

## **4. Diskussion**

### **4.1. Angst und Verhaltensuntersuchungen an Tieren**

Angstgefühl selbst ist nicht meßbar. Erfäßbar sind aber die Folgeerscheinungen der Angst, die an den Verhaltensänderungen des Versuchstieres zu beobachten sind. Einzelne Komponenten der komplexen Verhaltensweisen können objektiviert, also gemessen werden (z.B. Häufigkeit einer bestimmten Bewegung, zurückgelegte Wegstrecken, Latenzen). Durch Reize, wie Isolation und Schmerz, sowie durch künstlich erzeugte Konfliktsituationen können auch beim Tier Reaktionen ausgelöst werden, die den Folgeerscheinungen der Angst des Menschen ähneln.

In Verhaltensuntersuchungen werden immer die Reaktionen des Gesamtorganismus betrachtet. Aussagen über die Funktion eines bestimmten Hirnareals oder spezieller Bahnsysteme sind damit nicht möglich. Vor und während der Untersuchungen können Streßfaktoren und andere spezielle Testsituationen beeinflussende Faktoren nicht ausgeschlossen bzw. ausgeschaltet werden und damit die Ergebnisse beeinflussen. Eine weitere Einschränkung der verhaltenspharmakologischen Methoden liegt in der Frage, inwieweit die in Tierversuchen erhaltenen Befunde auf den Menschen übertragbar sind. Es gibt bis heute kein Tiermodell, welches adequat diagnostische Kriterien und Behandlungsergebnisse vom Menschen nachahmen kann (Weiss et al., 2000).

Beim Menschen ist die Angst mit Krankheitswert erkennbar und behandlungsbedürftig. Beim Tier jedoch ist die Differenzierung zwischen adequaten und übersteigerten Reaktionen auf einen Angstreiz schwierig.

Die Angst bei unseren Haus- und Heimtieren ist von vielen Faktoren, vor allem von genetischen Faktoren und den Erfahrungen des Tieres, abhängig. Von Pferden ist bekannt, daß sie Furcht vor Menschen, anderen Tieren und auch vor Insekten entwickeln können. Die Fahrt im Auto ist für Katzen oft mit extremem Streß und Ängsten verbunden. In der Hundezüchtung gibt es für unterschiedliche Rassen teilweise gegensätzliche Zuchtziele, wie z.B. liebevolles oder aggressives Temperament der Hunde. Dabei treten unweigerlich Verhaltensprobleme auf. Es ist bekannt, daß Hunde Angst vor sozialer Isolation, bestimmten Geräuschen (z.B. Feuerwerk), Wettererscheinungen (Gewitter), glatten Oberflächen oder Treppen entwickeln können. Einige Hunde, die in ständiger Furcht und Angst leben, zeigen eine subklinische Hyperthyreose (Mertens und Dodman, 1998). Die Psychopharmakologie in der Veterinärmedizin steht noch am Beginn einer Entwicklung. Man ist dabei, Diagnosekriterien für bestimmte krankhafte Verhaltensstörungen festzulegen und

entsprechende Psychopharmaka beim Haustier, vor allem bei Hunden und Katzen, einzusetzen. Bei „Angsterkrankungen“ hat sich eine konsequente Verhaltenstherapie, gekoppelt mit der Gabe von Anxiolytika, bewährt. Durch die Gabe von Anxiolytika wird einerseits der Erfolg der Therapie beschleunigt und andererseits der Besitzer ermuntert, das gesamte Therapieprogramm zu befolgen.

Der Einsatz verschiedener Anxiolytika birgt ähnliche Probleme wie in der Humanmedizin in sich. Beispielsweise zeigen Benzodiazepine in vielen Spezies Abhängigkeiten mit anschließenden Entzugerscheinungen. Bei Katzen wirken sie lebertoxisch. Eine Befürwortung des Einsatzes von Pharmaka zur Behandlung der Angst bei Haustieren ist durch den Animal Medicinal Drug Use Clarification Act 1994 öffentlich erfolgt. Stein (1998) arbeitet an einer Klassifikation von Verhaltensstörungen bei Tieren, die für praktizierende Tierärzte nachvollziehbar und praktikabel ist. Obwohl die Psychopharmakologie bei Tieren ein relativ junges Feld ist, ist die Nutzung von Daten aus der Humanmedizin und damit auch die der Labortiere von großem Vorteil. Allerdings fehlen noch immer klinische Studien zur therapeutischen Wirksamkeit der eingesetzten Pharmaka.

Probleme bestehen bei jeder Art von Tierversuchen unter Laborbedingungen, da man die Tiere im unnatürlichen Lebensraum hält und untersucht (Kischka et al., 1997). „Konstruierte“ Angstversuche an Labornagern können in Bezug auf die verschiedenen meist unvollständig geklärten menschlichen Angsterkrankungen deshalb nur Kompromisse darstellen (Lister, 1990; Treit, 1985).

Verhaltensanalysen sind notwendig, um phänotypische Unterschiede zwischen verschiedenen Züchtungen bzw. dem Wildtyp und den Ratten mit Genmanipulationen zu charakterisieren. Sie können behilflich sein, die richtige Richtung einzuschlagen, um die zugrunde liegenden neurobiologischen Mechanismen von Angstzuständen zu erkennen (Gerlai, 1996b).

In den vorliegenden Untersuchungen sollte ein Angstzustand durch nachvollziehbare Stimuli unter Ausnutzung angeborener Verhaltensweisen bei den getesteten Ratten erzeugt werden. Diese Anforderungen erfüllen die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Tests.

#### 4.2. Verhaltensuntersuchungen an der TGR(mRen2)27

In der vorliegenden Arbeit sollte das Angstverhalten der TGR-Ratte untersucht werden. Um das Verhalten dieser Ratte beurteilen zu können, war es notwendig, die Ergebnisse mit

denen der „ursprünglichen“, nicht genetisch veränderten Ratte (der SD-Ratte) zu vergleichen.

In komplexer Weise wird das „Verhalten“ von Ratten im Gehirn organisiert. Das Verhalten von genmanipulierten Tieren kann durch die drei nachfolgend beschriebenen Möglichkeiten beeinflusst werden.

1. Das Gen bestimmt bzw. verändert eine spezielle Verhaltensweise. Diese Veränderung ist dann meßbar.
2. Die Genmanipulation wird im Spontanverhalten kompensiert. Diese genetische Veränderung ist dann möglicherweise durch Gabe eines Stimulus sichtbar.
3. Durch die Änderung eines Gens werden zusätzlich kompensatorische bzw. sekundäre und tertiäre usw. Mechanismen aktiviert. Das Verhalten dieser Tiere würde sich insgesamt verändern. Es ist möglich, daß ein zusätzliches Gen biologische Reaktionen in größerem Umfang auslöst, als bisher angenommen wurde (Gerlai, 1996b).

Der Phänotyp dieser genetisch veränderten Ratten wird nicht nur durch genetische Faktoren, sondern auch durch nichtgenetische, d.h. Umweltfaktoren, bestimmt (Voigt et al., 2000). Das kann bedeuten, daß die Verhaltensänderungen nur unter bestimmten Umweltbedingungen zur Ausprägung kommen. Folglich ist es nahezu unmöglich, das Verhalten einer transgenen Ratte vorauszusagen.

Daraus ergibt sich die Notwendigkeit, das Verhalten dieser Tiere so sorgfältig und umfassend wie möglich zu analysieren. Dazu gehören nicht nur spontane Verhaltensweisen, sondern auch das stimulierte und motivierte Verhalten sowie Lern- und Gedächtnisleistungen. Auch die Wirkungen von Pharmaka auf transgene Tiere können verändert sein. Aus diesem Grunde wurden bei der TGR-Ratte nicht nur das Angstverhalten, sondern auch verschiedene andere Verhaltensweisen untersucht, die mit dem Angstverhalten bzw. dem Ablauf der Angsttests in Verbindung stehen, wie die Lokomotion im Elevated-plus-maze-Test oder das Freßverhalten im Konflikttest.

Außerdem war es notwendig, die TGR-Ratte umfassend zu charakterisieren, um die bei erhöhtem Blutdruck ausgelösten Veränderungen bewerten zu können.

Zur Charakterisierung des Angstverhaltens der TGR-Ratte wurden folgende Untersuchungen durchgeführt:

- a) Freß- und Trinkverhalten,
- b) modifizierte Open-field-Tests: im weißen und schwarzen Open-field, Konflikttest, Social-interaction-Test,
- c) Holeboard-Test,
- d) Black-white-box Test,
- e) Elevated-plus-maze-Test (Pharmakongabe: 1 und 3mg/kg Diazepam,

1 und 3mg/kg Propranolol),  
f) Free-exploratory-Test.

*a) Freiß- und Trinkverhalten*

Das Freißverhalten der transgenen Tiere wurde untersucht, um die Auswirkungen des erhöhten Angiotensinspiegels im ZNS auf das Freißverhalten zu ermitteln. Außerdem gehört zur umfassenden Charakterisierung transgener Tiere die Untersuchung von motiviertem Verhalten. Da die beiden Untersuchungsgruppen sowohl mit als auch ohne Futterentzug keine deutlichen Unterschiede in der Nahrungsaufnahme zeigten, kann man annehmen, daß das Freißverhalten durch das zusätzliche Reningen nicht wesentlich beeinflusst wird.

Zur Überprüfung der körperlichen Entwicklung wurden die Gewichte der Tiere gemessen. Die Ratten wurden über drei Tage getestet und waren in der Altersklasse jung adult. Die Körpergewichte der TGR-Ratten lagen im Mittel unter denen der SD-Ratten, aber die Verläufe der Gewichtsentwicklungen beider Rattengruppen waren parallel und kontinuierlich. Die transgenen Ratten scheinen in ihrer körperlichen Entwicklung hinter der ihrer Kontrolltiere zu liegen, wobei sie sich in diesem „unteren Niveau“ wahrscheinlich kontinuierlich weiterentwickeln.

Da das RAAS das Durstverhalten beeinflusst, wurde auch das Trinkverhalten der TGR-Ratten und ihrer Kontrolltiere untersucht. Die deutlich gesteigerte Aufnahme von Trinkwasser der TGR-Ratten gegenüber ihren Kontrolltieren hängt sicherlich mit der erhöhten Konzentration von Angiotensin II im ZNS zusammen. Epstein et al. (1970) und Lind und Johnson (1982) stellten fest, daß Angiotensin II Trinken induziert, wenn es zentral, d.h. i.c.v., verabreicht wird. Dieses Ergebnis könnte auf eine Folge der erhöhten Konzentration von Angiotensin II im ZNS im Vergleich zu den Kontrolltieren hindeuten. Die erhöhte Expression der Maus-Renin-mRNA in der Nebenniere (Zona glomerulosa) verursacht eine gesteigerte Reninproduktion. Dadurch könnte ebenfalls das Durstverhalten beeinflusst worden sein.

*b) modifizierte Open-field-Tests*

Der Test im weißen und im schwarzen offenen Feld resultierte aus der Idee, das Angstverhalten in einer für die Ratten aversiven (hellen) und fremden Umgebung und in einer für die Ratten weniger „unangenehmen“ Umgebung (rotes Licht) zu untersuchen. Der Open-field-Test als solcher kann nur Hinweise auf unterschiedliches Angstverhalten durch die Auswertung von Laufmustern und Thigmotaxis geben. Von dem Unterschied der Aversivität (helles und dunkles Open-field) wurde erwartet, daß ängstliche Tiere große Aversion gegen eine helle Umgebung zeigen und mutige, neugierige Tiere nicht so stark.

Borbely et al. (1975) untersuchten die motorische Aktivität in Abhängigkeit von verschiedenen Lichtparametern. Sie stellten fest, daß die Anwesenheit von Licht und dessen Intensität die lokomotorische Aktivität beeinflussen, d.h., intensives Licht vermindert die lokomotorische Aktivität. Im vorliegenden Versuch legte die SD-Ratte, verglichen mit der TGR-Ratte, im weißen Open-field eine deutlich längere Wegstrecke zurück. Dieses Ergebnis könnte ein Hinweis darauf sein, daß die transgene Ratte in Bezug auf die lokomotorische Aktivität aversiver auf helles Licht reagierte als die SD-Ratte. Sowohl im schwarzen-, als auch im gesamten Open-field war jedoch die zurückgelegte Wegstrecke bei den TGR-Ratten deutlich kürzer gegenüber ihren Kontrolltieren. Das bedeutet, daß die lokomotorische Aktivität der TGR-Ratte an sich geringer war als die der Kontrollratte. Eine geringere Anzahl an Eintritten in die beiden Zonen läßt ebenfalls auf eine schwächere lokomotorische Aktivität schließen. Bei der Messung der Anzahl der Eintritte in die Innenzone traten die TGR-Ratten am zweiten Versuchstag weniger in die schwarze Innenzone ein als die SD-Ratten.

Die TGR-Ratten bewegten sich nicht nur weniger im Open-field, sondern auch langsamer als ihre Kontrolltiere.

Da Ratten angeborene Angst vor der „ungeschützten Mitte“ haben, wurde zusätzlich in jedem Open-field eine Innen- und eine Außenzone festgelegt. Die Innenzone des Open-fields stellt für die Ratte eine Überwindung ihrer natürlichen Neophobie dar. Die Ergebnisse der Messung des Parameters Aufenthaltszeit in der Innen- und Außenzone zeigten beim Vergleich der TGR-Ratten mit den SD-Ratten keine deutlichen Effekte.

Die Anzahl an „Rearings“ war bei den SD-Ratten tendenziell höher.

In diesem Test zeigten die transgenen Ratten eine niedrigere lokomotorische und auch exploratorische Aktivität. Diese Ergebnisse könnten damit auf ein stärkeres ängstliches Verhalten der TGR-Ratten gegenüber ihren Kontrolltieren hindeuten. Es gibt in der Literatur unterschiedliche Ansichten in der Bewertung der lokomotorischen Aktivität. Lister (1990) empfiehlt, die Lokomotion nicht als „Index der Angst“ zu betrachten. Jedoch verursachen Angst und Schmerzen oft das sogenannte „Freezing“ (die Ratte bewegt sich nicht mehr) und damit eine Verringerung der lokomotorischen Aktivität (Gerlai, 1996b).

Der Test im weißen und schwarzen offenen Feld allein reicht nicht aus, um Aufschluß über das Angstverhalten der TGR-Ratten zu bekommen. Die Ergebnisse können nur im Zusammenhang mit denen der anderen Tests diskutiert werden.

Im Konflikttest nahmen die TGR-Ratten deutlich schneller das angebotene Futter auf. Dieses Ergebnis könnte, im Gegensatz zu den Ergebnissen anderer Tests, auf ein weniger ängstliches Verhalten der transgenen Ratten hindeuten.

Da die transgenen Ratten in den durchgeführten Freißversuchen keinen höheren Verbrauch an Futter zeigten, ist von einem generell erhöhten Bedarf an Futter nicht auszugehen.

Die Ratten wurden 16 Stunden vor dem Konflikttest futterdepriviert. Der Energieverbrauch der TGR-Ratten könnte durch den erhöhten Blutdruck oder andere kompensatorische Mechanismen höher sein als der der SD-Ratten und damit zu einem größeren bzw. schnelleren Hungerreiz führen. Durch diesen Konflikt könnte auch die Neophobie der transgenen Ratten schneller überwunden werden. Untersuchungen zum Energieverbrauch dieser transgenen Ratten sind bisher nicht bekannt. Vielleicht brauchen die transgenen Ratten sogar einen entsprechenden Anreiz wie das Futter, um ihre Angst z.B. vor der Mitte des Open-field, zu überwinden. Dieses Testergebnis spricht nicht für die Ängstlichkeit der TGR-Ratte. Die Bewertung hinsichtlich des Angstverhaltens ist nur im Zusammenhang bzw. Vergleich mit den weiteren Ergebnissen der Testbatterie möglich.

Im Social-interaction-Test wurden die Latenzzeit bis zur ersten Kontaktaufnahme, die Summe der Kontaktzeiten und die Frequenz der Sozialkontakte erfaßt. Der Vergleich dieser Parameter zwischen den TGR- und den SD-Rattenpaaren ergab keine nennenswerten Unterschiede.

Die Testergebnisse sind sehr stark von Veränderungen der Testbedingungen abhängig. File und Hyde (1978) stellten fest, daß eine große Variabilität des Sozialkontaktes in Abhängigkeit vom Alter der Tiere, der Tageszeit der Versuchsdurchführung, der Beleuchtungsstärke im Open-field, der Versuchsdauer und der Gewöhnung der Tiere an die Umgebung besteht. Diese Variablen wurden versucht auszuschalten, und die Testbedingungen waren für beide Gruppen gleich. Allerdings standen nur vier TGR- und sechs SD-Rattenpaare für den Test zur Verfügung. Um eine statistisch besser gesicherte Aussage über den Sozialkontakt der TGR-Ratte zu erhalten, müßte der Test mit jeweils mindestens sieben Rattenpaaren erfolgen.

### *c) Holeboard-Test*

Im Holeboard-Test untersuchten die TGR-Ratten die Löcher tendenziell weniger, und die zurückgelegte Wegstrecke war deutlich kürzer, im Vergleich mit den Kontrolltieren. Die Messung der „head dips“ am ersten Versuchstag wird als direkte Exploration interpretiert, während an den nachfolgenden zwei Tagen die Verminderung der „head dips“ als Habituation (Gewöhnung) an eine unbekannte Umwelt angesehen wird (File und Wardill, 1975a). Die Anzahl der untersuchten Löcher verringerte sich am zweiten und dritten Versuchstag bei beiden Gruppen kontinuierlich.

In diesem Test zeigten die transgenen Ratten über drei Tage eindeutig eine verringerte lokomotorische Aktivität gegenüber ihren Kontrollratten. Die leicht verminderte Exploration und die geringere lokomotorische Aktivität weisen eher auf einen geringeren Bewegungsdrang als auf verändertes Angstverhalten der transgenen Ratten hin. Diese Aussage wird durch die Ergebnisse der Untersuchungen im weißen und schwarzen Open-field bestätigt. Die Tiere zeigten in unterschiedlichen Testapparaturen, mit unterschiedlichen Stimuli, in gleicher Weise verringerte Lokomotion.

Die Gewöhnung der Tiere an das Holeboard war bei beiden Versuchsgruppen ähnlich.

#### *d) Black-white-box-Test*

Ein Anstieg der Aufenthaltszeit und der „Rearings“ im weißen Kompartiment bei den untersuchten Ratten wird in diesem Test als anxiolytischer Effekt interpretiert (Costall et al., 1989).

Alle gemessenen Parameter des Black-white-box-Tests im ersten Versuch zeigten tendenziell eine erhöhte Lokomotion und Exploration der SD-Ratten. Dieses Ergebnis schien auf eine leicht gesteigerte Ängstlichkeit der TGR-Ratten hinzuweisen. Jedoch im zweiten Versuch des Black-white-box-Tests war kein Unterschied zwischen den beiden Untersuchungsgruppen erkennbar.

Die nicht vollständig übereinstimmenden Ergebnisse des Black-white-box-Tests könnten mit den unterschiedlichen Methoden der Auswertung zusammenhängen. Der erste Versuch wurde visuell über eine Videoaufzeichnung ausgewertet, während der zweite Versuch über ein kameragesteuertes Verhaltensprogramm automatisch ausgewertet wurde. Dieses Verhaltensprogramm erkennt helle und dunkle Bildpunkte. Da die Ratten und ein Kompartiment der Black-white-box von weißer Farbe sind, können Fehlinformationen nicht vollständig ausgeschlossen werden. Andererseits wäre es vielleicht möglich, daß die transgenen Ratten unterschiedlicher „Charge“ auch Unterschiede in Verhaltenstests zeigen. Jahreszeitliche Schwankungen sind ebenfalls in Betracht zu ziehen, da der erste Versuch im Juni und der zweite Versuch im Februar durchgeführt wurde.

#### *e) Elevated-plus-maze-Test*

Wilson et al. (1996) untersuchten die TGR-Ratten im Vergleich zu den SD-Ratten im Elevated-plus-maze-Test. Die transgenen Ratten hielten sich gegenüber ihren Kontrolltieren für kürzere Zeit auf den offenen Armen auf. Die Anzahl von Eintritten in die offenen Arme war ebenfalls geringer. In einer Studie von Voigt et al. (1999) zeigten die TGR-Ratten auf dem Elevated-plus-maze deutlich kürzere Aufenthaltszeiten und geringere Anzahl von Eintritten in die offenen Arme als die SD-Ratten. Die reduzierte exploratorische und

lokomotorische Aktivität auf den offenen Armen weist auf eine stärkere Ängstlichkeit der TGR-Ratten hin.

In der vorliegenden Arbeit wurden diese Ergebnisse in Bezug auf die Aufenthaltszeit auf den offenen Armen nur in der Tendenz bestätigt. Bezüglich der Eintritte in die offenen und auch in beide (offene und geschlossene) Arme traten keine nennenswerten Unterschiede zwischen den transgenen Ratten und den SD-Ratten auf. Die transgenen Ratten zeigten im Vergleich zu den SD-Ratten keinen deutlichen Unterschied in der lokomotorischen Aktivität.

Die Verabreichung von angstlösenden Medikamenten soll die Angst vor den offenen, ungeschützten Armen des Elevated-plus-maze abschwächen. Die anxiolytische Wirkung des Benzodiazepins Diazepam wird häufig als Standard im Vergleich zu potentiell anxiolytisch wirkenden Substanzen verwendet (Guimaraes et al., 1990; Taukulis und Goggin, 1990; Wright et al., 1991; Wright et al., 1992).

Bei den transgenen Ratten löste Diazepam einen anxiolytischen Effekt aus, während die SD-Ratten keinen Effekt bzw. bei der höheren Dosierung (3mg/kg) sogar einen Abfall der Aufenthaltszeit auf den offenen Armen zeigten. Möglicherweise wirkt Diazepam in der höheren Dosierung bei den SD-Ratten schon sedierend. Dagegen spricht allerdings, daß die lokomotorische Aktivität (Anzahl der Eintritte in die offenen und geschlossenen Arme) tendenziell über dem Kontrollwertes liegt. Diazepam wird als Standardanxiolytikum eingesetzt und man geht von einer deutlichen anxiolytischen Wirkung dieser Substanz in Verhaltenstests aus. In der vorliegenden Arbeit zeigte Diazepam jedoch bei SD-Ratten keinen solchen anxiolytischen Effekt. Weiterführende Untersuchungen in der Arbeitsgruppe haben gezeigt, daß bei Ratten von unterschiedlichen Stämmen auch unterschiedliche anxiolytische Wirkungen durch Diazepam auftraten. So wirkt Diazepam bei Fischer-Ratten schon in niedrigen Dosen anxiolytisch. Dagegen erzeugte es bei den weniger ängstlichen Wistar-Ratten keine Anxiolyse (Promotionsschrift Bert, 2001 eingereicht). File (1982, 1983) untersuchte die Wirkung von Benzodiazepinen auf die exploratorische und lokomotorische Aktivität bei Hooded-Lister-Ratten und drei Mäusestämmen. Nach der Gabe von Benzodiazepinen gab es sowohl zwischen den drei Mäusestämmen deutlich Verhaltensunterschiede, als auch individuelle Unterschiede zwischen den Hooded-Lister-Ratten. Die anxiolytische Wirkung von Diazepam bzw. Benzodiazepinen scheint stark mit dem „Grundlevel der Angst“ in den unterschiedlichen Tierstämmen zusammenzuhängen. Daraus folgt, daß ein Tier bzw. ein bestimmter Tierstamm, der im Test vergleichsweise angstlos ist, auf die Gabe eines Anxiolytikums nicht unbedingt ansprechen muß. Aus diesem Grund werden Stammes- und Zuchtlinienvergleiche durchgeführt. Nur so ist es möglich, das Verhalten beispielsweise von SD-Ratten zu werten und zu vergleichen.



Der  $\beta$ -Blocker Propranolol wird in der Klinik als Anxiolytikum verwendet. Er senkt bekanntlich die Herzfrequenz. Der nachfolgende Blutdruckabfall beeinflusst allerdings nicht den Test, da er erst später als Folge der verringerten Herzfrequenz einsetzt. Griebel (1995) stellte fest, daß die antagonistische Wirkung von Propranolol am 5-HT<sub>1/2C</sub>-Rezeptor den anxiolytischen Effekt verursachen könnte.

Die transgenen Ratten hielten sich, vor allem bei geringerer Dosierung von Propranolol, tendenziell länger auf den offenen Armen auf gegenüber dem Kontrollwert. Die lokomotorische Aktivität der TGR-Ratten war tendenziell, gegenüber dem Kontrollwert, erhöht. Die SD-Ratten dagegen zeigten keine Hinweise auf anxiolytische Effekte durch Propranolol. Dieses Ergebnis zeigt eine gewisse Übereinstimmung mit dem von Diazepam. In beiden Untersuchungen reagierte die SD-Ratte nicht auf die eingesetzten Pharmaka, die einen erzeugten „Angsteffekt“ mindern sollten.

Es ist bekannt, daß Serotonin bei der Ratte in aversiven Situationen, wie im Elevated-plus-maze-Test, aus den präsynaptischen Endigungen der Serotoninneurone im Hippocampus freigesetzt wird (Marsden et al., 1993). Ein intrahippocampaler Anstieg von Serotonin wurde ebenfalls im Social-interaction-Test (Cadogan et al., 1994) und im Vogel-conflict-test (Matsuo et al., 1996) festgestellt.

Voigt et al. (1999) untersuchten die transgenen Ratten und ihre Kontrolltiere auf dem Elevated-plus-maze mit gleichzeitiger mikrodialytischer Messung von Serotonin im Hippocampus-Gebiet des Gehirns der Ratten. Die Freisetzung von Serotonin stieg sowohl bei den TGR-Ratten als auch bei den SD-Ratten deutlich an. Jedoch nach dem Test hielt die Serotoninfreisetzung bei den SD-Ratten länger an als bei den TGR-Ratten. In dem Test zeigten die TGR-Ratten wiederum ein „ängstlicheres“ Verhalten (kürzere Aufenthaltszeiten auf den offenen Armen) und geringere lokomotorische Aktivität (weniger Eintritte in die offenen und geschlossenen Arme) als die SD-Ratten.

In der vorliegenden Arbeit konnten diese Verhaltensuntersuchungen nur in Tendenzen bestätigt werden. In diesem Zusammenhang war die deutlich ausgeprägte Wirkung von Diazepam auf der TGR-Ratte auffällig. Hingegen zeigten die SD-Ratten nach der Gabe von Diazepam und Propranolol keine anxiolytischen Effekte.

#### *f) Free-exploratory-paradigm-Test*

Die transgenen Ratten zeigten in diesem Test am ersten Versuchstag ein ähnliches Interesse an ihrer Umgebung bzw. ihren Nachbarn außerhalb ihres Käfigs wie die SD-Ratten. Am zweiten und dritten Tag waren in der Tendenz mehr transgene Tiere einer

Gruppe außerhalb des Heimatkäfigs mit längeren Aufenthaltszeiten erkennbar. Das letztgenannte Ergebnis könnte als eine bessere Habituation der SD-Ratten gewertet werden. Die Tiere sollten durch die Anreize „Freiheit“ und erreichbare Nachbarn lernen, ihre Angst vor der unbekanntem Umgebung zu überwinden und täglich zur gleichen Tageszeit „Ausgang“ zu haben. Geht man von dieser Aufgabenstellung aus, dann lernten die TGR-Ratten tendenziell besser ihre „Ausgangszeit“ zu nutzen.

Es wäre interessant, diesen Test in der Dunkelphase bzw. unter Rotlicht durchzuführen, um die Tiere in ihrer aktiveren Zeit zu beobachten. Man könnte anschließend den „aversiven“ Test (helles Licht am Tage) mit dem weniger „aversiven“ Test vergleichen.

Belcheva et al. (1997) applizierten Angiotensin II in das Hippocampus-Gebiet von SD-Ratten. Sie erhielten, mit verschiedenen Dosen (0.1, 0.5 und 1.0µg) von Angiotensin II bei der Messung der exploratorischen und lokomotorischen Aktivität, unterschiedliche Ergebnisse. Angiotensin II veränderte dosisabhängig die lokomotorische Aktivität, also die Anzahl der horizontalen und vertikalen Bewegungen. Im Elevated-plus-maze-Test traten die SD-Ratten nach die Applikation von 0.1µg Angiotensin II öfter in die offenen Arme ein.

Aus diesen Ergebnissen ergaben sich erste Hinweise dafür, daß Angiotensin II in bestimmte Hirnareale appliziert, Einfluß auf Hirnfunktionen hat. Es gibt auch widersprüchliche Befunde, in denen die Applikation von Angiotensin II in Hirnstrukturen anxiogene Effekte zeigte.

Die TGR-Ratte ist geeignet, die Funktion von Angiotensin II im ZNS weitergehend zu erforschen. In den bereits erläuterten Untersuchungen von Voigt et al. (1999) verhielten sich die TGR-Ratten ängstlicher auf dem Elevated-plus-maze als die SD-Ratten. In der Arbeit von Wilson et al. (1996) zeigten die TGR-Ratten ebenfalls ängstlicheres Verhalten auf dem Elevated-plus-maze. Um den Angststatus von Ratten eindeutig beurteilen zu können, ist die Durchführung von Untersuchungen in einer Testbatterie nötig. Aus diesem Grund wurden die Tiere in verschiedenen Angsttests untersucht. Außerdem wurden gleichzeitig spontane und motivierte Verhaltensweisen getestet, um den Einfluß dieser möglichen Veränderungen auf das Angstverhalten einschätzen zu können.

Es erhebt sich die Frage, in welchem Zusammenhang die Verhaltenseffekte mit dem RAAS stehen. Die TGR-Ratten trinken mehr als ihre Kontrolltiere. Der vermehrte Durst der Ratten wird mit der erhöhten Angiotensinkonzentration im ZNS zusammenhängen (Voigt et al., 2000). In der Studie von Wilson et al. (1996) wurden TGR-Ratten nach drei Stunden Wasserentzug auf dem Elevated-plus-maze getestet. Die Ratten mit Wasserentzug verhielten sich deutlich weniger ängstlich im Elevated-plus-maze-Test. Dies könnte bedeuten, daß das Suchverhalten durch die Motivation, Wasser zu finden, verstärkt sein

könnte. Der Stimulus Futterentzug löste im Konflikttest ebenfalls ein „angstloses“ Verhalten aus. Daraus ergibt sich die Frage, ob die TGR-Ratte zur Überwindung ihrer Angst bestimmte Motivationen bzw. Stimuli braucht.

Die Daten der vorliegenden und weiterer Arbeiten (Voigt et al., 1999; Wilson et al., 1996) deuten auf einen Unterschied im Angstverhalten bei der TGR-Ratte gegenüber ihrer Kontrollratte, der SD-Ratte, hin. Die Ergebnisse der Untersuchungen im Elevated-plus-maze-Test von Voigt (2000) und Wilson (1996) lassen die Vermutung zu, daß sich das Angstverhalten der TGR-Ratten im Vergleich zu ihrem Wildtyp deutlich unterscheidet. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigten aber nur leichte Veränderungen und teilweise nur eine tendenziell gesteigerte Ängstlichkeit der TGR-Ratten. Insgesamt gibt es kein Merkmal der untersuchten Tiere, das stabil, reproduzierbar, deutlich und in verschiedenen Testsituationen zur Ausprägung kommt. Allerdings muß auf die deutlich stärkeren Wirkungen von Anxiolytika (Diazepam und Propranolol) hingewiesen werden. Auffällig war außerdem, daß die Substanzen Diazepam und Propranolol bei den SD-Ratten keine anxiolytischen Effekte im Elevated-plus-maze-Test auslösten.

#### 4.3. Verhaltensuntersuchungen an verschiedenen Tierstämmen

Die Ergebnisse der Untersuchungen zeigten, daß deutliche Verhaltensunterschiede im Angst- oder Explorationsverhalten existieren. Dies gilt sowohl zwischen den unterschiedlichen Rattenstämmen als auch innerhalb eines Stammes bei Ratten von verschiedenen Züchtern.

In den Tests wurden die Reaktionen auf unterschiedliche Stimuli untersucht. Die lokomotorische Aktivität scheint nicht zwangsläufig im Zusammenhang mit dem Angstverhalten zu stehen. Die Lewis- und Wistar-Ratten von Charles River z.B. zeigten zwar im Open-field eine hohe lokomotorische Aktivität, aber im Konflikttest und im Free-exploratory-paradigm-Test verhielten sich die Lewis-Ratten ängstlicher als die Wistar-Ratten von Charles River. Im Holeboard- und im Social-interaction-Test zeigten allerdings die Lewis-Ratten weniger Angst als die Wistar-Ratten von Charles River. So verhielten sich die verschiedenen Rattenstämme, mit Ausnahme der Fischer-Ratten, unterschiedlich ängstlich in den durchgeführten Angsttests. Die Fischer-Ratten waren insgesamt ängstlicher als alle anderen getesteten Rattenstämme. Ihre lokomotorische Aktivität war am geringsten.

Vergleicht man das Angstverhalten der SD-Ratten mit den anderen Rattenstämmen, dann fällt auf, daß die SD-Ratten im Konflikt- und im Free-exploratory-paradigm-Test deutlich weniger ängstlich waren. Im Holeboard-Test zeigten sie weniger Ängstlichkeit als die Lewis-

Ratten und die Wistar-Ratten von Winkelmann. Im Social-interaction-Test hatten die SD-Ratten neben den Wistar-Ratten vom BGVV die kürzesten Kontaktzeiten im Vergleich zu den anderen getesteten Tieren. Von den getesteten Ratten ist die SD-Ratte als „angstlosester Rattenstamm“ anzusehen. Weiterführende Untersuchungen in der Arbeitsgruppe haben gezeigt, daß bei Ratten von unterschiedlichen Stämmen auch unterschiedliche anxiolytische Wirkungen durch Diazepam auftraten. Die Tiere wurden auf dem Elevated-plus-maze getestet. So wirkt Diazepam bei Fischer-Ratten schon in niedrigen Dosen anxiolytisch. Es wird deutlich, daß die Fischer-Ratten im Gegensatz zu den SD-Ratten ängstlicher waren und auf das Standardanxiolytikum eindeutig reagierten. Dagegen erzeugte Diazepam bei den weniger ängstlichen Wistar-Ratten keine Anxiolyse (persönliche Mitteilung Bert, 2000). In der vorliegenden Arbeit zeigte Diazepam bei SD-Ratten ebenfalls keinen anxiolytischen Effekt. Die anxiolytische Wirkung von Diazepam bzw. Benzodiazepinen scheint stark mit dem „Grundlevel der Angst“ in den unterschiedlichen Rattenstämmen zusammenzuhängen. Eine pharmakologische Beeinflussung ist nur in gewissen Grenzen möglich.

Es ist bekannt, daß genetische Differenzen zwischen unterschiedlichen Rattenstämmen existieren (Kosten et al., 1994, Shanks et al., 1994). Diese genetischen Unterschiede scheinen sich auf das Verhalten auszuwirken. Außerdem könnten neurochemische Unterschiede zwischen den einzelnen Rattenstämmen bestehen, wie z.B. bei den Fischer- und Lewis-Ratten (Guitart et al., 1993; Kosten et al.; 1994, Shanks et al., 1994).

Die Aufzucht- bzw. die Umweltbedingungen in den verschiedenen Zuchtbetrieben haben wahrscheinlich ebenfalls einen Einfluß auf das Angstverhalten der Ratten, auch innerhalb eines Rattenstammes. Die Analyse genetischer und „biochemischer“ Differenzen zwischen den Rattenstämmen könnte das Wissen über neurochemische Grundlagen des Angstverhaltens erweitern. Dazu studierten Rex et al. (1999) das Verhalten von selbst aufgezogenen Wistar- und Fischer Ratten im Elevated-plus-maze-, Black-white-box-, Sozial-interaction- und im modifizierten Open-field-Test. Die Fischer-Ratten verhielten sich, wie auch in den vorliegenden Untersuchungen, deutlich angstvoller als die Wistar-Ratten in allen Tests.

Die Beziehung zwischen Verhaltensvariationen und neurochemischen Unterschieden wurde in einer separaten Studie mit Hilfe der Mikrodialyse untersucht (Rex et al., 1999). Während die Ratten auf dem Elevated-plus-maze getestet wurden, ist gleichzeitig die Serotoninfreisetzung im ventralen Hippocampus gemessen worden. Der Aufenthalt auf dem Elevated-plus-maze bewirkte einen Anstieg der Serotoninausschüttung bei den Fischer-Ratten. Dagegen zeigten die Wistar-Ratten keine Änderung des Serotoninspiegels in diesem

Test. Diese Ergebnisse machen deutlich, daß das Angstverhalten von genetischen Faktoren beeinflusst wird sowohl auf emotionaler als auch auf biochemischer Ebene. Die Umwelteinflüsse, die ebenfalls den Phänotyp prägen, wurden durch identische Aufzucht- und Lebensbedingungen für beide Rattenstämme ausgeschaltet bzw. durch den Vergleich der am Institut aufgezogenen Ratten mit dem vom Züchter bezogenen erfaßt. Es ergab sich, daß die Haltungsbedingungen einen Einfluß auf das Verhalten der Tiere haben, die Stammesunterschiede aber nach wie vor sichtbar bleiben und zu dominieren scheinen. Zur Auswertung von Verhaltensversuchen und der entsprechenden Literatur ist es notwendig, diese Tierstamm- und Züchterunterschiede in Betracht zu ziehen.

#### 4.4. Schlußbetrachtungen

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit machen deutlich, daß die TGR-Ratte im Vergleich zur SD-Ratte Verhaltensabweichungen zeigt, die nur bei eingehender Betrachtung auffallen bzw. nur durch Stimulation, Reize oder Pharmaka auftreten.

Die physiologischen Funktionen sind verändert. Die erhöhte Wasseraufnahme und der erhöhte Blutdruck stehen in direktem Bezug zum RAAS hinsichtlich der Regulation des Kreislaufs.

Der erhöhte Wert von Angiotensin im ZNS scheint einen Einfluß auf bestimmte Verhaltensweisen der TGR-Ratte zu haben, wobei Auswirkungen der Genmanipulation auf andere physiologische Funktionen, wie z.B. die Nahrungsaufnahme, weiter zu untersuchen sind. Es bleibt deshalb unklar, warum in den bisherigen Untersuchungen (Voigt et al., 1999; Wilson et al., 1996) und in den vorliegenden Versuchen die TGR-Ratten mehr oder weniger ängstlicher sind als die Kontrollratten, aber im Konflikttest, basierend auf Nahrungsreiz, ein deutlich gegenteiliger Effekt eintritt. Betrachtet man die Ergebnisse der gesamten Testbatterie, kann nicht von einer eindeutig ängstlicheren TGR-Ratte im Vergleich zu ihrem Wildtyp ausgegangen werden.

Fraglich bleibt, ob die durchgeführten Angsttests für die SD-Ratte geeignet sind. Die SD-Ratten zeigten auch im Vergleich zu den anderen Rattenstämmen in drei von vier Verhaltenstests ein wenig ängstliches Profil. Dieser Rattenstamm wird als Labortier oft verwendet, sein Verhalten ist jedoch nicht ausreichend charakterisiert. Die SD-Ratten scheinen für Verhaltensuntersuchungen zur Erfassung anxiolytischer Pharmakonwirkungen, z.B. in etablierten Verhaltenstests, wenig geeignet. Im Elevated-plus-maze-Test, der als klassischer Angsttest verwendet wird, war durch das Standardanxiolytikum Diazepam kein

anxiolytischer Effekt auslösbar. Da die Tiere in den Testsituationen keine Angst zeigten, konnte auch keine „Abnahme von Angst“ gemessen werden.

Die Untersuchungen des Angstverhaltens von verschiedenen Tierstämmen und Züchtern haben deutliche Unterschiede gezeigt. Laborratten werden oft traditionsgemäß und ohne bewußte Vorauswahl in Verhaltensuntersuchungen eingesetzt. Im anschließenden nationalen und internationalen Vergleich der Ergebnisse kann es zu Fehlinterpretationen kommen. Chritchley und Handley (1987b) und Gerlai (1996) berichteten von unterschiedlichen Effekten in Verhaltenstests nach der Applikation von Anxiolytika oder anxiogen wirkenden Substanzen. Das fehlende Wissen bei der Auswahl der Labortiere könnte eine Ursache sein.

Aufgrund der unterschiedlich hohen „Level der Angst“ bei Rattenstämmen ist es möglich, daß Ratten mit niedrigem „Level der Angst“ auf bestimmte Reize oder auch Pharmaka nicht reagieren.

Ausgehend von der Tatsache, daß der Phänotyp die Summe aus genetischen- und Umweltfaktoren ist, ist eine Entwicklung der Tiere unter möglichst ähnlichen Bedingungen ein weiterer zu beachtender Aspekt, um Variablen für Versuchsergebnisse auszuschalten. Für eine sichere Vergleichbarkeit von Ergebnissen aus Verhaltensuntersuchungen ist es notwendig, sowohl den gleichen Rattenstamm zu nutzen, als auch die Ratten von einem Züchter zu beziehen.

Außerdem wurde in den Untersuchungen deutlich, daß die lokomotorische Aktivität nicht unbedingt im Zusammenhang mit dem Angstverhalten steht.