

5. Diskussion

Pathologische Angststörungen gehören zu den häufigsten psychischen Erkrankungen beim Menschen. Die Ursachen sowie neurobiologische Mechanismen und Therapiemöglichkeiten sind bisher noch nicht ausreichend erforscht. In dieser Hinsicht befassen sich heute Wissenschaftler mit den Untersuchungen der morphofunktionellen Bedeutung des Nervensystems, mit der Entwicklung neuer Therapiemethoden sowie neuer, auf das zentrale Nervensystem wirkenden, Psychopharmaka. Dabei sind neben klinischen Studien tierexperimentelle Untersuchungen zur Klärung der wissenschaftlichen Fragen unerlässlich. Insbesondere ist die Verhaltensanalyse verschiedener Labortierarten bei der Charakterisierung pathologischer Angstzustände hilfreich.

Entscheidende Bedeutung haben dabei die physiologische Angstreaktion und ihre Symptome. Die natürliche angeborene Angst der Tiere (Griebel, 1995) hilft, die zugrunde liegenden Mechanismen pathologischer Angstzustände besser zu verstehen und sie erfolgreich zu bekämpfen (Gerlai, 1996). Die Angst oder das Angstgefühl selbst ist aber nicht messbar. Es sind nur die Folgeerscheinungen der Angst in Form von komplexen oder einzelnen Verhaltensreaktionen zu beobachten. Charakteristisch dafür sind z.B. die „Schreckstarre“, häufiges Urinieren, häufige Wiederholungen einer Bewegung oder zurückgelegte Wegstrecken, die häufige Besichtigung neuer unbekannter Räume und erhöhte Exploration (Bronstein und Hirsch 1976; Takahachi et al., 1980).

Mit der Entwicklung der verhaltenspharmakologischen Forschung entstand das Problem der Vergleichbarkeit der Versuchsergebnisse. Es wurde festgestellt, dass Labortiere einer Art aber verschiedener Zuchtlinien sich im Verhalten, im Stoffwechsel und im Hormonhaushalt unterscheiden (Palm, 1998) und deshalb in ähnlichen aversiven Situationen verschiedene Stressreaktionen und Verhaltensformen aufweisen (Acri et al., 1995; Van der Staay und Blokland, 1996; Popova et al., 1998) und dadurch widersprüchliche Aussagen über die Wirkung von Psychopharmaka liefern können (Onaivi et al., 1992). Unpassend ausgewählte Versuchstiere können also im voraus die Gefahr falscher Ergebnisse von Untersuchungen in sich tragen. Daher ist bei der Durchführung von verhaltenspharmakologischen Studien die Auswahl der Versuchstiere, die in diesen Studien eingesetzt werden, von grosser Bedeutung. Je mehr Studienergebnisse zu diesem Thema vorliegen und je besser einzelne Tierstämme erforscht werden, desto geringer wird die Wahrscheinlichkeit, Auswahl- und Einsatzfehler zu begehen.

In unserer Arbeit untersuchten wir zwei Zuchtlinien von Wistar- und Sprague Dawley-Ratten aus einem Zuchtbetrieb in Deutschland und Russland (Novosibirsk) aus dem Vivarium des Institutes für Zytologie und Genetik der russischen Akademie der Wissenschaften, wo sie in langer Isolation gezüchtet worden waren.

Mit dieser Arbeit sollte festgestellt werden, inwieweit Zuchtbedingungen auf das angstassoziierte und exploratorische Verhalten wirken und ob möglicherweise eine Sublinienbildung stattfindet. Es sollte also geklärt werden, ob die lange isolierte Züchtung der russischen Ratten bestimmte Einflüsse auf sie ausübte und zu möglicherweise genetischen und dadurch neurophysiologischen Unterschieden im Vergleich zu identischen Stämmen deutscher Herkunft führte.

Es ist bekannt, dass durch mögliche spontane Mutationen eines Gens einige physiologische Prozesse ausfallen oder andere zusätzliche kompensatorische bzw. sekundäre Mechanismen aktiviert werden können, die ihrerseits entsprechende biologische Reaktionen auslösen und infolgedessen das Verhalten des Tieres verändern (Kosten et. al., 1994; Gerlai, 1996). So wurde als Hypothese angenommen, dass auch „deutsche“ und „russische“ Versuchstiere des ursprünglich gleichen Stammes sich unterschiedlich verhalten könnten.

Um den Faktor unterschiedlicher Aufzuchtbedingungen auszuschliessen (Walsh und Cummins, 1976), wurden die Ratten aller Stämme nach der Einlieferung im institutseigenen Tierstall unter gleichen Bedingungen vermehrt und aufgezogen. Am Anfang der Experimente wurden die Ratten bezüglich ihres Fress- und Trinkverhaltens und der Gewichtsentwicklung untersucht. Danach fanden die Verhaltensstudien statt.

In unserer Arbeit verwendeten wir Verhaltenstests, die auf unconditioniertem exploratorischem Verhalten basieren und die natürliche angeborene Angst der Tiere vor unbekanntem offenen Flächen ausnutzen. Dabei wurden folgende Angsttests durchgeführt:

1. Elevated-plus-maze-Test
2. Open-Field-Test
3. Free-exploratory-paradigm-Test

Zugleich wurden zur Beurteilung des Explorations- und Habitationsverhaltens der Hole-Board-Test und für die Bestimmung der motorischen Koordination der Rota-Rod-Test durchgeführt. Anschliessend fanden analytische Untersuchungen statt, um die neurochemischen Hintergründe des Verhaltensprofils der Ratten festzustellen und zu versuchen, einen Zusammenhang zwischen dem Angstverhalten der Versuchstiere und dem Serotoninspiegel zu finden.

1. Studien der Nahrungsaufnahme und Veränderung des Körpergewichts der Ratten

Die vorliegende Arbeit begann mit Untersuchungen zur Nahrungsaufnahme sowie zu Veränderungen des Körpergewichts der Versuchstiere. Da viele Forscher von vielfältigen Abweichungen in der Physiologie der Ratten aus verschiedenen Zuchtlinien berichteten (Overstreet und Rezvani, 1996; Palm, 1998), war das Ziel unserer Untersuchungen, mögliche Differenzen in der Nahrungsaufnahme und der Entwicklung des Körpergewichtes zwischen den Zuchtlinien der Versuchsratten festzustellen.

Im Laufe dieser Untersuchungen stellte sich heraus, dass Wistar-Ratten beider Zuchtlinien allgemein mehr Futter und Wasser aufnahmen als SD-Ratten. Dabei zeigten Ratten der russischen Wistar-Zuchtlinie eine deutlich höhere Wasseraufnahme bei den trächtigen und eine höhere Futteraufnahme bei den laktierenden weiblichen Ratten. Ein besonders erhöhter Nahrungskonsum im Vergleich zwischen den deutschen und den russischen Wistar-Jungratten (zur Pubertät) wurde ebenfalls bei den russischen Ratten registriert. Die SD-Ratten beider Zuchtlinien zeigten ebenso Unterschiede im Nahrungsverhalten: Die russischen SD-Ratten nahmen in allen Fressversuchen generell weniger Futter- und Wasser auf als die deutschen SD-Ratten. Russische Wistar-Ratten nahmen also überdurchschnittlich höhere und SD-Ratten unterdurchschnittlich niedrigere Nahrungsmengen auf als die deutschen Pendanten.

Diese Versuchsergebnisse stehen in Übereinstimmung mit der Entwicklung der Körpergewichte der jüngeren Ratten und können sie teilweise erklären. Bei den männlichen und den weiblichen russischen Wistar-Ratten wurden deutlich höhere Körpergewichte erfasst als bei den deutschen Wistar-Ratten, was auf die grössere Futteraufnahme zurückzuführen sein kann.

Russische SD-Ratten zeigten im Versuch nach dem 20. Lebenstag die niedrigsten Körpergewichte, die ebenfalls mit geringsten Werten der Nahrungsaufnahme entsprechend positiv korrelierten. Beim Vergleich der Gewichtsentwicklung lagen die Werte der deutschen Wistar- und SD-Ratten im Bereich der Angaben der Tierzuchtbetriebe „Dimed Schönwalde“ und „Charles River“. Russische Wistar-Ratten hatten vergleichsweise ein höheres und russische SD-Ratten ein leichteres Körpergewicht.

Diese Befunde lassen genetische Unterschiede zwischen den Ratten der untersuchten Zuchtlinien mit ursprünglich gleicher Herkunft und eine eventuelle Sublinienbildung vermuten. Shanks und Mitarbeiter (1994) berichteten ebenfalls über eine mögliche Entstehung von Abweichungen in

der Erbinformation der Tiere im Laufe längerer Zeit, die die gesamte Physiologie eines Individuums beeinflussen können.

2. Verhaltensuntersuchungen

Die in unserer Arbeit verwendeten Angsttests beruhen auf unterschiedlichen Stimuli, die die natürliche, angeborene Angst bei den Laborratten auslösen (Treit, 1985; Gerlai, 1996) und dadurch die Aufklärung der Abweichungen im Angstverhalten ermöglichen.

Mehrere Autoren berichteten über unterschiedliche Verhaltensweisen, die bei verschiedenen Rattenstämmen nachgewiesen wurden (Ramos et al., 1997; Popova et al., 1998; Rex et al., 1999). Es gibt ebenfalls viele Befunde hinsichtlich Verhaltensdifferenzen zwischen verwandten Zuchtlinien. So wiesen Rex und Mitarbeiter (1996) unterschiedliches Angstverhalten bei Wistar-Zuchtlinien nach, die in Deutschland von verschiedenen Institutionen gezüchtet wurden, und Overstreet und Rezvani (1996) stellten ein unterschiedliches Verhalten bei Fawn-Hooded-Ratten fest. Da weiterer Bedarf in vergleichenden Verhaltensstudien der verwandten Zuchtlinien besteht, versuchten wir mit unseren Experimenten neuere Erkenntnisse darüber zu bekommen und einen möglichen Beitrag zu diesen Studien zu leisten.

In der Literatur wird diskutiert, dass einige der Verhaltenstests unterschiedliche Formen der Angst widerspiegeln und sich nicht für jede Art von Versuchstieren eignen (Lister, 1990; Griebel, 1995; Menard und Treit, 1999). Um das möglichst breite Spektrum der Verhaltensweisen von Versuchstieren erforschen zu können, sind Untersuchungen mit einer Testbatterie notwendig (Lal und Emmett-Oglesby, 1983). Zudem sollen die Angsttests international anerkannt und pharmakologisch ausreichend validiert sein.

Aufgrund all dieser Forderungen wurden die oben genannten Verhaltenstests ausgewählt und durchgeführt. Um dabei altersbedingte Unterschiede im Verhalten auszuschliessen (File, 1992), wurden in allen Angststudien jüngere Ratten im gleichen Alter eingesetzt (Tab. 10).

Test	Parameter	♂/♀	Wistar Deutschland	Wistar Russland	SD Deutschland	SD Russland
Elevated-Plus-Maze	Zeit in den offenen Armen	♂ ♀		=		+
	Prozentualer Anteil der Eintritte in die offenen Arme zu den Gesamteintritten	♂ ♀		= (+)		+
	Anzahl der Head dips	♂ ♀	(+)	=		(+) +
	Aktive Zeit	♂ ♀		=		+
	Zurückgelegte Wegstrecke	♂ ♀		= +		(+) +
	Anzahl der Rearings	♂ ♀		+	+	+
Open Field	Zeit in der Aussenzone	♂ ♀		=	+	=
	Aktive Zeit	♂ ♀		=		+
	Zurückgelegte Wegstrecke	♂ ♀		=		(+) +
	Anzahl der Rearings	♂ ♀		+		+
Hole Board	Zeit bis zum ersten Head dip	♂ ♀		=	+	
	Anzahl der Head dips	♂ ♀		+		+
	Aktive Zeit	♂ ♀		+		+
	Zurückgelegte Wegstrecke	♂ ♀		+		= +
	Anzahl der Rearings	♂ ♀		+	+	+
F.E.P.	Zeit bis zum ersten Herauskommen aus dem Heimatkäfig	♂ ♀		(+) =	+	=
	Prozentualer Anteil herausgekommener Ratten	♂ ♀		=		+
	Zeit ausserhalb der Käfige	♂ ♀		=		+
R-R	Zeit auf dem Rota-Rod	♂ ♀	+	=		= +
5-HT	Serotoninkonzentration in angstrelevanten Gehirngebieten	♂ ♀	+	+	+	=

Tab. 10: Übersicht der wichtigsten Ergebnisse der Verhaltenstests und biochemischen Untersuchungen. Verglichen werden jeweils deutsche mit den russischen Ratten. „+“ – $p < 0,05$, „(+“ – $p < 0,1$ und „=“ – kein Unterschied.

Elevated-plus-maze-Test

Der Elevated-plus-maze-Test ist weltweit anerkannt und wird unter allen Angstmodellen am Tier in der Verhaltensforschung am häufigsten verwendet.

In diesem Test wurden allgemein zwischen russischen und deutschen Wistar-Ratten beider Geschlechter keine eindeutigen Unterschiede festgestellt. Nur die russischen Wistar-Weibchen zeigten eine erhöhte Anzahl von Eintritten in die offenen Arme und eine längere zurückgelegte Wegstrecke. Dies wurde aber von keinem weiteren Parameter bestätigt und deutet eher darauf hin, dass die Tiere etwas aktiver sind.

Die Versuchsergebnisse deutscher und russischer SD-Ratten wiesen deutliche Unterschiede auf und charakterisierten die russischen SD-Ratten beider Geschlechter als eindeutig weniger ängstlich. Wenig ängstlicheres Verhalten russischer SD-Ratten spiegelte sich in häufiger Besichtigung und höherem prozentualen Anteil der Eintritte in die offenen Arme zu den Gesamteintritten, sowie in der aktiven Zeit im Test wider. Dies stimmte auch mit Ergebnissen von Pellow und Mitarbeiter (1985) und Chaouloff und Mitarbeiter (1995) überein. Pellow und File (1986) bestätigten ebenfalls eine negative Korrelation zwischen der Anzahl der Eintritte in die offene Fläche, der aktiven Zeit und dem Angstniveau der Tiere.

Wichtige Information über das Verhaltensprofil der Tiere stellen Werte der Aufenthaltszeiten in den offenen Armen dar. Rodgers und Cole (1994) bestimmten bei ängstlicheren Ratten nur kurze oder gar keine Aufenthalte in den offenen Armen. In unserer Arbeit waren eindeutig längere Aufenthaltszeiten bei russischen SD-Ratten in offenen Armen registriert, was ihre geringere Ängstlichkeit unterstreicht.

Ebenfalls zeichneten sich russische SD-Ratten durch erhöhte Anzahl an Head dips aus. In eigenen Untersuchungen berichteten Blanchard und Mitarbeiter (1991) sowie Cole und Rodgers (1993) von geringerer Ängstlichkeit der Versuchstiere anhand erhöhter Anzahl von Head dips, was unseren Befunden entspricht.

Die Literatur enthält verschiedene Meinungen bezüglich der lokomotorischen Aktivität. Einige Autoren ziehen bei der Auswertung der Ergebnisse eines Verhaltenstests die Lokomotion als Bezeichnung der Angst nicht in Betracht (Lister, 1990, Manosewitz und Joel, 1973). Andere Forscher dagegen bestätigen, dass Angst bzw. Stresssituationen die Schreckstarre, das so genannte „Freezing“, verursachen können, ein Verhaltensmerkmal, bei dem die Tiere reduzierte Lokomotion oder gar keine Bewegung aufweisen (Gerlai, 1996; Bronstein und Hirsch, 1976;

Nevison et al., 1999). Aufgrund der gewonnenen Daten und der Ergebnisse aus Literaturrecherchen sind wir der Meinung, dass die lokomotorische Aktivität tatsächlich ein sehr wichtiges Verhaltensmerkmal ist und als zusätzlicher Bestimmungswert der Angst in diesem und in weiteren Angsttests verwendet werden kann. Für das weniger ängstliche Verhaltensprofil russischer SD-Ratten gegenüber deutschen SD-Ratten spricht in unserer Arbeit auch die höhere Anzahl der Eintritte in die offenen und geschlossenen Arme (Zonenwechsel), die erhöhte vertikale Exploration (Anzahl an Rearings), sowie die längere horizontale Lokomotion (zurückgelegte Wegstrecke).

Open-Field-Test

Im Open-Field-Test wird die natürliche Neophobie und Aversivität der Ratten gegenüber grossen und „fremden“ Räumen genutzt (Archer, 1973; Lorenz, 1971; Griebel, 1995). Da diese Tiere angeborene Angst vor hell beleuchteten und offenen Räumen haben (Montgomery, 1955; Stöhr et al., 1998), wurde die Testfläche der Apparatur in eine Aussen- und Mittelzone aufgeteilt. Tiere mit einem höheren „Angstniveau“ meiden die offenen Flächen, bewegen sich langsam und wenn, dann hauptsächlich in der Aussenzone entlang schützender Wände (Chaouloff et al., 1995; Archer, 1973). Aufgrund der in der vorliegenden Studie gewonnenen Ergebnisse (Tab. 10) kann zusammengefasst werden, dass deutsche und russische Wistar-Ratten auch in diesem Test ein prinzipiell ähnliches Verhalten zeigten.

Die Testergebnisse der SD-Ratten zeigten, dass die russischen SD-Ratten weniger Zeit in der Aussenzone verbrachten und öfter das Innere des Open Field betraten. Diese Ergebnisse stimmen mit Befunden von Handley und Mithani (1984) überein. Sie berichteten ebenfalls, dass mutigere Tiere generell neugieriger waren, öfter das Innenfeld eines Open Field betraten und dort längere Aufenthaltszeiten verbrachten.

Diese Parameter stimmten mit den Daten der lokomotorischen Aktivität überein, die die Verhaltensunterschiede zwischen deutschen und russischen Rattenlinien in diesem Experiment betonten. Ebenso wie Lister (1990) sowie Manosewitz und Joel (1973) im Elevated-plus-maze-Test kritisierte Sheldon (1968), den Parameter „Lokomotion“ im Open-Field-Test als Angstparameter anzunehmen. Viele Untersuchungen an Ratten in diesem Test wiesen aber darauf hin, dass eine geringere lokomotorische Aktivität mit dem verminderten exploratorischen

Verhalten der Versuchsratten verbunden ist (Treit, 1985) und eine stärkere Ängstlichkeit der Tiere bedeuten kann (Costall et al., 1989; File, 1985b).

In unserem Test wurden deutlich längere zurückgelegte Wegstrecken und eine höhere Anzahl an Rearings bei den russischen SD-Ratten, im Vergleich zu den deutschen, festgestellt. Die gewonnenen Resultate glichen den Befunden von Borbely und Mitarbeitern (1975), die ebenso über Zusammenhang von lokomotorischer Aktivität der Versuchstiere mit der Stärke der Aversionsfaktoren berichteten. Unsere Ergebnisse sprechen auch dafür, dass die russischen SD-Ratten aktiver sind.

Hole-Board-Test

Das Experiment wurde an zwei aufeinander folgenden Tagen durchgeführt und diente in unserer Arbeit für die Untersuchung des gerichteten Explorations- und Habitationsverhaltens der Tiere (Durkan und Lister, 1989). Ausserdem lieferte dieser Test Daten über die lokomotorische Aktivität, die die Charakterisierung von Rattenstämmen bzw. Zuchtlinien komplettierten (Handley und Mithani, 1984; Costall et al., 1987). Der Boden des Hole-Board hatte 16 Löcher, die bei den schon von Natur aus neugierigen Ratten den Drang zur Exploration verstärkten (File und Wardill, 1975a, b). Die Anzahl der untersuchten Löcher (Head dips) wurde als Kriterium exploratorischer Aktivität interpretiert.

Am ersten Versuchstag wird ein aktives exploratorisches Verhalten als ein Merkmal verminderter Ängstlichkeit gewertet (Griebel et al., 1993; Townsend, 1997), da das Erkundungsverhalten an sich für das Tier ein gewisses Risiko darstellt. Am nachfolgenden Versuchstag weist die Abnahme der Explorationsaktivität auf die Habituation bzw. Gewöhnung der Versuchstiere an die neue und unbekannte Umgebung hin und wird als Gedächtniseffekt bezeichnet (File and Wardill, 1975b; Schildlein et al., 2000).

Die russischen Wistar- und SD-Ratten untersuchten am ersten Versuchstag die aversiv wirkende Umgebung (Griebel, 1995) aktiver als die deutschen Pendanten, untersuchten dabei eine eindeutig größere Anzahl von Löchern. Am zweiten Versuchstag waren die Unterschiede stärker ausgeprägt. Die deutschen Versuchsratten zeigten in diesem zweiten Testabschnitt im prozentualen Anteil durchschnittlich eine wesentlich geringere Anzahl an Head dips im Hole-Board als die russischen Wistar- und SD-Ratten, waren weniger aktiv und brauchten deutlich längere Zeiten bis zum Erkundungsbeginn.

Obwohl alle Tiere die Testapparatur schon aus dem ersten Versuchstag kannten, zeigten russische Wistar- und SD-Ratten am zweiten Versuchstag wiederholt eine höhere Anzahl an Head dips.

Das neugierige Verhalten russischer Ratten an beiden Tagen stimmte teilweise mit den Ergebnissen der lokomotorischen Aktivität überein. Zwar legten männliche russische Wistar- und SD-Ratten am ersten Versuchstag längere Wegstrecken zurück, sie richteten sich aber dafür eindeutig öfter auf, verglichen mit den deutschen Ratten.

Zusammenfassend weisen die gewonnenen Daten darauf hin, dass russische Ratten an beiden Versuchstagen deutlich aktiver und neugieriger waren, sie nahmen vermutlich die Umgebung und die Testbedingungen als weniger aversiv wahr bzw. waren fähiger, die eigene Angst als solche besser zu überwinden. Aus der Literatur ist ebenfalls bekannt, dass zwischen der exploratorischen Aktivität und der Ängstlichkeit der Tiere ein direkter Zusammenhang besteht (Townsend, 1997).

Allerdings habituierten russische Versuchstiere schlechter (hatten ein schlechteres Gedächtnis) als die deutschen Wistar- und SD-Ratten, die aus dem ersten Versuchstag anscheinend bessere Erkenntnisse über die Testapparatur hatten und offensichtlich über ein besseres Objektgedächtnis verfügten. Das erklärt die unterschiedliche Anzahl an Head dips zwischen russischen und deutschen Ratten am zweiten Versuchstag.

Free-exploratory-paradigm-Test

Der Free-exploratory-paradigm-Test liefert informative Werte über das exploratorische Verhalten der Tiere (Griebel et al., 1993) und die Überwindung des Konfliktes, entweder in dem bekannten sicheren Heimatkäfig zu bleiben oder dem Explorationsdrang zu folgen. Es ist nicht möglich, allein aufgrund dieser Studie definitiv das Verhaltensprofil der Tiere zu diskutieren (Hughes, 1968). Jedoch ist dieses Experiment eine wichtige Ergänzung anderer Verhaltensuntersuchungen.

Die in unserem Free-exploratory-paradigm-Test erfassten Daten waren leider inhomogen und konnten statistisch nur überwiegend tendenziell gesichert werden. Es stellte sich jedoch heraus, dass russische und deutsche Wistar-Ratten im Versuch keine Unterschiede aufwiesen, mit Ausnahme der deutschen Wistar-Weibchen, die am dritten Versuchstag in der Mehrheit ausserhalb von Käfigen vertreten waren und dabei kürzere Aufenthaltszeiten zeigten.

Bei den SD-Ratten unterschieden sich die Männchen. Die russischen SD-Ratten kamen dabei im Durchschnitt schneller aus den Heimatkäfigen und in grösserer Anzahl als deutsche SD-Männchen heraus.

Im Laufe des Tests wurde festgestellt, dass die Versuchstiere sich mit jedem Tag zunehmend schneller aus den Heimatkäfigen wagten und längere Zeit draussen verblieben. Diese Steigerung der Aufenthaltszeit erklärt sich mit der Habituation der Tiere zu den wirkenden Versuchsbedingungen, wie „plötzliche Freiheit“ und „Erreichbarkeit der Nachbarn“ (File and Wardill, 1975b).

Prinzipiell stimmen die Ergebnisse dieses Experimentes mit den Daten früherer Verhaltenstests überein. Bezogen auf die deutschen und russischen Wistar-Ratten lässt sich zusammenfassen, dass die beiden Zuchtlinien ebenfalls, wie in früheren Angsttests, vom Verhalten sehr ähnlich waren und sich nur in einigen Parametern unterschieden. Die Resultate von SD-Ratten glichen ebenso den Befunden früheren Tests. Die russischen SD-Ratten (in diesem Test nur die männlichen) waren aktiver, neugieriger und offensichtlich weniger ängstlich.

Die grundsätzlichen Unterschiede zwischen den deutschen und russischen männlichen SD-Ratten in diesem Test erklären sich, wie auch in früheren Tests, ebenfalls mit der unterschiedlichen Wahrnehmung der Testssituation. Obwohl hier die aversiven Stimuli und die Motivation eindeutig milder waren, im Gegensatz zu den vorherigen Verhaltenstests mit stärkeren Stressfaktoren, wiesen deutsche SD-Männchen eindeutig niedrigere exploratorische Aktivität auf und können als ängstlichere Tiere charakterisiert werden. Sie verliessen später und in geringerer Zahl die Heimatkäfige, um die Umgebung und die näheren „Nachbarn“ zu erkunden. Dazu trugen die Käfige bei, die den nötigen Schutz vor der „Aussenwelt“ gaben und genug Wasser und Futter zur Verfügung stellten; die Versuchstiere wurden also rundum versorgt.

Rota-Rod-Test

Um die motorischen Fähigkeiten der Ratten unserer Versuchslinien diskutieren zu können, wurden sie im Rota-Rod-Test untersucht. Dieser Versuch diente zur Charakterisierung der physischen Ausdauer und des Koordinationsvermögens der Tiere. In diesem Experiment wurden die Tiere zur Fortbewegung und Haltung auf der sich drehenden Walze unter ständig steigender Belastung (Umdrehungsgeschwindigkeit) gezwungen.

Zwischen deutschen und russischen männlichen Ratten beider Stämme wurden keine nennenswerten Unterschiede in motorischen und sensorischen Funktionen festgestellt. Bei den weiblichen Ratten konnten sich bei den Wistars die deutsche Weibchen, bei den SD-Ratten russische Weibchen viermal länger auf der sich drehenden Stange halten als die jeweils anderen

Weibchen. Demzufolge konnte eine entsprechend höhere physische Ausdauer nachgewiesen werden.

Zusammenfassung der Verhaltensergebnisse

Zusammenfassend wiesen die Ergebnisse der Verhaltensstudien darauf hin, dass zwischen den deutschen und russischen Wistar-Ratten keine deutlichen Unterschiede im Bezug auf das angstassoziierte Verhalten vorhanden waren. Die Versuchstiere dieser Linien explorierten etwa gleich, waren ähnlich aktiv und zeigten nahezu gleiche lokomotorische Aktivität. Nur im Hole-Board-Test schienen die russischen Wistar-Ratten weniger ängstlich und lokomotorisch und exploratorisch aktiver zu sein. Dafür zeigten sie eine schlechtere Habituation bzw. ein schlechteres Gedächtnisvermögen im Vergleich zu den deutschen Wistar-Ratten.

Bei den SD-Ratten wichen die Testsergebnisse stark von einander ab und charakterisierten die russischen SD-Ratten, gegenüber den deutschen, als eindeutig mutiger. In durchgeführten Verhaltenstests waren russische SD-Ratten aktiver, explorierten mehr, verbrachten längere Zeiten in offenen Flächen, legten längere Strecken zurück und richteten sich öfter auf. Allerdings habituierten sie schlechter bzw. hatten ein schlechteres Objektgedächtnis als deutsche SD-Ratten. Im Bezug auf das Angstverhalten sind die russischen SD-Ratten interessant für weitergehende Untersuchungen.

4. Neurochemische Untersuchungen

Bestimmung der Serotoningehalte in drei Gehirnregionen

Für die Charakterisierung der Versuchstiere in unserer Arbeit waren die analytischen Untersuchungen der Serotoninkonzentration in angstrelevanten Gehirnarealen interessant.

Es ist bekannt, dass das serotonerge Transmissionssystem eine entscheidende Bedeutung bei der Entstehung, dem Verlauf und der Regulation verschiedener physiologischer und pathologischer Zustände des Nervensystems im Ganzen und den Angstzuständen im Einzelnen hat (Lesch et al., 1994, 1996; Iversen, 1984; Owens und Nemeroff, 1994). Während bestimmter und vom Tier als gefährlich wahrgenommener Situationen findet in angstrelevanten Gebieten des Gehirns, wie dem Hippokampus, dem präfrontalen Cortex und der medianen und dorsalen Raphe, eine Ausschüttung von Serotonin aus präsynaptischen Endigungen serotonerger Neurone statt

(Popova et al., 1978; Lesch und Mössner, 1998; Marsden et al., 1993, 1995; Uhl und Johnson, 1994). Rex und Mitarbeiter (1999, 2002) untersuchten mittels Mikrodialyse die Freisetzung von Serotonin im zentralen Nervensystem von Ratten verschiedener Stämme bei ihrer Exposition im Elevated-plus-maze. Sowohl in diesen als auch in ihren früheren Untersuchungen an Meerschweinchen (Rex et al., 1993; Rex und Fink, 1997) wurde festgestellt, dass bei aversiven Testbedingungen die extrazelluläre Serotoninkonzentration anstieg und mit dem Angstniveau der Tiere korrelierte. Im Gegensatz zu diesen Resultaten stehen Befunde von Kulikov und Mitarbeitern (1997), die trotz unterschiedlichen Verhaltens in Angsttests keine Differenzen in der Serotoninfreisetzung in Gehirnen von Ratten feststellen konnten. Dennoch erfassten sie abwechselnd hohe Konzentrationen von Serotoninmetaboliten.

Andere Autoren wiesen ebenso auf die angstinduzierte Steigerung der extrazellulären Serotoninkonzentration in Gehirngebieten von Versuchsratten hin (Cadogan et al., 1994). Wie in anderen monoaminergen Systemen auch, sind die terminalen serotonergen Neurone dadurch charakterisiert, dass sie durch Freisetzung von Serotonin seinen extrazellulären Spiegel aufrechterhalten (Jacobs et al., 1984; Whitaker-Azmitia et al., 1987). Aus diesem Grunde konnte man annehmen, dass in angstrelevanten Gehirngebieten bei normalen (alltäglichen) Lebensbedingungen bestimmte rattenstamm- bzw. linienspezifische intrazelluläre Serotoningehalte vorkommen, die bei gefährlichen Situationen entsprechend der vorhandenen Konzentration freigesetzt werden können und mit der Sensibilität der Tiere und ihrer Ängstlichkeit gegenüber aversiv wirkenden Umweltfaktoren korrelieren.

In diesem Zusammenhang untersuchten wir in unserer Arbeit die Gewebskonzentrationen von Serotonin in der medianen und dorsalen Raphe, da bekannt ist, dass in diesem Gehirngebiet die Somata serotonerger Neurone vorkommen, wo dieser Transmitter gebildet und gespeichert wird (Dahlström und Fuxe, 1964). Ausserdem wurden Hippokampus und Cortex untersucht. Hier befinden sich Projektionen serotonerger Neurone, durch die Serotonin freigesetzt wird, wodurch diese Hirnareale zu Hauptprojektionsgebieten des serotonergen Systems gezählt werden (Steinbusch, 1981). Ähnlich wie mediane und dorsale Raphe sind diese Hirnstrukturen an Mechanismen der Entwicklung und des Verlaufs möglicher Angstzustände beteiligt und regulieren dabei das entsprechende Verhalten der Tiere (Barnes und Sharp, 1999; Menard und Treit, 1999). Diese Voraussetzungen veranlassten uns dazu, genannte Gehirngebiete bezüglich ihrer Serotoninkonzentrationen zu untersuchen, und zu versuchen, einen möglichen

Zusammenhang zwischen Serotoningehalt und dem Angstniveau der Ratten unserer Versuchsstämme bzw. Linien zu finden (Vanhoutte et al., 1993).

Generell wurden höchste Serotoninkonzentrationen bei allen Ratten in der medianen/dorsalen Raphe festgestellt (Soghomonian et al., 1989), was auch zu erwarten war.

Im Einzelnen wurden bei den deutschen männlichen und weiblichen Wistar-Ratten in allen drei Gehirngebieten eindeutig höhere Serotoninkonzentrationen im Vergleich zu den russischen Pendants erfasst. Dabei zeigten Ratten der russischen Linie mit dem geringeren Serotoningehalt nur im Hole-Board das eindeutig weniger ängstliche Verhalten. Sie waren aktiver, bewegten sich mehr und untersuchten eine grössere Anzahl von Löchern.

Die Untersuchungen des Gehirnmaterials von SD-Ratten lieferten teils eindeutige, teils nicht homogene Ergebnisse. Bei männlichen deutschen und russischen SD-Ratten wurden gleiche Serotoninkonzentrationen bestimmt, obwohl russische SD-Männchen in Verhaltenstests sich deutlich weniger ängstlich verhielten. Bei den weiblichen russischen SD-Ratten waren in allen drei Gehirnregionen die Serotoninkonzentrationen halb so hoch wie bei den deutschen weiblichen SD-Ratten, die eindeutig „ängstlicher“ waren.

Die geringere „Ängstlichkeit“ russischer SD-Ratten bezeichnete sich durch häufiges und längeres Betreten der offenen Arme im Elevated-plus-maze-Test, durch kürzere Aufenthaltszeiten in der Aussenzone des Open Fields und der Untersuchung einer grösseren Anzahl von Löcher im Hole-Board-Test. Zudem zeigten sie eine erhöhte lokomotorische Aktivität, die aus häufigem Zonenwechsel, der zurückgelegten Wegstrecke und einer hohen Anzahl an Rearings bestand.

Unsere Ergebnisse weisen darauf hin, dass ein enger Zusammenhang zwischen dem Serotoningehalt im ZNS und dem angstbezogenen Verhalten nicht zwingend gegeben ist. Verantwortlich dafür könnte sein, dass die Gehaltsbestimmungen keine Aussage über die Synthese oder Freisetzung von Serotonin liefern. Diesbezüglich werden hauptsächlich zwei Grundmeinungen diskutiert, die diese Tatsache zu erklären versuchen.

Laut einer Forschungsrichtung ist es ein stammspezifischer präsynaptischer Transportmechanismus des Serotonins im Nervensystem, der den Ursachen zugrunde liegen könnte (Lesch et al., 1997). Bekannt sind 14 verschiedene Serotoninrezeptoren. Allerdings existiert nur ein einziger Transporter, der Serotonin aus dem synaptischen Spalt wieder in die Nervenendigung aufnehmen kann. Dieser Serotonintransporter (5-HTT) befördert Serotonin aus dem synaptischen Spalt zurück in die Nervenendigung und regelt damit die Wirkdauer und

Menge des Serotonins an der postsynaptischen Membran (Blakely et al., 1994; Uhl und Johnson, 1994; Lesch et al., 1997). In diesem Zusammenhang kann die erhöhte funktionelle Aktivität dieses Transportmechanismus den Zustand des Nervensystems selbst, ihre Antwortreaktionen und Regulierungsfunktionen entsprechend steuern. Es besteht ebenfalls die Möglichkeit, dass ein Polymorphismus des Serotonintransportergens Einfluss auf das angstrelevante Verhalten haben kann.

Nach einer anderer Auffassung kann die verminderte Ängstlichkeit, wie im Falle der russischen SD-Ratten, durch geringe Produktion in den Effektorgebieten der serotoninspezifischen Rezeptoren und ihre verringerte Sensibilität zu diesem Neurotransmitter erklärt werden (Popova et al., 1998; Marsden, 1996). Beide Standpunkte sind gut begründet und können die geringere Ängstlichkeit russischer männlicher SD-Ratten erklären.

Weitere Ursache für die unterschiedlichen Serotoninkonzentrationen und die Unterschiede im angstbezogenen Verhalten können in Sublinien-spezifischen Unterschieden in der Synthese, der Freisetzung und dem Speichervermögen von Serotonin begründet sein (Lesch und Mössner, 1998; Blakely et al., 1994).

Besonders interessant aber waren die gewonnenen Ergebnisse der russischen SD-Weibchen. Sie lassen bestimmte Parallelen zwischen dem wenig ängstlichen Verhalten und den Serotoninkonzentrationen dieser Ratten erkennen. Dadurch sind diese Ratten für weitere Untersuchungen in Bezug auf Verhaltensunterschiede und ihrer neurobiologischen Grundlagen mit dem Schwerpunkt „Angst“ ganz besonders geeignet.

Weitere Mikrodialyseuntersuchungen zur Freisetzung von Serotonin wären in der Zukunft erforderlich, um den Zusammenhang zwischen der Serotoninfreisetzung und dem angstbezogenen Verhalten zu erhärten.

5.1. Schlussbetrachtung

Aufgrund vorliegender Ergebnisse unserer Testbatterie ist festzustellen, dass sich die deutschen Wistar- und besonders SD-Ratten hinsichtlich einzelner physiologischer, Verhaltens- und neurochemischer Eigenschaften von den russischen Ratten entsprechender Stämme unterscheiden. Es wurden deutliche Abweichungen im angstbezogenen Verhalten deutscher und

russischer SD-Ratten festgestellt, die sich durch das weniger ängstliche Verhaltensmuster in aversiven Situationen der russischen SD-Ratten auszeichneten. Eindeutige Differenzen zwischen deutschen und russischen Rattenlinien wurden auch in der neurochemischen Untersuchung nachgewiesen und prägten sich durch erhöhte Serotoninkonzentrationen in bestimmten Gehirngebieten der deutschen männlichen und weiblichen Wistar- und weiblichen SD-Ratten aus. In Anbetracht der Ergebnisse dieser Studien kann zusammengefasst werden, dass, obwohl die untersuchten gleichnamigen Rattenlinien in der Vergangenheit eine gemeinsame Herkunft hatten und mit einander verwandt sind, bestimmte Unterschiede zwischen diesen Rattenlinien vorhanden sind. Als Grund werden Veränderungen des genetischen Materials und dadurch der Physiologie der Ratten der russischen Linien diskutiert, die offensichtlich infolge isolierter Züchtung dieser Tiere im Laufe längerer Zeit entstanden. Besonders interessant für weitere Untersuchungen sind die SD-Ratten.

Untersuchungen an genmanipulierten Nagetieren brachten Erkenntnisse, dass bestimmte Gene in Verhaltensweisen wie Sexual-, Aggressions-, Tagesrhythmus-, Muttertier- oder auch im Lernverhalten beteiligt sind (Miczek et al., 2001; Peripato et al., 2002). Viele Autoren sind ebenfalls der Meinung, dass spontane Mutationen in Genen der Tiere, die im Verlaufe der Zucht auftreten können, imstande sind, die Verhaltensreaktionen sowohl auf emotionaler als auch auf biochemischer Ebene zu verändern (Broadhurst, 1958; Porsolt et al., 1978). Heils und Mitarbeiter (1995) berichteten über den Zusammenhang der Veränderungen im Gen, das für den Serotonintransporter zuständig ist, mit Verhaltensänderungen der Tiere. Ähnliche Befunde über Entstehung möglicher Veränderungen im Gen und somit im Verhalten wurden in Arbeiten anderer Autoren für Mäuse (Ramos et al., 1997; Trullas und Skolnik, 1993) und für Ratten (Rex et al., 1996; Gerlai, 1996) gemacht. Auch für das menschliche Gehirn sind diese Verhältnisse bekannt (Little et al., 1998; Heinz et al., 2000).

Die möglichen genetischen Veränderungen können nicht nur das Angstverhalten der Tiere, sondern auch die damit verbundenen physiologischen Eigenschaften beeinflussen (Overstreet und Reswani, 1996). In unserer Arbeit war es besonders durch erhöhte Nahrungsaufnahme bei den jungen Ratten der russischen Wistar-Linie ausgeprägt. Auffällig waren auch die Wachstumswerte, die eine aussergewöhnlich schnelle Gewichtszunahme charakterisierten und ebenfalls bei den Ratten russischer Wistar-Linie mittels Wiegen festgestellt wurden.

Das Entstehen möglicher genetisch bedingter Veränderungen im Verhalten von Ratten wurde ebenso in Studien anderer Autoren (Guitart et al., 1993; Shanks et al., 1994; Rex und Fink, 1997; Sudakov et al., 2001) diskutiert. Sie unterstrichen die Wahrscheinlichkeit der Entstehung von genetischen Mutationen bei Ratten verwandter Zuchtlinien im Laufe einer langen Züchtung. Die Ergebnisse unserer Untersuchungen stimmen mit ihrem Standpunkt überein.

Generell lieferten die Ergebnisse unserer Studie qualitativ neue Kenntnisse über Verhaltensbesonderheiten und neurobiochemische Grundlagen der „Angst“ der Laborratten, die weiterhin bei den experimentellen Untersuchungen Anwendung finden können.

Ausserdem deckte die vorliegende Arbeit ein weiteres Problem in der Verhaltensforschung auf, dass die Versuchsratten oft traditionsgemäß und ohne bewusste Auswahl der Stämme in verschiedenen Verhaltensuntersuchungen eingesetzt werden. Zudem werden sie aus verschiedenen Zuchtbetrieben einbezogen, wo unterschiedliche und nicht standardisierte Zucht- und Haltungsbedingungen vorhanden sind. Aus diesem Grund ist die Publikation unterschiedlicher Ergebnisse in der nationalen und internationalen pharmakologischen Gemeinschaft möglich.