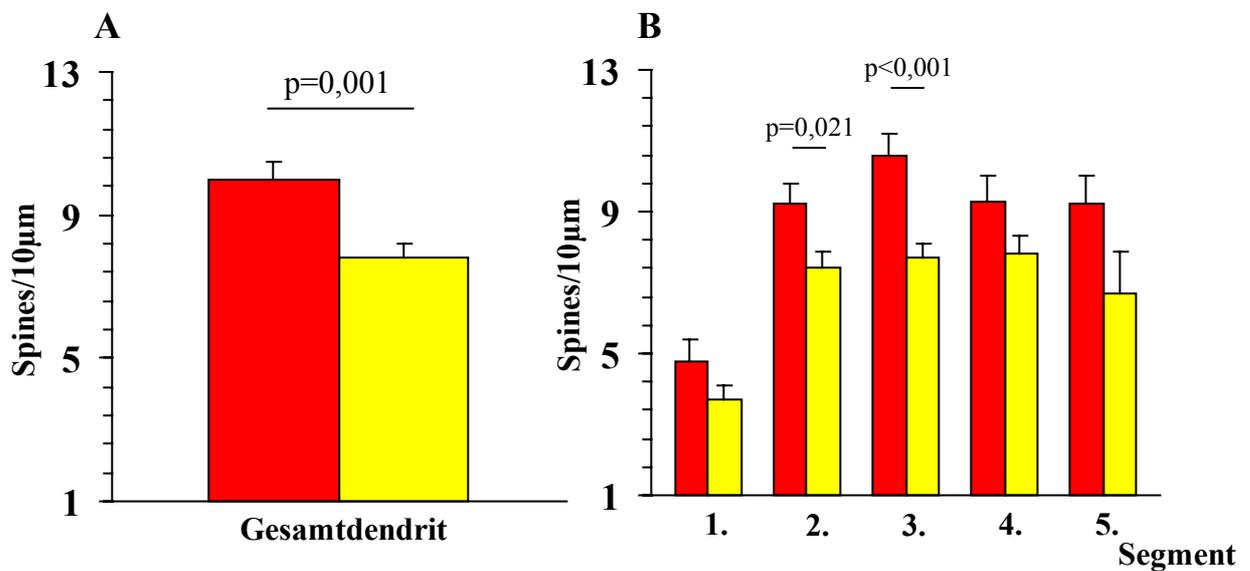
## 2.2. Basaldendriten

a) Bei der Analyse der Einzelsegmente (Abb. 13B; Tab. 4, 9) zeigt sich in allen Verzweigungsordnungen ein Trend zu höheren Basalspinedichten der sozialen Käfigtiere im Vergleich zu sozialen Volieretieren. Dieser Unterschied ist in der 2. und 3. Verzweigungsordnung sowie beim gesamten Basaldendritenbaum (28%; Abb. 13A; Tab. 4, 9) signifikant.

b) Die mittlere Länge der gesamten Basaldendriten (Abb. 13C; Tab. 5, 10) ist bei den Volieretieren signifikant größer als bei den Käfigtieren (23%). Die höhere Basalspinedichte der Käfigtiere könnte u.a. auch durch deren kürzere Basaldendritenlängen bedingt sein.

Eine Analyse der einzelnen durchschnittlichen Basalsegmente (Abb. 13D; Tab. 5, 10) ermittelt keinen signifikanten Unterschied zwischen den beiden Tiergruppen.

## Einfluss einer reizarmen Umgebung auf die Basalspinesfrequenzen



## Einfluss einer reizarmen Umgebung auf die Basaldendritenlängen

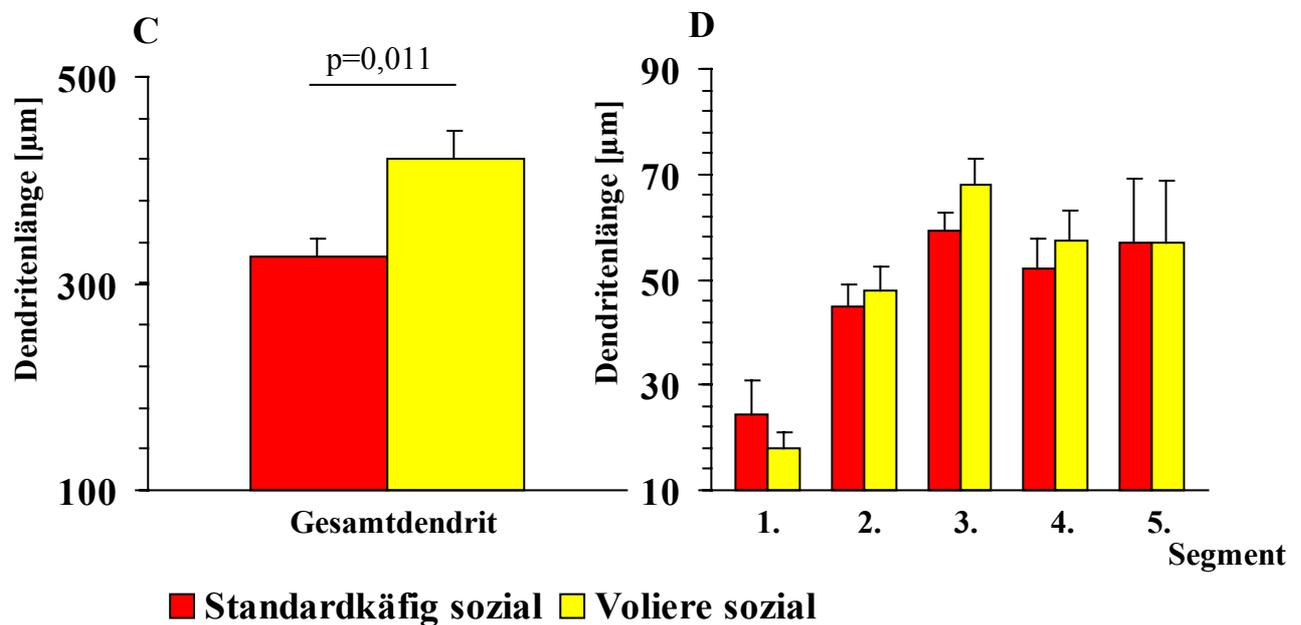


Abb. 13. (A) mittlere Spinedichte der gesamten Basaldendritenbäume, (B) durchschnittliche Spinedichte der einzelnen Basalsegmente, (C) mittlere Länge der gesamten Basaldendritenbäume, (D) durchschnittliche Länge der einzelnen Basalsegmente.

Angegeben sind Mittelwerte und Standardfehler, sowie die P-Werte des paarweisen Vergleichs mittels Mann-Whitney U-Test.

### **3. Einfluss von wiederholtem kurzzeitigem Elternentzug auf die Entwicklung dendritischer Spines im anterioren cingulären Cortex (ACd)**

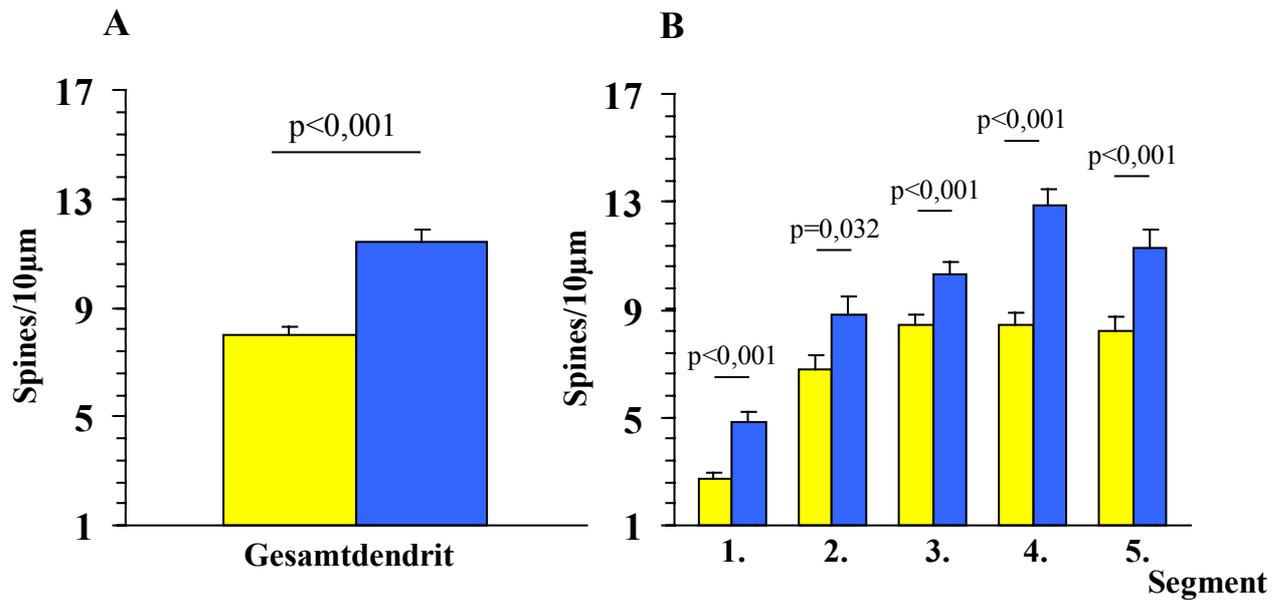
Wiederholter kurzzeitiger Elternentzug während der ersten drei Wochen führt zu Veränderungen der Spinedichten von Schicht-II/III Pyramidenzellen des ACd. Die lichtmikroskopische Analyse der Apikal- (Abb. 14A) und Basaldendriten (Abb. 15A) von 21tägigen Volieretieren zeigt signifikant höhere Spinedichten bei separierten im Vergleich zu sozialen Tieren.

#### **3.1. Apikaldendriten**

a) Von der 1. bis zur 5. Verzweigungsordnung (Abb. 14B; Tab. 7) und bei der mittleren Spinedichte der gesamten Apikaldendritenbäume über alle Verzweigungsordnungen (Abb. 14A; Tab. 7) weisen die separierten Tiere signifikant höhere Apikalspinedichten (43%) als die sozial aufgewachsenen Tiere auf.

b) Lediglich in der 4. Verzweigungsordnung (Abb. 14D; Tab. 8), aber nicht in der mittleren Länge des gesamten Apikaldendritenbaums (Abb. 14C; Tab. 8) treten signifikante Unterschiede zwischen den beiden Gruppen auf. In der 4. Ordnung könnten die höheren Apikalspinedichten der separierten Tiere u.a. durch deren geringere Dendritenlänge in diesem Segment bedingt sein. In den übrigen Segmentordnungen kann man jedoch von einer tatsächlich veränderten Absolutanzahl der Apikalspines ausgehen.

**Einfluss von wiederholtem Elternentzug auf die Apikalspinesfrequenzen**



**Einfluss von wiederholtem Elternentzug auf die Apikaldendritenlängen**

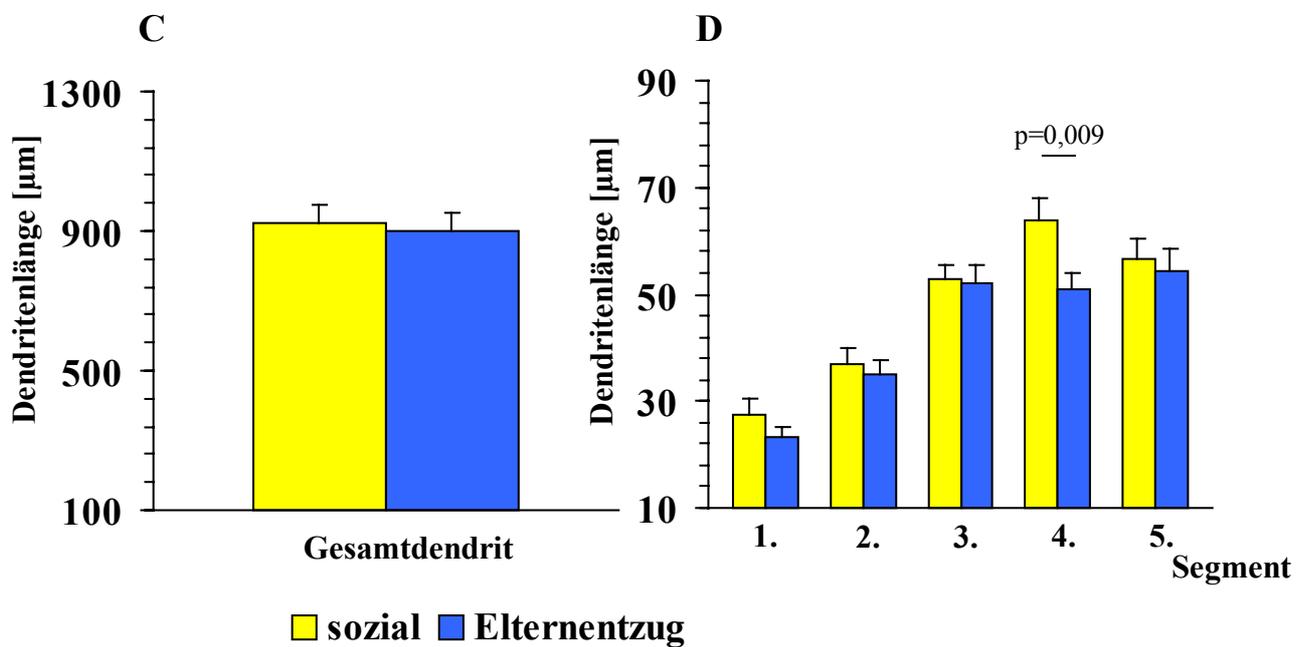


Abb. 14. (A) mittlere Spinedichte der gesamten Apikaldendritenbäume, (B) durchschnittliche Spinedichte der einzelnen Apikalsegmente, (C) mittlere Länge der gesamten Apikaldendritenbäume, (D) durchschnittliche Länge der einzelnen Apikalsegmente.

Angegeben sind Mittelwerte und Standardfehler, sowie die P-Werte des paarweisen Vergleichs mittels Mann-Whitney U-Test.

### 3.2. Basaldendriten

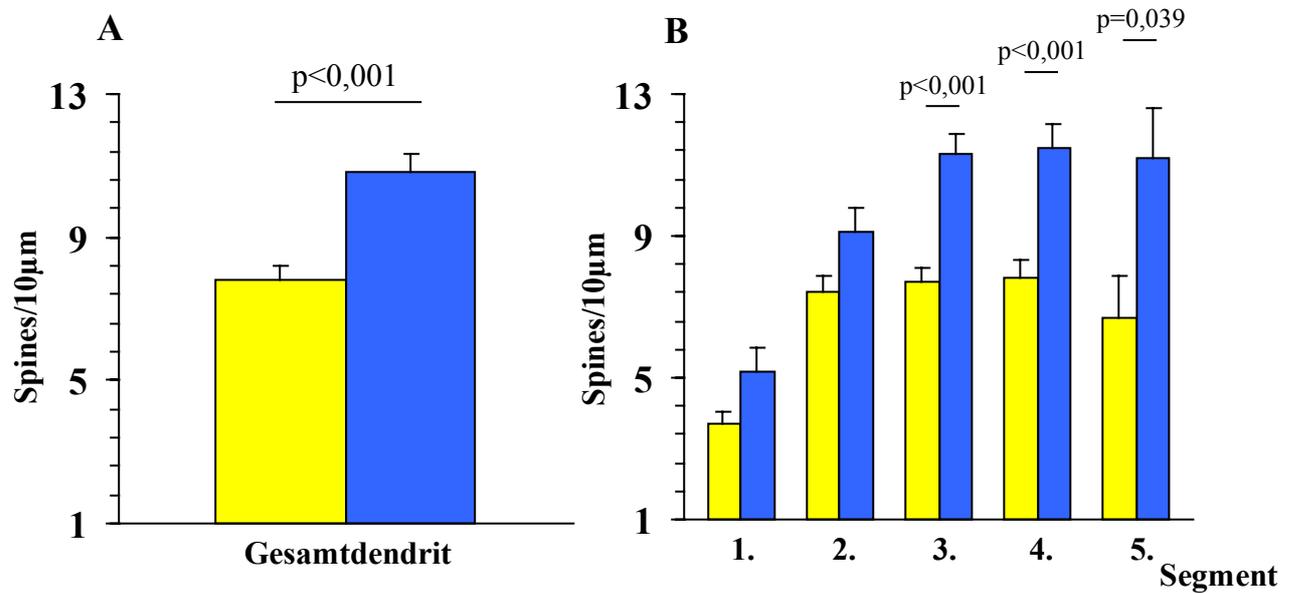
Der Vergleich von sozial aufgewachsenen mit wiederholt separierten 21tägigen Volieretieren führt zu folgenden Ergebnissen:

a) In den ersten fünf Verzweigungsordnungen (Abb. 15B; Tab. 9) ist die Dichte der Basalspines von separierten Tieren höher als die ungestört aufgewachsener Degus. Signifikant ist dieser Unterschied im 3., 4. und 5. Basalsegment, sowie bei der mittleren Spinedichte der gesamten Basaldendritenbäume (38%; Abb. 15A; Tab. 9).

b) Zwischen den beiden Gruppen sind in der mittleren Länge der gesamten Basaldendritenbäume (Abb. 15C; Tab. 10) keine Unterschiede nachweisbar. Somit kann hier davon ausgegangen werden, dass die Veränderung der Spinedichte der Gesamtdendriten nicht auf eine Veränderung der Dendritenlänge zurückzuführen ist.

Im 3. Basalsegment haben die separierten Tiere allerdings signifikant kürzere Dendritenlängen als die sozialen Kontrollen (Abb. 15D; Tab. 10), was hier u.a. auch zu der erhöhten Spinedichte der separierten Tiere beitragen könnte.

## Einfluss von wiederholtem Elternentzug auf die Basalspinesfrequenzen



## Einfluss von wiederholtem Elternentzug auf die Basaldendritenlängen

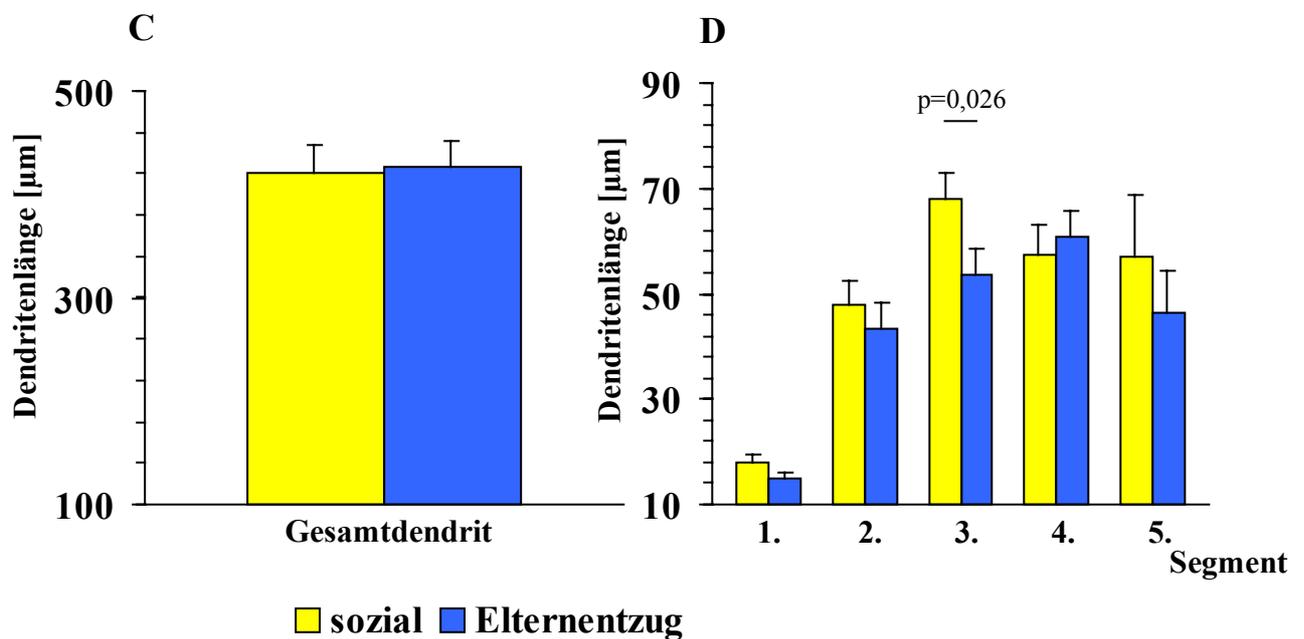


Abb. 15. (A) mittlere Spinedichte der gesamten Basaldendritenbäume, (B) durchschnittliche Spinedichte der einzelnen Basalsegmente, (C) mittlere Länge der gesamten Basaldendritenbäume, (D) durchschnittliche Länge der einzelnen Basalsegmente.

Angegeben sind Mittelwerte und Standardfehler, sowie die P-Werte des paarweisen Vergleichs mittels Mann-Whitney U-Test.

#### **4. Einfluss des Vaters auf die Entwicklung dendritischer Spines im anterioren cingulären Cortex (ACd)**

Es konnte bisher gezeigt werden, dass nach wiederholter Trennung der Jungtiere von den Eltern in den ersten drei Lebenswochen, eine erhöhte Spinefrequenz der Schicht-II/III Pyramidenzellen des ACd die Folge ist. In dieser Studie soll nun untersucht werden, welchen Einfluss es auf die Entwicklung der Jungtiere hat, wenn die väterliche Bezugsperson während der ersten drei Lebenswochen kontinuierlich fehlt.

Wie auch wiederholter kurzzeitiger Elternentzug führt das Fehlen des Vaters während der ersten drei Wochen zu signifikanten morphologischen Veränderungen in der Entwicklung der Schicht-II/III Pyramidenzellen des ACd. Der Effekt auf die Spinedichten ist jedoch umgekehrt wie beim wiederholten kurzzeitigen Elternentzug. Die Analyse der Apikal- (Abb. 16A) und Basaldendriten (Abb. 17A) 21-tägiger Volieretiere zeigt hier signifikant niedrigere Spinedichten bei deprivierten Tieren im Vergleich zu sozialen Tieren.

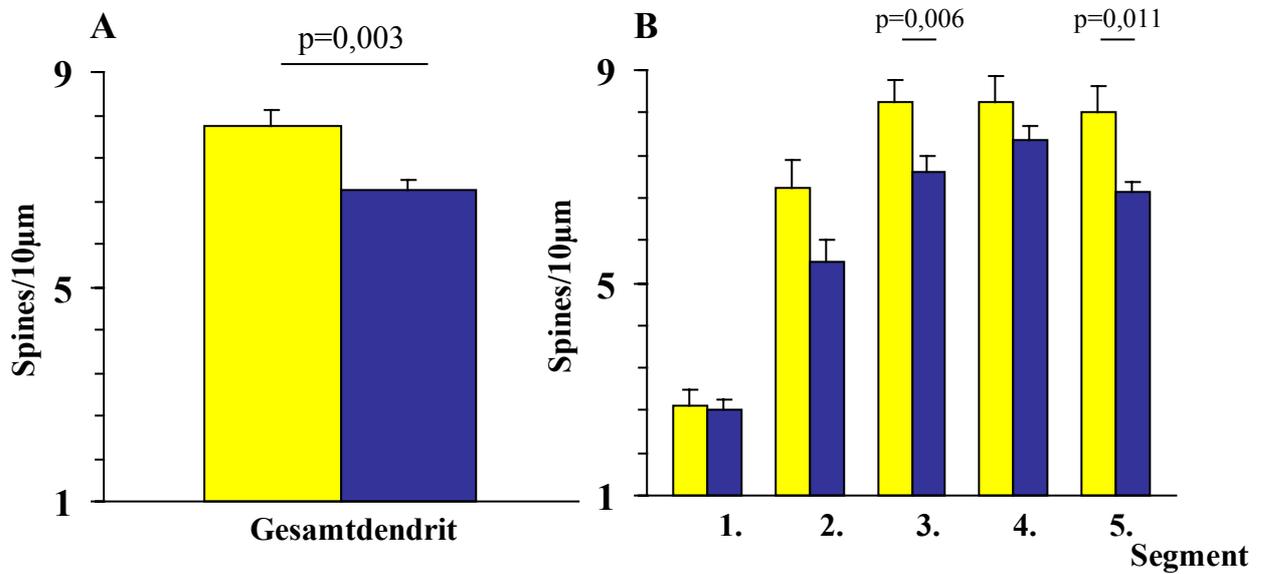
##### **4.1. Apikaldendriten**

a) Ein Vergleich der mittleren Spinedichte der gesamten Apikaldendritenbäume über alle ihre Verzweigungsordnungen (Abb. 16A; Tab. 11) zeigt eine 15% geringere Spinefrequenz bei den deprivierten Tieren. Betrachtet man den gesamten Dendritenverlauf und vergleicht die Spinefrequenzen der beiden Versuchsgruppen jeweils in den einzelnen Dendritenabschnitten (Abb. 16B; Tab. 11), so ergeben sich die größten Unterschiede in den Apikalsegmenten der 3. (15 %) und 5. (20 %) Verzweigungsordnung. Die deprivierten Tiere weisen hier signifikant niedrigere Spinedichten auf als die sozialen Kontrollen.

b) Vergleicht man nun die Längen der Apikaldendriten, so stellt sich heraus, dass Vaterentzug zu keinen Veränderungen in der Länge des Apikaldendritenbaums (Abb. 16C; Tab. 12), auch nicht der durchschnittlichen Längen seiner Einzelsegmente (Abb. 16D; Tab. 12) führt.

Es ist somit nachweisbar, dass die geringere Apikalspinedichte vaterloser Tiere ihre Ursache nicht in verlängerten Dendritensegmenten hat.

## Einfluss des Vaters auf die Apikalspinesfrequenzen



## Einfluss des Vaters auf die Apikaldendritenlängen

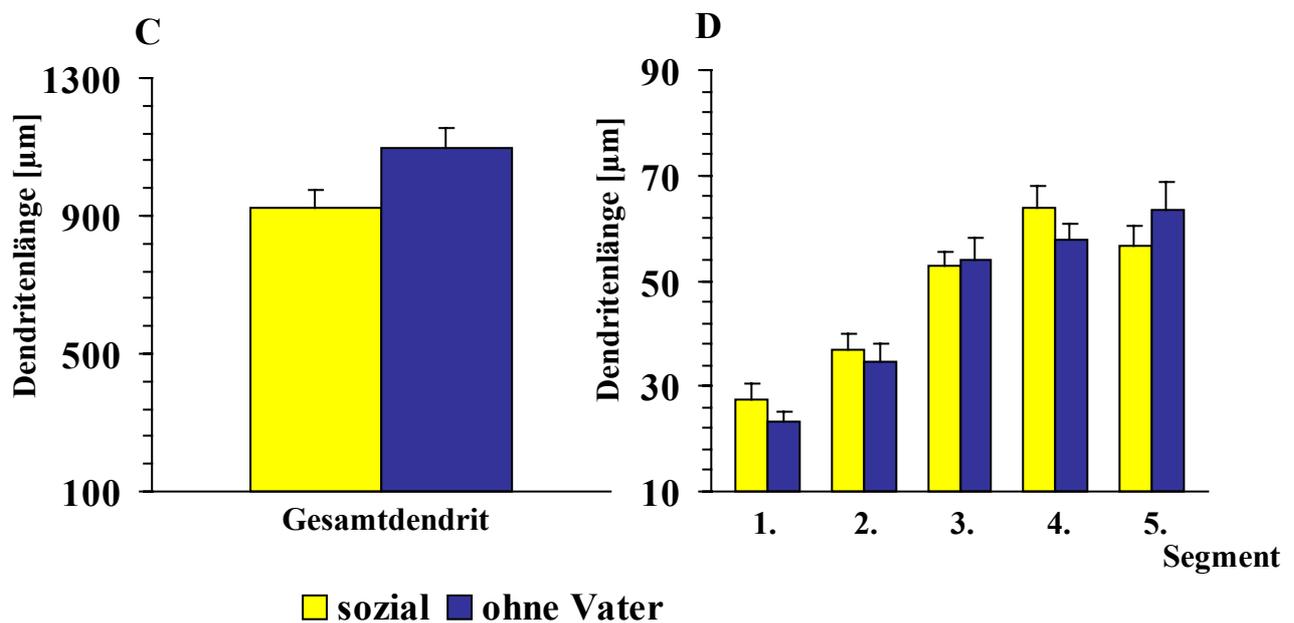


Abb. 16. (A) mittlere Spinedichte der gesamten Apikaldendritenbäume, (B) durchschnittliche Spinedichte der einzelnen Apikalsegmente, (C) mittlere Länge der gesamten Apikaldendritenbäume, (D) durchschnittliche Länge der einzelnen Apikalsegmente.

Angegeben sind Mittelwerte und Standardfehler, sowie die P-Werte des paarweisen Vergleichs mittels Mann-Whitney U-Test.

## 4.2. Basaldendriten

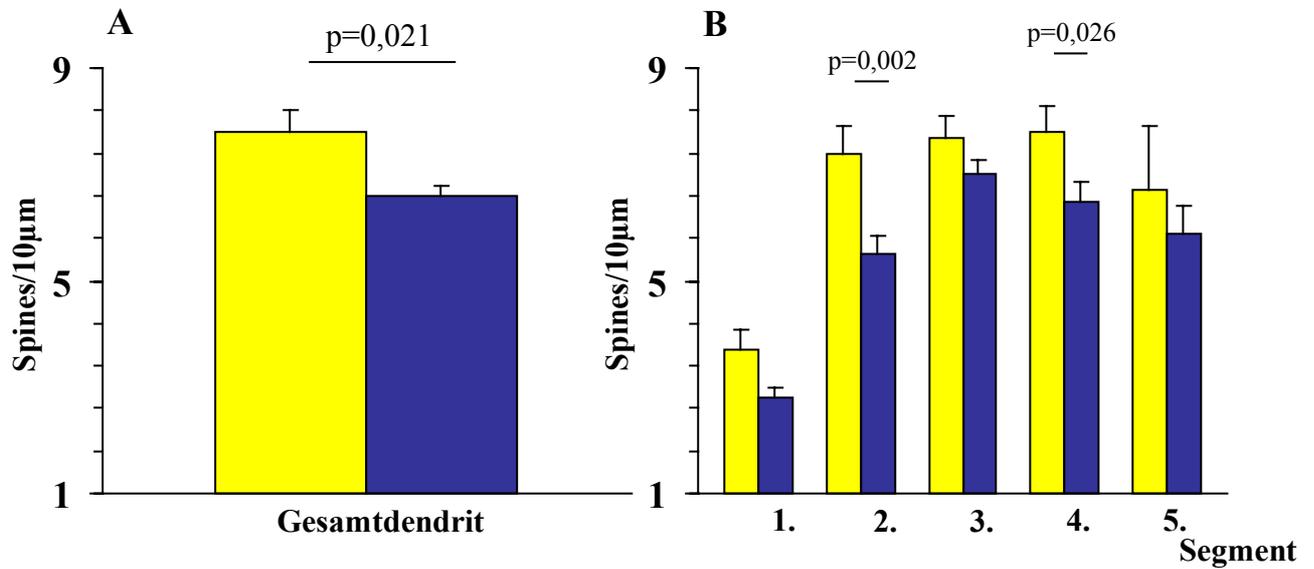
Ein Vergleich der Basalspinefrequenzen der beiden Versuchsgruppen spiegelt die Ergebnisse der Apikaldendriten wieder:

a) Vergleicht man die mittlere Spinedichte der gesamten Basaldendritenbäume über alle ihre Verzweigungsordnungen (Abb. 17A; Tab. 13), zeigt sich eine 15% geringere Spinefrequenz bei den deprivierten Tieren. Signifikante Unterschiede zwischen sozial und vaterlos aufgewachsenen Tieren bestehen in der 2. (26 %) und 4. (17 %) Verzweigungsordnung (Abb. 17B; Tab. 13).

b) Vaterentzug führt nicht zu einer Veränderung der mittleren Länge des Basaldendritenbaums (Abb. 17C; Tab. 14). Die Einzelsegmentanalyse (Abb. 17D; Tab. 14) zeigt lediglich in der 2. Verzweigungsordnung signifikant kürzere Basaldendriten der deprivierten Tiere auf.

Somit kann auf jeden Fall davon ausgegangen werden, dass die geringere Spinedichte vaterloser Tiere nicht auf eine Verlängerung der Dendriten zurückzuführen ist.

## Einfluss des Vaters auf die Basalspinefrequenzen



## Einfluss des Vaters auf die Basaldendritenlängen

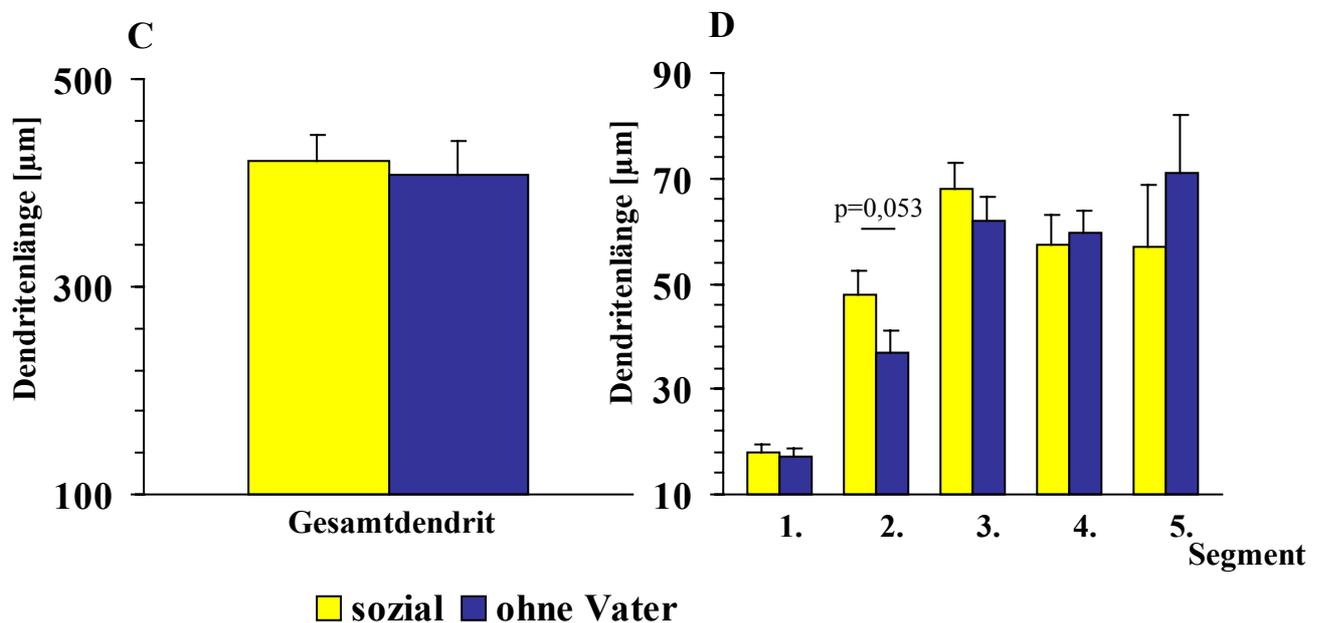


Abb. 17. (A) mittlere Spinedichte der gesamten Basaldendritenbäume, (B) durchschnittliche Spinedichte der einzelnen Basalsegmente, (C) mittlere Länge der gesamten Basaldendritenbäume, (D) durchschnittliche Länge der einzelnen Basalsegmente.

Angegeben sind Mittelwerte und Standardfehler, sowie die P-Werte des paarweisen Vergleichs mittels Mann-Whitney U-Test.

## **5. Beteiligung des serotonergen Systems an den separationsinduzierten Veränderungen dendritischer Spines**

Der Nachweis signifikant höherer Apikal- und Basalspinedichten von Schicht-II/III Pyramidenzellen am 21. Lebenstag von in den ersten drei Wochen täglich von Eltern und Geschwistern separierten Tieren im Vergleich zu sozialen 21tägigen Kontrolltieren (vgl. Ergebnisse unter 3.) bildete die Grundlage für die Versuche, deren Ergebnisse im Folgenden dargelegt werden sollen. Bevor mit den eigentlichen pharmakologischen Experimenten begonnen wurde, stellte sich die Frage, ob dieser Unterschied der Spinedichten auch zwischen sozialen/salineinjizierten und separierten/salineinjizierten Tieren nachweisbar ist. Sofern dies der Fall wäre, wäre damit die methodische Voraussetzung geschaffen, pharmakologisch die Beteiligung des serotonergen Systems bei erfahrungsinduzierten synaptischen Veränderungen zu analysieren.

Nachdem im Statistiktest mit dem Kruskal-Wallis Anova keine signifikanten Unterschiede bezüglich der Apikal- (Abb. 18) und Basaldendritenlängen (Abb. 19) zwischen den vier verschiedenen injizierten Volieregruppen nachzuweisen waren, sind diese nicht paarweise mit dem Mann Whitney U-Test überprüft worden.

### **5.1. Apikaldendriten**

#### I. Voruntersuchungen

Es zeigt sich, dass wiederholte Separation von Eltern und Geschwistern auch bei salineinjizierten Tieren zu höheren Apikal- (Abb. 18) und Basalspinedichten (Abb. 19) führt, wenn auch der Unterschied nicht so groß ist wie zwischen nichtinjizierten, sozialen und separierten Tieren.

*Vergleich zwischen sozialen/salineinjizierten Tieren und separierten/salineinjizierten Tieren (Abb. 18; Tab. 15-17)*

a) Im Vergleich zu sozialen, salineinjizierten Tieren weisen separierte, salineinjizierte Tiere im 3. und 4. Apikalsegment sowie bei den gesamten Apikaldendritenbäumen (13%) signifikant höhere Spinedichten auf.

b) Die mittlere Apikaldendritenlänge der gesamten Dendritenbäume ist nicht unterschiedlich zwischen den beiden Gruppen und die veränderte Apikalspinedichte weist somit auf eine größere Anzahl von Apikalspines der separierten, salineinjizierten Tiere hin.

## II. Pharmakologische Untersuchungen: Blockade der 5-HT<sub>1A</sub>-Rezeptoren

Tiere, welche vor den Separationen mit 0,1 bzw. 1 mg/kg Way-100635 behandelt wurden, weisen keine erhöhten Apikal- (Abb. 18) und Basalspinedichten (Abb. 19) auf. Eine Blockade des serotonergen Systems verhindert also die Auswirkungen frühkindlicher Separationserfahrungen auf die Spinefrequenzen der Schicht-II/III Pyramidenzellen im ACd.

*Vergleich zwischen sozialen/salineinjizierten Tieren und separierten, mit 0,1 mg/kg Way-100635 injizierten Tieren (Abb. 18; Tab. 15-17)*

Zwischen sozialen, salineinjizierten und pharmakologisch mit 0,1 mg/kg Way-100635 behandelten Tieren, welche nach der täglichen Injektion eine Stunde separiert wurden, bestehen keine Unterschiede in a) der Dichte der Apikalspines und b) der mittleren Gesamtlänge der Apikaldendriten von Schicht-II/III Pyramidenzellen. Im Vergleich zu sozialen, salineinjizierten Tieren ändert sich somit die absolute Apikalspineanzahl durch die Separation nicht, wenn das serotonerge System blockiert wurde.

*Vergleich zwischen sozialen/salineinjizierten Tieren und separierten, mit 1 mg/kg Way-100635 injizierten Tieren (Abb. 18; Tab. 15-17)*

a) Bei einer 10fachen Konzentration des 5-HT<sub>1A</sub>-Antagonisten Way-100635 vor der täglichen Separation weisen die so behandelten Tiere im 1. Apikalsegment signifikant höhere Spinefrequenzen als die sozialen, salineinjizierten Tiere auf. In den Verzweigungen der 2. bis 5. Ordnung, in der mittleren Apikalspinedichte und b) der mittleren Apikaldendritenlänge der gesamten Dendriten bestehen keine Unterschiede zwischen den beiden Gruppen. Im Vergleich zu sozialen, salineinjizierten Tieren ändert sich somit die absolute Apikalspineanzahl durch die Separation auch dann nicht, wenn das serotonerge System durch eine 10fache Konzentration des Antagonisten blockiert wurde.

*Vergleich zwischen separierten/salineinjizierten Tieren und separierten, mit 0,1 mg/kg Way-100635 injizierten Tieren (Abb. 18; Tab. 15-17)*

a) Im Vergleich zu Tieren, welche vor der Separation mit Saline injiziert wurden, ist die Apikalspinedichte der vor der Separation pharmakologisch mit 0,1 mg/kg Way-100635 behandelten Tiere in den Verzweigungsordnungen 2 bis 5 geringer. Im 5. Segment und bei der mittleren Spinedichte der gesamten Dendritenbäume (12%) ist dieser Unterschied signifikant.

b) In der Apikaldendritenlänge sind keine Veränderungen nachweisbar.

*Vergleich zwischen separierten/salineinjizierten Tieren und separierten, mit 1 mg/kg Way-100635 injizierten Tieren (Abb. 18; Tab. 15-17)*

Ähnliche Ergebnisse lassen sich bei einer 10fachen Konzentration des 5-HT<sub>1A</sub>-Antagonisten nachweisen:

a) Die Apikalspinedichte dieser Tiere ist in den Verzweigungsordnungen 2 bis 5 geringer als die der separierten, salineinjizierten Tiere. Im 3. Segment und bei der mittleren Spinedichte der gesamten Dendritenbäume (14%) ist dieser Unterschied signifikant.

b) In der Apikaldendritenlänge sind keine Veränderungen nachweisbar.

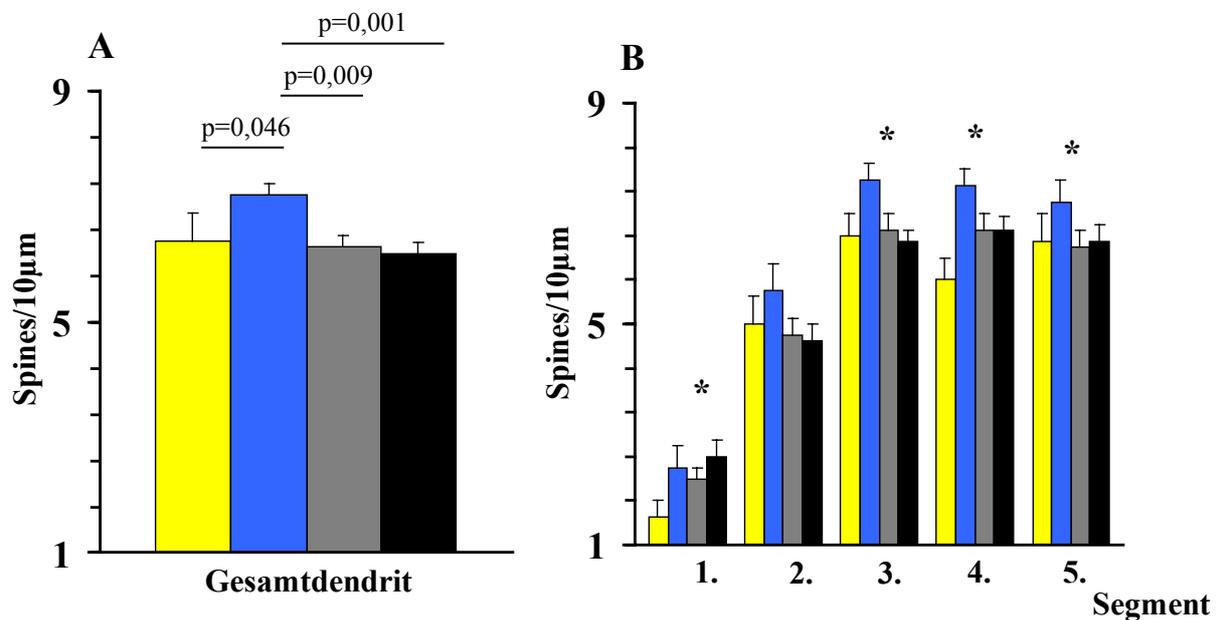
**► Eine Blockade der 5-HT<sub>1A</sub>-Rezeptoren verhindert also die durch die wiederholte Separation von den Eltern und Geschwistern induzierten erhöhten Apikalspinedichten.**

*Vergleich zwischen separierten, mit 0,1 mg/kg Way-100635 injizierten Tieren und separierten, mit 1 mg/kg Way-100635 injizierten Tieren (Abb. 18; Tab. 15-17)*

Weder in a) der Dichte der Apikalspines noch in b) der Länge der Apikaldendriten lassen sich Unterschiede zwischen mit 0,1 mg/kg und mit 1 mg/kg Way-100635- injizierten, separierten Tieren finden.

**► Die Wirksamkeit der niedrigeren Konzentration reicht bereits aus, die erfahrungsinduzierten Veränderungen zu blockieren.**

### Einfluss von 5-HT<sub>1A</sub>-Blockade auf die separationsinduzierten Veränderungen der Apikalspinesfrequenzen



### Einfluss von 5-HT<sub>1A</sub>-Blockade auf die Apikaldendritenlängen

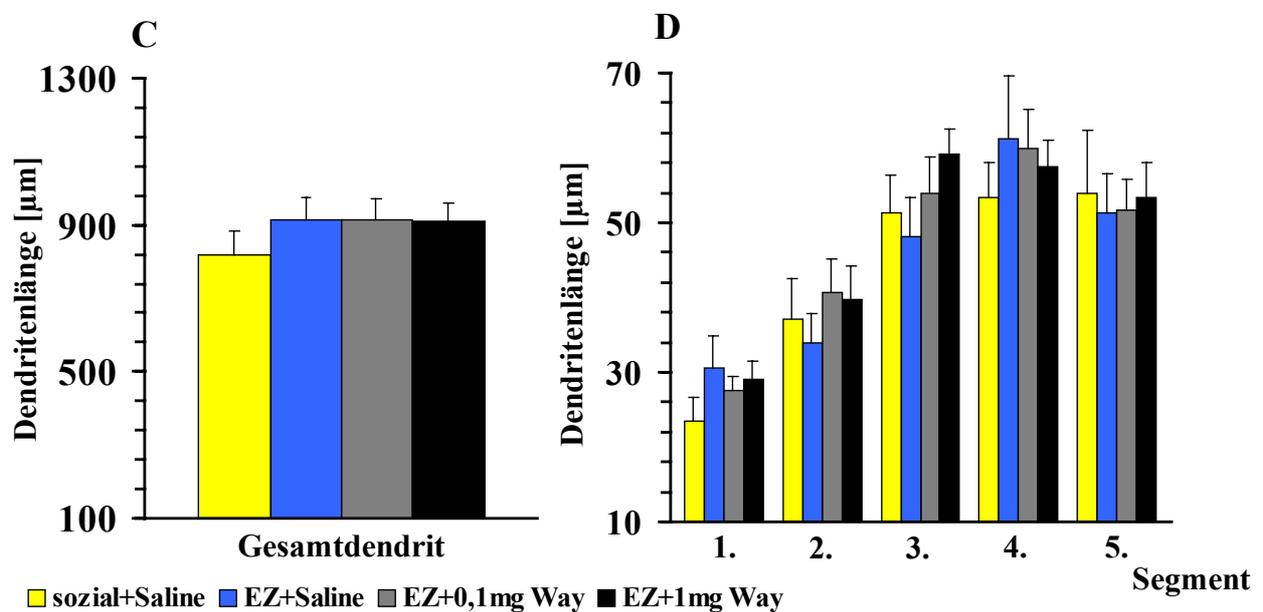


Abb. 18. (A) mittlere Spinedichte der gesamten Apikaldendritenbäume, (B) durchschnittliche Spinedichte der einzelnen Apikalsegmente, (C) mittlere Länge der gesamten Apikaldendritenbäume, (D) durchschnittliche Länge der einzelnen Apikalsegmente.

Angegeben sind Mittelwerte und Standardfehler, sowie die P-Werte des paarweisen Vergleichs mittels Mann-Whitney U-Test. Sternchen zeigen signifikante Unterschiede zwischen mehreren Gruppen (Kruskal Wallis One-Way ANOVA).

## 5.2. Basaldendriten

### I. Voruntersuchungen

*Vergleich zwischen sozialen/salineinjizierten Tieren und separierten/salineinjizierten Tieren (Abb. 19; Tab. 18-20)*

- a) Im Vergleich zu sozialen, salineinjizierten Tieren weisen separierte, salineinjizierte Tiere in den Basalsegmenten 1 bis 4 sowie bei den gesamten Basaldendritenbäumen (18%) signifikant höhere Spinedichten auf.
- b) Die mittlere Basaldendritenlänge der gesamten Dendritenbäume ist nicht unterschiedlich zwischen den beiden Gruppen. Die veränderte Basalspinedichte weist auf eine größere Anzahl von Basalspines der separierten, salineinjizierten Tiere im Vergleich zu sozialen, salineinjizierten Tieren hin.

### II. Pharmakologische Untersuchungen: Blockade der 5-HT<sub>1A</sub>-Rezeptoren

*Vergleich zwischen sozialen/salineinjizierten Tieren und separierten, mit 0,1 mg/kg Way-100635 injizierten Tieren (Abb. 19; Tab. 18-20)*

Zwischen sozialen, salineinjizierten und pharmakologisch mit 0,1 mg/kg Way-100635 behandelten Tieren, welche nach der täglichen Injektion eine Stunde separiert wurden, bestehen keine Unterschiede in a) der Dichte der Basalspines und in b) der mittleren Gesamtlänge der Basaldendriten von Schicht-II/III Pyramidenzellen. Im Vergleich zu sozialen, salineinjizierten Tieren ändert sich somit die absolute Basalspineanzahl durch die Separation nicht, wenn das serotonerge System blockiert wurde.

*Vergleich zwischen sozialen/salineinjizierten Tieren und separierten, mit 1 mg/kg Way-100635 injizierten Tieren (Abb. 19; Tab. 18-20)*

Auch bei der 10fachen Konzentration des 5-HT<sub>1A</sub>-Antagonisten Way-100635 vor der täglichen Separation ändert sich a) die Dichte der Basalspines und b) die mittlere Gesamtlänge der Basaldendriten nicht im Vergleich zu sozialen, salineinjizierten Tieren. Die absolute Basalspineanzahl ändert sich somit auch dann nicht durch die Separation, wenn das serotonerge System durch eine 10fache Konzentration des Antagonisten blockiert wurde.

*Vergleich zwischen separierten/salineinjizierten Tieren und separierten, mit 0,1 mg/kg Way-100635 injizierten Tieren (Abb. 19; Tab. 18-20)*

a) Im Vergleich zu Tieren, welche vor der Separation mit Saline injiziert wurden, ist die Basalspinedichte der vor der Separation pharmakologisch mit 0,1 mg/kg Way-100635 behandelten Tiere in allen Verzweigungsordnungen geringer. Im 2. und 3. Segment und bei der mittleren Spinedichte der gesamten Dendritenbäume (15%) ist dieser Unterschied signifikant.

b) In der Basaldendritenlänge ist kein Unterschied nachweisbar. Die geringere Spinedichte der mit 0,1 mg/kg Way-100635 behandelten, separierten Tiere ist nicht auf eine Verlängerung der Dendritensegmente zurückzuführen, sondern spiegelt eine Veränderung der absoluten Spineanzahl wieder.

*Vergleich zwischen separierten/salineinjizierten Tieren und separierten, mit 1 mg/kg Way-100635 injizierten Tieren (Abb. 19; Tab. 18-20)*

Ähnliche Ergebnisse lassen sich bei einer 10fachen Konzentration des 5-HT<sub>1A</sub>-Antagonisten nachweisen:

a) Die Basalspinedichte dieser Tiere ist in allen Verzweigungsordnungen geringer als die separierter, salineinjizierter Tiere. Im 3. und 4. Segment und bei der mittleren Spinedichte der gesamten Dendritenbäume (15%) ist dieser Unterschied signifikant.

b) In der Basaldendritenlänge sind keine Veränderungen nachweisbar.

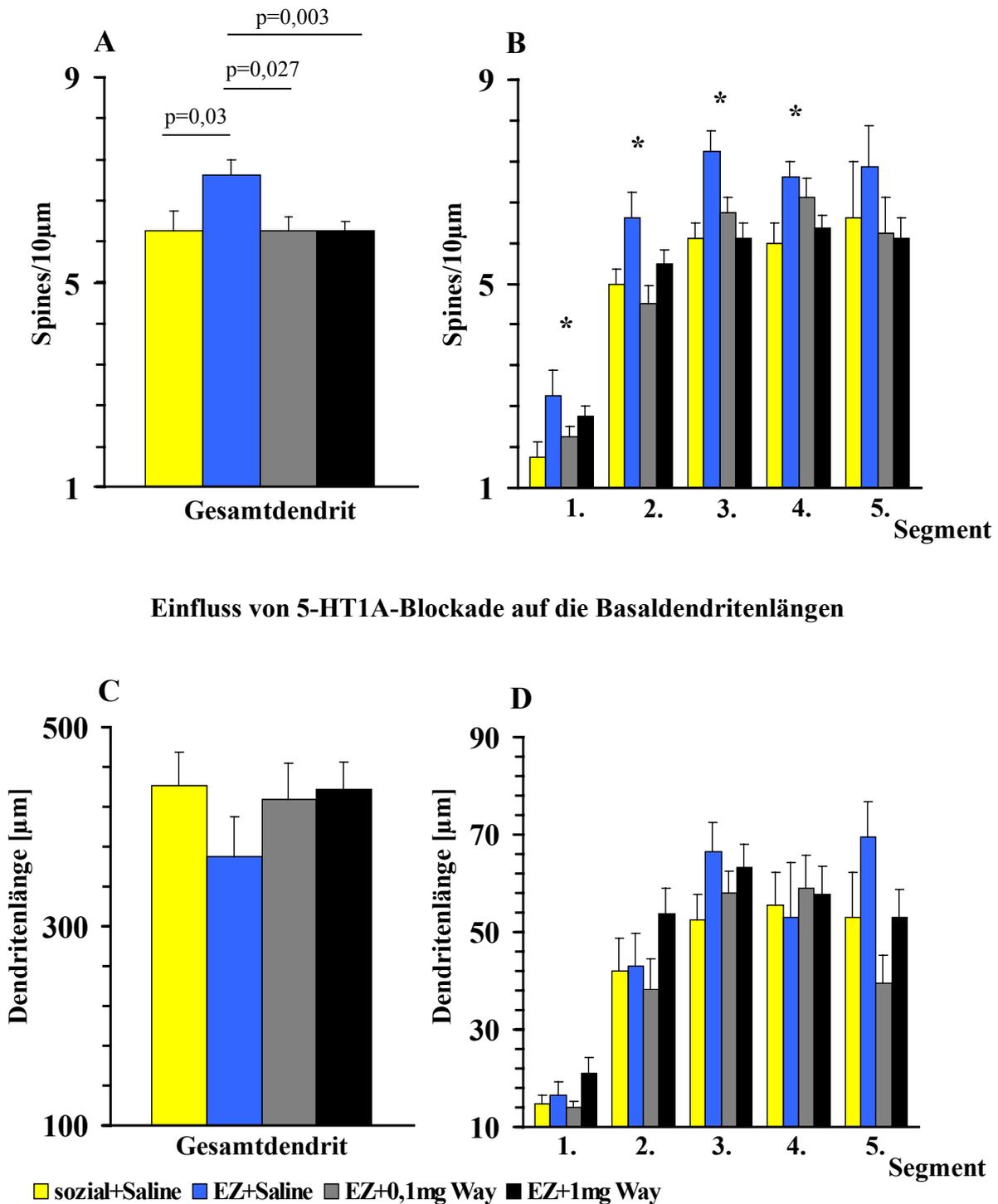
**► Eine Blockade der 5-HT<sub>1A</sub>-Rezeptoren unterdrückt also die durch die wiederholte Separation von Eltern und Geschwistern induzierten erhöhten Basalspinedichten.**

*Vergleich zwischen separierten, mit 0,1 mg/kg Way-100635 injizierten Tieren und separierten, mit 1 mg/kg Way-100635 injizierten Tieren (Abb. 19; Tab. 18-20)*

Weder in a) der Dichte der Basalspines noch in b) der Länge der Basaldendriten lassen sich Unterschiede zwischen mit 0,1 mg/kg und mit 1 mg/kg Way-100635- injizierten, separierten Tieren finden.

**► Die Wirksamkeit der niedrigeren Konzentration reicht bereits aus, die erfahrungsinduzierten Veränderungen zu blockieren.**

### Einfluss von 5-HT<sub>1A</sub>-Blockade auf die separationsinduzierten Veränderungen der Basalspinesfrequenzen



### Einfluss von 5-HT<sub>1A</sub>-Blockade auf die Basaldendritenlängen

Abb. 19. (A) mittlere Spinedichte der gesamten Basaldendritenbäume, (B) durchschnittliche Spinedichte der einzelnen Basalsegmente, (C) mittlere Länge der gesamten Basaldendritenbäume, (D) durchschnittliche Länge der einzelnen Basalsegmente.

Angegeben sind Mittelwerte und Standardfehler, sowie die P-Werte des paarweisen Vergleichs mittels Mann-Whitney U-Test. Sternchen zeigen signifikante Unterschiede zwischen mehreren Gruppen (Kruskal Wallis One-Way ANOVA).

## 6. Hirn- und Körpergewichte

### 6.1. Postnatale Entwicklung der Hirn- und Körpergewichte

In der folgenden Abbildung (Abb. 20) sind die Mittelwerte der Hirn- und Körpergewichte 0, 14, 21 und 45 Tage alter sozialer Tiere dargestellt.

Der Vergleich der Körpergewichte zeigt signifikante Unterschiede zwischen allen Altersstadien (Abb. 20B; Tab. 21). Bei den Hirngewichten besteht nur zwischen P21 und P45 kein signifikanter Unterschied (Abb. 20A; Tab. 21).

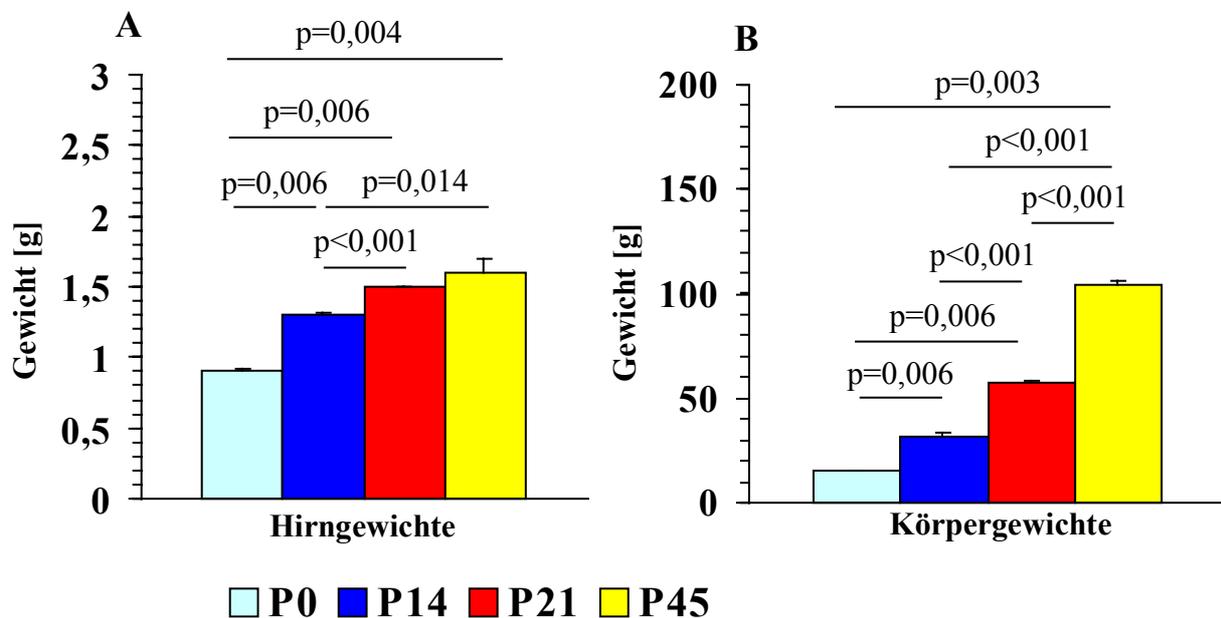


Abb. 20. Postnatale Entwicklung von (A) Hirn- und (B) Körpergewichten. Angegeben sind Mittelwerte und Standardfehler, sowie die P-Werte des paarweisen Vergleichs mittels Mann-Whitney U-Test.

### 6.2. Einfluss einer reizarmen Umgebung auf Hirn- und Körpergewichte

Hirn- und Körpergewichte (Tab. 21) der sozialen, 21tägigen in Standardkäfigen aufgewachsenen Tiere sind signifikant höher (Hirngewicht:  $p=0,042$ ; Körpergewicht:  $p=0,003$ ) als die der sozialen, 21tägigen Tiere aus den Volieren (Tab. 22). Möglicherweise sind die höheren Körpergewichte der Käfigtiere das Resultat der beschränkten Bewegungsfreiheit in ihrer Umgebung.

### **6.3. Einfluss von wiederholtem kurzzeitigem Elternentzug auf Hirn- und Körpergewichte**

In Tabelle 22 sind die Mittelwerte und Standardabweichungen der Hirn- und Körpergewichte 21tägiger sozialer und separierter Tiere angegeben. Weder bei den Hirn- noch bei den Körpergewichten lassen sich signifikante Abweichungen zwischen den zwei Versuchsgruppen nachweisen.

Es kann somit davon ausgegangen werden, dass wiederholter Elternentzug die körperliche Entwicklung nicht beeinträchtigt hat.

### **6.4. Einfluss des Vaters auf Hirn- und Körpergewichte**

Der Vergleich der Körpergewichte zeigt einen signifikanten Unterschied ( $p = 0,014$ ) zwischen den beiden Versuchsgruppen. Tiere, welche ohne Vater aufwuchsen, sind schwerer als sozial aufgewachsene Tiere. Bei den Hirngewichten besteht kein signifikanter Unterschied. Es kann somit davon ausgegangen werden, dass das Fehlen des Vaters die körperliche Entwicklung unter Laborbedingungen nicht beeinträchtigt. Möglicherweise hatten diese Tiere aber weniger Bewegung, weil ihnen der Vater als Spielgefährte fehlte.

In Tabelle 23 sind die Mittelwerte und Standardabweichungen der Hirn- und Körpergewichte 21 Tage alter, sozial und vaterlos aufgewachsener Tiere angegeben.

### **6.5. Einfluss wiederholter intraperitonealer Injektionen auf Hirn- und Körpergewichte**

Ein Kruskal-Wallis Anova zeigte keine signifikanten Unterschiede bei den Hirngewichten der vier verschiedenen injizierten Tiergruppen, so dass auf den statistischen Vergleich jeweils zweier Gruppen mittels Mann-Whitney U-Test bezüglich der pharmakologisch behandelten Tiere verzichtet wurde (Tab. 24, 25).

Separierte, mit 1 mg Way-100635 injizierte Tiere haben ein höheres Körpergewicht als die anderen Versuchsgruppen und dieser Trend wird signifikant im Vergleich mit der salineinjizierten Gruppe (Tab. 24, 25).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass der Vergleich von Körper- und Hirngewichten eine unzureichende körperliche Entwicklung der separierten und injizierten Tiere ausschließt.

## 7. Untersuchungen zu erfahrungsinduzierten Veränderungen von Cortisol und ACTH im Blut

### 7.1. Einfluss von wiederholtem kurzzeitigem Elternentzug auf Cortisol und ACTH im Blut

*Octodon degus* besitzen ähnlich dem Menschen und im Gegensatz zu anderen Nagern Cortisol (Kenagy et al., 1999).

In Tabelle 26 sind die Mittelwerte und Standardabweichungen der Blut-Cortisol-Werte 21 Tage alter sozialer und separierter Volieretiere angegeben. Die beiden Versuchsgruppen sind am P21 nicht signifikant unterschiedlich (Abb. 21).

Die statistische Auswertung der ACTH-Werte war nicht möglich, da die Konzentrationen von ACTH zu oft unter dem Detektionslimit der Messeinrichtung lagen.

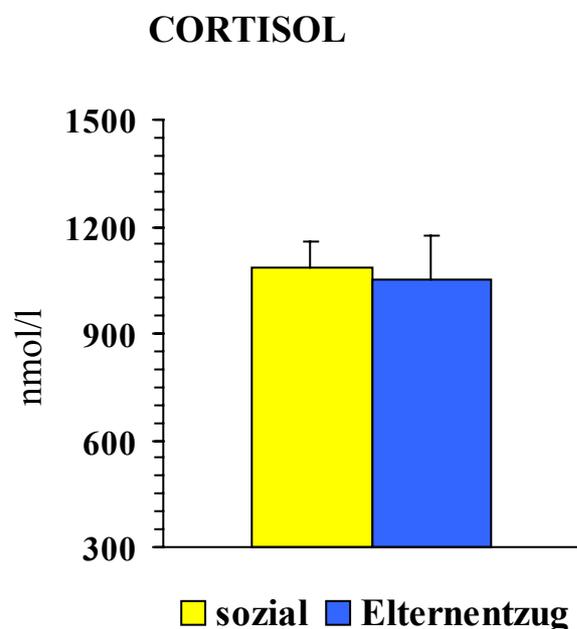


Abb. 21. Mittelwerte und Standardfehler der basalen Cortisol-Werte.

## 7.2. Einfluss des Vaters auf Cortisol und ACTH im Blut

Statistisch lässt sich kein signifikanter Unterschied bezüglich der basalen Cortisol-Konzentrationen, gemessen im Blutplasma sozialer und vaterlos aufgewachsener 21-tägiger Volieretiere nachweisen (Abb. 22; Tab. 27).

Eine statistische Auswertung der ACTH-Werte war nicht möglich, da die Konzentrationen von ACTH oft unter dem Detektionslimit der Messeinrichtung lagen.

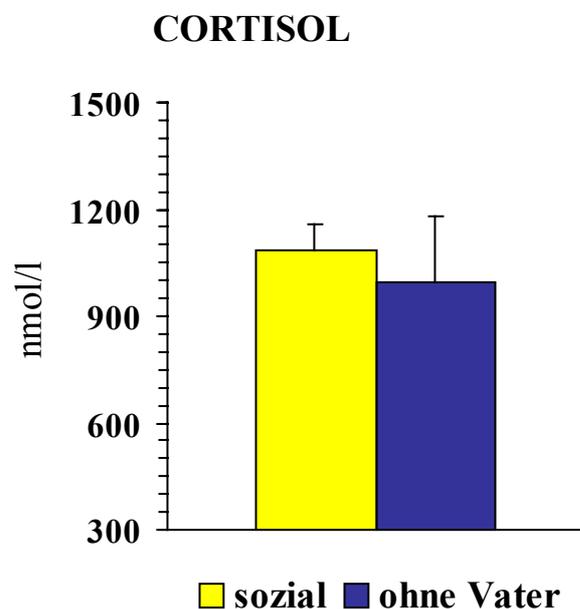


Abb. 22. Mittelwerte und Standardfehler der basalen Cortisol-Werte.

## 7.3. Einfluss wiederholter intraperitonealer Injektionen auf Cortisol und ACTH im Blut

Salineinjizierte, elternseparierte Tiere zeigen eine geringere Cortisol-Konzentration im Blut als die Tiere der anderen experimentellen Gruppen (Volieraufzucht) am P21 (Abb. 23; Tab. 28). Mittels eines Kruskal-Wallis Anovas konnten jedoch keine signifikanten Unterschiede der basalen Cortisol-Werte zwischen den vier injizierten Versuchsgruppen nachgewiesen werden, so dass auf den paarweisen Vergleich mittels Mann-Whitney U-Test verzichtet wurde.

Eine statistische Auswertung der ACTH-Werte war aus den oben genannten Gründen nicht möglich.

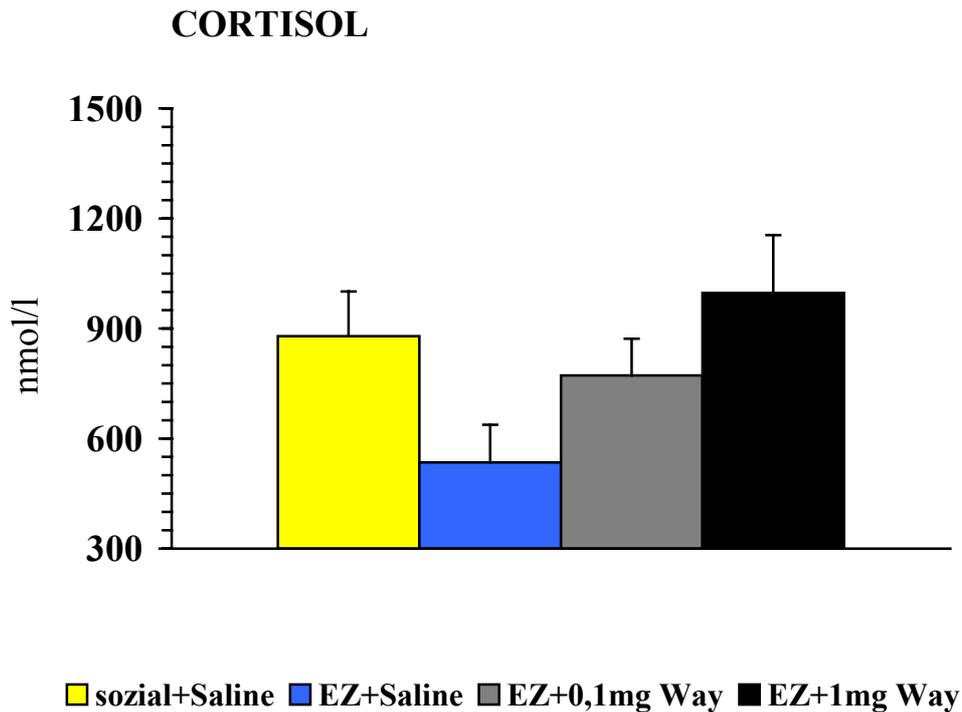


Abb. 23. Mittelwerte und Standardfehler der basalen Cortisol-Werte.

## **Versuch B – Einfluss von wiederholtem kurzzeitigem Elternentzug auf die Entwicklung inhibitorischer Systeme**

### **1. Einfluss von wiederholtem kurzzeitigem Elternentzug auf die Entwicklung inhibitorischer Interneurone im medialen Präfrontalcortex (PFC)**

#### **1.1. Deskriptive Beobachtungen Parvalbumin-, Calbindin- und Calretinin-positiver Neurone in den Subregionen des medialen PFC**

An dieser Stelle sollten calciumbindende Proteine enthaltende Neurone des PFC von Ratten und Degus, bezüglich ihrer Form und Verteilung deskriptiv verglichen werden. Colokalisationen der verschiedenen calciumbindenden Proteine untereinander, wie sie bei Ratten nachgewiesen wurden (Kubota et al., 1994), sollten überprüft werden. In Versuch A wurde der 5-HT<sub>1A</sub>-Rezeptor pharmakologisch untersucht. Eine Lokalisation des 5-HT<sub>1A</sub>-Rezeptors auf Calbindin- und Parvalbumin-positiven Neuronen, wie sie bei Ratten beobachtet wurde (Abb. 24), sollte im PFC von Degus nachgewiesen werden, um eventuelle

Zusammenhänge der Einflüsse von serotonergen und GABAergen Systemen auf die Spineentwicklung aufzuzeigen.

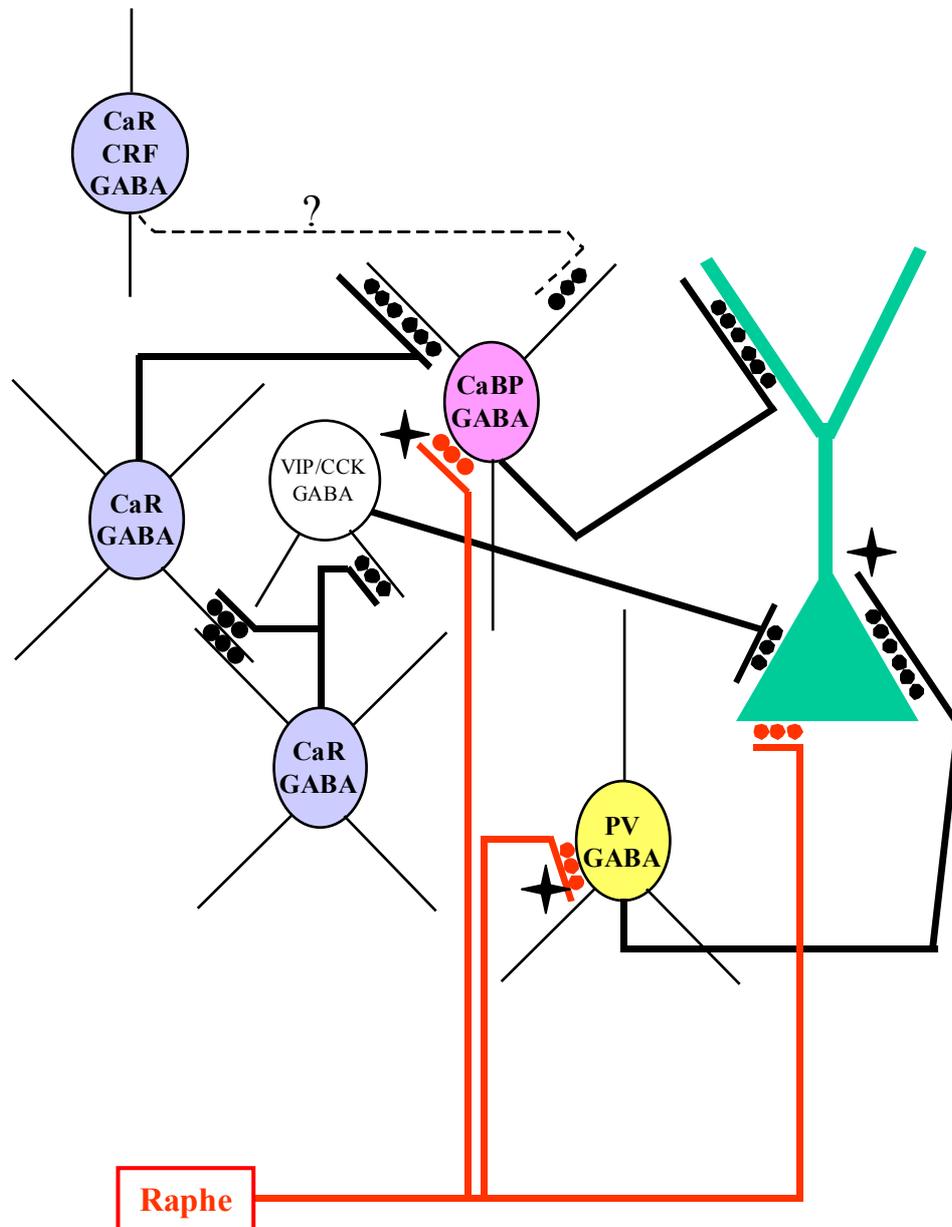
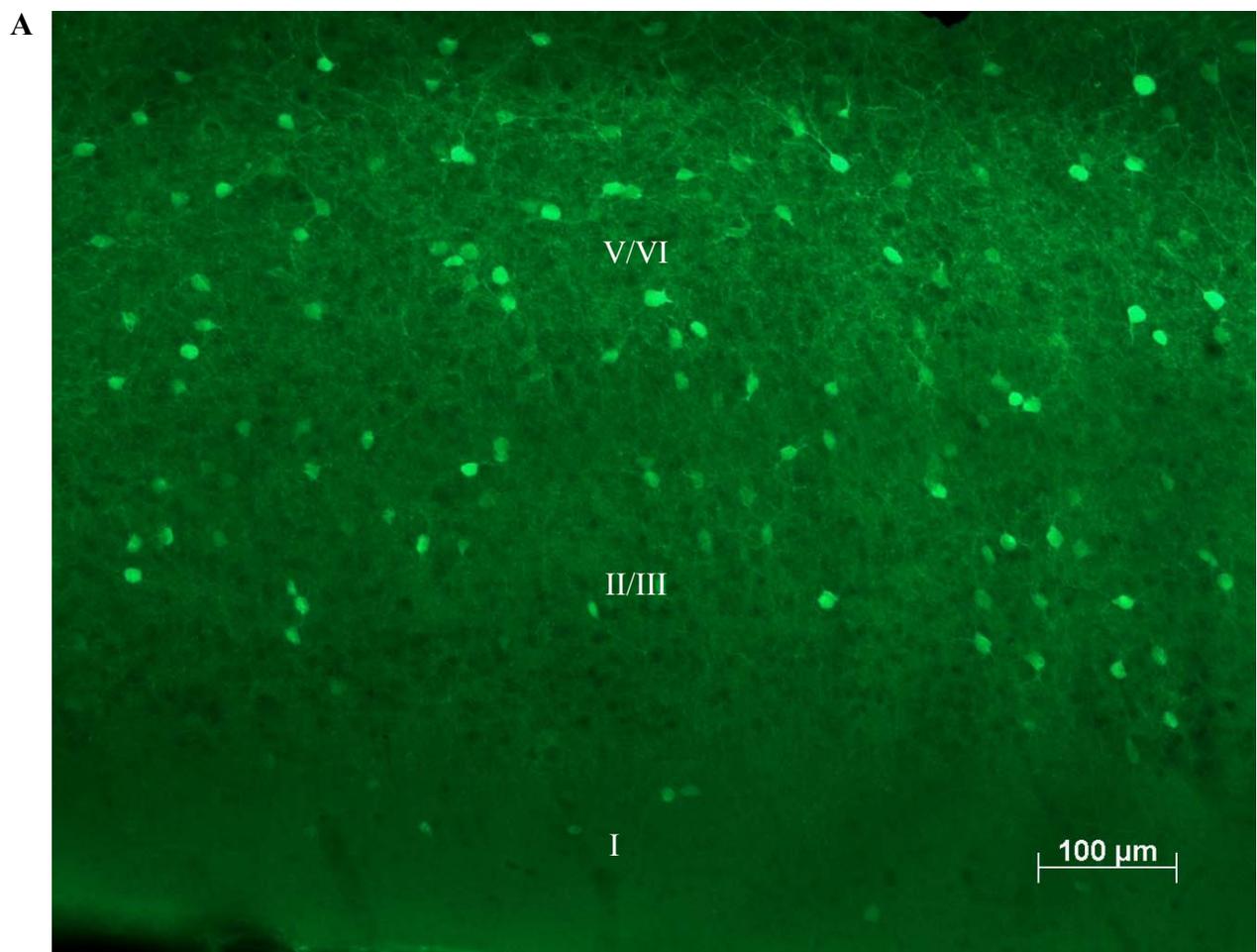


Abb. 24. Verbindungen GABAerger Interneurone (dicke, schwarze Linien) untereinander und mit Pyramidenzellen (grün), sowie serotonerger Input (5-HT) aus der Raphe (rote Linien). Kreise markieren Kontakte zwischen den Zellen (schwarz = GABA(A)- bzw. (B)-Rezeptoren, rot = 5HT<sub>1A</sub>-Rezeptoren). CaR = Calretinin, CaBP = Calbindin, PV = Parvalbumin, VIP = vasoaktives intestinales Polypeptid, CCK = Cholecystokinin. (Freund & Gulyás, 1997; Aznar et al., 2003; teilweise bestätigt durch eigene Befunde (schwarze Sternchen) im PFC von *Octodon degus*)

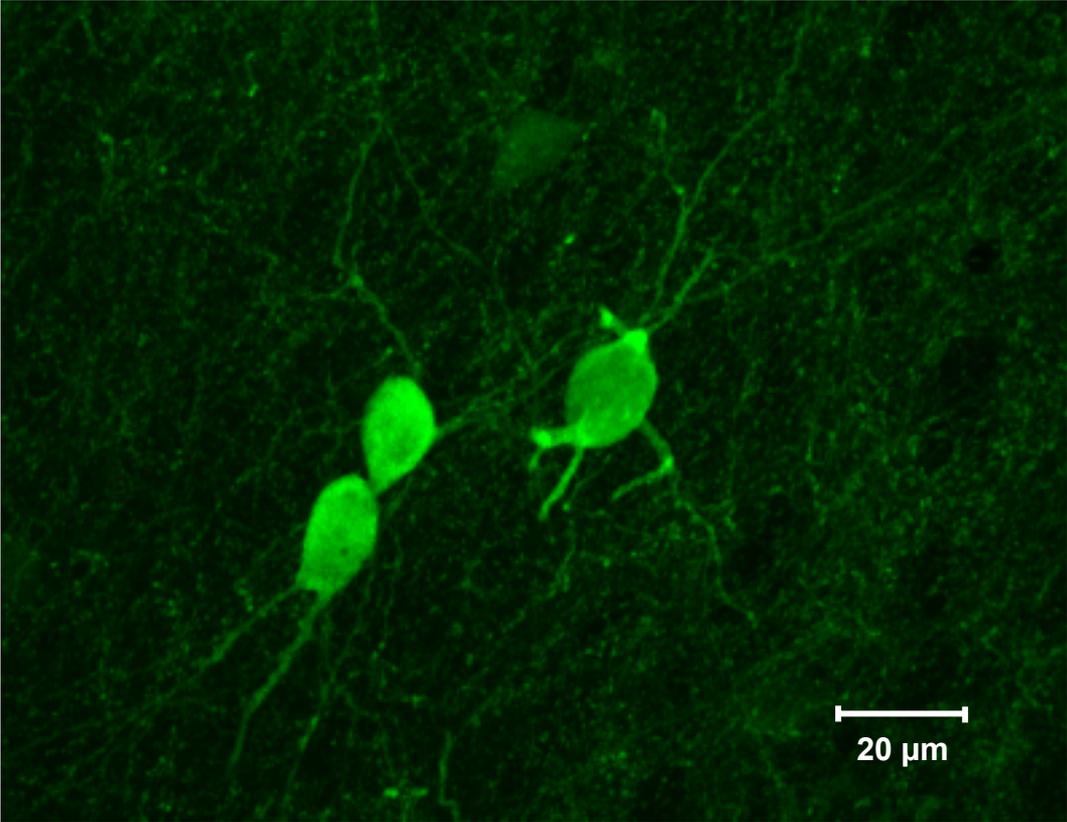
### *Parvalbumin*

Eine hohe Konzentration PV-immunoreaktiver, meist großer multipolarer Zellen ist in Schicht V und VI des PFC zu beobachten, aber auch die Schicht-II/III weist viele Neurone auf, welche das Protein Parvalbumin enthalten (Abb. 25A,B). Auf Soma und Dendriten PV-positiver Zellen im PFC sind 5-HT<sub>1A</sub>-Rezeptoren lokalisiert (Abb. 25C).

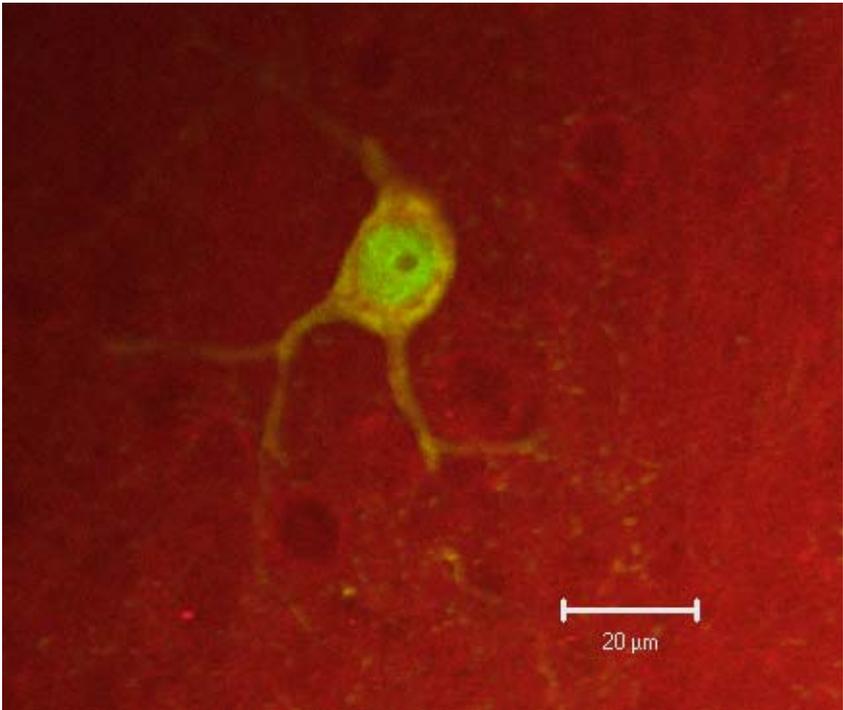
Im PFC von *Octodon degus* sind PV-Terminalien um die Somata von Pyramidenzellen qualitativ nachweisbar (Abb. 25D).



**B**



**C**



**D**

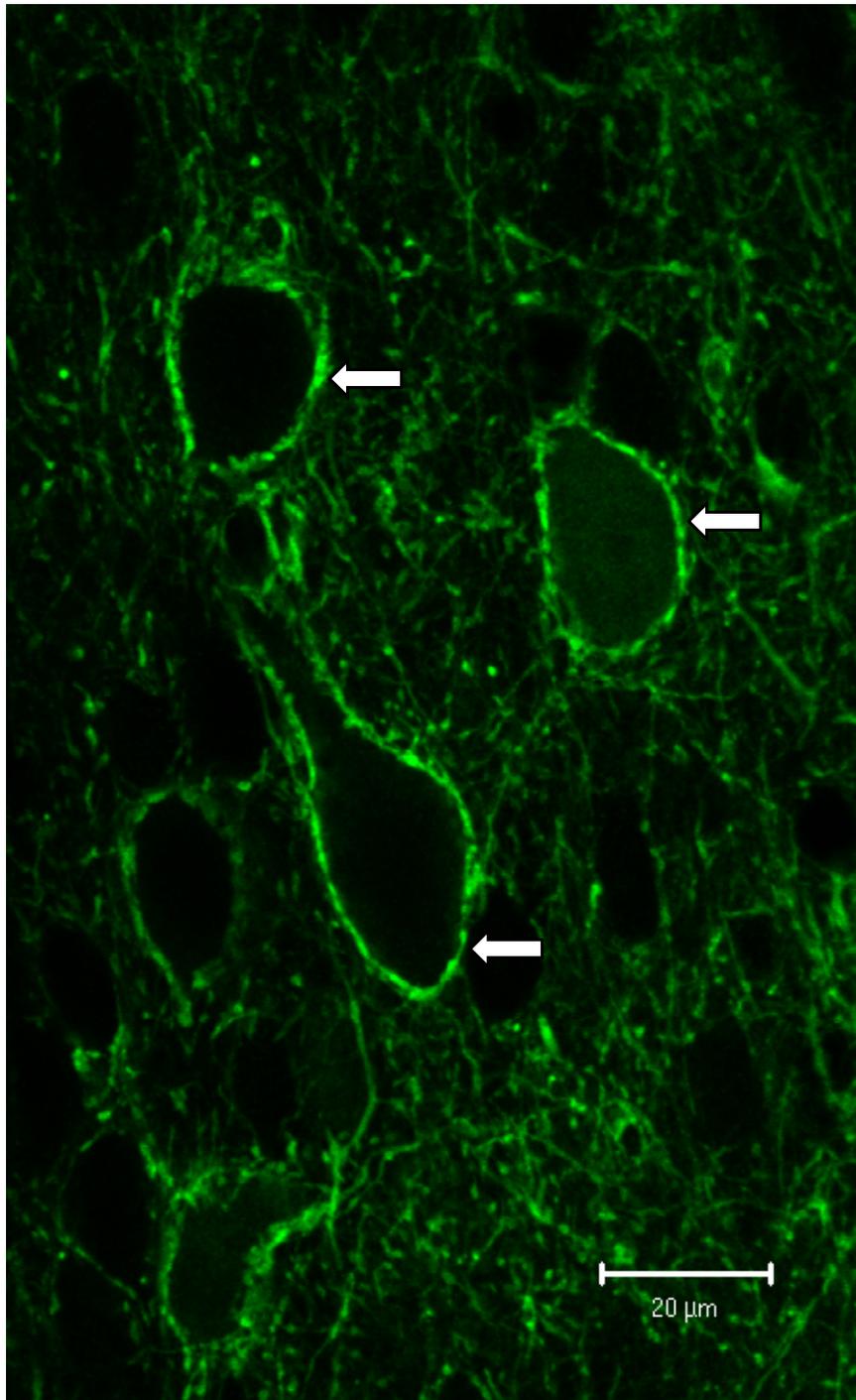
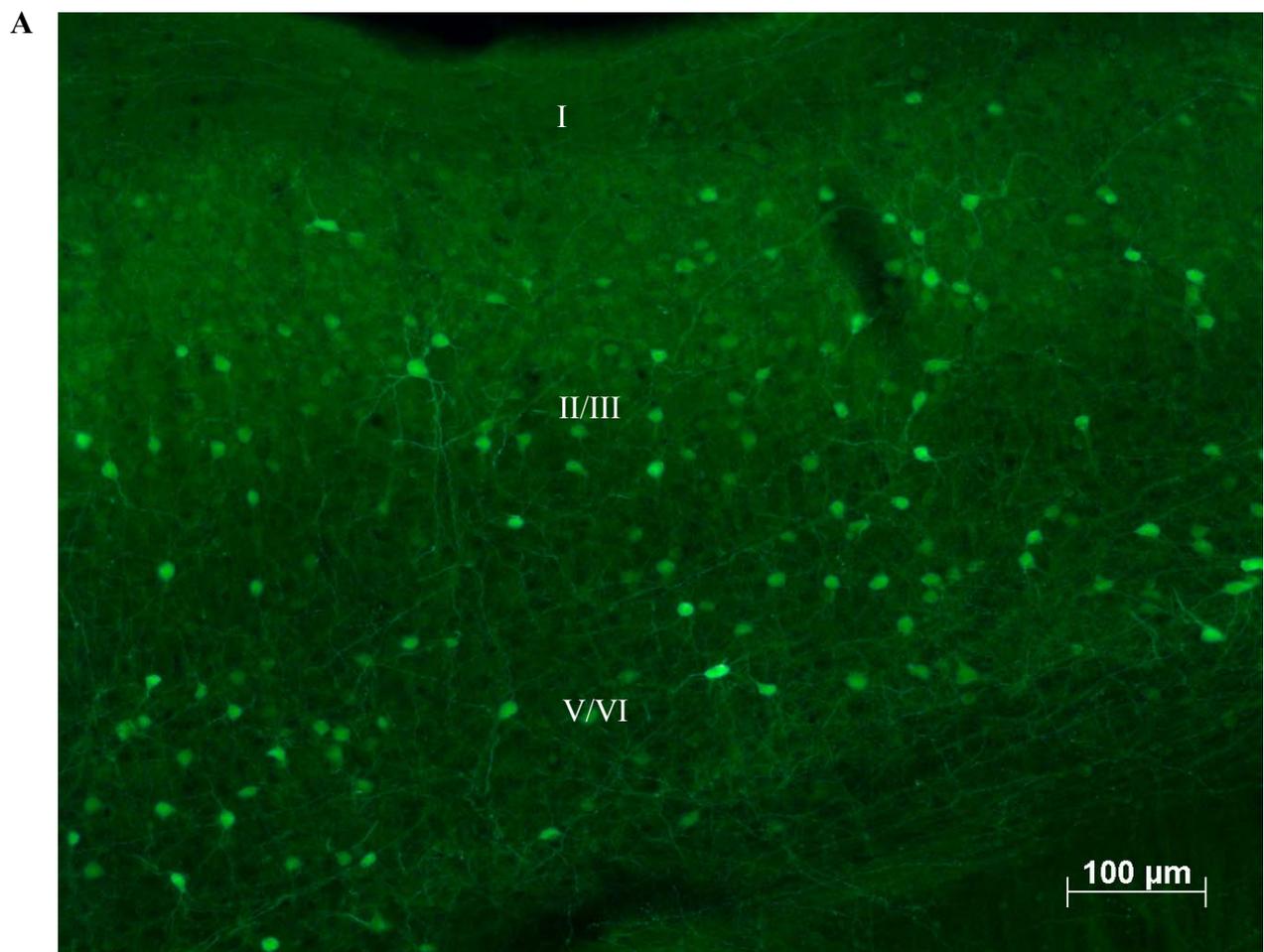


Abb. 25. (A-C) Fluoreszenzfärbung Parvalbumin-positiver Neurone (Alexa 488, grün),  
(A) Verteilung über die Zellschichten des PFC am Beispiel des IL, Aufnahme mit AxioCam und AxioScope (Zeiss),  
(B-D) Zusammengesetzte Bildstapel, Aufnahme mit Laserscan-Mikroskop LSM 510 META (Zeiss),  
(C) Neuron, immunopositiv für Parvalbumin (Alexa 488, grün) und 5-HT<sub>1A</sub> (Alexa 546, rot),  
(D) Pfeile markieren Parvalbumin-positiv Terminalien um die Zellkörper Parvalbumin-negativer Pyramidenzellen (Alexa 488, grün).

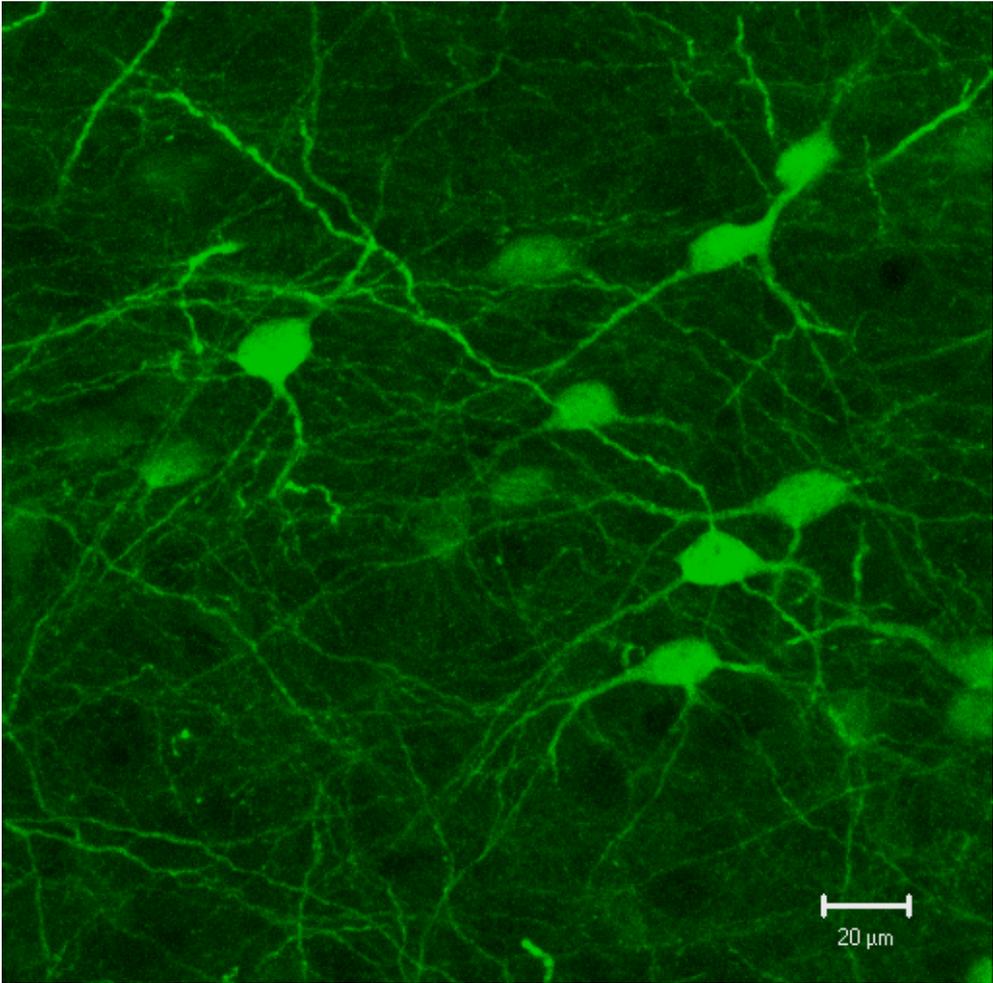
### *Calbindin*

In allen Subregionen des PFC sind am 45. und am 90. Tag CaBP-D28k-positive Zellen präsent, sie verteilen sich relativ gleichmäßig über die Zellschichten und sind meist multipolar, z.T. auch bipolar (Abb. 26A,B). Teilweise scheint CaBP-D28k schwach in Pyramidenzellen vorhanden zu sein, wie es auch bei Ratten beschrieben wurde (Hof et al., 1999).

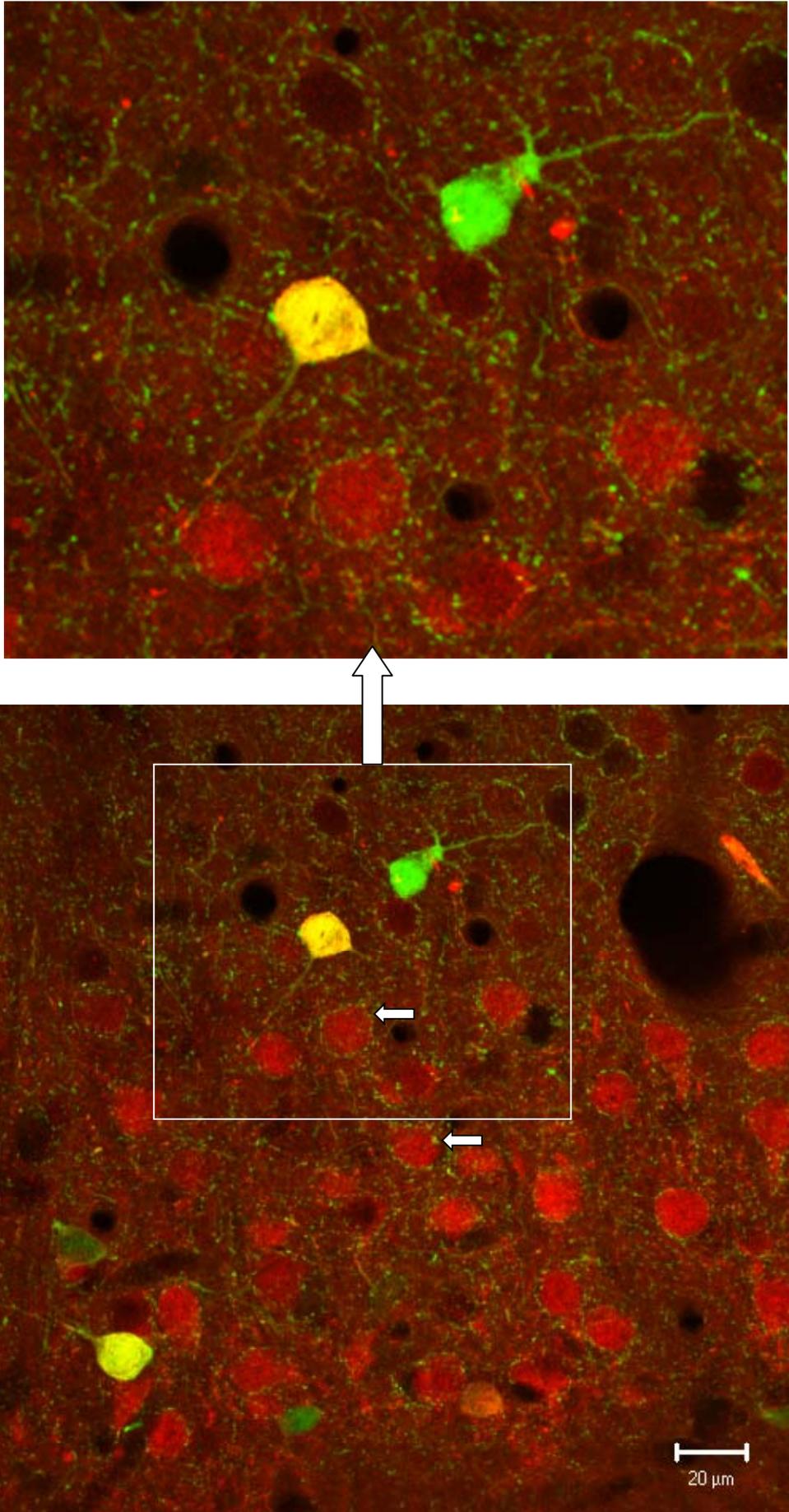
Qualitativ lassen sich, wie u.a. bei Ratten (Hof et al., 1999) Colokalisationen von CaBP-D28k und Parvalbumin im PFC von *Octodon degus* nachweisen, und PV-Terminalien kann man um die Somata CaBP-D28k-positiver, PV-negativer Neurone beobachten (Abb. 26C). Auf den Zellkörpern CaBP-D28k-positiver Zellen sind außerdem 5-HT<sub>1A</sub>-Rezeptoren lokalisiert (Abb. 26D).



**B**



C



D

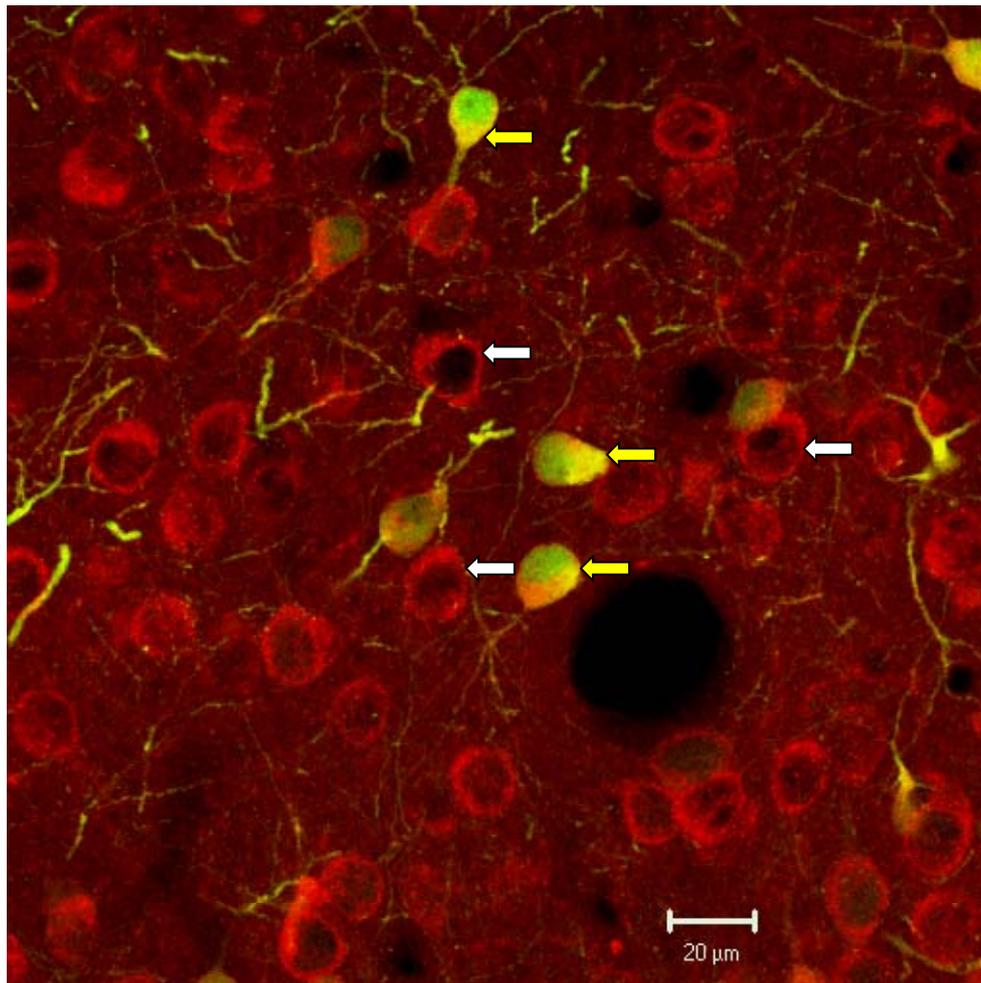


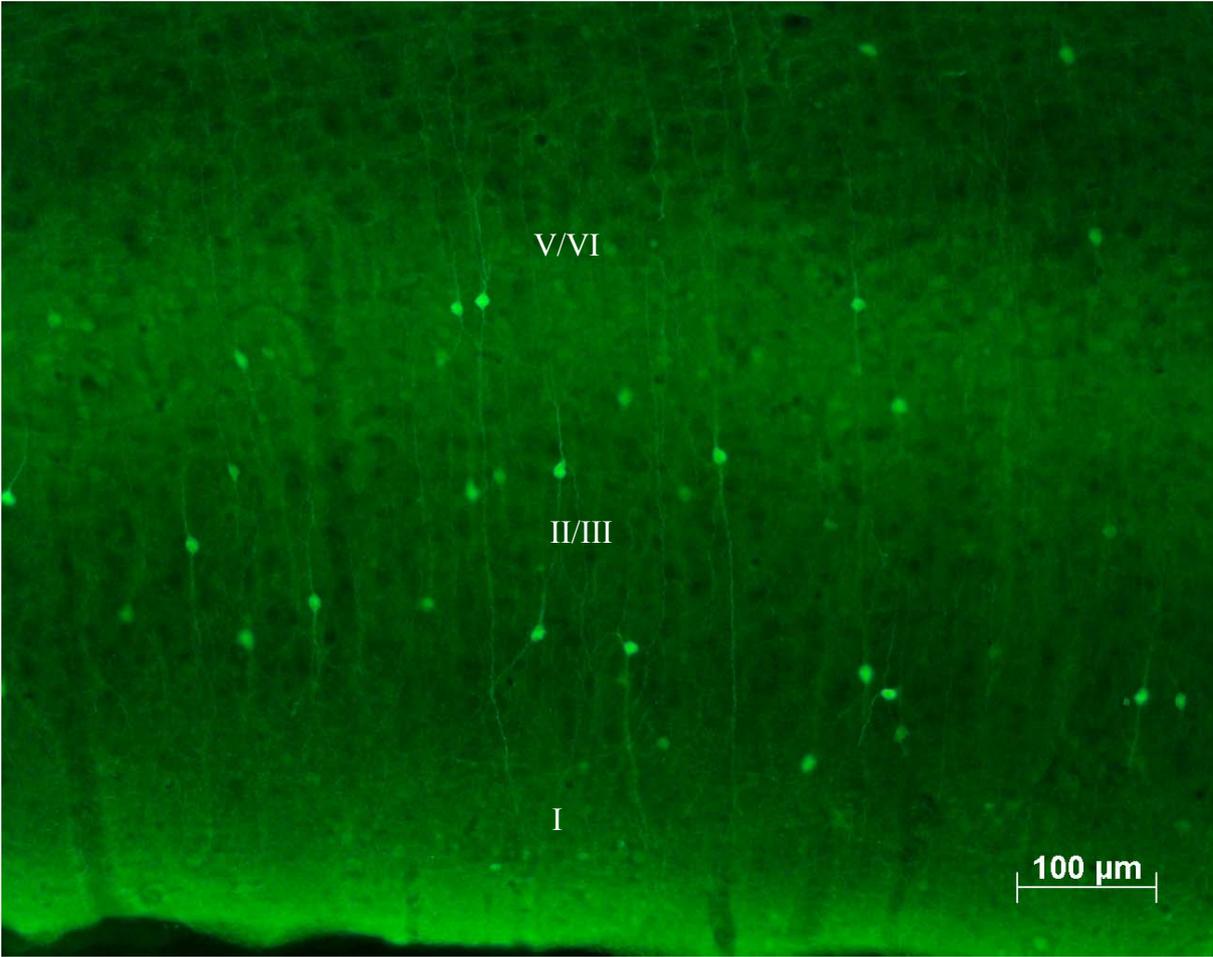
Abb. 26. (A, B) Fluoreszenzfärbung CaBP-D28k-positiver Neurone (Alexa 488, grün), (A) Verteilung über die Zellschichten des PFC am Beispiel des IL, Aufnahme mit Axiocam und Axioskop (Zeiss), (B-D) Zusammengesetzter Bildstapel, Aufnahme mit Laserscan-Mikroskop LSM 510 META (Zeiss), (C) Colokalisation von CaBP-D28k (Alexa 546, rot) und Parvalbumin (Alexa 488, grün), colokalisierte Zellen erscheinen gelb, Pfeile markieren Parvalbumin-positive Terminalien um CaBP-D28k-positiver Neurone, (D) Colokalisation von CaBP-D28k (Alexa 488, grün) und  $5\text{-HT}_{1A}$  (Alexa 546, rot),  $5\text{-HT}_{1A}$ -Rezeptoren befinden sich auf den Zellkörpern CaBP-D28k-negativer (weiße Pfeile) und CaBP-D28k-positiver Zellen (gelbe Pfeile).

### *Calretinin*

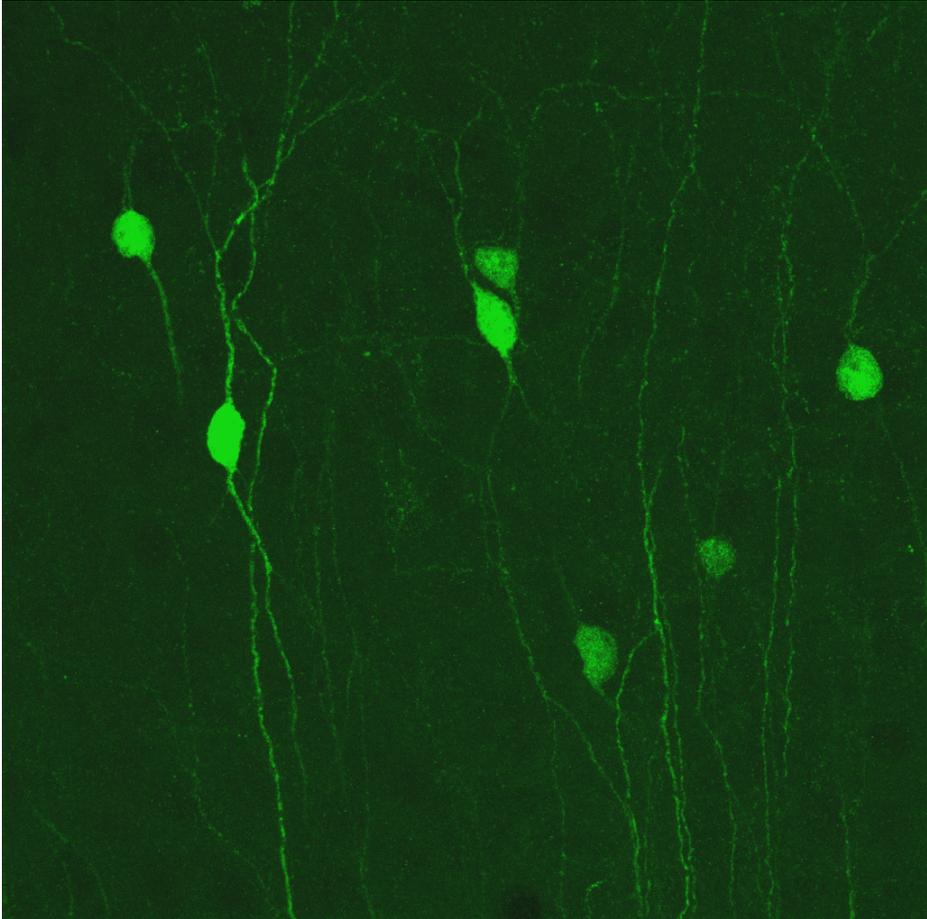
Zumeist bipolar geformt, sind Calretinin enthaltende Zellen vor allem in Schicht II/III der untersuchten Hirnregionen zu finden (Abb. 27A,B).

Colokalisationen von Calbindin und Calretinin, wie sie u.a. bei Ratten beobachtet wurden (Hof et al., 1999), konnte ich bisher nicht nachweisen. Colokalisationen von Calretinin und CRF sind im PFC von *Octodon degus* qualitativ nachweisbar (Abb. 27B-D).

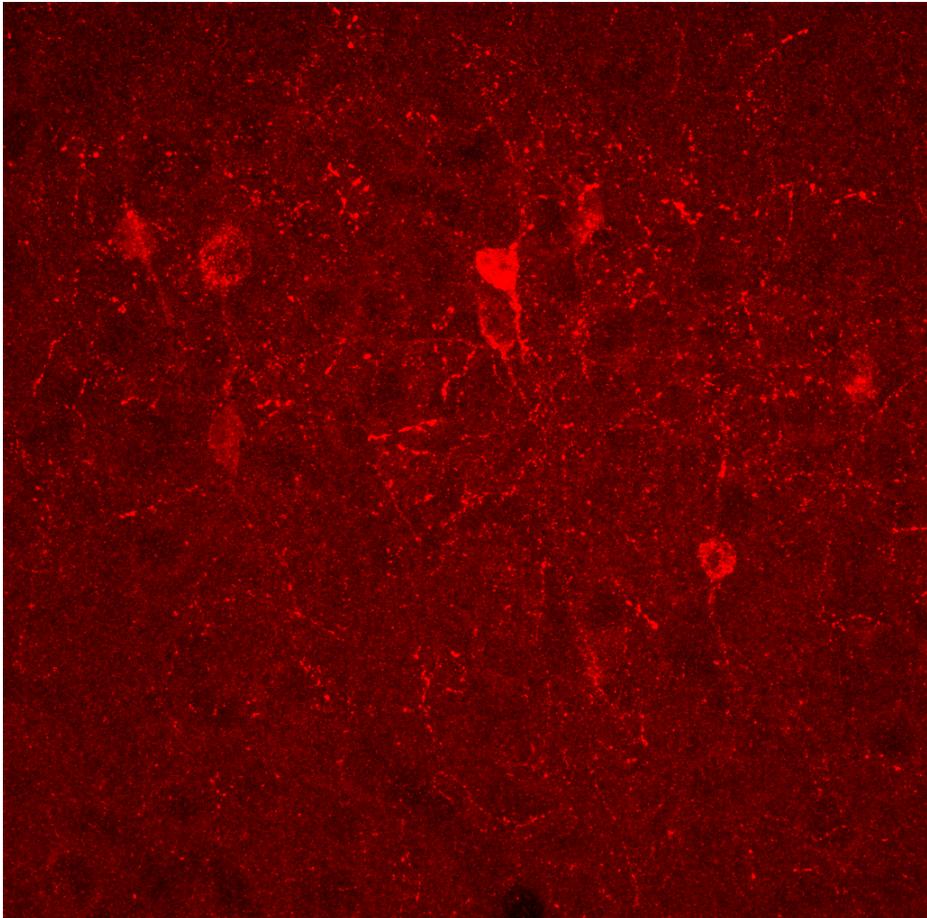
A



**B**



**C**



D

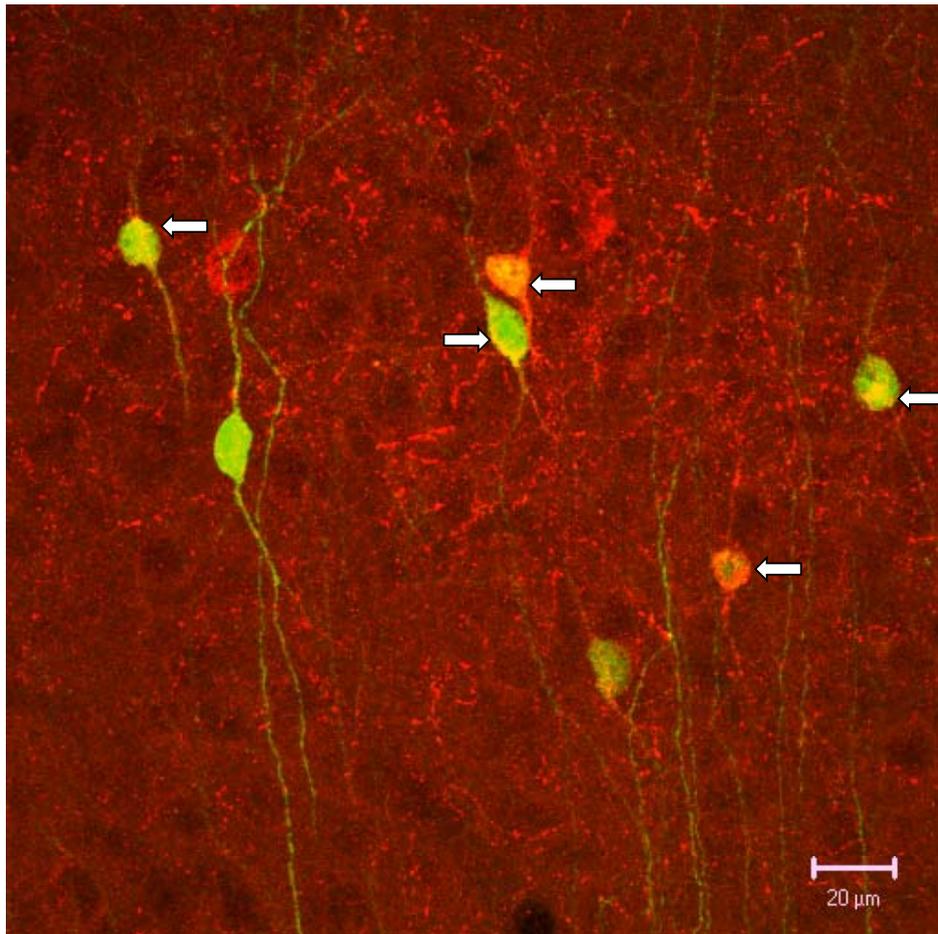


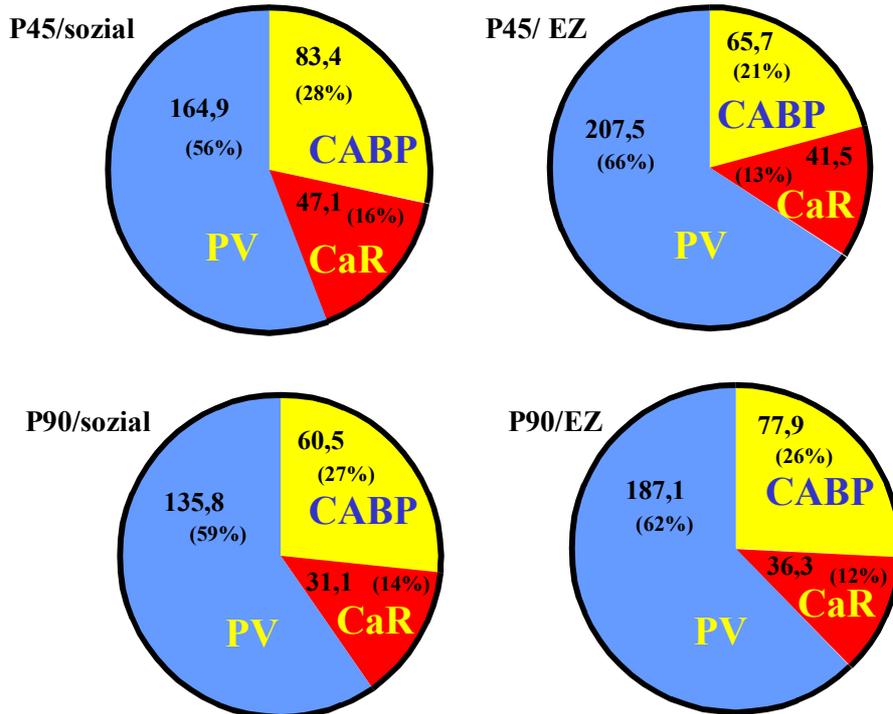
Abb. 27 (A-D) Fluoreszenzfärbung CaR-positiver Neurone (Alexa 488, grün),  
 (A) Verteilung über die Zellschichten des PFC am Beispiel des IL, Aufnahme mit Axiocam und Axioskop (Zeiss),  
 (B-D) Zusammengesetzter Bildstapel, Aufnahme mit Laserscan-Mikroskop LSM 510 META (Zeiss),  
 (B,C) Einzelbilder und (D) Colokalisation von CaR (Alexa 488, grün) und CRF (Alexa 546, rot), colokalisierte Zellen erscheinen gelb (Pfeile).

## 1.2. Prozentuale Verteilung von Parvalbumin-, Calbindin- und Calretinin-positiven Neuronen in den Subregionen des medialen PFC

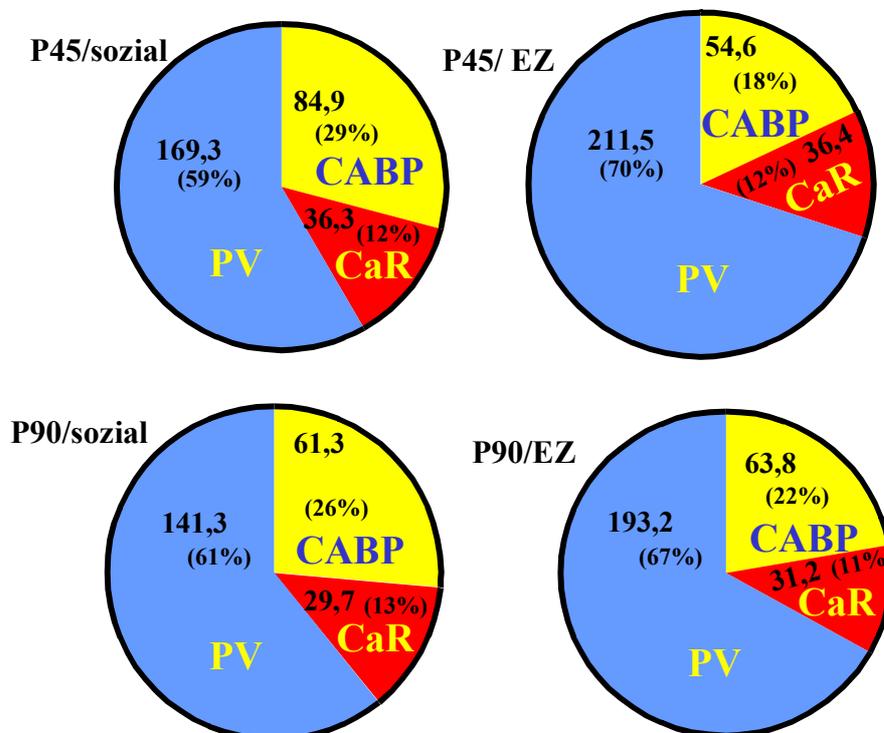
Parvalbumin-, Calretinin-, und Calbindin- immunoreaktive Zellen sind in den vier untersuchten Subregionen des PFC (Abb. 1) bei sozialen und separierten 45tägigen und 90tägigen Käfigtieren nachweisbar. Setzt man die Verteilung aller calciumbindenden Proteine als 100%, so zeigt sich, dass, abhängig von der Versuchsgruppe und der untersuchten Teilregion, bis zu 70% dieser Neurone Parvalbumin enthalten, bis zu 53% Calbindin und bis zu 16% Calretinin (Abb. 28; Tab. 29). Da calciumbindende Proteine auch colokalisiert sein

können (Kubota et al., 1994), ist die Gesamtdichte aller calciumbindenden Proteine (Tab. 29) kein realer Wert und wurde nicht statistisch ausgewertet. Es zeigt sich jedoch eine Tendenz, dass die Gesamtdichte aller calciumbindenden Proteine sowohl bei 45tägigen separierten Tieren als auch bei 90tägigen separierten Tieren im Vergleich zu den gleichaltrigen Normaltieren in allen untersuchten Subregionen des PFC höher ist (Tab. 29). Zwischen dem 45. und dem 90. Lebensstag nimmt die Dichte aller calciumbindenden Proteine in den untersuchten Subregionen ab (Tab. 29).

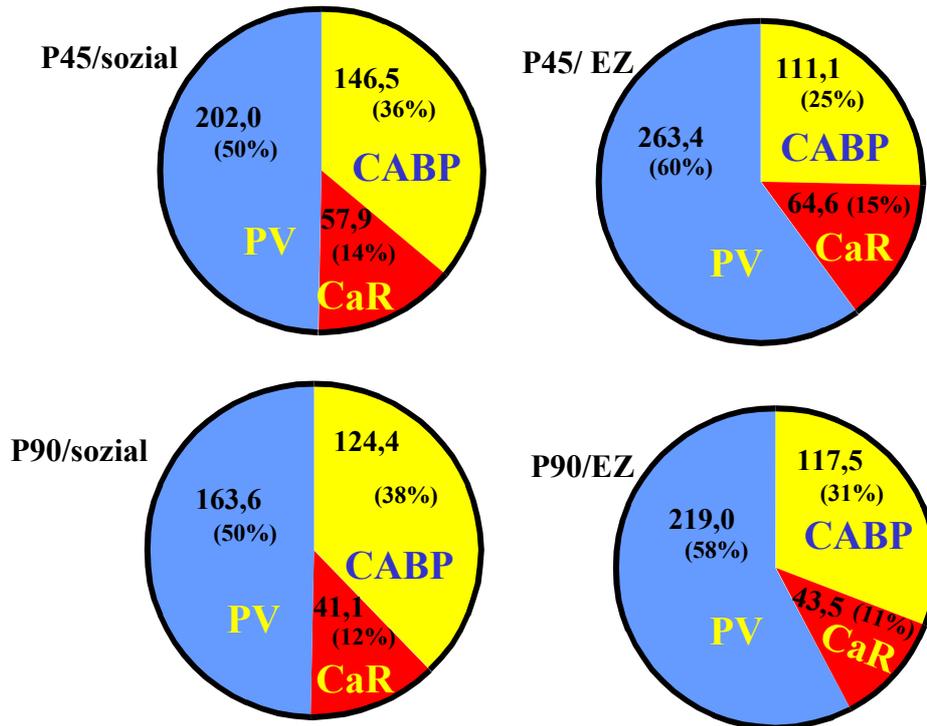
## Anteriorer cingulärer Cortex



## Präcentraler medialer Cortex



## Prälimbischer Cortex



## Infralimbischer Cortex

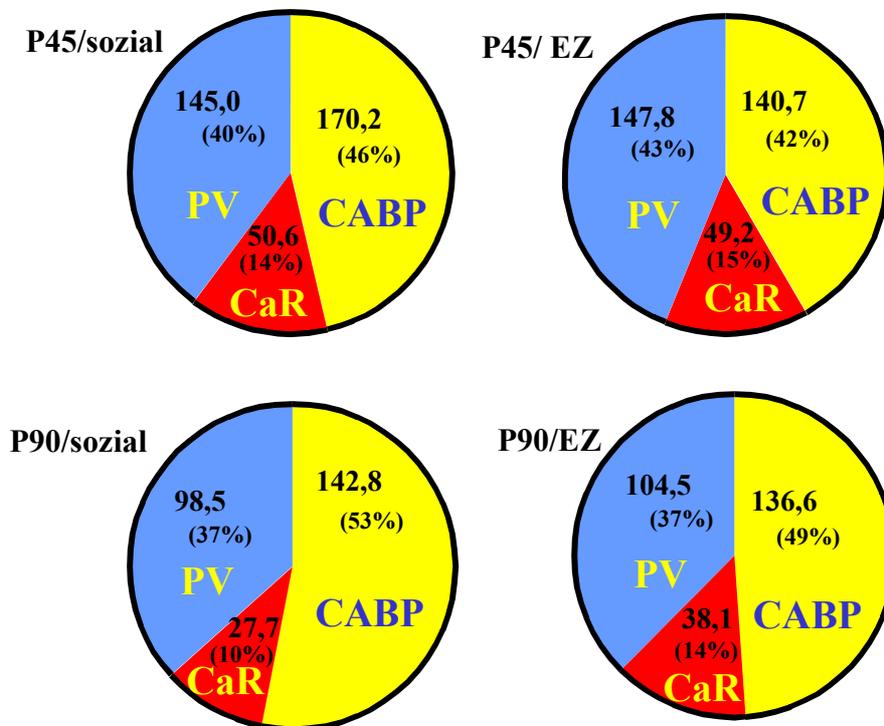


Abb. 28. Mittelwerte von Zelldichten und prozentuale Verteilung der GABAergen Interneurone (dargestellt durch den immunocytochemischen Nachweis calciumbindender Proteine) der vier Versuchsgruppen in Abhängigkeit von der untersuchten Teilregion.

### **1.3. Veränderungen der Dichten Parvalbumin-, Calbindin- und Calretinin-positiver Interneurone in den Subregionen des medialen PFC**

#### *Parvalbumin*

**P45:** In den Subregionen ACd, PrCm und PL zeigt sich ein nichtsignifikanter Trend zu höheren Zelldichten bei separierten Tieren im Vergleich zu sozialen Tieren. Die quantitative Auswertung des infralimbischen Cortex weist keine Veränderung bei separierten Tieren nach (Abb. 29; Tab. 29).

**P90:** Im Vergleich zu sozialen Tieren sind signifikant höhere Zelldichten im ACd und im PrCm separierter Tiere nachweisbar. Im PL besteht ein solcher, jedoch nichtsignifikanter Trend. Die quantitative Auswertung des infralimbischen Cortex weist auch in diesem Altersstadium keine Veränderung bei separierten Tieren nach (Abb. 29; Tab. 29).

Die Dichte PV-immunoreaktiver Zellen im ACd nimmt bei sozialen Tieren vom 45. bis zum 90. Lebensstag nahezu signifikant ( $p=0,052$ ) ab. Dieser Trend besteht auch in den übrigen Subregionen des PFC, sowie zwischen separierten 45tägigen und 90tägigen Tieren (Abb. 29; Tab. 29).

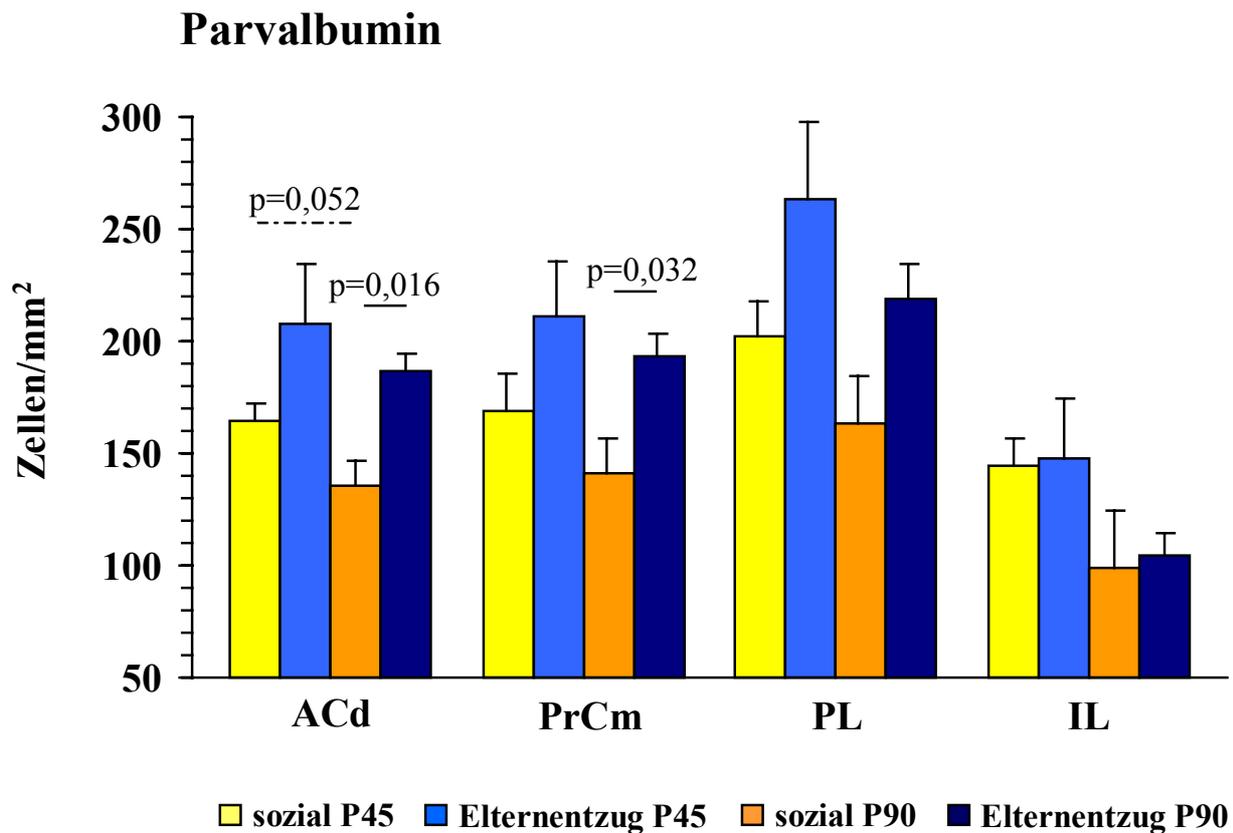


Abb. 29. Mittelwerte und Standardfehler der Dichte PV-immunopositiver Zellen sozialer und separierter Käfigtiere. Die P-Werte des paarweisen Vergleichs mittels Mann-Whitney U-Test sind angegeben.

#### *Calbindin*

**P45:** Signifikant geringere Dichten CaBP-D28k-positiver Neurone sind im ACd sowie im PrCm von separierten im Vergleich zu sozialen Tieren zu beobachten. Diese Veränderungen sind im PL und IL nur als nichtsignifikanter Trend zu verzeichnen (Abb. 30; Tab. 29).

**P90:** In diesem Altersstadium sind in keiner der Subregionen des PFC signifikante Unterschiede in der Dichte CaBP-D28k-positiver Zellen zwischen sozialen und separierten Tieren nachweisbar (Abb. 30; Tab. 29).

90tägige sozial aufgewachsene Tiere weisen in allen Subregionen des PFC geringere Dichten CaBP-D28k-immunoreaktiver Zellen auf als 45tägige Tiere. Dieser Trend ist im ACd und im PrCm signifikant. Zwischen separierten 45- und 90tägigen Tieren bestehen keine signifikanten Unterschiede (Abb. 30; Tab. 29).

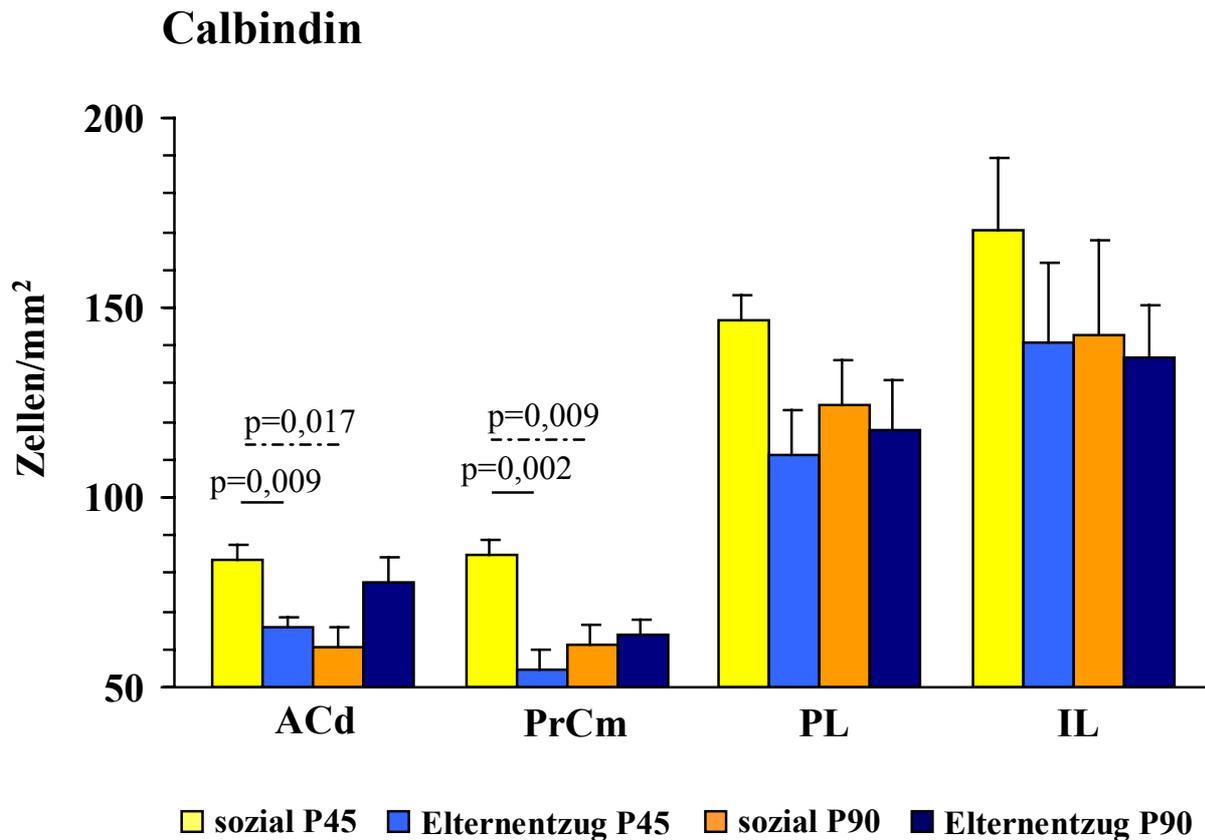


Abb. 30. Mittelwerte und Standardfehler der Dichte CaBP-D28k-immunopositiver Zellen sozialer und separierter Käfigtiere. Die P-Werte des paarweisen Vergleichs mittels Mann-Whitney U-Test sind angegeben.

#### Calretinin

**P45:** In der Dichte von Calretinin-positiven Zellen ist zwischen der sozialen und der separierten Gruppe in keiner Subregion des PFC ein signifikanter Unterschied nachweisbar (Abb. 31; Tab. 29).

**P90:** Auch in diesem Altersstadium gibt es keine signifikanten Unterschiede zwischen sozialen und separierten Tieren (Abb. 31; Tab. 29).

In allen Subregionen des PFC ist die Dichte Calretinin-positiver Neurone am 90. Lebensstag geringer als am 45. Lebensstag. Dieser Trend besteht sowohl bei sozialen als auch bei separierten Tiergruppen. Im ACd und im IL 90tägiger sozialer Tiere sind signifikant Unterschiede im Vergleich zu sozialen 45tägigen Tieren nachweisbar. Separierte 90tägige Tiere weisen im PL signifikant geringere Dichten CaR-immunoreaktiver Neurone als 45tägige separierte Tiere auf (Abb. 31; Tab. 29).

Calretinin ist das einzige der untersuchten calciumbindenden Proteine, das bei *Octodon degus* sehr häufig mit CRF colokalisiert ist (Abb. 27D; Tab. 30).

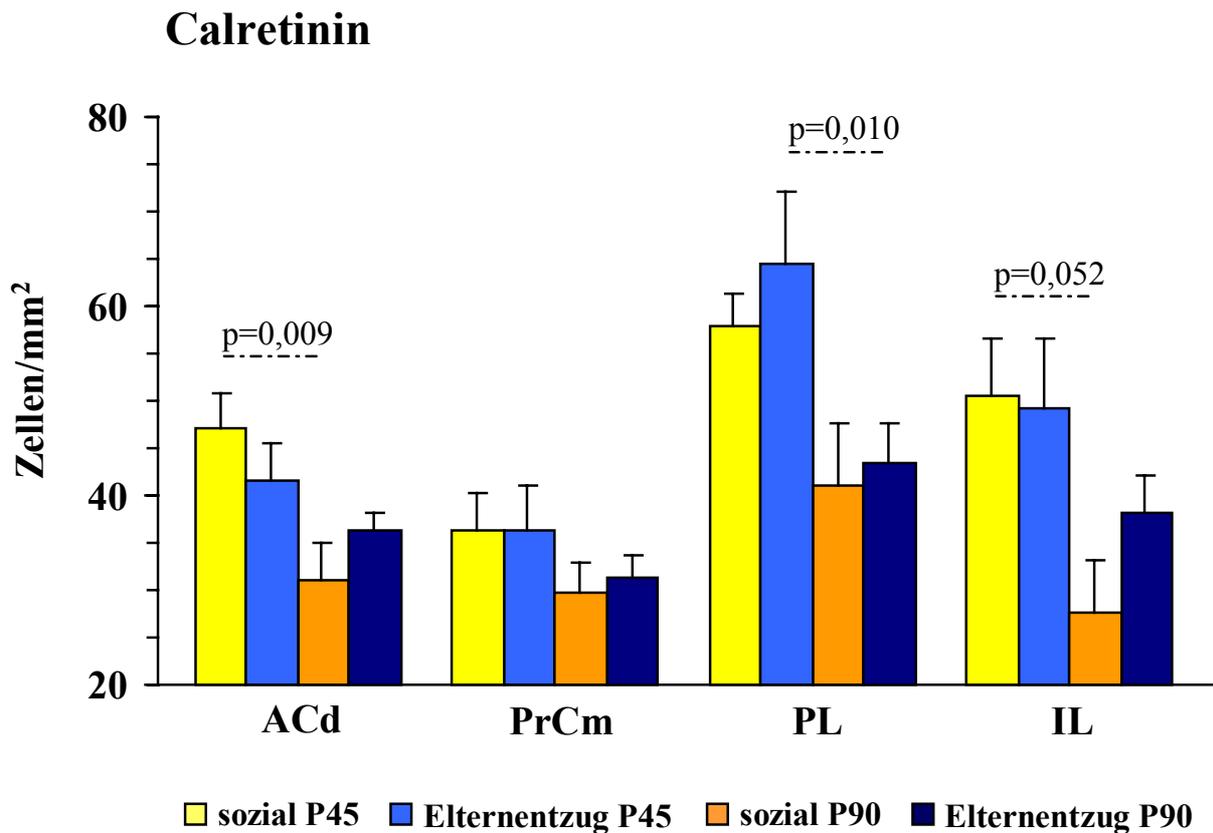


Abb. 31. Mittelwerte und Standardfehler der Dichte CaR-immunopositiver Zellen sozialer und separierter Käfigtiere. Die P-Werte des paarweisen Vergleichs mittels Mann-Whitney U-Test sind angegeben.

## 2. Einfluss von wiederholtem kurzzeitigem Elternentzug auf die Entwicklung von CRH exprimierenden Neuronen im medialen Präfrontalcortex (PFC)

### *Corticotropin-Releasing-Hormon (CRH)*

**P45:** Zwischen Kontrolltieren und separierten Tieren lässt sich in keiner der untersuchten Subregionen des PFC ein signifikanter Unterschied in der Dichte CRH enthaltender Neurone nachweisen (Abb. 32; Tab. 30).

**P90:** Auch zwischen 90tägigen sozialen und separierten Tieren lässt sich kein signifikanter Unterschied in der Dichte CRH enthaltender Neurone nachweisen (Abb. 32; Tab. 30).

Sowohl bei sozialen als auch bei separierten Tieren nimmt die Dichte CRH exprimierender Neurone in allen Subregionen des medialen PFC vom 45. zum 90. Lebenstag hin ab. Im PrCm sind diese Unterschiede zwischen den Altersstadien signifikant (Abb. 32; Tab. 30).

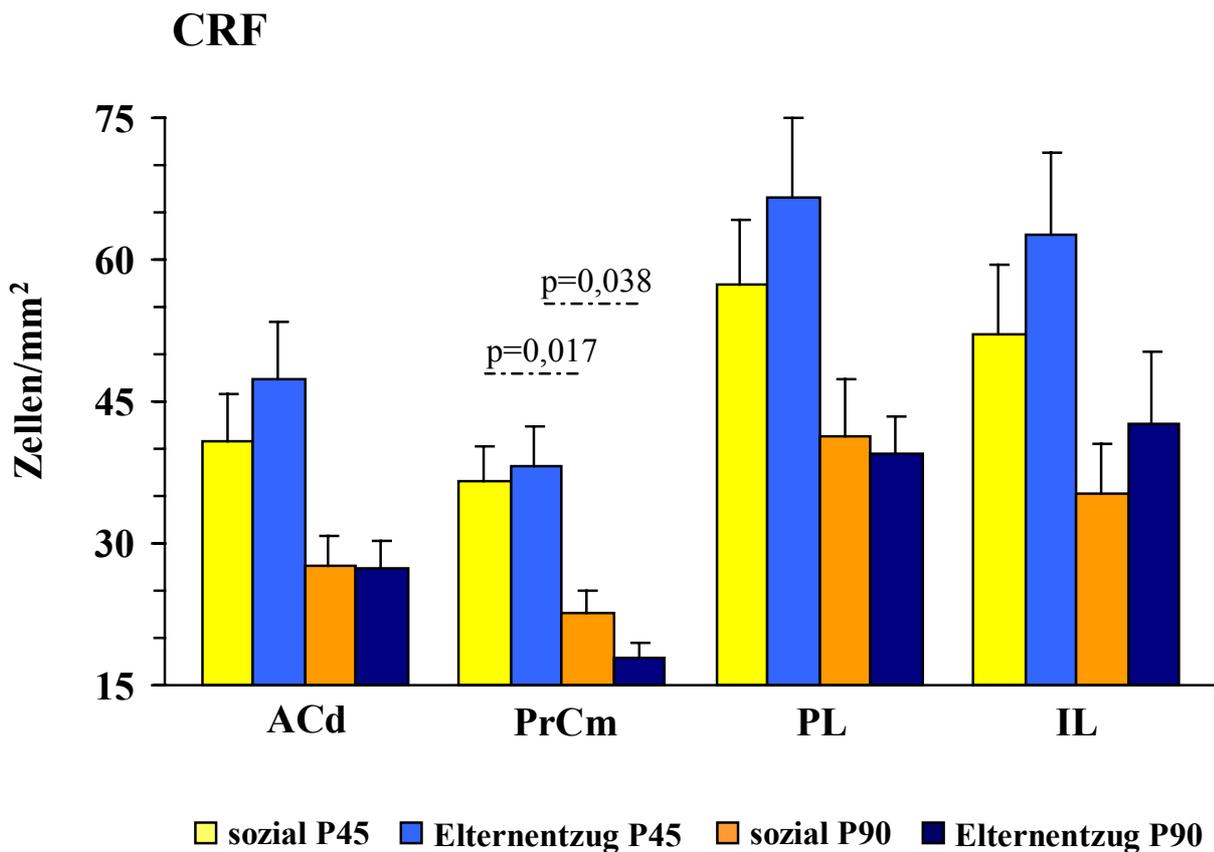


Abb. 32. Mittelwerte und Standardfehler der Dichte CRH-immunopositiver Zellen sozialer und separierter Käfigtiere. Die P-Werte des paarweisen Vergleichs mittels Mann-Whitney U-Test sind angegeben.

#### *Colokalisation von CRH und Calretinin*

Wie zuvor beschrieben, ist CRH im PFC von Degus sehr oft mit CaR colokalisiert, selten jedoch mit Calretinin oder Parvalbumin (Abb. 27D; Tab. 30).

**P45:** Bei beiden experimentellen Gruppen sind etwa 50-70%, in Abhängigkeit von der untersuchten Teilregion, der CRH-positiven Zellen mit CaR doppelgefärbt. Signifikante Veränderungen zwischen Kontrolltieren und separierten Tieren in Bezug auf die Dichte colokalisierter Zellen, sind in keiner Teilregion des PFC nachzuweisen. Im ACd und im PL besteht jedoch ein Trend zu einer höheren Dichte CaR/CRH colokalisierter Zellen bei separierten Tieren im Vergleich zu Kontrollen (Abb. 33; Tab. 30).

**P90:** Bei sozialen 90tägigen Tiere liegen die Colokalisationen von CaR und CRH zwischen 30 und 50%, bei separierten zwischen 17 und 34%. In allen untersuchten Subregionen des PFC sind die Dichten colokalisierter Zellen bei separierten Tieren geringer als bei sozialen. Im PrCm ist dieser Unterschied signifikant (Abb. 33; Tab. 30).

Sowohl bei sozialen als auch bei separierten Tieren nimmt die Dichte CaR/CRH colokalisierter Zellen vom 45. zum 90. Lebensstag hin ab. Im PrCm, PL und IL sozialer Tiere, sowie im ACd, PrCm und PL separierter Tiere ist dieser Unterschied signifikant (Abb. 33; Tab. 30).

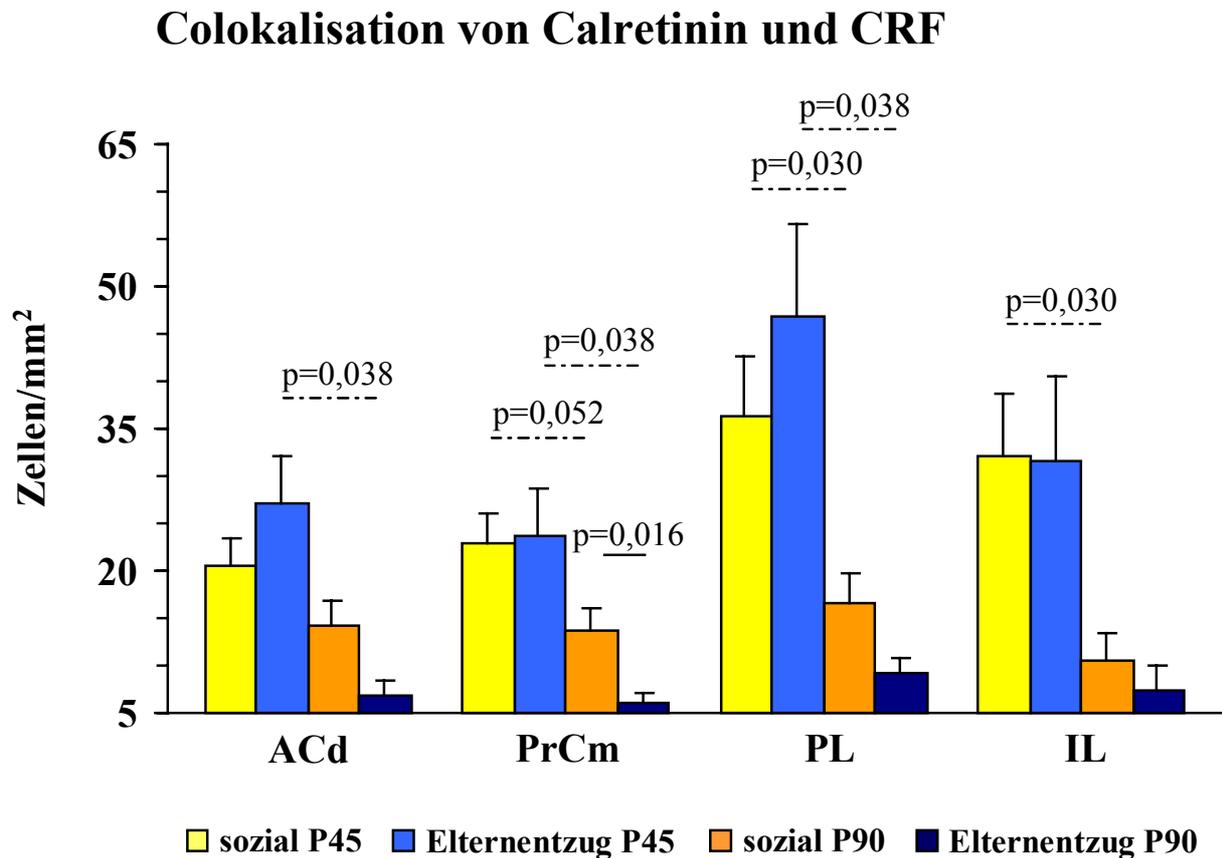


Abb. 33. Mittelwerte und Standardfehler der Dichte CaR/CRH-colokalisierter immunopositiver Zellen sozialer und separierter Käfigtiere. Die P-Werte des paarweisen Vergleichs mittels Mann-Whitney U-Test sind angegeben.

### 3. Hirn- und Körpergewichte

**P45:** Separierte Tiere dieses Altersstadiums haben signifikant höhere Hirn- und Körpergewichte als soziale Tiere (Abb. 34A,B; Tab. 31).

**P90:** Bezüglich der Hirngewichte ist kein signifikanter Unterschied zwischen elternseparierten und sozialen Tieren nachweisbar (Abb. 34A; Tab. 31). Letztere weisen jedoch höhere Körpergewichte auf (Abb. 34B; Tab. 31).

Vom 45. zum 90. Lebensstag nehmen die Hirn- und Körpergewichte der sozialen Tiere signifikant zu (Abb. 34A,B; Tab. 31). Bei separierten Tieren ändert sich nur das Körpergewicht im Verlaufe der Entwicklung (Abb. 34A,B; Tab. 31).

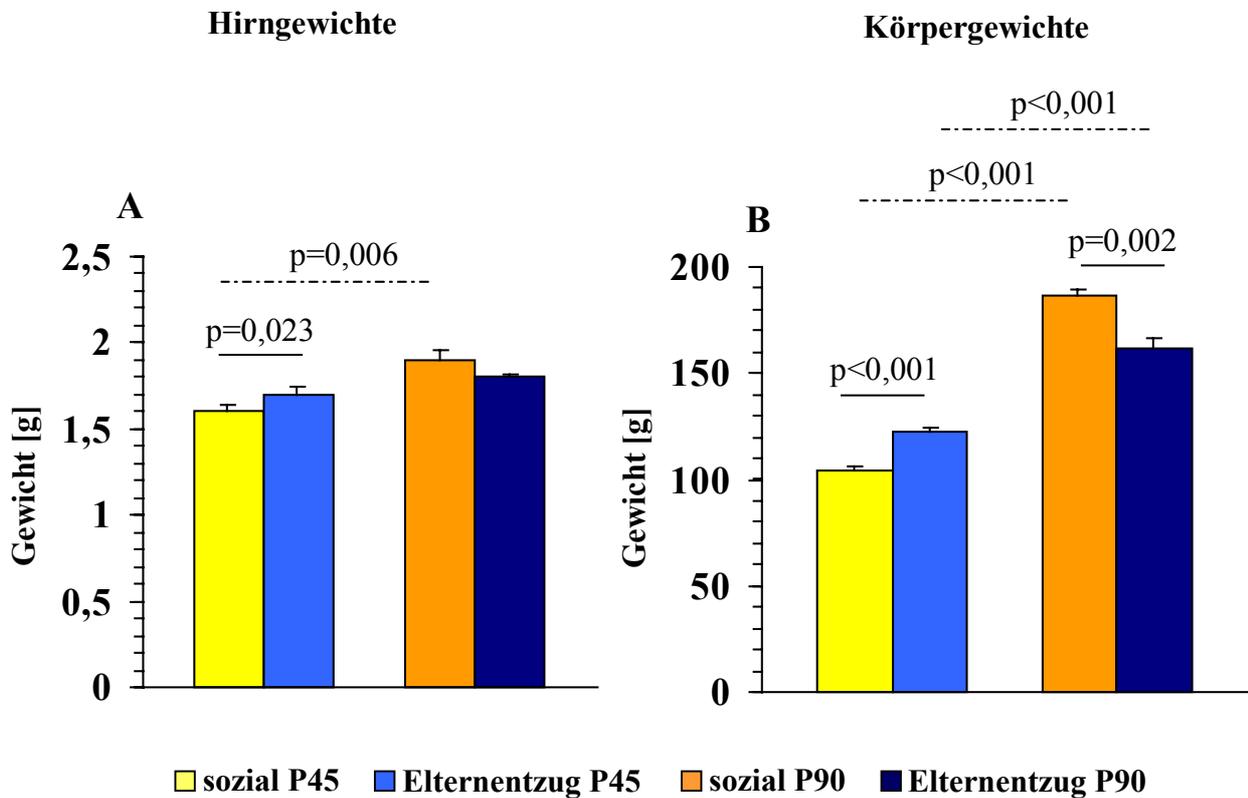


Abb. 34. Entwicklung von (A) Hirn- und (B) Körpergewichten sozialer und separierter Tiere. Angegeben sind Mittelwerte und Standardfehler, sowie die P-Werte des paarweisen Vergleichs mittels Mann-Whitney U-Test.

## IV. Diskussion

### 1. Postnatale Entwicklung dendritischer Spines und ihre Beeinflussung durch frühkindliche Erfahrungsprozesse

#### 1.1. Postnatale Entwicklung dendritischer Spines im anterioren cingulären Cortex

Ein Ziel der vorliegenden Arbeit war es zu klären, welche morphologischen Veränderungen der Schicht-II/III Pyramidenzellen des ACd im Verlaufe der frühkindlichen Entwicklung von *Octodon degus* auftreten. Es gelang in dieser Studie erstmals, einen Anstieg und eine spätere Reduktion der Spinedichte bei einem Nagetier nachzuweisen. Die zwischen dem 21. und 45. Tag beobachtete Verringerung der Spinedichten ist vermutlich u.a. auch das Resultat verlängerter Dendriten und nicht ausschließlich die Folge eines Spine-Abbaus. Auch im ACd von Ratten wurde die stärkste Zunahme der Spinedichte zwischen dem 10. und dem 20. Postnataltag beschrieben, während die stärkste Zunahme des dendritischen Wachstums, wie bei Degus, bis zum 14. Lebenstag erfolgte (Schönheit & Haensel, 1988).

Synaptische Eliminierungsprozesse sind neben der Synapsenneubildung ein grundlegendes Prinzip bei der erfahrungsgesteuerten funktionellen Reifung neuronaler Netzwerke (Scheich 1987; Segal 2001). Sie wurden z.B. in diversen Hirnarealen von Primaten im Verlaufe der frühkindlichen Entwicklung gefunden (Huttenlocher 1984; Bourgeois & Rakic, 1993). Die funktionelle Bedeutung scheint dabei darin zu liegen, durch eine initiale Überproduktion jede der vorgesehenen Zielzellen zunächst mit Kontakten zu versorgen. Das Überangebot an Synapsen wird schließlich während der Entwicklung auf die relevanten Verbindungen reduziert, und zwar werden diejenigen erhalten, welche durch Stimulation mit relevanten Umweltreizen stabilisiert worden sind (Changeux & Danchin, 1976; Lohof et al., 1996). Quantitative elektronenmikroskopische Untersuchungen der Synapsendichte während der postnatalen Entwicklung von Affen zeigten in präfrontalen, visuellen, somatosensorischen und motorischen Cortices einen Anstieg der Synapsenzahl bis einige Monate nach der Geburt, gefolgt von einer Plateauphase bis zum dritten Lebensjahr und einer Abnahme der Synapsendichte in der Pubertät bis ins Erwachsenenalter von vier Jahren (Rakic et al., 1986; Zecevic et al., 1989; Bourgeois & Rakic, 1993). Auch bei Menschen wurde in verschiedenen Hirnarealen eine initiale Synaptogenese, gefolgt von einer Reduktion synaptischer Verbindungen beobachtet (Huttenlocher 1979; 1984; Huttenlocher & de Courten, 1987).

Studien am Cortex von Nagern, wie der Ratte, zeigen postnatal einen Anstieg der synaptischen Verbindungen während der ersten Lebenswochen (Adams & Jones, 1982; Markus et al., 1987), jedoch ohne anschließende Synapsenreduktion. Diese trat erst bei alten Tieren (17 Monate) auf (Adams & Jones, 1982). Eine selektive Eliminierung nichtrelevanter Verbindungen und eine zeitgleiche Neubildung relevanter Verbindungen ist jedoch bei der Nagerentwicklung nicht auszuschließen, denn Auf- und Abbau der Spines laufen viel dynamischer ab (Segal 2001) als bisher angenommen wurde. Diese gegenläufigen, vermutlich immer parallel, d.h. zeitgleich ablaufenden Prozesse könnten eine messbare Änderung der Spinedichte verhindern.

## **1.2. Einfluss einer reizarmen Umgebung auf die Entwicklung dendritischer Spines im anterioren cingulären Cortex**

Eine Form von Umweltdeprivation besteht in der Aufzucht in kleinen, reizarmen Käfigen, wie sie in Tierversuchslaboren Standard sind. Ich konnte zeigen, dass ein ungestörtes Aufwachsen in kleinen Standardkäfigen im Gegensatz zum Aufwachsen in großen Volieren, welche eine komplexere Umgebung bieten, am Postnataltag 21 zu höheren Spinedichten im ACd dieser Tiere führt. Die kürzeren Dendritenlängen der in einer reizarmen Umgebung aufgewachsenen Tiere könnten u.a. zu den höheren Spinedichten beitragen. Diese Befunde zeigen, dass die Komplexität der frühkindlichen Umwelt die Entwicklung der Schicht-II/III Pyramidenzellen in einer limbischen corticalen Region moduliert. Sie indizieren eine umwelt- und aktivitätsinduzierte verstärkte Spinebildung während der ersten drei Lebenswochen und/oder, dass der möglicherweise gleichzeitig ablaufende Spineabbau in diesem assoziativen Hirngebiet durch fehlende Umweltreize unterdrückt wird. Frühere Studien (Bock & Braun, 1998) haben gezeigt, dass das Fehlen entsprechender Umweltreize einem selektiven Spineabbau in assoziativen Vorderhirnarealen entgegenwirkt.

Im limbischen ACd scheint eine reizarme Umgebung im Vergleich zu sensorischen Hirnarealen genau gegensätzliche Auswirkungen auf die Entwicklung der Spinedichten zu haben, auf die Entwicklung der Dendriten jedoch ähnliche Effekte: Nach somatosensorischer und motorischer Deprivation in einer reizarmen Umgebung wurden geringere Spinedichten bei Schicht-III Pyramidenzellen somatosensorischer und motorischer Regionen von Affen gefunden (Bryan & Riesen, 1989). Im motorischen Cortex wurden bei sozialdepriviert

aufgewachsenen Affen im Alter von sechs Monaten bei nicht-spinetragenden Neuronen reduzierte dendritische Verzweigungsmuster nachgewiesen (Struble & Riesen, 1978).

Das Aufwachsen in einer komplexen Umgebung führt in sensorischen Regionen zu höheren Spinedichten und längeren Dendritenbäumen, wie im occipitalen Cortex (Volkmar & Greenough, 1972; Diamond et al., 1975; Turner & Greenough, 1985; Rosenzeig & Bennett, 1996), im medialen präoptischen Areal (Sanchez Toscano et al., 1991) und im Striatum (Comery et al., 1995; 1996) von Ratten gezeigt wurde.

Insgesamt lassen sich diese Studien jedoch nur bedingt mit den vorliegenden Ergebnissen vergleichen, da das Aussetzen in eine reizarme bzw. komplexe Umgebung meist zum Zeitpunkt der Entwöhnung von der Mutter stattfand und nicht während der frühkindlichen Entwicklung. Möglicherweise lassen sich die Auswirkungen veränderter Umweltreize in sensorischen und motorischen Regionen auch erst während der späteren Entwicklung induzieren, denn im somatosensorischen Cortex der von mir untersuchten Tiere fand sich kein Unterschied zwischen den in einer reizarmen Umgebung und den in einer komplexeren Umgebung aufgewachsenen Tieren (Abraham, *unveröffentlichte Ergebnisse*).

### **1.3. Einfluss von wiederholtem kurzzeitigem Elternentzug auf die Entwicklung dendritischer Spines im anterioren cingulären Cortex**

Die wiederholte kurzzeitige Separation von den Eltern und Geschwistern induziert einen Anstieg der Spinedichten, jedoch keine Veränderung der Dendritenlängen von Schicht-II/III Pyramidenzellen im ACd. Dieses Ergebnis untermauert unsere Arbeitshypothese, dass frühkindliche sozio-emotionale Erfahrungen die Entwicklung der synaptischen Architektur in limbischen corticalen Regionen beeinflussen. Darüber hinaus zeigen diese Befunde an 21tägigen Tieren, dass die synaptischen Veränderungen relativ schnell vonstatten gehen. Da die hier am Postnataltag 21 gemessene Spinerhöhung bei separierten Tieren selbst noch nach dreiwöchiger ungestörter Haltung in der Familie am Postnataltag 45 (Pubertät) nachgewiesen werden kann (Helmeke et al., 2001a,b), handelt es sich offenbar um einen relativ stabilen Effekt.

Bisher ist unklar, welche Auswirkungen wiederholter Elternentzug und die hier beschriebenen, resultierenden neuromorphologischen Veränderungen auf das spätere Verhalten und die kognitiven Leistungen von Degus haben. Verhaltensänderungen, einschließlich emotionaler und kognitiver Veränderungen, sind zu erwarten, da auch in

anderen limbischen Regionen separationsinduzierte Veränderungen gemessen wurden (Braun et al., 2002, *Abstract*). Diesbezüglich werden zur Zeit Verhaltensexperimente an Degus durchgeführt, welche notwendig sind, um eine Aussage im Hinblick auf positive oder negative Auswirkungen frühkindlicher, kurzzeitiger Separationen und den nachgewiesenen Veränderungen im ACd stellen zu können. Acht Tage alte Degujungen, welche während der ersten Woche wiederholt kurzzeitig (eine Stunde) separiert wurden, zeigten ähnliche Verhaltensänderungen, z.B. eine hohe Explorations- und Aufrichtungsrate (Braun et al., 2003) wie Jungtiere von Müttern mit starkem Pflegeverhalten (Francis & Meaney, 1999). Diese Ergebnisse sind jedoch zum einen wegen des unterschiedlichen Zeitfensters und zum anderen wegen verschiedener Interpretationen in Bezug auf erhöhtes Explorationsverhalten (Denenberg 1969; Liebsch et al., 1998; Escorihuela et al., 1999) diskrepant.

Vor allem bei Ratten, die im Gegensatz zu Degus unter Laborbedingungen stets ohne Vater aufwachsen, wurden in einer Vielzahl von Studien die Auswirkungen von Mutterentzug auf die Endokrinologie und das Verhalten von Jungtieren (Hall 1998) untersucht. Unterschiedliche Paradigmen wie z.B. die Dauer der Separation und die Art der Separation (Hall 1998) erschweren jedoch den Vergleich zu den vorliegenden Ergebnissen: Die Bezeichnung „Maternal Separation“ wird in unzähligen Arbeiten sowohl für die Separation der Jungtiere von der Mutter als auch für die Separation eines Jungtieres von der Mutter und den Geschwistern verwendet. Außerdem variiert die Länge der Separation beträchtlich zwischen den verschiedenen experimentellen Studien. Eine einmalige 24stündige Separation wird ebenso als „frühzeitiger Mutterentzug“ definiert, wie täglich stattfindende Separationen, die wiederum je 15 Minuten, eine Stunde oder drei bis sechs Stunden andauern können. Dementsprechend verschieden sind auch die Folgen von kurzzeitigem (15 Minuten) und langfristigem (3-6 Stunden) Mutterentzug, wobei hier auch wieder zwischen den akuten und den Spätfolgen unterschieden werden muss.

### 1.3.1. Positive Auswirkungen erfahrungsinduzierter Veränderungen dendritischer Spines

*Bindungsverhalten zwischen Eltern und ihren Kindern wird nicht durch das Ausmaß der gemeinsamen Interaktion, sondern durch deren Qualität bestimmt (Blanz et al., 1986).*

Einige Studien belegen, dass kurzzeitige Separationen durchaus positive Effekte auf das sich entwickelnde Individuum haben können, wenn das Pflegeverhalten der Mutter positiv beeinflusst wurde. Eine starke ‚Bemutterung‘ der Jungtiere nach dem Zurücksetzen im Anschluss an die Separation, wie sie z.B. bei Ratten beschrieben wurde (Pryce et al., 2001), könnte die Ursache für die höheren Spinedichten der wiederholt kurzzeitigem Elterntzug ausgesetzten Degus sein und nicht oder nicht ausschließlich die tägliche einstündige Separation. Erste Beobachtungen an elternseparierten *Octodon degus* weisen auf einen erhöhten sozialen Kontakt zwischen dem väterlichen Tier und in geringerer Ausprägung auch zwischen der Mutter und zwischen den Geschwistern hin (Becker et al., 2003, *Abstract*). Somit ist auch bei Degus keinesfalls auszuschließen, dass erhöhter Sozialkontakt durch die Eltern, welchen die Jungtiere nach ihrer kurzzeitigen Separation erfahren haben könnten, die Effekte des traumatischen Separationserlebnisses reduziert oder kompensiert und seinerseits zusätzlich positive Auswirkungen ausübt, die zu einer verstärkten Spinebildung im ACd führen. In dieser Region, welche in die sozio-emotionale Kommunikation zwischen Eltern- und Jungtieren involviert ist (Poeggel & Braun, 1996), wäre das nicht verwunderlich. Die erhöhten Spinedichten im ACd separierter Degus wären in diesem Fall nicht die Folgen einer unkontrollierten Synaptogenese, sondern ließen sich als eine den Anforderungen angepasste, komplexere Reifung der Pyramidenzellen, induziert durch erhöhten sozio-emotionalen Input und den damit verbundenen Lern- und Erfahrungsprozessen interpretieren.

Diese Hypothese initiiert weitere Überlegungen, welche den Unterschied in den Spinedichten, gefunden zwischen Käfig- und Volieretieren erklären könnten. Möglicherweise führen nicht die Einflüsse einer komplexeren Umgebung zu den geringeren Spinedichten bei Volieretieren, sondern weniger soziale Kontakte zwischen Eltern- und Jungtieren. Es ist durchaus denkbar, dass sich die Tiere in der größeren Voliere besser ‚aus dem Weg gehen‘ können und weniger ‚Bemutterung‘ durch die Eltern stattfindet.

Bei Menschen ist erwiesen, dass adäquate elterliche Pflege die kognitive Entwicklung von Kindern begünstigt (Bowlby 1977; Suomi 1997).

Adäquates Mutterverhalten scheint ein bedeutender Faktor zu sein, welcher Langzeitauswirkungen auf das Verhalten und die physiologischen Funktionen der Nachkommen hat (Smotherman 1977). Diese früh erhobene Theorie wurde inzwischen von zahlreichen Studien an Menschen und Tieren belegt: So ist bekannt, dass mütterliche Pflege die Hauptquelle taktiler Stimulation für das sich entwickelnde Jungtier bildet und sich sowohl auf das körperliche Wachstum als auch auf die neuronale Reifung auswirkt (Schanberg & Field, 1987; Levine 1994; Suomi 1997). Die Auswirkungen von langanhaltendem Mutterentzug (täglich 3-6 Stunden), sind u.a. reduzierte Wachstumshormonlevel, erhöhte Spiegel katabolischer adrenaler Glucocorticoide und reduzierte BDNF-Expression (Kuhn et al., 1990; Roceri et al., 2002). Diese Veränderungen können durch Streicheln der separierten Jungtiere mit weichen Haarpinseln - eine Imitation der taktilen Stimulation durch die Mutter - verhindert werden (van Oers et al., 1998).

Mütter kurzzeitig (täglich 15 Minuten) separierter Jungtiere verbringen genauso viel Zeit mit ihnen wie die Kontrollmütter, weisen aber ein stärkeres Pflegeverhalten auf (Liu et al., 1997). Eine weitere Studie bestätigte, dass sich infolge täglicher 15minütiger Separation junger Ratten zwischen dem 1. und dem 12. Lebenstag, das Pflegeverhalten der Mütter insgesamt erhöhte. Nach einer zeitgleich stattfindenden vierstündigen Separation stieg die Bemutterung lediglich kurz nach dem Zurücksetzen der Jungtiere, aber nicht dauernd an (Pryce et al., 2001).

Bei Ratten und Mäusen reduziert eine tägliche kurzzeitige Separation (3-15 Minuten) in den ersten Lebenswochen endokrine Funktionen und Verhaltensreaktionen auf Stress im adulten Alter (Meaney et al., 1996). In einer vergleichenden Studie an Rattenjungen zeigte sich, dass eine tägliche 15minütige Separation die gleichen Folgen für das Jungtier hervorruft wie ein ungestörtes Aufgewachsen bei Müttern, welche ein überdurchschnittlich hohes Pflegeverhalten aufwiesen: Die Nachkommen beider Versuchsgruppen hatten im Erwachsenenalter geringere ACTH- und Corticosteron- Antworten auf Stress als ungestört aufgewachsene Ratten von Müttern mit durchschnittlichem oder geringen Pflegeverhalten (Francis & Meaney, 1999).

Liu et al. 2000 postulierten, dass mütterliches Verhalten aktiv die hippocampale Synaptogenese stimuliert und zwar durch Systeme, welche die erfahrungsabhängige neurale Entwicklung steuern: Jungtiere von Müttern mit hohem Pflegeverhalten wiesen am 8. und am

90. Postnataltag einen Anstieg von NMDA-Rezeptoren, BDNF mRNA, Synaptophysin und damit der hippocampalen Synaptogenese, der cholinergen Innervation des Hippocampus und schließlich besseres räumliches Lernen und ein besseres Gedächtnis als Jungtiere von Müttern mit geringem Pflegeverhalten auf.

Inwieweit sich diese Ergebnisse auf die limbischen Areale junger Degus, die zwar auch nur kurzzeitige, aber einstündige Separationen erfahren und eine erhöhte Synaptogenese im ACd (vorliegende Arbeit), sowie in der CA-1 Region des Hippocampus unter Verwendung der 21tägigen Tiere dieser Arbeit (Braun et al., 2002, *Abstract*) haben, übertragen lassen, bedarf weiterer, vor allem Verhaltensuntersuchungen. Diese könnten überprüfen, ob eine tägliche einstündige Separation der Jungtiere zu erhöhtem elterlichen Pflegeaufwand und wenn ja welchen Ausmaßes führt. Erste Resultate verstärkter sozialer Kontakte des Vatertieres zu den zurückgesetzten Jungen (Becker et al., 2003, *Abstract*) wurden schon erwähnt. Eine Studie an Ratten, die ähnlich wie in dieser Studie in den ersten Lebenswochen täglich eine Stunde separiert wurden und erhöhte Spinedichten im ACd aufwiesen (Braun & Bock, 2000, *Abstract*) und die geringeren Spinedichten der vaterlosen Degus, welche weniger elterliche Pflege erfuhren, bestärken die Vermutung, dass erhöhte elterliche Pflege zu den beobachteten Veränderungen im ACd kurzzeitig separierter Degus führt.

### **1.3.2. Negative Auswirkungen erfahrungsinduzierter Veränderungen dendritischer Spines**

Mit der Ausbildung der ersten sozio-emotionalen Bindung zur Mutter bzw. Mutterattrappe (Filialprägung) kommt es in einer lernrelevanten, assoziativen Vorderhirnregion bei Haushuhnküken zu einer Abnahme der Spinedichte, und zwar durch die selektive Eliminierung nichtrelevanter Verbindungen (Bock & Braun, 1998). Das heißt, nicht nur der Aufbau von Spines, sondern auch der Abbau von Spines wird von emotionalen Umweltreizen moduliert. Für einen optimalen Verlauf des synaptischen Selektionsprozesses ist ein adäquates Reizangebot von essenzieller Bedeutung. Unterbleibt diese Umweltstimulation, so erfolgt keine synaptische Umstrukturierung des neuronalen Netzwerkes, reizdepriviert aufgezogene Haushuhnküken besitzen erhöhte Synapsendichten in einem, dem PFC analogen, lernrelevanten Vorderhirngebiet (Wallhäußer & Scheich, 1987; Bock & Braun, 1998).

Die wiederholt stattfindende Unterbrechung des sozio-emotionalen Kontaktes junger Degus zu ihren Eltern könnte somit auch eine Störung der neuronalen Entwicklung bedingen, welche

die für eine Spezifizierung der synaptischen Verschaltungen notwendige Synapseneliminierung blockiert. Eine „unkontrollierte“ Spinebildung bzw. ein unterdrückter Spineabbau könnte den beobachteten erhöhten Spinedichten zugrunde liegen.

Je nach Hirnregion, Form, Zeitraum und Dauer der Deprivation können diese synaptischen Selektionsprozesse jedoch in ganz unterschiedliche Richtungen laufen. So besitzen Neurone im motorischen bzw. sensorischen Cortex von depriviert aufgewachsenen Ratten und Affen weniger Synapsen und dendritische Verzweigungen als Tiere, die in einer abwechslungsreichen Umgebung aufwuchsen (Globus et al., 1973; Struble & Riesen, 1978; Sirevaag & Greenough, 1988). Bei frühkindlich deprivierten Ratten zeigte sich in der dorsomedialen Amygdala eine Verminderung der perforierten Synapsen und der Länge der synaptischen Kontaktzonen (Ichikawa et al., 1993). Solche regionsspezifischen veränderten Verschaltungsmuster innerhalb des limbischen Systems könnten die für eine normale Verhaltensentwicklung notwendige koordinierte Interaktion zwischen diesen Regionen dauerhaft stören (Braun & Bogerts, 2001). Sensorische Deprivation beim erwachsenen Versuchstier zeigt dagegen auch nach einer Dauer von mehreren Wochen eine vergleichsweise nur sehr geringe Beeinträchtigung.

Die wiederholte Separation von den Eltern und Geschwistern führt bei *Octodon degus* in noch weiteren limbischen Arealen zu synaptischen Veränderungen: Analog zu den erhöhten Spinedichten im ACd 21tägiger und 45tägiger frühkindlich separierter Tiere (Helmeke et al., 2001a,b) zeigten sich in einer weiteren präfrontalen Region, dem infralimbischen Cortex, höhere Dichten von Spine- und Schaftsynapsen (Ovtscharoff Jr. & Braun, 2001). Im Hippocampus wurden bei den 21tägigen Tieren aus dieser Studie nach Separation erhöhte Spinedichten in der CA-1 Region und geringere Spinedichten im Gyrus dentatus gefunden (Braun et al., 2002, *Abstract*). Dagegen wurden in einer nicht-limbischen Region, dem somatosensorischen Cortex, keine Veränderungen der Spinedichten wiederholt kurzzeitig separierter 21tägiger *Octodon degus*, welche in der vorliegenden Arbeit untersucht wurden, festgestellt (Abraham et al., 2003, *Abstract*).

Es gibt erste Hinweise dafür, dass Störungen solcher synaptischer Umstrukturierungen im Verlauf der postnatalen Hirnentwicklung eine der Ursachen für bestimmte psychische Erkrankungen, z.B. für neurotische, depressive und dissoziale Entwicklungen sein könnten (Bogerts 1996). Feinberg (1982-83) postulierte eine gestörte perinatale Synapsenselektion als eine denkbare Ursache für Schizophrenie, dagegen sprechen jedoch die geringeren Spinedichten im dorsolateralen präfrontalen Cortex von Schizophreniepatienten (Glantz & Lewis, 2000). Auch muss die vor allem aus den chronischen Deprivationsstudien stammende

Interpretation, dass das Vorhandensein von vielen Synapsen sich positiv auf die intellektuellen und psychosozialen Kapazitäten auswirkt, revidiert und differenzierter betrachtet werden. Beispielsweise finden sich beim Fragilen X Syndrom sowohl abnormal erhöhte Spinedichten, als auch Veränderungen ihrer Form und Größe (Comery et al., 1997; Nimchinsky et al., 2001). Auch im ACd manisch depressiver Patienten ließ sich eine erhöhte Dichte von Spinesynapsen feststellen (Aganova & Uranova, 1990). Bei der Pathogenese verschiedener psychischer Erkrankungen werden prä- und/oder postnatale Schädigungen bzw. Fehlentwicklungen der Emotionsschaltkreise, insbesondere der Kerngebiete des mesolimbischen corticalen Systems diskutiert (Maeda 1994). Die Mechanismen, die bei früh psychosozial induzierten Erkrankungen, wie z.B. bestimmte Depressionsformen, zu solchen fehlerhaften synaptischen Verschaltungen führen, könnten den Prinzipien der synaptischen Selektion folgen, deren normaler oder pathologischer Verlauf durch verschiedene exogene und endogene Faktoren während der Individualentwicklung reguliert wird.

Frühkindlicher Mutterentzug ist ein etabliertes Tiermodell für Depression, da dessen Auswirkungen mit den Eigenschaften verschiedener Depressionsformen in Verbindung gebracht werden können (Lehmann & Feldon, 2000). Mutterentzug induziert bei Jungtieren physiologische, endokrine, metabolische, neurochemische und Verhaltensänderungen, welche nicht das Resultat sensorischer Deprivation, sondern sozio-emotionaler Deprivation in Kombination mit emotionalem Stress zu sein scheinen (Hofer 1994). Die Separation von der Familie und das Aussetzen in eine fremde Umgebung repräsentieren eine traumatische Erfahrung für das Jungtier und eine Vielzahl von Studien indiziert, dass früher Mutterentzug negative Auswirkungen auf die Entwicklung des Verhaltens und auf physiologische Funktionen hat (Hofer 1975; 1987; Trause et al., 1981; Kalin et al., 1987; Bowlby 1988; Kuhn et al., 1990; Levine et al., 1993). Insbesondere langzeitiger Mutterentzug (täglich 3-6 Stunden) scheint irreversible pathologische Auswirkungen auf die Entwicklung und das spätere Verhalten der Tiere zu haben. Dementsprechend unterschiedlich sind die Folgen kurzzeitiger und langanhaltender Separationen: Bei Ratten und Mäusen reduzieren tägliche kurzzeitige Separationen (3-15 Minuten) in den ersten Lebenswochen endokrine und Verhaltensreaktionen auf Stress im adulten Alter (Meaney et al., 1996). Dagegen führen länger währende Separationen (täglich 3-6 Stunden) zu erhöhten endokrinen und Verhaltensreaktionen auf Stress (Plotsky & Meaney, 1993; van Oers et al., 1998). Diese Effekte langanhaltender Separationen während bestimmter Phasen der frühkindlichen Entwicklung bleiben zeitlebens erhalten und sind mit einer anfälligen Gesundheit in Stresssituationen assoziiert (Meaney et al., 1988; Laban et al., 1995; Bhatnagar et al., 1996).

Auch das Suchtverhalten ändert sich langfristig nach frühkindlichem Mutterentzug: Erwachsene Ratten, welche in den ersten zwei Lebenswochen täglich drei Stunden von der Mutter separiert wurden, zeigen eine höhere Präferenz zum Alkoholkonsum als nichtseparierte bzw. kurzzeitig (täglich 15 Minuten) separierte Ratten (Huot et al., 2001). Inwieweit sich diese Auswirkungen langzeitigen Mutterentzugs bei Ratten auf die wiederholte einstündige Elternseparation junger Degus übertragen lassen, muss in weiteren, vor allem Verhaltensversuchen geklärt werden.

#### **1.4. Einfluss des Vaters auf die Entwicklung dendritischer Spines im anterioren cingulären Cortex**

Wie in dieser Arbeit gezeigt wurde, induziert wiederholter Elterntzug beim sich entwickelnden Jungtier eine erhöhte Anzahl spinesynaptischer Verbindungen im ACd. Eine folgerichtige Frage war nun, was passiert während der Entwicklung des Gehirns, wenn nur ein Elternteil, der Vater, und zwar nicht nur kurzzeitig, sondern chronisch fehlt? In der vorliegenden Arbeit wurde zum ersten Mal gezeigt, dass sich das Fehlen des Vaters bei der „Erziehung“ der Jungtiere signifikant auf die synaptische Entwicklung im ACd auswirkt (Helmeke et al., 2002, *Abstract*): Das Fehlen des Vaters bei der Aufzucht der Jungtiere führte zu geringeren Spinedichten im ACd. Dieses Ergebnis bestätigt wiederholt die Empfänglichkeit des dorsalen anterioren cingulären Cortex, als Teil des limbischen Systems, für emotionale Umwelteinflüsse während früher Phasen der Hirnentwicklung. Wie schon zuvor zitiert wurde, spielt die synaptische Umgestaltung des corticalen Netzwerkes eine Schlüsselrolle bei der durch Umwelteinflüsse regulierten Spezialisierung der neuronalen Verbindungen (Huttenlocher 1979; Bourgeois & Rakic, 1993; Granger et al., 1995; Webb et al., 2001). Als Antwort auf die verminderten Sozialkontakte, die bei Jungtieren ohne Vater stattfinden, scheint das sich entwickelnde Gehirn mit unterdrückter Synapsenproliferation zu reagieren, also weniger exzitatorische neuronale Verbindungen, weniger Spines zu bilden.

Die Interaktion zwischen dem Vater und seinen Nachkommen ist bereits gut untersucht bei der Tierart *Octodon degus*. Diese Spezies ist charakterisiert durch komplexe Familien- und Sozialstrukturen, sowie ein vielfältiges Spielverhalten (Wilson 1982), und es wurde beschrieben, dass die männlichen Elternteile zu einem Großteil an der Erziehung der Jungen beteiligt sind (Reynolds & Wright, 1979; Wilson 1982). Darüber hinaus stellte Wilson in ihrer Studie von 1982 sogar fest, dass der Kontakt der Mutter zu den Jungtieren postnatal abnimmt,

während der des Vaters zunimmt, und dieser sich doppelt so oft mit den Jungtieren beschäftigt wie die Mutter. Ebenso wurde dies bei der California mouse gezeigt (Wright & Brown, 2002). Auch bei Menschen nimmt die erzieherische Bedeutung des Vaters mit dem Alter des Kindes zu (Blanz et al., 1986).

Die fehlenden Sozialkontakte, insbesondere die Verhaltensweisen, die nur der Vater vermittelt, nicht aber die Mutter, könnten ausschlaggebend für die Veränderungen im somatosensorischen Cortex von *Octodon degus* sein: Chronischer Vaterentzug führte auch in dieser Region zu signifikant geringeren Spinedichten (Abraham, *unveröffentlichte Ergebnisse*), während bei den wiederholt elternseparierten Tieren im somatosensorischen Cortex kein Unterschied gefunden wurde (Abraham et al., 2003, *Abstract*).

Der Kontakt, den Deguväter zu ihren Jungtieren haben, beinhaltet nicht nur die Pflege der Jungtiere, sondern umfasst auch ein ausgeprägtes und vielfältiges Spielverhalten zwischen den Vätern und den Jungen (Reynolds & Wright, 1979). Untersuchungen aus unserer eigenen Arbeitsgruppe bestätigen diese Beobachtungen (Becker et al., 2003, *Abstract*). Deguväter sorgen also für eine komplexe sensorische und emotionale Stimulation bei ihren Jungen und tragen damit im Prinzip auch zu einer komplexen vielfältigen sozialen Umgebung, welche von den Jungen wahrgenommen wird, bei. Denkt man einen Schritt weiter, liegt es auf der Hand, dass das Fehlen des Vaters dazu führt, dass die Jungtiere weniger Pflege erhalten, bei Mäusen wurde dies inzwischen bewiesen (Wright & Brown, 2000; Bredy et al., 2002, *Abstract*), und somit im Vergleich zu Jungtieren, welche von beiden Elternteilen erzogen werden, sowohl sensorisch als auch emotional gewissermaßen depriviert sind. Bei diesen Überlegungen möchte ich nicht vergessen darauf hinzuweisen, dass bisher nicht bekannt ist, in welchem Ausmaß die Mutter durch das Fehlen des Partners beeinflusst oder gar gestresst wird. Dies wird derzeit in unserer Arbeitsgruppe untersucht. Veränderungen des Brutpflegeverhaltens der Mutter könnten auch zu den beobachteten Veränderungen beitragen.

Eine Beteiligung des Vaters an der Erziehung der Jungtiere, wie sie auch bei einigen anderen Tierarten wie z.B. der California mouse (Trainor & Marler, 2001) und Präriemäusen (Lonstein & De Vries, 1999) beobachtet wird, erhöht die Pflege die den Jungen zuteil wird und entlastet möglicherweise auch die Mutter (Wright & Brown, 2000). Kürzlich zeigte eine Studie an der California mouse einen Zusammenhang zwischen dem Fehlen des Vaters bei der Aufzucht der Jungen und deren späterer Leistungsfähigkeit räumliches Lernen und Objekterkennung betreffend (Bredy et al., 2002, *Abstract*). So erhöht sich normalerweise bei gehandelten Jungtieren (Handling = täglich 15 Minuten Separation) die Fähigkeit zu

räumlichen Lernen und Objekterkennung (Liu et al., 2000). Bei männlichen Jungtieren, welche ohne Vater aufwuchsen, wurde dieser Effekt nicht beobachtet. Weibliche Jungtiere, welche ohne Vater aufwuchsen, zeigten interessanterweise ein ähnlich gutes räumliches Lernvermögen wie gehändelte weibliche Jungtiere. Dies könnte das Resultat einer stärkeren Bemutterung der weiblichen Jungtiere während des Aufwachsens ohne Vater sein (Bredy et al., 2002, *Abstract*).

Beobachtungen an Menschen bewiesen, dass vaterlos aufgewachsene Kinder Defizite im Bereich der sozialen Fähigkeiten aufweisen (Blanz et al., 1986). Eine epidemiologische Studie an 8 und 13jährigen Kindern zeigte, dass Knaben, welche ohne Vater aufwuchsen, signifikant häufiger psychisch auffällig werden. Bei Mädchen wurde in dieser Beziehung kein Unterschied gefunden.

Weitere klinische Studien an Menschen fanden eine Korrelation zwischen dem Fehlen eines Elternteils und der Entwicklung von Verhaltensstörungen, Depression (Bifulco et al., 1987), Alkoholismus (Tennant & Bernardi, 1988), Schizophrenie (Furukawa et al., 1998) und Persönlichkeitsstörungen (Paris et al., 1994).

## **2. Beteiligung des serotonergen Systems an den separationsinduzierten Veränderungen dendritischer Spines**

Bezüglich einer Beteiligung des serotonergen Systems an Lern- und Erfahrungsprozessen während der frühkindlichen Entwicklung sind aus der Literatur einige, wenn auch bisher diskrepante Ergebnisse bekannt: So beobachteten einige Studien eine Hochregulation dieses neuromodulatorischen Transmitters bzw. seiner Metabolite (Spear & Scalzo, 1985; Bickerdike et al., 1993) andere den gegenteiligen Effekt (Andersen et al., 1999; Heinz 1999) nach bzw. während akuter und chronischer Sozialdeprivation. Ratten, welche in der frühen Kindheit wiederholt kurzzeitig separiert wurden, zeigen einen erhöhten Serotoninumsatz und geringere Serotoninkonzentrationen im Hippocampus und im frontalen Cortex (Smythe et al., 1994). Die Gabe von 5-HT<sub>1A</sub>-Agonisten vor der Separation reduziert die Ultraschalllaute (quantifizierbares Maß für Stress/Angst) von Rattenjungen (Fish et al., 2000). Eine Vielzahl von Studien hat gezeigt, dass Stress bzw. eine Aktivierung des HPA-Achsen-Systems, wie sie z.B. während des Mutterentzuges auftritt, das serotonerge System modulieren kann. Beispielsweise führt die chronische Gabe externer Corticosteroide oder synthetischer Glucocorticoide bei erwachsenen Ratten zu Veränderungen der Konzentrationen spezifischer

5-HT-Rezeptoren, inklusive der 5-HT<sub>1A</sub>-Rezeptoren im Gehirn (Lopez et al., 1997). Langzeitiger Mutterentzug (einmal 24 Stunden) in den ersten zwei Lebenswochen von Ratten, welcher eine Aktivierung des HPA-Achsen-Systems induziert (Pihoker et al., 1993; Vazquez et al., 2000), führte schon 24 Stunden nach dem Ende der Separation zu erhöhten Konzentrationen von 5-HT<sub>1A</sub>- und 5-HT<sub>2A</sub> mRNA in der CA-1 Region des Hippocampus und im parietalen Cortex (Vazquez et al., 2000).

Eine stressinduzierte Modulation des serotonergen Systems könnte eine Rolle bei den synaptischen Veränderungen spielen, die bei den elternseparierten Degus dieser Studie nachgewiesen wurden. Tatsächlich konnte ich in dieser Arbeit erstmalig nachweisen, dass die verstärkte Spinebildung, welche als Folge kurzzeitiger Separation im ACd gefunden wurde, durch die Gabe des 5-HT<sub>1A</sub>-Antagonisten Way-100635 verhindert wird. Wiederholte kurzzeitige Separation in der zweiten Postnatalwoche führt bei Degus zu einer erhöhten Dichte von 5-HT<sub>1A</sub>-Rezeptoren im Hippocampus (Ziabreva et al., 2003b) und im Präfrontalcortex einschließlich des ACds (Ziabreva et al., 2003a). Diese separationsinduzierte Hochregulation der 5-HT<sub>1A</sub>-Rezeptoren könnte die trophische Wirkung von Serotonin auf die Synaptogenese verstärken, und zwar möglicherweise direkt über die 5-HT<sub>1A</sub>-Rezeptoren, die auf den Zellkörpern von Pyramidenzellen (Aznar et al., 2003) lokalisiert sind. Durch die pharmakologische Blockade der 5-HT<sub>1A</sub>-Rezeptoren während der Separation wird dieser serotonerge stimulatorische Effekt auf die Spinebildung blockiert.

Wegen seiner trophischen Wirkung auf die neuronale Proliferation (Lauder et al., 1981), sowie auf die Synapsenentwicklung (Lauder & Krebs, 1978; Lipton & Kater, 1989; Vu & Törk, 1992; Whitaker-Azmitia & Azmitia, 1994), vor allem während der frühen Hirnentwicklung, könnte Serotonin die Ausbildung und Stabilisierung von synaptischen Verbindungen innerhalb der limbischen Schaltkreise beeinflussen. Experimente an Zellkulturen (neuronales Embryonengewebe) haben bereits gezeigt, dass 5-HT die Synapsenbildung im Hippocampus und im cerebralen Cortex fördern (Chubakov et al., 1986) oder hemmen (Haydon et al., 1984) kann. Im Gyrus dentatus von Ratten, welche während der zweiten Postnatalwoche täglich mit PCA (Parachloramphetamin, senkt den Serotoninspiegel) bzw. mit dem 5-HT<sub>1A</sub>-Rezeptor-Antagonisten NAN-190 behandelt wurden, fand sich eine vergleichbare Spinereduktion am 14., 21. und 60. Lebenstag (Yan et al., 1997) und eine Reduktion von Spinesynapsen am 14. und 21. Lebenstag, welche am 60. Tag nicht mehr beobachtet wurde (Faber & Haring, 1999). Die Spinereduktion konnte im Falle der PCA-behandelten Tiere durch die Gabe eines 5-HT<sub>1A</sub>-Agonisten (Buspirone) verhindert werden (Yan et al., 1997). Die Autoren dieser Studie vertreten die Hypothese, dass die

neurotrophische Wirkung von Serotonin über astrocytische 5-HT<sub>1A</sub>-Rezeptoren unter Beteiligung des S100 $\beta$  Proteins (Marshak 1990; Whitaker-Azmitia & Azmitia, 1994; Wilson et al., 1998) vermittelt wird. Außerdem stützen diese Ergebnisse die Vermutung, dass 5-HT über den 5-HT<sub>1A</sub>-Rezeptor an der Überproduktion von Spines während einer für die hippocampale Entwicklung frühen kritischen Phase beteiligt ist (Faber & Haring, 1999). Ähnliche Mechanismen könnten auch den von mir beobachteten Spineveränderungen zugrunde liegen.

### **3. Einfluss von wiederholtem kurzzeitigem Elternentzug auf die Entwicklung inhibitorischer Systeme**

#### **3.1. Deskriptive Beobachtungen zu Interneuronen, die calciumbindende Proteine oder CRH im medialen Präfrontalcortex enthalten**

Calbindin-, Calretinin-, und Parvalbumin-immunoreaktive Zellen werden in der Literatur meist als nicht-pyramidale Interneurone charakterisiert (DeFelipe 1997). Meine Beobachtungen im PFC von *Octodon degus* stehen damit in Einklang. Analog zu Untersuchungen bei Ratten (Celio 1990; Gabbott et al., 1997) und Primaten (Condè et al., 1994) ist Parvalbumin bei *Octodon degus* in großen multipolaren, wahrscheinlich Korb- und Chandelierzellen, Calretinin v.a. in kleinen spindelförmigen bipolaren Zellen und Calbindin in bi- und multipolaren, wahrscheinlich Martinottizellen, sowie schwach in Schicht-II/III Pyramidenzellen (Hof et al., 1999) vorhanden. Calbindin und Parvalbumin sind teilweise colokalisiert und Parvalbumin-Terminalien konnten um die Zellkörper Parvalbumin-negativer CaBP-D28k-positiver Zellen beobachtet werden. Außerdem wurden, wie auch bei Studien im PFC und Hippocampus von Ratten beschrieben (Freund & Gulyas, 1996; Gabbott et al., 1997), Parvalbumin-Terminalien um die Somata Parvalbumin-negativer Pyramidenzellen nachgewiesen.

Auch die Verteilung und Morphologie CRH enthaltender Neurone gleicht bei *Octodon degus* der, wie sie bei Ratten gefunden wurde (Sawchenko et al., 1993; Yan et al., 1998): Sie sind, wenn auch spärlich, über alle Regionen des PFC verteilt und meistens als kleine spindelförmige bipolare Zellen in Schicht-II/III bzw. als etwas größere, multipolare Zellen in Schicht-V/VI lokalisiert. Charakteristisch ist jedoch das dichte Neuropil dieser Zellen in allen corticalen Schichten, oft finden sich punktförmige Strukturen um die Somata von ungefärbten

Neuronen herum. Im Gegensatz zu Ratten (Yan et al., 1998; Hof et al., 1999) findet man CRH bei *Octodon degus* äußerst selten mit CaBP-D28k oder Parvalbumin colokalisiert, häufig jedoch mit Calretinin.

### **3.2. Einfluss von wiederholtem kurzzeitigem Elternentzug auf die Entwicklung inhibitorischer Interneurone im medialen Präfrontalcortex**

Parallel zu den Veränderungen exzitatorischer spine-(synaptischer) Verbindungen nach Elternentzug (Helmeke et al., 2001a,b) wurden auch Veränderungen des inhibitorischen GABAergen Systems im sich entwickelnden Gehirn überprüft. Die Ergebnisse dieser Studie, in der Veränderungen der Dichte von Zellen, immunopositiv für calciumbindende Proteine, quantifiziert wurden, untermauern unsere Arbeitshypothese, dass frühkindliche Separationserfahrungen in spezifischen Subregionen des PFC zu Veränderungen des inhibitorischen Systems führen (Helmeke et al., 2000, *Abstract*). Diese Veränderungen sind zudem abhängig vom Alter der untersuchten Tiere: Wiederholt kurzzeitig separierte Jungtiere besitzen am 45. Postnataltag signifikant geringere Zelldichten CaBP-D28k-immunopositiver GABAerger Interneurone, deren Anzahl am 90. Postnataltag wieder der von Normaltieren entspricht. Im Gegensatz dazu zeigen die Parvalbumin-immunopositiven GABAergen Interneurone im ACd und im PrCm erst am 90. Postnataltag eine erhöhte Dichte, d.h. in diesem Fall handelt es sich um eine verzögerte, langfristige Veränderung. Die CaR/CRH-immunoreaktiven Neurone zeigen bei den elternseparierten Tieren keine Veränderungen. Innerhalb der Normalentwicklung lässt sich jedoch bei allen drei calciumbindenden Proteinen eine Abnahme der Dichte vom 45. bis zum 90. Lebenstag nachweisen, ein Indiz für eine langanhaltende Beeinflussbarkeit der inhibitorischen Subsysteme im Verlaufe der Entwicklung.

Eine Veränderung der Dichten von Zellen, immunopositiv für calciumbindende Proteine, reflektiert jedoch höchstwahrscheinlich nicht eine Veränderung der tatsächlichen Anzahl der Interneurone. Die gemessenen Veränderungen sind eher ein Indikator für eine aktivitätsinduzierte veränderte Regulation dieser Proteine in den Interneuronen, welche wiederum Auswirkungen auf die Calcium-Pufferung dieser Neurone hat (Heizmann & Braun, 1995). Die im Folgenden diskutierten Veränderungen der Zelldichten sollen deshalb als eine Herab- bzw. Hochregulation der inhibitorischen Aktivität von Interneuronen definiert werden.

Bisher beobachteten einige wenige Studien eine Beeinflussung des GABAergen Systems durch Mutterentzug: Bei Applikation von Benzodiazepin-Agonisten während des Mutterentzuges, ist eine Reduktion der im Ultraschallbereich liegenden Stressvokalisation von Rattenjungen die Folge (Olivier et al., 1998). Western Blot Analysen an Rattenjungen, welche in den ersten zwei Lebenswochen wiederholt langfristig (sechs Stunden pro Tag) von der Mutter separiert wurden, zeigten signifikant größere Konzentrationen von Calbindin und Calretinin im Hippocampus (Lephart & Watson, 1999). Weitere Studien untersuchten bei *Octodon degus* die kurzfristigen Auswirkungen von Elterntzug auf das GABAerge System: In Regionen des limbischen Systems, dem präfrontalen Cortex (Ziabreva et al., 2003a), dem Hippocampus und der Amygdala (Ziabreva et al., 2003b) war eine Reduktion von GABA(A)-Rezeptoren die Folge wiederholter Separationen in der zweiten Postnatalwoche. Die Dichte NADPH-Diaphorase-positiver Neuronen, welche teilweise GABAerge Interneurone repräsentieren, war ebenfalls reduziert und zwar in der Core-Region des Nucleus accumbens und im Präfrontalcortex 45tägiger Degus (Braun et al., 2000). Diese Ergebnisse korrelieren nur bedingt mit denen, die ich innerhalb dieser Arbeit gefunden habe. Zwar verringerte sich die Dichte CaBP-D28k enthaltender Neurone bei 45tägigen elternseparierten Jungtieren, insgesamt stieg jedoch die Zelldichte aller calciumbindenden Neurone, d.h. aller GABAergen Zellen, an. Dieses Ergebnis indiziert ein verschobenes Gleichgewicht der Aktivität verschiedener inhibitorischer Interneurone als Folge wiederholten Elterntzugs. Insgesamt zeigen diese Studien, dass sich die Aktivität des GABAergen Systems in limbischen Regionen durch Mutter- bzw. Elterntzug verändert, diese Veränderungen jedoch mit dem Zeitpunkt der Untersuchung, der Dauer der Separation und dem untersuchten Hirngebiet variieren.

Die Dichte der CRH-Interneurone, die überwiegend mit Calretinin colokalisiert waren, änderte sich wie die der Gesamtpopulation der Calretinin enthaltenden Neurone nach wiederholtem kurzzeitigem Elterntzug nicht. Auch die basalen Cortisol-Werte frühkindlich separierter Degus waren, zumindest an deren 21. Lebenstag unverändert. Es wird in weiterführenden Untersuchungen überprüft, ob sich separationsinduzierte Einflüsse auf das CRH-System und auf die HPA-Achsen-Aktivierung von *Octodon degus*, ähnlich wie bei Ratten, erst in einem späteren Altersstadium und nach länger anhaltenden Separationen (Ehlers et al., 1993; Pihoker et al., 1993; Plotsky & Meaney, 1993) messen lassen.

Veränderungen der GABAergen Neurotransmission werden auch mit verschiedenen Erkrankungen bei Menschen in Verbindung gebracht: So fanden sich geringere Dichten von Parvalbumin und Calbindin enthaltenden Neuronen, nicht aber von Calretinin enthaltenden

Neuronen im PFC von Schizophreniepatienten (Beasley et al., 2002), weniger Parvalbumin-positive thalamocorticale Projektionsneurone bei Schizophreniepatienten (Danos et al., 1998), reduzierte Dichten von Calbindin enthaltenden Neuronen im anterioren cingulären Cortex von Schizophreniepatienten und von Patienten mit bipolaren Störungen (Cotter et al., 2002), sowie geringere GABA-Konzentrationen im occipitalen Cortex von Patienten mit Depression (Sanacora et al., 1999).

GABAergen Interneuronen wird die Kontrolle über die exzitatorische Aktivität von Schicht-III Pyramidenzellen zugesprochen (Keverne 1999; Lewis et al., 1999). Über die Aktivität GABAerger Interneurone könnten diese Mechanismen dem Anstieg der (überwiegend exzitatorischen) Spinedichten im ACd der separierten Degus (Helmeke et al., 2001a,b), entgegen wirken.

Sofern sich schon in den ersten drei Lebenswochen eine herabregulierte Aktivität von Calbindin-positiven Interneuronen nachweisen ließe, könnte dies u.a. auch für einen Anstieg der Spinedichten in den ersten drei Lebenswochen verantwortlich sein. Die Herabregulation der inhibitorischen Aktivität von Interneuronen durch eine verringerte Produktion von GABA führt in den CA-3 Pyramidenzellen von Schnittkulturen junger Ratten zu geringeren spontanen inhibitorischen postsynaptischen Strömen (Engel et al., 2001) und indiziert eine geringere Hemmung der Pyramidenzellen durch GABA. Inhibitorische Interneurone senden multiple Terminalien zu den Dendriten und Zellkörpern von Pyramidenzellen (Abb. 24), und es ist bekannt, dass calciumbindende Proteine enthaltende Interneurone die Aktivität von Pyramidenzellen, ihren exzitatorischen Input und Output, beeinflussen (Condè et al., 1994; DeFelipe 1997; Freund & Gulyas, 1997). In Hippocampuskulturen von Ratten wurde durch eine Blockade des GABAergen Systems, nach Gabe von GABA(A)-Antagonisten oder Bicucullin, ein Anstieg der Spontanaktivität, gefolgt von einem Anstieg der Spinedichten induziert (Papa & Segal, 1996). Ähnliche Mechanismen könnten zu der beobachteten höheren Spinedichte separierter Degus führen, indem durch die geringere Aktivität CaBP-D28k enthaltender Interneurone die Spontanaktivität der Pyramidenzellen ansteigt und mehr Spines gebildet werden.

#### **4. Mögliche Interaktionen serotonerger und GABAerger Mechanismen bei den separationsinduzierten Spineveränderungen**

Neben der Wirkung von 5-HT als neurotrophischem Faktor oder dem Effekt einer verringerten Inhibition der Pyramidenzellen durch weniger GABA-aktive CaBP-D28k enthaltende Interneurone bzw. einer Kombination aus diesen Möglichkeiten, könnte auch eine Interaktion der serotonerger und GABAerger Systeme zu höheren Spinedichten führen. Die erhöhten Spinedichten nach Elternentzug am 21. bzw. am 45. Lebensstag (Helmeke et al., 2001a,b) könnten ihre Ursache in einer verminderten Inhibition von Pyramidenzellen haben, und zwar durch eine verstärkt über 5-HT<sub>1A</sub>-Rezeptoren (Ziabreva et al., 2003a) vermittelte Inhibition GABAerger CaBP-D28k enthaltender Interneurone. Blockiert man diese Inhibition der Interneurone durch 5-HT<sub>1A</sub>-Rezeptorantagonisten, wie im vorliegenden pharmakologischen Experiment, werden die Pyramidenzellen weiterhin inhibiert und die separationsinduzierte Spinevermehrung unterbleibt.

Erhöhte Spontanaktivität der Neurone im Hippocampus von Rattenneuronenkulturen, ausgelöst durch eine Blockade des GABAerger Systems, führte zu einem Anstieg der Spinedichte um 60% (Papa & Segal, 1996), und aus elektrophysiologischen Arbeiten an Ratten ist 5-HT induzierte GABAerge Inhibition im piriformen Cortex (Sheldon & Aghajanian, 1990) und Hippocampus (Ropert & Guy, 1991) bekannt. Anatomische Tracing und Doppelfärbungsstudien liefern zudem den Beweis für eine spezifische Innervation GABAerger Interneurone durch serotonerge Afferenzen aus der Raphe. Sie innervieren hauptsächlich die Dendriten CaBP-D28k-positiver GABAerger Interneurone in Schicht I-III des Cortex (Freund et al., 1990; Hornung & Celio, 1992; Smiley & Goldman-Rakic, 1996). Weitere immunohistochemische Studien (Aznar et al., 2003), sowie qualitative Beobachtungen im Rahmen dieser Arbeit, zeigen 5-HT<sub>1A</sub>-Rezeptoren auf den Somata CaBP-D28k- und Parvalbumin-positiver Interneurone. Während GABAerge Interneurone im Hippocampus, welche GABA(A) vermittelte schnelle IPSPs produzieren, 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptoren besitzen (Ropert & Guy, 1991; McMahon & Kauer, 1997) und durch Serotonin aktiviert werden, wurde in anderen Studien gefunden, dass Serotonin späte, höchstwahrscheinlich GABA(B) vermittelte IPSPs über 5-HT<sub>1A</sub>-Rezeptoren reduziert (Segal 1990; Ghadimi et al., 1994). Letzterer Befund ist für die vorliegende Studie außerordentlich interessant, denn sollte dieser auch für den anterioren cingulären Cortex zutreffen, vermitteln vermutlich GABA(B)-Rezeptoren an Pyramidenzellen eine späte Inhibition (Lacaille & Schwartzkroin, 1988) durch

CaBP-D28k-positive Interneurone. Wird die Aktivität dieser CaBP-D28k-positiven Interneurone über einen separationsinduzierten Anstieg von 5-HT<sub>1A</sub>-Rezeptoren (Ziabreva et al., 2003a) gehemmt, könnte dies die geringere immunocytochemische Nachweisbarkeit (Herabregulation des Proteins) dieser Neurone nach Elternentzug, sowie eine erhöhte Aktivität der Pyramidenzellen und die daraus resultierenden erhöhten Spinedichten erklären. Die hier angestellten Überlegungen können, wie bereits erwähnt, beim derzeitigen Kenntnisstand lediglich hypothetisch bleiben. Um zu beweisen welche Mechanismen letztendlich den erfahrungsgesteuerten synaptischen Veränderungen limbischer Hirnareale zugrunde liegen sind weitere morphologische, pharmakologische und möglicherweise elektrophysiologische Untersuchungen weiterer Transmittersysteme und Zeitfenster notwendig.

## 5. Ausblick

Aufbauend auf den in dieser Arbeit dargelegten Befunden bleibt es nun zu klären, ob die durch Umwelteinflüsse induzierten hirmorphologischen Veränderungen in noch weiteren limbischen Hirnregionen zu beobachten sind. Darüber hinaus müsste analysiert werden, auf welche Weise das Ausmaß und die Art der Veränderungen abhängig sind von der Qualität und der Dauer der Umweltveränderungen und den dabei gemachten Erfahrungen, und inwieweit es besonders sensible oder vulnerable Zeitfenster im Verlauf der Postnatalentwicklung gibt, in denen solche frühen Erfahrungen zu massiven Veränderungen der Hirnfunktion führen können. Letztlich muss auch noch geklärt werden, ob die nachgewiesenen hirnbioologischen Veränderungen zu Verhaltensänderungen in positiver oder in negativer Richtung führen, und inwieweit sich diese über den gesamten Lebenszeitraum erstrecken.

Diese Erkenntnisse könnten unser Verständnis über den Einfluss sozio-emotionaler Beziehungen auf die neuronale- und Verhaltensentwicklung erweitern und hoffentlich nutzen lassen. Beispielsweise wären sie für die Erziehung von Kindern im Vorschul- und Grundschulalter von Bedeutung, um diese optimal auf das spätere Leben vorzubereiten und Begabungen frühzeitig während des Entwicklungsprozesses zu fördern.

Aber auch bei der Untersuchung der Entstehung von psychischen Krankheiten spielen Tiermodelle eine bedeutende Rolle. Diese liegt in der Möglichkeit, neuronale Veränderungen zu überprüfen und quantitativ auf zellulärer, synaptischer und molekularer Ebene zu erfassen.

Frühkindliche Separationserfahrungen, Veränderungen des serotonergen und des GABAergen Systems, insbesondere in limbischen Hirnregionen, werden mit verschiedenen pathogenen Erscheinungsbildern, wie z.B. Epilepsie, Schizophrenie, Depression und Alzheimer (Bogerts 1999; Keverne 1999; Lewis et al., 1999; Braun & Bogerts, 2001; Avoli et al., 2002; Baumann et al., 2002; Schechter et al., 2002) in Verbindung gebracht. Tierexperimentelle Analysen dieser Systeme sollten dazu beitragen die Zusammenhänge zwischen veränderten Hirn-(Transmitter)-Funktionen und psychosozialen Faktoren bzw. neurologischen Krankheiten zu klären.

## V. Zusammenfassung

Ein für das Überleben der Nachkommen bedeutender Lernprozess ist die Herausbildung einer emotionalen Bindung zwischen dem Neugeborenen und seinen Eltern. Unsere Arbeitshypothese postuliert, dass diese emotionale Bindung über die kontinuierliche Interaktion mit der Bezugsperson nicht nur das spätere emotionale Verhalten, sondern auch die Reifung limbischer Hirnregionen prägend beeinflusst. Diese Hypothese sollte im Rahmen der vorliegenden Arbeit mithilfe verschiedener methodischer Ansätze überprüft werden. Am Tiermodell *Octodon degus* untersuchte ich, welche Art von Veränderungen der früh postnatalen sozio-emotionalen Umgebung die synaptische Entwicklung im limbischen anterioren cingulären Cortex beeinflussen können. Darüber hinaus wurden erfahrungsinduzierte Veränderungen der neuromodulatorischen Systeme quantitativ untersucht.

Die Fragestellung lässt sich in folgende Fragenkomplexe aufgliedern:

- Lassen sich im Verlauf der Postnatalentwicklung des anterioren cingulären Cortex Phasen des Spineauf- und -abbaus beobachten, vergleichbar zu den Befunden an Primaten?
- Wirkt sich die wiederholte kurzzeitige bzw. chronische Trennung von einem oder beiden Elternteilen auf die Entwicklung exzitatorischer Synapsen im anterioren cingulären Cortex aus?
- Wirkt sich die wiederholte kurzzeitige Trennung von den Eltern auf die Entwicklung inhibitorischer Systeme, d.h. auf die Anzahl GABAerger Interneurone aus?
- Wirkt sich die wiederholte kurzzeitige Trennung von den Eltern auf die Entwicklung stressrelevanter Systeme, d.h. auf die Dichte von Neuronen die Corticotropin-Releasing-Hormone enthalten, aus?
- Inwieweit sind serotonerge Mechanismen bei den separationsinduzierten synaptischen Veränderungen involviert?

Die Hauptbefunde sind wie folgt zusammenzufassen:

- Die Entwicklung der dendritischen Spines (exzitatorische Spinesynapsen) zeigt zwischen dem ersten und dem 21. Lebensstag einen kontinuierlichen Anstieg und nimmt bis zum 45. Lebensstag wieder ab. Hiermit wurde erstmals für einen Nager nachgewiesen, dass der Präfrontalcortex eine ähnliche phasenspezifische synaptische Reifung wie bei Primaten durchläuft.

- Eine, beginnend mit dem ersten Tag nach der Geburt, tägliche einstündige Trennung von den Eltern führt am 21. Lebenstag (Zeitpunkt vor der Entwöhnung von der Mutter) zu einer erhöhten Dichte dendritischer Spines im limbischen anterioren cingulären Cortex. Die chronische Trennung vom Vater, beginnend mit dem ersten Tag nach der Geburt, bewirkt hingegen eine Reduktion dendritischer Spines im anterioren cingulären Cortex. Die Aufzucht in Großvolieren führt zu signifikant geringeren Spinedichten im Vergleich zur Aufzucht in Standardkäfigen.
- Eine tägliche einstündige Trennung von den Eltern führt am 45. Lebenstag zu einer phasenspezifischen und regionspezifischen veränderten Balance von neuronalen GABAergen Subpopulationen in den verschiedenen Subregionen des Präfrontalcortex, einschließlich dem anterioren cingulären Cortex. Bei den elternseparierten Tieren ist die Gesamtpopulation der GABAergen Neurone erhöht.
- Separationsinduzierte Veränderungen stressrelevanter neuronaler Subsysteme, d.h. Neurone die Corticotropin-Releasing-Hormone enthalten (und zum Teil auch GABAerg sind), zeigten sich im präfrontalen Cortex in diesem Altersstadium nicht.
- Die pharmakologische Studie ergab, dass die Gabe eines Antagonisten gegen den serotonergen 5HT<sub>1A</sub>-Rezeptor die separationsinduzierte Vermehrung von exzitatorischen Spinesynapsen blockieren kann.

Diese Resultate stehen prinzipiell im Einklang mit unserer Arbeitshypothese, dass frühe postnatale Veränderungen der sozio-emotionalen Umgebung die Entwicklung von exzitatorischen synaptischen Verbindungen und von inhibitorischen Interneuronen in limbischen Cortexarealen modulieren können. Die beobachteten erfahrungsinduzierten Veränderungen im anterioren cingulären Cortex können als Anpassung der neuronalen Verbindungen an veränderte sozio-emotionale Umweltbedingungen interpretiert werden. Es ist zu vermuten, dass solche erfahrungsinduzierten Veränderungen des limbischen Systems die psychosozialen und kognitiven Kapazitäten im Erwachsenenalter determinieren. Da anzunehmen ist, dass ähnliche Mechanismen auch bei der erfahrungsgesteuerten funktionellen Reifung des menschlichen Gehirns beteiligt sind, sind die aus dieser Arbeit hervorgehenden Erkenntnisse von allgemeiner und fundamentaler Bedeutung für die Erforschung von erfahrungs- und lernabhängiger synaptischer Plastizität im sich entwickelnden Gehirn, einschließlich ihrer pathologischen Formen.

## VI. Abkürzungsverzeichnis

ACd	anteriorer cingulärer Cortex
AI	agranulärer insulärer Cortex
CaBP-D28k	Calbindin
CaR	Calretinin
CRH/CRF	Corticotropin-Releasing-Hormon/Factor
EZ	Elternentzug
GABA	$\gamma$ -Aminobuttersäure
GAD	Glutamatdecarboxylase
5-HT	5-Hydroxytryptamin, Serotonin
IL	infralimbischer Cortex
ip	intraperitoneal
LO	laterale orbitale Area
LTP	Lang-Zeit Potenzierung
M1	prämotorischer Cortex
MD	mediodorsaler Nucleus
MO	mediale orbitale Area
P	Postnataltag
PBS	Phosphat-Puffer
PCA	Parachloramphetamin
PFA	Paraformaldehyd
PFC	präfrontaler Cortex
PL	prälimbischer Cortex
PrCm	präcentraler medialer Cortex
PV	Parvalbumin
RF	Sulcus rhinalis
SN	Substantia nigra
VTA	ventrales Tegmentum

## VII. Literatur

- Abellan MT, Jolas T, Aghajanian GK, Artigas F (2000) Dual control of dorsal raphe serotonergic neurons by GABA(B) receptors. Electrophysiological and microdialysis studies. *Synapse*. **36**:21-34.
- Abraham A, Helmeke C, Braun K (2003) Cortical dendritic spine development is modulated by juvenile emotional and physical stress and 5-HT<sub>1A</sub>-receptor activation. *29<sup>th</sup> Göttingen Neurobiology Conference. Georg-Thieme-Verlag. Im Druck. Abstract.*
- Adams I, Jones DG (1982) Quantitative ultrastructural changes in rat cortical synapses during early-, mid- and late-adulthood. *Brain. Res.* **239**:349-63.
- Aganova EA, Uranova NA (1990) Morphometric analysis of synaptic contacts in the anterior limbic cortex in endogenous psychoses. *Zh. Nevropatol. Psikhiatr. Im. S. S. Korsakova.* **90**:53-7.
- Agid O, Shapira B, Zislin J, Ritsner M, Hanin B, Murad H, Troudart T, Bloch M, Heresco-Levy U, Lerer B (1999) Environment and vulnerability to major psychiatric illness: a case control study of early parental loss in major depression, bipolar disorder and schizophrenia. *Mol. Psychiatry.* **4**:163-72.
- Andersen SL, Lyss PJ, Dumont NL, Teicher MH (1999) Enduring neurochemical effects of early maternal separation on limbic structures. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **877**:756-9.
- Angevine JB, Sidman RL Jr, (1961) Autoradiographic study of cell migration during histogenesis of cerebral cortex in the mouse. *Nature.* **192**:766-8.
- Anisman H, Zaharia MD, Meaney MJ, Merali Z (1998) Do early-life events permanently alter behavioral and hormonal responses to stressors? *Int. J. Dev. Neurosci.* **16**:149-64.
- Avoli M, D'Antuono M, Louvel J, Kohling R, Biagini G, Pumain R, D'Arcangelo G, Tancredi V (2002) Network and pharmacological mechanisms leading to epileptiform synchronization in the limbic system in vitro. *Prog. Neurobiol.* **68**:167-207.
- Azmitia EC, Segal M (1978) An autoradiographic analysis of the differential ascending projections of the dorsal and median raphe nuclei in the rat. *J. Comp. Neurol.* **179**:641-67.
- Aznar S, Qian Z, Shah R, Rahbek B, Knudsen GM (2003) The 5-HT(1A) serotonin receptor is located on calbindin- and parvalbumin-containing neurons in the rat brain. *Brain. Res.* **959**:58-67.
- Baumann B, Bielau H, Krell D, Agelink MW, Diekmann S, Wurthmann C, Trubner K, Bernstein HG, Danos P, Bogerts B (2002) Circumscribed numerical deficit of dorsal raphe neurons in mood disorders. *Psychol. Med.* **32**:93-103.
- Beasley CL, Zhang ZJ, Patten I, Reynolds GP (2002) Selective deficits in prefrontal cortical GABAergic neurons in schizophrenia defined by the presence of calcium-binding proteins. *Biol. Psychiatry.* **52**:708-15.
- Becker K, Bock J, Braun K (2003) Changes of parental behavior after acute and repeated separation from the offspring in the precocious species *Octodon degus*. *29<sup>th</sup> Göttingen Neurobiology Conference. Georg-Thieme-Verlag. Im Druck. Abstract.*
- Beckstead RM (1979) An autoradiographic examination of corticocortical and subcortical projections of the mediodorsal-projection (prefrontal) cortex in the rat. *J. Comp. Neurol.* **184**:43-62.
- Bhatnagar S, Shanks N, Meaney MJ (1996) Plaque-forming cell responses and antibody titers following injection of sheep red blood cells in nonstressed, acute, and/or chronically stressed handled and nonhandled animals. *Dev. Psychobiol.* **29**:171-81.
- Bickerdike MJ, Wright IK, Marsden CA (1993) Social isolation attenuates rat forebrain 5-HT release induced by KCI stimulation and exposure to a novel environment. *Behav. Pharmacol.* **4**:231-236.
- Bifulco AT, Brown GW, Harris TO (1987) Childhood loss of parent, lack of adequate parental care and adult depression: a replication. *J. Affect. Disord.* **12**:115-28.
- Blanz B, Geisel B, Laucht M, Esser G, Schmidt MH (1986) Role of the father in the development of school-age children. Results of an epidemiologic study. *Z. Kinder. Jugendpsychiatr.* **14**:5-31.
- Bock J (1998) Lerninduzierte synaptische Veränderungen in assoziativen Vorderhirnarealen des Haushühnkükens (*Gallus gallus domesticus*): Metabolische, morphologische und pharmakologische Untersuchungen unter besonderer Berücksichtigung des NMDA-Rezeptors. *Dissertationsschrift. Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg.*

- Bock J, Braun K (1998) Differential emotional experience leads to pruning of dendritic spines in the forebrain of domestic chicks. *Neural. Plast.* **6**:17-27.
- Bock J, Braun K (1999) Filial imprinting in domestic chicks is associated with spine pruning in the associative area, dorsocaudal neostriatum. *Eur. J. Neurosci.* **11**:2566-70.
- Bogerts B (1996) Plasticity of brain structure and function as the neurobiological principle of psychotherapy. *Z. Klein. Psychol. Psychiatr. Psychother.* **44**:243-52.
- Bogerts B (1999) The neuropathology of schizophrenic diseases: historical aspects and present knowledge. *Eur. Arch. Psychiatry. Clin. Neurosci.* **4**:2-13.
- Bourgeois JP, Rakic P (1993) Changes of synaptic density in the primary visual cortex of the macaque monkey from fetal to adult stage. *J. Neurosci.* **13**:2801-20.
- Bowlby J (1977) The making and breaking of affectional bonds. I. Aetiology and psychopathology in the light of attachment theory. An expanded version of the Fiftieth Maudsley Lecture, delivered before the Royal College of Psychiatrists, 19 November 1976. *Br. J. Psychiatry.* **130**:201-10.
- Bowlby J (1988) Developmental psychiatry comes of age. *Am. J. Psychiatry.* **145**:1-10.
- Braun K, Bogerts B (2000) Juvenile experience and learning modulate the functional maturation of the brain: relevance for the genesis and therapy of mental disorders. *Psychother. Psychosom. Med. Psychol.* **50**:420-7.
- Braun K, Bogerts B (2001) Experience guided neuronal plasticity. Significance for pathogenesis and therapy of psychiatric diseases. *Nervenarzt.* **72**:3-10.
- Braun K, Bock J (2000) Maternal separation alters spine density in the anterior cingulate cortex of the rat. *Abstract Viewer/Itinerary Planner. Washington, DC: Society for Neuroscience, 2000.* Program No. 206.1. CD-ROM. *Abstract.*
- Braun K, Helmeke C, Friedrich P, Schwabe T, Ovtscharoff W Jr., Poeggel G (2002) Influence of parental deprivation on synaptic development of the anterior cingulate cortex, hippocampus and amygdala. *Dev. Psychobiol.* **41**:300. *Abstract.*
- Braun K, Kremz P, Wetzl W, Wagner T, Poeggel G (2003) Influence of maternal deprivation on the behavioral development in *Octodon degus*: modulation by maternal vocalizations. *Dev. Psychobiol.* Im Druck.
- Braun K, Lange E, Metzger M, Poeggel G (2000) Maternal separation followed by early social deprivation affects the development of monoaminergic fiber systems in the medial prefrontal cortex of *Octodon degus*. *Neuroscience.* **95**:309-18.
- Braun S, Scheich H (1997) Influence of experience on the representation of the "mothering call" in frontoparietal and auditory cortex of pups of the rodent *Octodon degus*: FDG mapping. *J. Comp. Physiol.* **181**:697-709.
- Bredy TW, Lee AJ, Meaney MJ, Brown RE (2002) Neonatal handling, paternal care and offspring cognitive development in the monogamous California mouse (*Peromyscus californicus*) *Abstract Viewer/Itinerary Planner. Washington, DC: Society for Neuroscience, 2002.* Program No. 534.9. CD-ROM. *Abstract.*
- Brindley DN, Rolland Y (1989) Possible connections between stress, diabetes, obesity, hypertension and altered lipoprotein metabolism that may result in atherosclerosis. *Clin. Sci. (Lond).* **77**:453-61.
- Brodbeck AJ, Irwin OC (1946) The speech behavior of infants without families. *Child. Dev.* **17**:145-156.
- Brodmann K (1912) Neue Ergebnisse über die vergleichende histologische Lokalisation der Grosshirnrinde mit besonderer Berücksichtigung des Stirnhirns. *Suppl. Anat. Anz.* **41**:157-216.
- Brown RM, Crane AM, Goldman PS (1979) Regional distribution of monoamines in the cerebral cortex and subcortical structures of the rhesus monkey: concentrations and in vivo synthesis rates. *Brain. Res.* **168**:133-50.
- Bryan GK, Riesen AH (1989) Deprived somatosensory-motor experience in stump-tailed monkey neocortex: dendritic spine density and dendritic branching of layer IIIB pyramidal cells. *J. Comp. Neurol.* **286**:208-17.
- Carette B, Poulain P, Beauvillain JC (2001) Noradrenaline modulates GABA-mediated synaptic transmission in neurones of the mediolateral part of the guinea pig lateral septum via local circuits. *Neurosci. Res.* **39**:71-7.
- Casanovas JM, Hervas I, Artigas F (1999) Postsynaptic 5-HT<sub>1A</sub> receptors control 5-HT release in the rat medial prefrontal cortex. *Neuroreport.* **10**:1441-5.

- Cavada C, Reinoso-Suarez F (1985) Topographical organization of the cortical afferent connections of the prefrontal cortex in the cat. *J. Comp. Neurol.* **242**:293-324.
- Caviness VS Jr, Sidman RL (1973) Time of origin of corresponding cell classes in the cerebral cortex of normal and reeler mutant mice: an autoradiographic analysis. *J. Comp. Neurol.* **148**:141-51.
- Celio MR (1990) Calbindin D-28k and parvalbumin in the rat nervous system. *Neuroscience.* **35**:375-475.
- Changeux JP, Danchin A (1976) Selective stabilisation of developing synapses as a mechanism for the specification of neuronal networks. *Nature.* **264**:705-12.
- Chubakov AR, Gromova EA, Konovalov GV, Chumasov EI, Sarkisova EF. (1986) Effect of serotonin on the development of a rat cerebral cortex tissue culture. *Neurosci. Behav. Physiol.* **16**:490-7.
- Comery TA, Harris JB, Willems PJ, Oostra BA, Irwin SA, Weiler IJ, Greenough WT. (1997) Abnormal dendritic spines in fragile X knockout mice: maturation and pruning deficits. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **94**:5401-4.
- Comery TA, Shah R, Greenough WT (1995) Differential rearing alters spine density on medium-sized spiny neurons in the rat corpus striatum: evidence for association of morphological plasticity with early response gene expression. *Neurobiol. Learn. Mem.* **63**:217-9.
- Comery TA, Stamoudis CX, Irwin SA, Greenough WT (1996) Increased density of multiple-head dendritic spines on medium-sized spiny neurons of the striatum in rats reared in a complex environment. *Neurobiol. Learn. Mem.* **66**:93-6.
- Conde F, Lund JS, Jacobowitz DM, Baimbridge KG, Lewis DA (1994) Local circuit neurons immunoreactive for calretinin, calbindin D-28k or parvalbumin in monkey prefrontal cortex: distribution and morphology. *J. Comp. Neurol.* **341**:95-116.
- Cotter D, Landau S, Beasley C, Stevenson R, Chana G, MacMillan L, Everall I (2002) The density and spatial distribution of GABAergic neurons, labelled using calcium binding proteins, in the anterior cingulate cortex in major depressive disorder, bipolar disorder, and schizophrenia. *Biol. Psychiatry.* **51**:377-86.
- Danos P, Baumann B, Bernstein HG, Franz M, Stauch R, Northoff G, Krell D, Falkai P, Bogerts B (1998) Schizophrenia and anteroventral thalamic nucleus: selective decrease of parvalbumin-immunoreactive thalamocortical projection neurons. *Psychiatry. Res.* **82**:1-10.
- Daval G, Verge D, Becerril A, Gozlan H, Spampinato U, Hamon M (1987) Transient expression of 5-HT1A receptor binding sites in some areas of the rat CNS during postnatal development. *Int. J. Dev. Neurosci.* **5**:171-80.
- Dawson LA, Nguyen HQ (1998) Effects of 5-HT1A receptor antagonists on fluoxetine-induced changes in extracellular serotonin concentrations in rat frontal cortex. *Eur. J. Pharmacol.* **345**:41-6.
- De Luka SR, Protic S, Vrbaski SR (1998) Gamma aminobutyric acid--its function, disorders and their sequelae. *Med. Pregl.* **51**:319-24.
- DeFelipe J (1997) Types of neurons, synaptic connections and chemical characteristics of cells immunoreactive for calbindin-D28K, parvalbumin and calretinin in the neocortex. *J. Chem. Neuroanat.* **14**:1-19.
- Denenberg VH (1969) Open-field behavior in the rat: what does it mean? *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **159**:852-9.
- Diamond A (2000) Close interrelation of motor development and cognitive development and of the cerebellum and prefrontal cortex. *Child. Dev.* **71**:44-56.
- Diamond MC, Lindner B, Johnson R, Bennett EL, Rosenzweig MR (1975) Differences in occipital cortical synapses from environmentally enriched, impoverished, and standard colony rats. *J. Neurosci. Res.* **1**:109-119.
- Dinopoulos A, Dori I (1995) The development of the serotonergic fiber network of the lateral ventricles of the rat brain: a light and electron microscopic immunocytochemical analysis. *Exp. Neurol.* **133**:73-84.
- Divac I, Öberg RGE (1990) Prefrontal cortex: The name and the thing. In: *The forebrain in nonmammals*. WK Schwerdtfeger, P Germroth (Eds.) Springer. Berlin, pp. 213-20.
- Engel D, Pahner I, Schulze K, Frahm C, Jarry H, Ahnert-Hilger G, Draguhn A (2001) Plasticity of rat central inhibitory synapses through GABA metabolism. *J. Physiol.* **535**:473-82.

- Escorihuela RM, Fernandez-Teruel A, Gil L, Aguilar R, Tobena A, Driscoll P (1999) Inbred Roman high- and low-avoidance rats: differences in anxiety, novelty-seeking, and shuttlebox behaviors. *Physiol. Behav.* **67**:19-26.
- Faber KM, Haring JH (1999) Synaptogenesis in the postnatal rat fascia dentata is influenced by 5-HT<sub>1A</sub> receptor activation. *Brain. Res. Dev. Brain. Res.* **114**:245-52.
- Feinberg I (1982-83) Schizophrenia: caused by a fault in programmed synaptic elimination during adolescence? *J. Psychiatr. Res.* **17**:319-34.
- Fifkova E, Anderson CL, Young SJ, Van Harreveld A (1982) Effect of anisomycin on stimulation-induced changes in dendritic spines of the dentate granule cells. *J. Neurocytol.* **11**:183-210.
- Fish EW, Sekinda M, Ferrari PF, Dirks A, Miczek KA (2000) Distress vocalizations in maternally separated mouse pups: modulation via 5-HT(1A), 5-HT(1B) and GABA(A) receptors. *Psychopharmacology.* **149**:277-85.
- Fleming AS, O'Day DH, Kraemer GW (1999) Neurobiology of mother-infant interactions: experience and central nervous system plasticity across development and generations. *Neurosci. Biobehav. Rev.* **23**:673-85.
- Francis DD, Caldji C, Champagne F, Plotsky PM, Meaney MJ (1999) The role of corticotropin-releasing factor--norepinephrine systems in mediating the effects of early experience on the development of behavioral and endocrine responses to stress. *Biol. Psychiatry.* **46**:1153-66.
- Francis DD, Meaney MJ (1999) Maternal care and the development of stress responses. *Curr. Opin. Neurobiol.* **9**:128-34.
- Freund TF, Gulyas AI (1997) Inhibitory control of GABAergic interneurons in the hippocampus. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* **75**:479-87.
- Freund TF, Gulyas AI, Acsady L, Gores T, Toth K (1990) Serotonergic control of the hippocampus via local inhibitory interneurons. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **87**:8501-5.
- Fulk GW (1976) Notes on the activity, reproduction and social behavior of *Octodon degus*. *J. Mammal.* **57**:495-505.
- Furukawa T, Mizukawa R, Hirai T, Fujihara S, Kitamura T, Takahashi K (1998) Childhood parental loss and schizophrenia: evidence against pathogenic but for some pathoplastic effects. *Psychiatry. Res.* **81**:353-62.
- Furukawa TA, Ogura A, Hirai T, Fujihara S, Kitamura T, Takahashi K (1999) Early parental separation experiences among patients with bipolar disorder and major depression: a case-control study. *J. Affect. Disord.* **52**:85-91.
- Fuster JM (1985) The prefrontal cortex, mediator of cross-temporal contingencies. *Hum. Neurobiol.* **4**:169-79.
- Fuster JM (2001) The prefrontal cortex--an update: time is of the essence. *Neuron.* **30**:319-33.
- Gabbott PL, Dickie BG, Vaid RR, Headlam AJ, Bacon SJ (1997) Local-circuit neurones in the medial prefrontal cortex (areas 25, 32 and 24b) in the rat: morphology and quantitative distribution. *J. Comp. Neurol.* **377**:465-99.
- Ghadimi BM, Jarolimek W, Misgeld U (1994) Effects of serotonin on hilar neurons and granule cell inhibition in the guinea pig hippocampal slice. *Brain. Res.* **633**:27-32.
- Giguere M, Goldman-Rakic PS (1988) Mediodorsal nucleus: areal, laminar, and tangential distribution of afferents and efferents in the frontal lobe of rhesus monkeys. *J. Comp. Neurol.* **277**:195-213.
- Glantz LA, Lewis DA (2000) Decreased dendritic spine density on prefrontal cortical pyramidal neurons in schizophrenia. *Arch. Gen. Psychiatry.* **57**:65-73.
- Glaser EM, Van der Loos H (1981) Analysis of thick brain sections by obverse-reverse computer microscopy: application of a new, high clarity Golgi-Nissl stain. *J. Neurosci. Methods.* **4**:117-25.
- Globus A, Rosenzweig MR, Bennett EL, Diamond MC (1973) Effects of differential experience on dendritic spine counts in rat cerebral cortex. *J. Comp. Physiol. Psychol.* **82**:175-81.
- Goldman-Rakic PS (1987) Circuitry of the frontal association cortex and its relevance to dementia. *Arch. Gerontol. Geriatr.* **6**:299-309.
- Goldman-Rakic PS (1996) Regional and cellular fractionation of working memory. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **93**:13473-80.
- Goldman-Rakic PS, Lidow MS, Smiley JF, Williams MS (1992) The anatomy of dopamine in monkey and human prefrontal cortex. *J. Neural. Transm. Suppl.* **36**:163-77.

- Granger B, Tekaiia F, Le Sourd AM, Rakic P, Bourgeois JP (1995) Tempo of neurogenesis and synaptogenesis in the primate cingulate mesocortex: comparison with the neocortex. *J. Comp. Neurol.* **360**:363-76.
- Gray PH (1958) Theory and evidence of imprinting in human infants. *J. Psychol.* **46**:155-166.
- Groenewegen HJ (1988) Organization of the afferent connections of the mediodorsal thalamic nucleus in the rat, related to the mediodorsal-prefrontal topography. *Neuroscience.* **24**:379-431.
- Groenewegen HJ, Wright CI, Uylings HB (1997) The anatomical relationships of the prefrontal cortex with limbic structures and the basal ganglia. *J. Psychopharmacol.* **11**:99-106.
- Gruss M, Braun K (1997) Distinct activation of monoaminergic pathways in chick brain in relation to auditory imprinting and stressful situations: a microdialysis study. *Neuroscience.* **76**:891-9.
- Gubernick DJ, Teferi T (2000) Adaptive significance of male parental care in a monogamous mammal. *Proc. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* **267**:147-50.
- Hall FS (1998) Social deprivation of neonatal, adolescent, and adult rats has distinct neurochemical and behavioral consequences. *Crit. Rev. Neurobiol.* **12**:129-162.
- Harlow HF, Harlow MK (1962) Social deprivation in monkeys. *Scient. Am.* **207**:137-46.
- Harris KM, Jensen FE, Tsao B (1992) Three-dimensional structure of dendritic spines and synapses in rat hippocampus (CA1) at postnatal day 15 and adult ages: implications for the maturation of synaptic physiology and long-term potentiation. *J. Neurosci.* **12**:2685-705.
- Harris KM, Kater SB (1994) Dendritic spines: cellular specializations imparting both stability and flexibility to synaptic function. *Annu. Rev. Neurosci.* **17**:341-71.
- Haydon PG, McCobb DP, Kater SB (1984) Serotonin selectively inhibits growth cone motility and synaptogenesis of specific identified neurons. *Science.* **226**:561-4.
- Hedner T, Lundborg P (1980) Serotonergic development in the postnatal rat brain. *J. Neural. Transm.* **49**:257-79.
- Heinz A (1999) Serotonergic dysfunction caused by social isolation. Implications for the development of aggressiveness and alcoholism. *Nervenarzt.* **70**:780-9.
- Heizmann CW, Braun K (1995) Calcium regulation by calcium-binding proteins in neurodegenerative disorders. *Springer-Verlag*. Heidelberg, Germany.
- Helmeke C, Braun K, Poeggel G (2001) Influence of differential emotional experience on synaptic development of the anterior cingulate cortex. *Abstract Viewer/Itinerary Planner. Washington, DC: Society for Neuroscience, 2001*. Program No. 738.2. CD-ROM. *Abstract.*
- Helmeke C, Ovtsharoff W Jr, Poeggel G, Braun K (2001) Juvenile emotional experience alters synaptic inputs on pyramidal neurons in the anterior cingulate cortex. *Cereb. Cortex.* **11**:717-27.
- Helmeke C, Ovtsharoff W Jr., Poeggel G, Braun K (2002) Lack of paternal care reduces spine density in the limbic cortex. *Abstract Viewer/Itinerary Planner. Washington, DC: Society for Neuroscience, 2002*. Program No. 130.4. CD-ROM. *Abstract.*
- Helmeke C, Poeggel G, Braun K (2001) Differential emotional experience induces elevated spine densities on basal dendrites of pyramidal neurons in the anterior cingulate cortex of *Octodon degus*. *Neuroscience.* **104**:927-31.
- Helmeke C, Poeggel G, Richter-Levin G, Braun K (2000) Effect of juvenile emotional experience on CRF and calcium-binding proteins in the medial prefrontal cortex. *Forum of European neuroscience 2000, European Journal of Neuroscience*. Volume 12. Supplement 11. *044.11. Abstract.*
- Hof PR, Glezer II, Conde F, Flagg RA, Rubin MB, Nimchinsky EA, Vogt Weisenhorn DM (1999) Cellular distribution of the calcium-binding proteins parvalbumin, calbindin, and calretinin in the neocortex of mammals: phylogenetic and developmental patterns. *J. Chem. Neuroanat.* **16**:77-116.
- Hofer MA (1973) The effects of brief maternal separation on behavior and heart rate of two-week old rat pups. *Physiol. Behav.* **10**:423-30.
- Hofer MA (1975) Studies on how early maternal separation produces behavioral change in young rats. *Psychosom. Med.* **37**:245-64.
- Hofer MA (1987) Early social relationships: a psychobiologist's view. *Child. Dev.* **58**:633-47.
- Hofer MA (1994) Early relationships as regulators of infant physiology and behavior. *Acta. Paediatr. Suppl.* **397**:9-18.
- Horner CH (1993) Plasticity of the dendritic spine. *Prog. Neurobiol.* **41**:281-321.

- Hornung JP, Celio MR (1992) The selective innervation by serotonergic axons of calbindin-containing interneurons in the neocortex and hippocampus of the marmoset. *J. Comp. Neurol.* **320**:457-67.
- Hornung JP, Fritschy JM, Tork I (1990) Distribution of two morphologically distinct subsets of serotonergic axons in the cerebral cortex of the marmoset. *J. Comp. Neurol.* **297**:165-81.
- Hosokawa T, Rusakov DA, Bliss TV, Fine A (1995) Repeated confocal imaging of individual dendritic spines in the living hippocampal slice: evidence for changes in length and orientation associated with chemically induced LTP. *J. Neurosci.* **15**:5560-73.
- Huot RL, Thrivikraman KV, Meaney MJ, Plotsky PM (2001) Development of adult ethanol preference and anxiety as a consequence of neonatal maternal separation in Long Evans rats and reversal with antidepressant treatment. *Psychopharmacology.* **158**:366-73.
- Huttenlocher PR (1979) Synaptic density in human frontal cortex - developmental changes and effects of aging. *Brain. Res.* **163**:195-205.
- Huttenlocher PR (1984) Synapse elimination and plasticity in developing human cerebral cortex. *Am. J. Ment. Defic.* **88**:488-96.
- Huttenlocher PR, de Courten C (1987) The development of synapses in striate cortex of man. *Hum. Neurobiol.* **6**:1-9.
- Ichikawa M, Mastuoka M, Mori Y (1993) Effect of differential rearing on synapses and soma size in rat medial amygdaloid nucleus. *Synapse.* **13**:50-56.
- Ivanco TL, Racine RJ, Kolb B (2000) Morphology of layer III pyramidal neurons is altered following induction of LTP in sensorimotor cortex of the freely moving rat. *Synapse.* **37**:16-22.
- Joffe JM, Levine S (1973) Effects of weaning age and adult handling on avoidance conditioning, open-field behavior, and plasma corticosterone of adult rats. *Behav. Biol.* **9**:235-44.
- Kalin NH, Shelton SE, Barksdale CM (1987) Separation distress in infant rhesus monkeys: effects of diazepam and Ro 15-1788. *Brain. Res.* **408**:192-8.
- Kandel ER, Schwartz JH, Jessel TM (2000) Principles of neural science. *McGraw-Hill*. USA.
- Kenagy GJ, Place NJ, Veloso C (1999) Relation of glucocorticosteroids and testosterone to the annual cycle of free-living degus in semiarid central Chile. *Gen. Comp. Endocrinol.* **115**:236-43.
- Keverne EB (1999) GABA-ergic neurons and the neurobiology of schizophrenia and other psychoses. *Brain. Res. Bull.* **48**:467-73.
- Koch C, Zador A (1993) The function of dendritic spines: devices subserving biochemical rather than electrical compartmentalization. *J. Neurosci.* **13**:413-22.
- Kolb B (1984) Functions of the frontal cortex of the rat: a comparative review. *Brain. Res.* **320**:65-98.
- Kolb B, Whishaw IQ (1998) Brain plasticity and behavior. *Annu. Rev. Psychol.* **49**:43-64.
- Koob GF, Swerdlow NR (1988) The functional output of the mesolimbic dopamine system. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **537**:216-27.
- Korkotian E, Segal M (2000) Structure-function relations in dendritic spines: is size important? *Hippocampus.* **10**:587-95.
- Kosaka T, Katsumaru H, Hama K, Wu JY, Heizmann CW (1987) GABAergic neurons containing the Ca<sup>2+</sup>-binding protein parvalbumin in the rat hippocampus and dentate gyrus. *Brain. Res.* **419**:119-30.
- Kosofsky BE, Molliver ME (1987) The serotonergic innervation of cerebral cortex: different classes of axon terminals arise from dorsal and median raphe nuclei. *Synapse.* **1**:153-68.
- Krettek JE, Price JL (1977) The cortical projections of the mediodorsal nucleus and adjacent thalamic nuclei in the rat. *J. Comp. Neurol.* **171**:157-91.
- Kubota Y, Hattori R, Yui Y (1994) Three distinct subpopulations of GABAergic neurons in rat frontal agranular cortex. *Brain. Res.* **649**:159-73.
- Kuhn CM, Pauk J, Schanberg SM (1990) Endocrine responses to mother-infant separation in developing rats. *Dev. Psychobiol.* **23**:395-410.
- Kuhn CM, Schanberg SM (1998) Responses to maternal separation: mechanisms and mediators. *Int. J. Dev. Neurosci.* **16**:261-70.
- Laban O, Markovic BM, Dimitrijevic M, Jankovic BD (1995) Maternal deprivation and early weaning modulate experimental allergic encephalomyelitis in the rat. *Brain. Behav. Immun.* **9**:9-19.
- Lacaille JC, Schwartzkroin PA (1988) Stratum lacunosum-moleculare interneurons of hippocampal CA1 region. II. Intracellular and intradendritic recordings of local circuit synaptic interactions. *J. Neurosci.* **8**:1411-24.

- Ladd CO, Huot RL, Thirvikraman KV, Nemeroff CB, Meaney MJ, Plotsky PM (2000) Long-term behavioral and neuroendocrine adaptations to adverse early experience. *Prog. Brain. Res.* **122**:81-103.
- Lauder JM, Krebs H (1978) Serotonin as a differentiation signal in early neurogenesis. *Dev. Neurosci.* **1**:15-30.
- Lauder JM, Wallace JA, Krebs H (1981) Roles for serotonin in neuroembryogenesis. *Adv. Exp. Med. Biol.* **133**:477-506.
- Lehmann J, Feldon J (2000) Long-term biobehavioral effects of maternal separation in the rat: consistent or confusing? *Rev. Neurosci.* **11**:383-408.
- Lephart ED, Watson MA (1999) Maternal separation: hypothalamic-preoptic area and hippocampal calbindin-D28K and calretinin in male and female infantile rats. *Neurosci. Lett.* **267**:41-4.
- Levine S (1994) The ontogeny of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. The influence of maternal factors. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **746**:275-88; discussion 289-93.
- Levine S (2001) Primary social relationships influence the development of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in the rat. *Physiol. Behav.* **73**:255-60.
- Levine S, Wiener SG, Coe CL (1993) Temporal and social factors influencing behavioral and hormonal responses to separation in mother and infant squirrel monkeys. *Psychoneuroendocrinology.* **18**:297-306.
- Lewis DA, Pierri JN, Volk DW, Melchitzky DS, Woo TU (1999) Altered GABA neurotransmission and prefrontal cortical dysfunction in schizophrenia. *Biol. Psychiatry.* **46**:616-26.
- Li XM, Perry KW, Wong DT (1999) Difference in the in vivo influence of serotonin1A autoreceptors on serotonin release in prefrontal cortex and dorsal hippocampus of the same rat treated with fluoxetine. *Chin. J. Physiol.* **42**:53-9.
- Liebsch G, Montkowski A, Holsboer F, Landgraf R (1998) Behavioural profiles of two Wistar rat lines selectively bred for high or low anxiety-related behaviour. *Behav. Brain. Res.* **94**:301-10.
- Lindvall O, Björklund A, Divac I (1978) Organization of catecholamine neurons projecting to the frontal cortex in the rat. *Brain. Res.* **142**:1-24.
- Lipton SA, Kater SB (1989) Neurotransmitter regulation of neuronal outgrowth, plasticity and survival. *Trends. Neurosci.* **12**:265-70.
- Liu D, Diorio J, Day JC, Francis DD, Meaney MJ (2000) Maternal care, hippocampal synaptogenesis and cognitive development in rats. *Nat. Neurosci.* **3**:799-806.
- Liu D, Diorio J, Tannenbaum B, Caldji C, Francis D, Freedman A, Sharma S, Pearson D, Plotsky PM, Meaney MJ (1997) Maternal care, hippocampal glucocorticoid receptors, and hypothalamic-pituitary-adrenal responses to stress. *Science.* **277**:1659-62.
- Lohof AM, Delhaye-Bouchaud N, Mariani J (1996) Synapse elimination in the central nervous system: functional significance and cellular mechanisms. *Rev. Neurosci.* **7**:85-101.
- Lonstein JS, De Vries GJ (1999) Comparison of the parental behavior of pair-bonded female and male prairie voles (*Microtus ochrogaster*). *Physiol. Behav.* **66**:33-40.
- Lopez L, Vazquez D, Chalmers D, Watson S (1997) Regulation of 5-HT receptors and the hypothalamic-pituitary-adrenal axis: implications for the neurobiology of suicide. *Ann. NY. Acad. Sci.* **386**:106-134.
- Lorenz K (1935) Der Kumpan in der Welt des Vogels. *J. Ornithol.* **83**:137-413.
- Loscher W, Honack D (1993) Effects of the novel 5-HT1A receptor antagonist, (+)-WAY 100135, on stereotyped behaviour induced by the NMDA receptor antagonist dizocilpine in rats. *Eur. J. Pharmacol.* **242**:99-104.
- Lowrey LG (1940) Personality distortion and early institutional care. *Am. J. Orthopsychiatry.* **10**:576-585.
- Maeda H (1994) A theoretical and neurophysiological consideration on the pathogenesis of positive symptoms of schizophrenia: implications of dopaminergic function in the emotional circuit. *Jpn. J. Psychiatry. Neurol.* **48**:99-110.
- Marin-Padilla M (1970) Prenatal and early postnatal ontogenesis of the human motor cortex: a golgi study. I. The sequential development of the cortical layers. *Brain. Res.* **23**:167-83.
- Markus EJ, Petit TL, LeBoutillier JC (1987) Synaptic structural changes during development and aging. *Brain. Res.* **432**:239-48.
- Marshak DR (1990) S100 beta as a neurotrophic factor. *Prog. Brain. Res.* **86**:169-81.

- McCormick DA (1992) Neurotransmitter actions in the thalamus and cerebral cortex. *J. Clin. Neurophysiol.* **9**:212-23.
- McCormick DA, Prince DA (1985) Two types of muscarinic response to acetylcholine in mammalian cortical neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **82**:6344-8.
- McMahon LL, Kauer JA (1997) Hippocampal interneurons are excited via serotonin-gated ion channels. *J. Neurophysiol.* **78**:2493-502.
- Meaney MJ, Aitken DH, van Berkel C, Bhatnagar S, Sapolsky RM (1988) Effect of neonatal handling on age-related impairments associated with the hippocampus. *Science.* **239**:766-8.
- Meaney MJ, Diorio J, Francis D, Widdowson J, LaPlante P, Caldji C, Sharma S, Seckl JR, Plotsky PM (1996) Early environmental regulation of forebrain glucocorticoid receptor gene expression: implications for adrenocortical responses to stress. *Dev. Neurosci.* **18**:49-72.
- Miura H, Qiao H, Ohta T (2002) Influence of aging and social isolation on changes in brain monoamine turnover and biosynthesis of rats elicited by novelty stress. *Synapse.* **46**:116-24.
- Morilak DA, Garlow SJ, Ciaranello RD (1993) Immunocytochemical localization and description of neurons expressing serotonin<sub>2</sub> receptors in the rat brain. *Neuroscience.* **54**:701-17.
- Moser MB, Trommald M, Andersen P (1994) An increase in dendritic spine density on hippocampal CA1 pyramidal cells following spatial learning in adult rats suggests the formation of new synapses. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **91**:12673-5.
- Müller W, Connor JA (1991) Dendritic spines as individual neuronal compartments for synaptic Ca<sup>2+</sup> responses. *Nature.* **354**:73-6.
- Mulligan KA, Tork I (1988) Serotonergic innervation of the cat cerebral cortex. *J. Comp. Neurol.* **270**:86-110.
- Nimchinsky EA, Oberlander AM, Svoboda K. (2001) Abnormal development of dendritic spines in FMR1 knock-out mice. *J. Neurosci.* **21**:5139-46.
- Olivier B, Molewijk E, van Oorschoot R, van der Heyden J, Ronken E, Mos J (1998) Rat pup ultrasonic vocalization: effects of benzodiazepine receptor ligands. *Eur. J. Pharmacol.* **358**:117-28.
- Ovtscharoff W Jr, Braun K (2001) Maternal separation and social isolation modulate the postnatal development of synaptic composition in the infralimbic cortex of Octodon degus. *Neuroscience.* **104**:33-40.
- Papa M, Segal M (1996) Morphological plasticity in dendritic spines of cultured hippocampal neurons. *Neuroscience.* **71**:1005-11.
- Paris J, Zweig-Frank H, Guzder J (1994) Risk factors for borderline personality in male outpatients. *J. Nerv. Ment. Dis.* **182**:375-80.
- Parker G, (1993) Parental rearing style : examining for links with personality vulnerability factors for depression. *Soc. Psychiatry. Psychiatr. Epidemiol.* **28**:97-100.
- Parker G, Gladstone G, Mitchell P, Wilhelm K, Roy K (2000) Do early adverse experiences establish a cognitive vulnerability to depression on exposure to mirroring life events in adulthood? *J. Affect. Disord.* **57**:209-15.
- Parker G, Hadzi-Pavlovic D, Greenwald S, Weissman M (1995) Low parental care as a risk factor to lifetime depression in a community sample. *J. Affect. Disord.* **33**:173-80.
- Pihoker C, Owens MJ, Kuhn CM, Schanberg SM, Nemeroff CB (1993) Maternal separation in neonatal rats elicits activation of the hypothalamic-pituitary-adrenocortical axis: a putative role for corticotropin-releasing factor. *Psychoneuroendocrinology.* **18**:485-93.
- Plotsky PM, Meaney MJ (1993) Early, postnatal experience alters hypothalamic corticotropin-releasing factor (CRF) mRNA, median eminence CRF content and stress-induced release in adult rats. *Brain. Res. Mol. Brain. Res.* **18**:195-200.
- Poeggel G, Braun K (1996) Early auditory filial learning in degus (Octodon degus): behavioral and autoradiographic studies. *Brain. Res.* **743**:162-70.
- Poljakow GI (1979) Entwicklung der Neurone der menschlichen Großhirnrinde. VEB Georg Thieme Verlag, Leipzig.
- Pryce CR, Bettschen D, Feldon J (2001) Comparison of the effects of early handling and early deprivation on maternal care in the rat. *Dev. Psychobiol.* **38**:239-51.
- Rakic P, Bourgeois JP, Eckenhoff MF, Zecevic N, Goldman-Rakic PS (1986) Concurrent overproduction of synapses in diverse regions of the primate cerebral cortex. *Science.* **232**:232-5.

- Rausch G, Scheich H (1982) Dendritic spine loss and enlargement during maturation of the speech control system in the mynah bird (*Gracula religiosa*). *Neurosci. Lett.* **29**:129-33.
- Reynolds TJ, Wright JW (1979) Early postnatal physical and behavioural development of degus (*Octodon degus*). *Lab. Anim.* **13**:93-9.
- Rollenhagen A, Bischof HJ (1991) Rearing conditions affect neuron morphology in a telencephalic area of the zebra finch. *Neuroreport.* **2**:711-4.
- Rollenhagen A, Bischof HJ (1994) Phase specific morphological changes induced by social experience in two forebrain areas of the zebra finch. *Behav. Brain. Res.* **65**:83-8.
- Rollenhagen A, Bischof HJ (1994) Spine morphology of neurons in the avian forebrain is affected by rearing conditions. *Behav. Neural. Biol.* **62**:83-9.
- Rollenhagen A, Bischof HJ (1996) Activity-dependent plasticity in visual forebrain areas of the zebra finch. *Behav. Brain. Res.* **81**:207-13.
- Roceri M, Hendriks W, Racagni G, Ellenbroek BA, Riva MA (2002) Early maternal deprivation reduces the expression of BDNF and NMDA receptor subunits in rat hippocampus. *Mol. Psychiatry.* **7**:609-16.
- Ropert N, Guy N (1991) Serotonin facilitates GABAergic transmission in the CA1 region of rat hippocampus in vitro. *J. Physiol.* **441**:121-36.
- Rose JE, Woolsey CN (1948) The orbitofrontal cortex and its connections with the mediodorsal nucleus in rabbit, sheep and cat. *Res. Publ. Assoc. Nerv. & Ment. Dis.* **27**:210-32.
- Rosenfeld P, Gutierrez YA, Martin AM, Mallett HA, Alleva E, Levine S (1991) Maternal regulation of the adrenocortical response in preweanling rats. *Physiol. Behav.* **50**:661-71.
- Rosenzweig MR, Bennett EL (1996) Psychobiology of plasticity: effects of training and experience on brain and behavior. *Behav. Brain Res.* **78**:57-65.
- Sanacora G, Mason GF, Rothman DL, Behar KL, Hyder F, Petroff OA, Berman RM, Charney DS, Krystal JH (1999) Reduced cortical gamma-aminobutyric acid levels in depressed patients determined by proton magnetic resonance spectroscopy. *Arch. Gen. Psychiatry.* **56**:1043-7.
- Sanchez-Toscano F, Sanchez MM, Garzon J (1991) Changes in the number of dendritic spines in the medial preoptic area during a premature long-term social isolation in rats. *Neurosci. Lett.* **122**:1-3.
- Sawchenko PE, Imaki T, Potter E, Kovacs K, Imaki J, Vale W (1993) The functional neuroanatomy of corticotropin-releasing factor. *Ciba. Found. Symp.* **172**:5-21; discussion 21-9.
- Schanberg SM, Field TM (1987) Sensory deprivation stress and supplemental stimulation in the rat pup and preterm human neonate. *Child. Dev.* **58**:1431-47.
- Schechter LE, Dawson LA, Harder JA (2002) The potential utility of 5-HT1A receptor antagonists in the treatment of cognitive dysfunction associated with Alzheimer's disease. *Curr. Pharm. Des.* **8**:139-45.
- Scheich H (1987) Neural correlates of auditory filial imprinting. *J. Comp. Physiol.* **161**:605-19.
- Schnabel R, Herzog A, Michaelis B, Braun K (2002) Parental deprivation induces changes of distinct shape parameters of dendritic spines in the anterior cingulate cortex of *Octodon degus*. *Abstract Viewer/Itinerary Planner. Washington, DC: Society for Neuroscience, 2002.* Program No. 130.4. CD-ROM. *Abstract.*
- Schönheit B, Haensel P (1988) Neurohistologic studies of cortical pyramidal neurons in the rat following rehabilitation of early postnatal malnutrition. *J. Hirnforsch.* **29**:599-615.
- Schulz E, Renner J, Meyer U (1992) Quantitative analysis of lamina III pyramidal neurons in the parietal cortex of newborns. *J. Hirnforsch.* **33**:661-72.
- Sesack SR, Snyder CL, Lewis DA (1995) Axon terminals immunolabeled for dopamine or tyrosine hydroxylase synapse on GABA-immunoreactive dendrites in rat and monkey cortex. *J. Comp. Neurol.* **363**:264-80.
- Segal M (1990) Serotonin attenuates a slow inhibitory postsynaptic potential in rat hippocampal neurons. *Neuroscience.* **36**:631-41.
- Segal M (2001) Rapid plasticity of dendritic spine: hints to possible functions? *Prog. Neurobiol.* **63**:61-70.
- Segal I, Korkotian I, Murphy DD (2000) Dendritic spine formation and pruning: common cellular mechanisms? *Trends. Neurosci.* **23**:53-7.

- Sheldon PW, Aghajanian GK (1990) Serotonin (5-HT) induces IPSPs in pyramidal layer cells of rat piriform cortex: evidence for the involvement of a 5-HT<sub>2</sub>-activated interneuron. *Brain. Res.* **506**:62-9.
- Sirevaag AM, Greenough WT (1988) A multivariate statistical summary of synaptic plasticity measures in rats exposed to complex, social and individual environments. *Brain. Res.* **441**:386-392.
- Skeels HM (1966) Adult status of children with contrasting early life experiences. A follow-up study. *Monogr. Soc. Res. Child. Dev.* **31**:1-56.
- Smiley JF, Goldman-Rakic PS (1993) Heterogeneous targets of dopamine synapses in monkey prefrontal cortex demonstrated by serial section electron microscopy: a laminar analysis using the silver-enhanced diaminobenzidine sulfide (SEDS) immunolabeling technique. *Cereb. Cortex.* **3**:223-38.
- Smiley JF, Goldman-Rakic PS (1996) Serotonergic axons in monkey prefrontal cerebral cortex synapse predominantly on interneurons as demonstrated by serial section electron microscopy. *J. Comp. Neurol.* **367**:431-43.
- Smiley JF, Levey AI, Ciliax BJ, Goldman-Rakic PS (1994) D1 dopamine receptor immunoreactivity in human and monkey cerebral cortex: predominant and extrasynaptic localization in dendritic spines. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **91**:5720-4.
- Smotherman WP, Brown CP, Levine S (1977) Maternal responsiveness following differential pup treatment and mother-pup interactions. *Horm. Behav.* **8**:242-53.
- Smythe JW, Rowe WB, Meaney MJ (1994) Neonatal handling alters serotonin (5-HT) turnover and 5-HT<sub>2</sub> receptor binding in selected brain regions: relationship to the handling effect on glucocorticoid receptor expression. *Brain. Res. Dev. Brain. Res.* **80**:183-9.
- Spear LP, Scalzo FM (1985) Ontogenetic alterations in the effects of food and/or maternal deprivation on 5-HT, 5-HIAA and 5-HIAA/5-HT ratios. *Brain. Res.* **350**:143-57.
- Spitz RA (1945) Hospitalism: an inquiry into the genesis of psychiatric conditions in early childhood. *Psychoanal. Study. Child.* **1**: 53-74.
- Sprouse JS, Aghajanian GK (1987) Electrophysiological responses of serotonergic dorsal raphe neurons to 5-HT<sub>1A</sub> and 5-HT<sub>1B</sub> agonists. *Synapse.* **1**:3-9.
- Struble RG, Riesen AH (1978) Changes in cortical dendritic branching subsequent to partial social isolation in stump-tailed monkeys. *Dev. Psychobiol.* **11**:479-86.
- Suomi SJ (1997) Early determinants of behaviour: evidence from primate studies. *Br. Med. Bull.* **53**:170-84.
- Swanson LW (1981) A direct projection from Ammon's horn to prefrontal cortex in the rat. *Brain. Res.* **217**:150-4.
- Tennant C, Bernardi E (1988) Childhood loss in alcoholics and narcotic addicts. *Br. J. Addict.* **83**:695-703.
- Trainor BC, Marler CA (2001) Testosterone, paternal behavior, and aggression in the monogamous California mouse (*Peromyscus californicus*). *Horm. Behav.* **40**:32-42.
- Trause MA, Voos D, Rudd C, Klaus M, Kennell J, Boslett M (1981) Separation for childbirth: the effect on the sibling. *Child. Psychiatry. Hum. Dev.* **12**:32-9.
- Trommald M, Hulleberg G, Andersen P (1996) Long-term potentiation is associated with new excitatory spine synapses on rat dentate granule cells. *Learn. Mem.* **3**:218-28.
- Turner AM, Greenough WT (1985) Differential rearing effects on rat visual cortex synapses. I. Synaptic and neuronal density and synapses per neuron. *Brain. Res.* **329**:195-203.
- Uphouse L (1997) Multiple serotonin receptors: too many, not enough, or just the right number? *Neurosci. Biobehav. Rev.* **21**:679-98.
- Uylings HB, van Eden CG (1990) Qualitative and quantitative comparison of the prefrontal cortex in rat and in primates, including humans. *Prog. Brain. Res.* **85**:31-62.
- Van Eden CG, Uylings HB (1985) Cytoarchitectonic development of the prefrontal cortex in the rat. *J. Comp. Neurol.* **241**:253-67.
- Van Eden CG, Uylings HB (1985) Postnatal volumetric development of the prefrontal cortex in the rat. *J. Comp. Neurol.* **241**:268-74.
- van Oers HJ, de Kloet ER, Whelan T, Levine S (1998) Maternal deprivation effect on the infant's neural stress markers is reversed by tactile stimulation and feeding but not by suppressing corticosterone. *J. Neurosci.* **18**:10171-9.

- Verwer RW, Van Vulpen EH, Van Uum JF (1996) Postnatal development of amygdaloid projections to the prefrontal cortex in the rat studied with retrograde and anterograde tracers. *J. Comp. Neurol.* **376**:75-96.
- Volkmar FR, Greenough WT (1972) Rearing complexity affects branching of dendrites in the visual cortex of the rat. *Science.* **176**:1145-7.
- Volpe JJ (1987) Neuronal proliferation, migration, organization and myelination. *Neurol. Of the newborn.* 33-68. Philadelphia, London.
- Vu DH, Törk I (1992) Differential development of the dual serotonergic fiber system in the cerebral cortex of the cat. *J. Comp. Neurol.* **317**:156-74.
- Wallhäußer-Franke E, Nixdorf-Bergweiler BE, DeVoogd TJ (1995) Song isolation is associated with maintaining high spine frequencies on zebra finch 1MAN neurons. *Neurobiol. Learn. Mem.* **64**:25-35.
- Wallhäußer E, Scheich H (1987) Auditory imprinting leads to differential 2-deoxyglucose uptake and dendritic spine loss in the chick rostral forebrain. *Brain. Res.* **428**:29-44.
- Webb SJ, Monk CS, Nelson CA (2001) Mechanisms of postnatal neurobiological development: implications for human development. *Dev. Neuropsychol.* **19**:147-71.
- Whitaker-Azmitia PM, Azmitia EC (1994) Astroglial 5-HT<sub>1a</sub> receptors and S-100 beta in development and plasticity. *Perspect. Dev. Neurobiol.* **2**:233-8.
- Wilson MA, Molliver ME (1991) The organization of serotonergic projections to cerebral cortex in primates: retrograde transport studies. *Neuroscience.* **44**:555-70.
- Wilson SC (1982) Contact-promoting behavior, social development, and relationship with parents in sibling juvenile degus (*Octodon degus*). *Dev. Psychobiol.* **15**:257-68.
- Wilson CC, Faber KM, Haring JH (1998) Serotonin regulates synaptic connections in the dentate molecular layer of adult rats via 5-HT<sub>1a</sub> receptors: evidence for a glial mechanism. *Brain. Res.* **782**:235-9.
- Winterfeld KT, Teuchert-Noodt G, Dawirs RR (1998) Social environment alters both ontogeny of dopamine innervation of the medial prefrontal cortex and maturation of working memory in gerbils (*Meriones unguiculatus*). *J. Neurosci. Res.* **52**:201-9.
- Wright SL, Brown RE (2000) Maternal behavior, paternal behavior, and pup survival in CD-1 albino mice (*Mus musculus*) in three different housing conditions. *J. Comp. Psychol.* **114**:183-92.
- Wright SL, Brown RE (2002) The importance of paternal care on pup survival and pup growth in *Peromyscus californicus* when required to work for food. *Behav. Processes.* **60**:41-52.
- Yan W, Wilson CC, Haring JH (1997) 5-HT<sub>1a</sub> receptors mediate the neurotrophic effect of serotonin on developing dentate granule cells. *Brain. Res. Dev. Brain. Res.* **98**:185-90.
- Yilmazer-Hanke DM, Faber-Zuschratter H, Linke R, Schwegler H (2002) Contribution of amygdala neurons containing peptides and calcium-binding proteins to fear-potentiated startle and exploration-related anxiety in inbred Roman high- and low-avoidance rats. *Eur. J. Neurosci.* **15**:1206-18.
- Zecevic N, Bourgeois JP, Rakic P (1989) Changes in synaptic density in motor cortex of rhesus monkey during fetal and postnatal life. *Brain. Res. Dev. Brain. Res.* **50**:11-32.
- Ziabreva I (2000) Charakterisierung neurochemischer Veränderungen im limbischen System von Strauchratten (*Octodon degus*) nach früher Sozialdeprivation mittels quantitativer Rezeptorautoradiographie. *Dissertationsschrift.* Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg.
- Ziabreva, I, Poeggel G, Schnabel R, Braun K (2003) Separation-induced receptor changes in the hippocampus and amygdala of *Octodon degus*: Influence of maternal vocalizations. *J. Neurosci.* Im Druck.
- Ziabreva I, Schnabel R, Braun K (2000) Mother's voice protects from separation-induced changes of 5-HT<sub>1A</sub> and GABA<sub>A</sub> receptors. *Eur. J. Neurosci.* 12 (Suppl. 11), p87. *Abstract.*
- Ziabreva I, Schnabel R, Poeggel G, Braun K (2003) Mother's voice "buffers" separation-induced receptor changes in the prefrontal cortex of *Octodon degus*. *Neuroscience.* Im Druck.

## VIII. Anhang

### Durchführung der Golgi-Cox-Färbung

#### *Imprägnierung*

Es wurden drei verschiedene, wässrige Lösungen angesetzt:

Lösung A:	5% $K_2Cr_2O_7$	(Kaliumbichromat)
Lösung B:	5% $HgCl_2$	(Quecksilber-2-chlorid)
Lösung C:	5% $K_2CrO$	(Kaliumchromat)

Die Prozentangaben sind als Gewichtsprocente zu verstehen. Aus den drei Lösungen wurden zwei neue gemischt.

Lösung D:	Lösung A + Lösung B (1:1)
Lösung E:	Lösung C + aqua dest. (1:2,5)

Aus diesen Lösungen wurde die eigentliche Golgi-Cox-Lösung hergestellt, indem 1000 ml von Lösung D unter Rühren zu 1400 ml von Lösung E gegeben wurden. Diese Lösung wurde im Dunkeln bei Zimmertemperatur in einer braunen Auslaufflasche aufbewahrt. Bis zur erstmaligen Verwendung musste sie, wegen der Präzipitatbildung, mindestens 5 Tage stehen.

Die unfixierten Gehirne wurden 14 Tage bei Zimmertemperatur im Dunkeln in der Golgi-Lösung aufbewahrt. Das Volumen der Lösung betrug 50 ml. Anschließend wurden die Hirne in einer aufsteigenden Alkoholreihe und einem Ethanol-Ether-Gemisch nach folgendem Protokoll entwässert und in Celloidin (Fluka Chemie AG, Switzerland) eingebettet:

1. Waschen in aqua dest. 3 x je 2 min
2. langsames Entwässern im Kühlschrank (4-6°C)

50% Ethanol	4 h
70% Ethanol	über Nacht
80% Ethanol	über Nacht
96% Ethanol	über Nacht
96% Ethanol	über Nacht

## 3. Einbettung der Gehirne im Dunkeln bei Zimmertemperatur

100% Ethanol-Diethylether (1:1)	2 h
2% Celloidin	3 d
4% Celloidin	3 d
8% Celloidin	3 d

Danach wurden die Gehirne in 8-10%iger Celloidinmasse in einem Eindampfglas orientiert und in einem Exikator über Nacht bei geöffnetem Hahn stehen gelassen. Im Anschluss daran wurde in einem zweiten Schälchen bei geschlossenem Hahn das Trocknungsmittel Phosphorpentoxid (Fluka Chemie AG, Switzerland) dazugestellt, bis die Celloidinmasse etwa auf die Hälfte reduziert war. Nach Entfernen des Phosphorpentoxids wurde in einer Schale Chloroform in den Exikator gegeben. Dadurch polymerisierte das Celloidin in 1-2 Tagen aus. Der ausgehärtete Celloidinblock wurde dann in der gewünschten Form zugeschnitten und in 70%igem Alkohol im Kühlschrank einige Tage aufbewahrt, wodurch das Celloidin zur völligen Aushärtung gelangte. Der schneidfähige Block kann in 70%igem Ethanol im Kühlschrank (4-6°C) unbegrenzt aufbewahrt werden.

Zum Schneiden wurde der Block auf einen Holzklötz gelehrt (Kleber: Roticoll, Carl-Roth GmbH, Karlsruhe, Germany).

Mit einem Schlittenmikrotom (Microm, Heidelberg) wurden 150 µm dicke Transversalschnitte angefertigt. Das Messer wurde während des Schneidens mit 70%igem Ethanol befeuchtet, um ein Austrocknen zu verhindern. Die Schnitte wurden in 70%igem Ethanol aufgefangen und bis zur weiteren Verarbeitung am folgenden Tag kühl (4-6°C) und dunkel aufbewahrt.

*Reduktion der Gehirnschnitte*

1. Wässern mit aqua dest.	2 x je 5 min
2. Reduktion in alkalischer Lösung NH <sub>3</sub> : H <sub>2</sub> O (1:1)	40 – 50 min
3. Vertiefen der Schwärzung 0,5% Phenylendiamin I (Merck, Germany)	1 min
Vertiefen der Schwärzung 0,5% Phenylendiamin II	4 min
4. Wässern mit aqua dest.	2 x je 2 min
5. Stabilisieren der Imprägnation 1% Dektol (Kodak, Germany)	2 min
6. Wässern mit aqua dest.	2 x je 1 min
7. Stabilisieren der Imprägnation 5% Tetenal (Kodak, Germany)	5 min
8. Wässern mit aqua dest.	3 x je 5 min
9. Entwässern der Schnitte	

50% Ethanol	3 min
70% Ethanol	3 min
80% Ethanol	3 min
96% Ethanol	3 min

#### 10. Klären der Schnitte

Isopropanol (Optal) : 96% Ethanol (2:1)	2 x je 5 min
Isopropanol (Optal, Roth, Germany)	1 x 5 min
Xylol	3 x 5 min

Anschließend wurden die Schnitte zwischen zwei Deckgläschen in Merckoglas (Merck, Darmstadt, Germany) eingedeckelt, um sie später unter dem Mikroskop von zwei Seiten betrachten zu können.

#### Immunohistochemie

Drei Serien wurden für Fluoreszenz doppelgefärbt mit entweder 1) Mouse anti- $\alpha$ -Parvalbumin (PV, Maus-IgG, Sigma-Aldrich, Deisenhofen, Germany), 2) Mouse anti-Calbindin (CaBP-D28k, Maus-IgG, SWANT, Switzerland) oder 3) Mouse anti-Calretinin (CaR, Maus-IgG, Transduction Laboratories, USA) und Rabbit anti-Corticotropin-Releasing-Factor (CRF, Kaninchen-IgG, Peninsula Laboratories, Inc., USA). Die vierte Serie wurde in einer Einfachfärbung gegen Glutamatdecarboxylase (Rabbit anti-GAD, Kaninchen-IgG, Chemicon International, Ltd., Hofheim, Germany) gefärbt.

Bei den folgenden Reaktionsschritten wurde für alle nicht anders gekennzeichneten Wasch- und Inkubationsschritte 0,1 M PBS mit einem pH-Wert von 7,4 verwendet. Für eine bessere Spülung und Reaktion wurden bei allen Wasch- und Inkubationsschritten die Gewebekulturplatten auf einen Schüttler gestellt. Zur Vermeidung von Reaktionsunterschieden durchliefen alle Schnittserien exakt die gleiche Behandlung:

- dreimal Waschen in PBS
- Inkubation mit 10% Methanol und 1% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in PBS zur Unterdrückung der endogenen Peroxidase-Aktivität (45 min)
- Waschen in PBS bis dieses blasenfrei war
- Vorinkubation mit 2% Ziege-Normal-Serum (ZNS, DAKO, Hamburg, Germany) und 0,3% Triton-X-100 (Sigma-Aldrich, Deisenhofen, Germany) zur Perforierung der

Zellmembranen ermöglicht es den Antikörpern tiefer in das Gewebe einzudringen, in PBS (1 h)

- Primärantikörperinkubation: 1% ZNS, 0,05% Triton-X-100 und 1) Maus-anti-PV (1:5000) und Kaninchen-anti-CRF (1:8000), 2) Maus-anti-CaBP-D28k (1:2500) und Kaninchen-anti-CRF (1:8000), 3) Maus-anti-CaR (1:2500) und Kaninchen-anti-CRF (1:8000) über Nacht bei 4°C, 4) Kaninchen-anti-GAD (1:2000) zwei Tage bei 4°C.
- dreimal Waschen in PBS
- Zweitantikörperinkubation/Serien 1-3: Alexa 488 (anti-Maus-Ig, 1:250, grün fluoreszierend) und Alexa 594 (anti-Kaninchen-Ig, 1:375, rot fluoreszierend), 1% ZNS und 0,01% Triton-X-100 in PBS (25 min)
- Serien 1-3: dreimal Waschen in PBS, Aufziehen der Schnitte aus aqua dest. auf unbeschichtete Objektträger im Dunkeln, Eindeckeln in Fluoromount (Fluka Chemie AG, Switzerland)
- Zweitantikörperinkubation/Serie 4: Ziege-anti-Maus-Immunglobulin (Ig), biotinyliert (1:200, Amersham, Little Chalfont, UK), 1% ZNS und 0,01% Triton-X-100 in PBS (2 h)
- Serie 4: einmal Waschen in PBS, zweimal Waschen in PB (pH=7,6)
- Serie 4: Inkubation mit einem Extravidin/Peroxidase Komplex (1:200, Sigma-Aldrich, Deisenhofen, Germany) in PB (2 h)
- DAB-Nickel-Reaktion/Serie 4:
  - zweimal Waschen in PB
  - zweimal Waschen in 50 mM Tris-HCL-Puffer (pH=7,6)

*Chemikalien:*

- 0,05 mM Tris- HCL (pH=7,6) (Sigma-Aldrich, Deisenhofen, Germany)
- Ammoniumnickelsulfat (Riedel-de Haën AG, Seelze, Germany)
- DAB (Sigma-Aldrich, Deisenhofen, Germany)
- H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Sigma-Aldrich, Deisenhofen, Germany)
- PB- Puffer (pH =7,4)

*Reaktionslösung:*

- 0,5 g Ammoniumnickelsulfat in etwas Tris-HCL Puffer vorlösen

- 0,0125 g DAB ebenfalls in Tris-HCL Puffer vorlösen (extra Gefäß)
- beide Lösungen zusammen mit Tris-HCL auf 25 ml ins Becherglas auffüllen
- Lösung durch ein Millipore-Filter (Sartorius, Germany) mit einer Einwegspritze filtrieren
- 250 µl einer 1%igen H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Lösung (erst kurz vor dem Auftragen auf die Schnitte) zur fertigen Reaktionslösung dazugeben (2-5 min)
- Abstoppen durch Waschen mit PB
- Schnitte auf Chrom-Alaun-Gelatine beschichtete Objektträger aus Leitungswasser aufziehen und trocknen lassen
- Entwässerung: aufsteigende Alkoholreihe (70%, 96%, Optal, Xylol)
- Einbettung über Histoclear in Histomount (Life Sciences International, Frankfurt, Germany)

Parallel wurden jeweils einige Kontrollschnitte angefertigt. Die Behandlung erfolgte wie oben beschrieben, allerdings ohne die Zugabe des Primärantikörpers. Als Ergebnis zeigte sich keine immunopositive Farbreaktion.

### Messung von ACTH und Cortisol im Blutplasma

Die Messungen der basalen Blutwerte von ACTH und Cortisol wurden in Zusammenarbeit mit Prof. Claus Luley und Dr. Sabine Westphal vom Institut für Klinische Chemie und Biochemie der Medizinischen Fakultät der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg durchgeführt.

#### *ACTH-IMMULITE-Test*

- langsames Auftauen der tiefgefrorenen Plasma-Proben im Eisbad
- Lagerung der Proben bis zur Messung bei  $\leq 4^{\circ}\text{C}$
- Proben mit ACTH-Konzentrationen von über 1250 pg/ml müssen mit ACTH-Verdünnungspuffer verdünnt und erneut bestimmt werden
- erforderliche Probenmenge: 75 µl

- Messbereich bis: 1250 pg/ml
- Analytische Sensitivität: 9 pg/ml
- Kontrollen: DPC ACTH-Kontrollmodul

Der vollautomatische Festphasen-Sandwich-Chemilumineszenz-Enzymimmunoassay (DPC Diagnostic Products Corporation, Los Angeles, USA, DPC Biermann GmbH, Bad Nauheim, Germany) dient zur quantitativen Bestimmung von ACTH in EDTA-Plasma. Als Festphase wird eine mit spezifischen, monoklonalen ACTH-Antikörpern von der Maus beschichtete Polystyrolkugel verwendet. Diese Kugel ist Bestandteil des IMMULITE-Teströhrchens. ACTH aus der Probe wird während der ersten 30minütigen Inkubation an den Festphasenantikörper gebunden. In der darauffolgenden 30minütigen Inkubation bindet ein zweiter, mit alkalischer Phosphatase markierter polyklonaler Antikörper (Kaninchen) an das gebundene ACTH. Es entsteht ein sogenannter Sandwichkomplex. Beide Reaktionen laufen bei 37°C ab.

Ungebundene Komponenten werden anschließend mittels einer speziellen Zentrifugal-Waschtechnik entfernt.

Zugegebenes Chemilumineszenz-Substrat wird vom gebundenen Enzym während der folgenden 10minütigen Inkubation umgesetzt. Die dabei ausgelöste Lichtemission ist der ACTH-Konzentration in den Proben direkt proportional.

Bestandteile des Tests:

- ACTH-Teströhrchen enthalten Polystyrolkugeln beschichtet mit ACTH-Antikörpern (monoklonal, Maus), barcodiert
- ACTH-Reagenzmodul A enthält Protein-Puffer/Serum-Matrix, barcodiert
- ACTH-Reagenzmodul B enthält ACTH-Antikörper (polyklonal, Kaninchen), konjugiert mit alkalischer Phosphatase, barcodiert
- ACTH-Kalibratoren, Sollwerte im Barcode des Kits gespeichert in 2 Konzentrationen, Rinderprotein-Matrix, lypophylisiert
- ACTH-Verdünnungspuffer, ACTH-freie, bovine proteinbasierte Matrix
- Chemilumineszenz-Substratmodul, Adamantyldioxetanphosphat in Puffermatrix
- Waschmodul, Konzentrat
- Reinigungsmodul
- Reinigungslösung

- Probenträger, barcodiert, wiederverwendbar
- Probenröhrchen, Einwegmaterial

#### *IMMULITE 2000 Cortisol*

- langsames Auftauen der tiefgefrorenen Plasma-Proben im Eisbad
- Lagerung der Proben bis zur Messung bei  $\leq 4^{\circ}\text{C}$
- erforderliche Probenmenge: 10  $\mu\text{l}$  Serum
- Messbereich bis: 1 - 50  $\mu\text{g/dl}$
- Analytische Sensitivität: 0,20  $\mu\text{g/dl}$

Zur Diagnostik bzw. Quantitativen Bestimmung von Cortisol im Serum wird das IMMULITE 2000-System genutzt. Der kompetitive Immunoassay hat einen Inkubationszyklus von 30 Minuten und ist hochspezifisch für Cortisol.

Bestandteile des Tests:

- barcodierter Cortisol Kugel-Container, mit polyklonalem Cortisol-Antikörper (Hase) beschichtete Kugeln
- barcodierter Behälter für Cortisol-Reagenzien, enthält 11,5 ml alkalische Phosphatase, konjugiert mit Cortisol in einem Puffer
- Cortisol-Justierstandards mit jeweils 3 ml Cortisol in behandeltem Serum
- Chemilumineszenz-Substratmodul
- Waschmodul
- Reinigungsmodul
- Reaktionsgefäße, Einwegmaterial
- Teströhrchen zur Probenverdünnung
- Kontrollen

## Tabellen

**Tabelle 1:** Mittelwerte und Standardabweichungen der Dichte von Apikalspines, angegeben in der Anzahl der Spines/10µm:

Käfig	Verzweigungsordnung					Gesamt
	1.	2.	3.	4.	5.	
P0 sozial	2,4 ± 1,9	4,1 ± 1,9	5,4 ± 1,7	5,8 ± 1,6	6,3 ± 1,8	5,6 ± 1,3
P14 sozial	2,9 ± 2,1	7,4 ± 3,5	8,5 ± 2,8	8,3 ± 3,1	8,4 ± 3,2	8,0 ± 2,6
P21 sozial	1,8 ± 1,5	6,3 ± 3,5	9,7 ± 3,3	10,1 ± 2,6	10,6 ± 2,8	9,4 ± 2,2
P45 sozial	2,5 ± 1,9	5,7 ± 3,0	7,7 ± 2,2	8,4 ± 2,3	8,1 ± 2,1	7,5 ± 1,6

**Tabelle 2:** Mittelwerte und Standardabweichungen der durchschnittlichen Apikalsegmentlänge, angegeben in µm:

Käfig	Verzweigungsordnung					Gesamt
	1.	2.	3.	4.	5.	
P0 sozial	22,2 ± 15,2	39,2 ± 32,7	43,9 ± 24,4	52,1 ± 32,2	53,0 ± 25,7	492,6 ± 206,5
P14 sozial	25,4 ± 17,9	45,4 ± 32,7	68,5 ± 32,9	65,2 ± 30,5	69,7 ± 33,7	790,6 ± 210,5
P21 sozial	27,1 ± 16,1	30,9 ± 30,1	46,9 ± 21,3	58,6 ± 26,8	52,8 ± 24,8	810,5 ± 222,3
P45 sozial	34,8 ± 26,4	58,5 ± 48,9	65,4 ± 42,1	66,9 ± 31,7	63,2 ± 30,4	1044,1 ± 444,3

**Tabelle 3:** P-Werte nach dem Mann-Whitney U-Test, im Vergleich die unterschiedlichen Altersstadien von Käfigtieren (n. s. = nicht signifikant):

Apikalspinedichte					
Vergleich	1. Segment	2. Segment	3. Segment	4. Segment	5. Segment
P0 / P14	n. s.	<0,001	<0,001	<0,001	0,003
P0 / P21	n. s.	0,005	<0,001	<0,001	<0,001
P0 / P45	n. s.	0,013	<0,001	<0,001	0,001
P14 / P21	0,009	n. s.	n. s.	0,009	0,003
P14 / P45	n. s.	0,034	n. s.	n. s.	n. s.
P21 / P45	n. s.	n. s.	0,026	0,014	0,003
Durchschnittliche Apikalsegmentlänge					
Vergleich	1. Segment	2. Segment	3. Segment	4. Segment	5. Segment
P0 / P14	n. s.	n. s.	<0,001	n. s. (0,052)	0,033
P0 / P21	n. s.	n. s.	n. s.	n. s.	n. s.
P0 / P45	0,022	0,033	0,012	0,012	n. s.
P14 / P21	n. s.	0,01	0,005	n. s.	0,042
P14 / P45	n. s.	n. s.	n. s.	n. s.	n. s.
P21 / P45	n. s.	0,002	n. s.	n. s.	n. s.

**Tabelle 4:** Mittelwerte und Standardabweichungen der Dichte von Basalspines, angegeben in der Anzahl der Spines/10µm:

Käfig	Verzweigungsordnung					Gesamt
	1.	2.	3.	4.	5.	
P0 sozial	3,8 ± 1,8	5,1 ± 1,8	5,7 ± 1,8	4,9 ± 2,0	5,3 ± 1,8	5,2 ± 1,6
P14 sozial	4,7 ± 2,2	7,7 ± 2,7	7,9 ± 2,7	8,8 ± 3,2	7,1 ± 2,3	7,8 ± 2,3
P21 sozial	4,8 ± 3,2	9,2 ± 3,2	10,6 ± 3,0	9,3 ± 3,2	9,2 ± 2,3	10,0 ± 2,6
P45 sozial	3,5 ± 1,8	7,1 ± 2,1	8,0 ± 2,0	7,9 ± 2,2	8,8 ± 1,7	7,6 ± 1,7

**Tabelle 5:** Mittelwerte und Standardabweichungen der durchschnittlichen Basalsegmentlänge, angegeben in  $\mu\text{m}$ :

Käfig	Verzweigungsordnung					Gesamt
	1.	2.	3.	4.	5.	
P0 sozial	19,4 $\pm$ 8,9	29,8 $\pm$ 23,9	29,7 $\pm$ 17,5	18,4 $\pm$ 17,0	16,2 $\pm$ 13,0	126,9 $\pm$ 71,9
P14 sozial	25,6 $\pm$ 16,8	49,1 $\pm$ 24,8	64,6 $\pm$ 34,4	64,1 $\pm$ 34,1	61,5 $\pm$ 45,3	350,2 $\pm$ 157,7
P21 sozial	24,4 $\pm$ 17,2	45,0 $\pm$ 22,5	59,1 $\pm$ 19,2	52,1 $\pm$ 26,3	57,0 $\pm$ 37,0	325,4 $\pm$ 102,0
P45 sozial	24,0 $\pm$ 14,8	55,6 $\pm$ 26,9	63,7 $\pm$ 20,4	60,7 $\pm$ 26,8	60,8 $\pm$ 40,8	419,7 $\pm$ 156,3

**Tabelle 6:** P-Werte nach dem Mann-Whitney U-Test, im Vergleich die unterschiedlichen Altersstadien von Käfigtieren (n. s. = nicht signifikant):

Basalspinedichte					
Vergleich	1. Segment	2. Segment	3. Segment	4. Segment	5. Segment
P0 / P14	n. s.	<0,001	<0,001	<0,001	n. s.
P0 / P21	n. s.	<0,001	<0,001	<0,001	0,004
P0 / P45	n. s.	<0,001	<0,001	<0,001	0,005
P14 / P21	n. s.	n. s.	<0,001	n. s.	0,038
P14 / P45	0,01	n. s.	n. s.	n. s.	n. s.
P21 / P45	n. s.	0,009	<0,001	n. s.	n. s.
Durchschnittliche Basalsegmentlänge					
Vergleich	1. Segment	2. Segment	3. Segment	4. Segment	5. Segment
P0 / P14	n. s.	<0,001	<0,001	<0,001	0,01
P0 / P21	n. s.	<0,001	<0,001	<0,001	0,011
P0 / P45	n. s.	<0,001	<0,001	<0,001	0,007
P14 / P21	n. s.				
P14 / P45	n. s.				
P21 / P45	n. s.	0,041	n. s.	n. s.	n. s.

**Tabelle 7:** Mittelwerte und Standardabweichungen der Dichte von Apikalspines, angegeben in der Anzahl der Spines/10 $\mu\text{m}$ :

P21 Voliere	Verzweigungsordnung					Gesamt
	1.	2.	3.	4.	5.	
sozial	2,7 $\pm$ 1,7	6,8 $\pm$ 3,1	8,4 $\pm$ 2,4	8,4 $\pm$ 3,1	8,2 $\pm$ 3,0	8,0 $\pm$ 2,1
Elternentzug	4,8 $\pm$ 2,7	8,8 $\pm$ 4,6	12,5 $\pm$ 3,5	12,9 $\pm$ 3,9	11,3 $\pm$ 4,0	11,4 $\pm$ 2,9

**Tabelle 8:** Mittelwerte und Standardabweichungen der durchschnittlichen Apikalsegmentlänge, angegeben in  $\mu\text{m}$ :

P21 Voliere	Verzweigungsordnung					Gesamt
	1.	2.	3.	4.	5.	
sozial	27,3 $\pm$ 20,7	36,8 $\pm$ 20,2	52,7 $\pm$ 18,4	63,9 $\pm$ 25,9	56,7 $\pm$ 23,2	924,6 $\pm$ 317,3
Elternentzug	23,1 $\pm$ 12,7	35,0 $\pm$ 16,0	52,0 $\pm$ 22,5	50,8 $\pm$ 20,7	54,2 $\pm$ 26,6	899,3 $\pm$ 338,5

**Tabelle 9:** Mittelwerte und Standardabweichungen der Dichte von Basalspines, angegeben in der Anzahl der Spines/10 $\mu\text{m}$ :

P21 Voliere	Verzweigungsordnung					Gesamt
	1.	2.	3.	4.	5.	
sozial	3,7 $\pm$ 2,3	7,4 $\pm$ 3,4	7,7 $\pm$ 2,4	7,8 $\pm$ 2,2	6,7 $\pm$ 2,9	7,8 $\pm$ 2,6
Elternentzug	5,2 $\pm$ 4,3	9,1 $\pm$ 4,5	11,3 $\pm$ 3,5	11,5 $\pm$ 3,4	11,2 $\pm$ 4,3	10,8 $\pm$ 3,1

**Tabelle 10:** Mittelwerte und Standardabweichungen der durchschnittlichen Basalsegmentlänge, angegeben in  $\mu\text{m}$ :

P21 Voliere	Verzweigungsordnung					Gesamt
	1.	2.	3.	4.	5.	
sozial	17,9 $\pm$ 10,0	47,8 $\pm$ 30,7	68,1 $\pm$ 29,3	57,3 $\pm$ 26,6	57,1 $\pm$ 28,8	421,6 $\pm$ 160,2
Elterntzug	15,0 $\pm$ 6,3	43,2 $\pm$ 31,9	53,7 $\pm$ 29,6	60,7 $\pm$ 26,1	46,5 $\pm$ 23,7	425,9 $\pm$ 168,4

**Tabelle 11:** Mittelwerte und Standardabweichungen der Dichte von Apikalspines, angegeben in der Anzahl der Spines/10 $\mu\text{m}$ :

P21 Voliere	Verzweigungsordnung					Gesamt
	1.	2.	3.	4.	5.	
sozial	2,7 $\pm$ 1,7	6,8 $\pm$ 3,1	8,4 $\pm$ 2,4	8,4 $\pm$ 3,1	8,2 $\pm$ 3,0	8,0 $\pm$ 2,1
Vaterentzug	2,6 $\pm$ 1,3	5,4 $\pm$ 2,5	7,1 $\pm$ 1,9	7,7 $\pm$ 1,6	6,7 $\pm$ 1,5	6,8 $\pm$ 1,4

**Tabelle 12:** Mittelwerte und Standardabweichungen der durchschnittlichen Apikalsegmentlänge, angegeben in  $\mu\text{m}$ :

P21 Voliere	Verzweigungsordnung					Gesamt
	1.	2.	3.	4.	5.	
sozial	27,3 $\pm$ 20,7	36,8 $\pm$ 20,2	52,7 $\pm$ 18,4	63,9 $\pm$ 25,9	56,7 $\pm$ 23,2	924,6 $\pm$ 317,3
Vaterentzug	23,2 $\pm$ 12,5	34,8 $\pm$ 20,4	53,9 $\pm$ 26,4	57,7 $\pm$ 18,8	63,5 $\pm$ 30,8	1094,4 $\pm$ 392,9

**Tabelle 13:** Mittelwerte und Standardabweichungen der Dichte von Basalspines, angegeben in der Anzahl der Spines/10 $\mu\text{m}$ :

P21 Voliere	Verzweigungsordnung					Gesamt
	1.	2.	3.	4.	5.	
sozial	3,7 $\pm$ 2,3	7,4 $\pm$ 3,4	7,7 $\pm$ 2,4	7,8 $\pm$ 2,2	6,7 $\pm$ 2,9	7,8 $\pm$ 2,6
Vaterentzug	2,8 $\pm$ 1,2	5,5 $\pm$ 2,2	7,0 $\pm$ 1,6	6,5 $\pm$ 1,6	5,9 $\pm$ 1,5	6,6 $\pm$ 1,4

**Tabelle 14:** Mittelwerte und Standardabweichungen der durchschnittlichen Basalsegmentlänge, angegeben in  $\mu\text{m}$ :

P21 Voliere	Verzweigungsordnung					Gesamt
	1.	2.	3.	4.	5.	
sozial	17,9 $\pm$ 10,0	47,8 $\pm$ 30,7	68,1 $\pm$ 29,3	57,3 $\pm$ 26,6	57,1 $\pm$ 28,8	421,6 $\pm$ 160,2
Vaterentzug	17,2 $\pm$ 8,9	36,8 $\pm$ 27,5	62,1 $\pm$ 27,2	59,8 $\pm$ 19,8	71,2 $\pm$ 30,4	406,8 $\pm$ 212,9

**Tabelle 15:** Mittelwerte und Standardabweichungen der Dichte von Apikalspines, angegeben in der Anzahl der Spines/10 $\mu\text{m}$ :

P21 Voliere	Verzweigungsordnung					Gesamt
	1.	2.	3.	4.	5.	
sozial+Saline	1,5 $\pm$ 1,3	5,0 $\pm$ 2,3	6,6 $\pm$ 1,8	5,8 $\pm$ 1,8	6,5 $\pm$ 1,8	6,4 $\pm$ 2,3
EZ+Saline	2,4 $\pm$ 1,8	5,6 $\pm$ 2,0	7,6 $\pm$ 1,2	7,5 $\pm$ 1,3	7,2 $\pm$ 1,6	7,2 $\pm$ 0,8
EZ+0,1mg Way	2,2 $\pm$ 1,6	4,8 $\pm$ 2,1	6,7 $\pm$ 2,1	6,7 $\pm$ 1,6	6,4 $\pm$ 1,6	6,3 $\pm$ 1,4
EZ+1mg Way	2,6 $\pm$ 2,0	4,7 $\pm$ 1,9	6,5 $\pm$ 1,3	6,7 $\pm$ 1,6	6,5 $\pm$ 1,7	6,2 $\pm$ 1,1

**Tabelle 16:** Mittelwerte und Standardabweichungen der durchschnittlichen Apikalsegmentlänge, angegeben in  $\mu\text{m}$ :

P21 Voliere	Verzweigungsordnung					Gesamt
	1.	2.	3.	4.	5.	
sozial+Saline	23,5 $\pm$ 13,4	37,1 $\pm$ 23,9	51,4 $\pm$ 21,8	53,3 $\pm$ 20,5	53,9 $\pm$ 30,3	817,5 $\pm$ 280,1
EZ+Saline	30,5 $\pm$ 17,7	33,8 $\pm$ 17,0	48,0 $\pm$ 21,9	61,2 $\pm$ 34,5	51,2 $\pm$ 21,1	913,2 $\pm$ 260,7
EZ+0,1 mg Way	27,5 $\pm$ 12,2	40,7 $\pm$ 28,1	54,0 $\pm$ 29,5	59,8 $\pm$ 31,7	51,6 $\pm$ 23,4	913,7 $\pm$ 357,3
EZ+1 mg Way	29,1 $\pm$ 15,0	39,8 $\pm$ 27,6	59,2 $\pm$ 21,7	57,5 $\pm$ 21,9	53,4 $\pm$ 27,4	910,1 $\pm$ 303,9

**Tabelle 17:** P-Werte nach dem Mann-Whitney U-Test, im Vergleich die unterschiedlichen Versuchsgruppen, 21-tägiger Volieretierte (n. s. = nicht signifikant):

Apikalspines					
Vergleich	1. Segment	2. Segment	3. Segment	4. Segment	5. Segment
sozial+Saline/EZ+Saline	n. s.	n. s.	0,029	0,009	n. s.
sozial+Saline/EZ + 0,1mg Way	n. s.				
sozial+Saline/EZ + 1 mg Way	0,041	n. s.	n. s.	n. s.	n. s.
EZ+Saline/EZ + 0,1 mg Way	n. s.	n. s.	n. s.	n. s.	0,049
EZ+Saline/EZ+1 mg Way	n. s.	n. s.	0,002	n. s.	n. s.
EZ+0,1mg Way/EZ+1mg Way	n. s.				
Durchschnittliche Apikalsegmentlänge					
Vergleich	1. Segment	2. Segment	3. Segment	4. Segment	5. Segment
sozial+Saline/EZ+Saline	kein Test				
sozial+Saline/EZ + 0,1mg Way	kein Test				
sozial+Saline/EZ + 1 mg Way	kein Test				
EZ+Saline/EZ + 0,1 mg Way	kein Test				
EZ+Saline/EZ+1 mg Way	kein Test				
EZ+0,1mg Way/EZ+1mg Way	kein Test				

**Tabelle 18:** Mittelwerte und Standardabweichungen der Dichte von Basalspines, angegeben in der Anzahl der Spines/10 $\mu\text{m}$ :

P21 Voliere	Verzweigungsordnung					Gesamt
	1.	2.	3.	4.	5.	
sozial+Saline	1,6 $\pm$ 1,4	5,0 $\pm$ 1,4	5,9 $\pm$ 1,2	5,8 $\pm$ 1,5	6,3 $\pm$ 2,6	6,0 $\pm$ 1,7
EZ+Saline	2,8 $\pm$ 1,9	6,3 $\pm$ 1,9	7,6 $\pm$ 1,6	7,1 $\pm$ 0,8	7,3 $\pm$ 1,6	7,1 $\pm$ 1,3
EZ+0,1 mg Way	2,0 $\pm$ 1,4	4,6 $\pm$ 2,2	6,4 $\pm$ 2,0	6,7 $\pm$ 1,9	6,0 $\pm$ 2,1	6,0 $\pm$ 1,7
EZ+1 mg Way	2,4 $\pm$ 1,6	5,4 $\pm$ 1,6	5,9 $\pm$ 1,7	6,1 $\pm$ 1,2	5,9 $\pm$ 1,5	6,0 $\pm$ 1,2

**Tabelle 19:** Mittelwerte und Standardabweichungen der durchschnittlichen Basalsegmentlänge, angegeben in  $\mu\text{m}$ :

P21 Voliere	Verzweigungsordnung					Gesamt
	1.	2.	3.	4.	5.	
sozial+Saline	14,7 $\pm$ 7,7	42,0 $\pm$ 29,5	52,4 $\pm$ 23,2	55,4 $\pm$ 27,5	53,0 $\pm$ 22,5	441,8 $\pm$ 144,7
EZ+Saline	16,6 $\pm$ 11,0	42,9 $\pm$ 29,2	66,6 $\pm$ 24,7	53,0 $\pm$ 31,6	69,5 $\pm$ 14,6	369,9 $\pm$ 171,2
EZ+0,1 mg Way	14,1 $\pm$ 6,9	38,3 $\pm$ 18,6	58,0 $\pm$ 27,6	58,9 $\pm$ 37,1	39,4 $\pm$ 17,4	428,1 $\pm$ 223,0
EZ+1 mg Way	21,0 $\pm$ 10,6	53,8 $\pm$ 33,0	63,3 $\pm$ 28,4	57,7 $\pm$ 29,1	53,0 $\pm$ 19,6	437,4 $\pm$ 177,8

**Tabelle 20:** P-Werte nach dem Mann-Whitney U-Test, im Vergleich die unterschiedlichen Versuchsgruppen, 21tägiger Volieretiere (n. s. = nicht signifikant):

<b>Basalspines</b>					
<b>Vergleich</b>	<b>1. Segment</b>	<b>2. Segment</b>	<b>3. Segment</b>	<b>4. Segment</b>	<b>5. Segment</b>
sozial+Saline/EZ+Saline	0,037	0,03	0,005	0,03	n. s.
sozial+Saline/EZ + 0,1mg Way	n. s.				
sozial+Saline/EZ + 1 mg Way	n. s.				
EZ+Saline/EZ + 0,1 mg Way	n. s.	0,012	0,029	n. s.	n. s.
EZ+Saline/EZ+1 mg Way	n. s.	n. s.	0,002	0,031	n. s.
EZ+0,1mg Way/EZ+1mg Way	n. s.				
<b>Durchschnittliche Basalsegmentlänge</b>					
<b>Vergleich</b>	<b>1. Segment</b>	<b>2. Segment</b>	<b>3. Segment</b>	<b>4. Segment</b>	<b>5. Segment</b>
sozial+Saline/EZ+Saline	kein Test				
sozial+Saline/EZ + 0,1mg Way	kein Test				
sozial+Saline/EZ + 1 mg Way	kein Test				
EZ+Saline/EZ + 0,1 mg Way	kein Test				
EZ+Saline/EZ+1 mg Way	kein Test				
EZ+0,1mg Way/EZ+1mg Way	kein Test				

**Tabelle 21:** Mittelwerte und Standardabweichungen von Hirn- und Körpergewichten, angegeben in g:

<b>Käfig</b>	<b>Hirngewichte [g]</b>	<b>n-Zahl</b>	<b>Körpergewichte [g]</b>	<b>n-Zahl</b>
P0 sozial	0,9 ± 0,04	4	15,1 ± 0,35	4
P14 sozial	1,3 ± 0,06	7	32,0 ± 3,5	7
P21 sozial	1,5 ± 0,02	7	57,1 ± 3,8	7
P45 sozial	1,6 ± 0,3	8	104,2 ± 6,1	14

**Tabelle 22:** Mittelwerte und Standardabweichungen von Hirn- und Körpergewichten 21tägiger Volieretiere, angegeben in g:

<b>P21 Voliere</b>	<b>Hirngewichte [g]</b>	<b>n-Zahl</b>	<b>Körpergewichte [g]</b>	<b>n-Zahl</b>
sozial	1,5 ± 0,09	11	43,8 ± 5,9	11
Elternentzug (EZ)	1,4 ± 0,06	7	47,3 ± 2,3	7

**Tabelle 23:** Mittelwerte und Standardabweichungen von Hirn- und Körpergewichten, angegeben in g:

<b>P21 Voliere</b>	<b>Hirngewichte [g]</b>	<b>n-Zahl</b>	<b>Körpergewichte [g]</b>	<b>n-Zahl</b>
sozial	1,5 ± 0,09	11	43,8 ± 5,9	11
Vaterentzug	1,5 ± 0,03	6	53,3 ± 3,5	6

**Tabelle 24:** Mittelwerte und Standardabweichungen von Hirn- und Körpergewichten, angegeben in g:

<b>P21 Voliere</b>	<b>Hirngewichte [g]</b>	<b>n-Zahl</b>	<b>Körpergewichte [g]</b>	<b>n-Zahl</b>
sozial+Saline	1,4 ± 0,05	8	44,5 ± 2,4	8
EZ+Saline	1,4 ± 0,1	6	44,8 ± 7,2	6
EZ+0,1 mg Way	1,4 ± 0,2	5	42,0 ± 7,1	5
EZ+1 mg Way	1,5 ± 0,05	9	50,6 ± 2,8	9

**Tabelle 25:** P-Werte nach dem Mann-Whitney U-Test, im Vergleich die unterschiedlichen Versuchsgruppen, 21tägiger Volieretiere (n. s. = nicht signifikant):

Vergleich	Hirngewichte	Körpergewichte
sozial+Saline/EZ+Saline	kein Test	n. s.
sozial+Saline/EZ+0,1 mg Way	kein Test	n. s.
sozial+Saline/EZ+1 mg Way	kein Test	0,002
EZ+Saline/EZ+0,1 mg Way	kein Test	n. s.
EZ+Saline/EZ+1 mg Way	kein Test	n. s.
EZ+0,1 mg Way/EZ+1 mg Way	kein Test	n. s.

**Tabelle 26:** Mittelwerte und Standardabweichungen von Cortisol, gemessen aus dem Rumpfblood:

P21 Voliere	Cortisol [nmol / l]	n-Zahl
sozial	1084,3 ± 248,9	11
Elternentzug (EZ)	1051,6 ± 331,8	7

**Tabelle 27:** Mittelwerte und Standardabweichungen von Cortisol, gemessen aus dem Rumpfblood:

P21 Voliere	Cortisol [nmol / l]	n-Zahl
sozial	1084,3 ± 248,9	11
Vaterentzug	994,2 ± 453,1	6

**Tabelle 28:** Mittelwerte und Standardabweichungen von Cortisol, gemessen aus dem Rumpfblood:

P21 Voliere	Cortisol [nmol / l]	n-Zahl
sozial+Saline	879,3 ± 345,1	8
EZ+Saline	534,8 ± 206,3	4
EZ+0,1 mg Way	772,0 ± 300,9	1
EZ+1 mg Way	997,3 ± 415,5	7

**Tabelle 29:** Mittelwerte und Standardabweichungen der Dichte von Neuronen, calciumbindende Proteine enthaltend. Außerdem ist der prozentuale Anteil der einzelnen calciumbindenden Proteine im Verhältnis zu ihrer angenommenen Gesamtheit angegeben:

Regionen des PFC	P45 Käfig sozial [Zellen/mm <sup>2</sup> ]				P45 Käfig Elternentzug [Zellen/mm <sup>2</sup> ]			
	ACd	PrCm	PL	IL	ACd	PrCm	PL	IL
<b>Calbindin (CaBP-D 28k)</b>	83,4 ±4,4 (28%)	84,9 ±4,2 (29%)	146,5 ±6,5 (36%)	170,2 ±19,4 (46%)	65,7 ±2,7 (21%)	54,6 ±5,2 (18%)	111,1 ±11,8 (25%)	140,7 ±20,9 (42%)
<b>Calretinin (CaR)</b>	47,1 ±3,8 (16%)	36,3 ±4,0 (12%)	57,9 ±3,5 (14%)	50,6 ±6,1 (14%)	41,5 ±4,0 (13%)	36,4 ±4,7 (12%)	64,6 ±7,4 (15%)	49,2 ±7,4 (15%)
<b>Parvalbumin (PV)</b>	164,9 ±6,8 (56%)	169,3 ±15,9 (59%)	202,0 ±16,1 (50%)	145,0 ±11,7 (40%)	207,5 ±26,5 (66%)	211,5 ±24,5 (70%)	263,4 ±34,5 (60%)	147,8 ±26,3 (43%)
<b>Alle calciumbindenden Proteine</b>	295,4 (100%)	290,5 (100%)	406,4 (100%)	365,8 (100%)	314,7 (100%)	302,5 (100%)	439,1 (100%)	337,7 (100%)
Regionen des PFC	P90 Käfig sozial [Zellen/mm <sup>2</sup> ]				P90 Käfig Elternentzug [Zellen/mm <sup>2</sup> ]			
	ACd	PrCm	PL	IL	ACd	PrCm	PL	IL
<b>Calbindin (CaBP-D 28k)</b>	60,5 ±5,1 (27%)	61,3 ±5,3 (26%)	124,4 ±11,5 (38%)	142,8 ±24,8 (53%)	77,9 ±6,6 (26%)	63,8 ±3,9 (22%)	117,5 ±13,6 (31%)	136,6 ±14,3 (49%)
<b>Calretinin (CaR)</b>	31,1 ±4,0 (14%)	29,7 ±3,2 (13%)	41,1 ±6,6 (12%)	27,7 ±5,4 (10%)	36,3 ±1,8 (12%)	31,2 ±2,5 (11%)	43,5 ±4,2 (11%)	38,1 ±4,1 (14%)
<b>Parvalbumin (PV)</b>	135,8 ±10,8 (56%)	141,3 ±15,0 (61%)	163,6 ±21,2 (50%)	98,5 ±26,0 (37%)	187,1 ±7,3 (62%)	193,2 ±9,9 (67%)	219,0 ±16,0 (58%)	104,5 ±10,2 (37%)
<b>Alle calciumbindenden Proteine</b>	227,5 (100%)	232,3 (100%)	329,1 (100%)	269,0 (100%)	301,3 (100%)	288,2 (100%)	380,0 (100%)	279,2 (100%)

**Tabelle 30:** Mittelwerte und Standardabweichungen der Dichte von CRH enthaltenden Neuronen. Außerdem sind die prozentualen Anteile mit calciumbindenden Proteinen colokalisierter CRH-Zellen angegeben:

Regionen des PFC	P45 Käfig sozial [Zellen/mm <sup>2</sup> ]				P45 Käfig Elternentzug [Zellen/mm <sup>2</sup> ]			
	ACd	PrCm	PL	IL	ACd	PrCm	PL	IL
<b>Corticotropin-Releasing-Hormon (CRH)</b>	40,7 ±5,0 (100%)	36,5 ±3,7 (100%)	57,3 ±6,9 (100%)	52,2 ±7,2 (100%)	47,3 ±6,1 (100%)	38,1 ±4,2 (100%)	66,5 ±8,6 (100%)	62,6 ±8,6 (100%)
<b>CRH colokalisiert mit CaBP-D 28k</b>	0,9 ±0,3 (2%)	1,3 ±0,6 (3%)	0,7 ±0,3 (1%)	0,8 ±0,2 (2%)	0,9 ±0,2 (2%)	0,9 ±0,3 (2%)	1,5 ±0,3 (2%)	1,9 ±0,5 (3%)
<b>CRH colokalisiert mit CaR</b>	20,5 ±2,9 (50%)	22,8 ±3,2 (63%)	36,3 ±6,4 (64%)	32,2 ±6,4 (61%)	27,0 ±5,2 (57%)	23,7 ±5,1 (63%)	46,8 ±9,9 (70%)	31,7 ±8,7 (51%)
<b>CRH colokalisiert mit PV</b>	0,7 ±0,3 (2%)	1,0 ±0,5 (2%)	0,8 ±0,3 (1%)	0,6 ±0,1 (1%)	0,7 ±0,3 (2%)	0,9 ±0,4 (2%)	0,3 ±0,2 (1%)	0,3 ±0,2 (0%)
<b>CRH nicht colokalisiert</b>	18,6 (46%)	11,4 (32%)	19,4 (34%)	18,6 (36%)	18,6 (39%)	12,7 (33%)	18,0 (27%)	28,8 (46%)
Regionen des PFC	P90 Käfig sozial [Zellen/mm <sup>2</sup> ]				P90 Käfig Elternentzug [Zellen/mm <sup>2</sup> ]			
	ACd	PrCm	PL	IL	ACd	PrCm	PL	IL
<b>Corticotropin-Releasing-Hormon (CRH)</b>	27,7 ±3,1 (100%)	22,7 ±2,3 (100%)	41,3 ±6,0 (100%)	35,2 ±5,2 (100%)	27,4 ±7,6 (100%)	17,9 ±1,5 (100%)	39,5 ±4,0 (100%)	42,7 ±7,6 (100%)
<b>CRH colokalisiert mit CaBP-D 28k</b>	0,3 ±0,2 (1%)	0,1 ±0,06 (0%)	0,3 ±0,1 (1%)	0,2 ±0,1 (1%)	0,4 ±0,2 (1%)	0,05 ±0,05 (0%)	0,08 ±0,08 (0%)	0,1 ±0,1 (0%)
<b>CRH colokalisiert mit CaR</b>	14,3 ±2,6 (52%)	13,7 ±2,4 (61%)	16,6 ±3,2 (40%)	10,4 ±3,1 (29%)	6,8 ±1,6 (25%)	6,1 ±1,0 (34%)	9,1 ±1,8 (23%)	7,5 ±2,4 (17%)
<b>CRH colokalisiert mit PV</b>	0,6 ±0,3 (2%)	0,2 ±0,2 (1%)	0,6 ±0,4 (2%)	0,08 ±0,08 (0%)	0,05 ±0,05 (0%)	0,05 ±0,05 (0%)	0,0 ±0,0 (0%)	0,08 ±0,1 (0%)
<b>CRH nicht colokalisiert</b>	12,5 (45%)	8,7 (38%)	23,8 (57%)	24,5 (70%)	20,2 (74%)	11,78 (66%)	30,4 (77%)	35,0 (83%)

**Tabelle 31:** Mittelwerte und Standardabweichungen von Hirn- und Körpergewichten, angegeben in g:

Käfig	Hirngewichte [g]	n-Zahl	Körpergewichte [g]	n-Zahl
P45 sozial	1,6 ± 0,1	10	104,2 ± 6,1	14
P45 Elternentzug	1,7 ± 0,1	8	122,7 ± 7,1	12
P90 sozial	1,9 ± 0,1	6	186,8 ± 7,5	6
P90 Elternentzug	1,8 ± 0,04	6	161,7 ± 12,7	6

# Lebenslauf

---

## Persönliche Daten

---

Carina Helmeke

\* 03.11.1973 in Eberswalde-Finow

verheiratet, Deutsch

---

## Bildungsweg

---

1980 – 1990	Grund- und Realschule, Leipzig
1990 – 1992	Abitur, Max-Klinger-Gymnasium, Leipzig
1992 – 1994	Vordiplom Biologie, Universität Leipzig
1994 – 1995	Auslandsaufenthalt
1995 – 1997	Hauptstudium Biologie, Universität Leipzig
1997 – 1998	Diplomarbeit, Leibniz Institut für Neurobiologie Magdeburg
1998 – 2000	Wissenschaftliche Tätigkeit in der Abteilung Humanbiologie der Universität Leipzig bei Prof. Poeggel
seit Oktober 2000	Promotionsstudentin an der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg bei Prof. Braun

Magdeburg, den 14.03.03