

Altersabhängige Veränderungen
von Immunsystem und Verhalten weiblicher
Tupajas (*Tupaia belangeri*)

DIPLOMARBEIT

vorgelegt von

Christian Münkel

angefertigt am Lehrstuhl Tierphysiologie
der Universität Bayreuth
2005

Für Ulrike

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Warum wurde diese Untersuchung an <i>Tupaia belangeri</i> durchgeführt?	2
1.2	Physiologische Veränderungen im Alter	3
1.3	Verhalten im Alter	3
1.4	Altersabhängige Reaktionen auf Stress	4
1.5	Fragestellung	5
2	Tiere, Material & Methoden	6
2.1	Tiere	6
2.2	Haltungsbedingungen	7
2.3	Versuchsdurchführung	9
2.3.1	Versuchsteil 1: Veränderung im Alter unter Haltungsbedingungen	9
2.3.2	Versuchsteil 2: Altersabhängige Veränderung der Reaktion auf nicht sozialen Streß	9
2.4	Verhaltensuntersuchungen	10
2.4.1	Verhaltensaufnahme in den Haltungsräumen	10
2.4.2	Verhaltensaufnahme in den Versuchsräumen	10
2.4.3	Aufgenommene Verhaltensweisen	11
2.4.4	Auswertung der Videoaufnahmen	12
2.5	Aufnahme physiologischer Daten	12
2.5.1	Körpermasse	12
2.5.2	Blutabnahme	12
2.5.3	Immunologische und hämatologische Untersuchungen	14
2.5.3.1	Zellzahlbestimmung	14
2.5.3.2	Zellpopulationen des Vollblutes (Differentialblutbild)	14
2.5.3.3	Gewinnung Lymphozyten-Suspension (Dichtegradientenzentrifugation)	16
2.5.3.4	Lymphozytentransformationstest (LTT) von isolierten Zellen	17
2.5.3.5	Lymphozytentransformationstest mit Vollblut	18
2.5.3.6	In vitro-Phagozytosekapazität (Chemilumineszenstest) aus Vollblut	20
2.5.3.7	Klassische Komplementbindungsreaktion (CH ₅₀ -Test)	21
2.5.4	Endokrine Untersuchungen	25
2.6	Mathematik, Statistik und Darstellungsweise	28
3	Ergebnisse	29
3.1	Ergebnisse unter Haltungsbedingungen (Versuch 1)	29
3.1.1	Altersabhängige Unterschiede im Verhalten (Haltungsbedingungen)	29
3.1.2	Physiologische Veränderungen in Abhängigkeit vom Alter (unter Haltungsbedingungen)	33

3.1.2.1 Körpergewicht.....	33
3.1.2.2 Immunologische und hämatologische Parameter	33
3.1.2.3 Endokrine Parameter.....	36
3.2 Vergleich der Ausgangswerte von 8 Uhr und 12 Uhr.....	38
3.3 Altersabhängige Reaktionen auf nicht sozialen Stress (Versuch 2)	39
3.3.1 Altersabhängige Unterschiede im Verhalten	39
3.3.2 Altersabhängige Veränderung der Reaktion physiologischer Parameter (Umsetzphase).....	41
3.3.2.1 Körpermasse.....	41
3.3.2.2 Immunologische und hämatologische Parameter	42
3.3.2.3 Endokrine Parameter.....	43
4 Diskussion.....	46
4.1 Altersabhängige Veränderungen unter Haltungsbedingungen	46
4.1.1 Verhalten	46
4.1.2 Physiologie.....	48
4.2 Altersabhängig veränderte Reaktionen auf den Umsetzversuch.....	52
4.3 Schlussbetrachtung.....	54
5 Zusammenfassung.....	55
6 Anhang	56
6.1 Verwendete Abkürzungen.....	56
6.2 Geräte.....	57
6.3 Originaldaten.....	58
6.3.1 Versuch 1 (Haltungsbedingungen).....	58
6.3.1.1 Verhaltensdaten.....	58
6.3.1.2 Physiologische Daten	59
6.3.2 Versuch 2 (Umsetzphase)	63
6.3.2.1 Verhaltensdaten.....	63
6.3.2.2 Immunologische und hämatologische Parameter	64
7 Literaturverzeichnis	70

1 Einleitung

Aging is: „an increased liability to die, or an increasing loss of vigour, with increasing chronological age, or with the passage of the life cycle“ (COMFORT, 1960)

Sollte die derzeitige demographische Entwicklung eines generellen Geburtenrückgangs und einer wachsenden Lebenserwartung im Alter keine Änderung erfahren, sagen Prognosen eine dramatische „Überalterung“ der westlichen Gesellschaft voraus: Ein fünftel der Bürger wird dann über 65 Jahre alt sein (FURGUSON 1995; MAC GREGOR 1990). Diese Entwicklung wird insbesondere auf viele medizinische Fortschritte in der Vorbeugung und Behandlung von infektiösen Erkrankungen zurückgeführt.

Doch trotz der zentralen Bedeutung des Alterns für den Menschen sind die physiologischen Mechanismen, die zum Altern der Lebewesen und letztlich zu ihrem Tod führen, weitgehend unbekannt. Zwar gibt es die verschiedensten Hypothesen über die dem Altern zu Grunde liegenden Prozesse, doch keine kann auch nur einigermaßen als belegt oder allgemein gültig gelten. Selbstverständlich müssen Altern und Seneszenz letztlich auf Prozesse zurückzuführen sein, die auf zellulärer und subzellulärer Ebene ablaufen. Entsprechend werden gerade derartige Prozesse *in vivo* und - insbesondere - *in vitro* sehr intensiv untersucht (z.B. an Zellkulturen von Fibroblasten). Doch muss man sich über die Grenzen dieses Forschungsansatzes gerade im Bereich der Altersforschung im Klaren sein: Unterschiedliche Zelltypen altern selbst *in vitro* sehr unterschiedlich, *in vivo* gibt es sogar Zellen, die kaum altern, obwohl sie sich nicht teilen können (Nervenzellen). Es ist auch keineswegs geklärt, ob nicht eher eine Verschlechterung zentralnervöser oder endokriner, immunologischer oder sonstiger Regulationsprozesse für das Altern verantwortlich ist, als definierte zelluläre Prozesse (Übersicht: ARKING 1991; S. 283-284).

So stirbt heute etwa die Hälfte aller Menschen westlicher Industrienationen an Herz-Kreislaufkrankungen, an deren Entstehung neben genetischen Prädispositionen Umweltfaktoren einen entscheidenden Anteil haben. Es nehmen jedoch auch solche Erkrankungen zu, die für ältere Menschen typisch sind und an deren Entstehung oder Verlauf das Immunsystem beteiligt ist, wie die verschiedensten Krebsformen sowie Autoimmunkrankheiten (MC GLAUCHLEN & VOGEL 2003). In wieweit die Zunahme dieser Erkrankungen jedoch altersbedingt ist oder auf Außeneinflüsse zurück-

geht, die im Laufe des Lebens auf die Individuen einwirken, kann nicht entschieden werden, zumal sich gerade beim Menschen Ernährungs- und Lebensgewohnheiten ebenso wie verschiedene Umwelteinflüsse in den letzten Jahrzehnten stark verändert haben.

Um daher Aufschluss über altersabhängige Veränderungen zu erlangen, müssen Untersuchungen an Tieren durchgeführt werden, die unter standardisierten Bedingungen (konstantes Klima und Temperatur) gehalten werden. Dies ist jedoch aus finanziellen Gründen meist nur an relativ kurzlebigen Standardlabortieren wie Laborratten und Labormäusen möglich.

Im Rahmen meiner Diplomarbeit untersuchte ich daher altersabhängige Veränderungen an weiblichen Tupajas (*Tupaia belangeri*), die von ihrer Geburt an unter konstanten Laborbedingungen gehalten worden waren.

1.1 Warum wurde diese Untersuchung an *Tupaia belangeri* durchgeführt?

Die in diesem Versuch eingesetzten *Tupaia belangeri* gehören zur Ordnung Scandentia (Spitzhörnchen), welche in 5 Gattungen mit insgesamt 19 Arten eingeteilt wird. Spitzhörnchen sind etwa eichhörnchengroße, tagaktive Säugetiere, die in Südostasien weit verbreitet sind. Dort leben sie als Paare in festen Revieren, welche sie gegen Artgenossen des gleichen Geschlechts heftig verteidigen (KAWAMICHI & KAWAMICHI 1979). Sie ernähren sich von Insekten, Früchten, Samen und Knospen (MARTIN 1968).

Spitzhörnchen sind besonders in den Focus von Altersforschern geraten, weil sie phylogenetisch (Karyogramm Vergleiche) näher mit dem Menschen verwandt sind als dies Mäuse und Ratten sind (MÜLLER et al. 1999; PRIMMER 2002). Zudem werden Tupajas für ein Tier ihrer Größe sehr alt. Neuere Untersuchungen legen sich auf ein maximales Lebensalter abhängig von der Art auf 10-14 Jahre fest (PRIMMER 2002). Die in der Studie verwendete Art (*Tupaia belangeri*) ist anderen Scandentia Arten aufgrund der stabilsten Sterberate in den ersten 3-4 Lebensjahren als Modelorganismus vorzuziehen. Zudem werden sie schon seit den sechziger Jahren intensiv untersucht (v. HOLST 1972, 1998), es liegen daher umfassende Kenntnisse über ihr Ver-

halten (u.a. SPRANKEL 1961; MARTIN 1968; v. HOLST 1975, 1997) und die verschiedensten physiologischen Parameter vor. Zudem ist es möglich, Tupajas einzeln zu halten; dies gestattet es, ihr Verhalten ohne Störungen (z.B. durch Interaktionen mit Artgenossen) aufzuzeichnen.

1.2 Physiologische Veränderungen im Alter

Das Immunsystem unterliegt im Alter vielfältigen Veränderungen (GLOBERSON & EFFROS 2000). Dies ist vor allem für den Menschen von großer Bedeutung, da mit der Alterung Erkrankungen zunehmen, an deren Entstehung und Verlauf das Immunsystem beteiligt ist (s. oben). Untersuchungen über derartige altersabhängige Veränderungen wurden unter standardisierten Laborbedingungen u. a. an Mäusen durchgeführt (HIROKUWA & UTSAMA 2002). Die Autoren fanden eine signifikante Verschlechterung der Lymphozytenproliferationsfähigkeit mit zunehmendem Alter; ebenso wie zuvor bei Hunden auch STRASSER et al. (2000: Labrador Retriever). Entsprechende Befunde stammen auch von Pavianen (JAYASHANKAR 2003) und dem Menschen (KRAUSE et al. 1999; STRAUB 2001). Das spezifische Immunsystem nimmt also in seiner Aktivierbarkeit ab. Strasser et al. (2000) fanden zudem eine höhere Komplementaktivität bei Hunden im Alter.

Auch endokrine Parameter dürften altersabhängigen Veränderungen unterliegen, allerdings sind die Befunde widersprüchlich: Während manche Autoren z.B. bei Labornoten erhöhte Serumkonzentrationen von Corticosteron im Alter fanden, konnten andere Untersuchungen diese Befunde nicht bestätigen (Übersicht MASARO 1995). Diese Widersprüche könnten auf Unterschieden in Geschlecht oder Stamm der untersuchten Tiere beruhen (De KLOET 1992) oder auf unterschiedliche Zeitpunkte der Blutentnahmen. Im Vergleich hierzu sind Befunde bei Primaten einheitlich: Mensch, Rhesusaffen und Makaken zeigen keine erhöhten Cortisol-Werte im Alter.

1.3 Verhalten im Alter

Das Alter hat natürlich auch einen entscheidenden Einfluss auf das Verhalten von Individuen. Eine Untersuchung an Primaten zeigte eine Abnahme des Sexualverhalten und des aggressiven Verhalten gegenüber gleichaltrigen Artgenossen (AUJARD & PERRET 1998). Untersuchungen an weiblichen Ratten zeigten eine Abnahme der

Fellpflege (SCIMONELLI et al. 1998). Weiterhin fanden diese und andere Autoren (CHEN 2000; MEAD 1994; GATTERMAN 2003; EMBORG 1998) eine Abnahme der Lokomotion mit dem Alter bei Mäusen, Gerbils, Goldhamstern und Rhesus Affen. Vergleichbare Veränderungen belegen SIWAK et al. (2002) bei Hunden: Junge Beagle waren wesentlich aktiver, spielten mehr und erkundeten eine neue Umgebung stärker als ihre älteren Artgenossen. Bei älteren Tieren ging die Abnahme der Lokomotion mit längeren Ruhephasen einher.

1.4 Altersabhängige Reaktionen auf Stress

Stress hat genau wie das Altern Einfluss auf das Immunsystem. Werden Tiere irgendeiner Belastung ausgesetzt, zeigen sie verschiedene Stresssymptome. Der dabei wirkende Stress kann z. B. durch Artgenossen ausgelöst werden. Hierbei spielen vor allem Konfrontationen eine wichtige Rolle, bei denen Dominanzbeziehungen zwischen gleichgeschlechtlichen Artgenossen geklärt werden (v. HOLST 1972). Der Stress führt zu Verhaltensänderungen der unterlegenen Tiere; dies äußert sich beispielsweise in einer Reduktion ihrer Mobilität (v. HOLST 1972). Veränderungen zeigen sich auch auf physiologischer Ebene. Bei Stress kommt es zu einer Abnahme der Körpermasse (ZELENA 1999), einem Absinken der Lymphozytenzahl und deren Aktivierbarkeit (v. HOLST 1997; KAISER 1996; STEFANSKI 2001). Eine Abnahme der Aktivität fand man auch bei den Natürlichen Killerzellen (STEFANSKI 1998) und beim Komplementsystem (COE 1988). Stress ist zudem mit einem Anstieg der Nebennierenrindenhormone verbunden (AYENSU et al. 1994; COLLINS 1997; OTTEN et al. 2002).

1.5 Fragestellung

In dieser Arbeit sollten weibliche *Tupaia belangeri* hinsichtlich möglicher altersabhängiger Veränderungen in ihrem Verhalten und einigen physiologischen Parametern untersucht werden.

Es wurden folgende Fragestellungen bearbeitet:

1. Zeigen Tupajas mit zunehmendem Alter Veränderungen in ihrem Verhalten?
2. Finden sich bei Tupajas Zusammenhänge zwischen Alter und Immunparametern?
3. Verändern sich endokrine Parameter im Alter?
4. Reagieren Tupajas altersabhängig unterschiedlich in ihrem Verhalten und einigen physiologischen Parametern auf eine leichte, nicht soziale Belastung?

2 Tiere, Material & Methoden

2.1 Tiere

Als Versuchstiere wurden insgesamt 36 weibliche Tupajas (*Tupaia belangeri*) verwendet, die ausschließlich der institutseigenen Zucht des Lehrstuhls für Tierphysiologie in Bayreuth entstammten. Die Tiere waren zu Beginn der Untersuchung zwischen 3 Monaten und 7 Jahren alt. Ein Teil der Tiere war sozial unerfahren. Tabelle 1 gibt das Alter der Versuchstiere wieder.

Tabelle 1: Aufstellung aller Tiere und deren Alter mit Geburtsdatum.

Tier	Geburtsdatum	Alter zu Beginn der Versuche [Monate]
Bt 852	Mär 1998	83
Bt 871	Jun 1998	79
Bt 875	Jul 1998	79
Bt 887	Okt 1998	79
Bt 890	Okt 1998	75
Bt 902	Jan 1999	73
Bt 910	Feb 1999	72
Bt 926	Mai 1999	69
Bt 939	Okt 1999	64
Bt 942	Nov 1999	63
Bt 945	Nov 1999	62
Bt 948	Dez 1999	61
Bt 954	Feb 2000	60
Bt 986	Aug 2000	53
Bt 991	Okt 2000	52
Bt 996	Nov 2000	50
Bt 1001	Nov 2000	50
Bt 1005	Dez 2000	50
Bt 1022	Mär 2001	47
Bt 1110	Jul 2002	30
Bt 1117	Aug 2002	30
Bt 1124	Okt 2002	27
Bt 1148	Mär 2003	23
Bt 1209	Dez 2003	13
Bt 1225	Mär2004	11
Bt 1229	Mär 2004	11
Bt 1243	Apr 2004	10
Bt 1245	Apr 2004	10
Bt 1253	Jul 2004	8
Bt 1260	Aug 2004	7
Bt 1265	Aug 2004	7

Fortsetzung Tabelle 1: Aufstellung aller Tiere und deren Alter mit Geburtsdatum.

Tier	Geburtsdatum	Alter zu Beginn der Versuche [Monate]
Bt 1266	Aug 2004	7
Bt 1269	Aug 2004	7
Bt 1270	Aug 2004	7
Bt 1271	Aug 2004	7
Bt 1286	Nov 2004	3

2.2 Haltungsbedingungen

Vor und während des Versuchs lebten die Tiere in Einzelkäfigen (69×49×49cm; Eigenbau) mit Front-, Decken-, und Bodengittern aus rostfreien Drahtgitter und Seitenwänden aus Holz.

Die Haltungskäfige waren mit einem Kletterast, einem Futterkasten, einer Wasserflasche und einem verschließ und abnehmbaren Schlafkasten ausgestattet der auch dem Transport der Tiere diente. Unter den Käfigen befanden sich Kotwannen, die monatlich gewechselt wurden.

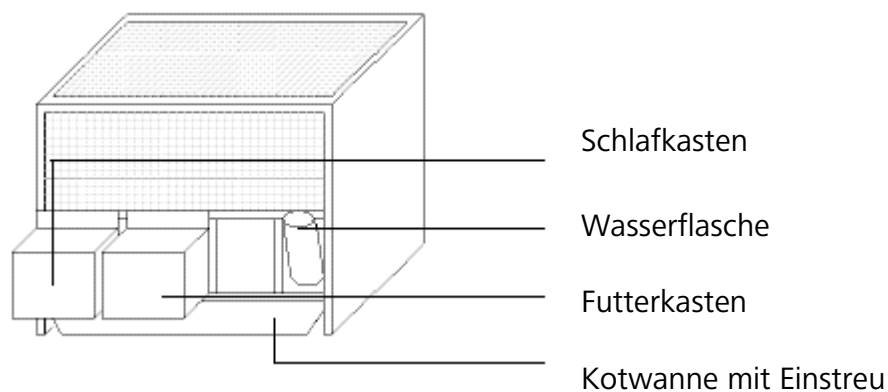


Abb. 1: Skizze eines Haltungskäfigs ; Vorderansicht

Alle Versuchstiere waren in Käfigen der oben beschriebenen Bauart, in insgesamt 8 verschiedenen Räumen unter identischen Haltungsbedingungen untergebracht.

In den Haltungsräumen herrschte ein künstlicher Tag-Nacht-Rhythmus von 12:12 Stunden (Hellphase: von 10.00-22.00 Uhr). Die Raumtemperatur betrug $25\pm 1^\circ\text{C}$ bei einer relativen Luftfeuchte von 40-60%. Den Tieren stand Wasser und standardisier-

tes Futter (altromin® 6023, Haltungsdiät Affen, Altromin GmbH) ad libitum zur Verfügung.

Für die Versuche unter Einfluss von nicht sozialem Stress („Umsetzversuche“) wurden die Tiere aus den Haltungsräumen in Versuchsräume mit speziellen Beobachtungskäfigen umgesetzt. Diese entsprachen in ihrem Aufbau zwei spiegelverkehrt aneinandergesetzten Haltungsraumkäfigen; Trinkflaschen, Schlaf und Futterkästen waren an der Rückfront abnehmbar angebracht, Bodendraht und Kotwanne waren durchgehend. Die Käfighälften waren durch eine Holzwand getrennt. Ein Sichtkontakt zwischen den 2 Tieren in einem Beobachtungskäfig war nicht möglich.

2.3 Versuchsdurchführung

Diese Untersuchung besteht aus zwei Versuchsteilen.

2.3.1 Versuchsteil 1: Veränderung im Alter unter **Haltungsbedingungen**

Von allen 36 Tieren wurden individuelle Werte der untersuchten physiologischen Parameter bestimmt. Diese Werte werden im Folgenden als 8h Ausgangswert (AGW_{8h}) bezeichnet.

Mindestens vierzehn Tage nach der Blutabnahme wurde von jedem Versuchstier eine gesamte Aktivitätsphase (12h, 10.00-22.00 Uhr) im Heimatkäfig mit einer Videokamera aufgezeichnet.

2.3.2 Versuchsteil 2: **Altersabhängige Veränderung der Reaktion auf nicht sozialen Streß**

Im zweiten Versuchsteil wurden die Tiere einer akuten nicht sozialen Stresssituation ausgesetzt. Hierfür wurden die Tiere zu Beginn der Hellphase für zwei Stunden (10.00-12.00 Uhr) in eine ihnen unbekannte Umgebung umgesetzt (Versuchsräume). Das Verhalten der Tiere wurde über die gesamte Dauer der Umsetzphase als Videoaufnahme festgehalten.

Im Anschluss an die Umsetzphase (12h) wurde von allen Tieren eine Blutprobe entnommen, um individuelle Werte der untersuchten physiologischen Parameter zu bestimmen.

Mindestens vierzehn Tage vor dem zweiten Versuchsteil wurden von jedem Tier die physiologischen Parameter um 12 Uhr bestimmt (AGW_{12}).

2.4 Verhaltensuntersuchungen

Von den Versuchstieren wurden in ihren Heimatkäfigen und während der Zeit in den Versuchsräume (Umsetzphase) das Verhalten mit Hilfe einer Videokamera aufgezeichnet.

2.4.1 Verhaltensaufnahme in den Haltungsräumen

Das Verhalten der Tiere in ihrem Haltungskäfig wurde mit Hilfe einer über dem Käfig angebrachten Miniatur-Kamera aufgezeichnet mit der alle Bereiche des Käfigs eingesehen werden konnten.

Die Kamera wurde bereits 24 Stunden vor der Aufzeichnung am Käfig montiert, da Vorversuche gezeigt hatten, dass nach dieser Zeit der Gewöhnung ein unbeeinflusstes Verhalten der Tiere zu beobachten ist.

2.4.2 Verhaltensaufnahme in den Versuchsräumen

Die Versuchsräume waren durch eine Trennwand mit einer verspiegelten Einwegscheibe in einen eigentlichen Versuchsraum, in dem sich der Beobachtungskäfig befand, und einen Beobachtungsraum getrennt. Im Beobachtungsraum wurde eine Videokamera mit Stativ eingesetzt, um das Verhalten der Tiere auf Videoband aufzuzeichnen.

2.4.3 Aufgenommene Verhaltensweisen

Bei der Auswertung mittels point-sampling wurden die unterstrichenen Verhaltensweisen aufgenommen, die übrigen Verhaltensweisen wurden nur bei der detaillierten continuous-sampling Methode berücksichtigt.

<u>„Ruhem“:</u>	Das Tier liegt mit geschlossenen Augen auf dem Boden bzw. auf dem Ast, dabei liegt der Kopf auf der Unterlage.
<u>„Verweilen“:</u>	Das Tier liegt oder steht still an einem Ort, dabei sind die Augen offen, der Kopf kann sich bewegen
<u>„Fressen“:</u>	Jede Aufnahme fester Nahrung (Pellets, Kot)
<u>„Trinken“:</u>	Jede Aufnahme von Wasser aus den Trinkflaschen
<u>„Putzen“:</u>	Das Tier reinigt sich mit Hilfe seiner Zähne, Pfoten oder der Zunge.
<u>„Kasten“:</u>	Das Tier befindet sich in seinem Schlafkasten
<u>„Lokomotion“:</u>	Das Tier verändert seine Position um mindestens eine Körperlänge
<u>„Exploration“:</u>	Das Tier läuft langsam durch den Käfig und bewegt den Kopf.
<u>„Turnen“:</u>	Das Tier vollführt einen schnellen Bewegungsablauf (“Salto”). Ein Ablauf umfaßt die Berührung von mindestens 3 Flächen (z.B. Boden, Wand, Decke)
<u>„Markieren“:</u>	Reiben von Bauch- oder Sternaldrüse an Käfig oder Ast

2.4.4 Auswertung der Videoaufnahmen

Sowohl das Verhalten der Tiere in den Haltungsräumen (12 Stunden), als auch die Phase des „Umsetzens“ (2 Stunden) wurden auf Videoband aufgezeichnet und ausgewertet.

Die Bestimmung von Verhaltensanteilen geschah mit einer Kombination aus „point-sampling“ für langandauernde- und „continuous-sampling“ für kurze Verhaltensweisen gewählt. Aufgrund von Erfahrungswerten wurde bei der „point-sampling“ Methode im Intervall von einer Minute während der gesamten Lichtphase vermerkt, welche Verhaltensweise die Tiere zu genau diesen Zeitpunkten zeigten.

Die Anzahl der kurzen Verhaltensweisen (Turnen, Markieren) wurde über die gesamte Lichtphase gezählt.

2.5 Aufnahme physiologischer Daten

Die einzelnen Testverfahren und ihre Bedeutung werden im Folgenden beschrieben. Alle verwendeten Geräte werden im Anhang aufgeführt.

2.5.1 Körpermasse

Die Tiere wurden mit Hilfe einer elektronischen Waage auf ± 1 g gewogen.

2.5.2 Blutabnahme

Materialien

- Skalpellklingen (doppelseitig)
- Heparinlösung (620 IU in 0,9% NaCl-Lösung; Sigma)
- 5ml –Spritzen (Becton-Dickinson) mit 0,5 ml Heparinlösung
- Reaktionsgefäß (1,5ml; Eppendorf)
- K₂-EDTA-Lösung (500mg/0,9%NaCl ml; Sigma)

Durchführung

Die Blutabnahmen für den 1. Versuchsteil erfolgten jeweils um 8 Uhr, d.h. zwei Stunden vor Beginn der Aktivitätsphase. Die Blutabnahmen für den 2. Versuchsteil erfolgten um 12 Uhr, also jeweils direkt nach der „Umsetzphase“, bzw als Ausgangswert 14 Tage vor Versuchsbeginn.

Die Tiere wurden in ihrem Schlafkasten eingesperrt und in ein Labor gebracht. Dort wurde der Schwanz mit Vaseline eingerieben und mit Hilfe einer doppelseitigen Skalpellklinge der Schwanzvenenplexus punktiert. Das austretende Blut wurde wie folgt verteilt:

Ca. 300 μ l in ein mit 10 μ l K_2 -EDTA-Lösung befülltes Reaktionsgefäß, zur Bestimmung der Leukozytenzahl,

ca. 200 μ l in ein leeres Reaktionsgefäß zur Bestimmung der Kortikosteroide und Östrogen-Konzentration,

ca. 50 μ l in ein Reaktionsgefäß ohne Antikoagulans zur Bestimmung der Komplementaktivität,

ca 500 μ l in eine mit 500 μ l Heparin-Lösung befüllte 5ml Spritze zur Bestimmung immunologischer Parameter.

Die Entnahme der Proben für die Hormon-Bestimmungen war stets innerhalb von drei Minuten nach Betreten des Haltungs- bzw. Versuchsraumes abgeschlossen (siehe: 2.6.4)

2.5.3 Immunologische und hämatologische Untersuchungen

In dieser Untersuchung wurde die Zahl der Leukozyten im Blut, die in vitro Lymphozytenproliferationsfähigkeit und die in vitro Phagozytoseaktivität bestimmt. Zudem wurden Blutausstriche angefertigt, um Anhand von Differentialblutbildern die Zellpopulation bestimmen zu können.

2.5.3.1 Zellzahlbestimmung

Materialien

- Coultergefäße (Coulter)
- Isoton Lösung (FACS-Flow™, Becton Dickinson)
- Lyseagenz (ZAP-OGlobin®, Coulter Electronics Ltd.)

Durchführung

Zellzahlbestimmungen, wie z.B. die der Leukozyten oder der Zellzahl in der Lyphozytenbande (vgl. 2.6.3.3), wurden mit Hilfe eines elektronischen Partikelzählgerätes auf der Basis der Leitfähigkeitsänderung in Abhängigkeit von der Partikelgröße durchgeführt. Die Erythrozyten werden mittels Diskriminatoren, in dieser Untersuchung ein Lyseagenz, von der Zählung ausgeschlossen.

20µl der zu messenden Suspensionen (EDTA Blut, heparinisieretes Blut, Zellsuspension) wurden invers zu 10ml Isoton-Lösung pipettiert und vorhandene Erythrozyten durch Zugabe von vier Tropfen Lyseagenz diskriminiert. Anschließend wurden die Proben in den Meßbereichen 3.75-4,1µm und über 4,1µm ausgezählt; das Zählergebnis entspricht der Zellzahl pro Mikroliter Blut bzw. Medium.

2.5.3.2 Zellpopulationen des Vollblutes (Differentialblutbild)

Materialien

- Objektträger
- May-Grünwald-Lösung (Merck)
- Giemsa-Lösung (Merck)
20ml Giemsa (filtriert) in 180ml Aqua bid.
- Aqua bidest.

Durchführung

Da für Tupajas keinerlei Antikörper gegen Membran-Marker erhältlich sind, wurden die Zellpopulationen aus dem Differentialblutbild nach einer vorhergehenden panoptischen Färbung nach Pappenheim (siehe RICK 1974) bestimmt.

Diese Färbemethode beruht auf dem Zerfall der Farbstoffe in wässrigen Lösungen in einen aktiven, den Farbstoffträger und einen inaktiven Teil. Der Farbstoffträger und die Zellinhalte bilden ein Farbsalz. Da saure Farbstoffe einen negativ geladenen aktiven Teil bilden, färben sie positiv geladene Eiweißstrukturen an. Basische Farbstoffe (Methylenblau) bilden positive aktive Farbstoffträger und färben demzufolge negativ geladene Eiweißstrukturen. Die Farbsalzbildung schafft somit die Grundlage der panoptischen Färbung (BAAKE & GILLES, 1994).

Die Blutausstriche wurden mit ca. 15µl des EDTA-Blutes angefertigt, einen Tag luftgetrocknet und anschließend für je 5 Minuten mit unverdünnter und 1:1 verdünnter (Aqua bidest.) May-Grünwald-Lösung gefärbt, anschließend wurden die Ausstriche in Aqua bidest. gespült. Danach wurden sie nochmals für 20 Minuten in frisch angesetzter Giemsa-Lösung gefärbt. Abschließend wurden die Objektträger noch zweimal mit Aqua bidest. gespült und dann bis zur mikroskopischen Auswertung lichtgeschützt gelagert.

Für die Färbung der Lymphozytenbanden-Ausstriche (vgl. 2.6.6) wurden die Färbzeiten wie folgt verändert: je 2 Minuten in unverdünnter und 1:1 verdünnter Maygrünwald-Lösung und 5 Minuten in der Giemsa-Lösung. Ansonsten wurde wie bei der Färbung der Blutausstriche vorgegangen. Die Bestimmung der Anteile der verschiedenen Leukozytenpopulationen erfolgte unter dem Mikroskop bei 1250facher Vergrößerung. Pro Blut-Ausstrich wurden 100 Leukozyten anhand von Form, Farbe und spezifischer Anfärbbarkeit in segmentkernige, basophile und eosinophile Granulozyten, Lymphozyten und Monozyten differenziert. Um die Reproduzierbarkeit der Zählergebnisse sicherzustellen, wurden bei jeder Auszählung neuer Ausstriche zwei ältere nochmals gezählt. Bei den Lymphozytenbanden-Ausstrichen wurden ebenfalls 100 Zellen ausgezählt, um die Bestimmung des Reinheitsgrades der Lymphozytenbande zu ermitteln.

2.5.3.3 Gewinnung Lymphozyten-Suspension (Dichtegradientenzentrifugation)

Materialien

- Percoll Trennlösung® (Dichte 1,077g/ml, seromed)
- sterile Zentrifugenröhrchen
- Plastik Reaktionsgefäß (15ml)
- Medium RPMI-1640 (Sigma, Biochrom KG,
5,5g/l NaCl, w 5mg/l Phenol Red
w2,0g/l NaHCO₃, w 25mM Hepes,
w 0,530 g/l N-Acetyl-L-alanyl-Iglutamine)
- FKS: fetales Kälberserum hitzeinaktiviert (Sigma)

Durchführung

Aufgrund einer höheren Dichte der Erythrozyten, Granulozyten und Monozyten im Vergleich zu den Mononukleiden (Lymphozyten) ist es möglich, diese durch die Dichtegradientenzentrifugation zu isolieren. Die Lymphozyten akkumulieren sich aufgrund ihrer geringeren Dichte im Vergleich zum Trennmittel auf dessen Interphase zum Serum.

Die Aufarbeitung des Blutes erfolgte unter sterilen Bedingungen. Aus dem peripheren Blut der Versuchstiere wurden etwa 1 ml heparinisiertes Vollblut (Spritze) mit Medium RPMI auf ein Endvolumen von 4ml verdünnt und vorsichtig auf eine in Zentrifugenglasröhrchen befindliche Percoll-Trennlösung im Verhältnis 1:1 überschichtet. Nach 20minütiger Zentrifugation (450g, Raumtemperatur, ohne Bremse) wurde die Lymphozytenbande vorsichtig mit einer Pipette abgezogen und in einem Plastikreaktionsgefäß mit 4ml Medium RPMI 1640 gewaschen (Zentrifugation: 250g, 10 Min, Raumtemperatur). Anschließend wurde das Pellet in 100µl FKS und 400µl Medium⁺⁺ resuspendiert.

Mit 15µl dieser Suspension wurde ein Ausstrich angefertigt, welcher über einer Bunsenbrennerflamme hitzefixiert wurde. Dieser Ausstrich diente der Bestimmung der tatsächlichen Lymphozytenkonzentration aus der Dichtegradientenzentrifugation, Diese kann bei Tupajas in einem Bereich von 60-90% schwanken. (Rest: Monozyten, Granulozyten).

20µl der Suspension wurden zur Bestimmung der Zellzahl in Coulter Gefäße pipetiert (vgl. 2.6.3.1).

Anschließend wurde durch Zugabe der entsprechenden Menge Medium⁺⁺ ein Zelltitert von 10⁵ Zellen/150µl eingestellt.

2.5.3.4 Lymphozytentransformationstest (LTT) von isolierten Zellen

Materialien

- Sterile Mikrotiterplatten mit Rundboden
96 Well, U-shaped, Tissue.culture treated (TPP)
- Medium RPMI-1640 (Sigma, Biochrom KG,
5,5g/l NaCl, w 5mg/l Phenol Red W
2,0g/l NaHCO₃, w 25mM Hapes, w 0,530 g/l N-Acetyl-L-alanyl-lglutamine)
- Medium⁺⁺
50ml Medium RPMI-1640
5ml Penicilin (100IU/ml) + Streptomycin (100mg/l)- Solution 2%(Sigma)
5ml fetales Kälberserum hitzeinaktiviert (FKS; Sigma)
- Concanavalin A Gebrauchslösung (ConA; Sigma)
2,5µg/ml
- Methyl ³H-Thymidin Stammlösung
(spez Akt:1Ci/mmol;NEN)
Gebrauchslösung: 20mCi/ml
- Glasfiberfiltermatten (Skatron Instruments)
- Szintillationsröhrchen (Beckmann)
- Szintilationsmittel (Unisafe 1, Zinsser Analytic)

Durchführung

Im Lymphozytentransformationstest von isolierten Zellen wird eine durch polyklonale Mitogene induzierte Proliferation von Lymphozyten gemessen. Die Bestimmung

der Aktivierbarkeit erfolgt unabhängig von Mediatoren, die sich im Blut befinden. Das in diesem Versuch eingesetzte Mitogen Concanavalin A (ConA), ein Lectin aus der Schwertbohne (*Canavalia ensiformes*), stimuliert dabei vor allem in T-Lymphozyten die Teilung und damit auch die Neusynthese von DNA. Im Kulturmedium vorhandenes radioaktiv markiertes Thymidin (Methyl-³H-Thymidin) wird in die neusynthetisierte DNA miteingebaut. Die Menge an eingebautem radioaktivem Thymidin wird anschließend in einem Beta-Counter bestimmt und stellt ein Maß für die Proliferationsfähigkeit der Lymphozyten dar. Der Test wurde nach einer Methode von GILMAN (1982) modifiziert nach SCHÜTT (1991) durchgeführt; alle Arbeitsschritte fanden in einer Sterilbank statt. Pro Versuchstier wurden in fünf Vertiefungen (Wells) einer Rundboden-Mikrotiterplatte jeweils 10^5 Zellen ($150\mu\text{l}$ der auf $10^5/150\mu\text{l}$ eingestellten Suspension; siehe 2.6.3.3) eingesät:

Vier Wells wurden durch die Zugabe von jeweils $25\mu\text{l}$ ConA- $(2,5 \times 10^{-3}\text{mg/well})$ Gebrauchslösung stimuliert, in das fünfte Well (Leerwert) wurden $25\mu\text{l}$ Medium⁺⁺ gegeben. Nach 24 Stunden Inkubation bei 37°C , 5% CO_2 erfolgte die Zugabe von $25\mu\text{l}$ ³H-Thymidingebrauchslösung (0,5 mCi) pro Well und eine weitere Inkubation von 24 Stunden bei 37°C , 5% CO_2 .

Durch Ernten mit einem Cell-Harvester auf Glasfiltermatten wurden die Zellen lysiert und die DNA-haltigen Zellkernreste auf den Filterplättchen fixiert, während Zelltrümmer, Medium und unverbrauchtes ³H-Thymidin den Filter passierten. Nach Überführen der Filterplättchen in Szintillationsröhrchen und der Zugabe von 3ml Szintillationsmittel wurde die Menge an eingebauter Radioaktivität in einem Beta-Counter ermittelt.

2.5.3.5 Lymphozytentransformationstest mit Vollblut

Der Lymphozytentransformationstest mit Vollblut basiert auf den selben Mechanismen wie der LTT mit isolierten Zellen. Der Test mißt die Fähigkeit der Lymphozyten in ihrem natürlichen Medium auf Antigene zu reagieren.

Materialien

- Sterile Mikrotiterplatten mit Rundboden
96 Well, U-shaped, Tissue culture treated (TPP)
- Medium RPMI-1640 (Sigma, Biochrom KG,

5,5g/l NaCl, w %mg/l Phenol Red W
2,0g/l NaHCO₃, w 25mM HEPES, w 0,530
g/l N-Acetyl-L-alanyl-l-glutamine)

- Medium⁺⁺
 - 50ml Medium RPMI-1640
 - 5ml Penicilin (100IU/ml)
 - Streptomycin (100mg/l)-Solution 2%(Sigma)
 - 5ml fetales Kälberserum (FKS; Sigma)
- Heparinisiertes Medium⁺⁺(Medium⁺⁺Hep)
Medium⁺⁺ mit 5 IU/ml Medium
- ConcavalinA Gebrauchslösung(ConA; Sigma)
2,5µg/ml
- Methyl ³H-Thymidin Stammlösung(spez Akt:
1Ci/mmol;NEN)
Gebrauchslsg. (1:50): 1ml Stammlösung + 49ml Medi-
um⁺⁺
- Glasfiberfiltermatten (Skatron Instruments)
- Szintillationsröhrchen (Beckmann)
- Szintilationsmittel (Unisafe 1, Zinsser Analytic)

Durchführung

Für diese Untersuchung wurden aus der Spritze mit heparinisiertem Blut 60µl entnommen und mit 540µl Medium⁺⁺Hep verdünnt. Von dieser Verdünnung wurden 5x100µl pro Tier auf die Mikrotiterplatte gegeben. Vier Wells wurden durch die Zugabe von jeweils 25µl ConA- Gebrauchslösung stimuliert und durch Zugabe von 50µl Medium⁺⁺Hep auf ein ausreichendes Volumen gebracht. In das fünfte Well (Leerwert) wurden 75µl Medium⁺⁺Hep gegeben.

Nach 72 Stunden Inkubation bei 37°C, 5% CO₂ wurden den Proben 25µl Thymidin-Gebrauchslösung zugegeben.

Nach weiteren 24 Stunden Inkubation wurden die Proben geerntet und gezählt (analog zu LTT von isolierten Zellen 2.3.4).

2.5.3.6 In vitro-Phagozytosekapazität (Chemilumineszenstest) aus Vollblut

Materialien

- Medium⁺⁺
 - 50ml Medium RPMI-1640
 - 5ml Penicilin (100IU/ml)
 - Streptomycin (100mg/l)- Solution 2% (Sigma)
 - 5ml fetales Kälberserum hitzeinaktiviert (FKS; Sigma)
- ZymosanA
 - von Saccharomyces cerevisiae 12mg/ml, (PBS; Sigma)
- Lucigenin 5,1mg/ml (Sigma)
- Phagozytoseröhrchen (Berhold)

Die Aktivität phagozytisch aktiver Zelle, vor allem eosinophiler und basophiler Granulozyten, aber auch neutrophiler Granulozyten und Monozyten führt zur Freisetzung hochreaktiver Sauerstoffspezies (O_2^- , H_2O_2 , $^{\circ}OH$, NO). Das Messprinzip dieser Methode beruht auf der Quantifizierung der aktiven Sauerstoffmoleküle mittels Chemilumineszenz. Die Ergebnisse geben Auskunft über die Kapazität der unspezifischen zellulären Immunantwort.

Die Phagozyten werden im Test durch das Antigen ZymosanA angeregt und bilden verstärkt Sauerstoffspezies, welche das chemiluminogene Substrat (Bis-N-methylacridinium-Nitrat = Lucigenin) in einen angeregten Zustand versetzt. Bei Rückkehr in den Grundzustand werden Photonen emittiert, die mit Hilfe von einem Luminescensgerät bei 510nm Wellenlänge detektiert werden können.

Durchführung

Für einen Testansatz wurde in einem Phagozytoseröhrchen 10 μ l Lucigenin und 460 μ l Medium⁺⁺ vorgelegt und nach Zugabe von 20 μ l heparinisiertem Vollblut (aus Spritze) für 30 Minuten vorinkubiert (37°C, 5% CO_2). Die Messung im Luminescensgerät wurde durch Zugabe von Zymosan A gestartet und dauerte 30 Minuten.

2.5.3.7 Klassische Komplementbindungsreaktion (CH₅₀-Test)

Materialien

- Plastikreaktionsgefäß 1,5ml (Eppendorf)
- Heyemsche Lösung
(0,5g NaCl, 2,5g Na₂SO₄, 0,25g HgCl₂ ad
100ml)
- Neubauer-Zählkammer
- Hammelblut (stabilisiert; DADE Behring)
(40 Vol%, Ethacridinlctat, max. 0,18g/l)
- Ambozeptor-Gebrauchslösung
0,4ml Ambozeptor für Schaferythrozyten
(DADEBehring)
mit PBS EDTA-Puffer auf 100ml auffüllen
- Barbiturat-Puffer
4,605g Diacetylbarbitursäure
0,11025g CaCl₂ x 2H₂O
1,0165g MgCl₂ x 2H₂O
35,064g NaCl
mit Aqua bidest. auf 1000ml auffüllen
- VBS-Puffer
58,2g Saccharose (Merck)
1g Gelatine (Merck)
200ml Barbituratpuffer
mit Aqua bidest. auf 1000ml auffüllen,
pH 7,3

- PBS 10fach
 - 80g NaCl
 - 2g KCl
 - 9,6g Na₂HPO₄ x H₂O
 - 2,4g KH₂PO₄
 - mit Aqua bidest. auf 1000ml auffüllen,
 - pH 7,4

- Reaktionsgefäße (0,75 ml, Eppendorf)
- 96-Well-Flachbodenplatte (Linbro)

Durchführung

Das Komplementsystem ist Teil der unspezifischen humoralen Immunabwehr. Ein Kaskadensystem aus 20 Serumproteinen führt zur Aktivierung phagozytierender Zellen durch Opsonierung von Pathogenen sowie deren direkter Lyse durch seine terminale Komponenten. Die Auslösung der Komplementkaskade erfolgt auf dem klassischen Weg über Antigen-Antikörper Komplexe als Initiator.

Die Bestimmung der Komplementaktivität erfolgte in einem Hämolyse Test (nach MEYER 1961). Hierbei dienen mit anti-Schaf-Antikörpern markierte Hammelerythrozyten als Targetzellen, deren komplementabhängige Lyse durch Absorptionsmessung des freigesetzten Hämoglobins quantifiziert werden kann.

Waschen der Schaferythrozyten: Für die Gewinnung der Erythrozyten wurden 5ml stabilisiertes Hammelblut in einem Plastikröhrchen (50ml) abzentrifugiert (1370g, %min, Raumtemperatur) und der Überstand abgesaugt. Zur Entfernung des Stabilisators folgten drei Waschschriffe mit PBS-EDTA-Puffer, wobei das Erythrozytenpellet vorsichtig in 5ml Puffer gelöst und dann auf ein Endvolumen von 25ml aufgefüllt wurde. Anschließend wurde die Erythrozytensuspension für 10 Minuten bei 37°C in vorgewärmten Puffer inkubiert und ein weiteres Mal wie oben beschrieben gewaschen. Zuletzt wurde das Erythrozytenpellet mit PBS-EDTA Puffer auf ein Gewicht von 5g eingestellt.

Ermittlung des Erythrozytentiters und Sensibilisierung: Mit Hilfe einer Zählkammer wurde die Konzentration der Suspension ermittelt und mit PBS-EDTA-Puffer auf eine Zellzahl von 10⁹/ml eingestellt, um anschließend mit einer analogen Menge

Ambozeptor-Gebrauchslösung versetzt zu werden. Nach 20-minütiger Inkubation (37°C) wurden die Erythrozyten abzentrifugiert (1370g, 10 Minuten) und abschließend einmal in PBS-EDTA-Puffer und dreimal in VBS-Puffer gewaschen. Die sensibilisierten Hammelerythrozyten wurden bis zum Gebrauch bei 2-8°C aufbewahrt.

Hämolysetest (modifiziert nach HARRISON & LACHMANN, 1986): Die Komplementblutproben (unbehandelte Reaktionsgefäße vgl.2.6.2.) wurden direkt nach der Blutabnahme zur Gerinnung für 30 Minuten bei 37 °C inkubiert und dann für weitere 60 Minuten im Kühlschrank bei 2 - 8 °C stehen gelassen. Das Serum wurde nach zweimaliger Zentrifugation (3 Minuten) in Reaktionsgefäßen (0,75 ml, Eppendorf) und bis zur Messung bei -20 °C gelagert.

Die Proben wurden erst direkt vor jedem Testansatz aufgetaut. In Eppendorfreaktionsgefäßen wurde eine Serumverdünnungsreihe in VBSS-Puffer angesetzt, wobei Vortests folgende optimale Verdünnungsstufen ergeben haben: Aus einer 1:100 Vorverdünnung wurden die Verdünnungsstufen 1:200, 1:400, und 1:800 erstellt. Zu jeder Verdünnungsstufe (Doppelansätze à 200µl) wurden 50µ sensibilisierte Schaferythrozyten zupipettiert und anschließend für 45 Minuten unter leichtem Schütteln bei 37 °C im Inkubator (37°C) inkubiert. Zusätzlich wurden drei Ansätze für die totale Lyse (50 µl Erythrozyten + Aqua bidest.), drei für die spontane Lyse (50µl Erythrozyten + 200µl VBSS-Puffer) und pro Probe je ein Leerwert der Verdünnungsstufen 1:100 und 1:200 zur Extrapolation des Hämoglobineigenanteils mit inkubiert. Nach Zugabe von 75µl VBS-Puffer wurden nicht lysierte Erythrozyten abzentrifugiert (3 Minuten) und der Hämoglobingehalt im Überstand bei 412nm photometrisch bestimmt.

Nach Korrektur der Meßwerte durch die gemittelte Spontanlyse und den Hämoglobinanteil jeder Serumprobe konnte anhand der totalen Lyse der Lysegrad jeder Verdünnungsstufe berechnet werden. Der Wert der 50%-Hämolyse ergab sich aus der doppeltlogarithmischen Auftragung von eingesetzter Serummengende [µl] und prozentualer Erythrozytenlyse: Wurden log (Serummengende) als Abszisse und log (Lyse/100-Lyse) als Ordinate gewählt, so ergab der Schnittpunkt der Regressionsgeraden mit der Abszisse die log Menge an Serum, die zu 50%iger Lyse führte. 1000 dividiert durch diese Zahl ergab die CH_{50} units/ml (vgl. Formel 1).

Lin Regression: $f(x) = ax + b$ mit

$$x = \log(\text{Serum}/\mu\text{l})$$

$$f(x) = \log\left(\frac{\%Lyse}{100 - \%Lyse}\right)$$

$$CH_{50} [U / ml] = \frac{1000}{10^{\frac{b}{a}}}$$

Formel 1: Berechnung des 50% Hämolysegrades CH₅₀-[U/ml]

Der CH₅₀-[U/ml] Wert ist somit ein Maß für die Aktivität des Komplementsystems: Je höher der CH₅₀ Wert einer Probe ist (hohe Absorption), umso mehr Erythrozyten wurden vom Komplementsystem zerstört, desto besser ist also die Abwehrkapazität des Komplementsystems.

2.5.4 Endokrine Untersuchungen

In diesem Teil der Untersuchung wurden das Sexualhormon Östradiol und die Glukokorticoide Kortisol und Kortikosteron mit Hilfe von Radioimmunoassays bestimmt.

Materialien

Reaktionsgefäße 2ml (etherfest, Eppendorf)

- Glutaminsäurepuffer
 - 3g L-Glutamin
 - 2,5ml 0,4% KCN-Lösung
 - ad 500ml Aqua dest.
- RIA-Puffer
 - 2,68g KH_2PO_4 (Merck)
 - 8,35g $\text{NaHPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$
 - 0,32g NaN_3 (Sigma)
 - 1g Rinderseumalbumin (Serva)
 - ad 1000ml Aqua bidest., pH 7,2
- Aktivkohle-Suspension
 - 0,5% (w/v) Norit A (Serva)
 - 0,5% (w/v) Dextran T 70 (Roth)
 - in RIA-Puffer, pH 7,2
- Tracer = Radioaktiv markiertes Hormon
(Kortisol, Kortikosteron, Östradiol)
- Rundbogenglasröhrchen
- Diethylether (Merck)
- Extrelut (Merck)
- Steroide
 - Kortisol, Kortikosteron, Östradiol
- Antikörper
 - (Verdünnug und Kreuzreaktion siehe Tabelle 2)
- Zählröhrchen (5ml, Beckman)

Angabe der Kreuzreaktion der verwendeten Antikörper:

Hormon	Kortisol- Antikörper	Kortikosteron- Antikörper	Östradiol Antikörper
Verdünnung	1:50000	1:10000	
Kortisol	100%	4,4%	< 0,001
Kortikosteron	1,3%	100%	0,001
Kortison	2%	0,65%	0,003
Deoxycortisol	10%	<0,4%	0,001
Deoxycorticosteron	0,16%	30%	0,003
17- α -OH-Progesteron	2,5%	<0,4%	0,003
Progesteron	<0,1%	35%	0,004
Testosteron	<0,1%	5,5%	0,012
Androstendion	<0,1%	3,2%	0,005
Aldosteron	<0,1%	0,8%	nicht getestet
Östradiol	nicht getestet	nicht getestet	100
Dihydroxytestosteron	nicht getestet	nicht getestet	0,08
DHEA	nicht getestet	nicht getestet	<0,005
Δ 4-Androstendion	nicht getestet	nicht getestet	<0,005
Östradiolsulfat	nicht getestet	nicht getestet	0,03
Östradiolglucoronid	nicht getestet	nicht getestet	0,08

Durchführung

Kortisol und Kortikosteronkonzentrationen im Serum

Die Glucokortikoide Kortisol und Kortikosteron sind Nebennierenrindenhormone und liegen im Blut überwiegend an Trägerproteine gebunden vor; somit stellen sie ein Reservoir dar, das mit dem Anteil an freien Hormonen im Gleichgewicht steht. Der Anstieg der Glucokortikoidwerte im Serum nach Einwirken einer Belastung erfolgt sehr schnell (KVETNANSKY 1978); bei Tupajas etwa drei Minuten nach Betreten des Raumes. Die Blutabnahme fand daher innerhalb der ersten drei Minuten nach Betreten des Raumes statt. Die Ausschüttung der Glucokortikoide unterliegt einem Tagegang, bei dem die höchsten Werte etwa zwei Stunden vor Beginn der Hellphase (JUNKER 1999) vorliegen. Aus diesem Grund wurden die Blutabnahmen für Ver-

suchsteil 1 immer zu dieser Zeit durchgeführt und für den Umsetzversuch von 10-12 Uhr eigene Ausgangswerte um 12 Uhr bestimmt.

Die durch Zentrifugation gewonnenen Serumproben wurden bis zur Aufarbeitung bei -20°C gelagert. Der Bestimmung der Kortisol- bzw. Kortikosteronkonzentration ging eine Glutamatfällung voraus. Die Hormonkonzentrationen wurde aus jeweils 5µl des Überstandes in Radioimmunoassay's (RIA) nach FENSKE (1989) ermittelt

Sexualhormone im Serum: Östradiol

Östradiol ist ein biologisch hochwirksames weibliches Sexualhormon, gehört zur Gruppe der Östrogene und wird in Gonaden und Nebennieren synthetisiert. Im Blut liegen die Östrogene vorwiegend an Globulin gebunden vor.

Da sich auch die Sexualhormonkonzentrationen bei akuter Belastung innerhalb relativ kurzer Zeit verändern, wurden die Proben zur Bestimmung ebenfalls innerhalb von drei Minuten entnommen.

Für den Östradiolassay wurden 20µl Serum in 1080µl Phoshatpuffer aufgenommen und als Doppelproben à 500µl auf Kieselgursäulen aufgetragen und durch zutropfen von 3ml Ether direkt in Assayröhrchen extrahiert, in denen nach Abdampfen des Lösungsmittel die Östradiolkonzentration in einem RIA nach der Methode von FENSKE UND PROBST (1982) durchgeführt wurde.

2.6 Mathematik, Statistik und Darstellungsweise

Um physiologische Veränderungen als Reaktion auf die Umsetzphase aus Versuch2 quantitativ darstellen zu können wurde im Versuch nach *Formel 2* der Quotient aus den Werten nach der Umsetzphase und den Ausgangswerten um 12 Uhr (AGW_{12}) berechnet. Dieser Dezimalwert wird im folgenden als prozentuale Änderung nach nicht sozialer Belastung angegeben.

$$\left[\left(\frac{\text{Umsetzversuche}}{AGW_{12h}} \right) - 1 \right] * 100 = \text{Änderung [\%]}$$

Formel 2: Berechnung der prozentualen Veränderung nach Belastung

Alle statistischen Berechnungen wurden mit dem Computerprogramm SPSS für Windows 6.1.3 durchgeführt. Für alle Tests werden die zweiseitig ermittelten Irrtumswahrscheinlichkeiten angegeben.

In den hier durchgeführten Versuchen waren weder die Verhaltensdaten, noch die physiologischen Daten normalverteilt. Es wurden daher ausschließlich nicht-parametrische Statistische Tests verwendet.

Als Signifikanzgrenze wurde ein α von 0,05 festgelegt.

Zur Untersuchung signifikanter Zusammenhänge zwischen dem Alter der Tiere und Physiologischen- oder Verhaltensdaten wurde der Rangkorrelations-Koeffizient R_s nach Spearman berechnet.

Unterschiede zwischen zwei nicht verbundenen Gruppen (=unabhängig) wurde mit dem Mann-Whitney-U-Test untersucht.

Die ermittelten Signifikanzen wurden folgendermaßen angegeben:

(* = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$);

Tendenzen ($p < 0,1$) wurden durch # gekennzeichnet.

In den Graphiken sind Medianwerte mit 25-75% Interquartilbereich oder individuelle Daten dargestellt.

3 Ergebnisse

In diesem Versuch wurden Unterschiede im Verhaltenstagesbudget der Tiere auf individueller Ebene der Tiere in Abhängigkeit von ihrem Alter untersucht.

3.1 Ergebnisse unter Haltungsbedingungen (Versuch 1)

3.1.1 Altersabhängige Unterschiede im Verhalten (Haltungsbedingungen)

Das Verhalten der Tiere wurde für 12 Stunden aufgezeichnet und ausgewertet.

Ingesamt ergaben sich für alle Verhaltensweisen große individuelle Unterschiede. Doch generell bestanden hoch signifikante altersabhängige Zusammenhänge bei <Lokomotion>, <Ruhen>, <Verweilen> und <Turnen>; nicht signifikant veränderte sich <Putzen> und die Nahrungsaufnahme im Alter.

Mit zunehmendem Alter zeigten die Tiere weniger Lokomotion (Abb. 2); entsprechend ruhten sie mehr (Abb. 3). Ebenfalls war ein Anstieg des <Verweilens> mit höherem Alter zu beobachten (Abb. 4).

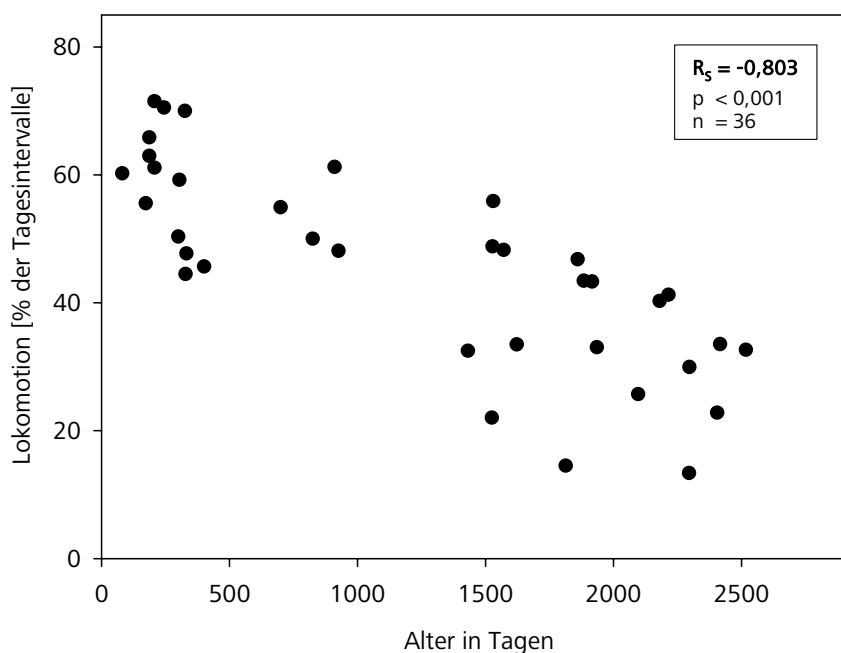


Abb. 2: <Lokomotion> in Abhängigkeit vom Alter der Tiere.

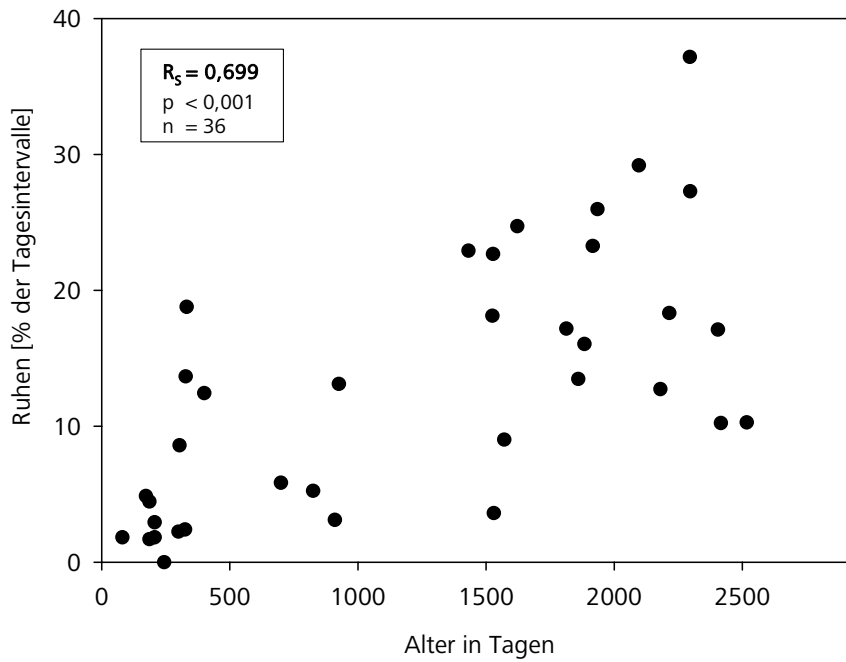


Abb. 3: <Ruhens> in Abhängigkeit vom Alter der Tiere.

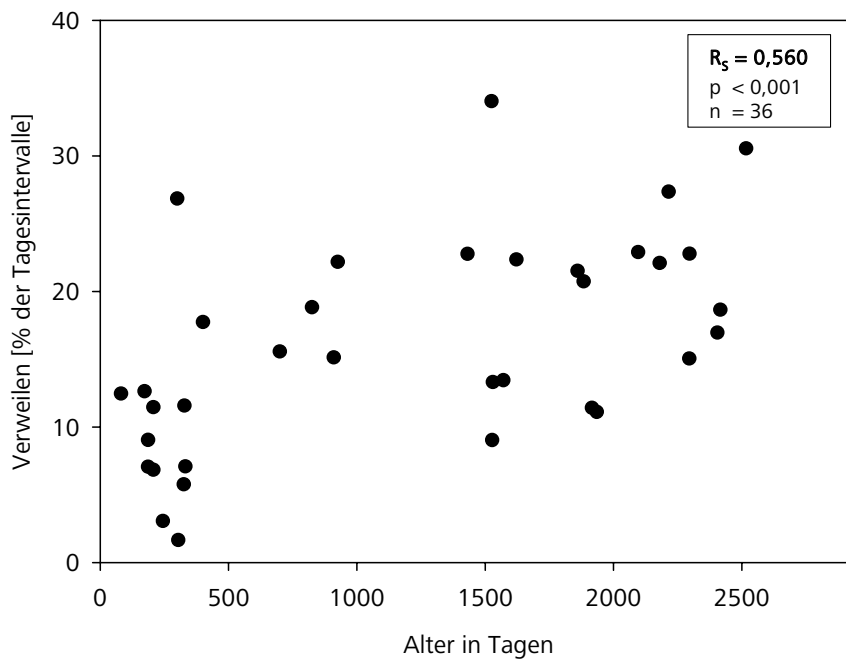


Abb. 4: <Verweilen> in Abhängigkeit vom Alter der Tiere.

Da mit zunehmendem Alter <Ruhen> einen deutlichen Anteil an der Gesamtbeobachtungszeit ausmacht wurde diese Verhaltensweise und Kastenaufenthalt für die folgende Auswertung nicht mit einbezogen. Während dieser als Gesamtaktivitätszeit (ohne Kastenaufenthalt und Ruhen) bezeichneten Auswertungsphase blieben die altersabhängigen Unterschiede von <Lokomotion> und <Verweilen> mit der gleichen Teststärke und Richtung bestehen (Tabelle 3).

Tabelle 3: Analyse von <Verweilen> und <Lokomotion> in Abhängigkeit vom Alter bezogen auf die Aktivitätszeit.

	Verweilen	Lokomotion
R_s	0,717	-0,778
p	0,001	0,001

Analog zur geringeren Lokomotion turnten die Tiere während der Gesamtbeobachtungszeit mit zunehmendem Alter weniger (Abb. 5).

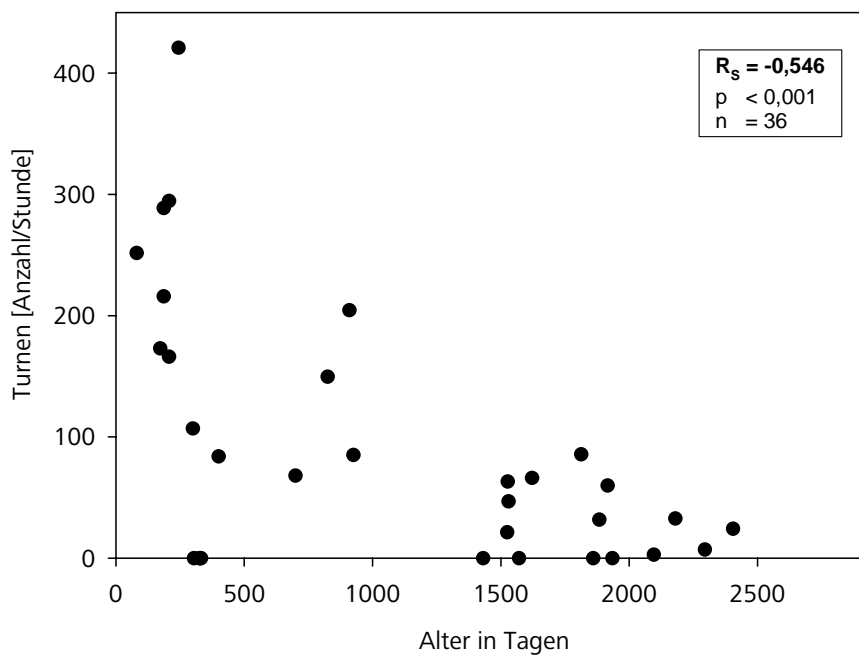


Abb. 5: <Turnen> pro Stunde in Abhängigkeit vom Alter der Tiere.

<Putzen> und <Fressen> veränderten sich mit dem Alter nicht (ohne Abb.), jedoch nahm <Trinken> bei älteren Tieren leicht ab. (Abb. 6).

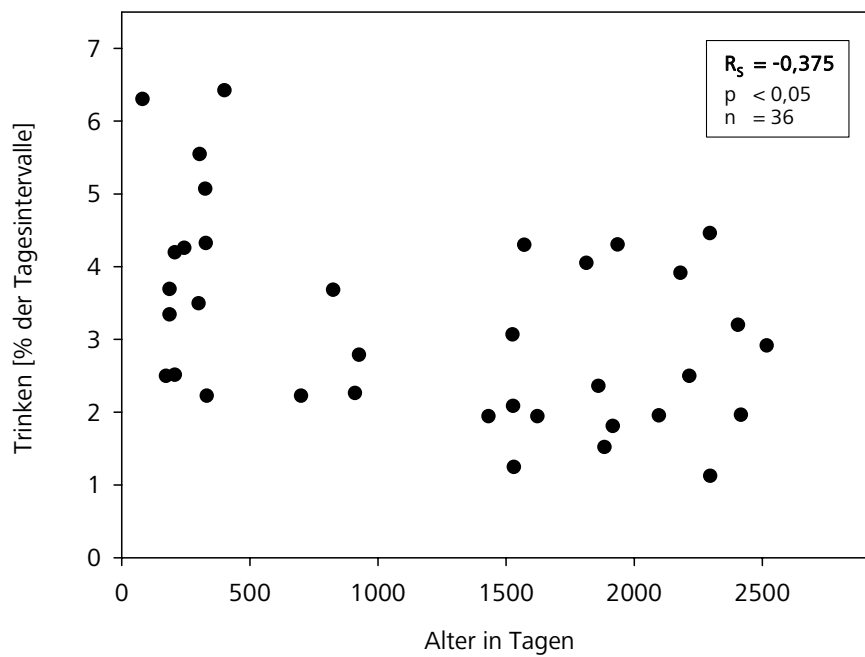


Abb. 6: <Trinken> in Abhängigkeit vom Alter der Tiere.

3.1.2 Physiologische Veränderungen in Abhängigkeit vom Alter (unter Haltungsbedingungen)

3.1.2.1 Körpergewicht

Das Körpergewicht der Versuchstiere zeigte keine altersabhängige Veränderung.

3.1.2.2 Immunologische und hämatologische Parameter

Die Gesamtzahl der Leukozyten, Lymphozyten und neutrophilen Granulozyten im peripheren Blut stand in keinem signifikanten Zusammenhang zum Alter der Tiere, jedoch veränderte sich das Verhältnis von Lymphozyten zu neutrophilen Granulozyten. Dies beruhte auf einem leichten Abfall des Lymphozytenanteil bei den alten Tieren (Abb. 7) und einem entsprechendem Anstieg des Anteils der neutrophilen Granulozyten (Abb. 8); die Funktion der neutrophilen Granulozyten (Phagozytoseaktivität) zeigte keine Veränderung im Alter. Es bestanden keine altersbedingten Effekte der Komplementaktivität.

Besonders auffällig war die stark reduzierte Funktionalität der Lymphozyten: Sowohl die in vitro Stimulierbarkeit isolierter Lymphozyten, sowie die von Lymphozyten aus dem Vollblut nahm stark ab (Abb. 9, Abb. 10).

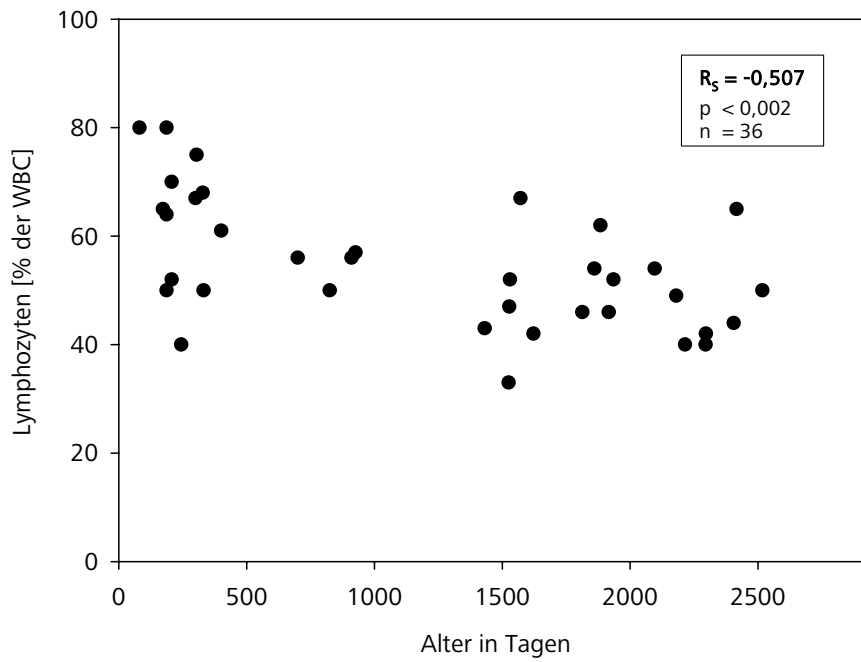


Abb. 7: Anteil der Lymphozyten im Differentialblutbild in Abhängigkeit vom Alter.

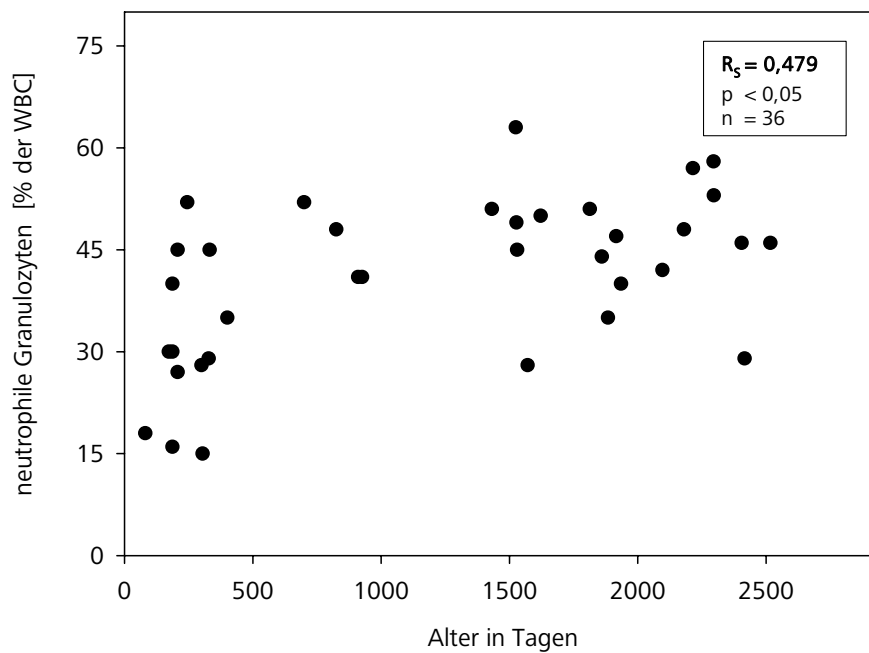


Abb. 8: Anteil an neutrophilen Granulozyten im Differentialblutbild in Abhängigkeit vom Alter der Tiere.

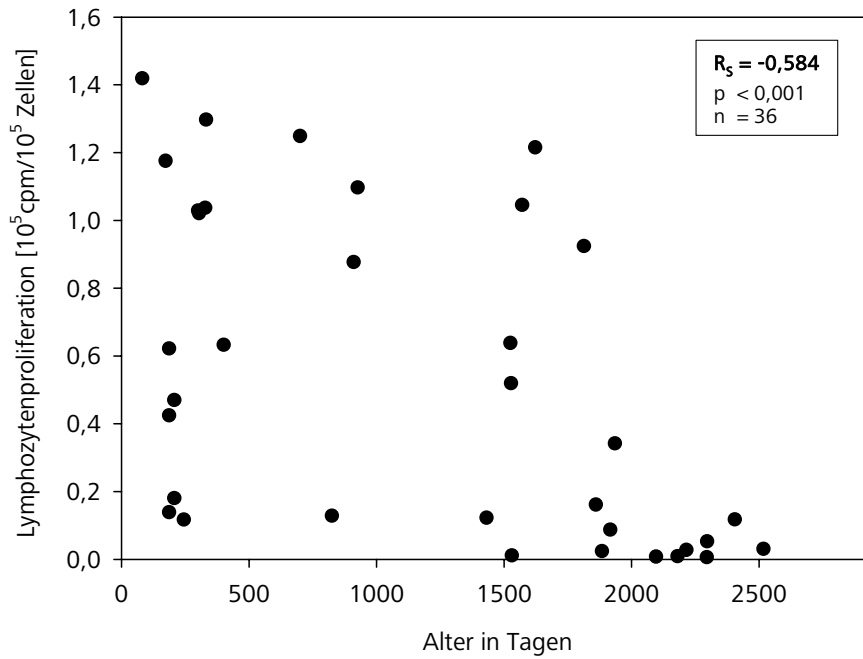


Abb. 9: Stimulierbarkeit der isolierten Lymphozyten in Abhängigkeit vom Alter der Tiere.

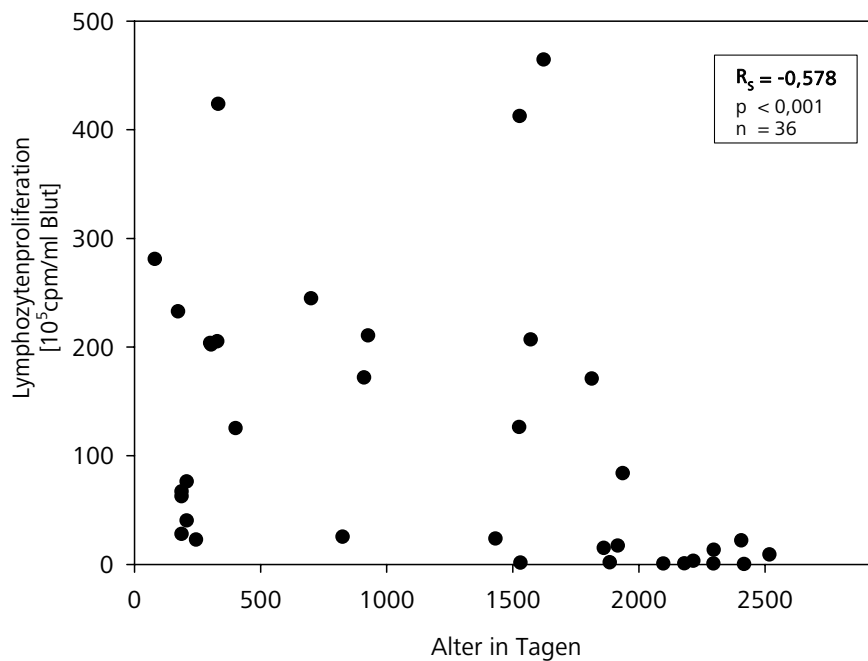


Abb. 10: Stimulierbarkeit der Lymphozyten im Vollblut in Abhängigkeit vom Alter der Tiere.

3.1.2.3 Endokrine Parameter

Die ermittelten Serum-Konzentrationen von Kortisol und Kortikosteron sowie von Östradiol nahmen mit zunehmendem Alter ab (Abb. 11 - Abb. 13).

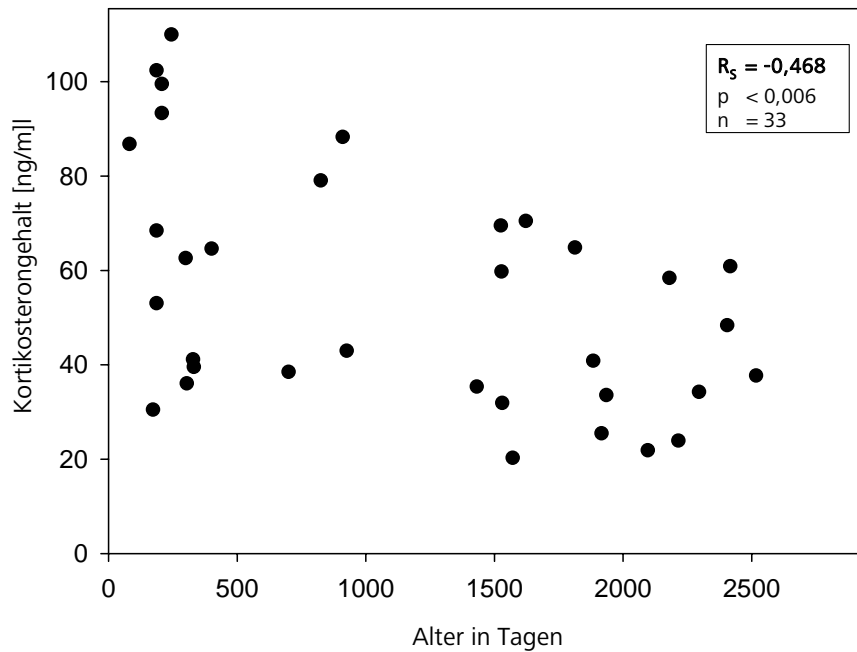


Abb. 11: Konzentration von Kortikosteron im Serum in Abhängigkeit vom Alter der Tiere.

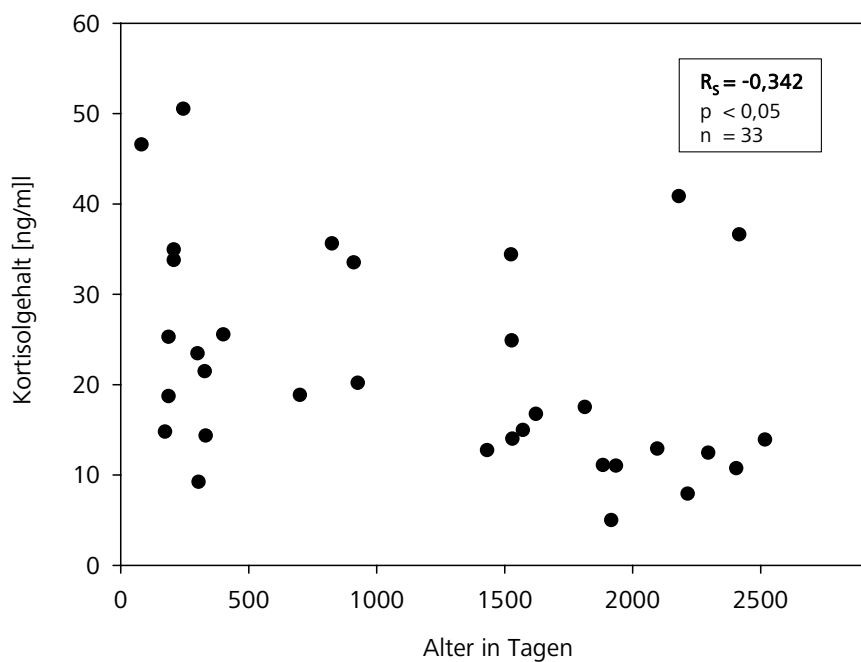


Abb. 12: Konzentration von Kortisol im Serum in Abhängigkeit vom Alter der Tiere.

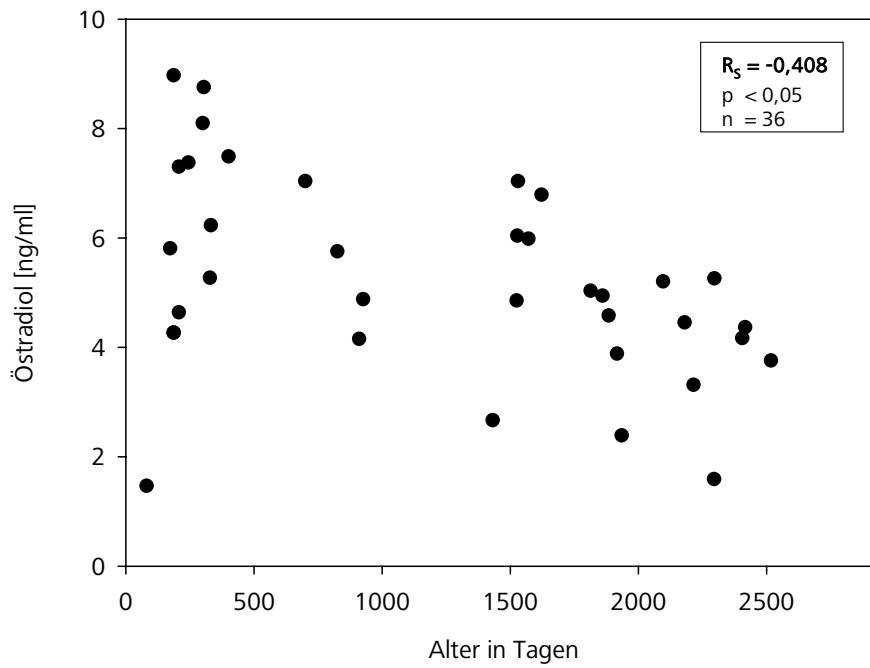


Abb. 13: Konzentration von Östradiol im Serum in Abhängigkeit vom Alter der Tiere.

3.2 Vergleich der Ausgangswerte von 8 Uhr und 12 Uhr

Vergleicht man die Veränderungen der physiologischen Parameter unabhängig vom Alter, so findet man einen signifikanten Abfall sowohl der Leukozyten und Granulozytenzahl, als auch der Glucokortikoide von den 8 Uhr zu den 12 Uhr - Werten. Hingegen war die Aktivierbarkeit der Lymphozyten im Vollblut um 12 Uhr signifikant höher als um 8:00 Uhr (*Tabelle 4*).

Auf individueller Ebene waren hierbei die 8 Uhr Werte der Proliferationsfähigkeit der Lymphozyten mit den entsprechenden 12 Uhr Werten signifikant negativ und die Östradiol Werte positiv korreliert. Für alle anderen in dieser Arbeit erfassten Parameter bestanden keine erkennbaren Beziehungen.

Tabelle 4: Mediane und Korrelationen der Ausgangswerte um 8 und um 12 Uhr

Angegeben sind im linken Teil der Tabelle die Mediane der Ausgangswerte zu den verschiedenen Uhrzeiten; diese wurden mittels Wilcoxon-Test für Paardifferenzen verglichen und die Irrtumswahrscheinlichkeit berechnet. Die beiden rechten Spalten geben die Korrelationsanalyse nach Spearman wider; hervorgehoben sind statistisch signifikante Zusammenhänge (Fett-Schrift).

	8 Uhr	12 Uhr	p	R_s	p
Leukozyten [n/ μ l]	6727	3147	0,003	0,0393	0,820
Lymphozyten [n/ μ l]	3688	2352	0,41	-0,0282	0,877
Granulozyten [n/ μ l]	2745	824	0,001	-0,285	0,206
Phagozytosekap. [10 ⁶ cpm 30Minuten/ml Blut]	320	598	0,932	0,163	0,354
Komplement- Akt. [IU/ml Serum]	1108	1644	0,234	0,00547	0,977
LTT iso. Zellen [10 ⁵ cpm/10 ⁵ Zellen]	0,44	0,38	0,668	0,470	0,006
LTT Vollblut [10 ⁵ cpm/mlVollblut]	64,9	95,18	0,001	0,499	0,002
Kortisol [ng/ml Serum]	18,7	4,9	0,001	0,0703	0,686
Kortikosteron [ng/ml Serum]	50,7	22,0	0,001	0,172	0,320
Östradiol [ng/ml Serum]	4,9	4,8	0,182	0,541	0,001

3.3 Altersabhängige Reaktionen auf nicht sozialen Stress (Versuch 2)

3.3.1 Altersabhängige Unterschiede im Verhalten

Das Verhalten der Tiere wurde während der 2 Stunden dauernden Umsetzphase aufgezeichnet. Alle Tiere zeigten in dieser leichten Belastung fast ausschließlich <Exploration>, <Lokomotion> und <Turnen>; die prozentualen Anteile der Aktivität waren bei jungen und alten Tieren in der neuen Umgebung vergleichbar hoch, während die alten Tiere im Heimatkäfig weniger aktiv waren als die jungen, also einen Anstieg ihrer Aktivität aufwiesen. Ältere Tiere waren zwar gleich aktiv wie die jungen jedoch explorierten sie den Käfig in der Umsetzphase weniger (Abb. 14). In der neuen Umgebung Turnten alle Tiere erheblicher weniger. Ältere Tiere turnten jedoch, ebenso wie unter Haltungsbedingungen, schwach ausgeprägt weniger als die jüngeren (Abb. 15).

Tiere die mehr als die Hälfte der Beobachtungszeit im Kasten verbrachten, waren im Mittel älter als die Tiere, die nicht so häufig im Kasten waren (Abb. 16). Die Verhaltensweisen <Fressen>, <Trinken> und <Putzen> zeigten junge und alte Tiere in einer großen individuellen Varianz ohne eine erkennbare Altersabhängigkeit.

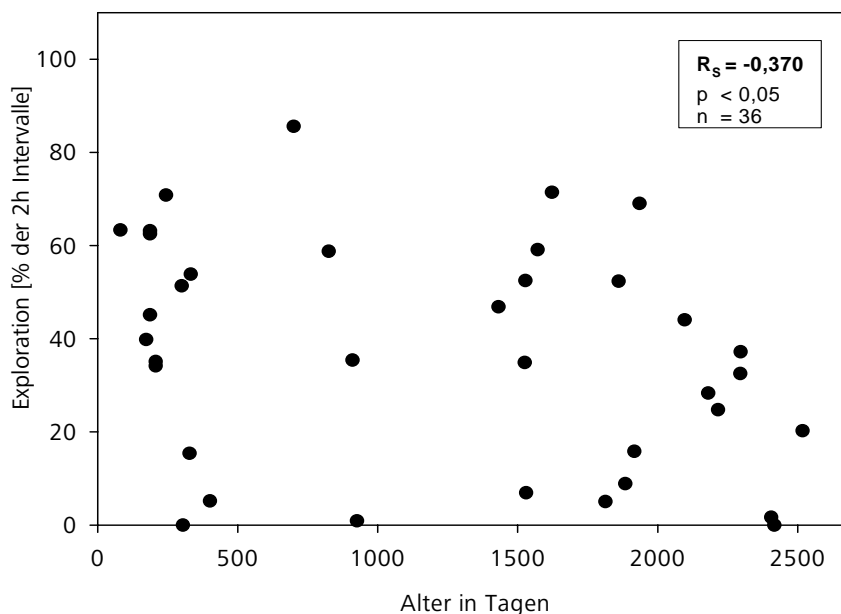


Abb. 14: <Exploration> während der Umsetzphase in Abhängigkeit vom Alter der Tiere.

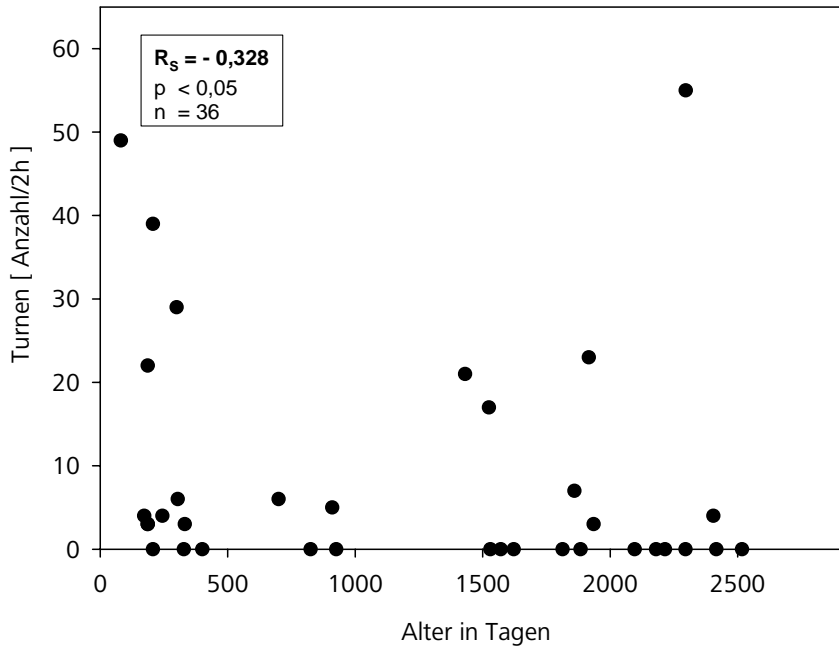


Abb. 15: <Turnen> während Umsetzphase in Abhängigkeit vom Alter der Tiere.

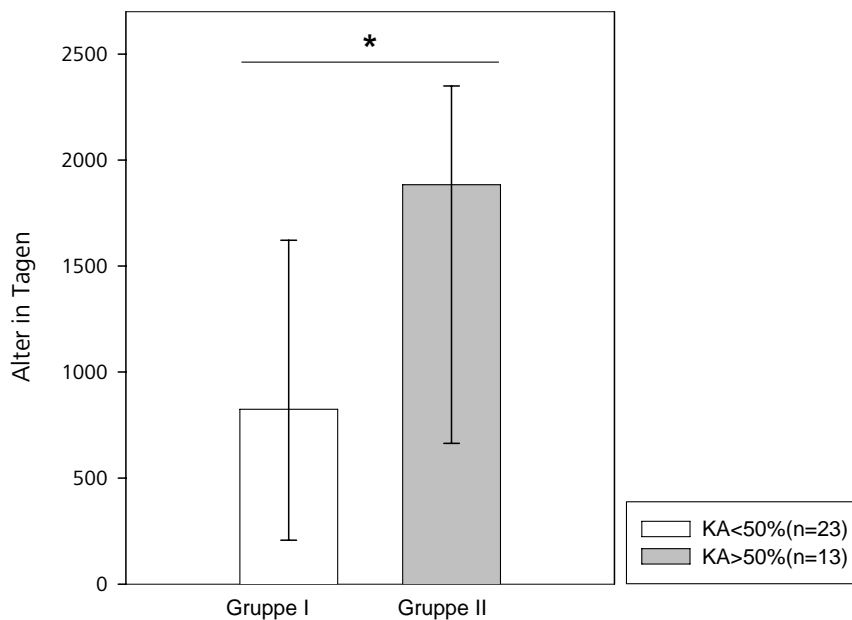


Abb. 16: Alter von Tieren, die weniger als 50 % der Zeit im Kasten verbrachten (Gruppe I) oder mehr als 50% (Gruppe II).

Angegeben sind die Mediane (Gruppe I: KA < 50% (n=12); Gruppe II: KA > 50% (n=12)) des Alters in Tagen.

Statistik: Mann-Whitney U Test *p < 0,05

Da Tiere die mehr als die Hälfte der Zeit im Kasten waren im Mittel älter waren, wurde die Kastenaufenthaltsdauer für die folgende Auswertung nicht mit einbezogen; in dieser Gesamtaktivitätszeit (ohne Kastenaufenthalt und Ruhen) ergaben sich – im Gegensatz zur Gesamtbeobachtungszeit – keine signifikanten altersabhängigen Effekte (*Tabelle 5*).

Tabelle 5: Analyse aller aufgenommenen Verhaltensweisen in Abhängigkeit vom Alter bezogen auf die Aktivitätszeit

	Lokomotion	Exploration	Verweilen	Fressen	Trinken	Putzen
R_s	-0,302	-0,0146	-0,0907	0,632	0,099	0,200
p	0,0729	0,931	0,597	0,716	0,568	0,242

3.3.2 Altersabhängige Veränderung der Reaktion physiologischer Parameter (Umsetzphase)

Um quantitative Aussagen über die physiologischen Veränderungen nach der leichten Belastung (Umsetzen in einen neuen Käfig und Raum) treffen zu können, wurden die prozentualen Veränderungen ausgehend vom Ausgangswert (12 Uhr) nach Formel 2 (vgl. 2.5) berechnet.

3.3.2.1 Körpermasse

Es ergaben sich keine altersabhängigen Veränderungen der Körpergewichte als Reaktion auf das Umsetzen.

3.3.2.2 Immunologische und hämatologische Parameter

Die Mehrzahl der Tiere reagierte – ungeachtet des Alters – auf die leichte Belastung mit folgenden Veränderungen: Verringerung der Leukozytenanzahl, Absinken der Phagozytosekapazität und der Komplementaktivität.

Alle bestimmten Veränderungen der Immunparameter nach Belastung zeigten keine signifikanten altersabhängigen Zusammenhänge; so war das Ausmaß der Veränderung der Zellzahlen und der Zellpopulationen im Blut, sowie die verringerte Komplementaktivität vom Alter der Tiere unbeeinflusst.

Die Lymphozytenproliferation konnte aufgrund eines technischen Defekts in diesem Versuchsteil nicht bestimmt werden.

Die absoluten Werte der Phagozytoseaktivität nach Umsetzen zeigten mit zunehmendem Alter der Weibchen eine negative signifikante Korrelation (Abb. 17).

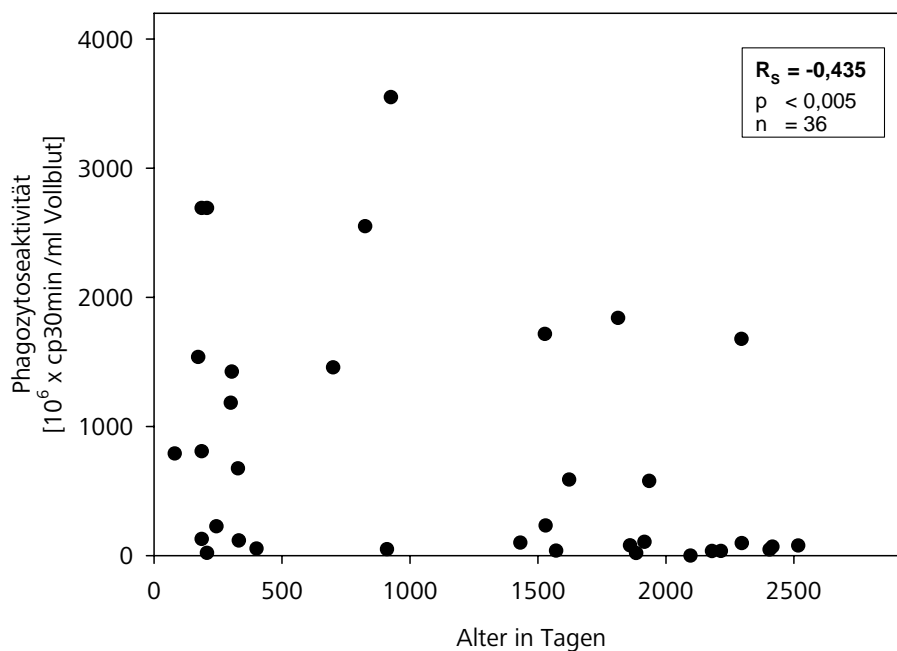


Abb. 17: Absolutwerte der Phagozytosekapazität nach Belastung in Abhängigkeit vom Alter der Tiere.

3.3.2.3 Endokrine Parameter

Mit zunehmendem Alter der Tiere verringerte sich die „Stressreaktion“ in Form der Ausschüttung der Glucokortikoide Kortisol und Kortikosteron ausgehend vom AGW_{12h} (Abb. 18, Abb. 19); auch die absoluten Werte der Glucokortikoidkonzentrationen waren bei älteren Tieren niedriger im Vergleich zu jüngeren (Abb. 20, Abb. 21).

Eine altersabhängige Veränderung der Östradiol Ausschüttung nach Belastung konnte nicht beobachtet werden.

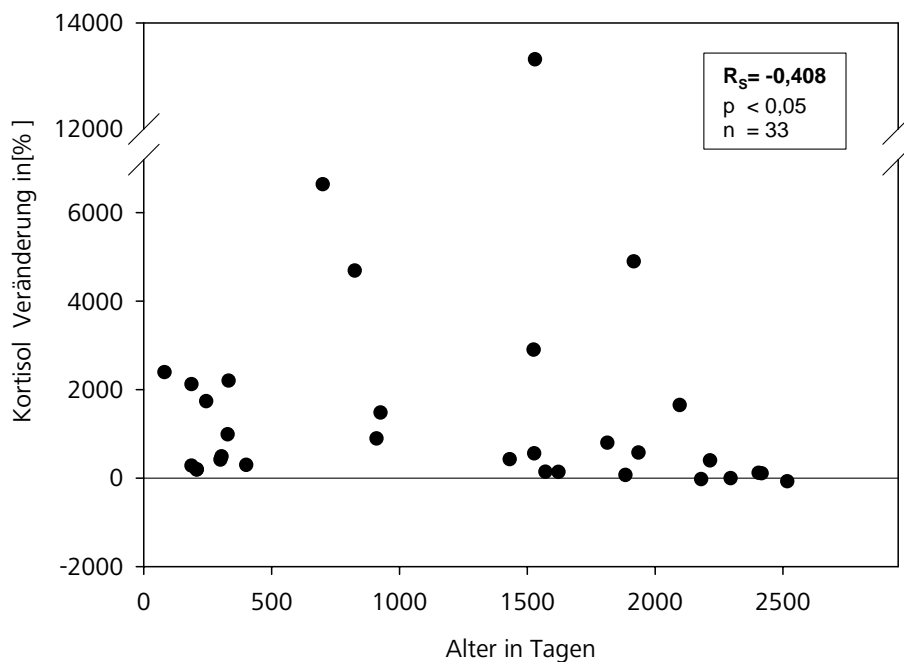


Abb. 18: Änderung der Kortisolkonzentration im Serum [%]nach Belastung in Abhängigkeit vom Alter der Tiere.

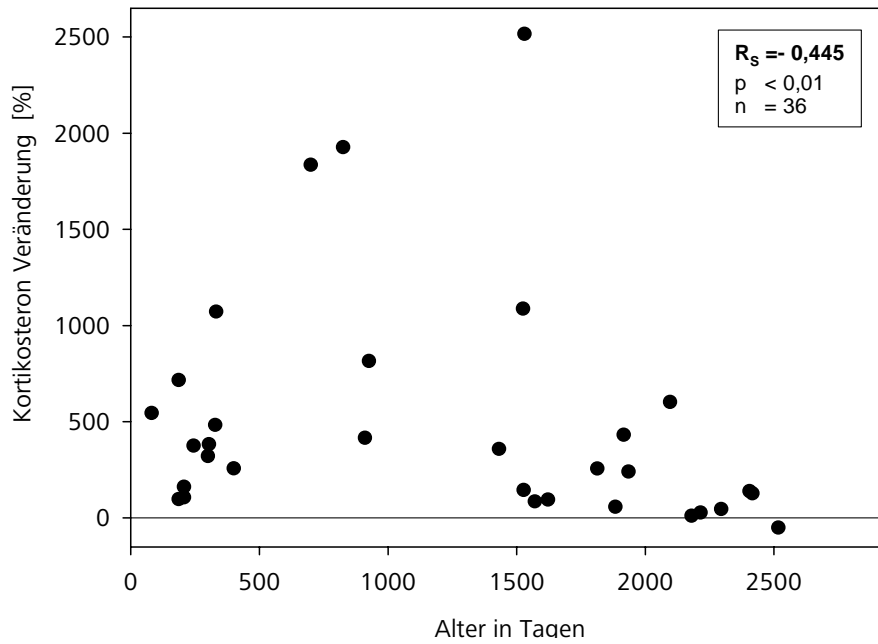


Abb. 19: Änderung der Kortikosteronkonzentration im Serum [%] nach Belastung in Abhängigkeit vom Alter der Tiere.

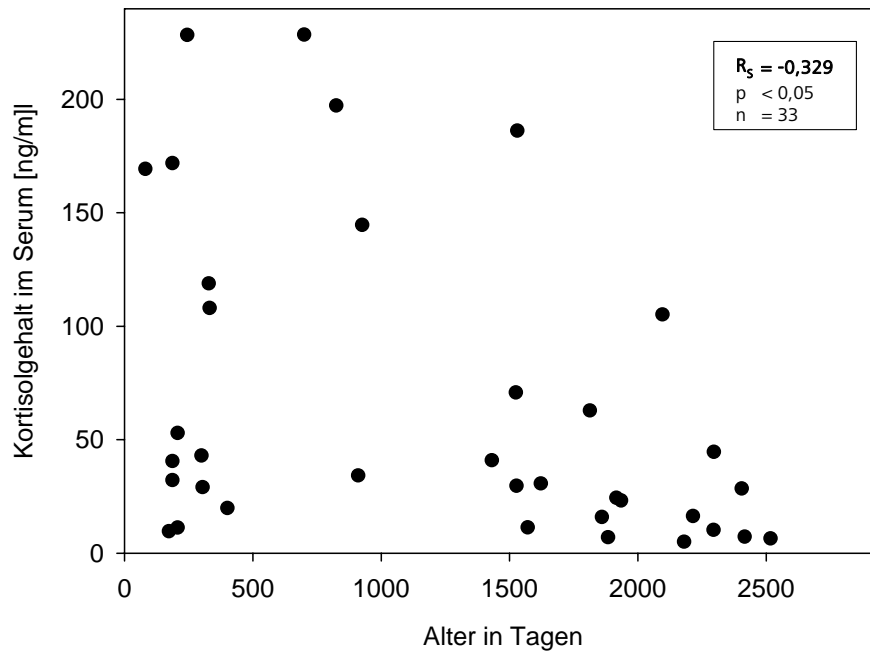


Abb. 20: Konzentration von Kortisol im Serum nach leichter Belastung in Abhängigkeit vom Alter der Tiere.

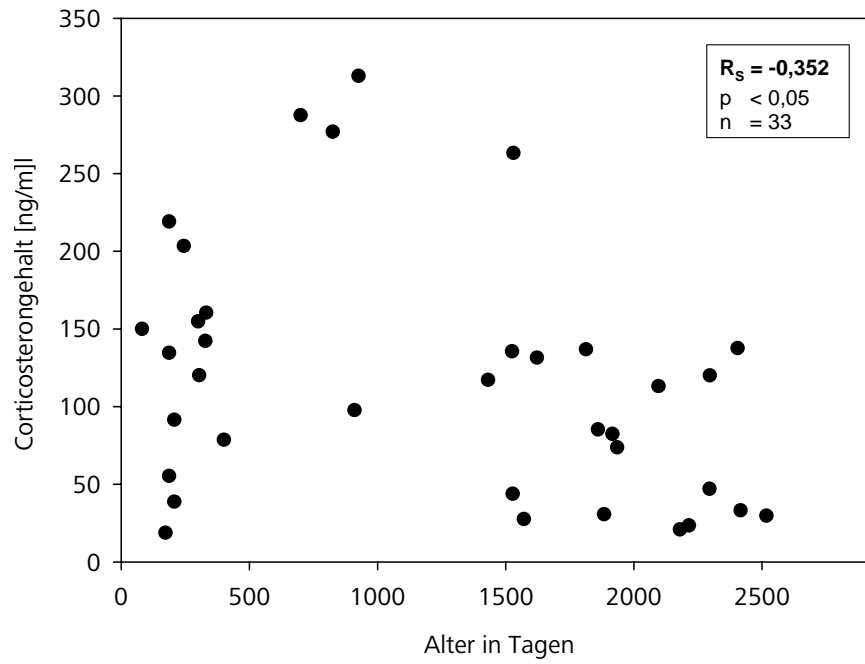


Abb. 21: Konzentration von Kortikosteron im Serum in Abhängigkeit vom Alter der Tiere.

4 Diskussion

In dieser Arbeit sollte geklärt werden, wie sich Verhalten und einige physiologische Parameter von *Tupaia belangeri* unter Kontrollbedingungen und bei einer leichten nicht sozialen Belastung mit dem Alter verändern.

4.1 Altersabhängige Veränderungen unter Haltungsbedingungen

4.1.1 Verhalten

Altersabhängige Veränderungen bestanden vor allem bei der Lokomotion der Tiere. Mit zunehmendem Alter der Tiere sank die Lokomotion stetig; jüngere Tiere waren zum Teil mehr als 70% der Lichtphase in Bewegung, ältere mit 30% hingegen deutlich weniger. Ebenso turnten die älteren Tiere deutlich weniger – einige sogar überhaupt nicht, obwohl sie sich außerhalb des Schlafkastens aufhielten. Analog zu der verringerten Aktivität verbrachten ältere Tiere zweimal mehr Zeit mit Ruhen und Phasen der Bewegungslosigkeit (<Verweilen>) als jüngere Tiere. Ältere Tiere verbrachten – wieder Erwarten – nicht mehr Zeit im Schlafkasten als jüngere, wie von männlichen Tupajas beschrieben (SCHERER 2005).

Eine Abnahme der motorischen Leistung aufgrund von physiologischen Veränderungen ist eine allgemein beschriebene Folge von Alterungsprozessen (JOSEPH & ROTH, 1988). Hierauf wird eine Abnahme der Aktivität im Verhalten mit dem Alter zurückgeführt und bereits bei einer Reihe von Arten, inklusive dem Menschen beschrieben: PARDON et al. (2000) konnten zum Beispiel bei Mäusen in einer „open field“ Versuchreihe eine Verringerung der Lokomotion im Alter feststellen. Die Gruppe ihrer jüngsten Tiere (6 Monate) zeigte im Versuch 10% mehr Lokomotion als die beiden mittleren Altersklassen (11-12 und 17-18 Monate). Die 23-24 Monate alten Tiere zeigten wiederum 40% weniger Lokomotion als diese mittelalten Tiere. Auch bei Ratten (SCIMONELLI 1998; VAN WASS 1995), Gerbils (MEAD L. 1994) und Goldhamstern (GATTERMAN 2003) wurde eine Abnahme der Aktivität im Alter beschrieben. SIWAK et al. (2002) untersuchten diesen Alterseffekt bei Hunden (Beagles). Nach ihren Befunden war die Aktivität bei den Alten (3 bis 9 Jahre) deutlich niedriger als bei den jüngeren

Hunden (1 bis 3 Jahre). Eine altersabhängige Abnahme von Aktivität fand man ebenfalls bei Rhesus Affen, gehalten in Heimatkäfigen (EMBORG 1998).

Ältere Tupaja Weibchen putzten sich ebenso gleich häufig und auf dieselbe Art und Weise wie jüngere Tiere; dies steht im Widerspruch zur generell abnehmenden Aktivität mit dem Alter und zu Befunden bei Ratten, bei denen eine Abnahme von Fellpflege (grooming) im Alter beschrieben wird (SCIMONELLI 1998).

In der vorliegenden Untersuchung konnten keine generelle altersabhängige Veränderungen in der Häufigkeit der Nahrungsaufnahme festgestellt werden, lediglich eine leicht verminderte Zahl der Trinkvorgänge konnte bei alten Tieren beobachtet werden. Entgegen dieser Befunde wird in der Literatur oft von verringerter Nahrungsaufnahme im Alter berichtet wird. So beschreiben MARCIA et al. (2002) eine Abnahme der aufgenommenen Kalorienmenge bei älteren Ratten. Auch Rhesusaffen nehmen im Alter weniger Nahrung zu sich, was MATTISON (2002) mit einer geringeren Freß-Motivation der Tiere begründet. Ebenso belegen Humanstudien weniger Hungergefühl und „spontane Nahrungszufuhr“ im Alter (ROLLS 1997). In Anbetracht dieser Befunde kann die beobachtete Abnahme des Trinkens im Alter infolge geringerer Trink-Motivation aber auch als Folge der generellen Reduktion der Aktivität im Alter von Tupajas erklärt werden.

4.1.2 Physiologie

In der vorliegenden Untersuchung der Immun- und Endokrinparameter fanden sich teilweise signifikante Veränderungen in Abhängigkeit vom Alter der Tiere.

Die Körpermasse der Versuchstiere und die der weiblichen Tupajas in der institutseigenen Tierhaltung veränderten sich nicht mit dem Alter. In diesem Befund unterscheiden sich Tupajas von anderen Labortieren zum Beispiel Ratten; bei denen die Körpermasse bedingt durch den steigenden Fettanteil ansteigt (THOMAS 2002; SKALICKY 2000). Junge Ratten sind in der Lage ihre Energiezufuhr auf den Bedarf, über Menge und Art der Nahrungszufuhr, zu regulieren (LARUE-ACHAGIOTIS 1992,1994; RICHTER 1941). Eine gestörte „Regulation und Energiebalance“ führt neben reduzierter Bewegungsfähigkeit nach ROLLS (1995) beim Menschen zu den oben beschriebenen Veränderungen im Alter.

Aus den vorliegenden Ergebnissen lässt sich schließen, dass die Regulationsfähigkeit von Tupajas im Alter nicht gestört ist.

Weiterhin konnten Veränderungen der Immunparameter festgestellt werden. Extrem ausgeprägt war die altersabhängige Reduktion der Lymphozytenproliferationsrate nach Stimulation im Alter; diese ergab im Vollblut von Tieren im Alter mit weniger als 1000 Lebenstagen im Mittel einen Wert von 200×10^5 cpm/ml und sank bei Tieren mit über 2000 Lebenstagen auf weniger als 50×10^5 cpm/ml ab. Nach Auffassung von GREELEY (2001) ist diese Abnahme der Proliferationsrate die zur Zeit am universellsten zu bestimmende Zeigergröße von Immunseneszenz. GREELEY stellt fest „[...] that Lymphoproliferate response to mitogens are likely to be a reliable indicator over a broad range for both genders“. Dies bestätigen eine Vielzahl von Untersuchungen an unterschiedlichsten Arten bis hin zum Menschen: Zum Beispiel konnten DE LA FUENTE et al. (2004) bei Ratten sowie AOKI et al. (1994) bei Mäusen eine Abnahme der Proliferationsrate nach mitogener Stimulation zeigen. Bei verschiedenen Hunderassen fanden GREELEY et al. (2001: Labrador Retriever), HOGENSEH et al. (2004: Mischlingshunde und div. Stämme) und STRASSER (2000: Schäferhunde) deutlich verminderte Lymphozytenproliferationsraten. Ebenso wiesen HOROHOV et al. (2000) bei Pferden diesen Alterseffekt nach. Schließlich konnten JAYASHANKAR et al.

(2003) bei Pavianen und STRAUB (2001) ebenso wie KRAUSE et al. (1999) in Humanstudien den Effekt auch bei Primaten nachweisen.

Die Zellzahl und prozentualen Anteile der Leukozytensubpopulationen sind grundsätzlich ein guter Indikator für den Zustand des spezifischen Immunsystems, weil sie in gesunden Individuen keine gerade ablaufenden Immunantworten widerspiegeln (GREELEY 2001, S. 67). In der vorliegenden Untersuchung nahm der prozentuale Anteil der Lymphozyten ab, zu Gunsten einer Zunahme der neutrophilen Granulozyten. Die Anzahl der Leukozyten blieb nahezu konstant. Ähnliche Befunde stammen auch von Ratten (FLAHERTY 1997), Katzen (HEATON 2002), Hunden (GREELEY 2001), Pferden (MC FARLANE 1998) und dem Menschen (RINK SEYFARTH 1997, PTAK & SZCEPANIK 1998). Die Literatur über Veränderungen von Zellzahl und Differentialblutbild im Alter ist allerdings widersprüchlich: ADLER UND NAGEL (1981) fanden in einer humanen longitudinal angelegten Studie keine altersabhängigen Effekte, wohingegen GOULD et al. (1998) bei Rhesus Affen und BOWDEN (1994) bei Makaken eine Abnahme der Lymphozytenzahl in unterschiedlicher Deutlichkeit beobachten konnten.

Bei der Auswertung der unspezifischen Parameter des Immunsystems ergaben sich keine altersabhängigen Veränderungen: Phagozytosekapazität und Komplementaktivität standen in keinem Zusammenhang mit dem Alter der Tiere. Diese Ergebnisse stimmen mit einer Untersuchung an männlichen Tupajas überein: Diese 8 Jahre alten Tiere (N=4) hatten selbst noch kurz vor ihrem Tod ein funktionierendes unspezifisches Immunsystem (SCHERER 2005).

Einige Arbeiten über Phagozytoseaktivität bestätigen die Konstanz des Parameters im Alter bei Hunden (GREELEY, 2001: Labrador Retiever) und Menschen (KUROIWA et al., 1989 ; NIWA et al., 1989). Andere Autoren fanden ein altersabhängiges Absinken der Phagozytosekapazität ebenfalls beim Menschen (POLIGAGNO et al., 1994) und zum Beispiel bei Mäusen (GERVAIS 1988).

Bei alten Tupajas sank demzufolge vor allem die Aktivierbarkeit des spezifischen Immunsystems (Lymphozytenproliferation) mit dem Alter: Die Lymphozyten teilen sich langsamer, nehmen in ihrer Anzahl ab können weniger infizierte Körperzellen abtöten (KLEIN 1991).

Veränderungen des Hormonsystems, die im Alter auftreten, sind gut beschriebene Vorgänge. Alle großen Drüsen des Hormonsystems erleben einen altersabhängigen

Niedergang (LAMBERTS et al., 1997; PARKER 1999; PERRY 1999); die Blutspiegel von Progesteron und Testosteron (Geschlechtsdrüsen), von Dehydroepiandrosteron, Androstendion und Aldosteron (Nebenniere), von Wachstumshormon (Hirnanhangdrüse), von Vitamin D (Darm, Leber, Haut, Niere), Calcitonin (Schilddrüse) und *Insulin-like growth factor-I* (IGF, Leber) nehmen zunehmend ab. Nun gibt es auch Hormone, die im Alter ansteigen können. Dies ist zum Beispiel das adrenocorticotrophe Hormon (ACTH). Andere sind das Follikel-stimulierende Hormon (FSH) und das luteininsierende Hormon (LH), die Geschlechtsdrüsen aktivieren. Diese Hormone sind übergeordnete Steuerhormone für periphere Drüsen. Da die Leistung der peripheren Drüsen – zum Beispiel der Nebenniere und der Geschlechtsdrüsen – nachlässt, versucht das übergeordnete Steuerzentrum durch eine Erhöhung der Auswurfleistung des Steuerhormons, die Produktion dieser peripheren Hormone zu stimulieren.

Interessanterweise belegen viele „Alters-Studien“ an Ratten, dass der Blutspiegel der Glucokortikoide ansteigt; da sehr wahrscheinlich die generell geringere Nebennierenaktivität zu einer niedrigeren Gesamthormonproduktion führt, die nun zur Herstellung der lebenswichtigen Glucokortikoide zu Ungunsten der anderen Hormone umgelenkt wird (DE KOSKY et al. 1984; HAUGERT et al. 1994; MEANEY et al. 1992; SAPOLSKY et al. 1986). Bei Primaten und dem Menschen wiederum bleiben die Blutspiegel des Cortisols, aufgrund von Regulationsmechanismen, mit zunehmendem Alter unverändert (ANTIFEROVA 1998; BLICHERT-TOFT 1978; BORN et al. 1995; GONCHOROVA 1997). In der vorliegenden Arbeit wurde entgegen aller bisherigen Befunde von Ratten und Primaten eine signifikante Abnahme der morgendlichen Kortisol- sowie Kortikosteronkonzentration mit zunehmendem Alter weiblicher Tupajas festgestellt. Die in der Literatur beschriebene Zunahme bei Ratten bezieht sich meist auf einen 24-Stunden Mittelwert oder eine Steigerung im Verhältnis zu anderen Nebennierenrindenhormonen (Androgene, Mineralkortikosteroide); aufgrund der unterschiedlichen Einheiten und Methoden ist ein Vergleich mit diesen Ergebnissen nicht möglich. Jedoch ist die Verminderung des morgendlichen Kortisolspiegels bei Frauen ein beschriebener Alterungsprozess (STRAUB 2001).

SAPOLSKY (1992) weist darauf hin, dass alle bisherigen Studien in denen kein Anstieg der Serum-Kortisolkonzentrationen im Alter gefunden wurde, auf falsch bestimmten Basalwerten der jungen Tiere basierte. Im vorliegenden Versuch ist die Wahrscheinlichkeit aufgrund der langjährig angewandten einheitlichen Methodik gering, dass die

Ergebnisse durch unterschiedliche Behandlung der jungen und alten Tiere bedingt sein könnten.

Im Zusammenhang mit einer Alterung des Endokrinum wird weiterhin der Abfall der Geschlechtshormone berichtet (Übersicht: BRANN & MAHESH 2004). In der vorliegenden Arbeit konnte eine Abnahme des Östrogens (Östradiol) im Alter nachgewiesen werden. Da über die Fortpflanzungsbiologie bei Spitzhörnchen keine abschließenden Kenntnisse vorliegen, kann diese Abnahme nicht ausschließlich als Alterungsprozess gedeutet werden.

4.2 Altersabhängig veränderte Reaktionen auf den Umsetzversuch

Alle Tiere zeigten während der Umsetzphase generell kaum Fressen, Trinken und Putzen; es konnten in diesen Verhaltensweisen keine altersabhängigen Veränderungen festgestellt werden.

Die Tiere verbrachten in der ungewohnten Umgebung im Mittel wesentlich mehr Zeit im Schlafkasten als unter Haltingsbedingungen. Tiere, die mehr als die Hälfte der Zeit im Schlafkasten beobachtet wurden, waren im Mittel doppelt so alt wie Tiere, die weniger im Kasten waren: Alte Tiere waren im Mittel somit länger im Schlafkasten. Wider erwartend konnte in der neuen Umgebung keine Abnahme der Gesamtaktivität mit zunehmendem Alter beobachtet werden wie sie unter Haltingsbedingungen vorhanden war; vielmehr waren die alten Tiere ebenso häufig aktiv wie die jungen. Das heißt, alte Tiere zeigten im Vergleich zum Heimatkäfig einen Anstieg der Aktivität. Ältere Tiere hatten eine andere Zusammensetzung ihres Verhaltens: sie explorierten den Käfig deutlich weniger und turnten weniger oft im Vergleich zu jungen Tieren. Erhöhte Exploration junger Tiere ist z.B. von SIWAK (2002) bei Hunden und CHEN (2004) bei Mäusen beschrieben. Im vorliegenden Versuch ist jedoch zu beachten, dass alte Tiere aufgrund ihres hohen Alters schon an zahlreichen Untersuchungen, die stets das Umsetzen in einen neuen Raum beinhalten, teilgenommen hatten. Aufgrund dessen war die Umgebung für sie vermutlich nicht neu und sie zeigten aus diesem Grund weniger Neugierde.

Alte und junge Tiere verhalten sich unter Belastung in diesem Versuch sehr ähnlich. Dieser Befund festigt sich, wenn man die Phasen in denen die Tiere sich fortbewegten (rel. Aktivitätszeit), gesondert auswertet. Hier ergaben sich keine altersabhängigen Veränderungen im Verhalten.

Demzufolge wurde als Veränderung im Alter unter Belastung ausschließlich eine erhöhte Kastenaufenthaltsdauer festgestellt.

Äußere Einflüsse, somit auch eine neue Umgebung, führen bei Wirbeltieren zu einer messbar veränderten Hormonausschüttung. Je nach Qualität des Stressors können einzelne Hormonsysteme in unterschiedlichem Maß betroffen sein. Als gutes Maß für die Einschätzung der Belastung eines Tieres gilt allgemein die Konzentration der Serum-Glucokortikoide (SELYE 1950; VON HOLST 1969; SACHSER & LICK 1989).

Belastungen haben zudem einen Einfluss auf das Immunsystem von Säugetieren der sich wie folgt äußert: Abnahme der Leukozyten und Lymphozytenzahl im Blut, verminderte Lymphozytenproliferationsfähigkeit sowie ein Absinken der Komplementaktivität (Überblick: COE 1993).

In der vorliegenden Studie reagierte die Mehrzahl der Tiere auf die kurze Belastung – in Bezug auf den Ausgangswert zu dieser Uhrzeit – mit individuell verringerter Leukozytenzahl, einer verminderten Phagozytosekapazität sowie einem Absinken der Komplementaktivität. Diese Veränderungen der Immunparameter nach Belastung zeigten jedoch keine generellen altersabhängigen Zusammenhänge.

Nahezu alle Tiere zeigten als physiologische individuelle Reaktion auf die Umsetzphase erhöhte Kortisol- und Kortikosteronkonzentrationen im Vergleich zum Basalwert. Diese „Stressreaktion“ verminderte sich mit zunehmendem Alter der Tiere. Ältere Tiere zeigten ferner nach der Belastung niedrigere absolute Kortisolkonzentrationen als jüngere. Studien an versuchsunerfahrenen Ratten konnten ebenfalls keine altersabhängigen Geschwindigkeits- oder Qualitätsunterschiede in der Stressantwort auf Kälte oder Immobilisationstress zeigen (SAPOLSKY 2003); ältere Ratten benötigen jedoch längere Latenzzeiten um ihre Basal Serumkonzentrationen zu erreichen. Entgegen dieser Befunde belegen Untersuchungen am Menschen eine Zunahme im Alter der Cortisolfreisetzung unter Einfluss eines standardisierten physiologischen Stressors (RASKIND 1995: Infusion einer Salzlösung).

Die alten Tiere haben im vorliegenden Versuch aufgrund ihres hohen Alters schon an zahlreichen Untersuchungen, die stets das Umsetzen in einen neuen Raum beinhalten, teilgenommen. Die niedrigeren Glucokortikoidkonzentrationen könnten somit eine Gewöhnung an die Situation darstellen.

4.3 Schlussbetrachtung

Es konnte eine deutliche Abnahme der Aktivität im Heimatkäfig bei älteren Tupajas beobachtet werden. Entgegen anderer Befunde nahmen die Tiere altersunabhängig gleich viel Futter zu sich und putzten sich ähnlich häufig. Die Tiere nahmen im Alter nicht an Körpermasse zu.

Bezüglich der Immunseneszenz verringerten sich ausgeprägt die Funktionalität und Anzahl der Zellen des spezifischen zellulären Immunsystems (Lymphozyten).

Entgegen der Befunde von anderen Tieren wurde eine Abnahme der Glucokortikoidkonzentrationen im Alter festgestellt.

Auf eine leichte nicht soziale Belastung, reagierten Tiere verschiedenen Alters ohne besondere Verhaltensunterschiede. Die älteren Tiere mit mehr Versuchserfahrung zeigten weniger Interesse an der neuen Umgebung und waren häufiger im Schlafkasten. Dies spiegelte sich auch in den geringeren Stresshormon-Konzentrationen bei älteren Tieren wieder.

5 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, ob es bei *Tupaia belangeri* (Spitzhörnchen) Veränderungen von Verhalten und im Immunsystem im Alter gibt. In einem ersten Versuch wurden unter Standard Laborbedingungen (Heimatkäfig) gehaltene, zwischen 3 Monaten und 7 Jahren alte, Tiere untersucht. Hierfür wurden Verhaltensaufzeichnungen der Hellphase (12h) per Video für eine spätere Auswertung erstellt. Für die Bestimmung von Hormonen und Immunparametern wurde den Tieren zwei Stunden vor Beginn der Aktivitätsphase Blut entnommen.

In einem weiteren Versuch wurden dieselben Individuen für 2 Stunden in eine ihnen unbekannte Umgebung gebracht, um zu erforschen, ob die Tiere verschiedenen Alters unterschiedlich in Verhalten und Physiologie auf diese leichte Belastung reagieren. Während der Zeit in der neuen Umgebung (Versuchsräume) wurden wiederum Verhaltensaufzeichnungen angefertigt und im Anschluss eine Blutabnahme durchgeführt. Zusätzlich wurden 2 Wochen vor diesem Versuch Vorwerte zu dieser Tageszeit bestimmt, um über individuelle Veränderungen Aussagen treffen zu können.

Die wichtigsten Befunde sind:

- Die Aktivität nimmt mit zunehmendem Alter ab.
- Körpermasse und Nahrungsaufnahme ändern sich nicht im Alter.
- Die Funktionalität und Anteile der Zellen des spezifischen Immunsystems nehmen bei Tupajas mit zunehmendem Alter ab.
- Die morgendlichen Glucokortikoidkonzentrationen im Serum nehmen mit dem Alter ab.
- Auf eine leichte Belastung reagieren alte und junge Tiere mit vergleichbarem Verhalten; ältere Tiere explorieren im Unterschied weniger das neue Umfeld.
- Die Glucokortikoidausschüttung auf eine Belastung hin nimmt mit zunehmendem Alter der Tiere ab.

6 Anhang

6.1 Verwendete Abkürzungen

Abb.	Abbildung
ConA	Concanavalin A
cpm	counts per minute
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
Hepes	4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinethansulfonsäure
LTT	Lymphozyten-Transformationstest
n	Anzahl
Lymph.	Lymphozyten
Mono.	Monozyten
Gran.	Granulozyten
n.g.	nicht gezählt
Akt.	Aktivität
p	statistische Irrtumswahrscheinlichkeit
PBS	phosphatgepufferte Saline
R_s	Korrelationskoeffizient nach Spearman
RIA	Radioimmunoassay
VBLTT	Vollblut-LymphozytenTransformationstest
VBS	Veronal Buffered Saline
VBSS	Veronal Buffered Sacharose Saline
WBC	White blood cells (Leukozyten)

6.2 Geräte

- Laborwaage (Modell PT 6, Sartorius)
- Partikelzählgerät (Coulter Electronics Ltd.)
- Mikroskop (Leitz)
- Zentrifuge (Roto Silenta/rp; Hettich)
- Cleanbench (Gelaire TC48, Flow Laboratories)
- Kühlzentrifuge (Roto Silenta/RP, Hettich)
- Inkubator. IR 1500; Flow Laboratories, ICN Biomedicals).
- Titertek Cell Harvester (Flow Flow Laboratories, ICN Biomedicals)
- Beta Counter (1409 Liquid Scintillation Counter, Wallac)
- Lumineszens-Messgerät: Multi-Bioluminat LB95505
- Eppendorf-Tischzentrifuge 5412
- Photometer: GenesysTM 5, Spectronics[®] Instruments

6.3 Originaldaten

6.3.1 Versuch 1 (Haltungsbedingungen)

6.3.1.1 Verhaltensdaten

Tabelle 6: Verhaltensdaten (12 Stunden) für alle Versuchstiere im Haltungskäfig.

r=ruhen,l=lokomotion,f=fressen,t=trinken,p=putzen,k=Kasten,s=sonst [% der Tagesintervalle]; t=turnen: angegeben in Anzahl pro Stunde.

Kennung Bt	r	L	f	t	p	k	s	t[n]
852	10,3	32,6	13,6	2,9	5,4	0,6	4,0	0
871	10,2	33,5	13,7	2,0	8,0	0,8	1,5	0
875	17,1	22,8	14,5	3,2	3,6	1,4	2,6	24,3
887	27,3	30,0	15,2	1,1	2,3	0,0	1,4	0
890	37,2	13,4	14,1	4,5	1,5	2,0	1,7	7,0
902	18,3	41,3	6,1	2,5	3,6	0,0	0,8	0
910	12,7	40,3	12,6	3,9	6,0	2,1	0,3	32,7
926	29,2	25,7	15,1	2,0	3,1	0,0	2,1	2,9
939	26,0	33,1	19,0	4,3	2,9	0,1	3,5	0
942	23,3	43,3	13,1	1,8	3,6	1,8	1,7	59,8
945	16,0	43,4	13,6	1,5	4,3	0,3	0,1	31,7
948	13,5	46,8	9,6	2,4	4,7	0,1	1,4	n.g.
954	17,2	14,5	2,8	4,1	6,1	1,5	0,0	85,5
986	24,7	33,5	14,6	1,9	1,9	0,1	0,8	66,1
991	9,0	48,3	16,6	4,3	5,3	0,0	3,1	n.g.
996	22,7	48,8	11,4	2,1	4,7	0,6	0,7	63,2
1001	18,1	22,0	19,5	3,1	2,8	0,0	0,4	21,3
1005	3,6	55,9	15,4	1,2	6,9	1,4	2,2	46,8
1022	22,9	32,5	14,0	1,9	4,0	0,6	1,3	0
1110	13,1	48,1	8,6	2,8	4,0	0,1	1,0	85,0
1117	3,1	61,2	12,0	2,3	4,0	1,3	1,0	204,4
1124	5,2	50,0	14,6	3,7	6,1	0,0	1,6	149,6
1148	5,8	54,9	17,4	2,2	2,9	0,6	0,6	68,0
1209	12,4	45,7	12,2	6,4	2,9	1,1	1,5	83,8
1225	18,8	47,7	17,5	2,2	2,9	0,4	3,3	0
1229	13,7	44,5	14,2	4,3	4,7	3,3	2,6	0
1236	2,4	70,0	8,9	5,1	3,9	0,0	3,9	0
1243	8,6	59,2	14,0	5,5	7,2	1,2	2,5	0
1245	2,2	50,3	10,8	3,5	3,8	0,4	2,1	106,8
1253	0,0	70,5	18,2	4,3	1,9	1,7	0,3	420,8
1260	4,9	55,6	17,1	2,5	4,6	1,5	1,3	172,9
1265	1,8	61,1	12,2	4,2	5,3	0,3	3,6	166,1
1266	2,9	71,5	8,0	2,5	6,0	0,0	1,1	294,5
1269	4,5	63,0	14,5	3,3	4,0	0,3	1,4	215,8
1271	1,7	65,8	15,5	3,7	3,2	0,0	2,9	288,7
1286	1,8	60,2	14,6	6,3	2,1	0,4	2,1	251,5

6.3.1.2 Physiologische Daten

**Tabelle 7: Aufstellung der ermittelten Gewichte [g] aller Versuchstiere unter
Haltungsbedingungen zwei Stunden vor Beginn der Hellphase (8 Uhr).**

Kennung Bt	Gewicht [g]
852	169
871	183
875	204
887	184
890	227
902	184
910	229
926	239
939	207
942	197
945	197
948	199
954	201
986	238
991	213
996	200
1001	229
1005	206
1022	195
1110	237
1117	193
1124	217
1148	190
1209	238
1225	174
1229	189
1243	168
1245	183
1253	164
1260	159
1265	202
1266	172
1269	175
1270	175
1271	163
1286	232

Tabelle 8: Auflistung immunologischer Parameter der Blutabnahme aller Versuchstiere um 8.00 Uhr(AGW_{8h}) unter Haltungsbedingungen.

Kennung Bt	Leukozyten [n/ μ l]	Phagozytose-Kap.[10 ⁶ cpm 30min/ml Blut]	Komplement-Akt. [IU/ml Serum]	LTT [cpm/10 ⁵ Zellen]	VBLTT [Cpm/ml Vollblut]
852	6840	0,00	662	3106	908719
871	5315	280,13	1001	251	33589
875	13588	4180,23	477	11744	2207920
887	7191	0,00	1140	5320	1341607
890	9783	1304,18	1148	593	77755
902	7564	1026,78	1229	2763	334917
910	4019	311,06	649	921	97179
926	3644	246,15	2078	779	73403
939	10562	1256,55	1591	34212	8386506
942	4303	6061,33	653	8736	1729728
945	3911	122,44	629	2428	196308
948	4801	127,71	318	16159	1514076
954	10243	307,40	1516	92437	17100864
986	8280	1378,65	483	121538	46446129
991	5481	73,47	3506	104548	20700592
996	8124	127,39	713	51972	41263761
1001	10796	24670,55	1743	63824	12637152
1005	4321	288,11	-	1151	158129
1022	19272	2705,00	-	12271	2380576
1110	17624	330,80	3088	109709	21064208
1117	6615	236,10	1352	87718	17192736
1124	10262	253,70	2604	12833	2540912
1148	17288	530,90	1763	124876	24475616
1209	6549	366,67	788	63300	12533488
1225	12804	212,30	470	129719	42368314
1229	8631	22130,77	1000	103691	20530752
1243	4416	26522,36	-	102141	20223984
1245	9807	24139,62	1213	102900	20374112
1253	6025	2615,54	-	11719	2285218
1260	13829	69,80	731	117576	23280048
1265	3887	154,09	-	18030	4046441
1266	2880	37,47	1275	46983	7625384
1269	5251	120,69	1008	62188	6277194
1270	5236	134,04	-	13885	2806166
1271	5912	1780,28	1077	42458	6711130
1286	18040	2460,00	2246	141920	28100160

Tabelle 9: Auflistung hämatologischer Parameter der Blutabnahme aller Versuchstiere um 8.00 Uhr(AGW_{8h}) unter Haltungsbedingungen.

Kennnung Bt	Anteil Lymph.	Anteil Mono	Anteil Gran.	Anzahl Lymph.	Anzahl Mono.	Anzahl Gran.
852	50	4	46	3420	273,6	3146,4
871	65	6	29	3454,75	318,9	1541,35
875	44	10	46	5978,72	1358,8	6250,48
887	42	5	53	3020,22	359,55	3811,23
890	40	2	58	3913,2	195,66	5674,14
902	40	3	57	3025,6	226,92	4311,48
910	49	3	48	1969,31	120,57	1929,12
926	54	4	42	1967,76	145,76	1530,48
939	52	8	40	5492,24	844,96	4224,8
942	46	7	47	1979,38	301,21	2022,41
945	62	3	35	2424,82	117,33	1368,85
948	54	2	44	2592,54	96,02	2112,44
954	46	3	51	4711,78	307,29	5223,93
986	42	8	50	3477,6	662,4	4140
991	67	5	28	3672,27	274,05	1534,68
996	47	4	49	3818,28	324,96	3980,76
1001	33	4	63	3562,68	431,84	6801,48
1005	52	3	45	2246,92	129,63	1944,45
1022	43	6	51	8286,96	1156,32	9828,72
1110	57	2	41	10045,68	352,48	7225,84
1117	56	3	41	3704,4	198,45	2712,15
1124	50	2	48	5131	205,24	4925,76
1148	56	2	52	9681,28	345,76	8989,76
1209	61	4	35	3994,89	261,96	2292,15
1225	50	5	45	6402	640,2	5761,8
1229	68	3	29	5869,08	258,93	2502,99
1243	75	10	15	3312	441,6	662,4
1245	67	5	28	6570,69	490,35	2745,96
1253	40	8	52	2410	482	3133
1260	65	5	30	8988,85	691,45	4148,7
1265	70	3	27	2720,9	116,61	1049,49
1266	52	3	45	1497,6	86,4	1296
1269	80	4	16	4200,8	210,04	840,16
1270	50	10	40	2618	523,6	2094,4
1271	64	6	30	3783,68	354,72	1773,6
1286	80	2	18	14432	360,8	3247,2

Tabelle 10: Auflistung endokriner Parameter der Blutabnahme aller Versuchstiere um 8.00 Uhr(AGW_{8h}) unter Haltungsbedingungen.

Kennung Bt	Kortisol [ng/ml Serum]	Kortikosteron [ng/ml Serum]	Östradiol [ng/ml Serum]
852	13,9	37,7	3,8
871	36,6	60,9	4,4
875	10,7	48,4	4,2
887	61,2	110,7	5,3
890	12,5	34,3	1,6
902	7,9	23,9	3,3
910	40,9	58,4	4,5
926	12,9	21,9	5,2
939	11,0	33,6	2,4
942	5,0	25,5	3,9
945	11,1	40,9	4,6
948	24,1	96,2	4,9
954	17,5	64,9	5,0
986	16,8	70,5	6,8
991	15,0	20,3	6,0
996	24,9	59,8	6,0
1001	34,4	69,5	4,9
1005	14,0	31,9	7,0
1022	12,7	35,4	2,7
1110	20,2	43,0	4,9
1117	33,5	88,3	4,2
1124	35,6	79,1	5,8
1148	18,9	38,5	7,0
1209	25,5	64,6	7,5
1225	14,3	39,6	6,2
1229	21,5	41,2	5,3
1243	9,2	36,1	8,8
1245	23,5	62,6	8,1
1253	50,5	110,0	7,4
1260	14,8	30,5	5,8
1265	33,8	93,3	7,3
1266	35,0	99,5	4,6
1269	18,7	53,0	9,0
1270	25,3	68,4	4,3
1271	2,3	102,4	4,3
1286	46,6	86,8	1,5

6.3.2 Versuch 2 (Umsetzphase)

6.3.2.1 Verhaltensdaten

Tabelle 11: Verhaltensdaten (2 Stunden) aller Versuchstiere während der Umsetzphase.

ex.=exploration, v=verweilen, l=lokomotion, f=fressen, tr=trinken, p=putzen, k=Kasten: angegeben in [% der Tagesintervalle]; tu=turnen, m=markieren: angegeben in Anzahl pro 2 Stunden.

Kennung Bt	ex.	v.	l.	f.	tr.	p	k	tu. [n]	m[n]
852,0	20,2	0	0	0	0	0	79,8	0	0
871,0	0	0	0	0	0	0	100	0	0
875,0	1,7	0,8	0	0	0	0	97,5	4,0	0
887,0	37,2	21,2	18,6	12,4	4,4	6,2	0	55,0	26,0
890	32,5	5,7	4,9	0	0	1,6	55,3	0	13,0
902,0	24,8	69,5	5,7	0	0	0	0	0	0
910	28,3	2,5	9,2	0	0	2,5	57,5	0	40
926,0	44,0	34,9	15,6	0	0	0	5,5	0	6,0
939,0	69,0	15,9	8,0	0	0	0	7,1	3,0	0
942,0	15,8	3,3	1,7	0	0	0	79,2	23,0	0
945,0	8,8	0	0	0	0	0	91,2	0	0
948,0	52,3	8,4	29,9	0	1,9	0,9	6,5	7,0	0
954,0	5,0	34,2	0	0	0	0	60,8	0	0
986,0	71,4	0	19,6	0	3,6	0	5,4	0	0
991,0	59,1	15,5	20	0	0	0	5,5	0	1,0
996,0	52,5	4,2	26,7	0,8	0	0,8	15,0	93,0	2,0
1001,0	34,9	17,8	8,5	0	0	0,8	38,0	17,0	45,0
1005,0	6,9	3,4	0	0	0	0	89,7	0	0
1022,0	46,8	18,0	23,4	5,4	0	0	6,3	21,0	20
1110	0,9	3,5	0	0	0	0	95,6	0	0
1117,0	35,4	24,8	11,5	0	0	0	28,3	5,0	37,0
1124,0	58,8	22,8	14,9	0	0	0	3,5	0	0
1148,0	85,6	4,5	3,6	0	0	0	6,3	6,0	0
1209,0	5,2	8,6	0,9	0	0	0	85,3	0	0
1225,0	53,8	31,6	12,8	0	0	0	1,7	3,0	16,0
1229,0	15,4	30,8	0,9	0	0	0	53,0	0	0
1243,0	0	0,9	5,5	0	0	0	93,6	6,0	0
1245,0	51,3	6,2	26,5	2,7	0	1,8	11,5	29,0	0
1253,0	70,8	6,9	13,9	0	0	0	8,3	4,0	0
1260	39,8	12,7	2,5	0	0,8	0	44,1	4,0	7,0
1265,0	34,2	3,3	14,2	0	0	0	48,3	39,0	0
1266,0	35,1	3,5	12,3	0	0	0	49,1	0	6,0
1269,0	45,1	31,9	4,4	0	0	0	18,6	3,0	0
1270	63,2	9,2	22,4	0	0	0	5,3	22,0	37,0
1271,0	62,5	14,2	20	0	0	0,8	2,5	3,0	0
1286,0	63,3	16,7	15,0	0	0	0	5,0	49,0	0

6.3.2.2 Immunologische und hämatologische Parameter

Tabelle 12: Auflistung immunologischer Parameter der Blutabnahme aller Versuchstiere um 12 Uhr (AGW_{12h}).

Kennung Bt	Leukozyten [n/μl]	Phagozytose-Kap. [10 ⁶ cpm30min/ml Blut]	Komplement-Akt. [IU/ml Serum]	LTT [cpm/10 ⁵ Zellen]	VBLTT [cpm/ml Vollblut]
852	8274	333	2493	120872	166682602
871	2261	390	2657	110410	25173423
875	5007	672	1669	78030	29571128
887	3254	481	596	147626	61933365
890	7911	699	4907	285486	135564502
902	1071	1062	728	160850	37075524
910	1895	177	-	71177	15896596
926	9254	2168	882	16639	8588863
939	2981	217	654	127367	32972328
942	2617	295	-	19722	2971793
945	2781	213	1175	233810	38966268
948	6017	4009	2780	36936	10806502
954	-	112	711	31915	-
986	3110	535	898	96680	10805549
991	3184	262	1398	21720	8471502
996	2333	640	782	18503	3129064
1001	922	557	1743	9700	660281
1005	2645	179	2421	43532	10448169
1022	3946	2489	2788	188	69683
1110	8226	5570	2476	2591	680731
1117	19077	3902	641	30402	47364948
1124	5400	286	3359	-	730
1148	886	297	1499	19940	2347622
1209	2966	148	1287	23130	6191148
1225	3936	733	1518	21007	933909
1229	2124	3867	738	21961	4065007
1243	20527	2336	2356	115416	86859759
1245	3483	459	3717	135702	39823282
1253	23345	3871	2880	31713	48895316
1260	2051	3680	1022	3781	644005
1265	1115	116	1987	239489	24523173
1266	1435	1092	1619	41809	5133629
1269	2708	117	779	41055	8300541
1270	4768	2643	2163	36730	8189827
1271	3955	4371	2906	67451	8365614
1286	969	3186	2154	26108	2010093

Tabelle 13: Auflistung immunologischer Parameter der Blutabnahme aller Versuchstiere nach der Umsetzphase (12 Uhr).

Kennung Bt	Leukozyten [n/ μ l]	Phagozytose- Kap.[10^9 cpm 30min/ ml Blut]	Komplement- Akt. [IU/ml Serum]	LTT [cpm/ 10^5 Zellen]	VBLTT .[cpm/ml Vollblut]
852	1427	78,00	2333,00	41612	7906248
871	1267	69,20	533,00	13044	2980129
875	1392	46,67	2301,00	9307	1442739
887	905	96,60	2137,00	22597	1578615
890	3657	1678,00	860,00	10194	1834837
902	3561	36,40	1769,00	735	797281
910	2419	34,65	4725,00	1887	132699
926	2054	0,00	3623,00	2541	354993
939	1703	578,00	750,00	19051	3314934
942	2366	106,20	565,00	24053	4709350
945	1477	19,42	1557,00	7507	1451891
948	1552	79,40	1124,00	761	191079
954	1154	1840,00	1831,00	2325	266859
986	6100	589,00	920,00	57221	9140428
991	2633	38,10	1656,00	21785	4191635
996	1486	1716,00	1031,00	84989	15585825
1001	517	4208,00	2514,00	18118	2917309
1005	2381	232,40	1193,00	149	35789
1022	2766	100,20	162,00	17119	5336057
1110	3513	3550,00	1858,00	1185	414942
1117	-	48,90	960,00	-	-
1124	-	2550,00	581,00	-	-
1148	641	1457,00	828,00	120	31935
1209	2097	54,40	1237,00	16512	3363622
1225	1271	116,90	3405,00	4909	62832
1229	974	675,60	1089,00	3483	682715
1243	6363	1424,00	2396,00	16137	24948200
1245	901	1184,00	1467,00	9358	861852
1253	753	226,60	807,00	7078	869027
1260	1339	1538,00	393,00	3571	1147614
1265	394	20,70	674,00	4910	1018626
1266	468	2692,00	1198,00	4074	268120
1269	2500	129,00	4134,00	4790	3470518
1270	1669	2692,00	423,00	18803	2483520
1271	-	807,30	618,00	-	-
1286	2889	790,00	712,00	1005	492165

Tabelle 14: Auflistung hämatologischer Parameter der Blutabnahme aller Versuchstiere um 12 Uhr (AGW_{12h}).

Kennnung Bt	Anteil Lymphozyten.	Anteil Monozyten	Anteil Granulozyten	Anzahl Lymph.	Anzahl Mono.	Anzahl Gran.
852	66,0	3,8	35,2	5461	314	2912
871	69,1	3,9	26,3	1562	88	595
875	54,0	7,0	36,0	2704	350	1803
887	76,4	1,8	21,1	2486	59	687
890	55,0	4,0	41,0	4351	316	3244
902	73,0	4,5	22,5	782	48	241
910	40,0	35,0	55,0	758	663	1042
926	76,0	4,5	19,5	7033	416	1805
939	78,0	0,5	21,5	2325	15	641
942	63,5	2,0	31,5	1662	52	824
945	72,0	3,5	24,5	2002	97	681
948	56,0	4,0	40,0	3370	241	2407
954	55,0	4,0	41,0	-	-	-
986	76,5	2,0	21,5	2379	62	669
991	59,0	3,0	36,5	1879	96	1162
996	78,5	3,0	18,5	1831	70	432
1001	-	-	-	-	-	-
1005	75,0	4,0	21,0	1984	106	555
1022	80,5	6,0	13,5	3177	237	533
1110	83,5	3,0	12,5	6869	247	1028
1117	87,5	4,5	8,0	16692	858	1526
1124	72,5	2,5	17,5	3915	135	945
1148	75,5	4,0	20,5	669	35	182
1209	58,5	3,5	38,0	1735	104	1127
1225	80,0	3,0	17,0	3149	118	669
1229	65,3	6,5	27,5	1386	138	583
1243	80,0	2,5	17,5	16422	513	3592
1245	63,0	7,0	30,0	2194	244	1045
1253	78,0	3,5	17,5	18209	817	4085
1260	64,0	1,0	35,0	1313	21	718
1265	-	-	-	-	-	-
1266	60,0	3,5	35,0	861	50	502
1269	60,0	2,0	37,5	1625	54	1016
1270	73,0	4,0	12,5	3481	191	596
1271	73,0	1,0	23,0	2887	40	910
1286	90,0	10,0	10,0	872	97	-

Tabelle 15: Auflistung hämatologischer Parameter der Blutabnahme aller Versuchstiere nach der Umsetzphase (12 Uhr).

Kennnung Bt	Anteil Lymphozyten	Anteil Monozyten	Anteil Granulozyten	Anzahl Lymph.	Anzahl Mono.	Anzahl Gran.
852	64	4	32	913,28	57,08	456,64
871	77	3	20	975,59	38,01	253,4
875	71	2,8	24,6	988,32	38,976	342,432
887	50	3	47	452,5	27,15	425,35
890	80	5	15	2925,6	182,85	548,55
902	74	3	22,5	2635,14	106,83	801,225
910	78	2	20	1886,82	48,38	483,8
926	39	3	58	801,06	61,62	1191,32
939	54,5	6,25	39,25	928,135	106,4375	668,4275
942	71	4	25	1679,86	94,64	591,5
945	46	4	50	679,42	59,08	738,5
948	59	4	37	915,68	62,08	574,24
954	69,5	1,5	29	802,03	17,31	334,66
986	37	6	57	2257	366	3477
991	65	5	30	1711,45	131,65	789,9
996	79	13	6	1173,94	193,18	-
1001	-	-	-	-	-	-
1005	54	2	44	1285,74	47,62	1047,64
1022	62	1	36	1714,92	27,66	995,76
1110	22	2	74	772,86	70,26	2599,62
1117	69,5	8,5	22	-	-	-
1124	70	3	27	-	-	-
1148	63	12	25	403,83	76,92	160,25
1209	77	2	19	1614,69	41,94	398,43
1225	70,5	2,5	26,5	896,055	31,775	336,815
1229	82	1	17	798,68	9,74	165,58
1243	75	4	21	4772,25	254,52	1336,23
1245	70	3	27	630,7	27,03	243,27
1253	72	2	24	542,16	15,06	180,72
1260	69,5	3	27,5	930,605	40,17	368,225
1265	72	3	25	283,68	11,82	-
1266	75	3	21	351	14,04	-
1269	49,5	15	35,5	1237,5	375	887,5
1270	80	2	18	1335,2	33,38	300,42
1271	-	-	-	-	-	-
1286	69	6	25	1993,41	173,34	722,25

Tabelle 16: Auflistung endokriner Parameter der Blutabnahme nach der Umsetzphase aller Versuchstiere um 12 Uhr.

Kennnung Bt	Kortisol [ng/ml Serum]	Kortikosteron [ng/ml Serum]	Östradiol [ng/ml Serum]
852	24,49	59,658	4,173
871	3,526	14,631	5,397
875	13,078	57,418	1,912
887	2,225	8,942	6,073
890	10,716	32,186	1,998
902	3,273	18,378	3,358
910	6,649	18,793	3,899
926	6,007	16,112	0,866
939	3,435	21,648	3,426
942	0,488	15,477	4,857
945	4,121	19,429	5,476
948	5,612	30,892	1,84
954	7	38,366	4,478
986	12,859	67,228	7,401
991	4,695	14,85	4,534
996	4,515	17,92	5,185
1001	2,355	11,419	4,547
1005	1,388	10,066	5,025
1022	7,793	25,551	3,003
1110	9,138	34,177	5,691
1117	3,439	18,948	4,947
1124	4,12	13,663	3,79
1148	3,388	14,86	10,22
1209	4,983	22,053	7,394
1225	4,688	13,681	4,894
1229	10,914	24,383	3,836
1243	4,946	24,88	5,729
1245	8,342	36,781	5,418
1253	12,427	42,773	4,578
1260	-	-	7,489
1265	3,902	14,849	4,233
1266	17,894	44,22	5,51
1269	8,484	28,08	5,364
1270	7,737	26,833	4,884
1271	3,436	26,419	-
1286	6,791	23,247	2,636

Tabelle 17: Auflistung endokriner Parameter der Blutabnahme aller Versuchstiere um 12 Uhr nach der Umsetzphase.

Kennnung Bt	Kortisol [ng/ml Serum]	Kortikosteron [ng/ml Serum]	Östradiol [ng/ml Serum]
852	6,458	29,748	2,457
871	7,26	33,284	4,7
875	28,438	137,695	2,774
887	44,672	120,075	3,3725
890	10,24	47,066	0,916
902	16,366	23,496	3,733
910	5,051	20,939	4,0145
926	105,192	113,202	5,8935
939	23,164	73,715	2,6565
942	24,391	82,405	4,7555
945	7,002	30,689	2,714
948	15,974	85,296	1,532
954	62,888	136,889	5,5685
986	30,724	131,494	4,521
991	11,327	27,604	5,139
996	29,708	43,946	6,89
1001	70,765	135,595	5,001
1005	186,186	263,306	7,5
1022	40,932	117,161	1
1110	144,642	312,879	6,1535
1117	34,21	97,76	4,416
1124	197,283	276,962	6,9655
1148	228,461	287,615	6,471
1209	19,866	78,721	10,319
1225	108,008	160,435	5,468
1229	118,849	142,293	6,357
1243	29,09	120,149	7,144
1245	43,01	154,862	6,318
1253	228,327	203,412	6,486
1260	9,676	18,815	5,648
1265	11,297	38,821	4,012
1266	52,974	91,509	1,987
1269	32,215	55,396	9,312
1270	171,862	219,123	4,247
1271	40,576	134,585	0,631
1286	169,292	150,039	6

7 Literaturverzeichnis

ADLER, P., NAGEL, H. (1981):

Studies of immune function in a human population.
In: Segre, D.: Immunobiological Aspects of Aging.
Marcel Dekker, N.Y., 295-311

ANTSIFEROVA, N., TARANOC, A.G. (1998):

Adrenal and testicular steroid genesis in aging and some chronic diseases in primates.
In: 10th International Congress on Hormonal Steroids, Quebec City

AOKI, K. (1995):

Age related changes in ConA induced cytokine production by splenocytes from senescence accelerated mice.
Immunology Letters, 46, 169-175

ARKING R. (1991):

Biology of Aging: Observations and Principles
Prentice Hall, London, Sydney, New Jersey, Toronto

AUJARD, F., PERRET, M. (1998):

Age related Effects on Reproductive Function and Sexual Competition in the Male Prosimian Primate, Micocebus Murinus.
Physiology & Behavior, 64, (4), 513-519

BLICHERT-TOFT, M. (1987):

The adrenal glands in old age.
In: Grennblatt, R.B., Geriatric Endocrinology.
Aging vol. 5, Raven Press, New York, 81-104

BORN, J. et al. (1995):

Effect of age and gender on pituitary-adrenocortical responsiveness in humans.
Eur. J. Endocrinology, 132, 705-711

BOWDEN, D.M., SHORT, R., WILLIAMS, D.D. (1994):

Immunological markers in a longitudinal study of aging in pigtailed macaques.
Journal. Gerontology, 49, 93-103

BRANN, D.W., MAHESH, V.B. (2004):

The aging reproductive neuroendocrine axis.
Steroids, 70, 273-283

CHEN GUI, HAI. (2004):

Age and sex related disturbance in a battery of sensimotor and cognitive tasks in Kunming mice.

Physiology & Behavior, 83, 531-541

COE, C.L., ROSENBERG, L., LEVINE, S. (1988):

Effect of maternal separation on the complement system and antibody responses in infant primates.

Int. J Neurosci., 40, 289-302

COE, C.L. (1993):

Psychosocial factors and immunity in nonhuman primates: a review

Psychosomatic Medicine, 55(3), 298-308

COLLINS, P., TSANG, W., METZGER, J.M. (1984):

Influence of stress on adrenocortical function in the male tree shrew (*Tupaia belangeri*).

Gen. Comp. Endocr. 55, 450-457

DE KLOET, R.E. (1992):

Corticosteroide, stress and aging.

Ann. N.Y. Acad. Sci., 663, 357-371

DE KOSKY, S.T., SCHEFF, S.V., COTMAN, C.V. (1984):

Elevated corticosteron levels. A mechanism for sprouting in the aged hippocampus.

Neuroendocrinology, 38, 33-40

DE LA FUENTE, M. et al. (2004):

Changes with ageing in several leukocyte functions of male and female rats.

Biogerontology, 5, 389-400

EMBORG, M.E., MUFSON, E.J. (1998):

Age related declines in nigral neuronal function correlate with motor impairment in rhesus monkeys.

Journal Comp. Neurol 401, 53-265

FENSKE, M., FUCHS, E., PROBST, B. (1982):

Corticosteroid, catecholamine and glucose plasma levels in rabbits after repeated exposure to a novel environment or administration of (1-24) ACTH or insulin.

Life Sci. 31, 127-132

FERGUSON, M. (1995):

Technology Foresight Panel on Health and Life Sciences.
Technology Foresight 4., London: HMSO

FLAHERTY, D.K., WAGNER, C.J., PANYIK, M.A. (1997):

Aging and lymphocyte subsets in the spleen and peripheral blood of the Sprague-Dawley rat.
Immunopharmacol. Immunotoxicol., 19, 185-195

GATTERMANN, R., FRITZSCHE P., WEINANDY, R. (2003)

Running-wheel activity and body composition in golden hamsters (*Mesocricetus auratus*).
Physiology & Behavior, 82(2/3), 541-544

GERVAIS F., PATEL E., SKAMENE E. (1988):

Increased natural resistance to *Listeria monocytogenes* in senescent mice correlates with enhanced macrophage bactericidal activity.
J. Gerontol, 43, B152-B156

GILMAN, S., SCHWARTZ, J., MILNER, R., BLOOM, F., FELDMANN, J. (1982):

β -Endorphin enhances lymphocyte proliferate responses.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA Vol. 79, 4226-4230

GONCHAROVA, N.D. (1997):

The hormonal function of the adrenal glands in humans and moneys during hemoblastosis and aging.
Byulleten Eksperimentalnoi Biologii I Medisiny, 124, 207-210

GOULD, K.G., AKINBAMI, M.A., MANN, D. (1989):

Effect of neonatal treatment with a gonadotropin releasing hormone antagonist on developmental changes in circulating lymphocyte subsets: a longitudinal study in male rhesus monkeys.
Dev Comp Immunol., 22(4), 457-67

GREELEY, E.H., BALLA, J.M., HARRISON, J.M., KEALY R.D, LAWLER, D.F., SEGRE, M., (2001):

The influence of age and gender on the immune system: a Longitudinal study in Labrador Retriever dogs.
Veterinary Immunology and Immunopathology, 82, 57-71

HARRISON, R.A., LACHMAN, J.P. (1997):

Complement technology, 4th edition
In: Schulz, K-H. : Psychoneuroimmunologie, 89-104
Verlag Hans Huber, Bern

HAUGERT, B.L., THRIVIKRAMAN, K. V., PLOTSKY, P.M. (1994):

Age related alterations of hypothalamic-pituitary-adrenal axis function in male Fischer 334 rats.

Endocrinology, 134, 1528-1536

HEATON, P. R., BLOUNT, D. G., MANN, S., DEVLIN P. (2002)

Assessing Age related Changes in Peripheral Blood Leukocyte Phenotypes in Domestic Shorthaired Cats using flow cytometry.

The American Society for Nutritional Sciences : J Nutr, 132, 1607S-1909S

HILLERAS, P.K., JORM, A., HERLITZ, A., WINBLAD, B. (1999):

Activity patterns in very old people: a survey of cognitively subjects ages 90 years or older.

Age Aging, 28, 174- 152

HIROKAWA, K., UTSUYAMA, M. (2002):

Animal models and possible human application of immunological restoration in the elderly

Mechanisms of aging and Development. 132, 1055-1063

HOGENESCH, H., THOMPSON, S., DUNHAM, A., CEDDIA, M., HAYEK, M. (2004):

Effect of age on immune parameters and the immune response of dogs to vaccines: a cross sectional study.

Veterinary Immunology and Immunopathology, 97, 77-85

VON HOLST, D., LESK, S. (1975):

Über den Informationsgehalt des Sternaldrüsensekrets männlicher und weiblicher *Tupaia belangeri*.

J. comp. Physiol., 103, 173-188

VON HOLST, D. (1969):

Sozialer Streß bei Tupajas (*Tupaia belangeri*)

Z. vergl. Physiologie, 63, 1-58

VON HOLST, D. (1994):

Auswirkung sozialer Kontakte bei Säugetieren.

Biol. Unserer Zeit; 164-174

VON HOLST, D., HUTZELMEYER, H. KAISER, C., VITEK, A. (1997):

Auswirkung sozialer Kontakte auf Endokrinum und Immunsystem von Tupajas.

In: Psychoneuroimmunology: Ein interdisziplinäres Forschungsgebiet, 73-89

Verlag Hans Huber, Bern

VON HOLST, D., (1998):

The concept of stress and its relevance for animal behavior.
In: Advances in the study of behaviour, 27, 1-131
Acadamec Press. Ney York

HOROHOV, D.W., KYDD, J.H., HANNANT, D. (2001)

The effect of aging on T cell response in the horse.
Development and Comparative Immunology, 26, 121-128

JANEWAY, A. JR. (2002)

Immunologie 5. Auflage
Spektrum Akademischer Verlag; Heidelberg, Berlin

JAYAASHANKAR, L., BRASKY, K.M., WARD, J.A., ATTANASIO, R. (2003)

Lymphocyte Modulation in a Baboon Model of Immunosenescence.
Clinical and Diagnostic Lab. Immunology ,Sept 2003, 870-875

JOSEPH, J. A., ROTH, G.S. (1988):

Altered striatal dopaminergic and cholinergic reciprocal inhibitory control and motor behavioral decrements in senescence.
Ann. N.Y. Acad. Sci.: 521, 110-122

JUNKER, M., (1999):

Einfluß variabler Licht-Dunkel Periodik auf Verhalten und physiologische Parameter von Tupaia belangeri.
Diplomarbeit, Fakultät Biologie, Chemie und Geowiss. Universität Bayreuth

KAISER, C. (1996):

Trennung physischer und psychischer Anteile sozialer Streißreaktionen bei männlichen Tupaia belangeri.
Inaugural Dissertation,
Fakultät Biologie, Chemie und Geowiss. Universität Bayreuth

KAMPEN, M., FUCHS, E. (1998):

Age-Related Levels of Urinary Free Cortisol in the Tree Shrew.
Neurobiology of Aging, 19, 363-366

KAWAMICHI, T., KAWAMICHI, M. (1979):

Spatial organisation and territory of Tree Shrews (Tupaia glis).
Anim. Behav., 27, 381-393

KLEIN, J. (1991):

Immunologie
VCH Verlagsgemeinschaft mbH, Weinheim

- KRAUSE, D., MASTRO, M., HANDTE, G. (1999):**
Immune function did not decline with aging in apparently healthy, well-nourished women.
Mechanisms of Ageing and Development, 12, 43-57
- KUROIWA ET AL. (1989):**
Re-evaluation of phagocytic respiratory burst in the physiological or inflammatory state in aging.
J. Clin. Lab. Immunol. . 29, 189-191
- LAMBERTS, S.W., BELD VAN DEN, A.W. (1997):**
The endocrinology of aging.
Science, 278, 419-424
- LARUE-ACHAGIOTIS et al. (1992):**
Dietary self-selection vs. complete diet: Body weight gain and meal pattern in rats.
Physiol. Behav., 51, 995-999
- LARUE-ACHAGIOTIS et al. (1994):**
Energy balance in an inbred strain of rats; Comparison with the Witstar strain.
Physiol. Behav., 55. 483-487
- MAC GREGOR, R., SHALIT, M. (1990):**
Neutrophil function in healthy elderly subjects.
J. Gerontology, 45, M55
- MASARO, R. (1995):**
Glucokortikoids and Aging
Aging Clin. Exp. Res.,7, 407-413
- MAYER , M.M. (1961):**
Complement and complement fixation
Experimental Immunchemistry, 133-240
Charles C. Thomas; Springfield, Ill
- MC GLAUCHLEN, W., KILEY, S., VOGEL, L.A. (2003):**
Ineffective humoral immunity in the elderly.
Microbes and Infection, 5 , 1279-1278
- McFARLANE, D., SELLON, DC., GIBBS, SA. (2001):**
Age-related quantitative alterations in lymphocyte subsets and immunoglobulin isotypes in healthy horses.
Am J Vet Res, 62(9), 1413-7

MEAD, L., HARGREAVES, E. L., OSSENKOPP, K. P., KAVALIERS, M. (1994):

A multivariate assessment of spontaneous locomotor activity in the Mongolian gerbil (*Meriones unguiculatus*): Influences of age and sex.

Physiology & Behaviour, 57 (5),893-899

MEANY, MJ., AITKEN, DH., SHARMA, S., VIAU, V. (1992) :

Basal ACTH, corticosterone, and corticosterone-binding globulin levels over the diurnal cycle, and age-related changes in hippocampal type I and type II corticosteroid receptorbinding capacity in young and aged, handled and nonhandled rats.

Neuroendocrinology, 55, 204-213

MÜLLER, S., STANYON, R., O'BRIAN, PCM, et al. (1999):

Defining the ancestral karyotype of all primates by multidirectional chromosome painting between tree shrews, lemurs and humans.

Chromosoma, 108, 393-400

NIWA et al. (1989):

Neutrophil chemotaxis and parameter of reactive oxygen species in human aging: cross-sectional and longitudinal studies.

Life Sci., 44, 1655-1664

OTTEN, W., (2002):

Physiological and behavioral effects of different success during social confrontation in pigs with prior dominance experience.

Physiology & Behavior,1-2, 127-133

PARDON, M.C., PÉREZ-DIAZ, JOUBERT, C., COHEN-SALMON, C. (2000):

Age dependent effects of a chronic ultra mild stress procedure on open-field behavior in B6D2F1 female mice.

Physiology & Behaviour, 75, 65-70

PARKER, C.R. JR (1999):

Adrenal function in aging.

Curr. Opin. Endocrinol. Diabetes, 6, 210-215

PERRY, H.M. (1999):

The endocrinology of aging

Clin Chem, 45, 1369-1376

POLIGANO et al. (1994):

Age-associated changes in neutrophil responsiveness in a human elderly population.

Cytobios, 80, 145-153

PRIMMER, S. (2002);

In search of a Model Species for Aging Research: A Study of Life Span of Tree Shrews.

Journal of Anti Aging Medicine, 5(2) 179-201

PTAK, W., SZCEPANIK, M. (1998):

Immunogerontology-aging of the immune system and its cause.

Przeegl Lek.,55(7-8), 397-9

RICHTER, C.P., SCHMIDT, E.C.H. (1941):

Increased fat intake and decreased carbohydrate intake of pancreatectomized rats.

Endocrinology, 28, 179-192

RICK, W. (1974):

Klinische Chemie und Mikroskopie

Springer Verlag; New York, Heidelberg, Berlin

RINK, L, SEYFARTH, M. (1997):

Characteristics of immunologic test values in the elderly

Gerontol Geriatr; 30(3), 220-5

ROLLS, B.J. (1995):

Age related impairments in the regulation off food intake.

Am.J. Clin. Nutr., 62, 923-931

SACHSER, N., LICK, C., (1998):

Social stress in guinea pigs.

Physiol. Behav., 46, 137-144

SAPOLSKY, R.M., KREY, L.C., MCEWEN, B.S., (1986):

The neuroendocrinology of stress and aging: the glucocorticoid cascade hypothesis.

Endocr. Rev., 284-301

SAPOLSKY, R.M., (1992):

Do glucocorticoid concentrations rise with age in the rat?

Neurobiology of aging, 13, 171-174

SAPOLSKY, M., KREY, L.C., MCEWEN, B. (2003):

The adrenocortical stress-response in aged male rat: Impairment of recovery from stress.

Experimental Gerontology, 18(1), 55-64

SCHÜTT, C., (1991):

Lymphozytentransformationstest.
In: Immunologische Arbeitsmethoden,
Gustav Fischer Verlag Jena

SCIMONELLI, T. ,MARUCCO, M., CELIES, M.E. (1999):

Age related Changes in Grooming Behaviour and Motor Activity in Female Rats.
Physiology & Behaviour, 66(3), 481-484

SCHERER, H. (2005):

Altersabhängige Veränderungen von Verhalten und physiologischen Parametern männlicher Tupajas (*Tupaia belangeri*)
Diplomarbeit, Fakultät Biologie, Chemie und Geowiss. Universität Bayreuth

SELYE, H. (1950):

The physiology and pathology of exposure to stress.
Acta, Montreal

SIWAK, C.T., MURPHEY, H.L., MUGGENBURG, B.A., MILGRAM, N.W. (2002):

Age dependent decline in locomotor activity in dog is environment specific.
Physiology & Behaviour, 75, 65-70

SKALICKY, M., NARATH, E., VIIDIK, A. (2000):

Housing conditions influence the survival and body composition of ageing rats.
Experimental Gerontology, 36, 159-170

SPRANKEL, H. (1961):

Über Verhaltensweisen und Zucht von *Tupaia glis* (Diard 1820) in Gefangenschaft.
Z.f. wissenschaftl. Zoologie, 165, 186-200

STEFANSKI, V., HENDRICHS, H.(1995):

Social confrontation in male guinea pigs: Behavior, experience, and complement activity.
Physiology & Behavior, 60(1), 235-391

STEFANSKI, V., ENGLER, H. (1998):

Effects of Acute and Chronic Social Stress on Blood Cellular Immunity in Rats.
Physiology & Behavior, 64(5), 733-741

STEFANSKI V. (2001):

Social stress in laboratory rats, Behavior, immune function, and tumor metastasis.
Physiology & Behaviour, 73, 385-391

STRAUB, R., CUTOLO, M., ZIETZ, B., SCHÖLMERICH, J. (2001):

The process of aging changes the interplay of the immune, endocrine and nervous systems.

Mechanisms of Ageing and Development, 122, 1591-1611

THOMAS, M.A., RICE, B. WEINSTOCK, D. (2001):

Effects of aging on food intake and body composition in rats.

Physiology & Behaviour, 76, 487-500

VAN WAAS, M.; SOFFIÉ, M. (1995):

Differential Environmental Modulations on Locomotor Activity, Exploration and Spatial Behavior in Young and Old Rats.

Physiology & Behaviour, 59(2), 265-271

ZELENA, D., HALLER, J., HALÁSZ, J., MAKARA, G.B. (1999):

Social stress of variable intensity: physiological and behavioral consequences.

Brain Research Bulletin, 48(3), 297-302

Diese Diplomarbeit wurde am Lehrstuhl Tierphysiologie der Universität Bayreuth bei Prof. Dr. D. von Holst von Januar 2005 bis Oktober 2005 durchgeführt.

Danksagung

Herzlich bedanke ich mich bei Herrn Prof. Dietrich von Holst für die Überlassung des Themas, die Betreuung meiner Arbeit sowie für seine ständige Gesprächsbereitschaft und die Unterstützung bei den Blutabnahmen.

Der „Arbeitsgruppe Tupaja“ danke ich für seine Unterstützung und für die freundliche Arbeitsatmosphäre; besonders Dr. Frank Uhl möchte ich für seine Hilfe bei den Blutabnahmen (Wochenende?), das Korrekturlesen der Diplomarbeit und für fachlichen sowie seelischen Beistand danken.

Inge Zerrener-Fritsche danke ich für die Hormonbestimmung.

Dr. Wolf Stöhr danke ich vor allem für seine Hilfe bei der Bewältigung technischer Probleme.

Herrn PD Dr. Volker Stefanski möchte ich für die mir entgegengebrachte Diskussionsbereitschaft sowie die hilfreichen Hinweise danken.

Karl-Heinz Pöhner und Kurt Bayer danke ich für die freundliche und tatkräftige Unterstützung bei allen Arbeiten in der Tierhaltung.

Ein besonderes Dankeschön geht an meine „Freundin“ für ihre aufmunternden Worte, das Korrekturlesen und die Befreiung von lästigen Nebensächlichkeiten des Alltags in der Endphase der Diplomarbeit.

Und nicht zuletzt danke ich meinen Eltern Hiltrud und Horst Munkel, auf deren Hilfe und Unterstützung ich mich während des gesamten Studiums verlassen konnte.

Erklärung

Ich erkläre hiermit an Eides statt,

dass ich die vorliegende Studienarbeit selbstständig angefertigt,
keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet
und keine unerlaubte fremde Hilfe in Anspruch genommen habe.

Die Arbeit wurde bisher noch keiner Prüfungsbehörde vorgelegt und auch nicht veröffentlicht.

Bayreuth, den 3. Oktober 2005

Christian Münkel