

## 2. LITERATURÜBERSICHT

### 2.1. Angst

Angst kann sich in Gefühlen ganz unterschiedlicher Intensität äußern. Diese können zwischen einem vagen Unbehagen und quälenden Angstzuständen variieren. Angst geht meist mit einer vegetativen Symptomatik wie Atembeschwerden, Herzrasen, Schmerzen in Brust oder Oberbauch, Muskelzittern sowie Schwäche einher. Die psychischen Symptome treten als Unruhe, Furcht und Schlaflosigkeit in Erscheinung. Oftmals drängen sich die körperlichen Beschwerden in den Vordergrund, so daß deren eigentliche Ursache häufig nicht erkannt wird (Snyder, 1990). Sigmund Freud betrachtete Angststörungen als Ursprung vieler neurotischer Erkrankungen und sah sie als eigenständiges Krankheitsbild an (siehe Freud und Breuer, 1993).

#### 2.1.1. Angst beim Menschen

Es kann zwischen zwei Formen der Angst unterschieden werden:

1. Die ‚normale‘ Angst: Sie ist eine emotionale Reaktion auf eine reale oder auch vorgestellte Bedrohung, die für die Mitmenschen nachvollziehbar ist. Dieses Gefühl der Besorgnis ist eine Form der Angst, die jeder Mensch schon einmal erlebt hat. In der Natur ist diese Art der Angst ein Schutz vor einer drohenden Gefahr, die die Körperfunktionen auf eine ‚fight or flight‘-Reaktion einstellt.

2. Die ‚pathologische‘ Angst: Sie ist ein unangepaßter Gemütszustand, die der auslösenden, für Außenstehende unwirklichen Bedrohung nicht entspricht.

Die unterschiedlichen Formen der Angststörungen machen es nicht immer einfach, die genaue Diagnose zu stellen und eine eindeutige Grenze zur ‚normalen‘ Angst zu ziehen. Die ‚American Psychiatric Association‘ (1994) versucht, die Beurteilung der pathologischen Angstzustände zu erleichtern, indem sie diese in ihrem Handbuch (DSM IV) wie folgt einteilt:

- Panikstörungen ohne oder mit Agoraphobie
- Agoraphobie ohne Panikstörung in der Vorgeschichte
- Spezifische oder soziale Phobie
- Zwangsstörungen

- Akute oder posttraumatische Belastungsstörung
- Generalisierte oder substanzinduzierte Angststörung
- Angststörung aufgrund eines medizinischen Krankheitsfaktors
- Nicht näher bezeichnete Angststörung.

Auch die WHO (1992) hat eine Klassifizierung mentaler Leiden und Verhaltensstörungen (ICD-10) herausgegeben, die sich größtenteils mit der DSM IV deckt. Die subjektive Empfindung des Patienten ist ein wichtiges Kriterium zur Beurteilung des Schweregrades der Erkrankung. Diese Bewertung versucht man z.B. über die ‚Hamilton Skala‘ zu objektivieren. Insgesamt sollen diese Einteilungen die Diagnosestellung unterstützen, aber auch den Verlauf der Erkrankung und den Therapieerfolg kontrollieren. In der klinischen Forschung werden diese Skalen ebenfalls eingesetzt, um beispielsweise eine anxiogene oder anxiolytische Wirkung einer Substanz zu erfassen.

Das psychische Erscheinungsbild der pathologischen Angst ist eigentlich nur beim Menschen erkennbar und im Tierexperiment kaum nachvollziehbar. Dennoch sind tierexperimentelle Angsttests notwendig, um einerseits neuartige Substanzen auf ihre mögliche anxiolytische Aktivität zu untersuchen und um andererseits die neuronale Basis der Angst zu erforschen (File, 1985).

### **2.1.2. Tierexperimentelle Angsttests**

Obwohl tierexperimentelle Angsttests niemals genau das spezifische Bild eines krankhaften Angstzustandes wiedergeben werden, so steht es außer Frage, daß Tiere Angst empfinden. Die Angsttests messen am Tier die Reaktionen auf unsichere/unvorhersehbare Situationen oder auf einen aversiven Stimulus (File, 1985). Man kann sowohl das Verhalten der Tiere als auch die physiologischen Veränderungen überprüfen. Es gibt eine große Anzahl von tierexperimentellen Angsttests, die teilweise sehr unterschiedliche Ansatzpunkte besitzen. Die Einteilungen der Angstmodelle folgen daher verschiedenen Gesichtspunkten, sind sich aber dennoch grundsätzlich sehr ähnlich (siehe Griebel, 1995; Lister, 1990; Treit, 1985). Die klassische Einteilung von File (1985) gliedert die Verhaltenstests in folgende drei Gruppen ein: Tests, die 1. Angst oder Aversion chemisch induzieren, die 2. auf einem Konflikt oder konditionierter Angst beruhen oder die 3. Angst durch eine neue und/oder aversive Umgebung erzeugen (Ausnutzung des Explorationsverhaltens). Generell werden diese

Angsttests mit Hilfe von bekannten anxiolytisch oder anxiogen wirksamen Substanzen validiert. Dabei zählen die Benzodiazepine heute noch zu den meist verwendeten Pharmaka. Heutige Überlegungen gehen in die Richtung, Angstmodelle zusätzlich auch über das Verhalten, wie beispielsweise über die Risikobereitschaft, zu validieren (Rodgers, 1997; Stephens, 1997). Grundsätzlich sollten zur Testung neuer Substanzen verschiedene Tiermodelle, d.h. eine Testbatterie, verwendet werden, da davon auszugehen ist, daß die unterschiedlichen Tiermodelle verschiedene Nuancen der Angst widerspiegeln und nicht jede Substanz in allen Angsttests gleich wirkt.

### *1. Tests, die Angst/Aversion chemisch induzieren*

#### *Der Drug discrimination-Test*

Ratten erhalten in dem von Lal und Shearman (1982) eingeführten Test randomisiert Injektionen entweder mit physiologischer Kochsalzlösung oder mit einer bekannt anxiogen wirksamen Substanz, wie z.B. Pentylentetrazol. Die Tiere werden darauf trainiert, nach der Applikation eine der jeweiligen Substanz entsprechende Taste zu drücken, wofür sie mit Futter belohnt werden. Im eigentlichen Test wird eine Substanz mit unbekannter Wirkung verabreicht. Wenn diese einen anxiogenen Effekt ausübt, wird von den Tieren die Pentylentetrazoltaste verstärkt gedrückt. Bei einer gemeinsamen Gabe von Pentylentetrazol und einer anxiolytisch wirkenden Substanz wird durch die antagonisierende Wirkung die Kochsalztaste vermehrt betätigt.

### *2. Konflikttests*

#### *Der Geller-Seifter-Test und der Vogel punished drinking-Test*

Diese beiden Tests (Geller und Seifter, 1960; Vogel et al., 1971) sind klassische Angsttests und ebenfalls mit einer Konditionierung des Versuchstieres verbunden. Sie beruhen auf einer Bestrafung (meist milde Elektroschocks), die die Futter- bzw. Wasseraufnahme des Tieres unterdrücken soll. Beide Modelle sind in zwei Trainingsphasen unterteilt: In der ersten Phase der Konditionierung wird die Futter- bzw. Wasseraufnahme (z.B. über Tastendruck) ohne Substanzeinfluß registriert und erfolgt ohne Bestrafung. Bei der zweiten Phase wird die Nahrungs- bzw. Wasseraufnahme mit einem Elektroschock kombiniert. Im eigentlichen Versuch soll die Zugabe z.B. einer anxiolytischen Substanz bewirken, daß sich das Aufnahmeverhalten von Futter bzw. Wasser unter der Bestrafung nicht verändert.

Ähnlich wie die klassischen Konflikttests funktionieren beispielsweise der Hot plate-, Fear potentiated startle reflex- oder der Passive avoidance-Test. Hier findet in der ersten Phase eine Konditionierung mittels Bestrafung oder einem anderen aversiven Stimulus statt, worauf die Tiere Abwehrreaktionen zeigen. Die Gabe einer anxiolytischen Substanz soll bewirken, daß in der zweiten Phase diese Abwehrreaktionen geringer ausfallen.

Nachteile der unter 1. und 2. aufgeführten Tests sind, daß durch die Konditionierungsphase ein erheblicher Arbeitsaufwand entsteht und die Ergebnisse sehr von einer erfolgreichen Konditionierung abhängig sind. Zudem können Substanzen, die eine analgetische, sedative Wirkung besitzen und/oder den Appetit beeinflussen, zu falschen Ergebnissen führen (Miczek, 1973).

### *3. Tests, die auf Unsicherheit in einer neuen Umgebung basieren*

Diese Tests nutzen angeborene und natürliche Verhaltensweisen der Tiere, wie das Explorationsverhalten, aus. Eine neue Umgebung erzeugt bei den Tieren einen Konflikt zwischen der Angst vor der fremden Situation/Umgebung und der Neugierde, die neue Umgebung zu erkunden (Lorenz, 1971). Nagetiere versuchen insbesondere weite, offene Flächen zu vermeiden. Sie suchen vielmehr Schutz (siehe Thigmotaxis) an Wänden oder ähnlichen Strukturen (Valzelli, 1969).

#### *Der Elevated plus maze-Test*

Der Elevated plus maze-Test geht auf eine Arbeit von Montgomery (1955) zurück. Er untersuchte Ratten in einer Y-förmigen, erhöht gelagerten Apparatur und stellte fest, daß die Tiere den wandlosen Teil mehr mieden als die zwei umrandeten Anteile. Daraus entwickelten Handley und Mithani (1984) eine kreuzförmige, erhöht gelagerte Apparatur, bei der zwei gegenüberliegende Arme offen, die anderen beiden von Wänden umschlossen sind. Eine verlängerte Zeit des Aufenthalts der Tiere in den offenen Armen und ein erhöhter Anteil der Eintritte in die offenen Arme in Bezug zu den Gesamteintritten wird als Maß für eine anxiolytische Wirkung einer Substanz gewertet (Pellow et al., 1985). Zur weiteren Beurteilung einer Angst-assoziierten Wirkung einer Substanz können auch die Parameter des sogenannten ‚risk assessment‘ (Risikobereitschaft) berücksichtigt werden (Cole und Rodgers, 1993; Blanchard et al., 1991; Molewijk et al., 1995). Dazu zählen die geschützten ‚Stretch Attend Postures‘ (SAP), d.h. das Strecken der Tiere von den geschlossenen Armen in die

offenen Arme sowie die ‚Head dips‘, d.h. das Hinunterbeugen von den offenen Armen in die Tiefe. Die verringerte Anzahl der SAPs und die erhöhte Anzahl der Head dips sind ebenfalls als anxiolytischer Effekt zu interpretieren. Der Elevated plus maze-Test kann neben den anxiolytischen auch anxiogene Effekte erfassen (Handley und Mithani, 1984; Pellow et al., 1985).

Eine Abänderung des Elevated plus maze ist das Elevated zero maze (Shepherd et al., 1994). Durch den ringförmigen Aufbau konnte das Zentrum, welches die vier Arme des Elevated plus maze umschließen, vermieden werden. Das Zentrum wird meist zwiespältig beurteilt, da man sich nicht einig ist, ob es zu den offenen oder geschlossenen Armen gezählt werden soll. Viele Wissenschaftler umgehen dieses Problem, indem sie das Zentrum bei der Auswertung nicht berücksichtigen. Bei einem Vergleich der Anzahl an Veröffentlichungen wird ersichtlich, daß sich allerdings das Elevated zero maze gegenüber dem Elevated plus maze nicht durchgesetzt hat.

#### *Der Black and white box-Test*

Der von Crawley und Goodwin (1980) entwickelte Test wurde bisher nur für Mäuse validiert. Eine Validierung für Ratten wurde im eigenen Institut vorgenommen (Barth, persönliche Mitteilung). Die Apparatur besteht aus einem hell erleuchteten und einem abgedunkelten Kompartiment, beide sind durch eine Öffnung verbunden. Generell ziehen die Ratten es vor, sich in dem dunklen Kompartiment aufzuhalten. Anxiolytisch wirkende Substanzen verlängern die Zeit in dem hellen Anteil und erhöhen die Anzahl der Wechsel zwischen den Kompartimenten (Costall et al., 1989). Auch in diesem Test unterstreicht eine erhöhte Anzahl der SAPs, d.h. das Strecken vom dunklen Kompartiment in das helle, die anxiolytische Wirkung einer Substanz (Rodgers et al., 1992). Zusätzlich kann die Zeit bis zum ersten Wiedereintritt in das weiße Kompartiment zur Beurteilung des Angstverhaltens herangezogen werden. Verkürzt sich diese Zeitspanne, so weist das ebenfalls auf einen anxiolytischen Effekt einer Substanz hin.

#### *Der modifizierte Open field-Test*

Der klassische Open field-Test basiert auf Verhaltensstudien von Hall (1934). Er beobachtete Versuchstiere in einer weiträumigen, quadratischen und nach oben offenen Box. Eine verminderte Aktivität und eine erhöhte Defäkation der Tiere wurde als eine gesteigerte ‚Emotionalität‘ (Broadhurst, 1960) gewertet. Diese Emotionalität zur Beurteilung von Angst heranzuziehen ist höchst fraglich. Lokomotion und Defäkation werden sehr häufig auch von

Substanzen, die keine anxiolytische Wirkung haben, beeinflusst (Cunha und Masur, 1978) und werden als Angstparameter schon seit längerem kritisiert. Dennoch ist es möglich, im Open field-Test Angstverhalten zu untersuchen. Ähnlich wie im Black and white box-Test vermeiden es die Tiere auch in diesem Modell, die Mitte der hellen offenen Fläche zu betreten, sondern sie halten sich vielmehr an der Schutz bietenden Umrandung auf. Einige Wissenschaftler messen daher die Zeit, die die Tiere im Inneren bzw. an der Umrandung des Open fields verbringen (siehe beispielsweise Chaouloff et al., 1995). Durch Hinzufügen weiterer Parameter wurde ermöglicht, das Open field als aussagekräftigen Angsttest zu verwenden. Britton und Britton (1981) modifizierten den Test dadurch, daß sie in das aversive Zentrum der Apparatur Futter stellten, an das die Tiere mittels Tastendruck gelangten. Anxiolytika verlängerten bei hungrigen Ratten die Zeitspanne, in der die Tiere Futter aufnahmen bzw. die Zeit, die die Tiere im Zentrum der Fläche verbrachten. Bodnoff und Mitarbeiter (1989) veränderten diesen Ansatz nur geringfügig: Sie boten das gewohnte Futter offen im Zentrum des Open field an und ermittelten die Zeit bis zur ersten Futteraufnahme. Die Verkürzung der Zeit bis zur ersten Futteraufnahme wurde als anxiolytischer Effekt gewertet.

Ein Nachteil dieses Ansatzes ist die Beurteilung von Substanzen, die das Freßverhalten der Tiere beeinflussen. Rex und Mitarbeiter (1998) konnten jedoch nachweisen, daß die von ihnen untersuchten Substanzen, wie Diazepam und 8-OH-DPAT, in ihrer anxiolytisch wirksamsten Dosis in einem anderen Test noch keinen Einfluß auf die Futteraufnahme von hungrigen Ratten in ihrer gewohnten Umgebung hatten.

Eine generelle Problematik der Tests, die auf Explorationsverhalten beruhen, ist die Bewertung der Lokomotion. Substanzen, die z.B. die motorische Aktivität erhöhen, könnten falsche Ergebnisse über Wirkung von Anxiolytika liefern. Daher sollte, unabhängig von den Parametern der Angst, die Lokomotion mitbestimmt werden. Die Messung der Lokomotion kann durch die zurückgelegte Distanz erfolgen, die vertikale Motorik durch die Anzahl der ‚Rearings‘ (d.h. das Aufrichten der Tiere mit den beiden Vorderpfoten). Die motorische Aktivität sollte sich nach der Gabe einer anxiolytischen Substanz nicht verändern. Dennoch kann sie nicht vollkommen unabhängig von der Angst beurteilt werden, da Anxiolytika insbesondere in diesen Tests das Explorationsverhalten, d.h. auch die motorische Aktivität, steigern (Treit, 1985). Vor allem im Open field-Test scheint das Angstverhalten eng mit der Lokomotion verknüpft zu sein. Eine gesteigerte Angst geht hier häufig mit einer verringerten Lokomotion einher (File, 1985; Gilad und Shiller, 1989).

### **2.1.3. Einflußfaktoren auf das Angstverhalten**

Viele neu entwickelte Anxiolytika, die klinisch beim Menschen erfolgreich eingesetzt werden, wie beispielsweise der 5-HT<sub>1A</sub>-Agonist Buspiron (Wheatley, 1982), zeigen in tierexperimentellen Angsttests teilweise keine bzw. sogar konträre Wirkungen (Griebel, 1995; Handley und McBlane, 1993). Daher wird die Übertragbarkeit der Ergebnisse von den Verhaltenstests auf eine mögliche klinische Anwendung hinterfragt. Ein Kritikpunkt ist, daß fast alle Angstmodelle mit Benzodiazepinen validiert wurden und somit die Sensitivität gegenüber neueren, nicht über die Benzodiazepin-Bindungsstelle wirkenden Substanzen zweifelhaft ist (Rodgers und Cole, 1994; File, 1987). Einige Autoren befaßten sich daher mit der Überprüfung einzelner Verhaltenstests, wie dem Elevated plus maze-Test (Griebel et al., 1993; Rodgers und Cole, 1994; Dawson und Tricklebank, 1995; Hogg, 1996) und dem Open field-Test (Walsh and Cummins, 1976), aber auch den Angstmodellen insgesamt (Treit, 1985; Treit und Menard, 1998; Rodgers, 1997). Zur besseren Beurteilung neuer Substanzen wird empfohlen, die Parameter des ‚risk assessment‘, wie z.B. die SAPs oder Head dips, vermehrt zu berücksichtigen (Blanchard et al., 1991). Es wird zusätzlich darüber nachgedacht, die Angstmodelle nicht nur pharmakologisch, sondern auch über das Verhalten zu validieren und den Schwerpunkt auf das Verhaltensmuster der Verteidigung zu legen (Griebel, 1995; Rodgers, 1997; Stephens, 1997).

Die Beurteilung der Angsttests wird zusätzlich dadurch erschwert, daß zahlreiche äußerliche und innerliche Faktoren das Angstverhalten der zu untersuchenden Tiere während der Experimente beeinflussen können. Es ist möglich, daß sich sowohl eine veränderte Versuchsanordnung als auch Unterschiede der verwendeten Versuchstiere auf das Angstverhalten auswirken (Rodgers und Cole, 1994).

#### **2.1.3.1. Variabilität in der Versuchsanordnung**

Die Vorgehensweisen bei den Experimenten zur Untersuchung des Angstverhaltens können sich sowohl innerhalb einer wissenschaftlichen Einrichtung als auch zwischen den verschiedenen Laboratorien unterscheiden.

A. Die Wahl des verwendeten Tests: Die einzelnen Angsttests können verschiedene Formen der Angst widerspiegeln und somit unterschiedliche Effekte von z.B. serotonerg wirksamen Substanzen hervorrufen (Treit, 1991). Tests, die auf unconditioniertem Verhalten basieren,

reflektieren beispielsweise Angst, die mit unkontrolliertem Streß verbunden ist. Tests, die auf einer Konditionierung beruhen, beschreiben dagegen eine Angst, die mit einem kontrollierbaren, aversiven Ereignis verknüpft ist (Griebel, 1995). Treit und Menard (1998) ordnen einigen Angstmodellen bestimmte Formen der Angst, wie dem Social interaction-Test die soziale Phobie oder dem Elevated plus maze-Test die Acrophobie, zu.

B. Die Applikationsart und die Dosis einer Substanz haben ebenfalls einen Einfluß auf deren Wirkung (Rodgers und Cole, 1994). Ebenso können akute und chronische Gaben unterschiedliche Effekte hervorrufen (Bodnoff et al., 1989; De Vry und Schreiber, 1993).

C. Der Einfluß der Haltungsbedingungen wird unterschiedlich eingeschätzt. So wird berichtet, daß Einzelhaltung von Ratten die Angst erhöht (Janowska et al., 1991), die motorische Aktivität steigert (Gentsch et al., 1988) oder gar keinen Effekt auf das Angstverhalten hat (Frussa-Filho et al., 1991).

D. Auch ein vermehrtes ‚Handling‘ der Tiere vor dem Test kann zu einer verminderten Angst führen (Schmitt und Hiemke, 1998; Andrews und File, 1993) und die Wirkung einer Substanz verändern (Boix et al., 1990; Brett und Pratt, 1990; Andrews und File, 1993).

E. Vorausgegangener ‚milder‘ Streß führt sehr wahrscheinlich zu einer Gewöhnung und somit zu einem reduzierten Angstverhalten von Ratten (Pellow et al., 1985) oder Mäusen (Lister, 1987). Dagegen kann starker Streß, wie z.B. forciertes Schwimmen (Britton et al., 1991) das Angstverhalten erhöhen. Wiederholte Versuchsdurchgänge können beispielsweise anxiolytische Effekte von Diazepam verwischen (File, 1990a).

F. Bei dem Einfluß der Lichtverhältnisse auf das Angstverhalten gehen die Meinungen auseinander (siehe Rodgers und Cole, 1994). McBlane und Mitarbeiter (1992) beobachteten beispielsweise, daß 8-OH-DPAT bei starker Beleuchtung eine anxiolytische Wirkung auslöst, jedoch bei schwacher Beleuchtung anxiogen wirkt.

G. Als weitere Einflußfaktoren sind unter anderem zu erwähnen: Die Bauweise der Apparaturen (z.B. beim Elevated plus maze: durchsichtige Wände der geschlossenen Arme oder geringer Rand an den offenen Armen, der die Tiere vor dem Herunterfallen bewahren soll), die Tageszeit, zu der der Versuch durchgeführt wird und sogar das Aussehen (z.B. Tragen eines Atemschutzes wegen Allergie) oder Körpergeruch des Versuchsdurchführenden können das Verhalten der Tiere beeinflussen (Crabbe et al., 1999).



### **2.1.3.2. Unterschiede des verwendeten Tiermaterials**

Die Auswahl geeigneter Versuchstiere ist für die Ausprägung der Angst im Verhaltenstest von großer Bedeutung, wobei Spezies, Geschlecht, Alter und der genetische Hintergrund zu den wesentlichen Faktoren zählen.

#### **2.1.3.2.1. Spezies, Alter und Geschlecht**

Das Verhalten verschiedener Tierspezies wird in Untersuchungen über das Angstverhalten meist nicht direkt miteinander verglichen. Meerschweinchen werden beispielsweise als sehr ängstliche Tiere beschrieben (Birmelin, 1990). Um sie überhaupt im Elevated plus maze-Test verwenden zu können, empfiehlt es sich, sie von Geburt an zu ‚handeln‘, um sie an die Versuchsbedingungen zu gewöhnen (Rex et al., 1993). Ohne ‚Handling‘ würde die Angst bei diesen Tieren so stark überwiegen, daß sie in eine Schreckstarre verfallen und so gut wie kein Explorationsverhalten zeigen.

Ratten und Mäuse sind die am häufigsten verwendeten Tiere in der Verhaltensforschung sowie in der Pharmakologie und unterscheiden sich in ihrem Verhaltensmuster kaum voneinander. Allerdings sind teilweise Unterschiede in der Reaktion auf die Gabe von Substanzen festgestellt worden, die häufig auf eine unterschiedliche Pharmakokinetik zurückgeführt werden können (siehe Marcucci et al., 1970; Fernandez-Guasti et al., 1992).

Die Berichte über Geschlechtsunterschiede im Angstverhalten von Ratten sind widersprüchlich. Fest steht, daß es einen Einfluß gibt, dieser aber noch von anderen Faktoren abhängig ist. So ist z.B. die Wahl des genutzten Angsttests (Johnston und File, 1991; Blanchard et al., 1993) oder des verwendeten Rattenstammes (Kulikov et al., 1997) entscheidend, ob weibliche Tiere mehr oder weniger ängstlich sind als die männlichen. Unterschiede zwischen männlichen und weiblichen Ratten können auch erst in einem bestimmten Alter der Tiere sichtbar werden (Imhof et al., 1993).

Das Alter der Tiere scheint ebenfalls ein wichtiger Faktor für das Angstverhalten von Ratten zu sein. Es konnte festgestellt werden, daß ältere Tiere im Vergleich zu jüngeren Tieren im Elevated plus maze-Test ein ängstlicheres Verhalten aufweisen (Imhof et al., 1993; File, 1990b; Frussa-Filho et al., 1991). Auch die Wirkung einzelner Substanzen scheint abhängig

vom Alter der Versuchstiere zu sein. Dieser Effekt kann wahrscheinlich auf die unterschiedliche Pharmakokinetik zurückgeführt werden (Acri et al., 1995; File, 1990b).

#### **2.1.3.2.2. Stammesunterschiede**

Mit dem Einfluß von Stammesunterschieden auf das Angstverhalten bzw. die ‚Emotionalität‘ von Ratten befaßt man sich schon seit Ende der 50er Jahre (Broadhurst, 1958). Wilcock und Broadhurst (1967) stellten fest, daß sich fünf verschiedene Inzucht-Rattenstämme im Escape avoidance conditioning-Test und im Open field-Test sowohl in der ‚Emotionalität‘ als auch in der Lokomotion unterscheiden. Seither gibt es zahlreiche Studien, die sich mit dem Einfluß genetischer Faktoren auf das Verhalten von Mäusen (z.B. Porsolt et al., 1978; Trullas und Skolnick, 1993) und Ratten (z.B. Porsolt et al., 1978; Rex et al., 1996; Ramos et al., 1997) in Angst- und Streßsituationen befassen. Fast alle der unter 2.1.2. beschriebenen Angstmodelle sind für diese Untersuchungen verwendet worden, so auch der Elevated plus maze-, der Black and white box- und der Open field-Test (z.B. Chaouloff et al., 1995; Overstreet und Rezvani, 1996; Stöhr et al., 1998).

Um einen genauen Einblick in die neurobiologischen Grundlagen psychischer Erkrankungen zu erhalten, war es eine Strategie, Stämme, die sich in ihrer Reaktion auf Streßsituationen unterscheiden, selektiv zu züchten. So wurden unter anderem Roman high- und low avoidance-Ratten entwickelt, die sich in ihrer Reaktionsweise im Shuttle box-Test unterscheiden, Maudsley reactive- und non-reactive-Ratten, die eine unterschiedliche ‚Emotionalität‘ besitzen und spontan hypertensive und normotensive Ratten (Gentsch et al., 1988), wobei sich die spontan hypertensiven Ratten weniger ängstlich verhalten (Kulikov et al., 1997).

Neben diesen speziell auf Unterschiede im Angstverhalten gezüchteten Rattenstämmen werden auch Inzuchtstämme verwendet, die sich durch ein besonderes Merkmal auszeichnen: Fawn hooded-Ratten haben beispielsweise eine Erkrankung der Blutplättchen entwickelt (Overstreet und Rezvani, 1996) und Lewis-Ratten sind anfällig für Arthritiden (Chaouloff et al., 1995). Daß diese Inzuchtstämme mit physiologischen Besonderheiten auch Unterschiede im Verhalten zeigen, ist nicht weiter erstaunlich.

Viele verhaltenspharmakologische Untersucher verwenden allerdings Inzuchtstämme, die keine besondere Merkmalsausprägung besitzen, wie zum Beispiel Fischer-Ratten, oder Auszuchtstämme wie Wistar-, Sprague Dawley- oder Lister-Ratten (Griebel, 1995). Die

Auszucht von Ratten beruht auf einer breiten genetischen Basis und hat die reproduzierbare Heterozygotie zum Ziel. Die Ungleichheit der Merkmale der einzelnen Individuen ist dabei auch über längere Sicht beständig, wobei die Physiologie und das Verhalten der Gesamtpopulation gleichbleibend sein sollte. Van der Staay (1997) bemerkte allerdings bei dem von ihm jahrelang verwendeten Wistar-Rattenstamm eine Veränderung im Lernverhalten: Bei einem Vergleich der Daten mehrerer Experimente, die über einen Zeitraum von einigen Monaten durchgeführt wurden, stellte er fest, daß die Tiere zu Beginn noch eine gute Lernkurve zeigten, gegen Ende des Untersuchungszeitraums aber nicht mehr ausreichend lernten. Da die Versuche immer unter denselben Versuchsbedingungen durchgeführt wurden, vermutete er, daß sich der genetische Hintergrund dieses Rattenstammes im Laufe der Zeit verändert hat und für die Unterschiede im Lernverhalten verantwortlich ist. Ebenso beobachteten Porsolt und Mitarbeiter (1978), daß Wistar-Ratten von zwei verschiedenen Züchtern im Forced swimming-Test unterschiedlich stark auf eine Substanzgabe reagierten.

Rex und Mitarbeiter (1996) beschäftigten sich ausführlicher mit der Problematik der Stammesunterschiede: Sie verglichen das Verhalten von drei Wistar-Auszuchtlinien von verschiedenen Züchtern und von drei Inzucht-Rattenstämmen (Lewis-, Fischer- und Brown Norway-Ratten), die alle vom gleichen Züchter stammten. Für die Untersuchungen verwendeten sie fünf verschiedene Verhaltenstests, darunter auch zwei Angstmodelle, den modifizierten Open field-Test und den Social interaction-Test. Die Ergebnisse zeigten, daß sich die einzelnen Rattenstämme deutlich voneinander unterschieden. Dabei ist hervorzuheben, daß sich die Fischer-Ratten im Vergleich zu den Wistar-Ratten vom selben Züchter offensichtlich ängstlicher verhielten und zudem eine etwas geringere motorische Aktivität aufwiesen. Zusätzlich konnten sie demonstrieren, daß sich auch die drei Auszuchtlinien sowohl in ihrem Angstverhalten als auch in der Lokomotion signifikant voneinander unterschieden. Die Frage, wie sich die Unterschiede im Verhalten insbesondere der drei Wistar-Auszuchtlinien begründen lassen, ist nicht zu beantworten. Einerseits können unterschiedliche Haltungsbedingungen bei den einzelnen Züchtern, wie das Handling der Tiere oder die Einstreu der Käfige, dafür verantwortlich sein, andererseits besteht auch die Möglichkeit, daß sich die Zuchtlinien durch zu geringe Neueinkreuzungen genetisch voneinander unterscheiden und Sublinien entstanden sind.

Daher sollte durch gezielte Untersuchungen abgeklärt werden, inwieweit Aufzuchtbedingungen das Angstverhalten der Versuchstiere beeinflussen oder ob ein

unterschiedlicher genetischer Hintergrund für das verschiedenartige Verhalten der Zuchtlinien verantwortlich ist.

Neben Unterschieden im spontanen Verhalten können auch Unterschiede in der Pharmakokinetik der Versuchstiere für die verschieden ausgeprägten Wirkungen von Substanzen verantwortlich sein. So ist von Mäusestämmen bekannt, daß sie eine unterschiedliche Empfindlichkeit gegenüber Benzodiazepinen besitzen (Gallaher et al., 1987). Bei einem generellen Überblick über die Wirkung von Benzodiazepinen bei Ratten konnten jedoch kaum Unterschiede zwischen einzelnen Stämmen festgestellt werden (Hogg, 1996). Anders verhält es sich bei 5-HT<sub>1A</sub>-Agonisten und 5-HT<sub>3</sub>-Antagonisten, deren anxiolytische Wirkung abhängig vom verwendeten Rattenstamm zu sein scheint (Hogg, 1996).

Bindungsstudien an der Benzodiazepin-Bindungsstelle oder am 5-HT<sub>1A</sub>-Rezeptor konnten ebenfalls zeigen, daß Unterschiede zwischen Rattenstämmen bestehen. Diese findet man v.a. bei Inzucht-Rattenstämmen, die auf eine bestimmte Merkmalsausprägung selektiert wurden, wie Maudsley reactive- und non-reactive-Ratten (Robertson et al., 1978), spontan hypertensive und normotensive Ratten (Gentsch et al., 1988) oder Roman high- und low avoidance-Ratten (Shephard et al., 1982). Aber auch bei Inzucht- und Auszucht-Rattenstämmen ohne besondere Merkmalsausprägung werden Unterschiede in der Benzodiazepin-Bindung (Onaivi et al., 1992) oder der 5-HT<sub>1A</sub>-Rezeptor-Bindung (Chaouloff et al., 1995) diskutiert.

## **2.2. Das zentrale GABAerge Transmissionssystem**

### **2.2.1. Die GABA-Rezeptoren**

GABA ( $\gamma$ -Aminobuttersäure) ist der wichtigste inhibitorische Neurotransmitter im Zentralnervensystem (ZNS). So verwenden 30-40 % aller Synapsen im Gehirn GABA als Transmitter (Iversen und Blohm, 1972). In Bindungsstudien mit Bicucullin, ein GABA-Antagonist, und Baclofen, ein GABA-Agonist, entdeckte man zwei verschiedene GABA-Rezeptoren. Der klassische, Bicucullin-empfindliche und der Bicucullin-unempfindliche, Baclofen-sensible GABA-Rezeptor wurden von Hill und Bowery (1981) als GABA<sub>A</sub>- bzw. GABA<sub>B</sub>-Rezeptor bezeichnet.

Der GABA<sub>A</sub>-Rezeptor ist mit einer Chlorid-Ionophore gekoppelt und besitzt eine Bindungsstelle für Benzodiazepine, Barbiturate und Neurosteroiden (Bormann, 1988). Bei

Aktivierung des Rezeptors durch GABA werden die Chloridkanäle geöffnet. Dadurch entsteht eine Hyperpolarisation der Membran des postsynaptischen Neurons, die wiederum zu einer verminderten Erregbarkeit des Neurons führt (Curtis und Johnston, 1974).

Der GABA<sub>B</sub>-Rezeptor ist währenddessen mit einem G-Protein gekoppelt und unempfindlich gegenüber Substanzen, die den GABA<sub>A</sub>-Rezeptor modulieren (Bowery, 1989).

Ein dritter GABA-Rezeptor Typ, der sowohl für Bicucullin als auch für Baclofen unempfindlich ist, wurde von Drew und Mitarbeitern (1984) als GABA<sub>C</sub>-Rezeptor bezeichnet. Das IUPHAR Komitee hat diesen Rezeptortyp als eine Untereinheit des GABA<sub>A</sub>-Rezeptors beschrieben (Barnard et al., 1998) und dazu angehalten, den Begriff ‚GABA<sub>C</sub>‘-Rezeptor zu vermeiden. Inzwischen gibt es neuere Erkenntnisse, die beweisen, daß dieser Rezeptortyp aufgrund von Pharmakologie, Aufbau, Funktion, Genstruktur sowie der zellulären Lokalisation ein eigenständiger Rezeptor ist, und es daher gerechtfertigt ist, ihn als GABA<sub>C</sub>-Rezeptor zu bezeichnen (Bormann, 2000).

### **2.2.2. Die Benzodiazepin-Bindungsstelle am GABA<sub>A</sub>-Rezeptor**

Der Wirkungsmechanismus der Benzodiazepine wurde einige Jahre nach ihrer zufälligen Entdeckung Ende der 50er Jahre aufgeklärt (siehe Sternbach, 1979).

Erst 1975 konnte ein genauer Zusammenhang zwischen Benzodiazepinen und GABA-Rezeptoren hergestellt werden: Wissenschaftler hatten herausgefunden, daß Benzodiazepine die inhibitorische Wirkung von GABA im Gehirn verstärken (Haefely et al., 1975; Costa et al., 1975). Zwei Jahre später wurden hoch-affine, stereospezifische Bindungsstellen für Benzodiazepine im ZNS von Säugetieren entdeckt (Squires und Braestrup, 1977; Möhler und Okada, 1977). Neben den im ZNS vorkommenden ‚zentralen‘ Bindungsstellen fanden Squires und Braestrup (1977) in mehreren peripheren Geweben weitere Benzodiazepin-Bindungsstellen, die später als ‚periphere Benzodiazepin-Rezeptoren‘ bezeichnet wurden. Im Gegensatz zu den ‚zentralen‘ Bindungsstellen sind sie nicht an einen GABA-Rezeptor gekoppelt (Rampe und Triggle, 1986). Die ‚peripheren‘ Rezeptoren wurden später ebenfalls im Gehirn, hauptsächlich an Astrozyten, nachgewiesen (Bruce et al., 1991).

Sigel und Mitarbeiter (1983) konnten zeigen, daß die Bindungsstellen für Benzodiazepine und GABA auf einem gemeinsamen Rezeptor-Komplex lokalisiert sind. Seitdem wurde angenommen, daß Benzodiazepin-Rezeptor, GABA<sub>A</sub>-Rezeptor und Chlorid-Ionophor zusammen einen ‚supramolekularen Komplex‘ bilden (Richards und Möhler, 1984).

Inzwischen wird der Ausdruck GABA/Benzodiazepin-Rezeptor als obsolet angesehen, und es wird vorgeschlagen, von einer Benzodiazepin-Bindungsstelle am GABA<sub>A</sub>-Rezeptor zu sprechen (Barnard et al., 1998). Der GABA<sub>A</sub>-Rezeptor setzt sich aus mehreren, meist drei Untereinheiten zusammen (Sanger et al., 1994). Derzeit sind 19 Untereinheiten (6 $\alpha$ , 4 $\beta$ , 3 $\gamma$ , 1 $\delta$ , 1 $\epsilon$ , 1 $\pi$  und 3 $\rho$ ) bekannt, die durch unterschiedliche Gene kodiert sind (Burt und Kamatchi, 1991; Barnard et al., 1998). Von einigen Untereinheiten weiß man, daß sie bei Säugetieren in Splice-Varianten existieren, so daß sich die Gesamtzahl der Untereinheiten um fünf weitere erhöht. Die GABA<sub>A</sub>-Rezeptoren im ZNS werden durch  $\alpha$ - und  $\beta$ - und zusätzlich von  $\gamma$ -,  $\delta$ - oder  $\epsilon$ -Untereinheiten gebildet (Barnard et al., 1998). Die Benzodiazepin-Bindungsstelle wird durch die  $\alpha$ -,  $\beta$ - und  $\gamma$ -Untereinheiten geformt. Die Affinität der klassischen Benzodiazepin-Agonisten, wie Diazepam, Flunitrazepam und Clonazepam, zu der Bindungsstelle ist besonders hoch an den  $\alpha_1$ - und  $\alpha_3$ -Untereinheiten (Barnard et al., 1998). Benzodiazepin-Bindungsstellen sind im Bulbus olfactorius, Hippokampus, Thalamus, Hypothalamus und Zerebellum nachzuweisen (Sanger et al., 1994).

### 2.2.3. Wirkungsmechanismus von Benzodiazepinen

Benzodiazepine gehören nach wie vor zu den am häufigsten verordneten Psychopharmaka und werden in der klinischen und experimentellen Pharmakologie als Standard verwendet. Die Wirkungen der Benzodiazepine reichen bei einer großen therapeutischen Breite von sedativ-hypnotisch, zentral muskelrelaxierend über antikonvulsiv zu anxiolytisch. Daneben besitzen die Benzodiazepine ein nicht zu unterschätzendes Potential zur Suchtbildung und Toleranzentwicklung. Sie bewirken über die primäre Besetzung der Benzodiazepin-Bindungsstelle eine Erhöhung der Affinität des Rezeptors zu GABA. Daraus folgt wiederum eine häufigere Öffnung der Chloridkanäle und die inhibitorische Wirkung von GABA im Gehirn wird gesteigert (Study und Barker, 1981).

Bezüglich des Angstverhaltens gibt es einige Hinweise darauf, daß die Benzodiazepine die Aktivität des serotonergen Transmissionssystems beeinflussen (Stein et al., 1973; López-Rubalcava et al., 1992). Autoradiographische Studien konnten zeigen, daß die zentralen Benzodiazepin-Bindungsstellen in hohen Konzentrationen in Hirnregionen vorhanden sind, die Projektions- oder Ursprungsregionen vom serotonergen System sind (Iversen, 1984), wie z.B. Amygdala, Hippokampus und dorsale Raphe. In diesen Gehirngebieten hemmte iontophoretisch applizierte  $\gamma$ -Aminobuttersäure die Feuerungsrate von 5-HT-Neuronen, ein

Effekt, der durch Benzodiazepingabe gesteigert wurde (Gallager, 1978). Rex und Mitarbeiter (1993) konnten zeigen, daß die Exposition von Meerschweinchen auf dem Elevated plus maze mit einer erhöhten Ausschüttung von Serotonin im Gehirn einhergeht. Nach Gabe von Diazepam wurden die Basalfreisetzung von Serotonin und der Anstieg der 5-HT-Konzentration, der durch den Aufenthalt auf dem Elevated plus maze ausgelöst wird, vermindert.

### **2.2.3.1. Diazepam**

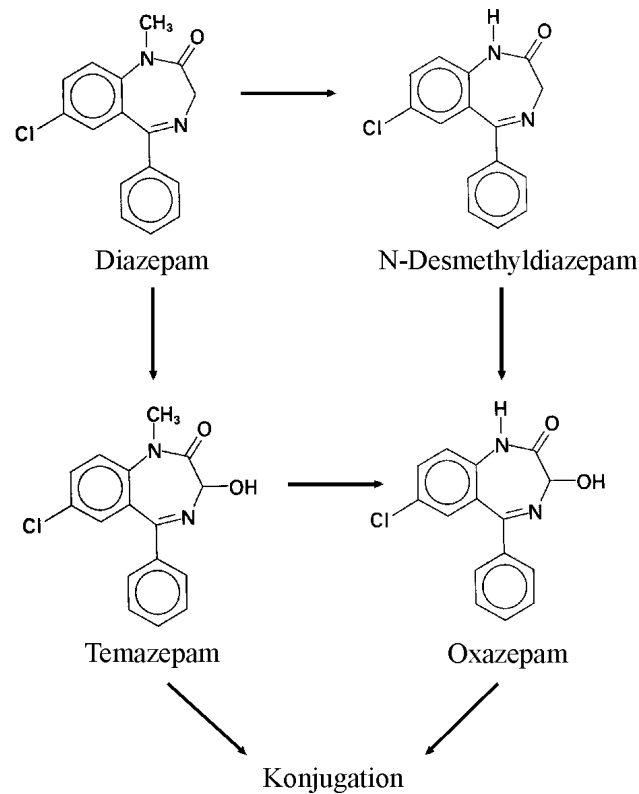
Diazepam wurde 1963 erstmals unter dem Namen Valium<sup>®</sup> zugelassen und wird in der Verhaltenspharmakologie sowie nach wie vor in der Klinik als Standardanxiolytikum betrachtet. Viele der tierexperimentellen Angstmodelle wurden mit Hilfe von Diazepam validiert. Im Elevated plus maze-Test erhöhte Diazepam den Anteil der Eintritte in die offenen Arme bezogen auf die Zahl der Gesamteintritte sowie die Zeit, die die Tiere in den offenen Armen verbrachten (Pellow et al., 1985). Diazepam verlängerte im Black and white box-Test die Dauer des Aufenthaltes der Tiere im weißen Kompartiment (Costall et al., 1989). Im modifizierten Open field-Test senkte Diazepam signifikant die Zeit bis zur ersten Futteraufnahme (Bodnoff et al., 1989).

Diazepam (7-Chlor-1,3-dihydro-1-methyl-5-phenyl-2H-1,4-benzodiazepin-2-on) wird in der Leber demethyliert und hydroxyliert (siehe Abb. 1). Dabei entstehen die drei Hauptmetaboliten N-Desmethyldiazepam, Temazepam und Oxazepam, die ihrerseits noch pharmakologisch aktiv sind und sedativ, hypnotisch sowie anxiolytisch wirken. N-Desmethyldiazepam wird durch Demethylierung von Diazepam am N<sub>1</sub>-Atom und Temazepam durch Hydroxylierung am C<sub>3</sub>-Atom gebildet. N-Desmethyldiazepam und z.T. auch Temazepam werden wiederum über Oxidation bzw. Demethylierung zu Oxazepam biotransformiert. Entscheidendes Enzym dabei ist das Cytochrom P450 (Klotz, 1987). Oxazepam und der restliche Anteil an Temazepam werden glukuronidiert und über die Niere ausgeschieden (Schwartz et al., 1965; Marcucci et al., 1970).

Diazepam zeichnet sich durch eine hohe Lipophilie aus und besitzt auch nach oraler Applikation eine hohe Bioverfügbarkeit. Bei Ratten liegt die Plasmaproteinbindung von Diazepam und N-Desmethyldiazepam bei 86 bzw. 91 %, und die Eliminations-Halbwertszeit von Diazepam beträgt ca. 1,1 h bzw. von N-Desmethyldiazepam ca. 0,3 h. Die totale

Plasmaclearance von Diazepam ist bei der Ratte im Vergleich zum Menschen, Hund, Kaninchen und Meerschweinchen um ein Vielfaches erhöht (Klotz et al., 1976).

**Abb. 1:** Abbau von Diazepam



Marcucci und Mitarbeiter (1970) konnten Diazepam bis zu 60 min nach i.v. Gabe im Plasma von Ratten nachweisen, wobei das Maximum bei 1 min lag. N-Desmethyldiazepam konnten sie nur zum Zeitpunkt von 5 min feststellen, was wahrscheinlich auf die geringe Empfindlichkeit der Bestimmungsmethode zurückzuführen ist. Klotz und Mitarbeiter (1976) dagegen konnten Diazepam nach i.v. Applikation bis zu 8 h und N-Desmethyldiazepam auch noch nach 4 h im Blutplasma bestimmen. Nach i.v. Gabe passierten Diazepam sowie die drei Hauptmetaboliten die Blut-Hirnschranke von Ratten (Klockowski und Levy, 1988). Marcucci und Mitarbeiter (1968) konnten im Gehirn von Ratten bis 60 min nach Applikation sowohl Diazepam als auch die demethylierten Metaboliten nachweisen. Diazepam wurde in verschiedenen Gehirnregionen von Ratten, wie Kortex und Hippokampus, bis zu 60 min auch nach i.p. Applikation festgestellt (Hironaka et al., 1984). Die im Vergleich zu Mäusen geringen Konzentrationen von N-Desmethyldiazepam im Blut und Gehirn von Ratten (Schwartz et al., 1965; Marcucci et al., 1968) lassen darauf schließen, daß der Hauptabbauweg von Diazepam bei Ratten über Temazepam erfolgt (Klotz et al., 1976).



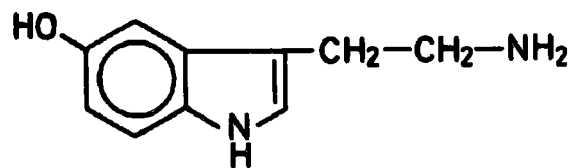
Es gibt verschiedene Methoden, Diazepam und seine Metaboliten im Blutplasma zu bestimmen. Eine Methode ist die Dünnschicht-Chromatographie (Schwartz et al., 1965). Eine weitere, sehr schnelle und effektivere Methode ist von Azzam und Mitarbeitern (1998) entwickelt worden, die auf der High Performance Liquid Chromatography (HPLC) basiert.

## 2.3. Das zentrale serotonerge Transmissionssystem

### 2.3.1. Der Neurotransmitter Serotonin

Rapport und Mitarbeiter (1948) entdeckten in Hirnextrakten eine Substanz, die in peripheren Geweben eine vasokonstriktorische Wirkung entfaltet. Sie konnten sie als kristalline Form isolieren und die chemische Struktur aufklären (5-Hydroxytryptamin, 5-HT; siehe Abb. 2).

**Abb. 2:** Strukturformel des Serotonins



Auf Grund der vasoaktiven Wirkung bezeichneten sie diese Substanz als ‚Serotonin‘. Es zeigte sich später, daß diese Substanz identisch war mit dem ‚Enteramin‘, das Anfang der 50er Jahre als kontraktile Substanz in enterochromaffinen Zellen der gastrointestinalen Mukosa nachgewiesen wurde. Twarog und Page (1953) konnten Serotonin im Gehirngewebe von Kaninchen und Ratten nachweisen. Eine detaillierte Untersuchung der Verteilung der 5-HT-Neuronen im ZNS wurde durch die Fluoreszenz-Histochemie möglich (Dahlström und Fuxe, 1964). Wooley und Shaw (1954) vertraten schon früh die Meinung, daß Serotonin eine bedeutende Rolle im ZNS einnimmt. Tatsächlich kontrolliert Serotonin eine Vielfalt von physiologischen und Verhaltens-Funktionen. So hat 5-HT Einfluß auf die Thermoregulation, die kardiovaskuläre Regulation, den zirkadianen Rhythmus, das Futter- und Sexualverhalten, die Schmerzempfindlichkeit, Lernen und Gedächtnis sowie das Aggressionsverhalten (Lucki, 1998; Chojnacka-Wójcik, 1995). Auch psychiatrische Erkrankungen wie Angststörungen, Depressionen und Anorexia nervosa werden von Fehlfunktion des serotonergen Transmissionssystems begleitet (Lucki, 1998).

### 2.3.2. Biosynthese, Freisetzung und Metabolismus von Serotonin

Serotonin kann als Indolamin die Blut-Hirn-Schranke nicht überwinden. Das im ZNS befindliche Serotonin wird aus der essentiellen Aminosäure L-Tryptophan gebildet, die mittels eines hoch affinen Transporters in die Nervenzelle geschleust wurde (Chojnacka-Wójcik, 1995).

Der erste Schritt der Synthese ist die Hydroxylierung von L-Tryptophan zu 5-Hydroxytryptophan. Das verantwortliche Enzym dieser Reaktion ist die Tryptophanhydroxylase, ein spezifisches Enzym, das zugleich auch den geschwindigkeitsbegrenzenden Faktor darstellt (Boadle-Biber, 1993). In einem zweiten Schritt wird 5-Hydroxytryptophan durch eine weniger spezifische Decarboxylase zu 5-Hydroxytryptamin (5-HT) umgewandelt.

5-HT wird in der Nervenzelle größtenteils in Vesikeln gespeichert. Ein geringerer Teil befindet sich im Zytoplasma im terminalen Abschnitt der Nervenzelle und kann somit unmittelbar nach der Synthese freigesetzt werden (Marsden, 1996). Das in den Vesikeln befindliche 5-HT ist wahrscheinlich an ein spezifisches Bindungsprotein gebunden, das durch eine Veränderung der Ionenverhältnisse (erhöhter  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom) bei der Entleerung abgespalten wird (Hertz und Tamir, 1981). Die Freisetzung von 5-HT aus den Vesikeln erfolgt durch kalziumabhängige Exozytose und wird erst durch eine langandauernde Stimulation der Neurone hervorgerufen.

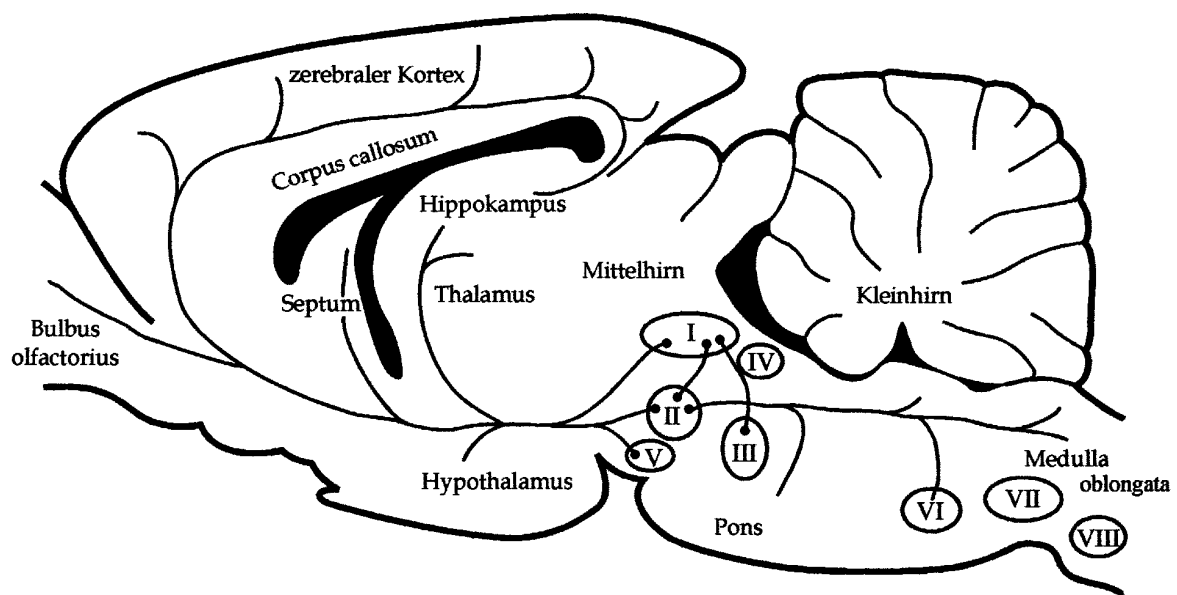
Anschließend werden ca. 90 % des freigesetzten Serotonins mittels eines  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase-Carriers, der sich in der präsynaptischen Membran befindet, wieder aufgenommen (Ross, 1982). In der Nervenendigung wird Serotonin entweder erneut in Vesikeln gespeichert oder durch die Monoaminoxidase A zu 5-Hydroxytryptophol oder 5-Hydroxyindolessigsäure metabolisiert, die wiederum in ihre 5-Methoxyderivate überführt werden. In der Epiphyse erfolgt ein weiterer Abbauweg von 5-HT zu N-Acetyl-5-Methoxytryptamin (Melatonin; Chojnacka-Wójcik, 1995).

### 2.3.3. Ursprungsgebiete und Projektionen der serotonergen Neurone

Amin und Mitarbeiter (1954) konnten Serotonin erstmals mit Hilfe eines Bioassays in verschiedenen Hirngebieten beim Hund nachweisen, wobei sie die höchsten Konzentrationen im Hypothalamus, im Mittelhirn und in der Area postrema fanden. Später gelang es Falk und

Mitarbeitern (1962), die Verteilung serotonerger Neurone im ZNS darzustellen. Dahlström und Fuxe (1964) beschrieben neun Zellgruppen, die die Ursprungsgebiete der serotonerger Neuronen bilden. Diese Gebiete stimmen mit der Lokalisation der Raphekerne überein. Mit noch genaueren Methoden konnten die feinen Strukturen und die Organisation der 5-HT Neurone sichtbar gemacht werden (Steinbusch, 1981).

**Abb. 3:** Ursprungsgebiete und Projektionsbahnen serotonerger Neurone (in Anlehnung an Paxinos und Watson, 1997)



I	Nc. raphe dorsalis	V	Zellen des Nc. interpeduncularis und Nc. pontis oralis
II	Nc. raphe medianus	VI	Nc. raphe magnus
III	Nc. raphe pontis	VII	Nc. raphe obscurus
IV	kaudaler Anteil des Nc. raphe dorsalis	VIII	Nc. raphe pallidus

Die rostrale Zellgruppe setzt sich aus dem dorsalen Raphekern, dem medianen Raphekern und umliegenden Anteilen, die nicht zu den Raphekerne gehören, zusammen. Von hier aus strahlen die Projektionsbahnen in alle Schichten der Großhirnrinde sowie in den Hippokampus, Hypothalamus, Thalamus, Bulbus olfactorius und das Septum (siehe Abb. 3). Projektionsbahnen der kaudalen Zellgruppe, gebildet von Nucleus raphe magnus, obscurus und pallidus sowie drei weiteren Zellanhäufungen, ziehen ins Rückenmark (Dahlström und Fuxe, 1964; Steinbusch, 1981). Der Hirnstamm und das Kleinhirn beziehen ihre serotonergen Projektionen aus der rostralen und kaudalen Zellgruppe (Halliday et al., 1995).

### 2.3.4. Klassifizierung, Verteilung und Funktion der Serotonin-Rezeptoren

Eine erste Einteilung der Serotonin-Rezeptoren nahmen Gaddum und Picarelli (1957) vor. Sie unterschieden nach funktionellen Gesichtspunkten zwischen zwei Rezeptoren, an denen entweder Morphium ( $M'$ -Rezeptor) oder Dibenzylin ( $D'$ -Rezeptor) antagonistisch wirkten. Durch Bindungsstudien mit Spiperon konnte ein dritter Rezeptor identifiziert werden (Peroutka und Snyder, 1979). Bradley und Mitarbeiter (1986) teilten die 5-HT-Rezeptoren in drei Rezeptorfamilien (5-HT<sub>1</sub>, 5-HT<sub>2</sub> und 5-HT<sub>3</sub>) ein.

Durch die Entwicklung neuer, selektiver Rezeptor-Agonisten bzw. -Antagonisten, durch molekularbiologische Techniken sowie durch die Identifizierung der intrazellulären Transduktionsmechanismen konnten bisher 7 Rezeptor-Familien und 14 strukturell und pharmakologisch unterschiedliche Rezeptor-Subtypen nachgewiesen werden (siehe Hoyer et al., 1994; Hoyer und Martin, 1997; Barnes und Sharp, 1999; Tab. 1).

Die Verteilung der einzelnen 5-HT-Rezeptorsubtypen im Gehirn scheint einem hoch spezifischen Muster zu folgen (siehe Tab. 1). Generell treten alle 5-HT-Rezeptoren postsynaptisch auf. Nur wenige Rezeptoren, 5-HT<sub>1A</sub>, 5-HT<sub>1B</sub> und eventuell 5-HT<sub>1D</sub>, sind als präsynaptische Autorezeptoren an den 5-HT-Neuronen vorhanden. Einige 5-HT-Rezeptoren (5-HT<sub>1B/1D</sub>, 5-HT<sub>2A/2C</sub>, 5-HT<sub>3</sub> und 5-HT<sub>4</sub>) befinden sich als Heterorezeptoren im terminalen Abschnitt von nicht-serotonergen Neuronen (z.B. GABAerge Neurone; siehe Barnes und Sharp, 1999).

Die biologischen Wirkungen, die über 5-HT-Rezeptoren vermittelt werden, sind weit gefächert. Neben zahlreichen physiologischen Regulationen (wie z.B. Thermoregulation, zirkadianer Rhythmus) haben sie auch einen großen Einfluß auf die Psyche (siehe Tab. 1). Insbesondere bei der Entstehung von pathologischen Angstzuständen scheint das serotonerge Transmissionssystem eine große Rolle zu spielen (Iversen, 1984; Handley und McBlane, 1993). Es wird vermutet, daß vor allem eine erhöhte 5-HT-Freisetzung für eine Verstärkung der Angst verantwortlich ist. So konnten Wise und Mitarbeiter (1972) die anxiolytische Wirkung von Oxazepam im Verhaltenstest durch intrazerebroventrikuläre Gaben von 5-HT aufheben. Sie zeigten ebenfalls, daß der Umsatz von 5-HT nach akuter Gabe von Oxazepam bei Ratten gesenkt wurde. Rex und Mitarbeiter wiesen nach, daß der Aufenthalt auf dem aversiven Elevated plus maze sowohl bei Meerschweinchen (1993) als auch bei Ratten (1999) mit einer erhöhten Ausschüttung von Serotonin im präfrontalen Kortex bzw. ventralen Hippokampus einhergeht.

**Tab. 1:** Einteilung, Verteilung und Funktion der 5-HT-Rezeptoren (nach Hoyer et al., 1994; Barnes und Sharp, 1999)

<b>Rezeptor-Familie</b>	<b>Subtyp</b>	<b>Vorkommen</b>	<b>Signalweiterleitung</b>	<b>agonistische, funktionelle Effekte</b>
5-HT <sub>1</sub>	5-HT <sub>1A</sub>	Hippokampus, laterales Septum, Kortex, dorsale und mediane Raphekerne	Hemmung der Adenylatzyklase	Angstverhalten, Hypothermie, Hyperphagie, gesteigertes Sexualverhalten, verringerte 5-HT-Freisetzung
	5-HT <sub>1B</sub>	bei Nagern: Basalganglien, Substantia nigra, Subiculum, dorsaler Raphekerne	Hemmung der Adenylatzyklase	erhöhte Lokomotion/Rotation, Hypophagie, Hypothermie, verringerte 5-HT-Freisetzung
	5-HT <sub>1D</sub>	beim Mensch: Basalganglien, Substantia nigra, Kortex, Hippokampus	Hemmung der Adenylatzyklase	noch ungeklärt, evtl. Thermoregulation
	5-ht <sub>1E</sub> <sup>+</sup>	Kortex, Putamen, Klastrum	Hemmung der Adenylatzyklase	noch ungeklärt
	5-ht <sub>1F</sub> <sup>+</sup>	Hippokampus, Kortex, dorsaler Raphekerne	Hemmung der Adenylatzyklase	noch ungeklärt
5-HT <sub>2</sub>	5-HT <sub>2A</sub>	Kortex, Klastrum, olfaktorische Kerngebiete, Hippokampus	Stimulierung der Phospholipase C	Angstverhalten, Hyperthermie, gesteigerte Lokomotion, Lernverhalten
	5-HT <sub>2B</sub>	v. a. peripher im Magenfundus, aber auch zentral in Zerebellum, Septum, Hypothalamus, Amygdala	Stimulierung der Phospholipase C	Angstverhalten, mitogene Effekte
	5-HT <sub>2C</sub>	Kortex, Hippokampus, Amygdala, Basalganglien	Stimulierung der Phospholipase C	Angstverhalten, Hypolokomotion, Hypophagie,
5-HT <sub>3</sub>	dorsaler vagaler Komplex des Hirnstammes, limbisches System	Kopplung an Kationenkanal	Angstverhalten, Lernverhalten, erhöhte Lokomotion, gesteigerte 5-HT-Freisetzung	
5-HT <sub>4</sub>	Hippokampus, Substantia nigra, Striatum	Stimulierung der Adenylatzyklase	Angstverhalten, Lernverhalten, gesteigerte 5-HT Freisetzung	
5-ht <sub>5</sub> <sup>+</sup>	Hippokampus, Kortex, Hypothalamus, Thalamus	noch ungeklärt, evtl. über Adenylatzyklase	noch ungeklärt, evtl. Wirkung auf Lokomotion und Exploration	
5-ht <sub>6</sub> <sup>+</sup>	Striatum, Nucleus accumbens, Hippokampus	Stimulierung der Adenylatzyklase	evtl. Angstverhalten, gesteigerte 5-HT-Freisetzung	
5-ht <sub>7</sub> <sup>+</sup>	Thalamus, Hypothalamus, Hippokampus	Stimulierung der Adenylatzyklase	zirkadianer Rhythmus, Hypophagie	

<sup>+</sup> Die Kleinschreibung von 5-ht bezeichnet die Rezeptortypen, die nur als rekombinante Rezeptoren bekannt sind.

Sie konnten ebenfalls zeigen, daß es bis ca. 40 min nach einer i.p. Gabe von 1,0 mg/kg Diazepam zu einem signifikantem Abfall der Basalfreisetzung von 5-HT im präfrontalen Kortex von Meerschweinchen kam (Rex et al., 1993).

Vor allem der 5-HT<sub>1A</sub>-Rezeptor sowie die drei Subtypen A, B und C des 5-HT<sub>2</sub>-Rezeptors sollen in einem engen Zusammenhang mit der Entwicklung von Angst stehen (Barnes und Sharp, 1999; Chojnacka-Wójcik, 1995). Zur Therapie von Angststörungen werden insbesondere Substanzen verwendet, die als Agonist am 5-HT<sub>1A</sub>-Rezeptor bzw. als Antagonisten am 5-HT<sub>2</sub>-Rezeptor angreifen (Millan und Brocco, 1993).

Dennoch wird die Bedeutung von 5-HT in der Entstehung von Angstzuständen immer wieder in Frage gestellt. Gardner (1986) wies darauf hin, daß einige am 5-HT-Rezeptor angreifende Substanzen, wie 8-OH-DPAT, Buspiron oder Ritanserin, keine konstanten anxiolytischen Effekte in tierexperimentellen Verhaltenstests zeigen. Er forderte daher, daß die getesteten Substanzen in der Klinik eindeutige anxiolytische Wirkungen aufweisen sollen, bevor sie zu den Anxiolytika gezählt werden können. Griebel (1995) dagegen vermutete, daß die unbeständigen Effekte der Substanzen darauf zurückzuführen sind, daß die eingesetzten Verhaltenstests wahrscheinlich verschiedene Angstformen nachahmen. Ein weiterer wichtiger Punkt ist, daß nicht nur das serotonerge Transmissionssystem, sondern wahrscheinlich mehrere Transmissionssysteme, wie das GABAerge, und andere Neurotransmitter, wie Noradrenalin und Dopamin, an der Ausprägung von Angstzuständen beteiligt sind (siehe Iversen, 1984; File, 1987; Menard und Treit, 1999; Handley und McBlane, 1993).

### **2.3.5. Ausgewählte serotonerg wirksame Pharmaka**

#### *8-OH-DPAT*

8-Hydroxy-2-(Di-N-Propylamino)Tetralin (8-OH-DPAT) wurde zunächst als selektiver und voller Agonist des 5-HT<sub>1A</sub>-Rezeptors beschrieben (Hjorth et al., 1989). Inzwischen ist aber bekannt, daß 8-OH-DPAT auch am 5-HT<sub>7</sub>-Rezeptor als Agonist wirkt (Plassat et al., 1993) und zudem eine Affinität zum Dopamin<sub>2</sub>-Rezeptor zeigt. Arborelius und Mitarbeiter (1993) konnten zeigen, daß 8-OH-DPAT in niedrigen Dosen die Feuerungsrate von Dopamin-Neuronen im ventralen Tegmentum erhöht. Dies würde erklären, daß mit 5-HT<sub>1A</sub>-Agonisten neben der anxiolytischen Wirkung auch weitere antipsychotische Effekte zu erzielen sind.

8-OH-DPAT wird ausschließlich in der experimentellen Pharmakologie eingesetzt. Dagegen werden strukturell verwandte 5-HT<sub>1A</sub>-Agonisten, wie z.B. Buspiron, erfolgreich klinisch zur

Behandlung von pathologischen Angstzuständen und Depressionen angewendet (Traber und Glaser, 1987).

Die pharmakologischen Effekte von 8-OH-DPAT im tierexperimentellen Angsttest sind widersprüchlich. So wurden sowohl anxiolytische, anxiogene oder auch keine Effekte in verschiedenen Verhaltenstests festgestellt (Rodgers und Cole, 1994; Menard und Treit, 1999). Die Gründe für diese gegensätzlichen Effekte sind noch weitestgehend ungeklärt. Handley und Mithani (1984) konnten beispielsweise beobachten, daß eine stark erhöhte Beleuchtung des Elevated plus maze-Tests die anxiogene Wirkung von 8-OH-DPAT in eine anxiolytische Wirkung umkehrte.

### *Ritanserin*

Ritanserin (R 55 667; 6-(2-[4-(bis[4-Fluorophenyl]methylen)-1-piperidinyl]-ethyl)-7-methyl-5H-thiazolo[3,2-a]pyrimidin-5-on) wurde zunächst als selektiver 5-HT<sub>2</sub>-Rezeptor-Antagonist entdeckt. Diese Erkenntnis beruhte darauf, daß Ritanserin die Wirkung von LSD im Drug discrimination-Test aufhob (Colpaert et al., 1985). Durch die neue Klassifizierung der 5-HT-Rezeptoren und die Entdeckung neuer Subtypen wurde ersichtlich, daß Ritanserin ein Antagonist an den 5-HT<sub>2A/2B/2C</sub>-Rezeptoren ist (Barnes und Sharp, 1999).

Es konnte in verschiedenen Verhaltenstests gezeigt werden, daß Ritanserin eine anxiolytische Wirkung entfaltet und im Gegensatz zu Chlordiazepoxid kaum einen Einfluß auf die Lokomotion hat und kein Suchtpotential aufweist (Meert und Janssen, 1989). Allerdings wurden auch bei Ritanserin gegensätzliche Effekte in den verschiedenen Angstmodellen festgestellt (Gardner, 1986; Handley und McBlane, 1993).