

Aus dem Institut für Pharmakologie und Toxikologie
der Medizinischen Fakultät
der Humboldt-Universität zu Berlin

***Untersuchungen zu der anxiolytischen Wirksamkeit des
Cholecystinin-B-Rezeptor-Antagonisten
L365.260 in zwei Angstmodellen bei Ratten***

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Veterinärmedizin
an der
Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Ulrich Sondern
Dipl. AHM
Tierarzt aus Wermelskirchen

Berlin 1999
Journal Nr. 2294

Gedruckt mit Genehmigung
des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin

Dekan:	Herr Univ.-Prof. Dr. Klaus Hartung
Erster Gutachter:	Frau Univ.-Prof. Dr. Heidrun Fink
Zweiter Gutachter:	Herr em Univ.-Prof. Dr. Hans-Hasso Frey
Tag der Promotion:	31.08.1999

Meinen Eltern

1	Einleitung	5
2	Literaturübersicht	7
2.1	Angst	7
2.1.1	Das Angstphänomen beim Menschen	7
2.1.2	Das Angstphänomen beim Tier	7
2.1.3	Klassifizierung der Angst	8
2.1.4	Tiermodelle / Modelle der Angst	9
2.1.4.1	Konflikt-Test (Open-field)	11
2.1.4.2	Elevated-plus-maze-Test	12
2.1.4.3	Übertragbarkeit von tierexperimentellen Ergebnissen auf den Menschen	13
2.1.4.4	Medikamentöse Angsttherapie	14
2.2	Cholecystokinin	16
2.2.1	Geschichtlicher Überblick	16
2.2.2	Molekulare Formen und Vorkommen von CCK	16
2.2.3	Anatomische Verteilung	17
2.2.3.1	Periphere Organe	18
2.2.3.2	Nervus vagus	18
2.2.3.3	Zentrale Verteilung	18
2.2.4	Kolokalisation und Interaktion mit anderen Neurotransmittern und -peptiden	19
2.2.5	Physiologie von CCK	20
2.2.5.1	Synthese	20
2.2.5.2	Abbau	20
2.2.5.3	Speicherung	21
2.2.5.4	Freisetzung und Verteilung	21
2.2.6	Funktionelle Bedeutung	21
2.2.6.1	Gastrointestinales Hormon	21
2.2.6.2	Neurotransmitter	21
2.2.6.3	CCK und Verhalten	22
2.2.6.4	CCK und Nervus vagus	23
2.2.7	Tierartliche Unterschiede	23
2.2.8	CCK-Rezeptoren	23
2.2.9	CCK-Rezeptor-Agonisten	26
2.2.10	CCK-Rezeptor-Antagonisten	27
2.2.10.1	Devazepide (L364.718)	28
2.2.10.2	L365.260	28
2.2.10.3	PD135.158	29
2.2.10.4	Klinische Einsatzmöglichkeiten von CCK-Antagonisten	30
2.2.11	Wirkung von CCK-Antagonisten in Tiermodellen der Angst	30
2.2.11.1	Konditionierende Modelle	30
2.2.11.2	Nicht-konditionierende Modelle	31
2.3	CCK und Angst	32
2.3.1	Beim Menschen	32
2.3.2	Beim Tier	34
3	Material und Methoden	35
3.1	Aufgabenstellung der Arbeit	35
3.2	Tiermaterial und Haltungsbedingungen	35
3.3	Verwendete Substanzen	36
3.4	Versuchsvorbereitungen	37
3.4.1	Narkosen	37
3.4.2	Operationstechniken	37
3.4.3	Intraventrikuläre Applikation	37

3.4.3.1	Intrahippokampale Applikation	37
3.4.3.2	Vagotomie	40
3.5	Verhaltenstests	41
3.5.1	Lichtverhältnisse	41
3.5.2	Konflikt-Test	42
3.5.3	Elevated-plus-maze-Test	43
3.6	Applikationstechniken	46
3.6.1	Systemische Applikation	46
3.6.2	Zentrale Applikation	46
3.6.3	Intraventrikuläre Applikation	46
3.6.4	Intrahippokampale Applikation	47
3.7	Applikationsschema	47
3.7.1	Konflikt-Test	48
3.7.1.1	Systemische Applikation im Konflikt-Test	48
3.7.1.2	Zentrale Applikation im Konflikt-Test	49
3.7.1.3	Kombinierte Applikation im Konflikt-Test	49
3.7.2	Elevated-plus-maze-Test	50
3.7.2.1	Systemische Applikation im Elevated-plus-maze-Test	50
3.7.3	Untersuchungen mit vagotomierten Tieren	51
3.8	Erfassen von Nebenwirkungen	51
3.9	Konzentrationsbestimmung von L365.260 in Plasma und Gehirn	52
3.9.1	Bestimmungsmethode	52
3.10	Histologische Kontrolle der zentralen Applikationen	53
3.11	Kontrolle der Vagotomie	53
3.11.1	Subjektive Beurteilung der lebenden Tiere	54
3.11.2	Fotografische Beurteilung der lebenden Tiere	54
3.11.3	Vermessung der lebenden Tiere	54
3.11.4	Fütterungsversuch	54
3.11.5	Lupenkontrolle post mortem	55
3.12	Statistische Methoden	55
4	Ergebnisse	57
4.1	Konflikt-Test	57
4.1.1	Einfluß unterschiedlicher Applikationen bei BgVV-Wistar-Ratten	57
4.1.2	Vergleich von BgVV- und Winkelmann-Wistar-Ratten	58
4.1.3	Systemische Applikationen bei BgVV-Wistar-Ratten	60
4.1.3.1	Standardpharmaka mit anxiolytischer Wirkung	60
4.1.3.1.1	Diazepam	60
4.1.3.1.2	8-OH-DPAT	61
4.1.3.2	CCK-Antagonisten	62
4.1.3.2.1	L365.260	62
4.1.3.2.2	PD135.158	63
4.1.3.3	CCK-Agonisten	64
4.1.3.3.1	BOC-CCK-4	64
4.1.3.3.2	CCK-8s	65
4.1.3.4	Simultane Gabe von CCK-Agonisten und CCK-Antagonisten	66
4.1.3.5	BOC-CCK-4 und L365.260	66
4.1.3.5.1	Zwischenergebnis der systemischen Applikationen bei BgVV-Wistar-Ratten	67
4.1.4	Zentrale Applikationen bei BgVV-Wistar-Ratten	68
4.1.4.1	CCK-Antagonisten	68
4.1.4.1.1	L365.260 i.c.v.	68
4.1.4.1.2	L365.260 i.h.	69

4.1.4.1.3	CCK-Agonisten	70
4.1.4.1.4	BOC-CCK-4 i.h.	70
4.1.4.1.5	CCK-8s i.h.	71
4.1.4.2	Zwischenergebnis der zentralen Applikationen bei BgVV-Wistar-Ratten	71
4.1.5	Kombinierte systemische und zentrale Applikationen bei BgVV-Wistar-Ratten	72
4.1.5.1.1	CCK-Antagonisten	72
4.1.5.1.2	L365.260 i.p. und Vehikel i.h.	72
4.1.5.1.3	L365.260 100 mg/kg i.p. und Vehikel i.h. oder Operation zentral	73
4.1.5.1.4	PD135.158 i.p. und Vehikel i.h.	74
4.1.5.2	CCK-Agonisten	75
4.1.5.2.1	Vehikel i.p. und BOC-CCK-4 i.h.	75
4.1.5.2.2	Zwischenergebnis der kombinierten systemischen und zentralen Applikationen bei BgVV-Wistar-Ratten	75
4.1.6	Systemische und zentrale Applikationen bei Winkelmann-Wistar-Ratten	76
4.1.6.1	Standardpharmaka mit anxiolytischer Wirkung	76
4.1.6.1.1	M-CPP i.p.	76
4.1.6.2	CCK-Agonisten	77
4.1.6.2.1	BOC-CCK-4 i.p.	77
4.1.6.2.2	BOC-CCK-4 i.c.v.	78
4.1.6.3	Zwischenergebnis der systemischen und zentralen Applikationen bei Winkelmann-Wistar-Ratten	78
4.2	Elevated-plus-maze	79
4.2.1	Einfluß unterschiedlicher Versuchsbedingungen	79
4.2.2	Vergleich von BgVV- und Winkelmann-Wistar-Ratten	81
4.2.3	Systemische Applikationen bei BgVV-Wistar-Ratten	82
4.2.3.1	Standardpharmaka mit anxiolytischer Wirkung	82
4.2.3.1.1	Diazepam	82
4.2.3.1.2	8-OH-DPAT	83
4.2.3.2	CCK-Antagonisten unter verschiedenen Versuchsbedingungen	84
4.2.3.2.1	L365.260 unter Versuchsbedingungen Va1	84
4.2.3.2.2	L365.260 unter Versuchsbedingungen Va2	85
4.2.3.2.3	L365.260 unter Versuchsbedingungen Va3	86
4.2.3.2.4	L364.718	87
4.2.3.2.5	PD135.158	88
4.2.3.3	Agonisten unter verschiedenen Versuchsbedingungen	89
4.2.3.3.1	CCK-Agonist BOC-CCK-4	89
4.2.3.3.2	5-HT-Agonist m-CPP	90
4.2.3.4	Zwischenergebnis der systemischen Applikationen bei BgVV-Wistar-Ratten	90
4.2.4	Systemische Applikationen bei Winkelmann-Wistar-Ratten	91
4.2.4.1	CCK-Agonisten	91
4.2.4.1.1	BOC-CCK-4 i.p.	91
4.3	Untersuchungen mit vagotomierten Tieren	92
4.3.1	Konflikt-Test	92
4.3.1.1	L365.260; BOC-CCK-4 einzeln und kombiniert i.p.	92
4.3.2	Elevated-plus-maze	94
4.3.2.1	L365.260; BOC-CCK-4 einzeln i.p.	94
4.3.3	Zwischenergebnis der Untersuchungen mit vagotomierten Tieren	96
4.4	L365.260-Konzentrationsbestimmungen in Plasma und Gehirn	96
4.4.1	Zwischenergebnis der L365.260-Konzentrationsbestimmungen in Plasma und Gehirn	97
4.5	Histologische Kontrolle der zentralen Applikationen	97
4.5.1	I.c.v.-Applikation	97
4.5.2	I.h.-Applikation	97
4.5.3	Zwischenergebnis der histologischen Kontrolle der zentralen Applikationen	97

4.6	Kontrolle der Vagotomie	97
4.6.1	Subjektive Beurteilung der lebenden Tiere	97
4.6.2	Fotografische Beurteilung der lebenden Tiere	98
4.6.3	Vermessung der lebenden Tiere	99
4.6.4	Fütterungsversuch	100
4.6.5	Lupenkontrolle post mortem	101
4.6.6	Fotografische Darstellung des post mortem Befundes	102
4.6.7	Zwischenergebnis der Vagotomiekontrolle	103
5	Diskussion	104
5.1	Schlußbetrachtung	126
6	Zusammenfassung	128
7	Summary	130
8	Abkürzungsverzeichnis	132
9	Literaturverzeichnis	134
10	Anhang A	167
10.1	Körperparameter scheinvagotomierter Tiere	167
10.2	Körperparameter vagotomierter Tiere	168
11	Anhang B	169
11.1	Meßergebnisse des Fütterungsversuchs mit scheinvagotomierten Tieren	169
11.2	Meßergebnisse des Fütterungsversuchs mit vagotomierten Tieren	170
12	Anhang C	171
12.1	Ergebnisse mit dem Konflikt-Test	171
12.1.1	I.p.-Applikation bei BgVV-Wistar-Ratten	171
12.1.2	I.p.-Applikation bei Winkelmann-Wistar-Ratten	172
12.1.3	I.c.v.-Applikation bei BgVV-Wistar-Ratten	172
12.1.4	I.c.v.-Applikation bei Winkelmann-Wistar-Ratten	173
12.1.5	I.h.-Applikation	173
12.1.6	Kombinierte i.p.-Applikation	174
12.1.7	Kombinierte i.p.- und i.h.-Applikation	174
13	Anhang D	175
13.1	Ergebnisse mit dem Elevated-plus-maze-Test	175
13.1.1	I.p.-Applikation bei BgVV-Wistar-Ratten	175
13.1.2	Zentrale Applikation	176
13.1.3	Kombinierte Applikation	176
13.1.4	I.p.-Applikation bei Winkelmann-Wistar-Ratten	177
13.1.5	Ergebnisse fünfminütiger Versuchsdauern auf dem Elevated-plus-maze	177
14	Anhang E	178
14.1	Meßergebnisse der Versuche mit vaguslädierten Tieren	178
14.1.1	Konflikt-Test	178
14.1.2	Elevated-plus-maze-Test	179

Danksagung

Frau Univ. Prof. Dr. Heidrun Fink danke ich für die Anregung zu dieser Arbeit und daß sie mir die Möglichkeit zur Durchführung der Versuche gab. Ihr stetes Interesse am Fortgang der Untersuchungen sowie ihre Bereitschaft zur Diskussion der jeweiligen Versuchsergebnisse waren für mich eine dankenswerte Unterstützung.

Herrn em. Univ. Prof. Dr. Hans-Hasso Frey danke ich für seine Bereitschaft zur Annahme dieser Dissertation am Fachbereich Veterinärmedizin der Freien Universität Berlin.

Frau Dr. Mechthild Voits gilt mein herzlicher und verbindlicher Dank für ihre wissenschaftliche Anleitung, die Bereitstellung grundlegender Literatur und ihr stetes offenes Ohr für meine Belange.

Herrn Dr. Andre Rex und *Frau Dr. Sabine Jödecke* bin ich dankbar verpflichtet für die mühevollen Korrekturlesungen.

Herrn Dipl.-Ing. Karl-Heinz Sondern und *Herrn Dr. Klemens M. Sondern* danke ich für die gewissenhafte Durchsicht der Endversion.

Desweiteren bedanke ich mich bei allen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Prof. H. Fink insbesondere bei *Frau Keilert, Frau Sprang, Frau Glatte, Herrn Sohr* für ihre Unterstützung.

Allen Mitarbeitern des Institutes für Pharmakologie und Toxikologie gilt ein besonderes Wort des Dankes für ihre menschliche Verbundenheit und die daraus resultierende gute und angenehme Arbeitsatmosphäre.

Dem Bundesministerium für Forschung und Technik danke ich für die Förderung des Projektes.

Lebenslauf

	geboren am 6. April 1963 in Wermelskirchen Familienstand: ledig Vater: Karl-Heinz Sondern, Diplom-Ingenieur Mutter: Maria Josefine Sondern, geb. Schmitz, Hebamme
1969 - 1973	Langeloh-Grundschule, Dortmund
1973 - 1983	Max-Planck-Gymnasium, Dortmund
1983 - 1984	Johann Wolfgang Goethe Universität, Frankfurt a.M. Mineralogie
1984 - 1985	Justus Liebig Universität, Giessen Biologie
1985 - 1992	Freie Universität Berlin Veterinärmedizin
22.07.1992	Approbation
1992 - 1996	Institut für Pharmakologie und Toxikologie Medizinische Fakultät der Humboldt-Universität zu Berlin Wissenschaftlicher Mitarbeiter
1996 - 1997	Freie Universität Berlin Stipendiat des Postgraduiertenkurs in Tropenveterinärmedizin / Tiergesundheitsmanagement
31.05.1997	Diploma in Animal Health Management (Dipl. AHM)
1997 - 1998	Tierarztpraxis Dr. M. Olivier Haltern (Westf.) Assistentztierarzt
Seit 1998	Tierarztpraxis Dr. M. Bühs Stadtlohn Assistentztierarzt

Selbständigkeitserklärung

Der Unterzeichnende erklärt gemäß § 8 Abs. 3 der Promotionsordnung des Fachbereichs Veterinärmedizin der Freien Universität Berlin vom 23. August 1983, daß er der selbstständige Verfasser der eingereichten Dissertation:

"Untersuchungen zu der anxiolytischen Wirksamkeit des Cholecystokinin-B-Rezeptor-Antagonisten L365.260 in zwei Angstmodellen bei Ratten"

ist und daß diese Arbeit nicht für ein früheres Promotionsverfahren eingereicht wurde.

Alle Hilfsmittel und Hilfen, auf deren Grundlage diese Arbeit verfaßt wurde, sind in den Kapiteln 3 und 9 der vorliegenden Dissertation angegeben.



Berlin, den 11. Mai 1999