Pubertäre chronische Ethanolbehandlung nach neonataler Ethanol-Applikation: Effekte auf emotionale, kognitive und perzeptuelle Verhaltensleistungen der Ratte

---

Aus der Abteilung Neuropharmakologie
des Instituts für Hirnforschung der Universität Bremen

DISSERTATION

zur Erlangung des akademischen Grades der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)

vorgelegt dem Fachbereich 2 (Biologie/Chemie)
der Universität Bremen

von Dipl.-Biol. Stephan Röskam
Oktober 2006

1. Gutachter Prof. Dr. Michael Koch

2. Gutachter PD Dr. Ursula Dicke

1. EINLEITUNG 1
1.1 Ethanol 1
1.1.1 Chemie 1
1.1.2 Historie 1
1.1.3 Pharmakologie 2
1.1.3.1 Wirkung auf das Gehirn 3
1.2 Das fetale Alkoholsyndrom 5
1.2.1 Tiermodelle zum fetalen Alkoholsyndrom 8
1.3 Cortikale und subcortikale Strukturen 10
1.3.1 Präfrontaler Cortex 10
1.3.2 Amygdala 12
1.3.3 Hippocampus 13
1.3.4 Nucleus Accumbens und ventrales tegmentales Areal 14
1.3.5 Begründung der Auswahl der cortikalen und subcortikalen Strukturen 16
1.4 Verhaltenstests 17
1.4.1 Die akustisch ausgelöste Schreckreaktion 17
1.4.1.1 Die Präpulsinhibition der ASR 18
1.4.1.2 Die Regulation der PPI 19
1.4.1.3 Die Funktion der PPI 19
1.4.2 *Open field*-Test 21
1.4.3 *Progressive ratio*-Test 23
1.4.4 *Object recognition*-Test 24
1.4.5. *Elevated plus maze*-Test 25
1.5 Ziel der Arbeit 26

2. MATERIAL UND METHODEN 27
2.1 Versuchstiere 27
2.2 Substanzen 28
2.3 Verhaltenstests 29
2.3.1 PPI der ASR 29
2.3.2 O*pen field*-Test 31
2.3.3 *Progressive ratio*-Test 32
2.3.3.1 Futterpräferenz-Test 33
2.3.4 *Object recognition*-Test 34
2.3.5 *Elevated plus maze*-Test 35

2.4 Versuchsaufbau 36
2.4.1 Pharmakologische Manipulation 36
2.4.2 Chronologische Reihenfolge der Verhaltenstests 37
2.5 Histologie 38
2.5.1 Präparation der Gehirne 38
2.5.2 Thionin-Färbung 39
2.5.3 Goldchlorid-Färbung 39
2.5.3.1 Messung der Myelinisierungsstärke 39
2.5.4 Immunhistochemie: Parvalbumin 41
2.5.4.1 Messung der Parvalbumin-immunreaktiven Interneuronen 42
2.6 Statistische Auswertung 42

3. ERGEBNISSE 43
3.1 Verhaltenstests....43
3.1.1 PPI der ASR 43
3.1.1.1 PPI und ASR adoleszenter Ratten 43
3.1.1.2 PPI und ASR adulter Ratten 44
3.1.2 *Open field*-Test 47
3.1.2.1 *Open field*-Test in adoleszenten Ratten 47
3.1.2.2 *Open field*-Test in adulten Ratten 47
3.1.2.2.1 Aktivität 48
3.1.2.2.2 Laufweg 49
3.1.2.2.3 Aufrichten 50
3.1.2.2.4 Aufenthalt Mitte 51
3.1.3 *Progressive ratio*-Test 52
3.1.3.1 PR1-Aufgabe 52
3.1.3.2 PR3-Aufgabe 53
3.1.4 Futterpräferenz-Test 54
3.1.5 *Object recognition*-Test 55
3.1.6 *Elevated plus maze*-Test 57
3.2 Histologie 59
3.2.1 Auswertung der Myelinisierungsstärke 59
3.2.2 Auswertung der Parvalbumin-immunreaktiven Interneuronen 65
3.2.3 Auswertung der Nissl-Färbung 70

4. DISKUSSION 71
4.1 Verhaltenstests 71
4.1.1 PPI und ASR 71
4.1.2 *Open field*-Test 74
4.1.3 *Progressive ratio*-Test und Futterpräferenz-Test 78
4.1.4 *Object recognition*-Test 82
4.1.5 *Elevated plus maze*-Test 84
4.2 Histologie 90
4.2.1 Myelinisierung 90
4.2.2 Parvalbumin-immunreaktive Interneurone 93

5. ZUSAMMENFASSUNG 96

6. LITERATUR 97

7. DANKSAGUNG 119

1. Einleitung

1.1 Ethanol

1.1.1 Chemie

Ethylalkohol oder Ethanol (Summenformel C_2H_5OH), im üblichen Sprachgebrauch als Alkohol bezeichnet, stammt aus der grossen Gruppe der Alkohole, die Derivate der Kohlenwasserstoffe sind, bei denen ein Wasserstoff-Atom durch einen Hydroxyl-Gruppe, -OH, ersetzt ist (die Hydroxyl-Gruppe ist eine der wichtigsten funktionellen Gruppen in der Chemie und verleiht einer organischen Verbindung die charakteristischen chemischen und physikalischen Eigenschaften eines Alkohols). Ethanol ist eine farblose, brennbare Flüssigkeit und entsteht in Gegenwart von Hefe durch Gärung von Kohlenhydraten (Fructose [Fruchtzucker] oder Glucose [Traubenzucker]), die in Früchten und Getreide enthalten sind.

1.1.2 Historie

Die Bezeichnung Alkohol stammt aus dem arabischen Sprachraum (*al-kuhl*) und heisst soviel wie feines Pulver oder Weingeist (auch: durch Destillation gewonnene Substanzen). Paracelsus bezog es auf die bei der Destillation des Weines entstehenden feinen, flüchtigen Bestandteile und bezeichnete damit „das Feinste“. Ethanol spielt seit der Antike in fast allen Kulturen und zu allen Zeiten eine wichtige Rolle als Genuss- bzw. Lebensmittel. Schon in den Hochkulturen der Antike war der Ethanol, speziell in Form von Wein, beliebt und besonders im klassischen Altertum als Kultgetränk verehrt. In der Medizin des Altertums und des Mittelalters wurde Ethanol einerseits als wertvolles Lebenselixier (aqua vitae), Arznei- und Stärkungsmittel angepriesen, andererseits wurde aber auch auf seine schädliche Wirkung hingewiesen, anschaulich formuliert von dem Reformationsprediger Sebastian Franck im 16. Jahrhundert: „Wenig getrunken ist gesund, und ein arczney den Menschen zu erhalten erschaffen...Zu vil ist aber gyfft“ (Schott, 2001, S. 1958). Diese ambivalente Haltung gegenüber dem Ethanol besteht bis heute, wobei aus heutiger Sicht die negativen Konsequenzen des missbräuchlichen und chronischen Ethanolkonsums für die Gesundheit deutlich schwerer wiegen als die möglicherweise positiven Effekte.

1.1.3 Pharmakologie

Im Vergleich zu anderen Pharmaka ist Ethanol eine „schwache“ Substanz. Um einen pharmakologischen Effekt im Organismus produzieren zu können, müssen mehrere Gramm pro Kilogramm (g/kg) Körpergewicht aufgenommen werden, wohingegen andere Substanzen bereits in Dosen von wenigen Milli-, Nano- oder Pikogramm pro Kilogramm pharmakologisch relevante Effekte erzielen. Ethanol besitzt eine sehr simple Struktur, die keine asymmetrische Kohlenwasserstoffverbindung darstellt. Dies befähigt Ethanol aufgrund seiner fehlenden Stereoselektivität, im Gegensatz zu anderen Substanzen, zu der Interaktion mit fast allen biologischen Substraten. Ethanol ist aufgrund seiner chemischen Natur zudem wasserlöslich und weniger stark lipidlöslich, so dass Ethanol auf jede Zelle und somit jedes Organ und Gewebe des Körpers seine toxische Wirkung entfalten kann (Fadda und Rosetti, 1998).

Die Aufnahme von Ethanol findet im oberen Verdauungstrakt statt. Ein sehr geringer Anteil wird auch in der Mundhöhle und der Speiseröhre resorbiert. Eine geringe Menge Ethanol wird im Magen, der grössere Teil im Dünndarm über die Schleimhäute aufgenommen und gelangt in den Blutkreislauf. Die Geschwindigkeit der Ethanolresorption ist dabei abhängig von der Magen-Darmfüllung.

Ethanol wird in der Leber durch oxidative Prozesse zu Wasser und Kohlendioxid (CO_2) metabolisiert. Über das im Cytosol lokalisierte Enzym Alkohol-Dehydrogenase (ADH) wird Ethanol zu Acetaldehyd umgewandelt, um dann von dem Enzym Aldehyd-Dehydrogenase (ALDH) zu Acetat (Essigsäure) oxidiert zu werden. Acetat wird anschliessend über Acetyl-CoA zu Wasser und CO_2 abgebaut. Bei einem hohen Ethanolkonsum kann zu dem Hauptmetabolismus zusätzlich das mikrosomale Ethanol oxidierende System (MEOS) aktiviert werden, welches über das Enzym Cytochrom-P450-Monooxygenase Ethanol abbaut.

Wie oben bereits erwähnt, beeinflusst Ethanol aufgrund seiner Wasser- und Lipidlöslichkeit jede Zelle sowie jedes Organ und Gewebe. Ethanol kann somit bei akutem wie chronischem Konsum oder Missbrauch toxisch wirken und zu schweren körperlichen Störungen führen, wobei die verschiedenen Organsysteme entweder direkt oder indirekt betroffen sind und die Störungen in der Häufigkeit und im Schweregrad variieren. Zu den Folgekrankheiten zählen u.a. neurologische Störungen, Beeinträchtigungen des Herz-Kreislaufsystems, gastro-intestionale Störungen, Schädigungen der Leber und Bauchspeicheldrüse sowie Störungen des Stoffwechsels. Zahlreiche epidemiologische Studien verweisen zudem auf ein

erhöhtes Karzinomrisiko durch einen erhöhten Ethanolkonsum für Tumoren im Mundbereich, Kehlkopf, Darm, der Speiseröhre, der Leber und der Brust (z.B. Merzenich, 2002).

1.1.3.1 Wirkung auf das Gehirn

Ethanol überwindet auf Grund seiner Struktur und Beschaffenheit die Blut-Hirn-Schranke und wirkt auch bei moderatem Ethanolkonsum (12-14 g Ethanol pro Kilogramm) auf das zentrale Nervensystem (ZNS). Die Wirkung von Ethanol auf das Gehirn bezieht multiple molekular- und zellbiologische Substrate ein, die letztlich die Funktion von allen neuronalen Systemen beeinflussen. Die pharmakologische Wirkung von Ethanol ist dabei nicht selektiv, sondern beeinflusst die unterschiedlichen neurobiologischen Substrate gleichermassen, wie z.B. die Membranorganisation, membranständige Enzyme, an der Signaltransduktion beteiligte Enzyme und Proteine, Ionenkanäle, Transportproteine und die Genexpression neuronaler Zellen (Fadda und Rosetti, 1998). Auf der anderen Seite interagiert Ethanol mit spezifischen an der Neurotransmission beteiligten Rezeptorproteinen, z.B. mit dem Glycin-, Serotonin- und Acetylcholinrezeptor, aber vor allem mit dem $GABA_A$- und NMDA-Rezeptor (einen guten Übersichtsartikel über die Interaktion von Ethanol mit den verschiedenen Neurotransmittersystemen bietet: Faingold et al., 1998).

Als $GABA_A$-Rezeptor-Agonist begünstigt der akute Ethanolkonsum die Bindung von GABA an dem Rezeptor und verstärkt somit die inhibitorische GABAerge Neurotransmission, die durch einen vermehrten Chlorid-Einstrom zu einer Hyperpolarisation der Zelle führt und sedative, anxiolytische Effekte vermittelt. Zu dem führt der Ethanolkonsum zu einer Inhibition der primär exzitatorischen glutamatergen Neurotransmission am NMDA-Rezeptor, welche die Effekte am $GABA_A$-Rezeptor unterstützt. Diese akute Wirkung von Ethanol ist reversibel und führt zu keinen langfristigen funktionellen Veränderungen im Gehirn.

Der chronische Ethanolkonsum oder –missbrauch dagegen führt zu bleibenden Veränderungen in der Neurotransmission, die sich langfristig zu funktionellen neurobiologischen Störungen entwickeln können, die sich in der Entwicklung einer Abhängigkeit äussern und/oder zu neurodegenerativen Prozessen und damit zu perzeptuellen, emotionalen und kognitiven Defiziten führen. Neuropathologische Untersuchungen der Gehirne von ethanolabhängigen Erwachsenen und Kindern mit der Diagnose des fetalen Alkoholsyndroms (FAS) und

Ergebnisse aus Studien mit bildgebenden Verfahren (z.B. funktionelle Magnet-Resonanz-Tomografie [fMRI] oder herkömmliche MRI) von ethanolabhängigen Erwachsenen und Erwachsenen mit schädlichem Ethanolkonsum (zur genaueren Diagnose und Klassifikation der Ethanolabhängigkeit oder des schädlichen Ethanolkonsum siehe Diagnosekataloge DSM-IV und ICD-10) zeigten strukturelle Veränderungen und morphologische Defizite in verschiedenen Hirnregionen, die sich u.a. in einer Verminderung von frontalen cortikalen Neuronen, Reduktion und Veränderung der Dendritenstruktur von cortikalen Neuronen (z.B. Kril et al., 1997; Harper und Matsumoto, 2005), in einer allgemeinen und spezifischen Volumenreduktion des Gehirns und seiner Anteile (z.B. Oscar-Berman et al., 1997; Swayze et al., 1997; De Bellis, 2000; Nicolas et al., 2000), sowie in einem Verlust der weissen Substanz äussert (z.B. Kril und Halliday, 1999; Pfefferbaum et al., 2001).

1.2 Das fetale Alkoholsyndrom

Die Alkoholembryopathie oder das fetale Alkoholsyndrom (FAS) wurde erstmals während der so genannten Gin-Epidemie in England im 18. Jahrhundert von Medizinern beschrieben, fand aber unter den Gelehrten keine grosse Aufmerksamkeit. Es dauerte weitere 100-150 Jahre, bis sich einzelne Mediziner mit den Folgeerkrankungen des überhöhten Ethanolkonsums und –missbrauchs wissenschaftlich beschäftigten. Aber erst vor etwa 30 Jahren waren es Lemoine und Mitarbeiter (1968) und etwas später Jones et al. (1973), die verschiedene Symptome und Defizite wissenschaftlich beschrieben und systematisch unter der Bezeichnung Alkoholembryopathie oder fetales Alkkoholsyndrom zusammenfassten (Lemoine et al., 1968; Jones et al., 1973).

FAS tritt bei Kindern auf, deren Mütter während der Schwangerschaft ethanolabhängig sind oder einen missbräuchlichen, überhöhten Ethanolkonsum aufweisen (Merzenich, 2002). Ethanol passiert aufgrund seiner Wasser- und Lipidlöslichkeit ungehindert die Plazenta, die den Stoffaustausch zwischen Mutter und Embryo regelt, und exponiert den Embryo mit der gleichen Blutethanolkonzentration wie die Mutter. Die an dem Alkoholabbau beteiligten Enzyme wie die ADH oder ALDH sind im Embryo und Fetus nur mässig entwickelt, so dass der embryonale und fetale Alkoholmetabolismus verlangsamt ist und folglich die Ethanolexposition gegenüber dem ungeborenen Kind verlängert wird.

Um die klinische Diagnose des FAS stellen zu können, müssen die betroffenen Kinder folgende drei Kardinalsymptome aufweisen: (1) Prä- und neonatale Wachstumsretardierung, (2) eine kraniofaziale Dysmorphie (u.a. Mikroenzephalie, verkürzter Nasenrücken, kleine Zähne, schmales Oberlippenrot, fehlendes/flaches Philtrum, Augenfehlbildungen) und (3) Störungen des ZNS, die neurologische Störungen (u.a. Sprach- und Hörstörungen, Muskelhypotonie, motorische Dysfunktionen), Verhaltensstörungen (u.a. Hyperaktivität, Aggressivität, emotionale Instabilität) und kognitive Defizite (Aufmerksamkeitsstörungen, Defizite des Arbeitsgedächtnisses, Beeinträchtigungen der sogenannten „exekutiven Funktionen“) umfassen. Des weiteren können zusätzlich fakultative Symptome wie kardiovaskuläre und urogenitale Fehlbildungen sowie Extremitäten- und Skelettfehlbildungen auftreten (z.B. Larkby und Day; 1997; Löser, 2000; Kodituwakku et al., 2001; Warren und Foudin, 2001; Merzenich, 2002). Aufgrund des grossen Spektrums der ethanolbedingten Schädigungen bei Kindern wird das FAS in drei

Schweregrade unterteilt, die zwischen leichter, mässig ausgeprägter oder schwerer Form des FAS unterteilt werden. Milde Formen des FAS werden auch als fetale Alkoholeffekte (FAE) bezeichnet, wenn sie nur zwei der drei Kriterien zur Diagnose des FAS erfüllen (Merzenich, 2002).

Dabei ist der Schweregrad des FAS u.a. abhängig von der konsumierten Ethanolmenge (angegeben in Gramm pro Tag), dem Trinkmuster (damit ist die zeitliche Verteilung der Ethanolaufnahme gemeint) und dem Zeitpunkt der Ethanolexposition gegenüber dem Embryo während der Schwangerschaft. Längsschnittstudien zeigten, dass auch bei einem moderaten Ethanolkonsum (12-14 g Ethanol pro Tag) eine Schädigung des Kindes nicht ausgeschlossen werden kann (Merzenich, 2002). Zudem konnte belegt werden, dass das so genannte *binge-drinking* (das Konsumieren einer erhöhten Ethanolmenge über einen kurzen Zeitraum, bei dem kurzfristig eine sehr hohe Blutethanolkonzentration erreicht wird) das Risiko einer Schädigung des Gehirns um ein Vielfaches erhöht (z.B. Maier und West, 2001). Zusätzlich ist der Zeitpunkt, an dem der Ethanol während der Schwangerschaft missbräuchlich konsumiert wurde, dafür verantwortlich, welche Organsysteme betroffen sind, da die kritischen Phasen für die einzelnen Organe zeitlich verschieden sind (Abb. 1). Die Ethanolexposition während des ersten und zweiten Trimesters der Schwangerschaft führt in erster Linie zu schweren morphologischen Störungen verschiedenster Organe und Körperteile, darunter u.a. kraniofaziale Dysmorphien (siehe oben), Augen-, Nieren- und Genitalfehlbildungen, Herzfehler und Extremitäten/Skelettfehlbildungen (Löser, 2000; Rice und Barrone, 2000; Merzenich, 2002). Das ZNS dagegen ist während der gesamten Schwangerschaft vulnerabel gegenüber den teratogenen Eigenschaften des Ethanols, wobei unterschiedliche Hirngebiete verschieden stark betroffen sein können, abhängig von der aufgenommenen Ethanolmenge und dem Trinkmuster der Mutter, der unterschiedlichen Vulnerabilität der verschiedenen Hirnstrukturen gegenüber Ethanol und dem Zeitpunkt der Exposition gegenüber Ethanol während der Schwangerschaft. Die Folgen der Ethanolexposition während der Schwangerschaft für das ZNS umfasst eine ganze Bandbreite von neurologischen Beeinträchtigungen, die u.a. geistige Entwicklungsverzögerungen, Sprach-, Hör-, Ess-, Schluck- und Schlafstörungen, verschiedene Ausprägungen von Muskeldysplasien, verminderte Schmerzempfindlichkeit, fein- und grobmotorische zerebelläre Dysfunktionen und Epilepsien beinhalten können. Auf Verhaltensebene

wurden folgende klinische Symptome beschrieben: Hyperaktivität, Hyperexzibilität, Distanzlosigkeit, Vertrauensseligkeit, erhöhte Risikobereitschaft, Autismus, (erhöhte) Aggressivität, dissoziales Verhalten und emotionale Instabilität. Kognitive Defizite umfassen u.a. Lern-, Gedächtnis- und Aufmerksamkeitsstörungen, verminderte Konzentrationsleistungen und Beeinträchtigungen der exekutiven Funktion, die sich in einer Leistungsminderung im logischen Denken, lösen komplizierter Probleme, Rechnen und kombinatorischen Denken, Abstraktionen, Erlernen von Regeln und Erfassen von Sinnzusammenhängen zeigen (Löser, 2000; Rice und Barrone, 2000; Merzenich, 2002). Speziell die Phase des *brain growth spurt* (zweites bis drittes Trimester der Schwangerschaft), in der das Gehirn nicht nur am schnellsten an Gewicht zulegt sondern parallel auch kritische neuronale Entwicklungsprozesse ablaufen (auch als Synaptogenese bezeichnet: verstärktes Auswachsen der Axone und Dendriten, höchste Rate der Synapsenbildung, Gliogenese, Myelinisierung, Reifen der chemischen Neurotransmission), scheint sehr empfindlich gegenüber den toxischen Eigenschaften von Ethanol zu sein (Dobbing und Sands, 1979; Rice und Barrone, 2000; Merzenich, 2002).

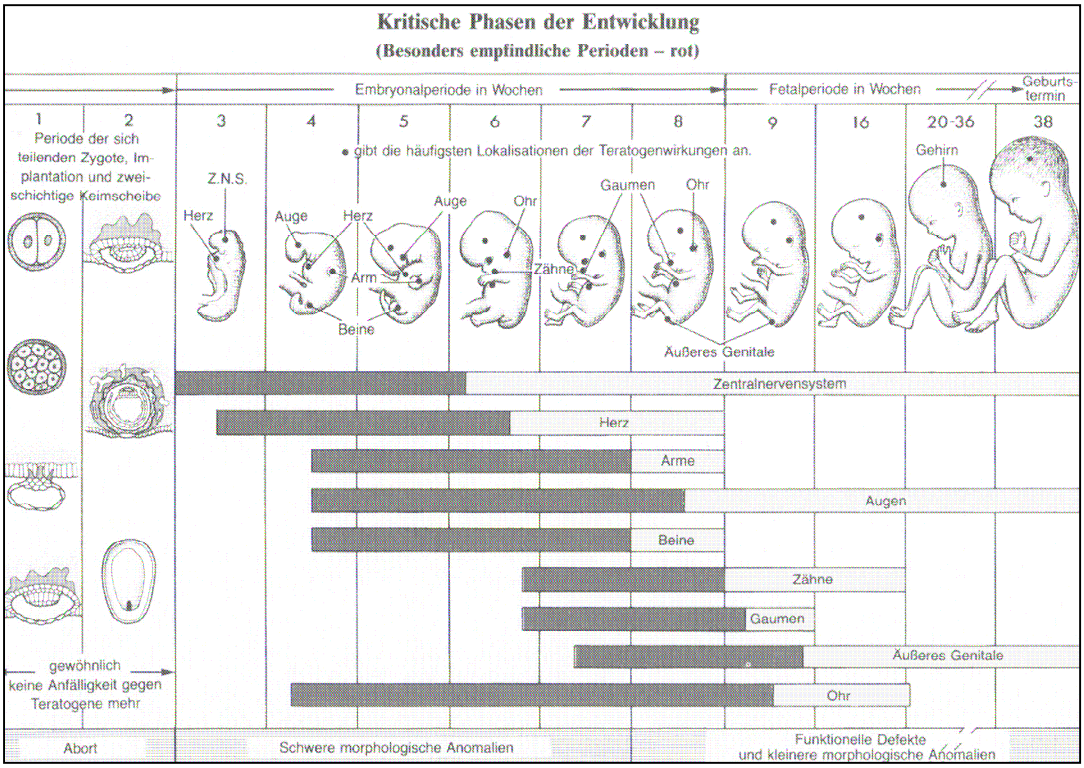


Abb. 1. Dargestellt sind die verschiedenen Stadien der embryonalen- und fetalen Entwicklung und deren vulnerablen Zeitfenster gegenüber Alkohol (Grafik: Moore/ Persaud (1996). Aus: Merzenich, 2002).

Die Prävalenz für das Auftreten des FAS beträgt 1:300 und ist damit neben *Morbus Down* (1:800) einer der häufigsten mit der Geburt auftretenden Schädigungen. Die Inzidenz des FAS in der westlichen Welt variiert zwischen 0,5-5 Promille (Deutschland: ca. 3:1000) und ist aufgrund der wissenschaftlichen Erkenntnisse und medialen Aufklärung stark rückläufig (Löser, 2000; May und Gossage, 2001; Merzenich, 2002).

1.2.1 Tiermodelle zum fetalen Alkoholsyndrom

Interessanterweise entspricht die neonatale Hirnentwicklung (*postnatal day* [PD] 4-10) bei Ratten weitgehend der pränatalen Entwicklung beim Menschen (2.-3.Trimester der Schwangerschaft). Daher ist die neonatale Ratte gut geeignet für Untersuchungen der Effekte von Ethanol während der Synaptogenese, die schädigenden Einflüssen *in-utero* während dem 2.-3.Trimester der Schwangerschaft beim Menschen entsprechen (Dobbing und Sands, 1979; Rice und Barrone, 2000). In der Literatur gibt es verschiedene Ansätze, um die Ethanolexposition des Fetus im Tiermodell zu simulieren. Ethanol wird entweder über die Trinkflasche, mit einem Zerstäuber als Aerosol, mit der Schlundsonde oder als intraperitoneale Injektion verabreicht. Jedes Modell hat seine Vor- und Nachteile und es gibt bis heute kein einheitliches Tiermodell zum FAS. Unbestritten ist hingegen die neurotoxische Wirkung des Ethanols und deren Konsequenzen für die Entwicklung des Gehirns und den daraus folgenden neurobiologischen Störungen, die in eine veränderte Hirnanatomie und -physiologie und letztendlich in eine Störung der Perzeption, Kognition und Emotionalität mündet.

Unter anderem beeinträchtigt die Ethanolgabe während der prä- oder neonatalen Phase bei Nagern die neuronale Migration im Cortex (z.B. Hirai et al., 1999), führt zu Degeneration von Neuronen im PFC (z.B. Ikonomidou et al., 2000) und Hippocampus (z.B. Bonthius und West, 1990), vermindert cortiko-cortikale Projektionen und calbindin-immunoreaktive cortikale Interneurone (Granato et al., 2003; Granato, 2006). Zudem treten massive Veränderungen auf Neurotransmitter- und Rezeptorebene (z.B. Grobin et al., 2000; Goodlett und Horn, 2001; Bellinger et al., 2002) auf. Des weiteren ist die Myelinisierung bestimmter Hirnregionen in neonatalen Ratten und Mäusen stark beeinträchtigt (z.B. Harris et al., 2000; Ozer et al., 2000). Die neonatale Ethanolexposition bei Nagern führt darüber hinaus u.a. zu Beeinträchtigungen der Lern- und Gedächtnisleistungen (z.B. Garcia-Moreno, 2002; Girard und Wainwright, 2002), der lokomotorischen Aktivität (z.B. Tran et al., 2000)

sowie zu Defiziten im Sozialverhalten (z.B. Lugo, 2003) und in der sozialen Kommunikation (z.B. Kelly et al., 1997).

1.3 Cortikale und subcortikale Strukturen

1.3.1 Präfrontaler Cortex

Einen wichtigen Bestandteil des Frontallappens von Säugetieren und Menschen stellt der präfrontale Cortex (PFC) dar. Hiermit wird der Anteil der Hirnrinde bezeichnet, der sich anterior der prämotorischen Areale befindet. Der PFC entwickelt sich sowohl phylogenetisch als auch ontogenetisch als eines der letzten cortikalen Areale neben den Kleinhirn im Säugerhirn und erreicht seine maximale Ausdehnung im adulten Stadium (van Eden et al., 1990; Uylings und van Eden, 1990; Uylings et al., 2003). Der PFC ist die Region im Säugerhirn, die als cortikales Projektionsareal Afferenzen des mediodorsalen Nucleus des Thalamus erhält (Uylings und van Eden, 1990; Uylings et al., 2003). Dabei ist der PFC keine einheitliche Struktur, sondern weist in seiner Cytoarchitektur sowie in seinen afferenten und efferenten Projektionen Unterschiede auf. Aufgrund dieser hodologischen Befunde geht man auch von einer funktionellen Differenzierung der präfrontalen Gebiete aus (van Eden et al., 1990; Uylings und van Eden, 1990; Uylings et al., 2003). Der PFC des Menschen lässt sich in verschiedene Bereiche unterteilen: nach Miller und Cohen in den orbitalen, medialen, lateralen und medio-dorsalen Anteil (Miller und Cohen, 2001) und nach Fuster in den orbitalen, medialen und dorsolateralen Anteil (Fuster, 2001). Bei der Ratte ist der PFC in zwei Hauptareale, dem medialen (mPFC) und lateralen (lPFC) präfrontalen Cortex, unterteilt, wobei der mPFC der Ratte weitestgehend dem dorsolateralen präfrontalen Cortex des Menschen äquivalent ist. Der mPFC der Ratte kann darüber hinaus in den dorsomedialen (dmPFC) und ventromedialen (vmPFC) präfrontalen Cortex unterteilt werden. Der dorsale Anteil beinhaltet das Frontalareal 2 sowie das dorsale anteriore cinguläre Areal, der ventrale Anteil das prä- und das infralimbische Areal. Der PFC besitzt afferente und efferente Konnektionen mit fast allen neocortikalen Gebieten. Der dmPFC unterhält zahlreiche Verbindungen mit dem motorischen, somatosensorischen und gemischt somatosensorischen-motorischen Cortex. Der vmPFC kommuniziert vorrangig mit dem Subikulum, entorhinalen und perirhinalen Cortex. Der lPFC hat Verbindungen mit dem olfaktorischen, perirhinalen, piriformen und dem parietalen somatosensorischen Cortex. Darüber hinaus existieren reziproke Verbindungen innerhalb der Untereinheiten des PFC (Uylings und van Eden, 1990; Ongür und Price, 2000; Heidbreder und Groenewegen, 2003; Uylings et al., 2003).

Desweiteren unterhält der PFC reziproke Verbindungen mit subcortikalen Gebieten, darunter mit dem ventralen tegmentalen Areal (VTA), der Amygdala, dem Striatum, dem Hypothalamus, dem Mittelhirn, dem Hirnstamm sowie dem Rückenmark (Uylings und van Eden, 1990). Die wichtigste subcortikale Ausgangsstruktur des PFC stellt das Striatum, bestehend aus dem Caudatus-Putamen und dem Nucleus accumbens (NAC), dar (Uylings und van Eden, 1990; Ongür und Price, 2000).

Der PFC besitzt wie der gesamte Neocortex zwei Hauptklassen von Neurone, Projektions- und local circuit-Neurone. Die wichtigsten Neurotransmitter der Projektionsneurone innerhalb der thalamocortikalen, cortikothalamischen und cortikocortikalen Konnektionen sind exzitatorische Aminosäuren wie Aspartat und Glutamat. Local circuit Neurone dagegen wirken inhibitorisch und beinhalten den Neurotransmitter γ-Amino-Buttersäure (GABA). Durch ihren hemmenden Einfluss nehmen die GABAergen Interneurone eine besondere Stellung in der komplexen Funktionsweise des PFC ein (Letinic et al., 2002).

Der PFC ist für höhere, kognitive Funktionen, die für willentliches, zielgerichtetes Verhalten unverzichtbar sind, verantwortlich. Zu den höheren, kognitiven Funktionen zählen Leistungen wie Problemlösung, Abstraktionsvermögen, Handlungsplanung, Urteilsbildung, Entscheidungsfindung, Vorraussicht, Schlussfolgerung, Gedächtnis und Aufmerksamkeit. Diese höheren, kognitiven Leistungen werden auch als „exekutive Funktionen“ bezeichnet (Funahashi, 2001; Faw, 2003; Miller und D’Esposito, 2005).

Schäden des PFC beim Menschen führen nicht zu einem einzigen, charakteristischen Defizit, vielmehr führen Schäden des PFC zu Störungen grösserer Bandbreite, die vor allem die oben erwähnten exekutiven Funktionen betreffen (Miller, 1999; Duncan, 2001; Funahashi, 2001; Faw, 2003). Ein bekanntes und zugleich klassisches Beispiel ist die oft zitierte Fallgeschichte des Phineas Gage von Harlow im Jahre 1868. Sie beschreibt, in welchem Ausmass die Funktionen des PFC durch schwerwiegende Verletzungen des Frontallappens beeinträchtigt werden können.

1.3.2 Amygdala

Die Amygdala (*Corpus amygdaloideum*, Mandelkern) ist ein bilateral angelegter Kernkomplex im medialen Temporallappen und wichtiger Bestandteil des limbischen Systems, welches 1937 von Papez als anatomisches Substrat von Emotionen bezeichnet wurde (Rensing, 2006). Die Amygdala besteht aus etwa 13 Kernen, welche wiederum in weitere Untereinheiten gegliedert werden, die umfangreiche inter- und intra-amygdaloide Verbindungen eingehen. Die einzelnen Kerne und deren Untereinheiten lassen sich nach ihrem cytoarchitektonischem Aufbau, ihrer histochemischen Eigenschaften und aufgrund der Verbindungen, die sie eingehen, unterscheiden. Nach dieser Klassifikation sind die Amygdalakerne in drei Hauptgruppen zu fassen: (1) die tiefen oder basolateralen Kerne, (2) die oberflächigen oder Cortex-ähnlichen Kerne und (3) den centromedialen Kernen, bestehend aus dem medialen und centralen Kern. Zusätzlich existiert noch eine Gruppe von Kernen, die nicht den drei Gruppen zugeordnet werden können und daher einer eigene Gruppen zugeordnet werden. Für die Verhaltensteuerung, Furcht/Angst-Verarbeitung sowie zur Bildung des emotionalen Gedächtnisses sind vor allem drei Gebiete wichtig: der laterale und basale Kern, die zusammen den basolateralen Komplex bilden und der centrale Kern. Der basolaterale Komplex zeigt eine cortex-artige Struktur, mit Pyramidenzellen und GABAergen Interneuronen sowie afferenten glutamatergen Projektionen (Le Doux, 2000b; Sah et al., 2003; Morgane et al., 2005). Die basolaterale Kerngruppe ist die Haupteingangsstruktur für Afferenzen aus dem Thalamus, Hypothalamus, Hippocampus, präfrontalen, orbitofrontalen, anterioren cingulären, entorhinalen und perirhinalen Cortex sowie von primär-sensorischen Cortexarealen (auditorisch, visuell, somatosensorisch), mit denen Sie reziprok verschaltet ist. Der basolaterale Komplex ist das Hauptziel der meisten sensorischen Informationen, die hauptsächlich aus zwei Quellen stammen: aus den sensorischen Kernen des Thalamus und den primär-sensorischen Arealen des Cortex (Le Doux, 2000b; Sah et al., 2003). Die thalamischen sensorischen Informationen erreichen die Amygdala schneller als die sensorischen Informationen aus dem Cortex. Dies geschieht unbewusst und vermittelt kurzfristige, primitive, emotionale Reaktionen und bereitet die Amygdala auf den Empfang weiterer Informationen vor. Die sensorischen Informationen des Cortex erreichen kurze Zeit später die Amygdala, nachdem sie im Cortex analysiert und bewertet wurden und veranlassen die Amygdala zur Aufrechterhaltung oder zur Elimination der

emotionalen Reaktion (Kandel et al., 2000). Die Informationen aus dem basolateralen Komplex werden über eine intra-amygdaloide Projektion zum centralen Kern der Amygdala gesendet. Der centrale Kern ist die Hauptausgangsstruktur der Amygdala und sein morphologischer Aufbau unterscheidet sich wesentlich von dem des basolateralen Anteil. Er zeigt eine striatum-artige Struktur und besitzt afferente GABAerge Projektionen. Er projiziert vor allem zu den autonom-vegetativen, motorischen und viszeralen Schaltstellen des Mesencephalon und zu wichtigen Kernen in der Pons und Medulla oblongata und veranlässt über diese Verbindungen die adäquaten autonomen und endokrinen Reaktionen auf die efferenten Informationen aus dem basolateralen Komplex (Kandel et al., 2000; LeDoux, 2000a; Sah, 2003).

Zusammenfassend kann man sagen, dass die Amygdala u.a. wesentlich an der Entstehung von Emotionen, der Bildung von emotionalen Gedächtnisprozessen, der Regulation von autonom-vegetativer Funktionen sowie bei der Verarbeitung von olfaktorischen, gustatorischen und nozizeptiven Informationen beteiligt ist.

Eine Dysfunktion der Amygdala kann u.a. zu pathologischen Angstzuständen, zum Verlust von Furcht und Aggression und zur Fehleinschätzung von emotional relevanten Reizen oder Situationen führen. Die Amygdala ist demnach von zentraler Bedeutung für die Wahrnehmung und Speicherung emotional relevanter Ereignisse, die für das Überleben des Individuums und einem angepassten Sozialverhaltens eminent wichtig ist (LeDoux, 2000a; LeDoux, 2000b; Sah, 2003; Morgane, 2005).

1.3.3 Hippocampus

Ebenso wie die Amygdala wird auch der Hippocampus (oder die Hippocampusformation) zum limbischen System gezählt. Der Hippocampus kann aufgrund seiner Cytoarchitektur und seiner histochemischen Eigenschaften in vier Areale gegliedert werden: das Ammonshorn (*Cornu Ammonis*; CA1 – CA4), den Gyrus dentatus, das Subikulum und den Gyrus parahippocampalis mit dem entorhinalen und perirhinalen Cortex. Die wichtigste Eingangsstruktur für Informationen aus den primär-sensorischen, assoziativen Cortexarealen und den limbischen Afferenzen ist der entorhinale Cortex. Von hier aus werden die Informationen über drei grosse Projektionen weitergeleitet. Aus dem entorhinalen Cortex entspringt der *Tractus perforans*, dessen Axone auf den Körnerzellen des Gyrus dentatus enden. Die glutamatergen Axone der Körnerzellen, die Moosfasern, ziehen zu den Pyramidenzellen der CA3-Region im Hippocampus. Die CA3-

Pyramidenzellen projizieren über die Schaffer-Kollaterate ebenfalls glutamaterg zu der CA1 Region, die ihrerseits über das Subikulum, der wichtigsten Ausgangsstruktur des Hippocampus, efferente Projektionen u.a. zum entorhinalen Cortex, NAC, zur Amygdala und verschiedenen Arealen des PFC unterhält. Neben dem Subikulum unterhalten die einzelnen Hippocampusareale ihrerseits eine Vielzahl von Verbindungen mit cortikalen und subcortikalen Regionen. Zusätzlich spielen cholinerge Afferenzen aus dem Septum, serotonerge Eingänge aus den Raphé-Kernen, noradrenerge Eingänge aus dem Locus coeruleus sowie histaminerge Eingänge aus den Mamillarkörpern ein wichtige Rolle für die Funktionsweise des Hippocampus (Squire und Kandel, 1999; Kandel et al., 2000).

Der Hippocampus ist wesentlich an der Speicherung deklarativer und räumlicher Gedächtnisinhalte beteiligt. Die grundsätzliche Funktion des Hippocampus besteht in der Überführung von kurzfristigen Gedächtnisinhalten in langfristige deklarative Gedächtnisengramme, um diese wiederum zur Langzeitspeicherung den dafür zuständigen Assoziationscortices zuzuführen. Die funktionelle Bedeutung des Hippocampus ergab sich u.a. aus den klinischen Befunden bilateraler Ablationen der Hippocampi bei Epilepsie-Patienten (z.B: die berühmte Fallbeschreibung von H.M., einem Epilepsie-Patienten von B. Milner im Jahre 1957). Diese Patienten litten nach dem neurochirurgischen Eingriff an einer permanten anterograden Amnesie, wobei das Lang- bzw. Kurzzeitgedächtnis intakt blieb (Squire und Kandel, 1999, Kandel et al., 2000).

1.3.4 Nucleus Accumbens und ventrales tegmentales Areal

Das menschliche Striatum setzt sich aus mehreren Komponenten zusammen: dem Nucleus Caudatus, dem Putamen (auch Caudatus-Putamen) und dem Globus Pallidus. Bei den Nagern wird das Caudatus-Putamen als dorsales Striatum bezeichnet und wird in eine ventrale und dorsale Region gegliedert. Das ventrale Striatum wird als Nucleus Accumbens bezeichnet und setzt sich wiederum aus zwei Hauptregionen zusammen: aus der *shell*- und der *core*-Region. Diese beiden Untereinheiten des NAC können aufgrund cytoarchitektonischer und histologischer Charakteristika und anhand ihrer ausgeprägten afferenten und efferenten Projektionen unterschieden werden (Pennartz et al., 1994; Groenewegen et al., 1996; van Dongen, 2005). Die Neurone des NAC bestehen zu 90-95% aus GABAergen medium spiny Neuronen. Die restlichen 5-10% der Neuronen sind Interneurone unterschiedlicher Klassen (z.B. Voorn et al., 2004; Wolf et al., 2004).

Der NAC erhält glutamaterge Afferenzen aus cortikalen, limbischen Regionen (PFC, der Amygdala, Hippocampus, Thalamus) sowie dopaminerge Eingänge aus mesopontinen Arealen, insbesondere aus dem VTA. Die *shell*-Region des NAC sendet efferente Projektionen zum ventralen Pallidum, zur Amygdala, zum lateralen präoptischen Areal, zum lateralen Hypothalamus, zum pedunculopontinen tegmentalen Nucleus, zum medialen VTA, zur Substantia nigra pars compacta und zum centralen Höhlengrau. Dagegen projiziert die *core*-Region hauptsächlich zum dorsolateralen ventralen Pallidum, zum lateralen Teil des VTA und zur Substantia nigra (Pennartz et al., 1994; Groenewegen et al., 1996; Ikemoto und Panksepp, 1999).

Aufgrund seiner efferenten Projektionen zum ventralen Pallidum, welches als Ausgangsstruktur für die Informationen aus dem NAC gilt und an der Initiierung und Ausführung motorischer Verhaltensweise beteiligt ist, wird der NAC auch als *interface* zwischen den limbischen und motorischen Systemen bezeichnet (detailiertere Ausführung: siehe Abschnitt 1.4.2). Des weiteren ist der NAC an der Modulation von unkonditionierten Verhaltenweisen wie der lokomotorischen Aktivität, des appetitiven und aversiven Verhaltens sowie an der Kontrolle von zielgerichtetem Verhalten, Motivation, Sucht und Belohnung beteiligt (z.B. Kalivas und Nakamura, 1999; van Dongen, 2005; Cardinal et al., 2002; Salamone et al., 2003; Cardinal und Everitt, 2004; Voorn et al., 2004; Wolf et al., 2004; Goto et al., 2005).

Eine entscheidende Rolle neben dem NAC bei der Vermittlung von motivierten, belohnten oder verstärkenden Verhaltensweisen nehmen die dopaminergen Afferenzen aus dem VTA ein. Das VTA ist eine Struktur im Mesencephalon, dessen Neuronen hauptsächlich den Neurotransmitter Dopamin ausschütten und Ausgangspunkt des mesotelencephalen dopaminergen Systems (A8-A10) sind. Dieses lässt sich in das nigrostriatale dopaminerge System (A9), mesolimbische dopaminerge System (A8) und das mesocortikale dopaminerge System (A10) unterteilen. Das nigrostriatale Dopamin System sendet ausgehend von der Substantia nigra pars compacta und zum kleinen Teil aus dem ventrolateralen Anteil des VTA seine dopaminergen Projektionen zur Amygdala, zum dorsalen Striatum, NAC, olfaktorischen Tuberkel und suprarhinalen Cortex. Das mesolimbische dopaminerge System innerviert ausgehend von dem VTA den NAC, die Amygdala, die Stria terminalis, den olfaktorischen Tuberkel, das laterale Septum und den lateralen Hypothalamus. Das VTA projiziert über das mesocortikale

Dopamin System zum mPFC, den anterioren cingulären Cortex und zum suprarhinalen Cortex (Gardner et al., 2000; Kandel et al., 2000). Im Gegenzug erhält das VTA zahlreiche Eingänge aus verschiedenen Hirnregionen, darunter aus dem NAC, PFC, lateralen Hypothalamus, der Substantia nigra, der Stria terminalis und verschiedenen Kerngebieten der mesopontinen Areale (Ikemoto und Panksepp, 1999).

1.3.5 Begründung der Auswahl der cortikalen und subcortikalen Strukturen

Die Auswahl des PFC als Vertreter der Hirnrinde und der Amygdala, des Hippocampus, des NAC als Vertreter des limbischen Systems sowie des VTA als Vertreter des Mittelhirns des Gehirns begründet sich in der Tatsache, dass sie besonders empfindlich gegenüber Störeinflüssen während der neonatalen Hirnentwicklung der Ratte sind. Zudem sind sie an der Regulation und Modulation der in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Verhaltensversuche massgeblich beteiligt. Der PFC ist am emotionalen (akustisch ausgelöste Schreckreaktion, Präpulsinhibition, *elevated plus maze*-Test), motivationalen (*progressive ratio*-Test) und explorativen Verhalten (*open field*-Test) beteiligt und hat einen modulierenden Einfluss auf das Kurzzeitgedächtnis (*object recognition*- Test). Die Amygdala dagegen ist primär am emotionalen Verhalten beteiligt. Der Hippocampus wird u.a. mit der Wiedererkennung von Objekten (*object recognition*-Test) in Verbindung gebracht, der NAC und das VTA einerseits an der Vermittlung von explorativem und andererseits an der Modulation von motivationalem und belohnendem Verhalten beteiligt.

1.4 Verhaltenstests

1.4.1 Die akustisch ausgelöste Schreckreaktion

Die akustisch ausgelöste Schreckreaktion (ASR) ist eine phylogenetisch alte, universell auftretende motorische Antwort auf unvermittelt auftretende, intensive Reize. Sie besteht aus einem „Zusammenschrecken“ mit Lidschluss und einer Kontraktion der Gesichts-, Nacken- und nachfolgend der gesamten Skelettmuskulatur (Landis und Hunt, 1939). Eine Zunahme der Herzfrequenz und peripherer Vasokonstriktion ist ebenfalls zu beobachten. Dieses Verhaltensmuster kann als eine nicht unterdrückbare, protektive Reaktion gegenüber Feinden, Umwelteinflüssen und als Reaktion in Vorbereitung einer „flight/fight“-Reaktion gesehen werden. Die ASR kann sowohl olfaktorisch, taktil, visuell als auch akustisch ausgelöst werden (Koch, 1999). Die Schwelle zur akustisch ausgelösten ASR der Ratte liegt im Mittel bei ca. 87 dB *sound pressure level* (SPL) über der Hörschwelle und hat ein Maximum bei einer Frequenz von 10 kHz (Pilz et al., 1987). Die ASR wird unter anderem durch die Reizintensität und Flankendauer beeinflusst. Dabei steigt die Reaktionsstärke mit zunehmender Stimulusintensität und ist am effektivsten bei einer Flankendauer von 0-0,4 ms (Pilz et al., 1987).

Die ASR hat eine elektromyographisch gemessene Latenzzeit von ca. 10 ms. Aufgrund dieser kurzen Latenz zwischen Reizpräsentation und ASR nimmt man an, dass der zugrundeliegende Schaltkreis aus wenigen, seriell geschalteten Neuronen besteht. Tracing-, Stimulations- und Läsionsexperimente bestätigten diese Annahme. Die ASR wird demnach durch einen simplen, oligosynaptischen, neuronalen Schaltkreis im pontinen Hirnstamm vermittelt. Das ASR-vermittelnde Netzwerk besteht aus 3 hintereinandergeschalteten Kerngebieten (Abb. 2; Koch, 1999).

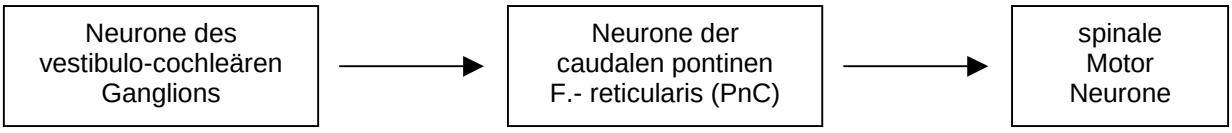


Abb. 2. Schaltkreis zur Vermittlung der ASR (Koch, 1999).

Der PnC erhält direkten, kurzlatenten, auditorischen Input von verschiedenen Kerngebieten der zentralen Hörbahn und projiziert auf cranielle und spinale Motoneurone, welche für den motorischen Output verantwortlich sind (Lingenhöhl and Friauf, 1992). Der PnC erhält von einer Vielzahl von Hirngebieten inhibitorische und exzitatorische Afferenzen, die in modulierender Weise in den neuronalen Schaltkreis der ASR eingreifen. Aufgrund dieser zentralen Position des PnC in der ASR wird er als sensomotorisches Interface bezeichnet (Lingenhöhl und Friauf, 1992; Koch, 1999).

Erhält das sensomotorische Interface einen hemmenden Einfluss, der den motorische Output reduziert, spricht man auch von einem „sensorimotor gating“ (Koch, 1998; Swerdlow et al., 2001). Diese Modulation der ASR, in der die Amplitude der ASR reduziert ist, wird auch als Präpulsinhibition (PPI) bezeichnet (Hoffman und Ison, 1980; Koch, 1999).

1.4.1.1 Die Präpulsinhibition der ASR

Die Amplitude der ASR ist reduziert, wenn kurz vor dem Schreckreiz ein Präpuls visueller, taktiler oder akustischer Natur präsentiert wird, der selber keine ASR auslöst (Hoffman und Ison, 1980; Koch, 1999; Abb. 3). Die Präpulsinhibition (PPI) tritt schon nach der ersten Präsentation auf und scheint demnach keinem Lern- oder Habituationsprozess zu unterliegen. Jedoch zeigen Untersuchungen jüngerer Zeit, dass, abhängig von den präsentierten Parametern, die PPI habituieren kann (Gewirtz und Davis, 1995; Quednow et al., 2006). Die PPI nimmt mit steigender Präpulsintensität zu und erreicht ihr Maximum bei einer Präpulslänge von 10-20 ms. Bei Ratten ist die PPI am effektivsten bei einem Interstimulusinterval von 100 ms zwischen dem Präpuls und dem Schreckreiz (Hoffman and Ison, 1980; Blumenthal, 1999).

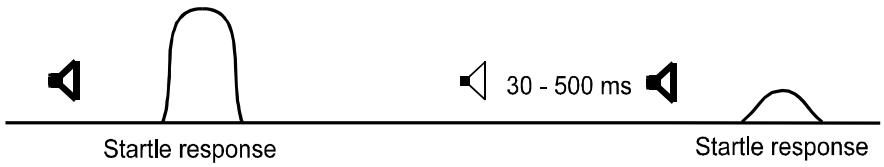


Abb. 3. Schematische Darstellung der PPI der ASR (Koch, 1999).

1.4.1.2 Die Regulation der PPI

Der neuronale Mechanismus, der die PPI vermittelt, ist noch nicht völlig verstanden. Nach dem derzeit favorisierten Modell stimuliert ein auditorischer Präpuls sequentiell frühe Strukturen des aufsteigenden auditorischen Systems, den Colliculus inferior, den Colliculus superior sowie den pedunculopontinen tegmentalen Kern (PPTg), der mittels einer inhibitorischen, cholinergen Projektion auf den PnC einwirkt (Abb. 4). Diese Inhibition des PnC führt zu einer Hemmung des motorischen Outputs (Koch, 1998).

Die PPI der ASR steht deutlich unter dem Einfluss übergeordneter cortikaler und subcortikaler Strukturen, die an der Regulation der PPI beteiligt sind. Die Identifikation anatomischer Strukturen basiert vornehmlich auf Läsionsstudien und tierexperimentellen Untersuchungen zur pharmakologischen Beeinflussung der PPI. Strukturen wie das septohippocampale System (Koch, 1996), das ventrale Pallidum (Kretschmer and Koch, 1998), der PPTg (Koch et al., 1993), der PFC (Koch und Bubser, 1994; Japha und Koch, 1999) sowie die Amygdala (Fendt et al., 2000) sind an der Modulation der PPI beteiligt. Die an der Regulation der PPI beteiligten cortikalen und subcortikalen Gebiete projizieren zum NAC, in dem glutamaterge und dopaminerge Afferenzen integriert werden und an die Areale im Hirnstamm weitergeleitet werden, die die PPI vermitteln (Kretschmer und Koch, 1998; Fendt und Koch, 1999).

1.4.1.3 Die Funktion der PPI

In Grahams klassischer Arbeit über die funktionelle Bedeutung der PPI geht sie von einer protektiven Funktion der PPI aus. In ihrem Modell aktiviert der Präpuls inhibitorische Mechanismen, die die präattentive (nicht bewusste) Wahrnehmung und Analyse des Präpulses vor einer Störung durch einen Schreckreiz und der damit gekoppelten ASR schützt (Graham, 1975). Braff und seine Mitarbeiter beschreiben das Phänomen der PPI als ein Konzept der sensomotorischen Hemmung oder als Wahrnehmungsfilter. Ablenkende, irrelevante Stimuli werden herausgefiltert, um die Verarbeitung relevanter, bedeutender Stimuli zu gewährleisten und vor Überladung mit Reizen zu schützen (Braff, 2001). Die Untersuchung der PPI stellt ein operationales Mass dar, um diese sensomotorische Hemmung auf ihre Funktion hin zu untersuchen.

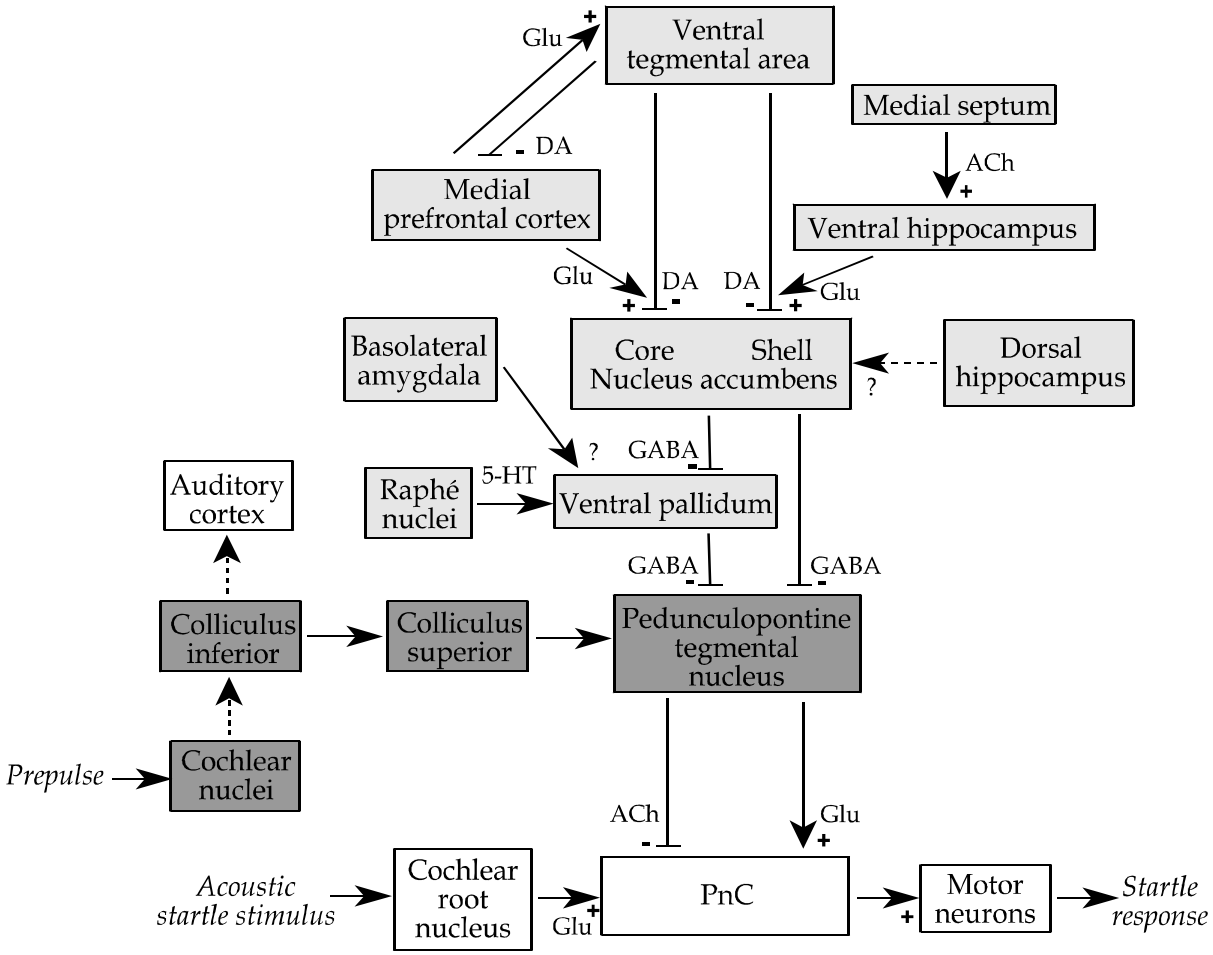


Abbildung 4. Hypothetischer Schaltkreis zur Vermittlung der PPI der ASR und dessen Modulationen. Abbkürzungen: Glu, Glutamat; DA, Dopamin; ACh, Acetylcholine; GABA, γ-amino-Buttersäure; 5-HT, Serotonin; +, erregende; -, inhibierende Neurotransmitter-Aktion; ?, direkte Interaktion fraglich (Aus: Koch, 1999).

1.4.2 *Open field*-Test

Die lokomotorische Aktivität ist eine spontan auftretende, instinktive Verhaltensweise, die bei der Konfrontation mit einer neuen unbekannten Umgebung auftritt und zum Explorationsverhalten gezählt wird. Neben der horizontalen Aktivität beinhaltet die lokomotorische Aktivität zusätzlich die vertikale Aktivität (das Aufrichten) zur Orientierung und Exploration der Umgebung (Skinner und Garcia-Rill, 1993).

Nach heutigen Kenntnissen wird die lokomotorische Aktivität über einen komplexen cortiko-limbischen-striatalo-pallido-pedunculopontinen Schaltkreis moduliert (Abb. 5), in dem der NAC als entscheidende Schaltstelle zwischen den limbischen-cortikalen Strukturen, die äussere und innere motivierende Informationen zu zielgerichtetem Verhalten generieren, und den motorischen Strukturen, die an der Bewegungsausführung beteiligt sind, fungiert. Mogenson et al. (1993) bezeichnen die Funktion des NAC auch als *limbic-motor integrative process*, der motivationale Reize in motorisches Verhalten übersetzt. Der NAC erhält glutamaterge Afferenzen aus cortikalen (Amygdala, PFC, Hippocampus) sowie dopaminerge Projektionen aus subcortikalen Strukturen (z.B. aus dem VTA) und projiziert selbst GABAerg zum ventralem Pallidum (VP) und dem PPTg, die ihrerseits Projektionen zum mediodorsalen Thalamus und über die mediale medulläre Formatio reticularis zum Rückenmark besitzt. Das VP wird als primäre Ausgangsstruktur beschrieben, die über den mediodorsalen Thalamus die Aktivität des motorischen Cortex moduliert und mit den klassischen motorischen Strukturen kommuniziert (Skinner und Garcia-Rill, 1993; Groenewegen et al., 1996; Kalivas und Nakamura, 1999).

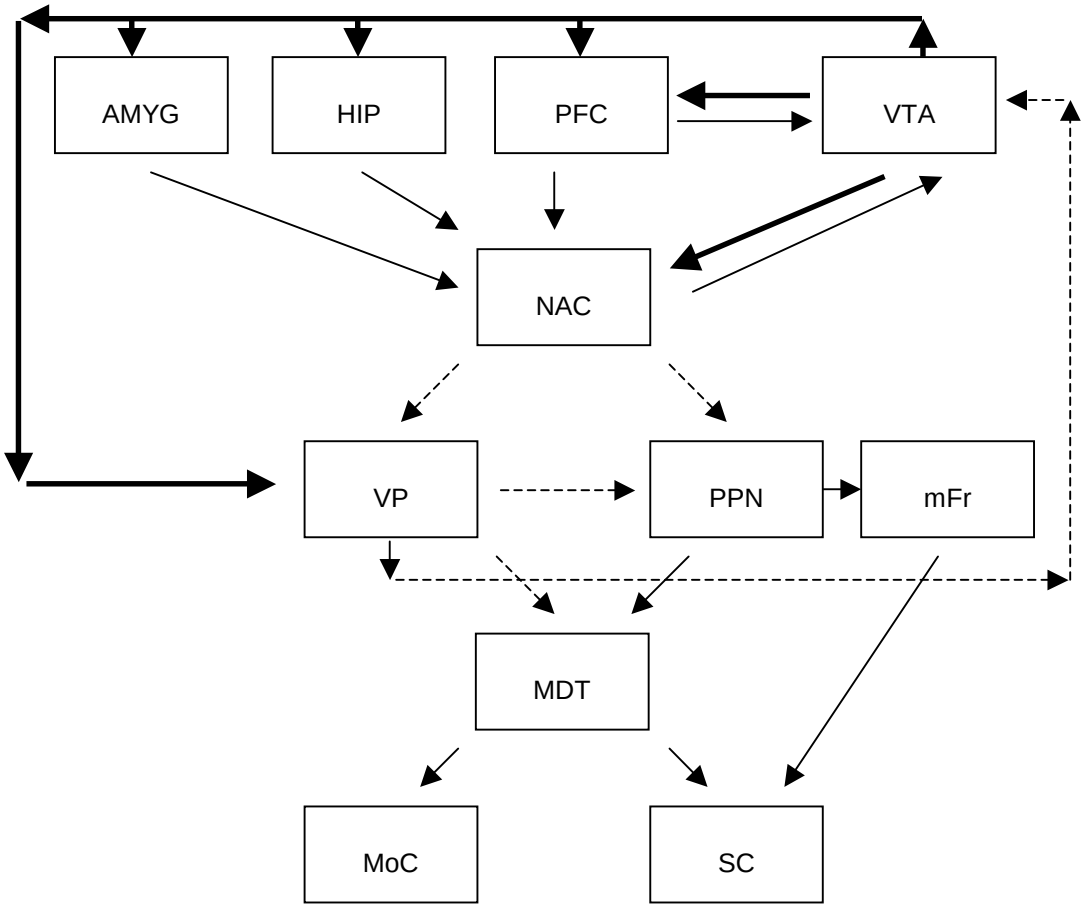


Abb. 5. Hypothetischer neuronaler Schaltkreis der cortiko-limbischen-striato-pallido-pedunculopontinen Feedback-Schleife, die an der Regulation der lokomotorischen Aktivität beteiligt ist. Die hervorgehobenen schwarzen Pfeile stellen dopaminerge-, die gestrichelten Pfeile GABAerge- und die schwarzen Pfeile glutamaterge Verbindungen dar (Abkürzungen: AMYG: Amygdala; HIP: Hippocampus; PFC: Präfrontaler Cortex; VTA: ventrales tegmentales Areal; NAC: Nucleus Accumbens; VP: ventrales Pallidum; PPN: pedunculopontiner tegmentaler Kern; mFr: medulläre Formatio reticularis; MDT: medio-dorsaler Thalamus; MoC: motorischer Cortex; SC: Rückenmark).

1.4.3 *Progressive ratio*-Test

Zur Beurteilung der relativen Stärke oder des Wertes einer Belohnung führte Hodos 1961 den *progressive ratio* (PR)-Test ein (Hodos, 1961). Während dieses PR-Tests steigt die operante Anforderung an das Versuchstier. um eine konstante Belohnung zu erlangen, innerhalb festgelegter Kriterien (z.B. innerhalb eines bestimmten Zeitintervalls) linear oder progressiv an. Diejenige Phase, in der das Versuchstier die geforderte Leistung nicht mehr erbringt, wird als *break point* bezeichnet und wurde einerseits als Maß für die relative Stärke der Belohnung, unabhängig des motivationalen Zustand des Tieres (Hodos und Kalman, 1963; Cheeta et al., 1995; Reilley, 1999), andererseits als Maß für die Motivation des Tieres zur Erlangung der Belohnung definiert. Der *break point* im Sinne der zweiten Definition scheint das Resultat einer Kosten-Nutzen-Analyse des Versuchstieres zu sein, bei der die Stärke (oder der Anreiz) der Belohnung den „Nutzen“ und die geforderte Leistung zur Erhaltung dieser Belohnung die „Kosten“ in dieser Rechnung darstellen. Beim *break point* scheint der Anreiz der Belohnung (oder Nutzen) nicht stark genug zu sein, um die erforderte Leistung (oder Kosten) zur Erhaltung dieser Belohnung aufzubringen. Die Motivation des Tieres zur Erlangung der Belohnung ist demnach abhängig von dem Anreiz (oder Stärke) der Belohnung und der geforderten Leistung, um diese zu erhalten (Richardson und Roberts, 1996; Barr und Phillips, 1999; Alderson et al., 2002; Salamone, 2006).

Diese Interpretationen werden durch Beobachtungen unterstützt, die zeigen, dass sich der *break point* abhängig von der Größe der Belohnung sowie vom Sättigungs- und Deprivationsgrad des Tieres beeinflussen lässt (Mobini et al., 2000). Darüber hinaus wird die Bestimmung des *break point* in der PR-Aufgabe von einer Vielzahl von Parametern beeinflusst, die in keinem direktem Zusammenhang mit der Stärke der Belohnung stehen, wie z.B. die Höhe des Hebels, der geforderte Kraftaufwand für den Hebeldruck oder die Anzahl der Hebeldrücke (Aberman et al., 1998). Zusätzlich können auch Extinktions- und Frustationsprozesse eine wichtige Rolle beim *break point* spielen (Stewart, 1975; Cetin et al., 2004).

1.4.4 *Object recognition*-Test

Das Wiederkennen von Objekten (*object recognition*; bei Wiedererkennen von Artgenossen: *social recognition*) ist eine Funktion des Arbeitsgedächtnisses, speziell des Kurzzeitgedächtnisses, und kann bei Ratten unter Anwendung des *object recognition* (OR)-Tests untersucht werden. Die Wiedererkennung ist ein neuronaler Prozess, bei dem sich das Versuchstier bei einem ihm präsentierten Stimulus (z.B. ein Objekt) bewusst wird, dass es diesen schon einmal zuvor erfahren hat und daraufhin wiedererkennt. Dieser Prozess des Wiederkennens beinhaltet, dass die charakteristischen Eigenschaften eines Stimulus (sei es ein Gegenstand oder ein Ereignis) wahrgenommen, identifiziert und mit einer bereits erfahrenen Erinnerung verglichen werden müssen (Steckler et al., 1998a). Der OR-Test basiert auf dem Wissen, dass Versuchstiere sich länger mit einem neuen, ihnen unbekannten Objekt beschäftigen als mit einem Objekt, welches ihnen schon zuvor präsentiert wurde und somit bekannt war (Blanchard et al., 1970). Erfolgt innerhalb einer Stunde eine zweite Präsentation desselben Objektes, nimmt unter normalen Bedingungen das Explorationsverhalten des Tieres ab. Liegt zwischen der ersten und zweiten Präsentation desselben Objektes dagegen mehr als zwei Stunden, so wird das schon mal zuvor erfahrene Objekt wieder als neu und interessant wahrgenommen. (Everts und Koolhaas, 1997; Bertaina-Anglade, 2006). Das Gleiche gilt für die Präsentation eines neuen Objektes innerhalb der ersten Stunde. Für diese Gedächtnisprozesse zur Wiederkennung von Objekten wird ein neuronales Netzwerk aus verschiedenen Strukturen angenommen, welches u.a. Areale des temporalen Cortex, des rhinalen Cortex (insbesondere die entorhinalen und perirhinalen Anteile), des mediodorsalen Thalamus, und bestimmte Areale des präfrontalen Cortex beinhaltet (Steckler et al., 1998b). Dieser Wiedererkennungsprozess ist ebenso wie andere Gedächtnisleistungen empfindlich gegenüber pharmakologischen Manipulationen (Steckler et al., 1998c). Zum Einen kann dieser Prozess durch gedächtnisfördernde Substanzen (z.B. durch cholinerge Agonisten) verbessert (Puma et al., 1999), zum Anderen kann er aber auch durch Verabreichung von bestimmten Pharmaka (z.B. durch den NMDA-Rezeptor Antagonisten MK-801 oder den muscarinischen Antagonisten Scopolamin verschlechtert werden (de Lima et al., 2005; Winters & Bussey, 2005).

1.4.5. *Elevated plus maze*-Test

Der *elevated plus maze* (EPM)-Test zur Messung des angstassoziierten Verhaltens geht zurück auf die Arbeiten von Montgomery (1955). Aus dieser Untersuchung ging hervor, dass Ratten erhöhte und offene Gänge stärker mieden als geschlossene. Er zeigte damit, dass eine neue, unbekannte Umgebung als aversiver Stimulus wirken konnte und bei den Ratten entweder Angst- oder Explorationsverhalten auslöste. Somit war der EPM-Test ein Maß für den Konflikt zwischen dem Explorationsverhalten auf der einen Seite und der Angst auf der anderen Seite. Der EPM-Test als Test für angstassoziiertes Verhalten bei Ratten wurde als erstes von Pellow et al. (1985) validiert. Das EPM besteht aus zwei sich gegenüberliegenden offenen (ohne Seitenwände ausgestatteten) Arme und zwei sich gegenüberliegenden geschlossenen (mit hohen Seitenwänden ausgestatteten) Armen, die in einer Plus-Form angeordnet sind. Naive Tiere zeigen unter normalen Bedingungen eine deutliche Präferenz für die geschlossenen Arme und halten sich seltener in den offenen Armen auf (Pellow et al., 1985; Rodgers und Dalvi, 1997). Als klassische Parameter zur Messung von angstassoziiertem Verhalten werden die Anzahl der Eintritte und die Aufenthaltsdauer in den offenen Armen sowie die Eintritte in die geschlossenen Arme und/oder die Gesamteintritte in die Arme gemessen. Es zeigte sich, dass sowohl die Anzahl der Eintritte als auch die Aufenthaltsdauer in den offenen Armen gegenüber anxiolytischen und anxiogenen Pharmaka empfindlich sind (z.B. wird nach Gabe eines Anxiolytikum eine längere Aufenthaltsdauer und eine erhöhte Anzahl von Eintritten in die offenen Arme beobachtet), wohingegen die Anzahl der Eintritte in die geschlossenen Arme und/oder Gesamteintritte in die Arme üblicherweise unempfindlich gegenüber diesen Substanzen sind und eher als Mass für die lokomotorische Aktivität anzusehen ist (File, 1990; Kliethermes, 2005).

1.5 Ziel der Arbeit

Schädigende Ereignisse (Virusinfektionen, Drogen, Ethanol) beeinträchtigen die Entwicklung des Gehirns in vielfältiger Weise (Rice und Barone, 2000). Vor allem das Frontalhirn und das limbische System sind vulnerabel gegenüber Störeinflüssen während der frühen neonatalen Hirnentwicklung (Ikonomidou et al., 2000). Die intrauterine Exposition des menschlichen Fetus mit Ethanol führt zu schwerwiegenden Schädigungen des ZNS, die zu einer veränderten Hirnanatomie und -physiologie sowie letztlich zu einer Störung der Perzeption, Kognition und Emotionalität führt. Bislang nicht geklärt ist die Frage, in welcher Weise schädliche Einflüsse wie der Ethanolkonsum während der Pubertät Einfluss auf solch ein vulnerables Gehirn nehmen.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit besteht daher in der Untersuchung der Auswirkungen von neonataler und/oder pubertärer chronischer Ethanolbehandlung auf kognitive, emotionale und perzeptuelle Verhaltensleistungen und deren Konsequenzen für die Entwicklung des Gehirns bei der Ratte.

2. Material und Methoden

2.1 Versuchstiere

Alle Versuche wurden mit männlichen Ratten (Rattus norvegicus) vom Stamm Wistar durchgeführt. Adulte männliche und weibliche Wistar Ratten wurden von Harlan-Winkelmann (Borchen, Deutschland) bezogen und paarweise in großen Makrolonkäfigen Typ IV (60 x 38 x 25 cm) unter Standardbedingungen gehalten. Im Zuchtraum herrschte ein Licht-Dunkel-Zyklus von 12 h (Beleuchtung von 0700 bis 1900 Uhr). Die Tiere erhielten freien Zugang zu Wasser und wurden ad libitum mit Zuchtfutter (Nohrlin, Bad Salzuflen, Deutschland) gefüttert. Nach einer Zeitspanne von drei Wochen, innerhalb derer die Verpaarung und die Befruchtung des Weibchens statt fand, wurden die männlichen Tiere aus dem Käfig entfernt. Nach der Geburt der Jungen wurde der Wurf sofort auf acht männliche Welpen reduziert. Reichte die Anzahl der männliche Tiere dafür nicht aus, wurde die Wurfgröße mit weiblichen Tieren vervollständigt. Nach dem Absetzen der männlichen Versuchstiere an PD21 wurden diese in einem separaten Haltungsraum in Gruppen von drei bis sechs Tieren in Makrolonkäfigen Typ IV unter konstanten Bedingungen und einem Licht-Dunkel-Zyklus von 12 h (Beleuchtung von 0700 bis 1900 Uhr) gehalten. Die Ratten erhielten freien Zugang zu Wasser und Haltungsfutter (Nohrlin, Bad Salzuflen, Deutschland) bis zu PD35. Daraufhin wurden die Tiere über den gesamten Verlauf der Versuche durch kontrollierte Fütterung von 12 g Haltungsfutter/Ratte/Tag auf einem Körpergewicht von 250-300 g gehalten. Dieses Körpergewicht entspricht etwa 85% des bei freier Fütterung erzielten Gewichts bis zu einem Alter von 12 Monaten. Während der Durchführung des PR-Tests und des Präferenz-Tests wurde die Futtermenge jeden Tag neu bestimmt, da die Tiere bei diesen Experimenten Kaseinpellets erhielten. Entsprach die Menge der gefressenen Pellets während dieser Versuche nicht den 12 g des Standardlaborfutters, so wurden die Tiere in ihren Haltungskäfigen mit Laborfutter nachgefüttert. Das Gewicht der Tiere wurde täglich kontrolliert. Wasser stand den Tieren jeder Zeit ad libitum zur Verfügung.

2.2 Substanzen

Pharmakon: Alkohol (99,8%, p.a.)
Chemischer Name: Ethyl-Alkohol, Ethanol
Summenformel: C_2H_6O
Molekulargewicht: 46,07 g/mol
Hersteller: Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland

Ethanol wurde mit Saline (0,9% NaCl) auf 20% Volumenkonzentration verdünnt und in einer Dosis von 5 g/kg (2x 2,5 g/kg) den neonatalen Ratten und in einer Dosis von 1 g/kg den adoleszenten Ratten intraperitoneal (i.p.) appliziert.

Pharmakon: Diazepam-Lipuro
Chemischer Name: 7-Chlor-2,3-dihydro-1-methyl-5-phenyl-2H-1,4-benzodiazepin-2-on
Summenformel: $C_{16}H_{13}ClN_2O$
Molekulargewicht: 284,75 g/mol
Hersteller: B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland

Das Benzodiazepin Diazepam (Abb. 6) wirkt inhibitorisch als Agonist an der Benzodiazepin-Bindungsstelle des $GABA_A$-Rezeptors. Die Substanz wurde mit Saline verdünnt und 30 min vor Beginn der Versuche in einer Dosis von 1,25 mg/kg i.p. verabreicht.

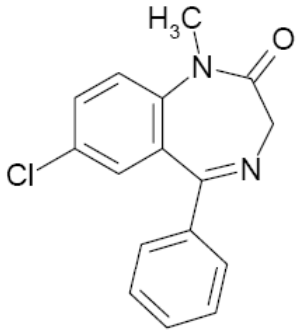


Abb. 6. Die Strukturformel von Diazepam.

2.3 Verhaltenstests

2.3.1 PPI der ASR

Für die Messung der PPI der ASR der Tiere wurde das TSE Startle Response System (TSE Systems, Bad Homburg, Deutschland) verwendet. Das System bestand aus zwei Startleboxen, einer Steuereinheit und einem PC mit Steuer- und Auswertungssoftware (TSE Startle Response Software Version 2.00). Die Startleboxen bestanden aus einer durch Schaumstoff schallgedämmten Kammer (320 x 320 x 320 mm) mit ausschaltbarem Hauslicht, einer Lautsprechereinheit und einer piezoelektrischen Messplattform zur Aufnahme der Reaktionen der Tiere (Abb. 7). Die Lautsprecher befanden sich in 4 cm Entfernung rechts und links der Ratten in Kopfhöhe. Während der Versuche befanden sich die Tiere in schalldurchlässigen Metallgitterkäfigen (270 x 90 x 100mm). Die Bewegungen der Tiere wurden über die Messplattform aufgenommen und in Spannungsänderungen umgewandelt, die proportional zur Bewegungsstärke waren. Die Signale wurden mit einem Analog-Digital-Wandler an den PC zur weiteren Analyse weitergeleitet.

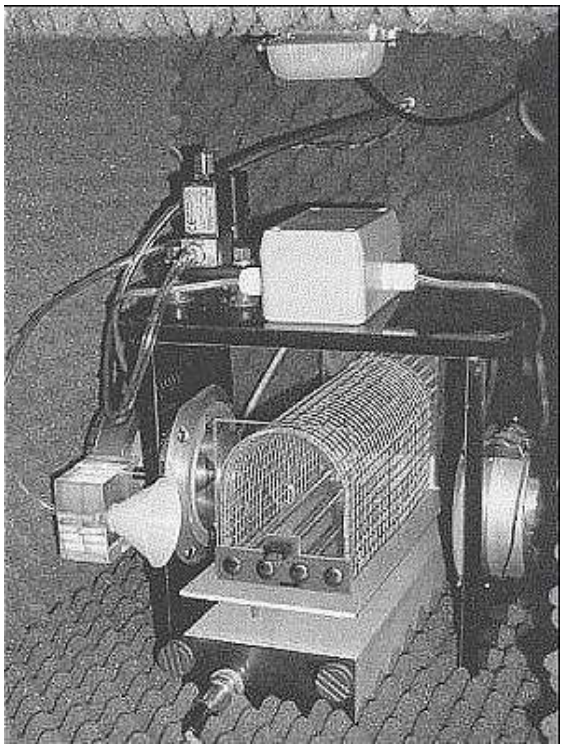


Abb. 7. Startle-Box von innen. Abgebildet ist die Lautsprechereinheit, die bewegungssensitive Messplattform sowie der schalldurchlässige Käfig. Die Startle-Box ist von innen mit schalldämmenden Schaumstoff ausgekleidet (Aus: Bedienungshandbuch des TSE Startle Response System™).

Die Tiere hatten vor jedem Versuch 5 Minuten Zeit, sich an die Startle-Box zu gewöhnen und erhielten anschliessend 10 initiale Schreckreize (Habituation), die nicht in die statistische Auswertung eingingen. Die unterschiedlichen Reizdarbietungen erfolgten in randomisierter Form. Zwischen jeder Darbietung gab es ein Intertrialintervall (IT) von 20 bis 30 Sekunden. Jede Reizform wurde 10 mal präsentiert. Als Schreckreiz diente bei den Versuchen ein Rauschpuls (weißes Rauschen) mit einer Intensität von 100 dB SPL und einer Dauer von 20 ms (ohne Anstiegs- und Abstiegsflanken). Während der gesamten Experimente war ein Hintergrundrauschen (weißes Rauschen) von 60 dB aktiviert.

Direkt im Anschluß an die Habituation wurde das eigentliche Programm gestartet. Das gesamte Programm bestand aus 6 verschiedenen Trials, welche den Tieren im Verlauf des Experiments je 10 Mal randomisiert präsentiert wurden.

1.Trial: Schreckreiz (100 dB SPL, Dauer 20 ms)

2.Trial: Kontrolle (kein Reiz)

3.Trial: Präpuls (10 kHz Sinuston mit einer Intensität von 85 dB SPL, Dauer 20 ms)

4.Trial: Schreckreiz mit vorausgehendem Präpuls (Präpuls 72 dB SPL, 100 ms vor Einsetzen des Schreckreizes)

5.Trial: Schreckreiz mit vorausgehendem Präpuls (Präpuls 80 dB SPL, 100 ms vor Einsetzen des Schreckreizes)

6.Trial: Schreckreiz mit vorausgehendem Präpuls (Präpuls 85 dB SPL, 100 ms vor Einsetzen des Schreckreizes).

Als Maß für die PPI dient die prozentuale Abschwächung der Reaktionsamplitude nach der kombinierten Präsentation des Präpulses und des Schreckreizes gegenüber der Reaktion auf den Schreckreiz allein (Formel 1).

$$PPI\ (\%) = 100 - (P+S * 100 / S)$$

Formel 1. Berechnung der prozentualen PPI. Abbkürzungen: P+S: Präpuls und Schreckreiz; S: Schreckreiz.

2.3.2 O*pen field*-Test

Die lokomotorische Aktivität der Tiere wurde im *open field* (44,7 cm x 44,7 cm x 44,7 cm; ActiMot, TSE Systems, Bad Homburg, Deutschland) über einen Zeitraum von 35 min gemessen. Das verwendete *open field* aus grauem Kunststoff war quadratisch angeordnet (45 x 45 cm; Abb. 8). Die Wände waren 44 cm hoch und bestanden aus durchsichtigem Plexiglas (45 x 45 x 44 cm). In einem stabilen Metallrahmen, der das gesamte *open field* umspannte, waren in 3 cm Höhe über dem Boden photoelektrische Lichtschranken angebracht, welche die horizontale Aktivität der Tiere aufzeichneten und an einen PC weiterleiteten. Die vertikale Aktivität wurde durch Lichtschranken registriert, die sich im Rahmen in einer Höhe von 13 cm befanden. Zu Beginn der Aufzeichnungen wurden die Tiere jeweils in die Mitte des *open field* platziert. Folgende lokomotorische Verhaltensweisen wurden ausgewertet: Laufzeit [s], der zurückgelegte Weg [m], Aufrichten [Anzahl], und die Dauer des Aufenthalts der Tiere in der Mitte des *open field* [in Prozent; im Verhältnis zur Gesamtaufenthaltsdauer].

Abb. 8. Dargestellt ist ein aus Plexiglas bestehendes *open-field* und der umgebene Rahmen mit integrierten Lichtschranken.

2.3.3 *Progressive ratio*-Test

Für die Durchführung der PR-Tests und der Messung des *break point* wurde das TSE Operant Behaviour System (TSE Systems, Bad Homburg, Deutschland) verwendet. Das System bestand aus einer Skinnerbox, einer Steuereinheit und einem PC mit Steuer- und Auswertungssoftware von TSE Systems. In der Skinnerbox waren zwei Hebel, drei farbige Lämpchen (weiß, rot, grün; über jeden der beiden Hebel), ein Hauslicht und ein Futterausgabebehälter mit beweglicher Klappe zwischen den beiden Hebeln angebracht. Die Hebel befanden sich im Abstand von 4,5 cm links und rechts von dem Futterbehälter in einer Höhe von 4,5 cm (Abb. 9).

Abb. 9. Skinnerbox von innen. Abgebildet sind die Hebel auf beiden Seiten und die darüber angebrachten farbigen Lämpchen. Der Futterausgabebehälter mit beweglicher Klappe liegt mittig zwischen den beiden Hebeln.

Der Trainingsablauf in der Skinnerbox und die anschließenden PR-Tests wurden in drei verschiedene Phasen unterteilt, welche sich über sechs Tage erstreckten (Tabelle 1). In der ersten Phase wurden die Tiere einen Tag vor Beginn des Trainings mit den wohlschmeckenden Kaseinpellets vertraut gemacht und für 30 min an die Skinnerbox gewöhnt (*shaping*). Diese erste Phase diente zur Habituation an die Apparatur, dem Ort der Futterausgabe und zur Gewöhnung an die durch die bewegliche Futterklappe und dem Kaseinpellet-Spender verursachten Geräusche.

Die zweite Phase beinhaltete das Training der Tiere im *continuous reinforcement* (CRF)-Modus und erstreckte sich über drei aufeinanderfolgende Tage. Während dieser Konditionierungsphase wurde jeder Hebeldruck mit einem Kaseinpellet belohnt. Jeder Trainingsdurchgang dauerte für jedes Versuchstier 30 min An den nächsten beiden Tagen erfolgte dann die Durchführung der eigentlichen Tests im PR-Modus. Am ersten Tag wurde der PR 1-, am zweiten Tag der PR3-Modus durchgeführt. Gegenüber dem CRF-Modus steigert sich die instrumentelle Anforderung in beiden Modi linear:

PR1-Modus: 1,2,3,4,5,6,7,8,9,10,...,(Hebeldruck pro Kaseinpellet),

PR3-Modus 3,6,9,12,15,18,21,24,...,(Hebeldruck pro Kaseinpellet),

wobei jedes Versuchstier 3 min Zeit hat, dass jeweilige Ratio zu komplettieren. Dass Ratio, in welchem das Versuchstier innerhalb von 3 min die erforderte Leistung nicht mehr erbringt, wird als *break point* bezeichnet und der Test wurde an dieser Stelle beendet.

Tab. 1. Zeitlicher Verlauf des PR-Tests (Abkürzungen: CRF: continuous reinforcement, PR: *progressive ratio*).

Tag	Tag 1	Tag 2-4	Tag 5	Tag 6
	Habituation	CRF-Training	PR1-Test	PR3-Test

2.3.3.1 Futterpräferenz-Test

Um zu überprüfen, ob die neonatale und/oder pubertäre chronische Ethanolbehandlung einen Einfluss auf die Futterpräferenz und den allgemeinen Futterkonsum (Zuchtfutter und die in der PR-Aufgabe verabreichten Kaseinpellets) der Versuchstiere besitzt, wurde ein Futterpräferenztest durchgeführt. Die Versuchstiere wurden einzeln für 10 min in einen Käfig gesetzt, in welchem sich zwei identische Petrischalen mit jeweils 20 g Kaseinpellets und 20 g kalorienäquivalentes Zuchtfutter befanden. Der Futterpräferenztest wurde jeweils einen Tag vor Beginn der PR-Tests durchgeführt und es wurde die konsumierte Menge des Laborfutters, die konsumierte Menge der Kaseinpellets und der Gesamtkonsum protokolliert.

2.3.4 *Object recognition*-Test

Die Versuchstiere wurden drei Stunden vor Beginn des OR-Tests in Einzelkäfige gesetzt, damit sie sich an die neue Umgebung habituieren konnten. In den Einzelkäfigen wurden später auch die Versuche durchgeführt. Der OR-Test bestand aus drei verschiedenen Experimenten (einem Haupttest sowie zwei Kontrolltests), die an drei unterschiedlichen Tagen durchgeführt wurden (Tab. 2). Während des Haupttests wurde den Versuchstieren das gleiche Objekt (ein Messbecher) zweimal für die Dauer von jeweils 5 min präsentiert, mit einer Pause von 30 min zwischen beiden Präsentationen. Im ersten Kontrollexperiment erfolgte die zweite Präsentation des gleichen Objektes (Verschlusskappe einer Trinkflasche) nach einer Unterbrechung von 120 min (Kontrolltest 1). Im zweiten Kontrollexperiment erfolgte nach der initialen Präsentation eines Objektes (eine Mörserschale) für 5 min die Präsentation eines neuen Objektes (Messzylinder) für 5 min mit einer Pause von 30 min zwischen beiden Präsentationen (Kontrolltest 2).

Während der beiden Präsentationen wurde die Zeit gemessen, in welcher sich die Versuchstiere mit den Objekten beschäftigten. Folgende Verhaltensweisen bezogen auf die Objekte wurden protokolliert: Schnüffeln, Lecken, Knabbern, Anfassen, Stossen und Ziehen. Zwischen den jeweiligen Versuchen lag mindestens ein versuchsfreier Tag.

Tab. 2. Zeitlicher Verlauf des OR-Tests.

Tag	Tag 1	Tag 3	Tag 5
	Haupttest	Kontrolltest 1	Kontrolltest 2
1. Objekt	Messbecher	Verschlusskappe	Mörserschale
2. Objekt	Messbecher	Verschlusskappe	Messzylinder
Präsentationsdauer 1. und 2. Objekt	5 min	5 min	5 min
Präsentation 2. Objekt nach	30 min	120 min	30 min

2.3.5 *Elevated plus maze*-Test

Zur Bestimmung der Ängstlichkeit der Versuchstiere wurde ein EPM eingesetzt. Das EPM bestand aus zwei offenen Armen (76 x 12 cm mit einem 1 cm breiten und 1,5 cm hohen Rand), die sich gegenüber lagen, und aus zwei geschlossenen Armen (76 x 12 cm mit 1 cm breiten und 26,7 cm hohen Wänden), die sich ebenfalls gegenüber lagen. Die vier Arme waren über eine zentrale Plattform (14 x 14 cm) miteinander verbunden und befanden sich in einer Höhe von 74 cm über den Boden (Abb. 10). Oberhalb des EPM, in einer Höhe von 250 cm, befand sich eine Videokamera, die mit einem Monitor im Versuchraum verbunden war.

Jedes Versuchstier wurde auf die zentrale Plattform gesetzt (mit der Schnauze in Richtung eines offenen Arms) und für 5 min über den Monitor live beobachtet. Aufgezeichnet wurden die Eintritte in die offenen und geschlossenen Arme (in Prozent zu den Gesamteintritten) sowie die Aufenthaltsdauer in den offenen und geschlossenen Armen (in Prozent zur Gesamtaufenthaltsdauer). Als Eintritt wurde gewertet, wenn sich das Versuchstier mit allen vier Beinen in einem Arm befand.

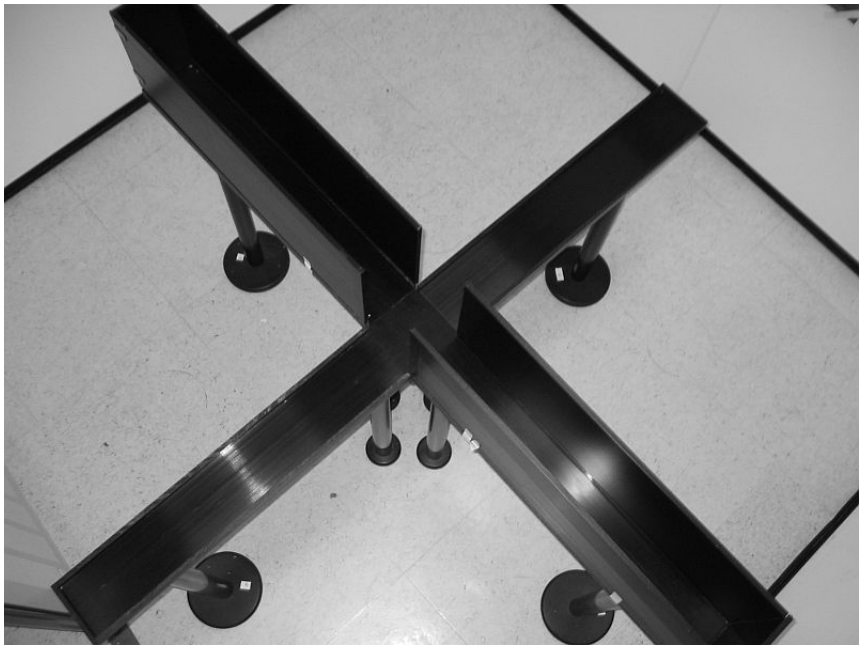


Abb. 10. Dargestellt ist das EPM mit seinen sich gegenüber liegenden offenen und geschlossenen Armen mit der zentralen Plattform.

2.4 Versuchsaufbau

2.4.1 Pharmakologische Manipulation

An PD7 wurde den Ratten nach Ikonomidou et al. (2000) eine 20%ige Ethanol-Lösung (verdünnt mit 0,9% Saline) in einer Dosis von 5 g/kg Körpergewicht (KG) i.p. verabreicht, verteilt auf zwei Applikationen in einer Dosis von jeweils 2,5 g/kg KG (Gruppe 1). Zwischen den beiden Behandlungen lag ein Zeitraum von zwei Stunden, in der die Versuchstiere zurück in ihren Käfig gesetzt wurden. Zur Stressvermeidung wurden die i.p.-Injektionen unter einer Cryo-Anästhesie durchgeführt, bei der die Ratten für eine Zeit von 5-10 min durch Hypothermie narkotisiert wurden. Neonatale Ratten sind in diesem Alter wechselwarm und fallen bei Unterkühlung in ein Kältekoma, welches durch Erwärmen komplett reversibel ist (Phifer und Terry, 1986; Kolb und Cioe, 2001). Als Kontrolle dienten zwei Gruppen neonataler Ratten, die entweder eine 0,9%ige Saline-Lösung (Gruppe 2; ebenfalls zwei Injektionen in einem Intervall von 2 Stunden) oder keine Injektion erhielten (Gruppe 3).

Jede dieser drei Gruppen wurde mit Beginn der Pubertät in jeweils zwei Untergruppen unterteilt (Tab. 3), die entweder chronisch mit Ethanol in einer Dosis von 1 g/kg KG oder mit einer 0,9%igen Saline-Lösung behandelt wurden. Die chronische Ethanolbehandlung erfolgte über einen Zeitraum von 25 Tagen während der gesamten Pubertät (PD40 – PD65). Innerhalb dieses Zeitraumes wurden den Versuchstieren in unregelmässigen Abständen 20 Injektionen verabreicht. Jedes Versuchstier erhielt 10 mal keine, 10 mal eine und 5 mal zwei Injektionen.

Tab. 3. Dargestellt sind die sechs Behandlungsgruppen: Drei Gruppen und deren Behandlung an PD7 sowie die Unterteilung dieser drei Gruppen und deren weiteren Behandlung während der Pubertät.

1. Behandlung	Gruppe 1		Gruppe 2		Gruppe 3	
PD7 (akut)	Ethanol		Saline		Kontrolle	
2. Behandlung	Gr. 1A	Gr. 1B	Gr. 2A	Gr. 2B	Gr. 3A	Gr. 3B
PD40-65 (chronisch)	Ethanol	Saline	Ethanol	Saline	Ethanol	Saline

2.4.2 Chronologische Reihenfolge der Verhaltenstests

Die präpubertären Verhaltensexperimente beinhalteten die Aufzeichnung der lokomotorischen Aktivität, die Messung der PPI der ASR, der ASR und wurden zwischen PD35 und PD40 durchgeführt.

Nach Absetzen der chronischen Behandlung bis zum Beginn der Verhaltenstests in der Adultphase lag ein Zeitraum von 10 Tagen, in dem keine Experimente durchgeführt wurden. Dadurch sollte gewährleistet werden, dass die Versuchstiere weder unter noch andauernder Drogenwirkung stehen noch unter möglichen Entzugserscheinungen leiden. Die lokomotorische Aktivität, die PPI der ASR und die ASR wurden zwischen PD75 und PD80 gemessen. Von PD90 bis PD95 wurde der OR-Test durchgeführt. Der PR-Test zur Bestimmung des *break point* fand von PD100 bis PD106 statt. Abschliessend wurde das Angstverhalten der Versuchstiere auf dem EPM an PD110 untersucht.

2.5 Histologie

2.5.1 Präparation der Gehirne

Nach Beendigung der Verhaltensexperimente wurden alle Versuchstiere mit einer Lethaldosis Chloralhydrat (Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland; 720 mg/kg) narkotisiert und für eine Schwerkraft-Perfusion vorbereitet. Zunächst wurden die Versuchstiere mit 200 ml einer PBS-Lösung transkardial vorgespült, um den Körperkreislauf von Blut zu befreien. Anschlissend wurden die Versuchstiere mit 300 ml einer 4℃ kalten, 4%igen Perfusionslösung (4% Paraformaldehyd in 0,1 M Phosphatpuffer [PB], mit einem pH-Wert von 7,4; Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland) transkardial perfundiert. Im Anschluss an die Perfusion wurden die Gehirne freipräpariert, entnommen und zur Kryoprotektion für mindestens 48 Stunden in einer 30%igen Saccharose-Lösung aufbewahrt, bis die Gehirne auf den Boden der Gefässe gesunken waren.

Mit Hilfe eines Gefriermikrotoms (Jung CM 3000, Leica Instruments, Nussloch, Deutschland) wurden von den Gehirne in sechs Serien Frontalschnitte (Schnittdicke 40 µm, Schnittabstand 240 µm) angefertigt und in 0,1 M PB aufgefangen. Von den sechs Serien wurden mit drei Serien jeweils eine Nissl-Färbung (Thionin), eine Myelinscheidenfärbung (Goldchlorid) und eine Färbung der GABAergen Interneuronen (Parvalbumin) durchgeführt. Die drei verbliebenen Serien dienten als Ersatzserien und wurden nach Abschluss der Auswertungen verworfen.

2.5.2 Thionin-Färbung

Die Schnitte wurden aus einer Gelatine-Chromalaun-Lösung auf entfettete Objektträger aufgezogen. Nach dem Trocknen erfolgte eine Rehydration der Schnitte mit Hilfe einer absteigenden Ethanolreihe (jeweils drei Minuten in 100%, 96%, 70% und 50% Ethanol). Nach kurzem Waschen der Schnitte in destilliertem Wasser wurden die Schnitte für 90 s in Thionin (Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland) gefärbt. Anschliessend erfolgte eine Dehydrierung der Schnitte mit Hilfe einer aufsteigenden Ethanolreihe (Konzentration und Dauer entsprechend der absteigenden Ethanolreihe) sowie die Fixierung der Schnitte in einem Terpineol-Roti®-Histol-Gemisch (Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland). Im Anschluss wurden die Objektträger mit Entellan® (Merck, Darmstadt, Deutschland) eingedeckt.

2.5.3 Goldchlorid-Färbung

Zum Nachweis von Myelin wurden die Schnitte aus einer Gelatine-Chromalaun-Lösung zunächst auf entfettete Objektträger aufgezogen und luftgetrocknet. Anschließend wurden die Schnitte für zwei bis drei Stunden in einer 0,2% Goldchloridlösung (pH 6,8-7) (Tetrachloraurate-trihydrat, Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland) eingefärbt. Danach wurden die Schnitte in destilliertem Wasser gespült und für 5 min in eine frisch-angesetzten 2,5% Na-Thiosulfat-Lösung fixiert. Im Anschluß erfolgte eine Spülung der Schnitte für 30 min unter fließendem Leitungswasser, ein nochmaliges kurzes Spülen in destilliertem Wasser und danach über eine aufsteigende Ethanolreihe die Fixierung in Terpineol und in Roti®-Histol. Im Anschluß wurden die Objektträger mit Entellan® eingedeckt.

2.5.3.1 Messung der Myelinisierungsstärke

Die Messung der relativen Myelinisierungsstärke erfolgte mit Hilfe eines Bildanalysesystems, bestehend aus einer digitalen Kamera (RT Slider Spot, Visitron Systems GmbH, Puchheim, Deutschland) und einer Bildanalysesoftware (MetaMorph, Version 4.6, Universal Imaging Corp., Downington PA 19335, USA) und wurde in folgenden Hirngebieten durchgeführt: PFC (+2,7 mm und +1,7 mm anterior-posterior von Bregma [AP]), NAC (+1,7 mm AP), Amygdala (-1,8 mm AP), dorsaler

Hippocampus (-3,3 mm AP), ventraler Hippocampus (-4,5 mm AP) und VTA (-6,04 mm AP). Die stereotaxischen Koordinaten der untersuchten Hirnareale wurden nach dem Hirnatlas von Paxinos und Watson (1998) bestimmt. Hierfür wurde zunächst bei 100facher Vergrösserung das mikroskopische Bild digitalisiert und an einen PC weitergeleitet. Unterstützt von der Bildanalysesoftware wurde der Kontrast des Bildes verstärkt, so dass die Software in einem weiteren Schritt die gefärbten Fasern gegen den Hintergrund unterscheiden und markieren und anschliessend die relative Myelinisierungsstärke des untersuchten Hirnareals berechnen konnte (in Prozent zur Gesamtfläche des Areals; siehe Abbildung 11).

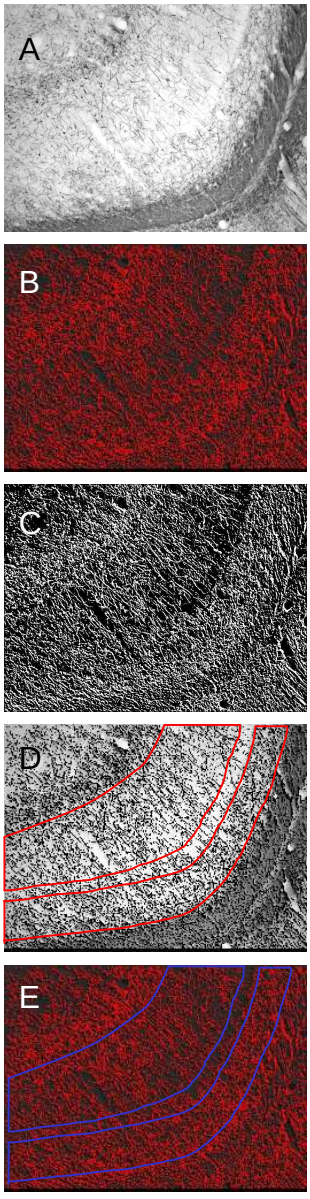


Abb. 11. Methode zur Bestimmung der Myelinisierung im Goldchlorid-Schnitt. (A) Zunächst wurde der zu messende Bereich mit einer Digitalkamera (Spot RT Slyder) als Schwarz-Weiß Aufnahme digitalisiert und an das Bildanalyseprogramm (Meta Morph) übertragen. Jeder Graustufe wurde dabei ein Zahlenwert von 0 (schwarz) bis 4096 (weiß) zugeordnet.
(B) Die Pixel, die durch Goldchlorid gefärbte Fasern repräsentieren, zeichneten sich durch abrupte Übergänge der Graustufenintensitäten gegenüber benachbarten Pixel aus. Jedes Pixel wurde mit den es umgebenden Pixel so verrechnet, dass sich die Fasern deutlich abzeichneten. Dadurch hoben sich die Werte innerhalb der Graustufenskala stark vom Hintergrund ab und konnten automatisiert markiert werden.
(C) Die markierten Werte wurden nun als binäres Bild in eine Schwarz-Weiß-Matrize überführt. Die Matrize wurde anschließend auf das Originalbild addiert, so dass herausgerechnete Fasern über den Fasern des Originalbildes lagen. So konnte kontrolliert werden, ob die Fasern tatsächlich selektiv markiert wurden. Wie in der Abbildung links am Beispiel des ventralen Hippocampus zu sehen ist, wurden zu dichte Faserbündel nur unvollständig erfasst.
(D und E) Die Region, in der die relative Myelinisierungsstärke gemessen werden sollte, wurde nun auf dem Bild mit den hervorgehobenen Fasern markiert und anschließend auf das binäre Bild übertragen. Der Anteil der myelinisierten Fasern in % sowie die Fläche der Region in μm^2 wurden für die markierten Bereiche automatisiert gemessen (Aus: S. Klein, 2005).

2.5.4 Immunhistochemie: Parvalbumin

Um GABAerge Interneuronen sichtbar zu machen, wurde eine Schnittserie immunhistochemisch mit einem Antikörper gegen Parvalbumin (PV) gefärbt. Die Schnitte wurden dreimal für jeweils zehn Minuten in jeweils 5 ml Tris-gepufferter Saline (TBS, pH 7,6) im *Free-Floating*-Verfahren gewaschen. Anschliessend wurden sie 30 min in 5 ml TBS unter Zusatz von 60 µl Wasserstoffperoxid (H_2O_2; Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland) vorinkubiert, um die endogene Peroxidase-Aktivität zu hemmen. Die Schnitte wurden danach wieder gewaschen. Es folgte die Inkubation in dem primären Antikörper (monoclonal Anti-Parvalbumin; Maus IgG1; Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland) bei einer 1:2000 Verdünnung in einem Carrier (12 ml Kaninchen-Serum, 120 µl Na-azid und 180 µl Triton) für mindestens 24 Stunden auf einem Rüttler bei 4℃. Nach der Inkubation wurden die Schnitte gewaschen und danach für eine Stunde bei Raumtemperatur in dem sekundären Antikörper (Kaninchen-Anti-Maus IgG; DAKO A/S, Dänemark) bei einer Verdünnung von 1:1000 in einem Carrier (13 ml Rinderserum-Albumin-PBS-Lösung, 130 µl Na-azid) inkubiert. Nach dem erneuten Waschen der Schnitte wurden diese in Streptavidin-Merrettichperoxidase (1:375, DAKO A/S, Dänemark) für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Die Schnitte wurden wiederum gewaschen und danach 15 min in einer DAB-Lösung (3,3'-Diaminbenzidin-Lösung x 4 HCL [Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland] in 4 ml TBS/ Nickelammoniumsulfat) vorinkubiert. Dann wurde 20 µl H_2O_2 pro 4 ml DAB-Lösung hinzugefügt und es folgte eine 15 minütige Inkubation unter Sichtkontrolle. Um die Farbreaktion abzubrechen wurden die Schnitte gewaschen, dann in einer Petrischale von anterior nach posterior sortiert und schliesslich aus einer Gelatine-Chromalaun-Lösung auf entfettete Objektträger aufgezogen. Nach dem Trocknen wurden die Schnitte in einer aufsteigenden Ethanolreihe dehydriert, in Terpineol und in Roti®-Histol fixiert und mit Entellan® eingedeckt.

2.5.4.1 Messung der Parvalbumin-immunreaktiven Interneuronen

Für die Zählung der Parvalbumin-immunreaktiven Interneuronen (PVI) wurde das bereits unter Kapitel 2.5.3.1 beschriebene Bildanalysesystem eingesetzt. Mit Hilfe der dazugehörigen Kamera wurde ein Live-Bild der jeweils auszuzählenden Region erstellt und die PVI wurden dann bei 100facher Vergrösserung ausgezählt. Dabei wurde jedes GABAerge Interneuron, das sich bei der Fokussierung der Schnitte scharf stellen ließ, farbig markiert, so dass Doppelzählungen und Auslassungen minimiert wurden. Ausgezählt wurden folgende Hirnareale: anteriorer und posteriorer PFC, Amygdala, dorsaler Hippocampus (CA1 und CA2 Region), ventraler Hippocampus (CA1 und CA2 Region). Die Zählung erfolgte für alle Hirnregionen an zwei aufeinanderfolgenden Schnitten/Tier mit einem Abstand von 240 μm. Im Anschluss wurden die Fläche, in der die PVI ausgezählt wurden, ausgemessen und das Volumen (Fläche der ausgemessenen Hirnregion x Hirnschnittdicke [40 μm] x Anzahl der Schnitte) sowie die Interneuronendichte (PVI/mm^3) ermittelt.

2.6 Statistische Auswertung

Für die Auswertung der Ergebnisse wurden die beiden Statistikprogramme EXCEL (Microsoft, USA) und SigmaStat (Statcon, Witzenhausen, Deutschland) verwendet, mit deren Hilfe ein- bzw. zweifaktorielle Varianzanalysen (ANOVA) durchgeführt wurden. Gegebenfalls wurde ein post-hoc Tukey-Test angewendet. Zum paarweisen Vergleich wurde ein Student’s t-Test hinzugezogen, bei einem unpaarweisen Vergleich wurde ein unpaired t-Test durchgeführt. Als signifikant galten alle Ergebnisse mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $p < 0,05$.

3. Ergebnisse

3.1 Verhaltenstests

3.1.1 PPI der ASR

3.1.1.1 PPI und ASR adoleszenter Ratten

Die zwischen PD35 und PD40 durchgeführten Messungen der PPI zeigte keinen Unterschied zwischen den jeweiligen Behandlungsgruppen bei allen drei Präpulsintensitäten (72 dB: ANOVA: $F_{2,79} = 2,4$; $p > 0,05$; 80 dB: ANOVA: $F_{2,79} = 1,2$; $p > 0,05$; 85 dB: ANOVA: $F_{2,79} = 0,5$; $p > 0,05$; Abb. 12).

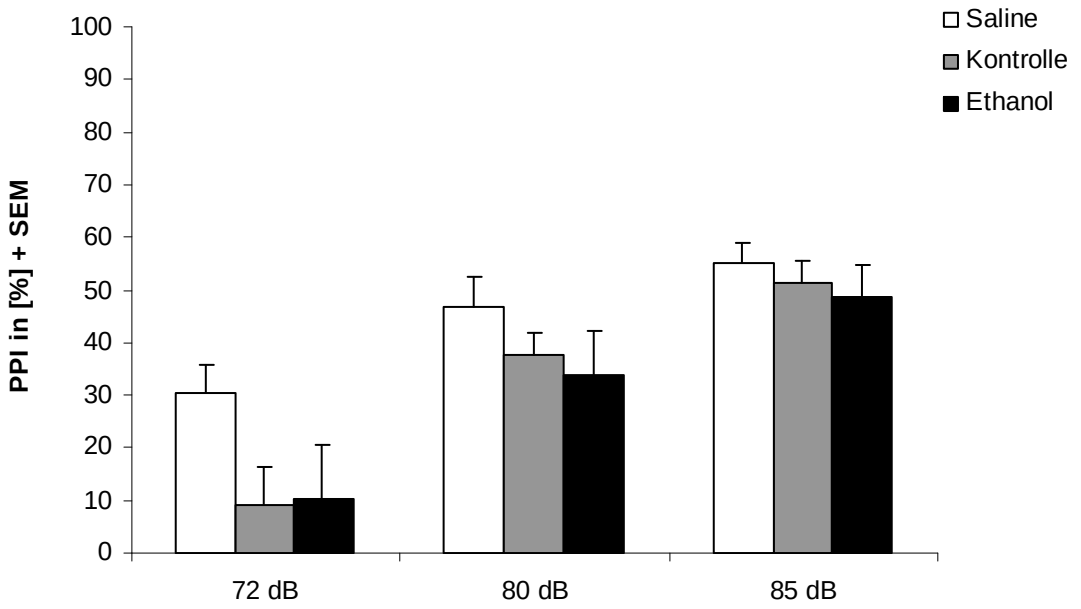


Abb. 12. Dargestellt ist die mittlere PPI in Prozent + SEM. Die unterschiedlichen neonatalen Behandlungen hatten keinen Einfluß auf die PPI im juvenilen Stadium (PD35) bei allen drei Präpulsintensitäten (Saline, n = 26; Kontrolle, n = 31; Ethanol, n = 25).

Die Auswertung der ASR-Amplituden juveniler Tiere zeigte keinen Unterschied zwischen den drei Behandlungsgruppen (ANOVA: $F_{2,79} = 1$; $p > 0,05$; Tab. 4).

Tab. 4. ASR-Amplituden juveniler Tiere an PD35 (Saline, n = 26; Kontrolle, n = 31; Ethanol, n = 25).

	Saline	Kontrolle	Ethanol
ASR ± SEM	129,2 (± 12,5)	129,8 (± 11,8)	108,9 (± 11,8)

3.1.1.2 PPI und ASR adulter Ratten

Die zwischen PD75 und PD80 durchgeführten Messung der PPI und ASR zeigte keinen Unterschied zwischen den jeweiligen Behandlungsgruppen bei allen drei Präpulsintensitäten (Abb. 13-15). Weder die neonatale Ethanolgabe, die pubertäre chronische Ethanolbehandlung noch die Doppelbehandlung mit Ethanol beeinflussten die PPI mit einem Präpuls von 72 dB (ANOVA: 1.Behandlung: $F_{2,76} = 1,5$; $p > 0,05$; 2.Behandlung: $F_{1,76} = 1$; $p > 0,05$), 80 dB (ANOVA: 1.Behandlung: $F_{2,76} = 1,5$; $p > 0,05$; 2.Behandlung: $F_{1,76} = 1,4$; $p > 0,05$) und 85 dB (ANOVA: 1.Behandlung: $F_{2,76} = 2$; $p > 0,05$; 2.Behandlung: $F_{2,76} = 1$; $p > 0,05$).

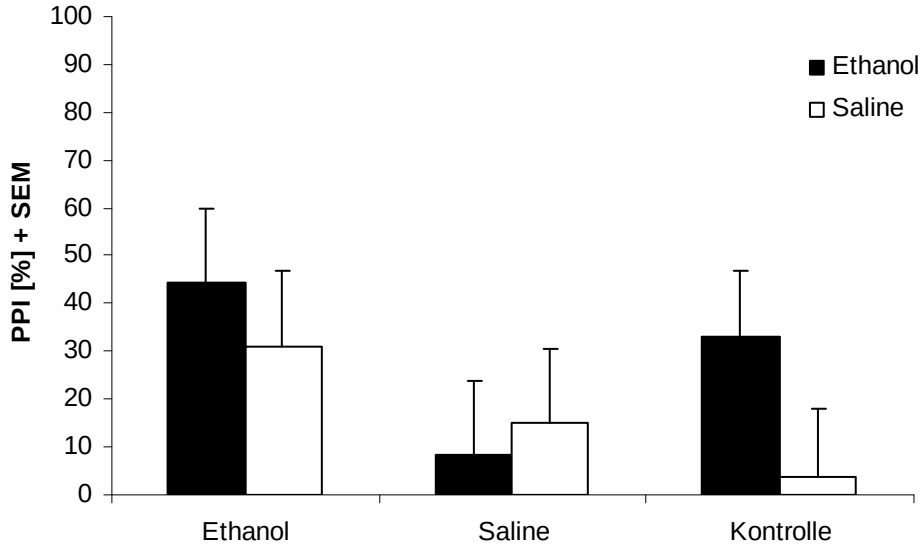


Abb. 13. Dargestellt ist die mittlere PPI in Prozent + SEM. Sowohl die neonatale Ethanolgabe als auch die pubertäre chronische Ethanolbehandlung hatten keinen Effekt auf die PPI mit einem Präpuls von 72 dB (Ethanol/Ethanol, Saline/Ethanol und Saline/Saline: n = 13; Kontrolle/Ethanol: n = 16; Kontrolle/Saline: n = 15; Ethanol/Saline: n = 12).

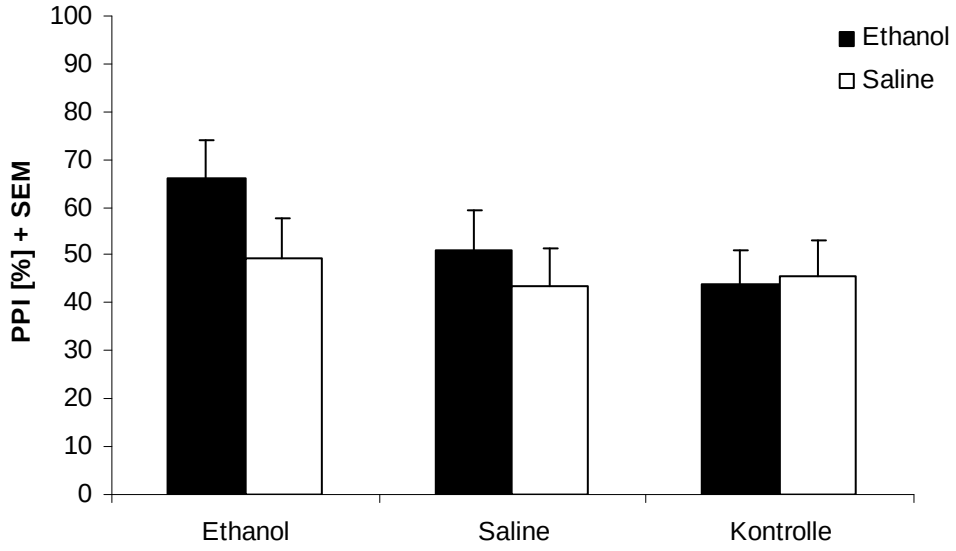


Abb. 14. Dargestellt ist die mittlere PPI in Prozent + SEM. Sowohl die neonatale Ethanolgabe als auch die pubertäre chronische Ethanolbehandlung hatten keinen Effekt auf die PPI mit einem Präpuls von 80 dB (Ethanol/Ethanol, Saline/Ethanol und Saline/Saline: n = 13; Kontrolle/Ethanol: n = 16; Kontrolle/Saline: n = 15; Ethanol/Saline: n = 12).

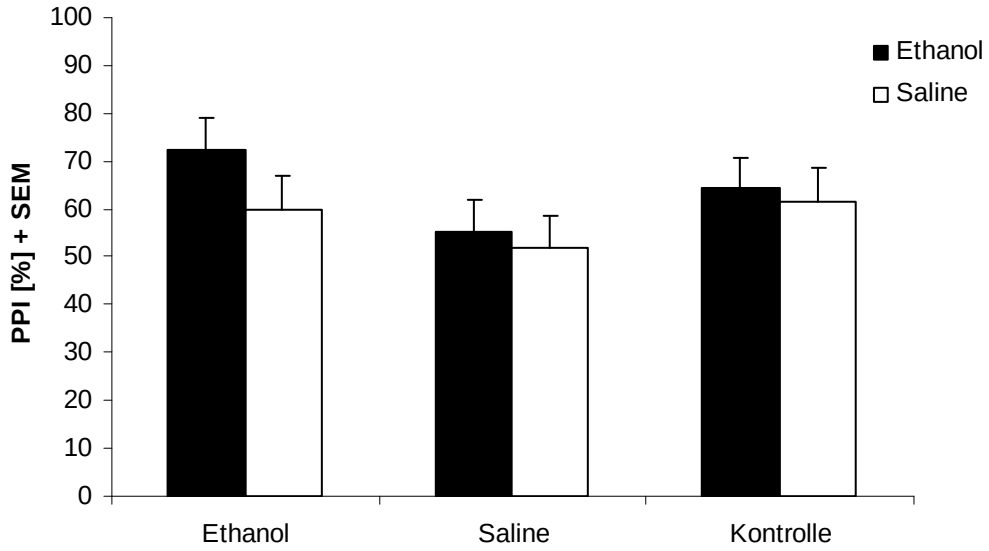


Abb. 15. Dargestellt ist die mittlere PPI in Prozent + SEM. Sowohl die neonatale Ethanolgabe als auch die pubertäre chronische Ethanolbehandlung hatten keinen Effekt auf die PPI mit einem Präpuls von 85 dB (Ethanol/Ethanol, Saline/Ethanol und Saline/Saline: n = 13; Kontrolle/Ethanol: n = 16; Kontrolle/Saline: n = 15; Ethanol/Saline: n = 12).

Auch hatte die neonatale Ethanolgabe und die pubertär chronische Ethanolbehandlung keinen Einfluss auf die ASR-Amplituden adulter Tiere (ANOVA: 1.Behandlung: $F_{2,76} = 1,8$; $p > 0,05$; 2.Behandlung: $F_{1,76} = 0,3$; $p > 0,05$; Tab. 5).

Tab. 5. Zwischen den sechs Behandlungsgruppen zeigte sich kein signifikanter Unterschied hinsichtlich der mittleren ASR-Amplituden adulter Tiere (Ethanol/Ethanol, Saline/Ethanol und Saline/Saline: n = 13; Kontrolle/Ethanol: n = 16; Kontrolle/Saline: n = 15; Ethanol/Saline: n = 12).
.

1. Behandlung	Ethanol		Saline		Kontrolle	
2. Behandlung	Ethanol	Saline	Ethanol	Saline	Ethanol	Saline
ASR-Amplitude + SEM	109,77 (± 24,45)	107,39 (± 25,45)	118,75 (± 24,45)	160,26 (± 24,45)	155,81 (± 22,76)	150,04 (± 22,76)

3.1.2 *Open field*-Test

3.1.2.1 *Open field*-Test in adoleszenten Ratten

Die neonatale Ethanol-Applikation an PD7 hatte keinen Effekt auf die im *open field* gemessenen Verhaltensparameter juveniler Ratten (Tab. 6). Es zeigten sich keine Unterschiede zu der Kontroll- und Salinegruppe in Bezug auf die Dauer der motorischen Aktivität [s] (ANOVA: $F_{2,61} = 0,01$; $p > 0,05$), den zurückgelegten Weg [m] (ANOVA: $F_{2,61} = 0,1$; $p > 0,05$), das Aufrichtverhalten (ANOVA: $F_{2,61} = 0,9$; $p > 0,05$) und die Aufenthaltsdauer in der Mitte [%] (ANOVA: $F_{2,61} = 0,9$; $p > 0,05$).

Tab. 6. Gemessene Verhaltensparameter im *open field* bei juvenilen Ratten (Saline, n = 22; Kontrolle, n = 21; Ethanol, n = 21).

	Saline	Kontrolle	Ethanol
Aktivität [s]	380,64 (± 28,20)	373,24 (± 28,14)	377,05 (± 34,30)
Laufweg [m]	116,15 (± 7,92)	116,05 (± 10,80)	111,25 (± 11,65)
Aufrichten	48,22 (± 4,37)	59,86 (± 9,05)	50,29 (± 5,63)
Aufenthalt Mitte [%]	0,79 (± 0,01)	1,01 (± 0,25)	0,67 (± 0,17)

3.1.2.2 *Open field*-Test in adulten Ratten

Im Gegensatz zu der motorischen Aktivität von juvenilen Ratten zeigten die Messungen adulter Ratten signifikante Unterschiede zwischen den Behandlungsgruppen bezüglich der Verhaltensparameter Aktivität (Abb. 16), zurückgelegter Weg (Abb. 17) und Aufrichtverhalten (Abb. 18) im *open field*. Die Aufenthaltsdauer in der Mitte wurde jedoch weder von der neonatalen noch von der pubertär chronischen Ethanolgabe beeinflusst (Abb. 19).

3.1.2.2.1 Aktivität

Diejenigen Gruppen, die während der Pubertät chronisch mit Ethanol behandelt wurden, waren signifikant weniger aktiv als die Saline behandelten Gruppen (ANOVA: $F_{1,67} = 4,79$; $p < 0,05$). Dieser Effekt ist über alle Behandlungsgruppen gleich verteilt und unabhängig von der neonatalen Behandlung der Tiere.

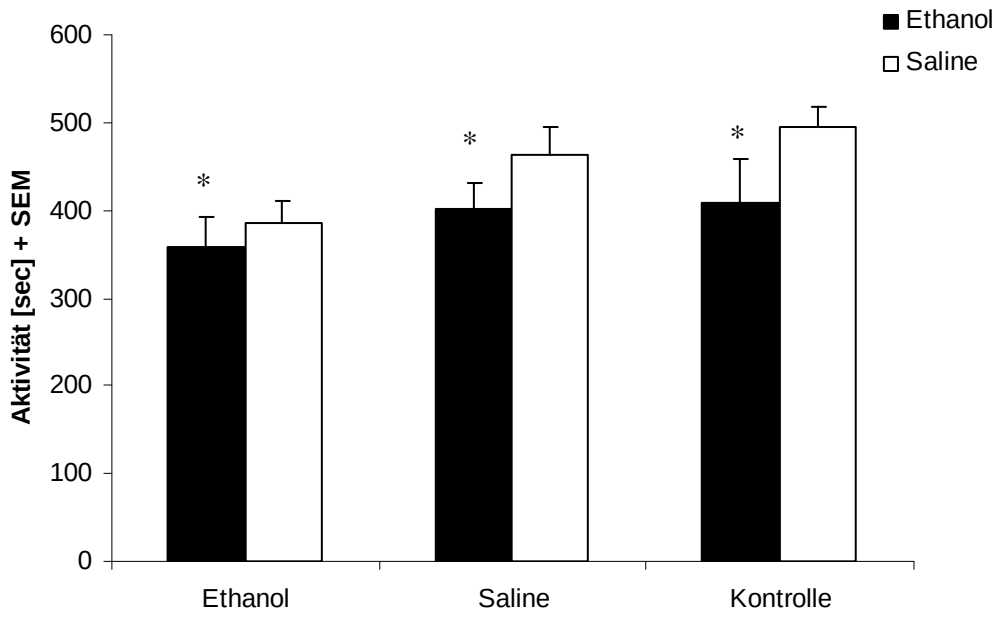


Abb. 16. Dargestellt ist die Dauer der motorischen Aktivität in Sekunden + SEM. Die chronische Ethanolbehandlung während der Pubertät führte zu einer Reduktion der Aktivitätsdauer im *open field* adulter Tiere (∗p = 0,032; Kontrolle/Ethanol und Ethanol/Ethanol, n = 10; Saline/Ethanol und Saline/Saline, n = 13; Kontrolle/Saline, n = 15; Ethanol/Saline, n = 12).

3.1.2.2.2 Laufweg

Auch zeigte sich bei den adulten Tieren ein signifikanter Effekt der chronischen Ethanolbehandlung während der Pubertät auf die zurückgelegte Strecke im *open field*. Die mit Ethanol behandelten Ratten hatten eine signifikant geringere Strecke zurückgelegt als die mit Saline behandelten Ratten (ANOVA: $F_{1,67} = 6,75$; $p < 0,05$).

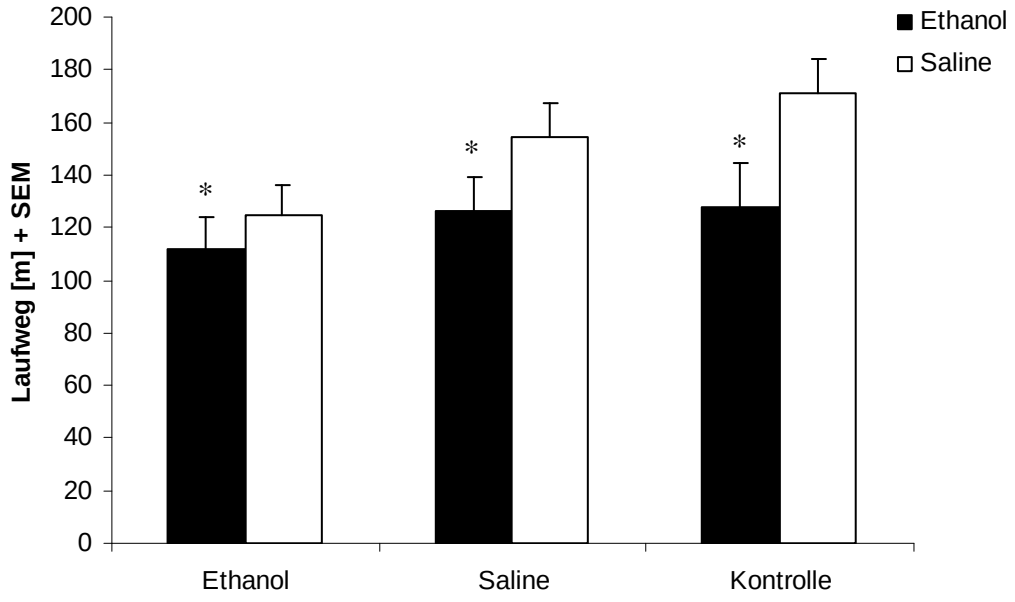


Abb. 17. Dargestellt ist die zurückgelegte Strecke in Metern + SEM. Nach der chronischen Ethanolbehandlung während der Pubertät hatten die adulten Tiere eine kürzere Strecke im *open field* zurückgelegt als die mit Saline behandelten Tiere (∗p = 0,012; Kontrolle/Ethanol und Ethanol/Ethanol, n = 10; Saline/Ethanol und Saline/Saline, n = 13; Kontrolle/Saline, n = 15; Ethanol/Saline, n = 12).

3.1.2.2.3 Aufrichten

Beim Vergleich der Versuchsgruppen zeigt sich ein Effekt der neonatalen Ethanolbehandlung. Diejenigen Tiere, denen an PD7 Ethanol appliziert wurde, zeigten gegenüber der Kontrollgruppe ein signifikant reduziertes Aufrichtverhalten im *open field* (ANOVA: $F_{2,67} = 3,21$; $p < 0,05$). Additiv zu dem neonatalen Ethanoleffekt hatte auch die pubertäre Ethanolbehandlung einen Einfluss auf das Aufrichtverhalten der Tiere. So richteten sich die pubertär mit Ethanol behandelten Tiere signifikant weniger auf als die mit Saline behandelten Tiere (ANOVA: $F_{1,67} = 8,48$; $p < 0,05$).

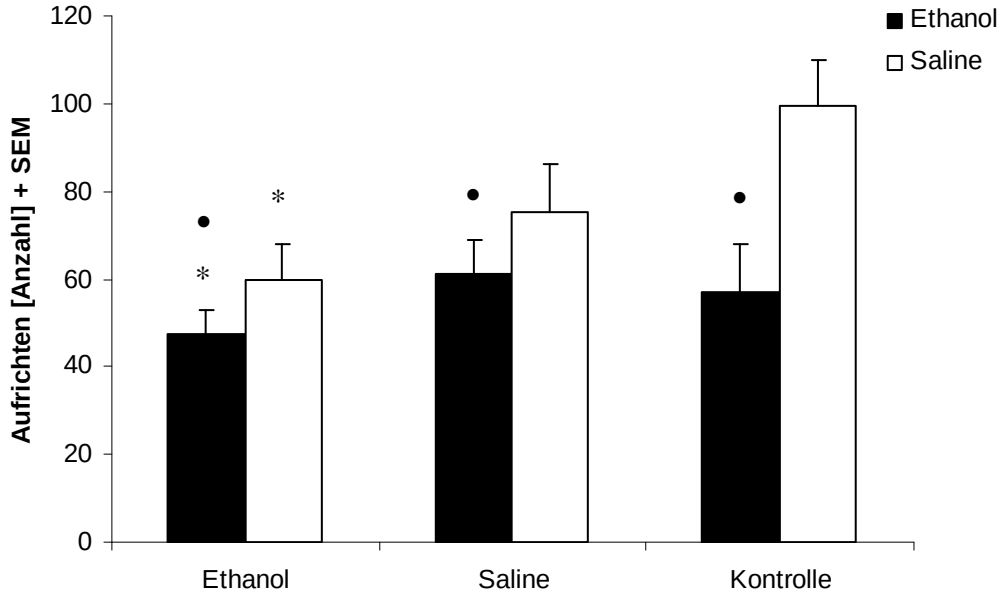


Abb. 18. Dargestellt ist Anzahl der Aufrichtungen + SEM. Die neonatale Ethanolgabe führte gegenüber der neonatalen Salinebehandlung zu einem verminderten Aufrichtverhalten (∗p = 0,037). Nach der chronischen Ethanolbehandlung richteten sich die Ratten signifikant weniger auf im Vergleich zu den mit Saline behandelten Ratten (•p = 0,005; Kontrolle/Ethanol und Ethanol/Ethanol, n = 10; Saline/Ethanol und Saline/Saline, n = 13; Kontrolle/Saline, n = 15; Ethanol/Saline, n = 12).

3.1.2.2.4 Aufenthalt Mitte

Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Behandlungsgruppen in Bezug auf den Aufenthalt in der Mitte des *open field* (ANOVA: 1.Behandlung: $F_{2,67} = 2,14$; $p > 0,05$; 2.Behandlung: $F_{1,67} = 1,88$; $p > 0,05$).

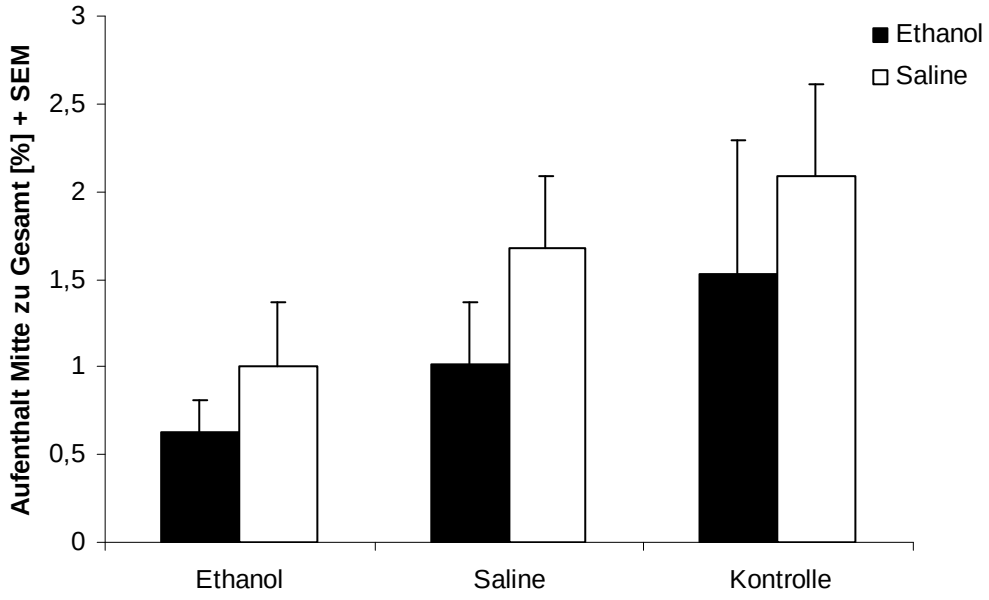


Abb. 19. Dargestellt ist das Verhältnis der Aufenthaltsdauer der Ratten in der Mitte zum Gesamtaufenthalt im *open field* in Prozent + SEM. Weder die neonatale noch die pubertäre chronische Ethanolbehandlung veränderte die Aufenthaltsdauer adulter Ratten in der Mitte des *open field* (Kontrolle/Ethanol und Ethanol/Ethanol, n = 10; Saline/Ethanol und Saline/Saline, n = 13; Kontrolle/Saline, n = 15; Ethanol/Saline, n = 12).

3.1.3 *Progressive ratio*-Test

3.1.3.1 PR1-Aufgabe

Die Auswertung des *break point* in der PR1-Aufgabe (Abb. 20) ergab einen Interaktionseffekt der neonatalen und der pubertären chronischen Ethanolbehandlung der Tiere (ANOVA: $F_{2,74} = 3{,}88$; $p < 0{,}05$). Nach der Doppelbehandlung mit Ethanol hatten die Ratten einen höheren *break point* im Vergleich zu den pubertär mit Saline behandelten Ratten. Dieser Effekt konnte jedoch vom post-hoc Tukey-Test ($p > 0{,}05$) nicht bestätigt werden.

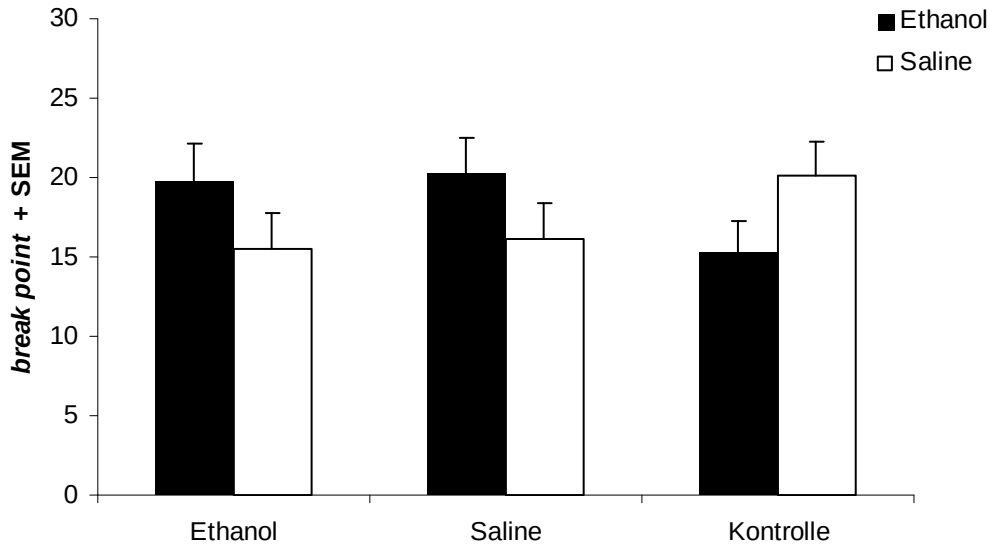


Abb. 20. Effekte neonataler Ethanol-Applikation und chronischer Ethanolgabe während der Pubertät auf die Leistung in einer PR-Aufgabe. Dargestellt ist der mittlere *break point* + SEM. Die zweifaktorielle Varianzanalyse ergab einen signifikanten Interaktionseffekt der neonatalen und pubertären chronischen Ethanolbehandlung, der jedoch nach Anwendung des post-hoc Tukey-Test nicht aufrechterhalten werden konnte (Saline/Saline, Saline/Ethanol und Ethanol/Ethanol, n = 13; Kontrolle/Ethanol, n = 16; Kontrolle/Saline, n = 15; Ethanol/Saline, n = 12).

3.1.3.2 PR3-Aufgabe

Nach der Analyse des *break point* in der PR3-Aufgabe (Abb. 21) zeigte sich ein Interaktionseffekt der neonatalen und pubertären Behandlung (ANOVA: $F_{2,74} = 3,34$; $p < 0,05$). Diejenigen Gruppen, denen neonatal und pubertär Ethanol verabreicht wurde, haben einen signifikant höheren *break point* gegenüber den Gruppen, denen pubertär Saline appliziert wurde ($p = 0,049$).

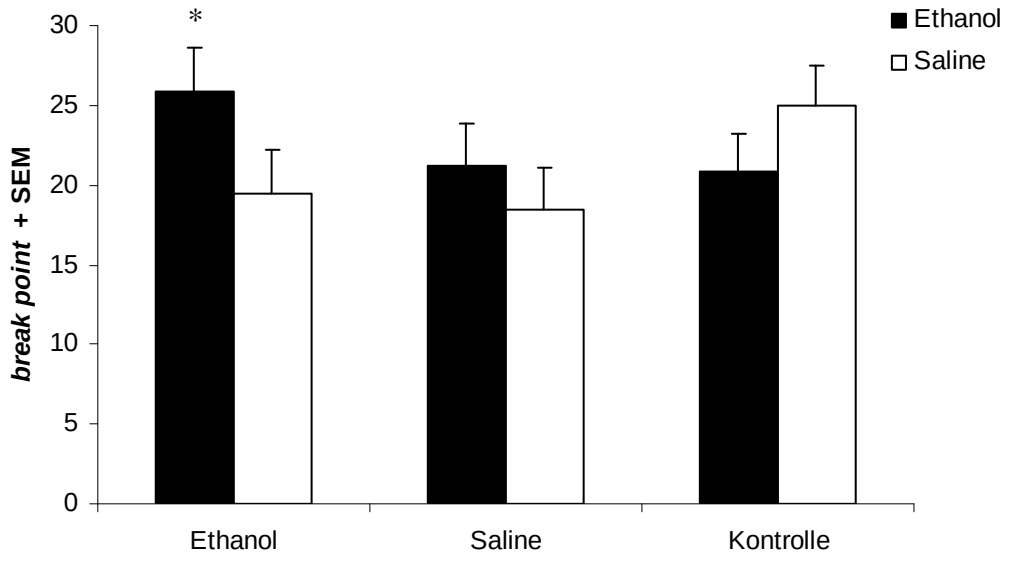


Abb. 21. Effekte neonataler und pubertär chronischer Ethanolgabe auf die Bestimmung des *break point*. Dargestellt ist der mittlere *break point* + SEM. Die Ratten mit einer doppelten Ethanolbehandlung hatten einen höheren break point als die pubertär mit Saline behandelten Ratten (∗p = 0,049; Saline/Saline, Saline/Ethanol und Ethanol/Ethanol, n = 13; Kontrolle/Ethanol, n = 16; Kontrolle/Saline, n = 15; Ethanol/Saline, n = 12).

3.1.4 Futterpräferenz-Test

Zwischen den Behandlungsgruppen konnte kein signifikanter Unterschied bezüglich der Futterpräferenz der Tiere festgestellt werden (Tab. 7). Weder die neonatale noch die pubertäre chronische Ethanolbehandlung hatte einen Einfluss auf die konsumierte Menge der Caseinpellets (ANOVA: 1.Behandlung: $F_{2,76} = 1,94$; $p > 0,05$; 2.Behandlung: $F_{1,76} = 0,20$; $p > 0,05$), des Laborfutters (ANOVA: 1.Behandlung: $F_{2,76} = 0,53$; $p > 0,05$; 2.Behandlung: $F_{1,76} = 2,84$; $p > 0,05$) und auf den Gesamtfutterkonsum (ANOVA: 1.Behandlung: $F_{2,76} = 1,85$; $p > 0,05$; 2.Behandlung: $F_{1,76} = 0,76$; $p > 0,05$).

Tab. 7. Ergebnisse des Futterpräferenz-Test.

1. Behandlung	Ethanol		Saline		Kontrolle	
2. Behandlung	Ethanol	Saline	Ethanol	Saline	Ethanol	Saline
Pellets [g]	6,58 (± 0,56)	7,27 (± 0,58)	7,95 (± 0,56)	6,42 (± 0,56)	7,82 (± 0,51)	8,05 (± 0,52)
Laborfutter [g]	0,41 (± 0,11)	0,08 (± 0,11)	0,27 (± 0,11)	0,22 (± 0,11)	0,19 (± 0,10)	0,10 (± 0,10)
GFM [g]	6,99 (± 0,51)	7,35 (± 0,53)	8,22 (± 0,51)	6,64 (± 0,51)	8,02 (± 0,46)	8,16 (± 0,48)
Anteil Pellets [%]	92,75 (± 1,98)	98,87 (± 1,90)	96,47 (± 1,98)	95,01 (± 1,98)	97,31 (± 1,78)	97,78 (± 1,98)

Dargestellt sind die konsumierten Mengen der Kaseinpellets, des Laborfutters, die GFM sowie der relative Anteil der Kaseinpellets an der GFM. Es zeigten sich keine Effekte neonataler Ethanol-Applikation und pubertärer Ethanolbehandlung auf den Futterkonsum adulter Tiere (Abkürzung: GFM: Gesamtfuttermenge; Saline/Saline, Saline/Ethanol und Ethanol/Ethanol, n = 13; Kontrolle/Ethanol, n = 16; Kontrolle/Saline, n = 15; Ethanol/Saline, n = 12).

3.1.5 *Object recognition*-Test

Weder die neonatale Ethanol-Applikation an PD7 noch die Ethanolgabe während der Pubertät hatte einen Einfluss auf das Wiedererkennen von Objekten im Haupttest (Präsentation eines identischen Objektes nach 30 min; Abb. 22). Es gab demnach keinen signifikanten Unterschied zwischen den Gruppen bezüglich der Reduktion der Investigationszeit (ANOVA: 1.Behandlung: $F_{2,76} = 1{,}13$; $p > 0{,}05$; 2.Behandlung: $F_{1,76} = 0{,}08$; $p > 0{,}05$).

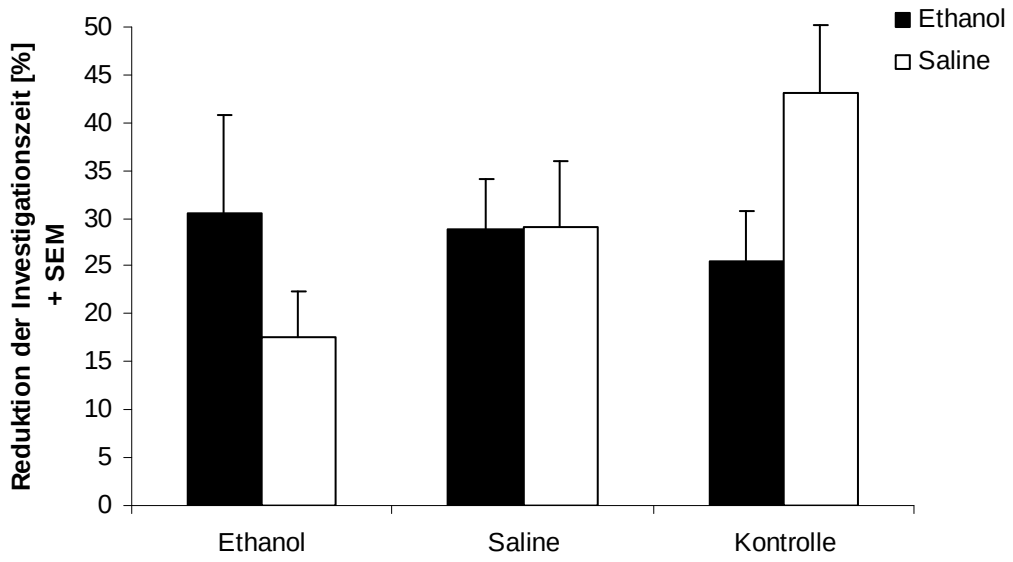
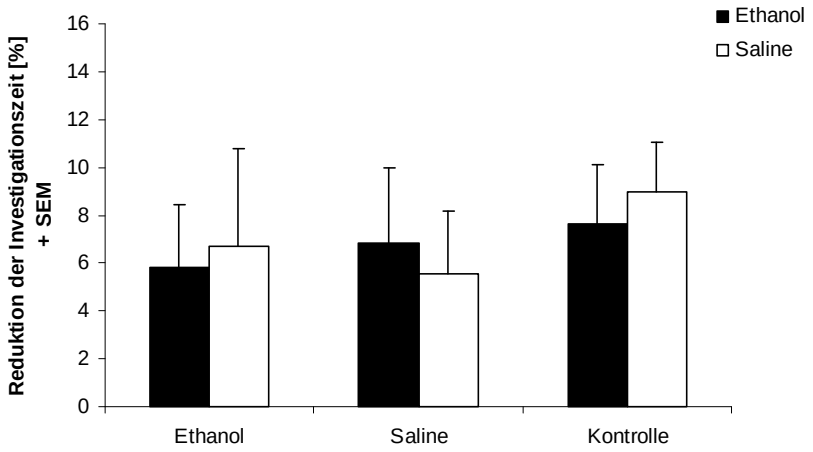


Abb. 22. Effekte neonataler und pubertärer Ethanolbehandlung auf die Gedächtnisleistung adulter Ratten im OR-Test. Dargestellt ist die Reduktion der Investigationszeit während der zweiten Präsentation des Objektes im Vergleich zur ersten Präsentation des Objektes in Prozent + SEM. Es wurde kein signifikanter Unterschied zwischen den Behandlungsgruppen festgestellt (Saline/Saline, Saline/Ethanol und Ethanol/Ethanol, n = 13; Kontrolle/Ethanol, n = 16; Kontrolle/Saline, n = 15; Ethanol/Saline, n = 12).

Auch in den beiden Kontrollexperimenten gab es keinen Effekt der neonatalen und pubertären Behandlung. Es wurde kein signifikanter Unterschied zwischen den verschiedenen Versuchsgruppen im ersten Kontrollexperiment (Präsentation des gleichen Objektes nach 120 min; ANOVA: 1.Behandlung: $F_{2,76} = 0,39$; $p > 0,05$; 2.Behandlung: $F_{1,76} = 0,02$; $p > 0,05$; Abb. 23a) und zweiten Kontrolltest (Präsentation eines neuen Objektes nach 30 min; ANOVA: 1.Behandlung: $F_{2,76} = 0,62$; $p > 0,05$; 2.Behandlung: $F_{1,76} = 0,29$; $p > 0,05$; Abb. 23b) festgestellt.

a)



b)

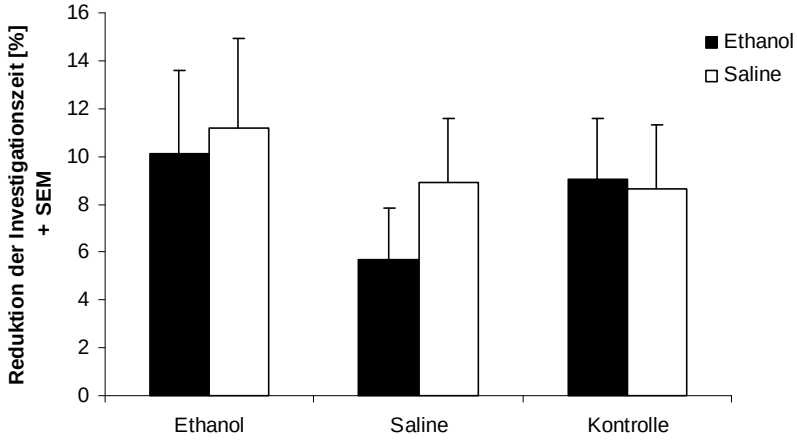
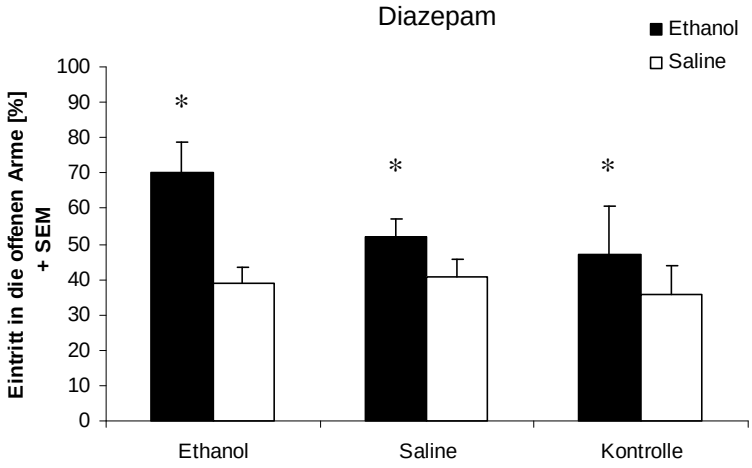


Abb. 23. Dargestellt sind die Ergebnisse der beiden Kontrollexperimente des OR-Test. Sowohl im ersten (a) als auch im zweiten Kontrollexperiment (b) konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den jeweiligen Versuchsgruppen festgestellt werden (Saline/Saline, Saline/Ethanol und Ethanol/Ethanol, n = 13; Kontrolle/Ethanol, n = 16; Kontrolle/Saline, n = 15; Ethanol/Saline, n = 12).

3.1.6 *Elevated plus maze*-Test

Für die Auswertung des Angstverhaltens der Versuchstiere auf dem EPM wurden die Eintritte in die offenen Arme und die Aufenthaltsdauer in den offenen Armen nach akuter Applikation von Diazepam und Saline analysiert. Es zeigte sich ein Interaktionseffekt zwischen der pubertären chronischen Ethanolbehandlung und der akuten Diazepam-Injektion bezüglich der Eintritte in die offenen Arme (ANOVA: $F_{1,27}$ = 7,22; p > 0,05; Abb. 24a). Nach der Verabreichung von Diazepam betraten die pubertär mit Ethanol behandelten Tiere signifikant häufiger die offenen Arme als die mit Saline behandelten Tiere Die akute Saline-Injektion hatte dagegen kein Effekt auf das Eintrittsverhalten in die offenen Arme (ANOVA: p > 0,05; Abb. 24b). Nach der Analyse der Gesamteintritte (Eintritte in die offenen und geschlossenen Arme) ergab sich hinsichtlich der lokomotorischen Aktivität keinen signifikanten Behandlungseffekt (Daten nicht gezeigt).

a)



b)

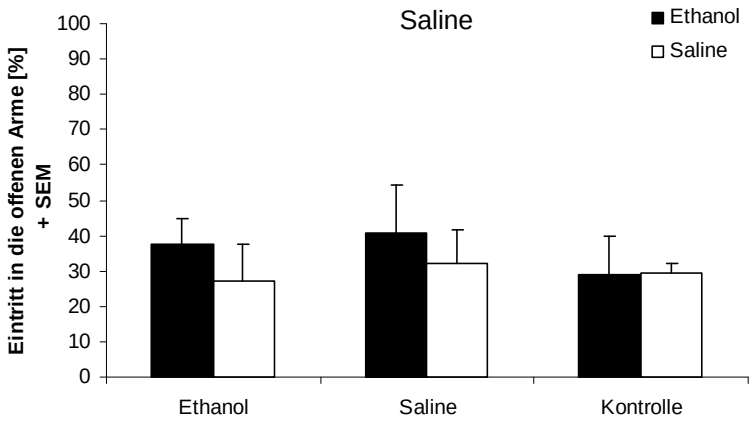
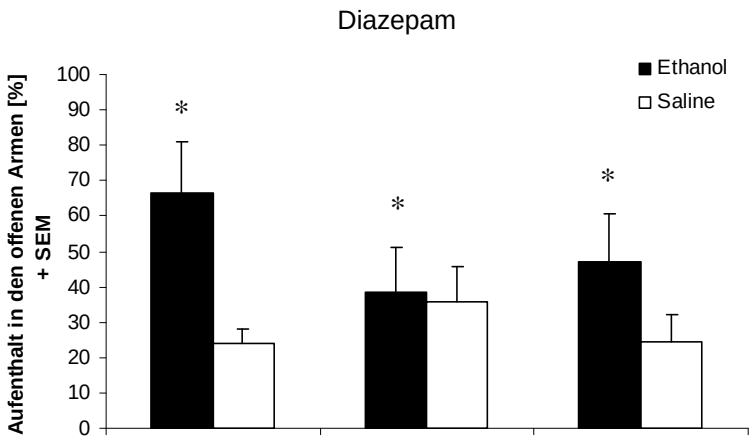


Abb. 24. Dargestellt sind die Eintritte der Tiere in die offenen Arme (in Prozent zu den Gesamteintritten) nach akuter Diazepam- (a) und Saline-Injektion (b). Nach der Verabreichung von Diazepam betraten die pubertär mit Ethanol behandelten Tiere signifikant häufiger die offenen Arme als die mit Saline behandelten Tiere (∗p = 0,012; Saline/Saline, n = 6; Saline/Ethanol, Ethanol/Ethanol, Ethanol/Saline, Kontrolle/Ethanol, n = 5; Kontrolle/Saline, n = 7).

Ein Interaktionseffekt zwischen der akuten Diazepam-Injektion und der chronischen Ethanolbehandlung konnte auch hinsichtlich der Aufenthaltsdauer in den offenen Armen beobachtet werden (ANOVA: $F_{1,27} = 9,35$; $p < 0,05$; Abb. 25a). Pubertär mit Ethanol behandelte Tiere hielten sich nach der akuten Diazepam-Applikation signifikant länger in den offenen Armen auf als die pubertär mit Saline behandelten Tiere ($p = 0,005$). Auch die akute Saline-Injektion hatte einen signifikanten Einfluss auf den Aufenthalt der Versuchstiere in den offenen Armen (ANOVA: $F_{2,23} = 4,33$; $p < 0,05$; Abb. 25b). Zum Einen führte sie bei den neonatal und pubertär mit Ethanol behandelten Tieren dazu, dass sie sich signifikant kürzer in den offenen Armen aufhielten im Vergleich zu den pubertär mit Saline behandelten Tiere ($p = 0,017$) und zum Anderen, dass sich die Tiere mit der neonatalen Ethanolbehandlung signifikant länger in den offenen Armen aufhielten als die unbehandelten Tiere ($p = 0,042$).

a)



b)

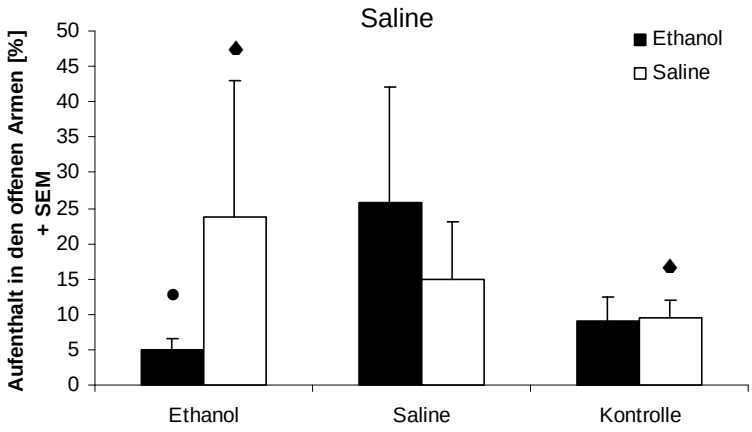


Abb. 25. Dargestellt ist die Aufenthaltsdauer der Tiere in den offenen Armen (in Prozent zur Gesamtaufenthaltsdauer) nach akuter Diazepam- (a) und Saline-Injektion (b). Nach der Diazepam-Applikation hielten sich die pubertär mit Ethanol behandelten Tiere länger in den offenen Armen auf (∗p = 0,005). Nach der Saline-Applikation war die Aufenthaltsdauer in den offenen Armen der neonatal und pubertär mit Ethanol behandelten Tiere kürzer (•p = 0,017). Zudem hielten sich die an PD 7 mit Ethanol behandelten Tiere signifikant länger in den offenen Armen auf als die unbehandelten Tiere (♦p = 0,042; Saline/Saline, Saline/Ethanol, n = 5; Ethanol/Ethanol, Ethanol/Saline, Kontrolle/Ethanol, n = 4; Kontrolle/Saline, n = 7).

3.2 Histologie

3.2.1 Auswertung der Myelinisierungsstärke

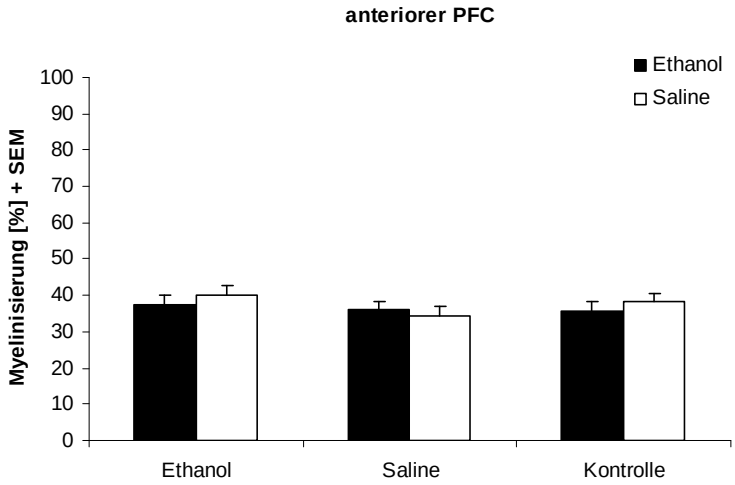
Die quantitative Analyse der mit Goldchlorid gefärbten Hirnschnitte des posterioren PFC zeigte einen Interaktionseffekt zwischen der neonatalen und pubertären Behandlung (ANOVA: $F_{2,24} = 2,05$; $p < 0,05$). Diejenigen Gruppen, denen sowohl neonatal als auch pubertär Ethanol verabreicht wurde, zeigten gegenüber den Gruppen, denen pubertär Saline appliziert wurde, einen niedrigeren Myelinisierungsgrad. Die neonatale Ethanolbehandlung allein dagegen führte zu einer stärkeren Myelinisierung des posterioren PFC im Vergleich zu den unbehandelten Tieren (Abb. 26b).

Für das VTA zeigte sich ein signifikanter Effekt der pubertären Ethanolbehandlung gegenüber der Salinebehandlung auf die Myelinisierungsstärke, unabhängig von der jeweiligen neonatalen Behandlung (ANOVA: $F_{1,24} = 5,92$; $p < 0,05$). Nach der pubertären chronischen Ethanolgabe war ein höherer Myelinisierungsgrad im VTA zu erkennen (Abb. 29).

Dagegen hatte weder die neonatale noch die chronische Ethanolgabe einen Einfluss auf die Myelinisierung des anterioren PFC (ANOVA: 1.Behandlung: $F_{2,24} = 1,2$; $p < 0,05$; 2.Behandlung: $F_{1,24} = 0,4$; $p < 0,05$; Abb. 26a), des NAC (ANOVA: 1.Behandlung: $F_{2,24} = 0,7$; $p < 0,05$; 2.Behandlung: $F_{1,24} = 0,1$; $p < 0,05$; Abb. 27a), der Amygdala (ANOVA: 1.Behandlung: $F_{2,24} = 3,6$; $p < 0,05$; 2.Behandlung: $F_{1,24} = 0,5$; $p < 0,05$; Abb. 27b) sowie des dorsalen Hippocampus (ANOVA: 1.Behandlung: $F_{2,24} = 0,6$; $p < 0,05$; 2.Behandlung: $F_{1,24} = 0,3$; $p < 0,05$; Abb. 28a) und ventralen Hippocampus (ANOVA: 1.Behandlung: $F_{2,24} = 1,1$; $p < 0,05$; 2.Behandlung: $F_{1,24} = 0,3$; $p < 0,05$; Abb. 28b).

Abbildung 30 zeigt repräsentative Fotomikrografien histologischer Färbungen des posterioren PFC und des VTA unbehandelter sowie pubertär chronisch mit Ethanol behandelten Tieren.

a)



b)

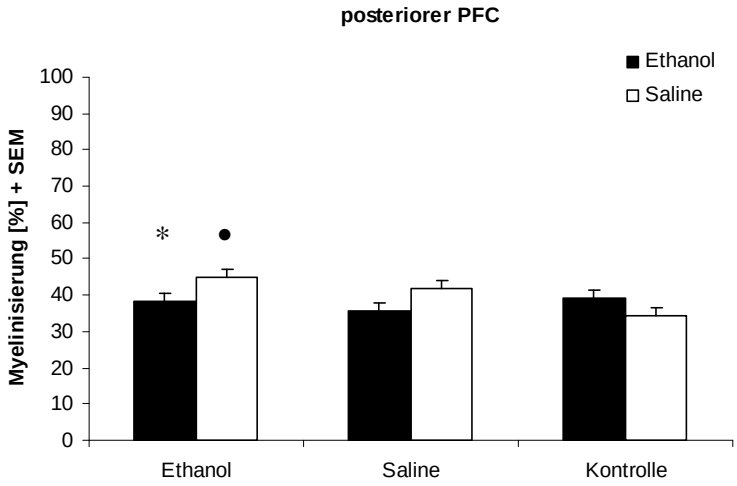
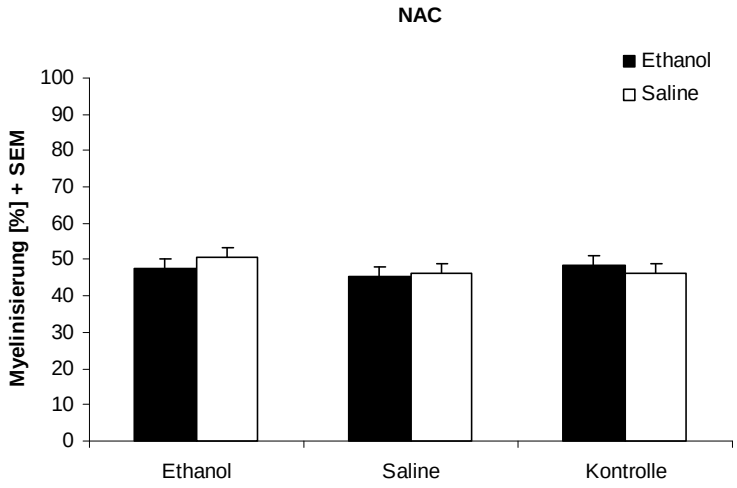


Abb. 26. Effekte neonataler und pubertär chronischer Ethanolbehandlung auf die Myelinisierung des anterioren (a) und posterioren (b) PFC. Dargestellt ist der Myelinisierungsgrad in Prozent + SEM des anterioren und posterioren PFC. Nach neonataler und pubertärer Ethanolbehandlung war ein signifikant niedrigerer Myelinisierungsgrad gegenüber mit Saline behandelten Tieren im posterioren PFC zu erkennen (∗p = 0,043). Die neonatale Ethanolbehandlung allein dagegen führte zu einer signifikant stärkeren Myelinisierung des posterioren PFC im Vergleich zu den unbehandelten Tieren (•p = 0,005; alle Behandlungsgruppen: n = 5).

a)



b)

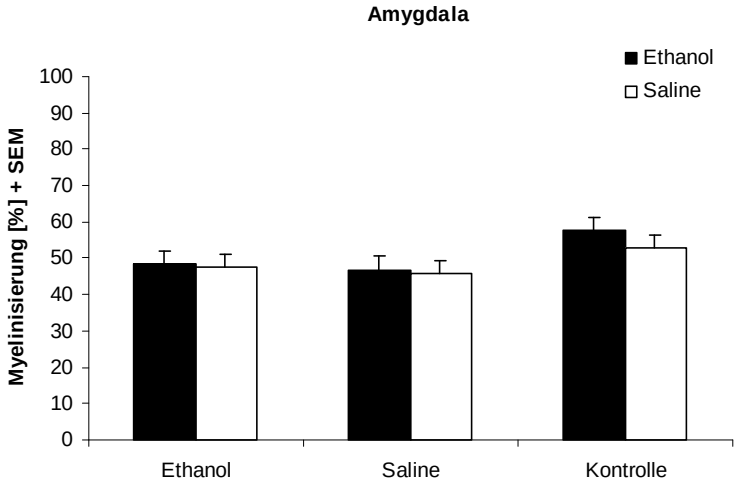
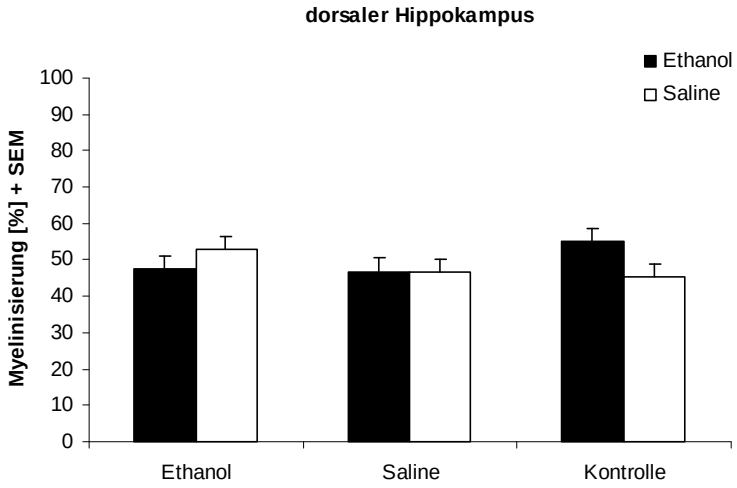


Abb. 27. Effekte neonataler und pubertär chronischer Ethanolbehandlung auf die Myelinisierung des NAC (a) und der Amygdala (b). Dargestellt ist der Myelinisierungsgrad in Prozent + SEM des NAC und der Amygdala. Weder die neonatale noch die pubertäre Ethanolgabe hatte einen Einfluss auf die Myelinisierung dieser beiden Hirnregionen (alle Behandlungsgruppen: n = 5).

a)



b)

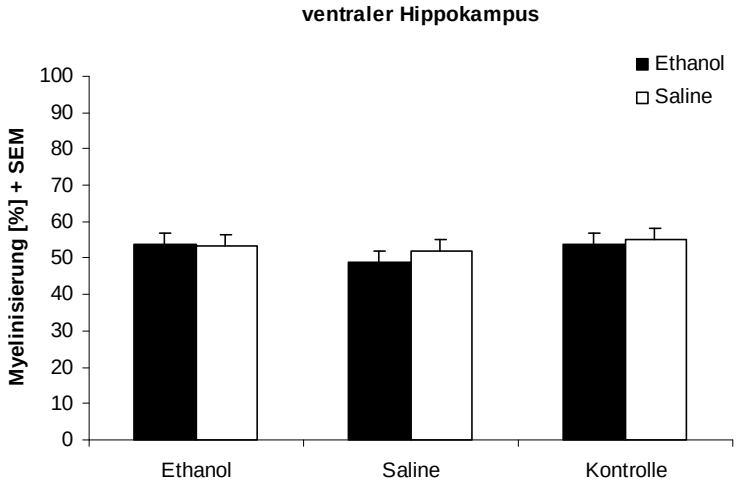


Abb. 28. Effekte neonataler und pubertär chronischer Ethanolbehandlung auf die Myelinisierung des dorsalen (a) und ventralen (b) Anteil des Hippocampus. Dargestellt ist der Myelinisierungsgrad in Prozent + SEM des dorsalen und ventralen Hippocampus. Weder die neonatale noch die pubertäre Ethanolgabe hatte einen Einfluss auf die Myelinisierung des Hippocampus (alle Behandlungsgruppen: n = 5).

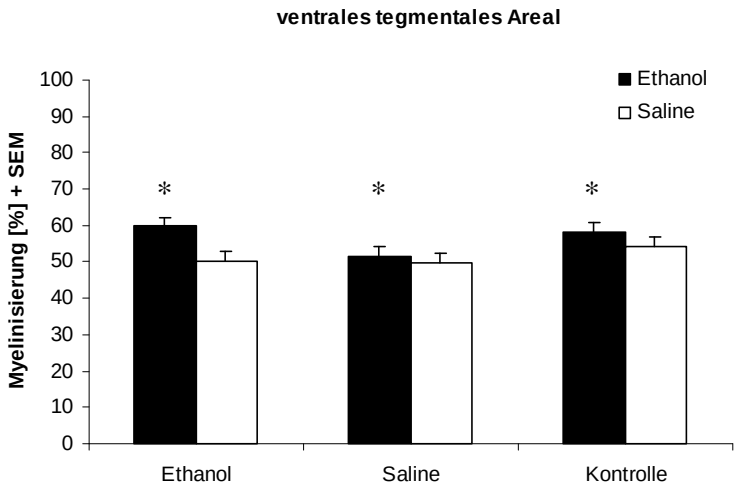


Abb. 29. Effekte neonataler und pubertärer chronischer Ethanolbehandlung auf die Myelinisierung des ventralen tegmentalen Areals. Dargestellt ist der Myelinisierungsgrad in Prozent + SEM des VTA. Es zeigte sich ein Effekt der pubertären chronischen Ethanolbehandlung, der unabhängig von der neonatalen Behandlung ist. Alle in der Pubertät mit Ethanol behandelten Tiere zeigten einen signifikant ausgeprägteren Myelinisierungsgrad (∗p = 0,023; alle Behandlungsgruppen: n = 5).

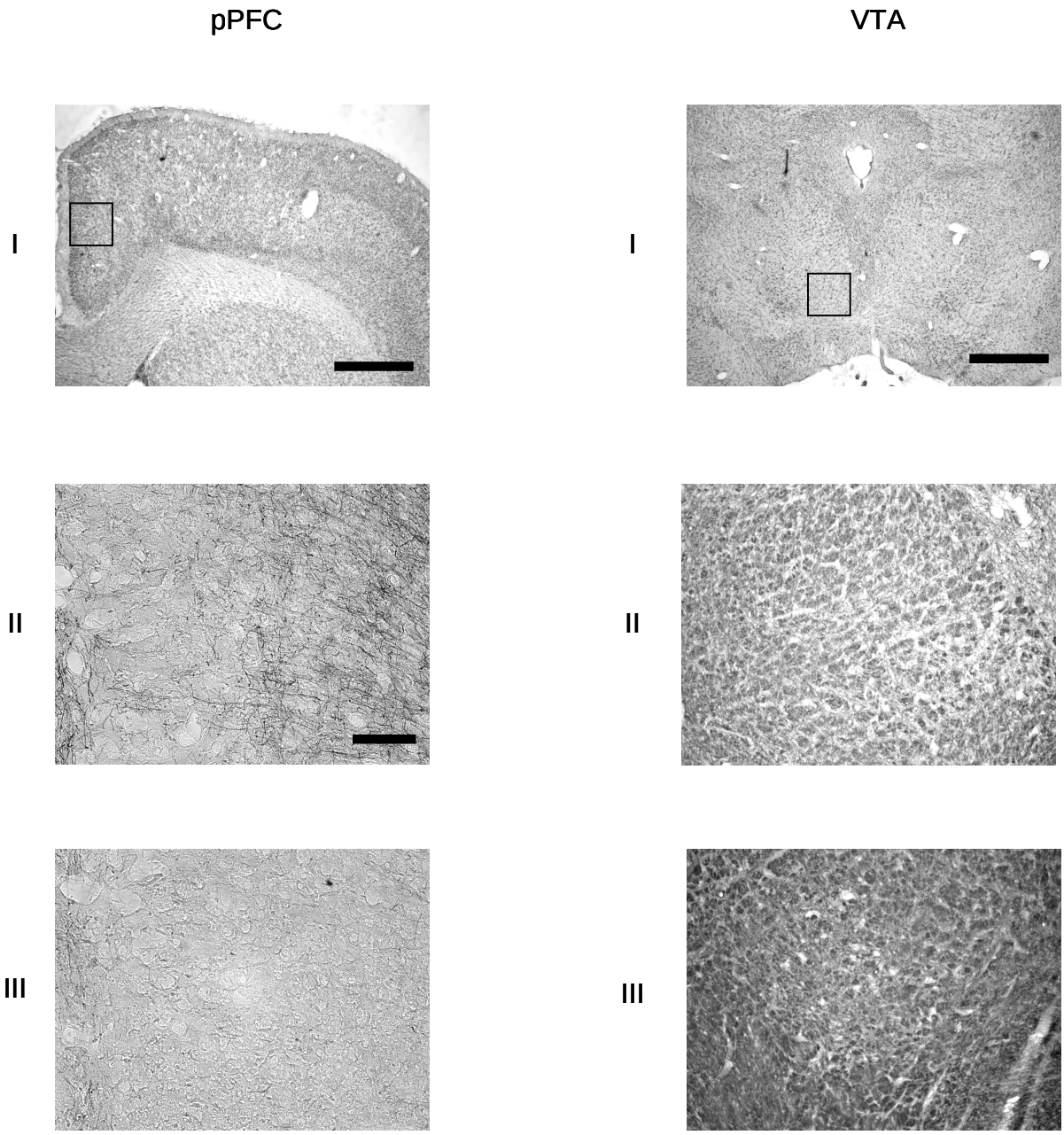


Abb. 30. Die Abbildung zeigt Fotomikrografien von Frontalschnitten (40 μm) des posterioren PFC und der VTA unbehandelter Tiere mit Nissl-Färbung (pPFC I und VTA I) und Goldchlorid-Färbung (pPFC II und VTA II) sowie Aufnahmen goldchlorid-gefärbter Schnitte des posterioren PFC und des VTA von pubertär mit Ethanol behandelten Tieren (pPFC III und VTA III). pPFC II und VTA II sind jeweils Vergrösserungen der in pPFC I und VTA I markierten Flächen. Es zeigte sich eine deutliche Abnahme der Markscheiden im posterioren PFC nach der chronischen Ethanolbehandlung im Vergleich zu den unbehandelten Tieren. Nach der pubertären Ethanolbehandlung sind nur noch wenige goldchlorid-gefärbte Myelinscheiden im posterioren PFC zu erkennen (linker Bildrand pPFC III). Im VTA wurde eine Zunahme der Myelinisierung nach der pubertären chronischen Ethanolbehandlung beobachtet (VTA III). Aufgrund des rostro-caudalen Verlaufs der Axone im VTA sind die myelinisierten Fasern fast ausschlisslich im Querschnitt zu sehen. Kalibrierbalken: pPFC I, VTA I: 1000 μm; pPFC II: 100 μm.

3.2.2 Auswertung der Parvalbumin-immunreaktiven Interneuronen

Die quantitative Auswertung der PVI in den ausgewählten Hirnregionen wurde pro Behandlungsgruppe bei fünf Tieren an zehn Schnitten (zwei Schnitte/Tier/Hirnregion) durchgeführt. Zunächst wurden die Flächen der ausgewählten Hirnregionen bestimmt, in der die PVI ausgezählt wurden. Die Anzahl der PVI im dorsalen Hippocampus ist nach neonataler Ethanolexposition gegenüber den neonatal mit Saline behandelten Tieren reduziert (ANOVA: $F_{2,24} = 3,6$; $p > 0,05$; Abb. 32). Dieser Effekt hebt sich jedoch nach der Analyse der Interneuronendichte auf (siehe unten). Für den anterioren PFC (ANOVA: 1.Behandlung: $F_{2,24} = 1,9$; $p < 0,05$; 2.Behandlung: $F_{1,24} = 0,4$; $p < 0,05$; Abb. 32), posterioren PFC (ANOVA: 1.Behandlung: $F_{2,24} = 1,1$; $p < 0,05$; 2.Behandlung: $F_{1,24} = 1$; $p < 0,05$; Abb. 32), die Amygdala (ANOVA: 1.Behandlung: $F_{2,24} = 1,3$; $p < 0,05$; 2.Behandlung: $F_{1,24} = 0,9$; $p < 0,05$; Abb. 32) und den ventralen Hippocampus (ANOVA: 1.Behandlung: $F_{2,24} = 1,3$; $p < 0,05$; 2.Behandlung: $F_{1,24} = 2,1$; $p < 0,05$; Abb. 32) ergab sich kein signifikanter Unterschied zwischen den Behandlungsgruppen.

Danach wurden die Volumina der ausgewählten Hirnregionen bestimmt. Dabei traten keine signifikanten Unterschiede zwischen den Behandlungsgruppen hinsichtlich des anterioren PFC (ANOVA: 1.Behandlung: $F_{2,24} = 0,5$; $p < 0,05$; 2.Behandlung: $F_{1,24} = 1,7$; $p < 0,05$), des posterioren PFC (ANOVA: 1.Behandlung: $F_{2,24} = 0,7$; $p < 0,05$; 2.Behandlung: $F_{1,24} = 2,1$; $p < 0,05$), der Amygdala (ANOVA: 1.Behandlung: $F_{2,24} = 0,4$; $p < 0,05$; 2.Behandlung: $F_{1,24} = 3,7$; $p < 0,05$) des dorsalen Hippocampus (ANOVA: 1.Behandlung: $F_{2,24} = 1,1$; $p < 0,05$; 2.Behandlung: $F_{1,24} = 0,9$; $p < 0,05$) und ventralen Hippocampus auf (ANOVA: 1.Behandlung: $F_{2,24} = 2,2$; $p < 0,05$; 2.Behandlung: $F_{1,24} = 1$; $p < 0,05$).

Nach Zählung der PVI konnte mit Hilfe des zuvor ausgemessenen Volumens die Interneuronendichte bestimmt werden. Es zeigte sich kein signifikanter Effekt der neonatalen und/oder pubertärer chronischen Ethanolbehandlung auf die Interneuronendichte im anterioren PFC (ANOVA: 1.Behandlung: $F_{2,24} = 0,8$; $p < 0,05$; 2.Behandlung: $F_{1,24} = 0,3$; $p < 0,05$), posterioren PFC (ANOVA: 1.Behandlung: $F_{2,24} = 0,1$; $p < 0,05$; 2.Behandlung: F1,24 = 1,3; $p < 0,05$), in der Amygdala (ANOVA: 1.Behandlung: $F_{2,24} = 0,4$; $p < 0,05$; 2.Behandlung: $F_{1,24} = 3,7$; $p < 0,05$), im dorsalen Hippocampus (ANOVA: 1.Behandlung: $F_{2,24} = 2,6$; $p < 0,05$; 2.Behandlung: $F_{1,24} = 0,1$; $p < 0,05$) und ventralen Hippocampus (ANOVA: 1.Behandlung: $F_{2,24} = 3,3$; $p < 0,05$; 2.Behandlung: $F_{1,24} = 2,1$; $p < 0,05$).

Abbildung 31 zeigt exemplarische Fotomikrografien histologische Bilder des dorsalen Hippocampus und der Amygdala unbehandelter Tiere.

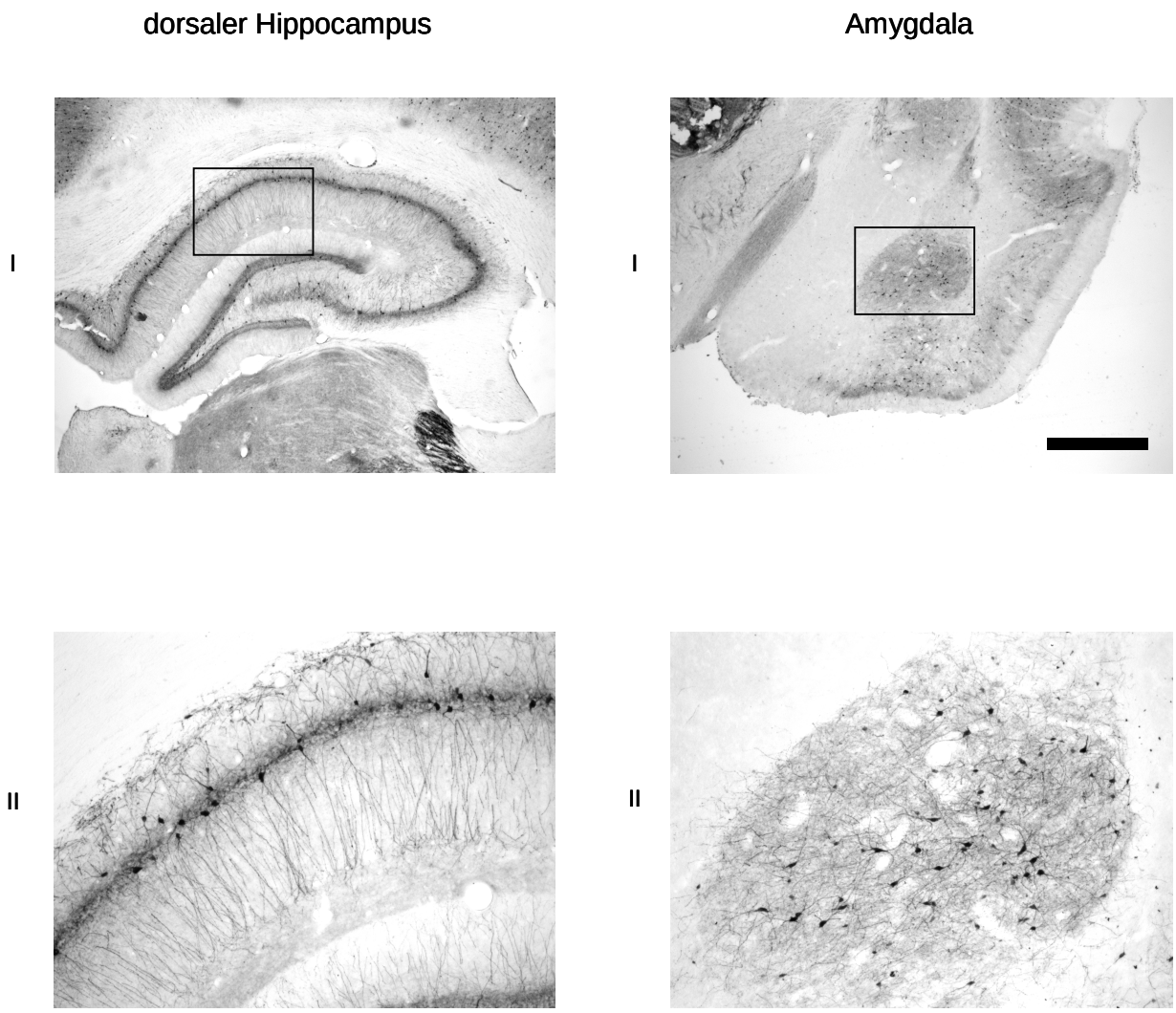
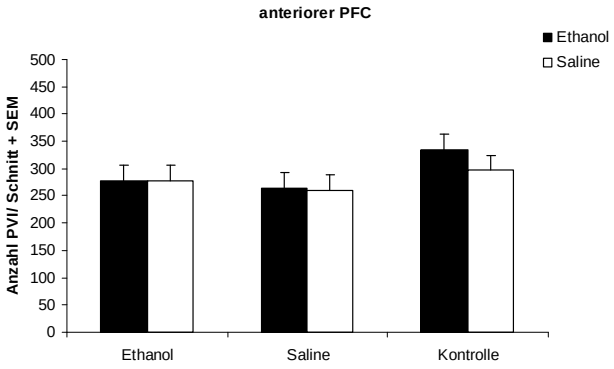
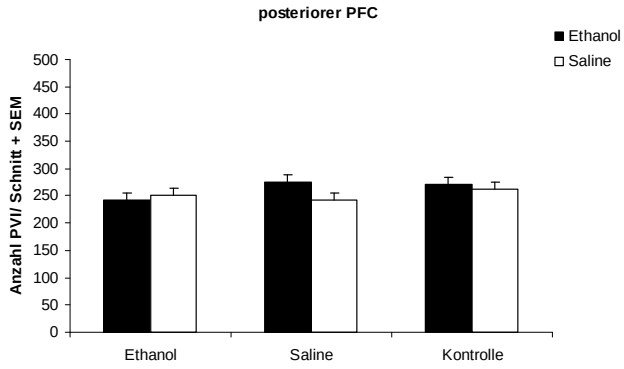


Abb. 31. Die Abbildung zeigt Frontalschnitte (40 µm) des dorsalen Hippocampus (dorsaler Hippocampus I und II) und der Amygdala (Amygdala I und II) unbehandelter Tiere mit Parvalbumin-immunreaktiven Neuronen. Die oberen beiden Mikrofotografien zeigen den dorsalen Hippocampus und die Amygdala 25fach vergrössert. Die unteren beiden Bilder sind jeweils Vergrösserungen der in den obigen Bildern markierten Flächen. Man erkennt gefärbte Perikarya und Fasern (Dendriten und Axone) im Stratum oriens des Hippocampus (links) und im basolateralen Kern der Amygdala (rechts). Die neonatale und/oder pubertär chronische Ethanolbehandlung hatte keinen signifikanten Einfluss auf die Anzahl und Dichte Parvalbumin-immunreaktiver Neuronen in allen untersuchten Hirnregionen. Kalibrationsbalken: 1000 µm.

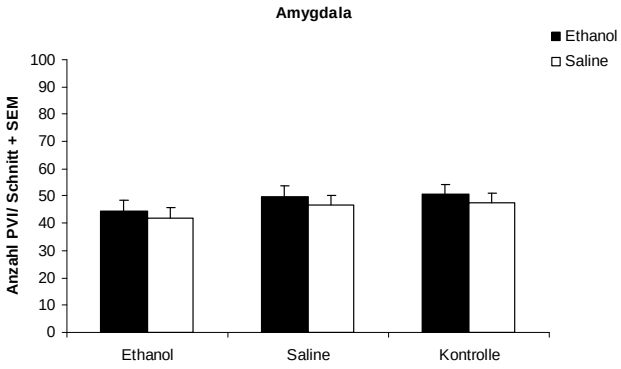
a)



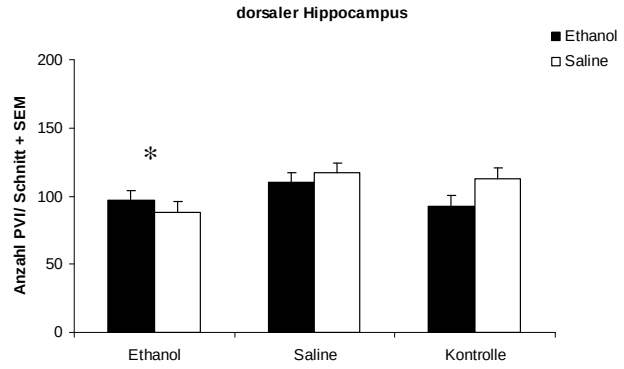
b)



c)



d)



e)

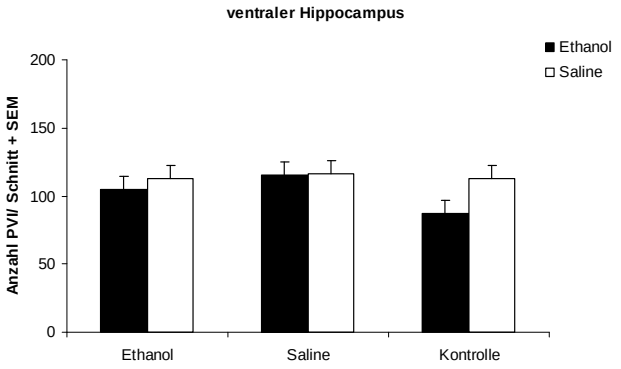


Abb. 32. Effekte neonataler und pubertär chronischer Ethanolbehandlung auf die Anzahl parvalbumin-immunreaktiver Interneurone (PVI)/ Hirnschnitt im anterioren (a), posterioren PFC (b), in der BLA (c), im dorsalen Hippocampus (d) und ventralen Hippocampus (e). Nach der neonatalen Ethanolbehandlung war die Anzahl der PVI im dorsalen Hippocampus gegenüber den mit Saline behandelten Tieren signifikant reduziert (∗p = 0,034). Es gab keinen signifikanten Unterschied zwischen den Behandlungsgruppen hinsichtlich PVI in den übrigen Hirnregionen (alle Behandlungsgruppen: n = 5).

Tab. 8. Ergebnisse der quantitativen Analyse des anterioren PFC.

Behandlungs-Gruppen	Gesamtzahl PVI	Fläche (mm^2)	Volumen (mm^3)	Interneuronendichte (PVI/ mm^3)
EE	2784 (±282)	1,909 (±0,15)	0,764 (±0,06)	365,882 (±37,47)
ES	2777 (±282)	1,546 (±0,15)	0,618 (±0,06)	449,983 (±37,47)
SE	2654 (±282)	1,611 (±0,15)	0,644 (±0,06)	413,272 (±37,47)
SS	2607 (±282)	1,644 (±0,15)	0,658 (±0,06)	403,497 (±37,47)
KE	3359 (±282)	1,864 (±0,15)	0,746 (±0,06)	462,305 (±37,47)
KS	2964 (±282)	1,706 (±0,15)	0,683 (±0,06)	437,158 (±37,47)

Alle Daten sind Mittelwerte ± SEM. Die einzelnen Behandlungsgruppen unterscheiden sich nicht signifikant bezüglich der Gesamtzahl PVI, der Fläche, des Volumens und der Interneuronendichte im anterioren PFC (Abkürzungen: EE: Ethanol/Ethanol, ES: Ethanol/Saline, SE: Saline/Ethanol, SS: Saline/Saline, KE: Kontrolle/Ethanol, KS: Kontrolle/Saline; alle Behandlungsgruppen: n = 5).

Tab. 9. Ergebnisse der quantitativen Analyse des posterioren PFC.

Behandlungs-Gruppen	Gesamtzahl PVI	Fläche (mm^2)	Volumen (mm^3)	Interneuronendichte (PVI/ mm^3)
EE	2421 (±134)	1,144 (±0,10)	0,458 (±0,04)	535,545 (±62,14)
ES	2502 (±134)	1,067 (±0,10)	0,427 (±0,04)	600,790 (±62,14)
SE	2745 (±134)	1,106 (±0,10)	0,442 (±0,04)	623,151 (±62,14)
SS	2417 (±134)	1,106 (±0,10)	0,442 (±0,04)	570,819 (±62,14)
KE	2706 (±134)	1,354 (±0,10)	0,541 (±0,04)	508,316 (±62,14)
KS	2620 (±134)	1,066 (±0,10)	0,427 (±0,04)	666,094 (±62,14)

Alle Daten sind Mittelwerte ± SEM. Die einzelnen Behandlungsgruppen unterscheiden sich nicht signifikant bezüglich der Gesamtzahl PVI, der Fläche, des Volumens und der Interneuronendichte im posterioren PFC (Abkürzungen: EE: Ethanol/Ethanol, ES: Ethanol/Saline, SE: Saline/Ethanol, SS: Saline/Saline, KE: Kontrolle/Ethanol, KS: Kontrolle/Saline; alle Behandlungsgruppen: n = 5).

Tab. 10. Ergebnisse der quantitativen Analyse der Amygdala.

Behandlungs-Gruppen	Gesamtzahl PVI	Fläche (mm^2)	Volumen (mm^3)	Interneuronendichte (PVI/ mm^3)
EE	444 (±39)	0,525 (±0,04)	0,210 (±0,02)	210,894 (±19,51)
ES	419 (±39)	0,541 (±0,04)	0,217 (±0,02)	195,593 (±19,51)
SE	500 (±39)	0,590 (±0,04)	0,236 (±0,02)	213,640 (±19,51)
SS	465 (±39)	0,496 (±0,04)	0,198 (±0,02)	233,504 (±19,51)
KE	505 (±39)	0,635 (±0,04)	0,254 (±0,02)	212,587 (±19,51)
KS	474 (±39)	0,507 (±0,04)	0,203 (±0,02)	233,625 (±19,51)

Alle Daten sind Mittelwerte ± SEM. Die einzelnen Behandlungsgruppen unterscheiden sich nicht signifikant bezüglich der Gesamtzahl PVI, der Fläche, des Volumens und der Interneuronendichte in der Amygdala (Abkürzungen: EE: Ethanol/Ethanol, ES: Ethanol/Saline, SE: Saline/Ethanol, SS: Saline/Saline, KE: Kontrolle/Ethanol, KS: Kontrolle/Saline; alle Behandlungsgruppen: n = 5).

Tab. 11. Ergebnisse der quantitativen Analyse des dorsalen Hippocampus.

Behandlungs-Gruppen	Gesamtzahl PVI	Fläche (mm^2)	Volumen (mm^3)	Interneuronendichte (PVI/ mm^3)
EE	∗965 (±78)	1,915 (±0,16)	0,766 (±0,07)	126,163 (±12,25)
ES	∗883 (±78)	2,235 (±0,16)	0,894 (±0,07)	99,712 (±12,25)
SE	1097 (±78)	2,121 (±0,16)	0,848 (±0,07)	129,722 (±12,25)
SS	1168 (±78)	2,058 (±0,16)	0,823 (±0,07)	146,904 (±12,25)
KE	925 (±78)	2,232 (±0,16)	0,893 (±0,07)	106,262 (±12,25)
KS	1131 (±78)	2,353 (±0,16)	0,941 (±0,07)	124,543 (±12,25)

Alle Daten sind Mittelwerte ± SEM. Die neonatale Ethanolbehandlung führte gegenüber Saline behandelten Tieren zu einer Reduktion von PVI im dorsalen Hippocampus (∗p = 0,034). Die einzelnen Behandlungsgruppen unterscheiden sich dagegen nicht signifikant bezüglich der Fläche, des Volumens und der Interneuronendichte im dorsalen Hippocampus (Abkürzungen: EE: Ethanol/Ethanol, ES: Ethanol/Saline, SE: Saline/Ethanol, SS: Saline/Saline, KE: Kontrolle/Ethanol, KS: Kontrolle/Saline; alle Behandlungsgruppen: n = 5).

Tab. 12. Ergebnisse der quantitativen Analyse des ventralen Hippocampus.

Behandlungs-Gruppen	Gesamtzahl PVI	Fläche (mm^2)	Volumen (mm^3)	Interneuronendichte (PVI/ mm^3)
EE	1051 (±97)	1,575 (±0,10)	0,630 (±0,04)	170,730 (±20)
ES	1129 (±97)	1,567 (±0,10)	0,627 (±0,04)	180,741 (±20)
SE	1153 (±97)	1,383 (±0,10)	0,553 (±0,04)	211,376 (±20)
SS	1159 (±97)	1,429 (±0,10)	0,573 (±0,04)	207,693 (±20)
KE	873 (±97)	1,750 (±0,10)	0,700 (±0,04)	127,095 (±20)
KS	1129 (±97)	1,464 (±0,10)	0,585 (±0,04)	191,790 (±20)

Alle Daten sind Mittelwerte ± SEM. Die einzelnen Behandlungsgruppen unterscheiden sich nicht signifikant bezüglich der Gesamtzahl PVI, der Fläche, des Volumens und der Interneuronendichte im ventralen Hippocampus (Abkürzungen: EE: Ethanol/Ethanol, ES: Ethanol/Saline, SE: Saline/Ethanol, SS: Saline/Saline, KE: Kontrolle/Ethanol, KS: Kontrolle/Saline; alle Behandlungsgruppen: n = 5).

3.2.3 Auswertung der Nissl-Färbung

Die qualitative Auswertung der Nissl-gefärbten Hirnschnitte zeigte keinen Unterschied zwischen den Behandlungsgruppen hinsichtlich der Grobmorphologie im anterioren und posterioren PFC, NAC, in der Amygdala, im dorsalen und ventralen Hippocampus sowie in dem VTA. Weder die neonatale noch die chronische Ethanolbehandlung während der Pubertät hatte einen Effekt auf die Zellzahl und Zelldichte der untersuchten Hirnregionen nach einer Nissl-Färbung (Daten nicht gezeigt).

4. Diskussion

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war die Untersuchung der Effekte einer frühen ethanol-bedingten Entwicklungsstörung in Kombination mit einer pubertären chronischen Ethanolbehandlung auf perzeptuelle, emotionale und kognitive Verhaltensleistungen der Ratte. Untersucht wurden die sensomotorische Integrationsleistung, explorative und motorische Verhaltensweisen, das Wiedererkennen von Objekten sowie das motivationale und angstassoziierte Verhalten der Ratte. Darüber hinaus wurden bestimmte Hirnregionen histologisch untersucht. Zum einen wurde der Myelinisierungsgrad, zum anderen die Anzahl und Dichte Parvalbumin-immunreaktiver Interneuronen überprüft.

4.1 Verhaltenstests

4.1.1 PPI und ASR

Die ASR ist eine natürliche, universell auftretende Abwehr- und Schutzreaktion auf plötzlich auftretende, intensive akustische Reize. Diese motorische Antwort kann durch die Präsentation eines schwächeren Präpulses, der selbst keine Schreckreaktion auslösen kann, moduliert werden. Dieses Phänomen wird als PPI bezeichnet und ist ein operationales Mass für die sensomotorische Reaktionsunterdrückung, welche die Verarbeitung relevanter, bedeutender Stimuli bei paralleler Filterung von ablenkenden, irrelevanten Stimuli gewährleisten und vor der Überladung mit Reizen schützen soll (Koch, 1999).

Die neonatale Ethanolbehandlung an PD7 hatte weder bei juvenilen noch bei adulten Tieren einen Effekt auf die ASR und PPI. Die vorliegenden Ergebnisse unterstützen die Befunde, dass die Ethanolbehandlung während der pränatalen (Potter et al., 1987) und neonatalen Entwicklungsphase (Woolfrey et al., 2005) keinen Einfluss auf die PPI in juvenilen und adulten Ratten hatte. In der vorliegenden Untersuchung wurde den neonatalen Ratten an PD7 5 g/kg einer 20%igen Ethanollösung IP verabreicht, wohingegen Woolfrey et al. (2005) den neonatalen Ratten von PD5 bis PD9 täglich 5,25 g/kg einer 12%igen Ethanollösung mittels einer Schlundsonde verabreichten. In der Studie von Potter et al. (1987) konsumierten die trächtigen Weibchen vom ersten Schwangerschaftstag an bis zur Geburt 12,36 g/kg/Tag einer 20%igen Ethanollösung, die über einen Flüssigkeitsspender

verabreicht wurde. Weder die Applikationsart und -dosis noch der Zeitraum der Verabreichung hat anscheinend einen Einfluss auf die PPI in juvenilen und adulten Ratten. Obwohl Ethanol aufgrund seiner Beschaffenheit eine omnipotente, toxische Wirkung im Gehirn ausübt (siehe 1.1.3.1), scheinen die Hirnstrukturen, Neurotransmitter und -peptide, die massgeblich an der Vermittlung der PPI beteiligt sind (Koch und Fendt, 2003), nicht in ausreichender Stärke so beeinflusst worden zu sein, um eine Veränderung in der PPI von juvenilen und adulten Ratten hervorzurufen.

Zudem unterstützen meine Ergebnisse die Befunde von Woolfrey et al. (2005) hinsichtlich einer unveränderten ASR in juvenilen und adulten Ratten nach einer neonatalen Ethanolbehandlung. Dagegen beobachteten Potter et al. (1987) eine Zunahme der ASR in juvenilen Ratten nach einer pränatalen Ethanolbehandlung. Diese unterschiedlichen Ergebnisse bezüglich der ASR könnten darauf hinweisen, dass die der ASR zugrundeliegenden neuronalen Schaltkreise vulnerabler gegenüber einer pränatalen Ethanolbehandlung im Vergleich zu einer neonatalen Ethanolbehandlung sind (Woolfrey et al., 2005).

In der vorliegenden Studie hatte die pubertäre chronische Ethanolbehandlung keinen Einfluss auf die PPI in adulten Ratten. Vergleichbare Ergebnisse wurden auch in anderen Studien erzielt. Sandbak et al. (2000) zeigten, dass die PPI adulter Ratten nach einer chronischen Ethanolbehandlung über 16 Tage (in einer Dosis von 3 bis 6 g/kg/Tag) nicht verändert war. Brunell et al. (2006) beobachteten, dass die akute Ethanolapplikation in adoleszenten Ratten ebenfalls keine Veränderung der PPI bewirkte. Im Gegensatz dazu existiert eine ganze Reihe von Untersuchungen, die zeigen, dass Ethanol Einfluss auf die PPI nehmen kann. Zum Beispiel hat die akute Ethanolapplikation oder –aufnahme eine Reduktion der PPI in Menschen (Hutchinson et al., 2003) und Ratten zur Folge (Jones et al., 2000). Zudem berichteten Rassnick et al. (1992) über eine reduzierte PPI während der akuten Phase des Ethanolentzugs in Ratten. Dagegen gibt es nach Sichtung der relevanten Literatur nur wenige Studien, die den Einfluss einer chronischen Ethanolbehandlung während der Adoleszenz auf die PPI untersuchten. Im Gegensatz zu den Ergebnissen der vorliegenden Studie berichteten z.B. Slawecki und Ehlers (2005) über eine erhöhte PPI nach einer chronischen Ethanolbehandlung während der Adoleszenz. Dabei verabreichten sie den Ratten über 14 Tage eine Ethanoldosis, die zu einer mittleren Blutethanolkonzentration von ca. 250 mg/dl

(entspricht ca. 2 Promille) führte und deutlich über der Blutethanolkonzentration lag, die in der vorliegenden Studie erzielt wurde (siehe unten). Ein möglicher Grund für die unterschiedlichen Ergebnisse könnten methodische Differenzen sein. Die gegensätzlichen Befunde könnten demnach auf die unterschiedlichen Ethanolbehandlungen zurückzuführen sein. Während in der vorliegenden Studie die Tiere über einen Zeitraum von 25 Tagen 20 IP-Injektionen einer 20%igen Ethanollösung in einer Dosis von 1 g/kg verabreicht bekamen, wurden die adoleszenten Ratten in der Studie von Slawecki und Ehlers über einen Zeitraum von 14 Tagen mit einem hochdosierten Ethanoldampf bestäubt (82 bis 84 ml/Tag einer 95%igen Ethanollösung), welcher eine Blutethanolkonzentration von 225 bis 275 mg/dl (entspricht ca. 1,8 – 2,25 Promille) über die gesamten Zeitraum der Ethanolbehandlung zur Folge hatte. Obwohl die Blutethanolkonzentration der behandelten Tiere in der vorliegenden Studie nicht bestimmt wurde, konnte, mit Verweis auf die Studie von Livy et al. (2003), eine niedrigere Blutethanolkonzentration in der vorliegenden Studie angenommen werden. Livy et al. (2003) zeigten, dass die akute IP-Injektion einer 21%igen Ethanollösung in einer Dosis von 3,8 g/kg höchstens einen Wert von ca. 240 bis 250 mg/dl (nach ca. 100 bis 120 min) erreicht. Umgerechnet auf die in der vorliegenden Arbeit verwendete niedrigere Dosis von 1 g/kg führte dies zu einer Blutethanolkonzentration von ca. 60 bis 65 mg/dl (entspricht ca. 0,53 Promille), die in etwa einem Viertel der von Slawecki und Ehlers gemessenen Blutethanolkonzentration entspricht und folglich die unterschiedlichen Ergebnisse auf die unterschiedlichen Ethanoldosen, denen die Tiere ausgesetzt waren, zurückzuführen sind. Weitere Studien, die die Wirkung verschiedener chronischer Ethanolbehandlungen mit unterschiedlichen Ethanoldosen und -konzentrationen während der Adoleszenz auf die PPI untersuchen, könnten zeigen, ob höhere Ethanoldosen eine erhöhte PPI zur Folge haben.

Die vorliegende Arbeit zeigte zudem eine unveränderte ASR nach der pubertären chronischen Ethanolbehandlung. Dies steht in Diskrepanz zu einer ganzen Reihe von Studien, die über eine Reduktion der ASR nach einer akuten oder chronischen Ethanolapplikation oder –aufnahme im Menschen (Grillon et al., 1994; Grillon et al., 2000; Hutchison et al., 2003) und Ratten berichteten (z.B. Pohorecky et al., 1976; Rassnick et al., 1992; Slawecki und Ehlers, 2005; Brunell et al., 2006). Diese Abschwächung in der ASR wird den sedativen und anxiolytischen

Eigenschaften von Ethanol zugeschrieben (Jones et al., 2000; Slawecki und Ehlers, 2005; Brunell et al., 2006). Das Ergebnis einer unveränderten ASR nach der chronischen Ethanolbehandlung in dieser Studie könnte ebenfalls an den unterschiedlich verwendeten Ethanoldosen und den damit erzielten Blutethanolkonzentration der Tiere liegen. Demnach könnte es sein, dass die in dieser Studie verabreichte Ethanoldosis und -menge nicht ausreichte, um eine Reduktion in der ASR auszulösen.

4.1.2 *Open field*-Test

Die Konfrontation mit einer neuen unbekannten Umgebung induziert spontan auftretende, instinktive Verhaltenweisen, die zum Explorationsverhalten gezählt werden. Neben der horizontalen ambulatorischen Aktivität beinhaltet die lokomotorische Aktivität auch die vertikale Aktivität (das Aufrichten), die der besseren Orientierung und Exploration der Umgebung dient (Skinner und Garcia-Rill, 1993). Die lokomotorische Aktivität wird durch einen komplexen Schaltkreis reguliert, in dem der NAC als Relay-Station zwischen den limbischen-cortikalen Strukturen, die äussere und innere motivierende Informationen zu zielgerichteten Verhalten generieren, und den motorischen Strukturen, die an der Bewegungsausführung beteiligt sind, fungiert (Mogenson et al., 1993).

Neben der Auswertung der Gesamtaktivität und der zurückgelegten Strecke als Maß für die horizontale und der Anzahl der Aufrichtungen als Indikator der vertikalen Aktivität, wurde noch der Aufenthalt in der Mitte des *open field* als eine weitere explorative Verhaltensweise ausgewertet. Ratten besitzen von Natur aus eine Aversion gegenüber ungeschützten, offenen Bereichen und halten sich bevorzugt in Randbereichen auf. Diese Randbereiche werden im *open field* durch die Wände repräsentiert und bieten den Ratten Schutz, wohingegen dessen Zentrum einen ungeschützten Bereich darstellt, den die Ratten meiden. Die Erkundung des Zentrums des *open field* kann deshalb als Indikator für ein reduziertes Angstverhalten der Ratte gedeutet werden (Kliethermes, 2005).

Die neonatale Ethanolbehandlung hatte keinen Einfluss auf die horizontale Aktivität juveniler und adulter Ratten gemessen im *open field*. Dagegen reduzierte die neonatale Ethanolbehandlung die vertikale Aktivität (operationalisiert über die Messung der Anzahl der Aufrichtungen) adulter Ratten im Gegensatz zu juvenilen Ratten. Die pubertäre chronische Ethanolbehandlung vermindert sowohl die

horizontale als auch die vertikale Aktivität adulter Ratten. Das im *open field* gemessene Angstverhalten war nach der pubertären chronischen Ethanolgabe hingegen nicht verändert.

Hinweise aus der relevanten Literatur zur Wirkung der prä- und neonatalen Ethanolexposition auf das lokomotorische Verhalten juveniler und adulter Tiere zeigen recht uneinheitliche Befunde. So zeigen die Ergebnisse nicht nur Unterschiede innerhalb der juvenilen und adulten Tiere, sondern auch zwischen den beiden Entwicklungsphasen. Einige Studien zeigten nach pränataler Ethanolgabe reduzierte lokomotorische Verhaltensweisen juveniler (Kunko et al., 1996) und adulter Tiere (Abel, 1979), unveränderte lokomotorische Aktivität adulter Tiere (Mothes et al., 1996; Randall und Hannigan, 1999; Byrnes et al., 2001) und gesteigertes exploratives Verhalten in adulten Tieren (Butters et al., 2000; Tran et al., 2000). Untersuchungen, die neonatale Ethanolbehandlungen durchführten, zeigten einerseits erhöhtes lokomotorisches Verhalten juveniler (Riley et al., 1993; Gilbertson und Barron, 2005) und adulter Tiere (Melcer et al., 1995; Tran et al., 2000), andererseits keinen Effekt auf die lokomotorische Aktivität adoleszenter (Sonderegger et al., 1982; Hansen-Trench und Barron, 2005) und adulter Tiere (Tran et al., 2000; Hansen-Trench und Barron, 2005).

Die neonatale Ethanolapplikation verminderte im Gegensatz zu juvenilen Ratten die Anzahl der Aufrichtungen adulter Ratten. Möglicherweise finden in der Adoleszenz Veränderungen auf der Ebene der neuronalen Systeme statt, die an der Regulation der vertikalen Aktivität beteiligt sind. Speziell die Pubertät stellt eine kritische Entwicklungsphase dar, welche extrem von hormonellen Veränderungen, Umstrukturierungen von verschiedenen Hirnregionen und der Beendigung von Reifungsprozessen (z.B. der Neurotransmittersysteme, Myelinisierung) geprägt ist (Thompson et al., 2000; Levitt, 2003; Sisk und Foster, 2004; Graaf-Peters und Hadders-Algra, 2006). Diese einschneidenden Ereignisse während des Übergangs von der Adoleszenz zum Erwachsenenstadium könnten dafür verantwortlich sein, dass die neuronalen Netzwerke und Transmittersysteme, welche die vertikale Aktivität regulieren, gegenüber einer Ethanolapplikation im adulten Stadium eine gesteigerte Vulnerabilität entwickeln, die sich letztlich in einem reduziertem Aufrichtverhalten widerspiegeln.

Studien zur chronischen Ethanolbehandlung adoleszenter und adulter Tiere und deren Konsequenzen für die lokomotorische Aktivität im adulten Tier lieferten

unterschiedliche Befunde. Es wurde von gesteigertem explorativen Verhalten adulter Ratten berichtet, die über einen Zeitraum von 80 Tagen Ethanol verabreicht bekamen (Rasmussen et al., 2001). Dagegen zeigten verschiedene Untersuchungen verminderte lokomotorische Verhaltensweisen in Ratten, die über einem Zeitraum von 12-14 Tagen (Slawecki et al., 2004), 49 Tagen (Capaz et al., 1981) und 140 Tagen (Waller et al., 1982), sowie in Mäusen, die über 21 Tagen (Manley und Little, 1997) Ethanol verabreicht bekamen. Zudem wurde auch unverändertes lokomotorisches Verhalten nach einer chronischen Ethanolbehandlung beobachtet (Slawecki et al, 2001; Sahr et al., 2004). Erwähnenswert ist die interessante Tatsache, dass akut verabreichtes Ethanol in Mäusen und Ratten zu komplexen dosisabhängigen biphasischen Effekten über die Zeit führt. So wurde berichtet, dass Ethanol in kleiner Dosis verabreicht als psychomotorisches Stimulanz in Mäusen wirkt (Chuck et al., 2006), in mittleren und hohen Dosen jedoch die motorische Aktivität der Mäuse und Ratten beeinträchtigt und Sedation auslösen kann (Correa et al., 2003; Rezvani und Levin, 2004).

Ein möglicher Ansatzpunkt für die verminderte lokomotorische Aktivität adulter Ratten nach einer pubertären chronischen Ethanolbehandlung könnten veränderte neuronale Strukturen oder Mechanismen sein, die an der Vermittlung und Regulation der lokomotorischen Aktivität beteiligt sind. Die kontinuierliche Verabreichung von Ethanol während einer kritischen Entwicklungsphase wie der Pubertät könnte zu einer Dysfunktion des cortiko-limbischen-striato-pallido-pedunculopontinen Netzwerkes führen, welches in der Regulation des explorativen und motorischen Verhalten massgeblich involviert ist. Wo genau Ethanol in diesem komplexen System seine Wirkung ausübt, bleibt aufgrund seiner Beschaffenheit, Struktur und seiner omnipotenten Wirkung auf fast alle an diesem Netzwerk beteiligten neurobiologischen Substrate und Neurotransmittersysteme unklar.

Der Befund einer gestörten Myelinisierung im VTA und im PFC nach einer neonatalen und pubertären Ethanolexposition aus der vorliegenden Studie (siehe 4.1.2) bietet möglicherweise einen Erklärungsansatz für die reduzierten lokomotorischen Verhaltensweisen adulter Ratten nach der pubertären chronischen Ethanolgabe. Das VTA und der PFC haben als Komponenten des cortiko-limbischen-striato-pallido-pedunculopontinen Netzwerkes einen modulierenden Einfluss auf die lokomotorische Aktivität. Diesen Einfluss üben sie über dopaminerge und glutamaterge Projektionen auf andere Hirnareale innerhalb dieses Schaltkreises aus

(siehe 1.4.2). Strukturelle Veränderungen im VTA und PFC können zu einer Dysbalance der dopaminergen und glutamatergen Neurotransmission innerhalb des Netzwerkes führen. Spekulativ könnte das mesolimbische Dopaminsystem, ausgehend vom VTA, durch die chronische Ethanolexposition während der Pubertät beeinträchtigt worden sein, und zwar in der Weise, dass die dopaminerge Kommunikation mit dem NAC, PFC, Hippocampus, der Amygdala und dem ventralen Pallidum durch eine erhöhte dopaminerge Neurotransmission verstärkt wird. Die Veränderungen in der Myelinisierung des VTA und PFC nach einer neonatalen und pubertären chronischen Ethanolexposition könnten die Leitungsgeschwindigkeiten der relevanten Axone im PFC und dem VTA beeinträchtigen und somit eine störungsfreie Kommunikation zwischen den Neuronen verhindern. Die Folge ist ein gestörtes Timing der Informationsübertragung zwischen den Hirnregionen, die an der Vermittlung des explorativen und motorischen Verhalten massgeblich beteiligt sind, die sich in einer verminderten lokomotorischen Aktivität adulter Ratten äussert.

Die reduzierte lokomotorische Aktivität nach der pubertären chronischen Ethanolgabe könnte, neben den strukturellen Störungen im cortiko-limbischen-striato-pallido-pedunculopontinen Netzwerk, auch auf eine erhöhte Empfindlichkeit des juvenilen mesolimbischen Dopaminsystems zurückzuführen sein.

Tatsächlich gibt es Hinweise aus früheren Studien, die belegen, dass das mesolimbische Dopaminsystem während der Adoleszenz und speziell in der Pubertät einer prominenten Reorganisation unterliegt und seinen Reifungsprozess beendet. Zudem unterläuft das mesolimbische Dopaminsystem eine Reihe weiterer Veränderungen auf Transmitter- und Rezeptorebene, so dass die Adoleszenz letztlich eine kritische Entwicklungsphase für das dopaminerge System darstellt (Sahr et al., 2004). Vom mesolimbischen Dopaminsystem wird angenommen, dass es an der Regulation von Belohnung und Verstärkung beteiligt ist. Zudem weiss man, dass verschiedene Substanzen das mesolimbische System beeinflussen, darunter auch Ethanol (Koob, 1992; Samson et al., 1992). Ausserdem ist bekannt, dass Ethanol das mesolimbische Dopaminsystem auf verschiedenste Weise aktiviert. Ethanol erhöht u.a. die Feuerrate mesolimbischer, dopaminerger Neurone und führt zu einer erhöhten Ausschüttung von Dopamin aus dem NAC und VTA (z.B. Di Chiara, 1988; Brodie et al., 1990; Di Chiara, 1997). Berücksichtigt man die Tatsache, dass sich das mesolimbische Dopaminsystem bis weit in die Adoleszenz entwickelt und dass Ethanol diesen Schaltkreis auf unterschiedlicher Ebene beeinflussen kann,

so legt es die Vermutung nahe, dass das unreife mesolimbische Dopaminsystem eine erhöhte Vulnerabilität gegenüber einer chronischen, zwangsweisen Aktivierung durch Ethanol entwickelt, die zu langfristigen neurobiologischen und verhaltensrelevanten Störungen führt, die sich wiederum in einem reduzierten explorativen und motorischen Verhalten manifestiert.

4.1.3 *Progressive ratio*-Test und Futterpräferenz-Test

Zur Operationalisierung der relativen Stärke oder des Wertes einer Belohnung wurde der PR-Test entwickelt (Hodos, 1961). In diesem Test steigt die instrumentelle Anforderung an das Tier, um eine konstante Belohnung zu erlangen, innerhalb festgelegter Kriterien linear oder progressiv an. Diejenige Phase, in der das Versuchstier die geforderte Leistung nicht mehr erbringt, wird als *break point* bezeichnet und wurde einerseits als Maß für die relative Stärke der Belohnung, unabhängig vom motivationalen Zustandes des Tieres (Hodos und Kalman, 1963; Cheeta et al., 1995; Reilley, 1999), andererseits als Maß für die Motivation des Tieres zur Erlangung der Belohnung definiert (Salamone, 2006).

Die Interpretation des *break point* ist nicht unproblematisch, da die Bestimmung des *break point* von einer Vielzahl von Parametern beeinflusst wird, die von motivationaler und nicht-motivationaler Natur sein können (Aberman et al., 1998). Ein motivationaler Faktor, der den *break point* beeinflusst, ist z.B. der Sättigungsgrad der Ratte. Bei hungrigen Ratten ist die Bereitschaft, für eine zunehmende Belohnung zu arbeiten, verstärkt, d.h. hungrige Ratten haben einen höheren *break point* (Reilly, 1999). Unter den nicht-motivationalen Faktoren, die den *break point* beeinflussen, fallen z.B. motorische Störungen, die Hebelhöhe und der Kraftaufwand, der für den Hebeldruck erforderlich ist, um eine Belohnung zu erhalten. Auch spielen Faktoren wie Extinktionsprozesse und aversives Frustempfinden beim Ausbleiben der Belohnung eine wichtige Rolle. Zusätzlich existieren unterschiedliche Auffassungen hinsichtlich der Definitionskriterien des *break points* sowie bei der Durchführung der PR-Aufgabe (Stafford und Branch, 1998; Stewart, 1975). In der vorliegenden Arbeit wird diejenige Phase als *break point* bezeichnet, in der die Ratte innerhalb eines bestimmten Zeitfensters die erforderte Leistung nicht mehr erbringt, d.h. dass die Ratten in dieser PR-Aufgabe ihre Leistung zur Erlangung der Belohnung innerhalb eines vorgegebenen Zeitlimits erbringen müssen. Dagegen bezeichnen verschiedene Studien den break point als den

Zeitpunkt, an dem das Versuchstier über einen bestimmten Zeitraum, z.B. 5 min, inaktiv ist, d.h. dass innerhalb dieses Zeitraumes keine operante Handlung (Drücken des Hebels) des Tieres zur Erlangung der Belohnung stattfindet. Auch gibt es unterschiedliche Anforderungen bei der Durchführung des PR-Tests. In der vorliegenden Arbeit wurde eine linear ansteigende instrumentelle Anforderung an die Ratte gestellt, wohingegen andere Studien eine exponentielle Steigerung der operanten Anforderung verwenden (Mobini et al., 2000).

Es wurden zwei PR-Aufgaben durchgeführt, die sich lediglich in ihrer linearen instrumentellen Anforderung unterscheiden. Bei der PR1-Aufgabe erhöhte sich die instrumentelle Anforderung zur Erlangung des Kaseinpellets um jeweils 1 Hebeldruck, d.h. in der ersten Phase mussten sie einmal drücken, um das Kaseinpellet zu erhalten, in der zweiten Phase zweimal, usw. In der PR3-Aufgabe erhöhte sich die instrumentelle Anforderung an die Ratte progressiv. In diesem PR-Test mussten die Ratten in der ersten Phase dreimal den Hebel drücken, um die Belohnung zu erhalten, in der zweiten Phase sechsmal, usw. Die PR1 und PR3-Tests wurden durchgeführt, um zu überprüfen, ob die neonatale und/oder pubertäre chronische Ethanolbehandlung einen unterschiedlichen Effekt auf verschiedene instrumentelle Anforderungen haben.

Weder die neonatale Ethanolbehandlung noch die chronische Ethanolbehandlung veränderte den *break point* in der PR1- und PR3-Aufgabe. Dagegen führte die kombinierte neonatale und pubertäre chronische Ethanolbehandlung zu einer Erhöhung des *break point* in der PR3-Aufgabe adulter Ratten, nicht jedoch in der PR1-Aufgabe. Diese Versuchstiere zeigten in der PR3-Aufgabe eine erhöhte Bereitschaft, bei ansteigender instrumenteller Anforderung für eine Belohnung zu arbeiten.

Nur wenige Studien beschäftigten sich mit dem Einfluss der prä- und neonatalen Ethanolexposition auf operantes und motivationales Verhalten adulter Tiere. Diese Untersuchungen zeigten, dass die Ethanolexposition keinen bzw. nur minimalen Einfluss auf das instrumentelle Verhalten adulter Tiere hatte (Segar et al., 1999), so dass die Ergebnisse der vorliegenden Studie mit diesen Befunden im Einklang stehen.

Es existieren auch nur einige wenige Studien, die sich mit einer adoleszenten und adulten chronischen Ethanolbehandlung und deren Auswirkung auf operantes Verhalten in Ratten auseinandergesetzt haben (z.B. Denoble und Begleiter, 1979;

Siciliano und Smith, 2001). Beide Studien zeigen eine Beeinträchtigung des instrumentellen Verhaltens nach längerer Ethanolexposition. Jedoch gibt es eine ganze Reihe von Untersuchungen, die nach akuter Ethanolexposition ein erhöhtes (z.B. Barrett und Stanley, 1980; Tomie et al., 1998) oder reduziertes operantes Verhalten in adulten Tieren beobachten konnten (z.B. Middaugh et al., 1992; Petry, 1998; Popke et al., 2000). Somit reiht sich das Ergebnis der vorliegenden Studie, dass die pubertäre Ethanolbehandlung keinen Einfluss auf das operante und motivationale Verhalten adulter Ratten hat, in die uneinheitlichen Ergebnisse früherer Untersuchungen ein.

Für die Interpretation des Ergebnisses eines höheren *break point* in der PR3-Aufgabe nach einer kombinierten neonatalen und pubertären chronischen Ethanolbehandlung gibt es mehrere Ansatzpunkte.

Der höhere *break point* könnte auf eine höhere motorische Aktivität der Versuchstiere zurückzuführen sein. Da jedoch im *open field* (siehe 4.2.4) sogar eine signifikante Reduktion in der lokomotorischen Aktivität nach neonataler und chronischer Ethanolbehandlung zu beobachten war, kann eine veränderte motorische Aktivität nicht für den erhöhten *break point* verantwortlich sein.

Eine erhöhte Präferenz für die Kaseinpellets könnte ebenfalls zu einem höheren *break point* nach einer Doppelbehandlung mit Ethanol führen. Nach Cheeta et al. (1995) und Hodos (1961) stellt der *break point* ein Maß für die relative Stärke oder den Wert einer Belohnung dar, unabhängig vom motivationalen Zustand des Tieres. Eine Erhöhung des *break point* würde nach dieser Definition auf ein erhöhtes Belohnungsempfinden gegenüber den Kaseinpellets beruhen. Es konnten aber keine Unterschiede zwischen den Behandlungsgruppen hinsichtlich der Futterpräferenz und dem Gesamtfutterkonsum beobachtet werden. Die empfundene Belohnungsstärke und damit der hedonische Wert der Belohnung hat sich nach der neonatalen und pubertären chronischen Ethanolbehandlung nicht verändert.

Eine erhöhter *break point* könnte auch in einer veränderten Motivation des Tieres zu sehen sein (Alderson et al., 2002; Salamone, 2006). Dieser höhere *break point* ist möglicherweise das Resultat einer Kosten-Nutzen-Analyse, in der das Versuchstier die relative Stärke der Belohnung mit der geforderten instrumentellen Anforderung verglichen hat. Ausgehend von der unveränderten Belohnungsstärke der Kaseinpellets und dem gleichbleibenden Belohnungsempfinden, könnte die Bereitschaft erhöht worden sein, für diese Belohnung die erforderte Leistung zu

erbringen. Demnach hat die kombinierte neonatale und pubertäre chronische Ethanolexposition dazu geführt, dass die Motivation des Versuchstieres gestiegen ist, für diese Belohnung zu arbeiten.

Wenn man die vorliegenden Ergebnisse mit den heutigen Theorien über die neurobiologische Natur von Motivation und Belohnung vergleicht, dann könnte man schlussfolgern, dass die kombinierte neonatale und pubertäre chronische Ethanolexposition nicht das *liking*, d.h. die hedonische Reaktion auf eine Belohnung, sondern das *wanting*, also das zielgerichtete Verhalten, diese Belohnung zu erhalten, beeinflusst hat (Nader et al., 1997; Berridge und Robinson, 1998 und 2003). Dies kann eine Folge von Veränderungen in den Funktionsnetzwerken sein, die für die Übersetzung von Motivation in zielgerichtetes Verhalten verantwortlich und an der Vermittlung von motivationalen, belohnenden und verstärkenden Verhaltenweisen sowie an der Regulation des operanten Verhaltens während der PR-Aufgabe beteiligt sind. Das Funktionsnetzwerk umfasst Hirnstrukturen wie z.B. den NAC, präfrontale Hirnregionen und Strukturen aus dem Mesencephalon, wie z.B. den PPTg und das VTA und kommuniziert u.a. über die mesolimbischen und –cortikalen Dopaminsysteme miteinander. Verschiedene Studien liefern deutliche Hinweise auf eine aktivierende Funktion von Ethanol auf das mesolimbische Dopaminsystem (Koob, 1992; Samson et al., 1992). Ethanol erhöht z.B. die Feuerrate mesolimbischer Neurone, und steigert den extrazellulären Dopamingehalt des NAC (Di Chiara, 1997; Brodie et al., 1990). Vor allem ist eine gesteigerte Aktivität im mesolimbischen Dopaminsystem, welches seinen Ursprung im VTA hat, eng mit der Motivation, für eine Belohnung zu arbeiten, assoziiert (Berridge und Robinson, 1998). Zudem konnten Studien, die chronische Ethanolbehandlungen durchführten, langfristige Veränderungen des mesolimbischen Dopaminsystem dokumentieren (Brodie et al., 2002; Sahr et al., 2004). Brodie et al. (2002) zeigten, dass eine chronische Ethanolexposition bei Mäusen über 21 Tagen zu einer gesteigerten Sensitivität dopaminerger VTA Neuronen gegenüber einer akuten Ethanolapplikation im adulten Stadium führt, während Sahr et al. (2004) nach einer 40tätigen Ethanolexposition über eine erhöhte basale Dopaminneurotransmission sowie einen verlängerten Anstieg des extrazellulären Dopmingehalts nach einer akuten Ethanolgabe adulter Ratten berichteten.

Im Rahmen der vorliegenden Studie wurden verschiedene Hirnregionen des mesolimbischen Dopaminsystem histologisch untersucht. Die histologische

Auswertung des mPFC und des VTA zeigte Veränderungen in der Myelinisierung nach der neonatalen und pubertären chronischen Ethanolbehandlung (siehe 4.1.2). Diese Befunde unterstützen die Tatsache, dass es nach der neonatalen und pubertären chronischen Ethanolexposition zu strukturellen Veränderungen im VTA und mPFC und in der Folge zu einer gestörten mesolimbischen Dopamintransmission in den betreffenden Hirnarealen kommt. Diese Beeinträchtigung der neuronalen Schaltkreise, die an der Regulation von motivationalen, belohnenden und verstärkenden Verhaltensweisen beteiligt sind, führt möglicherweise zu einem erhöhtem operanten Verhalten, dass sich in einer Erhöhung des *break point* in der PR3-Aufgabe niederschlägt.

4.1.4 *Object recognition*-Test

Der OR-Test untersucht die Funktion des Kurzzeitgedächtnisses anhand des Wiedererkennens von Objekten. Dabei nimmt man an, dass dem Wiedererkennen von Objekten ein neuronaler Prozess zugrunde liegt, durch den sich das Versuchstier daran erinnert, einem ihm präsentierten Stimulus bereits zuvor schon einmal erfahren zu haben. Dieser Prozess des Wiederkennens beinhaltet, dass die charakteristischen Eigenschaften eines Stimulus wahrgenommen, identifiziert und mit einer bereits erfahrenen Erinnerung verglichen werden müssen (Steckler et al., 1998a).

Die an PD7 durchgeführte neonatale Ethanolbehandlung hatte keinen Effekt auf die Wiedererkennungsleistung adulter Ratten. Vergleichbare Ergebnisse erzielten auch Kim et al. (1997), die in ihrer Studie über keine Beeinträchtigung der Wiedererkennungsleistung adulter Ratten nach einer pränatalen Ethanolbehandlung berichteten. Diese Studie ist, meinem Wissen nach, neben der vorliegenden Studie die Einzige, die sich mit dem Wiederkennen von Objekten im adulten Tier nach einer pränatalen und neonatalen Ethanolbehandlung beschäftigt. Im Gegensatz dazu gibt es zahlreiche Studien, die den Einfluss prä- und neonataler Ethanolapplikation (akut und chronisch) auf das räumliche Gedächtnis untersucht und Beeinträchtigungen im räumlichen Gedächtnis adulter Tieren gefunden haben (z.B. Girard und Wainwright, 2002; Obernier et al., 2002; Silvers et al., 2003; Clements et al., 2005).

Für die Verarbeitung von räumlichen und nicht-räumlichen Gedächtnisprozessen werden zwei parallel existierende Gedächtnisnetzwerke angenommen. Die Hirnstrukturen, die an den räumlichen Gedächtnisprozessen beteiligt sein sollen, umfassen den Hippocampus, die Mammillarkörper, thalamische

Nuclei und der mPFC. Dagegen wird vom nicht-räumlichen, objektbezogenen Gedächtnis angenommen, dass es von verschiedenen temporalen Assoziationscortices, vom rhinalen Cortex, dem mediodorsalen Thalamus und verschiedenen präfrontalen Areale vermittelt wird (Steckler et al., 1998b). Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit und der Studie von Kim et al. (1997) könnten darauf hinweisen, dass die Systeme, die die räumlichen Gedächtnisprozesse vermitteln, vulnerabler gegenüber einer pränatalen oder neonatalen Ethanolbehandlung sind als die Hirnregionen, die an der Regulation des nicht-räumlichen, objektbezogenen Gedächtnisses beteiligt sind.

Zudem erweitern die Ergebnisse meiner Studie das Zeitfenster - hier von der pränatalen bis zur frühen postnatalen Phase - innerhalb dessen die Wiedererkennungsleistung von Objekten durch die Ethanolbehandlung nicht beeinträchtigt wird, trotz unterschiedlicher Ethanoldosen. Während Kim et al. (1997) den trächtigen weiblichen Ratten während der ganzen Schwangerschaft täglich ca. 11 g/kg (entspricht ca. 145 bis 155 mg/dl bzw. ca. 1,5 Promille) verabreichten, bekamen die Ratten in der vorliegenden Studie nur 1 g/kg/Tag (entspricht ca. 60 bis 65 mg/dl bzw. ca. 0,53 Promille). Allerdings ist es nicht auszuschliessen, dass eine höhere pränatal oder neonatal verabreichte Ethanoldosis zu einer Störung der Wiedererkennungsleistung adulter Ratten führen kann.

Die pubertäre chronische Ethanolbehandlung hatte keinen Einfluss auf die Wiederkennungsleistung adulter Ratten. Damit steht das Ergebnis der vorliegender Studie in Diskrepanz zu den Befunden andere Untersuchungen, die nach einer chronischen Ethanolbehandlung adulter Ratten (Garcia-Moreno et al., 2002), nach der Verabreichung unterschiedlicher Substanzen, wie z.B. Scopolamin, Physostigmin (Ennaceur und Meliani, 1992) und L-NAME (Coob et al., 1995), nach der Bestrahlung mit Mikrowellen (Mickley et al., 1994) sowie nach einer Läsionierung des mPFC (Schneider und Koch, 2006) eine reduzierte Wiedererkennungsleistung beobachteten. Es gibt verschiedene Ansätze, um die gegensätzlichen Ergebnisse von Garcia-Moreno et al. (2002) und der vorliegenden Studie zu erklären. Ein Ansatzpunkt wäre der Zeitpunkt der chronischen Ethanolapplikation. Mehrere Studien zeigten, dass sich die Effekte einer akuten und chronischen Ethanolapplikation während der Adoleszenz deutlich von den Effekten einer Ethanolbehandlung in der adulten Phase der Tiere hinsichtlich kognitiver Leistungen unterscheiden (White und Swartzwelder, 2004). Markwiese et al. (1998) zeigten,

dass sich adoleszente Ratten nach einer akuten Ethanolapplikation eine signifikant schlechtere räumliche Gedächtnisleistung im *Morris water maze* zeigten als adulte Ratten. Zusätzlich wurde auch über ein räumliches Arbeitsgedächtnisdefizit im *Morris water maze* nach einer adoleszenten chronischen Ethanolbehandlung berichtet (Silvers et al., 2003). White et al. (2000) beobachteten in ihrer Studie, dass die adoleszente chronische Ethanolbehandlung zu grösseren Arbeitsgedächtnisdefiziten im *eight-arm radial maze* nach einer akuten Ethanolgabe führte im Vergleich zu einer adulten chronischen Ethanolbehandlung. Auch zeigte sich nach eine kürzere Latenzzeit bis zum Einsetzen der Hypoaktivität während der Entzugsphase nach einer adoleszenten chronischen Ethanolbehandlung gegenüber einer adulten chronischen Ethanolgabe (Slawecki und Roth, 2004). Slawecki und Ehlers (2005) beobachteten eine erhöhte PPI der ASR nach einer adoleszenten chronischen Ethanolgabe im Vergleich zu der adulten chronischen Ethanolgabe. Des weiteren verabreichten Garcia-Moreno et al. (2002) in ihrer Studie in einem Doppelansatz den adulten Tieren über 70 bzw. 120 Tagen einer Ethanollösung mit steigender Konzentration (beginnend ab PD21 mit einer 2%igen Ethanollösung, die wöchentlich bis PD77 um 2% erhöht wurde. Danach wurde die Ethanolkonzentration auf 20% erhöht und bis zum OR-Test an PD90 bzw. PD180 aufrechterhalten) verabreichten. Die Ethanoldosis variierte über den ganzen Zeitraum von ca. 4 g/kg in der ersten Woche bis ca. 25 g/kg in der letzten Woche. Im Vergleich zu der in der vorliegenden Arbeit verwendeten Ethanoldosis von 1 g/kg, die in einem Zeitraum von 21 Tagen verabreicht wurden, verabreichten Garcia-Moreno et al. (2002) eine deutlich höhere Ethanoldosis, die zusätzlich noch über einen längeren Zeitraum verabreicht wurde. Dies kann ebenfalls für die unterschiedlichen Leistungen im OR-Test verantwortlich sein.

4.1.5 *Elevated plus maze*-Test

Der EPM-Test als Methode zur Untersuchung der angstassoziierten Verhaltensweisen von Ratten wurde als erstes von Pellow et al. (1985) validiert und basiert auf den Beobachtungen von Montgomery (1955), der zeigte, dass Ratten erhöhte und offene Gänge meiden und geschlossene Gänge bevorzugen. Aufgrund seiner Beobachtungen kam er zu dem Schluss, dass eine neue, unbekannte Umgebung aversiv auf die Ratte wirkt und einen Konflikt zwischen Angst- oder Explorationsverhalten auslöst. Somit gilt der EPM-Test als operationales Mass für

den Konflikt zwischen dem Explorationsverhalten und den angstassoziierten Verhaltensweisen.

Das EPM besteht aus zwei sich gegenüberliegenden offenen und geschlossenen Armen. Naive Tiere präferieren unter normalen Testbedingungen eindeutig die geschlossenen Arme und meiden die offenen Arme (Pellow et al., 1985; Rodgers, 1997; Rodgers und Dalvi, 1997; Rodgers et al., 1997). Anxiolytische sowie anxiogene Substanzen beeinflussen das explorative bzw. angstassoziierte Verhalten der Tiere im EPM (Pellow und File, 1986).

Ermittelt wurde die Aufenthaltsdauer in den offenen Armen und die Anzahl der Eintritte in die offenen und geschlossenen Arme. Die Aufenthaltsdauer und die Anzahl der Eintritte in die offenen Arme sind generell durch anxiolytische und anxiogene Substanzen beeinflussbar. Nach Gabe eines Anxiolytikum etwa ist eine längere Aufenthaltsdauer und eine erhöhte Anzahl von Eintritten in die offenen Arme zu beobachten, wohingegen nach Verabreichung eines anxiogenen Pharmaka die Aufenthaltsdauer verkürzt und die Anzahl der Eintritte in die offenen Arme reduziert ist (Rodgers und Dalvi, 1997). Die Gesamtanzahl der Eintritte in die geschlossenen und offenen Arme wird normalerweise nicht durch angstverändernde Substanzen beeinflusst und wird üblicherweise als Mass für die explorative Aktivität der Tiere verwendet (Kliethermes, 2005).

Nach der neonatalen Ethanolbehandlung hielten sich die Tiere signifikant länger in den offenen Armen auf als die Kontrolltiere. Hinsichtlich der Häufigkeit der Eintritte in die offenen Arme gab es keine signifikante Unterschiede zwischen den Behandlungsgruppen. Die Auswertung der Gesamteintritte der geschlossenen und offenen Arme zeigte ebenfalls keine behandlungsspezifischen Unterschiede.

Die erhöhte Aufenthaltsdauer in den offenen Armen deutet auf einen anxiolytischen Effekt der neonatalen Ethanolapplikation hin. Dieses Ergebnis unterstützt die Befunde anderer Studien, die ebenfalls eine erhöhte Aufenthaltsdauer und eine Zunahme in der Anzahl der Eintritte in die offenen Arme nach einer pränatalen Ethanolgabe berichteten (Osborn et al., 1998a; 1998b; Carneiro et al., 2005; Gabriel et al., 2006). Die Ergebnisse der vorliegenden Untersuchung erweitern die Bandbreite bestehender Befunde insofern, als dass die bisherigen Studien pränatale Ethanolbehandlungen durchführten, wohingegen die vorliegende Studie die Ethanolapplikation an neonatalen Ratten durchführte. Somit vergrössert sich das Zeitfenster von der pränatalen bis zur neonatalen Entwicklungsphase, in der eine

Ethanolbehandlung langfristig Einfluss nimmt auf die an der Regulation der angstvermittelnden und explorativen Verhaltensweisen beteiligten Strukturen sowie deren pharmakologischen Eigenschaften.

Durch die akute Verabreichung des anxiolytisch wirkenden Benzodiazepins Diazepam sollte überprüft werden, ob die neonatale Ethanolapplikation langfristig zu einer veränderten Wirksamkeit von Benzodiazepinen in adulten Ratten führte. Das Benzodiazepin Diazepam wirkt inhibitorisch als Agonist an der Benzodiazepin-Bindungsstelle des $GABA_A$-Rezeptors und führt zu einem erhöhtem Chlorid-Einstrom, der in einer Hyperpolarisation des Neuron endet. Eine veränderte anxiolytische Wirksamkeit der akuten Diazepamgabe könnte demnach auf eine veränderte GABAerge Neurotransmission nach der neonatalen Ethanolbehandlung hinweisen.

Die akute Diazepam-Injektion hatte keinen Einfluss auf das adulte Angstverhalten der neonatal mit Ethanol behandelten Ratten. Die Tatsache, dass sich neben der vorliegenden Arbeit nur eine weitere Untersuchung mit den Folgen einer Ethanolapplikation in der Frühentwicklung und einer späteren adulten Diazepamgabe beschäftigt (Osborn et al., 1998b), erschwert die Interpretation der vorliegenden Ergebnisse. Osborn et al. (1998b) fanden bei den Nachkommen pränatal mit Ethanol behandelten weiblichen Ratten einen erhöhten anxiolytischen Effekt nach der akuten Diazepam-Injektion. Ein möglicher Ansatzpunkt zur Klärung dieser Diskrepanz könnte der unterschiedliche Zeitpunkt der Ethanolapplikation sein, denn Osborn et al. verabreichen Ethanol pränatal, wohingegen in der aktuellen Studie Ethanol an PD7, also neonatal, verabreicht wurde. Dies könnte dazu geführt haben, dass sich möglicherweise die pharmakologischen Charakteristika der an dem EPM-Verhalten beteiligten Strukturen und Transmittersysteme unterschiedlich entwickelt haben und daraufhin nach einer akuten Diazepam-Injektion entgegengesetzte angst-assoziierte Verhaltensweisen abrufen.

Die kombinierte neonatale und pubertäre chronische Ethanolbehandlung dagegen führte zu einer signifikanten Reduktion der Aufenthaltsdauer in den offenen Armen im Vergleich zu den nur an PD7 mit Ethanol behandelten Tieren. Da sich jedoch die Aufenthaltsdauer der Tiere mit einer doppelten Ethanolexposition nicht signifikant von der Aufenthaltsdauer der Kontrolltiere unterscheidet, kann man nicht von einem „generellen“ anxiogenen Effekt der neonatalen und pubertären Ethanolbehandlung sprechen, sondern nur von einem „relativen“ anxiogenen Effekt,

der nur im Vergleich mit der pathologisch erhöhten Aufenthaltsdauer der neonatal mit Ethanol behandelten Tiere zu beobachten ist.

Die chronische Ethanolexposition während der Pubertät zeigte keine Veränderungen des Angstverhaltens im EPM-Test nach der akuten Saline-Injektion. Dagegen führte die akute Diazepam-Injektion bei pubertär chronisch mit Ethanol behandelten Ratten zu einer längeren Aufenthaltsdauer und zu einer gesteigerten Anzahl von Eintritten in die offenen Arme. Dieser anxiolytische Effekt war nach Verabreichung des Benzodiazepins bei den Ethanol behandelten Tieren stärker als bei den Kontrolltieren. Die akute Diazepam-Injektion hatte dagegen keinen stimulierenden Effekt auf die lokomotorische Aktivität der Ratten unterschiedlicher Behandlungsgruppen.

Anxiolytische Effekte von Ethanol und Diazepam, sowie deren Eigenschaft, anxiogen-wirkende Substanzen zu antagonisieren, wurden sowohl im Menschen als auch im Tier beschrieben (Boerngen-Lacerda und Souza-Formigoni, 2000; Langen et al., 2002; Wilson et al., 2004; Burghardt und Wilson, 2006). Ethanolabhängige Patienten berichteten zum Beispiel, dass sie Ethanol tranken, um ihre Angstzustände zu lindern. Klinische Studien beschreiben dieses Phänomen als eine Art Selbstmedikation der ethanolabhängigen Patienten, um die bei dem Ethanolentzug auftretenden Angstzustände entgegen zu wirken (Allan, 1995), die übrigens durch klinische Beobachtungen als obligat beschrieben werden (Kushner et al., 2000).

Eine grosse Anzahl von Tierstudien, die sich mit dem Entzugsverhalten nach einer chronischen Ethanolexposition über einem längerem Zeitraum beschäftigten, berichteten über ein gesteigertes Angstverhalten, das sich in einer reduzierten lokomotorischen Aktivität, verminderten Anzahl von Eintritten in die offene Arme und einer kürzeren Aufenthaltsdauer in den offenen Armen des EPM äussert. Die Zeitpunkte der EPM-Tests nach der letzten Ethanolexposition variieren dabei in den verschiedenen Studien von einigen Stunden bis einigen Wochen nach Absetzen der Ethanolbehandlung (Silvestre et al., 2002; Kliethermes, 2005). Zudem konnten einige Studien belegen, dass nach mehreren Wochen der Abstinenz keine anxiogenen Effekte mehr zu beobachten waren (Lal et al., 1991; Valdez et al., 2003). In der vorliegenden Studie lagen zwischen der letzten Ethanolapplikation und dem EPM-Test mindestens 30 Tage und es wurden weder anxiogene noch anxiolytische Effekte nach der pubertären chronischen Ethanolexposition beobachtet. Diese Befunde werden auch von den Ergebnissen von White et al. (2000) unterstützt, die

ebenfalls nach einer chronischen Ethanolbehandlung während der Adoleszenz keine anxiogenen und anxiolytischen Effekte fanden.

Die akute Diazepam-Injektion löste in den pubertär chronisch mit Ethanol behandelten Tiere grössere anxiolytische Effekte aus als in den Kontrolltieren, die sich in einem längerem Aufenthalt in den offenen Armen sowie einer gesteigerten Anzahl der Eintritte in die offenen Arme widerspiegeln. Dabei hatte die Diazepamgabe keinen Einfluss auf die lokomotorische Aktivität dieser Tiere.

Die grössere anxiolytische Wirkung der akuten Diazepam-Injektion bei den Ratten, die während der Pubertät eine chronischen Ethanolbehandlung erhielten, könnte möglicherweise auf eine gesteigerte Sensitivierung des GABAergen Systems zurückzuführen sein.

GABA ist der primäre inhibitorische Neurotransmitter im ZNS adulter Säuger (Farrant und Nusser, 2005). Seine hemmende Wirkung wird über den ubiquitär vorkommenden $GABA_A$-Rezeptor (GABAR) vermittelt. Der GABAR setzt sich aus 5 Polypeptid-Untereinheiten zusammen, die zu einem Pentamer angeordnet sind und im Zentrum einen Chlorid-Kanal formen. Bindet GABA an diesen GABAR, erhöht sich die Öffnungswahrscheinlichkeit des Chlorid-Kanals, welches zu einem erhöhten Chlorid-Einstrom führt, der letztlich die Nervenzelle hyperpolarisiert und die Wahrscheinlichkeit des Neurons reduziert, ein Aktionspotential zu generieren (Farrant und Nusser, 2005). Bis dato wurden 17-20 GABAR-Untereinheiten identifiziert (α1-6, β1-4, γ1-3, ρ1-3 und δ, ε, θ, π), von denen, dem heutigen Wissensstand nach, mindestens ein Mitglied der α, β und γ Untereinheiten den natürlichen GABAR-Komplex bilden. Diese hohe Anzahl von Untereinheiten führt zu einer erheblichen Heterogenität unter den GABAR-Komplexen im ZNS der Säuger (Liberzon et al., 2003; Follesa et al., 2005; Wafford, 2005).

Eine ganze Reihe von Verbindungen und Substanzen können an diesen GABAR binden und dessen Aktivität modulieren, darunter u.a. Ethanol, Barbiturate, Steroide, Picrotoxin und Benzodiazepine (Liberzon, 2003). Bislang wurde nur für die Benzodiazepine eine spezifische Bindungsstelle beschrieben, über welche die Substanzen ihre modulatorische Wirkung auf den GABAR ausüben. Alle anderen Substanzen, wie z.B. Ethanol, modulieren die GABAerge Neurotransmission über Non-Benzodiazepin-Bindungsstellen.

Ethanol verstärkt den GABA-vermittelten Chlorid-Einstrom in die Nervenzelle, was zu einer Hyperpolarisation und Hemmung von Aktionspotentialen führt, und,

abhängig natürlich von der Ethanolkonzentration und -dosis, seine anxiolytische und sedative Wirkung im ZNS bewirkt (Grobin et al, 1998; Grobin et al., 2000a; Follesa et al., 2005). Die Folgen einer chronischen Ethanolexposition auf die GABAR-Funktion und -Expression sind sehr gut untersucht. Viele Studien berichteten, dass chronisch verabreichtes Ethanol seine Wirkung auf die GABAerge Neurotransmission nicht über eine Veränderung der Anzahl von GABAR erzielt, sondern über die Veränderungen der Stöchiometrie der GABAR-Untereinheiten auf mRNA- und Proteinebene (Grobin et al, 1998; Grobin et al., 2000b). So konnte gezeigt werden, dass nach einer chronische Ethanolbehandlung u.a. die Expression der α1 und α2 Untereinheiten vermindert war bei einer parallelen Erhöhung der Expression der α4, α6, β1, β2, β3, γ1 und γ2 Untereinheiten (z.B. Grobin et al, 1998; Cagetti et al., 2003; Liang et al., 2004; Follesa et al., 2005; Mehta und Ticku, 2005). Darüber hinaus wurde beobachtet, dass die chronische Ethanolexposition zusätzlich hirnregionsspezifische Veränderungen in der Expression GABAR-Untereinheiten auslöst, d.h. dass zum Beispiel nach einer chronischen Ethanolexposition die Expression der α1 Untereinheit im PFC reduziert, im Hypothalamus dagegen erhöht ist (Grobin et al., 2000).

Ethanol führt auch zu Veränderungen in den GABAR-Untereinheiten, die als spezifische Bindungsstelle für Benzodiazepine dienen (z.B. Charlton et al., 1997; Mehta und Ticku, 2005; Sheela Rani und Ticku, 2006). Damit Benzodiazepine ihre positive allosterische Modulation am GABAR ausüben können, müssen eine γ2 Untereinheit sowie angrenzend α1-3 oder α5 Untereinheiten präsent sein (z.B. McKernan et al., 2000; Tecott, 2000; Morris et al., 2006). Veränderungen in der Expression dieser Untereinheiten durch eine chronische Ethanolexposition könnten eventuell dazu führen, dass sich die Affinität der Bindungsstelle am GABAR für Benzodiazepine ändert und dementsprechend eine veränderte pharmakologische Wirkweise zur Folge hat. Das könnte möglicherweise erklären, warum sich die Tiere im EPM-Test nach der pubertären chronischen Ethanolbehandlung und der akuten Diazepam-Injektion länger in den offenen Armen aufhielten und eine gesteigerte Anzahl von Eintritten in die offenen Arme aufwiesen als die Kontrolltiere. Die chronische Ethanolexposition während der Adoleszenz steigerte also die generelle anxiolytische Wirkung von Diazepam adulter Ratten, möglicherweise über eine Veränderung der Affinität des GABAR für Benzodiazepine.

4.2 Histologie

4.2.1 Myelinisierung

Für die saltatorische Reizweiterleitung der Aktionspotentiale entlang der Axone und zur Stabilisierung der Axone im ZNS spielt Myelin eine sehr wichtige Rolle. Die Myelinscheiden, die die Axone umgeben, werden im ZNS von den Oligodendrozyten gebildet (Wiggins, 1986; Baumann und Pham-Dinh, 2001) und sorgen für eine effiziente und schnelle, und damit möglichst störungsfreie Kommunikation zwischen den Nervenzellen. Oligodendrozyten bilden sich kurz nach der Neurogenese und ihre Differenzierung folgt dem Entwicklungsmuster der Axiogenese, wobei die Differenzierung über komplexe trophische Signale zwischen den Oligodendrozyten und den sie umgebenden Neuronen induziert und gesteuert wird. Der Höhepunkt der Myelinbildung findet bei der Ratte um die zweite Woche nach der Geburt statt. Die Reifungsprozesse dauern, sowohl bei den Nagern als auch den Menschen, noch bis zum Erreichen der Adoleszenz bzw. frühen Erwachsenenalter an (Giedd, 1999; Rice und Barrone, 2000; Gogtay et al., 2004).

Die neonatale und pubertäre chronische Ethanolbehandlung führte im posterioren PFC zu einer signifikanten Reduktion der Myelinisierung gegenüber den mit Saline behandelten Ratten. Demnach führte die neonatale Ethanolbehandlung allein zu keiner Reduktion der Markscheiden im posterioren PFC, sondern nur in Abhängigkeit einer pubertären Ethanolbehandlung.

Diese Ergebnisse stehen in Diskrepanz zu den Befunden anderer Studien, die durch pränatale (Ozer et al., 2000) und neonatale systemische Ethanolbehandlungen (Zoeller et al. 1994) sowie molekularbiologischen Untersuchungen in Zellkulturen aus fetalen Oligodendrozyten (Bichenkov und Ellingson, 2001) Veränderungen in myelin-assoziierten Proteinen wie dem *myelin basic protein* und *myelin-associated glycopeptide* gefunden haben, die eine Reduktion der Myelinisierung im ZNS zur Folge hatten. Untersuchungen der Axone des optischen Nervs von Nagern konnten ebenfalls zeigen, dass eine Ethanolexposition während der ersten Woche nach der Geburt zu einer Ausdünnung der Myelinscheiden (Phillips et al., 1991; Komatsu et al., 2003) und zur allgemeinen Reduktion der Myelinisierung führte (Harris et al., 2000; Komatsu et al., 2003). Es ist äusserst schwierig, Befunde aus der *in-vivo* Forschung mit denen aus *in-vitro* Untersuchungen zu vergleichen. Komplexe Vorgänge aus lebenden funktionierenden Systemen lassen sich nur begrenzt in

einfachen Zellkulturen simulieren. Daher sind Vergleiche von *in-vivo* und *in-vitro* erhobenen Daten zur Beurteilung der Effekte neonataler Ethanolbehandlungen auf die Myelinisierung von verschiedenen Hirnregionen mit Vorsicht durchzuführen und bei der Interpretation der Ergebnisse ist Rücksicht auf die unterschiedliche Natur der erhobenen Daten zu nehmen. Die unterschiedlichen Ethanoldosen und Zeitpunkte der pränatalen und neonatalen Ethanolexpositionen und die damit erzielten Blutethanolkonzentrationen der Tiere könnte ebenfalls dazu beigetragen haben, dass die Ergebnisse der vorliegenden Studie im Vergleich zu den genannten Untersuchungen in die entgegengesetzte Richtung zeigen.

Bislang gibt es nur wenige Studien zu den Effekten pubertärer oder adulter chronischer Ethanolbehandlungen, mit oder ohne einer ethanolbedingten Störung in der Frühentwicklung, auf die Myelinisierung verschiedener Hirnregionen. Jedoch gibt es einzelne Hinweise aus der Humanforschung, dass chronischer und langfristiger Ethanolkonsum zu Veränderungen in der Myelinisierung führt. Verschiedene Studien belegen, dass chronischer Ethanolmissbrauch zu einem Verlust der weissen Substanz im PFC führt und das die Expression von Proteinen, die mit der weissen Substanz des PFC assoziiert sind, bei Menschen mit chronischem Ethanolmissbrauch oder einer Ethanolabhängigkeit gestört ist (Alexander-Kaufman et al., 2006; Schlaepfer et al., 2006). Zudem zeigen post-mortem Untersuchungen von Gehirnen ethanolkranker Personen, dass Gene, die für die Myelinisierung im Gehirn verantwortlich sind, stark verändert waren (Liu et al., 2006). Somit unterstützen die Ergebnisse der vorliegenden Studie, dass es durch eine langfristige Ethanolexposition zu einer Reduktion in der Myelinisierung des posterioren PFC kommt, die Befunde aus der Humanforschung hinsichtlich der Myelinisierungsstörung des PFC bei ethanolkranken Patienten.

Im VTA hatte dagegen die pubertäre chronische Ethanolbehandlung eine Erhöhung des Myelinisierungsgrad zur Folge.

Es ist bekannt, dass die prä- und neonatale Ethanolexposition u.a. über die Störung von myelin-assoziierten Proteinen zu einer Reduktion der Myelinisierung führt (siehe oben). Inwieweit aber die pubertäre chronische Ethanolbehandlung zu einer Erhöhung des Myelinisierungsgrades im VTA führen konnte und inwieweit vielleicht kompensatorische Mechanismen und Prozesse beteiligt sind, konnte im Rahmen dieser Studie nicht geklärt werden. Zumal die Ergebnisse aus dem VTA denen aus dem posterioren PFC entgegenstehen. Ein Ansatzpunkt wäre die

Hypothese der unterschiedlichen Vulnerabilität der beiden Hirnregionen gegenüber den Effekten von Ethanol. Es könnte in Betracht gezogen werden, dass die entwicklungsgeschichtlich jüngeren Hirnanteile wie der PFC und seine Subregionen, empfindlicher gegenüber Substanzen wie Ethanol sind als stammesgeschichtlich ältere Anteile des Gehirns, wie das VTA, eine Region des Mittelhirns.

Methodische Fehler könnten ebenso dazu beigetragen haben, dass sich die Ergebnisse erstens von anderen Studien unterscheiden und zweitens sich die Befunde einer reduzierten Myelinisierung im posterioren PFC und der Erhöhung des Myelinisierungsgrad im VTA nach der neonatalen und pubertären Ethanolbehandlung in der aktuellen Arbeit entgegenstehen. Es ist nicht auszuschliessen, dass die Ergebnisse aufgrund der angewandten Mess-Methodik und der Qualität der Goldchlorid-Färbung nicht dem tatsächlichen Myelinisierungsgrad entsprechen und zu einem gewissen Grad einem Auswertungsfehler unterliegen. Die Messung der Myelinisierung der ausgewählten Hirnregionen erfolgte mit Hilfe eines Bildanalysesystems (bestehend aus einer digitalen Kamera und einer speziellen Bildanalysesoftware), welches das mikroskopische Bild digitalisierte und an einen PC weiterleitete. Mit der Bildanalysesoftware konnte der Kontrast des Bildes so verstärkt werden, dass sich die goldchlorid-gefärbten Markscheiden gegen den Hintergrund unterschieden und markiert sowie die relative Myelinisierungsstärke des untersuchten Hirnareals berechnet werden konnte. Aufgrund der unterschiedlich hohen Qualität der Goldchlorid-Färbung waren nicht alle Hirnschnitte innerhalb einer Behandlungsgruppe gleich stark gefärbt, so dass der Kontrast des mikroskopischen Bildes bei den schwächer gefärbten Hirnschnitten durch die Bildanalysesoftware nicht optimal verstärkt wurde im Vergleich zu den kräftigen goldchlorid-gefärbten Hirnschnitten.

Es sei noch einmal darauf hingewiesen, dass eine Störung der Myelinisierung von Nervenfasern (ob Reduktion oder Erhöhung) vor allem die Leitungsgeschwindigkeit der betroffenen Axone im posterioren PFC und in dem VTA beeinflusst und somit die störungsfreie Kommunikation zwischen den Nervenzellen beeinträchtigt. Dadurch kann es zu einem gestörten Timing der Informationsübertragung zwischen verschiedenen Hirngebieten, die ganz unterschiedlichen Funktionsnetzwerken angehören, kommen. Dieses könnte

mitverantwortlich sein für die in den Verhaltensexperimenten gefundenen Effekte der neonatalen und pubertären chronischen Ethanolexposition sein.

4.2.2 Parvalbumin-immunreaktive Interneurone

Parvalbumin (PV) ist neben Calbindin-D28K (CB) und Calretinin (CR) eines von drei Mitgliedern der EF-hand-Familie, einer Gruppe von calcium-bindenden Proteinen (DeFelipe, 1997). Das Vorhandensein von Parvalbumin korreliert mit dem intrazellulären Ca^{2+}-Gehalt und wird, neben den Muskelzellen und einigen endokrinen Geweben, typischerweise in schnellfeuernden GABAergen Interneuronen (Korb- und Kandelaberzellen) exprimiert. Eine mögliche Beteiligung von PV an der neuronalen Differenzierung und neuronalen Erregbarkeit wird ebenfalls diskutiert (Alcantara et al. 1993). Hinweise darauf liefern verschiedene Studien, die eine Beteiligung von PV an der Regulation der Aktivität Ca^{2+}-abhängiger Kaliumkanäle zeigten und dem PV aufgrund der Eigenschaft Ca^{2+}-Ionen binden zu können, eine Pufferfunktion zuschrieben. Durch die Annahme, dass PV in GABAergen Zellen mit hoher elektrischer und metabolischer Aktivität vorkommen, schloss man, dass die Konzentration von PV in direktem Zusammenhang mit dem Aktivitätsgrad der jeweiligen Interneuronen steht. Zusätzlich wird dem PV eine exzitoprotektive Funktion zugeschrieben, da es GABAergen Zellen vor unkontrollierten CA^{2+}-Erhöhungen, die einer irreversiblen Zellschädigung vorausgehen, schützt und somit zu einer Stabilisierung der intracellulären Calcium-Konzentration beiträgt (Heizmann und Braun, 1992; Celio, 1990).

Nach Auszählung der PVI zeigte sich eine Reduktion der PVI im dorsalen Hippocampus nach der neonatalen Ethanolbehandlung. Nach Bestimmung der Interneuronendichte hob sich dieser Effekt jedoch auf, so dass es keinen Unterschied zwischen den Behandlungsgruppen hinsichtlich der Interneuronendichte im dorsalen Hippocampus gab. Für die Analyse der PVI im dorsalem Hippocampus wurden zwei aufeinanderfolgende Schnitte pro Tier ausgewertet. Aufgrund der heterogenen Verteilung der PVI im dorsalen Hippocampus besteht die Möglichkeit, dass die ausgewählten Schnitte der neonatal mit Ethanol behandelten Tiere nicht repräsentativ für die Gesamtzahl der PVI im dorsalen Hippocampus waren und somit zu dem Befund einer signifikanten Reduktion der PVI im dorsalen Hippocampus nach der neonatalen Ethanolgabe führte.

Die neonatale und pubertäre chronische Ethanolbehandlung hatten keinen Effekt auf die Zellzahl und Interneuronendichte in anterioren bzw. posterioren PFC, im NAC, in der Amygdala und im ventralen Hippocampus. Zudem führte die neonatale und pubertäre Ethanolbehandlung zu keiner Veränderung der Volumina der einzelnen Hirnregionen.

Obwohl die Exposition von Ethanol gegenüber neonatalen Tieren eine Reihe von Störungen in der frühen Hirnentwicklung (während der *brain growth spurt* Phase) bewirkt, die u.a. eine erhöhte apoptotische Neurodegeneration induziert (Ikonomidou et al., 2000) und zu Veränderungen in der Proliferation, Differenzierung, Synaptogenese und Myelinisierung (Rice und Barrone, 2000) führt, scheinen die PVI der untersuchten Hirnregionen der Ethanolbehandlung während der Phase des *brain growth spurt* zu widerstehen. Dies überrascht, denn schliesslich entwickelt sich das GABAerge System sowohl in der Ratte als auch im Menschen postnatal bis in die frühe Adoleszenz, wobei hervorzuheben ist, dass die Entwicklung im Gegensatz zu allen anderen Neurotransmitter neonatal und nicht pränatal beginnt (Rice und Barrone, 2000). Deshalb besteht in der frühen postnatalen Periode ein Zeitfenster, in dem die unreifen GABAergen Interneurone besonders empfindlich auf toxische Schäden reagieren. Einige Studien konnten zeigen, dass eine pränatale Ethanolexposition zu einer Reduktion von PVI im cingulären Cortex und medialen Septum führt (Moore et al., 1997; 1998). Demgegenüber zeigen Ergebnisse anderer Studien, dass die neonatale Ethanolgabe die Anzahl PVI im primären, somatosensorischen Cortex und im cingulären Cortex nicht beeinflusst (Mitchell et al., 2000; Granato, 2006). Die Befunde der vorliegenden Studie, dass eine neonatale Ethanolgabe zu keiner Reduktion der PVI im PFC, NAC, im dorsalen und ventralen Hippocampus und in der Amygdala führt, unterstützen diese Befunde. Diese Ergebnisse bekräftigen die Tatsache, dass die Vulnerabilität einer bestimmten Hirnregion oder neuronalen Population gegenüber einer frühen Ethanolexposition abhängig von dem Zeitpunkt der Ethanolexposition ist (Stanwood und Levitt, 2004).

Die Tatsache, dass es zwischen den Behandlungsgruppen keinen signifikanten Unterschied in der PVI-Dichte nach einer Ethanolexposition gab, lässt zudem den Schluss zu, dass die elektrische und metabolische Aktivität der GABAergen Interneurone, die mit dem Vorkommen von PV in der Zelle korreliert, unverändert blieb und damit die normale inhibitorische Neurotransmission in den jeweiligen Hirnregionen nicht beeinträchtigt wurde.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Zählung der PVI nicht stereologisch durchgeführt, da die Interneuronendichte sehr gering war und die PVI in einer Fokusebene lagen. In der Regel werden jedoch die Zellen stereologisch gezählt, d.h. dass alle Zellen, die sich beim Durchfokussieren scharf stellen lassen, in einem definierten Teilvolumen gezählt und dadurch mögliche Doppelzählungen vermieden werden, indem die Neurone der obersten Ebene ausgelassen werden (West, 1999; Selemon, 2002). Die nicht-stereologische Zählweise birgt das Risiko der Doppelzählung einzelner Zellen (West, 1999; Selemon, 2002). Dadurch, dass sich die Zellen im histologischen Schnitt auf einer Fokussierungsebene befanden und der Abstand zwischen den ausgezählten Schnitten jeweils 240 µm betrug, war das Risiko der Doppelzählung jedoch eher gering.

5. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurden die Effekte einer frühen Entwicklungsstörung, die durch die neonatale intraperitoneale Verabreichung von Ethanol ausgelöst wurde, in Kombination mit einer pubertären chronischen Ethanolbehandlung auf perzeptuelle, emotionale und kognitive Verhaltensleistungen der Ratte untersucht.

Es zeigten sich neben den additiven Effekten der kombinierten neonatalen und chronischen Ethanolbehandlung während der Pubertät der Ratten auch zusätzliche Effekte der jeweiligen Einzelbehandlungen, die sich in unterschiedlichen Verhaltensstörungen äusserten. Die neonatale Ethanolbehandlung führte zu langfristigen Störungen in angstassoziierten Verhaltensweisen und Beeinträchtigungen des explorativen und lokomotorischen Verhaltens. Die pubertäre chronische Ethanolexposition führte zu einer Reduktion der lokomotorischen Aktivität, steigerte den anxiolytischen Effekt der akuten Verabreichung von Diazepam und erhöhte den Myelinisierungsgrad im VTA. Die kombinierte neonatale und chronische Ethanolbehandlung steigerte das operante Verhalten der Tiere in der Weise, als dass sich die Bereitschaft der Ratten für eine Belohnung zu arbeiten, steigerte. Zudem führte die Doppelbehandlung mit Ethanol zu Myelinisierungsdefiziten im PFC.

Die Tatsache, dass neonatale Ethanolgabe und/oder chronische Verabreichung von Ethanol während der Adoleszenz, speziell in der Pubertät, zu langfristigen funktionellen neurobiologischen Störungen führen können, die sich in der Entwicklung einer Abhängigkeit äussern können und/oder zu neurodegenerativen Prozessen und damit zu perzeptuellen, emotionalen und kognitiven Defiziten führen, zeigt, welches Risiko die Substanz Ethanol in sich birgt und welche Folgen der Konsum für das sich entwickelnde Gehirn hat. Daher ist es von enormer Dringlichkeit, auf die Gefahren des Ethanolkonsums während der Schwangerschaft und wichtiger Entwicklungsphasen wie die der Pubertät hinzuweisen und gleichzeitig aber auch für einen verantwortungsvollen Umgang mit Ethanol zu plädieren.

6. Literatur

Abel EL (1979) Prenatal effects of alcohol on open-field behavior, step-down latencies, and "sleep time". Behav Neural Biol 25: 406-410.

Aberman JE, Ward SJ, Salamone JD (1998) Effects of dopamine antagonists and accumbens dopamine depletions on time-constrained progressive-ratio performance. Pharmacol Biochem Behav 61: 341-348.

Alcantara S, Ferrer I, Soriano E (1993) Postnatal development of parvalbumin and calbindin D28K immunoreactivities in the cerebral cortex of the rat. Anat Embryol (Berl) 188: 63-73.

Alderson HL, Brown VJ, Latimer MP, Brasted PJ, Robertson AH, Winn P (2002) The effect of excitotoxic lesions of the pedunculopontine tegmental nucleus on performance of a progressive ratio schedule of reinforcement. Neuroscience 112: 417-425.

Alexander-Kaufman K, James G, Sheedy D, Harper C, Matsumoto I (2006) Differential protein expression in the prefrontal white matter of human alcoholics: a proteomics study. Mol Psychiatry 11: 56-65.

Allan CA (1995) Alcohol problems and anxiety disorders--a critical review. Alcohol Alcohol 30: 145-151.

Barr AM, Phillips AG (1999) Withdrawal following repeated exposure to d-amphetamine decreases responding for a sucrose solution as measured by a progressive ratio schedule of reinforcement. Psychopharmacology (Berl) 141: 99-106.

Barrett JE, Stanley JA (1980) Effects of ethanol on multiple fixed-interval fixed-ratio schedule performances: dynamic interactions at different fixed-ratio values. J Exp Anal Behav 34: 185-198.

Baumann N, Pham-Dinh D (2001) Biology of oligodendrocyte and myelin in the mammalian central nervous system. Physiol Rev 81: 871-927.

Bellinger FP, Davidson MS, Bedi KS, Wilce PA (2002) Neonatal ethanol exposure reduces AMPA but not NMDA receptor levels in the rat neocortex. Brain Res Dev Brain Res 136: 77-84.

Berridge KC, Robinson TE (1998) What is the role of dopamine in reward: hedonic impact, reward learning, or incentive salience? Brain Res Brain Res Rev 28: 309-369.

Berridge KC, Robinson TE (2003) Parsing reward. Trends in Neurosciences 26: 507-513.

Bertaina-Anglade V, Enjuanes E, Morillon D, Drieu lR (2006) The object recognition task in rats and mice: A simple and rapid model in safety pharmacology to detect amnesic properties of a new chemical entity. J Pharmacol Toxicol Methods 54: 99-105.

Bichenkov E, Ellingson JS (2001) Ethanol exerts different effects on myelin basic protein and 2',3'-cyclic nucleotide 3'-phosphodiesterase expression in differentiating CG-4 oligodendrocytes. Brain Res Dev Brain Res 128: 9-16.

Blanchard RJ, Shelton VF, Blanchard DC (1970) Historical effects of stimulus exposure: readiness to eat and object exploration. Learning and Motivation 1: 432-444.

Blumenthal TD (1999) Short lead interval startle modification. In: Startle modification: implications for neuroscience, cognitive science, and clinical science (Dawson ME, Schell AM, Böhmelt AH, eds), pp 51-72. Cambridge: University Press Cambridge.

Boerngen-Lacerda R, Souza-Formigoni ML (2000) Does the increase in locomotion induced by ethanol indicate its stimulant or anxiolytic properties? Pharmacol Biochem Behav 67: 225-232.

Braff DL, Geyer MA, Light GA, Sprock J, Perry W, Cadenhead KS, und Swerdlow NR (2001) Impact of prepulse characteristics on the detection of sensorimotor gating deficits in schizophrenia. Schizophrenia Res 49: 171-178

Brodie MS, Shefner SA, Dunwiddie TV (1990) Ethanol increases the firing rate of dopamine neurons of the rat ventral tegmental area in vitro. Brain Res 508: 65-69.

Brunell SC, Spear LP (2006) Effects of acute ethanol or amphetamine administration on the acoustic startle response and prepulse inhibition in adolescent and adult rats. Psychopharmacology (Berl) 186: 579-586.

Burghardt PR, Wilson MA (2006) Microinjection of naltrexone into the central, but not the basolateral, amygdala blocks the anxiolytic effects of diazepam in the plus maze. Neuropsychopharmacology 31: 1227-1240.

Butters NS, Gibson MA, Reynolds JN, Brien JF (2000) Effects of chronic prenatal ethanol exposure on hippocampal glutamate release in the postnatal guinea pig. Alcohol 21: 1-9.

Byrnes ML, Reynolds JN, Brien JF (2001) Effect of prenatal ethanol exposure during the brain growth spurt of the guinea pig. Neurotoxicol Teratol 23: 355-364.

Cagetti E, Liang J, Spigelman I, Olsen RW (2003) Withdrawal from chronic intermittent ethanol treatment changes subunit composition, reduces synaptic function, and decreases behavioral responses to positive allosteric modulators of GABAA receptors. Mol Pharmacol 63: 53-64.

Capaz FR, Vanconcellos LE, De Moraes S, Neto JP (1981) The open field: a simple method to show ethanol withdrawal symptoms. Arch Int Pharmacodyn Ther 251: 228-236.

Cardinal RN, Parkinson JA, Hall J, Everitt BJ (2002) Emotion and motivation: the role of the amygdala, ventral striatum, and prefrontal cortex. Neurosci Biobehav Rev 26: 321-352.

Cardinal RN, Everitt BJ (2004) Neural and psychological mechanisms underlying appetitive learning: links to drug addiction. Curr Opin Neurobiol 14: 156-162.

Carneiro LM, Diogenes JP, Vasconcelos SM, Aragao GF, Noronha EC, Gomes PB, Viana GS (2005) Behavioral and neurochemical effects on rat offspring after prenatal exposure to ethanol. Neurotoxicol Teratol 27: 585-592.

Celio MR (1990) Calbindin D-28k and parvalbumin in the rat nervous system. Neuroscience 35: 375-475.

Cetin T, Freudenberg F, Fuchtemeier M, Koch M (2004) Dopamine in the orbitofrontal cortex regulates operant responding under a progressive ratio of reinforcement in rats. Neurosci Lett 370: 114-117.

Charlton ME, Sweetnam PM, Fitzgerald LW, Terwilliger RZ, Nestler EJ, Duman RS (1997) Chronic ethanol administration regulates the expression of GABAA receptor alpha 1 and alpha 5 subunits in the ventral tegmental area and hippocampus. J Neurochem 68: 121-127.

Cheeta S, Brooks S, Willner P (1995) Effects of reinforcer sweetness and the D2/D3 antagonist raclopride on progressive ratio operant performance. Behav Pharmacol 6: 127-132.

Chuck TL, McLaughlin PJ, Arizzi-LaFrance MN, Salamone JD, Correa M (2006) Comparison between multiple behavioral effects of peripheral ethanol administration in rats: sedation, ataxia, and bradykinesia. Life Sci 79: 154-161.

Clements KM, Girard TA, Ellard CG, Wainwright PE (2005) Short-term memory impairment and reduced hippocampal c-Fos expression in an animal model of fetal alcohol syndrome. Alcohol Clin Exp Res 29: 1049-1059.

Cobb BL, Ryan KL, Guel-Gomez V, Mickley GA (1995) Chronic administration of L-NAME in drinking water alters working memory in rats. Brain Res Bull 38: 203-207.

Correa M, Arizzi MN, Betz A, Mingote S, Salamone JD (2003) Locomotor stimulant effects of intraventricular injections of low doses of ethanol in rats: acute and repeated administration. Psychopharmacology (Berl) 170: 368-375.

De Bellis MD, Clark DB, Beers SR, Soloff PH, Boring AM, Hall J, Kersh A, Keshavan MS (2000) Hippocampal volume in adolescent-onset alcohol use disorders. Am J Psychiatry 157: 737-744.

de Lima MN, Laranja DC, Bromberg E, Roesler R, Schroder N (2005) Pre- or post-training administration of the NMDA receptor blocker MK-801 impairs object recognition memory in rats. Behav Brain Res 156: 139-143.

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.

Denoble VJ, Begleiter H (1979) Impairment of acquisition of a DRL schedule following prolonged ethanol consumption. Pharmacol Biochem Behav 10: 393-396.

Di Chiara G, Imperato A (1988) Drugs abused by humans preferentially increase synaptic dopamine concentrations in the mesolimbic system of freely moving rats. Proc Natl Acad Sci U S A 85: 5274-5278.

Di Chiara G (1997) Alcohol and dopamine. Alcohol Res Health 21: 108-114.

Dobbing J, Sands J (1979) Comparative aspects of the brain growth spurt. Early Hum Dev 3: 79-83.

Duncan J (2001) An adaptive coding model of neural function in prefrontal cortex. Nat Rev Neurosci 2: 820-829.

Ennaceur A, Meliani K (1992) Effects of physostigmine and scopolamine on rats' performances in object-recognition and radial-maze tests. Psychopharmacology (Berl) 109: 321-330.

Everts HG, Koolhaas JM (1997) Lateral septal vasopressin in rats: role in social and object recognition? Brain Res 760: 1-7.

Fadda F, Rossetti ZL (1998) Chronic ethanol consumption: from neuroadaptation to neurodegeneration. Prog Neurobiol 56: 385-431.

Faingold CL, N'Gouemo P, Riaz A (1998) Ethanol and neurotransmitter interactions--from molecular to integrative effects. Prog Neurobiol 55: 509-535.

Farrant M, Nusser Z (2005) Variations on an inhibitory theme: phasic and tonic activation of GABA(A) receptors. Nat Rev Neurosci 6: 215-229.

Faw B (2003) Pre-frontal executive committee for perception, working memory, attention, long-term memory, motor control, and thinking: a tutorial review. Conscious Cogn 12: 83-139.

Fendt M, Koch M (1999) Cholinergic modulation of the acoustic startle response in the caudal pontine reticular nucleus of the rat. Eur J Pharmacol 370: 101-107.

Fendt M, Schwienbacher I, Koch M (2000) Amygdaloid N-methyl-D-aspartate and gamma-aminobutyric acid(A) receptors regulate sensorimotor gating in a dopamine-dependent way in rats. Neuroscience 98: 55-60.

File SE (1990) New strategies in the search for anxiolytics. Drug Des Deliv 5: 195-201.

Follesa P, Biggio F, Talani G, Murru L, Serra M, Sanna E, Biggio G (2005) Neurosteroids, GABA(A) receptors, and ethanol dependence. Psychopharmacology (Berl) 1-14.

Funahashi S (2001) Neuronal mechanisms of executive control by the prefrontal cortex. Neurosci Res 39: 147-165.

Fuster JM (2001) The prefrontal cortex--an update: time is of the essence. Neuron 30: 319-333.

Gabriel KI, Yu CL, Osborn JA, Weinberg J (2006) Prenatal ethanol exposure alters sensitivity to the effects of corticotropin-releasing factor (CRF) on behavior in the elevated plus-maze. Psychoneuroendocrinology, in press.

Garcia-Moreno LM, Conejo NM, Capilla A, Garcia-Sanchez O, Senderek K, Arias JL (2002) Chronic ethanol intake and object recognition in young and adult rats. Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry 26: 831-837.

Gardner EL, Ashby CRJ (2000) Heterogeneity of the mesotelencephalic dopamine fibers: physiology and pharmacology. Neurosci Biobehav Rev 24: 115-118.

Gewirtz JC, Davis M (1995) Habituation of prepulse inhibition of the startle reflex using an auditory prepulse close to background noise. Behav Neurosci 109: 388-395.

Giedd JN, Blumenthal J, Jeffries NO, Castellanos FX, Liu H, Zijdenbos A, Paus T, Evans AC, Rapoport JL (1999) Brain development during childhood and adolescence: a longitudinal MRI study. Nat Neurosci 2: 861-863.

Gilbertson RJ, Barron S (2005) Neonatal ethanol and nicotine exposure causes locomotor activity changes in preweanling animals. Pharmacol Biochem Behav 81: 54-64.

Girard TA, Wainwright PE (2002) Testing the spatial- versus object-learning distinction: water-maze performance of male rats exposed to ethanol during the brain growth spurt. Behav Brain Res 134: 493-503.

Gogtay N, Giedd JN, Lusk, L, Hayashi KM, Greenstein D, Vaitzis AC, Nugent TF 3rd, Herman DH, Clasen LS, Toga AW, Rapoport JL, Thompson PM (2004) Dynamic mapping of human cortical development during childhood through early adulthood. Proc Natl Acad Sci USA 101: 8174-8179.

Goodlett CR, Horn KH (2001) Mechanisms of alcohol-induced damage to the developing nervous system. Alcohol Res Health 25: 175-184.

Goto Y, Grace AA (2005) Dopaminergic modulation of limbic and cortical drive of nucleus accumbens in goal-directed behavior. Nat Neurosci 8: 805-812.

Graaf-Peters VB, Hadders-Algra M (2006) Ontogeny of the human central nervous system: what is happening when? Early Hum Dev 82: 257-266.

Graham FK (1975) The more or less startling effects of weak prestimulation. Psychophysiology 12: 238-248.

Granato A, Di Rocco F, Zumbo A, Toesca A, Giannetti S (2003) Organization of cortico-cortical associative projections in rats exposed to ethanol during early postnatal life. Brain Res Bull 60: 339-344.

Granato A (2006) Altered organization of cortical interneurons in rats exposed to ethanol during neonatal life. Brain Res 1069: 23-30.

Grillon C, Sinha R, O'Malley SS (1994) Effects of ethanol on the acoustic startle reflex in humans. Psychopharmacology (Berl) 114: 167-171.

Grillon C, Sinha R, Ameli R, O'Malley SS (2000) Effects of alcohol on baseline startle and prepulse inhibition in young men at risk for alcoholism and/or anxiety disorders. J Stud Alcohol 61: 46-54.

Grobin AC, Matthews DB, Devaud LL, Morrow AL (1998) The role of GABA(A) receptors in the acute and chronic effects of ethanol. Psychopharmacology (Berl) 139: 2-19.

Grobin AC, Fritschy JM, Morrow AL (2000a) Chronic ethanol administration alters immunoreactivity for GABA(A) receptor subunits in rat cortex in a region-specific manner. Alcohol Clin Exp Res 24: 1137-1144.

Grobin AC, Papadeas ST, Morrow AL (2000b) Regional variations in the effects of chronic ethanol administration on GABA(A) receptor expression: potential mechanisms. Neurochem Int 37: 453-461.

Groenewegen HJ, Wright CI, Beijer AV (1996) The nucleus accumbens: gateway for limbic structures to reach the motor system? Prog Brain Res 107: 485-511.

Hansen-Trench LS, Barron S (2005) Effects of neonatal alcohol and/or cocaine exposure on stress in juvenile and adult female rats. Neurotoxicol Teratol 27: 55-63.

Harper C, Matsumoto I (2005) Ethanol and brain damage. Curr Opin Pharmacol 5: 73-78.

Harris SJ, Wilce P, Bedi KS (2000) Exposure of rats to a high but not low dose of ethanol during early postnatal life increases the rate of loss of optic nerve axons and decreases the rate of myelination. J Anat 197 Pt 3: 477-485.

Heidbreder CA, Groenewegen HJ (2003) The medial prefrontal cortex in the rat: evidence for a dorso-ventral distinction based upon functional and anatomical characteristics. Neurosci Biobehav Rev 27: 555-579.

Heizmann CW, Braun K (1992) Changes in Ca(2+)-binding proteins in human neurodegenerative disorders. Trends Neurosci 15: 259-264.

Hirai K, Yoshioka H, Kihara M, Hasegawa K, Sawada T, Fushiki S (1999) Effects of ethanol on neuronal migration and neural cell adhesion molecules in the embryonic rat cerebral cortex: a tissue culture study. Brain Res Dev Brain Res 118: 205-210.

Hodos W (1961) Progressive ratio as a measure of reward strength. Science 134: 943-944.

Hodos W, Kalman G (1963) Effects of increment size and reinforcer volume on progressive ratio performance. J Exp Anal Behav 6: 387-392.

Hoffman HS, Ison JR (1980) Reflex modification in the domain of startle: I. Some empirical findings and their implications for how the nervous system processes sensory input. Psychol Rev 87: 175-189.

Hutchison KE, Rohsenow D, Monti P, Palfai T, Swift R (1997) Prepulse inhibition of the startle reflex: preliminary study of the effects of a low dose of alcohol in humans. Alcohol Clin Exp Res 21: 1312-1319.

Hutchison KE, McGeary J, Wooden A, Blumenthal T, Ito T (2003) Startle magnitude and prepulse inhibition: effects of alcohol and attention. Psychopharmacology 167: 235-241.

Ikemoto S, Panksepp J (1999) The role of nucleus accumbens dopamine in motivated behavior: a unifying interpretation with special reference to reward-seeking. Brain Res Brain Res Rev 31: 6-41.

Ikonomidou C, Bittigau P, Ishimaru MJ, Wozniak DF, Koch C, Genz K, Price MT, Stefovska V, Horster F, Tenkova T, Dikranian K, Olney JW (2000) Ethanol-induced apoptotic neurodegeneration and fetal alcohol syndrome. Science 287: 1056-1060.

Japha K, Koch M (1999) Picrotoxin in the medial prefrontal cortex impairs sensorimotor gating in rats: reversal by haloperidol. Psychopharmacology 144: 347-354.

Jones AE, McBride WJ, Murphy JM, Lumeng L, Li T, Shekhar A, McKinzie DL (2000) Effects of ethanol on startle responding in alcohol-preferring and -non-preferring rats. Pharmacol Biochem Behav 67: 313-318.

Jones KL, Smith DW (1973) Recognition of the fetal alcohol syndrome in early infancy. Lancet 2: 999-1001.

Kalivas PW, Nakamura M (1999) Neural systems for behavioral activation and reward. Curr Opin Neurobiol 9: 223-227.

Kandel ER, Schwartz JH, Jessel TM (2000) Principles of neural science, 4th Edition, New York: McGraw-Hill.

Kelly SJ, Tran TD (1997) Alcohol exposure during development alters social recognition and social communication in rats. Neurotoxicol Teratol 19: 383-389.

Kim CK, Kalynchuk LE, Kornecook TJ, Mumby DG, Dadgar NA, Pinel JP, Weinberg J (1997) Object-recognition and spatial learning and memory in rats prenatally exposed to ethanol. Behav Neurosci 111: 985-995.

Klein S (2005) Retrograde Tracerstudie nach PFC Läsion. Diplomarbeit aus dem Fachbereich 2 (Biologie, Chemie) der Universität Bremen, Deutschland.

Kliethermes CL (2005) Anxiety-like behaviors following chronic ethanol exposure. Neurosci Biobehav Rev 28: 837-850.

Koch M, Kungel M, Herbert H (1993) Cholinergic neurons in the pedunculopontine tegmental nucleus are involved in the mediation of prepulse inhibition of the acoustic startle response in the rat. Exp Brain Res 97: 71-82.

Koch M, Bubser M (1994) Deficient sensorimotor gating after 6-hydroxydopamine lesion of the rat medial prefrontal cortex is reversed by haloperidol. Eur J Neurosci 6: 1837-1845.

Koch M (1996) The septohippocampal system is involved in prepulse inhibition of the acoustic startle response in rats. Behav Neurosci 110: 468-477.

Koch M (1998) How can adaptive behavioural plasticity be implemented in the mammalian brain? Z Naturforsch 53: 593-598.

Koch M (1999) The neurobiology of startle. Prog Neurobiol 59: 107-128.

Koch M, Fendt M, Kretschmer BD (2000) Role of the substantia nigra pars reticulata in sensorimotor gating, measured by prepulse inhibition of startle in rats. Behav Brain Res 117: 153-162.

Koch M, Fendt M (2003) Startle response modulation as a behavioral tool in neuropharmacology. Curr Neuropharmacol 1: 175.185.

Kodituwakku PW, Kalberg W, May PA (2001) The effects of prenatal alcohol exposure on executive functioning. Alcohol Res Health 25: 192-198.

Kolb B, Cioe J (2001) Cryoanethesia on postnatal day 1, but not day 10, affects adult behavior and cortical morphology in rats. Brain Res Dev Brain Res 130: 9-14.

Komatsu S, Sasaki Y, Shiota K (2003) A quantitative study of the facial nerve in mice prenatally exposed to ethanol. Congenit Anom (Kyoto) 43: 41-45.

Koob GF (1992) Drugs of abuse: anatomy, pharmacology and function of reward pathways. Trends Pharmacol Sci 13: 177-184.

Kril JJ, Halliday GM, Svoboda MD, Cartwright H (1997) The cerebral cortex is damaged in chronic alcoholics. Neuroscience 79: 983-998.

Kril JJ, Halliday GM (1999) Brain shrinkage in alcoholics: a decade on and what have we learned? Prog Neurobiol 58: 381-387.

Kunko PM, Wallace MJ, Robinson SE (1996) Gestational cocaine and ethanol exposure alter spontaneous and cocaine-induced behavior in weanling rats. Pharmacol Biochem Behav 55: 559-564.

Kushner MG, Abrams K, Thuras P, Thuras P, Hanson KL (2000) Individual differences predictive of drinking to manage anxiety among non-problem drinkers with panic disorder. Alcohol Clin Exp Res 24: 448-458.

Lal H, Prather PL, Rezazadeh SM (1991) Anxiogenic behavior in rats during acute and protracted ethanol withdrawal: reversal by buspirone. Alcohol 8: 467-471.

Landis C, Hunt WA (1939) The startle pattern. New York: Farrar and Rinchart.

Langen B, Dietze S, Fink H (2002) Acute effect of ethanol on anxiety and 5-HT in the prefrontal cortex of rats. Alcohol 27: 135-141.

LeDoux JE (2000a) Cognitive-Emotional Interactions: Listen to the Brain. In: Cognitive neuroscience of emotion (Lane RD, Nadel L, eds), pp 129-155. New York Oxford: Oxford University Press.

LeDoux JE (2000b) Emotion circuits in the brain. Annu Rev Neurosci 23: 155-184.

Lemoine P (1968) Les enfants de parents alcooliques: anomalies observeé: à propos des 127 cas. Quest Med 8: 476-482.

Letinic K, Zoncu R, Rakic P (2002) Origin of GABAergic neurons in the human neocortex. Nature 417: 645-649.

Levitt P (2003) Structural and functional maturation of the developing primate brain. J Pediatr 143: S35-S45.

Liang J, Cagetti E, Olsen RW, Spigelman I (2004) Altered pharmacology of synaptic and extrasynaptic GABAA receptors on CA1 hippocampal neurons is consistent with subunit changes in a model of alcohol withdrawal and dependence. J Pharmacol Exp Ther 310: 1234-1245.

Liberzon I, Phan KL, Khan S, Abelson JL (2003) Role of the $GABA_A$ receptor in anxiety: Evidence from animal models, molecular and clinical psychopharmacology, and brain imaging studies. Current Neuropharmacology 1: 267-283.

Lingenhohl K, Friauf E (1992) Giant neurons in the caudal pontine reticular formation receive short latency acoustic input: an intracellular recording and HRP-study in the rat. J Comp Neurol 325: 473-492.

Liu J, Lewohl JM, Harris RA, Iyer VR, Dodd PR, Randall PK, Mayfield RD (2006) Patterns of gene expression in the frontal cortex discriminate alcoholic from nonalcoholic individuals. Neuropsychopharmacology 31: 1574-1582.

Livy DJ, Parnell SE, West JR (2003) Blood ethanol concentration profiles: a comparison between rats and mice. Alcohol 29: 165-171.

Löser H (2000) Alkohol und Schwangerschaft - Embryopathie und Alkoholeffekte. Therapeutische Umschau 57: 246-252.

Lugo JNJ, Marino MD, Cronise K, Kelly SJ (2003) Effects of alcohol exposure during development on social behavior in rats. Physiol Behav 78: 185-194.

Maier SE, West JR (2001) Drinking patterns and alcohol-related birth defects. Alcohol Res Health 25: 168-174.

Manley SJ, Little HJ (1997) Enhancement of amphetamine- and cocaine-induced locomotor activity after chronic ethanol administration. J Pharmacol Exp Ther 281: 1330-1339.

Markwiese BJ, Acheson SK, Levin ED, Wilson WA, Swartzwelder HS (1998) Differential effects of ethanol on memory in adolescent and adult rats. Alcohol Clin Exp Res 22: 416-421.

May PA, Gossage JP (2001) Estimating the prevalence of fetal alcohol syndrome. A summary. Alcohol Res Health 25: 159-167.

McKernan RM, Rosahl TW, Reynolds DS, Sur C, Wafford KA, Atack JR, Farrar S, Myers J, Cook G, Ferris P, Garrett L, Bristow L, Marshall G, Macaulay A, Brown N, Howell O, Moore KW, Carling RW, Street LJ, Castro JL, Ragan CI, Dawson GR, Whiting PJ (2000) Sedative but not anxiolytic properties of benzodiazepines are mediated by the GABA(A) receptor alpha1 subtype. Nat Neurosci 3: 587-592.

Mehta AK, Ticku MK (2005) Effect of chronic administration of ethanol on GABAA receptor assemblies derived from alpha2-, alpha3-, beta2- and gamma2-subunits in the rat cerebral cortex. Brain Res 1031: 134-137.

Melcer T, Gonzalez D, Riley EP (1995) Locomotor activity and alcohol preference in alcohol-preferring and -nonpreferring rats following neonatal alcohol exposure. Neurotoxicol Teratol 17: 41-48.

Merzenich H (2002) Alkohol in der Schwangerschaft – Ein kritisches Resümee. Eine Expertise im Auftrag der BzgA von Hiltrud Merzenich und Peter Lang. Bundeszentrale für gesundheitliche Aufklärung, Köln, BzgA-Köln: BzgA, 2002 (Forschung und Praxis der Gesundheitsförderung; Bd. 17).

Mickley GA, Cobb BL, Mason PA, Farell S (1994) Disruption of a putative working memory task and selective expression of brain c-fos following microwave-induced hyperthermia. Physiol Behav 55: 1029-1038.

Middaugh LD, Bao K, Shepherd CL (1992) Comparative effects of ethanol on motor activity and operant behavior. Pharmacol Biochem Behav 43: 625-629.

Miller BT, D'Esposito M (2005) Searching for "the top" in top-down control. Neuron 48: 535-538.

Miller EK (1999) The prefrontal cortex: complex neural properties for complex behavior. Neuron 22: 15-17.

Miller EK, Cohen JD (2001) An integrative theory of prefrontal cortex function. Annu Rev Neurosci 24: 167-202.

Mitchell JJ, Paiva M, Heaton MB (2000) Effect of neonatal ethanol exposure on parvalbumin-expressing GABAergic neurons of the rat medial septum and cingulate cortex. Alcohol 21: 49-57.

Mobini S, Chiang TJ, Ho MY, Bradshaw CM, Szabadi E (2000) Comparison of the effects of clozapine, haloperidol, chlorpromazine and d-amphetamine on performance on a time-constrained progressive ratio schedule and on locomotor behaviour in the rat. Psychopharmacology (Berl) 152: 47-54.

Mogenson GJ, Brudzynski SM, Wu M, Yang CR, Yim CY (1993) From motivation to action: a review of dopaminergic regulation of limbic-nucleus accumbens-ventral pallidum-pedunculopontine nucleus circuitries involved in limbic-motor integration. In: Limbic Motor Circuits and Neuropsychiatry (Kalivas PW, Barnes CD, eds), pp 193-236. Boca Raton, Florida: CRC Press, Inc.

Montgomery KC, Monkman JA (1955) The relation between fear and exploratory behavior. J Comp Physiol Psychol 48: 132-136.

Moore DB, Ruygrok AC, Walker DW, Heaton MB (1997) Effects of prenatal ethanol exposure on parvalbumin-expressing GABAergic neurons in the adult rat medial septum. Alcohol Clin Exp Res 21: 849-856.

Moore DB, Quintero MA, Ruygrok AC, Walker DW, Heaton MB (1998) Prenatal ethanol exposure reduces parvalbumin-immunoreactive GABAergic neuronal number in the adult rat cingulate cortex. Neurosci Lett 249: 25-28.

Morgane PJ, Galler JR, Mokler DJ (2005) A review of systems and networks of the limbic forebrain/limbic midbrain. Prog Neurobiol 75: 143-160.

Morris HV, Dawson GR, Reynolds DS, Atack JR, Stephens DN (2006) Both alpha2 and alpha3 GABAA receptor subtypes mediate the anxiolytic properties of benzodiazepine site ligands in the conditioned emotional response paradigm. Eur J Neurosci 23: 2495-2504.

Mothes HK, Opitz B, Werner R, Clausing P (1996) Effects of prenatal ethanol exposure and early experience on home-cage and open-field activity in mice. Neurotoxicol Teratol 18: 59-65.

Nader K, Bechara A, van der Kooy D (1997) Neurobiological constraints on behavioral models of motivation. Ann Rev Psychol 48: 85-114.

Nicolas JM, Fernandez-Sola J, Robert J, Antunez E, Cofan M, Cardenal C, Sacanella E, Estruch R, Urbano-Marquez A (2000) High ethanol intake and malnutrition in alcoholic cerebellar shrinkage. QJM 93: 449-456.

Obernier JA, White AM, Swartzwelder HS, Crews FT (2002) Cognitive deficits and CNS damage after a 4-day binge ethanol exposure in rats. Pharmacol Biochem Behav 72: 521-532.

Ongur D, Price JL (2000) The organization of networks within the orbital and medial prefrontal cortex of rats, monkeys and humans. Cereb Cortex 10: 206-219.

Osborn JA, Kim CK, Steiger J, Weinberg J (1998a) Prenatal ethanol exposure differentially alters behavior in males and females on the elevated plus maze. Alcohol Clin Exp Res 22: 685-696.

Osborn JA, Yu C, Gabriel K, Weinberg J (1998b) Fetal ethanol effects on benzodiazepine sensitivity measured by behavior on the elevated plus-maze. Pharmacol Biochem Behav 60: 625-633.

Oscar-Berman M, Shagrin B, Evert DL, Epstein C (1997) Impairments of brain and behavior: The neurological effects of alcohol. Alcohol Res Health 21: 65-75.

Ozer E, Sarioglu S, Gure A (2000) Effects of prenatal ethanol exposure on neuronal migration, neuronogenesis and brain myelination in the mice brain. Clin Neuropathol 19: 21-25.

Paxinos G, Watson C (1998) The rat brain in stereotaxic coordinates. San Diego: Academic Press.

Pellow S, Chopin P, File SE, Briley M (1985) Validation of open:closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. J Neurosci Methods 14: 149-167.

Pellow S, File SE (1986) Anxiolytic and anxiogenic drug effects on exploratory activity in an elevated plus-maze: a novel test of anxiety in the rat. Pharmacol Biochem Behav 24: 525-529.

Pennartz CM, Groenewegen HJ, Lopes da Silva FH (1994) The nucleus accumbens as a complex of functionally distinct neuronal ensembles: an integration of behavioural, electrophysiological and anatomical data. Prog Neurobiol 42: 719-761.

Petry NM (1998) Ethanol's effects on operant responding: differentiating reinforcement efficacy and motor performance. Physiol Behav 64: 117-122.

Pfefferbaum A, Rosenbloom M, Deshmukh A, Sullivan E (2001) Sex differences in the effects of alcohol on brain structure. Am J Psychiatry 158: 188-197.

Phifer CB, Terry LM (1986) Use of hypothermia for general anesthesia in preweanling rodents. Physiol Behav 38: 887-890.

Phillips DE, Krueger SK, Rydquist JE (1991) Short- and long-term effects of combined pre- and postnatal ethanol exposure (three trimester equivalency) on the development of myelin and axons in rat optic nerve. Int J Dev Neurosci 9: 631-647.

Pilz PK, Schnitzler HU, Menne D (1987) Acoustic startle threshold of the albino rat (Rattus norvegicus). J Comp Psychol 101: 67-72.

Pohorecky LA, Cagan M, Brick J, Jaffe SL (1976) The startle response in rats: effect of ethanol. Pharmacol Biochem Behav 4: 311-316.

Popke EJ, Allen SR, Paule MG (2000) Effects of acute ethanol on indices of cognitive-behavioral performance in rats. Alcohol 20: 187-192.

Potter BM, Berntson GG (1987) Prenatal alcohol exposure: effects on acoustic startle and prepulse inhibition. Neurotoxicol Teratol 9: 17-21.

Puma C, Deschaux O, Molimard R, Bizot JC (1999) Nicotine improves memory in an object recognition task in rats. Eur Neuropsychopharmacol 9: 323-327.

Quednow BB, Kuhn KU, Beckmann K, Westheide J, Maier W, Wagner M (2006) Attenuation of the prepulse inhibition of the acoustic startle response within and between sessions. Biol Psychol 71: 256-263.

Randall S, Hannigan JH (1999) In utero alcohol and postnatal methylphenidate: locomotion and dopamine receptors. Neurotoxicol Teratol 21: 587-593.

Rasmussen DD, Mitton DR, Green J, Puchalski S (2001) Chronic daily ethanol and withdrawal: 2. Behavioral changes during prolonged abstinence. Alcohol Clin Exp Res 25: 999-1005.

Rassnick S, Koob GF, Geyer MA (1992) Responding to acoustic startle during chronic ethanol intoxication and withdrawal. Psychopharmacology (Berl) 106: 351-358.

Reilly S (1999) Reinforcement value of gustatory stimuli determined by progressive ratio performance. Pharmacol Biochem Behav 63: 301-311.

Rensing L, Koch M, Rippe B, Rippe V (2006) Neurobiologische Grundlagen von Stressreaktionen. München: Spektrum Akademischer Verlag.

Rezvani AH, Levin ED (2004) Adolescent and adult rats respond differently to nicotine and alcohol: motor activity and body temperature. Int J Dev Neurosci 22: 349-354.

Rice D, Barone SJ (2000) Critical periods of vulnerability for the developing nervous system: evidence from humans and animal models. Environ Health Perspect 108 Suppl 3: 511-533.

Richardson NR, Roberts DC (1996) Progressive ratio schedules in drug self-administration studies in rats: a method to evaluate reinforcing efficacy. J Neurosci Methods 66: 1-11.

Riley EP, Barron S, Melcer T, Gonzalez D (1993) Alterations in activity following alcohol administration during the third trimester equivalent in P and NP rats. Alcohol Clin Exp Res 17: 1240-1246.

Rodgers RJ, Cao BJ, Dalvi A, Holmes A (1997) Animal models of anxiety: an ethological perspective. Braz J Med Biol Res 30: 289-304.

Rodgers RJ (1997) Animal models of 'anxiety': where next? Behav Pharmacol 8: 477-496.

Rodgers RJ, Dalvi A (1997) Anxiety, defence and the elevated plus-maze. Neurosci Biobehav Rev 21: 801-810.

Sah P, Faber ES, Lopez DA, Power J (2003) The amygdaloid complex: anatomy and physiology. Physiol Rev 83: 803-834.

Sahr AE, Thielen RJ, Lumeng L, Li TK, McBride WJ (2004) Long-lasting alterations of the mesolimbic dopamine system after periadolescent ethanol drinking by alcohol-preferring rats. Alcohol Clin Exp Res 28: 702-711.

Salamone JD, Correa M, Mingote S, Weber SM (2003) Nucleus accumbens dopamine and the regulation of effort in food-seeking behavior: implications for studies of natural motivation, psychiatry, and drug abuse. J Pharmacol Exp Ther 305: 1-8.

Salamone JD (2006) Will the last person who uses the term 'reward' please turn out the lights? Comments on processes related to reinforcement, learning, motivation and effort. Addict Biol 11: 43-44.

Samson HH, Tolliver GA, Haraguchi M, Hodge CW (1992) Alcohol self-administration: role of mesolimbic dopamine. Ann N Y Acad Sci 654: 242-253.

Sandbak T, Rimol LM, Jellestad FK, Murison R (2000) Relating acoustic startle reactivity and plasticity to alcohol consumption in male Wistar rats. Physiol Behav 68: 723-733.

Schlaepfer TE, Lancaster E, Heidbreder R, Strain EC, Kosel M, Fisch HU, Pearlson GD (2006) Decreased frontal white-matter volume in chronic substance abuse. Int J Neuropsychopharmacol 9: 147-153.

Schneider M, Koch M (2006) The effect of chronic peripubertal cannabinoid treatment on deficient object recognition memory in rats after neonatal mPFC lesion. Eur Neuropsychopharmacol, in press.

Schott H (2001) Das Alkoholproblem in der Medizingeschichte. Deutsche Ärzteblatt 98: 1958.

Segar TM, Klebaur JE, Bardo MT, Barron S (1999) Acquisition of a fixed ratio schedule in adult male rats neonatally exposed to ethanol and/or cocaine. Alcohol Clin Exp Res 23: 7-11.

Selemon LD, Rajkowska G (2002) Two-dimensional versus three-dimensional cell counting. Biol Psychiatry 51: 838-840.

Sheela Rani CS, Ticku MK (2006) Comparison of chronic ethanol and chronic intermittent ethanol treatments on the expression of GABA(A) and NMDA receptor subunits. Alcohol 38: 89-97.

Siciliano D, Smith RF (2001) Periadolescent alcohol alters adult behavioral characteristics in the rat. Physiol Behav 74: 637-643.

Silvers JM, Tokunaga S, Mittleman G, Matthews DB (2003) Chronic intermittent injections of high-dose ethanol during adolescence produce metabolic, hypnotic, and cognitive tolerance in rats. Alcohol Clin Exp Res 27: 1606-1612.

Silvestre JS, Pallares M, Nadal R, Ferre N (2002) Opposite effects of ethanol and ketamine in the elevated plus-maze test in Wistar rats undergoing a chronic oral voluntary consumption procedure. J Psychopharmacol 16: 305-312.

Sisk CL, Foster DL (2004) The neural basis of puberty and adolescence. Nat Neurosci 7: 1040-1047.

Skinner RD, Garcia-Rill E (1993) Mesolimbic interactions with mesopontine modulation of locomotion. In: Limbic Motor Circuits and Neuropsychiatry (Kalivas PW, Barnes CD, eds), pp 155-191. Boca Raton, Florida: CRC Press, Inc.

Slawecki CJ, Betancourt M, Cole M, Ehlers CL (2001) Periadolescent alcohol exposure has lasting effects on adult neurophysiological function in rats. Brain Res Dev Brain Res 128: 63-72.

Slawecki CJ, Roth J (2004) Comparison of the onset of hypoactivity and anxiety-like behavior during alcohol withdrawal in adolescent and adult rats. Alcohol Clin Exp Res 28: 598-607.

Slawecki CJ, Ehlers CL (2005) Enhanced prepulse inhibition following adolescent ethanol exposure in Sprague-Dawley rats. Alcohol Clin Exp Res 29: 1829-1836.

Sonderegger TB, Calmes H, Corbitt S, Zimmermann EG (1982) Lack of persistent effects of low-dose ethanol administered postnatally in rats. Neurobehav Toxicol Teratol 4: 463-468.

Squire LR und Kandel ER (1999) Gedächtnis: Die Natur des Erinnerns. Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag.

Stafford D, Branch MN (1998) Effects of step size and break-point criterion on progressive-ratio performance. J Exp Anal Behav 70: 123-138.

Stanwood GD, Levitt P (2004) Drug exposure early in life: functional repercussions of changing neuropharmacology during sensitive periods of brain development. Curr Opin Pharmacol 4: 65-71.

Steckler T, Drinkenburg WH, Sahgal A, Aggleton JP (1998a) Recognition memory in rats--I. Concepts and classification. Prog Neurobiol 54: 289-311.

Steckler T, Drinkenburg WH, Sahgal A, Aggleton JP (1998b) Recognition memory in rats--II. Neuroanatomical substrates. Prog Neurobiol 54: 313-332.333-348.

Steckler T, Drinkenburg WH, Sahgal A, Aggleton JP (1998c) Recognition memory in rats—III. Neurochemical substrates. Prog Neurobiol 54: 333-348.

Swayze VW, Johnson VP, Hanson JW, Piven J, Sato Y, Giedd JN, Mosnik D, Andreasen NC (1997) Magnetic resonance imaging of brain anomalies in fetal alcohol syndrome. Pediatrics 99: 232-240.

Stewart WJ (1975) Progressive reinforcement schedule: A review and evaluation. Aust J Psychol 27: 9-22.

Swerdlow NR, Geyer MA, Braff DL (2001) Neural circuit regulation of prepulse inhibition of startle in the rat: current knowledge and future challenges. Psychopharmacology 156: 194-215.

Tecott LH (2000) Designer genes and anti-anxiety drugs. Nat Neurosci 3: 529-530.

Thompson PM, Giedd JN, Woods RP, MacDonald D, Evans AC, Toga AW (2000) Growth patterns in the developing brain detected by using continuum mechanical tensor maps. Nature 404: 190-193.

Tomie A, Cunha C, Mosakowski EM, Quartarolo NM, Pohorecky LA, Benjamin D (1998) Effects of ethanol on Pavlovian autoshaping in rats. Psychopharmacology (Berl) 139: 154-159.

Tran TD, Cronise K, Marino MD, Jenkins WJ, Kelly SJ (2000) Critical periods for the effects of alcohol exposure on brain weight, body weight, activity and investigation. Behav Brain Res 116: 99-110.

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.

Uylings HB, Groenewegen HJ, Kolb B (2003) Do rats have a prefrontal cortex? Behav Brain Res 146: 3-17.

Valdez GR, Zorrilla EP, Roberts AJ, Koob GF (2003) Antagonism of corticotropin-releasing factor attenuates the enhanced responsiveness to stress observed during protracted ethanol abstinence. Alcohol 29: 55-60.

van Dongen YC, Deniau JM, Pennartz CM, Galis-de Graaf Y, Voorn P, Thierry AM, Groenewegen HJ (2005) Anatomical evidence for direct connections between the shell and core subregions of the rat nucleus accumbens. Neuroscience 136: 1049-1071.

van Eden CG, Kros JM, Uylings HB (1990) The development of the rat prefrontal cortex. Its size and development of connections with thalamus, spinal cord and other cortical areas. Prog Brain Res 85: 169-183.

Voorn P, Vanderschuren LJ, Groenewegen HJ, Robbins TW, Pennartz CM (2004) Putting a spin on the dorsal-ventral divide of the striatum. Trends Neurosci 27: 468-474.

Wafford KA (2005) GABAA receptor subtypes: any clues to the mechanism of benzodiazepine dependence? Curr Opin Pharmacol 5: 47-52.

Waller MB, McBride WJ, Lumeng L, Li TK (1982) Induction of dependence on ethanol by free-choice drinking in alcohol-preferring rats. Pharmacol Biochem Behav 16: 501-507.

Warren KR, Foudin LL (2001) Alcohol-related birth defects--the past, present, and future. Alcohol Res Health 25: 153-158.

West MJ (1999) Stereological methods for estimating the total number of neurons and synapses: issues of precision and bias. Trends Neurosci 22: 51-61.

White AM, Ghia AJ, Levin ED, Swartzwelder HS (2000) Binge pattern ethanol exposure in adolescent and adult rats: differential impact on subsequent responsiveness to ethanol. Alcohol Clin Exp Res 24: 1251-1256.

White AM, Swartzwelder HS (2004) Hippocampal function during adolescence: a unique target of ethanol effects. Ann N Y Acad Sci 1021: 206-220.

Wiggins RC (1986) Myelination: a critical stage in development. Neurotoxicology 7: 103-120.

Wilson MA, Burghardt PR, Ford KA, Wilkinson MB, Primeaux SD (2004) Anxiolytic effects of diazepam and ethanol in two behavioral models: comparison of males and females. Pharmacol Biochem Behav 78: 445-458.

Winters BD, Bussey TJ (2005) Glutamate receptors in perirhinal cortex mediate encoding, retrieval, and consolidation of object recognition memory. J Neurosci 25: 4243-4251.

Wolf ME, Sun X, Mangiavacchi S, Chao SZ (2004) Psychomotor stimulants and neuronal plasticity. Neuropharmacology 47 Suppl 1: 61-79.

Woolfrey KM, Musisca NJ, Hunt PS, Burk JA (2005) Early postnatal ethanol administration does not affect prepulse inhibition in rats. Physiol Behav 84: 747-752.

Zoeller RT, Butnariu OV, Fletcher DL, Riley EP (1994) Limited postnatal ethanol exposure permanently alters the expression of mRNAS encoding myelin basic protein and myelin-associated glycoprotein in cerebellum. Alcohol Clin Exp Res 18: 909-916

7. Danksagung

Ganz besonders bedanken möchte ich mich bei meinem Doktorvater Prof. Dr. Michael Koch für die Möglichkeit zur Bearbeitung dieses interessanten Themas, für die hervorragende Betreuung sowie für die immer hilfreichen und interessanten Diskussionen rund ums Thema und “rund ums Leder“.

Ein grosser Dank auch an die Mitarbeiter der Arbeitsgruppe Koch für die vielen hilfreichen Diskussionen, lustigen, unterhaltsamen Gespräche und für die angenehme Arbeitsatmosphäre.

Bedanken möchte ich mich auch bei Steffen Klein für seine Hilfe und Unterstützung bei meinem Kampf mit der Bildanalyse bzw. Bildanalysesoftware.

Ein besonderes Dankeschön geht auch an Dr. Miriam Schneider und Thomas *Tom* Enkel für die vielen fachlichen wie nicht-fachlichen Gespräche, ihre grosse Hilfsbereitschaft und für ihre Freundschaft...*Tom* möchte ich darüber hinaus für die wochentäglichen und wochenendlichen unterhaltsamen und lustigen “Diskussionsabende“ danken, die mir doch sehr geholfen haben, dem Laboralltag zu entfliehen.

Des weiteren danke ich Frau PD Dr. Ursula Dicke für die Übernahme des 2. Gutachtens.

Meinen Eltern und meiner Freundin Tanja gilt ein ganz besonderer Dank, insbesondere für die finanzielle und moralische Unterstützung sowie den grossen emotionalen Rückhalt. Danke!!!