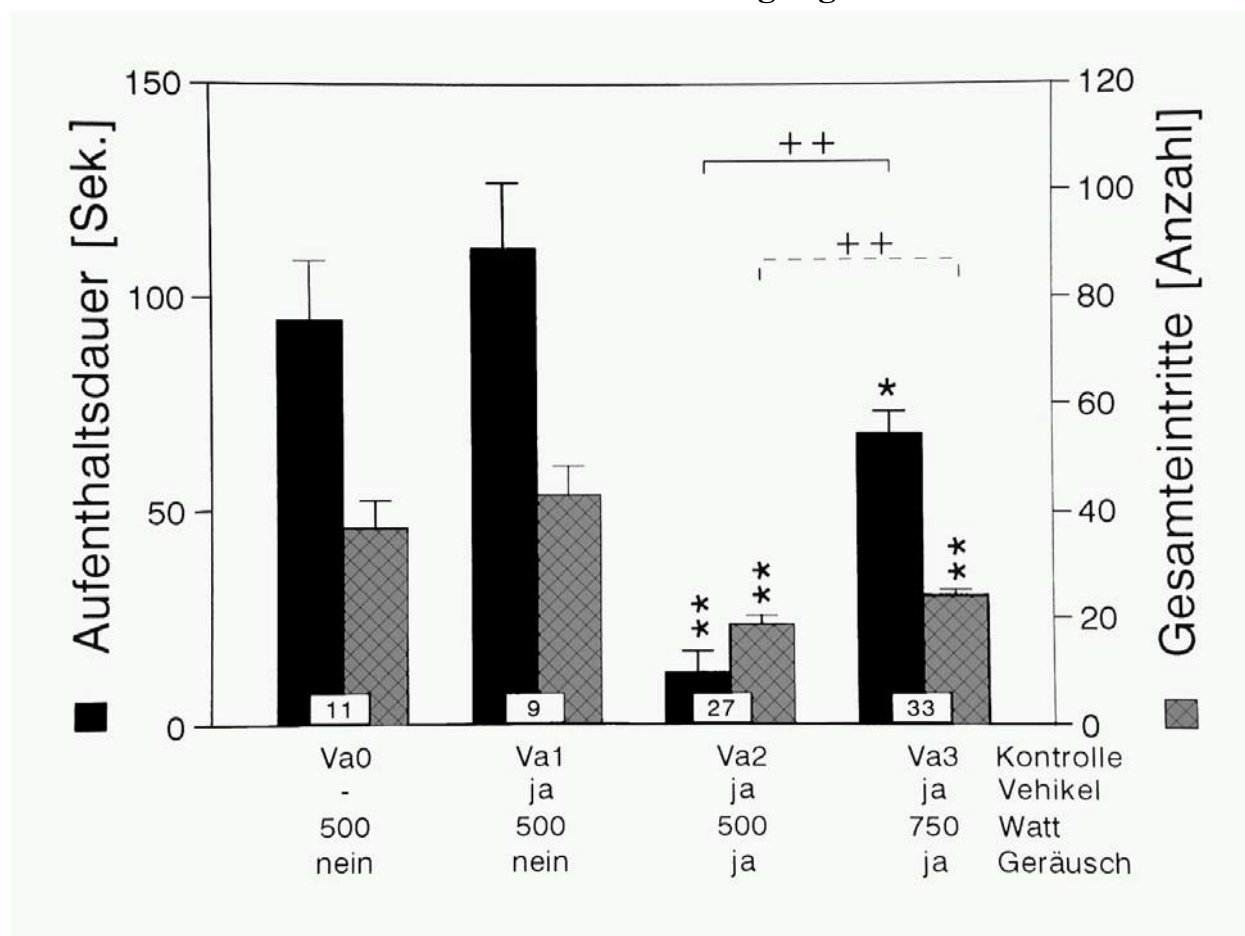


## 4.1 Elevated-plus-maze-Test

### 4.1.1 Einfluß unterschiedlicher Versuchsbedingungen



**Abb. 4-21** Vergleich der Basalwerte von BgVV-Wistar-Ratten bei unterschiedlichen Versuchsbedingungen (Va 0, Va 1, Va 2, Va 3) auf dem Elevated-plus-maze ohne Applikation von Substanz (Va 1) oder nach intraperitonealer Applikation von Vehikel (Va 1, Va 2, Va 3). Der Beobachtungszeitraum beträgt 5 Minuten. Die gefüllten Balken (y1-Achse) zeigen die Aufenthaltsdauer der Tiere auf den offenen Armen in Sekunden als Maß für die 'Ängstlichkeit' der Tiere. Die gekreuzten Balken (y2-Achse) zeigen die Anzahl der Gesamteintritte als Maß für die lokomotorische Aktivität der Tiere. Dargestellt ist jeweils der Mittelwert + SEM einer Gruppe. Die Anzahl (n) ist in den dazugehörigen Balkenpaaren angegeben. Signifikante Unterschiede der Gruppen zu der Gruppe Va 0 sind mit \* für  $p < 0,05$  und \*\* für  $p < 0,01$  gekennzeichnet. Signifikante Unterschiede zwischen den Vehikelgruppen (Va 1, Va 2, Va 3) sind mit ++ für  $p < 0,01$  gekennzeichnet.

In Abb. 4-21 sind die Basalwerte von BgVV-Wistar-Ratten bei unterschiedlichen Versuchsbedingungen auf dem Elevated-plus-maze dargestellt. Va 0 und Va 1 wurden unter gleichen Bedingungen (500 Watt, ohne Geräuschkulisse) durchgeführt. Weder die Aufenthaltsdauer auf den offenen Armen noch die lokomotorische Aktivität unterschieden sich bei Tieren, die keine Applikation erhielten (Va 0) von den Tieren, die i.p. Vehikel erhielten (Va 1). Manipulationseinflüsse auf die Tiere sowie eine Eigenwirkung des Vehikels sind somit auszuschließen.

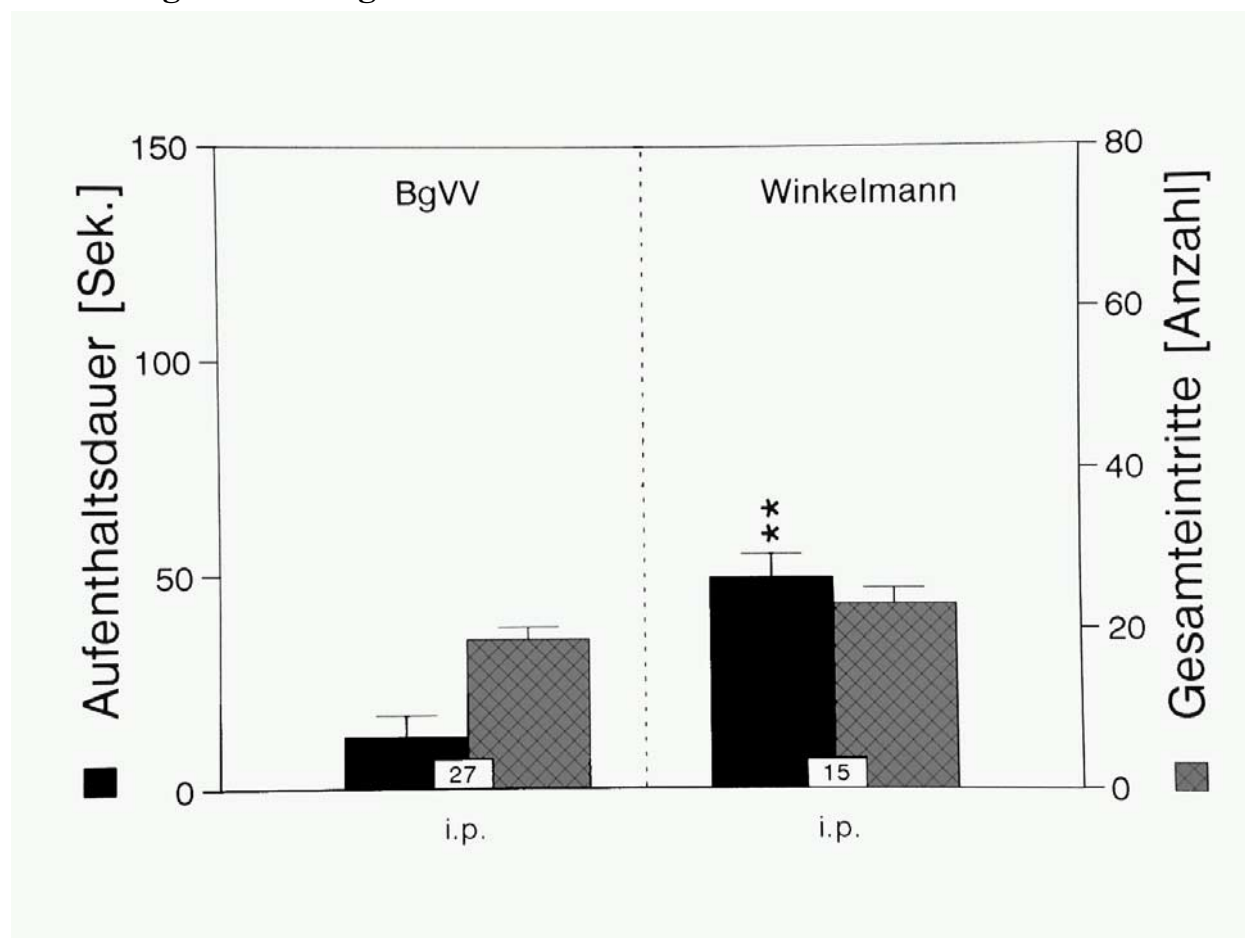
Wurden die Versuchsbedingungen durch Hinzufügen von maskierenden Geräuschen verändert (Va 2 und Va 3), so erniedrigten sich sowohl die mittleren Aufenthaltsdauern auf den offenen Armen auf 12 Sekunden bei Va 2 (Va 2 vs Va 1,  $p < 0,01$ ) und 68 Sekunden bei Va 3 (Va 3 vs Va 1,  $p < 0,05$ ) als auch die Anzahl der Gesamteintritte.

Wurde die Lichtintensität verändert, so zeigte sich, daß bei stärkerer Beleuchtung mit 750 Watt (Va 3), bei sonst gleichen Versuchsbedingungen, die Aufenthaltsdauer auf den offenen Armen höher war als bei 500 Watt (Va 3 vs Va 2  $p < 0,01$ ). Bei der Anzahl der Gesamteintritte war jedoch kein Unterschied festzustellen (Va 3 vs Va 2,  $p = 0,6$ ). Dies würde für eine geringere Ängstlichkeit der Tiere bei höherer Beleuchtungsintensität sprechen. Es ist aber zu beachten, daß bei intensiverer Beleuchtung nicht nur die offenen Arme, sondern auch die geschlossenen Arme heller ausgeleuchtet waren, woraus sich ein geringerer Unterschied in den Bedingungen auf den offenen und geschlossenen Armen ergibt.

Es ist somit möglich die Basalwerte im Angstverhalten einer Zuchtlinie durch Variation der Versuchsbedingung 'Licht' so zu verschieben, daß sowohl Untersuchungen von anxiogen als auch von anxiolytisch wirkenden Substanzen möglich sind.

Die weiteren Versuche wurden je nach Fragestellung bei 500 Watt und/oder 750 Watt mit Geräuschkulisse durchgeführt. Lediglich der Versuch mit BOC-CCK-4 wurde mit Winkelmann-Wistar-Ratten durchgeführt und nicht mit BgVV-Wistar-Ratten wiederholt.

#### 4.1.2 Vergleich von BgVV- und Winkelmann-Wistar-Ratten



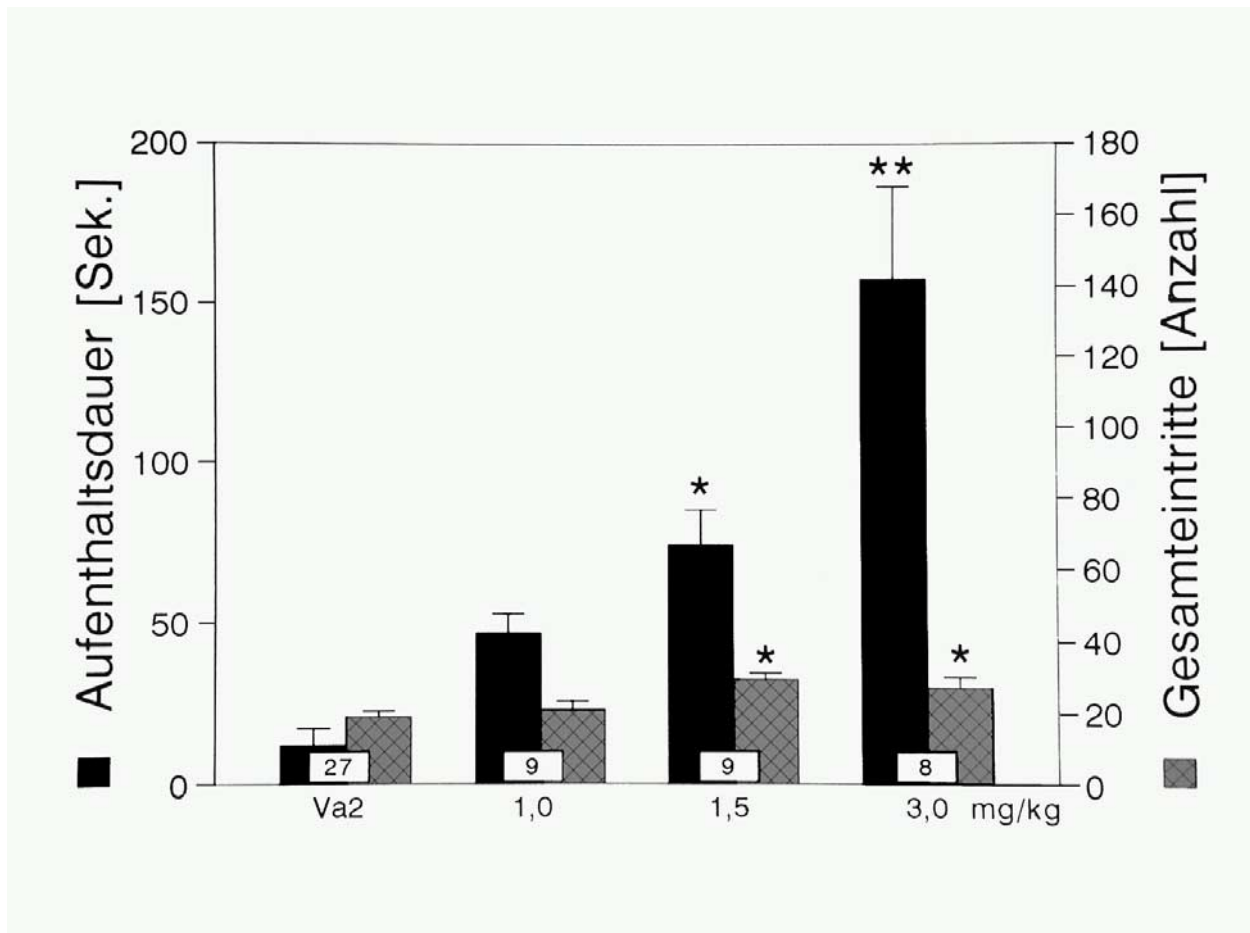
**Abb. 4-22** Vergleich der Aufenthaltsdauern zweier verschiedener Zuchtlinien (BgVV- und Winkelmann) sowie die lokomotorische Aktivität (Gesamteintritte) auf dem Elevated-plus-maze 20 Minuten nach intraperitonealer Applikation von Vehikel (i.p.) unter Versuchsbedingungen Va 2. Für weitere Erläuterungen siehe Abb. 4-21.

In Abb. 4-22 sind die unterschiedlichen Ausgangslagen des Angstniveaus (Basalwerte) von Wistar-Ratten zweier verschiedener Züchter auf dem Elevated-plus-maze dargestellt. Bei intraperitonealer Applikation von Vehikel blieben die BgVV-Tiere während der Testdauer von 5 Minuten durchschnittlich 12 Sekunden auf den offenen Armen während die Wistar-Ratten der Winkelmann-Versuchstierzuchtanstalt signifikant länger (49 Sekunden,  $p < 0,01$ ) auf den offenen Armen zubrachten. Die lokomotorische Aktivität war bei beiden Zuchtlinien ähnlich.

### 4.1.3 Systemische Applikationen bei BgVV-Wistar-Ratten

#### 4.1.3.1 Standardpharmaka mit anxiolytischer Wirkung

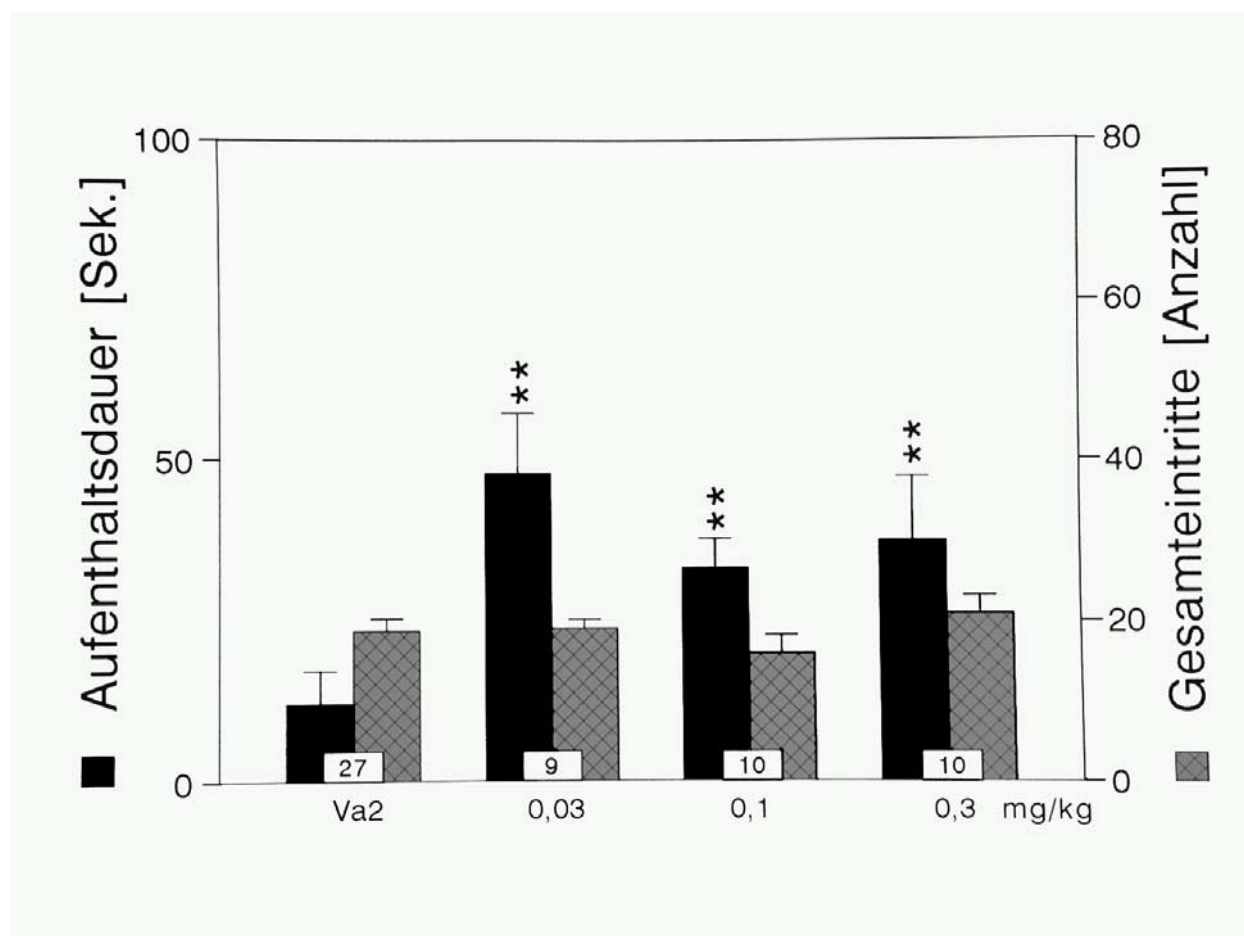
##### 4.1.3.1.1 Diazepam i.p.



**Abb. 4-23** Aufenthaltsdauer von BgVV-Wistar-Ratten auf den offenen Armen in Sekunden sowie die lokomotorische Aktivität (Gesamteintritte) auf dem Elevated-plus-maze unter Versuchsbedingungen Va 2, 25 Minuten nach i.p.-Applikation von Diazepam und Vehikel (Va2). Signifikante Unterschiede der Substanzgruppen und der Vehikelgruppe (Va2) sind mit \* für  $p < 0,05$  und \*\* für  $p < 0,01$  gekennzeichnet. Für weitere Erläuterungen siehe Abb.4-21

Diazepam führte in den Dosierungen von 1,0, 1,5 und 3,0  $\mu\text{g}/\text{kg}$  unter den Versuchsbedingungen Va 2 zu einer dosisabhängigen Verlängerung der Aufenthaltsdauer der Tiere auf den offenen Armen (Abb. 4-23). Während die Kontrolltiere (Va2) durchschnittlich 12 Sekunden auf den offenen Armen zubrachten, erhöhte sich die Aufenthaltsdauer in der niedrigen Dosierung schon auf 46,7 Sekunden ( $p=0,8$ ). In der mittleren und hohen Dosierung verlängerte sich die Aufenthaltsdauer auf 73,9 (1,5 mg/kg) und 157,5 Sekunden (3,0 mg/kg). Diese Unterschiede zur Kontrollgruppe waren in der mittleren Dosierung mit  $p < 0,05$  und in der hohen Dosierung mit  $p < 0,01$  signifikant. Die lokomotorische Aktivität war in der niedrigen Dosierung nur leicht und in den beiden höheren Dosierungen signifikant ( $p < 0,01$ ) erhöht. Nebenwirkungen der Substanz in Form einer Muskelrelaxation der Stufe 2 waren in diesem Test nur in der hohen Dosierung von 3,0 mg/kg feststellbar.

## 4.1.3.1.2 8-OH-DPAT i.p.

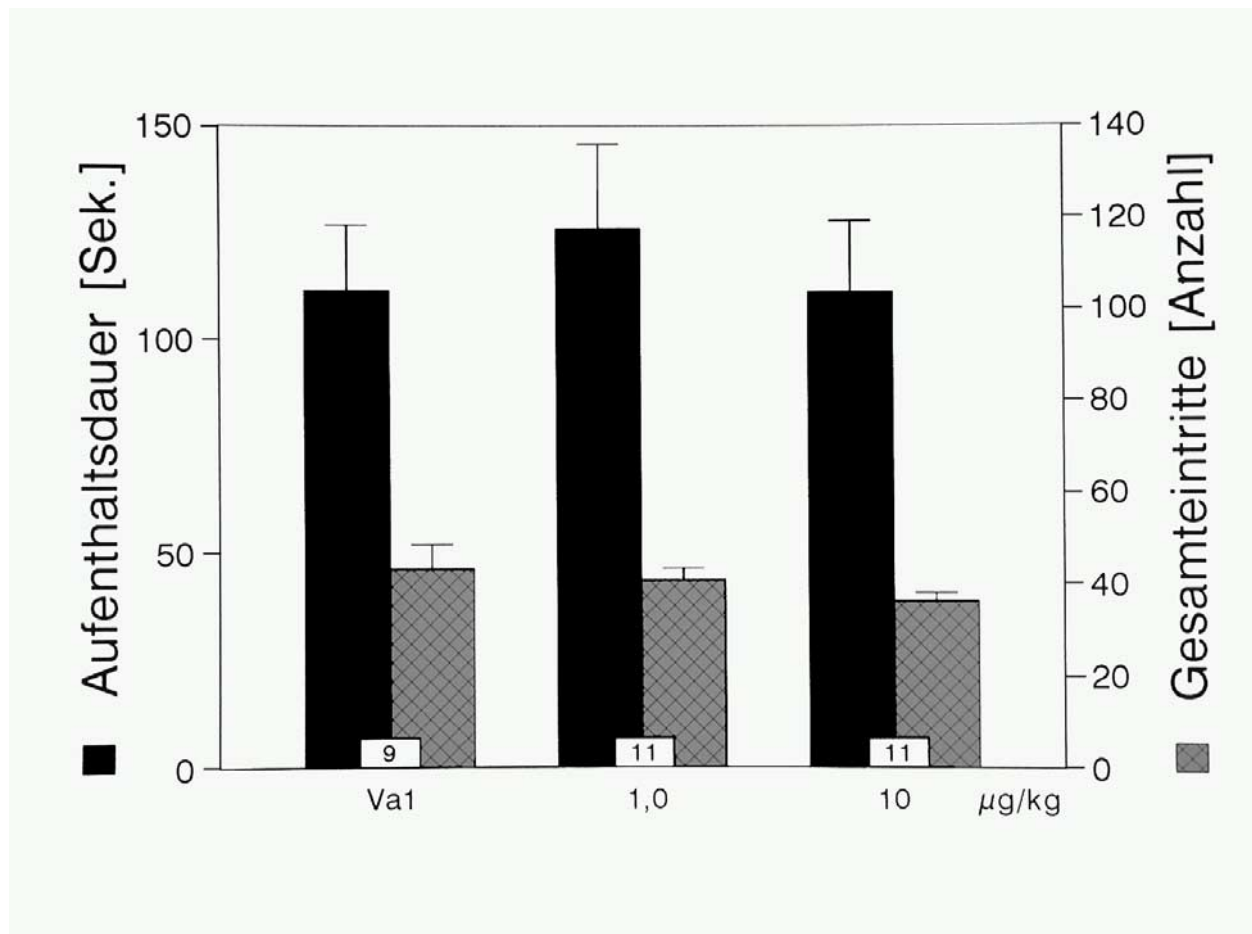


**Abb. 4-24** Aufenthaltsdauer von BgVV-Wistar-Ratten auf den offenen Armen in Sekunden sowie die lokomotorische Aktivität (Gesamteintritte) auf dem Elevated-plus-maze unter Versuchsbedingungen Va 2, 25 Minuten nach i.p.-Applikation von 8-OH-DPAT und Vehikel (Va2). Für weitere Erläuterungen siehe Abb.4-21.

Der 5-HT<sub>1a</sub>-Agonist 8-OH-DPAT führte in allen drei Dosierungen zu einer signifikanten Verlängerung der durchschnittlichen Aufenthaltsdauer der Tiere auf den offenen Armen (Abb. 4-24). Im Vergleich mit den Kontrolltieren (12 Sekunden), erhöhten sich die Aufenthaltsdauern in allen verwendeten Dosierungen signifikant ( $p < 0,01$ ). In der Dosierung von 0,03 mg/kg auf 47,8 Sekunden, in der Dosierung von 0,1 mg/kg auf 33,1 Sekunden und in der höchsten Dosierung von 0,3 mg/kg auf 37,4 Sekunden. Die Lokomotion der Tiere war nicht verändert.

### 4.1.3.2 CCK-Antagonisten unter verschiedenen Versuchsbedingungen

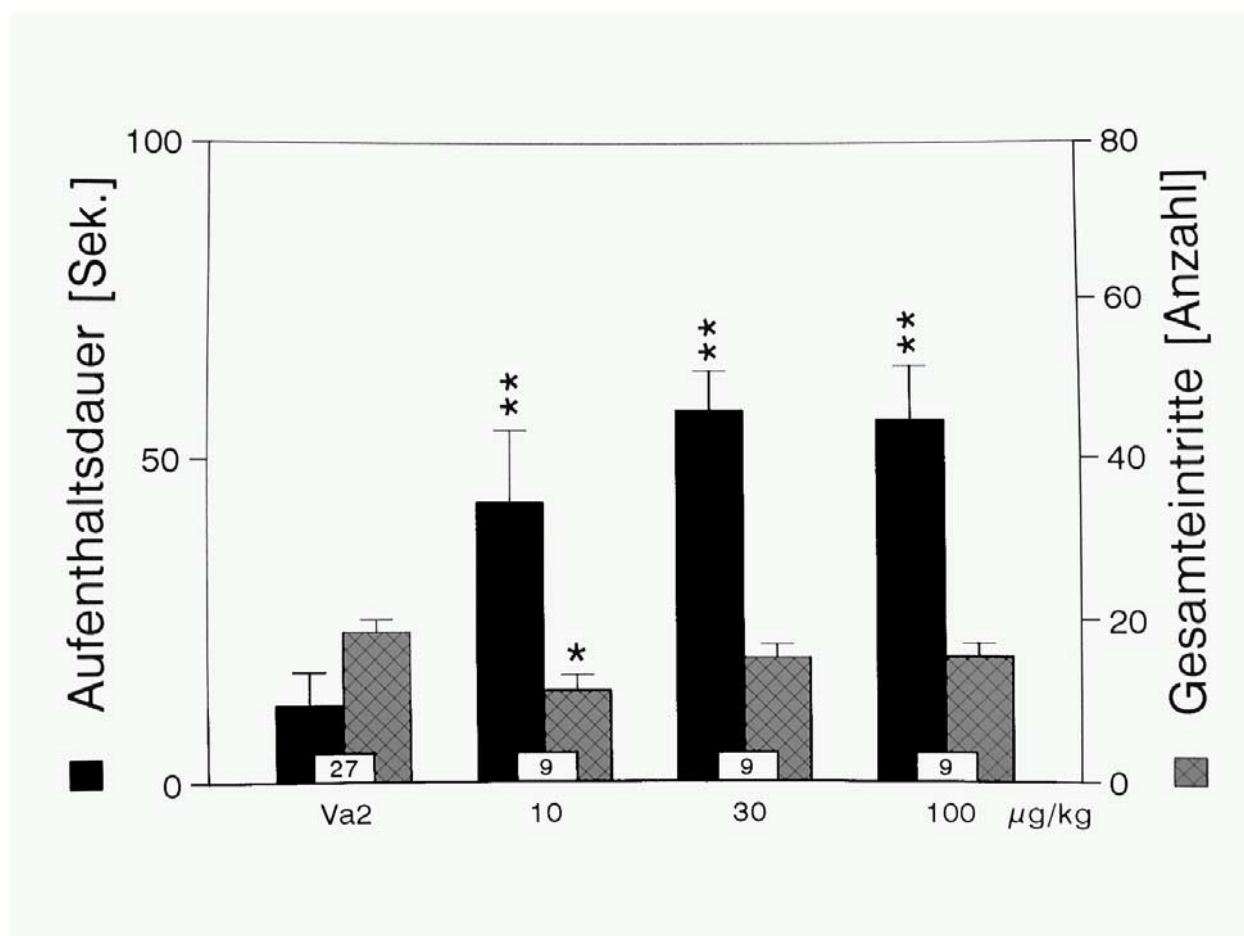
#### 4.1.3.2.1 L365.260 unter Versuchsbedingungen Va1



**Abb. 4-25** Aufenthaltsdauer von BgVV-Wistar-Ratten auf den offenen Armen in Sekunden sowie die lokomotorische Aktivität (Gesamteintritte) auf dem Elevated-plus-maze unter Versuchsbedingungen Va 1, 20 Minuten nach i.p.-Applikation von L365.260 und Vehikel (Va1). Für weitere Erläuterungen siehe Abb. 4-21.

Die intraperitoneale Applikation des CCK<sub>B</sub>-Rezeptor-Antagonisten L365.260 führte unter den Versuchsbedingungen Va 1 (500 Watt, ohne Geräuschkulisse) zu keiner Verlängerung der Aufenthaltsdauer der Tiere auf den offenen Armen (Abb. 4-25). Während die Tiere der Kontrollgruppe durchschnittlich 111,5 Sekunden auf den offenen Armen verweilten, betrug die Verweildauer nach Applikation auf 1 µg/kg auf 125,9 Sekunden ( $p=0,6$ ) und nach Applikation von 10 µg/kg 110,9 Sekunden ( $p=0,9$ ). Die lokomotorische Aktivität war ebenfalls unverändert.

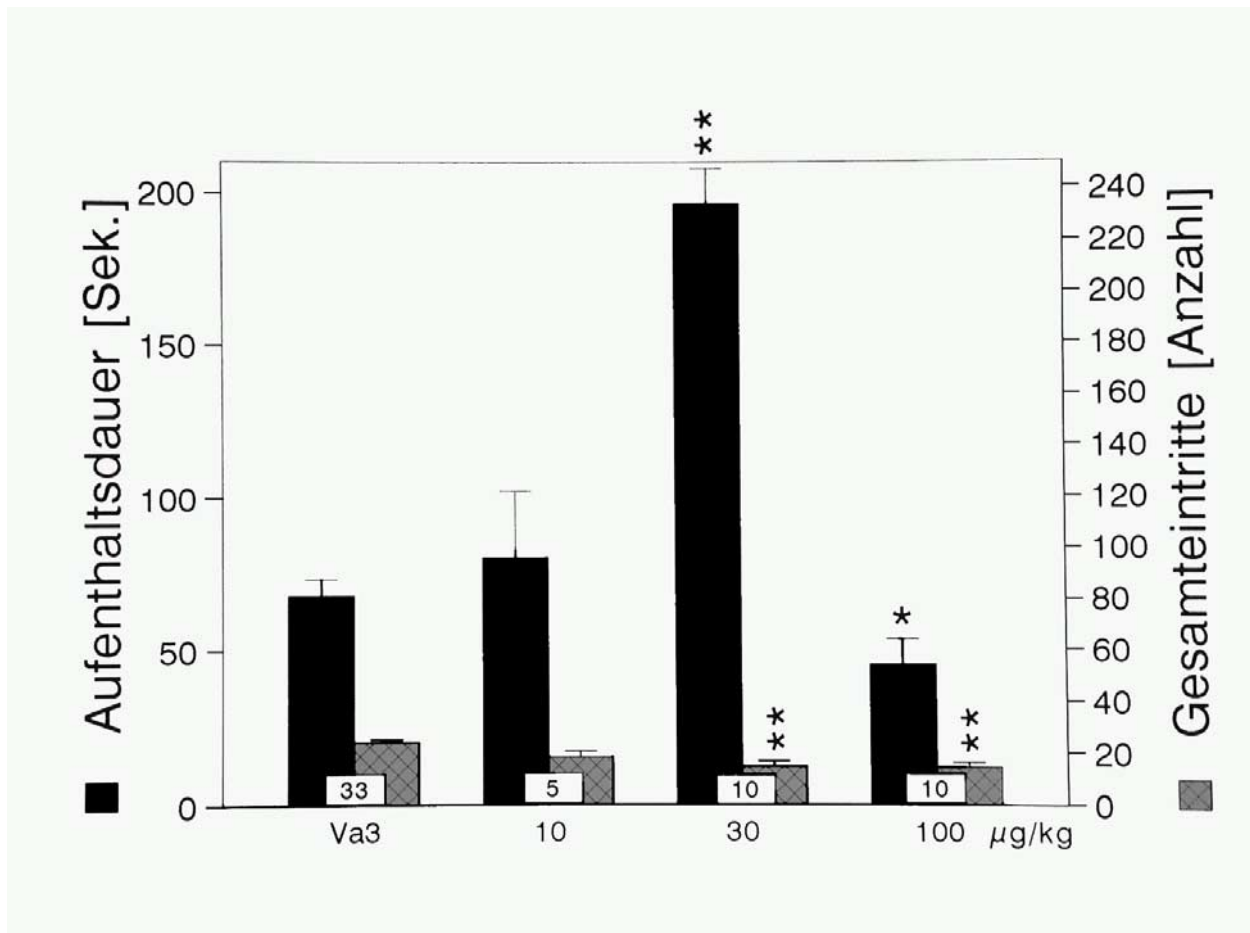
## 4.1.3.2.2 L365.260 unter Versuchsbedingungen Va 2



**Abb. 4-26** Aufenthaltsdauer von BgVV-Wistar-Ratten auf den offenen Armen in Sekunden sowie die lokomotorische Aktivität (Gesamteintritte) auf dem Elevated-plus-maze unter Versuchsbedingungen Va 2, 20 Minuten nach i.p.-Applikation von L365.260 und Vehikel (Va2). Signifikante Unterschiede zwischen den Dosierungsgruppen und der Vehikelgruppe sind mit \* für  $p < 0,05$  gekennzeichnet. Für weitere Erläuterungen siehe Abb. 4-21.

Unter den Versuchsbedingungen Va 2 (500 Watt, mit Geräuschkulisse) führte die i.p.-Applikation von L365.260 zu einer verlängerten Aufenthaltsdauer der Tiere auf den offenen Armen (Abb. 4-26). Während die Kontrolltiere für durchschnittlich 12 Sekunden auf den offenen Armen blieben, erhöhte sich der Wert in der niedrigsten Dosierung von 10 µg/kg verglichen mit der Kontrollgruppe (Va2) auf 43,2 Sekunden ( $p < 0,01$ ), in der Dosierung von 30 µg/kg auf 57,4 Sekunden ( $p < 0,01$ ) und in der höchsten Dosierung von 100 µg/kg auf 55,8 Sekunden ( $p < 0,01$ ). Die lokomotorische Aktivität der Tiere war in den beiden hohen Dosierungen leicht und in der niedrigsten Dosierung sogar signifikant gesenkt.

## 4.1.3.2.3 L365.260 unter Versuchsbedingungen Va 3

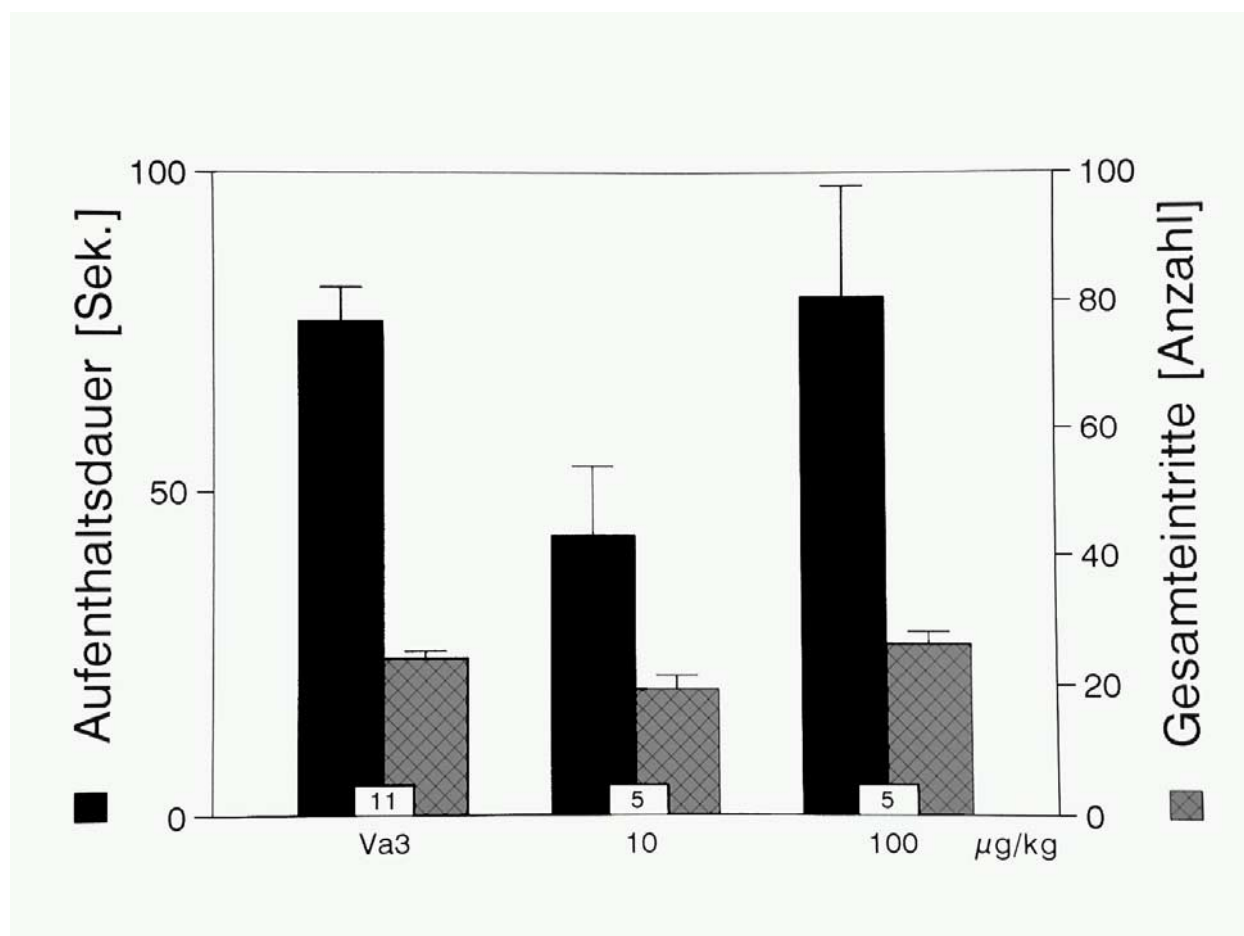


**Abb. 4-27** Aufenthaltsdauer von BgVV-Wistar-Ratten auf den offenen Armen in Sekunden sowie die lokomotorische Aktivität (Gesamteintritte) auf dem Elevated-plus-maze unter Versuchsbedingungen Va 3, 20 Minuten nach i.p.-Applikation von L365.260 und Vehikel (Va3). Signifikante Unterschiede zwischen den Dosierungsgruppen und der Vehikelgruppe sind mit \* für  $p < 0,05$  und mit \*\* für  $p < 0,01$  gekennzeichnet. Für weitere Erläuterungen siehe Abb. 4-21.

Unter den Versuchsbedingungen Va 3 (750 Watt, mit Geräuschkulissee) führte die i.p.-Gabe von L365.260 zu einer signifikanten Verlängerung der Aufenthaltsdauer auf den offenen Armen (Abb. 4-27). Die Aufenthaltsdauer von 196,2 Sekunden ( $p < 0,01$ ) war bei der Applikation von 30 µg/kg signifikant verlängert, verglichen mit der Kontrollgruppe, die sich durchschnittlich 67,85 Sekunden auf den offenen Armen aufhielt. In der niedrigen Dosierung von 10 µg/kg war die Aufenthaltsdauer mit 80,2 Sekunden ( $p = 0,45$ ) ähnlich der der Kontrollgruppe. In der höchsten Dosierung von 100 µg/kg war die durchschnittliche Aufenthaltsdauer mit 45,2 Sekunden ( $p < 0,05$ ) sogar signifikant erniedrigt. Die Lokomotion war bei allen Dosierungen erniedrigt und erreichte in den beiden hohen Dosierungen Signifikanz.



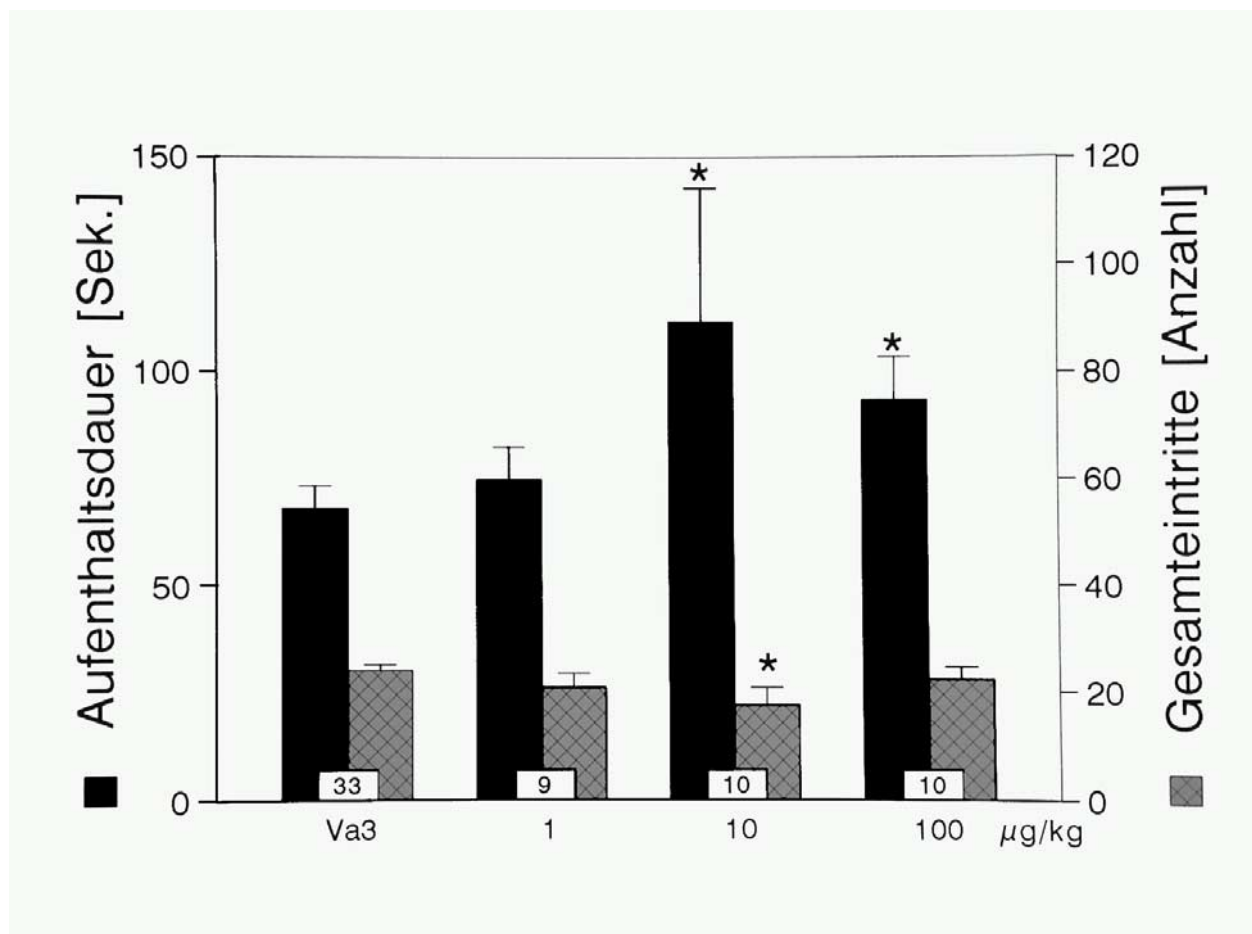
## 4.1.3.2.4 L364.718



**Abb. 4-28** Aufenthaltsdauer von BgVV-Wistar-Ratten auf den offenen Armen in Sekunden sowie die lokomotorische Aktivität (Gesamteintritte) auf dem Elevated-plus-maze unter Versuchsbedingungen Va 3, 20 Minuten nach i.p.-Applikation von L364.718 und Vehikel (Va3). Für weitere Erläuterungen siehe Abb. 4-21.

Die i.p.-Applikation von L364.718 unter den Versuchsbedingungen Va 3 führte in der Dosierung von 10 µg/kg zu einer leichten Verkürzung der durchschnittlichen Aufenthaltsdauer auf den offenen Armen, während sie in der Dosierung von 100 µg/kg nicht verändert war (Abb. 4-28). Die Tiere der Kontrollgruppe hielten sich durchschnittlich 67,9 Sekunden auf den offenen Armen auf. Nach Substanzgabe verkürzte sich die Aufenthaltsdauer in der niedrigen Dosierung auf 43,0 Sekunden ( $p=0,1$ ); in der hohen Dosierung lag sie mit 80,6 Sekunden ( $p=0,41$ ) nur wenig über dem Wert der Kontrollgruppe. Die Lokomotion war vergleichbar mit der der Kontrolltiere.

## 4.1.3.2.5 PD135.158

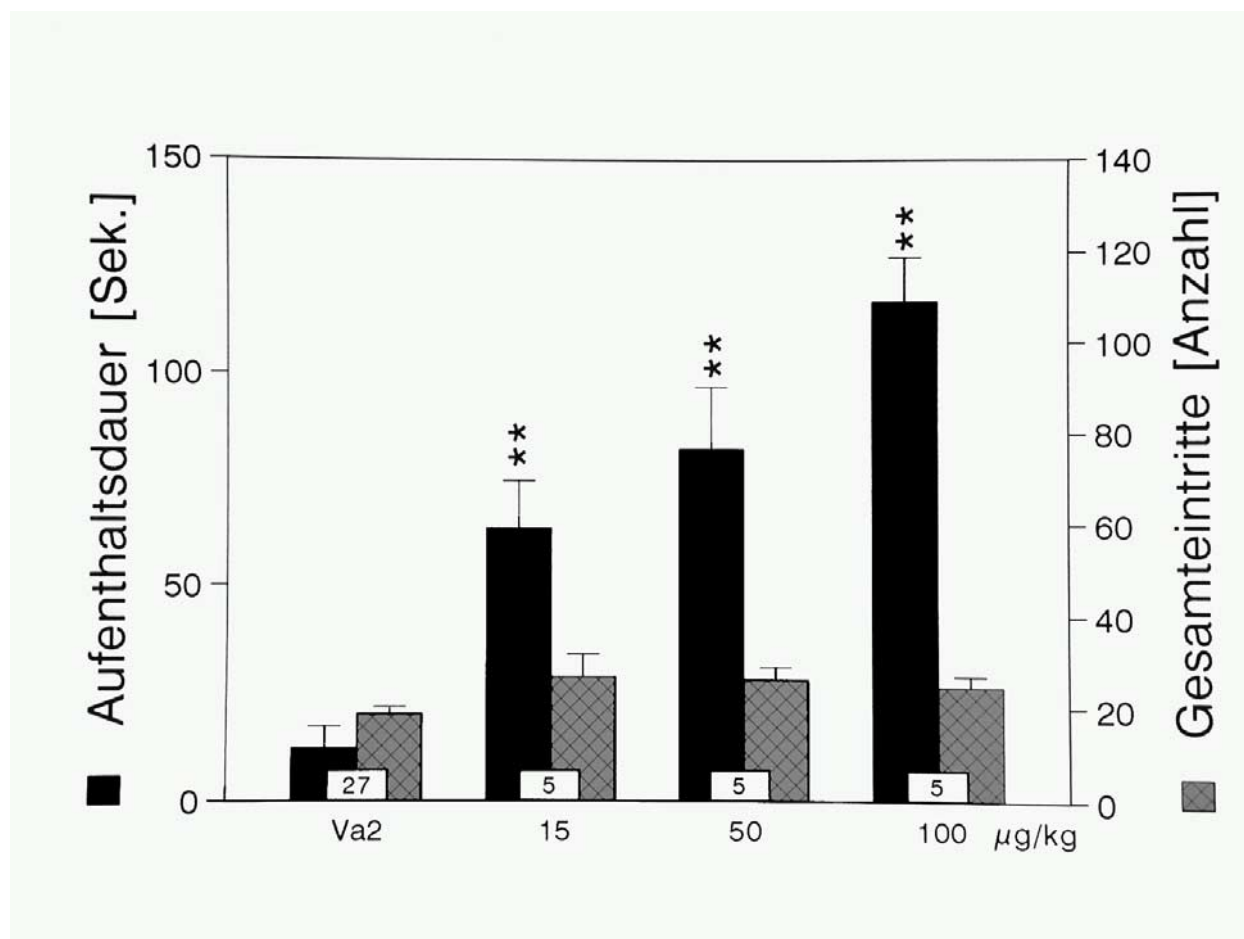


**Abb. 4-29** Aufenthaltsdauer von B6VW-Wistar-Ratten auf den offenen Armen in Sekunden sowie die lokomotorische Aktivität (Gesamteintritte) auf dem Elevated-plus-maze unter Versuchsbedingungen Va 3, 20 Minuten nach i.p.-Applikation von PD135.158 und Vehikel (Va3). Für weitere Erläuterungen siehe Abb. 4-21.

Die i.p.-Applikation von PD135.158 führte unter den Versuchsbedingungen Va 3 zu einer deutlichen Veränderung der Aufenthaltsdauern auf den offenen Armen (Abb. 4-29). Im Vergleich zur Kontrollgruppe (67,9 Sekunden) erhöhte sich in der niedrigsten Dosierung von 1 µg/kg die Aufenthaltsdauer auf 74,6 Sekunden ( $p=0,55$ ), in der Dosierung von 10 µg/kg signifikant auf 111,4 Sekunden ( $p<0,01$ ) und in der höchsten Dosierung von 100 µg/kg signifikant auf 93,3 Sekunden ( $p<0,05$ ). Die lokomotorische Aktivität war nur in der mittleren Dosierung signifikant ( $p=0,01$ ) erniedrigt und lag in den anderen Dosierungen im Bereich der Kontrolle.

### 4.1.3.3 Agonisten unter verschiedenen Versuchsbedingungen

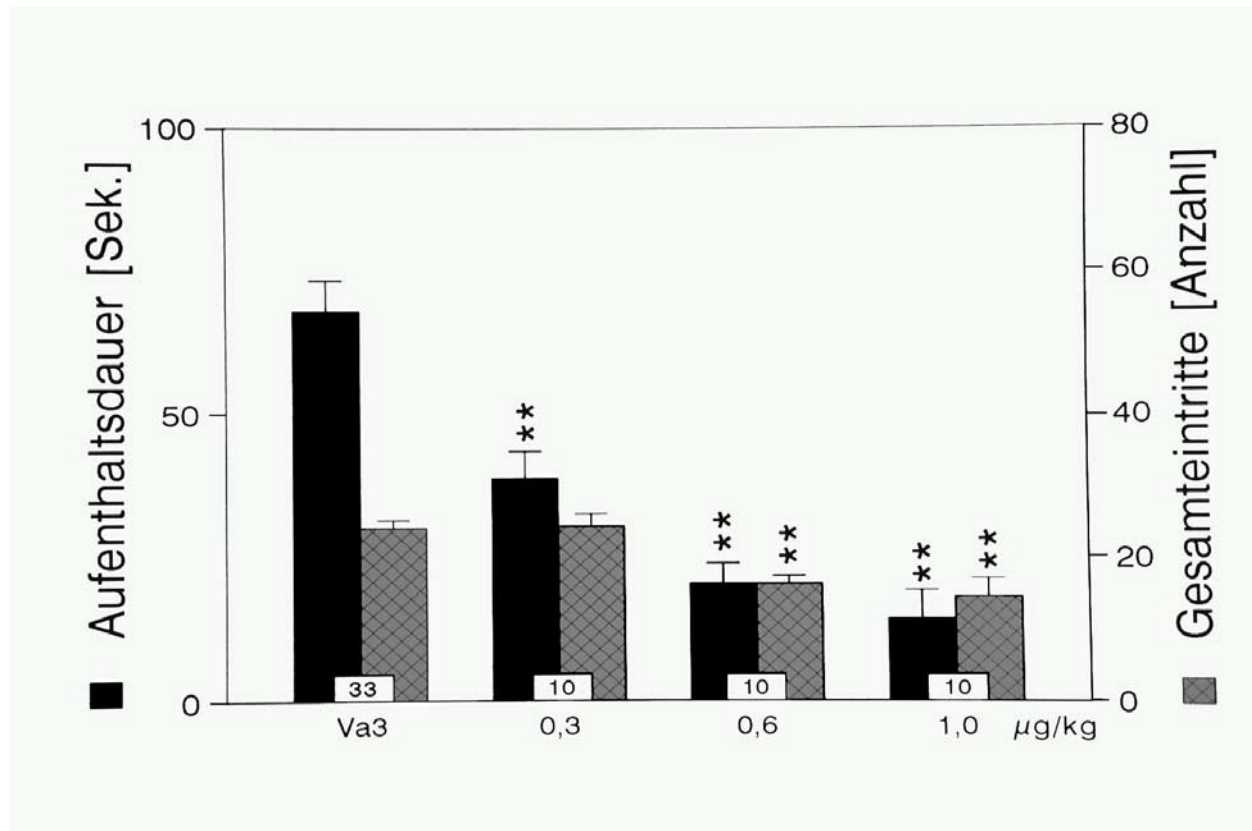
#### 4.1.3.3.1 CCK-Agonist BOC-CCK-4



**Abb. 4-30** Aufenthaltsdauer von BgVV-Wistar-Ratten auf den offenen Armen in Sekunden sowie die lokomotorische Aktivität (Gesamteintritte) auf dem Elevated-plus-maze unter Versuchsbedingungen Va 2, 10 Minuten nach i.p.-Applikation von BOC-CCK-4 und Vehikel (Va2). Signifikante Unterschiede der Substanzgruppen zu der Vehikelgruppe sind mit \*\* für  $p < 0,01$  gekennzeichnet. Für weitere Erläuterungen siehe Abb. 4-21.

Die i.p.-Gabe von BOC-CCK-4 führte unter Versuchsbedingungen Va 2 zu einer dosisabhängigen Verlängerung der Aufenthaltsdauer der Tiere auf den offenen Armen (Abb. 4-30). Im Vergleich zu der Kontrollgruppe (12 Sekunden) verlängerte sich die Aufenthaltsdauer in der niedrigen Dosierung von 15 µg/kg auf 63,4 Sekunden ( $p < 0,01$ ), in der mittleren Dosierung von 50 µg/kg auf 82,0 Sekunden ( $p < 0,01$ ) und in der höchsten Dosierung von 100 µg/kg auf 116,8 Sekunden ( $p < 0,01$ ). Die lokomotorische Aktivität der Tiere war nicht verändert.

#### 4.1.3.3.2 5-HT-Agonist m-CPP



**Abb. 4-31** Aufenthaltsdauer von BgVV-Wistar-Ratten auf den offenen Armen in Sekunden sowie die lokomotorische Aktivität (Gesamteintritte) auf dem Elevated-plus-maze unter Versuchsbedingungen Va 3, 20 Minuten nach i.p.-Applikation von m-CPP und Vehikel (Va3). Signifikante Unterschiede der Substanzgruppen zu der Vehikelgruppe (Va3) sind mit \* für  $p < 0,05$  und \*\* für  $p < 0,01$  gekennzeichnet. Für weitere Erläuterungen siehe Abb. 4-21.

Der 5-HT-Agonist m-CPP führte in allen Dosierungen zu einer signifikanten Verkürzung der Aufenthaltsdauer der Tiere auf den offenen Armen (Abb. 4-31). Im Vergleich zur Kontrollgruppe (67,9 Sekunden) verkürzte sich die Aufenthaltsdauer auf den offenen Armen nach i.p.-Applikation von m-CPP in der Dosierung von 0,3 mg/kg auf 38,6 Sekunden ( $p < 0,01$ ), bei 0,6 mg/kg auf 20,3 Sekunden ( $p < 0,01$ ) und bei 1,0 mg/kg auf 14,1 Sekunden ( $p < 0,01$ ).

Die lokomotorische Aktivität war, verglichen mit der Kontrollgruppe, in der niedrigen Dosierung unverändert, in den beiden hohen Dosierungen aber signifikant erniedrigt ( $p < 0,01$ ). Nebenwirkungen waren in keiner der Dosierungen feststellbar.

#### 4.1.3.4 Zwischenergebnis der systemischen und kombinierten Applikationen bei BgVV-Wistar-Ratten

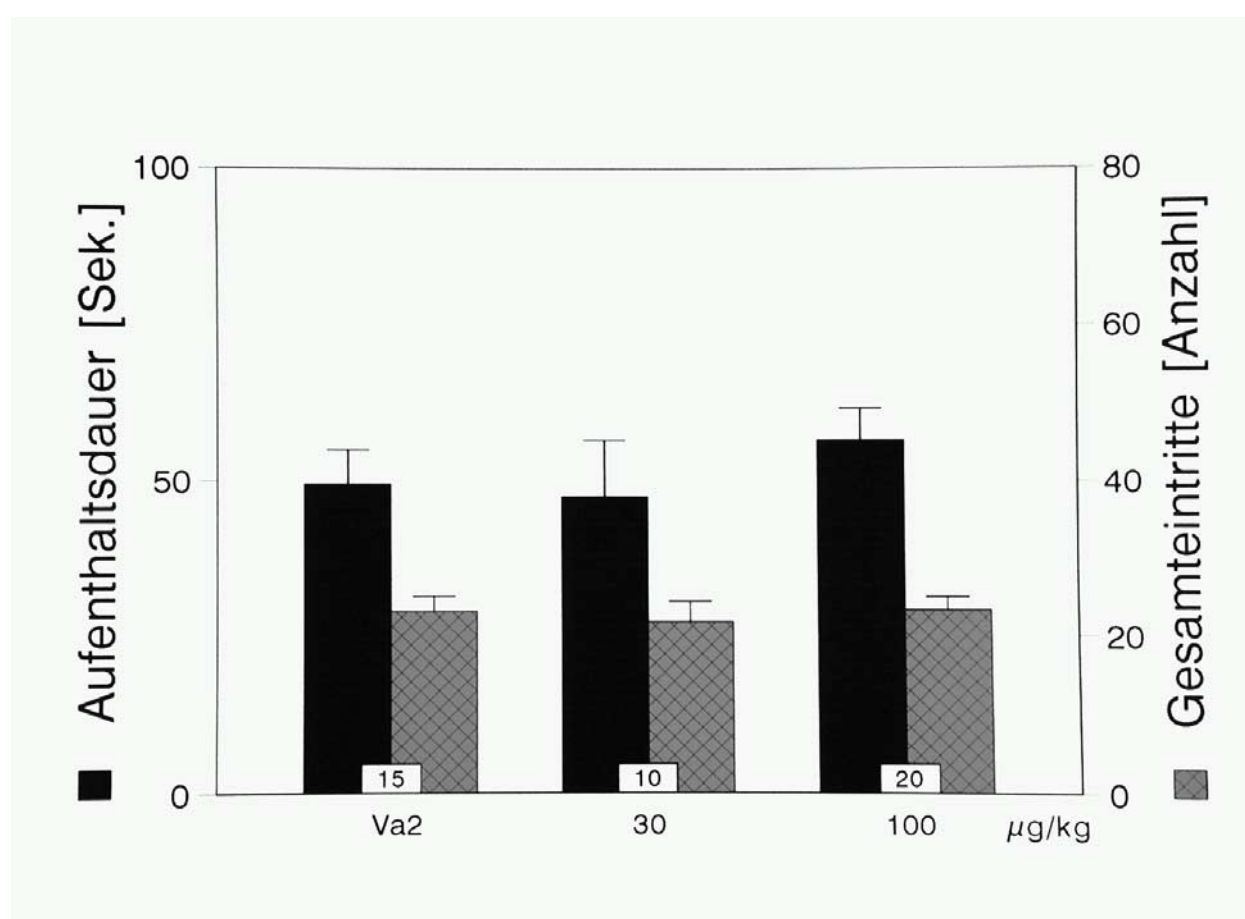
Durch Variation der Versuchsbedingung 'Licht' können auf dem Elevated-plus-maze sowohl anxiogen als auch anxiolytisch wirkende Substanzen an einer Zuchtlinie untersucht werden. BgVV-Wistar-Ratten sind, analog zu den Ergebnissen beim Konflikt-Test, auch in dieser Versuchsanordnung ängstlicher. Die Substanzen, Diazepam und 8-OH-DPAT, die als Standardsubstanzen zur Provokation einer anxiolytischen Wirkung verwendet werden, zeigten

die erwartete anxiolytische Wirkung. Die CCK-Antagonisten L365.260, L364.718 und PD135.158 zeigten in engen Dosisbereichen z.T. ein signifikantes anxiolytisches Wirkungsprofil. Der CCK-Agonist CCK-4 und das über das serotonerge Transmittersystem agonistisch wirkende m-CPP zeigten uneinheitliche Wirkungen. Während CCK-4 unter den Versuchsbedingungen Va 2 die Aufenthaltsdauern der Tiere dosisabhängig und signifikant verlängerte, verkürzte m-CPP die Aufenthaltsdauern auf den offenen Armen unter den Versuchsbedingungen Va 3 ebenfalls signifikant und dosisabhängig.

#### 4.1.4 Systemische Applikation bei Winkelmann-Wistar-Ratten

##### 4.1.4.1 CCK-Agonisten

##### 4.1.4.1.1 BOC-CCK-4 i.p.



**Abb. 4-32** Dargestellt ist die Aufenthaltsdauer der Tiere in Sekunden sowie die lokomotorische Aktivität (Gesamteintritte) von Winkelmann-Wistar-Ratten auf dem Elevated-plus-maze unter Versuchsbedingungen Va 2, 10 Minuten nach i.p.-Applikation von BOC-CCK-4 und Vehikel (Va2). Für weitere Erläuterungen siehe Abb. 4-21.

Die i.p.-Applikation von BOC-CCK-4 (Abb. 4-32) führte bei Winkelmann-Tieren unter den Versuchsbedingungen Va 2 zu keiner Veränderung der Aufenthaltsdauer auf den offenen Armen. Die durchschnittliche Aufenthaltsdauer der Kontrollgruppe (Va2) auf den offenen Armen betrug bei den Winkelmann-Tieren 49,5 Sekunden nach Applikation von BOC-CCK-4 in der Dosierung

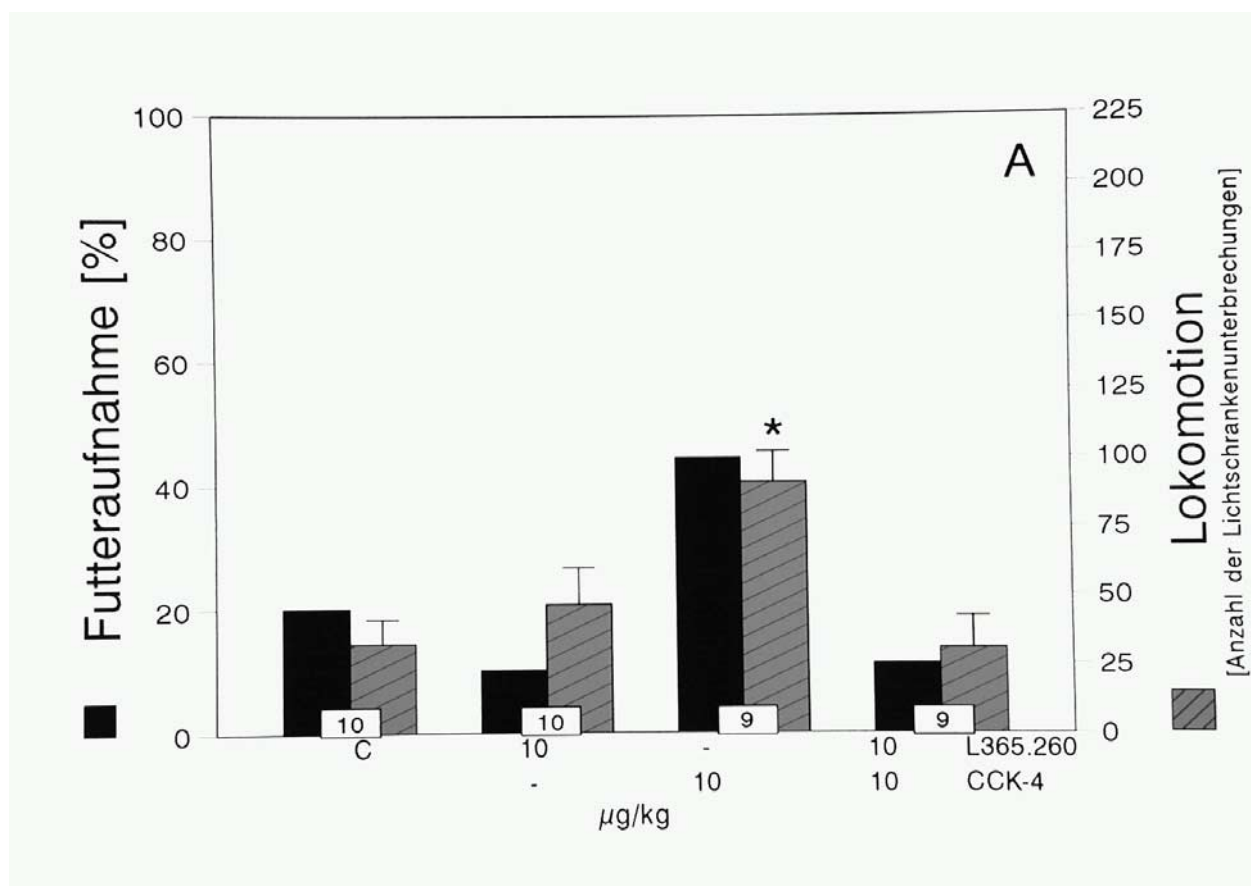
von 30 µg/kg 47,3 Sekunden ( $p=0,83$ ) und in der Dosierung von 100 µg/kg 56,1 Sekunden ( $p=0,39$ ). Die Werte der lokomotorischen Aktivität waren nicht verändert.

## 4.2 Untersuchung mit vagotomierten Tieren

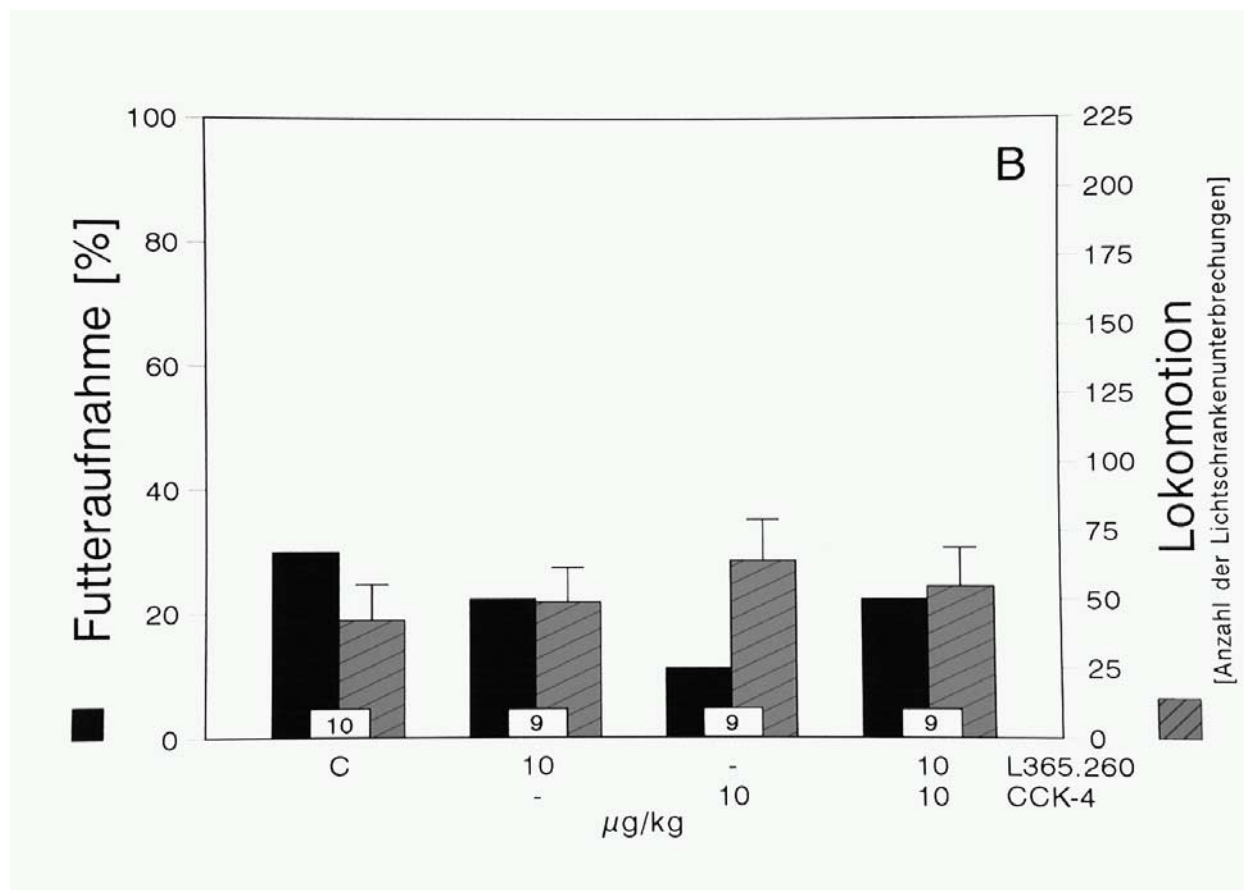
Die Rolle von afferenten Fasern des Nervus vagus in der Vermittlung angstinduzierter Verhaltensweisen ist bisher nicht eindeutig geklärt. Allerdings wurden CCK-Rezeptoren auf dem N. vagus nachgewiesen (siehe Punkt 2.2.3.2). Eine Aktivierung bzw. Hemmung von CCK-Rezeptoren des N. vagus durch peripher applizierte CCK-Agonisten bzw. -Antagonisten kann zu einer Modulation von angstassoziierten Verhaltensweisen unter Umgehung der BHS führen. Daher wurden Untersuchungen mit vagotomierten und scheinvagotomierten Tieren durchgeführt, um zu überprüfen, welchen Einfluß die vagalen CCK-Rezeptoren bei der Vermittlung von angstinduzierten Verhaltensweisen haben.

### 4.2.1 Konflikt-Test

#### 4.2.1.1 L365.260; BOC-CCK-4 einzeln und kombiniert i.p.



**Abb. 4-33 A** Anteil der futteraufnehmenden Tiere in Prozent sowie die lokomotorische Aktivität von vagotomierten BgVV-Wistar-Ratten (A) im Konflikt-Test, 20 Minuten nach i.p.-Applikation von L365.260, 10 Minuten nach i.p.-Applikation von BOC-CCK-4, der kombinierten i.p.-Applikation beider Substanzen mit substanzspezifischen VBZ sowie die Applikation von Vehikel (C). Signifikante Unterschiede zwischen den Dosierungsgruppen und der Vehikelgruppe sind mit \* für  $p<0,01$  gekennzeichnet. Für weitere Erläuterungen siehe Abb. 4-21.



**Abb. 4-33 B** Anteil der futteraufnehmenden Tiere in Prozent sowie die lokomotorische Aktivität von scheinvagotomierten BgVV-Wistar-Ratten (B) im Konflikt-Test, 20 Minuten nach i.p.-Applikation von L365.260, 10 Minuten nach i.p.-Applikation von BOC-CCK-4, der kombinierten i.p.-Applikation beider Substanzen mit substanzspezifischen VBZ sowie die Applikation von Vehikel (C). Signifikante Unterschiede zwischen den Dosierungsgruppen und der Vehikelgruppe sind mit \* für  $p < 0,01$  gekennzeichnet. Für weitere Erläuterungen siehe Abb. 4-21.

Wenn man vagotomierten Ratten (Abb. 4-33 A) simultan 10 µg/kg des CCK<sub>B</sub>-Rezeptor-Agonisten BOC-CCK-4 und 10 µg/kg des Antagonisten L365.260 (11,1 %), sowie L365.260 als Einzelapplikation gab (10 %), so kam es im Vergleich zur Kontrollgruppe (20 %) zu keiner Veränderung des Anteils der Tiere, die Futter aufnehmen.

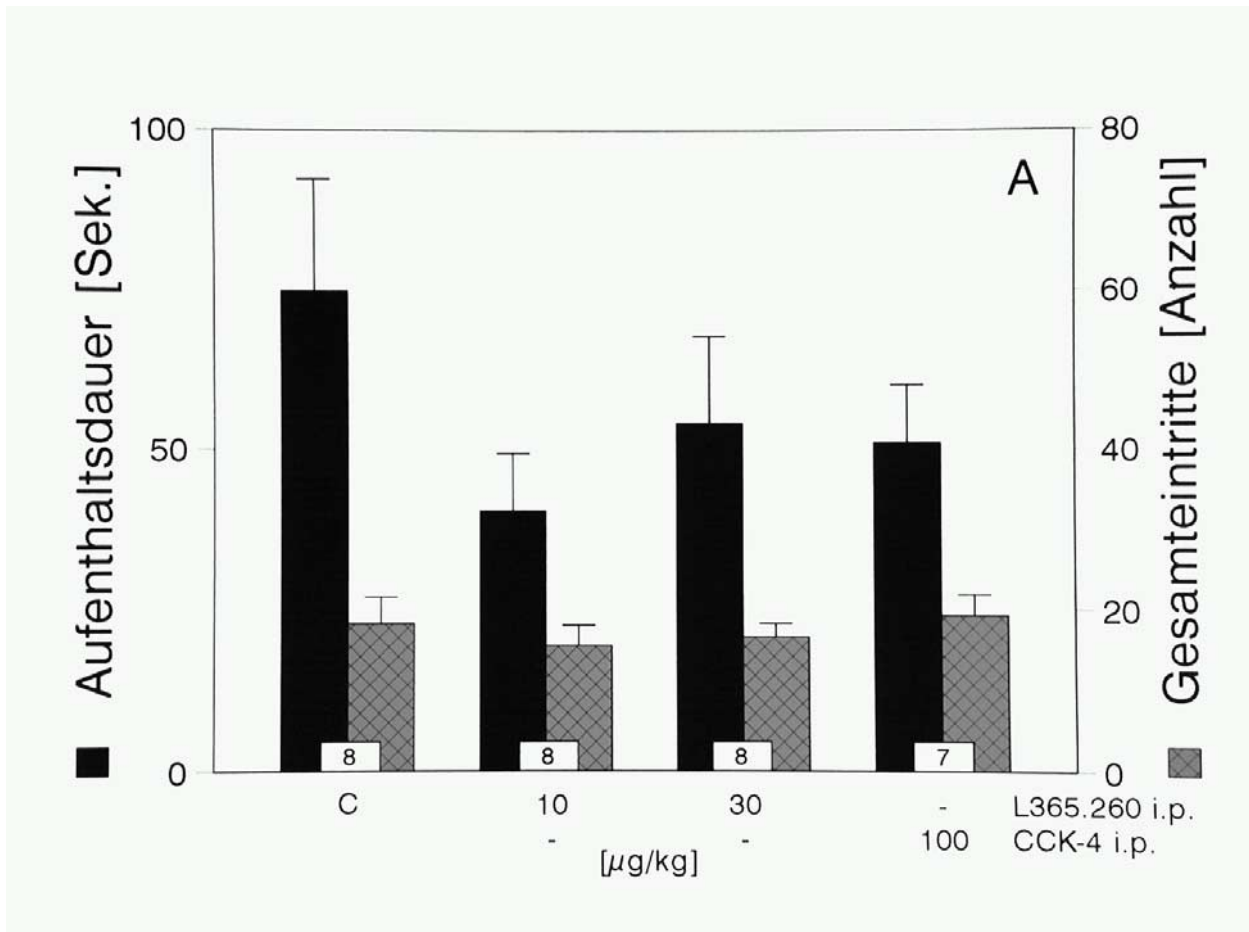
Demgegenüber bewirkte die Einzelapplikation von 10 µg/kg BOC-CCK-4 eine Erhöhung des Anteils der Tiere, die Futter aufnehmen, auf 44,5 % ( $p=0,35$ ). Während die lokomotorische Aktivität der Tiere bei Einzelapplikation von L365.260 und der simultanen Gabe von Agonist und Antagonist sich nicht veränderte, war sie bei der Einzelapplikation von BOC-CCK-4 sogar signifikant erhöht ( $p < 0,05$ ).

Gab man scheinvagotomierten Tieren (Abb. 4-33 B) 10 µg/kg des CCK<sub>B</sub>-Rezeptor-Agonisten BOC-CCK-4 und 10 µg/kg des CCK<sub>B</sub>-Rezeptor-Antagonisten L365.260 simultan, so kam es mit 22,3 % im Vergleich zur Kontrollgruppe (30 %) kaum zu einer Senkung des Anteils der Tiere, die Futter aufnehmen. Bei der Einzelapplikation bewirkte die Gabe von L365.260 mit 22,3 % keine Veränderung des Anteils der Tiere, die Futter aufnehmen. Die Gabe von 10 µg/kg BOC-

CCK-4 senkte demgegenüber den Anteil der Tiere, die Futter aufnahmen, auf 11,1 % ( $p=0,58$ ). Die Lokomotion der Tiere war nicht verändert.

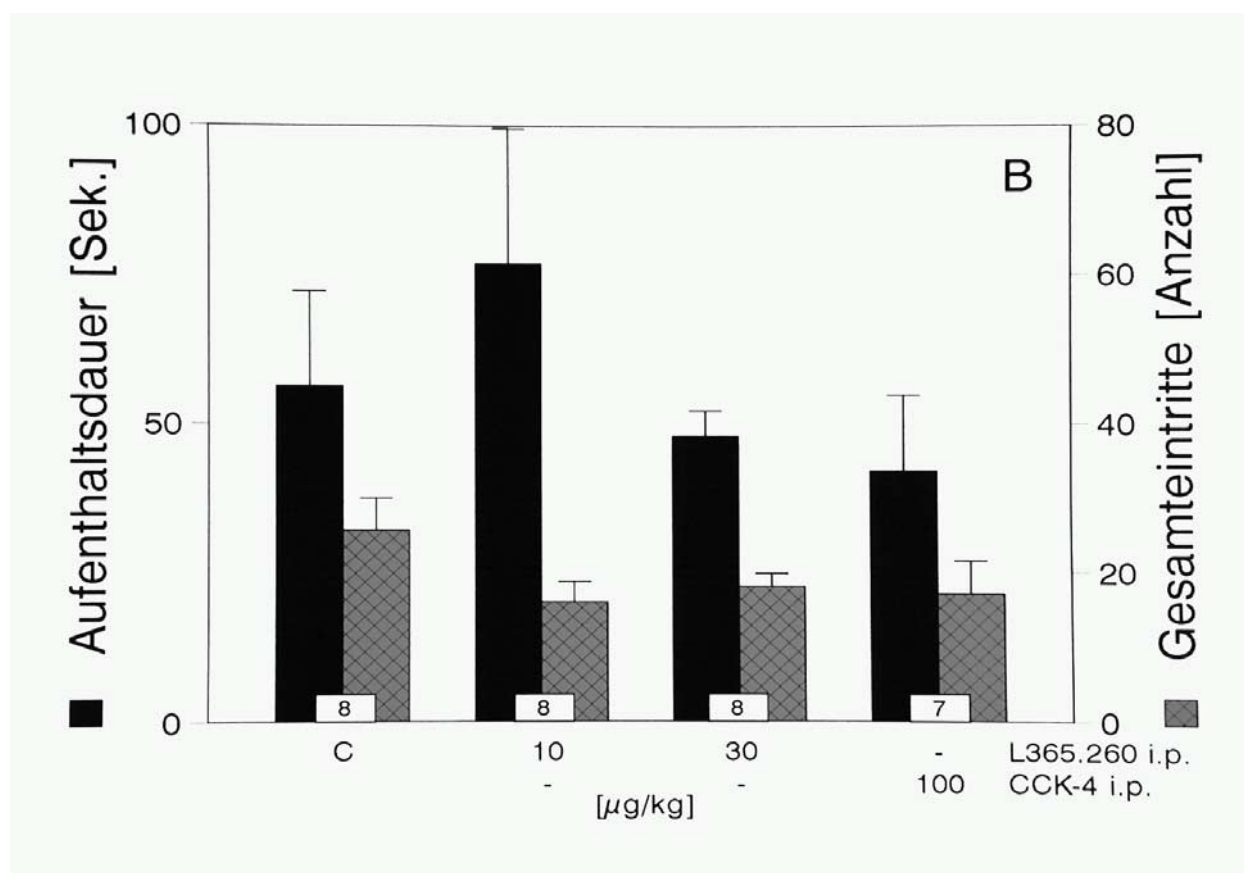
## 4.2.2 Elevated-plus-maze

### 4.2.2.1 L365.260; BOC-CCK-4 einzeln i.p.



**Abb. 4-34 A** Aufenthaltsdauer der Tiere auf den offenen Armen in Sekunden sowie die lokomotorische Aktivität (Gesamteintritte) von vagotomierten BgVV-Wistar-Ratten (A) auf dem Elevated-plus-maze unter den Versuchsbedingungen Va 3, 20 Minuten nach i.p.-Applikation von L365.260, 10 Minuten nach BOC-CCK-4 Applikation und Vehikel (C). Für weitere Erläuterungen siehe Abb. 4-21.





**Abb. 4-34 B** Aufenthaltsdauer der Tiere auf den offenen Armen in Sekunden sowie die lokomotorische Aktivität (Gesamteintritte) von vagotomierten (A) und scheinvagotomierten (B) BgVV-Wistar-Ratten auf dem Elevated-plus-maze unter den Versuchsbedingungen Va 3, 20 Minuten nach i.p.-Applikation von L365.260, 10 Minuten nach BOC-CCK-4 Applikation und Vehikel (C). Für weitere Erläuterungen siehe Abb. 4-21.

Die Abbildungen 4-34 A und B zeigen, daß bei scheinvagotomierten Tieren die Applikation des CCK<sub>B</sub>-Rezeptor-Antagonisten L365.260 in einer Dosierung von 10 µg/kg zu einer Verlängerung der Aufenthaltsdauer auf den offenen Armen führte, während eine Dosiserhöhung von L365.260 und die Applikation von BOC-CCK-4 zu keinen erheblichen Veränderungen führten. Desweiteren hatten vagotomierte Kontrolltiere (B) gegenüber scheinvagotomierten Kontrolltieren ein höheres Angstniveau.

Während die vagotomierten Kontrolltiere (A) sich durchschnittlich 74,9 Sekunden auf den offenen Armen aufhielten, kam es nach der Applikation von L365.260 in der Dosierung von 10 µg/kg zu Absenkungen der Aufenthaltsdauer auf 40,4 Sekunden ( $p=0,1$ ) und in der Dosierung von 30 µg/kg auf 54,0 Sekunden ( $p=0,36$ ). Alle Verkürzungen der Aufenthaltsdauern waren jedoch nicht signifikant. Die Lokomotion war in keiner der Gruppen verändert.

Die scheinvagotomierten Kontrolltiere (B) hielten sich durchschnittlich 57,3 Sekunden auf den offenen Armen auf. Die Applikation von L365.260 führte in der Dosierung 10 µg/kg zu einer Steigerung der Aufenthaltsdauer auf 76,8 Sekunden ( $p=0,49$ ), die jedoch nicht signifikant war. 30 µg/kg führten zu einer Aufenthaltsdauer von 47,9 Sekunden ( $p=0,58$ ), die dem Niveau der

Kontrolltiere entsprach. Die Applikation von 10 µg/kg BOC-CCK-4 verkürzte die Aufenthaltsdauer auf 42,0 Sekunden ( $p=0,48$ ). Die lokomotorische Aktivität war nur bei den Kontrolltieren leicht erhöht.

#### 4.2.3 Zwischenergebnis der Untersuchungen mit vagotomierten Tieren

Die Ergebnisse der Versuche mit vagotomierten und scheinvagotomierten Ratten sind auf den ersten Blick widersprüchlich. Der CCK-Agonist BOC-CCK-4 wirkt anxiolytisch im Konflikt-Test bei vagotomierten Tieren. Der CCK-Antagonist L365.260 zeigt nur im Elevated-plus-maze bei scheinvagotomierten Tieren in niedriger Dosierung anxiolytische Wirkung. Eine schlüssige Hypothese über die Beteiligung des Nervus vagus am Angstgeschehen kann nicht abgeleitet werden. Möglicherweise beeinflusst das Operationstrauma die Ergebnisse in nicht unerheblichem Ausmaß.

#### 4.3 L365.260-Konzentrationsbestimmung in Plasma und Gehirn

<b>Struktur</b>	<b>VBZ [Minuten]</b>	<b>Tier</b>	<b>Konzentration [ng/ml]</b>	<b>Mittelwert [ng/ml]</b>
<i>Plasma</i>	10	1	145,3	122,2
		2	159,0	
		3	62,4	
	20	1	225,1	142,8
		2	120,5	
		3	82,8	
	30	1	80,6	61,0
		2	102,6	
		3	<50	
<i>Gehirn</i>	20	1	<50	
		2	<50	
		3	<50	

**Tab. 4-1** Konzentrationen von L365.260 in Plasma und Gehirn von männlichen BgVV-Wistar-Ratten nach unterschiedlichen VBZ und nach i.p.-Applikation von 500 µg/kg L365.260. Die Gehirnproben wurden durch Doppelbestimmung und Nachextraktion kontrolliert.

Nach i.p.-Applikation von 500 µg/kg L365.260 lag die Plasmakonzentration der Substanz zwischen <50 und 225 ng/ml, wobei die höchsten Konzentrationen nach 20 Minuten gemessen wurden. Nach 10 Minuten wurden durchschnittlich 122,2 ng/ml, nach 20 Minuten 142,8 ng/ml und nach 30 Minuten nur noch 61,0 ng/ml gemessen. Die Gehalte an L365.260 im Gehirn wurden nach 20 Minuten bestimmt. Die Substanz war nachweisbar, aber ihr Gehalt nicht quantifizierbar, da die Konzentration unterhalb 50 ng/ml lag.

### **4.3.1 Zwischenergebnis L365.260-Konzentrationsbestimmung in Plasma und Gehirn**

Aus diesen Ergebnissen läßt sich ableiten, daß der CCK<sub>B</sub>-Rezeptor-Antagonist L365.260 bei den gewählten VBZ für die Dauer der Versuche in ausreichender Konzentration im Plasma vorhanden ist, um eine rezeptorvermittelte Wirkung zu gewährleisten.

## **4.4 Histologische Kontrolle der zentralen Applikationen**

### **4.4.1 Intracerebroventrikuläre Applikation**

Für die Versuche mit i.c.v.-Applikationen wurden 95 Ratten operativ vorbereitet. Von diesen Tieren mußte aus der Auswertung ein Tier (1,1 %) ausgeschlossen werden, da der rechte laterale Ventrikel nicht eindeutig getroffen war und die Substanzapplikation daher in eine benachbarte Struktur erfolgte. Ein Tier (1,1 %) schied aufgrund abnormen Verhaltens aus der Auswertung aus. Bei diesem Tier wurde nach Tötung und post mortem Untersuchung ein intracerebraler Infekt nachgewiesen.

### **4.4.2 Intrahippokampale Applikation**

Von den für die Versuche mit i.h.-Applikation operativ vorbereiteten 282 Ratten mußten von der statistischen Auswertung 25 Tiere ausgeschlossen werden.

Bei 11 Tieren war die hippokampale Struktur nur unilateral getroffen (siehe Punkt 3.9). 14 Tiere verstarben intra- bzw. postoperativ.

### **4.4.3 Zwischenergebnis der histologischen Kontrolle der zentralen Applikationen**

Die Ergebnisse belegen, daß mit den gewählten intracerebralen Applikationsarten die Zielstrukturen bei geringem experimentellen Aufwand zuverlässig mit Testsubstanz erreicht werden können.

## **4.5 Kontrolle der Vagotomie**

### **4.5.1 Subjektive Beurteilung der lebenden Tiere**

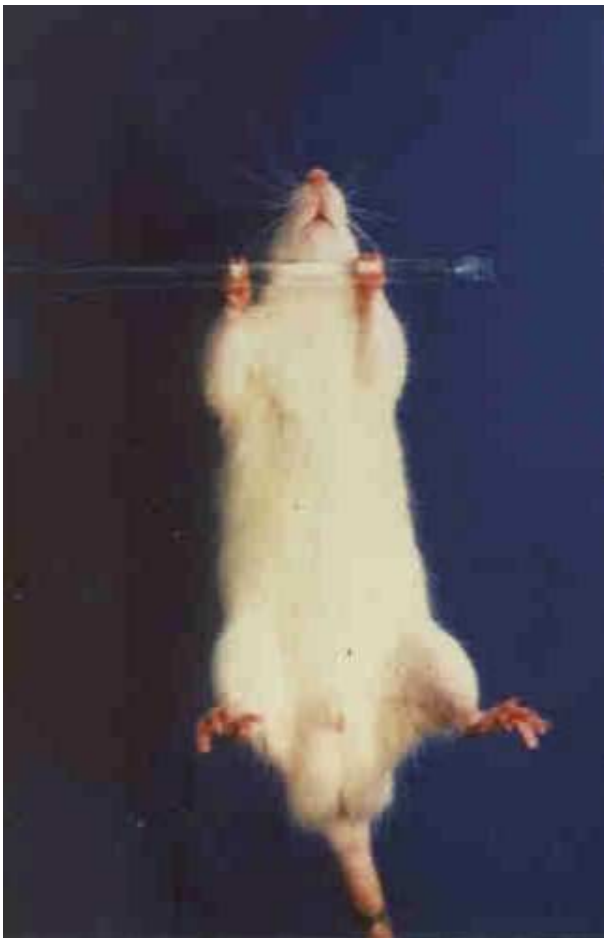
Die subjektive Beurteilung der Tiere erfolgte am 28. und 29. Tag post operationem an den Tieren, die am Fütterungsversuch teilgenommen haben. Dabei wurden die nach dem Zufallsprinzip ausgesuchten Tiere vom Untersucher allein aufgrund ihrer Körperform in vagotomierte und scheinvagotomierte Tiere eingeteilt.

Dabei wurden alle 32 scheinvagotomierte Tiere (100 %) eindeutig als scheinvagotomiert identifiziert. Von den 29 vagotomierten Tieren wurden 19 Tiere (65,5 %) als vagotomiert beurteilt. Die verbleibenden 10 Tiere (34,5 %) wurden dahingehend beurteilt, daß die Vagotomie

äußerlich nicht erkennbar bzw. nicht erfolgreich durchgeführt war (siehe Tab. I und II, Anhang A).

Von 19 makroskopisch positiv beurteilten Tieren wurde bei 17 Tieren (89,5 %) post mortem die Vagotomie als erfolgreich durchgeführt bestätigt. Bei den 10 Tieren, bei denen der Vagotomieerfolg negativ beurteilt worden war, bestätigte sich die Diagnose bei 8 Tieren (80 %). Betrachtet man die Beurteilung aller vagotomierten Tiere (100 %) wurden nur bei jeweils zwei Tieren eine falsch positive (6,9 %) bzw. eine falsch negative (6,9 %) Diagnose gestellt.

#### 4.5.2 Fotografische Beurteilung der lebenden Tiere



**Bild 4-1**

**Bild 4-2**

Die Bilder zeigen ein scheinvagotomiertes (NL 1/8) (Bild 4-1) und ein vagotomiertes Tier (L 1/9) (Bild 4-2) am 28. Tag post operationem an einem Glasstab hängend von ventral.

Bei dem vagotomierten Tier (Bild 4-2) sind starke laterale Ausbuchtungen der Bauchwand deutlich zu sehen, die bei dem scheinvagotomierten Tier (Bild 4-1) nicht sichtbar sind. Als Ursache für diese palpatorisch gut verschieblichen Ausbuchtungen konnte durch die Obduktion eine ektatische Magenblase identifiziert werden (siehe 4.5.6).

Eine metrische Auswertung der Bilder durch das Ausmessen der Körperbreite rechts und links von der Medianen brachte keine verwertbaren Ergebnisse, da die Tiere nicht immer exakt von

ventral erfaßt werden konnten. Schon leichte Drehungen der Tiere um die eigene Längsachse führten zu verfälschten Ergebnissen.

### 4.5.3 Vermessung der lebenden Tiere

Vergleicht man 4 Wochen post operationem die Ergebnisse der Vermessung von Körpergewicht (KGW), Körperlänge (KL), Körperumfang (KU) und Körperbreite (KB) der scheinvagotomierten (SV) und vagotomierten Tiere (V), so kann man signifikante Unterschiede feststellen (siehe Tab. 4-2).

Das mittlere Körpergewicht von lädierten Tieren liegt mit  $318 \pm 9,4$  Gramm (Gruppe V) signifikant ( $p < 0,01$ ) unter dem Gewicht der scheinvagotomierten Tiere mit  $355 \pm 7,0$  Gramm. Unterteilt man die Gruppe der lädierten Tiere aufgrund des Ergebnisses der Lupenkontrolle in Tiere, bei denen der Vagotomieerfolg bestätigt wurde (Gruppe V I), und Tiere, bei denen der Erfolg nicht mehr bestätigt werden konnte (Gruppe V II), so kann man feststellen, daß der signifikante Unterschied zwischen scheinvagotomierten Tieren und lädierten Tieren der Gruppe V I noch deutlicher ist ( $p < 0,01$ ), während zwischen den scheinvagotomierten Tieren und den Tieren der Gruppe V II der Unterschied nicht signifikant ist ( $p = 0,01$ ). Ebenso verhält es sich im Bezug auf die Parameter Körperlänge ( $p_{V I} = 0,01$ ,  $p_{V II} < 0,05$ ,  $p_{V II} < 0,05$ ), Körperumfang ( $p_{V I} < 0,01$ ,  $p_{V II} = 0,01$ ,  $p_{V II} = 0,09$ ), und Körperbreite ( $p_{V I} < 0,01$ ,  $p_{V II} < 0,01$ ,  $p_{V II} < 0,05$ ).

Bildet man die Relationen aus Körperumfang und Körpergewicht multipliziert mit dem Faktor 100, Körperlänge zu Körpergewicht multipliziert mit dem Faktor 100 und Körperbreite zu Körperlänge multipliziert mit dem Faktor 100, so stellt man fest, daß die Werte aller Gruppen (V, V I und V II) für die Relationen von Körperumfang und Körperlänge zum Körpergewicht verglichen mit den scheinvagotomierten Tieren signifikant ( $p < 0,05$ ) höher liegen außer dem erniedrigten Wert für die Relation von Körperbreite zu Körperlänge. Allerdings kann anhand der p-Werte eine absteigende Rangfolge von Gruppe V I über die gesamten lädierten Tiere (VL) zu der Gruppe V II aufgestellt werden. Auch bei der Relation KB zu KL multipliziert mit dem Faktor 100 ist ein signifikanter Unterschied festzustellen. Hier liegen die Werte der vagotomierten Tiere deutlich niedriger als die Werte der scheinvagotomierten Tiere. Somit wird deutlich, daß die Ergebnisse aus Versuchen mit vagotomierten Tieren eindeutiger werden, wenn die Versuchsergebnisse von Tieren, die nicht eindeutig vagotomiert wurden, bei der Auswertung nicht berücksichtigt werden. Der Unterschied zwischen scheinvagotomierten Tieren (SV) und vagotomierten Tieren (V) inklusive der Tiere, bei denen die Operation nicht eindeutig erfolgreich war, ist immer noch signifikant ( $p < 0,05$ ).

Gruppe (N)	KGW	KL	KU	KB	<u>KU * 100</u>	<u>KL * 100</u>	<u>KB * 100</u>
	[g]	[cm]	[cm]	[cm]	KGW	KGW	KL
<b>SV</b> <b>(32)</b>	355 ± 7,0 (272 - 462)	42,5 ± 0,4 (37,0 - 46,5)	17,7 ± 0,2 (15,7 - 20,5)	5,5 ± 0,1 (4,9 - 6,4)	5,1 ± 0,1 (4,0 - 6,0)	6,8 ± 0,1 (6,0 - 8,0)	23,1 ± 0,3 (21,0 - 25,0)
<b>V</b> <b>(29)</b>	318 ± 9,4 (272 - 462) (p<0,01)	41,1 ± 0,4 (36,3 - 45,1) (p=0,02)	19,1 ± 0,5 (15,7- 29,9) (p=0,011)	5,9 ± 0,1 (4,9 - 7,3) (p<0,05)	6,0 ± 0,2 (5,0 - 8,0) (p<0,05)	25,7 ± 0,6 (21,0- 34,0) (p<0,05)	7,4 ± 0,2 (6,0 - 11,0) (p<0,05)
<b>VI</b> <b>(19)</b>	311 ± 9,6 (220 - 386) (p<0,01)	40,7 ± 0,6 (36,3 - 44,8) (p<0,01)	19,3 ± 0,7 (15,7- 29,9) (p=0<0,05)	6,0 ± 0,1 (5,1 - 7,3) (p<0,05)	6,2 ± 0,2 (5,0 - 8,0) (p<0,05)	26,6 ± 0,8 (22,0 - 34,0) (p<0,05)	7,4 ± 0,2 (6,0 - 10,0) (p<0,05)
<b>VII</b> <b>(10)</b>	327 ± 25,0 (304 - 352) (p=0,18)	41,8 ± 0,5 (40,2 - 45,1) (p=0,72)	18,5 ± 0,5 (16,0 - 20,9) (p=0,678)	5,7 ± 0,2 (4,9 - 6,8) (p=0,057)	5,8 ± 0,3 (5,0 - 8,0) (p>0,05)	24,1 ± 0,9 (21,0 - 29,0) (p=0,39)	7,4 ± 0,4 (6,0 - 11,0) (p=0,64)

**Tab. 4-2** Körperparameter von scheinvagotomierten (SV) und vagotomierten (V) Tieren als Mittelwert ± SEM 4 Wochen nach der Operation sowie in Klammern die Spannweite der Meßwerte von Minimum bis Maximum. Die Gruppe der vagotomierten Tiere wurde zusätzlich aufgeteilt in Tiere bei denen der Vagotomieerfolg durch die Lupenkontrolle post mortem bestätigt (V I) bzw. nicht bestätigt wurde (V II). KGW: Körpergewicht, KL: Körperlänge bis Schwanzansatz, KU: Körperumfang, KB: Körperbreite sowie die Relationen von Körperumfang zu Körpergewicht (KU/KGW\*100), Körperlänge zu Körpergewicht (KL/KGW\*100) und Körperbreite zu Körperlänge (KB/KL\*100).

#### 4.5.4 Fütterungsversuch

Beim Fütterungsversuch 10 Wochen nach der Operation wurde bei den Tieren der Operationserfolg kontrolliert. Zur Beurteilung, ob die Vagotomie vollständig durchgeführt war, wurde das Gewicht der gefüllten Mägen der vagotomierten Tiere mit denen der scheinvagotomierten verglichen. Auch hier wurde die Gruppe der vagotomierten Tiere (V) auf der Grundlage der Lupenkontrolle in die Gruppen V I und V II unterteilt.

Vergleicht man post mortem das Gewicht der gefüllten Mägen, das Gewicht der entleerten Mägen, das Gewicht des Mageninhaltes und den prozentualen Anteil des Magengewichtes am Gesamtkörpergewicht von vagotomierten Tieren mit den Werten für die scheinvagotomierten Tiere, so erhält man für zwei Gruppen (V und V I) signifikant höhere Werte. Allerdings kann auch hier anhand der p-Werte eine Rangfolge aufgestellt werden, die derjenigen entspricht, die sich bei der Vermessung der Tiere (siehe Punkt 4.6.3.) ergab.

Somit erhält man post mortem auch hier eine Verfälschung der Ergebnisse, wenn die Tiere der Gruppe V II nicht aus der Auswertung herausgenommen werden.

<b>Gruppe (N)</b>	<b>KGW [g]</b>	<b>Magen voll [g]</b>	<b>Magen leer [g]</b>	<b>Mageninhalt [cm]</b>	<b>Magen voll [%]</b>
<b>SV (32)</b>	382 ± 10,0 (178 - 510)	7,4 ± 0,3 (4,0 - 11,0)	2,2 ± 0,08 (1,7 - 4,0)	5,2 ± 0,3 (1,9 - 8,5)	2,0 ± 0,10 (1,0 - 4,7)
<b>V (29)</b>	336 ± 10,5 (253 - 486) (p<0,01)	39,2 ± 5,7 (2,0 - 100,4) (p<0,01)	5,0 ± 0,4 (1,5 - 9,9) (p<0,01)	34,18 ± 5,3 (0,2 - 93,2) (p<0,01)	12,0 ± 1,8 (0,8 - 36,7) (p<0,01)
<b>VI (19)</b>	332 ± 12,3 (253 - 438) (p<0,01)	56,1 ± 5,5 (20,9 - 100,4) (p<0,01)	6,5 ± 0,3 (4,5 - 9,9) (p<0,01)	49,6 ± 5,3 (15,5 - 93,2) (p<0,01)	17,3 ± 1,9 (6,9 - 36,7) (p<0,01)
<b>VII (10)</b>	344 ± 20,3 (267 - 486) (p=0,079)	7,1 ± 0,7 (2,0 - 9,8) (p=0,66)	2,1 ± 0,1 (1,5 - 3,0) (p=0,78)	5,0 ± 0,7 (0,2 - 7,5) (p=0,72)	2,1 ± 0,2 (0,8 - 3,2) (p=0,82)

**Tab. 4-3** Körperparameter von scheinvagotomierten (SV) und vagotomierten (V) Tieren als Mittelwert ± SEM sowie in Klammern die Spannweite zwischen Minimum und Maximum der Meßergebnisse, die am Tötungstag 10 Wochen nach der Operation erhoben wurden. Die Gruppe der vagotomierten Tiere wurde zusätzlich aufgeteilt in Tiere, bei denen der Vagotomieerfolg durch die Lupenkontrolle post mortem bestätigt (V I) bzw. nicht bestätigt wurde (V II).  
KGW: Körpergewicht, Magen voll [g]: Gewicht des gefüllten Magens in Gramm, Magen leer: Gewicht des entleerten Magens, Mageninhalt: Gewicht des Mageninhaltes, Magen voll [%], prozentualer Anteil des gefüllten Magens am Gesamtkörpergewicht. Signifikante Unterschiede der einzelnen Werte zu den entsprechenden Werten der Gruppe der scheinvagotomierten Tiere (SL) sind in Klammern angegeben.

#### 4.5.5 Lupenkontrolle post mortem

Bei der Lupenkontrolle wurden am Tötungstag 10 Wochen post operationem alle Tiere untersucht. Dabei wurde folgendes Ergebnis erhoben. Alle scheinoperierten Tiere hatten einen intakten Nervus vagus. Von den anfänglich 32 noch verbliebenen 29 vagotomierten Tieren wurde bei 19 Tieren (65,5 %) die Vagotomie mit Hilfe der Lupenkontrolle bestätigt (Tab. 4-2, Gruppe V I). Bei 10 Tieren (34,5 %) wurden verbleibende bzw. wieder zusammengewachsene Äste des Nervus vagus gefunden (Tab. 4-2, Gruppe V II).

Vergleicht man diese Ergebnisse mit der makroskopischen Beurteilung (siehe Punkt 4.5.1), so stellt man fest, daß von 19 makroskopisch positiv beurteilten Tieren bei 17 Tieren (89,5 %) die Vagotomie bestätigt wurde. Bei 10 Tieren, bei denen der Vagotomieerfolg negativ beurteilt worden war, bestätigte sich die Diagnose bei 8 Tieren (80 %). Somit wurden bei jeweils zwei Tieren eine falsch positive (10,5 %) bzw. bei einem Tier eine falsch negative (20 %) Diagnose gestellt.

#### 4.5.6 Fotografische Darstellung des post mortem Befundes



**Bild 4-3** Post mortem Befund eines vagotomierten Tieres (links) und eines scheinvagotomierten Tieres (rechts) 10 Wochen nach der Operation. Deutlich sichtbar ist die ausgeprägte Dilatation des Magens des vagotomierten Tieres.



**Bild 4-4** Vergleichende Darstellung des post mortem Befundes der Mägen eines vagotomierten (L 2/10) und eines scheinvagotomierten Tieres (NL 1/1) 10 Wochen nach der Operation.



#### **4.5.7 Zwischenergebnis der Vagotomiekontrolle**

Die Daten zeigen, daß allein durch eine inspektorische Beurteilung der Versuchstiere die Erfolgskontrolle der Vagotomie mit hinreichend großer Spezifität und Sensitivität erfolgen kann. Alle zusätzlich überprüften Methoden liefern bei erhöhtem experimentellem Aufwand keine wesentliche Verbesserung der Beurteilungsergebnisse.



