

5. Versuchsauswertung und Statistik

5.1. 5-HT-Immunhistochemie

Um einen sicheren Eindruck des Läsionsgrades erhalten zu können, wurde von allen lädierten Tieren die gesamte Rapheregion in Serie von kaudal nach rostral in einer Dicke von 20 µm geschnitten und jeder zweite Schnitt immunhistochemisch bearbeitet. Die Auswertung der Schnitte erfolgte mit Hilfe eines Lichtmikroskops. Bei nicht vollständiger Läsion der medianen bzw. dorsalen Raphe wurden die noch vorhandenen serotonergen Zellen der einzelnen Schnitte ausgezählt. Anhand der noch vorhandenen Zellzahl pro histologischem Schnitt wurde entschieden, ob die Tiere in die Auswertung mit eingehen oder entfallen. Die Läsionen galten als erfolgreich, wenn nach DRN-Läsion pro Schnitt noch ≤ 15 Zellen bzw. nach MRN-Läsion ≤ 5 Zellen nachweisbar waren. Bei einer mittleren Zellzahl pro Schnitt von 190 Zellen in der DRN und 60 Zellen in der MRN, sind demzufolge bei lädierten Tieren im Vergleich zu Kontrolltieren noch bis zu 8 % der serotonergen Raphezellen vorhanden. Die mittlere Zellzahl pro Schnitt der MRN bzw. DRN wurde ermittelt, indem von sechs scheinlädierten Tieren jeweils neun Schnitte (drei aus rostraler, zentraler und kaudaler Region) ausgezählt wurden und a) der Mittelwert der Zellzahlen von den neun Schnitten pro Tier und anschließend b) der Mittelwert der sechs Kontrolltiere gebildet wurde.

5.2. Gehaltsbestimmungen

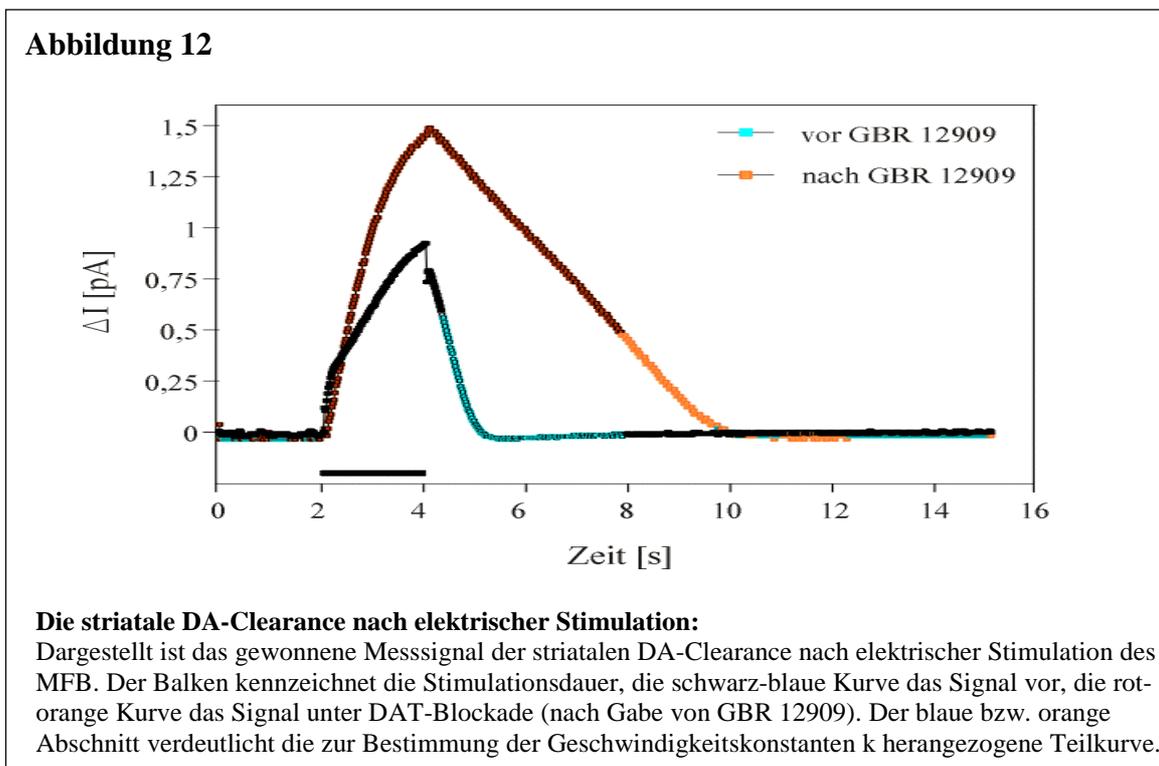
Zur zusätzlichen Charakterisierung der 5,7-DHT-Läsion wurden bei den Jungtieren Gehaltsbestimmungen sowohl von 5-HT und 5-HIAA als auch DA und DOPAC in ausgewählten Hirnarealen durchgeführt. Die von scheinlädierten und lädierten Tieren bestimmten Gehalte wurden entsprechend der Hirnregion, des Läsionsortes (DRN oder MRN) sowie des Zeitpunktes nach Läsion (eine, drei und neun Wochen) miteinander verglichen. Statistische Unterschiede der beiden Tiergruppen (Läsion und Scheinläsion) wurden mittels Students t-Test ($p < 0,05$) sowie bei nichtnormalverteilten Daten durch Anwendung des Mann-Whitney-Tests ($p < 0,05$) ermittelt.

Um vergleichend den Grad der Gehaltserniedrigungen von 5-HT sowie 5-HIAA in den einzelnen Regionen nach den drei Zeiträumen der Läsionswirkung zu erfassen, wurden die

Gehalte nach Läsion in Bezug zur scheinläderten Gruppe in Prozent dargestellt. Grundlage der Prozentangabe sind die Medianwerte der Gruppen.

5.3. Kontinuierliche Amperometrie

Es wurden während eines Versuches pro Tier zwanzig Messungen (elektrische Stimulation und Aufzeichnung der DA-Ausschüttung und -Wiederaufnahme) vorgenommen, jeweils zehn Messungen vor und zehn nach Verabreichung von GBR 12909 bzw. Fluoxetine, d.h. vor und nach Blockade der DAT- bzw. 5-HT-Transporter. Die gemessenen DA-Clearance-Kurven wurden mit Hilfe eines mathematischen Computerprogramms (Mathematika 2.0) an eine Kurve pseudo-erster Ordnung angepasst und die Geschwindigkeitskonstante k [1/s] des DA-Uptakes errechnet. Von den zwanzig bestimmten Geschwindigkeitskonstanten eines Tieres wurde das arithmetische Mittel der ersten zehn vor Substanzgabe bzw. der folgenden zehn nach Substanzgabe gebildet. Bei Versuchen unter Anwendung von GBR 12909 ist die Differenz dieser Mittelwerte, als Ausdruck des hochaffinen DA-Uptakes, der Basiswert, der dem Vergleich der einzelnen Tiergruppen zu Grunde liegt. Abbildung 12 zeigt ein Beispiel der DA-Clearance-Kurven vor und nach Gabe von GBR 12909 und die zur mathematischen Auswertung herangezogene Teilkurve.



Die statistische Auswertung der Daten wurde mit dem Programm Sigma Stat (Version 1.0) vorgenommen.

1. Bestimmung der DA-Clearance vor und nach Applikation von GBR 12909

Mit Hilfe einer einfachen Varianzanalyse ($p < 0,05$) wurde zunächst geprüft, ob zwischen den 3 Tiergruppen (lädierte Tiere, scheinlädierte Tiere und unbehandelte Kontrollen) vor bzw. nach GBR-Gabe signifikante Unterschiede feststellbar sind. Im Falle eines positiven Ergebnisses wurde im Weiteren mittels Student-Newman-Keuls-Test ($p < 0,05$) der Vergleich der einzelnen Gruppen vorgenommen. Da in zwei Fällen die Daten nicht normalverteilt waren (1.: MRN/ Jungtiere/ 9 Wo nach Läsion/ vor GBR 12909-Gabe; 2.: DRN/ Adulte/ 9Wo nach Läsion/ nach GBR 12909-Gabe), wurde für den statistischen Vergleich dieser Gruppen eine verteilungsunabhängige Varianzanalyse (Kruskal-Wallis-Test; $p < 0,05$) sowie der Dunns-Test ($p < 0,05$) herangezogen.

2. Charakterisierung der striatalen DAT-Blockade

Unter Anwendung des Student-t-Tests für gepaarte Daten wurde festgestellt, ob nach GBR-12909-Behandlung, d.h. nach Inhibition des hochaffinen DA-Uptakes, signifikante Veränderungen der DA-Clearancerate bei den einzelnen Tiergruppenpaaren (unbehandelte, scheinlädierte und lädierte Tiere; vor und nach GBR 12909-Gabe) auftraten. Drei Gruppen zeigten keine Normalverteilung der Daten (1. u. 2.: MRN/ Jungtiere/ 3 Wo Läsionsdauer/ scheinlädierte u. lädierte Tiere; 3.: MRN u. DRN/ Adulte/ 3Wo Läsionsdauer/ unbehandelte Kontrollen), hier wurde der nichtparametrische Wilcoxon-Test für Datenpaare verwendet.

Um einen vergleichenden Eindruck zu erhalten, in welchem Maß die DAT-Blockade die DA-Clearancerate bei den drei Tiergruppen eines Zeitabschnittes verändert, wurde auf Basis der Medianwerte die herabgesetzte DA-Clearancerate unter GBR 12909-Wirkung in Prozent ermittelt.

3. Bestimmung des hochaffinen DA-Uptakes

Durch einfache Varianzanalyse ($p < 0,05$) bzw. Student-Newman-Keuls-Test ($p < 0,05$) wurden signifikante Unterschiede zwischen den 3 Tiergruppen (lädierte Tiere, scheinlädierte Tiere und unbehandelte Kontrollen) ermittelt. In zwei Fällen zeigten die Werte keine Normalverteilung (1.: DRN/ Jungtiere/ 9 Wo Läsionsdauer; 2.: DRN/ Adulte/ 3 Wo Läsionsdauer). Für die statistische Auswertung dieser Gruppen wurde der nichtparametrische Kruskal-Wallis-Test ($p < 0,05$) sowie der Dunns-Test ($p < 0,05$) verwendet.

4. Bestimmung der DA-Clearance vor und nach Applikation von Fluoxetin

Die statistische Auswertung der Fluoxetin-behandelten Tiergruppe erfolgte mit dem Student-t-Test für Datenpaare.