

## **2. Literaturübersicht**

### **2.1. Angst mit Krankheitswert beim Menschen**

Angsterkrankungen beim Menschen sind ein großes Problem. Zwei bis vier Prozent der gesamten Population leiden an unterschiedlichen Angsterkrankungen.

Vierzig Prozent der psychoaktiven Medikamente, die verkauft werden, sind Anxiolytika (Stephens und Andrews, 1991). Es gibt einen therapeutischen und ökonomischen Druck, neue Möglichkeiten der Behandlungen zu entwickeln und die „Angstmechanismen“ intensiver zu erforschen (Hendrie et al., 1996). Trotz intensiver Bemühungen gelingt es häufig nicht, besonders bei länger andauernden Angstzuständen, medikamentös eine befriedigende Wirkung zu erzielen. Es besteht also weiterhin dringender Forschungsbedarf (Morgner, 1996).

Neue Arzneimittel werden in der Klinik getestet und angewendet. Für die Forschung ist es notwendig, Kontakt zur Klinik zu halten, um die Wirksamkeit der Arzneimittel zu erfahren (File, 1992). Um Modellsubstanzen bzw. Standards zu entwickeln und festzulegen, müssen Grundlagenforschung und klinische Forschung zusammenarbeiten.

Für die Entwicklung von Tiermodellen war es notwendig, zwischen Depression und Angststörungen in ihren Ursachen zu differenzieren (File, 1992).

Die Depression ist beim Menschen eine Form der seelischen Störung, ein Zustand gedrückter Stimmungslage, der u.a. mit verminderter Reizansprechbarkeit verbunden ist. Sobald sie ohne erkennbare Ursachen auftritt, wird sie als pathologisch psychische Störung angesehen. Angsterkrankungen können gleichzeitig mit einer Depression auftreten. Oft ist die Depression eine Folge von Angsterkrankungen. Auch beim Tier sind depressive Zustände bekannt. Sie werden z.B. durch Isolierung oder Herdenveränderung ausgelöst.

Verhaltenstests wurden pharmakologisch validiert, um zwischen Angst und Depression unterscheiden zu können. Dazu wurden Antidepressiva eingesetzt, wodurch die Wirksamkeit auf „depressive Tiermodelle“ ermittelt werden kann. Im klinischen Alltag ist die Trennung zwischen Angsterkrankungen und Depression nicht immer so scharf und eindeutig. Bester Hinweis für Gemeinsamkeiten beider Erkrankungen ist die immer weiter erfolgende Indikationserweiterung für die Antidepressiva, die bislang nur für die enge Indikation der entsprechenden Psychose zum Einsatz kamen.

In der Forschung hat man sich bemüht, Tiermodelle für die verschiedensten Zentralnervensystem(ZNS)-Störungen zu entwickeln. So wurden Tiermodelle für depressive Erkrankungen geschaffen und pharmakologisch mit den klinisch gebräuchlichen

Antidepressiva validiert. Ebenso wurden Angstmodelle beim Tier entwickelt und mit Anxiolytika validiert. Überschneidungen zwischen den beiden ZNS-Erkrankungen und in der Wirksamkeit der Arzneimittelgruppen treten aber dennoch auf und sind derzeit auch Gegenstand intensiver Forschung.

Unter dem klinischen Begriff der Angststörung werden Angstneurose, Phobie und sonstige Angststörungen zusammengefaßt. Gemeinsam ist beiden erstgenannten Angststörungen, daß die Betroffenen in einem nicht mehr angemessenen Ausmaß beeinträchtigt sind. Die Symptome können sich auf psychischen, motorischen und/oder physiologischen Ebenen manifestieren.

Die phobischen Störungen sind durch Angstsymptome gekennzeichnet, die vor allem durch eindeutig definierte Situationen oder Objekte hervorgerufen werden (z.B. Agoraphobie).

Von den Phobien sind die sonstigen Angststörungen abzugrenzen, d.h. die generalisierte Angststörung und die Panikstörung. Bei der generalisierten Angst tritt die Angst frei flottierend auf. Bei der Panikstörung hat die Angst anfallsweisen Charakter mit symptomfreien Intervallen.

Die klinische Klassifizierung von Angsterkrankungen wird in einem Diagnosemanual vorgenommen, z.B. dem DSM-III-R (Diagnostic and Statistica Manual of Mental Disorders). Es existieren mehrere Diagnoseverzeichnisse, in denen teilweise unterschiedene Symptome bzw. Diagnosekriterien festgelegt sind.

Die wichtigsten Angstsymptome nach der ICD-10 (International Classification of Diseases) Klassifikation sind in nachfolgender Übersicht dargestellt:

Vegetative Symptome	Herzklopfen oder erhöhte Herzfrequenz, Schweißausbrüche, Fein- oder grobschlägiger Tremor, Mundtrockenheit,
Andere körperliche Symptome	Atembeschwerden, Beklemmungsgefühl, Thoraxschmerzen oder –mißempfindungen, Übelkeit, Erbrechen, abdominale Mißempfindungen,
Psychische Symptome	Schwindel, Unsicherheit, Schwäche, Benommenheit, Derealisation, Depersonalisation, Angst vor Kontrollverlust, Angst verrückt zu

Weitere Symptome	werden, Angst zu sterben, Hitzewallungen, Kälteschauer, Gefühllosigkeit oder Kribbelgefühle, Erröten oder Zittern, Ruhelosigkeit, Unfähigkeit, sich zu entspannen.
------------------	---

Zur Pharmakotherapie von Angsterkrankungen teilt Morgner (1996) die Angst in drei Grundformen ein.

1. Angemessene „normale“ Angst (Alltagsangst)
2. Primäre Angstkrankheiten (z.B. phobische Störungen)
3. Sekundäre Angstsyndrome (z.B. durch koronare Herzerkrankung)

Diese Einteilung erfordert für den zweiten und den dritten Punkt voneinander abweichende Behandlungsansätze.

## 2.2. Angstuntersuchungen in der tierexperimentellen Forschung

In der Klinik existieren verschiedene Diagnoseschlüssel, deren Unterscheidung strittig ist (File, 1992). Jedoch werden Unterschiede zwischen den Angstformen nicht angezweifelt.

Angststörungen mit Krankheitswert sind eine komplexe Erkrankungsgruppe. Die Heterogenität von Angststörungen wird von klinischer Seite akzeptiert und ist nachvollziehbar: Panikattaken und Phobien sind unterschiedliche Krankheitsbilder.

Vor den Verhaltenspharmakologen stand die Aufgabe, Tiermodelle der Angst zu entwickeln, die zum einen die klinische Situation nachstellen und zum anderen auch für die unterschiedlichen Arzneimittelgruppen, deren Wirksamkeit klinisch bestätigt ist, empfindlich sind (File, 1995). In tierexperimentellen Untersuchungen wurde festgestellt, daß in den verschiedenen Angsttests auch unterschiedliche Neurotransmitter freigesetzt werden (File et al., 1993a). Diese Tatsache beweist, daß Unterschiede innerhalb der verschiedenen Angsttests existieren (File, 1995).

Es wurden im Laufe der Zeit eine Vielzahl von Tiermodellen der Angst vorgeschlagen und eine große Anzahl hat sich durchgesetzt. Dabei konnte gezeigt werden, daß die verschiedenen Modelle tatsächlich unterschiedlich auf die entsprechenden Pharmaka ansprechen.

Es ist schwierig, Tiermodelle zu entwickeln, in denen die entsprechenden psychischen Störungen bzw. psychiatrische Krankheitszustände „erzeugt“ werden (File, 1987). Außerdem ist nicht bekannt, ob Tiere die subjektive Angst ähnlich empfinden wie der Mensch (Weiss et al., 2000). Die vielen verschiedenen Angsterkrankungen können bisher nicht in analoge Tiermodelle umgesetzt werden. Um mit größerer Sicherheit Voraussagen über die Wirksamkeit neuartiger Pharmaka treffen zu können, hilft man sich damit, mehrere Angsttests durchzuführen (Lal und Emmett-Oglesby, 1983). Durch die Verwendung einer Testbatterie werden unterschiedliche Angstformen erfaßt. Zur Beurteilung des Angstverhaltens muß eine Testbatterie verwendet werden, bei der die Angstausslösung auf unterschiedlichen Stimuli beruht (Crawley und Paylor, 1997). Durch aversive Stimuli werden ängstliche Reaktionen im Versuchstier erzeugt (Gerlai, 1996b; Treit, 1985).

Insgesamt kann die derzeitige Situation hinsichtlich der Entwicklung von Tiermodellen der Angst nur so eingeschätzt werden, daß die Modelle nichts anderes als eine extreme Situation für das Tier bedeuten und die unterschiedlichen Reaktionen auf diese Situationen bewertet werden. Eine pathologisch gesteigerte Angst beim Labortier gibt es nicht. Bei Hunden und Katzen sind Angsterkrankungen bekannt. Es gibt Trennungsängste, bestimmte Phobien, Panikattacken in vergleichbarer Weise zum Menschen. Bei Labornagern wurden bisher keine Angsterkrankungen diagnostiziert. Deshalb haben alle Tiermodelle in der experimentellen Forschung Einschränkungen für die Übertragbarkeit auf klinische Situationen. „Angstversuche“ bei der Ratte können also nur Modelle darstellen (Lal und Emmett-Oglesby, 1983).

Transgene Tiere können hier eine Chance darstellen. Durch bestimmte genetische Veränderungen könnten der Angstzustand bzw. die Angstreaktionen der Tiere verändert werden. Diese Tiere würden möglicherweise ein Krankheitsmodell darstellen, wie sie bereits für z.B. Bluthochdruck und Diabetes existieren.

Bei der Entwicklung und Durchführung von Angsttests gibt es außerdem methodisch-technische Probleme, die nachfolgend erläutert werden.

Um Verhaltensuntersuchungen international vergleichen zu können, müssen die Untersuchungen standardisiert werden. Die Untersuchungs- und Umweltbedingungen sind jedoch in vielen Laboratorien verschieden und damit nur bedingt vergleichbar. Das Grundverhalten der Versuchstiere wird deutlich beeinflusst von Faktoren wie:

- Streß vor dem Versuch (z.B. Warten in einem Vorbereitungsraum),
- Handling der Tiere (z.B. Umsetzen der Tiere durch ausschließlichen Schwanzkontakt),
- das Lichtregime (z.B. unterschiedliche Zeiten der Versuchsdurchführung),
- vorhergehende Tests und
- Veränderungen im Heimatkäfig (z.B. Beschäftigungsmaterial im Käfig oder nicht)

(Dawson und Tricklebank, 1995; Rodgers und Cole, 1995).

Weibliche Ratten verhalten sich meist ängstlicher in Verhaltensuntersuchungen als männliche Ratten. Männliche Tiere unterliegen im Gegensatz zu den weiblichen Tieren geringeren hormonellen Schwankungen. Aus diesen Gründen werden bevorzugt männliche Labortiere für Verhaltensuntersuchungen verwendet.

Das Alter der Tiere beeinflusst ebenfalls die Ergebnisse der Untersuchungen. Es ist bekannt, daß ältere Ratten weniger explorieren und schwächer auf Anxiolytika ansprechen (File, 1992).

In den Laboratorien weltweit werden verschiedene Rattenstämme und Zuchtlinien traditionsgemäß eingesetzt. Es wurde deutlich, daß die verschiedenen Rattenstämme sehr unterschiedliches spontanes Verhalten als Antwort auf einen Angstreiz zeigen und, daß sie außerdem auch auf Pharmaka (zumeist Anxiolytika) unterschiedlich stark reagieren (Chaouloff et al., 1994; Glowa und Hansen, 1994; Pellow et al., 1985; Trullas und Skolnick, 1993).

Wiederholungen von Angsttests einer Versuchsgruppe führen zu verschiedenen Ergebnissen, da Gewöhnung, Lerneffekte und Dauerstreß auftreten können. Deshalb ist es nicht möglich, Ratten in Angstexperimenten mehrfach zu nutzen.

Studien haben gezeigt, daß Anxiolytika unterschiedliche, teilweise gegensätzliche Wirkungen in Angsttests haben (Griebel, 1995). Es sind also falsch positive bzw. falsch negative Ergebnisse in Einzeltests nicht auszuschließen (Rodgers und Cole, 1995). Ursachen dafür könnten sein:

- viele Angsttests sind nur pharmakologisch validiert, d.h., eine Verhaltens- und physiologische Validierung fehlt,
- Effekte sind (nach pharmakologischer Validierung) oft nur an der chemischen Klasse der Benzodiazepine nachgewiesen, d.h., diese Tests können möglicherweise nur verschiedene Verhaltenseffekte von Benzodiazepinen reflektieren (Chopin und Briley, 1987),
- vor allem Nicht-Benzodiazepin-Anxiolytika (Broekkamp et al., 1989; Chopin und Briley, 1987; Griebel, 1995) sind in mehreren Tiermodellen ineffektiv,
- speziell im Elevated-plus-maze-Test und im Social-interaction-Test versagen z.B. 5-Hydroxytryptamin( $5\text{-HT}_{1A}$ )-Agonisten (File, 1978) oder 5-HT<sub>3</sub>-Antagonisten (File und Johnston, 1989) (beide Tests sind unter dem Punkt 2.5. erläutert).

Daraus ergibt sich die Notwendigkeit, verschiedene, international anerkannte Angsttests durchzuführen. Die Versuchstiere sollten gleichen Geschlechts sein, zu einer Altersgruppe gehören und, es sollte vorher klar sein, welcher Rattenstamm und welche Zuchtlinie eingesetzt wird.

### 2.3. Anxiolytika und anxiogen wirkende Substanzen

Anxiolytika kompensieren Verhaltenseffekte, die durch unterschiedliche Reize ausgelöst werden.

Gray et al. (1981) teilten diese Reize in die drei nachfolgenden Klassen ein:

- 1.) Reize in Verbindung mit Bestrafung
- 2.) Reize in Verbindung mit Frustration aufgrund des Fehlens einer Belohnung
- 3.) neue Reize, die bewirken:
  - a) die Inhibition des „laufenden“ Verhaltens
  - b) die Erhöhung der Stufe der Erregung
  - c) die Erhöhung der Aufmerksamkeit zu „Neuheiten“ der Umwelt.

#### 2.3.1. Klinisch eingesetzte Psychopharmaka

Psychopharmaka sind Arzneistoffe, deren Hauptwirkung darin besteht, psychopathologische Symptome zu beseitigen oder abzuschwächen. Die Einteilung der Psychopharmaka erfolgt nach ihrem therapeutisch angestrebten Effekt. Eine große Gruppe sind die Tranquillantien, die nicht antipsychotisch wirken. Die zweite wichtige Gruppe stellen die Neuroleptika und Antidepressiva dar, die antipsychotisch wirksam sind.

*Tranquillantien*, in verschiedenen Einteilungen auch *Anxiolytika* und *Ataraktika* genannt, sind Verbindungen mit vorwiegend dämpfender Wirkung auf die Psyche, die Angst vermindern, affektiv entspannen und nichtpsychotische Erregungszustände sowie deren somatische Begleiterscheinungen mindern.

Anxiolytika erster Wahl sind nach wie vor die Benzodiazepine (im Punkt 2.3.2.1. erläutert).

Da bekannt war, daß das serotonerge Neurotransmissionssystem bei Angst verändert ist, wurde nach Substanzen gesucht, die dieses System beeinflussen. Buspiron und Ipsaspiron sind Medikamente, die die Aktivität des 5-HT-Systems im Gehirn beeinflussen.

Buspiron ist ein Agonist vornehmlich an präsynaptischen, aber auch an postsynaptischen 5-HT<sub>1A</sub>-Rezeptoren im ZNS. Bei der anxiolytischen Wirkung von Buspiron spielen offenbar Mechanismen der Veränderung der 5-HT-Neurotransmission eine Rolle, die erst nach wiederholter Gabe zur Ausprägung kommen. Deshalb kommt es zu einem verzögerten Wirkungseintritt mit einer Latenz von zwei bis zu vier Wochen beim Menschen.

Im Vergleich zu den Benzodiazepinen besitzt Buspiron eine geringere anxiolytische Wirkungsstärke, und wird zur symptomatischen Behandlung von Angstzuständen mit den Leitsymptomen Angst, innere Unruhe und Spannungszuständen angewendet.

Nach Absetzen von Buspiron ist, im Unterschied zu Benzodiazepinen, nicht mit Entzugserscheinungen oder dem raschen Wiederauftreten von Angstsymptomen (Reboundeffekt) zu rechnen.

Die Hauptindikation der *Neuroleptika* sind die schizophrenen und manischen Psychosen. Obwohl Neuroleptika als Antipsychotika klassifiziert wurden, werden sie auch bei Angsterkrankungen eingesetzt. Ihre Verwendung als Anxiolytika wird jedoch kontrovers beurteilt, da auch bei niedrigen Dosierungen unerwünschte extrapyramidale Wirkungen beobachtet werden.

Die wichtigsten Wirkungen der Neuroleptika sind:

1. die Beseitigung oder Abschwächung produktiver Symptome („antipsychotische Wirkung“), bezogen auf die Schizophrenie gegen Denkstörungen, Wahnideen und Halluzinationen
2. die Abschwächung von Negativsymptomen schizophrener Erkrankungen, wie Verarmung der Sprache, affektive Verflachung, sozialer Rückzug und Apathie
3. die Sedierung, bei psychomotorischen Erregungszuständen und affektiver Spannung
4. die anxiolytische Wirkung in niedriger Dosierung (sie ist schwächer gegenüber Benzodiazepinen und Antidepressiva).

Das kardinale pharmakologische Merkmal der Neuroleptika ist die antagonistische Wirkung an Dopaminrezeptoren (D<sub>2</sub>-Typ).

Es werden niederpotente (z.B. Promazin), mittelpotente und hochpotente (z.B. Haloperidol) Neuroleptika unterschieden. Im Vergleich zu den hoch- oder starkpotenten Neuroleptika wirken die nieder- oder schwachpotenten Neuroleptika stärker sedativ und vegetativ sowie schwächer extrapyramidal-motorisch und antipsychotisch.

Neuroleptika führen in der Langzeitbehandlung nicht zur Abhängigkeit. Bei Langzeitverabreichung sind jedoch Spätdyskinesien nicht auszuschließen und deshalb möglichst nicht länger als drei Monate fortlaufend einzusetzen (Morgner, 1996).

Die therapeutische Wirkung der *Antidepressiva* beruht auf einer primären Hemmung der neuronalen Wiederaufnahme von Noradrenalin oder Serotonin. Da die Wirkung der Antidepressiva erst nach gewisser Latenz auftritt, werden adaptive Mechanismen auf Rezeptorebene diskutiert. Hauptindikationsgebiet sind schwere depressive Erkrankungen. Weiterhin werden sie bei chronischen Schmerzen, Panikattacken, generalisierter

Angststörung, Zwangssyndrom und Bulimie verwendet. Antidepressiva wirken im allgemeinen dämpfend, stimmungsaufhellend und aktivierend.

Eine angstlösende Wirkungskomponente findet sich insbesondere bei den trizyklischen Antidepressiva Imipramin und Clomipramin bzw. Amitriptylin sowie bei den irreversiblen MAO(Monoaminoxidase)-Hemmern. Der anxiolytische Soforteffekt ist nicht so stark ausgeprägt wie bei den Benzodiazepinen, da die volle Wirkung erst später eintritt.

## 2.3.2. Anxiolytisch wirkende Substanzen in den Untersuchungen

### 2.3.2.1. Benzodiazepine

Benzodiazepine verändern die Konfiguration des Gammaaminobuttersäure(GABA)<sub>A</sub>-Rezeptors, indem sie mit einer spezifischen Bindungsstelle an diesem Rezeptor reagieren. An dem „Benzodiazepinrezeptor“ wird eine allosterische Veränderung des GABA<sub>A</sub>-Rezeptors ausgelöst, so daß das freigesetzte GABA ihn nun effektiver stimulieren kann. Durch die Aktivierung des GABA<sub>A</sub>-Rezeptors werden Chloridionen-Ströme induziert bzw. die Erregbarkeit der Neuronenmembran vermindert (Hyperpolarisation). Diese Primärwirkung kann sich auf andere Transmittersysteme, mit denen das GABA-erge System in Wechselwirkung steht, differenziert auswirken.

Benzodiazepine, wie Diazepam, Clobazam und Clonazepam, wirken an ihren Bindungsstellen am GABA<sub>A</sub>-Rezeptor als Agonisten, d.h. sie fördern die Wirkung von GABA. Außerdem gibt es Partialagonisten, kompetitive Antagonisten und inverse Agonisten.

In besonders hoher Zahl kommen Benzodiazepin-Bindungsstellen im Limbischen System vor. Die Hauptwirkung der Benzodiazepine findet demzufolge in diesem Bereich des Gehirns statt.

Die Wirkungen der Benzodiazepine am Menschen werden nachfolgend beschrieben:

Benzodiazepine haben eine allgemein beruhigende und Affekte dämpfende Wirkung.

Therapeutisch werden sie genutzt zur:

1. Anxiolyse (Unterdrückung von Angst, affektiver Spannung und Erregung)

Sie werden vorwiegend in Zusammenhang mit der Verminderung generalisierter Angststörungen gesehen (Nutt, 1991).

2. Beruhigung und Schlafförderung

3. Zentralen Muskelrelaxation

4. Behandlung der Epilepsie.

Längere Einnahme über zirka drei Monate hinaus führen häufig zur Abhängigkeit und zur Toleranzentwicklung.

Zusammenfassend ist festzustellen, daß Benzodiazepine bei akut beginnenden, intensiven, bedrohlich erlebten, primären und sekundären Angstzuständen im Rahmen von Panikattacken, generalisierten Angsterkrankungen mit depressiven Störungen, Phobien und posttraumatischen Belastungsstörungen als Mono- und Adjuvanttherapie gut wirksam, jedoch wegen der Gefahr der Toleranz und Abhängigkeit nur kurzzeitig einsetzbar sind.

Im Tierversuch gelten Benzodiazepine als „Goldstandard“ für Anxiolytika.

Weitere Wirkungen der Benzodiazepine an der Ratte sind vielfältig und werden im nachfolgenden erläutert:

Benzodiazepine stimulieren in geringen Dosen das Erkundungsverhalten und die Lokomotion (File, 1985a; Lister, 1990), wirken jedoch in höheren Dosen sedierend. Außerdem können Benzodiazepine die Ergebnisse von Angsttests beeinflussen, indem sie möglicherweise retrograde Amnesien, Ataxien, Myorelaxationen oder Hyperthermien auslösen (Cooper, 1984; Frith et al., 1984; Groneim et al., 1984). Weiterhin ist bekannt, daß Diazepam bei Ratten eine Hyperphagie induziert (Cooper, 1980; Johnson, 1978; Poschel, 1971).

Dosisabhängig unterdrücken sie bedingte Vermeidungs- und Fluchtreaktionen und verhindern spontane oder induzierte Aggressivität. Benzodiazepine wirken antikonvulsiv. Die elektrische Aktivität der Areale des Limbischen Systems wird schon in Dosen herabgesetzt, die die des Cortex cerebri noch nicht beeinflussen.

Trotz der vielfältigen Wirkungen bzw. Nebenwirkungen werden Benzodiazepine, vor allem Diazepam, nach wie vor zur pharmakologischen Validierung von Angsttests genutzt (File, 1992).

#### 2.3.2.2. Der Betablocker Propranolol

Propranolol ist der älteste klinisch verwendete  $\beta$ -Blocker. Er hemmt  $\beta_1$ - und  $\beta_2$ -Adrenozeptoren gleich stark, kompetitiv und reversibel. Durch seine hohe Lipophilie passiert Propranolol die Blut-Hirn-Schranke gut.

Alle nachfolgend beschriebenen Effekte von Propranolol sind dosisabhängig. Am Herzen werden  $\beta_1$ -Adrenozeptoren blockiert. Es kommt zur negativ chronotropen, dromotropen, inotropen und lusitropen Wirkung. Die Kontraktilität des Herzens, wie sie durch die diastolische Füllung und den aktuellen Vagotonus gegeben ist, wird durch den Betablocker nicht herabgesetzt, sondern nur die zusätzliche, durch einen situationsbedingten Sympatikotonus hervorgerufene Erhöhung der Kontraktionskraft. Außerdem wird die

Automatie unterdrückt. Der Sauerstoffbedarf und das Herzzeitvolumen sinken aufgrund der Abnahme von Herzfrequenz und -kontraktilität. Die Barorezeptoren nehmen an Empfindlichkeit zu (Brunner, 1978).

Die  $\beta_1$ -Rezeptor-vermittelte Reninsekretion aus der Niere wird gehemmt und damit auch die Bildung von Angiotensin.

Propranolol besitzt lokalanästhetische Wirkung (Membran-„Stabilisierung“) und einen sogenannten „Nicht-Beta-Effekt“, der bis jetzt nicht vollständig geklärt ist (Koella, 1978).

Für die blutdrucksenkende Wirkung wird zusätzlich ein zentraler Mechanismus vermutet (Crow und Arbuthnott, 1972; Perkins und Moore, 1973). Im Gehirn sind  $\beta$ -Rezeptoren nachgewiesen worden, wobei sich die höchsten Konzentrationen im limbischen System, Hippocampus und in der Großhirnrinde zeigten (Alexander et al., 1975). Es gibt außerdem Hinweise dafür, daß Propranolol einen Teil seiner Wirkungen über  $5\text{-HT}_{2B}$ -Rezeptoren entfaltet. Über diese Angriffsorte werden die psychischen Wirkungen erklärt.

Propranolol wird therapeutisch beim Menschen u.a. als Antiarrhythmikum und Antihypertensivum, bei Herzinsuffizienz, zur Behandlung von Angina pectoris und bei ischämischen Herzerkrankungen angewendet.

Beta-Adrenozeptor-Antagonisten senken die Frequenz des Herzens, vor allem eine durch psychische Belastung erhöhte Herzfrequenz. Nicht- $\beta_1$ -selektive Antagonisten vermindern durch Blockade von  $\beta_2$ -Adrenozeptoren die Frequenz und Amplitude eines Tremors, vor allem der Finger.

Außer den peripher vegetativen Funktionen erzeugen  $\beta$ -Blocker Effekte, die die Psyche und das Verhalten beeinflussen (Koella, 1978). Sie werden deshalb in der Klinik bei Erwartungsängsten, Streßreaktionen, Phobien und Angstzuständen mit deutlich somatischen Begleiterscheinungen angewendet. Im Rahmen der sozialen Phobie und der spezifisch (isolierten) Phobie sind  $\beta$ -Blocker Mittel erster Wahl (Morgner, 1996). Insbesondere bei vegetativen Erscheinungen der Angst, wie kardiovaskuläre Manifestationen, Magen-Darm-Symptome, abnorme Schweiß- und Speichelreaktionen sind  $\beta$ -Blocker indiziert. Im Gegensatz zu Tranquillantien besteht bei  $\beta$ -Blockern keine Gefahr der Abhängigkeitsentwicklung bzw. Sucht. Auch die Entwicklung einer Toleranz ist nicht bekannt (Kielholz, 1978).

Bei der Ratte verursacht Propranolol im Elevated-plus-maze-Test (Chopin und Briley, 1987), im modifizierten Open-field-Test (Voigt et al., 1999) und im Social-interaction-Test (Gao und Cutler, 1992) anxiolytische Effekte.

### 2.3.3. Anxiogen wirkende Substanzen

Es gibt eine Vielzahl von angstauslösenden Substanzen, von denen einige der hier vorgestellten Substanzen in der experimentellen Forschung zur Auslösung anxiogener Effekte verwendet werden:

### *1. Cholezystokinin (CCK)*

Die Funktion von CCK im Magen-Darm-Trakt besteht in der Auslösung der Entleerung der Gallenblase, der Anregung der Sekretion des Pankreas und der Aktivierung der Motilität des Darmtrakts.

Im ZNS sind für das neuroaktive Peptid CCK zwei Rezeptortypen bekannt. Es ist zum einen der CCK-A-Rezeptor, welcher eine hohe Affinität für das Oktapeptid CCK-8s (sulfatiert) und eine geringere Affinität für das Tetrapeptid CCK-4 besitzt und in einigen abgrenzbaren ZNS-Arealen gefunden wird. Der zweite Rezeptor ist der CCK-B-Rezeptor, welcher eine hohe Affinität für beide CCK-Fragmente besitzt. Letzteren findet man ubiquitär im ZNS verteilt.

Über CCK-A-Rezeptoren wird hauptsächlich die Nahrungsaufnahme beeinflusst. Es gibt aber auch Hinweise auf eine Beteiligung von CCK-A-Rezeptoren bei angstbezogenem Verhalten (Fink et al., 1998; Lemaire et al., 1992).

Klinische und tierexperimentelle Studien zeigten übereinstimmend, daß im wesentlichen die CCK-B-Rezeptoren eine Rolle bei angstassozierten Prozessen spielen (Chopin und Briley, 1993; Costall et al., 1991; Singh et al., 1991).

Bei Patienten mit anamnestisch bekannten Panikzuständen konnten mit dem Tetrapeptid CCK-4 akute Panikattacken ausgelöst werden (Bradwejn et al., 1991). Panikartige Anfälle konnten auch mit einer CCK-4-Injektion bei gesunden Probanden erzeugt werden (De Montigny, 1989).

### *2. Pentetrazol, Pentylenetetrazol (engl.), (PTZ)*

PTZ ist ein Stammhirnkonvulsivum, es erregt die diffusen Neuronensysteme der Formatio reticularis und dabei auch die in ihr gelegenen Kreislauf- und Atemzentren.

Diese Substanz wird in der experimentellen Pharmakologie genutzt, um die Wirksamkeit von Antiepileptika bei Labortieren zu untersuchen (Esplin und Zablocka-Esplin, 1969). Bei Ratten werden durch PTZ tonische und klonische Krämpfe ausgelöst (Blum und Zacks, 1958). Beim Menschen wurde außerdem entdeckt, daß PTZ in niedrigeren Dosen („pre-konvulsiver“ Effekt) einen intensiven Angstzustand auslöst (Rodin, 1958; Rodin und Calhoun, 1970).

PTZ wird als anxiogene Substanz verwendet, da sie bei Nagern in unterschiedlichen Tiermodellen „Angst“ erzeugt (Lal und Emmett-Oglesby, 1983). Im Elevated-plus-maze-Test reduziert PTZ bei Ratten die Aufenthaltszeit bzw. die Exploration auf den offenen Armen und

die Anzahl der Eintritte in die offenen Arme, indikativ für einen anxiogenen Effekt (Cole et al., 1995). File (1984) berichtete auch von einer Reduktion der exploratorischen und lokomotorischen Aktivität im Holeboard-Test bei Ratten nach Applikation von PTZ.

### *3. M-chlorophenylpiperazine (mCPP)*

M-chlorophenylpiperazine, mCPP, ist ein 5-HT<sub>1B</sub>- und hauptsächlich 5-HT<sub>2C</sub>-Agonist (Graeff et al., 1996). Kennett (1993) berichtete, daß der 5-HT<sub>2C</sub>-Rezeptor eine wichtige Rolle bei der Erzeugung von Angstzuständen spielt. Diese Substanz zeigte z.B. im Social-interaction-Test anxiogene Effekte (Whitton und Curzon, 1990). Bilkei-Gorzo et al. (1998) stellten fest, daß mittels mCPP induzierte Angsteffekte beim Labortier im Black-white-box-Test anxiolytische Wirkungen von Pharmaka überprüft bzw. ermittelt werden können. Connell et al. (1995) erzeugten mit mCPP einen deutlichen Anstieg der Furcht, aber nicht der allgemein bekannten Angst (public speaking anxiety).

Bei Menschen mit bestehenden latenten Panikattacken löste mCPP einen akuten Panikanfall aus (Charney et al., 1987).

## 2.4. Tiermodelle zur Erfassung von Veränderungen im Angstverhalten

### 2.4.1. Klassifizierung von Tiermodellen der Angst

Tiermodelle der Angst werden von verschiedenen Autoren unterschiedlich eingeteilt. Diese Einteilungen existieren nach wie vor in der internationalen Literatur. Es hat sich keine der Einteilungen als allgemein gültig oder anerkannt durchsetzen können. Deshalb werden die drei am häufigsten gebrauchten Einteilungen betrachtet. Die Tiermodelle der Angst sind oft gleichzeitig auch der Aufbau für das Experiment, so daß die Trennung zwischen Tiermodell und Test oft verwischt.

Für die neuropsychopharmakologische Forschung wurden von File (1992) die bekannten Modelle bzw. Tests zur Erfassung von Angstverhalten folgendermaßen klassifiziert:

#### Tests, basierend auf Bestrafung

Die Versuchstiere müssen für diese Tests trainiert werden. Der Versuch wird in zwei Etappen durchgeführt: erstens eine bestrafungsfreie Phase, um eine Beeinflussung der Futter- und Wasseraufnahme durch die Substanz zu erkennen, und zweites eine Phase mit kombinierten Elektroschocks. Eine „anxiolytische“ Wirkung wird angenommen, wenn keine Verminderung der Futteraufnahme während der Bestrafungsphase auftritt.

### (A) „*Delivery of punishment*“

#### 1. „Punished lever-pressing“ z.B. Geller-Seifter Test

Der Test wurde von Geller und Seifter (1960) entwickelt. Er ist ein klassischer Angsttest, bei dem die Futterraufnahme durch die Tiere mit milden Elektroschocks kombiniert wird.

#### 2. „Punished drinking“

Der Test wurde von Vogel et al. (1971) entwickelt. Bei diesem Test wird das Trinken der durstigen Tiere mit milden Elektroschocks kombiniert.

#### 3. „Punished locomotion“

Bei diesem Test wird die lokomotorische Aktivität in einer neuen Umgebung mit milden Elektroschocks kombiniert (Howard und Pollard, 1986).

Eine anxiolytische Wirkung zeigt sich daran, daß die Tiere weniger das bestrafte Verhalten unterdrücken.

### (B) „*Anticipation of punishment*“

#### „Conditioned emotional response“ (CER)

In der Phase der Konditionierung wird ein Stimulus (z.B. helles Licht) zusammen mit Elektroschocks kombiniert. Nach Gabe des konditionierten Stimulus, also in der nachfolgenden Phase, wird das „laufende“ Verhalten unterdrückt (z.B. Hebel drücken in der Skinner Box) oder die Schreckreaktion auf Geräusche o.ä. steigt an (Davis, 1991).

### Tests, basierend auf reduzierter Belohnung

In diesen Tests werden die Tiere trainiert, auf eine Belohnung zu reagieren. Die Belohnung wird i.d.R. nach Hebeldruck in Form von Futter oder „Liebenswürdigkeiten“ erreicht. Die Belohnung wird im späteren Verlauf entweder zurückgenommen („Extinction“) oder reduziert (z.B. ein Abfall in der Zucker-Konzentration), d.h. es wird ein sukzessiver „negative contrast“ erzeugt (File, 1992).

Wenn die Belohnungen reduziert oder vollständig unterbrochen werden, reagieren die Tiere auf diese Enttäuschung. Anxiolytika, speziell Diazepam vermindert die Stärke der Reaktion. Dieser Test ist nach wie vor umstritten. Es gibt andere Interpretationen, in denen dieses Tiermodell auch für Untersuchungen von Frustrationsreaktionen eingesetzt wird.

### Tests ethologischer Herkunft

Die ethologischen Angsttests basieren generell auf Situationen oder Stimuli, die für das „normale“ Verhalten der Tiere relevant sind.

(A) „Based on exploratory behaviour“

Durch die anxiolytische Wirkung einer Substanz kann ein Anstieg der motorischen Aktivität oder Exploration induziert werden. In einer aversiven Umgebung (z.B. hell erleuchteter Raum) entsteht beim Versuchstier der Konflikt zwischen dem Wunsch der Erkundung dieses neuen Raums und der Aversion gegen das helle Licht. Die Zunahme von Lokomotion und Exploration weist auf eine „anxiolytische Aktivität“ hin.

1. „Black-white-box-Test“ (siehe Punkt 2.5.3.)
2. „Elevated-plus-maze-Test“ (siehe Punkt 2.5.4.)

(B) „Based on social behaviour“

1. „Social-interaction-Test in rats“ (siehe Punkt 2.5.1.3.)
2. „Social and aggressive encounters in mice“

Krsiak et al. (1984) studierten die Effekte von Substanzen am sozialen Verhalten von männlichen Mauspaaren. Eine Maus wurde vor dem Test für mehrere Wochen isoliert, die zweite wurde in einer Gruppe gehalten. Die entsprechende Substanz wird nur der vorher isoliert gehaltenen Maus appliziert. Anxiolytische Substanzen induzieren die Erhöhung der „sozialen Untersuchungen“ des Mauspartners und reduzieren das defensive Verhalten.

3. „Primate social behaviour“

Dieser Test ist ein guter Beweis, daß die Sozialposition von Tieren auf die Wirkung von Substanzen einen Einfluß haben kann und vice versa. In einer Gruppe von Talapoin-Affen ist das Verhalten des dominanten Tieres dieser Gruppe meist empfindlich gegenüber anxiolytischen Substanzen, während der untergeordnete Affe auf Antidepressiva anspricht (Vellucci, 1991; Übersicht: File, 1992). Damit ist es möglich, mit einem entsprechenden Versuchsaufbau Verhaltensreaktionen auf anxiolytische und antidepressive Pharmaka zu erhalten.

4. „Separation-induced vocalisation“

Man geht davon aus, daß Rattenbabies Rufe im Ultraschallbereich ausstoßen, wenn sie von ihrer Mutter getrennt werden. Dieser Test ist ebenfalls eine relativ einfache und „robuste“ Methode, anxiolytische Substanzeffekte zu messen (Gardner, 1985; Insel et al. 1986).

Die zweite, hier vorgestellte Einteilung von Tiermodellen der Angst erfolgte durch Green und Hodges (1991), Lister (1990) und Treit (1985). Sie teilten die Angstmodelle in zwei generelle Kategorien ein:

Die erste Kategorie ist das Modell der bedingten Reflexe. Dazu gehören beispielhaft folgende Tests: der Geller-Seifter-Konflikt-Test, der Vogel-punished-drinking-Test und der Four-plate-Test.

Diese Art von Tests benötigen Training, aversive Stimuli in Form von Futter- oder Wasserentzug und/oder elektrische Schocks, d.h. entsprechende „Bestrafungstests“ nach File (1992).

Die zweite Kategorie ist das Modell der unbedingten Reflexe. Tierversuche dieser Kategorie sind z.B. der Rodent-social-interaction-Test, der Separation-induced-vocalization-Test, der Primate-social-behaviour-Test, der Elevated-plus-maze-Test und der Mouse-light/dark-exploration-Test.

Die Tests der zweiten Kategorie basieren auf spontanem Verhalten und sind pharmakologisch, physiologisch und ethologisch validiert (Chopin und Briley, 1987). Sie sind für das Versuchstier nicht schmerzhaft, und entsprechen bei der Einteilung nach File (1992) vor allem Tests ethologischer Herkunft.

Untersuchungen mit unbedingten Reflexen beinhalten ein „reichhaltigeres Verhalten“. Es sind mehr als nur „Einzelpunktmessungen“. Sie bieten dadurch größere definierte Meßbereiche. Gegenüber den Tests der bedingten Reflexe nähern sie sich verschiedenen Formen menschlicher Angst an (Rodgers und Cole, 1995).

Eine andere Unterteilung der bereits angeführten Angstmodelle beschrieben Lal und Emmett-Oglesby (1983):

Alle Angstmodelle sollten bestimmte Stimuli beinhalten, die einen neuen Zustand, einen Angstzustand innerhalb der Tiere, induzieren.

Die induzierten Reize greifen an verschiedene „Rezeptoren“ an. Diese „Rezeptoren“ werden in zwei Reizmodelle unterteilt. Dabei wird zwischen „Exterozeptoren“ und „Interozeptoren“ unterschieden.

Die „Exterozeptoren“ werden durch äußere Reize angeregt und befinden sich auf der Haut, der Schleimhaut und auf den Sinnesorganen.

Gemeinsames Charakteristikum des exterozeptiven Reizmodells ist die Präsenz von aversiven Reizen. Es werden folgende Modelle unterschieden:

a) die Antwort-unabhängige Präsentation von Reizen

-Neue Umweltbedingungen

-Unvermeidliche aversive Ereignisse

-Konditioniertes aversives Verfahren

-Konditionierte emotionale Reaktion

- Potentielles Erschrecken
- Konditionierte Beschleunigung

b) die Antwort-abhängige Präsentation von Reizen

-Unterdrücktes Verhalten durch aversive Reize

Eine spezielle Reaktion eines Labortieres, z.B. einen Hebel drücken, um Futter zu erhalten, wird durch einen aversiven Stimulus, z.B. Elektroschock, im späteren Verlauf unterdrückt.

-Verhaltensbeschleunigung durch aversive Reize

Durch eine spezielle Reaktion eines Versuchstieres wird der aversive Stimulus unterdrückt (z.B. eine Ratte flüchtet, wenn sie aus ihrem Käfig herausgenommen werden soll).

Als „*Interozeptoren*“ werden nervale Rezeptoren der Körperhöhlen und der darin befindlichen Organe und Gewebe betrachtet.

Gemeinsames Charakteristikum des interozeptiven Reizmodells ist die Anwendung von elektrischen Stimuli in spezifischen Arealen des Gehirns und die Verabreichung von anxiogenen Substanzen. Es werden unterschieden:

- a) die elektrische Stimulation des Gehirns und
- b) die pharmakologischen Manipulationen.

Die genannten Reize können als ursächliche Angststimuli des Menschen interpretiert werden.

Die Tiere werden den Stimuli ausgesetzt und auf Reaktions- bzw. Verhaltensdefizite beobachtet. Es ist dann möglich, einen „Index der Angst“ zu erstellen.

Verhaltensreaktionen werden von den genannten Reizen zuverlässig ausgelöst. Sie sind durch anxiolytische Substanzen antagonisierbar und werden als „Analoge der Angst“ akzeptiert.

Durch das Setzen von „exterozeptiven“ und „interozeptiven“ Reizen werden Angstreaktionen in Form von unkonditioniertem und konditioniertem Verhalten wahrgenommen. Ziel ist es, physiologische Zustände in den „Tieranaloge“ in Bezug auf die Angst beim Menschen zu induzieren.

Trotz der Antagonisierbarkeit der Verhaltensreaktionen mittels anxiolytischer Substanzen ist die Unterscheidung zwischen den Symptomen für Angst, Streß oder Furcht nicht möglich. Des weiteren sind direkte motorische Effekte von Anxiolytika nicht auszuschließen.

## 2.5. Angsttests für Ratten

Tiermodelle werden in der Angstforschung aus zwei prinzipiellen Gründen genutzt:

1. zur Screeningprüfung für neue therapeutische Substanzen und
2. als Simulation, um zugrundeliegende Mechanismen besser verstehen zu können (Green und Hodgers, 1991; Lister, 1990; Treit, 1985).

Tiermodelle zur Untersuchung des Angstverhaltens bei Nagetieren basieren meist auf physiologischen- bzw. auf Verhaltensantworten, die sich durch Benzodiazepin-Anxiolytika beeinflussen lassen (Rodgers und Cole, 1995). Durch anxiolytisch wirkende Substanzen ist es möglich, in Verhaltenstests die Angst vor Bestrafung, vor sozialer oder natürlicher Bedrohung, vor aversiver Lichtumgebung oder vor offenen Räumen zu dämpfen (in: Rex et al., 1996a).

Nager zeigen eine starke Neigung, neue Objekte und neue Umgebungen zu erforschen (Blanchard et al., 1993; Hughes, 1997). Diese Exploration gestattet den Tieren, sich mit ihrer unmittelbaren Umgebung vertraut zu machen und damit auch lebenswichtige Dinge wie Futter und Wasser, schützende „Unterkünfte“ und Sexualpartner zu finden. Die Exploration dient dem biologischen Ziel verschiedene motivierende Systeme in Gang zu setzen, wie z.B. hungrige Tiere nach Nahrung suchen zu lassen (Weiss et al., 2000).

Nachfolgend werden Angsttests vorgestellt, die die natürliche Neophobie, die Aversion gegen helles Licht und das Explorationsverhalten von Nagern nutzen.

### 2.5.1. Der Open-field-Test

Das offene Feld ist eine große, i.d.R. 1m×1m freie Fläche, die von Wänden umgeben ist. Der Test basiert auf der Verhaltensweise von Nagern unbekannte große Räume zu meiden, wodurch die exploratorische Aktivität vermindert wird und Thigmotaxis verstärkt auftritt (Christmas und Maxwell, 1970; Oliverio et al., 1973). Einen zusätzlichen aversiven Reiz stellt eine helle Ausleuchtung dar, d.h., es wird die ausgelöste Unsicherheit und Angst der Ratten ausgenutzt, die einer unbekanntem und/oder hell erleuchteten Umgebung ausgesetzt sind.

#### 2.5.1.1. Weißes Open-field und schwarzes Open-field

Hlinak und Rozmarova (1986) untersuchten das lokomotorische und exploratorische Verhalten von Ratten unter „rotem“ und „weißem“ Licht. Ratten sind nachtaktiv, und das diffuse rote Licht ahmt die Dunkelheit nach.

Die lokomotorische Aktivität wurde anhand der Häufigkeit an übertretenen Quadraten auf dem Boden der Testbox gemessen. Die Exploration wurde mit Hilfe der Anzahl vertikaler „Rearings“ (Aufrichten der Ratten) auf den Hinterbeinen erfaßt. Vierundzwanzig Ratten wurden für fünf Minuten unter „rotem“ Licht und ,eine Woche später, für fünf Minuten unter „weißem“ Licht beobachtet. Die lokomotorische und exploratorische Aktivität war unter „rotem“ Licht deutlich höher. Die Untersuchungen des Freiß- (Calhoun, 1962) und Sexualverhaltens bei männlichen Ratten (Larsson, 1956; Stefanick, 1983) zeigten ebenfalls höhere Aktivitäten bei „rotem“ Licht.

Aus diesen Ergebnissen resultierte die Idee eines neuen modifizierten Open-field-Tests. Eine Versuchsgruppe wurde an zwei Tagen unter „rotem“, für Ratten angenehmen Licht, beobachtet. Eine zweite Gruppe wurde gleichzeitig unter „weißem“, für Ratten aversiven Lichtverhältnissen, untersucht.

#### 2.5.1.2. Der Konflikttest

Beim Konflikttest befindet sich im Zentrum einer Open-field-Apparatur eine Petrischale mit bekanntem Pelletfutter.

Dieser einfache Test baut eine Konfliktsituation für eine hungrige Ratte auf. Der Konflikt entsteht zwischen der Angst vor einer neuen aversiven Umgebung und dem vorhanden Futterangebot (Rex et al., 1998).

Die Anzahl der Ratten, die gefressen haben und die Latenz bis zum „ersten Fressen“ wird ermittelt. Diese Parameter werden am aussagefähigsten für anxiolytische Effekte bei Ratten angesehen (Rex et al., 1998).

Die Reduktion der Messungen auf eine „ja-nein-Entscheidung“ für das Fressen vereinfacht die Analyse von angstbezogenem Verhalten (Rex et al., 1998). Hingegen haben die Zeit des Fressens, die Menge des gefressenen Futters und die Frequenz des Fressens keinen Informationsgehalt bezüglich des Angstverhaltens (Britton und Britton, 1981).

Britton und Britton (1981) prüften die Effekte von Anxiolytika bei futterdeprimierten Ratten im Konflikttest. Diazepam, Chlordiazepoxid, Pentobarbital und Ethanol führten zu einem Anstieg im Freißverhalten, d.h., die Menge des gefressenen Futters und die Anzahl der „Futterkontakte“ waren erhöht. Bei Morphinum und Haloperidol hingegen wurden diese Effekte nicht festgestellt.

Rex et al. (1996b) beschrieben anxiolytische Wirkungen von Diazepam und Abecarnil in diesem modifizierten Open-field-Test.

### 2.5.1.3. Der Social-interaction-Test

Dieser Test ist eine Weiterentwicklung des Open-field-Tests (File, 1978). Die aversive Umgebung des Open-fields verändert das Sozialverhalten von Tierpaaren (File und Hyde, 1978). Der Social-interaction-Test nutzt die Ungewißheit und Angst der Ratten in dieser unbekanntem bzw. hell erleuchteten Umgebung aus (File, 1987). Wenn Paare von männlichen Ratten sich in einem für sie unbekanntem, d.h., nicht etablierten Territorium befinden, kontaktieren sie bzw. beschnüffeln sich (File, 1978).

Zur Validierung des Tests auf Verhaltensbasis wurden, indikativ für Angst und Streß, die Defäkation und das Putzen als Ausdruck der Reduktion von sozialer Interaktion gewertet (File, 1980). Andere Ursachen für Reaktionsänderung, wie z.B. Exploration der Umgebung oder Änderung des Geruchs, wurden ausgeschlossen.

Zur physiologischen Validierung wurden die Änderungen des Adenocorticotropes Hormon (ACTH) -, Corticosteron- und Noradrenalinspiegels im Hypothalamus gemessen (File, 1992). Die Zeit der aktiven sozialen Interaktion wird während des Tests gemessen (z.B. Schnüffeln, den Partner putzen). Eine reduzierte Interaktion wird beobachtet, wenn die Partner sich nicht kennen bzw. der entsprechende Raum hell erleuchtet ist. Benzodiazepine kompensieren diese Effekte.

Wenn das Testgebiet bekannt und „dunkel“ (rot) beleuchtet ist, zeigen unbehandelte Tiere eine erhöhte soziale Interaktion. Die soziale Interaktion geht zurück, wenn das Versuchsfeld unbekannt und hell erleuchtet ist. Anxiolytische Substanzen heben diesen „Rückstand“ auf. Eine Steigerung der Kontaktzeit und -häufigkeit wird als angstmindernde Reaktion angesehen (File und Hyde, 1978; File, 1980).

### 2.5.2. Der Holeboard-Test

Boissier und Simon (1962; Übersicht: File und Wardill, 1975a) entwickelten den Holeboard-Test als einen einfachen Test, der die Reaktion von Mäusen auf eine neue Umgebung untersucht. Modifiziert wurde dieser Test von File (1973; Übersicht: File und Wardill, 1975a) und von File und Pope (1974; Übersicht: File und Wardill, 1975a) für Ratten.

In diesem Testsystem befinden sich Löcher im Boden der Apparatur. In diese Löcher können die Tiere ihren Kopf bzw. ihre Nasen stecken, das sogenannte „head-dipping“. File und Wardill (1975a) legten fest, daß „head-dipping“ der Messung von direkter Exploration entspricht. Eine Anzahl von Studien haben gezeigt, daß „head-dipping“, d.h. Exploration und Lokomotion, unabhängig voneinander variieren können (File, 1977; Lister, 1987a; Durcan und Lister, 1989). Der Holeboard-Test basiert auf einer gerichteten Exploration der Tiere, welche durch die eingefügten Löcher im Boden der Testbox hervorgerufen wird (Durcan und Lister, 1989). Unbehandelte Tiere wurden in einer Anzahl von Studien auf einen Zusammenhang zwischen lokomotorischer und exploratorischer Aktivität untersucht. Es

wurde von File (1985b) ein geringfügiger und von Lister (1987b) kaum ein Zusammenhang zwischen der lokomotorischen und der exploratorischen Aktivität bei diesem Test beschrieben.

Eine dosisabhängige Abnahme der lokomotorischen Aktivität nach einer Gabe von Pharmaka spricht für einen sedativen Effekt. Deshalb muß neben der exploratorischen auch die lokomotorische Aktivität gemessen werden, um sedative Effekte von verabreichten Substanzen auszuschließen.

Der Test ist für „naive“ und „retesting“ Tiere geeignet. Eine zehnminütige Testzeit erwies sich als ausreichend (File und Wardill, 1975b).

### 2.5.3. Der Black-white-box-Test

Dieser Test basiert auf der natürlichen Aversion von Mäusen und Ratten gegenüber hell erleuchteten Räumen (File, 1980). Crawley (1981) entwickelte den Test, in dem die Anzahl an Übergängen zwischen einem Licht- und einem Dunkel- Kompartiment genutzt wurde, um Angst zu messen. Die Mäuse wurden mit dem Wunsch, eine neue Umgebung erkunden zu wollen und ihrer Aversion gegenüber hellem Licht, konfrontiert. Die Tiere zeigten eine klare Präferenz für das dunkle Kompartiment. Der Anstieg der Anzahl an Übergängen, ohne einen Anstieg der generellen Lokomotion, wird als anxiolytischer Effekt angesehen. Costall et al. (1987) definierten eine anxiolytische Wirkung als einen Anstieg von „Rearings“ und lokomotorischer Aktivität in dem beleuchteten Kompartiment und/oder ein Abfall dieser Verhaltensparameter in dem dunklen Kompartiment.

Anxiolytisch wirkende Substanzen verlängern den Aufenthalt und die Exploration im hellen Teil der Box (Crawley und Goodwin, 1980; Blumstein und Crawley, 1983) und lassen die Zahl der Übertritte zwischen beiden Kompartimenten ansteigen.

Der Test ist sensitiv bezüglich anxiolytischer und anxiogener Wirkungen von Pharmaka bei Nagern (Lister, 1990), aber es gibt auch in diesem Test widersprüchliche Ergebnisse verschiedener Untersucher (Costall et al., 1987).

### 2.5.4. Der Elevated-plus-maze-Test

Das Elevated-plus-maze ist ein anerkannter Angsttest, der zur Zeit am meisten verwendet wird. Dieser Test basiert auf der natürlichen Angst von Nagern vor offenen Plätzen (Treit et al., 1993). Es entsteht beim Versuchstier ein Konflikt zwischen dem „Wunsch“ der Exploration und der aversiven Umgebung (File, 1992). Der Test wird zur Charakterisierung anxiolytischer Substanzen und zur Erforschung von neurobiologischen Angstmechanismen genutzt (Setem et al., 1999). Er wurde für Ratten (Setem et al., 1999) und Mäuse (Lister, 1987b) etabliert und ist verhaltens-, pharmakologisch- und physiologisch validiert bei Ratten (Pellow et al. 1985; Pellow und File, 1986).

Das Elevated-plus-maze leitet sich von einer Apparatur von Montgomery (1955) ab. Der Test beruht auf einer Beziehung zwischen Furcht und exploratorischem Antrieb bei Ratten. Ziel der Entwicklung war es, Neugier und Furcht zu wecken und dadurch einen „Vermeidungskonflikt“ hervorzurufen. Montgomery (1955) fand heraus, daß Ratten auf einem Y-maze die „geschlossenen Bahnen“ (Arme mit Seitenwänden) bevorzugen. Diese Ergebnisse wurden interpretiert als Hinweis dafür, daß offene Arme gegenüber geschlossenen Armen ein höheres Niveau an Furcht erzeugen und somit zur Meidung von offenen Armen führen.

Diese initiale Vorstellung wurde von Handley und Mithani (1984) zu einem potentiellen Angsttest weiterentwickelt.

Die Apparatur besteht aus je zwei sich gegenüberliegenden Armen, die entweder ohne Seitenwände oder von Seitenwänden umgeben sind. Das „Plus-maze“ ist zirka 60cm vom Erdboden erhöht, um einen zusätzlichen aversiven Reiz auszulösen.

Was ruft die Meidung der offenen Arme hervor?

File (1992) bezeichnet in erster Linie die Höhe und die „Offenheit“ der Arme und sekundär die Lichtstärke als Ursache der erzeugten Angst.

Treit und Kollegen variierten die Höhe des Elevated-plus-maze. Sie erzielten dabei keinen bzw. kaum einen Effekt. Das wichtigste Charakteristikum der Meidung der offenen Arme ist laut Falter et al. (1992) und Treit et al. (1993) der Mangel bzw. das Fehlen von Seitenwänden. Dieses Ergebnis bestätigt, daß Nager in neuer Umgebung erhöhte Thigmotaxis zeigen.

Pellow et al. (1985) stellten fest, daß Ratten erhöhtes „Furchtverhalten“ in Form verstärkter Unbeweglichkeit und Defäkation auf den offenen Armen zeigten.

Der Elevated-plus-maze-Test zeigt anxiolytische und anxiogene Pharmakonwirkungen bei Nagern an (Lister, 1990). Die prozentuale Erfassung der Eintritte in die offenen Arme mißt die durch Furcht induzierte Hemmung von exploratorischer Aktivität (Chopin und Briley, 1987). Das Verhältnis von Eintritten und Aufenthaltszeiten auf den offenen Armen wird zur Ermittlung von Angstindizes genutzt. Diese Indizes korrelieren negativ mit der Angst, da ihre Werte bei der Gabe von klassischen Anxiolytika ansteigen und bei der Gabe von anxiogenen Substanzen abfallen (Almeida et al., 1991; Chopin und Briley, 1987; Guimaraes et al., 1990; Pellow und File, 1986; Pellow et al., 1985).

Der Test besitzt eine gute Sensitivität gegenüber Pharmaka, die am GABA<sub>A</sub>/Benzodiazepin-Rezeptor-Komplex angreifen (Davis, 1991). Serotonerge Substanzen zeigten widersprüchliche Wirkungen in diesem Test. Bei der Behandlung mit 5-HT<sub>1A</sub>-Agonisten wurde über anxiolytische (Almeida et al., 1991; Critchley und Handley, 1987b; Kostowski et al., 1992), anxiogene (Critchley und Handley, 1987a; Motta et al., 1992; Pellow et al., 1987) und keinerlei Effekte (Artaiz et al., 1995; Critchley und Handley, 1987a; Critchley und

Handley, 1987b; Pellow und File, 1986) berichtet. Ähnliche widersprüchliche Studien existieren für die 5-HT<sub>2</sub>- (Pellow et al., 1987; Wright et al., 1992) und die 5-HT<sub>3</sub>- (Artaiz et al., 1995; File und Johnston, 1989; Wright et al., 1992) Rezeptor-Antagonisten.

Pellow et al. (1985) beschreiben den Elevated-plus-maze-Test als einen vorteilhaften Test aus folgenden Gründen:

1. der Test ist schnell, einfach und ohne teures Zubehör durchzuführen,
2. er basiert auf spontanem Verhalten und vermeidet damit Ermüden und Training,
3. er ist fähig, akute anxiolytische Effekte von Benzodiazepinen zu identifizieren.

Ein weiterer Vorteil des Tests ist die unabhängige Erfassung der lokomotorischen Aktivität durch die Anzahl der Gesamteintritte in die offenen und geschlossenen Arme.

Der Elevated-plus-maze-Test wird als validiertes Angstmodell für Ratten und zur „Vorhersage“ von Substanzreaktionen beim Menschen genutzt (Lister, 1990).

#### 2.5.5. Der Free-exploratory-paradigm-Test

Es ist bekannt, daß Mäuse und Ratten in einer Umgebung, in der sie sich frei bewegen können bzw. die Wahl zwischen dem bekannten und dem unbekanntem Kompartiment haben, oft eine „annähernde Reaktion“ gegenüber dem neuen Kompartiment zeigen (Griebel et al., 1993). Hughes (1968), Misslin und Ropartz (1981) beschreiben diese Reaktion der Tiere als Neugier oder „Neues-suchendes“ Verhalten, gefolgt von einer deutlichen Präferenz für unbekannte Plätze und starken exploratorischen Reaktionen.

Griebel et al. (1993) entwickelten einen Test, in dem Mäuse in einer Box beobachtet wurden, in der ein Teil der Box den Mäusen bereits bekannt und der andere Teil unbekannt war. Der Test wurde im für die Mäuse bekannten Tierstall durchgeführt.

Dieser Test wurde modifiziert. Käfige von vier einzeln sitzenden Tieren wurden im bekannten Tierstall nebeneinander gestellt. Der Deckel der Einzelboxen wurde als eine Art Treppe jeweils in die Boxen eingehängt. Die Tiere konnten problemlos aus ihren Boxen heraus und die neue Umgebung und ihre „Nachbarn“ kennenlernen. Es wurde die Zeit registriert, die die Tiere außerhalb ihrer Boxen verbrachten.

#### 2.6. Transgene und gendefiziente Tiere zur Untersuchung des Angstverhaltens

Transgene Tiere sind Individuen, die als Folge einer experimentellen Übertragung in ihren somatischen und meist auch in ihren Keimbahnen rekombinierte DNA-Sequenzen

(Transgene) tragen. Es können insbesondere physiologische und pathologische Situationen im Versuchstier auf molekularer Ebene rekonstruiert werden (Brem, 1993).

Mit der Entwicklung transgener Tiermodelle ist eine vielversprechende Technik entstanden, die neue Erkenntnisse über die Ursachen und Therapiemöglichkeiten von Erkrankungen des Nervensystems ermöglicht.

Obwohl komplexe Erkrankungen wie Depression und Schizophrenie im Tiermodell wahrscheinlich nicht vollständig „abgebildet“ werden können, ist es möglich, genetische Einflüsse auf einzelne Kardinalsymptome psychiatrischer Syndrome tierexperimentell zu untersuchen.

Die Mutation eines einzelnen Gens kann spezifische Verhaltensänderungen, komplexe Verhaltensänderungen oder keine Verhaltensänderungen auslösen.

Es ist notwendig, den Phänotyp der genmanipulierten Tiere durch Verhaltensuntersuchungen zu erfassen und zu quantifizieren. Solche Tiermodelle mit Verhaltensanomalien sind von großem Wert für die Erforschung der Ursachen psychiatrischer Syndrome und ihrer Therapie.

Transgene Tiere können heute mit verschiedenen Techniken hergestellt werden. Bei den sogenannten *knockout*-Tieren wird ein Wirtsgen inaktiviert. Klinische und tierexperimentelle Studien zeigten einen Zusammenhang zwischen verschiedenen psychiatrischen Erkrankungen und einer Störung des serotonergen Systems (Asberg et al. 1987; Übersicht: Montkowski und Holsboer, 1996). Saudou et al. (1994; Übersicht: Montkowski und Holsboer, 1996) entwickelten eine 5-HT<sub>1B</sub>-Rezeptor-*knockout*-Maus, da Studien gezeigt haben, daß Agonisten dieses Rezeptorsubtyps antiaggressive Eigenschaften besitzen. Die Aggressivität dieser Tiere wurde in einem Verhaltenstest ermittelt. Die 5-HT<sub>1B</sub>-Rezeptor-Mäuse verhielten sich in diesem Test deutlich aggressiver gegenüber ihren Kontrolltieren (Montkowski und Holsboer, 1996).

Eine andere transgene Technik ist dadurch gekennzeichnet, daß ein fremdes Gen in das Genom von Tieren, den sogenannten transgenen Tieren, eingebaut wird (Voigt et al., 2000). Dem im Hypothalamus synthetisierten Neuropeptid Corticotropin-releasing Hormon (CRH) wird eine zentrale Rolle in der Entstehung pathologischer Angstzustände zugeschrieben (Holsboer, 1995; Übersicht: Montkowski und Holsboer, 1996). Vale et al. (1994; Übersicht: Montkowski und Holsboer, 1996) entwickelten eine transgene Maus, die vermehrt CRH produziert. Dies wiederum führte zu einer erhöhten ACTH- und Kortikosteronfreisetzung. Verhaltensstudien in experimentellen Angsttests zeigten, daß die Tiere ängstlicher waren als ihre Kontrolltiere (Stenzel-Poore et al., 1994; Übersicht: Montkowski und Holsboer, 1996).

Bei Angiotensin(AT)<sub>2</sub>-defizienten Mäusen wurde das AT<sub>2</sub>-Rezeptor-Gen inaktiviert, um die Rolle der AT-Rezeptoren im ZNS zu prüfen. Die Mäuse zeigten, verglichen mit dem Wildtyp, „ängstlicheres“ Verhalten. Noradrenerge- und Corticotropin-releasing Faktoren neuronaler

Systeme scheinen in dieses „ängstliche“ Verhalten involviert zu sein. Durch z.B. Diazepam, Captopril und Prazosin ( $\alpha_1$ -Antagonist) wird das ängstliche Verhalten bei diesen Mäusen gedämpft (Okujama et al., 1999).

Anhand der Beispiele transgener Tiermodelle wird erkennbar, daß diese Tiere eine große Bedeutung in der Aufklärung der Ursachen und der Therapie von psychiatrischen Erkrankungen haben können. Allerdings kann die Ausschaltung oder die gezielte Veränderung eines bestimmten Gens zu Morbidität und Letalität oder durch adaptive Prozesse zu Sekundärveränderungen führen. Dies kann das Verhalten so stark beeinflussen, daß ein direkter Rückschluß „vom Gen zum Verhalten“ nur bedingt möglich wird (Montkowski und Holsboer, 1996).

### 2.6.1. Die transgene Ratte - TGR (mRen2)27

Bluthochdruck ist ein polygenetischer Zustand. Er ist die Hauptursache von kardiovaskulären Krankheiten mit Todesfolgen durch zerebrale Hämorrhagien, Herzversagen und Nierenkrankheiten. Gene, die eine zentrale Rolle in der Bluthochdruckkontrolle spielen, wurden charakterisiert und geklont.

Die untersuchte transgene Ratte besitzt zusätzlich das Ren-2-Gen der DBA Maus (spezieller Mäusestamm), wodurch starker Bluthochdruck verursacht wird.

Die TGR (mRen2)27 repräsentiert deshalb ein Tiermodell für Bluthochdruck (Mullins et al., 1990).

Die Herstellung der TGR-(mRen2)27 Ratte erfolgt mittels Desoxyribonukleinsäure(DNA)-Mikroinjektion in das Genom der SD-Ratte. Bei dieser Technik werden befruchtete Eizellen aus einer trächtigen Ratte isoliert und ein lineares DNA-Fragment, das DBA-Maus/2J Ren-2-Gen, einschließlich der 5,3 und 9,5 Kilobasen von 5' und 3' flankierten Sequenzen, mikroinjiziert (Mullins et al., 1990). Die Eizellen werden anschließend in die Eileiter von Ammentieren reimplantiert und können sich weiter entwickeln.

Die verwendete TGR-Ratte ist eine Kreuzung zwischen der weiblichen homozygoten transgenen Ratte mit dem (mRen2)27 Gen und der männlichen SD-Ratte. Die in dieser Arbeit verwendete männliche transgene (mRen2)27 Ratte ist somit heterozygot für das (mRen2)27 Gen.

Weibliche und männliche transgene Ratten entwickeln ab der vierten Woche rapiden Bluthochdruck, und das Maximum wird in einem Alter von neun Wochen erreicht (Mullins et al., 1990). Zwischen der 5.-15. Woche steigt der Blutdruck bis auf 300 mm Hg an (Sander et al., 1992). Die Applikation von 10 mg/kg Captopril (Angiotensin-Converting-Enzyme Inhibitor) pro Tag in das Trinkwasser reduziert den Blutdruck um 40-60 mm Hg (Mullins et al., 1990).

Die Nebennieren, hauptsächlich die Zellen der Zona glomerulosa, zeigen eine

Überexpression der Maus-Renin-mRNA. In der Nebenniere der TGR-Ratten sind im Vergleich zu den Kontrolltieren größere Mengen des Reninproteins gelagert. Dagegen wird in der Niere der transgenen Ratte kaum noch Renin produziert. Auf immunhistochemischer Ebene zeigen die Nieren der transgenen Ratten signifikant reduzierte Renin- und Angiotensin II-Immunoaktivität in der afferenten Arteriole. Ultrastrukturelle Analysen von der afferenten Arteriolenwand zeigen die vollständige Abwesenheit von reninsekretorischer Granula. Die Wand der Arteriolen und Arterien in der Niere ist stark verdickt. Glomeruläre Schäden, einschließlich verschiedener Stufen von Sklerosen, wurden beobachtet. Die thorakale Aorta zeigt Verdickungen in der Tunica media durch Muskelhypertrophie und interstitielle Fibrose. Die Wand der Koronararterien und -arteriolen ist verdickt und perivaskuläre Fibrosen treten auf.

Die genannten Fakten zeigen, daß die TGR-Ratten alle typischen Merkmale bzw. Charakteristika der Pathologie des Bluthochdrucks aufweisen. Damit ist die TGR-Ratte ein interessantes Modell für entsprechende therapeutische Ansätze (Bachmann et al., 1992).

Der Angiotensingehalt im Plasma ist vermindert. Im Urin der TGR-Ratten wurde ein erhöhter Wert an Aldosteron festgestellt (Mullins et al., 1990).

Moriguchi et al. (1995) konnten feststellen, daß die Expression des Ren-2-Gens in der TGR-Ratte assoziiert ist mit einer ansteigenden Konzentration von Angiotensin II und Angiotensin (1-7) im ZNS. Angiotensin II wurde z.B. im Hypothalamus bei der TGR-Ratte mit 827% und Angiotensin (1-7) mit 168% über dem Wert der SD-Kontrolltiere gefunden. Angiotensin I und Angiotensin II zeigten erhöhte Werte in der Medulla oblongata (Senanayake et al., 1994).

Bisher wurde angenommen, daß der Bluthochdruck der TGR-Ratte aus der Überexpression des Ren-2-Gens in der Nebenniere resultiert. Nach Entfernung der Nebenniere trat eine Normalisierung des Blutdrucks ein. Moriguchi et al. (1995) bezweifelten diese Annahme, da der normale Blutdruck zeitlich begrenzt und durch die Abnahme an Steroidhormonen begründet sein kann. Sie stellten fest, daß die Erhaltung des Bluthochdrucks bei der TGR-Ratte auch in Beziehung stehen könnte mit der erhöhten Expression des Ren-2-Gens im Gehirn. Die Applikation von Angiotensin II-Antikörpern intracerebroventricular (i.c.v.) in verschiedenen Dosen verursachte bei TGR-Ratten eine Senkung des Blutdrucks und Bradykardie, jedoch bei SD-Ratten blieb die Applikation ohne Effekte.

In Verhaltensuntersuchungen die von Wilson et al. (1996) und Voigt et al. (2000) zur Charakterisierung des Phänotyps durchgeführt wurden, ist festgestellt worden, daß die transgenen Ratten im Elevated-plus-maze-Test ängstlicher als die Kontrolltiere waren. Es

entsteht die Frage, ob diese Verhaltensänderung auf die Blutdruckveränderung der TGR-Ratten zurückzuführen ist. Söderpalm (1989) untersuchte spontan hypertensive Ratten. Diese Ratten waren weniger ängstlich als ihre normotensiven Kontrolltiere.

Daraus ergibt sich ein interessanter Ansatz, die Rolle von Angiotensin im Verhalten, speziell im Angstverhalten, zu untersuchen. Andererseits muß der Befund von Wilson et al. (1996) und Voigt et al. (2000) auch in anderen Angstmodellen beim Tier bestätigt werden, ehe tatsächlich davon gesprochen werden kann, daß Angiotensin eine Rolle bei der Ausprägung von Angstsymptomen spielt. Da das Angstverhalten im jeweiligen Test von einer Vielzahl von Variablen abhängen kann, ist das Ergebnis vom Elevated-plus-maze-Test vorsichtig zu bewerten.

#### 2.6.1.1. Das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS)

Neben dem katecholaminergen System ist das RAAS das bedeutendste hormonelle System für die Regulation des Blutdrucks.

Die sogenannten juxtaglomerulären Zellen der Niere sind hauptsächlich Ort der Synthese, Speicherung und Freisetzung des limitierenden proteolytischen Enzyms Renin. Die lokale Freisetzung von Renin setzt eine Reaktionskette in Gang, durch die schließlich die tubuläre Natrium- und Wasserresorption gesteigert und der arterielle Blutdruck erhöht wird.

Endokrine Zellen in den Wänden der afferenten Glomerulusarteriolen produzieren Renin als eine Antwort auf eine abnehmende Nierenperfusion und Plasmakonzentration an Natrium. Die Stimulation der  $\beta_1$ -Adrenozeptoren in den Nieren durch den Sympathikus erhöht ebenfalls die Reninfreisetzung.

Die Plasmahalbwertszeit des Renins beträgt 15 Minuten bei der Ratte und bis zwei Stunden beim Menschen (Peach, 1977).

Renin spaltet enzymatisch Angiotensinogen, ein aus der Leber stammendes  $\alpha_2$ -Globulin, dessen Hauptreservoir das Plasma ist. Das entstandene Dekapeptid Angiotensin I besitzt keine größere biologische Bedeutung. Die Peptidase, das Angiotensin-Converting-Enzyme (ACE), ist in hohen Konzentrationen in der Niere und der Lunge vorhanden und spaltet das Oktapeptid Angiotensin II ab. Dieser Vorgang findet vor allem im Lungenkreislauf statt (Campbell, 1987).

Angiotensin II ist einer der effektivsten Vasokonstriktoren. Es stimuliert außerdem die Aldosteronproduktion in der Zona glomerulosa der Nebennierenrinde. Folge der erhöhten Aldosteronsekretion sind eine positive Natriumbilanz und dadurch ein Anstieg des effektiven Blutvolumens. Darüber hinaus bewirkt Angiotensin II eine Katecholaminfreisetzung, eine Prolaktinsekretion und induziert Durst (Lu et al., 1995). Die Halbwertszeit für Angiotensin II im

Blut beträgt bei der Ratte 13 Sekunden (Al-Merani et al., 1978). Aus Angiotensin II entsteht durch die Einwirkung einer Aminopeptidase das Heptapeptid Angiotensin (1-7). Angiotensin II und Angiotensin III werden durch Angiotensinasen inaktiviert.

Die klassischen physiologischen Aktionen werden primär von AT-Rezeptor-Subtypen vermittelt. Bisher sind zwei AT-Rezeptor-Subtypen in der Peripherie und im Gehirn charakterisiert worden. Der AT<sub>1</sub>-Rezeptor wird z.B. selektiv von Losartan blockiert (Timmermans et al., 1993), während der AT<sub>2</sub>-Rezeptor nur von experimentell eingesetzten Substanzen blockiert wird (Whitebread et al., 1989). Beide Rezeptor-Subtypen wurden in der Nebenniere von Ratten gefunden. In der Nebennierenrinde tritt vor allem der AT<sub>1</sub>-Rezeptor und im Nebennierenmark hauptsächlich der AT<sub>2</sub>-Rezeptor auf (Chiu et al., 1989a; Chiu et al., 1989b). Der AT<sub>2</sub>-Rezeptor ist in verschiedenen fetalen Geweben (Grady et al., 1991) und im unreifen Gehirn (Millian et al., 1991) reichlich vorhanden. Hingegen ist dieser Rezeptor im adulten Tier nur spärlich nachzuweisen. Außer primär in dem bereits erwähnten Nebennierenmark ist das Vorkommen der AT<sub>2</sub>-Rezeptoren im uterinen Myometrium (Whitebread et al., 1989), in den Granulosazellen der Ovarien (Pucell et al., 1991) und im ZNS (Millian et al., 1991) beschrieben worden. Diese Befunde deuten darauf hin, daß AT<sub>2</sub>-Rezeptoren eine Rolle im Wachstum und in der Entwicklung spielen könnten (Lu et al., 1995).

Die biologische Hauptrolle des AT<sub>2</sub>-Rezeptors ist noch nicht völlig gesichert (Okuyama et al., 1999).

#### 2.6.1.2. Die Rolle von Angiotensin im ZNS

Da die Komponenten des RAAS auch bei hohem Blutdruck nicht die Blut-Hirn-Schranke durchdringen, ist das Vorkommen der RAAS-Bestandteile im ZNS eine Grundvoraussetzung für ein zentrales RAAS (Printz, 1988). Obwohl das zentrale RAAS von dem peripheren RAAS wahrscheinlich unabhängig reguliert wird, beeinflusst zirkulierendes Angiotensin II das zentrale System über das „Circumventrikularorgan“ (Wright und Harding, 1994). Dieses „Organ“ befindet sich im proximalen Ventrikel des Gehirns. Es ist stark vaskularisiert und besitzt eine reduzierte Blut-Hirn-Schranke bzw. Rezeptoren, die nicht durch die Blut-Hirn-Schranke geschützt sind. Dadurch können das zentrale und das periphere RAAS mit peripheren Neuromodulatoren aufeinander einwirken (Wright und Harding, 1994). Renin konnte im Gehirn mittels Radioimmunoassay und Immunohistochemie identifiziert werden (Healy und Printz, 1984). Durch analytische Untersuchungen mittels HPLC (high performance liquide chromatography) konnte festgestellt werden, daß Liquor und

Gehirnextrakte verschiedener Spezies Angiotensin II enthalten, das mit dem im Plasma vorkommenden identisch ist (Hermann et al., 1982).

Da AT-Rezeptoren im Gehirn vorkommen, könnte Angiotensin die Funktion eines Neurotransmitters haben (Phillips, 1987). Bei jungen Ratten wird Angiotensin in Gehirnregionen produziert, die die motorische Aktivität beeinflussen und in Teilen des limbischen Systems (Tsutsumi und Saaverda, 1991). Ganong (1984), Printz et al. (1982) und Wisniewski und Braszko (1985) erkannten, daß Angiotensin II mehrere zentrale Neurotransmittersysteme beeinflusst. Für eine eigenständige Transmitterfunktion sprechen Interaktionen mit dem zentralen noradrenergen System, hinsichtlich einer Kontrolle des Trinkverhaltens und des Blutdrucks (Bellin et al., 1987) und mit dem zentralen dopaminergen System, bezüglich des Einflusses auf Lernen und Gedächtnis (Wisniewski und Braszko, 1984). Im Gehirn von Ratten wurden AT<sub>1</sub>- und AT<sub>2</sub>-Rezeptor-Subtypen charakterisiert. Die Verteilung der AT<sub>1</sub>- und AT<sub>2</sub>-Rezeptoren im Rattenhirn wurde durch Bindungsstudien mittels Radioliganden definiert (Heemskerk und Saaverda, 1995; Timmermans et al., 1993; Tsutsumi und Saaverda, 1991). Okuyama et al. (1999) stellten fest, daß AT<sub>1</sub>-Rezeptoren in selektiven limbischen Gebieten und in Strukturen vorherrschen, die in die kardiovaskuläre- und Flüssigkeitsregulation involviert sind, wie sie in Teilen des Hippokampus und dem Plexus choroidei vorkommen. AT<sub>2</sub>-Rezeptoren sind konzentriert auf Gebiete, die einbezogen sind in das Lernverhalten und die Kontrolle der motorischen Aktivität, die sensorischen Gebiete und selektiv limbische Systemstrukturen (Okuyama et al., 1999). AT<sub>1</sub>- und AT<sub>2</sub>-Rezeptoren wurden in der ausgewachsenen Ratte im cingulären Cortex, der molekularen Schicht des cerebellaren Cortex und dem superior Colliculus gefunden. Gegenüber der zwei Wochen alten Ratte ist die Dichte der letztgenannten Rezeptoren bei der erwachsenen Ratte erheblich reduziert (Tsutsumi und Saaverda, 1991). Es existieren Befunde, daß AT<sub>1</sub>- und AT<sub>2</sub>-Rezeptoren bei der Vermittlung von Angst eine Rolle spielen könnten (Kaiser et al., 1992, Barnes et al., 1991). Andererseits gibt es widersprüchliche Ergebnisse mit den jeweiligen Antagonisten Losartan (AT<sub>1</sub>-Rezeptor) und PD 123177 (AT<sub>2</sub>-Rezeptor), die zu erhöhter Gedächtnisleistung ohne den Einfluß von Angst geführt haben. Im Widerspruch dazu berichteten Shepherd et al. (1996), daß diese Antagonisten keine bedeutenden Effekte in Tiermodellen bezüglich Angst und Gedächtnis haben. Daraus ist ersichtlich, daß die zentrale Rolle dieser Rezeptoren noch nicht klar ist.

Der AT<sub>1</sub>-Rezeptor-Antagonist Losartan (Kaiser et al., 1992) und der ACE-Hemmer Captopril (Costall et al., 1990) wurden genutzt, um die Wirkung von endogenem Angiotensin II zu hemmen. Das durch die letztgenannten Substanzen hervorgerufene „anxiolytische“ Verhalten deutet auf eine funktionelle Relevanz des AT<sub>1</sub>-Rezeptors hin. Eine mögliche Erklärung für das ängstliche Verhalten bei AT<sub>2</sub>-defizienten Mäusen könnte die Aktivierung

von AT<sub>1</sub>-Rezeptoren sein, da keine AT<sub>2</sub>-Rezeptoren im ZNS vorhanden sind (Gelband et al., 1998; Sumners, 1992).

Kulakowska et al. (1996) prüfte die Rolle des AT<sub>1</sub>-Rezeptors in unterschiedlichen Lern- und Gedächtnistests an Wistar-Ratten mit Losartan. Jedoch Losartan allein (1µg) zeigte in verschiedenen Verhaltenstests keinen Effekt. Es wurde 1nmol Angiotensin II i.c.v. appliziert. Die „Objektwiedererkennung“ und die konditionierten „Vermeidungsreaktionen“ wurden damit deutlich verbessert. Andere Studien berichten ebenfalls von erhöhtem Explorations- und Lernverhalten und verbesserter Gedächtnisleistung bei Ratten aufgrund dieser Applikation (Braszko et al., 1987; Yonkov et al., 1987). Wurde fünf Minuten vor der Angiotensin II-Applikation Losartan verabreicht, verbesserten sich die passive „Vermeidungsreaktion“ und die „Objektwiedererkennung“. Diese Ergebnisse weisen auf eine bedeutende Einbeziehung des AT<sub>1</sub>-Rezeptors bzw. des Angiotensin II in Bezug auf Lern- und Gedächtniseffekte hin.

Angiotensin II, mikrojiziert in das Hippokampus-Gebiet des Gehirns, beeinflusste die motorische Aktivität und zeigte anxiolytische Effekte (Belcheva et al., 1997). Im Widerspruch dazu bewirkte die i.c.v. Gabe von Angiotensin „anxiogenes“ Verhalten im Vogel-Konflikt-Test (Gerlai, 1996a). Über anxiolytische Effekte von ACE-Hemmern und vom Angiotensin-Antagonist Losartan wurde berichtet (Costall et al., 1990; Kaiser et al., 1992).

Die Tatsache, daß nicht nur Angiotensin sondern auch Angiotensin-Antagonisten und ACE-Hemmer verhaltensaktiv sind, deutet auf eine bedeutende Rolle des Systems Verhalten hin.

## 2.7. Tierstammvergleiche

Die Nutzung unterschiedlicher Rattenstämme bzw. gleicher Rattenstämme von verschiedenen Züchtern in Verhaltensversuchen ist problematisch. In mehreren Studien wurde über teils voneinander abweichende Ergebnisse und unterschiedliche Reaktionen auf anxiolytische Substanzen berichtet. File und Vellucci (1979) testeten Hooded-Ratten (Rattenstamm) von drei unterschiedlichen Züchtern im Social-interaction-Test und in einem Test zur Bewertung des exploratorischen Verhaltens. Außerdem bestimmten sie zur Bewertung des Stresses Kortikosteron, Noradrenalin und Dopamin. Die Hooded-Ratten verschiedener Züchter zeigten sowohl in den Verhaltens- als auch in den biochemischen Messungen von „Angst“ und „Stress“ Unterschiede. Abweichende Umweltfaktoren oder genetische Veränderungen der zur Zucht eingesetzten Ratten waren bei diesen drei Züchtern nicht bekannt. Es wurde berichtet, daß Benzodiazepine auf unterschiedliche Mäusestämme abweichende Wirkungen haben (Crawley und Davis, 1982; File, 1983). File (1983) untersuchte verschiedene Stämme von Mäusen, die nach PTZ-Injektion tonisch-

klonische Krämpfe zeigten. Gegen diese Krämpfe wurde den Mausstämmen Diazepam (Anti-PTZ-Effekt) injiziert. Nach zirka fünf Tagen kam es zur Ausprägung von Diazepam-Toleranzen, wobei der Zeitpunkt der Toleranzentwicklung bei den einzelnen Mausstämmen unterschiedlich war. Die Ursache dieser Tierstammunterschiede ist nicht bekannt.

Die Ergebnisse mehrerer Studien haben gezeigt, daß es teilweise unterschiedliche Reaktionen auf anxiolytische Substanzen in gleichen Angstmodellen und Testbedingungen gibt (File, 1985b). Speziell Nichtbenzodiazepin-Anxiolytika (Broekkamp et al., 1989; Chopin und Briley, 1987; Griebel, 1995) wie 5-HT<sub>1A</sub>-Agonisten (Critchley und Handley, 1987b) oder 5-HT<sub>3</sub>-Antagonisten sind in mehreren Tiermodellen, beispielsweise im Elevated-plus-maze-Test und im Social-interaction-Test, ineffektiv (File und Johnston, 1989).

Ursachen für diese unterschiedlichen Befunde in verschiedenen Laboratorien können abweichende Umweltbedingungen sein (Walsh und Cummins, 1976). Wie bereits erwähnt ist bekannt, daß das „Grundverhalten“ von verschiedenen Bedingungen, wie z.B. Streß und Handling der Tiere, Lichtregime, vorherige Tests und Unterkunft der Tiere deutlich beeinflusst wird (Dawson und Tricklebank, 1995; Rodgers und Cole, 1995). Angst- und Furchtverhalten wird außerdem vom Geschlecht und dem Alter der Tiere beeinflusst (File, 1992). Abweichungen im „Grundverhalten“ der eingesetzten Tiere bei der Erfassung von Angst- und Explorationsverhalten könnten in Bezug auf die Wirkung von anxiolytischen Substanzen ein kritischer Punkt sein und müssen vor Versuchsbeginn geklärt werden (Rodgers und Cole, 1995).