

**Einfluß von endogenem Oxytocin auf die neuroendokrine und
verhaltensbiologische Streßreaktivität unterschiedlicher Tiermodelle**

Dissertation
an der Fakultät für Biologie
der Ludwig-Maximilians-Universität München
Zoologisches Institut
Fachbereich Neurobiologie

vorgelegt von
Alexandra Wigger

am 31.03.2000

1. Berichterstatter: Prof. R. Landgraf
2. Berichterstatter: Prof. G. Neuweiler

Tag der mündlichen Prüfung: 11.12.2000

Abkürzungsverzeichnis

ACTH	Adrenocorticotropin
ANOVA	Statistische Varianzanalyse
AVP	Arginin-8-Vasopressin
CRH	<i>Corticotropin releasing hormon</i>
DNA	<i>Desoxyribonucleic acid</i> , Desoxyribonucleinsäure
EDTA	Ethylendiamin-Tetraacetat
EPM	<i>Elevated plus-maze</i>
FS	Forciertes Schwimmen, Schwimmstreß
GABA	<i>Gamma-aminobutyric acid</i> , γ -Aminobuttersäure
HAB	<i>High anxiety-related behaviour</i>
HNS	Hypothalamo-neurohypophysäres System
HPA Achse	Hypothalamo-adenohypophysär-adrenocorticale Achse
IU	<i>International units</i> , Internationale Einheiten
icv	intracerebroventriculär
iv	intravenös
KGW	Körpergewicht
LAB	<i>Low anxiety-related behaviour</i>
mRNA	<i>Messenger ribonucleic acid</i> , Boten-Ribonucleinsäure
min	Minute
n	Anzahl
NLX	Naloxon
n. s.	nicht signifikant
OXT	Oxytocin
P	Statistische Irrtumswahrscheinlichkeit
PVN	<i>Nucleus paraventricularis</i>
s	Sekunde
SDS	<i>Sodium dodecyle sulfate</i> , Natrium-Dodecylsulfat
SEM	Standardfehler des Mittelwertes
SON	<i>Nucleus supraopticus</i>
SSC	<i>Standard saline citrate</i> , Natriumchlorid/Natriumcitrat-Puffer
sc	subcutan
Upm	Umdrehungen pro Minute

Kurzbeschreibung

1	Einleitung	1
2	Material und Methoden	1
2.1	Tiere und Haltung	11
2.1.1	Selektion und Zucht von Angstzuchtratten	11
2.1.2	Cross-mating	12
2.1.3	Cross-fostering	13
2.2	Verhaltenstests und Streßparadigmen	13
2.2.1	<i>Elevated plus-maze-</i> und <i>open-arm-</i> Exposition	13
2.2.2	Schwimmstreß	15
2.2.3	Soziale Interaktion	16
2.2.4	Ultraschallvokalisations-Test	17
2.2.5	Spielerisches Kampfverhalten / <i>play fighting</i>	18
2.2.6	Kompetitives Trinkverhalten	18
2.3	Bestimmung neuroendokriner Parameter	19
2.3.1	Operationen	19
2.3.1.1	Implantation eines chronischen Jugularvenenkatheters	19
2.3.1.2	Implantation einer intracerebroventriculären Führungskanüle	19
2.3.1.3	Implantation einer Mikro- bzw. Retrodialysesonde	20
2.3.1.4	Histologische Kontrolle	21
2.3.2	Analytische Methoden	22
2.3.2.1	Entnahme, Behandlung und Volumina der Blutproben	22
2.3.2.1	Extraktion von Oxytocin und Vasopressin aus Blutplasma	22
2.3.2.3	<i>Radioimmunoassays</i>	22
2.3.2.4	<i>In situ</i> Hybridisierung	23
2.4	Pharmakologische Behandlungen	24
2.4.1	Opiat-Rezeptor-Antagonist	24
2.4.2	Oxytocin- und Vasopressin-Rezeptor-Antagonist	24
2.4.3	<i>Corticotropin releasing hormon</i>	24
2.5	Statistik	25

3	Ergebnisse	26
3.1	Regulation der hypothalamo-adenohypophysär-adrenocorticalen Achse und des emotionalen Verhaltens durch das zentrale oxytocinerge System	26
3.1.1	Zentrale Applikation eines Oxytocin-Rezeptor-Antagonisten bei Männchen und virginen Weibchen	26
3.1.1.1	Intracerebroventriculäre Applikation	26
3.1.1.2	Bilaterale Applikation in die paraventriculären Nuclei	29
3.1.2	Intracerebroventriculäre Applikation eines Oxytocin-Rezeptor-Antagonisten bei trächtigen und laktierenden Weibchen	32
3.2	Suppression der hypothalamo-adenohypophysär-adrenocorticalen Achse während der peripartalen Periode: Beteiligung endogener Opiate	40
3.2.1	Trächtigkeit	40
3.2.2	Geburt	43
3.3	Regulation des zentralen oxytocinergeren Systems durch endogene Opiate: Modifikationen während der Trächtigkeit	50
3.3.1	<i>Nucleus paraventricularis</i>	51
3.3.2	<i>Nucleus supraopticus</i>	53
3.3.3	Schwimmverhalten von virginen und trächtigen Ratten, Effekte von NLX	54
3.4	Die "Münchner HAB (high anxiety-related behaviour)- und LAB (low anxiety-related behaviour)-Ratten": Ein neues Tiermodell für angeborene emotionale Extreme	55
3.4.1	Verhaltensbiologische und neuroendokrine Charakterisierung von HAB/LAB-Ratten	55
3.4.1.1	Verhaltensuntersuchungen	55
3.4.1.1.1	Zuchterfolg	55
3.4.1.1.2	Soziale Interaktion	55
3.4.1.1.3	Soziale Dominanz	57
3.4.1.1.4	Altersverlauf der Angstdisposition	58
3.4.1.2	Neuroendokrine Reaktivität auf einen emotionalen Stressor	60
3.4.1.3	Freisetzung von Vasopressin und Oxytocin im <i>Nucleus paraventricularis</i>	64
3.4.1.4	Basale intrahypothalamische Expression von Vasopressin	68
3.4.2	Entwicklungsbiologische Determinanten der emotional extremen Phänotypen von HAB/LAB-Ratten	70
3.4.2.1	Pränatale Faktoren: Verhaltensbiologische und neuroendokrine Charakterisierung trächtiger HAB/LAB-Weibchen	70
3.4.2.2	Unmittelbar postnatale Faktoren: <i>cross-fostering</i> -Studie	78
3.4.2.3	Genetische Faktoren: <i>cross-mating</i> -Studie	79

4	Diskussion	82
4.1	Regulation der hypothalamo-adenohypophysär-adrenocorticalen Achse und des emotionalen Verhaltens durch das zentrale oxytocinerge System	84
4.2	Suppression der hypothalamo-adenohypophysär-adrenocorticalen Achse und des oxytocinergen Systems während der peripartalen Periode durch endogene Opiate	932
4.3	Die "Münchner HAB/LAB-Ratten" als neues Tiermodell für angeborene emotionale Extreme	103
5	Zusammenfassung und Perspektive	116
6	Literaturverzeichnis	119

Kurzbeschreibung

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Untersuchung der Regulation der hypothalamo-adenohypophysär-adrenocorticalen (HPA) Achse und des hypothalamo-neurohypophysären Systems sowie verhaltensbiologischer Streßreaktionen durch intrazerebral freigesetztes Oxytocin (OXT). Zunächst konnte bei virginen und männlichen Wistar-Ratten eine tonische Inhibition der HPA-Achse durch zentrales OXT nachgewiesen werden, die zum Teil im hypothalamischen *Nucleus paraventricularis* (PVN) vermittelt wird. Dahingegen wurde die verhaltensbiologische Streßreaktion nicht durch zentrales OXT beeinflusst. Zu weiteren Studien wurden zwei Tiermodelle (peripartale Periode und selektierte Angstzuchtratten) herangezogen.

Die peripartale Periode, welche Trächtigkeit, Geburt und Laktation einschließt, ist durch eine morphologische und funktionelle Aktivierung des zentralen OXT-Systems charakterisiert. Zur gleichen Zeit ist die Streßreaktivität der HPA-Achse reduziert. Es konnte jedoch gezeigt werden, daß die peripartale Suppression der HPA-Achse nicht durch das aktivierte OXT-System, sondern durch ebenfalls während dieser Phase modifizierte Wirkungen endogener Opiate vermittelt wird. Die verhaltensbiologische Streßreaktion hingegen wird nur während Trächtigkeit und Laktation durch zentrales OXT kontrolliert, wohingegen diesbezüglich kein Einfluß endogener Opiate beobachtet wurde.

Pathologische bzw. chronische Modifikationen von verhaltensbiologischen und neuroendokrinen Streßreaktionen sowie die Beteiligung zentral freigesetzter Neuropeptide (OXT und Arginin-8-Vasopressin [AVP]) konnten an zwei selektierten Wistar-Rattenlinien für erhöhte (HAB) bzw. verminderte (LAB) Ängstlichkeit auf der *elevated plus-maze* untersucht werden. Zunächst wurden beide Rattenlinien im Rahmen der vorliegenden Arbeit verhaltensbiologisch charakterisiert. So konnten stabile Linien-spezifische Unterschiede der Emotionalität in verschiedenen Altersstufen und Test-Paradigmen bestätigt werden. Die Untersuchung neuroendokriner Korrelate der differierenden Emotionalität von HAB- und LAB-Tieren ergab zunächst auf peripherer Ebene eine erhöhte Streßreaktivität der HPA-Achse und der Prolaktin-Freisetzung, nicht jedoch der neurohypophysären Freisetzung von OXT und AVP. Weiterführende Mikrodialyse-Studien untersuchten die Beteiligung im PVN freigesetzter Hormone des hypothalamo-neurohypophysären Systems, d. h. OXT und AVP, an der neuroendokrinen und emotionalen Disposition der HAB/LAB-Ratten. OXT zeigte keine Linien-spezifisch unterschiedliche Freisetzung im PVN, wodurch eine Beteiligung zentralen OXTs an den Unterschieden der neuroendokrinen und verhaltensbiologischen Streßreaktion bei HAB/LAB-Ratten weitgehend ausgeschlossen werden konnte. Die erhöhte Streßreaktivität der HPA-Achse bei HAB-Tieren konnte jedoch mit einer gesteigerten basalen und Schwimmstreß-induzierten Freisetzung von AVP im PVN assoziiert werden, die von einer erhöhten basalen Expression von AVP-mRNA im PVN begleitet wird.

Neben den neuroendokrinen Korrelaten der differierenden Ängstlichkeit in den Zuchtlinien sind die entwicklungsbiologischen Determinanten der emotionalen Extreme von hohem Interesse. So wurde an diesem Tiermodell, neben möglichen pränatalen (hormonellen) Einflüssen auf die fötale Entwicklung von HAB-Ratten, eine genetische Determination der Emotionalität nachgewiesen.

1 Einleitung

In der klinischen Therapie von Angsterkrankungen dominieren nach wie vor zufällig entdeckte bzw. empirisch entwickelte Substanzklassen, deren erwünschte Effekte oft mit hohen Nebenwirkungen behaftet sind. Die Angstforschung ist bemüht, neurobiologische und genetische Mechanismen der Emotionalität aufzuklären, um letztlich eine kausale Therapie psychiatrischer Erkrankungen zu ermöglichen. Zur Bearbeitung dieser Fragestellungen ist es zunächst einmal unerlässlich, die Symptomatik der Angsterkrankung zu definieren. Streß ist ein Muster spezifischer und unspezifischer Reaktionen eines Organismus auf Reizereignisse, sog. Stressoren, die seine Homöostase stören und seine Fähigkeit zur Bewältigung strapazieren oder überschreiten (Zimbardo 1988). So ist ein Stressor ein Reizereignis, das vom Organismus eine adaptive Reaktion verlangt, die auf physiologischer, verhaltensbiologischer, emotionaler und/oder kognitiver Ebene erfolgen kann. Auch Angst als emotionaler Zustand und die damit verbundene systemische Aktivierung sind Korrelate der Streßbewältigung. Neben individuellen Variationen der Streßreaktion kann diese aber auch pathologische Dysregulationen zeigen, die sich letztlich in der Expression von Angsterkrankungen, zu denen im weitesten Sinne auch die depressiven Erkrankungen zählen, äußern. Angesichts der Komplexität von emotionalem Verhalten, wie z. B. Angst, ist es nicht verwunderlich, daß an den verhaltensbiologischen und neuroendokrinen Reaktionen auf Stressoren eine Vielzahl von Neurotransmittern und Hirnarealen beteiligt sind, und daß der derzeitige Wissenstand auf diesem Gebiet noch lückenhaft ist. Da Patienten mit psychiatrischen Auffälligkeiten der neurobiologischen Forschung nur in sehr begrenztem Maße zugänglich sind, werden grundlegende neurobiologische Kontrollmechanismen an anderen Spezies studiert, und die Erkenntnisse daraus auf den Menschen übertragen. In der vorliegenden Arbeit werden neuroendokrine Systeme, die durch Streß-Exposition aktiviert werden und möglicherweise an der Expression von Angstverhalten beteiligt sind, auf ihre verhaltensbiologische Relevanz bei Wistar-Ratten getestet. Ein weiterer Schwerpunkt dieser Arbeit liegt auf Untersuchungen zur zentralen neurobiologischen Regulation dieser Systeme.

Einer der neuroendokrinen Hauptmechanismen zur Streßbewältigung ist die hypothalamo-adenohypophysär-adrenocorticale (HPA) Achse (Übersicht in Ur & Grossman 1994). Parvozelluläre Neuronen des hypothalamischen *Nucleus paraventricularis* (PVN) bilden *Corticotropin releasing hormon* (CRH, 41 Aminosäuren) und transportieren es über die Axone in die *Zona externa* der *Eminentia mediana*, wo es Stimulus-abhängig in das Portalblut der Adenohypophyse freigesetzt wird (Plotsky 1991, Kovaçs & Sawchenko 1996). Angeregt durch CRH geben corticotrope Zellen der Adenohypophyse Adrenocorticotropin

(ACTH, 39 Aminosäuren) in den peripheren Blutkreislauf ab (Rivier & Vale 1983 a, b), das in der Nebennierenrinde die Freisetzung von Corticosteron (Ratte, Maus) bzw. Cortisol (Mensch, Schwein) induziert. Corticosteron/Cortisol bewirkt u. a. Energiebereitstellung für die physiologische und verhaltensbiologische Streßreaktion durch Erhöhung des Blutzuckerspiegels (Induktion von Lipolyse und Glykogenolyse in der Leber) und des Proteinkatabolismus (Baxter & Tyrrell 1987) sowie Glucose-Aufnahme in verschiedene Areale des Gehirnes (Landgraf et al. 1978). Zusätzlich wirkt Corticosteron/Cortisol über zentrale Glucocorticoid- und Mineralocorticoid-Rezeptoren (Reul et al. 1985) hemmend auf die HPA-Achse ein (Keller-Wood & Dallmann 1984, Ratka et al. 1989, Dallmann et al. 1992). Diese negative Rückkopplung involviert neben dem PVN auch Strukturen im frontalen Kortex und im limbischen System, die übergeordnet an der Regulation der HPA-Achse beteiligt sind (Sapolsky & McEwen 1985, De Kloet 1991, Vázquez et al. 1996). In den letzten Jahren hat die HPA-Achse auch in der humanen Angst- bzw. Depressionsforschung immer mehr an Bedeutung gewonnen. So wurde z. B. eine erhöhte Aktivität der HPA-Achse bei depressiven Patienten beschrieben (Holsboer et al. 1989). Der sogenannte Dex/CRH-Test ermöglicht eine Funktionskontrolle der HPA-Achse auf hypothalamischer und adenohipophysärer Ebene. Er zeigt z. B. Störungen der negativen Glucocorticoid-Rückkopplung über eine verminderte Suppression der ACTH-Freisetzung nach Applikation des synthetischen Glucocorticoid-Agonisten Dexamethason. Eine zusätzliche Stimulation der corticotropen Zellen durch Applikation von synthetischem CRH (Holsboer et al. 1987) kann offenbaren, ob Veränderungen auf der Ebene der Adenohipophyse vorliegen. In diesem Test wurde bei depressiven Patienten eine verminderte Suppression der basalen sowie CRH-stimulierten ACTH-Freisetzung durch Dexamethason, also eine reduzierte Effektivität der negativen Rückkopplungsmechanismen und eine erhöhte Stimulierbarkeit der adenohipophysären corticotropen Zellen, gezeigt (Holsboer & Barden 1996).

Zusätzlich zur Stimulation der HPA-Achse durch eine Vielfalt von verschiedenen Stressoren wird auch die Freisetzung von Hormonen der Neurohypophyse durch Exposition diverser Stimuli erhöht. Magnozellige Neuronen des hypothalamischen *Nucleus supraopticus* (SON) und des PVN bilden die Nonapeptide Arginin-8-Vasopressin (AVP) und Oxytocin (OXT) in ihren Somata und transportieren sie durch ihre Axone - *via Zona interna der Eminentia mediana und Infundibulum* - zur Neurohypophyse (Übersicht siehe Hatton 1990), wo sie in terminalen Vesikeln gespeichert werden. Die Sekretion von AVP und OXT in den peripheren Blutkreislauf wird unabhängig voneinander durch verschiedene Stimuli induziert (Lang et al. 1983, Kasting 1988, Samson & Mogg 1990).

Plasma-AVP dient hauptsächlich der Aufrechterhaltung der Wasserhomöostase im Organismus (Jezova et al. 1995, Windle et al. 1995) und bewirkt Wasserrückresorption in der Niere sowie Vasokonstriktion. Dementsprechend wird die Freisetzung von AVP durch physiologische Stressoren wie Erhöhung der Plasmaosmolarität (Dunn et al. 1973, Landgraf et al. 1988, Neumann et al. 1993), Hämorrhagie (Kasting 1988), Hypoxie und diverse Schmerzstimuli (Gibbs 1986, Yagi 1992) erhöht. OXT hingegen gilt, neben einer untergeordneten Rolle bei Diurese und Natriurese (Windle et al. 1995), als "das klassische Streßhormon" bei der Ratte (Lang et al. 1983, Jezova et al. 1995). So wurde z. B. nach Schwimmstreß (Wotjak et al. 1998, Neumann et al. 1998) und Immobilisation (Carter & Lightman 1987a) ein Anstieg der OXT-Sekretion ins Blut beschrieben.

Expression der mRNA für AVP (Emson et al. 1988, Hallbeck et al. 1999) und OXT (Yoshimura et al. 1993) wurde unter anderem in hypothalamischen Nuclei, limbischen Arealen und der Amygdala nachgewiesen. Die Freisetzung dieser Neuropeptide erfolgt nicht ausschließlich über die Neurohypophyse in den peripheren Blutkreislauf, sondern auch an Dendriten und Perikaryen direkt in zentrale Kerngebiete (Ludwig 1998). So konnte die Freisetzung von AVP u. a. im PVN (Neumann et al. 1993, Wotjak et al. 1998), im SON (Neumann et al. 1996a, Wotjak et al. 1994, 1996) und im Septum (Ebner et al. 1999) gezeigt werden. Entsprechend wurden AVP-V1a- (und in geringem Maße auch V1b-) Rezeptoren in septalen, hypothalamischen und limbischen Neuronenpopulationen gezeigt (Ostrowski et al. 1994, Szot et al. 1994, Vaccari et al. 1998). Ebenso wurden Freisetzung von OXT (Neumann et al. 1993, Nishioka et al. 1998) und Präsenz spezifischer Rezeptoren (Yoshimura et al. 1993, Vaccari et al. 1998) in vielen corticalen, limbischen und hypothalamischen Kerngebieten nachgewiesen. Im Hypothalamus sezerniert, sind Neuropeptide kausal an der Regulation neuroendokriner Systeme beteiligt (Wotjak et al. 1994, 1996, Ludwig 1998). Neben der Autoregulation magnozellularer AVP- und OXT-Neuronen durch zentral sezerniertes AVP bzw. OXT im Hypothalamus (Wotjak et al. 1994, Kombian et al. 1997), beschrieben Wotjak et al. (1996) eine Inhibition der HPA-Achse durch im PVN freigesetztes AVP. Zusätzlich spielt AVP eine Rolle bei der zentralen Modulation von Angstverhalten, wobei jedoch in verschiedenen Studien anxiolytische (Appenrodt et al. 1998) oder anxiogene (Bhattacharya et al. 1998) Wirkungen von intracerebroventriculär (icv) appliziertem AVP beschrieben wurden.

Die Rolle des OXT-Systems bei der Regulation der HPA-Achse und des emotionalen Verhaltens hingegen ist noch unzureichend beschrieben. Nach peripherer Applikation synthetischen OXTs konnten sowohl anxiolytische Effekte als auch eine Suppression der HPA-Achse gezeigt werden (Windle et al. 1997, Legros et al. 1987). Da

jedoch eine effektive Passage der Blut-Hirn-Schranke durch Plasma-OXT fraglich ist (Ermisch et al. 1985), konnte die Beteiligung von OXT an der Regulation von verhaltensbiologischen und neuroendokrinen Streßreaktionen auf zentraler Ebene durch diese Untersuchungen nicht ausreichend geklärt werden. In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluß von intrazerebral freigesetztem OXT auf die Aktivität der HPA-Achse und das emotionale Verhalten zunächst in männlichen und virginen weiblichen Ratten getestet. Zu diesem Zweck wurde ein etablierter, selektiver OXT-Rezeptor-Antagonist (Manning et al. 1989) icv appliziert und dessen Einfluß auf die basale und Streß-induzierte Aktivität der HPA-Achse und das Angstverhalten auf der *plus-maze* untersucht. Da der hypothalamische PVN das Haupt-Regelzentrum für die Aktivität der HPA-Achse ist, wurde zudem mittels bilateraler retrodialytischer Applikation des OXT-Antagonisten direkt in den PVN untersucht, ob die Wirkungen von OXT in diesem Kerngebiet vermittelt werden (Kap. 3.1.1).

Zum Studium der zentralen Regulation neuroendokriner Systeme und ihrer funktionellen Relevanz bei der Expression von emotionalem Verhalten werden üblicherweise Gaben von Rezeptor-Agonisten oder -Antagonisten gewählt. Mit diesen Methoden kann man jedoch sehr schnell an Grenzen stoßen, da die verwendeten Pharmaka oft wenig spezifisch sind. Zumindest ist eine vertrauenswürdige Validierung der genutzten Substanzen gefordert, die ihrerseits nicht wenig aufwendig ist. Bei der Untersuchung anderer Fragestellungen kann es zweckmäßig sein, die Herstellung transgener Tiere (z. B. Knockout-Mäuse) zu realisieren. Auch diese Vorgehensweise kann jedoch Probleme aufwerfen, da die Verwendung genetisch manipulierter Tiere zum einen mit den Schwierigkeiten der Kompensation und zum anderen mit der uneinheitlichen Wahl geeigneter Kontrolltiere (Gerlai 1996) verbunden ist. Daher ist es sinnvoll, Tiermodelle mit physiologischen oder angeboren pathologischen (ohne Manipulation am Genom) Veränderungen der betreffenden Systeme zu nutzen.

Zunächst habe ich mich in der vorliegenden Arbeit eines Tiermodells bedient, das reversible physiologische Modifikationen der neuroendokrinen und verhaltensbiologischen Streßreaktivität aufweist. Dabei habe ich bewußt die Untersuchungen in einem Ausmaß durchgeführt, das Abweichungen von der primären Arbeitsrichtung zuläßt. Da der Organismus durch Stressoren eine systemische Aktivierung erfährt, sollten einzelne Vorgänge nicht ganz isoliert betrachtet, sondern im funktionellen Kontext gezeigt werden. Ich werde mich jedoch bemühen, immer wieder auf die Haupt-Fragestellung der Arbeit, nämlich des Anteils zentral freigesetzten OXTs an der verhaltensbiologischen und neuroendokrinen Streßreaktion, zurückzukommen.

1. Tiermodell: die peripartale Periode

Während der peripartalen Periode, welche die letzten Tage der Trächtigkeit, die Geburt, sowie die Laktationsphase einschließt, wurden in Ratten (Lightman 1992, Walker et al. 1995, Waddell and Atkinson 1994, Neumann et al. 1998), Schafen (Übersicht siehe Keller-Wood 1995), Pavianen (Goland et al. 1990) und Menschen (Carr et al. 1981, Nolten & Rückert 1981) funktionelle Adaptationen der HPA-Achse beschrieben. Bei Ratten konnte, neben basalem Hypercortisolismus, eine verminderte Reaktivität der HPA-Achse auf emotionale und physische Stressoren ab dem 15. Trächtigkeitstag (Neumann et al. 1998) und während der Laktation (Carter & Lightman 1987a, Walker et al. 1995) gezeigt werden. Diese neuroendokrinen Modifikationen werden vermutlich durch deutliche Veränderungen in der Freisetzung von Sexualsteroiden während der späten Trächtigkeit induziert und erfolgen auf verschiedenen regulatorischen Ebenen der HPA-Achse. In Ratten z. B. wurden während der Trächtigkeit eine reduzierte Aktivität der Glucocorticoid-Rückkopplung (Owens et al. 1987), eine gedämpfte Syntheseaktivität hypothalamischer CRH-Neuronen (Douglas & Russell 1994) sowie verminderte Erregbarkeit corticotroper Zellen der Adenohypophyse durch CRH (Keller-Wood 1998, Neumann et al. 1998) nachgewiesen. Zudem werden zentrale hypothalamische Einflüsse vermutet, da die Streß-induzierte Aktivierung von parvozellulären Neuronen des PVN bei trächtigen Ratten vermindert ist (da Costa et al. 1996a, Toufexis & Walker 1996).

Weiterhin sind während der peripartalen Periode funktionelle und morphologische Adaptationen des OXT-Systems bekannt, sowohl die zentrale (Neumann et al. 1993, 1995, 1996a) und periphere (Lightman & Young 1989, Neumann et al. 1993) Freisetzung von OXT als auch die zentrale neuronale Aktivität von OXT-Neuronen (Summerlee & Lincoln 1981, Theodosis & Poulain 1992, Neumann et al. 1995) betreffend. Morphologische Veränderungen magnozellularer Neuronen wie z. B. Rückzug der umgebenden Gliazellen, Bildung interneuroner *gap junctions* und Reorganisation dendritischer Formationen (Theodosis & Poulain 1992, 1993, Stern & Armstrong 1998) ermöglichen die Synchronisation der elektrophysiologischen Aktivität der OXT-Neuronen (*burst firing*, Summerlee and Lincoln 1981, Poulain & Wakerly 1982). Diese Modifikationen, zusammen mit einer zentralen Verschaltung der ipsilateralen SONs (*cross-talk*, Neumann et al. 1995, Summy Long et al. 1994), resultieren in einer hohen pulsatilen Freisetzung von OXT ins Blut, die während des Geburtsvorganges die Kontraktionen des Myometriums (Forsling et al. 1979, Ekesbo et al. 1991) und während der Laktationsphase die Kontraktionen der Myoepithelien der Milchdrüse beim Milchejektionsreflex auslöst. Neben den beschriebenen

(neuro)-endokrinen Veränderungen ist auch das angstbezogene Verhalten während Trächtigkeit und Laktation verändert. So wurde bei trächtigen im Vergleich zu virginen Ratten eine verminderte Exploration der offenen Bereiche des *plus-maze* beschrieben (Neumann et al. 1998). Die während der Trächtigkeit in ihrer Mobilität eingeschränkten Weibchen vermeiden damit potentiell gefährliche Situationen und schützen auf diese Weise sich selbst und die ungeborenen Nachkommen. Auch andere Verhaltensmuster der Tiere passen sich der besonderen Situation an. So zeigten Ratten während der peripartalen Periode eine erhöhte Aggressivität gegenüber Artgenossen (Erskine et al. 1978), wodurch sie ihre Nachkommen vor einer instinktiven Tötung durch diese bewahren. Zur Untersuchung der Funktion Reproduktions-bedingter Modifikationen des zentralen OXT-Systems bei der peripartalen Suppression der HPA-Achse und der veränderten Emotionalität wurde die icv-Applikation des OXT-Rezeptor-Antagonisten (s. o.) auch in trächtigen und laktierenden Weibchen angewendet und der Einfluß auf die basale und Streß-induzierte Aktivität der HPA-Achse bzw. das Angstverhalten auf der *plus-maze* untersucht (Kap. 3.1.2).

An der zentralen Regulation neuroendokriner Systeme sind verschiedene Substanzen maßgeblich beteiligt. Dazu gehören, neben den schon erwähnten Neuropeptiden und Glucocorticoiden, u. a. Noradrenalin, GABA, Dopamin und Serotonin (Calogero et al. 1988, Toufexis & Walker 1996, Kombian et al. 1996, Itoi et al. 1998) sowie endogene Opiate wie z. B. β -Endorphin. In virginen weiblichen, nicht aber männlichen Ratten kontrollieren endogene Opiate die Streß-induzierte periphere Freisetzung von OXT (Carter et al. 1986). Ebenso regulieren endogene Opiate die Aktivität der HPA-Achse (Buckingham & Cooper 1984, Plotsky 1986, Suda et al. 1992, Calogero 1996). Mit fortschreitender Trächtigkeit (Douglas et al. 1995) wurde eine effektive Inhibition der Aktivität von OXT-Neuronen durch endogene Opiate beschrieben, welche eine vorzeitige Freisetzung von OXT aus der Neurohypophyse verhindert. Dort wird das Peptid bis zur Freisetzung während der Geburt in terminalen Vesikeln gespeichert. Während der Geburt freigesetzte endogene Opiate (Fajardo et al. 1994, Petraglia et al. 1985) begrenzen die zentrale (Neumann et al. 1991) und periphere OXT-Freisetzung (Leng et al. 1987) zur Regulation der pulsatischen Sekretion während der Austreibung der Föten. Noch während der Laktation ist die Streß-induzierte Freisetzung von OXT vermindert (Carter & Lightman 1987a, Higuchi et al. 1991), so daß eine Erhöhung der OXT-Sekretion ins Blut auf den Milchejektionsreflex (Higuchi et al. 1986, Freund-Mercier et al. 1988, Neumann et al. 1993) beschränkt bleibt. Da auch die Streß-induzierte Freisetzung von Prolaktin während der späten Trächtigkeit durch endogene Opiate unterdrückt wird (Soaje & Deis 1994), könnte ein genereller zentraler Opioid-vermittelter Mechanismus die

Suppression neuroendokriner Streßreaktionen während der gesamten peripartalen Periode bestehen. In der vorliegenden Arbeit wurde daher der Einfluß endogener Opiate auf die basale und Schwimmstreß-induzierte Freisetzung von Hormonen der HPA-Achse und des hypothalamo-neurohypophysären Systems bei trächtigen und virginalen Tieren untersucht (Kap. 3.2.1). Dazu wurde eine intravenöse (iv) Applikation des Opiat-Rezeptor-Antagonisten Naloxon (NLX) gewählt.

Im Gegensatz zum OXT-System (Higuchi et al. 1986) wurde die Aktivität der HPA-Achse während der Geburt sowie der Einfluß endogener Opiate darauf in der Ratte bislang nicht untersucht. Der Geburtsprozess, während dem 12-15 Jungtiere geboren werden, dauert bei der Ratte ca. 90 Minuten und geht mit einer charakteristischen Verhaltensaktivierung des Tieres einher. Zu dem unmittelbar perinatalen Verhaltensrepertoire zählen z. B. der Bau eines "Nestes" vor und während der Geburt, Wehentätigkeit und Austreibung der Jungen, Heranziehen und Lecken der Neugeborenen, Plazentophagie und Selbstreinigung (van Leengoed et al. 1986). In einem weiteren Projekt wurde deshalb die Freisetzung von Hormonen der HPA-Achse und von OXT vor und während des Geburtsvorganges sowie der Einfluß einer NLX-Applikation hierauf untersucht (Kap. 3.2.2).

Wie oben ausgeführt, erfährt das zentrale OXT-System während der peripartalen Periode morphologische und funktionelle Veränderungen. So wird z. B. die basale Aktivität von hypothalamischen OXT-Neuronen während der späten Trächtigkeit durch endogene Opiate supprimiert (Douglas et al. 1995). Über die Streß-induzierte intrazerebrale Sekretion von OXT (und AVP) während der Trächtigkeit und den Einfluß endogener Opiate darauf ist jedoch noch wenig bekannt. Deshalb wurde in trächtigen und virginalen Weibchen die basale und Streß-induzierte Freisetzung von OXT (und AVP) sowohl im PVN als auch im SON mittels Mikrodialyse ermittelt. Die Regulation der Streß-induzierten Aktivität des zentralen OXT-Systems durch endogene Opiate wurde über subcutane (sc) Applikation des Opiat-Antagonisten NLX untersucht (Kap. 3.3).

Bei Ratten sind zwar während der peripartalen Periode sowohl die Reaktivität der HPA-Achse als auch die Emotionalität verändert, jedoch sind diese Modifikationen genau dem Zweck der Reproduktion angepaßt und stellen so einen besonderen physiologischen Zustand dar. Zudem werden die untersuchten Systeme massiv durch die während dieser Phase veränderte Dynamik der Sexualhormone beeinflusst. Da es die primäre Intention dieser Arbeit ist, einen Zugang zu psychopathologisch veränderter Emotionalität und den damit verbundenen neuroendokrinen Modifikationen zu finden, stößt man bei diesem Tiermodell an Grenzen. Aus den genannten Gründen schien es sinnvoller, weitere Untersuchungen an einem

zweiten Tiermodell mit psychopathologisch veränderter Emotionalität durchzuführen, um die tatsächliche Relevanz neuroendokriner Modifikationen bei der Expression von Angststörungen zu untersuchen. Auch hier verlangt die Untersuchung funktionell relevanter Mechanismen eine Abweichung von der primären Fragestellung der Funktion von zentralem OXT bei der Streßreaktion zugunsten einer detaillierten Untersuchung des zentralen AVP-Systems.

2. Tiermodell: Angstzuchtratten

Die Münchner HAB/LAB-Tiere sind zwei selektierte Wistar-Ratten-Linien, die zunächst mit 3 Familien pro Linie in Inzucht geführt wurden (1993-1996, Liebsch et al. 1998a). Seit 1996 wird die Zucht, ausgehend von den jeweils 3 "Urahn-Familien", in Auszucht mit z. Zt. jeweils 6-9 Familien pro Linie geführt. Selektionskriterium ist das angstbezogene Verhalten auf der *elevated plus-maze*, einem unkonditionierten, ethologisch relevanten Test für die Emotionalität von Nagern (Heinrichs et al. 1992, Hogg 1996). Dieses wird routinemäßig bei jedem Tier im Alter von 10 Wochen überprüft. HAB-Ratten haben eine hohe Angstdisposition (wenige Eintritte in die offenen Arme bzw. kurze Zeit auf den offenen Armen der *plus-maze*), LAB-Ratten eine niedrige Angstdisposition (viele Eintritte in die offenen Arme bzw. lange Zeit auf den offenen Armen, Liebsch et al. 1998a).

Auch in anderen unkonditionierten Verhaltenstests wurden hohe Linien-spezifische Unterschiede gefunden. So zeigten HAB-Ratten eine geringere Exploration der zentralen Zone im *open field* (Liebsch et al. 1998a) bzw. des erleuchteten Kompartiments der *black/white Box* (Henniger et al. 2000) als LABs. Im Porsolt-Schwimmtest - ein Modell für "depressives" Verhalten (Porsolt et al. 1977) - bevorzugten HABs eine passive (wenig aktives Schwimmverhalten, hohe Immobilität), LABs jedoch eine aktive (sehr aktives Schwimmverhalten, kaum Immobilität) Bewältigungsstrategie (Liebsch et al. 1998b). Verhaltensweisen und physiologische Parameter, die nicht in direktem Bezug zur Emotionalität von Nagern stehen, zeigten indes keine Linien-spezifischen Unterschiede. So ist z. B. das soziale Gedächtnis (Wiedererkennung von Jungtieren im *social discrimination*-Test, Engelmann et al. 1995, Landgraf et al. 1995a) ähnlich bei HAB- und LAB-Ratten (Liebsch et al. 1998a). Unter Basalbedingungen zeigten Körpertemperatur, lokomotorische Aktivität sowie Nahrungs- und Wasseraufnahme, welche radiotelemetrisch bei isoliert gehaltenen Männchen gemessen wurden, keine Linien-spezifischen Unterschiede (Liebsch et al. 1998b). Ergebnisse wie diese unterstreichen die Selektivität der Zuchtstrategie. In der vorliegenden Arbeit wurden die verhaltensbiologischen Untersuchungen der HAB/LAB-Ratten fortgesetzt. Zu diesem Zweck wurden Testungen auf Sozialverhalten (soziale Interaktion) und soziale

Dominanz (Kampfspiele von Jungtieren/*play fighting*, kompetitives Trinkverhalten adulter Tiere) durchgeführt. Zudem wurde die Präsenz der Verhaltensunterschiede in verschiedenen Altersstufen untersucht. Bei neugeborenen Ratten wurde hierzu ein Ultraschallvokalisations-Test (Winslow & Insel 1991) angewendet, bei adulten Tieren erfolgten Tests auf der *elevated plus-maze* in der 10. Lebenswoche sowie im Alter von 6-7 und 18 Monaten (Kap. 3.4.1.1).

Des Weiteren wurden die HAB/LAB-Ratten einer neurophysiologischen Charakterisierung unterzogen. Ein erster Schwerpunkt wurde hier auf neuroendokrine Modellsysteme gelegt, die in den letzten Jahren mit Emotionalität *per se* in Verbindung gebracht wurden. Untersuchungen bei psychiatrischen Patienten zufolge ist eine erhöhte Angstdisposition häufig mit einer Dysregulation der HPA-Achse (Holsboer 1989) verbunden. Weiterhin fand man bei solchen Patienten Veränderungen der peripheren Freisetzung von Prolaktin (Hardan et al. 1999), wodurch vermutlich eine veränderte Aktivität zerebraler dopaminerger und serotonerger Neuronen widerspiegelt wird (Cameron & Nesse 1988, Walsh et al. 1987). In der vorliegenden Arbeit wurden zunächst die oben angesprochenen neuroendokrinen Systeme in den HAB/LAB-Ratten untersucht. In den meisten Fällen wurde eine modifizierte *plus-maze*-Exposition als für Tiere beider Linien vergleichbarer emotionaler Stressor gewählt, bei welcher der Zugang zur neutralen Zone und den geschlossenen Armen verwehrt wurde (*open-arm*). Dennoch, da HAB-Tieren selektionsbedingt eine erhöhte Angstdisposition angeboren ist, wird auch die *open-arm*-Exposition bei ihnen eine höhere anxiogene Qualität haben als bei LAB-Ratten, weil ein Rückzug in die von ihnen bevorzugten geschlossenen Arme nicht möglich ist. So kann auch dieser Stressor nur einen Kompromiß zwischen einer höchstmöglichen Annäherung des Streß-Paradigmas an das Selektionskriterium und einem für beide Zuchtlinien möglichst vergleichbaren emotionalen Stressor darstellen. In einem ersten Experiment wurden die Plasmakonzentrationen von ACTH, Corticosteron und Prolaktin sowie von OXT und AVP in männlichen HAB- und LAB-Ratten unter basalen Bedingungen sowie nach *open-arm*-Exposition untersucht (Kap. 3.4.1.2).

Zentral an Dendriten und Perikaryen hypothalamischer Neuronen in PVN und SON freigesetztes AVP und OXT (Ludwig 1998) scheinen kausal an der Regulation neuroendokriner Systeme, wie z. B. der HPA-Achse (Wotjak et al. 1996), beteiligt zu sein. Zur Analyse potentieller Unterschiede in der zentralen Regulation der HPA-Achse bei HAB- und LAB-Ratten wurde die Freisetzung von OXT und AVP im PVN weiblicher und männlicher Tiere unter Basalbedingungen sowie nach Exposition eines emotionalen (*open-arm*) und eines physischen (Schwimmstreß) Stressors untersucht (Kap. 3.4.1.3). Zusätzlich

wurde bei männlichen HAB/LAB-Ratten eine *in situ* Hybridisierungs-Studie zur Ermittlung der basalen Expression von AVP-mRNA in diversen hypothalamischen Kerngebieten durchgeführt (Kap. 3.4.1.4).

Neben der verhaltensbiologischen und neurophysiologischen Charakterisierung der HAB/LAB-Ratten sind die entwicklungsbiologischen Determinanten der differierenden Emotionalität beider Linien von großem Interesse. So können z. B. Einflüsse während der Trächtigkeit persistente Veränderungen der Emotionalität induzieren (Weinstock 1997). Chronische Streß- bzw. Dexamethason-Behandlung trächtiger Ratten z. B. erhöhte die verhaltensbiologischen und neuroendokrinen Streßreaktionen bei deren Nachkommen (Cratty et al. 1995, Weinstock 1997). Im Hinblick auf solche pränatalen Faktoren wurden trächtige HAB/LAB-Ratten auf verhaltensbiologische und neuroendokrine Parameter untersucht und mit virginen Tieren beider Linien verglichen (Kap. 3.4.2.1).

Auch postnatale Faktoren können die Emotionalität von Säugetieren dauerhaft beeinflussen. So bewirkte tägliches 15-minütiges *handling* der Jungtiere während der ersten 3 Lebenswochen bei Ratten eine persistent reduzierte Ängstlichkeit, die sich bei adulten Tieren in vermehrter Exploration der offenen Bereiche des *open field* und der *plus-maze* (Meaney et al. 1985) sowie einer verminderten neuroendokrinen Streßreaktivität (Meaney et al. 1991, 1996) äußerte. Im Gegensatz dazu zeigten Tiere, die im gleichen postnatalen Zeitraum täglich einige Stunden vom Muttertier getrennt wurden (mütterliche Deprivation) eine gesteigerte Angstdisposition (Plotsky & Meaney 1993, Meaney et al. 1996, Wigger & Neumann 1998). Zur Untersuchung solcher postnataler erzieherischer Einflüsse wurde in der vorliegenden Arbeit eine Adoptionsstudie (*cross-fostering*) durchgeführt, bei der HAB-Neugeborene durch eine LAB-Mutter und *vice versa* aufgezogen wurden. Im Alter von 10 Wochen wurde das Verhalten auf der *plus-maze* von adoptierten (*cross-fostering*) Nachkommen mit dem von regulären Zuchtnachkommen bzw. von Geschwistern aus anderen Würfen verglichen (Kap. 3.4.2.2).

Da die Emotionalität der HAB/LAB-Ratten angeboren und durch die Linienzugehörigkeit vorhersehbar ist (siehe Kap. 3.4.1.1.1), ist es naheliegend, daß hier eine genetische Determination des angstbezogenen Verhaltens vorliegt. Zur Untersuchung der Erbllichkeit der verhaltensbiologischen Reaktion auf der *plus-maze* wurde eine Kreuzverpaarungs-Studie (*cross-mating*) durchgeführt. Hierzu wurden Männchen der LAB-Linie mit Weibchen der HAB-Linie und *vice versa* verpaart. Sowohl die F1- als auch F2-Nachkommen aus strenger Geschwister-Verpaarung der F1-Generation wurden auf ihr

Verhalten auf der *plus-maze*, dem Selektionskriterium der HAB/LAB-Linien, untersucht (Kap. 3.4.2.3).

2 Material und Methoden

2.1 Tiere und Haltung

Für die vorliegende Arbeit wurden männliche und weibliche Wistar-Ratten (Charles River, Sulzfeld, Deutschland) sowie HAB/LAB-Ratten beider Geschlechter verwendet. Die Tiere wurden in Gruppen von bis zu 6 Ratten pro Käfig gehalten und hatten freien Zugang zu Futter und Wasser. Die Raumtemperatur betrug $21\pm 2^{\circ}\text{C}$ bei einer Luftfeuchtigkeit von 60% und einem Licht/Dunkelzyklus von 12:12 h (Licht an um 06.00 h).

2.1.1 Selektion und Zucht von Angstzuchtratten

Die Selektion der Münchner Angstzuchtlinien wurde im Jahr 1993 initiiert. Wie in Liebsch et al. (1998a) detailliert beschrieben, wurden Tiere aus einer Population von kommerziell erworbenen Wistar-Ratten (Charles River, Deutschland) aufgrund ihrer Verhaltensleistung im *elevated plus-maze*-Test (Kap. 2.2.1) ausgewählt. Diejenigen Männchen und Weibchen, welche in diesem Test das ausgeprägteste ängstliche bzw. mutige Verhalten zeigten, wurden als Zuchtpaare zur Etablierung der HAB-Linie (*high anxiety-related behaviour*, hohe Angstdisposition) und der LAB-Linie (*low anxiety-related behaviour*, niedrige Angstdisposition) ausgewählt. 1994 wurden Ratten aus zwei Zuchtlinien, die an der Universität Leipzig aufgrund unterschiedlicher Leistung in einem Test für Fußschock-motivierte Hell/Dunkel-Diskriminierung (Y-Kammer) selektiert wurden (Hess et al. 1992), in die Münchner Zuchtlinien eingekreuzt. Dabei wurden Ratten, die in diesem Test ein hohes Maß an aktivem Meideverhalten zeigten, mit LAB-Ratten verpaart und Tiere mit schlechter Leistung in der Y-Kammer, die auch als extrem ängstlich charakterisiert werden konnten, mit HAB-Ratten. Seit dieser Einkreuzung (F1) werden die beiden Linien in Auszucht weitergeführt und je nach experimentellem Bedarf 4-6 aufeinanderfolgende Würfe pro Zuchtpaar aufgezogen. Zu Anfang wurden 2-3, später dann bis zu 12 Elternpaare pro Linie und Generation paarweise in Zuchtkäfigen (56 x 36 x 20 cm) gehalten. Die Jungen aus den Zuchtboxen werden im Alter von 21 Tagen von der Mutter abgesetzt und in gleichgeschlechtlichen Gruppen von maximal 5 Tieren pro Käfig gehalten. Alle äußeren Einflüsse (Käfigbewegung, Lärm etc.) und Berührungen der Tiere (*handling*) werden auf ein Minimum begrenzt und in beiden Linien strikt parallel durchgeführt.

Da die Zucht noch im Entwicklungsstadium ist, werden alle Nachkommen aus den beiden Zuchtlinien im Alter von 10 Wochen einem *plus-maze*-Naivtest unterzogen und wiederum jeweils die Tiere mit den extremsten Verhaltensleistungen für die nächste Generation verpaart. HAB-Ratten, die ein niedriges Angstniveau zeigen, LAB-Ratten, die sich als ängstlich erweisen sowie Tiere mit durchschnittlichen Leistungen (ca. 25-35 % der Zeit auf den offenen Armen verbracht) werden von weiteren Versuchen und der Zuchtplanung ausgeschlossen. Die meisten der in dieser Arbeit vorgestellten Daten wurden an Tieren aus den Generationen F7 bis F10 nach Einkreuzung der Leipziger Ratten gewonnen. Zudem wurden bei den HAB/LAB-Ratten Untersuchungen zum allgemeinen Zuchterfolg durchgeführt (siehe Generationenvergleich der Angstdisposition, Kap. 3.4.1.1.1).

2.1.2 *Cross-mating*

Dieses Experiment diente zur Untersuchung des Einflusses von genetischen Faktoren auf die Emotionalität der HAB/LAB-Ratten. Hierzu erfolgte die Verpaarung von Zuchtvätern der LAB-Linie mit sexuell naiven Weibchen der HAB-Linie und *vice versa* (Abb. 1). Die reguläre Zucht wurde im gleichen Zeitraum weitergeführt, so daß ausreichend Kontrolltiere zur Verfügung standen. Bei der Auswahl der Elterntiere (P-Generation) wurde ebenso wie bei der regulären Zuchtauswahl darauf geachtet, daß sowohl Männchen als auch Weibchen die Kriterien für extrem ängstliches bzw. mutiges Verhalten im *plus-maze*-Test erfüllten. *Cross-mating*-Nachkommen (F1), die im Alter von 10 Wochen ein intermediäres Angstverhalten (festgelegt auf 20-40 % der Testzeit in einem der offenen Arme verbracht) im *plus-maze*-Test zeigten, wurden zur Bildung einer F2-Generation mit ihren gegengeschlechtlichen Geschwistern (aus dem selben Wurf) verpaart. Die Nachkommen aus dieser Verbindung wurden ebenfalls im Alter von 10 Wochen einem *plus-maze*-Test unterzogen. Die Aufzuchtbedingungen waren bei regulären Zuchttieren und dem *cross-mating*-Nachwuchs (F1- und F2-Generation) identisch.

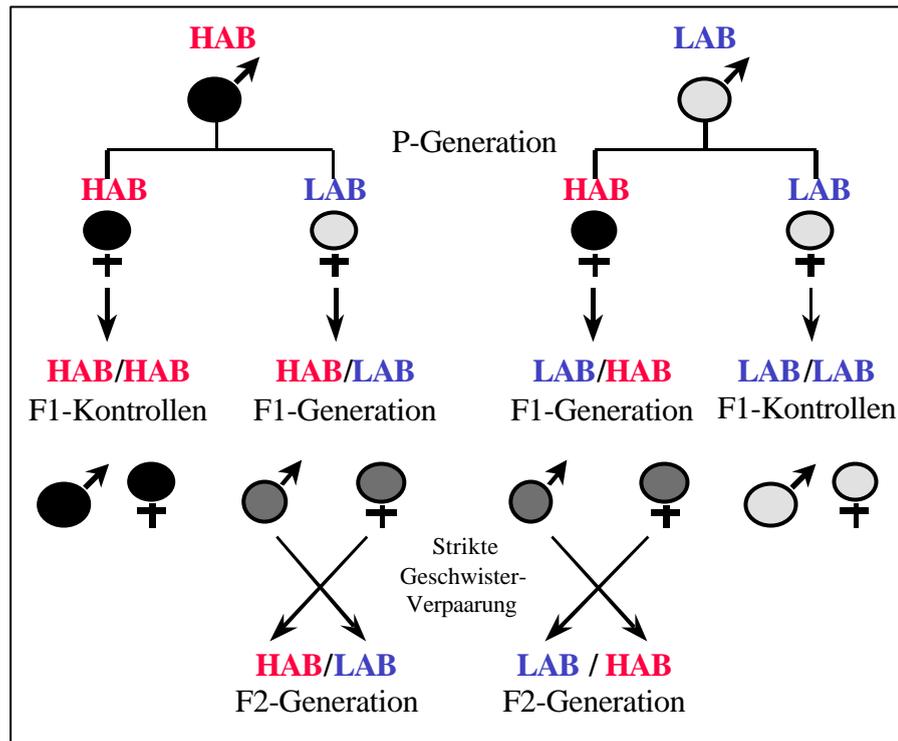


Abb. 1 Schema der Kreuzverpaarung (*cross-mating*): HAB (*high anxiety-related behaviour*)-Tiere sind schwarz, LAB (*low anxiety-related behaviour*)-Tiere hellgrau und intermediäre Nachkommen schraffiert dargestellt.

2.1.3 *Cross-fostering*

Zur Untersuchung des Einflusses von postnatalen erzieherischen Faktoren auf die Emotionalität der HAB- und LAB-Ratten wurden neugeborene Ratten der HAB-Linie während der postnatalen Tage 1 bis 21 (dem Zeitpunkt des Absetzens) von Muttertieren der LAB-Linie aufgezogen und *vice versa*. Als Kontrolltiere dienten Geschwistertiere aus vorangegangenen und folgenden Würfen sowie im gleichen Zeitraum geborene, jedoch bei ihren leiblichen Müttern aufgewachsene Zuchttiere. Das angstbezogene Verhalten des adoptierten (*cross-fostering*) Nachwuchses bzw. der Kontrolltiere wurde im Alter von 10 Wochen durch einen *plus-maze*-Test ermittelt.

2.2 Verhaltenstests und Streßparadigmen

2.2.1 *Elevated plus-maze- und open-arm-Exposition*

Die *plus-maze* ist ein un konditionierter Angsttest für Nagetiere (Pellow et al. 1985, 1996, Liebsch 1998a, Hogg 1996) und basiert auf dem Erzeugen einer Konfliktsituation

zwischen angeborener Scheu vor offenen und erhöhten Flächen und dem angeborenen Trieb, eine neue Umgebung zu explorieren.

Die Testapparatur (Abb. 2) befindet sich in einem ruhigen, durch einen Vorhang vom übrigen Raum abgegrenzten Bereich und besteht aus einer kreuzförmigen Plattform aus grauem Kunststoff, die sich in 70 cm Höhe über dem Boden befindet. Die Arme sind jeweils 50 cm lang und 10 cm breit und durch ein 10x10 cm großes Mittelstück (neutrale Zone) verbunden. Zwei gegenüberliegende Arme sind durch 25 cm hohe Seitenwände begrenzt (geschlossen), die beiden anderen weisen keine seitliche Begrenzung auf (offen). Die *plus-maze* wird durch 4 Halogenlampen mit einer durchschnittlichen Lichtintensität von 100 Lux ausgeleuchtet, wobei geschlossene Arme mit Rotlicht und offene Arme mit Weißlicht bestrahlt werden. Das Verhalten der Ratte während des Tests wurde über eine oberhalb der *plus-maze* installierte Videokamera beobachtet und mit einem Computerprogramm (PLUSMAZE[®], Fricke, München) aufgezeichnet und ausgewertet. Zu Beginn des 5 min-Tests wurde die Ratte mit Blickrichtung auf einen geschlossenen Arm in die neutrale Zone gesetzt. Ein "Eintritt" in einen Arm wurde notiert, sobald sich beide Vorderpfoten in diesem befanden. Zur Aufzeichnung eines "vollständigen Eintrittes" in einen offenen Arm kam es, wenn das Tier mit allen 4 Pfoten in ihn eintrat.

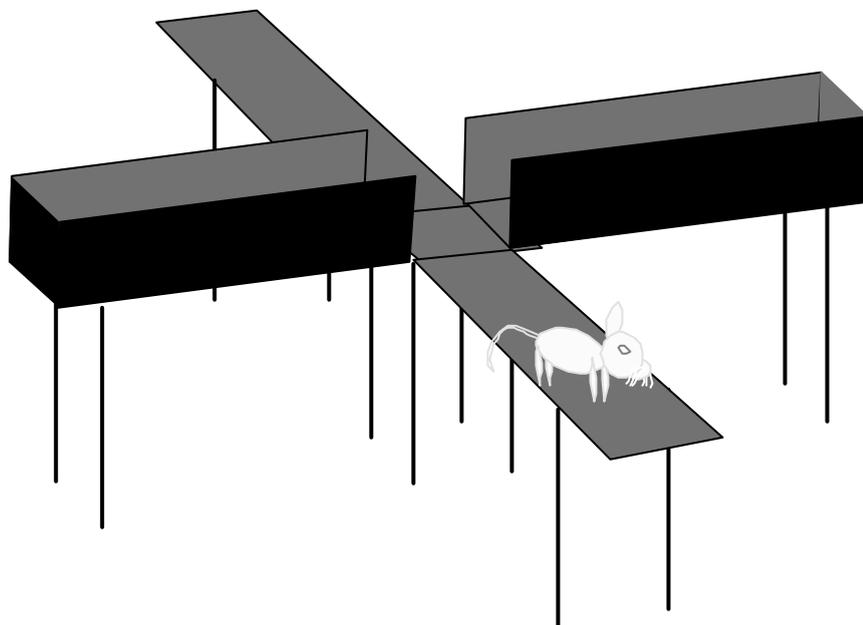


Abb. 2 Versuchsaufbau der *elevated plus-maze*. Die kreuzförmige Apparatur besteht aus 2 geschlossenen Armen mit Seitenwänden und 2 offenen Armen ohne Wände, die durch eine neutrale Zone verbunden werden. Sie ist aus dunkelgrauem Kunststoff und ca. 70 cm über dem Boden angebracht.

Folgende Parameter wurden bestimmt:

- Anzahl der "Eintritte" in offene bzw. geschlossene Arme
- Anzahl "vollständiger Eintritte" in einen offenen Arm
- Quotient aus der Anzahl der "Eintritte" in offene Arme und der Anzahl der "Eintritte" in alle Arme multipliziert mit 100 (= % Eintritte)
- Quotient aus der Zeit, die das Tier in den offenen Armen verbrachte und der Gesamtzeit in allen Armen multipliziert mit 100 (= % Zeit)
- Latenzzeit bis zum ersten "Eintritt" in einen der offenen Arme (maximal 300 s)

Tiere die von der Plattform sprangen oder fielen wurden vom Experiment ausgeschlossen.

Open-arm-Exposition als Stressor

Soll die *plus-maze*-Apparatur als Streßparadigma benutzt werden, können Quantität und Qualität des Stressors, je nach dem wie lange sich ein Tier auf den offenen Armen aufhält, stark variieren. Aus diesem Grunde wurde bei HAB/LAB-Ratten die *open-arm*-Exposition gewählt, ein dem *plus-maze* sehr ähnlicher emotionaler Stressor, bei dem der Zugang zur neutralen Zone und den geschlossenen Armen verwehrt wurde. Somit mußte sich jedes Tier während der ganzen Expositionsdauer (5-10 min) auf dem offenen Arm aufhalten.

2.2.2 Schwimmstreß

Diese Behandlung stellt einen starken psychischen und physischen Stressor dar, der die neuroendokrine Streß-Antwort effektiv stimuliert (Abel 1993, 1994, Kramer et al. 1993). Ein transparenter Acrylglaszylinder von 60 cm Höhe und 40 cm Durchmesser wurde bis zu einer Höhe von 40 cm mit Leitungswasser (19 °C bzw. 21 °C) gefüllt. Nach der Exposition, deren Dauer je nach Versuchsprotokoll variierte (60 s – 10 min), wurden die Tiere mit Stoffhandtüchern abgetrocknet und zurück in den Heimkäfig gebracht.

Folgende Parameter wurden bestimmt:

- Aktivität (*struggling*): Angestregtes Schwimmen, bei dem die Vorderpfoten des Tieres die Wasseroberfläche durchbrachen
- Schwimmen: Bewegung aller 4 Pfoten unter der Wasseroberfläche, Tauchen
- Immobilisation (*floating*): Völlige Immobilität des Tieres

2.2.3 Soziale Interaktion

Männliche und weibliche HAB/LAB-Ratten wurden 11 Tage vor der Testung in Einzelkäfigen (38x22x18 cm Höhe) gehalten. Zur Gewöhnung an die Testsituation wurde jedes der Versuchstiere an den zwei dem Versuchstag vorangehenden Tagen jeweils 10 min der Testarena exponiert. Die Testung wurde in einer weiß gestrichenen Holz-Box (54x36x27 cm Höhe) durchgeführt, deren Boden durch Linien in 6 gleich große (18x18 cm) Quadrate unterteilt war. Die Testarena wurde durch 40 ± 3 lux Kaltlicht ausgeleuchtet, wohingegen die übrige Raumbelichtung 30 min vor Versuchsbeginn bzw. den Gewöhnungsphasen reduziert wurde. Am Tag vor dem Test wurden gleichgeschlechtliche Interaktionspaare zugeordnet, die 1) der gleichen Zuchtlinie entstammten und 2) möglichst ähnliches Gewicht, Verwandtschaftsgrad und Östrusstadium (bei weiblichen Tieren) aufwiesen. Diese Kriterien sollten ein ausgewogenes Kräfte- und somit Dominanzverhältnis (File 1980) gewährleisten und eine Paarung von einander bekannten oder z. B. durch enge Verwandtschaft im Eigengeruch ähnlichen Tieren vermeiden.

Zu Beginn der 10 min-Testphase wurden die Tiere einander zugewandt in die Box gesetzt. Durch entsprechende Ausrichtung eines Drehspiegels über der Testarena wurde das Verhalten der Ratten beobachtet und mit Hilfe eines Computerprogrammes (Eventlog 1.0) ausgewertet.

Folgende Parameter wurden erfaßt:

- Aktive soziale Interaktion: Beschnüffeln, Nachfolgen, gegenseitige Fellpflege (*grooming*), Treten, Aufreiten, Bespringen, Ringen, Boxen, über- und untereinander Hindurchkrabbeln von Artgenossen (File 1980)
- Passive soziale Interaktion: Sitzen oder Liegen unter Körperkontakt, jedoch ohne miteinander zu interagieren
- Keine soziale Interaktion: Die Tiere zeigten lediglich Interesse an der nicht sozialen Umgebung (Exploration) oder an sich selbst (*self-grooming*)
- Lokomotorische Aktivität: Anzahl der Linienübertritte (wenn das Tier mit beiden Vorderpfoten eine der Linien überschritt). Dieser Verhaltensparameter wurde paarweise ausgewertet, da er einen von der sozialen Interaktion abhängigen Faktor darstellt.
- Defäkationsrate: Anzahl der Fäzes während der 10 min-Testung

2.2.4 Ultraschallvokalisations-Test

Dieser unconditionierte Test nutzt das angeborene Verhalten von Jungtieren, nach der Trennung von der Mutter im Ultraschallbereich zu vokalisieren und bietet so die Möglichkeit, schon in den ersten Lebenstagen eine Maßzahl für die Emotionalität eines Tieres zu erhalten (Insel et al. 1986a, Shapiro & Insel 1990). Je ängstlicher ein Jungtier ist desto höher ist die Anzahl seiner Rufe pro Minute (Frequenz). Validiert wurde diese Interpretation durch eine Verminderung der Ruffrequenz nach Applikation anxiolytischer Pharmaka (Winslow & Insel 1991) bzw. einer Erhöhung derselben nach anxiogener Behandlung (Insel & Harbaugh 1989). Dieses Verhalten besteht nur in den ersten beiden Lebenswochen und verschwindet nach dem Öffnen der Augen.

Mit Hilfe eines frequenzmodulierenden Richtmikrofons (Mini-3 Bat-Detector, Ultrasound Advice, Großbritannien), das ca. 15 cm über einer Glaspetrischale (Durchmesser 15 cm, durch ein Wasserbad auf 19 °C gekühlt) an einem Stativ befestigt und auf einen Frequenzbereich von ca. 40 kHz eingestellt wurde, konnten die Ultraschallrufe für das menschliche Ohr hörbar gemacht werden. Die Jungtiere wurden am 11. postnatalen Tag einzeln aus dem Wurf entnommen und auf die Glasfläche gesetzt (Abb. 3). Nach 5-minütiger Aufzeichnung der Ultraschallrufe wurden sie markiert und zurück in den mütterlichen Käfig gesetzt. Zur Aufnahme und späteren Auswertung mit einem Computerprogramm (Eventlog 1.0) wurde ein Recorder mit verstellbarer Bandgeschwindigkeit (Sony WM-DC) verwendet. Da Rattenjunge mit sehr hoher Frequenz vokalisieren, wurden die Rufe bei hoher Bandgeschwindigkeit aufgenommen und bei niedrigster Bandgeschwindigkeit ausgewertet.

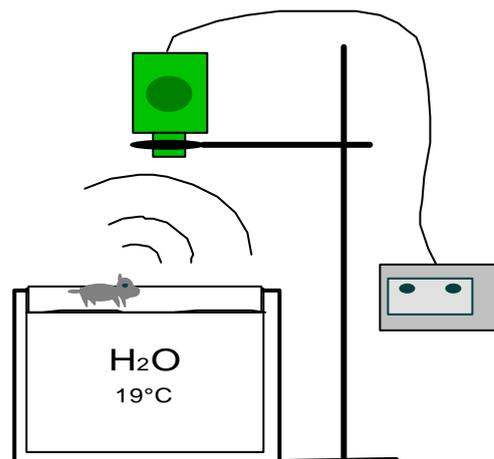


Abb. 3 Versuchsaufbau des Ultraschallvokalisations-Tests: Das zu untersuchende Rattenjunge befindet sich auf einer Glas-Petrischale, die durch ein Wasserbad auf 19 °C temperiert wird. Darüber wird an einem Stativ ein frequenzmodulierendes Richtmikrofon befestigt. Die Ultraschallrufe, die das Junge ausstößt, werden mit einem Tonbandgerät aufgezeichnet.

2.2.5 Spielerisches Kampfverhalten / *play-fighting*

Juvenile HAB- und LAB-Tiere (jeweils 8 Weibchen und 11 Männchen) wurden vom 30. bis zum 33. Lebenstag in Einzelkäfigen (20x26x14 cm Höhe) gehalten, um ihren Trieb nach Sozialkontakt zu steigern. Der Versuch fand am 33. Lebenstag zu Beginn der Dunkelphase um 19.00 h unter Infrarot-Beleuchtung statt. Jeweils ein HAB- und ein LAB-Tier gleichen Geschlechts wurden in einem Acrylglaskäfig (39x23x36 cm Höhe) zusammengebracht und das spielerische Kampfverhalten 10 min lang beobachtet. Lag eines der Tiere rücklings auf dem Boden, während das andere über ihm stand, wurde mit Hilfe eines Computerprogrammes (Eventlog 1.0) Unterwerfungsverhalten aufgezeichnet (Vanderschuren et al.1995).

2.2.6 Kompetitives Trinkverhalten

Dieser Test mißt ebenfalls das Dominanzverhalten von Ratten. Nach einer Wasserdeprivations-Phase wird zwei Tieren eine Wasserflasche angeboten. Das dominantere Tier wird sich durchsetzen und entsprechend länger an der Flasche trinken. Hierzu wurden jeweils ein HAB- und ein LAB-Weibchen mit möglichst geringen Unterschieden in Gewicht und Östrusphase 2 Tage vor der Testung zusammengesetzt, und die Wasserflasche wurde entfernt. Nach 45 h Wasserentzug wurde den Versuchspärchen (n=11) eine Wasserflasche angeboten und ihr Trinkverhalten während 10 min mittels eines Computerprogrammes (Eventlog 1.0) aufgezeichnet.

Folgende Parameter wurden bestimmt:

- Absolute Trinkzeit: Die Trinkdauer der einzelnen Tiere
- Trinkfrequenz: Die Anzahl der Trinkversuche
- Trinklatenz: Die Zeit bis zum ersten Trinkversuch

2.3 Bestimmung neuroendokriner Parameter

2.3.1 Operationen

2.3.1.1 Implantation eines chronischen Jugularvenenkatheters

Diese Methode (Remie et al. 1990) ermöglicht wiederholte Blutentnahmen am wachen Tier, ohne daß es in seinen Aktionen und Reaktionen beeinträchtigt wird. Der Katheter besteht aus einem Silikonschlauch (Dow Corning, USA, 4.5 cm Länge) der fest mit einem Polyethylenschlauch (PE-50, Portex, Großbritannien, 13 cm Länge) verbunden ist. Zur Implantation wurden die Katheter mit heparinierter Saline (Heparin-Natrium, Ratiopharm, Deutschland, 30 IU/ml in 0.9 % NaCl-Lösung) gefüllt. Die *Vena jugularis* wurde unter Halothan-Narkose (Hoechst GmbH, Frankfurt/Main, Deutschland) stumpf präpariert, mit einem flachen Schnitt eröffnet und der Katheter ca. 4.0 cm eingeführt. Nach Prüfung auf Durchgängigkeit wurde der Katheter am Gefäß fixiert und sc zum Nacken geführt. Das am Nacken austretende Schlauchende wurde auf ca. 6 cm Restlänge gekürzt und nach Injektion von 0.3ml einer antibiotikumhaltigen Lösung (Gentamycin, Centravet, Deutschland, 30 000 IU in 0.9 % NaCl-Lösung) verschlossen. Im Anschluß an die Implantation wurden die Tiere einzeln in Acrylglaskäfigen (20x25x30 cm Höhe) gehalten. Am 3. post-operativen Tag wurde der Katheter erneut mit 0.3 ml Gentamycin-Lösung (s. o.) gespült. Das Experiment fand nach einer 4-5-tägigen post-operativen Erholungsphase statt. Bei mehrtägigen Experimenten wurde am Ende jedes Versuchstages erneut 0.3 ml Gentamycin-Lösung injiziert und der Katheter verschlossen.

2.3.1.2 Implantation einer intracerebroventriculären Führungskanüle

Diese Operation ermöglicht die chronische oder akute Applikation von Pharmaka direkt in das zerebrale Ventrikelsystem. Die Implantation erfolgte unter Halothan-Narkose mit Hilfe eines stereotaktischen Apparates. Nach Eröffnung der Kopfhaut mit einem scharfen Skalpell, wurden zwei Befestigungsschrauben (eine im linken oberen, die andere im rechten unteren Quadranten) am Schädel fixiert. Die Führungskanüle (21 ga, Länge 12 mm) wurde mit den vorher ermittelten Koordinaten (1.6 mm lateral der Mittellinie und 0.6 mm caudal vom Bregma sowie 1.8 mm tief, Paxinos & Watson 1986) plziert, mit Zahnzement (Kallocryl, Deutschland) an den Befestigungsschrauben fixiert und mit einem Stylet verschlossen. Nach sc-Injektion von 0.03 ml eines Depot-Antibiotikums (Tardomyocel ®, Bayer AG, Deutschland) wurden die Tiere bis zum Experiment (4-5 Tage später) einzeln in

einem Acrylglaskäfig gehalten. Für die Infusion der Substanzen im Experiment wurden spezielle icv-Infusionskanülen (25 ga, Länge 14 mm) an 10 µl-Glasspritzen (Hamilton, Bonaduz, Schweiz) angeschlossen und in die Führungskanüle abgesenkt (Abb. 4).

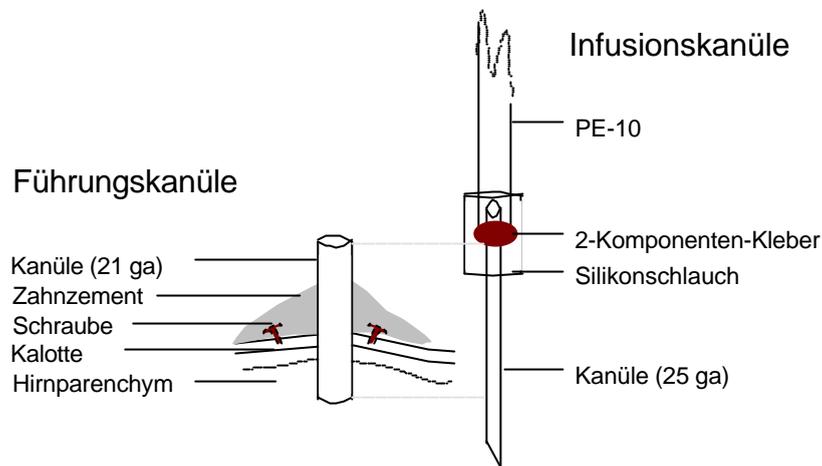


Abb. 4 Schematische Darstellung der icv-Infusionssysteme bestehend aus einer Führungskanüle (25 ga, 12 mm Länge) und einer Infusionskanüle (25 ga, 14 mm Länge). Am Versuchstag wird die abgesenkte icv-Infusionskanüle durch ein Verbindungsstück aus Silikonschlauch an der Führungskanüle fixiert.

2.3.1.3 Implantation einer Mikro- bzw. Retrodialysesonde

Die Mikro dialyse ermöglicht die Bestimmung der endogenen Freisetzung von Neuromodulatoren, aber auch die Applikation verschiedener Substanzen durch Retrodialyse, in definierten Hirnarealen am wachen Tier, ohne daß dieses in seinen Aktionen und Reaktionen beeinträchtigt wird (Engelmann et al. 1994, Neumann et al. 1993, Landgraf et al. 1995b). Die Implantation erfolgte unter Halothan-Narkose mit Hilfe eines stereotaktischen Apparates. Die Mikro dialysesonde (Abb. 5) wurde unter Verwendung der vorher ermittelten Koordinaten (PVN: 1.6 mm lateral und 1.7 mm caudal von Bregma sowie 8.9 mm tief mit 10° Lateralneigung, um eine Verletzung des sagittalen Sinus zu verhindern; SON: 1.6 mm lateral und 1.8 mm caudal sowie 9.3 mm tief, Paxinos & Watson, 1986) plaziert und mit Zahnzement (s. o.) an den Befestigungsschrauben fixiert. Anschließend wurden die Zu- und Ablaufschläuche (PE-10, Portex, Großbritannien) aufgesteckt und ebenfalls mit Zahnzement fixiert. Nach sc-Injektion von 0.03 ml eines Depotantibiotikums (s. o.) wurden die Tiere bis zum Experiment einzeln in Acrylglaskäfigen (s. o.) gehalten.

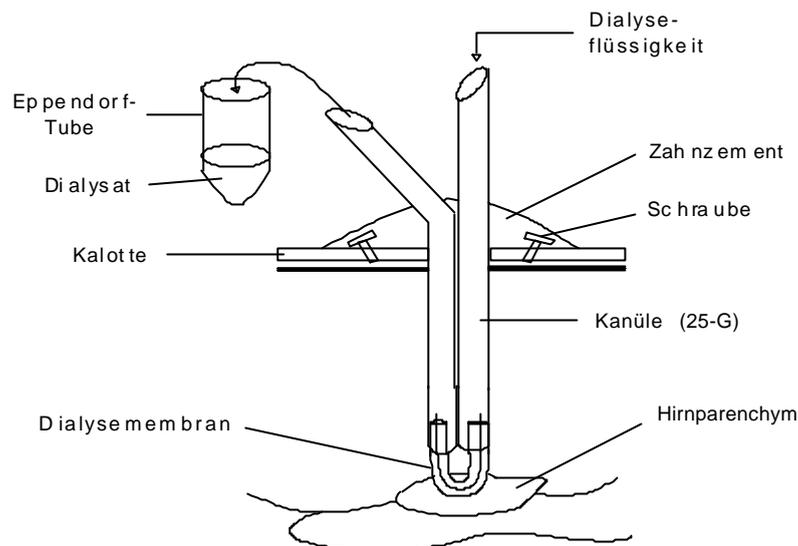


Abb. 5 Aufbau eines Mikrodialyse-Systems (Engelmann 1992)

2.3.1.4 Histologische Kontrollen

Am Ende der Experimente wurden die Tiere mit einer Überdosis Halothan getötet. Die Lokalisation der icv-Führungskanülen wurde in den entnommenen Hirnen mittels einer icv-Farbinjektion (5% Kresylviolett-Lösung) überprüft. Gehirne von Tieren mit einer Mikro- oder Retrodialysesonde wurden entnommen, in Trockeneis-gekühltem N-Methylbutan (Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland) schockgefroren und bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ aufbewahrt. Von den jeweils relevanten Kerngebieten wurden bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ Umgebungs- und Objekttemperatur Schnitte von $25\text{ }\mu\text{m}$ Dicke angefertigt (Cryocut, Microm HM 500, Walldorf, Deutschland) und diese mit Kresylviolett gefärbt, so daß die korrekte Plazierung der Sonden überprüft werden konnte (Abb. 6).

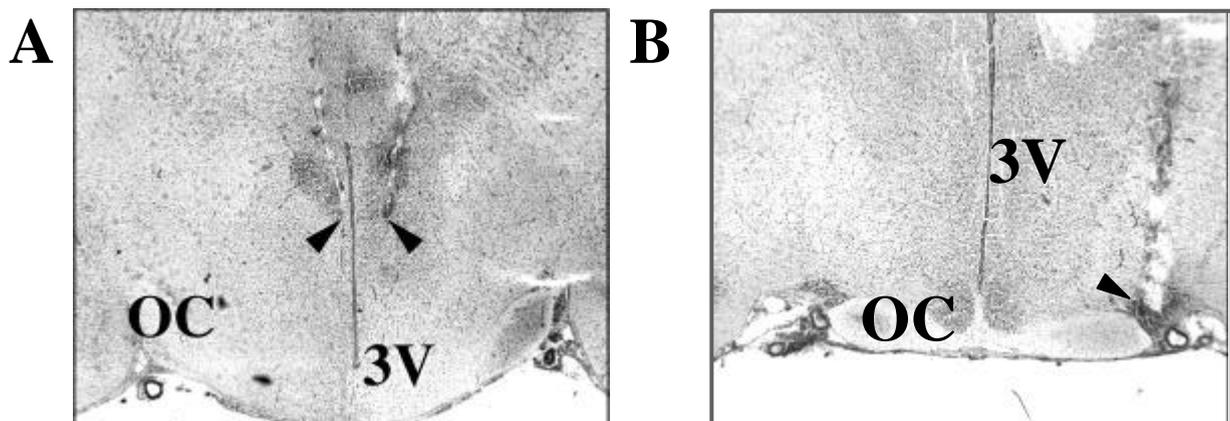


Abb. 6 Mikrophotographien von Hirnschnitten ($25\text{ }\mu\text{m}$) der hier untersuchten hypothalamischen Regionen. Die korrekte Plazierung der Mikrodialyse-Sonden innerhalb der *Nuclei* (A: bilaterale Plazierung im PVN, B: unilaterale Plazierung im SON) wird durch Läsionen angezeigt (Pfeile), die nach Entfernen der Systeme zurückbleiben. OC: Optisches Chiasma, 3V: III. Ventrikel.

2.3.2 Analytische Methoden

2.3.2.1 Entnahme, Behandlung und Volumina der Blutproben

Die Zeitpunkte der Blutentnahmen können den jeweiligen Versuchsprotokollen im Ergebnisteil entnommen werden. Die Blutproben wurden in eisgekühlten 1.5 ml-Probenröhrchen mit EDTA-Beschichtung (Kabe Labortechnik, Deutschland) und 10 µl Aprotinin (Trasylol, Bayer AG, Leverkusen, Deutschland) gesammelt und zentrifugiert (5 min, 4000 Upm, 4 °C). Plasma-Aliquote für die Analysen von ACTH (80 µl), Corticosteron (10 µl in 1.4 ml 1xPBS), OXT/AVP (160-220 µl), Prolaktin (80 µl) und Laktat (80 µl) wurden bis zur Analyse bei -20 °C gelagert. Das Volumen des entnommenen Blutes richtete sich nach den benötigten Plasmavolumina für die Aliquotierung. Nach jeder Blutentnahme erfolgte eine Volumensubstitution mit steriler 0.9 % NaCl-Lösung (Braun, Deutschland).

2.3.2.2 Extraktion von Oxytocin und Vasopressin aus Blutplasma

Die Extraktion der Nonapeptide OXT und AVP (Landgraf 1981) erfolgte mittels hitzeaktiviertem (3-4 h, 700°C) Glaspulver (LiChroprep Si 60, Merck, Deutschland; Porendurchmesser 20 Å). Jedes Plasma Aliquot (160-220 µl) wurde mit 1.0 ml einer Glaspulversuspension (20 mg/ml Aqua bidest) versetzt, gemischt und 30 min bei 4 °C rotierend bewegt. Nach Zentrifugation der Probe (2 min, 4000 Upm) und Absaugen des Überstandes wurde das Pellet mit jeweils 0.5 ml Aqua bidest und 0.1 N HCl gewaschen. Anschließend wurde das Pellet mit 0.5 ml 60 % Aceton (Raumtemperatur) vermischt und 30 min bei 4 °C bewegt, um die Nonapeptide aus den Poren des Glaspulvers zu lösen. Die Suspension wurde zentrifugiert und das Aceton, welches die Nonapeptide enthielt, vorsichtig in ein frisches Eppendorf-Tube übernommen. Die extrahierten Proben wurden lyophilisiert und bis zur Analyse bei -20 °C aufbewahrt.

2.3.2.3 Radioimmunoassays

Bei allen Analysen wurden die zu vergleichenden Gruppen in einem Ansatz gemessen, um Interassay-Variationen zu vermeiden.

Die quantitative Analyse von ACTH (ICN Biomedicals Inc., Costa Mesa, USA, Detektionslimit < 4.0 pg/ml oder Biochem Immunosystems, Deutschland, Sensitivität < 1.0 pg/ml) und Corticosteron (ICN Biomedicals Inc., Detektionslimit < 10.0 ng/ml oder DRG-Instruments, Deutschland, Sensitivität < 2.0 ng/ml) erfolgte mit kommerziellen

Testansätzen. Die quantitative Bestimmung von OXT bzw. AVP wurde mittels eines hochsensitiven und -selektiven Radioimmunoassays (NEN, Deutschland, Sensitivität < 0.03 pg/Probe, Kreuzreaktivität der Antiseren mit strukturverwandten Peptiden, einschließlich OXT bzw. AVP < 0.7 %, Landgraf 1995b) durchgeführt. Die intra-Assay Variationen waren zwischen 7 und 10 %.

Plasmakonzentrationen von Laktat wurden mit einem Enzymimmunoassay bestimmt (MPRI Laktat, Boehringer Mannheim, Deutschland).

2.3.2.4 *In situ* Hybridisierung

Diese Methode dient zur qualitativen und quantitativen Detektion der Genexpression (mRNA) in Schnittpräparaten von Gehirngewebe (*in situ*). Mittels hochspezifischer radioaktiv markierter Oligonukleotidsonden kann die zum Zeitpunkt der Entnahme aktuelle mRNA-Expression auf Zellniveau dargestellt werden.

Männliche HAB- und LAB-Ratten (je n=5, 250-300 g) wurden unter Basalbedingungen aus dem Heimkäfig entnommen und unter leichter Halothan-Narkose dekapitiert. Die entnommenen Gehirne wurden in Trockeneis-gekühltem Methylbutan schockgefrostet und bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C aufbewahrt. Mittels eines Cryocut (Umgebungs- und Objekttemperatur jeweils -20 °C) wurden 14 µm-Schnitte angefertigt, auf Objektträger aufgenommen (Probe on, Fisher scientific, Deutschland) und bei -20 °C in gut verschlossenen Boxen gelagert. Vor Gebrauch wurden die Schnitte mittels einer Ethanol / Chloroform / Ethanol-Reihe entwässert und luftgetrocknet.

Hier wurde ein hochspezifisches 48-mer-Oligonukleotid für AVP-mRNA verwendet, das gegen die letzten 16 Aminosäuren des Glycoproteins gerichtet ist, die AVP nicht mit OXT gemeinsam hat (5' gcagaagggccccggccggccccgtccagctgcgtggcgttgetccggtc, Ivell & Richter 1984, Villar et al. 1994). Das Oligonucleotid wurde mittels terminaler Transferase (TdT, Boehringer, Deutschland) mit ³⁵S-ATP (NEN, Deutschland) am 3'-Ende radioaktiv markiert und mittels t-RNA (Sigma, Deutschland)-Präzipitation aufgereinigt. Die markierte Probe wurde in 45 °C temperiertem Hybridisierungscocktail (für 200 ml: 100 ml deionisiertes Formamid, 40 ml 20 x SSC, 200 g Dextransulfat, 20 ml 0.2 M Na-Phosphatpuffer, 2 ml Denhardt's Lösung, 10 ml 20% Sarcosyl, 50 µl/ml Lachssperma-DNA, 40 µl/ml 5 M Dithiothreitol) aufgenommen und auf eine Konzentration von 1.000.000 cpm / 100 µl / Objektträger gebracht. Diese Mischung wurde auf die Schnitte gegeben (100 µl / Objektträger) und bei 45 °C für eine Dauer von 18-20 h in einer feuchten Kammer hybridisiert.

Nach dem Waschen (4 x 15 min mit 1 x SSC, 55°C; 1 x 30 min, RT; 1 x Aqua bidest 10 s, RT; 1 x 65% Ethanol, 60 s, RT; 1 x 95% Ethanol, 60 s, RT) und Trocknen der Schnitte wurden die Objektträger in 50% Photoemulsion (NTB2, Kodak, Deutschland) gedippt und 48 h unter Lichtausschluß exponiert. Nach Entwicklung (D19, Kodak, Deutschland) und Fixierung (Kodak Fixierer, Kodak, Deutschland) wurden die Schnitte gegengefärbt (Thionin 2%, 1 min), mit flüssigem, optisch inertem Kunstharz (Eukitt, Roth, Deutschland) beschichtet und mit einem Deckglas versehen. Nach Aushärtung des Harzes wurde die Silberkorndichte pro Kerngebiet $\hat{=}$ Radioaktive Markierung / Fläche) in den Schnittpräparaten mit Hilfe eines Computerprogrammes (Optimas 5.0) ermittelt.

2.4 Pharmakologische Behandlungen

2.4.1 Opiat-Rezeptor-Antagonist

Naloxon (NLX) ist ein kompetitiver Opiat-Rezeptor-Antagonist mit einer primär höheren Affinität gegenüber μ -Rezeptoren als gegenüber κ - oder δ -Rezeptoren (Sigma, Deutschland). Die Applikation erfolgte sc (5 mg/ml, 0.5 ml/kg) oder iv über den Jugularvenenkatheter (5 mg/ml, 0.5 ml/kg), wie detailliert in den Versuchsprotokollen beschrieben. Als Vehikel diente in jedem Fall sterile 0.9 % NaCl-Lösung.

2.4.2 Oxytocin-Rezeptor-Antagonist

Für die hier durchgeführten Studien wurde ein selektiver OXT-Rezeptor-Antagonist (Des Gly-NH₂ d(CH₂)₅ [Tyr(Me)², Thr⁴] OVT; pH 7.4, bereitgestellt von Dr. M. Manning, Toledo, USA) verwendet, dessen Wirkung auch gegenüber AVP als hochselektiv beschrieben ist (Manning et al. 1989). Zur Kontrolle der Selektivität des OXT-Antagonisten wurde ein ebenso selektiver AVP-V1-Rezeptor-Antagonist (d(CH₂)₅Tyr(Me)AVP, pH 7.4, ebenfalls Dr. M. Manning) appliziert. Die Administration erfolgte icv (0.75 μ g/5 μ l) oder direkt in den PVN über Retrodialyse (10 μ g/ml, Dialyserate 200 μ l/h), wie detailliert in den Versuchsprotokollen beschrieben. Als Vehikel diente Ringerlösung (Fresenius, Deutschland, pH 7.4).

2.4.3 Corticotropin releasing hormon

Die pharmakologische Stimulation der corticotropen Zellen der Adenohypophyse durch humanes CRH (Ferring, Deutschland) erfolgte durch eine iv-Applikation über den Jugularvenenkatheter (50 ng/kg, 0.5 ml/kg, siehe Versuchsprotokoll).

2.5 Statistik

Alle Daten sind als Mittelwert \pm mittlerer Standardfehler (SEM) angegeben und wurden mit einem Computerprogramm (GB-Stat V 6.0, Dynamic Microsystems, USA) ausgewertet, wobei Unterschiede ab $p < 0.05$ als statistisch signifikant angesehen wurden. Tiere, die post-operativ Anzeichen von Krankheit zeigten, wurden von den Versuchen bzw. der statistischen Analyse ausgeschlossen.

Die statistischen Vergleiche der basalen und stimulierten Plasmakonzentrationen von ACTH, Corticosteron, OXT, AVP und Prolaktin, der OXT- und AVP-Konzentrationen in den Mikrodialysaten und der Verhaltensdaten wurden mit 2-Weg (Gruppe x Zeit oder Behandlung x Zeit)- oder 3-Weg (Gruppe x Geschlecht x Zeit, Gruppe x Behandlung x Zeit)-Varianzanalysen mit anschließendem post-hoc-Test (Newman-Keuls) geführt. Gruppenunterschiede in den Plasma- oder Mikrodialyse-Werten sowie Verhaltensdaten, die keinen mehrfaktoriellen Vergleich erforderten, wurden mit einer 1-Weg-Varianzanalyse (Faktoren: Rattenlinie oder Behandlung) oder dem U-Test nach Mann-Whitney untersucht.

3 Ergebnisse

3.1 Regulation der hypothalamo-adenohypophysär-adrenocorticalen Achse und des emotionalen Verhaltens durch das zentrale oxytocinerge System

3.1.1 Zentrale Applikation eines Oxytocin-Rezeptor-Antagonisten bei Männchen und virginen Weibchen

3.1.1.1 Intracerebroventriculäre Applikation

Versuchsprotokoll

Männlichen (280-320 g) und virginen weiblichen (250-290 g) Ratten wurden eine icv-Führungskanüle und ein Jugularvenenkatheter implantiert. Nach der Operation wurden die Tiere einzeln gehalten und jeden Tag mit der Handhabung der icv-Infusion vertraut gemacht (*handling*), um unspezifische Streßreaktionen während des Experimentes zu vermeiden. Am 5. post-operativen Tag um 8.00 h wurden die Katheter durch Verlängerungsschläuche an 1 ml-Plastikspritzen gekoppelt, die mit heparinisierter Saline gefüllt wurden. Gleichzeitig wurden die mit Vehikel, OXT- oder V1-Antagonist beschickten und an 10 µl-Spritzen (gefüllt mit Ringerlösung) angeschlossenen icv-Infusionskanülen in die Führungskanülen abgesenkt und dort mittels eines Silikonschlauches befestigt. Um 10.00 h wurde eine 0.2 ml-Blutprobe entnommen (für ACTH und Corticosteron) und direkt danach Vehikel (5 µl), OXT-Antagonist (5 µl) oder AVP-V1-Antagonist (5 µl, nur Weibchen) icv infundiert. Nach 10 min wurde eine weitere Blutprobe entnommen, der Katheter abgekoppelt und die Infusionskanüle entfernt. Nach 5 min Testung auf der *plus-maze* wurden die Ratten in den Heimkäfig zurückgebracht und die Katheter wieder angekoppelt. Weitere Blutentnahmen von 2.0 ml erfolgten nach 5, 15 und 60 min (Abb. 7).

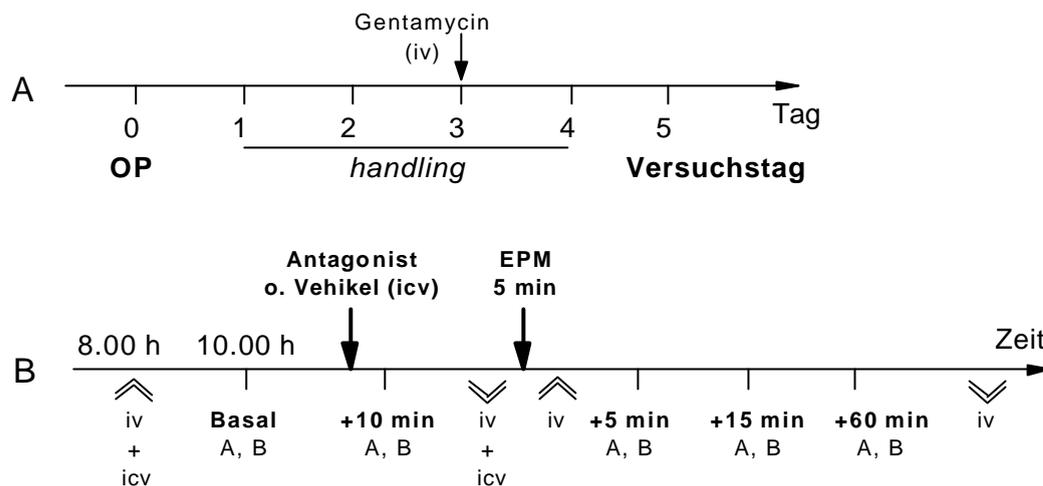


Abb. 7 Post-operativer Zeitraum (A) und Versuchstag (B) mit Zeitplan für die Blutentnahmen für ACTH [A] und Corticosteron [B], icv-Infusion der Antagonisten bzw. Vehikel und Exposition der *elevated plus-maze* (EPM). Doppelpfeile nach oben weisen auf die Zeitpunkte des Ankoppelns, Doppelpfeile nach unten auf die Zeitpunkte des Abkoppelns der Katheter (iv) bzw. der icv-Infusionskanülen (icv) hin.

Effekt des icv verabreichten OXT-Antagonisten auf die Freisetzung von ACTH und Corticosteron

Bei männlichen und virginen weiblichen Tieren beeinflusste die icv-Infusion des OXT-Rezeptor-Antagonisten sowohl die basale als auch die stimulierte Freisetzung von ACTH (3-Weg ANOVA, Geschlecht x Behandlung x Zeit: $F_{4,96}$ 0.79, $p=0.53$, Geschlecht x Zeit: $F_{4,96}$ 3.08, $p=0.02$, Behandlung x Zeit: $F_{4,96}$ 7.01, $p=0.0001$) und Corticosteron (Geschlecht x Behandlung x Zeit: $F_{4,84}$ 4.52, $p=0.0023$).

Bei Männchen war die basale Plasmakonzentration von ACTH und Corticosteron 10 min nach icv-Gabe des OXT-Antagonisten signifikant erhöht (ACTH: 4.33 ± 0.84 -facher Anstieg, $p < 0.05$ vs. basal; Corticosteron: 5.71 ± 0.97 -fach, $p < 0.01$ vs. basal; beide Hormone jeweils $p < 0.05$ vs. Vehikel, Abb. 8). Gleiche Effekte nach Infusion des OXT-Antagonisten zeigten sich bei virginen Weibchen (ACTH: 5.84 ± 1.50 -fach, $p < 0.01$ vs. basal; Corticosteron: 4.72 ± 0.23 -fach, $p < 0.01$ vs. basal; beide Hormone jeweils $p < 0.01$ vs. Vehikel, Abb. 8). Die Exposition auf der *plus-maze* induzierte einen signifikanten Anstieg der Plasmakonzentrationen von ACTH und Corticosteron bei Vehikel-behandelten Männchen (ACTH: 2.91 ± 0.49 -fach, Corticosteron: 2.48 ± 0.11 -fach, $p < 0.05$ vs. basal) und Weibchen (ACTH: 4.83 ± 1.11 -fach, Corticosteron: 3.21 ± 0.32 -fach, $p < 0.01$ vs. basal). Nach Behandlung mit dem OXT-Antagonisten waren die Plasmakonzentrationen von ACTH (männlich: $p < 0.05$; weiblich: $p < 0.01$ vs. Vehikel) und Corticosteron (männlich: n.s., weiblich: $p < 0.05$ vs. Vehikel, Abb. 8) in beiden Geschlechtern erhöht.

Die Infusion des AVP-V1-Rezeptor-Antagonisten bei einer zusätzlichen Gruppe virginer Weibchen (n=7) erhöhte ebenfalls die basalen (prä-Streß) Plasmakonzentrationen von ACTH (basal: 126 ± 20.9 , icv+10 min: 217 ± 48.6 pg/ml, 2.12 \pm 0.68-facher Anstieg, $p < 0.05$) und Corticosteron (basal: 212 ± 53.9 , icv+10 min: 323 ± 51.3 ng/ml, 2.03 \pm 0.56-fach, $p < 0.05$), jedoch war dieser Anstieg signifikant geringer als bei OXT-Antagonist-Behandlung ($p < 0.01$ vs. OXT-A). Auch die post-Streß Plasmakonzentrationen von ACTH (EPM+5 min: 333 ± 62.0 , +15 min: 345 ± 67.1 pg/ml, +60 min: 271 ± 46.9) und Corticosteron (EPM+5 min: 429 ± 37.5 , +15 min: 402 ± 19.8 , +60 min: 350 ± 16.2 ng/ml) waren nach Behandlung mit dem V1-Antagonisten im Vergleich zu Vehikel erhöht, jedoch in geringerem Maße als bei Infusion des OXT-Antagonisten.

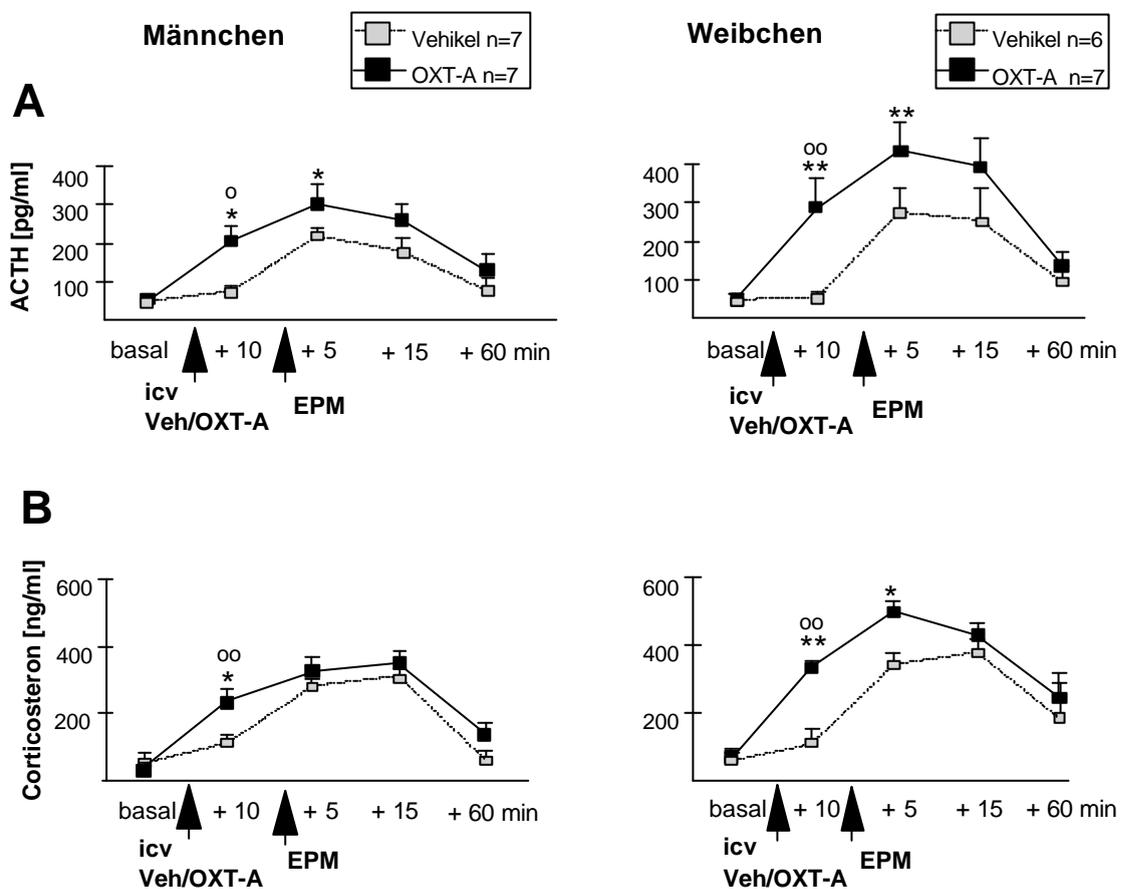


Abb. 8 Plasmakonzentrationen von ACTH (A) und Corticosteron (B) bei freibeweglichen männlichen und virginen weiblichen Wistar-Ratten, denen eine icv-Führungskanüle und ein Jugularvenenkatheter implantiert wurde. Je eine Blutentnahme erfolgte unter basalen Bedingungen und 10 min nach icv-Infusion von Vehikel (Veh, Ringerlösung, 5 μ l) oder einem OXT-Rezeptor-Antagonisten (OXT-A, 0.75 μ g/5 μ l). Danach wurden die Tiere 5 min auf der *elevated plus-maze* (EPM) getestet und weitere Blutproben wurden 5, 15 und 60 min nach Rückkehr der Tiere in den Heimkäfig entnommen. Daten sind Mittelwerte + SEM. $^{\circ}$ $p < 0.05$, $^{\circ\circ}$ $p < 0.01$ vs. basal; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ vs. Vehikel

Effekte des icv OXT-Antagonisten auf das angstbezogene Verhalten

Weder bei Männchen noch bei virginen Weibchen beeinflusste die Behandlung mit den OXT- oder V1-Rezeptor-Antagonisten das angstbezogene Verhalten auf der *plus-maze*. Sowohl die verbrachte Zeit auf den offenen Armen (2-Weg ANOVA; Behandlung: $F_{1,28} 1.04, p=0.32$) als auch die Anzahl von Eintritten in diese (2-Weg ANOVA; Behandlung: $F_{1,28} 0.05, p=0.80$) waren gleich bei Antagonist- und Vehikel-behandelten Tieren. Auch die lokomotorische Aktivität der Ratten (Anzahl der Eintritte in die geschlossenen Arme) wurde durch die Behandlung nicht verändert (Tabelle 1).

Tabelle 1 Angstbezogenes Verhalten (% Eintritte in die bzw. % Zeit auf den offenen Armen) und lokomotorische Aktivität (Eintritte in geschlossene Arme) männlicher und virginer weiblicher Ratten auf dem *elevated plus-maze* nach Behandlung mit einem OXT-Rezeptor-Antagonisten (OXT-A, 0.75 $\mu\text{g}/5 \mu\text{l}$), einem V1-Antagonisten (V1-A, 0.75 $\mu\text{g}/5 \mu\text{l}$) oder Vehikel (Ringerlösung, 5 μl). Daten sind Mittelwerte \pm SEM.

		% Eintritte	% Zeit	Eintritte geschlossen
Männchen	Vehikel (n=7)	34.3 \pm 3.11	16.8 \pm 3.41	9.86 \pm 1.14
	OXT-A (n=8)	34.1 \pm 3.62	22.8 \pm 4.91	10.8 \pm 1.24
Weibchen	Vehikel (n=9)	42.3 \pm 2.98	28.1 \pm 3.25	10.0 \pm 0.65
	OXT-A (n=8)	39.3 \pm 2.59	28.2 \pm 1.88	9.75 \pm 0.73
	V1-A (n=7)	41.6 \pm 2.00	29.4 \pm 3.91	10.8 \pm 1.03

3.1.1.2 Bilaterale Applikation in die paraventriculären Nuclei

Versuchsprotokoll

Am Tag vor dem Experiment, d. h. am 3. post-operativen Tag, wurden die weiblichen Tiere (n=21) dem *plus-maze* exponiert. Davor und 5 min danach wurde jeweils eine 2.0 ml-Blutprobe (Bestimmung von ACTH) entnommen, um die Reaktivität der HPA-Achse zu bestätigen.

Am nächsten Tag, d. h. am 4. post-operativen Tag, wurde unter basalen (ungestressten) Konditionen sowohl bei Männchen als auch bei Weibchen die Freisetzung von ACTH vor und nach bilateraler Retrodialyse des OXT-Rezeptor-Antagonisten oder Vehikel in die PVNs untersucht. Um 8.00 h wurden der Jugularvenenkatheter angekoppelt (s.o.) und die Mikrodialyse-Systeme an die Mikroinfusions-Pumpe angeschlossen. Während einer 2 h-Ruhephase wurden die Mikrodialyse-Systeme gespült (200 $\mu\text{l}/\text{h}$, sterile Ringerlösung,

pH 7.4), um ein Equilibrium zwischen dem Dialysemedium und der Extrazellulärflüssigkeit einzustellen. Nach zwei basalen 0.2 ml-Blutentnahmen (innerhalb von 30 min) wurde das Dialysemedium für 15 min durch eine OXT-Antagonist-haltige Lösung (10 µg/ml) ersetzt bzw. wurde der Tausch simuliert (Vehikel). Weitere Blutentnahmen folgten nach 15 und 45 min (Abb. 9). Vorausgesetzt, daß Moleküle gleicher Größe die Dialysemembran in gleichem Maße passieren können, wurde während der 15-minütigen Retrodialyse eine Gesamtmenge von 2-3 ng des OXT-Rezeptor-Antagonisten in das das System umgebende Gewebe (im PVN) abgegeben (Landgraf 1995a).

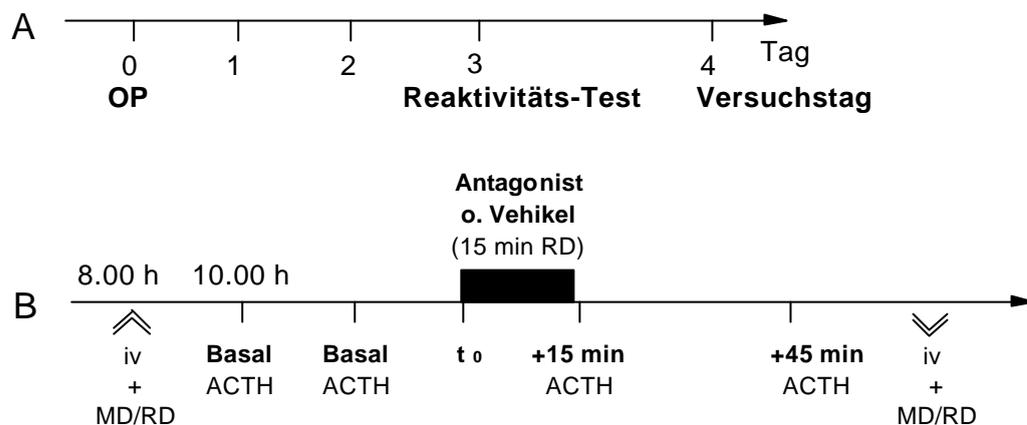


Abb. 9 Post-operativer Zeitraum (**A**) und Versuchstag (**B**) mit Zeitplan für die Blutentnahmen für ACTH. Nach der Entnahme von 2 basalen Blutproben wurde OXT-Antagonist bzw. Vehikel 15 min lang per Retrodialyse (15 min RD, 10 µg/ml, 200 µl/h) bilateral in die PVNs infundiert. Doppelpfeile nach oben weisen auf die Zeitpunkte des Ankoppelns, Doppelpfeile nach unten auf die Zeitpunkte des Abkoppelns der Katheter (iv) und der Dialysesysteme (MD/RD) hin.

Reaktivität der HPA-Achse auf emotionalen Streß nach bilateraler Implantation des PVN

Verglichen mit den Basalwerten zeigte sich 5 min nach *plus-maze*-Exposition ein signifikanter Anstieg (2.73 ± 0.13 -fach, $p < 0.01$) der ACTH-Freisetzung, der dem bei Ratten mit einer Katheter- sowie icv-Implantation vergleichbar ist. Für die statistische Analyse wurden die Ratten in Gruppen je nach Lokalisation der Mikrodialyse-Sonden eingeteilt (Tabelle 2). Diese Ergebnisse beweisen eine ungestörte Reaktivität der HPA-Achse auf einen milden emotionalen Stressor trotz Implantation von Mikrodialyse-Sonden in beide PVNs.

Tabelle 2 Plasmakonzentrationen von ACTH bei virginen weiblichen Ratten, denen eine Mikrodialyse-Sonde in den rechten und linken PVN implantiert wurde. Nach der Entnahme einer basalen Blutprobe wurden die Tiere dem *elevated plus-maze* exponiert und nach 5 min wurde eine weitere Blutprobe entnommen. Daten sind Mittelwerte \pm SEM. ** $p < 0.01$ vs. basal (2-Weg ANOVA)

ACTH [pg/ml]	Basal	EPM + 5 min
Bilateral getroffen	62.7 \pm 8.38	116 \pm 19.4 **
Unilateral getroffen	57.4 \pm 5.54	162 \pm 22.7 **
Nicht getroffen	43.5 \pm 7.78	168 \pm 25.2 **

Effekt des OXT-Antagonisten auf die basale Aktivität der HPA-Achse

Die bilaterale Retrodialyse des OXT-Antagonisten in die PVNs unter basalen (ungestreßten) Konditionen induzierte eine signifikante Erhöhung der ACTH-Plasmakonzentration sowohl bei Männchen als auch bei virginen Weibchen (3-Weg ANOVA, Geschlecht x Behandlung x Zeit: $F_{3,102}$ 1.87, $p=0.12$; Behandlung x Zeit: $F_{3,102}$ 20.9, $p < 0.0001$). Während sich die Plasmakonzentration von ACTH bei Vehikel-perfundierten Tieren beiderlei Geschlechts nicht veränderte, war sie 15 min nach Beginn der Retrodialyse mit dem OXT-Antagonisten sowohl bei männlichen (2.03 \pm 0.52-fach, $p < 0.01$ vs. Vehikel) als auch weiblichen (1.44 \pm 0.21-fach, $p < 0.05$ vs. Vehikel) Tieren erhöht (Abb. 10). Bei Tieren, die bei der histologischen Kontrolle uni- oder bilateral außerhalb des PVN plazierte Dialyse-Sonden aufwiesen hatte die Perfusion des Antagonisten keinen signifikanten Effekt (Abb. 10).

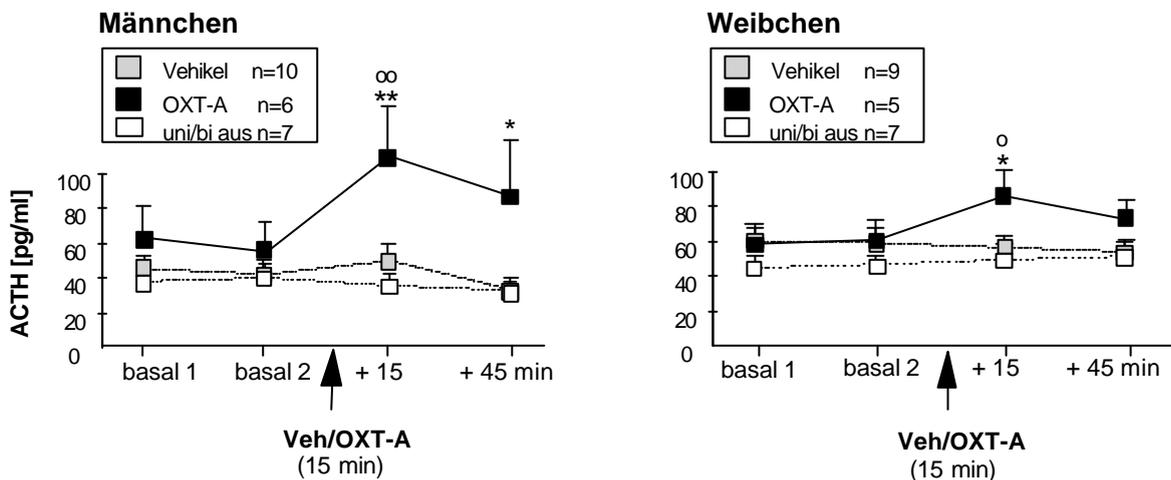


Abb. 10 Plasmakonzentrationen von ACTH bei männlichen und virginen weiblichen Ratten denen eine Mikrodialyse-Sonde in den rechten und linken PVN implantiert wurde. Nach der Entnahme von 2 basalen Blutproben (basal 1, basal 2) wurde das Dialysemedium für 15 min durch eine Antagonist-haltige Lösung (OXT-A, 10 μ g/ml) ersetzt, während dieser Tausch bei der Vehikel-Gruppe nur vorgetäuscht wurde. 15 und 45 min nach dem Wechsel der Dialyselösung wurden weitere Blutproben entnommen. Weiße Kästchen zeigen Daten von OXT-A-behandelten Tieren, bei denen die Mikrodialyse-Sonden unilateral oder bilateral außerhalb (uni/bi aus) des PVN lokalisiert waren. Daten sind Mittelwerte + SEM. ° $p < 0.05$, °° $p < 0.01$ vs. basal; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ vs. Vehikel

3.1.2 Intracerebroventriculäre Applikation eines OXT-Rezeptor-Antagonisten bei trächtigen und laktierenden Weibchen

Versuchsprotokoll (1. Versuchstag, elevated plus-maze)

Virgininen (250-290 g, s. o.), trächtigen (15./16. Trächtigkeitstag, 320-360 g) und laktierenden (Tag 2-6, 300-350 g) Ratten wurde eine icv-Führungskanüle und ein Jugularvenenkatheter implantiert. Nach der Operation wurden die Tiere einzeln gehalten, laktierende Tiere mit ihren Jungen. Am 5. post-operativen Tag um 8.00 h wurden die Katheter an 1 ml-Plastikspritzen (mit heparinisierter Saline gefüllt) gekoppelt. Die mit Vehikel oder OXT-Antagonist beschickten icv-Infusionskanülen wurden in die Führungskanülen abgesenkt und dort befestigt. Bei laktierenden Weibchen wurden alle Jungen bis auf eines aus dem Käfig entfernt. Bei den basalen Blutproben um 10.00 h, sowie 10 min nach icv-Infusion von Vehikel (5 µl) oder OXT-Antagonist (0.75 µg/5 µl) wurde eine 0.6 ml-Blutprobe (für ACTH, Corticosteron und OXT) entnommen. Nach Abkoppeln des Katheters und Entfernen der icv-Infusionskanüle wurden die Tiere 5 min auf der *plus-maze* getestet, anschließend in den Heimkäfig zurückgebracht und die Katheter wieder angekoppelt. Weitere Blutproben wurden 5 min (0.6 ml), 15 und 60 min (je 0.2 ml, für ACTH und Corticosteron) danach entnommen (Abb. 11). Bei Tieren, die am nächsten Tag erneut untersucht wurden, wurde der Katheter mit 0.3 ml Gentamycin-Lösung gespült und abgekoppelt. Laktierenden Weibchen wurden die Jungtiere zurückgegeben.

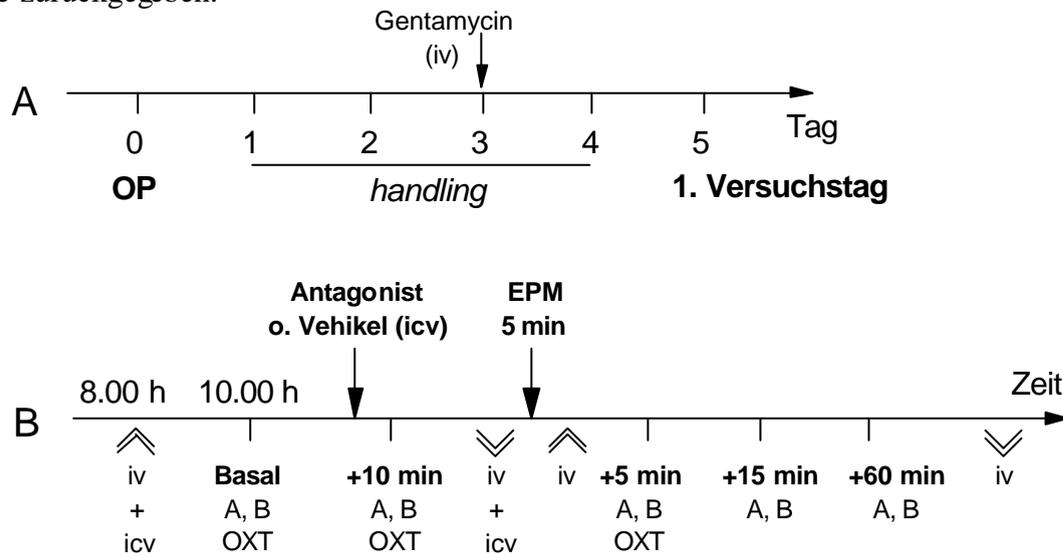


Abb. 11 Post-operativer Zeitraum (A) und 1. Versuchstag (B) mit Zeitplan für die Blutentnahmen für ACTH [A], Corticosteron [B] und Oxytocin [OXT], icv-Infusion des OXT-Antagonisten bzw. Vehikel und Exposition der *elevated plus-maze* (EPM). Doppelpfeile nach oben weisen auf die Zeitpunkte des Ankoppelns, Doppelpfeile nach unten auf die Zeitpunkte des Abkoppelns der Katheter (iv) bzw. der icv-Infusionskanülen (icv) hin.

Effekte auf die Aktivität der HPA-Achse, 1. Versuchstag (plus-maze)

Bei allen weiblichen Tieren beeinflusste die icv-Infusion des OXT-Rezeptor-Antagonisten sowohl die basale als auch die stimulierte Aktivität der HPA-Achse, jedoch in Abhängigkeit des Reproduktionsstadiums (3-Weg ANOVA, Reproduktionsstadium x Behandlung x Zeit, ACTH: $F_{8,144} 2.30, p=0.023$, Corticosteron: $F_{8,144} 7.16, p<0.0001$).

Basale (prä-Infusion) Werte von ACTH und Corticosteron zeigten keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen, wobei die Plasmakonzentration von Corticosteron bei trächtigen und laktierenden Ratten tendenziell höher war. Bei virginen Weibchen war die basale Plasmakonzentration von ACTH und Corticosteron 10 min nach icv-Gabe des OXT-Antagonisten signifikant höher als vor der Infusion (ACTH: Vehikel: 1.14 ± 0.26 -fach vs. Antagonist: 5.78 ± 1.49 -fach, $p<0.01$ vs. basal; Corticosteron: Vehikel: 1.71 ± 0.66 -fach vs. Antagonist: 4.73 ± 0.23 -fach, $p<0.01$ vs. basal, Abb. 12). Bei trächtigen (ACTH: Vehikel: 1.48 ± 0.23 -fach, Antagonist: 3.44 ± 1.18 -fach; Corticosteron: Vehikel: 2.27 ± 0.48 -fach, Antagonist: 3.21 ± 0.54 -fach) und laktierenden (ACTH: Vehikel: 1.33 ± 0.32 -fach, Antagonist: 1.52 ± 0.35 -fach, Corticosteron: Vehikel: 1.34 ± 0.41 -fach, Antagonist: 1.33 ± 0.20 -fach) Weibchen zeigte sich jedoch kein signifikanter Effekt des OXT-Antagonisten im Vergleich mit Vehikel (Abb. 12). Die Exposition auf der *plus-maze* induzierte einen signifikanten Anstieg der Plasmakonzentrationen von ACTH und Corticosteron bei Vehikel-behandelten virginen Weibchen (ACTH: 4.78 ± 1.13 -fach, Corticosteron: 3.16 ± 0.32 -fach, $p<0.01$); die Behandlung mit dem OXT-Antagonisten führte zu einer weiteren Erhöhung der Plasmakonzentrationen von ACTH ($p<0.01$ vs. Vehikel) und Corticosteron ($p<0.05$ vs. Vehikel, Abb. 12). Der Quotient "stimuliert / post-Infusion" war jedoch bei virginen Weibchen sowohl für ACTH (Vehikel: 4.88 ± 1.07 -fach vs. Antagonist: 1.54 ± 0.24 -fach, $p<0.01$) als auch für Corticosteron (Vehikel: 3.16 ± 0.34 -fach vs. Antagonist: 1.52 ± 0.09 -fach, $p<0.05$) nach Applikation des OXT-Antagonisten geringer.

Bei Vehikel-behandelten trächtigen und laktierenden Ratten induzierte die Exposition auf der *plus-maze* keinen signifikanten Anstieg der Freisetzung von ACTH (trächtig: 1.58 ± 0.25 -fach, laktierend: 2.19 ± 0.41 -fach, $p<0.01$ vs. virgin) und Corticosteron (trächtig: 1.13 ± 0.14 -fach, laktierend: 1.84 ± 0.27 -fach, $p<0.01$ vs. virgin). Auch die Behandlung mit dem OXT-Antagonisten führte zu keiner weiteren Erhöhung der Plasmakonzentrationen von ACTH (trächtig: 1.10 ± 0.36 -fach, laktierend: 1.42 ± 0.08 -fach, $p<0.01$ vs. virgin) und Corticosteron (trächtig: 1.22 ± 0.18 -fach, laktierend: 1.38 ± 0.13 -fach, $p<0.01$ vs. virgin, Abb. 12). Nach *plus-maze*-Exposition waren die Plasmakonzentrationen von ACTH und Corticosteron sowohl bei trächtigen als auch laktierenden OXT-Antagonisten-

behandelten Ratten signifikant niedriger als bei Vehikel- oder Antagonist-behandelten virginen Weibchen ($p < 0.01$, Abb. 12).

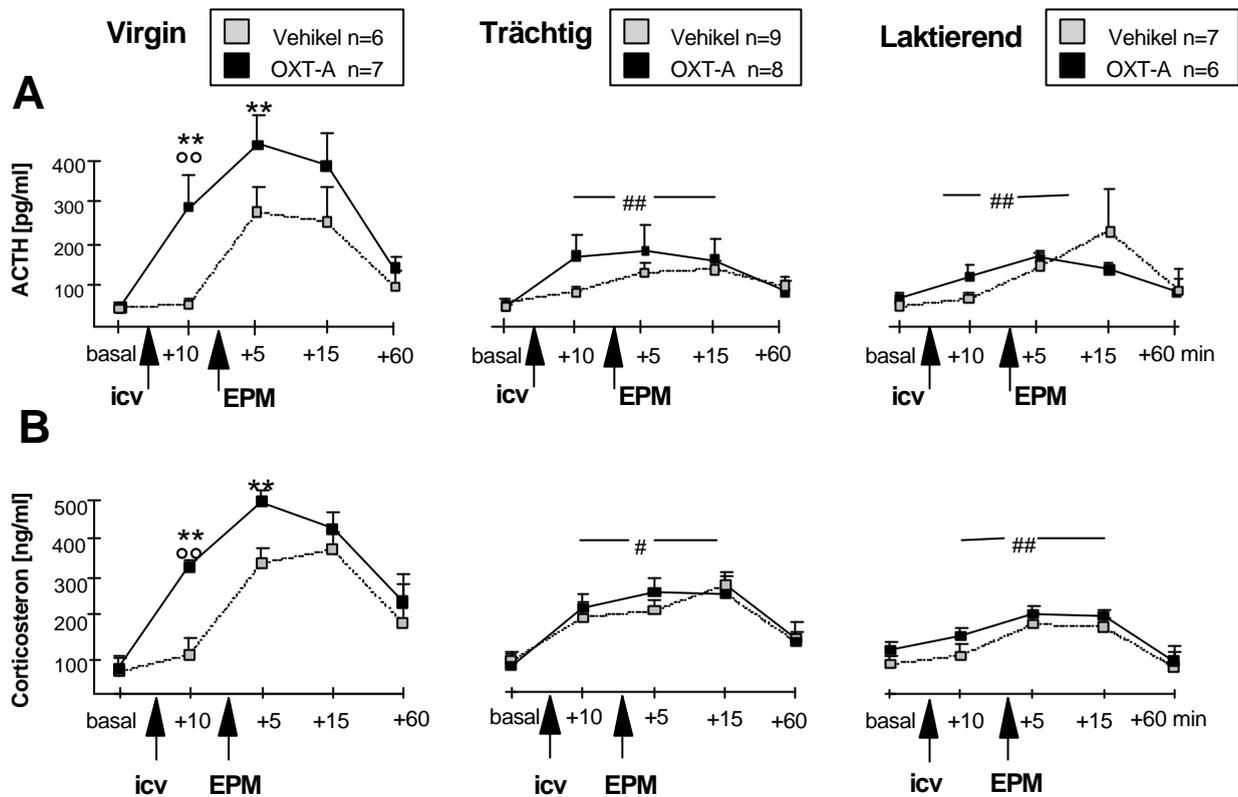


Abb. 12 Plasmakonzentrationen von ACTH (A) und Corticosteron (B) bei virginen, trächtigen (19./20. Trächtigkeitstag) und laktierenden (Laktationstage 6 bis 11) weiblichen Ratten, denen eine icv-Führungskanüle und ein Jugularvenenkatheter implantiert wurde. Je eine Blutprobe wurde unter basalen Bedingungen und 10 min nach icv-Infusion eines OXT-Antagonisten ($0.75 \mu\text{g}/5\mu\text{l}$, icv) oder Vehikel entnommen. Weitere Blutentnahmen folgten 5, 15 und 60 min nach einer 5 min-Testung auf der *elevated plus-maze* (EPM). Daten sind Mittelwerte + SEM. °° $p < 0.01$ vs. basal; ** $p < 0.01$ vs. Vehikel, # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$ vs. virgin

Effekte auf die periphere Freisetzung von OXT, 1. Versuchstag (plus-maze)

Die icv-Infusion des OXT-Rezeptor-Antagonisten beeinflusste deutlich die Freisetzung von OXT ins Blut in Abhängigkeit vom Reproduktionsstadium der Tiere (3-Weg ANOVA, Reproduktionsstadium x Behandlung x Zeit, $F_{6,117} 2.65$, $p = 0.019$).

Die basale (prä-Infusion) Plasmakonzentration von OXT war bei trächtigen Ratten signifikant höher als bei virginen und laktierenden Ratten ($p < 0.01$) und wurde weder bei virginen noch bei laktierenden Tieren durch die icv-Infusion des OXT-Antagonisten verändert. Im Gegensatz dazu war 10 min nach der Behandlung mit dem OXT-Antagonisten (post-Infusion) bei trächtigen Weibchen die Plasmakonzentration von OXT erhöht

(Antagonist: 1.33 ± 0.26 -fach, Vehikel: 1.02 ± 0.10 -fach, $p < 0.05$, Abb. 13). Bei keiner der untersuchten Gruppen induzierte die *plus-maze*-Exposition einen signifikanten Anstieg der Freisetzung von OXT. Nur bei den trächtigen, nicht aber den virginen oder laktierenden Tieren erhöhte die Behandlung mit dem OXT-Antagonisten die Freisetzung von OXT ins Blut nach *plus-maze*-Exposition (Vehikel: 1.23 ± 0.11 -fach vs. Antagonist: 1.42 ± 0.10 -fach, $p < 0.01$; $p < 0.01$ vs. post-Infusion, Abb. 13).

F

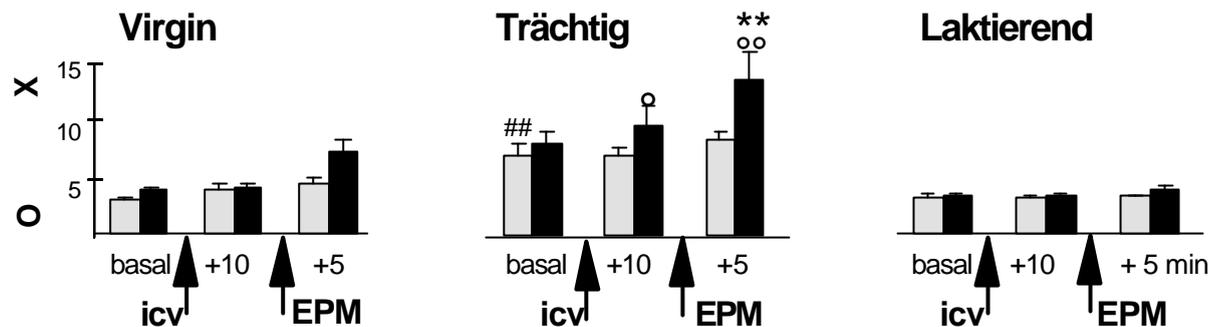


Abb. 13 Plasmakonzentrationen von Oxytocin (OXT) bei virginen, trächtigen und laktierenden Weibchen vor (basal) und 10 min nach icv-Infusion eines OXT-Antagonisten (OXT-A, $0.75 \mu\text{g}/5\mu\text{l}$) oder Vehikel ($5 \mu\text{l}$). Eine weitere Blutentnahme folgte 5 min nach der Testung auf der *elevated plus-maze* (EPM, 5 min). Daten sind Mittelwerte \pm SEM (Details und Anzahl der Tiere siehe Abb. 12). $^{\circ}$ $p < 0.05$, $^{\circ\circ}$ $p < 0.01$ vs. basal; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ vs. Vehikel, # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$ vs. virgin (2-Weg ANOVA)

Effekte des icv OXT-Antagonisten auf das angstbezogene Verhalten

Die icv-Infusion des OXT-Rezeptor-Antagonisten beeinflusste das angstbezogene Verhalten auf der *plus-maze* in Abhängigkeit vom Reproduktionsstadium der Weibchen (2-Weg ANOVA, Reproduktionsstadium x Behandlung; % Zeit: $F_{2,48} 3.54$, $p = 0.05$; % Eintritte: $F_{2,48} 2.55$, $p = 0.063$; Behandlung: $F_{1,48} 10.1$, $p = 0.0023$).

Nur bei trächtigen und laktierenden, nicht aber bei virginen Tieren erhöhte die Behandlung mit dem OXT-Antagonisten die Expression angstbezogenen Verhaltens auf der *plus-maze* (% Eintritte: trächtig und laktierend je $p < 0.05$ vs. Vehikel; % Zeit: trächtig $p < 0.01$, laktierend n.s. vs. Vehikel). Die lokomotorische Aktivität der Tiere (Eintritte in die geschlossenen Arme) war hingegen nach der Applikation des Antagonisten nicht verändert. Bei Vehikel-behandelten Weibchen zeigten sich keine Unterschiede im angstbezogenen Verhalten auf der *plus-maze* zwischen virginen, trächtigen und laktierenden Ratten (Abb. 14).

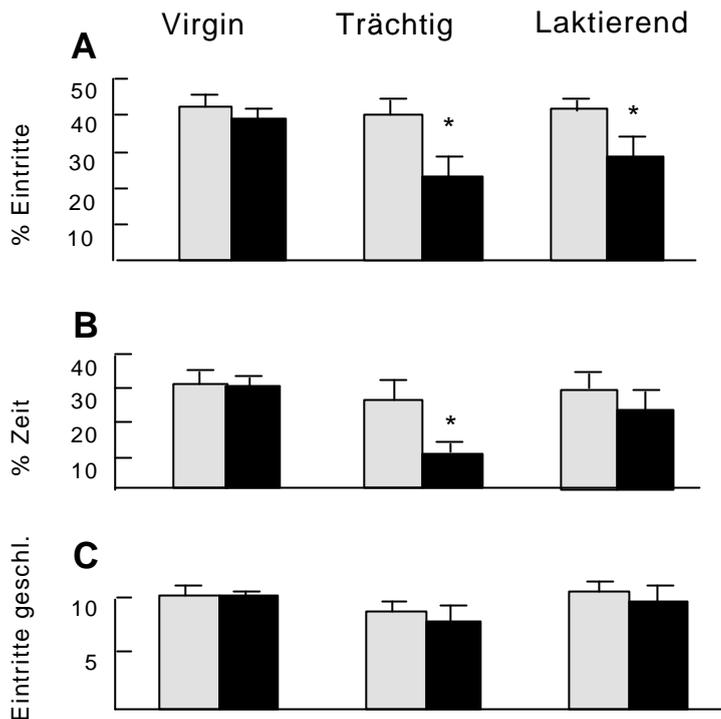


Abb. 14 Angstbezogenes Verhalten (**A**, **B**) und lokomotorische Aktivität (**C**) virginer (Vehikel n=9, Antagonist n=8), trächtiger (jeweils n=9) und laktierender (Vehikel n=9, Antagonist n=10) Weibchen auf der *elevated plus-maze* 10 min nach icv-Infusion von Vehikel (Ringerlösung, 5 μ l, graue Säulen) oder einem OXT-Antagonisten (OXT-A, 0.75 μ g/5 μ l, schwarze Säulen). (**A**) % Eintritte = Anzahl der Eintritte in die offenen Arme (**B**) % Zeit = auf den offenen Armen verbrachte Zeit (**C**) Anzahl der Eintritte in die geschlossenen Arme (Eintritte geschl.). Genaue Definitionen siehe Kap. 2.2.1. Daten sind Mittelwerte + SEM. * p<0.05 vs. Vehikel

Versuchsprotokoll (2. Versuchstag, Schwimmstreß)

Am 2. Versuchstag wurde bei virginen, trächtigen und laktierenden Weibchen die Aktivität der HPA-Achse vor einem komplexen physischen Stressor (Schwimmstreß, 60 s, 22°C) sowie 10 und 60 min danach unter Einfluß des icv OXT-Antagonisten untersucht. Am 6. post-operativen Tag (2. Versuchstag) wurden die Katheter wieder um 8.00 h angekoppelt, und die mit Vehikel oder OXT-Antagonist gefüllten und an eine 10 μ l-Spritze angeschlossenen icv-Infusionskanülen wurden in die Führungskanülen abgesenkt und dort befestigt. Um 10.00 h wurde eine 0.6 ml-Blutprobe (für ACTH, Corticosteron und OXT) entnommen, direkt danach wurde Vehikel (5 μ l) oder OXT-Antagonist (0.75 μ g/5 μ l) icv infundiert. Nach 10 min wurde eine weitere 0.6 ml-Blutprobe entnommen, der Katheter verschlossen und die Infusionskanüle entfernt. Nach 60 s Schwimmstreß wurden die Ratten abgetrocknet, in den Heimkäfig zurückgebracht und die Katheter wieder angekoppelt. Weitere Blutproben wurden 10 min (0.6 ml) und 60 min (0.2 ml, ACTH und Corticosteron) danach entnommen (Abb. 15).

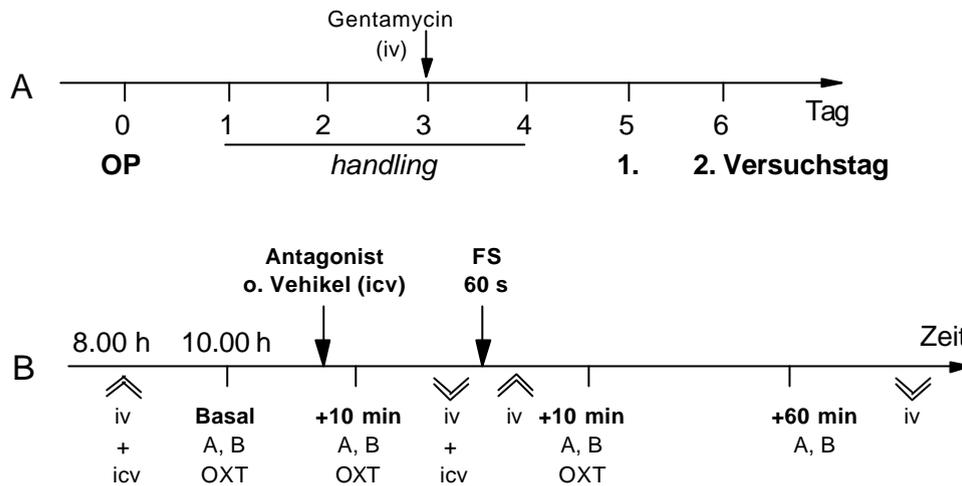


Abb. 15 Post-operativer Zeitraum (A) und 2. Versuchstag (B) mit Zeitplan für die Blutentnahmen für ACTH [A], Corticosteron [B] und Oxytocin [OXT], icv-Infusion des OXT-Antagonisten bzw. Vehikel, und Schwimmstreß-Exposition (FS). Doppelpfeile nach oben weisen auf die Zeitpunkte des Ankoppelns, Doppelpfeile nach unten auf die Zeitpunkte des Abkoppelns der Katheter (iv) bzw. der icv-Infusionskanülen (icv) hin.

Effekte auf die Aktivität der HPA-Achse, 2. Versuchstag (Schwimmstreß)

Auch am 2. Versuchstag beeinflusste die icv-Applikation des OXT-Rezeptor-Antagonisten signifikant die Aktivität der HPA-Achse in Abhängigkeit des Reproduktionsstadiums (3-Weg ANOVA, Reproduktionsstadium x Behandlung x Zeit: ACTH: $F_{6,153}$ 9.34, $p < 0.0001$, Corticosteron: $F_{6,153}$ 2.86, $p = 0.012$).

Bei den basalen (prä-Infusion) Plasmakonzentrationen von ACTH und Corticosteron gab es keine Gruppenunterschiede. Wie am 1. Versuchstag induzierte die icv-Applikation des OXT-Antagonisten bei virginen Weibchen einen deutlichen Anstieg der Freisetzung von ACTH und Corticosteron, verglichen mit basalen (prä-Infusion) Werten und mit der jeweiligen Vehikel-behandelten Kontrolle ($p < 0.01$, Abb. 16). Bei trächtigen und laktierenden Ratten war die basale Sekretion von ACTH und Corticosteron nach der icv-Infusion des OXT-Antagonisten erhöht, bei laktierenden Tieren erreichte dieser Unterschied auch statistische Signifikanz ($p < 0.01$ vs. basal prä-Infusion, $p < 0.05$ vs. Vehikel). Der prozentuale Anstieg (post-Infusion / basal prä-Infusion) von ACTH (virgin: 6.88 ± 0.98 -fach vs. laktierend: 3.02 ± 0.36 -fach, $p < 0.01$) und Corticosteron (virgin: 3.84 ± 0.27 -fach vs. laktierend: 2.03 ± 0.16 -fach, $p < 0.01$) wiederum war bei laktierenden Weibchen geringer (Abb. 16). Bei Vehikel-behandelten virginen Weibchen induzierte der Schwimmstreß einen Anstieg der Freisetzung von ACTH und Corticosteron ($p < 0.01$ vs. basal), der durch die Behandlung mit dem OXT-Antagonisten signifikant erhöht wurde ($p < 0.01$ vs. Vehikel). Der prozentuale Anstieg (post-Streß / post-Infusion) der Plasmakonzentrationen von ACTH (Vehikel: 4.32 ± 0.48 -fach vs. Antagonist: 1.94 ± 0.19 -fach) und Corticosteron (Vehikel: 2.48 ± 0.16 -fach

vs. Antagonist: 1.77 ± 0.18 -fach) war jedoch nach Applikation des OXT-Antagonisten - aufgrund der hohen post-Infusion Werte - geringer. Bei Vehikel-behandelten trächtigen und laktierenden Weibchen war der Streß-induzierte Anstieg der Freisetzung von ACTH und Corticosteron signifikant geringer als bei virginen Weibchen ($p < 0.01$ vs. virgin). Anders als bei virginen Weibchen verstärkte die Behandlung mit dem OXT-Antagonisten weder bei trächtigen noch bei laktierenden Weibchen die Streß-induzierte Freisetzung von ACTH und Corticosteron. So waren die Plasmakonzentrationen von ACTH und Corticosteron nach der Schwimmstreß-Exposition bei den Antagonist-behandelten trächtigen und laktierenden Weibchen signifikant geringer als bei Antagonist- oder Vehikel-behandelten virginen Weibchen ($p < 0.01$, Abb. 16). Der prozentuale Anstieg (post-Streß / post-Infusion) der Plasmakonzentrationen von ACTH (Vehikel: 4.34 ± 0.48 -fach vs. Antagonist: 1.93 ± 0.19 -fach) und Corticosteron (Vehikel: 2.54 ± 0.16 -fach vs. Antagonist: 1.82 ± 0.18 -fach) nach Applikation des OXT-Antagonisten war ebenfalls geringer bei trächtigen (ACTH: Vehikel: 2.11 ± 0.22 -fach vs. Antagonist: 1.43 ± 0.20 -fach, Corticosteron: Vehikel: 1.66 ± 0.21 -fach vs. Antagonist: 1.43 ± 0.17 -fach) und laktierenden (ACTH: Vehikel: 2.10 ± 0.22 -fach vs. Antagonist: 1.51 ± 0.20 -fach, Corticosteron: Vehikel: 1.79 ± 0.09 -fach vs. Antagonist: 1.28 ± 0.08 -fach) Weibchen.

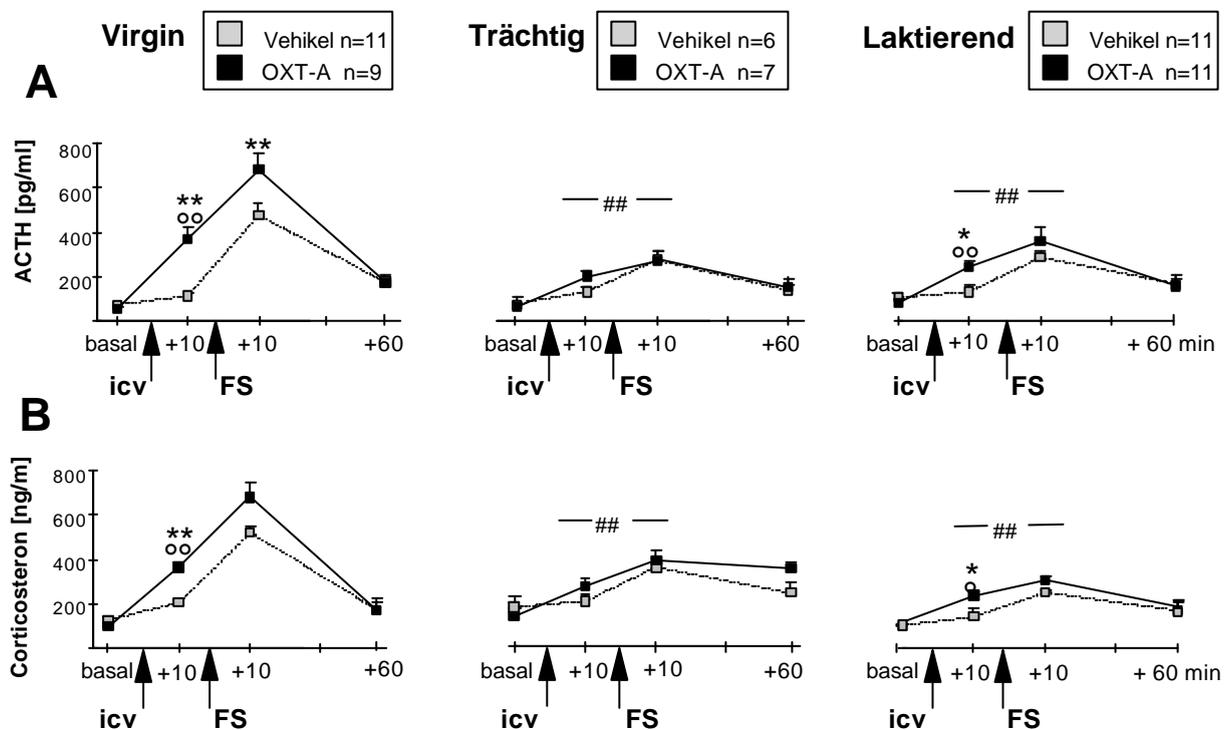


Abb. 16 Plasmakonzentrationen von ACTH (A) und Corticosteron (B) bei virginen, trächtigen (20./21. Trächtigkeitstag) und laktierenden (Tag 7-12) weiblichen Ratten. Je eine Blutprobe wurde unter basalen Bedingungen und 10 min nach icv-Infusion eines OXT-Antagonisten ($0.75 \mu\text{g}/5 \mu\text{l}$) oder Vehikel entnommen. Weitere Blutentnahmen

folgten 10 und 60 min nach Schwimmstreß (FS, 60 s, 22°C). Daten sind Mittelwerte + SEM. °° p<0.01 vs basal; * p<0.05, ** p<0.01 vs. Vehikel, ## p<0.01 vs. virgin
Effekte auf die periphere Freisetzung von OXT, 2. Versuchstag
(Schwimmstreß)

Auch am 2. Versuchstag beeinflusste die icv-Infusion des OXT-Rezeptor-Antagonisten signifikant die Freisetzung von OXT ins Blut in Abhängigkeit vom Reproduktionsstadium der Tiere (3-Weg ANOVA, Reproduktionsstadium x Behandlung x Zeit: $F_{4,86}$ 1.50, $p=0.20$, Reproduktionsstadium x Zeit: $F_{4,86}$ 7.00, $p<0.0001$, Abb. 17).

Die basale (prä-Infusion) Plasmakonzentration von OXT war bei trächtigen Ratten signifikant höher als bei virginen und laktierenden Ratten ($p<0.01$). Der Schwimmstreß führte nur bei Vehikel-behandelten virginen, nicht aber bei trächtigen oder laktierenden Weibchen zu einer Erhöhung der OXT-Freisetzung ins Blut (2.43 ± 0.20 -fach, $p<0.01$ vs. basal). Die icv-Infusion des OXT-Antagonisten beeinflusste deutlich die Freisetzung von OXT ins Blut von laktierenden (2-Weg ANOVA, Behandlung x Zeit: $F_{2,28}$ 3.21, $p=0.05$) und trächtigen ($F_{2,26}$ 4.83, $p=0.017$), nicht aber bei virginen ($F_{2,26}$ 0.089, $p=0.91$) Weibchen. Während die basale Freisetzung von OXT nach der Antagonist-Behandlung unverändert blieb, war der Streß-induzierte Anstieg von OXT bei trächtigen (Vehikel: 1.10 ± 0.16 -fach vs. Antagonist: 1.89 ± 0.30 -fach, $p<0.05$) und laktierenden Ratten (Vehikel: 1.23 ± 0.10 -fach vs. Antagonist: 1.92 ± 0.20 -fach, $p<0.01$, Abb. 17) erhöht.

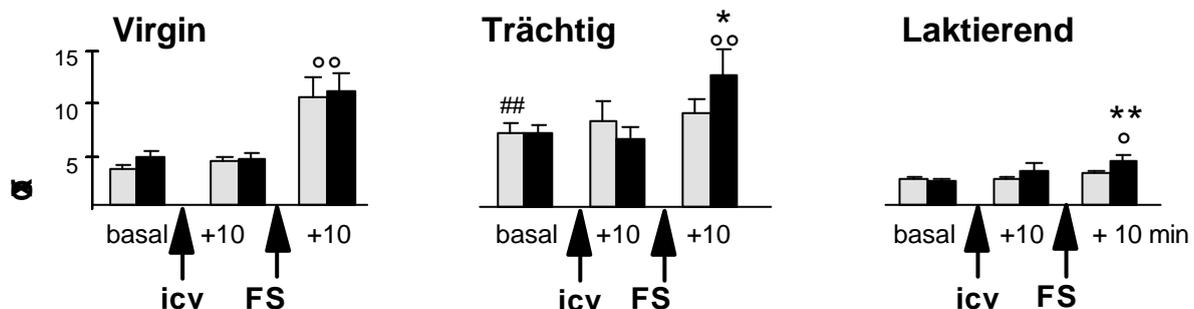


Abb. 17 Plasmakonzentrationen von Oxytocin (OXT) bei virginen, trächtigen und laktierenden Weibchen vor (basal) und 10 min nach icv-Infusion eines OXT-Antagonisten (OXT-A, 0.75 µg/5 µl) oder Vehikel (5 µl). Eine weitere Blutentnahme erfolgte 10 min nach Schwimmstreß (FS, 22 °C, 60s). Daten sind Mittelwerte ± SEM (Details und Anzahl der Tiere siehe Abb. 16). ° p<0.05, °° p<0.01 vs. basal; * p<0.05, ** p<0.01 vs. Vehikel, # p<0.05, ## p<0.01 vs. virgin

3.2 Suppression der hypothalamo-adenohypophysär-adrenocortical en Achse während der peripartalen Periode: Beteiligung endogener Opiate

3.2.1 Trächtigkeit

Versuchsprotokoll

Trächtigen (17./18. Trächtigkeitstag) und virginen Sprague Dawley Ratten wurde ein Jugularvenenkatheter implantiert (Silikon ID 0.50 mm, OD 0.75 mm, Alton, Grossbritannien) welcher mit heparinierter Saline gefüllt wurde. Bis zum Versuchstag wurden die Tiere einzeln gehalten und täglich an die Prozedur der Blutentnahme gewöhnt. Am 3. oder 4. post-operativen Tag (21. Trächtigkeitstag) wurden die Katheter um 8.00 h an 1 ml-Plastikspritzen (gefüllt mit heparinierter Saline) gekoppelt und eine 2 h-Ruhephase folgte. Anschließend wurde die neuroendokrine Sekretion bei virginen und trächtigen Ratten unter Basalbedingungen, nach NLX und nach Schwimmstreß (19 °C, 90 s) bestimmt. Um 09.30 h und 10.00 h wurden zwei Blutproben (0.2 ml für ACTH und Corticosteron bzw. 0.6 ml für ACTH, Corticosteron, OXT und AVP) unter basalen Bedingungen entnommen. Danach wurde NLX (5 mg/kg, 0.5 ml/kg) oder Vehikel iv appliziert. Weitere Blutentnahmen folgten 5 min (0.6 ml) und 15 min (0.2 ml) später. Danach wurden die Ratten dem Schwimmstreß ausgesetzt und weitere Blutproben 5, 15 und 60 min nach Zurücksetzen der Tiere in den Käfig entnommen (0.6 ml, Abb. 18).

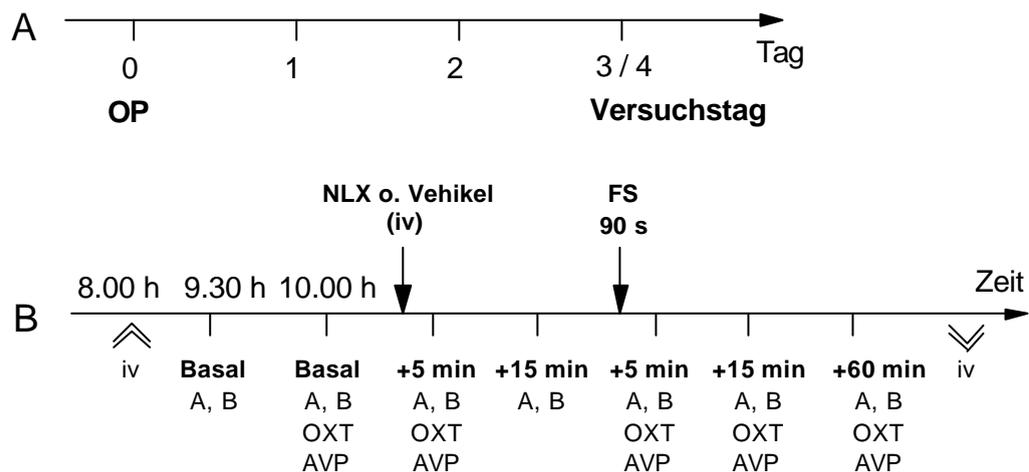


Abb. 18 Post-operativer Zeitraum (A) und Versuchstag (B) mit Zeitplan für die Blutentnahmen für ACTH [A], Corticosteron [B], Oxytocin [OXT] und Vasopressin [AVP]. Die iv-Infusion des Opiat-Antagonisten Naloxon (NLX) bzw. Vehikel erfolgte ca. 30-40 min vor Schwimmstreß-Exposition (FS). Doppelpfeile nach oben weisen auf die Zeitpunkte des Ankoppelns, Doppelpfeile nach unten auf die Zeitpunkte des Abkoppelns des Katheters (iv) hin.

Aktivität der HPA-Achse während der Trächtigkeit, Effekte von NLX

Die basalen Plasmakonzentrationen von ACTH und Corticosteron unterschieden sich nur wenig zwischen Vehikel-behandelten virginen und trächtigen Ratten. In allen Gruppen induzierte der Schwimmstreß einen signifikanten Anstieg der Plasmakonzentration von ACTH und Corticosteron nach 5 min ($p < 0.01$ vs. basal, Abb. 19). Nach 15 min ging die ACTH-Freisetzung wieder auf basale Werte zurück, wohingegen Corticosteron zu diesem Zeitpunkt ein Maximum erreichte. Bei Vehikel-behandelten trächtigen Ratten war die ACTH- und Corticosteron-Freisetzung 5 min nach der Schwimmstreß-Exposition signifikant geringer als bei Vehikel-behandelten virginen Ratten ($p < 0.05$). Dagegen wurden 15 min nach Schwimmstreß keine Unterschiede in den Plasmakonzentrationen von ACTH und Corticosteron zwischen Vehikel-behandelten trächtigen und virginen Ratten gefunden. Die Freisetzung von ACTH und Corticosteron war bei virginen Tieren 60 min nach dem Schwimmstreß zurückgegangen ($p < 0.05$ vs. 5 und 15 min), wohingegen bei trächtigen Ratten keine Reduktion der Werte erfolgte ($p < 0.01$ vs. virgin).

Die NLX-Behandlung hatte bei virginen und trächtigen Ratten keinen Effekt auf die basale ACTH- und Corticosteron-Freisetzung (Abb. 19). Die Freisetzung von ACTH 5 min nach Schwimmstreß wurde bei virginen Ratten durch NLX-Applikation signifikant vermindert ($p < 0.05$ vs. alle anderen Gruppen), wohingegen NLX in trächtigen Ratten keinen Effekt auf die Schwimmstreß-induzierte ACTH Sekretion hatte. Während die Streß-induzierte Freisetzung von Corticosteron bei virginen Ratten durch NLX-Applikation nicht signifikant verändert wurde, induzierte NLX bei trächtigen Ratten eine Erhöhung ($p < 0.05$). Die NLX-Behandlung hatte keinen Effekt auf die Plasmakonzentrationen von ACTH und Corticosteron 60 min nach Schwimmstreß.

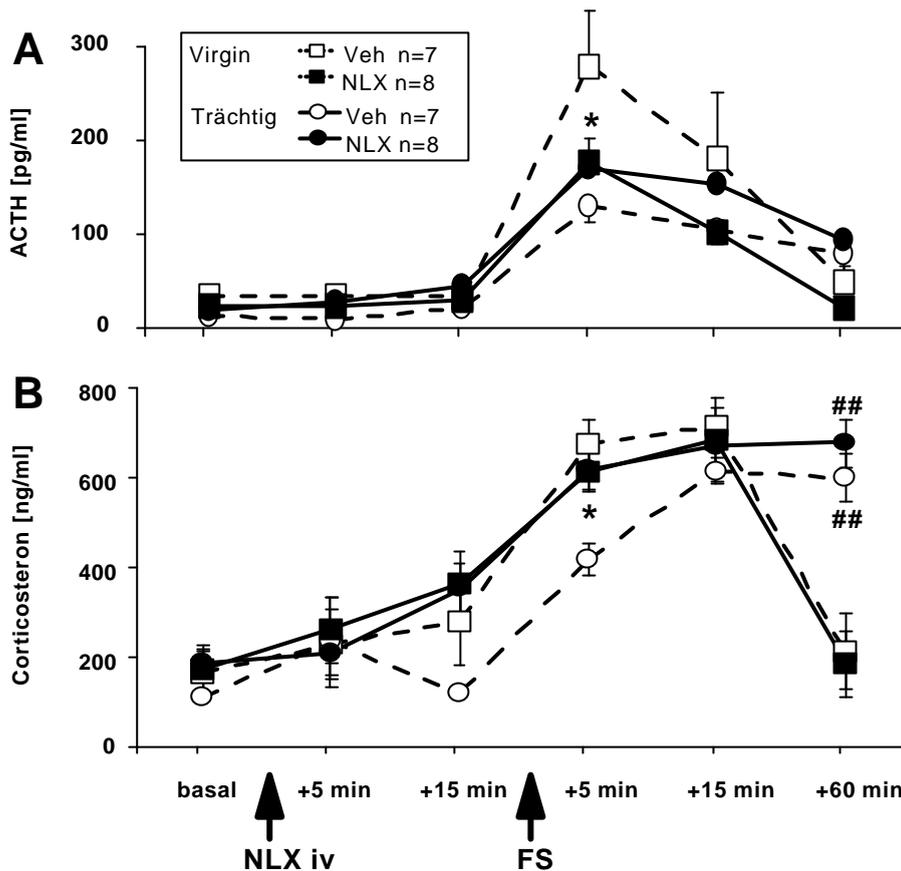


Abb. 19 Plasmakonzentrationen von ACTH (A) und Corticosteron (B) bei virginen und trächtigen (21. Trächtigkeitstag) Ratten. Nach der Entnahme von 2 basalen Blutproben (basaler Wert ist der Mittelwert von beiden) wurde den Tieren Vehikel oder Naloxon (NLX, 5mg/kg, 0.5 ml/kg, iv) injiziert. 5 und 15 min nach der Injektion sowie 5, 15 und 60 min nach Schwimmstreß (FS, 90 s, 19 °C) folgten weitere Blutentnahmen. Daten sind Mittelwerte \pm SEM. * $p < 0.05$ vs. Vehikel, ## $p < 0.01$ vs. virgin

Aktivität des hypothalamo-neurohypophysären Systems während der Trächtigkeit, Effekte von NLX

Die basalen Plasmakonzentrationen von OXT unterschieden sich nicht zwischen Vehikel-behandelten virginen und trächtigen Ratten. Die Schwimmstreß-Exposition bewirkte einen signifikanten Anstieg der Plasmakonzentration von OXT nach 5 min ($p < 0.01$ vs. basal, Abb. 20). Nach 15 min war die Freisetzung von OXT wieder auf basale Werte zurückgegangen. Weder 5 noch 15 min nach der Stressor-Exposition zeigten sich Unterschiede zwischen Vehikel-behandelten virginen und trächtigen Ratten. Die NLX-Behandlung steigerte die basale Freisetzung von OXT nur bei trächtigen Ratten ($p < 0.05$, Abb. 20), wohingegen der Anstieg bei virginen Tieren keine Signifikanz erreichte. Die Streß-induzierte Freisetzung von OXT nach 5 min wurde bei trächtigen (Vehikel: 1.88 ± 0.35 -facher Anstieg, NLX: 6.25 ± 0.88 -fach vs. prä-Streß), nicht jedoch bei virginen Ratten (Vehikel: 4.62 ± 2.00 -

fach, NLX: 2.61 ± 0.90 -fach vs. prä-Streß) durch NLX Applikation erhöht ($p < 0.01$ vs. Vehikel). Bei den NLX-behandelten Ratten waren die Plasmakonzentrationen von OXT noch 15 min nach Schwimmstreß-Exposition erhöht, wohingegen sie bei NLX-behandelten virginen Ratten auf basales Niveau zurückgegangen waren (Abb. 20).

Im Gegensatz zu OXT, blieben die Plasmakonzentrationen von AVP über die gesamte Versuchsdauer und in jeder Gruppe unverändert (Abb. 20).

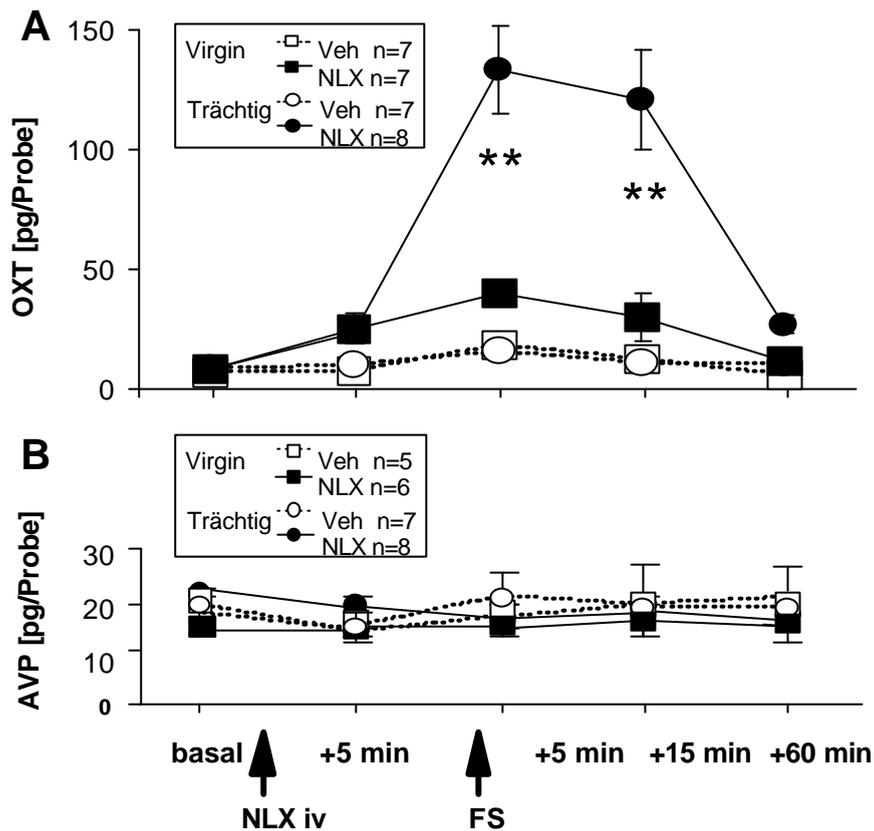


Abb. 20 Plasmakonzentrationen von OXT (A) und AVP (B) bei virginen und trächtigen (21. Trächtigkeitstag) Ratten. Nach der Entnahme einer basalen Blutprobe wurde den Tieren Vehikel oder Naloxon (NLX, 5mg/kg, 0.5 ml/kg, iv) injiziert. 5 min nach der Injektion sowie 5, 15 und 60 min nach Schwimmstreß (FS, 90 s, 19 °C) folgten weitere Blutentnahmen. Daten sind Mittelwerte \pm SEM. ** $p < 0.01$ vs. Vehikel

3.2.2 Geburt

Versuchsprotokoll

Trächtigen Ratten (17. Trächtigkeitstag, 320-380 g) wurde ein Jugularvenenkatheter implantiert. Bis zum 1. möglichen Geburtstermin (22. Trächtigkeitstag) wurden die Tiere einzeln gehalten und täglich an die Prozedur der Blutentnahme gewöhnt. Um 8.00 h des 22. Trächtigkeitstags (erst möglicher Geburtstermin, 5. post-operativer Tag, Abb. 21) wurden

die Katheter angekoppelt und die Ratten blieben 90 min lang ungestört. Ab 9.30 h bis 20.00 h oder bis zum Beginn des Geburtsvorganges erfolgten zur Bestimmung basaler Plasmakonzentrationen von ACTH und Corticosteron (1.5 h-Intervalle) bzw. OXT und Laktat (3 h-Intervalle) Blutentnahmen von 0.6 ml (OXT, ACTH und Corticosteron), 0.3 ml (ACTH, Corticosteron und Laktat) oder 0.2 ml (ACTH, Corticosteron, Abb. 21). Direkt nach Geburt des zweiten Jungen wurde eine 0.6 ml-Blutprobe entnommen und anschließend NLX (5 mg/kg, 1 ml/kg, n=6) oder Vehikel (1 ml/kg 0.9 % NaCl-Lösung, n=9) iv injiziert. Während der folgenden 60 min wurden aufeinanderfolgende Blutproben in Intervallen von 10 min (ACTH, Corticosteron) oder 20 min (OXT) entnommen (Abb. 21). Die Plasmakonzentration von Laktat wurde 30 min nach Geburt des zweiten Jungen bestimmt. Weitere Blutproben (ACTH, Corticosteron) wurden in 30 min-Abständen zwischen der 60. und der 150. min nach Geburt des zweiten Jungen entnommen. Um mögliche Effekte von hohem Blutverlust (Hämorrhagie) zu vermeiden, wurde den Tieren in 3 h-Abständen (vor der Geburt) bzw. 60 min nach Geburt des zweiten Jungen (direkt nach der Blutentnahme) jeweils 1.0 ml frisch entnommenes Spenderblut über den Katheter infundiert (Abb. 21).

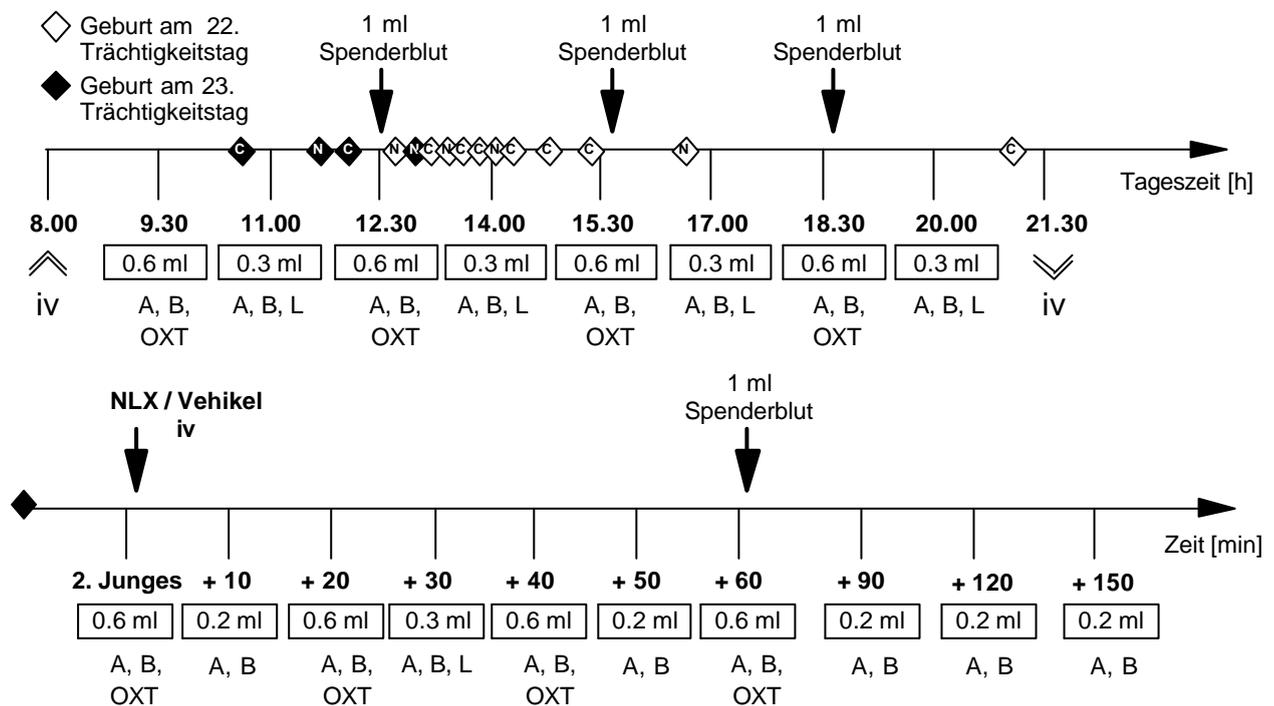


Abb. 21 Zeitpunkte und Volumina der Blutentnahmen vor und während Geburt. Plasmakonzentrationen von ACTH [A], Corticosteron [B], Oxytocin [OXT] und Laktat [L] wurden zu den bezeichneten Zeitpunkten bestimmt. Die Rauten zeigen die ungefähre Anfangszeit der Niederkunft (Geburt des zweiten Jungen) bei Ratten, die mit Vehikel (C) oder Naloxon (N) am 22. (weiße Rauten) oder 23. (Schwarze Rauten) Trächtigkeitstag gebären.

Während der ersten 60 min des Geburtsvorganges wurden die Tiere kontinuierlich observiert und folgende Parameter wurden aufgezeichnet: Wehen, einzelne Geburtszeitpunkte, mütterliches Verhalten einschließlich Plazentophagie, Lecken und Gruppieren der Jungen. Zudem wurde die Überlebensrate der Jungtiere am 1. postnatalen Tag ermittelt. Bei Weibchen, die nicht am 22. Trächtigkeitstag gebären, wurden die Katheter um 21.30 h verschlossen und am nächsten Tag um 8.00 h wieder angeschlossen, worauf das gleiche Versuchsschema folgte wie am ersten Tag.

Aktivität der HPA-Achse vor und während Geburt, Effekte von NLX

Bei Weibchen, die am 23. Trächtigkeitstag gebären (n=5), war noch am Vortag (22. Trächtigkeitstag) ein circadianer Rhythmus der Aktivität der HPA-Achse vorhanden. Von 9.30 h bis 14.00 h waren die Plasmakonzentrationen von ACTH und Corticosteron niedrig und stiegen dann kontinuierlich bis zur letzten Blutentnahme um 20.00 h an (Abb. 22).

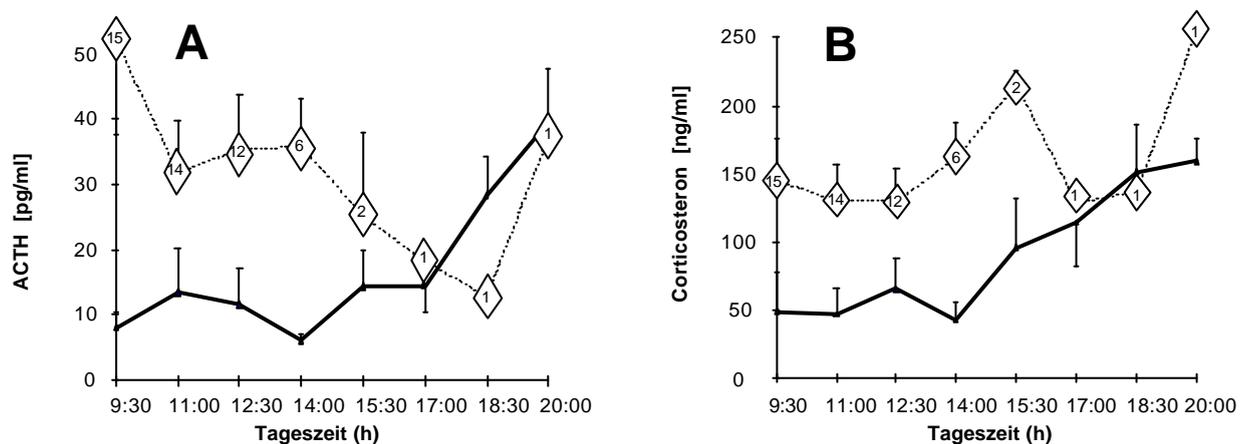


Abb. 22 Circadianer Rhythmus der basalen Plasmakonzentrationen von ACTH (**A**) und Corticosteron (**B**) bei trächtigen Ratten zwischen 9.30 h und 20.00 h am Tag vor (hier 22. Trächtigkeitstag, durchgezogene Linie, n=5) und am Tag der Geburt (unterbrochene Linien, Anzahl der Tiere ist innerhalb der Rauten angegeben). Daten sind Mittelwerte + SEM.

Am Tag der Geburt (22. oder 23. Trächtigkeitstag) war die Aktivität der HPA-Achse ganztägig auf einem sehr hohen Niveau (Abb. 23), zeigte jedoch einen Abfall der Plasmakonzentrationen von ACTH (1-Weg ANOVA, Faktor Zeit: $F_{4,120}$ 61.3, $p < 0.0001$) und Corticosteron (Faktor Zeit: $F_{4,148}$ 71.1, $p < 0.0001$) in den letzten 4-5 h vor der Geburt (n=15, beide Hormone: $p < 0.01$ basal-3 vs. letzte basale, Abb. 23). Der Beginn des Geburtsvorganges ging mit einer weiteren Absenkung der ACTH- und Corticosteron-Freisetzung einher (n=15, beide Hormone: $p < 0.01$ zweites Junges vs. letzte basale; Abb. 23).

Bei Vehikel-behandelten Tieren blieben die Plasmakonzentrationen von ACTH (Faktor Zeit: $F_{13,390}$ 101, $p < 0.0001$) und Corticosteron (Faktor Zeit: $F_{13,481}$ 108, $p < 0.0001$) bis zum Versuchsende niedrig ($n=9$, beide Hormone: $p < 0.01$ während Geburt vs. basal-3, basal-2 und letzte basale; Abb. 23), unabhängig von der Tageszeit der Geburt (Abb. 24) und den einzelnen Geburtszeitpunkten (1 repräsentatives Tier, Abb. 25). Bei NLX-behandelten Tieren hingegen induzierte der Geburtsvorgang einen Anstieg der Aktivität der HPA-Achse (2-Weg ANOVA, Faktoren Behandlung x Zeit: ACTH: $F_{13,169}$ 6.87, $p < 0.0001$; Corticosteron: $F_{13,169}$ 4.31, $p < 0.0001$). Die Plasmakonzentration von ACTH stieg 20 min nach Geburt des zweiten Jungen (sowie NLX Injektion) signifikant an und blieb die folgenden 50 min auf hohem Niveau ($p < 0.01$ vs. Vehikel; Abb. 23). Ebenso war die Freisetzung von Corticosteron 10-50 min nach NLX erhöht ($p < 0.01$ vs. Vehikel, Abb. 23). 90 min nach NLX-Applikation - in den meisten Fällen nach der Geburt des letzten Jungen - waren die Plasmakonzentrationen beider Hormone wieder auf dem Niveau der Kontrolltiere. Auch bei NLX-behandelten Tieren war der Aktivitätsverlauf der HPA-Achse unabhängig von der Tageszeit der Geburt (Abb. 24) und den einzelnen Geburtszeitpunkten (1 repräsentatives Tier, Abb. 25).

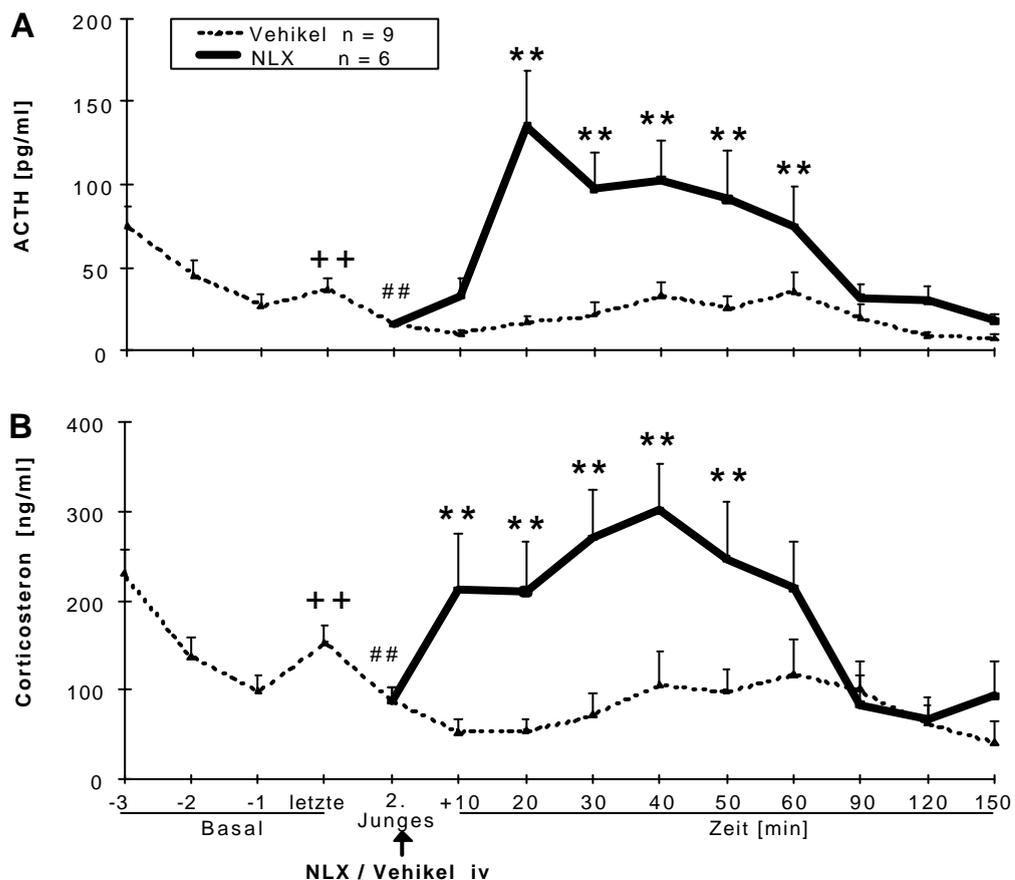


Abb. 23 Plasmakonzentrationen von ACTH (A) und Corticosteron (B) bis zu 5 Stunden vor bzw. während der Geburt. Nach Geburt des 2. Junges und Blutentnahme, wurde Vehikel (1 ml/ kg, iv) oder Naloxon (NLX, 5 mg/ kg, 1 ml/kg, iv) injiziert. Daten sind Mittelwerte + SEM. ++ $p < 0.01$ vs. basal-3, ## $p < 0.01$ vs. letzte basale (1-Weg ANOVA); ** $p < 0.01$ vs. Vehikel (2-Weg ANOVA)

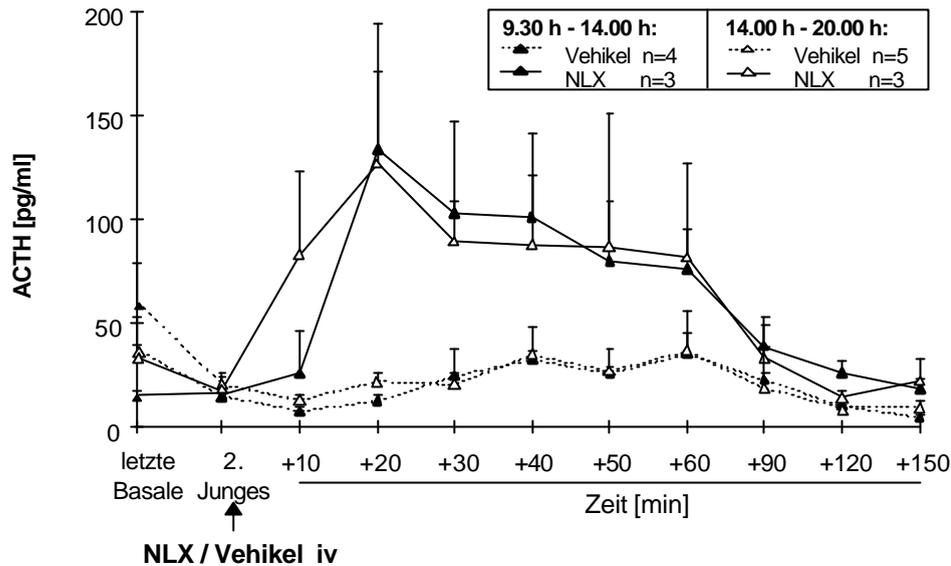


Abb. 24 Plasmakonzentrationen von ACTH unmittelbar vor (letzte basale) und während Geburt bei Ratten, die zwischen 9.00 h und 14.00 h (gefüllte Symbole) oder zwischen 14.00 h und 21.30 h (leere Symbole) niederkamen. Nach Geburt des 2. Jungen und Blutentnahme wurde Vehikel (1 ml/kg) oder Naloxon (NLX, 5 mg/kg, 1 ml/kg) iv injiziert. Daten sind Mittelwerte + SEM.

Aktivität der HPA-Achse bei aberrantem Geburtsverlauf

Zwei der Versuchstiere zeigten deutliche Abweichungen im Geburtsverlauf und wurden deshalb von der statistischen Analyse ausgeschlossen. Beide Ratten wiesen Anzeichen verlängerter Wehenphasen vor der Geburt (180 min Presswehen, Abb. 25 C) bzw. zwischen der Geburt des ersten und des zweiten Jungen (63 min Presswehen, Abb. 25 D) auf. Bei diesen Tieren trat, gegenteilig zur oben beschriebenen Suppression der Aktivität der HPA-Achse, ein Anstieg der ACTH-Freisetzung vor der Geburt des zweiten Jungen auf. Da beide Tiere mit NLX behandelt wurden, konnte der weitere Verlauf der HPA-Achsen-Aktivität nicht unter Kontrollbedingungen beobachtet werden.

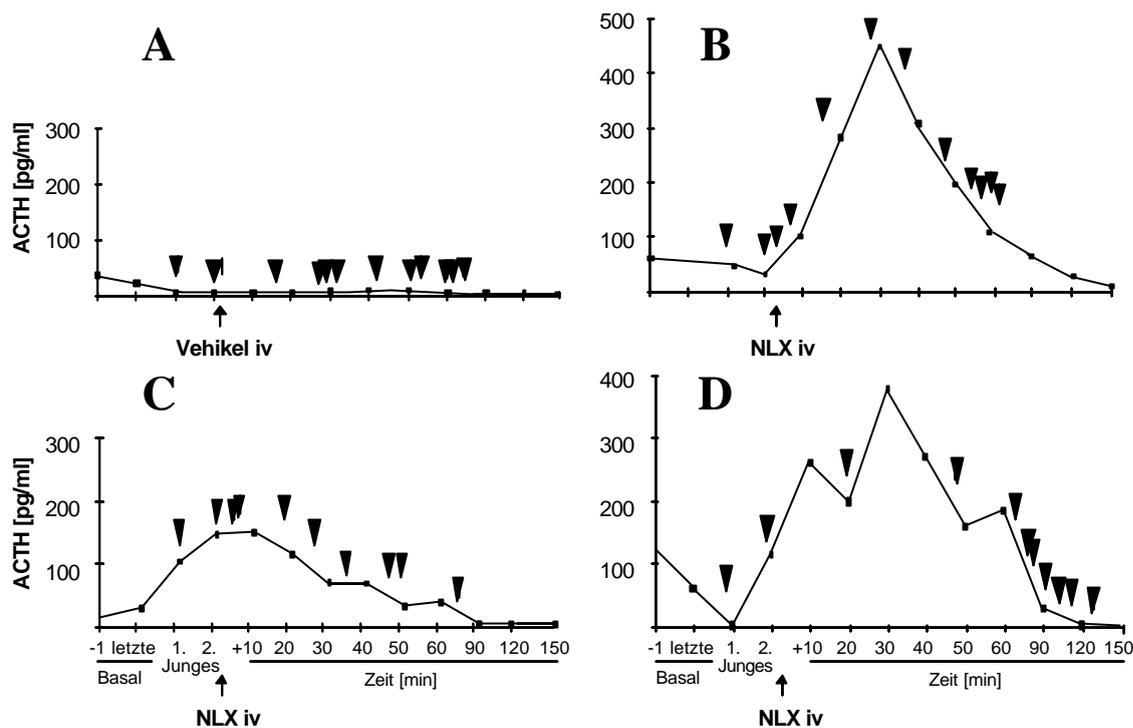


Abb. 25 Repräsentative Beispiele für die Freisetzung von ACTH in Relation zu den einzelnen Geburtszeitpunkten (Pfeilköpfe) bei Vehikel (A)- oder Naloxon (NLX, B)-Behandlung. (C) und (D) zeigen die Plasmakonzentrationen von ACTH bei zwei Ratten mit starken Abweichungen im Geburtsprozess. Anzeichen starker Wehen konnten bei (C) 180 min vor Geburt des ersten Jungen und bei (D) für eine Dauer von 63 min zwischen Geburt des ersten und des zweiten Jungen beobachtet werden.

Freisetzung von OXT vor und während Geburt, Effekte von NLX

Bei den Ratten, die am 23. Trächtigkeitstag gebären (n=5) war am Vortag (22. Trächtigkeitstag) kein circadianer Rhythmus der Freisetzung von OXT vorhanden, da die Plasmakonzentrationen von OXT um 9.30 h (11.0 ± 1.11 pg/ml), 12.30 h (13.2 ± 1.56 pg/ml), 15.30 h (11.7 ± 0.88 pg/ml) und 18.30 h (11.7 ± 1.22 pg/ml) keine Unterschiede zeigten. Am Tage der Geburt gab es ebenfalls keine Veränderungen der basalen OXT-Niveaus (9.30 h - 12.30 h: zwischen 7.50 und 15.5 pg/ml, 15.30 h - 18.30 h: zwischen 7.50 und 12.5 pg/ml).

Der Beginn des Geburtsvorganges, d.h. die Geburt der ersten beiden Jungen, ging mit einer Erhöhung der OXT-Freisetzung einher (1-Weg ANOVA, Zeit: $F_{4,44}$ 15.7, $p < 0.0001$, Abb. 26), die bis zu 60 min anhielt ($p < 0.01$ vs. basal). Die NLX-Behandlung nach der Geburt des zweiten Jungen induzierte, verglichen mit Kontrolltieren, eine weitere Erhöhung der OXT-Freisetzung (2-Weg ANOVA, Behandlung x Zeit: $F_{4,56}$ 4.79, $p < 0.001$). Die Plasmakonzentration von OXT stieg 20 min nach Geburt des zweiten Jungen (sowie NLX-Injektion) verstärkt an (1.40-fach vs. Vehikel, $p < 0.01$) und blieb bis 60 min danach auf hohem Niveau ($p < 0.01$ vs. Vehikel; Abb. 26). Sowohl bei Vehikel- als auch NLX-

behandelten Tieren erfolgte der Geburts-induzierte Anstieg der OXT-Freisetzung unabhängig von der Tageszeit der Geburt und den einzelnen Geburtszeitpunkten (Daten nicht gezeigt).

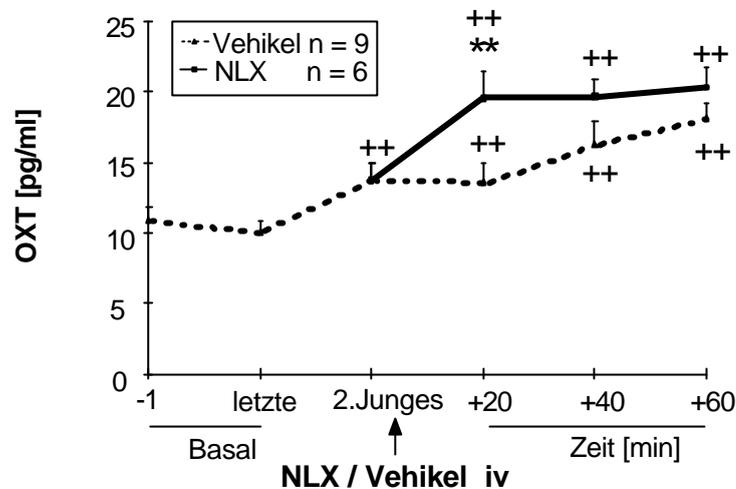


Abb. 26 Plasmakonzentrationen von OXT vor und während Geburt bei Ratten, denen nach Geburt des zweiten Jungen Vehikel (1 ml/kg.) oder Naloxon (NLX, 5 mg/kg, 1 ml/kg) iv injiziert wurde. Daten sind Mittelwerte + SEM. ++ $p < 0.01$ vs. basal (1-Weg ANOVA); ** $p < 0.01$ vs. Vehikel (2-Weg ANOVA)

Freisetzung von Laktat vor und während Geburt, Effekte von NLX

Die Plasmakonzentrationen von Laktat zeigten sowohl bei Behandlung mit Vehikel (basal: 0.82 ± 0.12 , +30 min: 1.84 ± 0.43 mmol/l) als auch nach NLX (basal: 1.01 ± 0.10 , +30 min: 1.46 ± 0.27 mmol/l) einen signifikanten Anstieg durch die Geburt, welcher jedoch unabhängig von der Behandlung war (2-Weg ANOVA, Faktor Behandlung: $F_{1,12}$ 0.10, $p=0.76$; Zeit: $F_{1,12}$ 7.12, $p=0.021$, Interaktion: $F_{1,12}$ 1.06, $p=0.33$).

Effekt von NLX auf den Geburtsverlauf und das mütterliche Verhalten

Die Geburtsintervalle zeigten keinen Unterschied zwischen Vehikel- und NLX-behandelten Tieren (Abb. 27). Auch das mütterliche Verhalten (Plazentophagie, Lecken und Gruppieren der Jungen; Daten nicht gezeigt) sowie die Überlebensrate der Jungen (Vehikel: 93 %, NLX: 90 %) wurde durch die NLX-Gabe nicht verändert.

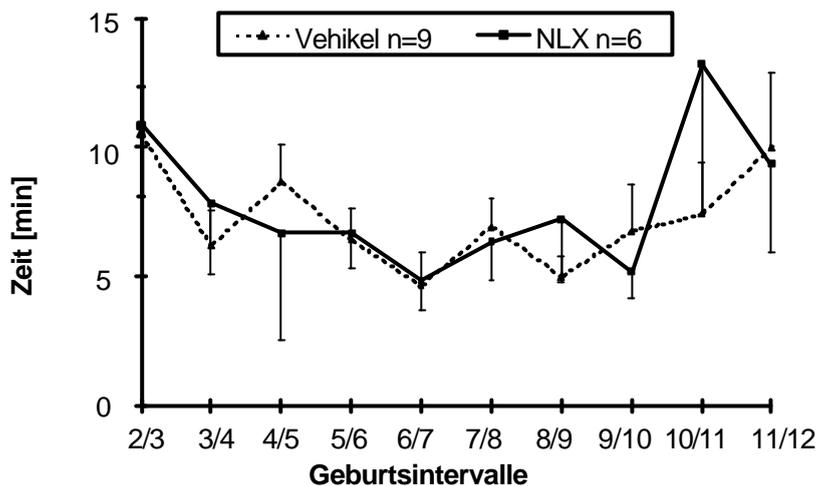


Abb. 27 Geburtsintervalle bei Ratten, denen Vehikel oder Naloxon (NLX) nach Geburt des zweiten Jungen iv injiziert wurde (Details siehe Legende zu Abb. 23). Daten sind Mittelwerte +/- SEM.

3.3 Regulation des zentralen oxytocinergen Systems durch endogene Opiate: Modifikationen während der Trächtigkeit

Versuchsprotokoll

In diesem Experiment wurde die basale und Streß-induzierte Freisetzung von OXT und AVP im Hypothalamus von virginen und trächtigen (18.-21. Trächtigkeitstag) weiblichen Wistar-Ratten sowie der Einfluß endogener Opiate untersucht. Hierzu wurde den Tieren eine Mikrodialyse-Sonde in den rechten PVN oder SON implantiert. Am 3. postoperativen Tag um 8.00 h wurden die Dialysesysteme an die Mikroinfusions-Pumpe angeschlossen. Während einer 2 h-Ruhephase wurden die Mikrodialyse-Systeme gespült (3.3 µl/min, sterile Ringerlösung, pH 7.4), um ein Equilibrium zwischen dem Dialysemedium und der Extrazellulärflüssigkeit einzustellen. Darauf folgten 6 Dialyseperioden (jeweils 30 min) an deren Ende die Sammelgefäße (1.5 ml Eppendorf-Tubes mit 10 µl 0.1 N HCl zur Proteasehemmung beschickt) gewechselt wurden. Zu Beginn wurden 3 basale 30 min-Dialysate (jeweils 100 µl) unter ungestörten Bedingungen gesammelt. Zu Beginn der 4. Sammlerperiode, 2 min nach sc-Injektion von NLX (5 mg/kg, 0.5 ml/kg) oder Vehikel (0.5 ml/kg), wurden die Tiere unter kontinuierlicher Dialyse einem 10 min-Schwimmstreß (19°C, Aufzeichnung der Dauer von *struggling*) ausgesetzt, abgetrocknet und zurück in den Käfig gesetzt. Die Dialysate Nr. 5 und 6 folgten unter ungestörten Bedingungen (Abb. 28).

Zusätzlich zur histologischen Kontrolle wurde am nächsten Tag bei allen Tieren eine funktionelle Kontrolle der Lokalisation der Mikrodialyse-Sonde durchgeführt. Hierzu

wurden die Dialysesysteme am 4. post-operativen Tag um 8.00 h an die Mikroinfusions-Pumpe angeschlossen und 2 h lang gespült (s.o.). Darauf folgten 2 basale 30 min-Dialysate (Nr. 7 und 8) unter ungestörten Bedingungen. Beim 9. Dialysat wurde das Dialysemedium durch eine hypertone Lösung (1 M NaCl in Ringerlösung, pH 7.4) ersetzt. Durch die Erhöhung der Na⁺- und Cl⁻-Ionenkonzentration in der Extrazellulärflüssigkeit werden die betroffenen Neuronen erregt und es erfolgt die Freisetzung der jeweiligen Neurotransmitter (Landgraf et al. 1988, Neumann et al. 1993). So wird ein oxytocinerges Neuron nach hypertoner Stimulation OXT freisetzen, ein vasopressinerges Neuron jedoch AVP. Es tritt hierbei ein sogenannter "Rebound"-Effekt auf, d.h. die maximale Erregung der Neuronen tritt erst nach einem weiteren Wechsel des hypertonen Dialysemediums auf isotones Medium (Dialysat Nr. 10) ein (Neumann et al. 1993).

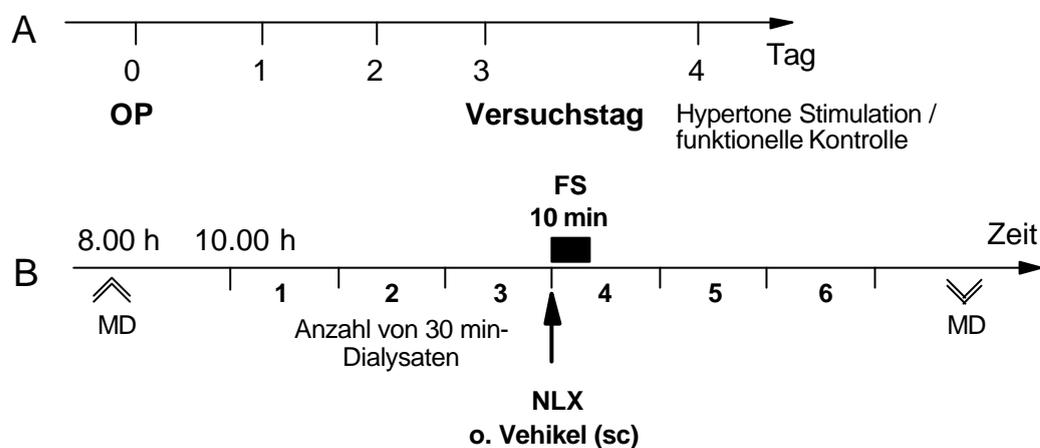


Abb. 28 Post-operativer Zeitraum (A) und Versuchstag (B) mit Zeitplan für die Gewinnung von Mikrodialogysaten aus dem PVN bzw. dem SON. Die sc-Injektion des Opiat-Antagonisten Naloxon (NLX) bzw. Vehikel erfolgte 2 min vor einem 10 min-Schwimmstreß (FS, 19°C) zu Beginn des 4. Dialysates. Doppelpfeile nach oben weisen auf die Zeitpunkte des Ankoppelns, Doppelpfeile nach unten auf die Zeitpunkte des Abkoppelns der Mikrodialogyse-Systeme (MD) hin.

3.3.1 *Nucleus paraventricularis*

Die basale (vor NLX und Schwimmstreß) Freisetzung von OXT zeigte keine signifikanten Unterschiede zwischen virginen und trächtigen Ratten (2-Weg ANOVA über die Dialysate 1-3; Gruppe: $F_{1,29} 2.06, p=0.16$, Zeit: $F_{1,29} 2.57, p=0.085$, Gruppe x Zeit: $F_{2, 60} 0.87, p=0.42$), wenn auch die für beide Behandlungsgruppen zusammengefaßten basalen Mittelwerte eine Tendenz zu erhöhter Sekretion bei trächtigen, verglichen mit virginen Ratten zeigten (Abb. 29 Insert).

Ein Vergleich der Gruppen und Behandlungen über die gesamte Versuchsdauer (Dialysate 1-6) ergab hochsignifikante Unterschiede in allen Faktoren (3-Weg ANOVA, Gruppe: $F_{1,31}$ 125, $p < 0.0001$; Behandlung: $F_{1,31}$ 16.6, $p = 0.0003$; Zeit: $F_{5,160}$ 368, $p < 0.0001$) sowie deren Interaktionen (Gruppe x Behandlung: $F_{1,31}$ 222, $p < 0.0001$; Gruppe x Zeit: $F_{5,160}$ 80.5, $p < 0.0001$; Behandlung x Zeit: $F_{5,160}$ 22.8, $p < 0.0001$; Gruppe x Behandlung x Zeit: $F_{5,160}$ 92.8, $p < 0.0001$). Bei Vehikel-behandelten Weibchen induzierte die Schwimmstreß-Exposition einen Anstieg der intra-PVN-Freisetzung von OXT (2-Weg ANOVA, Zeit: $F_{5,80}$ 10.5, $p < 0.0001$), der bei virginen (5.53-fach vs. basal, $p < 0.01$) und trächtigen (6.12-fach vs. basal, $p < 0.01$) Tieren gleich hoch war (Behandlung: $F_{1,15}$ 0.34, $p = 0.54$, Abb. 29). Nach NLX-Behandlung war die Freisetzung von OXT nach Schwimmstreß bei trächtigen Tieren erhöht (2.34-fach vs. Vehikel, $p < 0.01$, 3-Weg ANOVA), wohingegen bei virginen Tieren kein statistisch signifikanter Effekt auftrat. Bei Untersuchung der Streß-induzierten intranucleären Freisetzung von OXT nur bei virginen Ratten mittels einer 2-Weg ANOVA (Behandlung: $F_{1,14}$ 6.57, $p = 0.024$; Zeit: $F_{5,75}$ 9.14, $p < 0.0001$; Behandlung x Zeit: $F_{5,75}$ 2.66, $p = 0.03$) ergab sich eine signifikante Reduktion nach NLX-Applikation (0.33-fach vs. Vehikel, $p < 0.01$, Abb. 29).

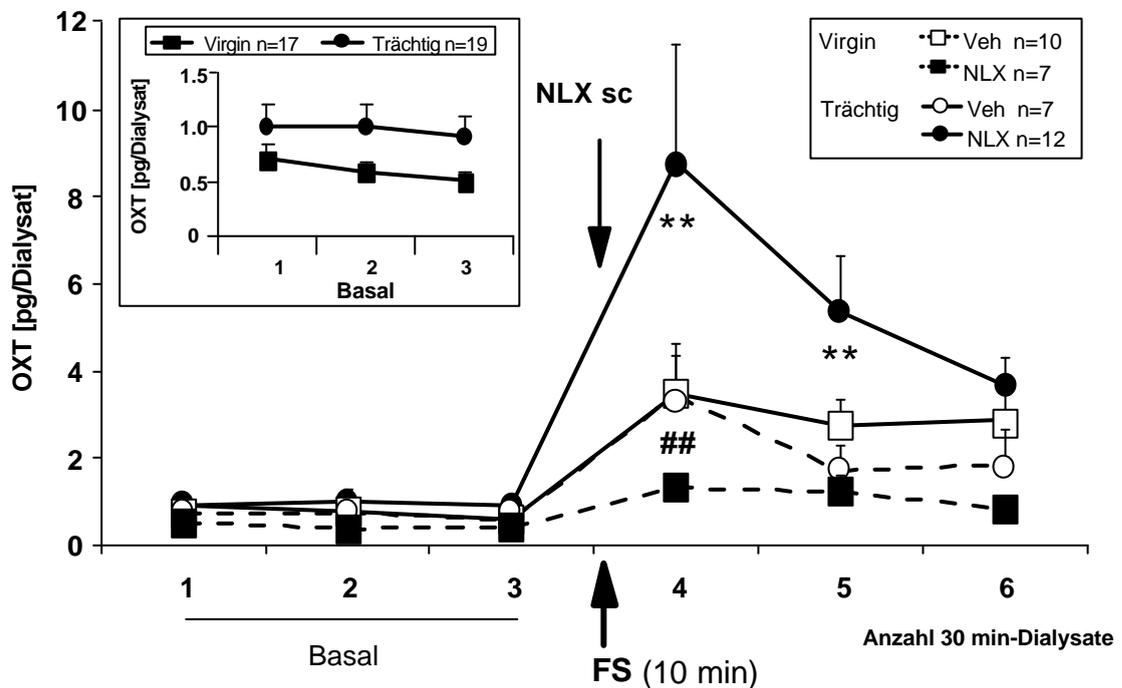


Abb. 29 OXT Konzentrationen in 30 min-Mikrodialysaten (Dialyserate 200 μ l/h) des rechten PVN unter Basalbedingungen (Dialysate 1-3, siehe auch Insert) und nach sc-Injektion von Vehikel (0.5 ml/kg) oder Naloxon (NLX, 5 mg/kg, 0.5 ml/kg) und 10 min Schwimmstreß (FS, 19°C). Daten sind Mittelwerte + SEM. ** $p < 0.01$ vs. trächtig Vehikel (3-Weg ANOVA); ## $p < 0.01$ vs. virgin Vehikel (2-Weg ANOVA)

Der statistische Vergleich der Freisetzung von AVP im PVN über die gesamte Versuchsdauer (Dialysate 1-6) ergab keine Unterschiede in den Gruppen (trächtig Vehikel, trächtig NLX und virgin Vehikel; virgin NLX wurde nicht untersucht; 2-Weg ANOVA, Gruppe: $F_{2,20}$ 0.68, $p=0.52$). Der Zeitverlauf zeigte jedoch einen signifikanten Anstieg der AVP-Freisetzung nach Schwimmstreß (Zeit: $F_{5,100}$ 13.7, $p<0.0001$, Interaktion: $F_{10,100}$ 1.47, $p=0.16$, Tabelle 3).

Tabelle 3 Freisetzung von AVP im PVN virginer und trächtiger Weibchen unter Basalbedingungen (Dialysate 1-3) und nach sc-Injektion von Vehikel (Veh, 0.5 ml/kg) oder Naloxon (NLX, 5 mg/kg, 0.5 ml/kg, nur trächtige Weibchen) und Schwimmstreß (FS, 10 min, 19°C). Daten sind Mittelwerte \pm SEM. * $p<0.01$ vs. basal (2-Weg ANOVA)

	Anzahl 30 min-Dialysate					
	1	2	3	4 (FS)	5	6
Virgin Veh (n=9)	0.16 \pm 0.05	0.14 \pm 0.04	0.14 \pm 0.04	0.34 \pm 0.13 *	0.29 \pm 0.10	0.43 \pm 0.18
Trächtig Veh (n=6)	0.10 \pm 0	0.10 \pm 0	0.1 \pm 0	0.49 \pm 0.28 *	0.23 \pm 0.09	0.19 \pm 0.07
Trächtig NLX (n=8)	0.19 \pm 0.06	0.15 \pm 0.05	0.13 \pm 0.03	0.62 \pm 0.40 *	0.37 \pm 0.20	0.16 \pm 0.04

3.3.2 *Nucleus supraopticus*

Die basale (vor NLX und Schwimmstreß) Freisetzung von OXT war bei trächtigen, verglichen mit virginen Ratten signifikant vermindert (2-Weg ANOVA über die Dialysate 1-3; Gruppe: $F_{1,28}$ 9.35, $p=0.005$, Zeit: $F_{2,58}$ 1.08, $p=0.35$, Gruppe x Zeit: $F_{2, 58}$ 1.04, $p=0.36$, Abb. 30).

Ein Vergleich der Gruppen und Behandlungen über die gesamte Versuchsdauer (Dialysate 1-6, 3-Weg ANOVA) ergab hochsignifikante Unterschiede bezüglich Reproduktionsstadium (Gruppe: $F_{1,30}$ 37.1, $p<0.0001$) und Zeitverlauf ($F_{5,155}$ 35.8, $p<0.0001$), nicht aber der Interaktion beider Parameter (Gruppe x Zeit: $F_{5,155}$ 2.117, $p=0.067$). Bei Vehikel-behandelten Tieren induzierte die Schwimmstreß-Exposition einen deutlichen Anstieg der intra-SON-Freisetzung von OXT, der bei trächtigen ($p<0.01$ vs. basal) und virginen Weibchen (4.12 -fach, $p<0.01$ vs. basal) signifikant war (2-Weg ANOVA, Zeit: $F_{1,13}$ 4.03, $p=0.0032$, Abb. 30). Aufgrund z. T. sehr niedriger basaler Werte - unterhalb der Detektionsgrenze - konnte bei trächtigen Tieren der prozentuale Anstieg der Plasmakonzentrationen von OXT nicht berechnet werden; die Grafik zeigt jedoch einen den virginen Tieren vergleichbaren Anstieg (Abb. 30). Nach NLX-Behandlung war die Freisetzung von OXT nach Schwimmstreß sowohl bei trächtigen als auch bei virginen Tieren unverändert im Vergleich zu Vehikel-Behandlung (3-Weg ANOVA, Behandlung: $F_{1,30}$ 0.46, $p=0.51$, Gruppe x Behandlung:

$F_{1,30} 0.082, p=0.78$, Behandlung x Zeit: $F_{5,155} 1.29, p=0.27$; Gruppe x Behandlung x Zeit: $F_{5,155} 0.71, p=0.61$, Abb. 30).

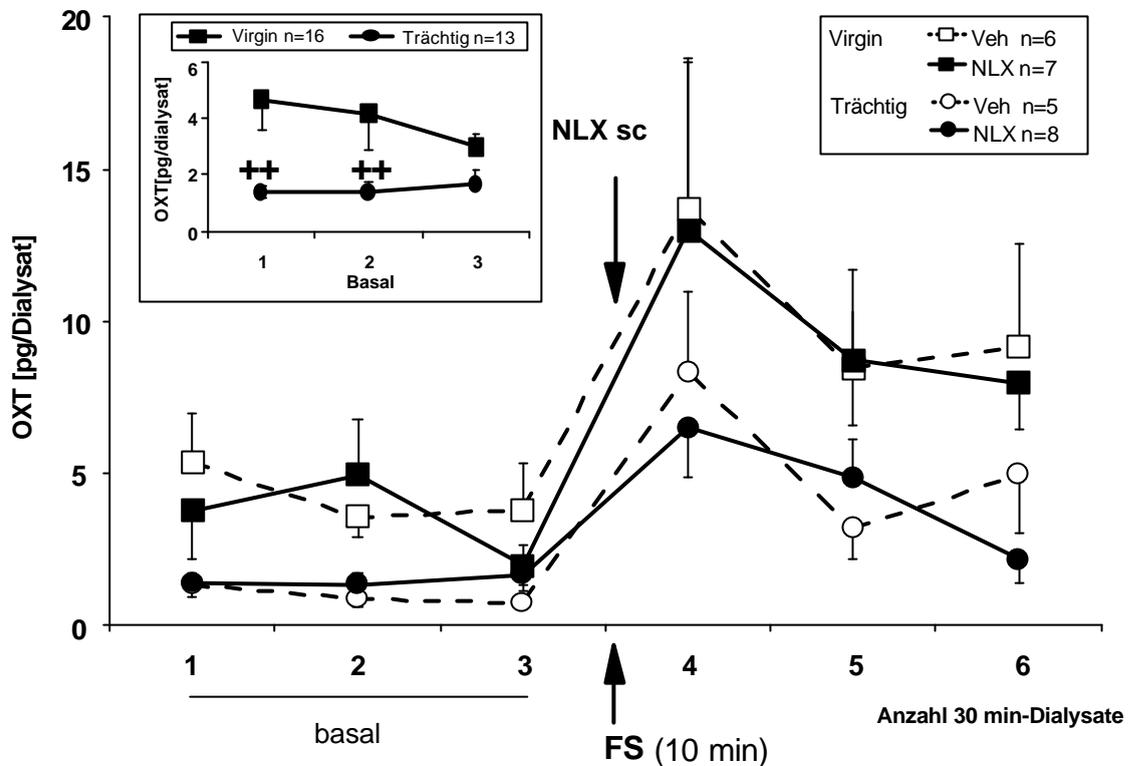


Abb. 30 OXT Konzentrationen in 30 min-Mikrodialysaten (Dialyserate 200 μ l/h) des rechten SON unter Basalbedingungen (Dialysate 1-3, siehe auch Insert) und nach sc-Injektion von Vehikel (0.5 ml/kg) oder Naloxon (NLX, 5 mg/kg, 0.5 ml/kg) und 10 min Schwimmstreß (FS, 19°C). Daten sind Mittelwerte \pm SEM. ++ $p<0.01$ vs. virgin (2-Weg ANOVA)

3.3.3 Schwimmverhalten von virginen und trächtigen Ratten, Effekte von NLX

Während des 10 min-Schwimmstresses wurde die Dauer des *struggling* bei trächtigen (Vehikel: 73.1 ± 7.88 min, NLX: 72.3 ± 12.7 min) und virginen (Vehikel: 82.1 ± 8.90 min, NLX: 105 ± 19.5 min) Weibchen gemessen. Der statistische Vergleich mit einer 2-Weg ANOVA ergab eine Tendenz zu weniger aktivem Schwimmverhalten bei trächtigen Tieren (Gruppe: $F_{1,14} 3.40 p=0.088$), jedoch keine Unterschiede bezüglich der Behandlung ($F_{1,15} 0.68 p=0.42$, Gruppe x Behandlung: $F_{1,15} 0.79 p=0.39$).

3.4 Die "Münchener HAB (*high anxiety-related behaviour*)- und LAB (*low anxiety-related behaviour*)-Ratten": Ein neues Tiermodell für angeborene emotionale Extreme

3.4.1 Verhaltensbiologische und neuroendokrine Charakterisierung von HAB/LAB-Ratten

3.4.1.1 Verhaltensuntersuchungen

3.4.1.1.1 Züchterfolg

Ein Generationenüberblick der HAB/LAB-Angstzuchtlinien ergab sowohl bei männlichen als auch bei weiblichen Tieren eine stetige Divergenz des Angstverhaltens zwischen beiden Linien, die sich innerhalb der letzten Generationen stabilisierte. Zur Verdeutlichung wurde in Abb. 31 exemplarisch der Verlauf der auf den offenen Armen verbrachten Zeit (% von der verbrachten Zeit auf allen Armen) für männliche HAB- und LAB-Tiere dargestellt.

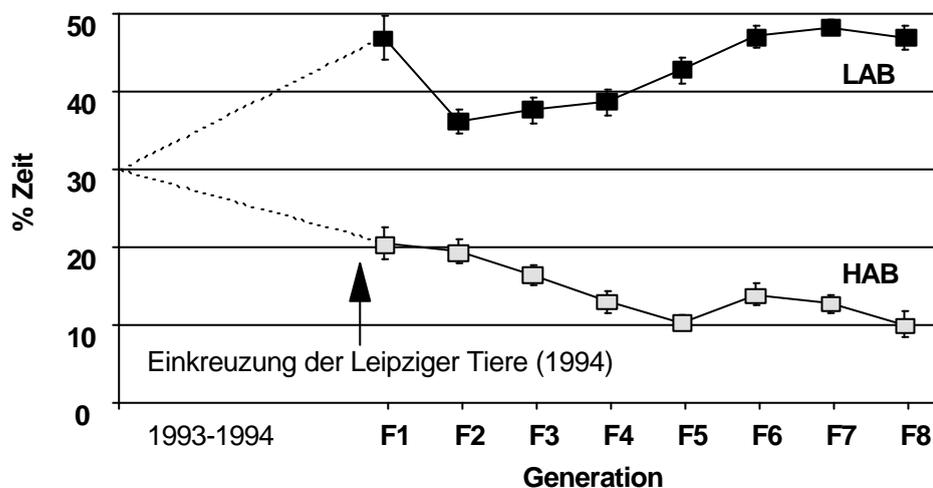


Abb. 31 Verlauf des angstbezogenen Verhaltens von männlichen HAB (hohe Angstdisposition)- und LAB (niedrige Angstdisposition)-Ratten innerhalb der Generationen F1 bis F8. Das zwischen den Zuchtlinien differierende Angstverhalten wurde exemplarisch an der auf den offenen Armen der *plus-maze* verbrachten Zeit (% Zeit) dargestellt.

3.4.1.1.2 Soziale Interaktion (siehe Kap. 2.2.3)

Während der 10 min-Testdauer verbrachten die männlichen Interaktionspaare der HAB-Linie signifikant weniger Zeit mit aktiver (Mann-Whitney U-Test, $p=0.0048$) und mehr Zeit mit passiver ($p=0.009$) sozialer Interaktion als die LAB-Tiere (Abb. 32). Ähnliche

Ergebnisse zeigten sich bei den Weibchen, wobei die Unterschiede jedoch keine statistische Signifikanz erreichten (aktive Interaktion: HAB: 173±23.3, LAB: 221±47.0 s, Mann-Whitney U-Test, p=0.39; passive Interaktion: HAB: 11.4±4.91, LAB: 3.70±0.42 s, p=0.47). Auch die Zeit ohne soziale Interaktion während der 10 min-Testdauer war bei männlichen HAB-deutlich höher als bei LAB-Tieren (Mann-Whitney U-Test, p=0.0048, Abb. 32), während bei den Weibchen wiederum keine statistische Signifikanz erreicht wurde (HAB: 418±24.3, LAB: 380±46.7 s, p=0.39).

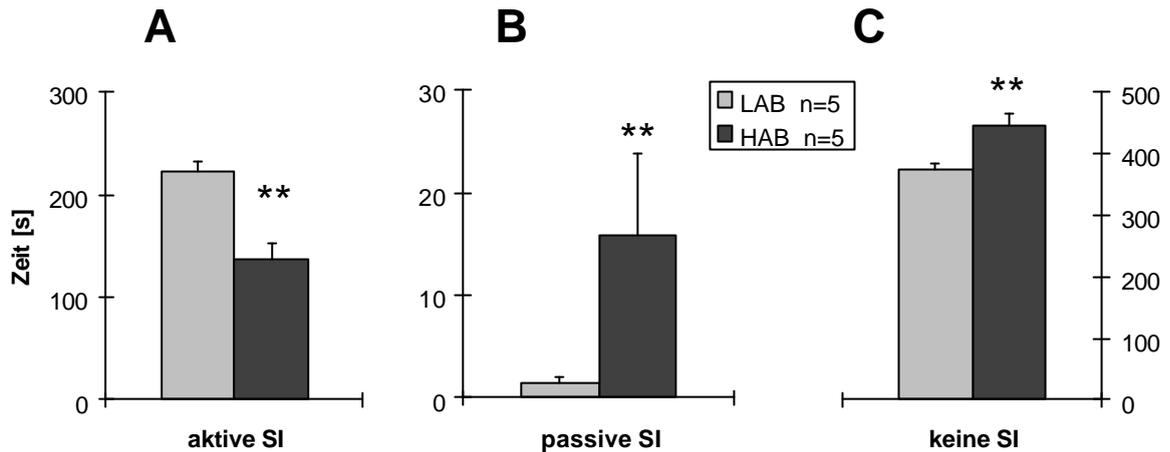


Abb. 32 (A) aktive und (B) passive soziale Interaktion sowie (C) Zeitdauer ohne Interaktion männlicher HAB- und LAB-Ratten während der 10 min-Testdauer. Daten sind Mittelwerte + SEM. ** p<0.01 vs. LAB (Mann-Whitney U-Test)

Die lokomotorische Aktivität, angezeigt durch die Anzahl der Linienübertritte während des 10 min-Tests (Tabelle 4), war sowohl bei männlichen (p<0.01 HAB vs. LAB) als auch weiblichen (p<0.05 HAB vs. LAB) HAB-Paaren signifikant geringer als bei den LAB-Tieren. Zudem zeigten männliche HAB-Ratten während der 10 min-Testung eine höhere Defäkationsrate als LABs (p<0.01, Tabelle 4). Bei weiblichen Tieren hingegen konnte in beiden Linien keine Defäkation beobachtet werden.

Tabelle 4 Locomotorische Aktivität (Anzahl der Linienübertritte) und Defäkationsrate (Anzahl der Fäzes) männlicher und weiblicher HAB- und LAB-Ratten während 10 min-Testdauer. Daten sind Mittelwerte + SEM. *p<0.05, **p<0.01 vs. LAB (Mann-Whitney U-Test)

		Anzahl der Linienübertritte	Anzahl der Fäzes
Männchen	HAB (n=5)	151±10.1 **	6.44±1.31 **
	LAB (n=5)	306±12.6	0.23±0.18
Weibchen	HAB (n=4)	251±33.4 *	0
	LAB (n=4)	526±107	0

3.4.1.1.3 Soziale Dominanz

Spielerisches Kampfverhalten / play fighting (siehe Kap. 2.2.5)

Weder die Dauer (2-Weg ANOVA, Linie x Geschlecht: $F_{1,34} 0.061$, $p=0.81$) oder Frequenz (Linie x Geschlecht: $F_{1,34} 0.78$, $p=0.38$) des Unterwerfungsverhaltens noch die Latenzzeit bis zur ersten Unterwerfung (Linie x Geschlecht: $F_{1,34} 0.80$, $p=0.38$, Tabelle 5) zeigten signifikante Linien- oder Geschlechts-spezifische Unterschiede. Im Vergleich zu Männchen zeigten weibliche Jungtiere beider Linien eine Tendenz zu erhöhter Dauer des Unterwerfungsverhaltens.

Tabelle 5 Spielerisches Kämpfen von weiblichen und männlichen HAB- und LAB-Jungtieren (33. postnataler Tag) nach 3-tägiger Einzelhaltung. Dauer und Frequenz des Unterwerfungsverhaltens sowie die Latenzzeit bis zum ersten Auftreten dieses Verhaltens zeigten keine Linien- oder Geschlechts-spezifischen Unterschiede. Daten sind Mittelwerte \pm SEM

		Dauer [s]	Frequenz [min^{-1}]	Latenz [s]
Weibchen	HAB (n=8)	10.9 \pm 3.80	5.38 \pm 1.40	211 \pm 41.3
	LAB (n=8)	13.6 \pm 4.29	7.00 \pm 1.89	156 \pm 32.5
Männchen	HAB (n=11)	7.56 \pm 1.99	5.73 \pm 1.46	286 \pm 50.3
	LAB (n=11)	6.28 \pm 1.18	6.82 \pm 1.34	261 \pm 41.8

Kompetitives Trinkverhalten (siehe Kap. 2.2.6)

Innerhalb der 10-minütigen Trinkflaschen-Exposition zeigten LAB-Tiere eine höhere absolute Trinkdauer als HABs (Mann-Whitney U-Test, $p=0.039$, Abb. 33). Bei der Trinkfrequenz (Mann-Whitney U-Test, $p=0.43$) und der Latenzzeit bis zum ersten Trinkversuch ($p=0.56$) hingegen bestanden keine Linien-spezifischen Unterschiede.

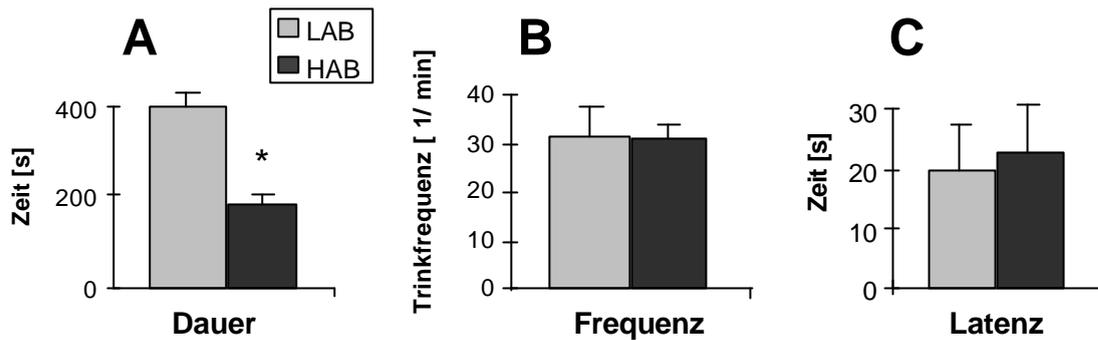


Abb. 33 Trinkdauer (A) und -frequenz (B) sowie Latenzzeit bis zum ersten Trinkversuch (C) bei weiblichen LAB- und HAB-Ratten nach 45 h Wasserdeprivation. Jeweils ein Weibchen jeder Linie wurden gemeinsam in einem Käfig gehalten (n=13) und ebenfalls dort wurde die Trinkflasche nach Wasserentzug geboten. Daten sind Mittelwerte + SEM. * p<0.05 vs. LAB (Mann-Whitney U-Test)

3.4.1.1.4 Altersverlauf der Angstdisposition

Ultraschallvokalisation (postnataler Tag 11, siehe Kapitel 2.2.4)

Die durch eine 5-minütige Separation von der Mutter induzierte Ultraschallvokalisation von Jungtieren zeigte bei HAB-Tieren eine signifikant höhere Ruffrequenz als bei LAB-Tieren (Mann-Whitney U-Test, p=0.025, Abb. 34). Bei diesem Verhaltensparadigma konnten keine Geschlechts-spezifischen Unterschiede beobachtet werden, so daß die Daten von männlichen und weiblichen Tieren zusammengefaßt wurden.

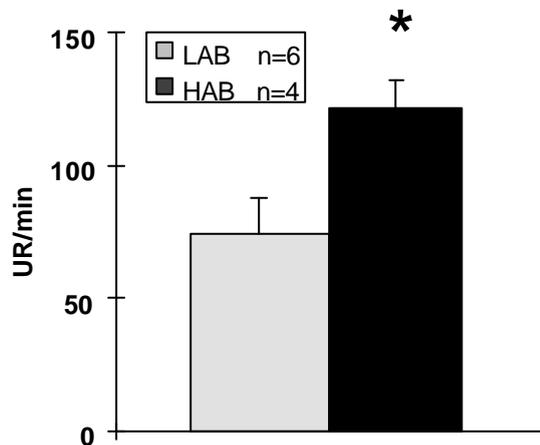


Abb. 34 Frequenz von Ultraschallrufen (UR/min, Glasfläche auf 19 °C temperiert) bei LAB- und HAB-Jungtieren (11. postnataler Tag) während 5 min Separation vom Muttertier. Daten sind Mittelwerte + SEM. * p<0.05 vs. LAB (Mann-Whitney U-Test, n=Anzahl der Würfe)

Testung adulter HAB/LAB-Tiere auf der elevated plus-maze (im Alter von 10 Wochen, 6-7 Monaten und 18 Monaten)

Alle HAB/LAB-Ratten werden routinemäßig im Alter von 10 Wochen auf der *plus-maze* getestet (siehe Kap. 2.2.1). Für die Untersuchung des Altersverlaufes wurde eine Gruppe von Tieren beider Linien herausgenommen und zusätzlich im Alter von 6-7 Monaten und 18 Monaten getestet. In der Zwischenzeit wurden die Tiere unter Normalbedingungen

gehalten. Die hier vorgestellten Ergebnisse sind nur vorläufiger Natur, da die letzte Testung (18 Monate) bisher nur bei einer kleinen Gruppe von HAB-Tieren (n=5) durchgeführt wurde.

Obwohl Tiere beider Linien im Alter von 6-7 Monaten seltener in die offenen Arme der *plus-maze* eintraten (HAB: $p < 0.05$, LAB $p < 0.01$ vs. 10 Wochen) und dort auch weniger Zeit verbrachten (HAB und LAB $p < 0.01$ vs. 10 Wochen) als bei der Naivtestung im Alter von 10 Wochen, blieben die Linien-spezifischen Unterschiede bei den Eintritten in die offenen Arme bzw. der dort verbrachten Zeit in allen Altersstufen signifikant (2-Weg ANOVA; % Zeit: Linie $F_{1,32}$ 322, $p < 0.0001$, Zeit: $F_{1,32}$ 30.5, $p < 0.0001$, Interaktion: $F_{1,32}$ 5.68, $p = 0.023$; % Eintritte: Linie $F_{1,32}$ 93.3, $p < 0.0001$, Zeit: $F_{1,32}$ 37.1, $p < 0.0001$, Interaktion: $F_{1,32}$ 7.09, $p = 0.012$, Abb. 35). Die lokomotorische Aktivität, angezeigt durch die Anzahl der Eintritte in die geschlossenen Arme (2-Weg ANOVA; Linie $F_{1,32}$ 35.0, $p < 0.0001$, Zeit: $F_{1,32}$ 10.2, $p = 0.0032$, Interaktion: $F_{1,32}$ 0.09, $p = 0.77$, Abb. 35) war sowohl im Alter von 10 Wochen als auch mit 6-7 Monaten bei männlichen HAB-Ratten geringer als bei LABs. Im Altersvergleich erfolgte bei HAB-Ratten eine signifikante Reduktion der lokomotorischen Aktivität ($p < 0.05$ 6-7 Monate vs. 10 Wochen), während eine solche bei LAB-Ratten nicht auftrat.

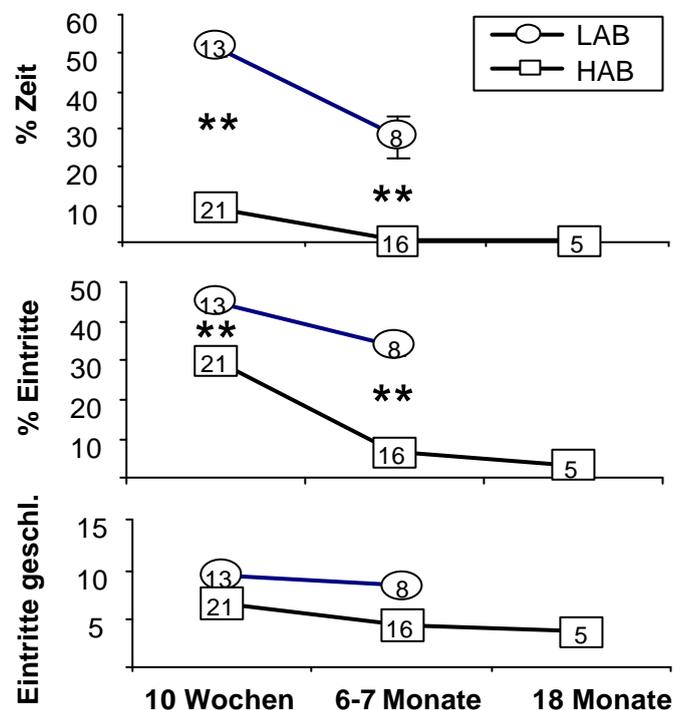


Abb. 35 Altersverlauf der Angstdisposition, angezeigt durch % Eintritte in die und % verbrachte Zeit auf den offenen Armen der *plus-maze* bei männlichen HAB- und LAB-Ratten (die jeweilige Anzahl der Tiere ist in den Symbolen angegeben). Die lokomotorische Aktivität der Tiere wird durch die Anzahl der Eintritte in die geschlossenen Arme (Eintritte geschl.) angezeigt. ** $p < 0.01$ HAB vs. LAB (2-Weg ANOVA)

3.4.1.2 Neuroendokrine Reaktivität auf einen emotionalen Stressor

Versuchsprotokoll

In diesem Experiment wurden adulte, männliche HAB (n=10, 340-380 g)- und LAB (n=11, 330-375 g)-Ratten getestet, deren Emotionalität im Alter von 10 Wochen bestätigt wurde (Abb. 38 Insert). Um 8.00 h des 5. post-operativen Tages wurden die Katheter angekoppelt und um 10.00 h wurde zur Bestimmung basaler Plasmakonzentrationen von ACTH, Corticosteron, OXT, AVP und Prolaktin eine 0.6 ml-Blutprobe entnommen. Direkt danach wurden die Katheter abgekoppelt und verschlossen und die Tiere 5 min einem offenen Arm der *plus-maze* exponiert (*open-arm*, siehe Kap. 2.2.1). Dann wurden die Tiere in den Heimkäfig zurückgesetzt, die Katheter angekoppelt und nach 5, 15 und 60 min weitere 0.6 ml-Blutproben entnommen (Abb. 36).

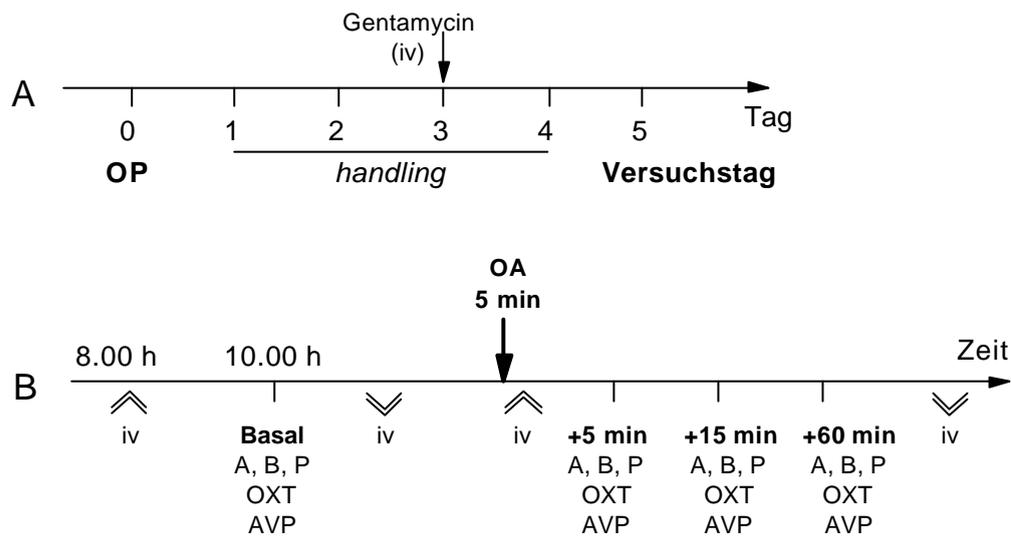


Abb. 36 Post-operativer Zeitraum (A) und Versuchstag (B) mit Zeitplan für die Blutentnahmen für ACTH [A], Corticosteron [B], Prolaktin [P], Oxytocin [OXT] und Vasopressin [AVP]. Nach der Entnahme einer basalen Blutprobe wurden die Tiere 5 min auf einen offenen Arm (OA) der *elevated plus-maze* gesetzt. Weitere Blutentnahmen folgten 5, 15 und 60 min danach. Doppelpfeile nach oben weisen auf die Zeitpunkte des Ankoppelns, Doppelpfeile nach unten auf die Zeitpunkte des Abkoppelns der Katheter (iv) hin.

Verhaltensbiologische Parameter

HAB-Ratten zeigten geringere exploratorische Aktivität, indiziert durch eine geringere Laufstrecke auf dem offenen Arm, als LAB-Ratten (Abb. 37).

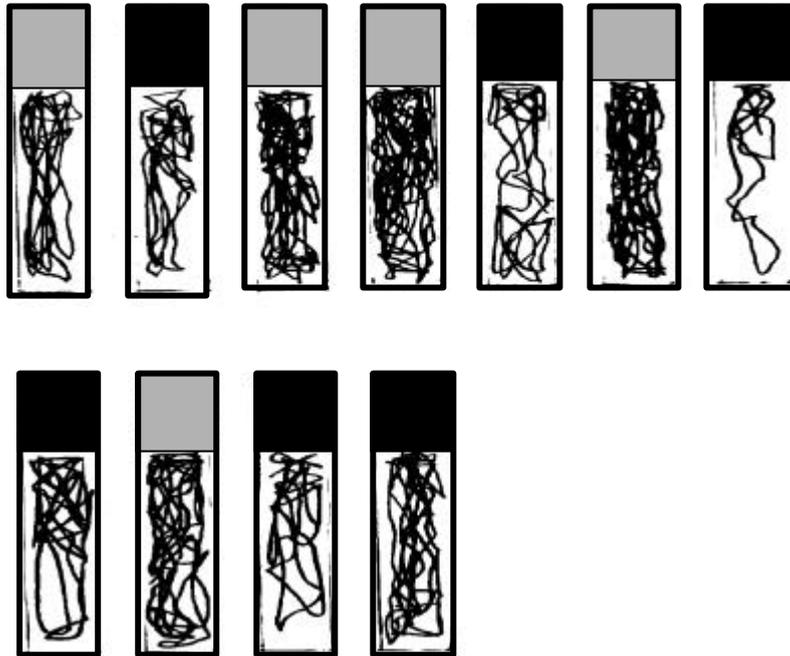


Abb. 37 Laufstrecken einiger männlicher HAB- und LAB-Ratten auf einem offenen Arm der plus-maze während der 5 min-Exposition. Hellgraue Quadrate zeigen LAB-Tiere (niedrige Angstdisposition), dunkelgraue Quadrate zeigen HAB-Tiere (hohe Angstdisposition). Geringe Exploration der offenen Arme (kürzere Laufstrecke) deutet auf erhöhte Ängstlichkeit hin.

Neuroendokrine Parameter

Die basalen Plasmakonzentrationen von ACTH und Corticosteron zeigten keine Linien-spezifischen Unterschiede, jedoch war sowohl die Freisetzung von ACTH (2-Weg ANOVA; Faktor Linie: $F_{1, 19} 5.02$, $p=0.037$, Zeit: $F_{3, 57} 23.4$, $p<0.0001$, Interaktion: $F_{3, 57} 4.92$, $p=0.0042$) als auch von Corticosteron (2-Weg ANOVA; Linie: $F_{1, 19} 4.19$, $p=0.055$, Zeit: $F_{3, 57} 149$, $p<0.0001$, Interaktion: $F_{3, 57} 3.87$, $p=0.014$) nach Exposition des Stressors bei HABs signifikant höher als bei LABs (ACTH: ca. 2.51-fach, Corticosteron: ca. 1.38-fach; beide Hormone $p<0.01$, Abb. 38).

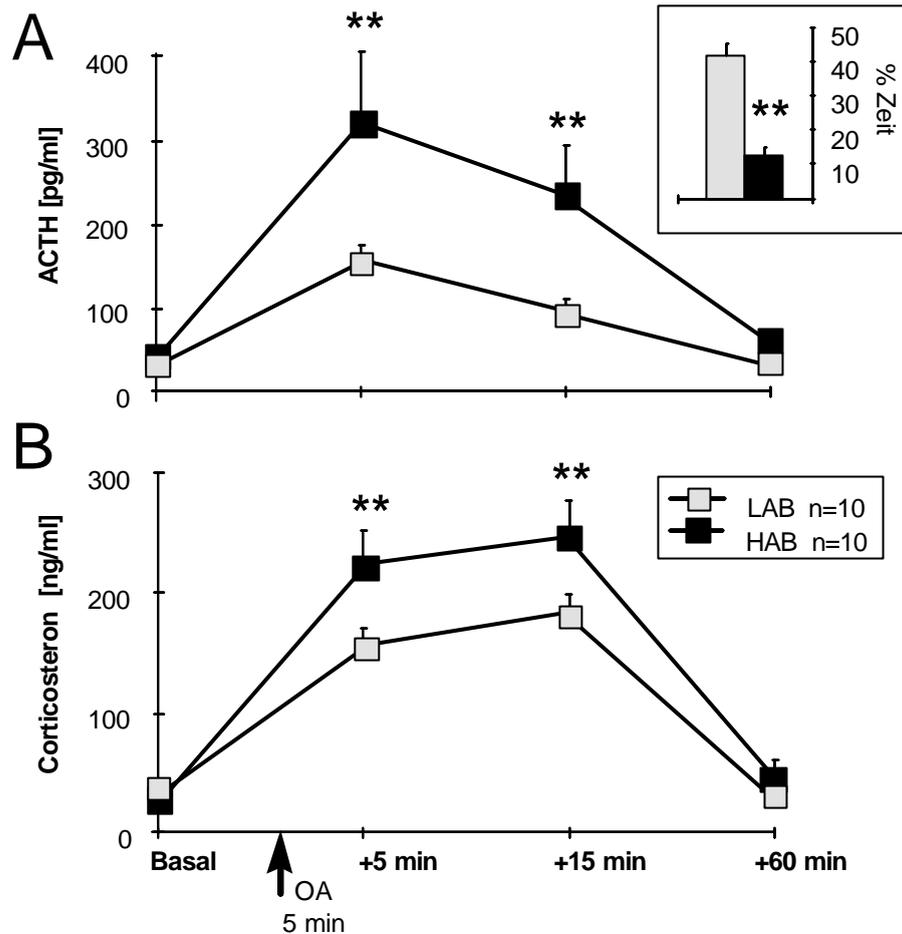


Abb. 38 Plasmakonzentration von ACTH (**A**) und Corticosteron (**B**) bei männlichen HAB- und LAB-Ratten (unterschiedliche Angstdisposition durch % Zeit auf den offenen Armen der *plus-maze* angezeigt, siehe Insert) vor und 5, 15 und 60 min nach einer 5 min-Exposition auf einem offenen Arm (OA) der *plus-maze*. Daten sind Mittelwerte + SEM. ** p<0.01 vs. LAB (2-Weg ANOVA)

Die Plasmakonzentration von Prolaktin war sowohl unter Basalbedingungen als auch 15 min nach Stressor-Exposition signifikant höher bei den HAB-Tieren (2-Weg ANOVA; Linie: $F_{1,17} 14.0$, $p=0.0016$, Zeit: $F_{1,17} 36.4$, $p<0.0001$, Interaktion: $F_{1,17} 11.3$, $p=0.0036$, Abb. 39). Auch der Quotient aus beiden Werten (stimuliert / basal) war höher in HAB- als in LAB-Ratten ($p<0.01$ Mann-Whitney U-Test).

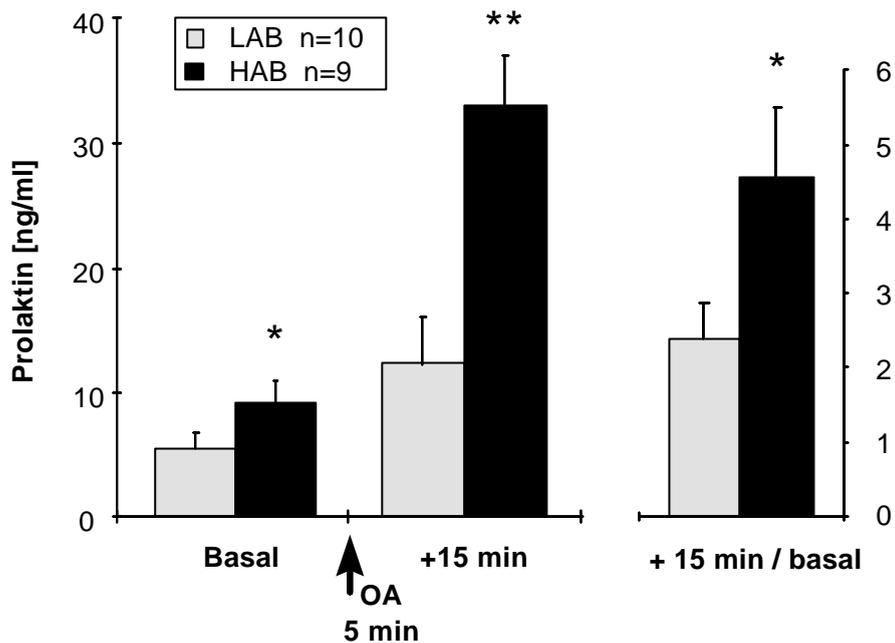


Abb. 39 Plasmakonzentration von Prolaktin bei männlichen HAB- und LAB-Ratten vor und 15 min nach einer 5 min-Exposition auf einem offenen Arm (OA) der *plus-maze*. Der Quotient "+15 min / basal" wurde aus den Daten errechnet. Daten sind Mittelwerte + SEM. * $p < 0.05$ ** $p < 0.01$ vs. LAB (2-Weg ANOVA, Mann-Whitney U-Test)

Es konnte hier erstmals gezeigt werden, daß der milde emotionale Stressor der *open-arm*-Exposition einen signifikanten Anstieg der Plasmakonzentration von OXT (2-Weg ANOVA, Linie: $F_{1,19} 0.60$, $p = 0.45$, Zeit: $F_{1,19} 6.57$, $p = 0.0007$, Interaktion: $F_{3,57} 0.94$, $p = 0.43$) induziert. Dahingegen wurde die Plasmakonzentration von AVP durch die Exposition des offenen Armes nicht verändert (Linie: $F_{1,18} 0.04$, $p = 0.84$, Zeit: $F_{3,54} 8.34$, $p = 0.0001$, Interaktion: $F_{3,54} 0.63$, $p = 0.60$). Bei keinem dieser Neuropeptide wurden Linien-spezifische Unterschiede festgestellt (Tabelle 6).

Tabelle 6 Plasmakonzentration von OXT und AVP bei männlichen HAB- und LAB-Ratten vor und 5, 15 und 60 min nach einer 5 min-Exposition auf einem offenen Arm (OA) der *plus-maze*. Daten sind Mittelwerte + SEM. # $p < 0.05$ vs. basal (2-Weg ANOVA)

		Basal	OA+5 min	OA+15 min	OA+60 min
OXT [pg/Probe]	HAB (n=9)	0.56 ± 0.05	0.84 ± 0.10 #	0.61 ± 0.05	0.62 ± 0.08
	LAB (n=10)	0.51 ± 0.06	0.92 ± 0.09 #	0.81 ± 0.16	0.59 ± 0.08
AVP [pg/Probe]	HAB (n=10)	1.70 ± 0.03	1.74 ± 0.03	1.59 ± 0.04	1.81 ± 0.04
	LAB (n=10)	1.70 ± 0.04	1.70 ± 0.04	1.61 ± 0.04	1.74 ± 0.04

3.4.1.3 Freisetzung von Vasopressin und Oxytocin im *Nucleus paraventricularis*

Versuchsprotokoll

In diesem Experiment wurde bei HAB/LAB-Ratten beiderlei Geschlechts die Freisetzung von OXT und AVP im PVN unter basalen Konditionen sowie nach Exposition eines vorwiegend emotionalen (10 min offener Arm der *plus-maze*) und eines vorwiegend physischen Stressors (10 min Schwimmstreß, 19°C) untersucht. Hierzu wurde den Tiere eine Mikrodialyse-Sonde in den rechten PVN implantiert. Am 2. post-operativen Tag um 8.00 h wurden die Dialyse-Systeme an die Mikroinfusions-Pumpe angeschlossen. Während einer 2 h-Ruhephase wurden die Mikrodialyse-Systeme gespült (200 µl/h, sterile Ringerlösung, pH 7.4), um ein Equilibrium zwischen dem Dialysemedium und der Extrazellulärflüssigkeit einzustellen. Darauf folgten 10 Dialyseperioden (je 30 min), an deren Ende die Sammelgefäße (1.5 ml Eppendorf-Tubes mit 10 µl 0.1 N HCl) gewechselt wurden (Abb. 40). Zuerst wurden zwei basale 30 min-Dialysate unter ungestörten Bedingungen gesammelt (je 100 µl). Zu Beginn der 3. Sammlerperiode wurden die Tiere unter kontinuierlicher Dialyse auf einen der offenen Arme der *plus-maze* gesetzt (10 min OA) und danach wieder zurück in den Heimkäfig gebracht. Zwei weitere Dialysate (Nr. 4 und 5) folgten unter ungestörten Bedingungen. Während der 6. Sammlerperiode wurden die Tiere einem 10 min-Schwimmstreß ausgesetzt, abgetrocknet und zurück in die Käfige gesetzt, woraufhin das 7. Dialysat wieder unter ungestörten Bedingungen folgte (Abb. 40).

Zusätzlich zur histologischen Kontrolle wurde bei allen Tieren eine funktionelle Kontrolle der Lokalisation der Mikrodialyse-Sonde durchgeführt. Dazu wurde nach Dialysieren des Nucleus mit isotoner Lösung (8. Dialysat, Ringerlösung) das Dialysemedium beim 9. Dialysat durch eine hypertone Lösung ersetzt. Nur Tiere bei denen ein "Rebound"-Effekt im 10. Dialysat (isoton) nachweisbar war (siehe Kap. 3.3), wurden zur statistischen Analyse zugelassen.

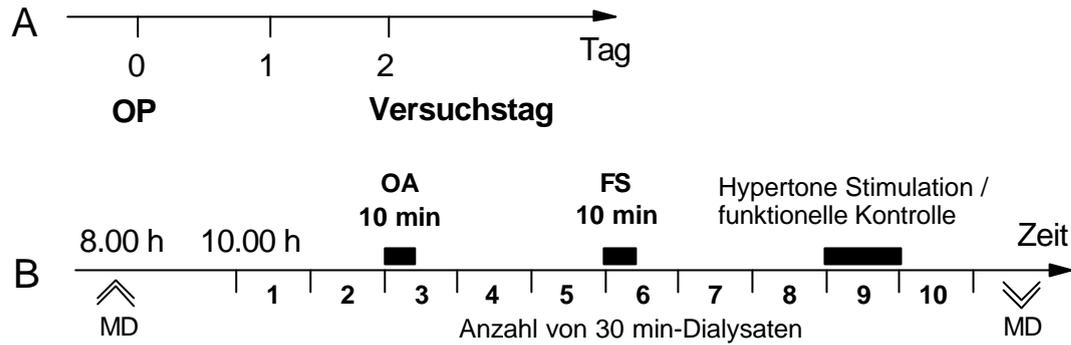


Abb. 40

Post-operativer Zeitraum (A) und Versuchstag (B) mit Zeitplan für die Gewinnung von Mikrodialysaten aus dem PVN männlicher und weiblicher HAB- und LAB-Ratten. Nachdem 2 Dialysate unter basalen Bedingungen gesammelt wurden, erfolgte zu Anfang der 3. Dialyseperiode eine 10 min-Exposition des offenen Armes der *plus-maze* (OA). Die Dialysate 4 und 5 wurden unter ungestörten Bedingungen gesammelt und zu Beginn des 6. Dialysates erfolgte ein 10 min-Schwimmstreß (FS, 19°C), wonach noch ein 7. Dialysat unter ungestörten Bedingungen gesammelt wurde. Die Dialysate 8-10 (8: isotone, 9: hypertone, 10: isotone Ringerlösung) wurden zur funktionellen Kontrolle der Lokalisation gesammelt. Doppelpfeile nach oben weisen auf die Zeitpunkte des Ankoppelns, Doppelpfeile nach unten auf die Zeitpunkte des Abkoppelns der Mikrodialyse-Systeme (MD) hin.

Basale und Streß-stimulierte Freisetzung von AVP im PVN von männlichen und weiblichen HAB- und LAB-Ratten

Die statistische Analyse der AVP-Freisetzung im PVN von HAB/LAB-Ratten über den gesamten Versuchszeitraum (Dialysate 1-7) mittels einer 2-Weg ANOVA ergab sowohl bei männlichen (Faktor Linie: $F_{1,12} \ 2.33 \ p=0.15$) als auch weiblichen (Linie: $F_{1,7} \ 0.58, \ p=0.47$) Tieren keine signifikanten Linien-spezifischen Unterschiede.

Wurde nur die basale Freisetzung (Dialysat 1) von AVP bei männlichen bzw. weiblichen HAB- und LAB-Ratten verglichen, zeigte sich bei den Männchen ein Linien-spezifischer Unterschied (Mann-Whitney U-Test, $p=0.028$, Abb. 41). Eine solche Differenz wurde jedoch bei Weibchen nicht beobachtet (Mann-Whitney U-Test, $p=0.46$, Abb. 41). In keiner der untersuchten Gruppen führte die Exposition des offenen Armes der *plus-maze* zu einer deutlichen Veränderung der intranucleären Freisetzung von AVP. Der 10 min-Schwimmstreß hingegen induzierte bei Männchen beider Zuchtlinien einen deutlichen Anstieg der AVP-Konzentration im Dialysat (2-Weg ANOVA, Zeit: $F_{6,72} \ 5.80, \ p<0.0001$). Bei Weibchen erwies die statistische Analyse, trotz eines sichtbaren Anstiegs der AVP-Konzentration im Dialysat nach Schwimmstreß bei HABs, keine signifikante Erhöhung (2-Weg ANOVA, Zeit: $F_{6,42} \ 1.84, \ p=0.11$). Die Differenz der AVP-Konzentration zwischen

dem 5. (ungestörte Bedingungen) und dem 6. (10 min Schwimmstreß) Dialysat war jedoch sowohl bei männlichen (HAB: 0.29 ± 0.08 , LAB: 0.064 ± 0.036 pg/Dialysat, Mann-Whitney U-Test, $p=0.020$) als auch weiblichen (HAB: 0.48 ± 0.16 , LAB: 0.036 ± 0.041 pg/Dialysat, Mann-Whitney U-Test, $p=0.37$) Tieren der HAB-Linie im Vergleich zu LAB-Ratten erhöht.

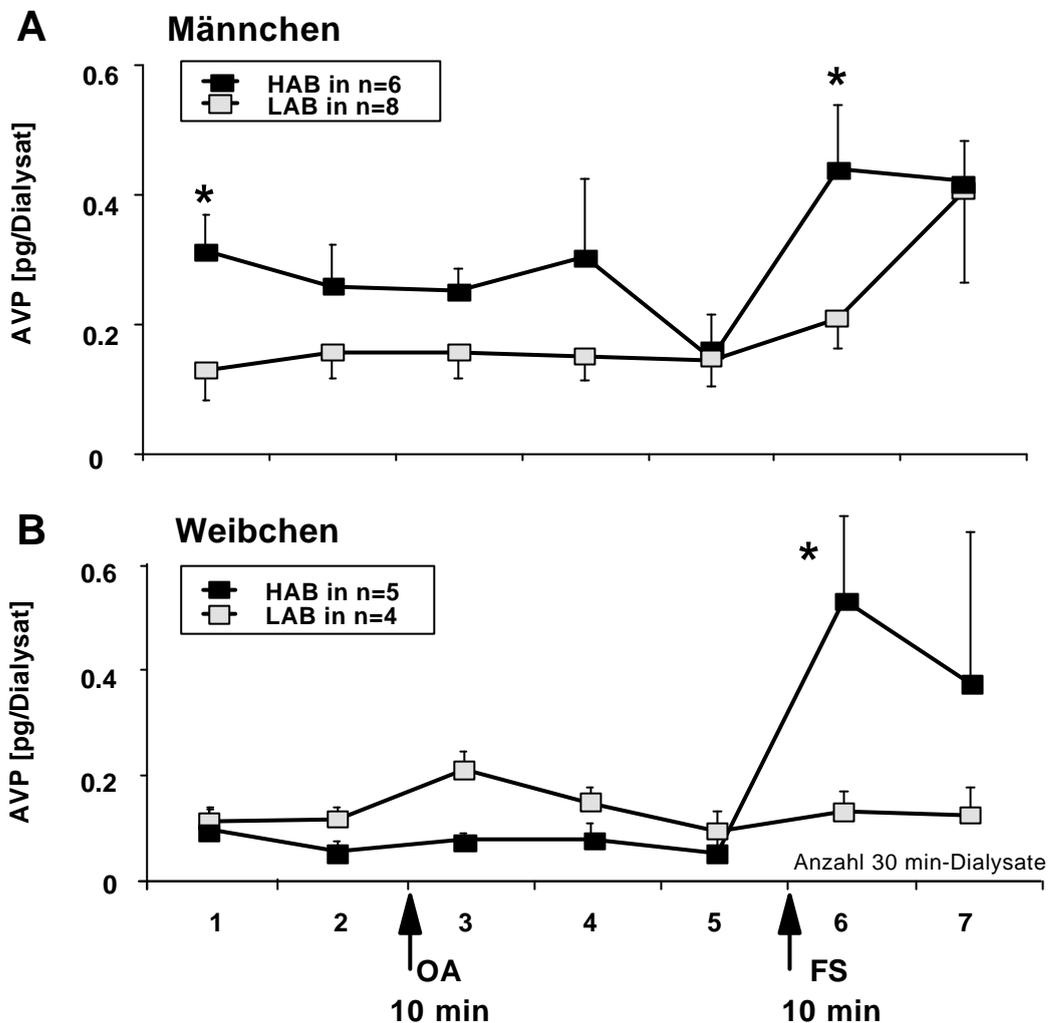


Abb. 41 AVP-Konzentrationen in 30 min-Mikrodialysaten (Dialyserate $200 \mu\text{l/h}$) des rechten PVN von männlichen (A) und weiblichen (B) HAB- und LAB-Ratten unter Basalbedingungen (Dialysate 1 und 2), nach emotionalem Streß (10 min offener Arm der *plus-maze*, OA, zu Beginn der 4. Dialyseperiode) oder physischem Streß (10 min Schwimmstreß, FS, bei 19°C zu Beginn der 6. Dialyseperiode). Das 4. und 5. Dialysat wurde unter ungestörten Bedingungen gesammelt. Daten sind Mittelwerte \pm SEM. * $p < 0.05$ vs. LAB (Mann-Whitney U-Test)

Basale und Streß-stimulierte Freisetzung von OXT im PVN von männlichen und weiblichen HAB- und LAB-Ratten

Die basale Freisetzung von OXT im PVN männlicher und weiblicher HAB/LAB-Ratten zeigte keine Linien-spezifischen Unterschiede. In keiner der untersuchten

Gruppen führte die Exposition des offenen Armes der *plus-maze* zu einer signifikanten Veränderung der intranucleären Freisetzung von OXT. Der 10 min-Schwimmstreß hingegen induzierte bei Männchen beider Zuchtlinien einen merklichen Anstieg der OXT-Konzentration im Dialysat (2-Weg ANOVA, Zeit: $F_{7,98}$ 11.0, $p < 0.0001$). Auch bei Weibchen der HAB-Linie war die intranucleäre Freisetzung von OXT 5 min nach Schwimmstreß erhöht ($p < 0.01$), wohingegen der Anstieg bei weiblichen LABs keine statistische Signifikanz erreichte (2-Weg ANOVA, Zeit: $F_{5,80}$ 2.59, $p = 0.032$). Sowohl bei männlichen (2-Weg ANOVA, Linie: $F_{1,14}$ 0.15, $p = 0.71$; Interaktion: $F_{7,98}$ 0.40, $p = 0.90$; Abb. 42) als auch bei weiblichen (2-Weg ANOVA, Linie: $F_{1,16}$ 0.52, $p = 0.48$; Interaktion: $F_{5,80}$ 0.78, $p = 0.57$; Abb. 42) HAB/LAB-Tieren ergaben sich keine nennenswerten Linien-spezifischen Unterschiede.

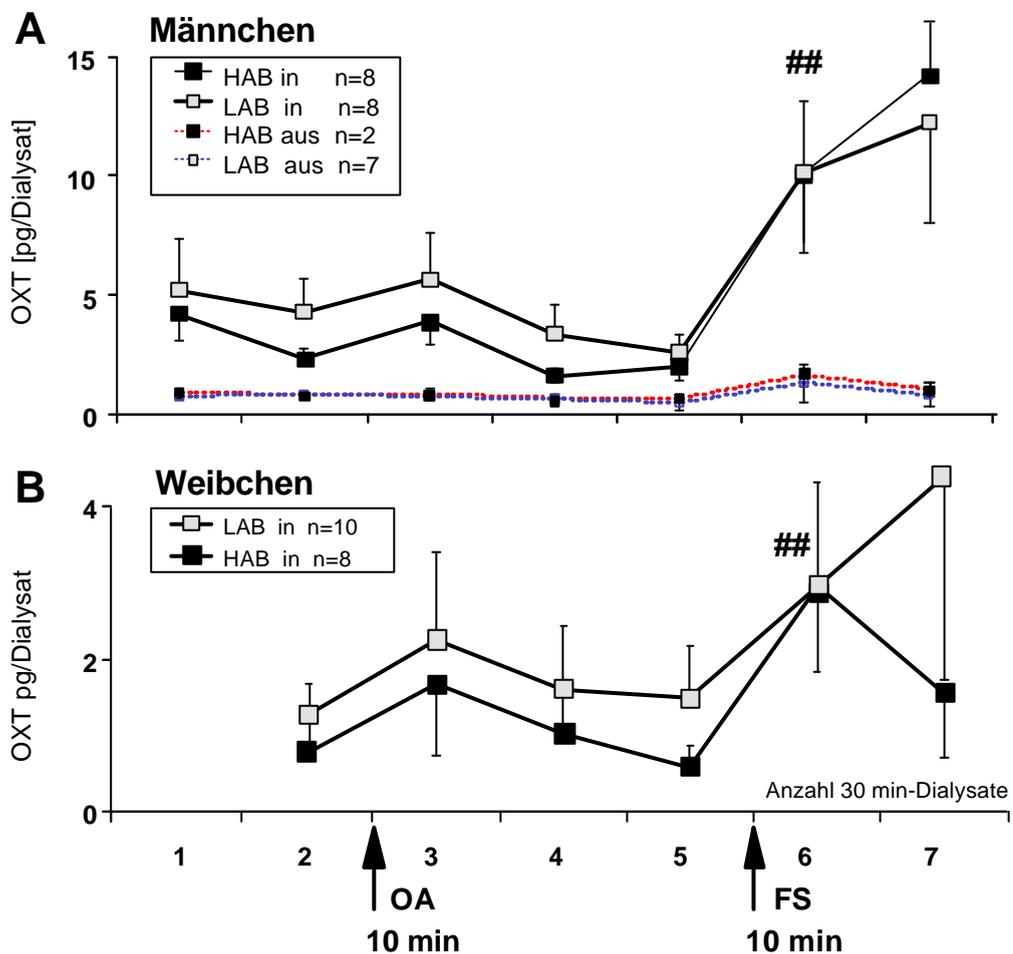


Abb. 42 OXT-Konzentrationen in 30-min Mikro dialysaten (Dialyserate 200 μ l/h) des rechten PVN von männlichen (A) und weiblichen (B) HAB- und LAB-Ratten unter Basalbedingungen (Dialysate 1 und 2), nach emotionalem Streß (10 min offener Arm der *plus-maze*, OA, zu Beginn der 4. Dialyseperiode) oder physischem Streß (10 min Schwimmstreß, FS, bei 19°C zu Beginn der 6. Dialyseperiode). Das 4. und 5. Dialysat wurde unter ungestörten Bedingungen gesammelt. Daten sind Mittelwerte \pm SEM. ## $p < 0.01$ vs. 5. Dialysat (2-Weg ANOVA)

3.4.1.4 Basale intrahypothalamische Expression von Vasopressin

Versuchsprotokoll

Für die quantitative Bestimmung der Expression von AVP in PVN und SON wurden männliche HAB- und LAB-Tiere (je n=5) aus dem Heimkäfig genommen und unter kurzer Halothan-Narkose (30 s) dekapitiert. Um eine Verfälschung der Ergebnisse durch akuten Isolations-Streß zu vermeiden, wurde darauf geachtet, daß keines der Tiere vor der Dekapitation alleine blieb. Die Gehirne wurden mittels Trockeneis-gekühltem Methylbutan schockgefroren und bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C aufbewahrt. An 14 µm-Schnitten dieser Gehirne wurde eine *in situ* Hybridisierung mit einer spezifischen Oligonukleotid-Sonde für AVP vorgenommen (siehe Kap. 2.3.2.4).

Basale Expression von AVP im PVN männlicher HAB- und LAB-Ratten

Die basale Expression von AVP im PVN männlicher HAB- und LAB-Ratten zeigte signifikante Linien-spezifischen Unterschiede, jedoch in Abhängigkeit von der Art der Neuronen. Unter Basalbedingungen wurde AVP-mRNA-Expression hauptsächlich in magnozellularen Neuronen des PVN nachgewiesen, wohingegen die Expression im parvozellulären Teil des PVN unter dem Detektionslimit lag. So wurde in magnozellulären Arealen des medialen PVN von HAB-Männchen eine signifikant höhere Dichte der Silberkörner pro Fläche gemessen als bei männlichen LABs (Mann-Whitney U-Test, $p=0.013$, Abb. 43).

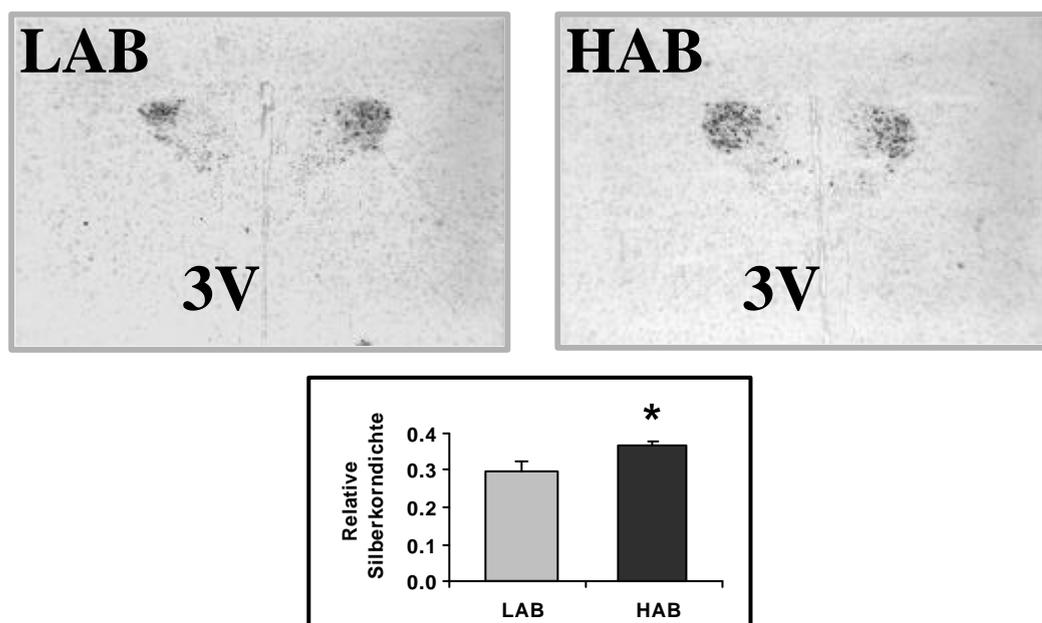


Abb. 43 Basale mRNA-Expression von AVP im magnozellularen Anteil des PVN männlicher HAB- und LAB-Tiere indiziert durch Silberkörner im Hellfeld-mikroskopischen Bild. Darunter ist das Ergebnis der quantitativen Analyse der Markierung pro Fläche mittels einer Bildbearbeitungs-Software (Optimas 5.0) dargestellt. 3V: III. Ventrikel. Daten sind Mittelwerte + SEM. * $p<0.05$ vs. LAB (Mann-Whitney U-Test)

Basale Expression von AVP im SON männlicher HAB- und LAB-Ratten

Die basale Expression von AVP in magnozellulären Neuronen des SON männlicher HAB- und LAB-Ratten zeigte keine signifikanten Linien-spezifischen Unterschiede (Mann-Whitney U-Test, $p=0.29$, Abb. 44).

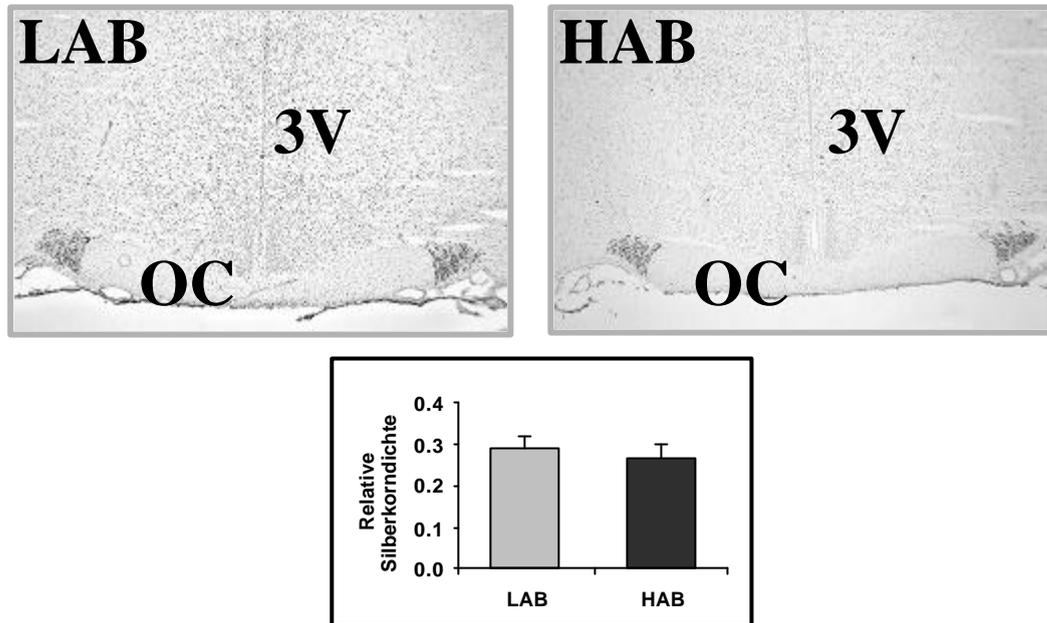


Abb. 44 Basale mRNA-Expression von AVP im SON männlicher HAB- und LAB-Tiere indiziert durch Silberkörner im Hellfeld-mikroskopischen Bild. Darunter ist das Ergebnis der quantitativen Analyse der Markierung pro Fläche mittels einer Bildbearbeitungs-Software (Optimas 5.0) dargestellt. OC: Optisches Chiasma, 3V: III. Ventrikel. Daten sind Mittelwerte + SEM.

3.4.2 Entwicklungsbiologische Determinanten für die emotional extremen Phänotypen der HAB/LAB-Ratten

3.4.2.1 Pränatale Faktoren: Verhaltensbiologische und neuroendokrine Charakterisierung trächtiger HAB/LAB-Weibchen

Versuchsprotokoll (1. Versuchstag, elevated plus-maze und Schwimmstreß)

Virgine HAB- und LAB-Ratten wurden im Alter von 12-14 Wochen mit sexuell erfahrenen Männchen der selben Zuchtlinie verpaart und bis zur Implantation in 3-er (trächtige Tiere) bzw. 5-er (virgine Tiere) Gruppen gehalten. 5 Tage vor Versuchsbeginn wurde trächtigen (280-330 g) und virginen (230-280 g) HAB- und LAB-Weibchen ein

chronischer Jugularvenenkatheter implantiert und dieser am 3. post-operativen Tag mit einer Gentamycin-haltigen Lösung gespült.

Am 5. post-operativen Tag wurden trächtige (18-20. Trächtigkeitstag) und virgine Weibchen beider Zuchtlinien in einem kombinierten Test aus *plus-maze* und Schwimmstreß auf verhaltensbiologische und neuroendokrine Parameter untersucht (Abb. 45). Die Katheter wurden um 8.00 h angekoppelt und nach zwei basalen Blutentnahmen um 9.30 h (0.6 ml für ACTH, Corticosteron, OXT und AVP) und 10.00 h (0.6 ml für ACTH, Corticosteron und Laktat – als Indikator für den physiologischen Aktivierungszustand) wieder abgekoppelt. Anschließend wurden die Tiere 5 min auf der *plus-maze* getestet, danach in die Käfige zurückgebracht und die Katheter angekoppelt. 5 Minuten später erfolgte eine dritte Blutentnahme (0.2 ml, ACTH und Corticosteron). Danach wurden die Tiere einem 90 s-Schwimmstreß (19°C) ausgesetzt, gründlich abgetrocknet und in die Käfige gebracht. Weitere Blutentnahmen folgten nach 5 min (0.3 ml für ACTH, Corticosteron und Laktat), 15 min (0.6 ml für ACTH, Corticosteron, OXT und AVP) und 50 min (0.2 ml, ACTH und Corticosteron). Nach dem Experiment wurden die Katheter mit 0.3 ml Gentamycin-Lösung gespült und abgekoppelt.

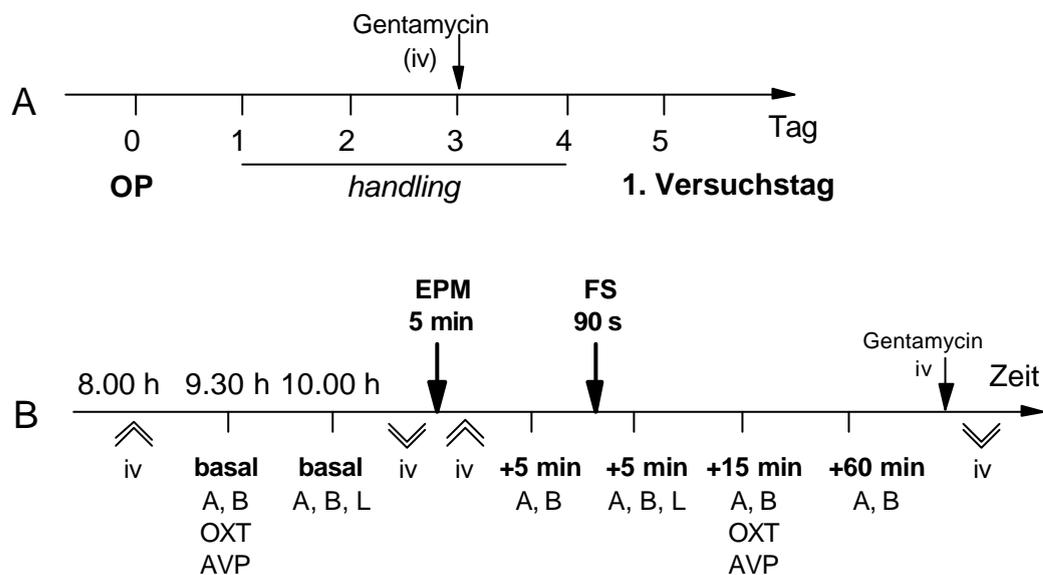


Abb. 45 Post-operativer Zeitraum (A) und 1. Versuchstag (B) mit Zeitplan für die Blutentnahmen für ACTH [A], Corticosteron [B], Oxytocin [OXT], Vasopressin [AVP] und Laktat [L, als Indikator für den physiologischen Aktivierungszustand]. Nach der Entnahme von 2 basalen Blutproben wurden die Tiere 5 min auf der *elevated plus-maze* (EPM) getestet. 5 min nach Zurücksetzen der Tiere in den Heimkäfig erfolgte eine weitere Blutentnahme. Danach wurden die Tiere einem 90 s-Schwimmstreß (FS, 19 °C) ausgesetzt, und weitere Blutentnahmen folgten 5, 15 und 60 min danach. Nach Abschluß des Experimentes wurden die Katheter mit 0.3 ml Gentamycin-Lösung gefüllt und verschlossen. Doppelpfeile nach oben weisen auf die Zeitpunkte des Ankoppelns, Doppelpfeile nach unten auf die Zeitpunkte des Abkoppelns der Katheter (iv) hin.

Verhaltensbiologische Parameter (emotionaler und physischer Stressor)

Auf der *plus-maze*, hier auch als milder emotionaler Stressor verwendet, zeigten virgine Ratten der HAB-Linie - verglichen mit LABs – eine erhöhte Ängstlichkeit, indiziert durch signifikant geringere % Eintritte in die offenen Arme und % Zeit darauf (beide Parameter $p < 0.01$, Abb. 46). Die selben Linien-spezifischen Verhaltensunterschiede bestanden auch zwischen dem 18. und 20. Trächtigkeitstag. So zeigten trächtige HAB-Ratten ebenfalls geringere % Eintritte in die offenen Arme und % Zeit darauf (beide Parameter $p < 0.01$, Abb. 46). Verglichen mit trächtigen LAB-Ratten wurde bei trächtigen HABs eine geringere lokomotorische Aktivität (Anzahl der Eintritte in die geschlossenen Arme) beobachtet ($p < 0.05$ vs. LAB).

Ein Vergleich virginer und trächtiger Tiere derselben Linie zeigte weniger Eintritte in die offenen Arme der *plus-maze* (HAB und LAB jeweils $p < 0.01$) bzw. eine geringere dort verbrachte Zeit (HAB und LAB jeweils $p < 0.01$) bei den trächtigen Weibchen beider Linien. Auch die lokomotorische Aktivität, angezeigt durch die Anzahl der Eintritte in geschlossene Arme, war während der Trächtigkeit verringert ($p < 0.01$ vs. virgin, Abb. 46).

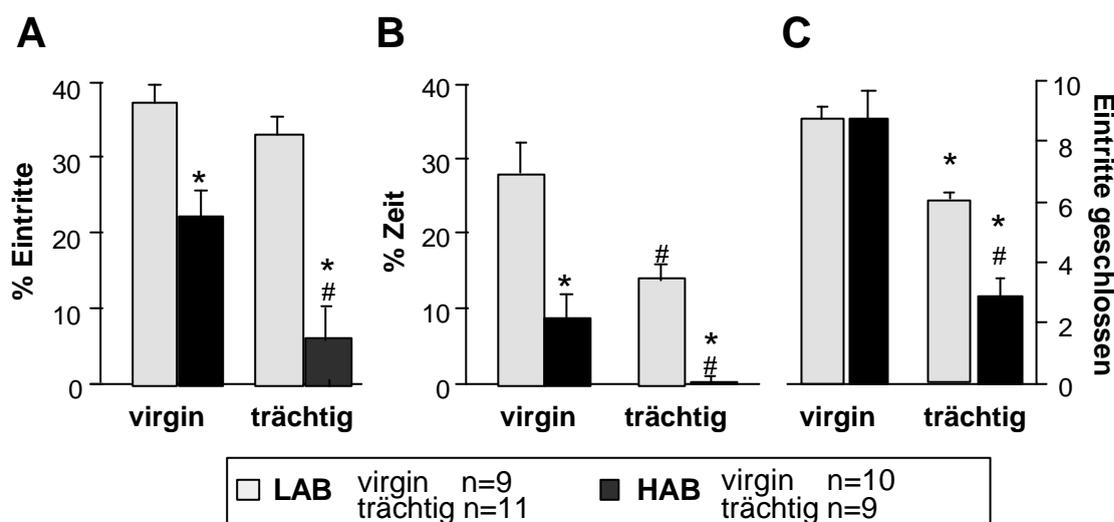


Abb. 46 Verhalten trächtiger (18-20. Trächtigkeitstag) und virginer HAB (hohe Angstdisposition)- und LAB (niedrige Angstdisposition)-Weibchen auf der *elevated plus-maze*. Ängstliches Verhalten von HAB-Ratten wird angezeigt durch einen verminderten Anteil der Eintritte in offene Arme (% Eintritte) und der dort verbrachten Zeit (% Zeit) während 5 min Testdauer. Locomotorische Aktivität wird indiziert durch die Anzahl der Eintritte in die geschlossenen Arme (Eintritte geschlossen). * $p < 0.01$ vs. LAB, # $p < 0.01$ vs. virgine Tiere der selben Linie (2-Weg ANOVA)

Während dem 90 s-Schwimmstreß war die Dauer des aktiven Schwimmens (*struggling*) sowohl bei virginen ($p < 0.01$) als auch bei trächtigen ($p < 0.05$) Weibchen der HAB-Linie (virgin: 35.7 ± 2.68 , trächtig: 34.1 ± 2.93 s) geringer als bei den LAB-Weibchen

(virgin: 52.8 ± 4.00 , trächtig: 48.4 ± 3.24 s) der jeweiligen Gruppe (2-Weg ANOVA, Linie: $F_{1,36}$ 22.8, $p < 0.0001$). Zwischen trächtigen und virginen Weibchen der selben Linie zeigten sich keine Unterschiede im Schwimmverhalten (2-Weg ANOVA, reproduktiver Status: $F_{1,36}$ 0.84, $p = 0.37$, Interaktion: $F_{1,36}$ 0.19, $p = 0.67$).

Neuroendokrine Parameter vor und nach emotionalem / physischem Streß ***ACTH und Corticosteron***

Die Mittelwerte der zwei basalen Plasmakonzentrationen von ACTH (2-Weg ANOVA Faktor Linie: $F_{1,34}$ 8.66, $p = 0.0058$, Reproduktionsstadium: $F_{1,34}$ 6.98, $p = 0.012$, Interaktion: $F_{1,34}$ 6.20, $p = 0.017$) und Corticosteron (Linie: $F_{1,34}$ 0.80, $p = 0.38$, reproduktiver Status: $F_{1,34}$ 13.8, $p = 0.0007$, Interaktion: $F_{1,34}$ 3.28, $p = 0.079$, Abb. 47) am 1. Versuchstag waren bei den trächtigen HAB-Weibchen, verglichen mit allen anderen Gruppen, signifikant erhöht (beide Hormone $p < 0.01$ vs. virgin und vs. LAB). Bei den virginen Tieren hingegen zeigten sich keine Linien-spezifischen Unterschiede der ACTH- und Corticosteron-Freisetzung.

Wurde die Freisetzung von Hormonen der HPA-Achse über den gesamten Versuchsverlauf mit einer 3-Weg ANOVA untersucht, so ergaben sich deutliche Unterschiede bezüglich des Reproduktionsstadiums, nicht jedoch hinsichtlich der Linienzugehörigkeit der Tiere (ACTH: Faktor Linie: $F_{1,36}$ 0.51, $p = 0.48$, Reproduktionsstadium: $F_{1,36}$ 33.1, $p < 0.0001$, Linie x Reproduktionsstadium: $F_{1,36}$ 0.077, $p = 0.78$; Corticosteron: (Linie: $F_{1,36}$ 0.73, $p = 0.40$, Reproduktionsstadium: $F_{1,36}$ 11.0, $p = 0.0021$, Linie x Reproduktionsstadium: $F_{1,36}$ 0.031, $p = 0.86$). Der Zeitverlauf der Plasmakonzentrationen von ACTH (Zeit: $F_{5,180}$ 91.0, $p < 0.0001$, Linie x Zeit: $F_{5,180}$ 2.55, $p = 0.029$, Reproduktionsstadium x Zeit: $F_{5,180}$ 23.8, $p < 0.0001$, Linie x Reproduktionsstadium x Zeit: $F_{5,180}$ 0.77, $p = 0.58$) und Corticosteron (Zeit: $F_{5,180}$ 423, $p < 0.0001$, Linie x Zeit: $F_{5,180}$ 3.05, $p = 0.011$, Reproduktionsstadium x Zeit: $F_{5,180}$ 16.7, $p < 0.0001$, Linie x Reproduktionsstadium x Zeit: $F_{5,180}$ 1.22, $p = 0.30$) wies ebenfalls signifikante Änderungen auf (Abb. 47).

Die 5 min-Exposition auf der *plus-maze* induzierte bei allen Gruppen einen signifikanten Anstieg von Plasma-ACTH und -Corticosteron (beide Hormone $p < 0.05$ vs. basal). Die Stimulation der ACTH-Freisetzung durch *plus-maze*-Exposition war bei trächtigen Tieren beider Linien weniger ausgeprägt ($p < 0.05$ vs. virgin) als bei den jeweiligen virginen Kontrollen, zeigte jedoch keine signifikanten Linien-spezifischen Unterschiede. Im Gegensatz dazu waren die Plasmakonzentrationen von Corticosteron nach *plus-maze* bei den Gruppen nur unwesentlich verschieden (Abb. 47).

Der 90 s-Schwimmstreß induzierte ebenfalls einen Anstieg der Plasmakonzentrationen von ACTH (virgine: $p < 0.01$, trächtige: $p < 0.05$ vs. basal) bzw. Corticosteron (alle Gruppen $p < 0.01$ vs. basal) bei allen Weibchen, welcher jedoch für ACTH bei trächtigen Tieren beider Linien weniger ausgeprägt war ($p < 0.05$ vs. virgin) als bei den jeweiligen virginen Kontrollen. Bei Corticosteron konnten 5 oder 15 min nach der Stressor-Exposition keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden. 50 min danach waren die Werte jedoch bei trächtigen Weibchen beider Linien deutlich höher ($p < 0.05$ vs. virgin). Sowohl bei trächtigen als auch virginen Tieren traten keine nennenswerten Linien-spezifischen Unterschiede der stimulierten ACTH- und Corticosteron-Konzentrationen auf (Abb. 47).

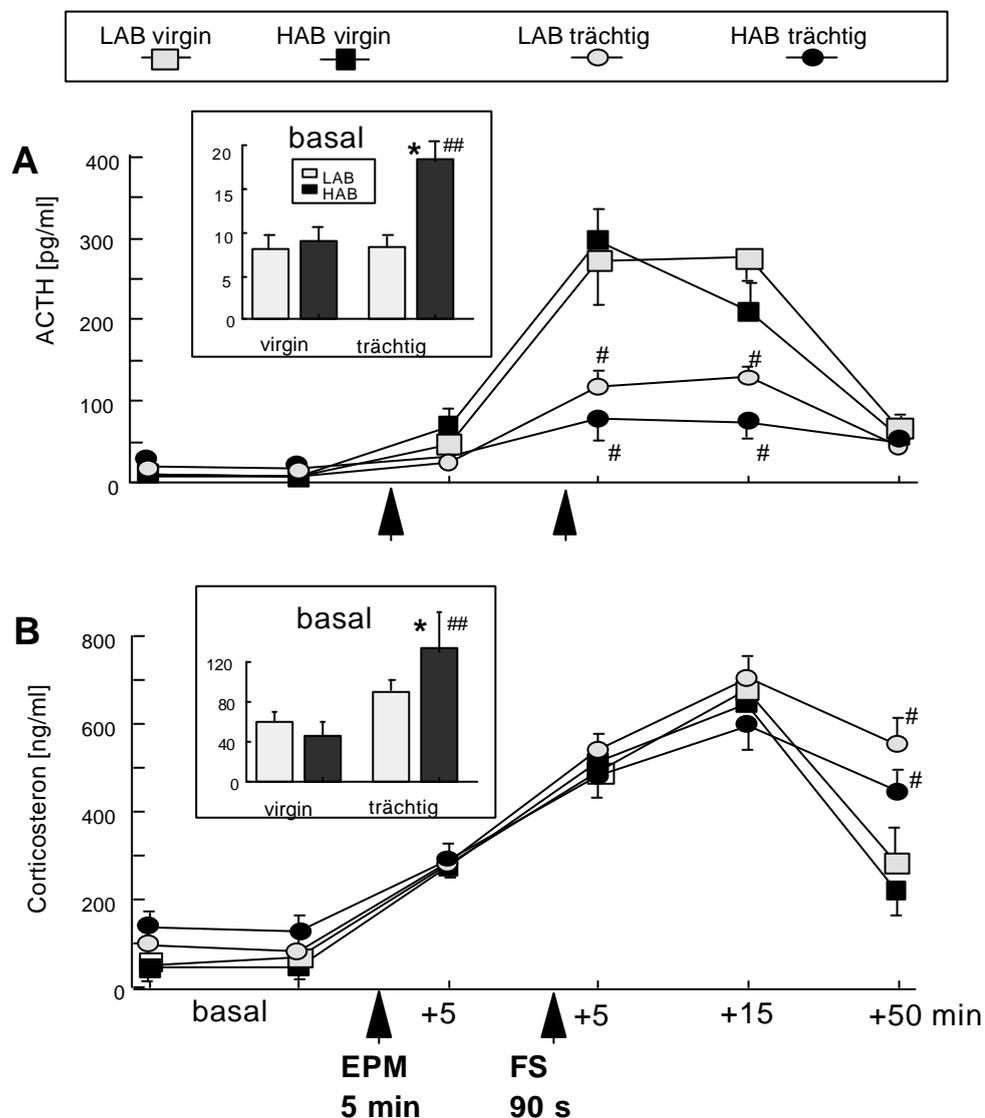


Abb. 47 Plasmakonzentrationen von ACTH (A) und Corticosteron (B) bei virginen und trächtigen (18-20. Trächtigkeitstag) HAB- und LAB-Weibchen unter basalen Bedingungen, 5 min nach *elevated plus-maze* (EPM, 5 min) sowie 5, 15 und 60 min nach Schwimmstreß (FS, 90 s, 19 °C). Zusätzlich sind jeweils die Mittelwerte der 2 basalen Plasmakonzentrationen von ACTH (Insert A) und Corticosteron (Insert B)

dargestellt. Daten sind Mittelwerte +/- SEM. *p<0.01 vs. LAB, # p<0.05 ## p<0.01 vs. die jeweilige virgine Kontrolle (2-Weg ANOVA)

OXT, AVP und Laktat

Die Plasmakonzentrationen von OXT (3-Weg ANOVA, Linie: $F_{1,38}$ 2.05, $p=0.16$, Reproduktionsstadium: $F_{1,38}$ 0.68, $p=0.42$) und AVP (Linie: $F_{1,38}$ 5.27, $p=0.027$, Reproduktionsstadium: $F_{1,38}$ 4.48, $p=0.041$) waren nicht unterschiedlich hinsichtlich des Reproduktionsstadiums oder der Linienzugehörigkeit (Tabelle 7). 15 min nach dem Schwimmstreß war die Freisetzung von OXT in allen Gruppen signifikant erhöht ($p<0.001$), mit einem tendenziell niedrigeren Anstieg bei virginen und trächtigen HABs (3-Weg ANOVA, Zeit: $F_{1,38}$ 30.4, $p<0.0001$, Reproduktionsstadium x Zeit: $F_{1,38}$ 0.062, $p=0.81$, Linie x Reproduktionsstadium x Zeit: $F_{1,38}$ 0.0005, $p=0.98$). Dahingegen fiel die Plasmakonzentration von AVP zum gleichen Zeitpunkt eher ab (3-Weg ANOVA, Zeit: $F_{1,38}$ 22.2, $p<0.0001$, Linie x Zeit: $F_{1,38}$ 6.39, $p=0.016$, Linie x Reproduktionsstadium x Zeit: $F_{1,38}$ 2.09, $p=0.16$), wobei diese Reduktion bei trächtigen HAB-Ratten signifikant wurde ($p<0.05$ vs. basal, $p<0.01$ vs. alle anderen Gruppen, Tabelle 7).

Die basalen Plasmakonzentrationen von Laktat unterschieden sich nicht hinsichtlich der Linienzugehörigkeit, jedoch waren sie bei trächtigen Tieren beider Linien deutlich erhöht ($p<0.05$ vs. virgin). Der Schwimmstreß induzierte einen signifikanten ($p<0.001$ vs. basal) Anstieg der Laktat-Konzentration im Blutplasma aller Gruppen (3-Weg ANOVA, Linie x Reproduktionsstadium: $F_{1,14}$ 39.1, $p<0.0001$, Zeit: $F_{1,14}$ 2596, $p<0.0001$, Linie x Zeit: $F_{1,14}$ 0.95, $p=0.35$, Reproduktionsstadium x Zeit: $F_{1,14}$ 156, $p<0.0001$, Linie x Reproduktionsstadium x Zeit: $F_{1,14}$ 20.6, $p=0.0005$), welcher bei virginen und trächtigen HAB-Ratten geringer ausgeprägt war als bei den jeweiligen LABs (virgin: $p<0.01$, trächtig: $p<0.05$ vs. LAB, Tabelle 7).

Tabelle 7 Plasmakonzentrationen von OXT, AVP und Laktat bei virginen und trächtigen HAB- und LAB-Ratten. Je eine Blutprobe wurde unter basalen Bedingungen und zu den angegebenen Zeitpunkten nach 90 s Schwimmstreß (FS, 19 °C) entnommen. Daten sind Mittelwerte ± SEM. *p<0.05, **p<0.01 vs. LAB; # p<0.05 vs. virgin; + p<0.05, ++ p<0.01 vs. basal (3-Weg ANOVA)

		HAB		LAB	
		virgin (n=11)	trächtig (n=9)	virgin (n=9)	trächtig (n=11)
OXT [pg/Probe]	basal	0.93±0.06	1.64±0.37	1.07±0.27	1.50±0.11
	FS + 15 min	4.04±1.13 ++	5.14±0.54 ++	6.87±3.59 ++	7.76±1.48 ++
AVP [pg/Probe]	basal	3.33±0.40	2.76±0.44	3.31±0.26	3.01±0.32
	FS + 15 min	2.46±0.32	1.36±0.12 +	2.78±0.30	2.86±0.26

Laktat	basal	6.47±1.07	12.8±0.13 #	6.65±0.64	9.02±1.68 #
[mmol/l]	FS + 5 min	35.6±3.68 ++ **	51.7±1.43 ++ *	65.8±3.02 ++	61.9±2.73 ++

Versuchsprotokoll (2. Versuchstag, Behandlung mit humanem CRH)

Am 6. post-operativen Tag wurde die Reaktivität der Adenohypophyse auf pharmakologische Behandlung mit humanem CRH (50 ng/kg, 0.5 ml/kg, Bissendorf Peptide, Wedemark, Deutschland) untersucht (Abb. 48). Die Tiere wurden um 8.00 h gewogen und die Katheter angekoppelt. Nach zwei basalen Blutentnahmen (0.2 ml, ACTH und Corticosteron) um 9.30 h und 10.00 h wurde CRH über den Jugularvenenkatheter injiziert. Jeweils 10, 30 und 60 min später erfolgten weitere Blutentnahmen (je 0.2 ml, ACTH und Corticosteron). Nach dem Experiment wurden die Tiere mit einer Überdosis Halothan getötet. Die Trächtigkeit wurde *post mortem* bestätigt.

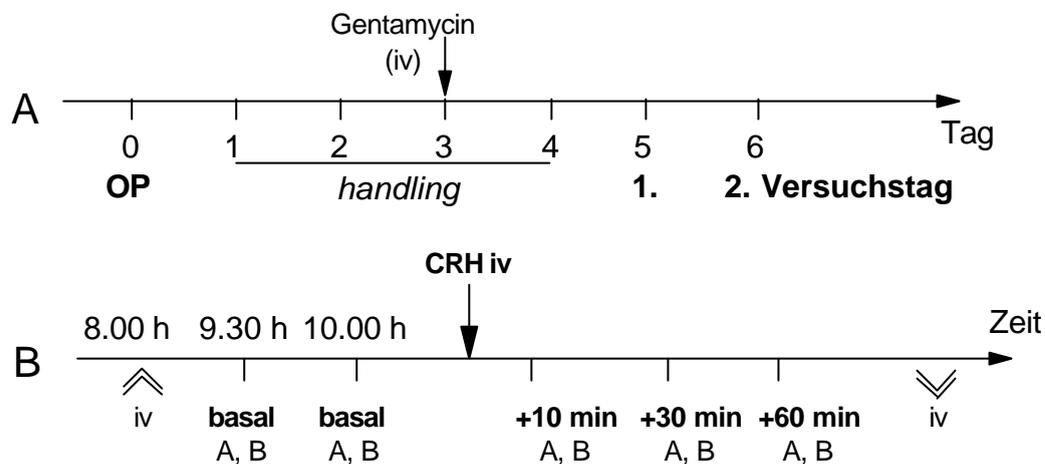


Abb. 48 Post-operativer Zeitraum (A) und 2. Versuchstag (B) mit Zeitplan für die Blutentnahmen für ACTH [A] und Corticosteron [B]. Nach der Entnahme von 2 basalen Blutproben wurde den Tieren humanes CRH (50 ng/kg, 0.5 ml/kg) oder Vehikel (0.5 ml/kg) durch den Jugularvenenkatheter (iv) injiziert. Weitere Blutentnahmen folgten 10, 30 und 60 min danach. Doppelpfeile nach oben weisen auf die Zeitpunkte des Ankoppelns, Doppelpfeile nach unten auf die Zeitpunkte des Abkoppelns der Katheter (iv) hin.

Neuroendokrine Parameter; Pharmakologische Stimulation mit CRH

Wie am 1. Versuchstag waren die basalen Plasmakonzentrationen von ACTH und Corticosteron bei trächtigen HAB-Weibchen deutlich höher als bei allen anderen Gruppen (ACTH $p < 0.05$, Corticosteron $p < 0.01$ vs. virgin und vs. LAB, Abb. 49). Bei den virginen Tieren hingegen zeigten sich keine Linien-spezifischen Unterschiede in der ACTH- und Corticosteron-Freisetzung.

Die iv-Injektion von CRH bewirkte in allen Gruppen einen signifikanten Anstieg von Plasma-ACTH und -Corticosteron (beide Hormone $p < 0.01$). Die Stimulation der

ACTH-Freisetzung durch CRH war bei trächtigen Tieren beider Linien weniger ausgeprägt ($p < 0.01$ vs. virgin) als bei den jeweiligen virginen Kontrollen, zeigte jedoch kaum Linien-spezifische Unterschiede (3-Weg ANOVA, Linie $F_{1,37}$ 0.087, $p = 0.77$, Reproduktionsstadium: $F_{1,37}$ 18.7, $p = 0.0001$, Linie x Reproduktionsstadium: $F_{1,37}$ 7.53, $p = 0.0093$, Zeit: $F_{4,148}$ 89.73, $p < 0.0001$, Linie x Zeit: $F_{4,148}$ 3.76, $p = 0.0061$, Reproduktionsstadium x Zeit: $F_{4,148}$ 30.3, $p < 0.0001$, Linie x Reproduktionsstadium x Zeit: $F_{4,148}$ 1.11, $p = 0.36$). Auch die Plasmakonzentrationen von Corticosteron waren nach CRH-Injektion in allen Gruppen angestiegen; eine Trächtigkeits-bedingte Suppression dieses Anstieges konnte allerdings nur bei HAB-Weibchen ($p < 0.01$), nicht aber bei LABs, beobachtet werden (3-Weg ANOVA, Linie: $F_{1,37}$ 2.27, $p = 0.14$, Reproduktionsstadium: $F_{1,37}$ 41.7, $p < 0.0001$, Linie x Reproduktionsstadium: $F_{1,37}$ 0.35, $p = 0.56$, Zeit: $F_{4,148}$ 71.8, $p < 0.0001$, Linie x Zeit: $F_{4,148}$ 5.35, $p = 0.0005$, Reproduktionsstadium x Zeit: $F_{4,148}$ 0.91, $p = 0.46$, Linie x Reproduktionsstadium x Zeit: $F_{4,148}$ 1.72, $p = 0.15$, Abb. 49).

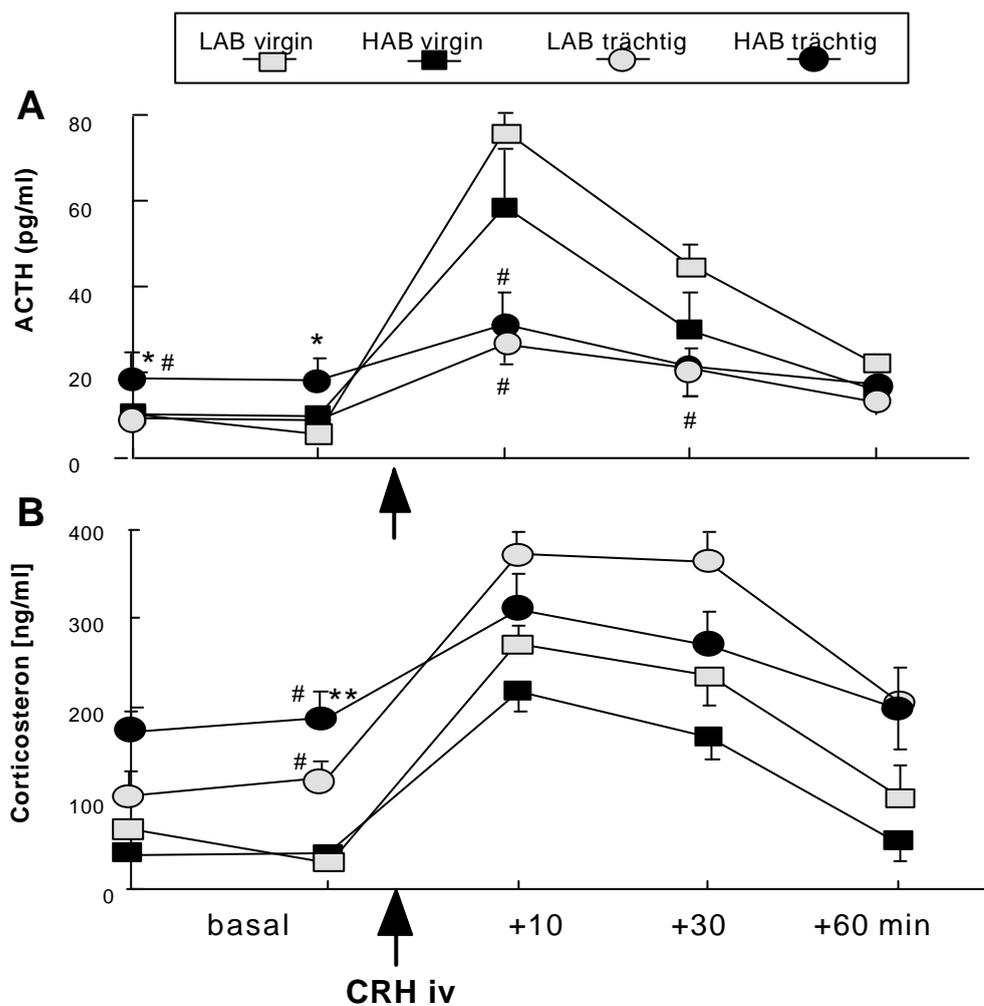


Abb. 49 Plasmakonzentrationen von ACTH (A) und Corticosteron (B) bei virginen und trächtigen (19.-21. Trächtigkeitstag) HAB- und LAB-Weibchen unter basalen Bedingungen sowie 10, 30 und 60 min nach iv-Applikation von humanem CRH (50

ng/kg, 0.5 ml/kg). Daten sind Mittelwerte +/- SEM. * p<0.05, **p<0.01 vs. LAB; # p<0.05, ## p<0.01 vs. jeweilige virgine Kontrolle (3-Weg ANOVA)

3.4.2.2 Unmittelbar postnatale Faktoren: *cross-fostering* -Studie

Verhaltensbiologische Untersuchungen

Die bei der Naivtestung im Alter von 10 Wochen erhobenen Daten auf der *plus-maze* zeigten keine Unterschiede zwischen den adoptierten Tieren, die durch Mütter der anderen Linie aufgezogen wurden (*cross-fostering*) und dem regulären, im gleichem Zeitraum und in der selben Generation aufgewachsenen Zuchtnachwuchs bzw. den Geschwistern der *cross-fostering*-Tiere aus vorangegangenen oder nachfolgenden Würfen (Tabelle 8).

Tabelle 8 Verhaltensparameter auf der *elevated plus-maze* bei männlichen (A) und weiblichen (B) HAB- (hohe Angstdisposition) und LAB- (niedrige Angstdisposition) Ratten, die vom 1. postnatalen Tag bis zum Absetzen im Alter von 3 Wochen bei einem Muttertier der anderen Linie aufgezogen wurden (*cross-fostering*, CF). Als Kontrollen dienten sowohl reguläre Zuchttiere der selben Generation, die im gleichen Zeitraum geboren wurden (Zeitraum), als auch Geschwistertiere aus vorangegangenen oder folgenden Würfen (Geschwister). Angstbezogenes Verhalten wird angezeigt durch Eintritte in offene Arme (% Eintritte), in offenen Armen verbrachte Zeit (% Zeit) und Anzahl vollständiger Eintritte während 5 min Testdauer. Die Latenzzeit bis zum ersten Eintritt in einen offenen Arm indiziert ebenfalls angstbezogenes Verhalten. Lokomotorische Aktivität wird gezeigt durch die Anzahl der Eintritte in geschlossene Arme. Daten sind Mittelwerte ± SEM (n= Anzahl der Würfe).

		Eintritte geschlossen	% Eintritte	% Zeit	Latenzzeit [s]	Vollständige Eintritte
A) Männchen						
<u>LAB</u>						
Geschwister	n=8	8.63±0.88	44.9±1.03	42.2±4.82	44.0±13.8	4.58±0.70
Zeitraum	n=11	8.54±0.40	43.4±2.57	42.9±4.64	37.5±7.82	4.76±0.56
CF	n=4	8.23±0.53	46.4±1.69	46.5±1.21	38.9±5.23	5.20±0.51
<u>HAB</u>						
Geschwister	n=5	6.67±0.89	21.6±3.60	9.67±3.67	110±25.3	0.76±0.33
Zeitraum	n=13	6.73±0.40	29.8±2.21	15.0±2.92	56.8±9.93	1.01±0.22
CF	n=4	6.27±0.87	22.0±6.36	6.91±2.54	110±35.3	0.62±0.28
B) Weibchen						
<u>LAB</u>						
Geschwister	n=7	9.66±0.55	45.8±1.32	45.7±2.95	27.7±3.49	5.84±0.54
Zeitraum	n=17	8.96±0.29	44.8±1.09	44.2±2.29	30.4±3.74	5.27±0.36
CF	n=4	10.2±0.46	42.8±2.90	39.5±3.41	37.5±9.07	6.21±1.83
<u>HAB</u>						
Geschwister	n=5	7.47±1.03	30.4±4.55	13.7±2.60	67.3±32.9	1.70±0.28

Zeitraum	n=11	8.19±0.89	28.0±3.06	14.1±2.46	57.6±22.3	1.47±0.20
CF	n=4	6.71±2.00	27.4±8.82	16.5±9.98	93.6±61.9	1.98±1.28

3.4.2.3 Genetische Faktoren: *cross-mating*-Studie

Verhaltensbiologische Untersuchungen

Die bei der Naivtestung im Alter von 10 Wochen erhobenen Daten auf der *plus-maze* ergaben signifikante Unterschiede zwischen dem *cross-mating*-Nachwuchs (F1 und F2) und dem regulären, im gleichen Zeitraum und in der selben Generation aufgewachsenen Zuchtnachwuchs (F1-Kontrolle). Sowohl bei männlichen als auch bei weiblichen Tieren lagen die *cross-mating*-Nachkommen bei allen angstbezogenen Parametern der *plus-maze*-Testung (% Eintritte, % Zeit, Abb. 50; vollständige Eintritte in die offenen Arme, Latenzzeit bis zum ersten Eintritt in einen offenen Arm, Tabelle 9) zwischen den Werten der HAB- und LAB-F1-Kontrollen (Abb. 50, Tabelle 9). Die statistische Analyse des Anteils der Eintritte in offene Arme an den Eintritten in alle Arme (% Eintritte) ergab keine Geschlechts-spezifischen Unterschiede (2-Weg ANOVA, Geschlecht: $F_{1,515} 0.43$, $p=0.51$), jedoch konnten signifikante Linien-spezifische Differenzen gezeigt werden (Linie: $F_{5,515} 16.7$, $p<0.0001$, Interaktion: $F_{5,515} 1.93$, $p=0.087$). Ebenso war der Anteil der in den offenen Armen verbrachten Zeit an der in allen Armen verbrachten Gesamtzeit (% Zeit) nicht unterschiedlich zwischen den Geschlechtern (2-Weg ANOVA, Geschlecht: $F_{1,515} 0.093$, $p=0.76$), zeigte aber deutliche Linien-spezifische Differenzen (Linie: $F_{5,515} 32.9$, $p<0.0001$, Interaktion $F_{5,515} 0.95$, $p=0.45$, Abb. 50). Auch die Anzahl der vollständigen Eintritte in einen offenen Arm differierte sowohl hinsichtlich des Geschlechts (2-Weg ANOVA, Geschlecht: $F_{1,515} 23.8$, $p<0.0001$) als auch bezüglich der untersuchten Linien (Linie: $F_{5,515} 31.9$, $p<0.0001$, Interaktion $F_{5,515} 0.90$, $p=0.48$, Tabelle 9). Weiterhin ergab die Analyse der Latenzzeit bis zum ersten Eintritt in einen offenen Arm, daß weibliche Tiere im Allgemeinen die offenen Arme eher betreten als ihre männlichen Artgenossen (2-Weg ANOVA, Geschlecht: $F_{1,515} 9.90$, $p=0.0017$). Zudem konnten auch in diesem Parameter signifikante Linien-spezifische Differenzen gezeigt werden (Linie: $F_{5,515} 3.15$, $p=0.0081$, Interaktion $F_{5,515} 3.16$, $p=0.010$, Tabelle 9).

Bei der die lokomotorische Aktivität beschreibenden Anzahl der Eintritte in geschlossene Arme zeigten sich die weiblichen Tiere aktiver (2-Weg ANOVA, Geschlecht: $F_{1,515} 61.4$, $p<0.0001$). Linien-spezifische Unterschiede konnten nur bei männlichen F1-Kontrollen beobachtet werden, wobei hier HABs weniger Eintritte in die geschlossenen Arme der *plus-maze* zeigten als LABs (Linie: $F_{5,515} 5.61$, $p<0.0001$, Interaktion $F_{5,515} 1.49$, $p=0.19$, Abb. 50).

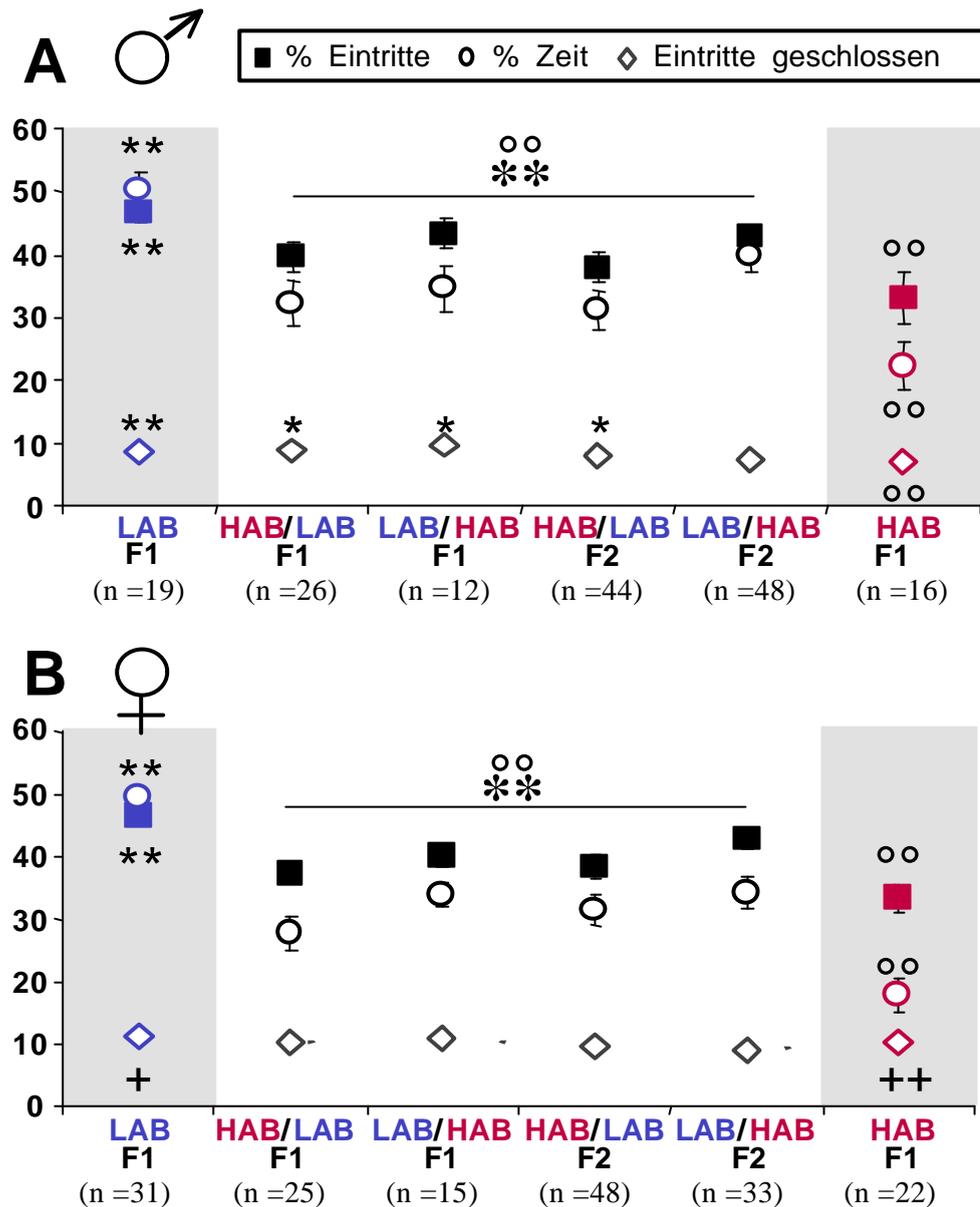


Abb. 50

Verhalten männlicher (A) und weiblicher (B) HAB (hohe Angstdisposition)- und LAB (niedrige Angstdisposition)-Ratten sowie von Intermediärtieren aus einer Kreuzung (*cross-mating*, CM) der beiden Linien (F1- und F2-Intermediate) auf der *elevated plus-maze*. Angstbezogenes Verhalten wird angezeigt durch den Anteil der Eintritte in die offenen Arme an der Gesamtanzahl der Eintritte in alle Arme (% Eintritte) bzw. durch den Anteil der in offenen Armen verbrachten Zeit an der in allen Armen verbrachten Gesamtzeit (% Zeit) während 5 min Testdauer. Lokomotorische Aktivität wird indiziert durch die Anzahl der Eintritte in die geschlossenen Arme (Eintritte geschlossen). * $p < 0.05$ ** $p < 0.01$ vs. HAB-F1-Kontrollen, ° $p < 0.05$ vs. LAB-F1-Kontrollen, + $p < 0.05$ ++ $p < 0.01$ vs. Männchen (2-Weg ANOVA)

Tabelle 9 Weitere Verhaltensparameter bei männlichen (**A**) und weiblichen (**B**) HAB (hohe Angstdisposition)- und LAB (niedrige Angstdisposition)-Ratten sowie bei Intermediärtieren aus einer Kreuzung (*cross-mating*, CM) der beiden Linien (F1- und F2-Intermediate) auf der *elevated plus-maze*. Angstbezogenes Verhalten wird angezeigt durch die Anzahl vollständiger Eintritte in die offenen Arme (vollst. Eintritte) und durch die Latenzzeit bis zum ersten Eintritt in einen der offenen Arme. * p<0.01 ** p<0.01 vs. HAB-F1-Kontrollen, °° p<.05 vs. LAB-F1-Kontrollen, ++ p<0.01 vs. Männchen (2-Weg ANOVA)

	<u>LAB</u> F1-Kontrolle	HAB/LAB F1-CM	LAB/HAB F1-CM	HAB/LAB F2-CM	LAB/HAB F2-CM	<u>HAB</u> F1-Kontrolle
A) Männchen						
vollst. Eintritte	4.92±0.32 **	2.87±0.30 ** °°	2.90±0.38 * °°	2.68±0.37 ** °°	3.10±0.24 ** °°	1.22±0.34 °°
Latenzzeit [s]	30.5±3.62 **	34.4±4.76 **	37.2±9.38 **	51.4±11.3 *	37.0±7.43 **	77.2±16.8 °°
B) Weibchen						
vollst. Eintritte	6.44±0.37 ** ++	3.05±0.26 °°	3.98±0.25 ** °°	3.71±0.35 ** °°	3.91±0.38 ** °°	2.12±0.28 °°
Latenzzeit [s]	24.0±2.82 **	311±5.04	31.9±4.62	40.7±8.03	32.5±6.37	27.0±4.02 °° ++

4 Diskussion

Im Rahmen dieser Arbeit konnte zunächst gezeigt werden, daß die basale und Streß-induzierte Aktivität der HPA-Achse bei männlichen und virginen weiblichen Ratten unter inhibitorischer Kontrolle durch zentral freigesetztes OXT steht, die teilweise über Neuronen des PVN vermittelt wird (siehe Kap. 3.1.1). Die neurohypophysäre Freisetzung von OXT sowie die Expression angstbezogenen Verhaltens hingegen schienen bei virginen Weibchen unabhängig von zentralem OXT zu sein.

Frühere Ergebnisse bestätigend, konnte während der peripartalen Periode eine verminderte Streßreaktivität der HPA-Achse beobachtet werden. Erstmals wurde eine deutliche Suppression der Freisetzung von ACTH und Corticosteron auch während der Geburt gezeigt (siehe Kap. 3.2). Obwohl die basale Sekretion von OXT ins Blut während der Trächtigkeit erhöht zu sein schien, konnten keine deutlichen Unterschiede der Streß-induzierten Sekretion zwischen virginen und trächtigen Ratten beobachtet werden. Auch die zentrale Freisetzung von OXT im PVN unterlag keinen merklichen Reproduktions-bedingten Modifikationen, wohingegen die Freisetzung im SON bei trächtigen Tieren allgemein reduziert war (siehe Kap. 3.3). Deutliche Veränderungen während der peripartalen Periode konnten allerdings hinsichtlich der Wirkungen intrazerebral freigesetzten OXTs nachgewiesen werden. So verschwand die tonische Inhibition der HPA-Achse durch OXT während Trächtigkeit und Laktation, wobei in dieser Phase die Streß-induzierte neurohypophysäre Freisetzung von OXT durch zentrales OXT kontrolliert wurde (siehe Kap. 3.1.2). Zudem wurde bei trächtigen und laktierenden Tieren ein anxiolytischer Effekt endogenen OXTs demonstriert (siehe Kap. 3.1).

Weiteren Resultaten zufolge wird die Reproduktions-bezogene Modifikation der neuroendokrinen Streßreaktivität u. a. durch Opiat-Rezeptoren vermittelt. Während die Reaktivität der HPA-Achse auf Schwimmstreß bei virginen Weibchen durch endogene Opiate stimuliert wird, verschwindet dieser Effekt im Laufe der Trächtigkeit, um sich letztlich zu einer effektiven Inhibition der HPA-Achse während der Geburt umzukehren (siehe Kap. 3.2). Auch die neurohypophysäre Freisetzung von OXT, bei virginen Tieren nicht durch Opiate beeinflußt, wurde gegen Ende der Trächtigkeit und während der Geburt effektiv durch endogene Opiate kontrolliert (siehe Kap. 3.2). Unabhängig von der peripheren Sekretion wird die Freisetzung von OXT im PVN von virginen Tieren durch endogene Opiate stimuliert. Während der Trächtigkeit jedoch kehrt sich diese Stimulation in eine effektive Inhibition um (siehe Kap. 3.3). Im SON hingegen konnte auch bei trächtigen Tieren keine Opiat-Wirkung beobachtet werden.

Zusammengefaßt zeigen die Daten deutliche Veränderungen zentraler OXT- oder Opiat-vermittelter Mechanismen während der peripartalen Periode und werden ausführlich in Kapitel 4.1 und 4.2 dargestellt und diskutiert. Die peripartale Periode erwies sich jedoch nicht als das ideale Tiermodell zum Studium der engen Beziehung zwischen HPA Achse und Emotionalität, da verhaltensbiologische und neuroendokrine Vorgänge sehr stark auf die Erfordernisse der Reproduktion ausgerichtet sind und zudem dissoziiert reguliert werden. Aus diesem Grunde schien es sinnvoll, sich dem Tiermodell der HAB/LAB-Ratten zuzuwenden, das eindeutig und selektiv pathophysiologische Veränderungen der Emotionalität vorweist. Hier konnte die Assoziation von verhaltensbiologischen und neuroendokrinen Vorgängen ohne störende Einflüsse, z. B. durch Reproduktions-bezogene hormonelle Schwankungen, untersucht werden.

Die verhaltensbiologische Charakterisierung von HAB/LAB-Ratten ergab konstante Unterschiede der Emotionalität in jedem Lebensalter und Geschlecht sowie auch während der peripartalen Periode. Zudem wurden deutliche Linien-spezifische Differenzen in verschiedenen angstbezogenen Tests beobachtet (siehe Kap. 3.4.1.1). Die neuroendokrinen Untersuchungen von HAB/LAB-Ratten zeigten bei HAB-Männchen, neben einer erhöhten basalen und Streß-induzierten Sekretion von Prolaktin, eine erhöhte Reaktivität der HPA-Achse auf einen emotionalen Stressor (*open-arm*, siehe Kap. 3.4.1.2). Die Mikrodialyse im PVN ergab weder unter basalen noch unter stimulierten Konditionen eine zwischen den Linien differierende Freisetzung von OXT, wohingegen bei männlichen HABs eine erhöhte basale sowie Schwimmstreß-induzierte Freisetzung von AVP gezeigt werden konnte (siehe Kap. 3.4.1.3). Zudem wurde mittels *in situ* Hybridisierung eine signifikant höhere basale Expression von AVP-mRNA im magnozellularen Anteil des PVN von HAB-Ratten nachgewiesen (siehe Kap. 3.4.1.4). Diese Ergebnisse deuten auf eine Assoziation der erhöhten Streßreaktivität von HAB-Ratten mit einer gesteigerten Expression und Freisetzung von AVP im PVN hin und werden in Kapitel 4.3 eingehender beschrieben und diskutiert. Wie durch die *cross-mating*-Studie bestätigt, liegt bei HAB/LAB-Ratten eine eindeutige genetische Determination des zwischen den Linien differierenden angstbezogenen Verhaltens vor (Kap. 3.4.2.1). Die Untersuchung perinataler Faktoren, die an der Ausprägung der differentiellen Emotionalität von HAB- und LAB-Ratten beteiligt sein könnten, ergab erhöhte Corticosteron-Konzentrationen im Blut trächtiger HAB-Weibchen unter basalen Bedingungen und somit die Möglichkeit einer zusätzlichen hormonellen Beeinflussung der HAB-Föten. Im Gegensatz dazu scheinen postnatale Einflüsse, d. h. mütterliches Verhalten, bei der Ausprägung der Emotionalität bei Tieren beider Linien keine große Rolle zu spielen (siehe Kap. 4.3).

4.1 Regulation der hypothalamo-adenohypophysär-adrenocorticalen Achse und des emotionalen Verhaltens durch das zentrale oxytocinerge System

Bei adulten männlichen und virginen weiblichen Ratten wurde die Aktivität der HPA-Achse durch zentrale Applikation eines OXT-Rezeptor-Antagonisten sowohl unter basalen Bedingungen als auch nach *plus-maze*-Exposition stimuliert (Abb. 8). Eine ähnliche Stimulation der basalen Freisetzung von ACTH durch zentral sezerniertes OXT konnte nach lokaler bilateraler Retrodialyse des Antagonisten in beide PVNs festgestellt werden (Abb. 10), wenn auch in geringerer Ausprägung. Auch die icv-Infusion eines V1-Rezeptor-Antagonisten bei virginen Weibchen zeigte einen inhibitorischen Effekt von zentral freigesetztem AVP auf die basale und stimulierte ACTH- und Corticosteron-Freisetzung. Im Gegensatz zu den deutlichen Effekten der zentralen Applikation der OXT- oder V1-Antagonisten auf die HPA-Achse, wurde sowohl bei männlichen als auch virginen weiblichen Tieren weder das angstbezogene Verhalten (% Eintritte und % Zeit) noch die lokomotorische Aktivität (Anzahl der Eintritte in die geschlossenen Arme) auf der *plus-maze* durch die Behandlung beeinflusst (Tabelle 1).

Als Hormon des hypothalamo-neurohypophysären Systems wird OXT in magnozellulären Neuronen von PVN und SON gebildet und seine Freisetzung von neurohypophysären Nervenendigungen in den peripheren Blutkreislauf durch eine Vielfalt von Stressoren ausgelöst (Carter & Lightman 1987a, Nishioka et al. 1998, Wotjak et al. 1998). Aufgrund dieser Beobachtung wurde seit langem eine mögliche Beteiligung von Plasma-OXT an der Regulation der ACTH- und Corticosteron/Cortisol-Freisetzung vermutet und bisher vor allem auf hypophysärer und adrener Ebene untersucht. Abhängig von der Spezies, dem gewählten Stressor und dem experimentellen Design wurden sowohl inhibitorische (Legros et al. 1987, Uvnäs-Moberg 1997) als auch exzitatorische (Gibbs 1985, Link et al. 1992) Wirkungen von OXT auf die Streß-induzierte Aktivierung der HPA-Achse beobachtet (siehe Übersichtsartikel Raff 1993). Da die hypophysäre Expression des OXT-Rezeptor-Gens auf laktotrope Zellen beschränkt zu sein scheint (Breton et al. 1995), werden die stimulierenden Effekte von Plasma-OXT auf adenoypophysäre corticotrope Zellen vermutlich über AVP-V1b- Rezeptoren vermittelt (Schlosser et al. 1994). Es ist also sehr unwahrscheinlich, daß der hier beschriebene inhibitorische Effekt zentralen OXTs auf die ACTH-Freisetzung durch eine Diffusion des icv-applizierten OXT-Antagonisten zu den corticotropen Zellen verursacht wird.

Intrazerebrale OXT-Freisetzung (Neumann & Landgraf 1989, Neumann et al. 1993, Nishioka et al. 1998, Ebner et al. 1999), OXT-Rezeptor-Expression (Yoshimura et al.

1993, Young et al. 1997) und OXT-Bindung (Brinton et al. 1984, Freund-Mercier et al. 1987, Tribollet et al. 1988, Kremarik et al. 1991, Patchev et al. 1993) konnten sowohl bei männlichen als auch weiblichen Ratten in verschiedenen Hirnregionen nachgewiesen werden. Dieses gilt auch für solche, die als reich an Glucocorticoid-Rezeptoren beschrieben wurden und deren Beteiligung an der Regulation afferenter Projektionen zu den hypothalamischen CRH-Neuronen und an der negativen Rückkopplung auf die HPA-Achse bekannt ist (Levin et al. 1988, Ur & Grossman 1994, Feldman & Weidenfeld 1995). Die stimulierende Wirkung des OXT-Antagonisten auf die HPA-Achse war ebenfalls, wenn auch in geringerem Maße als nach icv-Applikation, nach bilateraler Retrodialyse in die hypothalamischen PVNs vorhanden (Abb. 10). Dieses Ergebnis signalisiert eine teilweise Vermittlung des Effekts von zentralem OXT auf die ACTH-Freisetzung über Neuronen des PVN. Zudem ist es vorstellbar, daß der hier beschriebene inhibitorische Effekt von endogenem OXT auf die Aktivität der HPA-Achse zumindest teilweise auch über limbische Regionen, wie z. B. Hippokampus, Amygdala und Septum vermittelt wird. In diesem Kontext sollte erwähnt werden, daß die Anzahl zentraler OXT-Rezeptoren durch Dexamethason-Behandlung (Patchev et al. 1993) sowie hohe Konzentrationen von Glucocorticoiden und nach chronischem Streß (Liberzon & Young 1997) hochreguliert wurde. Diese Beobachtung suggeriert eine Beteiligung von endogenem OXT an der Beendigung der Streßreaktion oder an adaptiven Prozessen (z. B. bei wiederholter Stressor-Exposition), die zu einer verminderten Reaktivität der HPA-Achse führen. Zudem könnte OXT in limbischen Arealen in Langzeiteffekte von Streß auf Gedächtnisprozesse und damit in die Entwicklung von Streßbewältigungs-Strategien einbezogen sein. Ähnlich multiple Funktionen bei neuroendokrinen und kognitiven Prozessen wurden ebenfalls für AVP vorgeschlagen (Wotjak et al. 1994, 1996, Landgraf et al. 1995a, b, Makara et al. 1996, Liebsch et al. 1996, Engelmann et al. 1996, Raggenbass et al. 1998, Ebner et al. 1999). Für dieses Neuropeptid wurden, abhängig von dem Ort der Freisetzung, stimulierende (Sekretion in das hypophysäre Portalblut) oder inhibitorische (Freisetzung im PVN) Wirkung auf die HPA-Achse (Makara et al. 1996, Wotjak et al. 1996) und zudem eine Schlüsselrolle bei kognitiven Funktionen und Streßbewältigungs-Strategien (Engelmann et al. 1996, Ebner et al. 1999) beschrieben.

Aus der stimulierenden Wirkung des lokal in die PVNs applizierten OXT-Antagonisten auf die basale Freisetzung von ACTH läßt sich schließen, daß endogenes OXT eine inhibitorische Wirkung auf diejenigen Neuronen des PVN hat, die maßgeblich in die Regulation der HPA-Achse involviert sind, nämlich parvozelluläre CRH- und AVP-synthetisierende Neuronen. OXT-Rezeptor mRNA (Yoshimura et al 1993, Young et al. 1997)

und OXT-Bindungsstellen (Freund-Mercier et al. 1987) sowie ein Einfluß von OXT auf die elektrophysiologische Aktivität nicht-phasierer Neuronen (Kuriyama et al. 1993) wurden im PVN gefunden. Weiterhin wird OXT nach physischen Stimuli, wie z. B. Schwimmstreß, im Hypothalamus sezerniert (Nishioka et al. 1998, Wotjak et al. 1998). Solch lokal freigesetztes OXT könnte also zu dem Zusammenspiel verschiedenster Neurotransmitter / Neuromodulatoren beitragen, die an der Regulation der Aktivität von CRH/AVP-Neuronen im PVN beteiligt sind, einschließlich CRH und AVP selbst (Plotsky et al. 1984, Wotjak et al. 1996), Noradrenalin (Ur & Grossman 1994, Toufexis & Walker 1996), Serotonin und GABA (siehe Übersichtsartikel Itoi et al. 1998). In der vorliegenden Studie zeigte die icv-Infusion des AVP-V1-Rezeptor-Antagonisten ebenfalls einen inhibitorischen Effekt von zentralem AVP auf die basale ACTH- und Corticosteron-Freisetzung bei virginen weiblichen Ratten, wodurch neuere Ergebnisse bei männlichen Tieren (Wotjak et al. 1996) reproduziert werden konnten. Die Stimulation der HPA-Achse durch den V1-Antagonisten war jedoch, trotz gleicher Dosierung, geringer ausgeprägt als nach Applikation des OXT-Antagonisten. Dazu sollte erwähnt werden, daß die Wirkung der Antagonisten deutlich voneinander abgegrenzt werden kann, da beide hochselektiv sind (Manning et al. 1989). Die enge Interaktion von Neuropeptiden der HPA-Achse und des hypothalamo-neurohypophysären Systems bei der Regulation der ACTH-Freisetzung wird weiter unterstützt durch den Nachweis einer co-Lokalisation von CRH und AVP in parvozellulären Neuronen (Whitnall 1989, de Goeij et al. 1992) sowie von CRH und OXT in einer Gruppe magnozellularer OXT-Neuronen (Sawchenko et al. 1984, Levis & Sawchenko 1993). Weiterhin konnten synaptische Kontakte zwischen CRH- und magnozellularen OXT-Neuronen im PVN nachgewiesen werden (Hisano et al. 1992). Interessanterweise wurde ein circadianer Rhythmus der synthetischen Aktivität parvozellulärer OXT-Neuronen des PVN bei virginen weiblichen Ratten festgestellt (Arey & Freeman 1992); ein Zusammenhang mit der circadianen Rhythmik der Aktivität der HPA-Achse (Windle et al. 1998) wurde jedoch noch nicht untersucht.

Obwohl OXT, allerdings nur nach hochdosierter peripherer Applikation, mit verschiedenen Verhaltensweisen, die einen Bezug zur Emotionalität haben, in Verbindung gebracht werden konnte (King et al. 1985, Uvnäs-Moberg et al. 1994, Arletti and Bertolini 1987), wurde in dieser Studie kein Einfluß der icv-applizierten OXT- oder V1-Rezeptor-Antagonisten auf das angstbezogene Verhalten oder die lokomotorische Aktivität auf der *plus-maze* festgestellt (weder bei Männchen noch bei virginen Weibchen). Beim Menschen wird eine Beteiligung zentralen OXTs bei der Entstehung psychiatrischer Erkrankungen vermutet (Legros & Ansseau 1992). Dabei könnte OXT weniger bei der Regulation des

emotionalen Befindens sondern eher bei der Inhibition einer hyper-aktivierten HPA-Achse, die oft mit psychiatrischen Erkrankungen wie Depression und Angststörungen assoziiert ist (Holsboer 1999), eine Rolle spielen. Dieser Aspekt wird mit Hilfe der HAB/LAB-Ratten (s. u.) weiter verfolgt werden.

Eine deutliche Beteiligung von OXT wurde allerdings an der Regulation von Fortpflanzungs-orientierten Handlungen einschließlich sozialem, sexuellem und mütterlichem Verhalten (Arletti & Bertolini 1985, Richard et al. 1991, McCarthy 1995) nachgewiesen. OXT gilt als das wichtigste Peptidhormon für die Reproduktion sowohl bei weiblichen als auch männlichen Säugetieren, da es während Paarung, Geburt und Laktation ins Blut freigesetzt wird und für die Fortpflanzung essentielle Effekte auf den Organismus ausübt. Wird es im Gehirn freigesetzt, ist OXT u. a. in die Regulation von Verhaltensweisen involviert, die die Fortpflanzung begleiten (Argiolas & Gessa 1991, McCarthy et al. 1991, Carter 1992). Der inhibitorische Effekt von OXT auf die neuroendokrine Streßreaktivität, der hier bei virginen und männlichen Tieren beschrieben wird, spiegelt vielleicht einen grundlegenden regulatorischen Mechanismus wider, der sich zur Sicherung von Fortpflanzungsfunktionen (z. B. Paarung) entwickelt hat, die durch Streßreaktionen gestört würden (Rivier et al. 1986). Die OXT-induzierte Inhibition der Streßreaktion könnte es so dem Tier ermöglichen, seine Aufmerksamkeit auf die Reproduktion zu richten, es sei denn, der Stimulus/Stressor ist wirklich von lebensgefährdender Natur. An dieser Stelle sollte angemerkt werden, daß auch McCarthy et al. (1991) eine Beteiligung von zentralem OXT am Paarungsverhalten propagieren, wodurch ein Weibchen die Angst vor dem meist aggressiveren und größeren Männchen überwinden könnte.

Im zweiten Teil dieser Studie wurden die bei männlichen und virginen weiblichen Ratten durchgeführten Untersuchungen zur Rolle intrazerebral freigesetzten OXTs bei der Regulation der neuroendokrinen und verhaltensbiologischen Streßreaktion während der peripartalen Periode, einer Phase mit veränderter Aktivität des OXT-Systems und der HPA-Achse, untersucht. Während das OXT-System in der peripartalen Periode hochaktiviert ist (Theodosis & Poulain 1992, Douglas & Russell 1994, Young et al. 1997, Russell & Leng 1998), ist die Reaktivität der HPA-Achse auf emotionale und physische Stressoren gehemmt (Lightman 1992, Walker et al. 1995, Neumann et al. 1998). Es wurde die Hypothese aufgestellt, daß der inhibitorische Effekt von OXT auf die Streßreaktivität, der hier bei virginen und männlichen Tieren beschrieben wird, auch während der Trächtigkeit besteht. So könnte die Suppression der HPA-Achse nach Streß-Stimulation während der peripartalen

Periode (Lightman 1992, Neumann et al. 1996b, 1998) durch das aktivierte intrazerebrale OXT-System vermittelt werden. Der Vergleich der neuroendokrinen Wirkung des OXT-Antagonisten bei virginen, trächtigen und laktierenden Weibchen ergab jedoch ein Nachlassen der tonischen Inhibition der HPA-Achse durch OXT während der peripartalen Periode. Der OXT-Antagonist hatte bei trächtigen und laktierenden Weibchen weder unter basalen Bedingungen noch nach *plus-maze*- (Abb. 12) oder Schwimmstreß-Exposition (Abb. 16) einen Effekt auf die Aktivität der HPA-Achse. Mit diesem Ergebnis konnte die Hypothese, daß die Suppression der HPA-Achse nach Streß-Stimulation während der peripartalen Periode durch das aktivierte intrazerebrale OXT-System vermittelt wird, nicht aufrechterhalten werden. Eine solche effektive tonische Inhibition der basalen und Streß-induzierten Freisetzung von ACTH konnte nur bei männlichen und virginen weiblichen Ratten gezeigt werden (s. o.).

Intrazerebrale Wirkungen von Neuropeptiden, einschließlich OXT, werden durch Sexualhormone beeinflusst. So induziert z. B. Östrogen bei virginen Weibchen einen Anstieg funktioneller OXT-Rezeptoren im Gehirn (De Kloet et al. 1988, McCarthy et al. 1991, Patchev et al. 1993). Zudem bringen veränderte Konzentrationen ovarer Steroidhormone während der peripartalen Periode morphologische und funktionelle Anpassungen der hypothalamischen OXT-Neurone hervor (Montagnese et al. 1990) und ermöglichen damit die Verstärkung und Synchronisation deren Aktivität, die der pulsatilen Freisetzung von OXT während des Milchejektionsreflexes vorangeht (Lambert et al. 1993a, Moos et al. 1991). Stimulierende Effekte z. B. von Östrogen sind auch auf die HPA-Achse beschrieben und erfolgen maßgeblich über Reduktion der Effektivität der negativen Glucocorticoid-Rückkopplung (Burgess & Handa 1992, Carey et al. 1995). So wurde während der späten Trächtigkeit / Schwangerschaft eine erhöhte basale Freisetzung von Corticosteron (bei Ratten, Neumann et al. 1998) bzw. Cortisol (beim Menschen, Carr et al. 1981) nachgewiesen. Andererseits ist die Reaktivität der HPA-Achse auf emotionale und physische Stressoren (Walker et al. 1995, Neumann et al. 1998, siehe auch Kap. 3.2.1 und Kap. 3.4.2.1) während der peripartalen Periode ca. ab dem 15. Trächtigkeitstag vermindert. Diese Fortpflanzungs-gekoppelten funktionellen Veränderungen der HPA-Achse beziehen adaptive Mechanismen auf mehreren regulatorischen Ebenen ein, wie z. B. einige Hirnregionen, die in die Streßwahrnehmung involviert sind (da Costa et al. 1996a), hypothalamische CRH-Neuronen (Douglas and Russell 1994, da Costa et al. 1996a), corticotrope Zellen der Adenohypophyse (Neumann et al. 1998) sowie Zellen der Nebennierenrinde (Carr et al. 1981, Waddell & Atkinson 1994). Weiterhin wurde während

Trächtigkeit und Laktation ein Nachlassen der bei virginen Tieren ausgeprägten Verstärkung der ACTH-Freisetzung durch noradrenerge Projektionen vom Hirnstamm (Toufexis and Walker 1996, Toufexis et al. 1998) festgestellt. Die hier ermittelten Ergebnisse lassen vermuten, daß intrazerebral freigesetztes OXT an diesen Veränderungen nicht beteiligt ist.

Im Gegensatz zu der von OXT unabhängigen Regulation der HPA-Achse während der peripartalen Periode, wird die periphere Freisetzung von OXT bei trächtigen und laktierenden Ratten durch zentrales OXT stimulusabhängig reguliert. Die neuroendokrinen Adaptationen während der peripartalen Periode schließen eine Vielzahl morphologischer (Theodosis et al. 1984, Montagnese et al. 1987) und funktioneller Veränderungen des zentralen OXT-Systems ein (Hatton 1990, Richard et al. 1991). So wurde beschrieben, daß im hypothalamischen SON und PVN sezerniertes OXT die Zellen, die es synthetisieren und freisetzen, über einen positiven ultrakurzen Rückkopplungs-Mechanismus stimuliert (Freund-Mercier & Richard 1984, Lambert 1993a, b). Diese Auto-Exzitation ist eine Voraussetzung für die Synchronisation der hohen Feuerungsrate hypothalamischer OXT-Neuronen (Lambert et al. 1993b) und damit für die pulsatile OXT-Freisetzung ins Blut während der Geburt und dem Milchejektionsreflex (Neumann et al. 1993). Gleichzeitig ist die Reaktivität von OXT-Neuronen auf Stimuli supprimiert, die nicht Reproduktions-relevant sind (Carter & Lightman 1987a, Lightman & Young 1989, Patel et al. 1991, Walker et al. 1995, Neumann et al. 1998). So ist z. B. der Schwimmstreß-induzierte Anstieg der OXT-Freisetzung ins Blut bei trächtigen und laktierenden Ratten geringer als bei virginen Tieren (Abb. 17). Dies mag dazu dienen, vor Geburt und Laktation das neurohypophysäre OXT für Reaktionen auf wirklich relevante Stimuli, wie die Erweiterung des Muttermundes bzw. das Saugen der Jungen, zurückzuhalten. In der vorliegenden Studie konnte erstmals eine Reproduktions-gekoppelte Autoinhibition der Streß-induzierten OXT-Freisetzung ins Blut durch intrazerebrales OXT nachgewiesen werden. Mögliche Wirkungsorte dieser Inhibition könnten den Hypothalamus, wo magnozellige OXT-Neuronen lokalisiert sind, und/oder limbische Hirnareale einschließen (Ingram et al. 1995). Entsprechend wird OXT in PVN und SON sowie z. B. im Septum nach Schwimmstress bei männlichen (Wotjak et al. 1998, Ebner et al. 1999) und weiblichen Ratten (siehe Kap. 3.3 und 3.4.1.3) lokal freigesetzt. Ein exzitatorischer Effekt von OXT auf die elektrophysiologische Aktivität von OXT-Neuronen wurde während der peripartalen Periode (Moos et al. 1989), jedoch nicht bei virginen Ratten (Kuriyama et al. 1993) beschrieben. Daher sollte die Möglichkeit in Betracht gezogen werden, daß dendritisch freigesetztes OXT während Trächtigkeit und Laktation eher exzitatorische Afferenzen zu den OXT-Neuronen, z. B. vom Hirnstamm, inhibiert (Kombian et al. 1997) als die OXT-Neuronen selbst. Zudem

könnte intrazerebral freigesetztes OXT auch in limbischen Hirnregionen wirken, die an der Regulation der Aktivität von OXT-Neuronen beteiligt zu sein scheinen, wie z. B. der *Bed nucleus of the stria terminalis* und das laterale Septum (Moos et al. 1991). Für diese Regionen wurde während der peripartalen Periode eine erhöhte Dichte von OXT-Bindungsstellen (Insel 1990), begleitet von einer *in vitro* gemessenen Steigerung der neuronalen Sensitivität auf OXT (Ingram & Wakerley 1993), beschrieben. Die Stimulation der Streß-induzierten peripheren Freisetzung von OXT durch Applikation des spezifischen Antagonisten resultierte bei laktierenden Ratten in Plasmakonzentrationen von OXT, die weit unter denen virginer Ratten lagen (Abb. 17). Diese Beobachtung deutet auf die Präsenz weiterer inhibitorischer Mechanismen für die Streß-induzierte Freisetzung von OXT während der Laktation hin wie z. B. Suppression durch endogene Opiate (Douglas et al. 1995, siehe auch Kap. 4.2).

Im Gegensatz zu den Ergebnissen bei Männchen und virginen Weibchen (s. o.) konnte während der peripartalen Periode ein anxiolytischer Effekt endogenen OXTs beobachtet werden (Abb. 14). Die lokomotorische Aktivität der trächtigen und laktierenden Tiere, angezeigt durch die Anzahl der Eintritte in die geschlossenen Arme, wurde auch während der peripartalen Periode nicht durch Applikation des OXT-Antagonisten beeinflusst. So kann ein sedierender Effekt der Behandlung (Uvnäs-Moberg et al. 1994) ausgeschlossen werden. Es sollte jedoch in Erwägung gezogen werden, daß z. B. laktierende Ratten durch die Entnahme der Jungen 3 h vor der Testung einem zusätzlichen Stressor exponiert wurden, und daß die Antagonist-induzierten Veränderungen der Emotionalität, die nur während der peripartalen Periode gezeigt wurden, auf diesen zusätzlichen Stimulus zurückzuführen sein könnten. Bei virginen Ratten z. B. konnte ein deutlicher anxiolytischer Effekt von icv-appliziertem OXT nur nach Exposition eines milden Stressors (Testung in einer ungewohnten Umgebung, Windle et al. 1997) nachgewiesen werden. In der hier beschriebenen Studie jedoch wurden alle Ratten in ihrer gewohnten Umgebung getestet. Zudem trat die Wirkung des Antagonisten nicht nur bei laktierenden sondern auch bei trächtigen Tieren auf. Unterstützend zu unseren Ergebnissen einer anxiolytischen Wirkung von intrazerebral freigesetztem OXT, ausschließlich während einer Phase, in der das zentrale OXT-System hochaktiviert ist, beschrieben Windle et al. (1997) ein reduziertes Angstverhalten bei ovariectomierten, Östradiol-behandelten und chronisch mit synthetischem OXT icv-infundierten Ratten. Ebenso konnte bei laktierenden Ratten eine reduzierte Angstreaktion (*freezing*) auf anxiogene auditorische Stimuli gezeigt werden (Hard & Hansen 1984). Solche Verhaltensveränderungen könnten in Bezug stehen zu dem komplexen mütterlichen Verhalten, welches auch eine Steigerung sozialer Aggression zum Schutz der Nachkommen

vor Artgenossen einschließt (Erskine et al. 1978). So könnte das intrazerebrale OXT-System nicht nur in die Initiation mütterlichen Verhaltens zur Sicherung der Ernährung und der sozialen Entwicklung der Nachkommen involviert sein (Pedersen et al. 1979, 1992, da Costa et al. 1996b, Kendrick et al. 1997), sondern auch in die zum Schutz der Nachkommen notwendige Reduktion des Angstverhaltens bei der Mutter. Auch wenn die genauen Wirkungsorte noch unbekannt sind, sind daran wohl Projektionen parvozellulärer OXT-Neuronen des PVN (Insel et al. 1989b) in verschiedene limbische Areale einschließlich der olfaktorischen Bulbi, des medialen präoptischen Areals, des anterioren Hypothalamus, der *Substantia nigra* und der Amygdala beteiligt (Buijs 1978, Insel 1992). In diesen Regionen steigen während der peripartalen Periode sowohl OXT-Immunoreaktivität (Caldwell et al. 1987, Broad et al. 1993, Eriksson et al. 1996) als auch OXT-Rezeptor-Bindung (Insel 1986b, 1990, Young et al. 1997) an.

Diese funktionellen Veränderungen des OXT-Systems in limbischen und hypothalamischen Hirnregionen führen zu einer weiteren Fragestellung. Da ein steigender Effekt des OXT-Rezeptor-Antagonisten auf die Aktivität der HPA-Achse gerade bei trächtigen und laktierenden Ratten nicht nachweisbar war, muß die Möglichkeit in Betracht gezogen werden, daß die Dosierung des Antagonisten zu gering gewählt wurde, um Wirkungen von endogenem OXT zu hemmen. Dies scheint jedoch sehr unwahrscheinlich, da sowohl bei trächtigen als auch laktierenden Tieren Effekte des Antagonisten auf Angstverhalten (Abb. 14) und Streß-induzierte OXT-Freisetzung ins Blut (Abb. 13, Abb. 17) nachgewiesen wurden.

Aus den hier gewonnenen Ergebnissen läßt sich vielmehr schließen, daß die physiologische Wirkung von endogenem intrazerebralem OXT während der peripartalen Periode allein auf Fortpflanzungs-orientierte Funktionen wie z. B. die Wehentätigkeit bei der Geburt oder den Milcheinschuß in die Mamillen während der Laktation konzentriert ist. Die Suppression der HPA-Achse während der peripartalen Periode wird also offensichtlich durch andere regulatorische Mechanismen gesteuert wie z. B. die Modulation exzitatorischer Afferenzen u. a. von Hirnstamm-Projektionen auf hypothalamische CRH/AVP-Neuronen durch endogene Opiate (Douglas et al. 1995). Diese Möglichkeit wurde im Folgenden an trächtigen und gebärenden Ratten untersucht (s. u.).

4.4 Suppression der hypothalamo-adenohypophysär-adrenocorticalen Achse und des oxytocinergen Systems während der peripartalen Periode durch endogene Opiate

Der Vergleich trächtiger und virginer Ratten ergab keine signifikanten Unterschiede der basalen Aktivität der HPA-Achse, jedoch zeigte die HPA-Achse trächtiger Ratten eine reduzierte Reaktivität auf Schwimmstreß (Abb. 19). Während die Aktivität der HPA-Achse noch am Vortag der Geburt einen deutlichen circadianen Rhythmus zeigte (Abb. 22), blieb die basale Freisetzung von ACTH und Corticosteron am Tag der Geburt ganztägig auf einem sehr hohen Niveau, wurde jedoch in den letzten 4-5 Stunden vor der Geburt deutlich reduziert. Trotz physiologischer Aktivierung der Tiere während der Geburt ging der Beginn des Geburtsvorganges mit einer weiteren Absenkung der ACTH- und Corticosteron-Freisetzung einher ($p < 0.01$, Abb. 23). Bei Tieren, die nach der Geburt des zweiten Jungen mit Vehikel-Lösung behandelt wurden, blieb die Aktivität der HPA-Achse, unabhängig von der Tageszeit der Geburt und den einzelnen Geburtszeitpunkten, supprimiert. Die basale und Streß-induzierte Freisetzung von OXT ins Blut war bei virginen und trächtigen Ratten gleich hoch (Abb. 20). Mit Beginn des Geburtsvorganges trat jedoch eine Erhöhung der OXT-Freisetzung ein ($p < 0.01$ vs. basal, Abb. 26).

Die Untersuchung des zentralen OXT-Systems zeigte keine signifikanten Unterschiede der basalen OXT-Freisetzung im PVN virginer und trächtiger Ratten (Abb. 29 Insert), wohingegen diese im SON trächtiger Ratten signifikant vermindert war (Abb. 30 Insert). Die Schwimmstreß-induzierte Freisetzung von OXT im PVN virginer und trächtiger Tiere unterschied sich ebenfalls nicht (Abb. 29). Auch im SON stieg die Freisetzung von OXT nach Schwimmstreß (% Anstieg) bei virginen und trächtigen Tieren in gleichem Maße an, erreichte aber bei virginen Ratten aufgrund der hohen basalen Ausgangswerte höhere Absolutwerte (Abb. 30).

Die Applikation von NLX hatte weder bei virginen noch bei trächtigen Ratten einen signifikanten Effekt auf die basale ACTH- und Corticosteron-Freisetzung. Bei virginen Ratten wurde die Streß-induzierte Freisetzung von ACTH, nicht aber von Corticosteron, durch NLX-Applikation deutlich vermindert. Bei trächtigen Ratten hingegen blieb die geringe Plasmakonzentration von ACTH nach Schwimmstreß durch NLX unbeeinflusst, während die Streß-induzierte Freisetzung von Corticosteron durch NLX-Applikation sogar angehoben wurde ($p < 0.05$). Auch während des Geburtsvorganges induzierte die iv-Applikation von NLX einen starken Anstieg der Freisetzung von ACTH und Corticosteron (Abb. 23), jedoch ohne den physiologischen Aktivierungszustand (Laktat) und den Geburtsverlauf oder die

Überlebensrate der Jungtiere zu beeinflussen. So verschwindet die bei virginen Tieren präsente Opiat-vermittelte Stimulation der HPA-Achse im Laufe der Trächtigkeit zugunsten einer effektiven Opiat-Inhibition der HPA-Achse während der späten Trächtigkeit und der Geburt. Die basale und Streß-induzierte Freisetzung von OXT wurde bei trächtigen, nicht aber bei virginen Tieren durch Applikation von NLX gesteigert (Abb. 20). Ebenso konnte während des Geburtsvorganges die OXT-Freisetzung ins Blut durch NLX-Behandlung noch weiter gesteigert werden (Abb. 26). Diese Resultate zeigen also auch die Entstehung einer effektiven Opiat-Kontrolle der OXT-Neuronen im Zuge der Trächtigkeit.

Das zentrale OXT-System betreffend konnten in PVN und SON unabhängige Effekte von NLX auf die OXT-Freisetzung beobachtet werden. Im PVN virginer Tiere induzierte NLX eine Verringerung der OXT-Freisetzung nach Schwimmstreß, was auf einen stimulierenden Effekt endogener Opiate auf die intranucleäre Freisetzung von OXT hindeutet. Im Gegensatz dazu wurde die OXT-Freisetzung im PVN von trächtigen Tieren durch die NLX-Behandlung signifikant erhöht (Abb. 29), was eine Reproduktions-bezogene Inhibition der Streß-induzierten OXT-Freisetzung durch endogene Opiate andeutet. So scheint auch die Wirkung endogener Opiate auf die Freisetzung von OXT im PVN während der peripartalen Periode invertiert (Abb. 29). Auf die OXT-Freisetzung nach Schwimmstreß im SON hingegen hatte die Applikation von NLX keinen Effekt (Abb. 30). Die verhaltensbiologischen Untersuchungen während dem 10 min-Schwimmstreß zeigten bei trächtigen Weibchen, im Vergleich zu virginen Tieren, eine tendenzielle Verminderung aktiven Schwimmverhaltens, jedoch keinen Effekt der Behandlung mit NLX.

Auch diese Studie konnte eine reduzierte ACTH- und Corticosteron-Freisetzung nach Exposition eines Stressors während der späten Trächtigkeit (Erisman et al. 1990, Neumann et al. 1996, 1998, siehe auch Kap. 4.1) bestätigen. Zusammen mit der verminderten Reaktivität der HPA-Achse auf Stressoren, die schon bei laktierenden Ratten beschrieben wurde (Lightman & Young 1989, Lightman 1992), entsteht so der Eindruck einer gehemmten Streßreaktivität während der gesamten peripartalen Periode. Erst kürzlich konnte *in vivo* gezeigt werden, daß eine während der Trächtigkeit reduzierte Reaktivität der adenohipophysären corticotropen Neuronen auf CRH zu der verringerten Erregbarkeit der HPA-Achse nach Stressor-Exposition beiträgt (Johnstone et al. 1997, Neumann et al. 1998). Eine Rezeptor-Autoradiographie bestätigte, daß dieses Phänomen in einer verminderten Bindung von CRH an CRH-1-Rezeptoren, zusammen mit einer Verringerung der CRH-stimulierten Akkumulation von zyklischem AMP in den corticotropen Zellen der Adenohipophyse, begründet liegt (Johnstone et al. 1997, Neumann et al. 1998). Auch auf

hypothalamischer Ebene, speziell dem PVN, konnte während der Trächtigkeit eine reduzierte Aktivierung parvozellulärer Neuronen durch Immobilisations-Streß (da Costa et al. 1996a) und eine verminderte Expression von CRH-mRNA (Douglas & Russell 1994) nachgewiesen werden. Dies könnte unter anderem durch Drosselung der noradrenergen Erregung hypothalamischer Neuronen (Toufexis et al. 1998) während der Trächtigkeit bedingt sein. Zusammengefaßt sprechen diese Ergebnisse für eine Reproduktions-bedingte Verminderung der Streß-induzierten Erregung hypothalamischer Neuronen und eine Reduktion von positiven Verstärkermechanismen zwischen Hypothalamus und Adenohypophyse. So könnte unter anderem die schnelle Rückkopplungswirkung von Corticosteron auf die sekretorische Aktivität der HPA-Achse während der Trächtigkeit verbessert sein. Die verlängerte Erhöhung der ACTH- und Corticosteron-Plasmakonzentrationen nach Stressor-Exposition bei trächtigen Ratten (Abb. 19) spricht jedoch gegen diese Hypothese. Diese Beobachtung könnte eher durch eine verlängerte sekretorische Aktivität der Nebennierenrinde oder einen reduzierten metabolischen Abbau von Corticosteron, evtl. als eine Folge angestiegener Corticosteroid-bindender-Globuline (Seal & Doe 1967), erklärt werden. Auch eine Einflußnahme der nach Schwimmstreß angestiegenen Plasmakonzentration von OXT (Abb. 20) auf die adenohypophysäre und/oder adrenocorticale Sekretion sollte nicht ausgeschlossen werden (Samson & Schell 1995, Stachowiak et al. 1995, Link et al. 1992). Die biologische Relevanz der modifizierten Reaktivität der HPA-Achse während der Trächtigkeit wird deutlich, wenn man die erhöhte verhaltensbiologische sowie neuroendokrine Streßreaktivität pränatal gestreßter oder Corticosteron-behandelter Ratten betrachtet (Weinstock 1997). Das Peptidhormon ACTH kann im Gegensatz zu dem sehr lipophilen Steroidhormon Corticosteron die Blut-Plazenta-Schranke nicht überwinden (Dupouy et al. 1980). Auch der Transfer von Glucocorticoiden wird während der letzten Tage der Trächtigkeit durch placentare Enzyme wie z. B. die Corticosteron-inaktivierende 11 β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase (Burton & Waddell 1994, Seckl et al. 1995) minimiert. Die Reduktion der Streß-induzierten Freisetzung von Hormonen der HPA-Achse könnte ein zusätzlicher Mechanismus sein, um den Fötus vor exzessiven Konzentrationen von Corticosteron zu schützen.

In Vorbereitung und während der Geburt wurde in dieser Studie ebenfalls eine modifizierte Freisetzung von Hormonen der HPA-Achse bei der Ratte beobachtet (Abb. 23). Der circadiane Rhythmus der HPA-Achse (Atkinson & Waddell 1995) konnte bis zum Vortag der Geburt nachgewiesen werden, am Geburtstermin jedoch blieben die Plasmakonzentrationen von ACTH und Corticosteron sogar zwischen 9.30 h und 12.30 h auf

einem relativ hohen Niveau (Abb. 22). Dies zeigt eine Aktivierung der HPA-Achse in Vorbereitung der Geburt an. Einige Stunden vor der Niederkunft wurde jedoch eine deutliche Verminderung der ACTH- und Corticosteron-Freisetzung beobachtet, die sich in einer weiteren Reduktion nach Beginn des Geburtsvorganges fortsetzte (Abb. 23) und somit eine aktive Suppression der HPA-Achse andeutete. Da Plasma-Laktat ein Indikator für generelle motorische und respiratorische Aktivität ist, deutet der Anstieg der Plasmakonzentration von Laktat ca. 30-40 min nach Beginn des Geburtsvorganges trotz geringer sekretorischer Aktivität der HPA-Achse eine physische Aktivierung der gebärenden Ratte an. Bei männlichen Ratten wurde z. B. nach der Exposition eines physischen Stressors (z. B. Schwimmstreß, Abel 1994) ein deutlicher Zusammenhang zwischen dem Anstieg von Plasma-Laktat und -ACTH/Corticosteron beschrieben. Auch aus dieser Beobachtung kann auf eine aktive Suppression der HPA-Achse während des Geburtsvorganges geschlossen werden.

Obwohl recht spekulativ, gibt es doch mögliche Theorien für die physiologische Relevanz der Suppression der mütterlichen HPA-Achse während des Geburtsvorganges. 1) Dieser Mechanismus könnte dazu dienen, drastische metabolische Vorgänge im Organismus der gebärenden Mutter zu verhindern. So könnte z. B. über Stunden in hoher Konzentration zirkulierendes Corticosteron letzte Energiereserven mobilisieren, die aber noch für die postpartale Periode benötigt werden. 2) Eine erhöhte Aktivität der HPA-Achse während der peripartalen Periode könnte generell den normalen Geburtsprozess gefährden. So konnte eine Studie an Ratten (Mayer 1978) zeigen, daß die Applikation von ACTH vom 15. Trächtigkeitstag bis zum erwarteten Geburtstermin eine Verzögerung der Geburt oder den Tod der Föten *in utero* zur Folge hatte. Wurde hingegen die Behandlung mit ACTH am 20. Trächtigkeitstag beendet, so fand die Geburt zum normalen Termin statt und die Jungen überlebten. 3) Die Möglichkeit, daß die Suppression der HPA-Achse während der Geburt für die Neugeborenen einen Schutzmechanismus darstellt, sollte ebenfalls in Erwägung gezogen werden. In den meisten Spezies reagiert die fötale Entwicklung einschließlich der Entstehung neuronaler Strukturen während der peripartalen Periode sensibel auf erhöhte Plasmakonzentrationen von Corticosteron/Cortisol (Meaney et al. 1996, Weinstock 1997). Eine fortschreitende Verminderung der Reaktivität der HPA-Achse auf externe Stimuli wurde in der zweiten Hälfte der Trächtigkeit nachgewiesen (Neumann et al. 1998, s. o.) und scheint vorteilhaft für das Überleben des Nachwuchses zu sein. Ein anderer, ebenfalls spekulativer Aspekt ist, daß eine aktivierte HPA-Achse mit einer Verhaltensaktivierung, ähnlich einer akuten Streßantwort, assoziiert sein und so den Geburtsvorgang stören könnte. Folglich könnte eine verminderte neuroendokrine Reaktivität

zur Verhinderung des Risikos nicht-relevanter Verhaltensweisen während der Geburt beitragen. Bei den beiden Ratten, die verlängerte Wehenphasen vor oder nach Geburt des zweiten Jungen zeigten (Abb. 25 C und D), war ein Anstieg der Freisetzung von ACTH/Corticosteron zu verzeichnen. Obwohl dieses Phänomen noch näher untersucht werden sollte, kann daraus geschlossen werden, daß unphysiologische Störungen des Geburtsvorganges die Inhibition der HPA-Achse überwinden und deshalb zu einer erhöhten Freisetzung von ACTH führen. In weiteren Experimenten sollte darum die Reaktivität der HPA-Achse auf definierte externe Stimuli, z. B. emotionale oder physische Stressoren, während der Geburt untersucht werden. Auch könnte es von Interesse sein, ob solche Störungen während der Geburt Einfluß auf die verhaltensbiologische und neuroendokrine Streßreaktivität der Nachkommen haben können.

In der vorliegenden Studie konnte eine Stimulation der OXT-Freisetzung durch Schwimmstreß (einem komplexen, vorwiegend physischen Stressor, Abel 1994) auch während der späten Trächtigkeit nachgewiesen werden. Während die basale Freisetzung von OXT bei trächtigen Ratten erhöht schien (jedoch nicht konsistent, vergleiche auch Abb. 13 und 20), unterschied sich die maximale OXT Sekretion 5 min nach Exposition des Stressors nicht bei trächtigen und virginen Tieren (siehe auch Kap. 3.2.1). Im Gegensatz dazu wurde während der Laktationsphase eine stark reduzierte Streßreaktivität des OXT-Systems berichtet (Carter & Lightman 1987, Higuchi et al. 1991, siehe auch Kap. 3.1.2). Eine identische basale Freisetzung von OXT wurde in PVN und SON virginer und spät trächtiger Ratten beschrieben (Neumann et al. 1993), die Streß-induzierte OXT-Freisetzung wurde jedoch bisher nicht untersucht. In der vorliegenden Studie konnte sowohl unter basalen als auch unter Schwimmstreß-stimulierten Bedingungen eine völlig gleiche Freisetzung von OXT im PVN virginer und trächtiger Ratten beobachtet werden (Abb. 29). Im Gegensatz dazu war die OXT-Freisetzung im SON trächtiger Ratten unter beiden Bedingungen signifikant geringer als bei virginen Tieren (Abb. 30). Damit übereinstimmend wurde bei laktierenden Ratten eine reduzierte Erregbarkeit der supraoptischen OXT-Freisetzung nach hypertoner Stimulation beschrieben (Neumann et al. 1995).

Im Widerspruch zu den hier ermittelten Ergebnissen wurde während der peripartalen Periode eine hohe translatorische (Broad et al. 1993, Eriksson et al. 1996) und elektrophysiologische (Freund-Mercier & Richard 1984, Ingram & Wakerly 1993, Lambert et al. 1993b) Aktivierung der OXT-Neuronen beschrieben. Gegensätzlich zu der kontrollierten neurohypophysären Sekretion von OXT nach Streß-Stimulation erfolgt nach Reproduktionsbezogener Stimulation eine nahezu exzessive Freisetzung von OXT ins Blut (Higuchi et al.

1986, Neumann et al. 1993). Auch werden z. B. Geburt (Neumann et al. 1996a) und Laktation (Neumann et al. 1989, 1993, Lambert et al. 1993b) von einer Stimulation der intrahypothalamischen OXT-Freisetzung begleitet. Aus solchen Ergebnissen kann auf das Vorhandensein endogener Mechanismen geschlossen werden, die es während der peripartalen Periode ermöglichen, die zentrale und periphere Freisetzung von OXT nach nicht-relevanten Stimulationen zu unterdrücken, aber gleichzeitig die Freisetzung auf Reproduktions-bezogene Stimuli hin zu erlauben oder sogar zu verstärken.

Wie auch die vorliegende Studie bestätigt, scheinen endogene Opiate an der Regulation der Streßreaktivität beteiligt zu sein (Iyengar et al. 1986, Plotsky 1986, Pechnick et al. 1987, 1993). In der Fachliteratur existieren eine Vielzahl widersprüchlicher Berichte über die Wirkungen endogener Opiate auf die Aktivität der HPA-Achse bei männlichen oder virginen weiblichen Ratten, in Abhängigkeit von Dosierung und Art der Applikation (Pechnick 1993). So hat z. B. akute Opiat-Behandlung die Freisetzung von ACTH und Corticosteron dosisabhängig stimuliert (Kokka et al. 1973, Zimmermann & Chritchlow 1973, Simon et al. 1975, Jezová et al. 1982) und diese Wirkung wurde durch vorherige Applikation von NLX verhindert (Pechnick 1993). Dahingegen beschrieb Eisenberg (1980) eine Stimulation der HPA-Achse durch NLX. Die hier deutlich nachgewiesene NLX-induzierte Verminderung des ACTH-Anstieges nach Schwimmstreß bei virginen Weibchen weist auf eine Stimulation der Streß-induzierten ACTH-Freisetzung durch endogene Opiate hin (Abb. 20). Dieses Ergebnis bestätigt frühere Studien bei männlichen Ratten, die zeigen, daß Opiat-Agonisten die Reaktivität der HPA-Achse auf Stressoren steigern (Calogero et al. 1996). Dieser Effekt könnte über μ -Opiate vermittelt werden, da für κ -Opiat-Rezeptoren gegensätzliche Wirkungen beschrieben sind (Cover & Buckingham 1989). Bei trächtigen Ratten hingegen wurde die Freisetzung von ACTH nach Schwimmstreß-Exposition durch NLX-Behandlung nicht verändert (Abb. 20). Dies deutet ein Verschwinden des stimulierenden Effekts endogener Opiate auf die ACTH-Freisetzung während der späten Trächtigkeit an. Corticosteron betreffend konnte bei virginen Ratten nach NLX-Behandlung keine verminderte Freisetzung 5 oder 15 min nach Schwimmstreß-Exposition festgestellt werden. Dagegen hob NLX die Streß-induzierte Freisetzung von Corticosteron bei trächtigen Weibchen an (Abb. 19), so daß auch hier eine Umkehrung des NLX-Effektes bei trächtigen, verglichen mit virginen Ratten zu erkennen ist. Während der Geburt schließlich war die Freisetzung von ACTH und Corticosteron nach Applikation des Opiat-Antagonisten NLX stark erhöht (Abb. 24), was eine effektive Inhibition der HPA-Achse durch endogene

Opiate während der Geburt anzeigt. Aus den Daten, die in diesen Experimenten gewonnen wurden, kann geschlossen werden, daß sich die Opiat-vermittelte Stimulation der HPA-Achse bei virginen Tieren im Laufe der Trächtigkeit umkehrt, um dann schließlich während des Geburtsvorganges in einer starken inhibitorischen Wirkung endogener Opiate auf die ACTH- und Corticosteron-Freisetzung zu resultieren.

Es wurde gezeigt, daß die Plasmakonzentrationen von Corticosteron und die Effekte von NLX darauf während der späten Trächtigkeit nicht notwendigerweise denen von ACTH folgten (Abb. 20). Auch während der Geburt konnte ein von ACTH unabhängiger Einfluß endogener Opiate auf die Freisetzung von Corticosteron beobachtet werden, da diese nach der NLX-Infusion rascher anstieg als die von ACTH (Abb. 24). Dieses Phänomen könnte durch verschiedene Ansätze erklärt werden. So könnten zum einen adenohipophysäre Opiat-vermittelte Mechanismen die Freisetzung von ACTH beeinflussen, jedoch weniger effektiv auf die adrenale Sekretion einwirken. Damit übereinstimmend wurde in der Adenohipophyse eine geringe Opiat-Rezeptor-Bindung gezeigt (Simantov & Snyder 1977), jedoch konnte bisher keine direkte Wirkung endogener Opiate auf die hypophysäre Freisetzung von ACTH *in vivo* nachgewiesen werden (Pechnick et al. 1987). Zum anderen wurde für die adrenale Freisetzung von Corticosteron eine von der Plasmakonzentration von ACTH unabhängige Steigerung durch NLX (Jezová et al. 1982, Hashimoto et al. 1986) beschrieben. Außerdem konnte eine Zunahme der Reaktivität der Nebennierenrinde auf ACTH durch Opiate (Pechnick 1993) gezeigt werden, die Rezeptor-vermittelt zu sein schien und durch NLX-Behandlung verhindert werden konnte (Heybach & Vernikos 1981). Solche Berichte über die Beeinflussung der "peripheren" Anteile der HPA-Achse durch endogene Opiate sind selten und teilweise widersprüchlich, so daß es wahrscheinlicher ist, daß der hier beschriebene inhibitorische Effekt endogener Opiate auf die HPA-Achse während der peripartalen Periode, speziell während der Geburt, vorwiegend über zentrale - evtl. hypothalamische - Wirkorte vermittelt wird. Übereinstimmend mit dieser Hypothese konnten dort μ -, κ - und δ - Opiat-Rezeptoren nachgewiesen werden (Desjardins et al. 1990). So sollte die Absenkung der Plasmakonzentration von ACTH nach Beginn des Geburtsvorganges zumindest teilweise durch hypothalamische Opiate vermittelt werden, die zu einer reduzierten Sekretion von ACTH-Freisetzungsfaktoren führen. Da Applikation von NLX in den *Liquor cerebri* während fortgeschrittener Trächtigkeit eine Hemmung der Opiat-vermittelten Analgesie bewirkt (Sander & Gintzler 1987), sollte auch die Möglichkeit nicht außer Acht gelassen werden, daß der erhöhten Freisetzung von ACTH und Corticosteron nach

Applikation des Opiat-Antagonisten bei gebärenden Ratten eine NLX-induzierte Reduktion der Schmerzschwelle zugrunde liegt.

Die durchgeführten Experimente zeigen, daß die bei virginen Ratten vorhandene Stimulation der Schwimmstreß-induzierten ACTH-Freisetzung durch endogene Opiate während der Trächtigkeit verschwindet (Abb. 19) und in einer starken Inhibition während der Geburt gipfelt (Abb. 23). Auch die Opiat-vermittelte Stimulation der Prolaktin-Freisetzung bei virginen Ratten kehrt sich während der späten Trächtigkeit zu einer Inhibition durch Opiate um. Dieser Mechanismus wird anscheinend durch Veränderungen der Plasmakonzentration von Progesteron induziert (Soaje & Deis 1994). Es bleibt jedoch noch zu untersuchen, ob die Veränderungen von steroiden Sexualhormonen im Verlauf der Trächtigkeit ebenfalls für die Modifikation der Effekte endogener Opiate auf die Aktivität der HPA-Achse verantwortlich sind.

Die neurohypophysäre Freisetzung von OXT ins Blut wird sowohl bei virginen als auch trächtigen Tieren durch endogene Opiate eingeschränkt, jedoch mit einer erhöhten Effektivität während der peripartalen Periode (Abb. 20). Daraus kann geschlossen werden, daß die in dieser Phase erhöhte Aktivität des OXT-Systems unter effektiver inhibitorischer Kontrolle durch endogene Opiate steht. Frühere Ergebnisse bestätigend (Higuchi et al. 1986, Leng et al. 1987), konnten wir während der Geburt einen signifikanten Anstieg der Plasmakonzentration von OXT zeigen, der durch Applikation von NLX weiter gesteigert wurde (Bicknell et al. 1988, Abb. 26). Im Gegensatz zu früheren Studien (Leng et al. 1987, Rosenblatt et al. 1988) hatte NLX jedoch in unserer Untersuchung keinen spürbaren Effekt auf den Geburtsvorgang selbst oder auf die Expression mütterlichen Verhaltens. Der inhibitorische Effekt endogener Opiate auf das neurohypophysäre OXT-System, vor allem während der späten Trächtigkeit (Douglas et al. 1993, 1995), Geburt (Leng et al. 1987, Neumann et al. 1991) und Laktation (Dondi et al. 1991), ist ein bekanntes Phänomen. Bei männlichen (Samson et al. 1985) und virginen weiblichen Ratten (Carter et al. 1986) wurde eine Opiat-vermittelte Inhibition der OXT-Freisetzung ins Blut nach Immobilisations-Streß beschrieben, an der sowohl hypothalamische μ - als auch neurohypophysäre κ -Rezeptoren beteiligt sein könnten (Carter & Lightman 1987a). Endogene Opiate und OXT sind in magnozellulären Neuronen des PVN co-lokalisiert und werden von der Neurohypophyse co-sezerniert (Watson et al. 1982, Meister et al. 1990). Daher schien es wahrscheinlich, daß endogene κ -Opiate die stimulierte Freisetzung von OXT auf der Ebene der neurosekretorischen Terminalen in der Neurohypophyse hemmen (Bicknell & Leng 1982). Neuere Studien haben jedoch gezeigt, daß diese neurohypophysäre κ -Opiat-Inhibition gegen

Ende der Trächtigkeit reduziert ist (Sumner et al. 1992, Douglas et al. 1993). Dies spricht für eine wesentliche Funktion zentraler μ -Opiate bei der Restriktion der Streß-induzierten Freisetzung von OXT während der Trächtigkeit (Russell et al. 1993) und der physiologischen Sekretion während der Geburt.

Im Gegensatz zur peripheren Sekretion von OXT wird die Schwimmstreß-induzierte OXT-Freisetzung in den hypothalamischen PVN bei virginen Ratten durch endogene Opiate stimuliert. Diese Stimulation wandelt sich jedoch während der Trächtigkeit in eine Opiat-Inhibition um (Abb. 29) und ähnelt dann der Opiat-Kontrolle der peripheren Freisetzung von OXT während der Reproduktions-Phase. Es gibt mehrere Möglichkeiten der Einflußnahme endogener Opiate auf die Freisetzung von OXT innerhalb des PVN. 1) Opiat-Rezeptoren sind im PVN direkt auf den Zellkörpern der Neuronen vorhanden (Desjardins et al. 1990, Sumner et al. 1992, Inenaga et al. 1994) und könnten die OXT-Freisetzung unmittelbar regulieren. 2) Opiat-Rezeptoren wurden in vielen Hirnregionen nachgewiesen, die auch Projektionen zum PVN ausbilden (Mansour et al. 1988). So könnten Opiate exzitatorische oder inhibitorische Afferenzen zum PVN modulieren und so in die Steuerung der OXT-Freisetzung involviert sein. 3) Exzitatorische Afferenzen zu den OXT-Neuronen (Onaka et al. 1995, Ji et al. 1998) könnten direkt im PVN auf präsynaptischer Ebene durch endogene Opiate stimuliert (virgin) oder inhibiert (trächtig) werden. Diese Hypothese wird unterstützt durch die Beschreibung einer reduzierten Freisetzung von Noradrenalin im PVN während der peripartalen Periode, speziell während der Laktation (Toufexis et al. 1996, 1998). Die hier beschriebenen Resultate unterstützend, konnte eine Opiat-vermittelte Restriktion der Reaktivität des OXT-Systems auf andere Stimuli wie periphere Applikation von Cholecystokinin (CCK) oder Streß-Exposition während Trächtigkeit (Douglas et al. 1995) und Geburt (Hartman et al. 1986, Leng et al. 1987, 1988, Lawrence et al. 1992, 1994) gezeigt werden. Im Gegensatz zur reduzierten Antwort von OXT-Neuronen auf Schwimmstreß oder CCK, ist die Reduktion der Reaktivität auf osmotische Reize (Bull & Russell 1992) oder auf elektrische Stimulation der *Lamina terminalis* (Bull et al. 1994) während der Trächtigkeit nicht Opiat-vermittelt. Daher scheint eine selektive Wirkung endogener Opiate auf die afferenten Fasern zu OXT-Neuronen wahrscheinlicher. Trächtigkeits-bedingte Veränderungen der magno- oder parvozellulären neuronalen Expression von Prodynorphin oder Proenkephalin-A-mRNA, den Indikatoren für Opiat-Synthese, wurden bisher nicht nachgewiesen (Schriefer 1991, Douglas et al. 1993, Douglas & Russell 1994). Allerdings wurde kurz vor der Geburt ein Anstieg des hypophysären Gehaltes von β -Endorphin (Wardlaw & Frantz 1983, Dondi et al. 1991, Broad et al. 1993) sowie der

Expression von Pro-Opiomelanocortin-mRNA im *Nucleus arcuatus* (Redmond et al. 1996) beschrieben, was für einen zentralen Einfluß endogener Opiate auf OXT-Neuronen während der späten Trächtigkeit und der Geburt spräche.

Obwohl auch im SON μ - und κ -Opiat-Rezeptoren nachgewiesen wurden (Sumner et al. 1992), zeigte sich weder bei trächtigen noch bei virginen Tieren ein Effekt der NLX-Behandlung auf die Freisetzung von OXT nach Schwimmstreß. Im Gegensatz zu unseren Ergebnissen beschrieben Douglas et al. (1993, 1995) bei spät trächtigen (nicht aber bei virginen Tieren oder am 16. Trächtigkeitstag) eine effektive Opiat-vermittelte Begrenzung der OXT-Freisetzung in den SON unter basalen Bedingungen, die über μ -Rezeptoren vermittelt zu sein schien. Die Möglichkeit sollte jedoch in Betracht gezogen werden, daß geringe Effekte der NLX-Behandlung auf die Freisetzung von OXT während der Trächtigkeit durch die exzessive Aktivierung nach Schwimmstreß-Exposition, einem starken komplexen physischen Stressor, der die intranucleäre Freisetzung von Neuropeptiden massiv stimuliert (Wotjak et al. 1998), überdeckt werden könnten. Douglas et al. (1995) zeigten bei trächtigen Ratten einen stimulierenden Effekt von NLX auf die Feuerungsrate supraoptischer OXT-Neuronen nach systemischer CCK-Applikation. Durch dieses Ergebnis wird ebenfalls eine Opiat-vermittelte Hemmung supraoptischer OXT-Neuronen oder ihrer Afferenzen angezeigt. Eine Erklärung dieser widersprüchlichen Ergebnisse könnte in einer Stimulus-Spezifität der Reaktivität von OXT-Neuronen während der späten Trächtigkeit liegen, die auch in PVN und SON unterschiedlich reguliert werden könnte. Diese Hypothese wird durch mehrere Berichte gestützt. Bei spät trächtigen Ratten induzierte die Behandlung mit NLX eine erhöhte Reaktivität der OXT-Neuronen z. B. auf systemische Applikation von CCK (Douglas et al. 1995), nicht jedoch auf systemische hyperosmotische Stimulation (Bull et al. 1994). Diese beiden Stimuli werden über unterschiedliche Pfade vermittelt, da der CCK-Stimulus über noradrenerge Afferenzen von der A2 Zellgruppe des *Nucleus tractus solitarii* führt (Kendrick et al. 1991), während die hypertone Stimulation über die *Lamina terminalis* vermittelt wird (Bull et al. 1994). Da Opiat-Rezeptoren in einigen Hirnregionen nachgewiesen wurden, die zum SON projizieren (Mansour et al. 1988), ist eine Stimulus-spezifische Modulation exzitatorischer Afferenzen, z. B. von Hirnstamm-Neuronen (Sawchenko and Swanson 1982), durch endogene Opiate durchaus denkbar, die zu der selektiven Reaktivität von OXT-Neuronen während der peripartalen Periode beitragen könnte. Eine solche spezifische Aktivierung von OXT-Neuronen durch Reproduktions-bezogene Stimuli, bei gleichzeitiger nicht-Aktivierbarkeit durch nicht-relevante Stimuli, könnte die Speicherung des Peptides in terminalen Vesikeln ermöglichen. So wäre eine ausreichende Freisetzung von OXT während

Reproduktions-Vorgängen, die eine hohe Konzentration davon benötigen (z. B. Geburt und Milchejektion), garantiert.

Bei virginen Ratten üben endogene Opiate eine inhibitorische Kontrolle auf die periphere Freisetzung von OXT aus (Abb. 20), während gleichzeitig eine deutliche Opiat-Rezeptor-vermittelte Stimulation der OXT-Freisetzung im PVN beobachtet wurde (Abb. 29). Eine solche Dissoziation der zentralen und peripheren Freisetzung und Funktion von Neuropeptiden wurde bereits für das strukturell sehr ähnliche AVP beschrieben (Wotjak et al. 1998) und konnte auch in dieser Arbeit bestätigt werden. Dieses Peptidhormon wird durch Streß-Exposition nur auf zentraler Ebene (Wotjak 1996, 1998, Ebner et al. 1999, Tabelle 3) sowie in das adenohipophysäre Portalblut (Plotsky 1991) freigesetzt, während die Freisetzung von AVP aus neurohypophysären Nervenendigungen in den peripheren Blutkreislauf durch Streß-Exposition unbeeinflusst bleibt (Lang et al. 1983, Kasting 1988, Wotjak et al. 1996, 1998, siehe auch Kap. 3.1.2) oder sogar reduziert wird (Yagi 1992). Dies indiziert eine unterschiedliche Regulation der zentralen und peripheren Freisetzung aus den selben Neuronen. Die ähnliche neurohypophysäre (Abb. 20) und paraventriculäre (Tabelle 3) Freisetzung von AVP bei virginen und trächtigen Ratten deutet an, daß die Streßreaktivität von AVP-Neuronen während der Trächtigkeit keinen funktionellen Veränderungen unterliegt. Damit übereinstimmend ist AVP nicht bei Geburt oder Laktation beteiligt (Neumann & Landgraf 1989). Trotzdem wurden auch für AVP-Neuronen morphologische Modifikationen einschließlich Veränderungen der dendritischen Formationen beschrieben (Stern & Armstrong 1998). Diese könnten z. B. der Anpassung von AVP-Neuronen an die während Trächtigkeit und Laktation veränderte Osmoregulation (Koehler et al. 1993, Summy-Long et al. 1997) dienen. Die Streß-induzierte Stimulation der AVP-Freisetzung im PVN trächtiger Ratten zeigte sich hier unabhängig von der NLX-Behandlung (Tabelle 3). Auch während der Geburt konnte eine Unabhängigkeit der intrazerebralen AVP-Freisetzung von endogenen Opiaten gezeigt werden (Neumann et al. 1991). Ebenso wenig wurde die Sekretion von AVP von neurohypophysären Nervenendigungen ins Blut durch NLX-Behandlung beeinflusst (Bicknell & Leng 1982).

Die hier beschriebenen Modifikationen der Wirkung endogener Opiate auf die HPA-Achse und das OXT-System, nicht aber auf das AVP-System, während Trächtigkeit und Geburt zeigen selektive funktionelle Anpassungen hypothalamischer endokriner Systeme an die Anforderungen der Reproduktionsphase. Opiat-vermittelte Modifikationen des Streß- oder Geburts-induzierten Verhaltens konnten jedoch nicht beobachtet werden.

4.3 Die "Münchner HAB/LAB-Ratten" als neues Tiermodell für angeborene emotionale Extreme

Die verhaltensbiologische Charakterisierung von HAB/LAB-Ratten schloß verschiedene Tests auf Sozial- und Dominanzverhalten sowie auf angstbezogene Reaktionen ein. Im Test auf Sozialverhalten zeigten männliche HAB-Tiere weniger aktive und vermehrt passive, jedoch insgesamt weniger soziale Interaktion als LAB-Männchen (Abb. 32). Eine erhöhte Ängstlichkeit konnte bei HAB-Männchen durch eine verstärkte Defäkationsrate bestätigt werden (Tabelle 4). Ähnliche Unterschiede im Sozial- und Angstverhalten zeigten weibliche HAB/LAB-Ratten, wobei hier jedoch keine statistische Signifikanz erreicht werden konnte. Die lokomotorische Aktivität, angezeigt durch die Anzahl der Linienübertritte in der Testarena, war sowohl bei männlichen als auch weiblichen LABs höher als bei HABs (Tabelle 4). Die Linien-spezifischen Unterschiede im aktiven Sozialverhalten könnten dadurch erklärt werden, daß die Testung in einem zwar bekannten, aber dennoch ungewohnten Areal bei ängstlichen Tieren defensive Reaktionen wie *freezing*-Verhalten und Thigmotaxis auslösen (Rodgers 1997). So zeigten zumindest männliche HAB-Tiere auch eine erhöhte Defäkationsrate in der Testarena, was für eine anxiogene Qualität der Testumgebung und eine unterschiedliche Bewertung bzw. Bewältigung (Armario et al. 1988) dieser neuen Situation bei HAB- und LAB-Ratten spricht. So zeigen die Ergebnisse in diesem Test nicht nur Unterschiede der basalen Angstdisposition in beiden Linien sondern auch unterschiedliche Bewältigungsstrategien in einer neuen und anxiogenen Umgebung. Ein Bezug beider Faktoren zueinander ist offensichtlich (Overstreet et al. 1992). Auch die bei HAB-Ratten in der Testarena reduzierte lokomotorische Aktivität, die auch schon im *open-field*-Test beobachtet wurde (Liebsch et al. 1998b), sowie die Ausprägung einer eher passiven Bewältigungsstrategie im Porsolt Schwimmtest (Porsolt et al. 1977, Liebsch et al. 1998b) bestätigen diese Interpretation.

Die radiotelemetrische Untersuchung der basalen lokomotorischen Aktivität männlicher HAB/LAB-Ratten in Einzelhaltung ergab keine Linien-spezifischen Unterschiede (Liebsch et al. 1998b). Wurden die Tiere jedoch in Gruppen gehalten, so war die allgemeine Aktivität im Heimkäfig bei männlichen HAB-Tieren signifikant geringer als bei LABs (Henniger et al. 2000). Bei Untersuchungen zum Dominanzverhalten zeigten 33 Tage alte Jungtiere noch keine nennenswerten Linien- oder Geschlechts-spezifischen Unterschiede im spielerischen Kampfverhalten (Tabelle 5). Der Test auf kompetitives Trinkverhalten adulter Tiere jedoch ergab eine Dominanz der LAB- über die HAB-Tiere in dieser Konkurrenzsituation (Abb. 33). Diese Ergebnisse spiegeln die erhöhte aktive soziale

Interaktion bei LAB- im Vergleich zu HAB-Tieren wider und führen zu der Hypothese, daß das Sozialverhalten bei LAB-Tieren eher von aggressiven Interaktionen geprägt wird. Ähnliche Beobachtungen einer erhöhten Anzahl aggressiver Verhaltensweisen (Drohung, Kampf etc.) konnte auch in einer verhaltensbiologischen Untersuchung des Gruppenverhaltens im Heimkäfig, also unter absolut basalen Konditionen, gemacht werden (Henniger et al. 2000).

Die Testung des Altersverlaufes der Angstdisposition bei HAB- und LAB-Tieren ergab konstante Unterschiede der Emotionalität in jedem Lebensalter. Schon am 11. postnatalen Tag zeigten HAB-Junge eine deutlich höhere Ruffrequenz der durch Separation vom Muttertier induzierten Ultraschallvokalisation als LABs ($p < 0.05$, Abb. 34). Die dem Naivtest folgenden Tests auf der *plus-maze* im Abstand von einigen Monaten ergaben ebenfalls stabile Linien-spezifische Unterschiede des angstbezogenen Verhaltens (Abb. 35).

Die neuroendokrine Charakterisierung von HAB/LAB-Ratten wurde unter Basalbedingungen bzw. nach Stimulation durch emotionale (*open-arm*) und physische (Schwimmstreß) Stressoren durchgeführt. Dabei wurden verschiedene methodische Ansätze verwendet, um die periphere und zentrale neuroendokrine Aktivität zu untersuchen. Zunächst konnte, trotz gleicher Basalaktivität der HPA-Achse von HAB- und LAB-Männchen, eine erhöhte Reaktivität der ACTH- und Corticosteron-Freisetzung auf einen emotionalen Stressor (*open-arm*) bei HABs nachgewiesen werden ($p < 0.01$, Abb. 38). Die Wahl des offenen Armes der *plus-maze* als Stressor ermöglichte die Exposition eines vergleichbaren anxiogenen Stimulus für Tiere beider Rattenlinien. Obwohl HAB-Ratten immer noch eine geringere Exploration der offenen Arme, demonstriert durch eine geringere Laufstrecke (Abb. 37), zeigten als LAB-Ratten, war nun die bisher beschriebene Tendenz zu erhöhter Reaktivität der HPA-Achse nach *plus-maze*-Exposition bei HAB-Ratten (Liebsch et al. 1998 b) statistisch signifikant. Hier wurde offensichtlich, daß ein kausaler Zusammenhang von verhaltensbiologischen und neuroendokrinen Streßreaktionen nur durch die Wahl eines geeigneten Stressors zutage treten konnte. Dieser hier verwendete milde emotionale Stressor, der dem Selektionskriterium für HAB/LAB-Ratten sehr ähnlich ist, scheint im Gegensatz zu Schwimmstreß-Exposition (Liebsch et al. 1998b) sehr gut geeignet zu sein, um die Linien-spezifischen Unterschiede in der emotionalen Bewertung von Stressoren und der damit verbundenen differentiellen neuroendokrinen Streßreaktivität zu offenbaren.

Die HAB/LAB-Tiere bieten eine einzigartige Möglichkeit zur Untersuchung der zentralen Regulation der Reaktivität der HPA-Achse sowie der Beziehung zwischen

neuroendokrinen und verhaltensbiologischen (emotionalen) Streßreaktionen. In dieser Arbeit wurde besonderer Wert auf die Linien-spezifisch differentielle Regulation der HPA-Achse durch Hormone des hypothalamo-neurohypophysären Systems (siehe auch Kapitel 4.1) gelegt. So wurden zunächst die Plasmakonzentrationen von OXT und AVP unter den selben Bedingungen wie zuvor gemessen. Sowohl unter basalen Bedingungen als auch nach *open-arm*-Exposition waren die Plasmakonzentrationen von OXT vergleichbar zwischen den Linien (Tabelle 6). Dieses Ergebnis macht eine Beteiligung von Plasma-OXT an der Expression des Linien-spezifisch unterschiedlichen Angstverhaltens bzw. der unterschiedlichen Reaktivität der HPA-Achse bei HAB- und LAB-Ratten unwahrscheinlich. In diesem Zusammenhang ist es bemerkenswert, daß bei den *Roman-high*- und *-low-avoidance*-Ratten ein inverser Zusammenhang zwischen Emotionalität und der OXT Reaktion auf Immobilisations-Streß zu bestehen scheint (Carter & Lightman 1987b), während sich die Freisetzung von ACTH, Corticosteron und Prolaktin nach dem selben Stressor nicht signifikant zwischen den Linien unterschied (Gentsch et al. 1988). Anders als bei OXT war die Plasmakonzentration von AVP nach Stressor-Exposition weder bei HAB- noch bei LAB-Ratten erhöht, womit frühere Ergebnisse nach Schwimmstreß bestätigt werden konnten (Wotjak et al. 1998).

Da die zentrale Freisetzung von OXT und AVP unabhängig von der peripheren Freisetzung stattfinden kann (Wotjak et al. 1998) und beide Peptide auf zentraler Ebene wichtige Funktionen bei der Regulation der HPA-Achse übernehmen (Wotjak et al. 1994, 1996, siehe auch Kap. 4.1), wurde deren zentrale Freisetzung im hypothalamischen PVN mittels *in vivo* Mikrodialyse untersucht. So konnte die Beteiligung von OXT und AVP an der differentiellen Streßreaktivität der HPA-Achse bei HAB- und LAB-Männchen studiert werden. Weder bei HAB- noch bei LAB-Ratten erzeugte die Exposition eines emotionalen Stressors (10 min *open-arm*) eine effektive Stimulation der Freisetzung von OXT im PVN, wohingegen Exposition eines starken physischen Stressors (10 min Schwimmstreß) bei Tieren beider Linien einen signifikanten Anstieg der OXT-Konzentration im Dialysat verursachte (Abb. 42). In der Freisetzung von OXT im PVN von männlichen und weiblichen Tieren ergaben sich jedoch keine Unterschiede zwischen den HAB- und LAB-Linien (Abb. 42). Obwohl in einer vorangegangenen Studie der vorliegenden Arbeit eine tonische Inhibition der HPA-Achse durch im PVN freigesetztes OXT gezeigt werden konnte (siehe Kap. 4.1), spricht dieses Ergebnis gegen eine Beteiligung von intrazerebralem OXT an der unterschiedlichen Streßaktivierung der HPA-Achse bei HAB- und LAB-Ratten. Es bleibt zu untersuchen, ob z. B. eine ungleiche Dichte und/oder Bindungskapazität von OXT-Rezeptoren zu

differierenden Wirkungen der selben Menge von OXT auf die Reaktivität der HPA-Achse von HAB- und LAB-Ratten führen könnten.

Ebenso wie die Freisetzung von OXT wurde die Freisetzung von AVP im PVN nur durch 10 min Schwimmstreß, nicht aber durch 10 min *open-arm*-Exposition signifikant stimuliert (Abb. 41). Eine differenzierte statistische Analyse zeigte eine erhöhte basale Freisetzung von AVP bei männlichen (Abb. 41), nicht aber bei weiblichen HAB-Ratten. Nach Schwimmstreß zeigte sich bei HAB-Ratten beiderlei Geschlechts ein deutlich erhöhter Anstieg der AVP-Konzentration im Dialysat (je $p < 0.05$ vs. LAB). Dieses Ergebnis deutet auf eine Assoziation der erhöhten Reaktivität der HPA-Achse bzw. der extremen Ängstlichkeit von HAB-Ratten mit einer Anhebung der intrahypothalamischen (speziell intra-PVN) Freisetzung von AVP hin.

Multiple Funktionen bei neuroendokrinen und kognitiven Prozessen wurden mehrfach für AVP vorgeschlagen (Wotjak et al. 1994, 1996, Landgraf et al. 1995a, b, Makara et al. 1996, Liebsch et al. 1996, Engelmann et al. 1994, 1996, Raggenbass et al. 1998, Ebner et al. 1999). Nach Sekretion in das hypophysäre Portalblut wurde diesem Neuropeptid eine stimulierende, bei Freisetzung im PVN jedoch eine inhibitorische Wirkung auf die HPA-Achse zugesprochen (Makara et al. 1996, Wotjak et al. 1996). In der vorliegenden Arbeit zeigte die icv-Infusion des AVP-V1-Rezeptor-Antagonisten einen inhibitorischen Effekt von zentralem AVP auf die basale ACTH- und Corticosteron-Freisetzung bei männlichen und virginen weiblichen Ratten (Kap. 4.1), wodurch neuere Ergebnisse bei männlichen Tieren (Wotjak et al. 1996) reproduziert werden konnten. Zudem konnte eine co-Lokalisation von CRH und AVP in parvozellulären Neuronen nachgewiesen werden (Whitnall 1989, de Goeij et al. 1992), was die Theorie einer engen Interaktion von Neuropeptiden der HPA-Achse und des hypothalamo-neurohypophysären Systems bei der Regulation der ACTH-Freisetzung weiter unterstützt. Auch wurde eine Beteiligung zentralen AVPs an kognitiven Funktionen und der Ausprägung von Streßbewältigungs-Strategien (Engelmann et al. 1996, Ebner et al. 1999) beschrieben.

Ob das Ausmaß der AVP-Sekretion im PVN kausal an der differentiellen verhaltensbiologischen und neuroendokrinen Streßreaktivität der HAB/LAB-Ratten beteiligt ist, muß noch endgültig geklärt werden. Die ACTH-Freisetzung nach CRH-Stimulation war sowohl bei männlichen (Liebsch et al. 1998b) als auch weiblichen (siehe Kap. 3.4.2.1) Tieren nicht unterschiedlich zwischen den HAB- und LAB-Linien. Im Dex/CRH-Test (siehe Einleitung, Kap. 1) jedoch zeigten männliche HAB-Ratten eine pathologische non-Suppression der ACTH-Freisetzung nach Vorbehandlung mit Dexamethason und einen

pathologischen Anstieg nach CRH-Stimulus (Keck et al., unveröffentlicht), ähnlich den Ergebnissen bei depressiven Patienten (Holsboer & Barden 1996), wohingegen LABs wie humane Kontrollen reagierten. Die Applikation eines AVP-V1-Rezeptor-Antagonisten führte bei männlichen HAB-Ratten zu einer Normalisierung des Testergebnisses (Keck et al., unveröffentlicht). Diese Resultate geben Anlaß zu der Annahme, daß bei männlichen HAB-Ratten eine Modifikation des zentralen AVP-Systems bzw. der AVP-Freisetzung in das adenohipophysäre Portalblut der erhöhten Streßreaktivität der HPA-Achse zugrunde liegt.

Aus diesem Grunde wurde die Expression von AVP-mRNA in hypothalamischen Neuronen männlicher HAB- und LAB-Ratten mittels *in situ* Hybridisierung untersucht. Die AVP-Expression wurde unter basalen Bedingungen ermittelt, da dieser Zustand am ehesten die Verfügbarkeit der Neuropeptide nach akuter Streß-Exposition zeigen kann. Expression von AVP konnte u. a. im *Nucleus suprachiasmaticus* (nicht quantifiziert), im magnozellulareren Anteil des PVN (Abb. 43) und im SON (Abb. 44) gezeigt werden, wohingegen die Expression in parvozellulären Neuronen des PVN unter dem Detektionslimit lag. Signifikante Unterschiede zwischen HAB- und LAB-Tieren konnten nur im magnozellulareren Anteil des PVN nachgewiesen werden, wobei HABs eine signifikant höhere Expression von AVP mRNA zeigten als LABs (Abb. 43). Dieses Ergebnis bestätigt die vorher aufgestellte Hypothese, daß zentral exprimiertes und freigesetztes AVP eine kausale Rolle bei der gesteigerten Streß-Aktivierung der HPA-Achse von HAB-Ratten spielen könnte. Hierzu könnte ebenfalls eine gesteigerte Streß-induzierte Sekretion von AVP in das Portalblut der Adenohipophyse bzw. eine gesteigerte Freisetzung, quasi *en-passant*, aus den in die Neurohypophyse führenden AVP-Fasern beitragen (Holmes et al. 1986, Wotjak et al. 1996).

Die selektive Züchtung der HAB-Ratten auf hohe Angstdisposition wurde ebenfalls begleitet von einer erhöhten basalen und Streß-induzierten Freisetzung von Prolaktin. Dieses Ergebnis unterstreichend, war auch der Quotient "stimuliert / basal" bei HAB-Männchen höher als bei LABs. An dieser Stelle sollte angemerkt werden, daß die Freisetzung von Prolaktin auch im Verlauf psychiatrischer Erkrankungen verändert zu sein scheint (Hardan et al. 1999). Durch einen aktiven Transportmechanismus kann Prolaktin vom Plasma in die *cerebrospinal*-Flüssigkeit aufgenommen werden (Walsh et al. 1987). So könnte es auf zentraler Ebene in die Regulation emotionalen Verhaltens eingreifen. Diese Theorie bestätigend, wurden bereits anxiolytische Effekte icv-verabreichten Prolaktins bei Ratten beschrieben (Torner & Neumann 1998). Ob Plasma-Prolaktin eine kompensierende anxiolytische Funktion bei HAB-Ratten hat, muß jedoch noch untersucht werden. Die

Regulation der hypophysären Freisetzung von Prolaktin (Lamberts & McLeod 1990) erfolgt maßgeblich über das tubero-infundibuläre dopaminerge System (inhibierend) bzw. durch Serotonin (stimulierend). Interessanterweise scheint auch CRH, der primäre Stimulator der ACTH-Freisetzung auf adenohipophysärer Ebene und ein endogenes zentrales Anxiogenikum (Dunn & Berridge 1990), an der Stimulation der Sekretion von Prolaktin beteiligt zu sein (Morel et al. 1989, Akema et al. 1995). Unterschiede der Reaktivität von ACTH, Corticosteron und Prolaktin auf eine Vielzahl von Stressoren wurden auch bei *Roman high-* und *-low-avoidance* Ratten beschrieben (Gentsch et al. 1981, 1988, Walker et al. 1989, 1992, Steimer et al. 1997), die auch in ihrer angeborenen Ängstlichkeit differieren. Im Gegensatz zu unseren HAB/LAB-Ratten (Liebsch et al. 1998b), unterschieden sich diese Tiere jedoch auch in ihrer adenohipophysären Sensitivität auf CRH-Infusion und in ihrer basalen Aktivität der HPA-Achse (Gentsch et al. 1988, Walker et al. 1989, 1992).

Da Ängstlichkeit, eher noch als eine Stimulus-spezifische Angst, eines der Hauptsymptome in vielen Formen psychiatrischer Erkrankungen ist, kann die Identifikation neuroendokriner Korrelate der Angst im Tiermodell letztlich zu einer effektiveren Behandlung der Patienten führen. In dieser Untersuchung ergab die Exposition des für beide Linien vergleichbaren emotionalen Stressors (*open-arm*) eine Assoziation zwischen angstbezogenem Verhalten und der Streß-induzierten Freisetzung von ACTH, Corticosteron und Prolaktin. Dieses Phänomen ähnelt den an psychiatrischen Patienten erhobenen Befunden, die oft Zeichen einer hyper-reaktiven HPA-Achse in Assoziation mit einer hohen Angstdisposition zeigen (Holsboer 1989, Holsboer & Barden 1996), was für eine kausale Beziehung beider Parameter spricht. Dies macht die HAB/LAB-Ratten zu einem vielversprechenden Tiermodell für die weitere Erforschung der psychopathologischen Relevanz einer hyper-reaktiven HPA-Achse und anderer neuroendokriner Systeme. Weiterführende Untersuchungen werden an diesen Tieren unternommen, um einen gemeinsamen Pfad für die Streß-bezogene Regulation von CRH/ACTH/Corticosteron und Prolaktin zu finden, welcher jedoch unabhängig ist von demjenigen, der die Streß-induzierte OXT-Freisetzung reguliert.

Neben der Validierung der HAB/LAB-Ratten als Tiermodell für psychopathologische Emotionalität, waren auch die entwicklungsbiologischen Determinanten für die emotional extremen Phänotypen der HAB/LAB-Ratten von großem Interesse. Zunächst erfolgte zur Untersuchung pränataler Faktoren, die zur Ausprägung der emotionalen Disposition von HAB- und LAB-Tieren beitragen, eine verhaltensbiologische und neuroendokrine Charakterisierung trächtiger HAB/LAB-Weibchen. Der verhaltensbiologische

Vergleich trächtiger Tiere beider Linien mit den jeweiligen virginen Kontrollen ergab eine geringere Exploration der offenen Arme, verbunden mit einer verringerten lokomotorischen Aktivität, bei trächtigen Weibchen. Jedoch zeigte das angstbezogene Verhalten auf der *plus-maze* auch während der Trächtigkeit konstante Linien-spezifische Unterschiede. So traten HABs z. B. seltener in die offenen Arme ein und verbrachten dort auch weniger Zeit ($p < 0.01$, Abb. 46) als LABs. Während Schwimmstreß-Exposition zeigten sich zwar keine Unterschiede im Schwimmverhalten trächtiger und virginer Weibchen der selben Linie, jedoch war die Dauer aktiven Schwimmens (*struggling*) sowohl bei virginen als auch trächtigen Weibchen der HAB-Linie geringer als bei den jeweiligen LAB-Weibchen. Wie auch bei männlichen HAB/LAB-Ratten (siehe Kap. 3.4.1.2) zeigten sich bei virginen Tieren keine Linien-spezifischen Unterschiede der basalen Aktivität der HPA-Achse. Dahingegen waren die basalen Plasmakonzentrationen von ACTH und Corticosteron bei trächtigen HAB-Weibchen, verglichen mit allen anderen Gruppen, signifikant erhöht (Abb. 47). Obwohl die Exposition von *plus-maze* und Schwimmstreß in allen Gruppen einen deutlichen Anstieg der Plasmakonzentrationen von ACTH und Corticosteron induzierte, war die Stimulation der ACTH-Freisetzung durch beide Stressoren bei trächtigen Tieren beider Linien weniger ausgeprägt als bei den jeweiligen virginen Kontrollen. Es zeigten sich jedoch keine signifikanten Linien-spezifischen Unterschiede. Bei Stimulation der HPA-Achse durch iv-Injektion von CRH zeigte sich eine reduzierte Reaktivität der HPA-Achse während der Trächtigkeit, jedoch ohne Linien-spezifische Unterschiede. Die basalen und Schwimmstreß-stimulierten Plasmakonzentrationen von OXT und AVP differierten nicht hinsichtlich des Reproduktionsstadiums oder der Linienzugehörigkeit (Tabelle 7). 15 min nach dem Schwimmstreß war die Freisetzung von OXT in allen Gruppen erhöht, wohingegen die Plasmakonzentration von AVP zum Teil signifikant abfiel (trächtige HAB). Die basale Konzentration von Plasma-Laktat war in beiden Linien vergleichbar, jedoch war sie bei trächtigen deutlich höher als bei virginen Tieren. Korrespondierend zu der Aktivität des Schwimmverhaltens stieg die Plasmakonzentration von Laktat nach Schwimmstreß-Exposition in allen Gruppen an, jedoch in geringerem Maße bei den HAB-Ratten.

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, daß der deutliche Unterschied in der Angstdisposition der HAB- und LAB-Zuchtlinien (Liebsch et al. 1998a, b) über mehrere Generationen stabil blieb (siehe Kap. 3.4.1.1.1). Dieser Unterschied bestand auch während der Trächtigkeit (Abb. 47), trotz der extremen hormonellen Veränderungen, die während der peripartalen Periode erfolgen. Auch während Schwimmstreß-Exposition blieb das Verhalten von HAB/LAB-Ratten charakteristisch. So zeigten sowohl virgine als auch

trächtige HAB-Ratten weniger aktives (*struggling*) und somit mehr passives (*floating*) Schwimmverhalten als virgine und trächtige LABs, wodurch Ergebnisse an männlichen Tieren (Liebsch et al. 1998b) reproduziert werden konnten. Die Unterschiede im Schwimmverhalten spiegeln sich auch in den Plasmakonzentrationen von Laktat wider, die einen geringeren Schwimmstreß-induzierten Anstieg bei virginen und trächtigen HAB-Ratten zeigten (Tabelle 7). Diese Ergebnisse suggerieren eine enge Verbindung zwischen der emotionalen Bewertung einer neuartigen Situation und den Streßbewältigungs-Strategien. In diesem Kontext sollte betont werden, daß bisher keine Linien-spezifischen Unterschiede kognitiver Funktionen, wie z. B. beim Kurz (*social discrimination*-Test, Liebsch et al. 1998a)- oder Langzeitgedächtnis (*Morris water-maze*, Daten unveröffentlicht) beobachtet werden konnten.

Im Vergleich zu trächtigen LAB-Tieren waren die Plasmakonzentrationen von ACTH und Corticosteron unter Basalbedingungen bei trächtigen HABs erhöht (Abb. 47). Diese Ergebnisse führen zu der Annahme, daß die chronische Exposition erhöhter Corticosteron-Plasmakonzentrationen auf die sich entwickelnden Föten der HAB-Linie zu der Entstehung der extrem erhöhten emotionalen und/oder endokrinen Streßreaktivität beiträgt. So könnte die Streßwahrnehmung des Nachwuchses, einschließlich der Bewertung der potentiellen Gefährlichkeit eines Stimulus und der neuroendokrinen Reaktivität darauf bis hin zur Verhaltensantwort, zumindest teilweise vom pränatalen hormonellen Zustand der Mutter abhängen. Also muß der Übergang mütterlicher emotionaler Charakteristika auf den Nachwuchs über hormonelle Parameter während der späten Trächtigkeit und ein Einfluß dieser auf die individuelle Entwicklung der Nachkommen in Erwägung gezogen werden. Diese Schlußfolgerung wird durch eine Vielzahl von Studien unterstützt, die einen Beitrag der mütterlichen Streß-induzierten Freisetzung von Hormonen der HPA-Achse, speziell von Corticosteron, während der Trächtigkeit zu der emotionalen sowie neuroendokrinen Entwicklung der Nachkommen zeigen (Suchecki & Neto 1990, Fameli et al. 1994, Barbazanges et al. 1996, Vallée et al. 1997, siehe auch Übersichtsartikel Weinstock 1997).

Die reduzierte Corticosteron-Freisetzung nach Applikation von CRH bei trächtigen HAB-Ratten (Abb. 49) deckt vermutlich adaptive Mechanismen auf, die sich als Gegenregulation zur erhöhten basalen Aktivität der HPA-Achse entwickelt haben. So scheinen Veränderungen hypothalamischer ACTH-Freisetzungsfaktoren, wie z. B. CRH und AVP, eher ursächlich für die basale Aktivierung der HPA-Achse bei trächtigen HAB-Weibchen zu sein, als hypophysäre oder adrenale Mechanismen. Der Unterschied der basalen Aktivität der HPA-Achse zwischen trächtigen HAB- und LAB-Ratten ging nicht mit

unterschiedlicher Aktivierung nach Exposition des emotionalen und physischen Stressors einher. Es bleibt zu zeigen, ob dieses Phänomen in der aktivierten basalen Freisetzung von ACTH und Corticosteron oder in einer geringeren sensorischen Wahrnehmung potentiell gefährlicher Stimuli begründet ist, da HAB-Ratten sich bevorzugt in den geschlossenen, dunklen Kompartimenten der *plus-maze* aufhielten. In jedem Fall sollte auch die reduzierte lokomotorische Aktivität der HAB-Ratten, angezeigt durch eine geringere Anzahl von Eintritten in die geschlossenen Arme der *plus-maze* (Abb. 46) und durch geringe Zeit aktiven Schwimmens (*struggling*) während Schwimmstreß-Exposition als bei LABs, berücksichtigt werden. Allerdings erlaubt unser experimenteller Ansatz keinen direkten Vergleich der neuroendokrinen Reaktionen von HAB- und LAB-Ratten auf den emotionalen (*plus-maze*) mit denen auf den physischen Stressor (Schwimmstreß). Da beide Stressoren zeitlich aufeinander folgen, kann vor Schwimmstreß-Exposition kein definierter basaler Zustand mehr garantiert werden. Trotzdem kann davon ausgegangen werden, daß die Exposition des *plus-maze* (ein milder emotionaler Stressor) ca. 30 min zuvor die Reaktionen auf Schwimmstreß (ein starker physiologischer Stressor) nicht nennenswert beeinflußt.

In unserer Studie ergab ein Vergleich virginer HAB/LAB-Ratten keine signifikanten Unterschiede der ACTH- und Corticosteron-Freisetzung unter basalen oder stimulierten Bedingungen. Dies wird in der Wahl der Stressoren begründet sein, da bei männlichen HAB-Ratten eine erhöhte Reaktivität der HPA-Achse auch nur nach modifizierter *plus-maze*-Exposition (*open-arm*, siehe Kap. 3.4.1.2) beobachtet wurde, während die Linien-spezifischen Unterschiede nach Exposition des original *plus-maze* nur tendenziell vorhanden waren (Liebsch et al. 1998b). In diesem Experiment wurde bewußt, zugunsten einer parallelen Untersuchung des angstbezogenen Verhaltens im *plus-maze*-Test, auf die Verwendung einer *open-arm*-Exposition als mildem emotionalen Stressor verzichtet. Die vergleichbare Aktivierung der HPA-Achse bei weiblichen HAB- und LAB-Ratten nach Schwimmstreß-Exposition reproduzierte die Ergebnisse an Männchen beider Linien (Liebsch et al. 1998b). In diesem Zusammenhang sollte darauf hingewiesen werden, daß Schwimmstreß-Exposition die HPA-Achse extrem aktiviert, so daß annähernd ein Maximum der ACTH- und Corticosteron-Freisetzung erreicht wird. Unter solchen Bedingungen ist es vorstellbar, daß feinere Linien-spezifische Unterschiede in der Aktivierbarkeit der HPA-Achse nicht detektierbar sind. Zudem sollte erwähnt werden, daß in dieser Untersuchung auf den Nachweis des Östruszyklus bei virginen Tieren verzichtet wurde. So sollte auch die Möglichkeit, daß unterschiedliche Östrusstadien die Reaktivität der HPA-Achse der virginen HAB/LAB-Weibchen beeinflußt haben, nicht außer Acht gelassen werden.

Die weitere hormonelle Analyse trächtiger HAB- und LAB-Weibchen ergab zum einen keine nennenswerten Linien-Unterschiede der Plasmakonzentrationen von Progesteron und Östrogen während der Trächtigkeit (Daten unveröffentlicht) und zum anderen eine unveränderte neurohypophysäre Freisetzung von OXT und AVP unter basalen Bedingungen (Tabelle 7). Im Gegensatz zu dem Schwimmstreß-induzierten Anstieg von OXT blieb die Streß-induzierte Freisetzung von AVP unverändert bzw. nahm bei trächtigen HAB-Ratten sogar signifikant ab (Tabelle 7). Dies ist konsistent mit früheren Beobachtungen an männlichen Ratten (Yagi et al. 1992), jedoch trotzdem bemerkenswert, da die Plasma-Osmolarität - ein effizienter Stimulus für die AVP-Freisetzung - durch Schwimmstreß dramatisch ansteigt (Abel 1994, Wotjak et al. 1998).

Sowohl bei HAB- als auch LAB-Ratten konnten die typischen Trächtigkeitsbedingten Veränderungen der Aktivität der HPA-Achse beobachtet werden. Übereinstimmend mit früheren Ergebnissen (Neumann et al. 1998) war bei trächtigen Tieren (Tage 18-20) die Freisetzung von ACTH und Corticosteron, trotz erhöhter basaler Aktivität der HPA-Achse bei trächtigen HABs, nach Exposition von emotionalen und physischen Stressoren signifikant geringer als bei virginen Kontrollratten. So scheint die adaptive Absenkung der Reaktivität der HPA-Achse während der Trächtigkeit ein robuster physiologischer Mechanismus zu sein, der die sich entwickelnde fötale HPA-Achse vor exzessiven ACTH- und Corticosteron-Konzentrationen schützt. Diese reduzierte Reaktivität der HPA-Achse bei trächtigen Weibchen beider Zuchtlinien zeigt sich auch in einer reduzierten Reaktivität der adenohipophysären corticotropen Zellen auf exogenes CRH (Abb. 49). Damit konnten frühere Resultate bestätigt werden, die zudem während der Trächtigkeit eine reduzierte Bindung von CRH an CRH-1-Rezeptoren und eine verringerte CRH-stimulierte Akkumulation von zyklischem AMP in den corticotropen Zellen der Adenohipophyse beschreiben (Neumann et al. 1998). Es muß darauf hingewiesen werden, daß am letzten Tag der Trächtigkeit (2. Versuchstag) auch bei LAB-Ratten die basale Plasmakonzentration von Corticosteron erhöht war, jedoch in einem geringeren Ausmaß als bei HAB-Ratten (Abb. 49). Ein solcher basaler Hypercortisolismus wurde auch bei Normalratten während der späten Trächtigkeit beschrieben (Neumann et al. 1998). Es ist unwahrscheinlich, daß diese erhöhten Plasmakonzentrationen aus der Stressor-Exposition am ersten Versuchstag resultieren (Tannenbaum et al. 1997), da die gleich behandelten virginen Tiere keinen solchen Anstieg der basalen Hormonkonzentrationen zeigten. Unsere Studie bestätigt zudem, daß die Ängstlichkeit von Ratten am Ende der Trächtigkeit generell ansteigt (Neumann et al. 1998), da trächtige Tiere beider Linien weniger Zeit auf den offenen Armen der *plus-maze*

verbrachten und seltener in diese eintraten als die jeweiligen virginen Kontrollen (Abb. 46). Im Gegensatz dazu konnten keine Trächtigkeits-bedingten Veränderungen des Schwimmverhaltens beobachtet werden. Trotzdem ging das unveränderte Schwimmverhalten trächtiger Ratten mit einer verminderten Reaktivität der HPA-Achse einher (Abb. 47). Während also angeborene basale Angst bei trächtigen HAB-Ratten mit einer gesteigerten Aktivität der HPA-Achse assoziiert ist, scheint die verhaltensbiologische und neuroendokrine Streßreaktivität, abhängig vom jeweiligen Stressor, dissoziiert.

Die zur Untersuchung postnataler Faktoren, welche zur Determination der emotionalen Disposition von HAB- und LAB-Tieren beitragen, durchgeführte Adoptionsstudie (*cross-fostering*) ergab weder bei männlichen noch bei weiblichen Tieren einen Einfluß der mütterlichen Angstdisposition auf die Emotionalität der Nachkommen (Tabelle 8). Als Kontrollen zu den adoptierten Tieren, die durch Mütter der anderen Linie aufgezogen wurden, wurde sowohl regulärer, im gleichem Zeitraum und in der selben Generation aufgewachsener Zuchtnachwuchs als auch die vorher oder nachher durch die selben Eltern geborenen Geschwister herangezogen. Somit wurden intra-familiäre wie auch externe Faktoren (Jahreszeit, Umweltbedingungen) beachtet. Ansonsten wurden die Tiere vollkommen gleich behandelt und getestet.

Unterschiede unmittelbar postnataler Faktoren, die wichtig für die emotionale und neuroendokrine Entwicklung der Nachkommen sind (Cirulli et al. 1992, Liu et al. 1997, Caldji et al. 1998), konnten bei HAB- und LAB-Ratten bisher nicht nachgewiesen werden. Auch das postnatale mütterliche Verhalten schien sich in beiden Linien nicht zu unterscheiden (unveröffentlichte Daten). Neueste Untersuchungen von Caldji et al. (1998) zeigen eine Relevanz des unmittelbaren postpartalen mütterlichen Verhaltens (1-24 h nach Geburt), speziell der Intensität des Sauberleckens der Jungen nach der Geburt, bei der Ausprägung der Emotionalität und der neuroendokrinen Disposition der Nachkommen. Die Frage, ob das unmittelbare peripartale Verhalten der Muttertiere zur Ausprägung der verhaltensbiologischen und neuroendokrinen Unterschiede bei HAB/LAB-Ratten beiträgt, läßt sich mit dem methodischen Ansatz der vorliegenden Studie nicht klären. Deshalb werden weiterführend genauere Untersuchungen zum mütterlichen Verhalten während und unmittelbar nach der Geburt bei HAB/LAB-Ratten folgen. In diesem Zusammenhang sollte nochmals auf die in dieser Arbeit beschriebene Suppression der HPA-Achse während der Geburt durch endogene Opiate eingegangen werden (siehe Kap. 4.2). Da bei HAB-Ratten schon während der Trächtigkeit eine erhöhte basale Freisetzung von ACTH und Corticosteron gezeigt wurde (s. o.), wären bei diesen Tieren ebenfalls Modifikationen von Aktivität und Regulation der HPA-

Achse während der Geburt denkbar, die ihrerseits Einfluß auf die verhaltensbiologische und neuroendokrine Entwicklung der Nachkommen, aber auch auf das unmittelbar postnatale Verhalten des Muttertieres ausüben könnten.

Die Untersuchung genetischer Faktoren, welche zu der Determination der emotionalen Disposition von HAB- und LAB-Tieren beitragen, wurde mittels einer *cross-mating*-Studie durchgeführt. Hier ergaben sich signifikante Unterschiede zwischen dem *cross-mating* Nachwuchs und den Kontrollen (Abb. 50, Tabelle 9). Sowohl männliche als auch weibliche Tiere zeigten deutliche Differenzen des angstbezogenen Verhaltens zwischen den *cross-mating*-Nachkommen (F1- und F2-Generation) und dem regulären, im gleichen Zeitraum und in der selben Generation aufgewachsenen Zuchtnachwuchs (F1-Kontrolle). Bei Ratten beiderlei Geschlechts lagen die *cross-mating*-Nachkommen bei allen angstbezogenen Parametern der *plus-maze*-Testung zwischen den Werten der HAB- und LAB-F1-Kontrollen (Abb. 50, Tabelle 9). Dabei ergaben sich keine nennenswerten Geschlechts-spezifischen Unterschiede. Die lokomotorische Aktivität, angezeigt durch die Anzahl der Eintritte in geschlossene Arme, war bei männlichen HAB-F1-Kontrolltieren signifikant geringer als bei den korrespondierenden LAB-Kontrollen (Abb. 50). Im Vergleich zu Männchen war die lokomotorische Aktivität bei weiblichen Tieren beider Linien erhöht ($p < 0.05$, $p < 0.01$ vs. Männchen), zeigte aber keine Linien-spezifischen Unterschiede.

Die hier erhobenen Daten lassen eindeutig auf eine genetische Determination des differierenden angstbezogenen Verhaltens bei HAB- und LAB-Ratten schließen. Die Intermediärtiere der ersten Generation (HAB/LAB- oder LAB/HAB-F1-Tiere) zeigten in jedem der erhobenen Parameter, der eindeutig mit dem Faktor *Angst* korreliert ist (Henniger et al. 2000), Verhaltensdaten, deren Mittelwert genau zwischen denen der parental Linien liegt (Abb. 50). Ein solches Ergebnis spricht gegen eine ausschließliche Vererbung der unterschiedlichen Angstcharakteristika bei HAB/LAB-Ratten durch mütterliches oder väterliches Erbgut. Eher wird hier eine multigene Vererbung der Angstdisposition, wie sie schon mehrfach in Erwägung gezogen wurde (Brush 1991), angezeigt. Dennoch werden bestimmte Verhaltensweisen, so auch Angst, vermutlich durch sogenannte Hauptgene (Hen 1996) maßgeblich bestimmt, wobei eine Vielfalt weiterer Gene dann die Expression von emotionalem Verhalten modulieren dürfte. Unser Ziel wird es sein, diese Hauptgene durch Führung von reinen HAB- und LAB-Inzuchtlinien über bis zu 20 Generationen zu isolieren und näher zu charakterisieren. Eine hierbei in Frage kommende Technik könnte die Suche nach "*quantitative trait loci*" sein (Flint et al. 1996).

5 Zusammenfassung und Perspektive

Diese Arbeit konnte eine inhibitorische Kontrolle der HPA-Achse unter basalen und Streß-induzierten Bedingungen durch intrazerebrales OXT zeigen, die zumindest anteilig über Neuronen des hypothalamischen PVN vermittelt wird. Die neurohypophysäre Freisetzung von OXT und das angstbezogene Verhalten scheinen hingegen von zentralem OXT unabhängig zu sein. Eine ähnliche Funktion bei der Regulation der HPA-Achse und des Angstverhaltens wurde bereits für AVP beschrieben. Also sind beide Neuropeptide, wenn sie zentral freigesetzt werden, an der Modulation der Streßreaktion beteiligt und diese Funktion ist dissoziiert von ihrer peripheren Freisetzung und Wirkung.

Während der peripartalen Periode, die Trächtigkeit, Geburt und Laktation einschließt, sind morphologische und funktionelle Veränderungen von OXT-Neuronen bekannt. So erfolgt eine spezifische Aktivierung des Systems durch Reproduktions-bezogene Stimuli, während, wie auch hier bestätigt werden konnte, die Streßreaktivität der selben Neuronen inhibiert wird. Ähnlich ist die Streßreaktivität der HPA-Achse während Trächtigkeit und Laktation reduziert. So wurde in dieser Arbeit erstmalig eine Suppression der ACTH- und Corticosteron-Freisetzung auch während des Geburtsvorganges beschrieben. Die Untersuchung der Wechselwirkungen des zentralen OXT-Systems und der hypophysären Sekretion nach Streß-Exposition zeigte deutlich veränderte Effekte intrazerebral freigesetzten OXTs während der peripartalen Periode. Bezüglich der HPA-Achse konnte ein Nachlassen der tonischen Inhibition durch zentrales OXT beobachtet werden, während nun die Streß-induzierte neurohypophysäre Freisetzung von OXT sowie das angstbezogene Verhalten auf der *plus-maze* dadurch kontrolliert wurden. Die während der peripartalen Periode verminderte Streßreaktivität der HPA-Achse wird also, entgegen der primären Hypothese, offensichtlich nicht durch das aktivierte OXT-System vermittelt.

Da sowohl die HPA-Achse als auch das OXT-System z. T. durch endogene Opiate beeinflusst werden, lag die Vermutung nahe, daß Opiat-Rezeptoren die Reproduktions-bezogenen Modifikationen der neuroendokrinen Streßreaktivität vermitteln. Diese Hypothese konnte in der Tat bestätigt werden. Die Stimulation der HPA-Achse virginer Weibchen durch endogene Opiate verschwand gegen Ende der Trächtigkeit und resultierte in einer effektiven Inhibition der HPA-Achse während der Geburt. Während die neurohypophysäre OXT-Freisetzung bei virginen Tieren nicht durch Opiate beeinflusst wurde, entwickelte sich während der späten Trächtigkeit und während der Geburt eine effektive Kontrolle durch endogene Opiate. Die zentrale Freisetzung von OXT im PVN unterlag keinen merklichen Reproduktions-bedingten Modifikationen, wurde jedoch unabhängig von der peripheren

Sekretion durch endogene Opiate beeinflusst. Auch hier kehrte sich die bei virginen Tieren deutliche Stimulation der OXT-Freisetzung im PVN in eine effektive Inhibition während der Trächtigkeit um. Diese Modifikationen in der Wirkung von Opiat-Rezeptoren scheinen sowohl lokal als auch funktionell eng begrenzt zu sein, da auch bei trächtigen Tieren veränderte Opiat-Wirkungen weder hinsichtlich der OXT-Freisetzung im SON noch der verhaltensbiologischen Streßbewältigung beobachtet werden konnten.

Die primäre Intention der Arbeit, die funktionelle Relevanz zentralen OXTs bei der Expression von Angstverhalten und der Streßreaktivität der HPA-Achse zu klären, konnte mittels des Tiermodells der peripartalen Periode nicht weiter verfolgt werden. Erstens verschwand die bei männlichen und virginen Tieren beschriebene Kontrolle der HPA-Achse durch endogenes OXT während Trächtigkeit und Laktation. Zweitens deutet die nur bei trächtigen und laktierenden Tieren beobachtete anxiolytische Wirkung zentralen OXTs eine während der peripartalen Periode von neuroendokrinen Parametern dissoziierte Regulation verhaltensbiologischer Streßreaktionen an. Drittens erlauben die vielfältigen systemischen Modifikationen während der Reproduktion, einschließlich schwankender Konzentrationen von Sexualhormonen und der Veränderungen des endogenen Opiat-Systems, keine unbeeinflusste Untersuchung einzelner Streßhormon-Systeme. Deshalb war es sinnvoller, sich dem Tiermodell der HAB/LAB-Ratten zuzuwenden, das pathophysiologische Veränderungen der Emotionalität vorweist. Hier konnte die Assoziation von verhaltensbiologischen und neuroendokrinen Streßreaktionen selektiv untersucht werden.

Zunächst wurden die HAB/LAB-Tiere einer verhaltensbiologischen Charakterisierung unterzogen, die stabile Linien-spezifische Verhaltens-Unterschiede unter allen untersuchten Bedingungen bestätigen konnte. Die neuroendokrine Charakterisierung der Zuchttiere zeigte bei HAB-Männchen eine Assoziation der extremen Ängstlichkeit mit einer erhöhten Reaktivität der HPA-Achse auf einen emotionalen Stressor (*open-arm*). Jedoch konnte weder im Blut noch im PVN unter basalen oder stimulierten Konditionen eine differentielle Freisetzung von OXT gezeigt werden. Mit diesem Ergebnis konnte kein kausaler Zusammenhang des Linien-spezifisch unterschiedlichen Angstverhaltens und der unterschiedlichen Reaktivität der HPA-Achse auf Streß mit der zentralen oder peripheren OXT-Freisetzung festgestellt werden. Da jedoch eine erhöhte basale und Schwimmstreß-induzierte Freisetzung von AVP im PVN männlicher HABs ermittelt werden konnte, wurden weitere Untersuchungen bezüglich dieses Neuropeptides unternommen. So konnte bei männlichen HAB-Ratten mittels *in situ* Hybridisierung eine signifikant höhere basale Expression von AVP-mRNA in magnozellulären Neuronen des PVN nachgewiesen werden.

Die periphere AVP-Sekretion unter basalen und *open-arm*-stimulierten Konditionen zeigte weder Unterschiede zwischen HABs und LABs noch eine effektive Stimulation durch Streß-Exposition, so daß die erhöhte AVP-mRNA-Expression bei HABs die Grundlage für die gesteigerte zentrale Freisetzung bilden dürfte. Diese Ergebnisse signalisieren eine Interaktion von extremem Angstverhalten, erhöhter Streßreaktivität der HPA-Achse und gesteigerter Freisetzung von AVP im PVN bei HAB-Ratten. Unterstützt wurde diese Theorie auch durch die Normalisierung des pathologischen Dex/CRH-Tests bei HABs durch Applikation eines AVP-Antagonisten. Trotz dieser überzeugenden Hinweise sollten noch weitere Untersuchungen folgen, die durch Ausschalten der hypothalamischen AVP-Freisetzung mittels Antagonisten oder *antisense targeting* die Kausalität dieser Zusammenhänge klären könnten.

Neben der gesteigerten Reaktivität der HPA-Achse zeigten HAB-Ratten eine höhere periphere Freisetzung von Prolaktin unter basalen und Streß-stimulierten Bedingungen. Da dieses Ergebnis u. a. eine differentielle Aktivierung des zentralen Dopamin- und /oder Serotonin-Systems andeutet, sollten auch in dieser Hinsicht weitere Untersuchungen erfolgen, da auch diese Neurotransmitter mittelbaren oder unmittelbaren Einfluß auf die HPA-Achse ausüben können und zudem bei der Entstehung von Angst-/Depressions-Erkrankungen beteiligt zu sein scheinen.

Wie durch die *cross-mating*-Studie bestätigt, liegt bei HAB/LAB-Ratten eine eindeutige genetische Determination des zwischen den Linien differierenden angstbezogenen Verhaltens vor. Die Untersuchung perinataler Faktoren ergab zwar eine mögliche hormonelle Beeinflussung von HAB-Föten durch eine chronisch erhöhte Plasmakonzentration mütterlichen Corticosterons, jedoch dürfte diese allenfalls einen modulierenden Einfluß auf die fötale Entwicklung haben. So bietet dieses Tiermodell einzigartige Möglichkeiten nicht nur zum Studium der neuroendokrinen Grundlagen psychopathologischer Emotionalität sondern auch der genetischen Korrelate. Solche genetischen Studien, z. B. die Suche nach "*quantitative trait loci*" oder genetische Assoziationsstudien bei den HAB/LAB-Ratten werden möglicherweise einen großen Beitrag zum Verständnis der Entstehung psychiatrischer Erkrankungen beim Menschen leisten und zu einer spezifischeren pharmakologischen Therapie führen können.

6 Literaturverzeichnis

- Abel EL (1993) Physiological correlates of the forced swim test in rats. *Physiol Behav* 54:309-317.
- Abel EL (1994) A further analysis of physiological changes in rats in the forced swim test. *Physiol Behav* 56:795-800.
- Akema T, Chiba A, Oshida M, Kimura F, Toyoda J (1995) Permissive role of corticotropin-releasing factor in the acute stress-induced prolactin release in female rats. *Neurosci Letters* 198:146-148.
- Appenrodt E, Schnabel R, Schwarzberg H (1998) Vasopressin administration modulates anxiety-related behavior in rats. *Physiol Behav* 64:543-547.
- Arey BJ, Freeman ME (1992) Activity of oxytocinergic neurons in the paraventricular nucleus mirrors the periodicity of the endogenous stimulatory rhythm regulating prolactin secretion. *Endocrinology* 130:126-132.
- Argiolas A und Gessa GL (1991) Central functions of oxytocin. *Neurosci Biobehav Rev* 15:217-231.
- Arletti R, Bertolini A (1985) Oxytocin stimulates lordosis behavior in female rats. *Neuropeptides* 6:247-253.
- Arletti R, Bertolini A (1987) Oxytocin acts as an antidepressant in two animal models of depression. *Life Sci* 41:1725-1730.
- Armario A, Galvadà A, Martí O (1988) Forced swimming test in rats: effect of desipramine administration and the period of exposure to the test on struggling behaviour, swimming, immobility and defecation rate. *Eur J Pharmacol* 158:207-212.
- Atkinson HC, Waddell BJ (1995) The hypothalamo-pituitary-adrenal axis in rat pregnancy and lactation: circadian variation and interrelationship of plasma adrenocorticotropin and corticosterone. *Endocrinology* 136: 512-520.
- Barbazanges A, Piazza PV and Le Moal M (1996) Maternal glucocorticoid secretion mediates long-term effects of prenatal stress. *J Neurosci* 16:3943-3949.
- Baxter JD, Tyrell JB (1987) The adrenal cortex. In: Felig P, Baxter JD, Broadus AE, Frohman LA (eds.): *Endocrinology and Metabolism*, New York, McGraw-Hill p385-511.
- Bhattacharya SK, Bhattacharya A, Chakrabarti A (1998) Anxiogenic activity of intraventricularly administered arginine-vasopressin in the rat. *Biogen Amines* 14: 367-385.
- Bicknell RJ, Leng G (1982) Endogenous opiates regulate oxytocin but not vasopressin secretion from the neurohypophysis. *Nature* 298:161-162.
- Bicknell RJ, Leng G, Lincoln DW, Russell JA (1988) Naloxone excites oxytocin neurones in the supraoptic nucleus of the lactating rat after chronic morphine treatment. *J Physiol* 396:297-317.
- Breton C, Pechoux C, Morel G, Zingg HH (1995) Oxytocin receptor messenger ribonucleic acid: characterization, regulation, and cellular localization in the rat pituitary gland. *Endocrinology* 136:2928-2936.
- Brinton RE, Wamsley JK, Gee KW, Wan Y-P and Yamamura HI (1984) [³H]oxytocin binding sites in the rat brain demonstrated by quantitative light microscopic autoradiography. *Eur J Pharmacol* 102:365-367.
- Broad KD, Kendrick KM, Sirinatsinghi DJ and Keverne EB (1993) Changes in oxytocin immunoreactivity and mRNA expression in the sheep brain during pregnancy, parturition and lactation and in response to oestrogen and progesterone. *J Neuroendocrinol* 5:435-444.
- Brush FR (1991) Genetic determinants of individual differences in avoidance learning: behavioral and endocrine characteristics. *Experientia* 47:1039-1050.
- Buckingham J, Cooper TA (1984) Differences in hypothalamo-pituitary-adrenocortical activity in the rat after acute and prolonged treatment with morphine. *Neuroendocrinology* 38:411-417.
- Buijs RM (1978) Intra- and extrahypothalamic vasopressin and oxytocin pathways in the rat. Pathways to the limbic system, medulla oblongata and spinal cord. *Cell Tissue Res* 192:423-435.
- Bull PM, Russell JA (1992) Oxytocin secretory responses to hypernatraemia and inhibition by morphine in pregnant urethane-anaesthetised rats. *J Physiol* 452: p210.
- Bull PM, Douglas AJ, Russell JA (1994) Opioids and coupling of the anterior peri-third ventricular input to oxytocin neurones in anaesthetized pregnant rats. *J Neuroendocrinol* 6:267-274.

- Burgess LH, Handa RJ (1992) Chronic estrogen-induced alterations in adrenocorticotropin and corticosterone secretion, and glucocorticoid receptor-mediated functions in female rats. *Endocrinology* 131:1261-1269.
- Burton PJ, Waddell BJ (1994) 11 β -Hydroxysteroid dehydrogenase in the rat placenta: developmental changes and the effects of altered glucocorticoid exposure. *J Endocrinol* 143:505-513.
- Caldji C, Tannenbaum B, Sharma S, Francis D, Plotsky PM, Meaney MJ (1998) Maternal care during infancy regulates the development of neural systems mediating the expression of fearfulness in the rat. *Proc Natl Acad Sci USA* 95:5335-5340.
- Caldwell JD, Greer ER, Johnson MF, Prange AJ Jr, Pedersen CA (1987) Oxytocin and vasopressin immunoreactivity in hypothalamic and extrahypothalamic sites in late pregnant and postpartum rats. *Neuroendocrinology* 46:39-47.
- Calogero AE, Galluci WT, Chrousos GP, Gold PW (1988) Interaction between GABA-ergic neurotransmission and rat hypothalamic corticotropin-releasing hormone secretion *in vitro*. *Brain Res* 463: 28-36.
- Calogero AE (1996) The kappa-opioid receptor agonist MR-2034 stimulates the rat hypothalamic-pituitary-adrenal axis: studies in vivo and in vitro. *J Neuroendocrinol* 8:579-585.
- Cameron OG, Nesse RM (1988) Systemic hormonal and physiological abnormalities in anxiety disorders. *Psychoneuroendocrinology* 13:287-307.
- Carey MP, Deterd CH, de Koning J, Helmerhorst F, de Kloet ER (1995) The influence of ovarian steroids on hypothalamic-pituitary-adrenal regulation in the female rat. *J Endocrinol* 144:311-321.
- Carr BR, Parker CR, Madden JD, MacDonald PC, Porter JC (1981) Maternal plasma adrenocorticotropin and cortisol relationships throughout human pregnancy. *J Obstet Gynecol* 139: 416-421.
- Carter DA, Williams TD, Lightman SL (1986) A sex difference in endogenous opioid regulation of the posterior pituitary response to stress in the rat. *J Endocrinol* 111:239-244.
- Carter DA and Lightman SL (1987a) Oxytocin responses to stress in lactating and hyperprolactinaemic rats. *Neuroendocrinology* 46:532-537.
- Carter DA and Lightman SL (1987b) Oxytocin stress responses are dependent upon emotionality. *Psychoneuroendocrinology* 12:219-223.
- Carter CS (1992) Oxytocin and sexual behavior. *Neurosci Biobehav Rev* 16:131-144.
- Cirulli F, Gottlieb SL, Rosenfeld P, Levine S (1992) Maternal factors regulate stress responsiveness in the neonatal rat. *Psychobiology* 20:143-152.
- Cover PO, Buckingham J (1989) Effects of selective opioid-receptor blockade on the hypothalamo-pituitary-adrenocortical responses to surgical trauma in the rat. *J Endocrinol* 121:213-220.
- Cratty MS, Ward HE, Johnson EA (1995) Prenatal stress increases corticotropin-releasing factor (CRF) content and release in rat amygdala minces. *Brain Res* 675: 297-302.
- da Costa APC, Wood S, Ingram CD, Lightman SL (1996a) Region-specific reduction in stress-induced *c-fos* mRNA expression during pregnancy and lactation. *Brain Res* 742:177-184.
- da Costa AP, Guevara-Guzman RG, Ohkura S, Goode JA, Kendrick KM (1996b) The role of oxytocin release in the paraventricular nucleus in the control of maternal behaviour in the sheep. *J Neuroendocrinol* 8:163-177.
- Dallman MF, Akana SF, Scribner KA (1992) Stress, feedback and facilitation in the hypothalamo-pituitary-adrenal axis. *J Neuroendocrinol* 4: 517-526.
- De Goeij DCE, Jezova D, Tilders FJH (1992) Repeated stress enhances vasopressin synthesis in corticotropin-releasing factor neurons in the paraventricular nucleus. *Brain Res* 57:165-168.
- De Kloet ER, Rosenfeld P, Van Eekelen JAM, Sutano W, Levine S (1988) Stress, glucocorticoids and development. In: *Progress in Brain Research* (eds. Boer GJ, Feenstra MGP, Swaab DF, Van Haaren F), Elsevier, Amsterdam, 73: pp.101-120.
- DeKloet ER (1991) Brain corticosteroid receptor balance and homeostatic control. *Front Neuroendocrinol* 12: 95-164.
- Desjardins GC, Brawer JR, Beaudet A (1990) Distribution of μ , δ and κ opioid receptors in the hypothalamus of the rat. *Brain Res* 536:114-123.
- Dondi D, Maggi R, Panerai AE, Piva F, Limonta P (1991) Hypothalamic opiate tone during pregnancy, parturition and lactation in the rat. *Neuroendocrinology* 53:460-466.

- Douglas AJ, Dye S, Leng G, Russell JA, Bicknell RJ (1993) Endogenous opioid regulation of oxytocin secretion through pregnancy in the rat. *J Neuroendocrinol* 5:307-314.
- Douglas AJ, Russell JA (1994) Corticotropin releasing hormone, proenkephalin A and oxytocin mRNAs in the paraventricular nucleus in pregnancy and parturition in the rat. *Gene Therapy* 1 (suppl.), 85.
- Douglas AJ, Neumann I, Meeren HKM, Leng G, Johnstone LE, Munro G, Russell JA (1995) Central endogenous opioid inhibition of supraoptic oxytocin neurons in pregnant rats. *J Neurosci* 15:5049-5057.
- Dunn FL, Brennan TJ, Nelson AE, Robertson GL (1973) The role of blood osmolality and volume in regulating vasopressin secretion in the rat *J Clin Investigat* 52:3212-3219.
- Dunn AJ, Berridge CW (1990) Physiological and behavioral responses to corticotropin-releasing factor administration: is CRF a mediator of anxiety or stress responses? *Brain Res Rev* 15:71-100.
- Dupouy JP, Chatelain A, Allaume P (1980) Absence of transplacental passage of ACTH in the rat: direct experimental proof. *Biol Neonate* 37:96-102.
- Ebner K, Wotjak CT, Holsboer F, Landgraf R, Engelmann M (1999) Vasopressin released within the septal brain area during swim stress modulates the behavioral stress response in rats. *Eur J Neurosci* 11: 997-1002.
- Eisenberg RM (1980) Effects of naloxone on plasma corticosterone in the opiate naive rat. *Life Sci* 26:935-943.
- Ekesbo R, Alm P, Ekstrom P, Lundberg LM, Akerlund M (1991) Innervation of the uterine artery and contractile responses to neuropeptides. *Gynecol Obstet Invest* 31:3036-3042.
- Emson PC, Northrop A, Ichimiya Y (1988) Localization of vasopressin mRNA in the rat brain using in situ hybridization with short cRNA probes made from synthetic DNA templates. *Brain Res* 464:255-258.
- Engelmann M, Ludwig M, Landgraf R (1992) Microdialysis administration of vasopressin and vasopressin antagonists into the septum during pole-jumping behavior in rats. *Behav Neural Biol* 58:51-57.
- Engelmann M, Ludwig M, Landgraf R (1994) Simultaneous monitoring of intracerebral release and behavior: endogenous vasopressin improves social recognition. *J Neuroendocrinol* 6:391-395.
- Engelmann M, Wotjak CT, Landgraf R (1995) The social discrimination procedure: an alternative method to investigate juvenile recognition abilities in rats. *Physiol Behav* 58:315-321.
- Engelmann M, Wotjak CT, Ludwig M, Neumann ID, Landgraf R (1996) Behavioral consequences of intracerebral vasopressin and oxytocin: focus on learning and memory. *Neurosci Biobehav Rev* 20:341-358.
- Eriksson M, Ceccatelli S, Uvnäs-Moberg K, Iadarola M, Hokfelt T (1996) Expression of Fos-related antigens, oxytocin, dynorphin and galanin in the paraventricular and supraoptic nuclei of lactating rats. *Neuroendocrinology* 63:356-367.
- Erisman S, Carnes M, Takahashi LK (1990) The effects of stress on plasma ACTH and corticosterone in young and aging pregnant rats and their fetuses. *Life Sci* 47:1527-1533.
- Ermisch A, Barth T, Ruhle HJ, Skopkova J, Hrbas P, Landgraf R (1985) On the blood-brain barrier to peptides: accumulation of labelled vasopressin, DesGlyH²-vasopressin and oxytocin by brain regions. *Endocrinolog Exp* 19:29-37.
- Erskine MS, Barfield RJ, Goldman BD (1978) Intraspecific fighting during late pregnancy and lactation in rats and effects of litter removal. *Behav Biol* 23:206-213.
- Fajardo MC, Florido J, Villaverde C, Oltras CM, González-Ramírez AR, González-Gómez F (1994) Plasma levels of β -endorphin and ACTH during labor and immediate puerperium. *Eur J Obstet Gyn Reprod Biol* 55:105-108.
- Fameli M, Kitraki E, Stylianopoulou F (1994) Effects of hyperactivity of the maternal hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis during pregnancy on the development of the HPA axis and brain monoamines of the offspring. *Int J Dev Neurosci* 12:651-659.
- Feldman S, Weidenfeld J (1995) Neural mechanisms involved in the corticosteroid feedback effects on the hypothalamo-pituitary-adrenocortical axis. *Prog Neurobiol* 45:129-141.
- File S (1980) The use of social interaction as a method for detecting anxiolytic activity of chlordiazepoxide-like drugs. *J Neurosci Meth* 2: 219-238.

- Flint J, Corley R (1996) Do animal models have a place in the genetic analysis of quantitative human behavioral traits? *J Mol Med* 74:515-521.
- Forsling ML, MacDonald AA, Ellendorff F (1979) The neurohypophyseal hormones. In: *Physiology and Control of Parturition in domestic animals* (eds. Ellendorff F, Taverne M, Smidt D), Elsevier, Amsterdam p43-56
- Freund-Mercier MJ, Richard P (1984) Electrophysiological evidence for facilitatory control of oxytocin neurones by oxytocin during suckling in the rat. *J Physiol* 352:447-466.
- Freund-Mercier MJ, Stoeckel E, Palacios JM, Pazos A, Reichhart JM, Porte A, Richard P (1987) Pharmacological characteristics and anatomical distribution of [3H]oxytocin-binding sites in the Wistar rat brain studied by autoradiography. *Neuroscience* 20:599-614.
- Freund-Mercier MJ, Moos F, Poulain DA, Richard P, Rodriguez F, Theodosios DT, Vincent JD (1988) Role of central oxytocin in the control of the milk ejection reflex. *Brain Res Bull* 20:737-741.
- Gentsch C, Lichtsteiner M, Feer H (1981) Locomotor activity, defecation score and corticosterone levels during an openfield exposure: a comparison among individually and group-housed rats, and genetically selected rat lines. *Physiol Behav* 27:183-186.
- Gentsch C, Lichtsteiner M, Feer H (1988) Genetic and environmental influences on behavioral and neurochemical aspects of emotionality in rats. *Experientia* 44:482-490.
- Gerlai R (1996) Gene-targeting studies of mammalian behavior: is it the mutation or the background genotype? *TINS* 19:177-181.
- Gibbs DM (1985) Immunoneutralization of oxytocin attenuates stress-induced corticotropin secretion in the rat. *Regul Peptides* 12:273-277.
- Gibbs DM (1986) Vasopressin and oxytocin: hypothalamic modulators of the stress response: a review. *Psychoneuroendocrinology* 11:131-140.
- Goland RS, Stark RI, Wardlaw SL (1990) Response to corticotropin-releasing hormone during pregnancy in the baboon. *J Clin Endocrinol Metabol* 70:925-929.
- Hallbeck M, Hermanson O, Blomqvist A (1999) Distribution of preprovasopressin mRNA in the rat central nervous system. *J Comp Neurol* 411: 181-200.
- Hard E, Hansen S (1984) Reduced fearfulness in the lactating rat. *Physiol Behav* 35:641-643.
- Hardan A, Birmaher B, Williamson DE, Dahl RE, Ambrosini P, Rabinovich H, Ryan ND (1999) Prolactin secretion in depressed children. *Biol Psychiat* 46: 506-511.
- Hartman RD, Rosella-Dampman LM, Emmert SE, Summy-Long JY (1986) Inhibition of release of neurohypophysial hormones by endogenous opioid peptides in pregnant and parturient rats. *Brain Res* 382:352-359.
- Hashimoto K, Suemaru S, Hattori T, Takao T, Inoue H, Sugawara M, Kageyama J, Ota Z (1986) Effects of (D-Ala², Met⁵)-enkephalinamide and naloxone on ACTH and corticosterone secretion. *Endocrinol Japan* 33:813-820.
- Hatton G.I. (1990) Emerging concepts of structure-function dynamics in adult brain: the hypothalamo-neurohypophysial system. *Prog Neurobiol* 34: 437-504.
- Heinrichs SC, Pich EM, Miczek KA, Britton KT, Koob GF (1992) Corticotropin-releasing factor antagonist reduces emotionality in socially defeated rats via direct neurotropic action. *Brain Res* 581:190-197.
- Hen R (1996) Mean genes. *Neuron* 16:17-21.
- Henniger MSH, Ohl F, Hölter S, Weissenbacher P, Toschi N., Lörscher P, Wigger A, Spanagel R, Landgraf R (2000) Unconditioned anxiety and social behaviour in two rat lines selectively bred for high and low anxiety-related behaviour. *Behav Brain Res* in press
- Herman JP, Prewitt CM, Cullinan WE (1996) Neuronal circuit regulation of the hypothalamo-pituitary-adrenocortical stress axis. *Critical Rev Neurobiol* 10:371-394.
- Hess J, Lesser D, Landgraf R (1992) Vasopressin and oxytocin in brain areas of rats selectively bred for differences in behavioral performance. *Brain Res* 569:106-111.
- Heybach JP, Vernikos J (1981) Naloxone inhibits and morphine potentiates the adrenal steroidogenic response to ACTH. *Eur J Pharmacol* 75:1-6.
- Higuchi T, Tadokoro Y, Honda K, Negoro H (1986) Detailed analysis of blood oxytocin levels during suckling and parturition in the rat. *J Endocrinol* 110:251-256.

- Higuchi T, Bicknell RJ, Leng G (1991) Reduced oxytocin release from the neural lobe of lactating rats is associated with reduced pituitary content and does not reflect reduced excitability of oxytocin neurones *J Neuroendocrinol* 3:1061-1302.
- Hisano S, Li S, Kagotani Y, Daikoku S (1992) Synaptic associations between oxytocin-containing magnocellular neurons and neurons containing corticotropin-releasing factor in the rat magnocellular paraventricular nucleus. *Brain Res* 576:311-318.
- Hogg S (1996) A review of the validity and variability of the elevated plus-maze as an animal model of anxiety. *Pharmacol Biochem Behav* 54:21-30.
- Holmes MC, Antoni FA, Aguilera G, Catt KJ (1986) Magnocellular axons in passage through the median eminence release vasopressin. *Nature* 319: 326-329.
- Holsboer F, von Bardeleben U, Buller R, Heuser I, Steiger A (1987) Stimulation response to corticotropin-releasing hormone (CRH) in patients with depression, alcoholism and panic disorder. *Hormone Metabol Res* 16: 80-88.
- Holsboer F (1989) Psychiatric implications of altered limbic-hypothalamic-pituitary-adrenocortical activity. *Eur Arch Psychiatr Neurol Sci* 238:302-322.
- Holsboer F, Barden N (1996) Antidepressants and hypothalamic-pituitary-adrenocortical regulation. *Endocr Rev* 17:187-205.
- Holsboer F (1999) The rationale for corticotropin-releasing hormone receptor (CRH-R) antagonists to treat depression and anxiety. *J Psychiat Res* 33:181-214.
- Inenaga K, Nagatomo T, Nakao K, Yanihara N, Yamashita H (1994) Kappa selective agonists decrease postsynaptic potentials and calcium components of action potentials in the supraoptic nucleus of rat hypothalamus in vitro. *Neuroscience* 58:331-340.
- Ingram CD, Wakerley JB (1993) Post-partum increase in oxytocin-induced excitation of neurones in the bed nuclei of the stria terminalis in vitro. *Brain Res* 602:325-330.
- Ingram CD, Adams TS, Jiang QB, Terenzi MG, Lambert RC, Wakerley JB, Moos F (1995) Limbic regions mediating central actions of oxytocin on the milk-ejection reflex in the rat. *J Neuroendocrinol* 7:1-13.
- Insel TR, Hill JL, Mayor RB (1986a) Rat pup ultrasonic calls: possible mediation by the benzodiazepin receptor complex. *Pharmacol Biochem Behav* 24:1263-1267.
- Insel TR (1986b) Postpartum increases in brain oxytocin binding. *Neuroendocrinology* 44:515-518.
- Insel TR, Harbaugh CR (1989) Central administration of corticotropin-releasing factor alters rat pup isolation calls. *Pharmacol Biochem Behav* 32: 197-201.
- Insel TR (1990) Regional changes in brain OT receptors post-partum: time-course and relationship to maternal behaviour. *J Neuroendocrinol* 2:539-545.
- Insel TR (1992) Oxytocin - a neuropeptide for affiliation: evidence from behavioral, receptor autoradiographic, and comparative studies. *Psychoneuroendocrinology* 17:3-35.
- Itoi K, Seasholtz AF, Watson SJ (1998) Cellular and extracellular regulatory mechanisms of hypothalamic corticotropin-releasing hormone neurons. *Endocr J* 45:13-33.
- Ivell R, Richter D (1984) Structure and comparison of the oxytocin and vasopressin genes from rat. *PNAS USA* 81:2006-2010.
- Iyengar S, Kim HS, Wood PL (1986) Kappa opiate agonists modulate the hypothalamic-pituitary-adrenocortical axis in the rat. *J Pharmacol Exp Therapeut* 238:429-436.
- Jezová D, Vígás M, Jurcovicová J (1982) ACTH and corticosterone response to naloxone and morphine in normal, hypophysectomized and dexamethasone treated rats. *Life Sci* 31:307-314.
- Jezova D, Skultetyova I, Tokarev DI, Bakos P, Vígás M (1995) Vasopressin and oxytocin in stress. *Ann NY Acad Sci* 771:192-203.
- Ji Y, Mei J, Lu S (1998) Opposing effects of intracerebroventricularly injected norepinephrine on oxytocin and vasopressin neurons in the paraventricular nucleus of the rat. *Neurosci Letters* 244:3-16.
- Johnstone HA, Neumann I, Liebsch G, Shipston M, Seckl JR, Russell JA (1997) 125I-oCRH binding and CRH stimulation of cAMP production by the rat anterior pituitary in vitro are reduced in late pregnancy. *J Endocrinol* 152 (suppl):p191.
- Kasting NW (1988) Simultaneous and independent release of vasopressin and oxytocin in the rat. *Can J Physiol Pharmacol* 66:22-26.

- Keller-Wood M, Dallman MF (1984) Corticosteroid inhibition of ACTH secretion. *Endocr Rev* 5:1-24.
- Keller-Wood M (1995) Reflex regulation of hormonal responses during pregnancy. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 22:143-151.
- Keller-Wood M (1998) ACTH responses to CRF and AVP in pregnant and nonpregnant ewes. *Am J Physiol* 274:R1762-1768.
- Kendrick KM, Keverne EB, Hinton MR, Goode JA (1991) Cerebrospinal fluid and plasma concentrations of oxytocin and vasopressin during parturition and vaginocervical stimulation in the sheep. *Brain Res Bull* 26:803-807.
- Kendrick KM, DaCosta AP, Broad KD, Ohkura S, Guevara R, Levy F, Keverne EB (1997) Neural control of maternal behaviour and olfactory recognition of offspring. *Brain Res Bull* 44:383-395.
- King MG, Brown R, Kusnecov A (1985) An increase in startle response in rats administered oxytocin. *Peptides* 6:567-568.
- Koehler EM, McLemore GL, Tang W, Summy-Long JY (1993) Osmoregulation of the magnocellular system during pregnancy and lactation. *Am J Physiol* 264: R555-560.
- Kokka N, Garcia JF, Elliot HW (1973) Effects of acute and chronic administration of narcotic analgesics on growth hormone and corticotropin (ACTH) secretion in rats. *Prog Brain Res* 39:347-360.
- Kombian SB, Zidichouski JA, Pittman QJ (1996) GABAB receptors presynaptically modulate excitatory synaptic transmission in the rat supraoptic nucleus in vitro. *J Neurophysiol* 76:1166-1179.
- Kombian SB, Mougnot D, Pittman QJ (1997) Dendritically released peptides act as retrograde modulators of afferent excitation in the supraoptic nucleus in vitro. *Neuron* 19:903-912.
- Kovačs KJ, Sawchenko PE (1996) Sequence of stress-induced alterations in indices of synaptic and transcriptional activation in parvocellular neurosecretory neurons. *J Neurosci* 16:262-273.
- Kramer K, Dijkstra H, Bast A (1993) Control of physical exercise of rats in a swimming basin. *Physiol Behav* 53:271-276.
- Kremarik P, Freund-Mercier MJ, Stoeckel ME (1991) Autoradiographic detection of oxytocin- and vasopressin-binding sites in various subnuclei of the bed nucleus of the stria terminalis in the rat. Effects of functional and experimental sexual steroid variations. *J Neuroendocrinol* 3:689-698.
- Kuriyama K, Nakashima T, Kawarabayashi T, Kiyohara T (1993) Oxytocin inhibits nonphasically firing supraoptic and paraventricular neurons in the virgin female rat. *Brain Res Bull* 31:681-687.
- Lambert RC, Moos F, Richard P (1993a) Action of endogenous oxytocin within the paraventricular and supraoptic nuclei: a powerful link in the regulation of the bursting pattern of oxytocin neurons during the milk ejection reflex in rats. *Neuroscience* 57:1027-1038.
- Lambert RC, Moos FC, Ingram CD, Wakerley JB, Kremarik P, Guerné Y, Richard P (1993b) Electrical activity of neurones in the ventrolateral septum and bed nuclei of the stria terminalis in suckled rats: statistical analysis gives evidence for sensitivity to oxytocin and for relation to milk-ejection reflex. *Neuroscience* 54:361-376.
- Lamberts SWJ, MacLeod RM (1990) Regulation of prolactin secretion at the level of the lactotrop. *Physiol Rev* 70: 279-318.
- Landgraf R, Mintro A, Hess J (1978) Regional net uptake of ¹⁴C-glucose by rat brain under the influence of corticosterone. *Endocrinol Experimental* 12:119-129.
- Landgraf R (1981) Simultaneous measurement of arginine vasopressin and oxytocin in plasma and neurohypophyses by radioimmunoassay. *Endokrinologie* 78:191-204.
- Landgraf R, Neumann I, Schwarzberg H (1988) Central and peripheral release of vasopressin and oxytocin in the conscious rat after osmotic stimulation. *Brain Res* 457:219-225.
- Landgraf R, Gerstberger R, Montkowski A, Probst JC, Wotjak CT, Holsboer F, Engelmann M. (1995a) V1 vasopressin receptor antisense oligodesoxynucleotide into septum reduced vasopressin binding, social discrimination abilities, and anxiety-related behavior in rats. *J Neurosci* 15:4250-4258.
- Landgraf R (1995b) Intracerebrally released vasopressin and oxytocin: measurement, mechanisms and behavioural consequences. *J Neuroendocrinol* 7:243-253.

- Lang RE, Heil JWE, Ganten D, Hermann K, Unger T, Rascher W (1983) Oxytocin unlike vasopressin is a stress hormone in the rat. *Neuroendocrinology* 37:314-316.
- Lawrence AB, Petherick JC, McLean K, Gilbert CL, Chapman C, Russell JA (1992) Naloxone prevents interruption of parturition and increases plasma oxytocin following environmental disturbance in parturient sows. *Physiol Behav* 52:917-923.
- Lawrence AB, Petherick JC, McLean KA, Deans L, Chirnside J, Vaughan A, Clutton E, Terluow EMC (1994) The effect of environment on behaviour, plasma cortisol and prolactin in parturient sows. *Appl Anim Behav Sci* 39:313-330.
- Legros JJ, Chiodera P, Geenen V, von Frenckell R (1987) Confirmation of the inhibitory influence of exogenous oxytocin on cortisol and ACTH in man: evidence of reproducibility. *Acta Endocrinol* 114:345-349.
- Legros JJ, Ansseau M (1992) Neurohypophyseal peptides and psychopathology. In: *Progress in Brain Research* (eds. Swaab DF, Hofman MA, Mirmiran M, Ravid R, van Leeuwen FW), Elsevier, Amsterdam. 93: pp. 455-461.
- Leng G, Mansfield S, Bicknell RJ, Brown D, Chapman C, Hollingsworth S, Ingram CD, Marsh MI, Yates JO (1987) Stress-induced disruption of parturition in the rat may be mediated by endogenous opioids. *J Endocrinol* 114:247-252
- Leng G, Mansfield S, Bicknell RJ, Blackburn RE, Brown D, Chapman C, Dyer RG, Hollingsworth S, Shibuki K, Yates JO, Way SA (1988) Endogenous opioid actions and effects of environmental disturbance on parturition and oxytocin secretion in rats. *J Reprod Fertil* 84:345-356.
- Levin N, Shinsako J, Dallman MF (1988) Corticosterone acts on the brain to inhibit adrenalectomy-induced adrenocorticotropin secretion. *Endocrinology* 122:694-701.
- Levis MC, Sawchenko PE (1993) Neuropeptide co-expression in the magnocellular neurosecretory system of the female rat: evidence for differential modulation by estrogen. *Neuroscience* 54:1001-1018.
- Liberzon I, Young EA (1997) Effects of stress and glucocorticoids on CNS oxytocin receptor binding. *Psychoneuroendocrinology* 22:411-422.
- Liebsch G, Wotjak CT, Landgraf R, Engelmann M (1996) Septal vasopressin modulates anxiety-related behaviour in rats. *Neurosci Letters* 217:101-104.
- Liebsch G, Montkowski A, Holsboer F, Landgraf R (1998a) Behavioural profiles of two Wistar rat lines selectively bred for high or low anxiety-related behaviour. *Behav Brain Res* 94: 301-310
- Liebsch G, Linthorst ACE, Neumann ID, Reul JM, Holsboer F, Landgraf R (1998b) Behavioral, physiological, and neuroendocrin stress response and differential sensitivity to diazepam in two Wistar rat lines selectively bred for high- and low-anxiety-related behaviour. *Neuropsychopharmacology* 19:381-396.
- Lightman SL, Young WS III (1989) Lactation inhibits stress-mediated secretion of corticosterone and oxytocin and hypothalamic accumulation of corticotropin-releasing factor and enkephalin messenger ribonucleic acids. *Endocrinology* 124:2358-2364.
- Lightman SL (1992) Alterations in hypothalamic-pituitary responsiveness during lactation. In: *Oxytocin in Maternal, Sexual and Social Behaviors* (eds. Pedersen C et al.) *Ann N Y Acad Sci* 652:340-346.
- Link H, Dayanithi G, Fohr KJ, Gratzl M (1992) Oxytocin at physiological concentrations evokes adrenocorticotropin (ACTH) release from corticotrophs by increasing intracellular free calcium mobilized mainly from intracellular stores. Oxytocin displays synergistic or additive effects on ACTH-releasing factor or arginine vasopressin-induced ACTH secretion, respectively. *Endocrinology* 130:2183-2191.
- Liu D, Diorio J, Tannenbaum B, Caldji C, Francis D, Freedman A, Sharma S, Pearson D, Plotsky PM, Meaney MJ (1997) Maternal care, hippocampal glucocorticoid receptors, and hypothalamic-pituitary-adrenal responses to stress. *Science* 277:1659-1662.
- Ludwig M (1998) Dendritic release of vasopressin and oxytocin. *J Neuroendocrinol* 10:881-895.
- Makara GB, Kiss A, Lolait SJ, Aguilera G (1996) Hypothalamic-pituitary corticotroph function after shunting of magnocellular vasopressin and oxytocin to the hypophyseal portal circulation. *Endocrinology* 137:580-586.

- Manning M, Kruszynski M, Bankowski K, Olma A, Lammek B, Cheng LL, Klis WA, Seto J, Haldar J, Sawyer WH (1989) Solid phase synthesis of 16 potent (selective and nonselective) *in vivo* antagonists of oxytocin. *J Med Chem* 32:382-391.
- Mansour A, Khachaturian H, Lewis ME, Akil H, Watson SJ (1988) Anatomy of CNS receptors. *TINS* 11: 308-314.
- Mayer G (1978) Action de l'ACTH synthétique (β 1-23 corticotrophine) sur la gestation et la parturition chez la ratte. Note de Guy Mayer présentée par MR Courrier. *C R Acad Sci Paris*, t286, Série D: 879-882.
- McCarthy MM, Chung SK, Ogawa S, Kow LM and Pfaff DW (1991) Behavioral effects of oxytocin: is there a unifying principle? In: *Vasopressin* (eds. Jard S, Jamison R), Colloque INSERM, John Libbey Eurotext. 208: pp. 195-212..
- McCarthy MM (1995) Estrogen modulation of oxytocin and its relation to behavior. *Adv Exp Med Biol* 395:235-245.
- Meaney MJ, Aitken DH, Bodnoff SR, Iny LJ, Sapolsky RM (1985) The effects of postnatal handling on the development of the glucocorticoid receptor systems and stress recovery in the rat. *Prog Neuro-Psychopharmacol Biol Psychiat* 9:731-734.
- Meaney MJ, Mitchell JB, Aitken DH, Bhatnagar S, Bodnoff SR, Iny LJ, Sarrieau A (1991) The effects of neonatal handling on the development of the adrenocortical responses to stress: implications for neuropathology and cognitive deficits in later life. *Psychoneuroendocrinology* 16:85-103.
- Meaney MJ, Diorio J, Francis D, Widdowson J, LaPlanta P, Caldji C, Sharma S, Seckl JS, Plotsky PM (1996) Early environmental regulation of forebrain glucocorticoid receptor gene expression: implications for adrenocortical responses to stress. *Dev Neurosci* 18:49-72.
- Meister B, Villar MJ, Ceccatelli S, Hokfelt T (1990) Localisation of chemical messengers in magnocellular neurones of the hypothalamic supraoptic and paraventricular nuclei: an immunocytochemical study using experimental manipulations. *Neuroscience* 37:603-633.
- Montagnese C, Poulain DA, Vincent JD, Theodosis DT (1987) Structural plasticity in the rat supraoptic nucleus during gestation, post-partum lactation and suckling-induced pseudogestation and lactation. *J Endocrinol* 115:97-105.
- Montagnese C, Poulain DA, Theodosis DT (1990) Influence of ovarian steroids on the ultrastructural plasticity of the adult rat supraoptic nucleus induced by central administration of oxytocin. *J Neuroendocrinol* 2:225-231.
- Moos F, Richard P (1989) Paraventricular and supraoptic bursting oxytocin cells in rat are locally regulated by oxytocin and functionally related. *J Physiol* 408:1-18.
- Moos F, Ingram CD, Wakerley JB, Guerne Y, Freund-Mercier MJ, Richard P (1991) Oxytocin in the bed nucleus of the stria terminalis and lateral septum facilitates bursting of hypothalamic oxytocin neurons in suckled rats. *J Neuroendocrinol* 3:163-171.
- Morel G, Enjalbert A, Proulx L, Pelletier G, Barden N, Grossard F, Dubois PM (1989) Effects of corticotropin-releasing factor on the release and synthesis of prolactin. *Neuroendocrinology* 49:669-675.
- Neumann I, Landgraf R (1989) Septal and hippocampal release of oxytocin, but not vasopressin, in the conscious lactating rat during suckling. *J Neuroendocrinol* 1:305-308.
- Neumann I, Russell JA, Wolff B, Landgraf R (1991) Naloxone increases the release of oxytocin, but not vasopressin, within limbic brain areas of conscious parturient rats: a push-pull perfusion study. *Neuroendocrinology* 54:545-551.
- Neumann I, Ludwig M, Engelmann M, Pittman QJ, Landgraf R (1993) Simultaneous microdialysis in blood and brain: oxytocin and vasopressin release in response to central and peripheral osmotic stimulation and suckling in the rat. *Neuroendocrinology* 58:637-645.
- Neumann I, Landgraf R, Bauce L, Pittman QJ (1995) Osmotic responsiveness and cross talk involving oxytocin but not vasopressin or amino acids between the supraoptic nuclei in virgin and lactating rats. *J Neurosci* 15:3408-3417.
- Neumann I, Douglas AJ, Pittman QJ, Russell JA, Landgraf R (1996a) Oxytocin released within the supraoptic nucleus of the rat brain by positive feedback action is involved in parturition-related events. *J Neuroendocrinol* 8:227-233.

- Neumann I, Johnstone H, Landgraf R, Russell JA, Douglas AJ (1996b) ACTH and behavioural responses to stressful stimuli in pregnant rats. *J Endocrinol* 148S, P131.
- Neumann ID, Johnstone HA, Hatzinger M, Liebsch G, Shipston M, Russell JA, Landgraf R, Douglas AJ (1998) Attenuated neuroendocrine responses to emotional and physical stressors in pregnant rats involve adeno-hypophysial changes. *J Physiol* 508:289-300.
- Nishioka T, Anselmofranci JA, Li P, Callahan MF, Morris M (1998) Stress increases oxytocin release within the hypothalamic paraventricular nucleus. *Brain Res* 781:57-61.
- Nolten WE, Rückert PA (1981) Elevated free cortisol index in pregnancy: possible regulatory mechanisms. *Am J Obstet Gynecol* 139: 416-422
- Onaka T, Luckman SM, Antonijevic I, Palmer JR, Leng G (1995) Involvement of the noradrenergic afferents from the nucleus tractus solitarii to the supraoptic nucleus in oxytocin release after peripheral cholecystokinin octapeptide in the rat. *Neuroscience* 66:403-412.
- Ostrowski NL, Lolait SJ, Young III S (1994) Cellular localization of vasopressin V1a receptor messenger ribonucleic acid in adult male rat brain, pineal, and brain vasculature. *Endocrinology* 135:1511-1528.
- Overstreet DH, Rezvani AH, Janowski DS (1992) Maudsley reactive and nonreactive rats differ only in some tasks reflecting emotionality. *Physiol Behav* 52:149-152.
- Owens PC, Smith R, Brinsmead M (1987) Postnatal disappearance of the pregnancy-associated reduced sensitivity of plasma cortisol to feedback inhibition. *Life Sci* 41:1745-1750.
- Patchev VK, Schlosser SF, Hassan AHS, Almeida OFX (1993) Oxytocin binding sites in rat limbic and hypothalamic structures: Site-specific modulation by adrenal and gonadal steroids. *Neuroscience* 57:537-543.
- Patel H, Chowdrey HS, Lightman SL (1991) Lactation abolishes corticotropin-releasing factor-induced oxytocin secretion in the conscious rat. *Endocrinology* 128:725-727.
- Paxinos G, Watson C (1986) The rat brain in stereotaxic coordinates. Academic Press, Sydney, Australia.
- Pechnick RN, George R, Poland RE (1987) The effects of the systemic administration of N-methylmorphine chloride, a quaternary analogue of morphine that does not cross the blood-brain barrier, on the release of anterior pituitary hormones in the rat. *Psychoneuroendocrinology* 12:67-71.
- Pechnick RN (1993) Effects of opioids on the hypothalamo-pituitary-adrenal axis. *Ann Rev Pharmacol Toxicol* 32:353-382.
- Pedersen CA, Prange AJ (1979) Induction of maternal behaviour in virgin rats after intracerebroventricular administration of oxytocin. *Proc Natl Acad Sci USA* 76:6661-6665.
- Pedersen CA, Caldwell JD, Peterson G, Walker CH, Mason GA (1992) Oxytocin activation of maternal behavior in the rat. *Ann NY Acad Sci* 652:58-69.
- Pellow S, Chopin P, File SE, Briley M (1985) Validation of open : closed arms entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. *J Neurosci Meth* 14:149-167.
- Pellow S (1986) Anxiolytic and anxiogenic drug effects in a novel test of anxiety: are exploratory models of anxiety in rodents valid? *Meth Find Exp Clin Pharmacol* 8:557-565.
- Petraglia F, Baraldi M, Giarre G, Facchinetti F, Santi M, Volpe A, Genazzani AR (1985) Opioid peptides of the pituitary and hypothalamus: changes in pregnant and lactating rats. *J Endocrinol* 105:239-245.
- Plotsky PM, Bruhn TO, Vale W (1984) Central modulation of immunoreactive corticotropin-releasing factor secretion by arginine vasopressin. *Endocrinology* 115:1639-1641.
- Plotsky PM (1986) Opioid inhibition of immunoreactive corticotrophin-releasing factor secretion into the hypophysial-portal circulation of rats. *Regul Peptides* 16:235-242.
- Plotsky P (1991) Pathways to the secretion of adrenocorticotropin: a view from the portal. *J Neuroendocrinol* 3: 1-9.
- Plotsky PM, Meaney MJ (1993) Early postnatal experience alters hypothalamic corticotropin-releasing factor (CRF) mRNA, median eminence CRF content and stress induced release in adult rats. *Mol Brain Res* 18:195-200.
- Porsolt RD, LePichon M, Jalfre M (1977) Depression: a new animal model sensitive to antidepressant treatment. *Nature* 266:730-732.

- Poulain DA, Wakerly JB (1982) Elektrophysiology of hypothalamic magnocellular neurones secreting oxytocin and vasopressin. *Neuroscience* 7:773-808.
- Raff H (1993) Interactions between neurohypophysial hormones and the ACTH-adrenocortical axis. *Ann N Y Acad Sci* 689:411-425.
- Raggenbass M, Alberi S, Zaninetti M, Pierson P, Dreifuss JJ (1998) Vasopressin and oxytocin action in the brain: cellular neurophysiological studies. *Prog Brain Res* 119:263-273.
- Ratka A, Sutano W, Bloemers M, De Kloet ER (1989) On the role of brain mineralocorticoid (type I) and glucocorticoid (type II) receptors in neuroendocrine regulation. *Neuroendocrinology* 50:117-123.
- Redmond K, Douglas AJ, Bicknell RJ, Russell JA (1996) Evidence for plasticity in the m-endorphin innervation of the supraoptic nucleus during pregnancy in the rat. *J Physiol (London)* 495P 13P.
- Remie R, Van Dongen JJ, Rensema JW (1990) Permanent cannulation of the jugular vein (acc. to Steffens) In: *Manual of microsurgery on the laboratory rat Part I* (eds. Van Dongen JJ, Remie R, Rensema JW, Van Wunnik GHJ) Elsevier, Amsterdam pp.159-186.
- Reul JMHM, De Kloet ER (1985) Two receptor systems for corticosterone in rat brain: Microdistribution and differential occupation. *Endocrinology* 117:2505-2512.
- Richard P, Moos F, Freund-Mercier MJ (1991) Central effects of oxytocin. *Physiol Rev* 71:331-370.
- Rivier C, Vale W (1983a) Modulation of stress-induced ACTH release by corticotropin-releasing factor, catecholamines and vasopressin. *Nature* 305:325-327.
- Rivier C, Vale W (1983b) Interaction of corticotropin-releasing factor and arginine vasopressin on adrenocorticotropin secretion in vivo. *Endocrinology* 113: 939-942.
- Rivier C, Rivier J, Vale W (1986) Stress-induced inhibition of reproductive functions: role of endogenous corticotropin-releasing factor. *Science* 231:607-609.
- Rodgers RJ, Cao B-J, Dalvi A, Holmes A (1997) Animal models of anxiety: An ethological perspective. *Braz J Med Biol Res* 30:289-304.
- Rosenblatt JS, Mayer AD, Giordano AL (1988) Hormonal basis during pregnancy for the onset of maternal behavior in the rat. *Psychoneuroendocrinology* 13:29-46.
- Russell JA, Coombes JE, Leng G, Bicknell RJ (1993) Morphine tolerance and inhibition of oxytocin secretion by k-opioids acting on the rat neurohypophysis. *J Physiology* 469: 365-386.
- Russell JA, Leng G (1998) Sex, parturition and motherhood without oxytocin? *J Endocrinol* 157:343-359.
- Samson WK, McDonald JK, Lumpkin MD (1985) Naloxone-induced dissociation of oxytocin and prolactin releases. *Neuroendocrinology* 40:68-71.
- Samson WK, Mogg RJ (1990) Oxytocin as part of stress responses. In: *Current topics in Neuroendocrinology*, Springer Verlag, Berlin Heidelberg 10: pp. 33-60.
- Samson WK, Schell DA (1995) Oxytocin and the anterior pituitary gland. *Adv Exp Med Biol* 395:355-364.
- Sander HW, Gintzler AR (1987) Spinal cord mediation of the opioid analgesia of pregnancy. *Brain Res* 408:389-393.
- Sapolsky RM, McEwen BS (1985) Down-regulation of neural corticosterone receptors by corticosterone and dexamethasone. *Brain Res* 339:161-165.
- Sawchenko PE, Swanson LW (1982) The organization of noradrenergic pathways from the brainstem to the paraventricular and supraoptic nuclei in the rat. *Brain Res* 257:275-325.
- Sawchenko PE, Swanson LW, Vale WW (1984) Corticotropin-releasing factor: co-expression within distinct subsets of oxytocin-, vasopressin-, and neurotensin-immunoreactive neurons in the hypothalamus of male rats. *J Neurosci* 4:1118-1129.
- Schlosser SF, Almeida OFX, Patchev VK, Yassouridis A, Elands J (1994) Oxytocin-stimulated release of adrenocorticotropin from the rat pituitary is mediated by arginine vasopressin receptors of the V1b type. *Endocrinology* 135:2058-2063.
- Schriefer JA (1991) Diethylstilbesterol- and pregnancy-induced changes in rat neurointermediate lobe oxytocin, arginine vasopressin, methionine enkephalin and dynorphin. *Neuroendocrinology* 54:185-191.
- Seal US, Doe RP (1967) The role of corticosteroid binding globulin in mammalian pregnancy. *Exp Med Int Congress Series* 132:697-706.

- Seckl JR, Benediktsson R, Lindsay RS, Brown RW (1995) Placental 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase and the programming of hypertension. *J Steroid Biochem Mol Biol* 55:447-455.
- Shapiro LE, Insel TR (1990) Infant's response to social separation reflects adult differences in affiliative behavior: a comparative developmental study in prairie and montane voles. *Dev Psychobiol* 23:375-393.
- Simantow R, Snyder SH (1977) Opiate receptor binding in the pituitary gland. *Brain Res* 124:178-184.
- Simon M, George R, Garcia J (1975) Acute morphine effects on regional brain amines, growth hormone and corticosterone. *Eur J Pharmacol* 34:21-26.
- Soaje M, Deis RP (1994) A modulatory role of endogenous opioids on prolactin secretion at the end of pregnancy in the rat. *J Endocrinol* 140:97-102.
- Stachowiak A, Macchi C, Nussdorfer GG, Malendowicz LK (1995) Effects of oxytocin on the function and morphology of the rat adrenal cortex: in vitro and in vivo investigations. *Res Exp Med* 195:265-274.
- Steimer T, Driscoll P, Schulz PE (1997) Brain metabolism of progesterone, coping behavior and emotional reactivity in male rats from two psychogenetically selected lines. *J Neuroendocrinol* 9:169-175.
- Stern JE, Armstrong WE (1998) Reorganization of the dendritic trees of oxytocin and vasopressin neurons of the rat supraoptic nucleus during lactation. *J Neurosci* 18: 841-853.
- Suchocki D, Neto JP (1990) Prenatal stress and emotional response of adult offspring. *Physiol Behav* 49: 423-426.
- Suda T, Sato Y, Sumitomo T, Nakano Y, Tozawa F, Iwai I, Yamada M, Demura H (1992) β -endorphin inhibits hypoglycemia-induced gene expression of corticotrophin-releasing factor in the rat hypothalamus. *Endocrinology* 130:1325-1330.
- Summerlee AJ, Lincoln DW (1981) Electrophysiological recordings from oxytocinergic neurones during suckling in the unanaesthetized lactating rat. *J Endocrinol* 90:255-265.
- Summy-Long JY, Neumann I, Terrell ML, Koehler E, Gestl S, Landgraf R, Kadakara M (1994) Crosstalk in the magnocellular system during osmotic stimulation of one supraoptic nucleus. *Brain Res Bull* 33:645-654.
- Summy-Long JY, Gestl S, Terrell ML, Wolz G, Kadakara M (1997) Osmoregulation of the magnocellular neuroendocrine system during lactation. *Am J Physiol* 272:R275-288.
- Sumner BEH, Douglas AJ, Russell JA (1992) Pregnancy alters the density of opioid binding sites in the supraoptic nucleus and posterior pituitary gland of rats. *Neurosci Letters* 137:216-220.
- Szot P, Bale TL, Dorsa DM (1994) Distribution of messenger RNA for the vasopressin $v1a$ receptor in the CNS of male and female rats. *Mol Brain Res* 24:1-10.
- Tannenbaum B, Rowe W, Sharma S, Diorio J, Steverman A, Walker M, Meaney MJ (1997) Dynamic variations in plasma corticosteroid-binding globulin and basal HPA activity following acute stress in adult rats. *J Neuroendocrinol* 9:163-168.
- Theodosis DT, Poulain DA (1984) Evidence that oxytocin-secreting neurones are involved in the ultrastructural reorganisation of the rat supraoptic nucleus apparent at lactation. *Cell Tiss Res* 235:217-219.
- Theodosis DT, Poulain DA (1992) Neuronal-glia and synaptic plasticity of the adult oxytocinergic system. Factors and consequences. *Ann NY Acad Sci* 652:303-325.
- Theodosis DT, Poulain DA (1993) Activity-dependent neuronal-glia and synaptic plasticity in the adult mammalian hypothalamus. *Neuroscience* 57:501-535.
- Turner L, Neumann ID (1998) Effects of intracerebral prolactin on anxiety-related behavior and HPA axis activity in rats. *Soc Neurosci* 24: 371.19.
- Toufexis DJ, Walker CD (1996) Noradrenergic facilitation of the adrenocorticotropin response to stress is absent during lactation in the rat. *Brain Res* 737:71-77.
- Toufexis DJ, Thirvikraman KV, Plotsky PM, Morilak DA, Huang N, Walker CD (1998) Reduced noradrenergic tone to the hypothalamic paraventricular nucleus contributes to the stress hyporesponsiveness of lactation. *J Neuroendocrinol* 10:417-427.
- Tribollet E, Barberis C, Jard S, Dubois-Dauphin M, Dreifuss JJ (1988) Localization and pharmacological characterization of high affinity binding sites for vasopressin and oxytocin in the rat brain by light microscopic autoradiography. *Brain Res* 442:105-118.

- Ur E, Grossman A (1994) The neuroregulation of corticotropin secretion. In: *The pituitary gland*, 2nd ed. (Imura H, ed), Raven Press, New York. Pp. 309-330.
- Uvnäs-Moberg K, Ahlenius S, Hillegaard V, Alster P (1994) High doses of oxytocin cause sedation and low doses cause an anxiolytic-like effect in male rats. *Pharmacol Biochem Behav* 49:101-106.
- Uvnäs-Moberg K (1997) Oxytocin linked antistress effects – the relaxation and growth response. *Acta Physiol Scand* 640: 38-42.
- Vaccari C, Lolait SJ, Ostrowski NL (1998) Comparative distribution of vasopressin V1b and oxytocin messenger ribonucleic acid in brain. *Endocrinology* 139:5015-5033.
- Vallée M, Mayo W, Dellu F, Le Moal M, Simon H, Maccari S (1997) Prenatal stress induces high anxiety and postnatal handling induces low anxiety in adult offspring: correlation with stress-induced corticosterone secretion. *J Neurosci* 17: 2626-2636.
- van Leengoed E, Kerker E, Swanson HH (1986) Inhibition of post-partum maternal behaviour in the rat by injecting an oxytocin antagonist into the cerebral ventricles. *J Endocrinol* 112:275-282.
- Vanderschuren LJ, Niesink RJ, Van Ree JM (1995) Influence of environmental factors on social play behaviour of juvenile rats. *Physiol Behav* 58:119-123.
- Vázquez DM, Van Oers H, Levine S, Akil H (1996) Regulation of glucocorticoid and mineralocorticoid receptor mRNAs in the hippocampus of the maternally deprived infant rat *Brain Res* 731:79-90.
- Villar M.J, Ceccatelli S, Ronnqvist M, Häkfelt T (1994) Nitric oxide synthase increases in hypothalamic magnocellular neurons after salt loading in the rat. An immunohistochemical and in situ hybridization study. *Brain Res* 644: 273-281.
- Waddell BJ, Atkinson HC (1994) Production rate, metabolic clearance rate and uterine extraction of corticosterone during rat pregnancy. *J Endocrinol* 143:183-190.
- Walker C-D, Rivest RW, Meaney MJ, Aubert ML (1989) Differential activation of the pituitary-adrenocortical axis after stress in the rat: Use of two genetically selected lines (RLA and RHA) as a model. *J Endocrinol* 123:477-485.
- Walker C-D, Aubert ML, Meaney MJ, Driscoll P (1992) Individual differences in the activity of the hypothalamus-pituitary-adrenocortical system after stressors: Use of psychogenetically selected rat lines as a model. In: *Genetically defined animal models of neurobehavioral dysfunctions* (ed. Driscoll P) Birkhäuser, Boston, pp. 276-296.
- Walker C-D, Trottier G, Rochford J, Lavallée D (1995) Dissociation between behavioral and hormonal responses to the forced swim stress in lactating rats. *J Neuroendocrinol* 7:615-622.
- Walsh RJ, Slaby FJ, Posner BI (1987) A receptor-mediated mechanism for the transport of prolactin from blood to cerebrospinal fluid. *Endocrinology* 120:1846-1850.
- Wardlaw SL, Frantz AG (1983) Brain beta-endorphin during pregnancy, parturition, and the postpartum period. *Endocrinology* 113:1664-1668.
- Watson SJ, Akil H, Fischli W, Goldstein A, Zimmerman E, Nilaver G, van Wimersma Greidanus TB (1982) Dynorphin and vasopressin: common localisation in magnocellular neurones. *Science* 216:85-87.
- Weinstock M (1997) Does prenatal stress impair coping and regulation of hypothalamic-pituitary-adrenal axis? *Neurosci Biobehav Rev* 21:1-10.
- Whitnall MH (1989) Stress selectively activates the vasopressin-containing subset of corticotropin-releasing hormone neurons. *Neuroendocrinology* 50:702-707.
- Wigger A, Neumann ID (1998) Periodic maternal deprivation induces gender-dependent alterations in behavioral and neuroendocrine responses to emotional stress in adult rats. *Physiol Behav* 66:293-302.
- Windle RJ, Judah JM, Forsling ML (1995) Do vasopressin and oxytocin have synergistic renal effects in the conscious rat? *J Endocrinol* 144:441-448
- Windle RJ, Shanks N, Lightman SL, Ingram CD (1997) Central oxytocin administration reduces stress-induced corticosterone release and anxiety behavior in rats. *Endocrinology* 138:2829-2834.
- Windle RJ, Wood SA, Shanks N, Lightman SL, Ingram CD (1998) Ultradian rhythm of basal corticosterone release in the female rat: dynamic interaction with the response to acute stress. *Endocrinology* 139: 443-450.

- Winslow JT, Insel TR (1991) Infant rat separation is a sensitive test for novel anxiolytics. *Prog Neuro-Psychopharmacol Biol Psych* 15:745-757.
- Wotjak CT, Ludwig M, Landgraf R (1994) Vasopressin facilitates its own release within the rat supraoptic nucleus *in vivo*. *Neuroendocrinology* 5:1181-1184.
- Wotjak CT, Kubota M, Liebsch G, Montkowski A, Holsboer F, Neumann I, Landgraf R (1996) Release of vasopressin within the rat paraventricular nucleus in response to emotional stress: a novel mechanism of regulating adrenocorticotrophic hormone secretion? *J Neurosci* 16:7725-7732.
- Wotjak CT, Ganster J, Kohl G, Holsboer F, Landgraf R, Engelmann M (1998) Dissociated central and peripheral release of vasopressin, but not oxytocin, in response to repeated swim stress: new insights into the secretory capacities of peptidergic neurons. *Neuroscience* 85:1209-1222.
- Yagi K (1992) Suppressive vasopressin response to emotional stress. *Japan J Physiol* 42:681-703.
- Yoshimura R, Kiyama H, Kimura T, Araki T, Maeno H, Tanizawa O, Tohyama M (1993) Localization of oxytocin receptor messenger ribonucleic acid in the rat brain. *Endocrinology* 133:1239-1246.
- Young LJ, Muns S, Wang Z, Insel TR (1997) Changes in oxytocin receptor mRNA in rat brain during pregnancy and the effects of estrogen and interleukin-6. *J Neuroendocrinol* 9: 859-865.
- Zimbardo PG (1988) Psychology and life, 12th edition. Scott, Foresman and Company, Glenview, Illinois.
- Zimmermann E, Critchlow V (1973) Inhibition of morphine-induced pituitary-adrenal activation by dexamethasone in the female rat. *Proc Soc Exp Biol Med* 143:1224-1229.

Aus der vorliegenden Arbeit entstanden folgende Publikationen:

- Douglas AJ, Johnstone HA, Wigger A, Landgraf R, Russell JA, Neumann ID (1998) The role of endogenous opioids in neurohypophysial and hypothalamo-pituitary-adrenal axis hormone secretory responses to stress in pregnant rats. *J Endocrinol* 158:285-293.
- Wigger A, Neumann ID (1998) Endogenous opioids suppress the stress-induced release of oxytocin in the paraventricular nucleus of the pregnant rat. *Europ J Neurosci* 10 (suppl.10) 167.18.
- Neumann ID, Wigger A, Liebsch G, Holsboer F, Landgraf R (1998) Increased basal activity of the hypothalamo-pituitary-adrenal axis during pregnancy in rats bred for high anxiety-related behaviour. *Psychoneuroendocrinology* 23:449-463.
- Neumann I, Wigger A, Hatzinger M, Keck ME (1998) Pregnancy and aging. Two model systems with altered release patterns of oxytocin and vasopressin within the hypothalamus. *Adv Exp Med Biol* 449:179-181.
- Wigger A, Lorsch P, Oehler I, Keck ME, Naruo T, Neumann ID (1999) Nonresponsiveness of the rat hypothalamo-pituitary-adrenocortical axis to parturition-related events: inhibitory action of endogenous opioids. *Endocrinology*. 140:2843-2849.
- Landgraf R, Wigger A, Holsboer F, Neumann I (1999) Hyperreactive hypothalamo-pituitary-adrenocortical (HPA) axis in rats bred for high anxiety-related behaviour. *J Neuroendocrinol* 11:405-407.
- Neumann ID, Torner L, Wigger A (2000) Brain oxytocin: Differential inhibition of neuroendocrine stress responses and anxiety-related behaviour in virgin, pregnant and lactating rats. *Neuroscience* 95:567-575.
- Neumann ID, Wigger A, Torner L, Holsboer F, Landgraf R (2000) Brain oxytocin inhibits basal and stress-induced activity of the hypothalamo-pituitary-adrenal axis in male and female rats: partial action within the paraventricular nucleus. *J Neuroendocrinol* 11: in press.

Dank

Prof. Dr. Dr. Florian Holsboer hat mir die Promotionsarbeit am Max-Planck-Institut für Psychiatrie (Klinisches Institut) ermöglicht, wofür ihm an dieser Stelle gedankt sei.

Prof. Rainer Landgraf danke ich nicht nur für die Betreuung der Arbeit, sondern auch für die Vielfalt von Methoden, die ich unter seiner Führung erlernen durfte. Außerdem möchte ich ihm meinen Dank ausdrücken für sein Vertrauen in mein Management der HAB/LAB-Angstzucht und den Freiraum, den er mir dabei stets gegeben hat.

Bei Prof. Neuweiler bedanke ich mich ganz herzlich für seine Bereitschaft, das Zweitgutachten zu dieser Arbeit zu übernehmen.

Mein ganz besonderer Dank gilt Dr. Inga Neumann. Viele der in dieser Arbeit vorgestellten Studien wurden unter ihrer Leitung durchgeführt und ich konnte stets von ihrer Erfahrung und ihrem Wissen profitieren.

Ebenfalls möchte ich mich bei "den Schotten" Dr. Alison Douglas, Dr. John Russell und Dr. Heather Johnstone für die erfreuliche und fruchtbare Zusammenarbeit bedanken.

Auch den Dres Adelheid Kresse und Marianne Müller, die mich in die Geheimnisse der *in situ* Hybridisierung eingeweiht haben, schulde ich meinen Dank.

Nicht vergessen möchte ich einige wissenschaftlichen Mitglieder des MPI für Psychiatrie. So bedanke ich mich ganz herzlich bei den Dres Gudrun Liebsch, Mario Engelmann, Martin Keck, Karl Ebner, Frauke Ohl, Nicola Toschi, Rainer Spanagel, Inge Sillaber, Sabine Hölter sowie Markus Henniger für eine Vielzahl ergiebiger Diskussionen.

Ein ganz persönlicher Dank gilt zudem Christian Kirschke, der mir immer wieder wertvollen "psychologischen" Beistand leistete und Susanne Ruppert, die wenigstens etwas Durchblick hinsichtlich der deutschen Grammatik zeigte.

Ein ganz großes Dankeschön geht natürlich auch an die technische Besetzung der Arbeitsgruppe "Verhaltensneuroendokrinologie". Hierbei möchte ich ganz besonders Patrick Lörcher erwähnen, der mir bei den Implantationen, bei der experimentellen Durchführung und vor allem beim Zuchtmanagement eine unersetzliche Hilfe war. In diesem Zusammenhang bedanke ich mich auch bei Albin Varga, der als Tierpfleger sehr verantwortungsvoll für die Angstzucht-Tiere sorgte, auch unter oftmals erschwerten Bedingungen. Gabi Kohl danke ich für die vertrauenswürdige Analyse der Plasma- und Mikrodialyseproben. Auch Andrea Zahn, die sehr zum Gelingen der *in situ* Hybridisierung beigetragen hat, sollte nicht unerwähnt bleiben. Allen weiteren Technikern der Gruppe sowie Inge Schindler und Carola Hetzel danke ich ebenfalls herzlichst für die fortwährende Bereitschaft Hilfestellung zu leisten.

Nicht zuletzt möchte ich meinen Eltern danken, die es mir durch ihren unerschütterlichen Beistand ermöglicht haben, meine beruflichen Ziele zu verwirklichen. Auch bei meinem lieben Thomas bedanke ich mich, daß er jederzeit Vertrauen in meine Fähigkeiten hatte und meine "Stimmungsschwankungen" geduldig ertragen hat.

LEBENS LAUF

Name: Alexandra Wigger
Geburtsdatum: 28. Mai 1968
Geburtsort: München

Staatsangehörigkeit: deutsch
Familienstand: ledig

Vater: Dr. med. Peter Wigger, Chirurg
Mutter: Dr. med. Ingrid Wigger, Anaesthesistin

Schul Ausbildung:

1974-1978 Grundschule im Fasanenpark, Unterhaching
1978-1985 Gymnasium Unterhaching, Unterhaching
1985-1988 Landschulheim Kempfenhausen am Starnberger See, Berg
Abschluß: allg. Hochschulreife

Studium:

WS 1989 - SS 1991 Technologie und Biotechnologie der Lebensmittel
TU-München / Weihenstephan

WS 1991- 21.02.1997 Biologie, Diplom
Ludwig-Maximilian-Universität München

vorgezogene Diplomarbeit:

01.03.1996 - 30.12.1996 Max-Planck-Institut für Psychiatrie, München
Abt.: Verhaltensneuroendokrinologie bei Prof. Dr.R. Landgraf

Promotion:

01.04.1997 – 31.03.2000 Max-Planck-Institut für Psychiatrie, München
Abt.: Verhaltensneuroendokrinologie bei Prof. Dr.R. Landgraf