

4. DISKUSSION

Pathogene Angstzustände stellen die häufigste Form psychischer Erkrankungen in der Bevölkerung dar, und die Entwicklung einer dauerhaften Therapie ist infolgedessen von besonderem Interesse. Die Erforschung der neurobiologischen Grundlagen, die zur Ausprägung von Angstsymptomatiken führen, nimmt daher einen bedeutenden Bereich in der Neuropharmakologie ein. Welche zentralen Mechanismen für die Entstehung von Angststörungen eine Rolle spielen, ist bis heute noch nicht ausreichend geklärt. Sicher aber ist, daß das GABAerge und das serotonerge Transmissionssystem einen sehr großen Anteil daran haben (Iversen, 1984; File, 1987) und beide Systeme eng miteinander verknüpft zu sein scheinen (Stein et al., 1973; López-Rubalcava et al., 1992).

Seit Anfang der 60er Jahre werden Benzodiazepine erfolgreich zur Behandlung von Angstzuständen eingesetzt. Auf Grund ihrer zahlreichen Nebenwirkungen ist es notwendig geworden, neue Substanzen zu entwickeln, die rein anxiolytisch wirken. Diese Entwicklung, insbesondere von serotonerg wirksamen Pharmaka, wird dadurch erschwert, daß in den einzelnen tierexperimentellen Labors von sehr gegensätzlichen Wirkungen berichtet wird. Die im Tiermodell häufig untersuchten 5-HT_{1A}-Agonisten, Buspiron und 8-OH-DPAT, lösten anxiolytische und anxiogene Effekte aus oder waren sogar wirkungslos (Griebel, 1995; Handley und McBlane, 1993). Die Begründungen dafür sind sehr vielfältig: So haben Alter, Geschlecht oder die Wahl des Stammes der verwendeten Versuchstiere einen großen Einfluß auf das Angstverhalten sowie die Wirkung von Anxiolytika bzw. anxiogen wirksamen Pharmaka (Rodgers und Cole, 1994). Ebenso können die Art der Applikation oder die verabreichte Dosis für unterschiedliche Effekte einer Substanz verantwortlich sein (Griebel, 1995).

Viele Untersuchungen befassen sich mit dem Einfluß von Stammes- bzw. Zuchtlinienunterschieden auf das Angstverhalten von Ratten oder Mäusen. Die meisten beschäftigen sich mit dem Verhalten von Inzuchtlinien (z.B. Trullas und Skolnick, 1993; Ramos et al., 1997; Chaouloff et al., 1995) oder von speziellen Züchtungen (z.B. Gentsch et al., 1988; Gonzalez et al., 1998; Kulikov et al., 1997), wenige gehen auf das Verhalten von Auszuchtlinien ein (z.B. Onaivi et al., 1992; Rex et al., 1996, 1999).

Ratten-Auszuchtlinien sind dennoch von besonderem Interesse, weil sie, wie z.B. Wistar-Ratten, häufig für pharmakologische Untersuchungen verwendet werden. Man geht davon aus, daß sie durch ihre hohe genetische Variabilität keine besondere Merkmalsausprägung

besitzen und daher in Verhaltensversuchen ähnlich reagieren. Es konnte allerdings festgestellt werden, daß sich auch Auszuchtlinien in verschiedenen Verhaltenstests unterscheiden (Onaivi et al., 1992; Acri et al., 1995; Rex et al., 1996). Andere Untersuchungen konnten sogar zeigen, daß es unterschiedliche Reaktionen von Auszuchtlinien auf die Gabe von Psychopharmaka gibt (Porsolt et al., 1978; Onaivi et al., 1992). So besteht die Möglichkeit, daß die widersprüchlichen Aussagen der verschiedenen Labors über die Wirkung einer neu entwickelten Substanz ihren Ursprung in der Verwendung unterschiedlicher Stämme oder Zuchtlinien hat.

Zu Beginn der vorliegenden Arbeit sollte daher zunächst anhand von drei Ratten-Zuchtlinien untersucht werden, inwiefern Aufzuchtbedingungen das Angstverhalten beeinflussen.

In einer weiteren Untersuchung wurde geprüft, ob sich das grundlegende Angstverhalten von zwei Rattenstämmen und einer Zuchtlinie unterscheidet und welche Reaktionen die Gabe von drei Anxiolytika bei diesen Tieren hervorruft.

Unter Verwendung von Diazepam wurde untersucht, inwiefern sich die drei Versuchsgruppen im Metabolismus dieser Substanz unterscheiden.

In der abschließenden Untersuchung sollte aufgeklärt werden, ob es Unterschiede in den Serotoningehalten im Gehirn der drei Versuchsgruppen gibt.

4.1. Verhaltenspharmakologische Untersuchungen

Da mehrere Autoren davon ausgehen, daß die einzelnen Verhaltenstests unterschiedliche Formen der Angst repräsentieren und auch die Wirkung einer Substanz von der Art des Tests abhängig ist (Lister, 1990; Handley und McBlane, 1993; Griebel, 1995; Treit und Menard, 1998; Menard und Treit, 1999), wurden für die verhaltenspharmakologischen Untersuchungen drei Tiermodelle der Angst ausgewählt.

Der Elevated plus maze-Test, der Black and white box-Test und der Open field-Test sind viel genutzte und breit angewendete Angstmodelle, die ausreichend pharmakologisch validiert worden sind. Zudem ermöglichen diese Tests, sowohl anxiolytische als auch anxiogene Wirkungen einer Substanz zu erfassen (Pellow et al., 1985; Crawley und Goodwin, 1980; Rex et al., 1998).

4.1.1. Einfluß der Aufzuchtbedingungen

Aus den Studien von Rex und Mitarbeitern (1996) war bekannt, daß sich das Angstverhalten von verschiedenen Ratten-Auszuchtlinien, in diesem Fall drei Wistar-Zuchtlinien, unterscheidet. Um festzustellen, inwiefern diese Unterschiede auch bei Inzuchtlinien auftreten, wurden in der vorliegenden Arbeit drei Fischer-Zuchtlinien untersucht. Zusätzlich sollte überprüft werden, ob die Unterschiede im Angstverhalten durch verschiedene Aufzuchtbedingungen verursacht werden oder ob ein unterschiedlicher genetischer Hintergrund dafür verantwortlich ist. Da die gesamten Fischer-Ratten auf eine Zuchtlinie (Linie 344, begründet 1920 durch M.R. Curtis) zurückzuführen sind, müßten sie alle das gleiche Erbgut und somit auch ein ähnliches Verhalten besitzen.

Die Ergebnisse zeigten, daß sich sowohl die gekauften als auch die selbst aufgezogenen Fischer-Ratten untereinander in ihrem Angstverhalten unterscheiden. Dabei treten die Unterschiede nicht konstant in allen drei Tests auf. Bei den gekauften Tieren sind die Fischer/Winkelmann-Ratten im Vergleich zu den beiden anderen Zuchtlinien weniger ängstlich (siehe Black and white box- und modifizierter Open field-Test). Bei den selbst aufgezogenen Tieren fallen die Fischer/Charles River-Ratten durch ihr, verglichen mit den Fischer/Winkelmann- und Fischer/Schönwalde-Ratten, ängstlicheres Verhalten auf: So sind im Elevated plus maze-Test 8 von 11 Tieren von der Apparatur gefallen und in den anderen beiden Tests zeigen sie eine verminderte motorische Aktivität. Im Verhältnis zu den beiden anderen Zuchtlinien verhalten sich die selbst aufgezogenen Fischer/Schönwalde-Ratten nur im Open field-Test weniger ängstlich.

Zusätzlich scheint es, daß im Vergleich zu den gekauften Tieren die in unserem Tierstall aufgezogenen Fischer/Winkelmann- und Fischer/Charles River-Ratten durch unsere Aufzuchtbedingungen ängstlicher (siehe Black and white box-Test), die Fischer/Schönwalde-Ratten dagegen weniger ängstlich (siehe modifizierten Open field-Test) wurden. Auch wenn die Unterschiede im Angstverhalten zwischen den gekauften und selbst aufgezogenen Tieren in nur jeweils einem Test sichtbar sind, dürfen sie nicht vernachlässigt werden. Zudem geben sie einen Hinweis darauf, daß das Verhalten durch die Aufzuchtbedingungen in den einzelnen Angsttests unterschiedlich beeinflusst werden kann.

Es gibt leider kaum Untersuchungen, die sich mit den Einflüssen der Aufzuchtbedingungen auf das Angstverhalten befassen. Rex und Mitarbeiter (1996) vermuteten, daß die

Unterschiede, die sie im Verhalten von verschiedenen Wistar-Zuchtlinien gefunden hatten, auch auf die verschiedenen Zuchtbedingungen zurückgeführt werden können.

Eine Nachforschung unsererseits bei den drei Tierzüchtern konnte bestätigen, daß tatsächlich Unterschiede in den Aufzuchtbedingungen bestehen. Ein besonderes Augenmerk lag dabei auf der Art des Handlings der Tiere, da aus vielen Untersuchungen bekannt ist, daß vermehrtes Handling zu einer reduzierten Angst im Verhaltenstest führt (Andrews und File, 1993; Schmitt und Hiemke, 1998). Schmitt und Hiemke (1998) konnten ebenfalls eine unterschiedliche Auswirkung des Handlings auf verschiedene Rattenstämme feststellen. Die Aufzuchtbedingungen von Winkelmann und Charles River sind sich sehr ähnlich: Die Tiere werden nur durch Umgreifen des ganzen Körpers gefaßt. Zweimal in der Woche werden sie in frische Käfige umgesetzt und einmal pro Woche gewogen, d.h. sie erfahren relativ häufig menschlichen Kontakt. Aufzuchttiere in Schönwalde werden dagegen weniger gehandelt, d.h. nur einmal in der Woche umgesetzt und nur bei Bedarf gewogen. Das Anfassen der Tiere erfolgt entweder durch Umgreifen des Körpers oder durch Greifen des Tieres am Schwanzansatz. Unsere Haltungsbedingungen entsprechen in etwa denen von Winkelmann und Charles River, d.h. zweimal in der Woche werden die Tiere durch Umgreifen des Körpers umgesetzt. Der einzige Unterschied besteht darin, daß die Gewichtskontrolle bei unseren Tieren nur einmal vor dem Versuchsbeginn erfolgt.

Das geringere Handling wäre eine Erklärung für das ängstliche Verhalten der gekauften Fischer/Schönwalde-Ratten im Vergleich zu den unter unseren Bedingungen aufgezogenen Tieren. Die Fischer/Winkelmann- und die Fischer/Charles River-Ratten reagierten dagegen sensibler auf unsere Aufzuchtbedingungen, da bei uns das wöchentliche Wiegen der Tiere entfallen ist.

Die drei selbst aufgezogenen Fischer-Zuchtlinien differieren sowohl im Angstverhalten als auch in der motorischen Aktivität. Da bei diesen Tieren Unterschiede in der Aufzucht ausgeschlossen werden können, ist es wahrscheinlich, daß die drei Fischer-Zuchtlinien einen unterschiedlichen genetischen Hintergrund besitzen und sich Sublinien gebildet haben.

Eine Sublinienbildung ist eine Gruppe von Tieren, die innerhalb einer Zuchtlinie genetisch einheitlicher ist als die gesamte Zuchtlinie. Ein unterschiedliches Verhalten von verschiedenen Zuchtlinien ist vermehrt bei Auszuchtlinien festgestellt worden (z.B. Porsolt et al., 1978; van der Staay und Blokland, 1996) und weniger bei Inzuchtlinien (z.B. Overstreet und Rezvani, 1996). Neben einem unterschiedlichen Verhalten sind auch Unterschiede in der Aktivität der Leberenzyme (van der Laan et al., 1993) oder in der Empfindlichkeit gegenüber

Psychopharmaka, wie z.B. die unterschiedliche Wirkung von Imipramin bei zwei verschiedenen Wistarzuchtlinien (Porsolt et al., 1978), bekannt.

Insgesamt weisen diese Ergebnisse darauf hin, daß die Aufzuchtbedingungen einen nicht zu unterschätzenden Einfluß sowohl auf das Angstverhalten als auch auf die Lokomotion der untersuchten Fischer-Zuchtlinien haben. Es besteht zudem die Möglichkeit, daß sich durch den hohen Inzuchtgrad bei den verschiedenen Züchtern über Jahre hinweg Sublinien gebildet haben, die ein unterschiedliches Verhaltensmuster zeigen.

4.1.2. Vergleich der Kontrollgruppen

Obwohl aus den unter 4.1.1. aufgeführten Ergebnissen bekannt war, daß die Aufzuchtbedingungen eine wichtige Rolle für die Ausprägung des Angstverhaltens von Ratten spielen, war es auf Grund der hohen Tierzahl und der geringen Kapazität des institutseigenen Tierstalls nicht möglich, die Tiere für die folgenden Untersuchungen selbst aufzuziehen. Außerdem entspricht der direkte Bezug der Tiere vom Züchter der normalen Vorgehensweise in Forschungsinstituten. Für die Untersuchungen wählten wir Wistar-Ratten von Winkelmann aus, da dieser Rattenstamm der Standardstamm ist, der in unseren Labors verwendet wird. Als weiterer Stamm wurden Fischer-Ratten vom selben Züchter untersucht, um hier die gleichen Aufzuchtbedingungen garantieren zu können. Wistar-Ratten, wie auch Fischer-Ratten, werden routinemäßig in vielen verschiedenen Bereichen verwendet (siehe van der Laan et al., 1991; Griebel, 1995). Jedoch wird häufig in den Veröffentlichungen versäumt, die Bezugsquelle der Tiere anzugeben. Wistar-Ratten zählen zu den Auszuchtstämmen, die auf einer breiten genetischen Basis angelegt sind. Dennoch besteht die Möglichkeit, daß sie im Spontanverhalten variieren und unterschiedlich auf die Gabe von Psychopharmaka reagieren können. Daher wählten wir eine zweite Wistar-Zuchtlinie (Wistar-Ratten vom BgVV) für unsere Experimente aus.

Der Vergleich der Gruppen, die bei den pharmakologischen Untersuchungen als Kontrolle dienten, zeigt deutliche Unterschiede im Angstverhalten sowohl zwischen den Stämmen als auch zwischen den Zuchtlinien. Die Unterschiede treten konstant in allen drei Angstmodellen auf: Die Wistar/Winkelmann-Ratten zeigen im Elevated plus maze-, im Black and white box- und im modifizierten Open field-Test im Vergleich zu den Fischer/Winkelmann-Ratten und

den Wistar/BgVV-Ratten ein deutlich angstloseres Verhalten. Die Fischer/Winkelmann- und Wistar/BgVV-Ratten dagegen unterscheiden sich kaum voneinander. Nur im Black and white box-Test reagieren die Wistar/BgVV-Ratten noch ängstlicher als die Fischer/Winkelmann-Ratten.

Bis auf den modifizierten Open field-Test konnten kaum Unterschiede in der motorischen Aktivität der Tiere festgestellt werden. In diesem Test waren vor allem die Fischer/Winkelmann-Ratten wenig aktiv. Im Elevated plus maze-Test und Black and white box-Test zeigten sie jedoch keine Unterschiede in der zurückgelegten Distanz. Die verminderte Lokomotion der Fischer/Winkelmann-Ratten im modifizierten Open field-Test ist daher auf das verringerte Explorations- und somit auch Angstverhalten zurückzuführen.

Das ängstliche Verhalten der Fischer-Ratten wird von anderen Studien bestätigt. So betraten sie im Elevated plus maze-Test kein einziges Mal die offenen Arme (Chaouloff et al., 1995) oder reagierten auf milden Streß, erzeugt durch eine neue Umgebung, mit einer erhöhten ‚Emotionalität‘ (Stöhr et al., 1998). Ebenso konnten van der Staay und Blokland (1996) bei den Fischer-Ratten eine geringe motorische Aktivität im Open field-Test und im Light avoidance or dark preference-Test zeigen.

Vergleicht man die von Onaivi und Mitarbeitern (1992) untersuchten Wistar-Ratten mit den Fischer-Ratten von Chaouloff und Mitarbeitern (1995), so sind die Fischer-Ratten im Elevated plus maze-Test deutlich ängstlicher. Aciri und Mitarbeiter (1995) konnten Wistar-Ratten im Vergleich zu zwei weiteren Auszuchtstämmen im Acoustic startle response-Test eine deutlich höhere Amplitude nachweisen, was ebenfalls für ein geringere Ängstlichkeit dieses Rattenstammes spricht.

Viele Untersucher konnten Unterschiede im Angstverhalten zwischen verschiedenen Rattenstämmen nachweisen (z.B. Ramos et al., 1997; Gonzales et al., 1998; Onaivi et al., 1992), nur wenige führten jedoch einen direkten Vergleich zwischen Wistar- und Fischer-Ratten durch. Ramos und Mitarbeiter (1997) konnten beispielsweise keine Unterschiede im Angstverhalten zwischen Fischer- und Wistar-Ratten beobachten. Da die von ihnen verwendeten Wistar-Kyoto-Ratten als Inzuchtstamm für ihr streßanfälliges Verhalten bekannt sind (Gilad und Shiller, 1989) ist dies auch nicht weiter verwunderlich. Van der Staay und Blokland (1996) konnten ebenfalls keine signifikanten Unterschiede im Angstverhalten von Fischer- und Wistar-Ratten feststellen. Diese Ergebnisse sind mit den unsrigen nicht direkt vergleichbar, weil die von ihnen verwendeten Tiere vor dem eigentlichen Angsttest schon mehrere andere Verhaltensversuche durchlaufen hatten (vorangegangene Verhaltenstests

reduzieren das Angstverhalten, siehe Pellow et al., 1985) und sie im Vergleich zu unseren Tieren ein wesentlich höheres Alter zum Zeitpunkt des Versuches besaßen.

Im Einklang mit den vorliegenden Ergebnissen stehen die Arbeiten von Rex und Mitarbeitern (1996, 1999). Hier wiesen die Fischer-Ratten in mehreren Verhaltenstests ein deutlich ängstlicheres Verhalten auf als die Wistar-Ratten.

Daß auch Unterschiede im Verhalten von verschiedenen Ratten-Zuchtlinien bestehen können, wird durch die Untersuchung von Overstreet und Rezvani (1996) bestätigt. Sie stellten bei Fawn Hooded-Ratten, die von zwei verschiedenen Züchtern bezogen worden sind, ein unterschiedliches Verhalten fest. Ebenso ist von verschiedenen Wistar-Zuchtlinien bekannt, daß sie Unterschiede im Angstverhalten aufweisen (van der Laan et al., 1991; Rex et al., 1996).

4.1.3. Wirkung von Diazepam

Die anxiolytische Wirkung von Diazepam ist unumstritten. Diazepam wird seit den 60er Jahren erfolgreich zur Behandlung von Angstzuständen beim Menschen eingesetzt und gilt neben anderen Benzodiazepinen als Mittel der Wahl (Hollister, 1978). Die bei der vorliegenden Arbeit verwendeten Angstmodelle sind alle unter Zuhilfenahme von Diazepam validiert worden (Pellow et al., 1985; Costall et al., 1989; Bodnoff et al., 1989; Rex et al., 1998). Die Dosierung von Diazepam, um nach akuter Gabe eine anxiolytische Wirkung zu erzielen, reichte bei Ratten von 1,0 bis 2,5 mg/kg.

Bei der vorliegenden Untersuchung zum Einfluß von Diazepam auf das Angstverhalten von verschiedenen Rattenstämmen bzw. -zuchtlinien ergab sich ein unerwartetes Ergebnis: Bei den Fischer/Winkelmann-Ratten, die ein sehr ängstliches „Ausgangsverhalten“ hatten, konnte Diazepam schon in niedriger Dosis (0,5 mg/kg) in zwei der verwendeten Tests, Elevated plus maze- und modifizierten Open field-Test, eine deutliche Anxiolyse auslösen, im dritten Test (Black and white box-Test) war zumindest eine Tendenz nachzuweisen. Bei den wenig ängstlichen Wistar/Winkelmann-Ratten wirkte Diazepam in keinem der drei Verhaltenstests, auch nicht in einer höheren Dosierung (bis 4,0 mg/kg), anxiolytisch. Dagegen hatte Diazepam bei diesen Tieren einen Einfluß auf die motorische Aktivität, insbesondere auf die Rearings. Bei den ebenfalls ängstlichen Wistar/BgVV-Ratten war im Elevated plus maze-Test nach Gabe von Diazepam nur eine Tendenz zur Anxiolyse zu beobachten, die im modifizierten Open field-Test bestätigt wurde.

Bisher wurde von verschiedenen Mäusestämmen berichtet, daß sie unterschiedlich stark auf die Gabe von Benzodiazepinen ansprechen. Mäuse, die z.B. im Black and white box-Test eine höhere Ausgangsexploration zeigten, reagierten weniger empfindlich auf die Gabe von Benzodiazepinen (Crawley und Davis, 1982). Berichte über die pharmakologische Wirkung in verschiedenen Rattenstämmen beschränken sich auf spezielle Inzuchtlinien, wie Maudsley reactive- und non-reactive-Ratten (Commissaris et al., 1990). Diese Inzuchtlinien sind schon selektiv auf Unterschiede im Angstverhalten gezüchtet worden und zeichnen sich auch durch eine unterschiedliche Benzodiazepinbindung aus (Robertson et al., 1978). Ein vergleichender Überblick über die Wirkung der Benzodiazepine in verschiedenen Tierexperimenten weist sie als eindeutig anxiolytisch aus (Hogg, 1996). Eine mögliche Erklärung dafür, daß Diazepam dennoch bei den Wistar/Winkelmann-Ratten keinen anxiolytischen Effekt auslöste, ist, daß durch ihr wenig ängstliches „Ausgangsverhalten“ keine weitere Anxiolyse mehr erzielt werden konnte („Ceiling-Effekt“).

Im Widerspruch dazu steht die Arbeit von Ramos und Mitarbeitern (1997). Sie zeigten, daß Diazepam bei zwei Rattenstämmen, die ein signifikant unterschiedliches „Ausgangs-Angstverhalten“ hatten, sowohl bei den ängstlichen als auch bei den wenig ängstlichen Tieren eine anxiolytische Wirkung erzielte.

Andere Studien konnten dagegen bestätigen, daß sich eine Substanzgabe unterschiedlich bei verschiedenen Rattenstämmen, aber auch Zuchtlinien auswirken kann. Porsolt und Mitarbeiter (1978) konnten nachweisen, daß Imipramin, ein Antidepressivum, bei bestimmten Wistar-Ratten keine Wirkung hervorrief, wohingegen die Substanz bei einer weiteren Wistar-Zuchtlinie sowie bei zwei Sprague Dawley-Zuchtlinien deutliche Effekte zeigte. Onaivi und Mitarbeiter (1992) untersuchten die Wirkung des Benzodiazepins Flunitrazepam an drei Auszucht-Rattenstämmen. Dabei konnten sie feststellen, daß ein Rattenstamm, Long Evans hooded, eine höhere Sensibilität für Flunitrazepam im Vergleich zu den ebenfalls untersuchten Wistar- und Sprague Dawley-Ratten besaß.

Ebenfalls in Übereinstimmung mit unseren Versuchen stehen die Ergebnisse von van der Laan und Mitarbeitern (1991). Sie untersuchten zwei Wistar-Zuchtlinien auf Unterschiede in der Plasmakonzentration von Kortikosteron nach mildem Streß, d.h. die Reaktion der Tiere auf eine neue Umgebung, und in der Wirkung von Desmethyldiazepam, einem Metaboliten von Diazepam. Der Anstieg von Kortikosteron nach Streß kann als Zeichen vermehrter Angst gewertet werden und wird durch die Gabe von Anxiolytika unterdrückt. Die Kortikosteronkonzentrationen waren bei den zwei Wistar-Zuchtlinien sowohl bei den

unbehandelten Tieren als auch nach Substanzgabe unterschiedlich hoch. Zudem hielt der sedative Effekt von Desmethyldiazepam bei den beiden Zuchtlinien unterschiedlich lange an.

Insgesamt lassen die vorliegenden Ergebnisse die Annahme zu, daß

1. das unterschiedliche „Ausgangsverhalten“ der untersuchten Rattenstämme bzw. -zuchtlinien die Wirkung von Diazepam beeinflusst,
2. Unterschiede im Metabolismus von Diazepam die Ursache für die verschiedenen Effekte bei den Wistar- und Fischer-Ratten sind und daß
3. eine unterschiedliche Dichte der Benzodiazepinrezeptoren vorliegen könnte. Dies stützt sich auf Studien an speziellen Inzuchtlinien, wie z.B. Roman high und low avoidance- oder Maudsley reactive- und non-reactive-Ratten, die sich sowohl in ihrem Angstverhalten als auch in der Bindung von Benzodiazepinen unterscheiden (Gentsch et al., 1988; Robertson et al., 1978; Shephard et al., 1982). Auszuchtlinien wurden in dieser Hinsicht nur wenig untersucht (z.B. Onaivi et al., 1992). Es bleibt zukünftigen Untersuchungen vorbehalten, dies bei den in der vorliegenden Arbeit verwendeten Rattenstämmen bzw. -zuchtlinien genauer zu analysieren.
4. Außerdem kann vermutet werden, daß auch die Aktivitäten von zentralen Transmissionssystemen die Ausprägung des Angstverhaltens unterschiedlich beeinflussen. Da bekannt ist, daß Diazepam die Freisetzung von 5-HT im Gehirn senkt (Rex et al., 1993), könnten Unterschiede im serotonergen Transmissionssystem dazu führen, daß sich die Gabe von Diazepam auf das Angstverhalten der Wistar- und Fischer-Ratten unterschiedlich auswirkt.

Die Tatsache, daß Diazepam nicht in allen Verhaltenstests die gleiche Wirkung entfaltete, unterstützt die Meinung, daß die verschiedenen Angstmodelle unterschiedliche Formen der Angst beschreiben (Lister, 1990; Handley und McBlane, 1993; Griebel, 1995; Treit und Menard, 1998; und Menard und Treit, 1999) und weist darauf hin, daß zur Charakterisierung der Wirkung einer Substanz immer mehrere tierexperimentelle Verhaltenstests durchgeführt werden sollten.

4.1.4. Wirkung von 8-OH-DPAT

Der 5-HT_{1A}-Agonist 8-OH-DPAT erzielte weder bei den beiden Wistar-Zuchtlinien noch bei den Fischer-Ratten einen angstmodulierenden Effekt. Bei den Fischer/Winkelmann-Ratten könnte im Black and white box-Test eine geringe anxiogene Wirkung vermutet werden, weil 8-OH-DPAT in der höchsten Dosis einen ethologischen Parameter signifikant beeinflusste. Da dies aber bei keinem weiteren Parameter beobachtet wurde, ist dieser Befund eher als zufällig anzusehen. Insgesamt kann 8-OH-DPAT daher bei den untersuchten Tieren in allen drei Verhaltenstests als wirkungslos eingeschätzt werden. Im Gegensatz dazu hatte 8-OH-DPAT einen Einfluß auf die Lokomotion: Bei den Fischer/Winkelmann- und Wistar/BgVV-Tieren konnte eine geringe Steigerung der motorischen Aktivität festgestellt werden, wogegen 8-OH-DPAT bei den Wistar/Winkelmann-Ratten eher die Tendenz hatte, die Lokomotion zu senken.

Die Wirkungen von 8-OH-DPAT auf das Angstverhalten beim Tier sind in der Literatur sehr umstritten. Auf Grund der klinischen Erfahrung wird von einem 5-HT_{1A}-Agonisten erwartet, daß er anxiolytisch wirkt, es konnten aber auch anxiogene bzw. gar keine Effekte festgestellt werden (Griebel, 1995; Menard und Treit, 1999). Insgesamt überwiegt die anxiolytische Wirkung sowohl nach systemischer als auch nach intrazerebraler Applikation. Anxiogene und keine Wirkung sind fast gleichmäßig vertreten. Interessanterweise sind anxiogene Effekte vermehrt im Elevated plus maze-Test zu finden (Griebel, 1995).

Daß 8-OH-DPAT in unserem Versuch gar keine Wirkung zeigt, ist möglicherweise ein Hinweis darauf, daß das Design der verwendeten Tests für die Wirkungen von 5-HT_{1A}-Agonisten nicht geeignet ist, oder daß diese Angstmodelle ein Angstverhalten repräsentieren, welches von 8-OH-DPAT nicht beeinflusst wird. Dies wird durch die Tatsache gestützt, daß fast alle tierexperimentellen Angsttests mit Hilfe der Benzodiazepine entwickelt und validiert wurden. Somit können sie für andersartige Substanzen, wie die 5-HT-modulierenden Pharmaka, unempfindlicher sein (File, 1987; Rodgers und Cole, 1994; Rodgers, 1997; Menard und Treit, 1998). Ebenso wird von mehreren Wissenschaftlern diskutiert, daß die einzelnen Angstmodelle verschiedene Formen der Angst darstellen (Lister 1990; Handley et al., 1993; Treit und Menard, 1998). Beispielsweise wird angenommen, daß die soziale Phobie eher durch den Social interaction-Test und die Acrophobie eher durch den Elevated plus maze-Test reflektiert wird (Treit und Menard, 1998).

In einer weiteren Studie wird vermutet, daß postsynaptische 5-HT_{1A}-Rezeptoren die anxiolytischen Effekte im Social interaction-Test, aber nicht im Elevated plus maze-Test, vermitteln (Gonzalez et al., 1998). Handley und McBlane (1993) konnten beobachten, daß 8-OH-DPAT im Elevated plus maze-Test sowohl anxiolytisch als auch anxiogen wirkte und der jeweilige Effekt von Lichtverhältnissen abhängig war.

Inzwischen ist bekannt, daß 8-OH-DPAT kein reiner 5-HT_{1A}-Agonist ist, sondern auch agonistisch am 5-HT₇-Rezeptor wirkt (Plassat et al., 1993) und auch eine Affinität zum D₂-Rezeptor besitzt (Arborelius et al., 1993). So wäre es möglich, daß 8-OH-DPAT über diese Rezeptoren weitere, die Psychomotorik beeinflussende Wirkungen besitzt, die wiederum das Angstverhalten im Test beeinflussen können.

Unsere Ergebnisse legen die Vermutung nahe, daß die drei verwendeten Verhaltenstests unter unseren Versuchsbedingungen mit unseren Ratten unempfindlich für die Effekte von 8-OH-DPAT sind und somit auch falsch negative Ergebnisse denkbar sind. Weiterhin sind sie eine Bestätigung dafür, daß die in diesen Verhaltenstests nachgestellten Angstformen nicht allein über 5-HT_{1A}-Rezeptor-Mechanismen beeinflußt werden, sondern auch andere Mechanismen, wie das GABAerge System, eine große Rolle spielen.

4.1.5. Wirkung von Ritanserin

Die Wirkung von Ritanserin wurde nur im Elevated plus maze-Test geprüft. Hierbei zeigte Ritanserin weder angstmodulierende Effekte, noch konnte es die motorische Aktivität beeinflussen.

Im Widerspruch zu diesen Ergebnissen steht eine Untersuchung von Meert und Janssen (1989), die für Ritanserin im Elevated plus maze-Test sogar eine noch stärkere anxiolytische Wirkung nachwies als für das Benzodiazepin Chlordiazepoxid. Eine Studie von Setem und Mitarbeitern (1999), die zwei weitere 5-HT₂-Agonisten im selben Angstmodell testeten, konnten sowohl anxiogene als auch keine Effekte auf das Angstverhalten finden. Bei einem Überblick der Literatur sind alle möglichen Wirkungen von Ritanserin vertreten, unabhängig vom verwendeten Verhaltenstest (Griebel, 1995; Rodgers und Cole, 1994; Handley und McBlane; 1993).

Auch dieses Ergebnis gibt einen möglichen Hinweis darauf, daß der Elevated plus maze-Test eine Form der Angst wiedergibt, die nicht von allen 5-HT-Rezeptorsubtypen reguliert wird (Gonzalez et al., 1998) und daß alle zuvor erwähnten äußeren und inneren Variablen einen Einfluß auf das Versuchsergebnis haben.

4.2. Analytische Untersuchungen

4.2.1. Bestimmung der Plasmakonzentrationen von Diazepam und drei seiner Metaboliten

Die unterschiedliche Wirkung von Diazepam in den Verhaltenstests veranlaßte dazu, sich näher mit der Elimination dieser Substanz zu befassen. Da die Metaboliten von Diazepam ebenfalls pharmakologisch aktiv sind, wurden die Plasmakonzentrationen von Diazepam, N-Desmethyldiazepam, Temazepam und Oxazepam nach einer von Azzam und Mitarbeitern (1998) adaptierten Methode bestimmt. Ziel dieser Untersuchung war, die Plasmaspiegel der oben aufgeführten Substanzen zum Zeitpunkt der Verhaltensversuche zu bestimmen und festzustellen, ob sich die drei Versuchsgruppen hierin unterscheiden.

Die Ergebnisse zeigen deutliche Unterschiede zwischen den beiden Rattenstämmen Fischer und Wistar. So sind die Konzentrationen aller gemessenen Substanzen bei den Fischer/Winkelmann-Ratten gegenüber den beiden Wistar-Zuchtlinien signifikant erhöht. Die beiden Wistar-Zuchtlinien unterscheiden sich jedoch nicht voneinander.

Diese Unterschiede deuten darauf hin, daß Diazepam von den Fischer/Winkelmann-Ratten sehr viel langsamer metabolisiert wird. Speziesunterschiede im Abbau von Diazepam sind schon seit längerem bekannt, so sind beispielsweise die Konzentrationen von N-Desmethyldiazepam bei Mäusen im Vergleich zu Ratten wesentlich höher und länger vorhanden (Schwartz et al., 1965; Marcucci et al., 1970; Klotz et al., 1976). Es gibt aber nur wenige Untersuchungen, die sich mit dem Metabolismus von Benzodiazepinen bei verschiedenen Rattenstämmen befassen: Van der Laan und Mitarbeiter (1993) untersuchten die Pharmakokinetik von N-Desmethyldiazepam bei drei verschiedenen Wistar-Zuchtlinien. Sie stellten fest, daß eine Zuchtlinie (CrI:[Wi]BR) durch ihre schnelle Eliminationszeit von N-Desmethyldiazepam auffiel. In einer früheren Arbeit konnten sie nachweisen, daß sich

dieser Rattenstamm zudem durch eine geringere Reaktion gegenüber mildem Streß auszeichnet (van der Laan et al., 1991).

Das regulierende Enzym beim Abbau von Diazepam und seiner Metaboliten ist das Cytochrom P450 (Klotz, 1987). Eine unterschiedliche Aktivität dieses Enzyms sowie genetische Polymorphismen können der Grund für einen variablen Arzneimittelstoffwechsel sein (van der Laan et al., 1993). Da solche Unterschiede bei verschiedenen Rattenstämmen bekannt sind (Koster et al., 1989; van der Laan et al., 1993; Ikegwuonu et al., 1996; Larsen et al., 1994), wäre dies auch die mögliche Erklärung für die verschiedenen Plasmakonzentrationen von Diazepam und seiner Metaboliten bei den Fischer- und Wistar-Ratten. Weiterhin läßt sich daraus schlußfolgern, daß die hohen Plasmakonzentrationen bei den Fischer/Winkelmann-Ratten zum großen Teil für die starke anxiolytische Wirkung von Diazepam in der niedrigen Dosierung verantwortlich sind. Weitere Untersuchungen zur Pharmakokinetik von Diazepam und zur Aktivität von Cytochrom P450 sind daher geplant.

Ein weiterer Unterschied besteht eventuell in der Art des Abbauweges. So scheint Diazepam bei den Fischer/Winkelmann-Ratten zu gleichen Teilen über Temazepam und N-Desmethyldiazepam metabolisiert zu werden. Die Wistar-Zuchtlinien bauen Diazepam vermutlich vermehrt über N-Desmethyldiazepam ab. Normalerweise wandeln Ratten im Gegensatz zum Menschen Diazepam hauptsächlich zu Temazepam um (Schwartz et al. 1965; Marcucci et al., 1970), welches teilweise weiter zu Oxazepam metabolisiert oder direkt über die Niere ausgeschieden wird. Ob die unterschiedlichen Konzentrationen von N-Desmethyldiazepam und Temazepam dafür sprechen, daß Fischer- und Wistar-Ratten Diazepam unter Beteiligung verschiedener Stoffwechselwege metabolisieren, muß noch genauer untersucht werden.

4.2.2. Bestimmung der Serotoningehalte in drei Gehirngebieten

Serotoningehalte im ZNS unbehandelter Tiere

Im Zusammenhang mit Angststörungen wird dem zentralen serotonergen Transmissionssystem eine besondere Bedeutung beigemessen. So wird angenommen, daß eine erhöhte 5-HT-Freisetzung in den synaptischen Spalt mit einem gesteigerten Angstverhalten gekoppelt ist (Barnes und Sharp, 1999; Kulikov et al., 1997; Handley und McBlane 1993; Iversen, 1984). Der anxiolytische Effekt von 5-HT_{1A}-Agonisten wird darauf

zurückgeführt, daß sie die Feuerungsrate der 5-HT-Neurone über präsynaptische Rückkopplung senken und die 5-HT-Freisetzung hemmen.

Es wurde daher vermutet, daß der unterschiedlichen „Ängstlichkeit“ der beiden Rattenstämme bzw. Zuchtlinie Unterschiede in der Funktion des serotonergen Transmissionssystems zu Grunde liegen könnten. Um dies zu untersuchen, wurden die 5-HT-Gehalte in den Hirngebieten, präfrontaler Kortex, Hippokampus und mediane sowie dorsale Raphe, nach einer von Palkovits (1973) sowie von Orosco und Mitarbeitern (1990) entwickelten Methode bestimmt. Diese Gehirngebiete sind bedeutende Strukturen für den Ursprung von 5-HT-Neuronen sowie deren Projektionsbahnen und sind zudem in Angstmechanismen involviert (Menard und Treit, 1999; Barnes und Sharp, 1999). Die Raphekerne bestehen hauptsächlich aus den Somata serotonerger Neurone (Dahlström und Fuxe, 1964). Da die Zellkörper Bildungsstätte von 5-HT sind und es hier in Vesikeln speichern, ist ein vergleichsweise hoher Gehalt von 5-HT zu erwarten. Der präfrontale Kortex und der Hippokampus zählen zu den Hauptprojektionsgebieten der serotonergen Nervenzellen (Dahlström und Fuxe, 1964; Steinbusch, 1981), in diesen Bereichen befinden sich die Synapsen der serotonerger Neurone, in die das 5-HT freigesetzt wird. Außerdem sind beide Hirnstrukturen an der Ausprägung von Angsterscheinungen wesentlich beteiligt.

Tatsächlich sind die 5-HT-Gehalte im präfrontalen Kortex und im Hippokampus bei den ängstlicheren Fischer/Winkelmann-Ratten gegenüber den beiden Wistar-Zuchtlinien erhöht. Die ebenfalls ängstlichen Wistar/BgVV-Ratten nehmen eine Zwischenstellung ein, da sie gegenüber den Wistar/Winkelmann-Ratten im Hippokampus und in den zusammengefaßten Raphekernen einen höheren Gehalt an 5-HT aufweisen.

Im Gegensatz zu diesen Befunden steht eine Untersuchung von Schwarting und Mitarbeitern (1998). Sie konnten bei einer Wistar-Zuchtlinie (RCC-BLR), bei der die Tiere im Elevated plus maze-Test ein unterschiedliches Angstverhalten zeigten, am darauffolgenden Tag keine unterschiedlichen 5-HT-Konzentrationen im Hippokampus und präfrontalen Kortex feststellen. Da Schwarting und Mitarbeiter (1998) die Konzentrationen bei Tieren derselben Zuchtlinie gemessen haben, sind die Ergebnisse nicht mit den unseren vergleichbar. Kulikov und Mitarbeiter (1997) konnten ebenfalls bei zwei Rattenstämmen mit verschiedenem Angstverhalten (Lewis- und Spontan hypertensive-Ratten) keine Unterschiede in den 5-HT-Konzentrationen im gesamten Mittelhirn und Hippokampus nachweisen. Im Gegensatz zu unseren Untersuchungen bestimmten sie die Gehalte nicht in Stanzlingen sondern im gesamten Gehirnschnitt, so daß auch hier ein direkter Vergleich mit unseren Ergebnissen

nicht möglich ist. Dennoch stellten sie unterschiedlich hohe Konzentrationen der Tryptophanhydroxylase, ein entscheidendes Enzym der Serotoninsynthese (Boadle-Biber, 1993), fest, was auf Unterschiede im serotonergen Transmissionssystem hinweist.

Im Einklang mit den vorliegenden Ergebnissen steht jedoch die Arbeit von Rex und Mitarbeitern (1999). Sie konnten zeigen, daß Fischer-Ratten in verschiedenen Verhaltenstests ängstlicher waren als Wistar-Ratten und bei ihnen im Mikrodialyseversuch während der Exposition auf dem Elevated plus maze das extrazelluläre 5-HT stark anstieg, während bei den Wistar-Ratten keine Erhöhung registriert wurde.

Serotoningehalte im ZNS nach Gabe von Diazepam

In der abschließenden Untersuchung sollte überprüft werden, ob die systemische Gabe von Diazepam eine unterschiedliche Auswirkung auf die 5-HT-Gehalte der Fischer/Winkelmann-Ratten und der beiden Wistar-Zuchtlinien in den drei für das Angstverhalten relevanten Gehirngebieten hat.

Schon Stein und Mitarbeiter (1973) stellten einen engen Zusammenhang zwischen dem GABAergen und serotonergen Transmissionssystem her, da Benzodiazepine den Umsatz von Serotonin senkten. Es konnte ebenfalls demonstriert werden, daß Benzodiazepine die Senkung der Feuerungsrate serotonerger Neurone unterstützte (Gallager, 1978). Arbeiten von Dominic und Mitarbeitern (1975) sowie von Saner und Pletscher (1979) zeigten, daß Diazepam die 5-HT-Synthese verringerte. Rex und Mitarbeiter (1993) konnten in einer *in vivo* Studie belegen, daß die Gabe von 1,0 mg/kg Diazepam die Freisetzung von 5-HT im präfrontalen Kortex von Meerschweinchen deutlich senkt und zu einem verminderten Anstieg der 5-HT-Freisetzung während des Aufenthaltes der Tiere auf dem Elevated plus maze führt. Weitere Arbeiten (Soubrie et al., 1983; Collinge und Pycock, 1982; Balfour, 1980) zeigten, daß die systemische Gabe von Diazepam *in vivo* und *in vitro* im frontalen Kortex, Hippokampus und Striatum sowie in der Substantia nigra mit einer verringerten 5-HT-Freisetzung einhergeht. In den Raphekernen ist nach Diazepam-Gabe meist eine gesteigerte 5-HT-Freisetzung beobachtet worden (Soubrie et al., 1983; Collinge und Pycock, 1982).

Die Ergebnisse der vorliegenden Untersuchung zeigen, daß die Gabe von Diazepam zu einer Senkung der 5-HT-Gehalte im präfrontalen Kortex und im Hippokampus führt, besonders ausgeprägt bei den ängstlichen Fischer/Winkelmann- und ängstlichen Wistar/BgVV-Ratten. Bei den weniger ängstlichen Wistar/Winkelmann-Ratten konnte Diazepam nur im Hippokampus den schon relativ niedrigen 5-HT-Gehalt verringern, während im präfrontalen

Kortex keine Reduktion erfolgte. Die Gehalte in den beiden Raphekernen war bei allen drei untersuchten Rattenstämmen konstant.

Da die Messung der Gehalte sowohl den intrazellulären als auch den extrazellulären 5-HT-Gehalt erfaßt, ist es nicht möglich, eine genaue Aussage zu treffen, inwiefern Diazepam in unserem Versuch die Synthese oder die Freisetzung von Serotonin in diesen Gehirngebieten beeinflusst. Dennoch kann festgestellt werden, daß die systemische Gabe von Diazepam die 5-HT-Gehalte der untersuchten Rattenstämme bzw. -zuchtlinien unterschiedlich stark beeinflusst. Dabei scheint Diazepam insbesondere bei den ängstlichen Tieren den 5-HT-Gehalt deutlicher zu senken. Dies bestätigt wiederum die Annahme, daß eine enge Verbindung zwischen dem Angstverhalten und dem serotonergen System besteht.

Es gibt nur wenige Untersuchungen die sich mit dem Einfluß von Substanzen auf die zentralen 5-HT-Gehalte bei verschiedenen Rattenstämmen befassen. So konnten Romero und Mitarbeiter (1998) zwar keine Unterschiede in der Basalkonzentration von 5-HT im präfrontalen Kortex von drei Wistar-Zuchtlinien nachweisen, sie stellten aber fest, daß die Gabe von Kaliumchlorid und Citalopram unterschiedliche 5-HT-Konzentrationen bei diesen Zuchtlinien erzeugte. Einen weiteren Einfluß fanden Boix und Mitarbeiter (1990): Das Handling von Ratten konnte verhindern, daß Diazepam eine Wirkung auf die 5-HT-Konzentration hatte.

Zusammengefaßt weisen die Ergebnisse darauf hin, daß die Stammesunterschiede nicht nur im Verhalten und im Arzneimittelmetabolismus manifestiert sind, sondern auch Mechanismen der zentralen Neurotransmission betreffen. Die Unterschiede im serotonergen Transmissionssystem scheinen zu den Unterschieden im Verhalten beizutragen. Zudem besteht sehr wahrscheinlich ein Zusammenhang zwischen der differierenden Wirkung von Diazepam auf die 5-HT-Gehalte im Gehirn und den Effekten in den Verhaltenstests.