

## 4. Diskussion

Die pathologischen Angstzustände nehmen einen großen Prozentsatz der psychischen Erkrankungen ein. Die neurochemischen Hintergründe sind dabei noch weitgehend ungeklärt. Warum unterschiedliche Angsterkrankungen auf unterschiedliche Substanzklassen von Pharmaka ansprechen, liegt noch im Bereich der Spekulation. Ebenso kann man über die beteiligten Gehirnareale und Neurotransmitter bzw. deren Zusammenspiel nur Vermutungen anstellen. Um zu einem besseren Verständnis pathologischer Angstzustände zu kommen, wäre ein besseres Verständnis der Mechanismen hilfreich, die der physiologischen Angst zugrunde liegen. Von den zahlreichen Angstmodellen im Tierexperiment nutzen nur die auf unconditioniertem Explorationsverhalten basierenden die natürliche, angeborene Angst vor einer neuen Umgebung aus (Griebel, 1995). Dazu gehören auch der Elevated plus maze- und der Hole Board-Test. Im Elevated plus maze-Test können nicht nur 'anxiolytische', sondern auch 'anxiogene' Verhaltensänderungen erfaßt werden.

Als in den siebziger Jahren entdeckt wurde, daß die anxiolytisch wirksamen Benzodiazepine den Serotoninsatz senken (Stein et al., 1973: Oxazepam 20 mg/kg i.p.; Saner und Pletscher, 1979: Diazepam 1-3 mg/kg s.c.; Rex et al., 1993 Diazepam 1 mg/kg i.p.) und nach Serotoninreduktion eine Zunahme der bestraften Reaktionen im Konflikttest festgestellt wurde, die durch 5-HTP-Gabe wieder aufgehoben werden konnte (Geller und Blum, 1970), entstand die Hypothese, daß ein verminderter Serotoninsatz anxiolytisches Verhalten auslöst, während ein erhöhter Serotoninsatz zu gesteigertem Angstverhalten führt. Seitdem gab es zahlreiche Untersuchungen des Angstverhaltens, bei denen man versuchte, durch Gabe von para-Chloroamphetamin, para-Chlorophenylalanin (File und Hyde, 1977; Lorens, 1978) oder durch verschiedene Läsionstechniken eine Serotoninverarmung zu erreichen. Der Schwerpunkt bei Untersuchungen des Angstverhaltens nach neurotoxischen Läsionen der Raphekerne in unconditionierten Tests lag dabei zumeist auf dem dorsalen Raphekern, obwohl der mediane Raphekern ebenso in das Vorderhirn projiziert. Er versorgt Gehirnareale, die am Angstverhalten beteiligt sein sollen. Zusätzlich weisen Untersuchungen mit elektrischer Stimulation des MRN auf seine Beteiligung am Angstverhalten hin (Graeff und Silveira Filho, 1978).

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Überprüfung, ob die Läsion des medianen Raphekerns die Angstsymptome vermindert. Hierzu wurde der Elevated plus maze-Test, als ein gut validiertes Angstmodell gewählt, bei dem keine vorherige Konditionierung der Versuchstiere nötig ist. Außerdem sollte während der Versuchsdurchführung des verhaltenspharmakologischen Experimentes die gleichzeitige intrazerebrale Mikrodialyseuntersuchung erfolgen können. Von Interesse war der neurochemische Hintergrund, der mit Hilfe der *in vivo* Mikrodialyse am wachen, freibeweglichen Tier im Verhaltenstest und nach Pharmaka-induzierter Serotoninfreisetzung untersucht werden sollte.

#### **4.1. Verhaltensuntersuchungen nach Läsion des medianen Raphekerns**

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte im Elevated plus maze-Test an drei verschiedenen Zeitpunkten nach der Läsion kein Einfluß auf das Angstverhalten der getesteten Ratten nach 5,7-DHT Läsion bzw. Scheinläsion des medianen Raphekerns festgestellt werden. Dieses Ergebnis steht in Übereinstimmung mit einer Untersuchung von File et al. (1979), bei der kein Unterschied zwischen MRN-lädierten Tieren und Kontrollen im Social interaction-Test beobachtet werden konnte. Im inhaltlichen Widerspruch dazu stehen zwei Studien, bei denen die akute Applikation des 5-HT<sub>1A</sub>-Rezeptor-Agonisten 8-OH-DPAT, der über somatodendritische Autorezeptoren die Entladungsrate serotonerger Neurone hemmt, in den medianen Raphekern eine anxiolytische Wirkung sowohl im Social interaction-Test (Andrews et al., 1994) als auch im Black-and-White Box-Test und in einem modifizierten Vogel-Conflict-Test (Carli und Samanin, 1988) zur Folge hatte.

Ebenso inhomogen sind die Ergebnisse nach Ausschaltung des serotonergen Systems durch Neurotoxine, unabhängig von der Art der Applikation (in die Raphekerne oder i.c.v.) oder des Angstmodells (konditioniert oder unkonditioniert) (s. Literaturübersicht). Möglicherweise liegen Ursachen hierfür in den unterschiedlichen Dosierungen des Neurotoxins und den unterschiedlichen Volumina, in denen sie appliziert wurden. So berichten Björklund et al. (1973) über eine unspezifische Drucknekrose des Gewebes an der Kanülenspitze von 0,5 mm Durchmesser nach intrazerebraler Applikation von 2-4 µl physiologischer Kochsalzlösung. Lorens (1978) beschreibt eine Verringerung dieser unspezifischen Schädigung durch einen

längeren Injektionszeitraum und das Weglassen von Ascorbinsäure (als Antioxidans) aus der Injektionslösung.

Unterschiedliche Untersuchungsergebnisse können auch dadurch bedingt sein, daß einige Autoren die Verhaltensuntersuchungen in der Aktivitätsphase der Tiere durchführen, während andere diese Tests in die Inaktivitätsphase der Tiere legen. Da aber gerade das serotonerge System zirkadianen Schwankungen unterworfen ist, mag dies ein nicht unerheblicher Faktor sein.

Auch der Zeitpunkt, an dem die Verhaltensuntersuchung nach Durchführung der Läsion vorgenommen wurde, schwankt von Studie zu Studie. Dies ist jedoch wichtig für die Beeinflussung des Verhaltens durch den Eingriff an sich. Zum einen spielt die rein körperliche Komponente der Belastung durch die Narkose, die Wunde und den Wundschmerz eine Rolle und zum zweiten wird eine anxiogene Verhaltensbeeinflussung im Elevated plus maze von Tieren beschrieben (Hogg, 1996), die akutem operativem Streß ausgesetzt waren. In der vorliegenden Studie konnte bereits 5 Tage nach dem operativen Eingriff kein Effekt durch den Operationstreß im Elevated plus maze festgestellt werden.

Zusätzlich wird von einer Regeneration bzw. kompensatorischen Mechanismen serotonerger Neurone nach 5,7-DHT Applikation berichtet. So wird ein homotypisches kollaterales Einsprossen serotonerger Fasern nach 5,7-DHT Läsion der MRN-Projektionen via Cingulum und Indusium griseum in den dorsalen Hippokampus (Zhou und Azmitia, 1986), eine Reorganisation der Area dentata nach 5,7-DHT Läsion des medianen Raphekerns (Haring, 1991) oder eine Regeneration serotonerger Fasern im Hypothalamus nach einseitiger 5,7-DHT Injektion (Frankfurt und Azmitia, 1984) beschrieben. Ueda und Kawata (1994) untersuchten die Regeneration serotonerger Fasern nach i.c.v. Injektion des Neurotoxins 5,6-DHT in verschiedenen Hirnarealen. Drei Tage nach der Läsion zeigte sich ein massiver Schwund Serotonin-immunreaktiver Fasern im ganzen Gehirn, wobei die degenerativen serotonergen Fasern durch tropfenförmige Schwellungen ihrer proximalen Stümpfe gekennzeichnet waren. Aussprossende serotonerge Fasern aus diesen Schwellungen wurden bereits 5 Tage nach der Läsion beobachtet. Innerhalb von drei Monaten konnten abhängig vom Gehirngbiet drei Formen der Reorganisation serotonerger Fasern unterschieden werden: Hyperinnervation, Norminnervation und Hypoinnervation.

Um eine Veränderung des Verhaltens im Elevated plus maze durch regenerativen Mechanismen aufzudecken, wurden in der vorliegenden Studie drei Zeitpunkte der Verhaltensuntersuchung nach der MRN-Läsion gewählt. Der früheste Zeitpunkt von fünf Tagen wurde dabei als minimale Regenerationszeit der Tiere nach dem Operationsstreß

angenommen. Es zeigten sich aber zu allen drei Untersuchungszeitpunkten keine Unterschiede im Verhalten auf dem Elevated plus maze.

Änderungen der Aktivität der Tiere, die nach elektrolytischer Läsion des medianen Raphekerns beobachtet wurden (Lorens, 1978; Geyer et al., 1980), waren nach 5,7-DHT Läsion nicht nachvollziehbar. Vermutlich beruhen diese Verhaltensänderungen auf der Zerstörung von Neuronen anderer Neurotransmitter, die im medianen Raphekerengebiet liegen.

Da das Angstmodell Elevated plus maze auf dem Konflikt zwischen der Angst in einer fremden Umgebung und der Neugier, diese neue Umgebung zu erkunden, beruht, ist die Exploration ein wichtiger Aspekt in diesem Test. Um die Exploration von der lokomotorischen Aktivität abgrenzen zu können, wurde das Verhalten zusätzlich im Hole Board-Test untersucht. Auch in diesem Test konnte 14 Tage nach den Läsionen kein Unterschied im Verhalten zwischen unbehandelten, scheinlädierten und MRN-lädierten Tieren an beiden Tagen der Untersuchung erkannt werden. Auch Geyer et al. (1980) berichteten, daß die 5,7-DHT Läsion des medianen Raphekerns keinen Einfluß auf des Verhalten im Hole Board aufweist.

In der vorliegenden Untersuchung zeigten alle Tiergruppen eine deutliche Habituation der Exploration vom ersten auf den zweiten Tag. Dieses Ergebnis steht in Übereinstimmung mit Deakin et al. (1979), die nach 5,7-DHT-Läsion des medianen, dorsalen oder beider Raphekerne keinen Einfluß auf die Habituation der Orientierung im Lick-Distraction-Test, auf die Habituation der Aktivität im Open Field-Test oder auf die Habituation der Exploration im Hole Board-Test beobachteten. Im Widerspruch dazu steht eine Untersuchung von Baumgarten und Lachenmayer (1972), die nach i.c.v. Applikation von 5,7-DHT über eine fehlende Habituation auf wiederholt angebotene Stimuli berichteten.

Um eventuelle Einflüsse auf die Motorik der untersuchten Tiergruppen aufdecken zu können, wurden die Tiere nach dem Elevated plus maze-Test im RotaRod-Test untersucht. Dabei stellte sich heraus, daß weder die Scheinläsion noch die Läsion des medianen Raphekerns einen Einfluß auf die Motorik zu allen Untersuchungszeitpunkten aufwies.

Bei den Untersuchungen zum Nahrungsaufnahmeverhalten, stellte sich heraus, daß nach Läsion des medianen Raphekerns die Wirkung von peripher appliziertem CCK-8S abgeschwächt war. Bereits mehrere Studien legen den Schluß nahe, daß die appetitmindernde

Wirkung von CCK über Serotonin vermittelt wird. So konnten Stallone et al. (1989) zeigen, daß die appetitmindernde Wirkung von CCK durch den peripher und zentral wirksamen Serotoninblocker Metergolin deutlich abgeschwächt war, während dieser Effekt mit dem nur peripher wirkendem Xylamidin-Tosylat nicht erzielt werden konnte. Diese Beobachtungen ließen ihn vermuten, daß die CCKerge Wirkung auf die Nahrungsaufnahme von einem intakten zentralen Serotoninsystem abhängig sei. Poeschla et al. (1992) kamen nach Untersuchungen mit 8-OH-DPAT, das über präsynaptische 5-HT<sub>1A</sub>-Rezeptoren die zentrale Serotoninfreisetzung senkt, zu der gleichen Schlußfolgerung.

Die Auswirkungen auf das Nahrungsaufnahmeverhalten nach MRN-Läsion lassen vermuten, daß bereits die Ausschaltung dieses serotonergen Kerngebiets ausreicht, um das serotonerge System, das die CCKerge Wirkung vermittelt, soweit auszulenken, daß es zu keiner deutlichen Senkung der Nahrungsaufnahme nach CCK-8S Applikation kommt.

## 4.2. Mikrodialyse

### 4.2.1. Mikrodialyseuntersuchung an freibeweglichen Ratten auf dem Elevated plus maze nach Läsion des medianen Raphekerns

Um die neurochemischen Hintergründe des Verhaltens während des Aufenthalts auf dem Elevated plus maze zu beleuchten, kam die Methode der *in vivo* Mikrodialyse zum Einsatz. Da nach der Läsion des MRN keine Änderung des Angstverhaltens zu allen drei Untersuchungszeitpunkten im Elevated plus maze-Test beobachtet werden konnte, lag die Vermutung nahe, daß der dorsale Raphekern oder andere Teile des serotonergen Systems den Ausfall des MRN in den Projektionsgebieten kompensiert. Frühere *in vivo* Mikrodialysestudien haben bereits gezeigt, daß, wenn ein Tier einer fremden Umgebung ausgesetzt wird, es zu einem extrazellulären 5-HT-Anstieg in verschiedenen Gehirngebieten kommt (Rex et al., 1993; 1994). Es wird angenommen, daß dieser 5-HT-Anstieg mit 'Angst' assoziiert ist, die in diesem Verhaltensmodell auftritt. Dieser Anstieg kann durch vorherige Applikation von Diazepam verhindert werden und die getesteten Tiere zeigen dann verminderte Angst im Elevated plus maze-Test (Wright et al., 1992).

In der vorliegenden Mikrodialyseuntersuchung wurde der Hippokampus ausgewählt, da er am Angstverhalten beteiligt ist (Marsden et al., 1995) und seinen serotonergen Input hauptsächlich vom medianen Raphekern erhält, aber auch vom dorsalen Raphekern innerviert wird.

Die basalen extrazellulären 5-HT-Spiegel im Hippokampus unterschieden sich nicht zwischen den untersuchten Tiergruppen. Wie erwartet zeigten unbehandelte und scheinlädierte Tiere einen deutlichen Anstieg der extrazellulären 5-HT-Konzentration im Hippokampus während des Aufenthaltes auf dem Elevated plus maze. Bei den MRN-lädierten Tieren blieb dieser Anstieg aus. Trotz des fehlenden Anstiegs unterschieden sich die lädierten Tiere nicht im Angstverhalten auf dem Elevated plus maze während der Mikrodialyse von unbehandelten und scheinlädierten Tieren.

Eine direkte Kompensation durch Aufrechterhaltung des 5-HT-Anstiegs durch den dorsalen Raphekern kann somit für den Hippokampus ausgeschlossen werden. Es ist möglich, daß unterschiedliche Projektionen des MRN und des DRN für die unterschiedliche Funktion dieser Kerngebiete verantwortlich sind. So könnte es sein, daß andere Gehirngebiete für das Angstverhalten im Elevated plus maze eine wichtigere Rolle spielen, die ihren 5-HT-Input

hauptsächlich vom DRN erhalten, wie beispielsweise die Amygdala oder das dorsale periaquaeduktale Grau (DPAG), von denen angenommen wird, daß sie eine entscheidende Rolle bei Abwehrmechanismen spielen. Die elektrische Stimulation des DPAG wirkt bei Menschen und Tieren extrem aversiv (Nashold et al., 1969). Diese Wirkung kann durch Stimulation des dorsalen Raphekerns vermindert werden (Kiser et al., 1980). Aufgrund ihrer Studien mit dem Elevated T-maze stellten Graeff et al. (1997) die Theorie auf, daß 5-HT-Neurone, die vom DRN aufsteigen, vorhersehbare oder erlernte (konditionierte) Angst durch ihre Wirkung in der Amygdala steigern, während sie Panik (unkonditionierte Angst) im DPAG unterdrücken. Dies wäre eine mögliche Erklärung für die ausbleibende Anxiolyse nach MRN-Läsion; der intakte DRN kompensiert durch seine Wirkung auf das DPAG diesen Defekt.

Auf der anderen Seite könnten auch andere Transmissionssysteme, die in enger Interaktion mit dem 5-HT-System stehen, für die Kompensation des Ausfalls des MRN verantwortlich sein. Schon kurz nach den Erkenntnissen über die Wirkung der Benzodiazepine auf den zentralen Monoaminumsatz, wurde von Stein et al. (1973) ein zentrales Belohnungs- und ein Bestrafungssystem postuliert. Von diesen beiden antagonistischen Systemen sollte das Belohnungssystem vorwiegend noradrenergen und das Bestrafungssystem hauptsächlich serotonergen Ursprungs sein. Baraban und Aghajanian (1981) identifizierten noradrenerge Nervenendigungen im Nucleus Raphe dorsalis und Massari et al. (1979) konnten Projektionen der A<sub>1</sub> und A<sub>2</sub> Zellgruppe in den medianen Raphekern nachweisen. Umgekehrt berichteten Saito et al. (1996) von einem inhibitorischen Einfluß des serotonergen auf das noradrenerge System. Möglicherweise kann das noradrenerge System durch den partiellen inhibitorischen Ausfall des serotonergen Systems infolge der MRN-Läsion eine Veränderung im Angstverhalten kompensieren.

Ähnliche Interaktionen werden auch zwischen dem GABAergen und serotonergen System in bezug auf das Angstverhalten in Erwägung gezogen (Lopez-Rubalcava et al., 1992).

Dopamin wird wie Serotonin an der Beteiligung von psychischen Erkrankungen diskutiert. Es konnte in Mikrodialysestudien gezeigt werden, daß Streß die Dopaminspiegel bzw. den -umsatz, in Abhängigkeit von der Stärke und der Art des einwirkenden Stressors, in verschiedenen Gehirngebieten erhöht (Inoue et al., 1994). Morrow und Roth (1994) untersuchten die Auswirkung von Immobilisationsstreß auf den Dopaminumsatz im medialen prefrontalen Kortex (mPFC) und im Nucleus accumbens (NAS) nach 5,7-DHT Läsion des DRN. Sie fanden heraus, daß der basale Dopaminumsatz in scheinladierten und 5,7-DHT

lädierten Tieren sich nicht unterschied, aber die Antwort auf Immobilisationsstreß bei den 5,7-DHT lädierten Tieren, in bezug auf die Höhe des Dopaminumsatzes, deutlich stärker ausfiel als bei den Kontrolltieren. Die Relevanz eines erhöhten Dopaminumsatzes im mPFC und im NAS in Streßsituationen versuchten sie damit zu erklären, daß ein erhöhter mesokortikaler Dopaminumsatz möglicherweise die Funktion des Kortex in bezug auf kognitive Funktionen herabsetzt, damit grundlegende Funktionen, die mit dem Überleben assoziiert sind, z. B. Flucht, in den Vordergrund treten können, anstelle von höherentwickelten Funktionen, die zu diesem Zeitpunkt unnütz sind oder stören.

Dopaminerge Projektionen zum NAS sollen gerichtete lokomotorische Verhaltensweisen fördern. Streß-induzierter Anstieg von Dopamin im NAS könnte dafür zuständig sein, nützliche gerichtete lokomotorische Aktivitäten, z. B. Flucht, zu beschleunigen.

Als Konsequenz des gegenüber Kontrollen stark erhöhten Dopaminumsatzes in Streßsituationen bei 5,7-DHT Läsionen des DRN geben sie zwei Erklärungsmodelle an: 1) Dopamin ersetzt einfach das fehlende 5-HT und dadurch wird kein Effekt im Verhalten beobachtet oder 2) der gesteigerte Dopaminumsatz führt zu gesteigerten Verhaltenseffekten des Dopamins und damit zu einer Abschwächung höherer mentaler Funktionen und einer gesteigerten gerichteten lokomotorischen Antwort auf den Stressor.

Darüber hinaus berichteten Simon et al. (1993) von anxiogenen Effekten nach Aktivierung von Dopaminrezeptoren.

Diese Ergebnisse liefern auch eine denkbare Erklärung für das Fehlen von Verhaltenskorrelaten zum ausbleibenden extrazellulären 5-HT-Anstieg in der vorliegenden Studie.

Ein weiterer Erklärungsansatz bezieht sich schließlich auf die 5-HT-Rezeptoren. Wright et al. (1992) untersuchten in einer Mikrodialysestudie an Ratten die Wirkung von Diazepam, Ipsapiron und dem neuen Anxiolytikum F2692 (1-(3'-Trifluoro-Methylphenyl)1,4-Dihydro 3-Amino 4-Oxo 6-Methyl Pyridazin) auf das Angstverhalten im Elevated plus maze und den während der Exposition auftretenden extrazellulären 5-HT-Anstieg im Hippokampus, sowie auf die basalen 5-HT-Spiegel vor dem Aufenthalt auf dem Maze. Er fand heraus, daß Diazepam den 5-HT-Anstieg im Hippokampus hemmt und die Tiere ein anxiolytisches Verhaltensprofil zeigen. Der basale 5-HT-Spiegel war dabei unverändert. Ipsapiron, ein partieller 5-HT<sub>1A</sub>-Agonist verhindert ebenfalls den extrazellulären 5-HT-Anstieg im Hippokampus während des Aufenthaltes auf dem Elevated plus maze, ohne daß die Tiere jedoch im Angstverhalten verändert waren. Auch Ipsapiron hatte keinen Einfluß auf die

basale 5-HT-Konzentration, vor der Exposition auf dem Maze. F2692 inhibierte auch den extrazellulären 5-HT-Anstieg und die Tiere zeigten ein anxiolytisches Verhaltensprofil. Zusätzlich reduzierte F2692 den basalen 5-HT-Spiegel vor der Exposition der Tiere auf dem Elevated plus maze. Auch diese Studie belegt, daß nicht allein die Inhibition des hippocampalen extrazellulären 5-HT-Anstiegs zu einem anxiolytischen Verhaltensprofil im Elevated plus maze führt.

Cadogan et al. (1994) untersuchten ebenfalls in einer Mikrodialysestudie an Ratten die Wirkung von Diazepam diesmal auf das Angstverhalten im Social interaction-Test und den während des Tests auftretenden extrazellulären 5-HT-Anstieg im Hippokampus. Auch sie fanden heraus, daß Diazepam den im Test auftretenden 5-HT-Anstieg hemmt und die Tiere ein anxiolytisches Verhaltensprofil zeigen. Zusätzlich untersuchte sie die extrazelluläre cAMP (zyklisches Adenosinmonophosphat) -Konzentration im Hippokampus, die als Korrelat des intrazellulären cAMP-Spiegels ein Maß für die Aktivität von Adenylatzyklase-gekoppelten Rezeptoren darstellt. Nach Applikation von 8-OH-DPAT, einem 5-HT<sub>1A</sub>-Agonisten, stieg cAMP im Hippokampus an, ein Effekt der durch WAY 100135 (N-tert-butyl-3-(4-(2-methoxyphenyl)-piperazin-1-yl)-2-phenylpropanamid), einem selektiven 5-HT<sub>1A</sub>-Antagonisten, verhindert werden konnte. Unter den Bedingungen des Social interaction-Test steigt nicht nur 5-HT, sondern auch cAMP im Hippokampus. Dabei zeigte sich in dieser Studie, daß nach Applikation von Diazepam nicht nur der 5-HT-Anstieg, sondern auch der cAMP-Anstieg signifikant gehemmt war. WAY 100135 verursachte dagegen eine Potenzierung des 5-HT-Anstiegs, der cAMP Anstieg wurde aber gleichfalls gehemmt. Die Tiere zeigten jedoch keine Veränderung im Angstverhalten.

Diese Ergebnisse können folgendes bedeuten: Nicht allein die Ausschüttung von 5-HT an den Terminalen im Hippokampus, sondern auch die Wirkung an den Rezeptoren der Effektorzellen spielen eine entscheidende Rolle bei der Ausprägung von anxiolytischen Verhaltensprofilen. In den Studien von Wright et al. (1992) und Cadogan et al. (1994) tritt nach Applikation von Diazepam eine Anxiolyse auf. Dabei hemmt Diazepam den 5-HT- und den cAMP-Anstieg. Möglicherweise tritt nach Applikation von Ipsapiron keine Anxiolyse auf, weil Ipsapiron zwar den 5-HT-Anstieg hemmt, aber durch seine agonistische Wirkung an den Effektorzellen evtl. einen cAMP-Anstieg verursacht. WAY 100135 wiederum verhindert zwar einen Anstieg von cAMP, potenziert aber durch seine antagonistische Wirkung an präsynaptischen 5-HT<sub>1A</sub>-Autorezeptoren den 5-HT-Anstieg und führt dadurch ebenfalls nicht zur Anxiolyse.

Verschiedene Autoren (Azmitia et al., 1978; Patel et al., 1996) berichteten nach 5,7-DHT Läsionen von einer Supersensitivität von 5-HT<sub>1A</sub>-Rezeptoren bzw. einer erhöhten Expression des 5-HT<sub>1A</sub>-Rezeptor-Proteins. Es wäre also möglich, daß in der vorliegenden Studie nach der MRN-Läsion eine Supersensitivität bzw. eine erhöhte Expression der 5-HT-Rezeptoren an den Effektorzellen im Hippokampus auftritt. Dies könnte dazu führen, daß trotz des Ausbleibens des extrazellulären 5-HT-Anstiegs im Hippokampus die Aufrechterhaltung des basalen 5-HT-Spiegels ausreicht, um einen Anstieg von cAMP durch vermehrte Wirkung an den Rezeptoren hervorzurufen, und damit eine Abweichung im Angstverhalten zu kompensieren.

#### 4.2.2. Mikrodialyseuntersuchung an freibeweglichen Ratten im Heimatkäfig nach Applikation von Fenfluramin

Um zu überprüfen, inwieweit sich nach der MRN-Läsion überhaupt noch ein 5-HT-Anstieg pharmakologisch durch den Serotoninfreisetzer und Wiederaufnahmehemmer Fenfluramin auslösen läßt, wurden scheinlädierten und lädierten Tieren während der Mikrodialyse im Heimatkäfig 10 mg/kg i.p. appliziert. Während die scheinlädierten Kontrollen nach Applikation von Fenfluramin einen 10fachen Anstieg der extrazellulären 5-HT-Spiegel im Hippokampus zeigten, war der Anstieg bei den MRN-lädierten Tieren nur gering. Diese Beobachtung steht in Übereinstimmung mit zwei Studien, die nach 5,7-DHT-Läsion (i.c.v. oder intra raphe dorsalis) ebenfalls keine deutlichen Unterschiede in den basalen extrazellulären 5-HT-Spiegeln zwischen scheinlädierten und lädierten Ratten zeigten. Nach Stimulation mit Fenfluramin oder Kaliumchlorid war der bei den scheinlädierten Kontrollen auftretende 5-HT-Anstieg bei den lädierten Tieren ebenfalls deutlich abgeschwächt (Kirby et al., 1995; Romero et al., 1998).

Diese Ergebnisse zeigen, daß trotz massiver Schädigung des serotonergen Systems (73,2 %ige Reduktion der 5-HT-Gehalte im Hippokampus) der Organismus in der Lage ist, basale 5-HT-Spiegel aufrecht zu erhalten, aber daß diese Mechanismen nicht ausreichen, um auf pharmakologische Provokation zu antworten.

#### 4.3. Verhaltensuntersuchungen nach Läsion des dorsalen Raphekerns

Zwei Wochen nach der 5,7-DHT-Läsion des dorsalen Raphekerns konnte im Elevated plus maze-Test zwischen unbehandelten, scheinlädierten und lädierten Tieren kein Unterschied in bezug auf das Angstverhalten festgestellt werden. Obwohl die 5,7-DHT-Läsion des dorsalen Raphekerns, wie aus der Literatur hervorgeht, häufiger untersucht wurde als die des medianen Raphekerns, sind die Ergebnisse sowohl in unconditionierten, als auch in konditionierten Testverfahren unterschiedlich (s. Einleitung). Diese Diskrepanzen könnten in methodischen Unterschieden begründet sein (s. Kapitel 4.1.). Critchley et al. (1992) erzielten nach 5,7-DHT Läsion des dorsalen Raphekerns das gleiche Ergebnis im Elevated plus maze-Test wie in der vorliegenden Studie. Damit bestätigte sich die Spekulation, daß der DRN durch seine Wirkung auf die Amygdala oder das DPAG eine wichtigere Rolle für das Angstverhalten im

Elevated plus maze als der MRN spielt, nicht. Ansonsten hätte nach dem Ausfall des DRN eine Änderung im Angstverhalten eintreten müssen.

Bei den Untersuchungen zum Nahrungsaufnahmeverhalten nach 5,7-DHT Läsion des dorsalen Raphekerns stellte sich heraus, daß CCK-8S seine deutlich appetitmindernde Wirkung auch bei den lädierten Tieren behielt. Wenn man davon ausgeht, daß die hypophagische Wirkung von CCK-8S über Serotonin vermittelt wird, kommt dabei offensichtlich dem medianen Raphekern die entscheidende Rolle zu. Möglicherweise liegt dies an den unterschiedlichen Projektionen der beiden Raphekerne zu den entsprechenden Regionen im Hypothalamus, die als Kontrollzentrum für die serotonerge Wirkung auf das Nahrungsaufnahmeverhalten gelten. So erhält z. B. der Nucleus suprachiasmaticus (SCN) eine dichte serotonerge Innervation des MRN (Meyer-Bernstein et al., 1997). Larsen et al. (1996) berichteten von einer serotonergen Innervation des paraventriculären Nukleus (PVN), die dem MRN entstammt.

Faßt man die 5-HT-Gehalte der MRN- und DRN-lädierten Tiere (s. Tabelle 3) für den gesamten Hypothalamus zusammen, ergeben sich keine großen Unterschiede. Möglicherweise spielen die unterschiedlichen Projektionen der beiden Raphekerne zu den verschiedenen Kerngebieten im Hypothalamus die entscheidende Rolle.

#### **4.4. Verhaltensuntersuchungen nach Läsion des medianen und des dorsalen Raphekerns**

Bei den Untersuchungen zum Angstverhalten im Elevated plus maze-Test konnte 14 Tage nach der Läsion des medianen und dorsalen Raphekerns ein deutlicher Unterschied zwischen scheinlädierten und lädierten Tieren in der Häufigkeit der Eintritte in die offenen Arme bezogen auf die Gesamteintritte festgestellt werden. Die lädierten Tiere verbrachten auch mehr Zeit in den offenen Armen als die scheinlädierten. Dieser Unterschied erreichte jedoch keine Signifikanz. Dabei zeigte weder die Läsion noch die Scheinläsion einen Einfluß auf die Anzahl der Gesamteintritte oder auf die zurückgelegte Distanz im Elevated plus maze. Dieses Ergebnis steht im Widerspruch zu einer Studie von File (1980), die nach der Läsion des medianen und des dorsalen Raphekerns kein anxiolytisches Verhaltensprofil im Social interaction-Test feststellte. Allerdings zeigten die Tiere bei ihrer Studie eine reduzierte

lokomotorische Aktivität, die eine Auswertung erschwert, da anxiolytische Effekte maskiert werden können. In Übereinstimmung mit der vorliegenden Studie steht das Ergebnis von Briley et al. (1990), die das Neurotoxin 5,7-DHT i.c.v. applizierten und damit eine 99 %ige 5-HT-Reduktion im Hippokampus erreichten. Sie beobachteten ebenfalls deutlich häufigere Eintritte in die offenen Arme bezogen auf die Gesamteintritte bei den 5,7-DHT-lädierten Tieren im Vergleich zu den Kontrollen.

Die vorliegenden Ergebnisse deuten darauf hin, daß starke Beeinträchtigungen des serotonergen Systems, zu einem anxiolytischen Verhaltensprofil im Elevated plus maze führen. Möglicherweise ist hierbei die Beeinträchtigung so stark (s. auch 5-HT-Gehalte), daß basale 5-HT-Spiegel nicht mehr aufrechterhalten werden können und dies dazu führt, daß die kompensatorischen Mechanismen nicht mehr greifen. Dies wäre auch eine Erklärung für die in der Studie von Wright et al. (1992) (s. Kapitel 4.2.) beschriebene Wirkung von F2692, das bereits vor dem Aufenthalt auf dem Elevated plus maze den basalen 5-HT-Spiegel absenkt.

Die Ergebnisse deuten darauf hin, daß die Auswirkungen eines partiellen Ausfalls des serotonergen Systems durch Läsion des medianen oder des dorsalen Raphekerns auf das Angstverhalten im Elevated plus maze-Test durch kompensatorische Mechanismen aufgefangen werden. Erst ein nahezu kompletter Ausfall des serotonergen Systems scheint ein anxiolytisches Verhaltensprofil im Elevated plus maze-Test zu erzeugen.

Die Untersuchung konnte zeigen, daß der Ausfall des hippokampalen extrazellulären 5-HT-Anstiegs während des Aufenthaltes auf dem Elevated plus maze bei Tieren mit 5,7-DHT-Läsion des medianen Raphekerns keine Änderung des Angstverhaltens im Elevated plus maze-Test bewirkt.

Von besonderem Interesse bei weiterführenden Untersuchungen wären die 5-HT-Konzentrationen im *in vivo* Mikrodialyseversuch bei MRN- und DRN-lädierten Tieren vor und während des Aufenthaltes auf dem Elevated plus maze. Problematisch wäre dabei evtl. ein Absinken der Basalkonzentrationen, da sie sich bereits in der vorliegenden Untersuchung am Detektionslimit bewegen.

Weiterführende *in vivo* Mikrodialyseversuche, die die Konzentrationen von Dopamin, Noradrenalin und GABA vor, während und nach dem Aufenthalt auf dem Elevated plus maze untersuchen würden, könnten Licht in das Zusammenspiel der verschiedenen Neurotransmitter bei der Ausprägung des Angstverhaltens bringen. Weiterhin wäre die Einbeziehung anderer Gehirnstrukturen bei der Mikrodialyse aufschlußreich, vor allem

solcher, die für das Angstverhalten eine wichtige Rolle spielen, z. B. die Amygdala oder das DPAG.

Schließlich könnte man eine Testbatterie aus unterschiedlichen unconditionierten und konditionierten Angstverhaltenstests zusammenstellen, bei denen die Tiere gleichzeitig der *in vivo* Mikrodialyseuntersuchung unterzogen würden, um Rückschlüsse auf verschiedene Angstformen ziehen zu können.

Eine solche Übersicht über die neurochemischen Prozesse während des Angstverhaltens im Tierversuch würde ein Verständnis der pathologischen Angstzustände beim Menschen erleichtern.

## 5. Zusammenfassung

Seitdem die Theorie aufgestellt wurde, daß erhöhte Aktivität des zentralen serotonergen Neurotransmissionssystems angstfördernd wirkt, während Verminderung oder Aufhebung dieser serotonergen Aktivität angstmindernd ist, gab es zahlreiche Studien zu diesem Thema, die jedoch große Widersprüche in ihren Ergebnissen aufwiesen. Bei der Betrachtung der einzelnen Raphekerne lag der Schwerpunkt zumeist auf dem dorsalen Raphekern.

In der vorliegenden Arbeit sollte überprüft werden, ob sich die neurotoxische Läsion des medianen, des dorsalen und beider Raphekerne auf das Angstverhalten im Elevated plus maze-Test auswirkt. In einem zweiten Teil wurde vor, während und nach diesem Verhaltenstest der extrazelluläre hippocampale 5-HT-Spiegel mit Hilfe der *in vivo* Mikrodialyse bestimmt. Bei der Mikrodialyse im Heimatkäfig wurde der Einfluß der pharmakologischen Provokation auf das lädierte System untersucht. Ferner sollte der Einfluß der Läsion des medianen bzw. des dorsalen Raphekerns auf die appetitmindernde Wirkung des Neuropeptids Cholezystokinin untersucht werden.

Männlichen Sprague Dawley Ratten wurde das Neurotoxin 5,7-DHT entweder stereotaktisch in den medianen, den dorsalen oder beide Raphekerne injiziert. Um mögliche Regenerationsprozesse der serotonergen Neurone zu berücksichtigen, wurden Tiergruppen mit Läsion des medianen Raphekerns nach einer Erholungszeit von 5, 14 und 21 Tagen im Elevated plus maze getestet; Tiere mit Läsion des dorsalen bzw. beider Raphekerne jeweils nach 14 Tagen. Die Auswirkungen der MRN-Läsion wurde zusätzlich im Hole Board- und RotaRod-Test untersucht.

Bei jeweils einer Gruppe mit Läsion des medianen Raphekerns und einer Gruppe mit Läsion des dorsalen Raphekerns wurde nach CCK-8S-Applikation (8 µg/kg i.p.) die Nahrungsaufnahme überprüft. Für die *in vivo* Mikrodialyseversuche wurde den Tieren unmittelbar nach der MRN-Läsion eine Führungskanüle für die Mikrodialysesonde eingesetzt. Die Versuche wurden nach einer Regenerationszeit von 8-10 Tagen durchgeführt. Der erste Versuch untersuchte die 5-HT-Konzentrationen vor, während und nach dem Aufenthalt auf dem Elevated plus maze. Während des zweiten Versuchs im Heimatkäfig erhielten die Tiere eine Fenfluramininjektion (10 mg/kg i.p.). Zur Überprüfung der Läsionstechnik wurden die Tiere einer 5-HT-Gehaltsbestimmung oder einer histologischen Untersuchung unterzogen.

Es zeigte sich, daß bei den Tieren mit Läsion des medianen Raphekerns zu allen Untersuchungszeitpunkten keine Veränderung des Angstverhaltens im Elevated plus maze auftrat. Um so überraschender war der Befund, daß die lädierten Tiere im Gegensatz zu scheinlädierten und unbehandelten Kontrollen keinen 5-HT-Anstieg im Hippokampus während des Aufenthaltes auf dem Maze aufwiesen. Die Gehaltsbestimmungen und die pharmakologische Provokation mit Fenfluramin zeigten, daß bei den Tieren eine starke Beeinträchtigung des serotonergen Systems vorlag. Ebenso verhielt es sich mit den DRN-lädierten Tieren. Auch bei ihnen traten keine Veränderung im Angstverhalten auf, trotz deutlich verminderter 5-HT-Gehalte. Erst die Tiere mit Läsion beider Raphekerne zeigten verminderte Angstreaktionen im Elevated plus maze-Test bei massiver Absenkung ihrer 5-HT-Gehalte.

Die Untersuchung des Nahrungsaufnahmeverhaltens ergab, daß die appetitmindernde Wirkung von CCK-8S auch nach der Läsion des dorsalen Raphekerns ausgelöst wurde, während sie nach der Läsion des medianen Raphekerns abgeschwächt war.

Mögliche Erklärungen für das Ausbleiben von Verhaltenskorrelaten zu dem fehlenden 5-HT-Anstieg während des Aufenthaltes auf dem Elevated plus maze bei den MRN-lädierten Tieren sind kompensatorische Mechanismen; diskutiert werden die Möglichkeiten, daß der dorsale Raphekern den Ausfall des MRN in anderen Gehirngebieten als dem Hippokampus ausgleicht, daß andere Transmitter, die in enger Interaktion mit dem serotonergen System stehen, wie das dopaminerge, noradrenerge oder GABAerge System den Ausfall überlagern oder daß durch Rezeptorsupersensitivität oder vermehrte Rezeptorproduktion in den Effektorgebieten die basale 5-HT-Konzentration ausreicht, um das Angstverhalten aufrechtzuerhalten.

Offensichtlich wird das Angstverhalten erst dann in Richtung Anxiolyse ausgelenkt, wenn das serotonerge System nahezu komplett ausgeschaltet wird, wie durch die Läsion des medianen und dorsalen Raphekerns.

## 6. Summary

### BEHAVIOURAL AND NEUROCHEMICAL INVESTIGATION AFTER LESION OF THE MEDIAN AND DORSAL RAPHE NUCLEUS OF THE RAT

Since the theory was put forward that increased activity of central serotonergic neurotransmission leads to anxiogenic behaviour whereas antagonism or diminution of serotonergic activity causes anxiolysis, there were numerous studies for this topic which showed discrepancies in their results. In the analysis of the function of single raphe nuclei the main emphasis laid on the dorsal raphe nucleus.

The aim of this study was to examine the effect of neurotoxic lesion of the median, dorsal, and both raphe nuclei on anxiety-related behaviour displayed in the elevated plus maze-test. In a second part the extracellular hippocampal 5-HT-levels were measured with the *in vivo* microdialysis-technique before, during and after exposition to the maze. During microdialysis in the homecage the influence of pharmacological provocation on the lesioned system was examined. Further the consequences of lesion of the median raphe nucleus respectively lesion of the dorsal raphe nucleus on the reduction of food intake induced by the neuropeptide cholecystokinin were investigated.

Male Sprague Dawley rats received neurotoxic lesions of either the median, dorsal or both raphe nuclei. To consider possible regeneration-processes of serotonergic neurons, different groups of animals were tested in the elevated plus maze-test after recovery of 5, 14, and 21 days; animals with lesion of the dorsal raphe nucleus or both raphe nuclei were tested after 14 days. The consequences of the MRN-lesion was studied additionally in the Hole Board- and RotaRod-test.

In two groups with either lesion of the median or dorsal raphe nucleus food intake was investigated after application of CCK-8S (8 µg/kg i.p.).

For the *in vivo* microdialysis animals were implanted with microdialysis guide cannulas immediately after MRN-lesion. The experiments were carried out after a regeneration of 8-10 days. The first experiment investigated the 5-HT-levels before, during and after exposition to the elevated plus maze. During the second experiment in the homecage animals received an injection of Fenfluramin (10 mg/kg i.p.). To verify the lesion-technique animals were submitted to determination of 5-HT-contents or histological examination.

It could be shown that lesion of the median raphe nucleus was without effect on behaviour in the elevated plus maze-test at all times of testing. All the more surprising was the result that lesioned animals showed no increase in extracellular hippocampal 5-HT-levels during exposition to the maze in contrast to sham-lesioned and untreated controls. Determination of 5-HT-contents and pharmacological provocation with fenfluramine resulted in a strong impeding of the serotonergic system. Lesion of the dorsal raphe nucleus also was without effect on anxiety-related behaviour in spite of clear reduced 5-HT-contents. Only animals with lesion of both raphe nuclei showed an anxiolytic behavioural profile with massive decrease in their 5-HT-contents.

In the investigation of food intake the appetite suppressant effect of CCK-8S was preserved after lesion of the dorsal raphe nucleus, whereas this effect was reduced after lesion of the median raphe nucleus.

Possible explanations for the absence of behavioural correlates to the missing increase of 5-HT-levels during exposure to the elevated plus maze in MRN lesioned animals are compensatory mechanisms; may be that the dorsal raphe nucleus adjusts the loss of the MRN in other brain regions than the hippocampus, or that other transmitters, which are in close interaction with the serotonergic system, like the dopaminergic, noradrenergic or GABAergic system, overlap the loss, or that the effect on anxiety-related behaviour is maintained by receptor supersensitivity or by increased production of receptors in the effector regions.

Obviously the anxiety-related behaviour is only then unsettled towards anxiolysis, if the serotonergic system is nearly completely knocked out as seen by lesion of the median and dorsal raphe nucleus.