

Freiwilliger Alkoholkonsum bei Nagern:
Einfluss von Emotionalität und Stress

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors

der Naturwissenschaften

der Fakultät für Biologie

der Ludwig-Maximilians-Universität München

vorgelegt am 29. Mai 2002

von

Markus Henniger

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Rainer Landgraf
2. Berichterstatter: Prof. Dr. Peter Schlegel

Tag der mündlichen Prüfung: 2. Oktober 2002

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	6
1. Einleitung.....	8
2. Material und Methoden.....	12
2.1 Tiere	12
2.1.1 Allgemeines	12
2.1.2 Wistar-Ratten.....	12
2.1.3 HAB/LAB-Ratten	12
2.1.4 Mäuse.....	13
2.2 Testparadigmen Angst-bezogenen Verhaltens.....	13
2.2.1 Allgemeines	13
2.2.2 <i>Elevated Plusmaze</i> – Ratten.....	13
2.2.3 <i>Dark/Light-Box</i> – Mäuse.....	15
2.3 Freiwilliger Alkoholkonsum	16
2.3.1 Orale Alkoholselbstverabreichung – Ratten.....	16
2.3.2 Operante Alkoholselbstverabreichung – Ratten	16
2.3.3 Orale Alkoholselbstverabreichung – Mäuse.....	18
2.3.4 Trinkometer – Mäuse.....	18
2.4 Stressparadigmen	19
2.4.1 <i>Social Defeat</i> – Ratten	19
2.4.2 <i>Social Defeat</i> – Mäuse	20
2.4.3 <i>Restraint</i> – Ratten	21
2.4.4 <i>Restraint</i> – Mäuse	21
2.4.5 Beutestress – Mäuse	21
2.4.6 <i>Forced Swimming</i> – Mäuse	22
2.4.7 Sozialer Stress – Mäuse	23
2.5 Quantitative Analysen.....	23
2.5.1 <i>Immunoblotting</i>	23
2.5.2 Radioimmunoassays	24
Adrenocorticotropes Hormon.....	24
Corticosteron	25
2.5.3 Blutalkoholwerte.....	25
2.6 Substanzen	26
2.6.1 Alkohol	26
2.6.2 Saline	26
2.6.3 Diazepam	26
2.6.4 R121919.....	26
2.7 Statistik.....	26

3. Langzeit-Alkoholkonsum und Expression der NMDA Rezeptor-Untereinheit 2B.....	27
3.1 Einleitung	27
3.2 Versuchsdurchführung	29
3.3 Ergebnisse	30
3.4 Diskussion	31
4. Angst und Alkoholkonsum	34
4.1 Einleitung	34
4.2 Versuchsdurchführung	41
4.3 Ergebnisse	43
4.3.1 Basaler Alkoholkonsum.....	43
4.3.1.1 HAB/LAB-Ratten.....	43
Initialer Alkoholkonsum.....	43
4.3.1.2 B6/D2-Mäuse.....	44
Angst-bezogenes Verhalten in der <i>Dark/Light-Box</i>	44
Initialer Alkoholkonsum.....	47
Alkoholmetabolismus.....	48
4.3.1.3 Wistar-Ratten	49
Einfluss von Diazepam auf das Angst-bezogene Verhalten auf der	
<i>Elevated Plusmaze</i>	49
Einfluss von Diazepam auf den freiwilligen Alkoholkonsum	51
4.3.2 Rückfallartiger Alkoholkonsum.....	52
4.3.2.1 HAB/LAB-Ratten.....	52
ADE im Heimkäfig.....	52
4.3.2.2 Wistar-Ratten	53
Einfluss von Diazepam auf den ADE im Heimkäfig	53
Einfluss von Diazepam auf den ADE unter operanten Bedingungen	54
4.4 Diskussion	57
5. Stress und Alkoholkonsum.....	66
5.1 Einleitung	66
5.2 Versuchsdurchführung	76

5.3 Ergebnisse	80
5.3.1 Basaler Alkoholkonsum	80
5.3.1.1 Wistar-Ratten	80
Verhalten während des <i>Social Defeats</i>	80
Einfluss von <i>Social Defeat</i> auf den freiwilligen Alkoholkonsum	81
Einfluss von <i>Social Defeat</i> auf die basale und Stress-induzierte Freisetzung von ACTH und Corticosteron und das Gewicht der Nebennieren	82
5.3.1.2 HAB/LAB-Ratten.....	85
Langzeit-Alkoholkonsum	85
Verhalten während des <i>Social Defeats</i>	86
Einfluss von <i>Social Defeat</i> auf den freiwilligen Alkoholkonsum	87
5.3.1.3 B6/D2-Mäuse	89
Einfluss verschiedener Stressoren auf den freiwilligen Alkoholkonsum.....	90
Akuter <i>Social Defeat</i>	90
Akuter Beutestress	93
Wiederholter <i>Social Defeat</i>	93
Variierter Stress	95
Wiederholtes <i>Forced Swimming</i>	96
Verhalten während wiederholten <i>Forced Swimings</i>	97
Langzeit-Alkoholkonsum	100
Einfluss von sozialem Stress auf das kurzfristige Trinkmuster von B6- Mäusen	102
5.3.2 Rückfallartiger Alkoholkonsum	102
5.3.2.1 Wistar-Ratten.....	102
Verhalten während des <i>Social Defeats</i>	102
Einfluss von <i>Social Defeat</i> auf den ADE im Heimkäfig.....	104
Einfluss von <i>Social Defeat</i> auf die basale und Stress-induzierte Freisetzung von ACTH und Corticosteron und das Gewicht der Nebennieren	105
Einfluss von <i>Social Defeat</i> auf den ADE unter operanten Bedingungen	107
5.4 Diskussion	110
6. Zusammenfassung.....	118
7. Literaturverzeichnis.....	123
8. Danksagung	137
9. Lebenslauf.....	138
10. Publikationen.....	139

Abkürzungen

% v/v	Volumenprozent (<i>percent volume per volume</i>)
% w/v	Gewichtsprozent (<i>percent weight per volume</i>)
ACTH	Adrenocorticotropes Hormon
ADE	Alkoholdeprivationseffekt
ADH	Alkoholdehydrogenase
ADP	Alkoholdeprivationsphase
ANOVA	Varianzanalyse (<i>analysis of variance</i>)
B6	C57BL/6JOlaHsd
BNST	Bed Nucleus der Stria Terminalis
CRH	Corticotropin Releasing Hormon
CRHR1	Corticotropin Releasing Hormon Rezeptorsubtyp 1
CRHR2	Corticotropin Releasing Hormon Rezeptorsubtyp 2
D2	DBA/2OlaHsd
DZ	Diazepam
EgTA	Ethylen Glycol-bis(2-aminoethylether)-N,N,N',N'-Tetraessigsäure
EtOH	Alkohol
FR	<i>Fixed Ratio</i>
HAB	hohe Angstdisposition (<i>high anxiety-related behaviour</i>)
¹²⁵ I	¹²⁵ Iod
i.g.	intragastral
i.p.	intraperitoneal
LAB	niedrige Angstdisposition (<i>low anxiety-related behaviour</i>)
mRNA	Boten-Ribonukleinsäure (<i>messenger ribonucleic acid</i>)
n	Stichprobengröße

NAD	Nicotinamid-adenin-dinucleotid
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
NR	N-Methyl-D-Aspartat Rezeptor
NR2A	N-Methyl-D-Aspartat Rezeptor-Untereinheit 2A
NR2B	N-Methyl-D-Aspartat Rezeptor-Untereinheit 2B
NR2C	N-Methyl-D-Aspartat Rezeptor-Untereinheit 2C
NR2D	N-Methyl-D-Aspartat Rezeptor-Untereinheit 2D
NR3A	N-Methyl-D-Aspartat Rezeptor-Untereinheit 3A
NR3B	N-Methyl-D-Aspartat Rezeptor-Untereinheit 3B
p	Irrtumswahrscheinlichkeit
PMSF	Phenylmethansulfonylfluorid
PTZ	Pentylentetrazol
RIA	Radioimmunoassay
SDS-PAGE	Natrium (<i>Sodium</i>) Dodecylsulphat-Polyacrylamid Gel-Elektrophorese

1. Einleitung

Alkohol, eines der ältesten Genuss- und Rauschmittel überhaupt, wurde bereits in der Mittelsteinzeit zwischen 10000 und 5000 Jahren vor Beginn unserer Zeitrechnung konsumiert. So brauten die Tibeter aus Gerste Bier, die Kelten vergoren Honigwasser zu Met und die Skythen tranken vergorene Stutenmilch. Auf einem der ältesten Dokumente der Menschheitsgeschichte, dem „*Monument bleu*“ – im Louvre (Paris) ausgestellte Tontafeln der Sumerer von vor ca. 4000 Jahren – sind Bilder der Biererzeugung festgehalten. Ähnliche Belege finden sich auch aus dem dritten Jahrtausend auf ägyptischen Darstellungen, die Wein- und Bierherstellung zeigen (zitiert nach Hengartner & Merki, 1999). Heute führt Alkoholmissbrauch zu großen individuellen und gesellschaftlichen Problemen. Nach Angaben des Bundesministeriums für Gesundheit lag im Jahre 2000 in Deutschland bei 2,64 Millionen Menschen (4% der Wohnbevölkerung ab 18 Jahren) ein schädlicher Alkoholmissbrauch vor, davon waren 1,6 Millionen Menschen (2,4%) akut alkoholabhängig. Der daraus resultierende volkswirtschaftliche Schaden durch alkoholbezogene Morbidität und Mortalität wurde auf ca. 40 Milliarden DM (20 Milliarden €) jährlich beziffert (Bundesministerium für Gesundheit, 2000).

Während der Großteil der Menschen über ihr gesamtes Leben hinweg einen unschädlichen, genussorientierten Alkoholkonsum beibehält, fallen einzelne Individuen in ein schädliches Konsummuster: Es entwickelt sich Alkoholmissbrauch bzw. zwanghaftes, süchtiges Verhalten. Dabei spielen multiple Faktoren wie die genetische Disposition und verschiedene Umwelteinflüsse sowie deren Interaktion eine Rolle. Als zwei bedeutende Einflussfaktoren werden einerseits eine erhöhte Ängstlichkeit, andererseits das Erleben von Stress diskutiert (ausführliche Erläuterungen zum Zusammenhang zwischen Ängstlichkeit bzw. Stresserfahrung und freiwilligem Alkoholkonsum siehe Kap. 4.1 und 5.1).

Ein wertvolles Instrument, die Komplexität der Interaktion angeborener und erfahrener Faktoren zu reduzieren und den Einfluss bestimmter Voraussetzungen bzw. Manipulationen

auf verschiedene Phasen des Drogeneinnahmeverhaltens zu untersuchen, stellen Tiermodelle dar. Dabei lassen sich im Wesentlichen drei Phasen unterscheiden: der initiale Konsum, die Aufrechterhaltung des Alkoholkonsums über eine längere Zeit (*maintenance*) und das rückfallartige Trinken nach einer Zeit der Abstinenz. Der Initialkonsum liefert einerseits eventuell Hinweise auf die genetische Vulnerabilität gegenüber Drogeneinnahmeverhalten, andererseits stellt er die Basis für die weitere Untersuchung des Langzeitkonsums dar. Während der *Maintenance*-Phase finden möglicherweise neuronale Adaptationen an den dauerhaften Alkoholeinfluss statt. Dies ist der Zeitraum, während dem gegebenenfalls ein Übergang von einem freiwilligen, flexiblen Konsumverhalten zu einem eher starren, „zwanghaften“ und „süchtigem“ Verhalten stattfindet (Wolffgramm & Heyne, 1995). Die Untersuchung des rückfallartigen Alkoholkonsums besitzt eine erhebliche klinische Bedeutung. So stellt – trotz einiger Fortschritte in diesem Bereich – die Rückfallprophylaxe in der Behandlung von Alkoholikern immer noch die größte therapeutische Herausforderung dar.

Ein Testparadigma, in dem alle drei Phasen gut untersucht werden können, ist die orale Alkoholselbstverabreichung bei Ratten (siehe Übersichtsartikel Spanagel & Höltter, 1999, 2000). Dabei haben die Tiere in ihrem Heimkäfig über lange Zeit freien Zugang zu Wasser und drei verschiedenen konzentrierten Alkohollösungen (5%, 10% und 20% v/v).

In der vorliegenden Arbeit wurde bestimmt, ob der langfristige und dauerhafte Alkoholkonsum in diesem Paradigma neuronale Adaptationen im Gehirn der Ratten hervorruft. Untersucht wurde dies anhand der Expression der NMDA-Rezeptor-Untereinheit 2B (NR2B) in verschiedenen Hirnarealen Langzeit-alkoholerfahrener Ratten im Vergleich mit gleichaltrigen, dauerhaft nur wassertrinkenden Kontrollratten (Kap. 3).

Nach dem initialen Konsum und einer Phase des langfristigen Alkoholkonsums wird als Testparadigma rückfallartigen Alkoholkonsums der Alkoholdeprivationseffekt (ADE) genutzt. Dieser ist definiert als vorübergehender Anstieg des Alkoholkonsums nach einer

Deprivationsphase, er wurde in verschiedenen Tierarten – auch beim Menschen – beschrieben (Sinclair & Senter, 1967; Sinclair, 1971; Burish *et al.*, 1981). Nachdem also die Ratten über eine längere Zeitspanne freien Zugang zu Wasser und drei verschieden konzentrierten Alkohollösungen haben, wird ihnen der Alkohol für eine bestimmte Zeit entzogen. Nach Rückgabe der Alkoholflaschen zeigt sich der ADE in einem deutlichen Anstieg in der Präferenz für die höher konzentrierten Alkohollösungen, woraus sich der erhöhte Alkoholkonsum (in g pro kg Körpergewicht) ergibt (Spanagel *et al.*, 1996; Hölter *et al.*, 1998). Zusätzlich zum Heimkäfigparadigma wurde ein Modell der operanten rückfallartigen Alkoholselbstverabreichung entwickelt, das das Konsumverhalten der Tiere während des ADE unter Heimkäfigbedingungen gut widerspiegelt (Spanagel *et al.*, 1996; Hölter *et al.*, 1997, 1998; siehe Übersichtsartikel Spanagel & Hölter, 1999, 2000). Da es die Bestimmung des Alkoholverhaltens unbegrenzter aufeinanderfolgender Tage erlaubt, ist das Heimkäfigparadigma besser geeignet, um den langfristigen Einfluss einer Behandlung auf das Trinkverhalten zu untersuchen. Das operante Paradigma hat dagegen den Vorteil einer deutlich besseren zeitlichen Auflösung und ist daher besser geeignet, kürzerfristige Effekte einer Behandlung auf das Alkoholeinnahmeverhalten zu bestimmen (Hölter *et al.*, 2000). Der ADE ist als Testparadigma rückfallartigen Alkoholkonsums sehr gut validiert (siehe Übersichtsartikel Spanagel & Hölter, 1999; 2000). Er ist noch nach einer langen Zeit der Abstinenz nachweisbar und ist äußerst stabil gegenüber externen Reizen wie z.B. einer vorübergehenden Änderung der Haltungsbedingungen der Tiere (Gruppen- vs. Einzelhaltung). Selbst nach Beimischung geschmacksverändernder, d.h. verbitternder oder versüßender Substanzen zu den Lösungen konsumieren die Tiere nach der Deprivation deutlich mehr Alkohol als vor dem Alkoholentzug (Wolffgramm & Heyne, 1995; Spanagel *et al.*, 1996). Weiterhin wurde gezeigt, dass Acamprosat und Naltrexon den erhöhten Alkoholkonsum nach Deprivation verringern (Hölter *et al.*, 1997; Heyser *et al.*, 1998; Hölter & Spanagel, 1999). Diese beiden Substanzen werden in der Klinik bei Alkoholikern nach der Entzugsphase

erfolgreich als Rückfallprophylaktika eingesetzt (O'Malley *et al.*, 1992; Volpicelli *et al.*, 1992; Sass *et al.*, 1996; Whitworth *et al.*, 1996).

In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss von Ängstlichkeit (Kap. 4) und Stress (Kap. 5) auf den initialen, anhaltenden und rückfallartigen Alkoholkonsum im oben beschriebenen 4-Flaschenmodell untersucht. Dabei wurden Martinsrieder Wistar-Ratten und HAB/LAB-Ratten verwendet. Das Trinkverhalten der Martinsrieder Wistar-Ratten in diesem Modell ist sehr gut charakterisiert. Zudem wurde für sie der ADE als Paradigma rückfallartigen Alkoholkonsums validiert (siehe Übersichtsartikel Spanagel & Höltner, 1999, 2000). HAB- (*high anxiety-related behaviour*) und LAB- (*low anxiety-related behaviour*) Ratten stellen zwei Rattenlinien dar, die selektiv auf maximale Unterschiede im angstbezogenen Verhalten gezüchtet wurden und sind ein wertvolles Tiermodell zur Untersuchung biologischer Grundlagen der Emotionalität, der Wirkweisen anxiolytischer Substanzen (Liebsch *et al.*, 1998a,b; Landgraf *et al.*, 1999; siehe Übersichtsartikel Landgraf & Wigger, 2002), sowie der Interaktion erhöhter Ängstlichkeit und anderer Verhaltensweisen, wie dem freiwilligen Alkoholkonsum. In einem 3-Flaschenmodell der oralen Alkoholselbstverabreichung (Wasser, 5% und 10%-iger Alkohol) wurde der Zusammenhang zwischen Emotionalität bzw. Stresserleben und freiwilligem Alkoholkonsum zusätzlich bei B6- und D2-Mäusen untersucht. Diese beiden Inzucht-Mausstämme unterscheiden sich erheblich in ihrer angeborenen Präferenz für alkoholische Lösungen und werden daher häufig als Modell für Untersuchungen verschiedener Fragestellungen im Zusammenhang mit Alkohol verwendet (McClearn & Rodgers, 1959; Fuller, 1964; Schneider *et al.*, 1973; Belknap *et al.*, 1993; siehe Übersichtsartikel Phillips & Crabbe, 1991).

Ziel dieser Arbeit war die Untersuchung des Einflusses von Ängstlichkeit und Stress auf die oben genannten Phasen des freiwilligen Alkoholkonsums, um ihre Bedeutung als mögliche Risikofaktoren für die Entwicklung suchartigen Verhaltens in Nagern festzustellen. Die Weiterentwicklung von Ratten- oder Mausmodellen zu Paradigmen eines Angst- und/oder

Stress-induzierten Anstiegs des basalen bzw. rückfallartigen Alkoholkonsums ist bedeutsam für die Untersuchung der Interaktion von Angst/Stress und Alkoholwirkungen bzw. der Motivation, Alkohol zu konsumieren. Weiterhin könnten derartige Modelle dazu genutzt werden, Möglichkeiten der pharmakologischen Intervention im Hinblick auf die klinische Anwendung beim Menschen zu untersuchen.

2. Methoden

2.1 Tiere

2.1.1 Allgemeines

Die Tiere wurden unter Standardbedingungen bei einer Temperatur von 21 ± 2 °C und einer Luftfeuchtigkeit von ca. 55 % gehalten. Soweit nicht anders angegeben bestand freier Zugang zu Standardfutter (Altromin, Lage) und Wasser. Der Lichtzyklus betrug 12 Stunden (Licht an: 7 Uhr). Soweit nicht anders angegeben erfolgte die Haltung einzeln in Typ III (Ratten) bzw. Typ II (Mäuse) Makrolonkäfigen.

2.1.2 Wistar-Ratten

Es wurden 155 männliche Wistar-Ratten (Max-Planck-Institut für Biochemie, Martinsried) verwendet.

2.1.3 HAB/LAB-Ratten

Je acht männliche HAB- und LAB-Ratten (Generation F8, aktuelle Zählung begann 1996) wurden von der Arbeitsgruppe Verhaltensendokrinologie (Max-Planck-Institut für Psychiatrie, München) zur Verfügung gestellt.

Einzelheiten zur Etablierung und Charakterisierung der HAB/LAB-Ratten finden sich bei Liebsch *et al.* (1998b). Es handelt sich dabei um Wistar-Ratten, die vor über 10 Jahren bei einem kommerziellen Lieferanten (Charles River, Sulzfeld) gekauft wurden. Die Tiere

wurden nach ihrer Verhaltensleistung auf der *Elevated Plusmaze* (s. u.) selektiert. Tiere, die sich in diesem Verhaltensversuch am meisten bzw. am wenigsten ängstlich zeigten, wurden jeweils miteinander verpaart. Dadurch wurden zwei Linien etabliert, die sich deutlich und dauerhaft in ihrem Verhalten auf der *Elevated Plusmaze* unterscheiden: die HAB- (*high anxiety-related behaviour*) Linie mit hoher Angstdisposition, sowie die LAB- (*low anxiety-related behaviour*) Linie, die durch niedrige Angstdisposition gekennzeichnet ist. Die Nachkommen jeder Linie wurden in einem Alter von 10 Wochen auf der *Elevated Plusmaze* getestet. HAB-Tiere, die dabei eine niedrige und LAB-Tiere, die eine hohe Ängstlichkeit zeigten, sowie Individuen, die keine deutliche Tendenz zu einem dieser beiden Extreme zeigten, wurden sowohl für die Zucht, als auch für weitere Verhaltensexperimente ausgeschlossen.

2.1.4 Mäuse

42 männliche C57BL/6JOlaHsd und 30 männliche DBA/2OlaHsd wurden bei Harlan-Winkelmann (Borchen) bezogen.

2.2 Testparadigmen Angst-bezogenen Verhaltens

2.2.1 Allgemeines

Um die Tiere an die Testumgebung zu habituierten, wurden sie mindestens drei Tage vor einem Test in den Versuchsraum gebracht. Die Durchführung der Tests erfolgte zwischen 8.00 und 12.30 Uhr.

2.2.2 *Elevated Plusmaze* – Ratten

Im *Elevated Plusmaze*-Test bringt man das Tier in eine Konfliktsituation zwischen dem Antrieb zur Exploration einer neuen Umgebung einerseits und seiner angeborenen Angst vor

offenen, erhöhten Flächen andererseits. Eine verringerte Exploration der „offenen Arme“ (siehe unten) der Apparatur dient folglich als Indikator für eine erhöhte Ängstlichkeit.

Die Versuchsanordnung bestand aus einer plusförmigen Plattform aus grauem Kunststoff, die 73 cm über dem Boden angebracht war. Dabei waren zwei sich gegenüberliegende Arme jeweils von 40 cm hohen Seitenwänden umgeben („geschlossene Arme“), während die beiden anderen Arme keine Wände besaßen („offene Arme“). Die 50 cm langen und 10 cm breiten Arme waren durch eine 10 x 10 cm große Fläche verbunden („neutrale Zone“). Der Boden der gesamten Plattform war mit einer rauhen Gummimatte belegt. Die Apparatur war durch je einen weißen Strahler über den offenen Armen (durchschnittliche Lichtintensität: 140 lx), sowie je einen roten Strahler über den geschlossenen Armen (60 lx) ausgeleuchtet und von einem schwarzen, undurchsichtigen Vorhang umgeben.

Zu Beginn eines Testdurchgangs wurde eine Ratte mit Blickrichtung auf einen der geschlossenen Arme auf die neutrale Zone gesetzt. Während der Versuchsdauer von fünf Minuten wurden folgende Parameter von einer senkrecht über der Plattform montierten Videokamera erfasst, auf einen Monitor übertragen und direkt mit Hilfe des Computerprogramms PLUSMAZE (E. Fricke, München) festgehalten:

- (1) die Anzahl der Eintritte in die offenen und geschlossenen Arme, wobei ein Eintritt als das Setzen beider Vorderpfoten in den betreffenden Arm definiert war;
- (2) die auf den offenen sowie geschlossenen Armen verbrachte Zeit;
- (3) die Latenz bis zum ersten Eintritt in einen offenen Arm;
- (4) die Anzahl der „vollständigen Eintritte“ (mit allen vier Pfoten) in die offenen Arme.

Später wurde aus (1) und (2) die Anzahl der Eintritte in die offenen Arme in Prozent der Eintritte in alle Arme, sowie die auf den offenen Armen verbrachte Zeit in Prozent der auf allen Armen verbrachten Zeit errechnet.

2.2.3 Dark/Light-Box – Mäuse

Auch im *Dark/Light-Box*-Versuch befindet sich das Tier in einem Konflikt zwischen dem Drang zur Exploration der neuen Umgebung und der Aversion gegen eine exponierte Fläche. Im Gegensatz zur *Elevated Plusmaze* handelt es sich dabei jedoch nicht um eine erhöhte Plattform, sondern um ein hell beleuchtetes, weiträumiges Areal. Erhöhte Ängstlichkeit zeigt sich durch eine geringere Exploration dieses hellen Bereiches.

Die nach oben hin offene *Dark/Light-Box* bestand aus schwarzem und weißem Kunststoff und war in zwei unterschiedlich große Kompartimente unterteilt: ein größeres weißes (30 x 20 x 25 cm) und ein kleineres schwarzes Kompartiment (15 x 20 x 25 cm). Beide Kompartimente waren durch einen oben mit durchsichtigem Kunststoff geschlossenen Tunnel (4 x 7 x 10 cm) verbunden. Um den Kontrast der beiden Kompartimente zu verstärken, wurde das helle Kompartiment durch Kaltlicht mit einer Lichtintensität von 680 - 700 lx ausgeleuchtet, während die Lichtintensität im dunklen Abteil nur 2 – 3 lx betrug. Die Testbox befand sich in einem durch einen schwarzen, undurchsichtigen Vorhang abgetrennten Bereich des Raumes.

Ein Versuchsdurchlauf dauerte fünf Minuten. Zu Beginn wurde eine Maus in das dunkle Kompartiment mit dem Kopf in Richtung des Tunnels gesetzt. Über eine über der Box angebrachten Videokamera wurde das Verhalten des Tieres auf einen Monitor übertragen. Folgende Parameter wurden direkt mit Hilfe des Computerprogramms PLUSMAZE (E. Fricke, München) festgehalten:

- (1) die Anzahl der Eintritte in das helle sowie dunkle Kompartiment (als Eintritt galt das Plazieren aller vier Vorderpfoten in das jeweilige Abteil);
- (2) die in den jeweiligen Kompartimenten verbrachte Zeit;
- (3) die Latenz bis zum ersten Eintritt in das helle Kompartiment.

Aus (1) und (2) wurde die Anzahl der Eintritte in das helle Kompartiment in Prozent der Gesamteintritte in den Tunnel und beide Kompartimente, sowie die im hellen Kompartiment verbrachte Zeit in Prozent der gesamten Testzeit von fünf Minuten berechnet.

2.3 Freiwilliger Alkoholkonsum

2.3.1 Orale Alkoholselbstverabreichung – Ratten

Mit Beginn der Einzelhaltung bekamen die Tiere zusätzlich zur Wasserflasche je eine Flasche mit 5%, 10% und 20% v/v Alkohol. Mit Ausnahme der Tiere in Kap. 5.3.1.1 und der HAB/LAB-Ratten (Kap. 4.3.1.1, 4.3.2.1 und 5.3.1.2), die jeweils dauerhaft Zugang zu Alkohol hatten, wurden nach acht Wochen kontinuierlichen Zugriffs die drei Alkoholflaschen regelmäßig im Abstand von vier Wochen für drei Tage entzogen. Wurde das Auftreten eines ADE untersucht, so wurde den Tieren der Alkohol für zwei Wochen entzogen. An Messtagen wurden immer zur gleichen Uhrzeit alle Flaschen, das Futter und die Tiere gewogen. Um eventuelle Seitenpräferenzen auszugleichen, wurden die Positionen der Flaschen regelmäßig vertauscht. Aus den erhobenen Werten wurden der Futterkonsum (in g/kg), der Alkoholkonsum (in g/kg), die Gesamtalkoholpräferenz (in %) und die Präferenz für die einzelnen Alkoholkonzentrationen (in %) berechnet. Die Alkoholpräferenz ist definiert als der prozentuale Anteil der Summe der Trinkmengen von den drei Alkohollösungen an der Gesamttrinkmenge, die Präferenz für eine bestimmte Alkoholkonzentration wird berechnet als prozentualer Anteil der Trinkmenge von der jeweiligen Alkohollösung an der Gesamttrinkmenge.

2.3.2 Operante Alkoholselbstverabreichung – Ratten

Für die Versuche wurden acht operante Boxen verwendet, die durch einen PC, ein Interface und entsprechende Software (Schedule-Manager for Windows 2.05) angesteuert wurden (Med Associates Inc., Georgia, VT, USA). Die Boxen befanden sich zur Abschirmung von

Außengeräuschen in Holzkammern. Jede Holzkammer besaß einen in die Seitenwand montierten Ventilator, der einerseits für ausreichende Belüftung, andererseits für maskierendes Hintergrundrauschen sorgte. Die operanten Boxen waren jeweils ausgestattet mit einem Hauslicht, zwei gegenüberliegenden Hebeln, eine neben jedem der Hebel angebrachte Trinkmulde und einer Futterraufe an der hinteren Wand der Box. Ein Hebeldruck bewirkte, dass von einem Flüssigkeitsspender eine definierte Menge an Flüssigkeit (25 – 30 μ l) in die neben dem Hebel befindliche Trinkmulde tropfte. Jeder Druck auf den einen Hebel bewirkte die Freigabe eines Tropfens Wasser, jeder Druck auf den anderen Hebel setzte einen Tropfen 20%-igen Alkohols frei (*Fixed Ratio* (FR) 1/ FR 1). Die Sitzungen in den operanten Boxen begannen um 10 Uhr und dauerten 23 Stunden. Der normale Licht-Dunkel-Rhythmus der Tiere (Licht an: 7 – 19 Uhr) wurde während der Sitzungen in den Boxen beibehalten.

Ratten, die bereits mindestens fünf Monate Erfahrung mit dem in Kapitel 2.2.1 beschriebenen 4-Flaschen-Modell der oralen Alkoholselbstverabreichung im Heimkäfig hatten, wurden die Alkoholflaschen dauerhaft entzogen. Die operanten Sitzungen begannen nach zwei Wochen Alkoholabstinenz. Um das Erlernen der Assoziation zwischen Hebeldruck und Flüssigkeitsgabe zu beschleunigen, wurden die Tiere vor ihrer allerersten Sitzung für 24 Stunden flüssigkeitsdepriviert. Danach erfolgte keine Flüssigkeitsdeprivation mehr. Von nun an wurde für jede Ratte eine operante Sitzung pro Woche durchgeführt. Um Konditionierungseffekten vorzubeugen, wurde die Seite der Alkoholpräsentation jedesmal vertauscht. Experimente wurden erst durchgeführt, nachdem Hebeldruckverhalten, Alkoholkonsum und Alkoholpräferenz über mindestens drei Sitzungen stabil blieben. In ihrem Heimkäfig hatten die Tiere freien Zugang zu Futter und Wasser. Zugang zu Alkohol bestand nur während der wöchentlichen operanten Sitzungen.

2.3.3 Orale Alkoholselbstverabreichung – Mäuse

Die orale Alkoholselbstverabreichung bei Mäusen wurde gegenüber der bei Ratten etwas modifiziert. Mit einem Alter von acht Wochen, direkt nach der Lieferung wurden die Mäuse einzeln gesetzt und jeweils mit Futter und einer Standard-Wasserflasche versorgt. Nach zweieinhalb Wochen wurde die Standard-Wasserflasche durch drei 100 ml Wasserflaschen (Pereg, Mannheim) ersetzt. Um Tropffehler zu verringern, wurden speziell angefertigte Trinkkappen verwendet (Sillaber, 1999): Gummistopfen (Roth, Karlsruhe) wurden durchbohrt. Durch diese Bohrung wurden Glashalme ($\varnothing$ 6 mm, Länge 8 cm; Glasbläserei Martinsried) gesteckt, so dass sie ca. 1,5 cm in die Flasche und 3 cm aus dem Stopfen ragten. Diese Glashalme wurden vorne so verschmolzen, dass sich eine glatte, abgerundete Öffnung von etwa 1,5 mm bildete, durch die die Mäuse durch Lecken Flüssigkeit aufnehmen konnten. Durch regelmäßiges Wiegen wurde der Wasserkonsum aus den drei Flaschen bestimmt, um die bevorzugte Trinkposition der einzelnen Tiere zu bestimmen. Nach einer Woche wurden die drei Wasserflaschen entfernt und durch drei gleiche Flaschen, die Leitungswasser, 5% und 10%-igen Alkohol (v/v) enthielten, ersetzt. Die Wasserflasche wurde an die bevorzugte Trinkposition der einzelnen Mäuse plaziert. Damit sollte erreicht werden, dass eventuell alkoholpräferierende Tiere aktiv der Alkohollösung folgten. Für die gesamte Dauer des Experiments wurde die Position der jeweiligen Konzentrationen nicht mehr vertauscht. Durch regelmäßiges Wiegen der Tiere und der Flaschen wurde der Alkoholkonsum, die Alkoholpräferenz und die Präferenz für die jeweiligen Alkohollösungen bestimmt.

2.3.4 Trinkometer – Mäuse

Das elektronische Trinkometersystem bestand aus einem 8-kanaligen 10-Bit Datenerfassungssystem (Conrad Electronics, Hirschau), einem Analog/Digital-Wandler, einem PC und einem Datenerfassungsprogramm. Die Mäuse befanden sich in Gitterkäfigen (43 x 26 x 14 cm), die in reguläre Typ III- Makrolonkäfige (43 x 27 x 16 cm) eingehängt

waren, und hatten freien Zugang zu Wasser und einer 12%-igen Alkohollösung. Über Kabel waren die Kanäle des Datenerfassungssystems mit den metallischen Kappen der Trinkflaschen und dem Gitterkäfig verbunden. Wenn eine Maus an einer Flasche trank, wurde dadurch ein Stromkreis ($< 1 \mu\text{A}$) geschlossen und über das Datenerfassungsprogramm und den PC ein Signal aufgezeichnet. Das Trinkverhalten der Mäuse wurde durch das Schließen des Stromkreises nicht beeinflusst. Aus den Daten wurde die Dauer der Trinkzeit in Sekunden pro Stunde berechnet.

2.4 Stressparadigmen

2.4.1 Social Defeat – Ratten

Der *Social Defeat*-Stress beruht auf der Konfrontation eines Tieres mit einem aggressiven, sein Territorium verteidigenden Männchen.

Ratten der experimentell gestressten Gruppen („*Intruder*“) wurden sozialem Stress ausgesetzt, indem sie in den Heimkäfig eines aggressiven männlichen Artgenossen („*Resident*“; männliche LAB-Ratten, 450 – 550 g) gesetzt wurden. Um die durch Territorialverhalten bedingte Aggression der *Residents* zu erhöhen, wurden diese zusammen mit einem Weibchen gehalten, das kurz vor dem Stress aus dem Käfig genommen wurde. Zusätzlich wurden die *Residents* regelmäßig trainiert, männliche Eindringlinge anzugreifen.

Der Heimkäfig des *Residents* bestand aus durchsichtigem Kunststoff und konnte durch ein Gitternetz in zwei unterschiedlich große Kompartimente unterteilt werden. Der *Intruder* wurde in das kleinere Kompartiment (12 x 22,5 x 36 cm) gesetzt, das durch das Gitter vom im großen Kompartiment (26 x 22,5 x 36 cm) sitzenden *Resident* abgetrennt war. Nach zwei Minuten wurde das Trenngitter entfernt. Dies hatte einen sofortigen Angriff des *Residents* auf den *Intruder* zur Folge. Nach diesem Angriff wurden beide Tiere wieder durch das Gitter getrennt, so dass sich der *Intruder* wieder im kleineren Kompartiment befand. Das Verhalten

des *Intruders* wurde direkt beobachtet und einmal pro Minute das Auftreten einer der folgenden Verhaltensweisen notiert:

- (1) *Freezing* (das Tier ist, abgesehen von Atembewegungen, völlig regungslos);
- (2) Immobilität (wie *Freezing*, aber die Schnauzhaare bewegen sich);
- (3) soziale Investigation (der *Intruder* schnüffelt in Richtung *Resident* durch das Gitter);
- (4) Exploration (die Ratte untersucht die Einstreu oder den Käfig);
- (5) Körperpflegeverhalten.

Mit Hilfe eines Fledermaus-Detektors (Mini-3 Detector; Ultra Sound Advice, London, Großbritannien) wurde als zusätzliches Maß des Stresszustandes des Tieres einmal pro Minute geprüft, ob dieses im Ultraschallbereich von 20 – 30 kHz vokalisiert. Nach einer Beobachtungszeit von 15 Minuten wurde das Trenngitter nochmals geöffnet; unmittelbar nach dem darauffolgenden Angriff des *Residents* wurde der *Intruder* zurück in seinen Heimkäfig gesetzt.

Für jedes Tier wurde der prozentuale Anteil jeder Verhaltensweise an der Summe der zu den 15 Beobachtungszeitpunkten notierten Verhaltensweisen berechnet. Analog wurde mit der Ultraschall-Vokalisation verfahren.

2.4.2 Social Defeat – Mäuse

Der *Social Defeat*-Stress bei Mäusen wurde gegenüber dem bei Ratten durchgeführten leicht modifiziert. Die Größe des Heimkäfigs der *Residents* (männliche CD1 Mäuse; 36 – 45 g) betrug 6,5 x 12 x 20 cm (kleines Kompartiment) und 12 x 12 x 20 cm (großes Kompartiment). Der *Intruder* wurde ohne separierendes Trenngitter in den Heimkäfig des *Residents* gegeben. Nach dem ersten Angriff des *Residents* wurden beide Tiere durch ein Gitter voneinander getrennt. Zwei Minuten später wurde das Gitter geöffnet; nachdem der *Intruder* angegriffen wurde erfolgte wieder Trennung. Nach 15 Minuten Gesamtzeit wurde das Gitter ein weiteres mal geöffnet. Unmittelbar nach dem Angriff des *Residents* wurde der *Intruder* zurück in den

Heimkäfig gesetzt. Das Verhalten von *Resident* und *Intruder* wurde direkt beobachtet und die Latenz aller drei Angriffe des *Residents* gegen den *Intruder* wurde notiert.

2.4.3 *Restraint – Ratten*

Das Stress-induzierende Moment des *Restraint*-Stresses besteht aus einer starken Einschränkung der Bewegungsmöglichkeiten des Tieres; diesem wird damit die Möglichkeit genommen, die Situation aktiv zu beeinflussen.

Die Ratte wurde aus ihrem Heimkäfig genommen und für 15 Minuten in einen quaderförmigen Kunststoff-Restrainer (14 x 7 x 7 cm) gesteckt. Um eine ausreichende Luftzufuhr zu ermöglichen, befanden sich am vorderen Ende des Restrainers ca. 0,5 cm große Löcher. Das hintere Ende war mit einer Plastikfolie versehen, die um den Schwanz des Tieres herum geschlossen werden konnte. Dadurch war die Ratte so eng in den Restraint eingeschlossen, dass ihr nur kleine Bewegungen des Kopfes und des Schwanzes möglich waren.

2.4.4 *Restraint – Mäuse*

Der *Restraint*-Stress bei Mäusen wurde analog dem der Ratten durchgeführt. Als Restraint diente hier ein am vorderen Ende konisch zulaufendes 50 ml Falcon-Röhrchen, in dessen Spitze ein Loch geschnitten war, um eine ausreichende Luftzufuhr zu gewährleisten. Nach dem Einbringen des Tieres in das Röhrchen wurde dieses mit dem dazugehörigen Schraubverschluss verschlossen. Die Stressdauer betrug 60 Minuten, bzw. bei Anwendung als finaler Stressor 15 Minuten.

2.4.5 *Beute-Stress – Mäuse*

Beim Beute-Stress wird bei der Maus durch die Anwesenheit eines Fressfeindes Stress ausgelöst.

Als Fressfeinde wurden männliche Wistar-Ratten mit einem Körpergewicht von 330 – 420 g verwendet. Je eine Ratte wurde in einen Gitterkäfig (43 x 26 x 14 cm, Maschenweite 1 cm) gesetzt und je einer dieser Gitterkäfige wurde so auf zwei nebeneinanderstehende Maus-Einzelkäfige platziert, dass der Gitterboden des Rattenkäfigs auf die Gitterdeckel der Mauseinzelkäfige zu liegen kam. Die Stressdauer betrug 30 Minuten. Alle fünf Minuten wurde der Rattenkäfig um 180° gedreht, um zu verhindern, dass eine eventuelle Seitenpräferenz der Ratte eine unterschiedliche Stressintensität der beiden Mäuse darunter bewirkt. Die Tiere hatten während der Stressexposition Zugang zu Futter, Wasser und den beiden Alkoholflaschen, da diese in den Käfigen belassen wurden.

2.4.6 *Forced Swimming* – Mäuse

Während des *Forced Swim*-Stresses wird die Maus in eine lebensbedrohliche Situation gebracht, aus der sie aus eigener Kraft nicht entkommen kann.

Ein durchsichtiger Glasbehälter (Fassungsvermögen 2 l; Ø 13 cm) wurde mit 1200 ml 25°C warmen Wasser gefüllt (entsprechend einer Wassertiefe von 12 cm). Die Maus wurde in das Wasser gegeben und für die Testdauer von fünf Minuten wurden folgende Verhaltensweisen direkt beobachtet und mit Hilfe des Computerprogramms „Eventlog“ (freundliche Leihgabe von Dr. M. Engelmann) aufgezeichnet:

- (1) *Struggling* (heftige Strampelbewegungen aller vier Pfoten, die Vorderpfoten durchbrechen die Wasseroberfläche);
- (2) *Swimming* (ruhige Schwimmbewegungen);
- (3) *Floating* (das Tier treibt passiv auf dem Wasser, Bewegung der Pfoten dient ausschließlich der Balancehaltung).

Nach Ende der fünf Minuten wurde die Maus aus dem Wasser genommen, kurz abgetrocknet und in den Heimkäfig zurückgesetzt.

2.4.7 Sozialer Stress – Mäuse

Als Angreifer wurden männliche B6C3F1- sowie 129BL6N-Mäuse (25 – 35 g) in Gitterkäfigen gehalten, die denen der zu stressenden Tiere glichen. Sie wurden trainiert andere Mäuse, zu denen sie in den Käfig gesetzt wurden, anzugreifen. Der Angreifer wurde zu dem zu stressenden Tier in den Gitterkäfig gesetzt. Nachdem er dieses angegriffen hatte, wurden beide Tiere durch eine Metallbarriere, die im Gitterkäfig befestigt werden konnte, voneinander getrennt. Der Angreifer befand sich dabei im größeren Kompartiment (17 x 26 x 14 cm), das angegriffene Tier in einem kleineren (13 x 26 x 14 cm). Letzteres hatte dort Zugang zu Futter, Wasser- und Alkoholflasche. Nach 30 Minuten wurde der Angreifer aus dem Käfig herausgenommen und die Trennung im Käfig wurde wieder aufgehoben.

2.5 Quantitative Analysen

2.5.1 Immunoblotting

Die Ratten der experimentellen Gruppen (siehe Kap. 3.2) wurden in Isofluran narkotisiert und dekapitiert. Die Hirne wurden zügig herauspräpariert, in Methylbutan auf Trockeneis gefroren und bei -80°C aufbewahrt. Vor der Analyse wurden die Gehirne in frontalen Cortex, Nucleus accumbens, Striatum und Hippocampus seziert.

Für jede einzelne Ratte wurden die Hirnregionen in eiskaltem Membranpuffer (50 mM Tris-HCl pH 7,4; 3 mM MgCl₂; 1 mM EGTA; 1 µg/ml Pepstatin A; 1 µg/ml Leupeptin; 0,5 mM PMSF; 0,1 mM Benzamidin) homogenisiert, indem sie mittels einer Spritze wiederholt durch eine enge Kanüle (23G) gesaugt bzw. gedrückt wurden. Das Homogenat wurde bei 4°C zweimal 15 Minuten bei 18000 rpm zentrifugiert, um die Membranproteine abzutrennen. Zur weiteren Analyse wurde das Präzipitat verwendet. Dessen Proteinkonzentration wurde mit Hilfe des Bio-Rad DC Protein Assay Kits (Bio-Rad München) bestimmt. Jeweils gleiche Mengen an Protein (25µg) wurden durch 9 % Natrium Dodecylsulphat-Polyacrylamid Gel-Elektrophorese (SDS-PAGE; Laemmli, 1970) aufgetrennt und elektrophoretisch auf

Nitrozellulose-Membranen (0,45 µm, Schleicher & Schüll, Dassel) transferiert. Die Membranen wurden mit 5 % Rinderserum-Albumin geblockt und über Nacht mit dem primären Antikörper (Hase-Anti-NMDAR2B; Chemicon, Temecula, CA, USA; 1:5000 Verdünnung) bei Raumtemperatur inkubiert. Inkubation mit dem sekundären Antikörper (Esel-Peroxidase-gekoppeltes Anti-Hasen-IgG; Amersham Buchler, Braunschweig; 1:10000 Verdünnung) erfolgte für zwei Stunden bei Raumtemperatur. Alle Inkubationen, Blocken, dazwischen liegende Waschschriffe und Verdünnungen wurden mit Tris-Puffer, dem 0,1 % des Detergens *Tween* 20 beigefügt war, durchgeführt.

Die Antikörper Detektion erfolgte mit dem Amersham ECL *Western Blotting* Analyse-System; das Signal wurde auf Hyperfilm-ECL (Amersham Buchler) exponiert.

Um die eingesetzte Proteinkonzentration zu kontrollieren, wurden 25 µg der jeweiligen Probe durch 9 % SDS-PAGE aufgetrennt und die Gele mit Coomassie Brilliantblau gefärbt.

Sofern nicht anders angegeben, wurden alle Substanzen bei der Firma Sigma (Deisenhofen) bezogen.

Jedes Gel enthielt Proben aller experimenteller Gruppen. Die Analyse erfolgte durch Messung der optischen Dichte der Banden mit Hilfe des Optimas Bildanalyse-Systems (Optimas/BioScan, Edmonds, USA).

Für jedes Tier und jede Hirnregion wurden mindestens drei *Blots* angefertigt; die Werte wurden nach der Analyse gemittelt. Diese Daten wurden dann auf die im Coomassiegel ermittelte Proteinkonzentration normalisiert. Der Wert jedes Tieres wurde als Prozent des Mittelwertes der auf 100 % gesetzten Wasser-Kontrollgruppe berechnet.

2.5.2 Radioimmunoassays

Adrenocorticotropes Hormon (ACTH)

Die Höhe der ACTH-Konzentration im Blutplasma wurde mittels Radioimmunoassay (RIA) bestimmt. Das Prinzip des ACTH-RIA beruht auf der Konkurrenz zwischen ¹²⁵I-markiertem

und nicht-radioaktiv markiertem ACTH in den zu messenden Proben um eine definierte Anzahl von Bindungsstellen eines spezifischen Antikörpers. Je mehr nicht-markiertes Antigen in den zu bestimmenden Proben enthalten ist, desto weniger ^{125}I -markiertes Antigen kann von dem zugefügten Antikörper gebunden werden. Nach einem Inkubationsschritt ist die Menge an markiertem Antikörper-ACTH-Komplex umgekehrt proportional der Menge an unmarkiertem ACTH in den zu bestimmenden Proben. Zur Abtrennung von Antikörper-gebundenem und freiem ^{125}I wird die Doppelantikörpermethode eingesetzt, wobei ein zweiter Antikörper im Überschuss zugegeben wird. Durch Zentrifugation wird der gebildete sekundärer-Antikörper-primärer-Antikörper-ACTH-Komplex abgetrennt, ungebundenes Antigen im Überstand wird dekantiert und die Radioaktivität im Niederschlag des Teströhrchens mittels eines Gammazählers (LB 2103, Berthold) gemessen.

Verwendet wurde das ACTH (Human) ^{125}I RIA-Kit von DRG Instruments (Marburg). Es wurde nach Anleitung des Herstellers verfahren, jedoch wurde nur jeweils das halbe Volumen an Probe bzw. der jeweiligen Reagenzien eingesetzt.

Corticosteron

Corticosteronkonzentrationen im Blutplasma wurden mit Hilfe des Corticosteron (Ratte/Maus) RIA-Kits von DRG (Marburg) bestimmt. Das Prinzip dieses RIA folgt dem für ACTH (siehe oben). Abweichend von der Anleitung des Herstellers wurden jeweils 10 μl Plasma mit 1390 μl Phosphatpufferlösung verdünnt. Dazu wurden 600 μl Diluent gegeben. Im weiteren Verlauf wurde jeweils die Hälfte der angegebenen Volumina an Reagenzien eingesetzt.

2.5.3 Blutalkoholwerte

Die Blutalkoholkonzentration wurde enzymatisch mit dem Blutalkohol-Testkit von Sigma Diagnostics (St. Louis, USA) gemäß der Arbeitsanleitung für Vollblut bestimmt. Der Test

beruht auf der Wirkung von Alkoholdehydrogenase (ADH), die die Oxidation von Alkohol zu Acetaldehyd unter gleichzeitiger Reduktion von Nicotinamid-adenin-dinucleotid (NAD) zu NADH₂ katalysiert. Der damit verbundene Anstieg der Extinktion bei 340 nm ist der Alkoholkonzentration in der Probe direkt proportional. Die Messungen der Extinktion erfolgten mit dem Spektrophotometer DU 640 von Beckmann, München.

2.6 Substanzen

2.6.1 Alkohol

96%-iges Ethanol (Apotheke Krankenhaus Schwabing, München) wurde mit Leitungswasser zu den entsprechenden Konzentrationen verdünnt. Die Alkoholapplikation erfolgte durch orale Selbstverabreichung bzw. intragastral (i.g.) über eine Schlundsonde.

2.6.2 Saline

Isotone Kochsalzlösung der Firma Pharmacia, Erlangen wurde intraperitoneal (i.p.) injiziert.

2.6.3 Diazepam

Diazepam-Lipuro (B.Braun, Melsungen) wurde mit *Aqua ad injectabilia* zu den entsprechenden Konzentrationen verdünnt. Die Substanzapplikation erfolgte durch i.p. Injektion.

2.6.4 R121919

R121919 (Janssen, Beerse, Belgien) wurde in Leitungswasser gelöst und i.g. verabreicht.

2.7 Statistik

Bei einem Stichprobenumfang von $k=2$ wurde der Student's t-Test, bzw. bei ungleich verteilten Daten der Mann-Whitney U-Test angewendet. Bei mehrtägigen Messungen oder

Messungen an wiederholten Zeitpunkten wurden die Daten je nach Anzahl der verglichenen Bedingungen einer ein-, zwei- oder dreifaktoriellen Varianzanalyse (ANOVA) unterzogen. Bei Erreichen des Signifikanzniveaus von $p < 0,05$ wurde nach einer ANOVA zur Lokalisation der Effekte der Newman-Keuls-Test verwandt.

3. Langzeit- Alkoholkonsum und Expression der NMDA Rezeptor-Untereinheit 2B

3.1 Einleitung

Die chronische Einnahme hoher Alkoholmengen führt zu zellulären Adaptationen im zentralen Nervensystem (siehe Übersichtsartikel Fadda & Rossetti, 1998). Wird die Alkoholfuhr daraufhin gestoppt oder verringert, so resultiert dies in dem Auftreten von Entzugssymptomen (siehe Übersichtsartikel Adinoff *et al.*, 1988; Emmett-Oglesby *et al.*, 1990). Eine zentrale Rolle spielt dabei das glutamaterge System, im Speziellen Glutamat-Rezeptoren vom NMDA-Subtyp. In verschiedenen Studien wurde gezeigt, dass eine akute Alkoholapplikation die NMDA-induzierte Rezeptorantwort verringert (Dildy & Leslie, 1989; Hoffman *et al.*, 1989; Lovinger *et al.*, 1989; Wirkner *et al.*, 2000; siehe Übersichtsartikel Wirkner *et al.*, 1999), während chronische Alkoholbehandlung einen gegenteiligen Effekt auf die NMDA-Rezeptorfunktion ausübt (Gulya *et al.*, 1991; Iorio *et al.*, 1992; Hu & Ticku, 1995). Die funktionelle Hochregulation der NMDA-Rezeptoren durch dauerhaften Alkoholeinfluss hat nach Entzug des Alkohols eine zelluläre Übererregbarkeit und damit Entzugssymptome wie entzugsbedingte Krämpfe und neuronalen Zelltod zur Folge (siehe Übersichtsartikel Hoffman & Tabakoff, 1994; Tsai & Coyle, 1998).

Der NMDA-Rezeptorkomplex (NR) ist ein liganden-gesteuerter Ionenkanal. Er stellt ein heteromeres, integrales Membranprotein dar, das aus obligatorischen NR1 zusammen mit modulatorischen NR2-Untereinheiten besteht (Stephenson, 2001). Kürzlich wurden zwei weitere Untereinheiten charakterisiert: NR3A und NR3B (Ciabarra *et al.*, 1995; Sucher *et al.*, 1995; Nishi *et al.*, 2001; Chatterton *et al.*, 2002). Während die NR1-Untereinheit das Produkt

eines einzelnen Gens darstellt, von dem allerdings acht Splicingvarianten bekannt sind, gibt es bei der NR2-Untereinheit mindestens vier Polypeptide (NR2A, NR2B, NR2C, NR2D), die vier unterschiedlichen Genen entspringen (Hollmann & Heinemann, 1994). Diese sind im Gegensatz zur NR1-Untereinheit, die im Gehirn ubiquitär exprimiert wird (Moriyoshi *et al.*, 1991) regional in unterschiedlicher Menge vorhanden (Wenzel *et al.*, 1995): Während auch NR2A im Rattenhirn in nahezu allen Hirnregionen nachgewiesen wurde, ist die Verteilung der übrigen NR-Untereinheiten lokal eingeschränkter. NR2B ist stark in Vorderhirnregionen exprimiert, v.a. im Hippocampus, Striatum, Bulbus olfactorius und cerebralen Cortex, NR2C wurde hauptsächlich im Kleinhirn und NR2D v.a. in diencephalen, mesencephalen und Hirnstamm-Strukturen gefunden (Wenzel *et al.*, 1995).

Eine veränderte NR Expression nach chronischer Alkoholapplikation wurde wiederholt gezeigt: Veränderte Konzentrationen von Boten-Ribonukleinsäure (*messenger ribonucleic acid*, mRNA) für NR2A und NR2B nach chronischer Alkoholbehandlung wurde sowohl in Zellkulturen kortikaler Neurone als auch im cerebralen Cortex, Hippocampus und Kleinhirn von Mäusen und Ratten gefunden (Follesa & Ticku, 1995; Hu *et al.*, 1996; Snell *et al.*, 1996). Auf Proteinebene wurden veränderte Konzentrationen von NR1-, NR2A- und NR2B-Polypeptid in Zellkulturen kortikaler Neurone, in limbischen Arealen des Vorderhirns, im Hippocampus, Cortex und Kleinhirn von Ratten und Mäusen nachgewiesen (Narita *et al.*, 2000; Chandler *et al.*, 1999; Kalluri *et al.*, 1998; Follesa & Ticku, 1996b; Snell *et al.*, 1996).

„Chronische“ Alkoholbehandlung ist in diesen Studien definiert als die Applikation sehr hoher Alkoholdosen über eine oder zwei Wochen. Obwohl dieses Vorgehen im Vergleich zum Menschen möglicherweise bis zu einem gewissen Ausmaß eine schwere Alkoholdipsomanie über einige Tage hinweg widerspiegeln könnte, so befände sich doch ein Modell eines langfristigen freiwilligen Konsums niedrigerer Alkoholkonzentrationen näher an der humanen Situation.

In einer früheren Studie wurde gezeigt, dass der Langzeit-Alkoholkonsum im auch in der vorliegenden Arbeit verwendeten 4-Flaschenmodell der freiwilligen oralen Alkoholselbstverabreichung bei Ratten zu einem Anstieg der NR Funktion führte (Darstein *et al.*, 1998). Gemessen wurde dies anhand der NMDA-induzierten Freisetzung von [³H]-Acetylcholin in Schnitten des Striatums. Ziel der vorliegenden Studie war es, auf der Proteinebene den Einfluss langfristigen freiwilligen Alkoholkonsums auf die Expression der NR2B-Untereinheiten in verschiedenen Vorderhirnregionen bei Ratten zu untersuchen. Die Beteiligung der NR2B-Untereinheiten an der Sensitivität von NR für Alkohol wurde in nativen und rekombinanten NR gezeigt (Lovinger, 1995; Engblom *et al.*, 1997). Zudem weisen *in vivo* Experimente auf eine hohe Korrelation der inhibitorischen Effekte von Alkohol und Ifenprodil, einem selektiven NR2B Antagonisten, hin (Yang *et al.*, 1996). Auf der Verhaltensebene wurde in einer Studie von Narita *et al.* (2000) bei Mäusen ein verringertes Auftreten von Entzugssymptomen nach chronischem (fünftägigem) forciertem Alkoholkonsum durch die Gabe von Ifenprodil nachgewiesen.

Die genauere Kenntnis der zellulären Adaptationen cerebraler Neurone auf den langfristigen Einfluss von Alkohol eröffnet eventuell die Möglichkeit der Entwicklung wirksamerer Substanzen zur Behandlung von Entzugssymptomen sowie effektiverer Rückfallprophylaktika.

3.2 Versuchsdurchführung

In einem Alter von sechs Wochen wurden Martinsrieder Wistar-Ratten in zwei Gruppen aufgeteilt. Eine Gruppe hatte weiterhin freien Zugang zu Leitungswasser (Wassergruppe; n=7), die andere Gruppe bekam wie im Kap. 2.3.1 ausführlich beschrieben, in einem Paradigma der freiwilligen oralen Alkoholselbstverabreichung Zugang zu Wasser und 5%, 10% und 20%-igem Alkohol. Über eine Zeitspanne von 19 Monaten, über die die Tiere ununterbrochen Zugang zu Alkohol hatten, konsumierten diese durchschnittlich $2 \text{ g} \pm 0,5 \text{ g}$

reinen Alkohol pro kg Körpergewicht und Tag; die Alkoholpräferenz lag zwischen 30 und 40 Prozent. Nach 19 Monaten dauerhaftem Zugang zu Wasser bzw. Wasser und den drei Alkohollösungen, startete das eigentliche Experiment. Da die Tiere als Kontrollgruppen in einem weiteren Experiment verwandt wurden (bezüglich des Einflusses wiederholter Stresserfahrung auf den freiwilligen Alkoholkonsum Langzeit-alkoholerfahrener Martinsrieder Wistar-Ratten; siehe Kap. 5.3.1.1), wurden alle Ratten einem 15-minütigen *Restraint*-Stress (siehe Kap. 2.4.3) ausgesetzt, unmittelbar bevor sie in Isofluran betäubt und dekapitiert wurden. Vor und nach dem *Restraint* wurde Blut entnommen, um die basalen und Stress-induzierten Konzentrationen von ACTH und Corticosteron, sowie die Blutalkoholwerte zu bestimmen (siehe Kap. 2.5.2, 2.5.3). Direkt nach dem *Restraint* wurden die Ratten dekapitiert, die Hirne wurden zügig herauspräpariert und in Methylbutan auf Trockeneis gefroren. Die Hirne wurden bei -80°C gelagert, bis sie in die verschiedenen Hirngebiete dissektiert und für die Immunoblotanalyse (siehe Kap. 2.5.1) verwendet wurden.

3.3 Ergebnisse

Chronischer Alkoholkonsum bewirkte einen leichten (7%) aber statistisch signifikanten Anstieg des NR2B-Polypeptids im frontalen Cortex ($P < 0.05$, Mann-Whitney U-Test). Es ergab sich kein signifikanter Unterschied in der Menge des NR2B-Polypeptids zwischen Langzeit-alkoholkonsumierenden und Langzeit-wassertrinkenden Ratten im Nucleus accumbens, Striatum oder Hippocampus (Abb. 1).

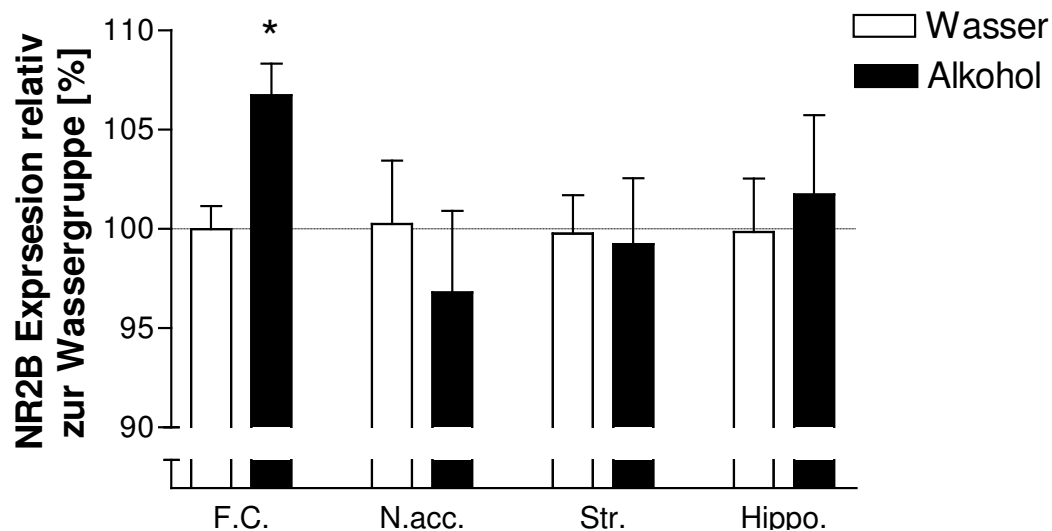


Abb. 1: Menge des NR2B-Polypeptids in verschiedenen Hirnregionen Langzeit-wassertrinkender Kontrollratten (n=7) und langfristig freiwillig Alkohol-konsumierender Ratten (n=5). Dargestellt sind Mittelwerte der prozentualen NR2B-Expression bezogen auf die auf 100% gesetzte Wassergruppe + Standardfehler. FC = frontaler Cortex, N.acc. = Nucleus accumbens, Str. = Striatum, Hippo. = Hippocampus. * $p < 0,05$ vs. Wassergruppe (Mann-Whitney U-Test).

3.4 Diskussion

Der Einfluss langfristigen freiwilligen Alkoholkonsums auf die Expression der NR2B-Untereinheit in verschiedenen Vorderhirnregionen von Ratten wurde untersucht. Über 19 Monate hatten die Ratten freien Zugang zu Wasser und Alkohol in drei verschiedenen Konzentrationen. Sie konsumierten in dieser Zeit durchschnittlich 2 g reinen Alkohol pro kg Körpergewicht und Tag. Der langfristige Alkoholkonsum führte zu einem leichten, jedoch statistisch signifikanten Anstieg des NR2B-Polypeptids im frontalen Cortex im Vergleich zur Langzeit-wasserkonsumierenden Kontrollgruppe. Es wurden keine statistisch signifikanten Unterschiede im Nucleus accumbens, Striatum oder Hippocampus gefunden.

Ein Anstieg der NR2B-Untereinheit nach „chronischer“ (fünf bis 12 Tage) Alkoholexposition wurde in Zellkulturen kortikaler Neuronen von Mäusen und Ratten gezeigt (Follesa & Ticku, 1996b; Chandler *et al.*, 1999). Dagegen führte in einer Studie von Narita *et al.* (2000) fünftägiger forcierter Alkoholkonsum bei Mäusen zwar zu einem deutlichen Anstieg der

NR2B-Untereinheit im limbischen Vorderhirn (mit Nucleus accumbens und olfaktorischem Tuberkel), jedoch nicht im cerebralen Cortex. Unterschiedliche Ergebnisse der vorliegenden Arbeit – verglichen mit anderen Studien, die den Einfluss chronischer Alkoholexposition auf die Expression von mRNA oder Polypeptid für NR2B in verschiedenen Hirngebieten untersuchten – könnten durch methodische Unterschiede bedingt sein, besonders bezüglich der Alkoholbehandlung: Erstens konsumierten in der vorliegenden Studie die Ratten den Alkohol freiwillig und zweitens nahmen sie täglich eine geringere Alkoholmenge auf, dieses jedoch über eine sehr lange Zeitspanne (nahezu ein gesamtes Rattenleben).

Es wurde bisher eine weitere Studie beschrieben, in der der Ansatz in dem hier verwendeten Modell der langfristigen freiwilligen oralen Alkoholselbstverabreichung verfolgt wurde. In dieser Studie wurde eine erhöhte NR-Funktion beobachtet, gemessen an der NMDA-evozierten Freisetzung von $[H^3]$ -Acetylcholin in Hirnschnitten des Striatums Langzeitalkoholerfahrener Martinsrieder Wistar-Ratten (Darstein *et al.*, 1998). Da in der vorliegenden Studie im Striatum kein Anstieg der NR2B-Expression gefunden wurde, erscheint die erhöhte NR-Funktion unabhängig von einer veränderten NR2B-Untereinheit zu sein. Alternativ könnten sich die unterschiedlichen Ergebnisse durch methodische Unterschiede zwischen den Studien erklären: Die Zeit des freiwilligen Alkoholkonsums betrug in der vorliegenden Studie 19 Monate, verglichen mit neun Monaten in der Arbeit von Darstein *et al.* (1998). Folglich waren die Tiere hier auch 10 Monate älter. Alterungsbedingte Veränderungen der NR-Funktion, wie eine verringerte Bindung von Agonisten und Antagonisten oder eine erniedrigte elektrophysiologische Antwort nach Applikation von NMDA, wurden beschrieben (Magnusson, 1998). Weiterhin wurden die Tiere bei Darstein *et al.* (1998) nach 24-stündiger Alkoholdeprivation dekapitiert, während in der vorliegenden Arbeit der Alkohol nicht entzogen wurde, um eine Beeinflussung der Ergebnisse durch Entzugsstress zu vermeiden. Während nicht auszuschließen ist, dass der Unterschied zwischen den beiden Studien durch die fehlende Entzugserfahrung der Tiere in der vorliegenden Arbeit bedingt ist, ist es

unwahrscheinlich, dass er eine Folge akuter Alkoholintoxikation darstellt, da auch hier zum Zeitpunkt der Hirnentnahme keine messbare Blutalkoholkonzentration vorlag (Daten nicht gezeigt). Weiterhin ist es sehr unwahrscheinlich, dass die Ergebnisse hier durch den *Restraint*, der unmittelbar vor der Dekapitation durchgeführt wurde, konfundiert sind, da die 15-minütige Zeitspanne der Stressexposition zu kurz ist, um Veränderungen auf der Proteinebene zu bewirken. Unabhängig von den genannten Unterschieden zwischen den Studien konnte durch die hier durchgeführte Untersuchung gezeigt werden, dass langfristiger freiwilliger Alkoholkonsum zu neuronalen Adaptationen in Form einer selektiven Hochregulation des NR2B im frontalen Cortex führte.

Neuere Ergebnisse aus Forschungen am Menschen, in denen bildgebende Verfahren, neuropsychologische Tests und weitere Techniken angewandt wurden, zeigten, dass besonders die Neurone des Frontallappens vulnerabel für die akuten und chronischen Wirkungen von Alkohol sind (siehe Übersichtsartikel Lyvers, 2000). Zudem wurde in Bindungsstudien mit Agonisten und Antagonisten verschiedener Glutamaterezeptoren auch in post-mortem Gewebe chronischer Alkoholiker ein leichter, aber selektiver Anstieg der Bindung am NMDA-Rezeptor im frontalen Cortex gezeigt (Freund & Anderson, 1996).

Es ist wahrscheinlich, dass die erhöhte Expression der NR2B-Untereinheit im frontalen Cortex, zumindest bei Nagern, eine zelluläre Adaptation an die anhaltende Unterdrückung der NMDA-Rezeptorfunktion durch den Alkohol darstellt. Diese Annahme wird durch zwei kürzlich erschienene Studien unterstützt, die einen Anstieg sowohl der mRNA als auch des Polypeptids des NR2B (nicht jedoch des NR2A) nach chronischer (fünftägiger) Exposition kortikaler Neurone von Mäusen mit den NMDA-Rezeptor Antagonisten AP5 bzw. CPP nachwiesen (Follesa & Ticku, 1996a,b).

Zusammenfassend zeigte sich bei langfristig freiwillig Alkohol konsumierenden Martinsrieder Wistar-Ratten, eventuell als direkte Folge einer Neuroadaptation an die dauerhafte inhibitorische Wirkung des Alkohols auf den NR, eine leichte, selektive

Hochregulation des NR2B im frontalen Cortex. Dies macht deutlich, dass die Tiere im 4-Flaschenmodell der freiwilligen oralen Alkoholselbstverabreichung ausreichende Mengen konsumierten, um eine nachweisbare neuroadaptive Anpassung an den Langzeit-Einfluss von Alkohol auf das zentrale Nervensystem zu entwickeln. Da die neuroadaptive Hochregulation des NR2B eine mögliche Ursache der Entwicklung von Entzugssymptomen sowie der hohen Rückfallwahrscheinlichkeit nach Absetzen des Alkohols ist, weisen die Ergebnisse der vorliegenden Studie zudem darauf hin, dass der NR2B ein möglicher Ansatzpunkt einer wirkungsvollen Behandlung von Alkoholikern sein könnte.

4. Angst und Alkoholkonsum

4.1 Einleitung

Schon vor über 2000 Jahren empfahl Hippokrates als Mittel gegen Ängstlichkeit eine Mischung aus Wein und Wasser (zitiert nach Baving & Olbrich, 1996). Der deutsche Neurologe Westphal, der als erster das Krankheitsbild der Agoraphobie (die Furcht, sich auf öffentlichen Plätzen aufzuhalten) beschrieb, nannte in seiner Arbeit von 1871 drei Mittel, diese Phobie zu lindern: einen vertrauten Begleiter, einen Gehstock und den Konsum von Alkohol (zitiert nach Wilson, 1988 und Baving & Olbrich, 1996). Seither wurde durch zahlreiche epidemiologische und klinische Studien eine Comorbidität zwischen Angsterkrankungen und Alkoholkonsum belegt (siehe Übersichtsartikel Weissmann, 1988; Kushner *et al.*, 1990; George *et al.*, 1990; Schuckit & Hesselbrock, 1994; Baving & Olbrich, 1996; Kushner *et al.*, 2000). Typischerweise wurde die Prävalenz von Angststörungen bei Patienten, die aufgrund von Alkoholproblemen in Behandlung waren, bzw. das Auftreten von Alkoholmissbrauch bei Patienten, die wegen Angststörungen behandelt wurden, untersucht. So wurden bei 16% bis 25% der Patienten mit Angststörungen Alkoholprobleme diagnostiziert (Winokur & Holemon, 1963; Woodruff *et al.*, 1972). Bei Patienten, die wegen Alkoholproblemen behandelt wurden, wiesen 23% bis 70% (Weiss & Rosenberg, 1985;

Mullaney & Trippett, 1979) Angststörungen auf. In beiden Gruppen von Patienten scheint ein Zusammenhang v.a. zwischen Agoraphobie sowie sozialer Phobie und Alkoholproblemen zu bestehen. So traten in beiden Patientengruppen Agoraphobie und Alkoholprobleme etwa doppelt so häufig zusammen auf, als nach der Prävalenz in der Gesamtbevölkerung zu erwarten wäre (Kushner *et al.*, 1990). Während aus der Gruppe der Patienten mit Angststörungen diejenigen, die an einer sozialen Phobie litten, etwa doppelt so oft Alkoholprobleme hatten als Individuen der Gesamtbevölkerung, wurde in der Gruppe der Alkoholpatienten sogar etwa neunmal häufiger ein Auftreten einer sozialen Phobie diagnostiziert, als es der Prävalenzrate in der Gesamtbevölkerung entspricht (Kushner *et al.*, 1990). Hinweise zur Klärung der Frage, ob eine kausale Beziehung zwischen Alkoholmissbrauch und Angststörungen vorliegt, kann die Untersuchung der zeitlichen Abfolge deren Auftretens geben. Die Ergebnisse früherer Studien wurden bei Kushner *et al.* (1990) zusammengefasst. Dabei ergab sich sowohl innerhalb als auch zwischen den verschiedenen Arten der Angsterkrankungen eine ziemliche Variationsbreite im Zeitpunkt des Auftretens der beiden Störungen bei Patienten, die sowohl an Angst- als auch an Alkoholproblemen litten. Allgemein ließ sich jedoch sagen, dass v.a. soziale und Agoraphobie dem Auftreten eines Alkoholproblems vorangingen, während die generalisierte Angststörung diesem zeitlich folgte. Für Panikstörungen ergab sich kein klarer Trend der zeitlichen Aufeinanderfolge von Angst- und Alkoholproblemen (Kushner *et al.*, 1990). Zwei Varianten der Ätiologie der Comorbidität von Angst- und Alkoholstörungen wurden hauptsächlich diskutiert: (1) das Vorhandensein einer Angststörung begünstigt sekundär das Auftreten der Alkoholprobleme und (2) Alkoholmissbrauch zieht die Entstehung von Angststörungen nach sich. Die erste Annahme geht davon aus, dass Alkohol in einer Art Selbstmedikation konsumiert wird, um Angstsymptome zu lindern (siehe unten). Dem zweiten Erklärungsversuch liegt die Beobachtung zugrunde, dass chronischer Alkoholkonsum Anpassungsprozesse im Zentralnervensystem (v.a. in glutamatergen, GABAergen und

noradrenergen Neuronen) induziert, die insbesondere im Alkoholentzug Angststörungen auslösen (siehe Übersichtsartikel Adinoff *et al.*, 1988; Emmett-Oglesby *et al.*, 1990). Diese beiden Erklärungsansätze zusammenfügend, schlagen Kushner *et al.* (2000) vor, dass eine Interaktion anxiolytischer und anxiogener Alkoholeffekte zur Entstehung der Comorbidität von Angststörungen und Alkoholproblemen führt. Danach wirkt Alkohol kurzfristig anxiolytisch, während er längerfristig zur Entstehung von Angstsymptomen beiträgt. Um einer entzugsinduzierten Angstsymptomatik nach einer Phase missbräuchlichen Alkoholkonsums vorzubeugen, bzw. um tatsächlich auftretende Angstzustände nach einer Verringerung des Alkoholkonsums zu lindern, wird wieder Alkohol getrunken. Da das jedoch wiederum langfristig die Alkoholprobleme verschlimmert, wird ein *circulus vitiosus* in Gang gehalten (Kushner *et al.*, 2000).

In der vorliegenden Studie sollte vorrangig die Hypothese geprüft werden, dass Alkohol Angst reduziert, und dass diese angstreduzierende Wirkung zum Alkoholkonsum motiviert. Diese Spannungs- oder Angstreduktionstheorie (*Tension Reduction*-Hypothese) wurde erstmals von Conger (1956) vorgestellt. Trotz einiger bestätigender Resultate aus klinischen Studien (Lipscomb *et al.*, 1980; Stockwell *et al.*, 1982; Kalodner *et al.*, 1989; Kushner *et al.*, 1994) ist die Validität der *Tension Reduction*-Hypothese stark umstritten (Cappell & Herman, 1972; Young *et al.*, 1990). Klinische Studien unterliegen manchen Einschränkungen. So bestehen häufig große Stichprobenunterschiede in Parametern wie z.B. Alter, Geschlecht, Motivation, soziales Umfeld, Dauer und Schweregrad der Erkrankung. Häufig sind klinische Studien retrospektiv, was die Interpretation der Ergebnisse oftmals schwierig macht. Zudem können Studien mit Patienten bzw. Probanden von Erwartungshaltungen, wie z.B. der Erwartung einer anxiolytischen Alkoholwirkung konfundiert sein (Young *et al.*, 1990; Himle *et al.*, 1999). Manche dieser Einschränkungen können durch tierexperimentelle Ansätze umgangen werden. Es wurden einige Tierexperimente zur *Tension Reduction*-Hypothese durchgeführt. In einer Studie von Spanagel *et al.* (1995) wurden Wistar-Ratten auf der

Elevated Plusmaze in ängstliche und weniger ängstliche Tiere selektiert und der Alkoholkonsum dieser Tiere im Heimkäfig gemessen. Es ergab sich eine positive Korrelation zwischen der Ängstlichkeit der Tiere und dem freiwilligen Alkoholkonsum. Dies weist auf eine Assoziation zwischen Emotionalität und Alkoholeinnahmeverhalten hin. Diese Annahme wird gestützt durch eine Studie von Möller *et al.* (1997a), in der eine bilaterale Läsion der zentralen Amygdala sowohl die experimentelle Ängstlichkeit als auch den freiwilligen Alkoholkonsum von Ratten verminderte. Eine weitere Möglichkeit zu untersuchen, ob Unterschiede in der Emotionalität Unterschiede im freiwilligen Alkoholkonsum zur Folge haben, ist die Bestimmung des Alkoholselbstverabreichungsverhaltens von Tieren, die selektiv auf Unterschiede in der angeborenen Ängstlichkeit gezüchtet wurden. Bis vor kurzem war bei Nagern nur eine solche Zucht beschrieben: die Maudsley *Reactive* und Maudsley *Non-reactive* Rattenlinien (Broadhurst, 1975). Diese Rattenlinien wurden selektiv auf maximale Unterschiede in der Defäkation im *Open Field*-Paradigma gezüchtet, ein Parameter, der als Maß der emotionalen Reaktivität angesehen wird. Untersuchungen, in denen der Alkoholkonsum zwischen den beiden Linien der Maudsley Ratten verglichen wurde, erbrachten keine eindeutigen Ergebnisse. Einige Studien zeigten einen erhöhten Alkoholkonsum der emotionaleren Maudsley *Reactive* Ratten (Brewster, 1969; Satinder, 1972; Drewek & Broadhurst, 1979; Adams *et al.*, 1991), andere Studien erbrachten das Gegenteil (Brewster, 1968; Overstreet *et al.*, 1993; Viglinskaya *et al.*, 1995).

In jüngerer Zeit wurden zwei Rattenlinien beschrieben, die selektiv auf maximale Unterschiede im Angst-bezogenen Verhalten auf der *Elevated Plusmaze* gezüchtet wurden: die HAB- (*high anxiety-related behaviour*) mit hoher, sowie die LAB- (*low anxiety-related behaviour*) mit niedriger Angstdisposition (Liebsch *et al.*, 1998a,b). Der Unterschied in der Emotionalität ist stabil in beiden Geschlechtern und wurde in weiteren Tests auf Angst-bezogenes Verhalten bestätigt (Henniger, 1998; Henniger *et al.*, 2000; Ohl *et al.*, 2001). Die HAB/LAB-Rattenlinien stellen daher eine wertvolle Möglichkeit dar, biologische Grundlagen

der Emotionalität, sowie Wirkweisen anxiolytischer Substanzen zu untersuchen (Liebsch *et al.*, 1998a,b; Landgraf *et al.*, 1999; siehe Übersichtsartikel Landgraf & Wigger, 2002).

Um den Einfluss angeborener Unterschiede in der Ängstlichkeit zu bestimmen, wurde der freiwillige Alkoholkonsum von HAB/LAB-Ratten im 4-Flaschenmodell der oralen Alkoholselbstverabreichung im Heimkäfig untersucht. Gemäß der oben beschriebenen Annahme, dass eine entscheidende Motivation zum Alkoholkonsum die Selbst-Medikation darstellt und der Alkohol aufgrund seiner anxiolytischen Wirkung eingenommen wird, wäre ein erhöhter Alkoholkonsum der ängstlicheren HAB- im Vergleich zu den weniger ängstlichen LAB-Ratten zu erwarten.

Der umgekehrte Weg, den Zusammenhang zwischen Emotionalität und Alkoholkonsum zu untersuchen, ist die Bestimmung des Angst-bezogenen Verhaltens von Tieren, die sich deutlich in ihrem Alkoholeinnahmeverhalten unterscheiden. Zwei Mausstämme, die sich erheblich in der Menge freiwillig konsumierten Alkoholkonsums unterscheiden, stellen die alkoholpräferierenden B6- und die den Alkohol eher meidenden D2-Mäuse dar (McClearn & Rodgers, 1959; Fuller, 1964; Schneider *et al.*, 1973; Belknap *et al.*, 1993; siehe Übersichtsartikel Phillips & Crabbe, 1991). Die Emotionalität dieser beiden Mausstämme wurde in der *Dark/Light-Box* untersucht. Ähnlich der *Elevated Plusmaze* stellt die *Dark/Light-Box* ein Testparadigma unkonditionierter Ängstlichkeit dar, in dem Tiere in eine Konfliktsituation zwischen Explorationsverhalten und der Aversion gegen exponierte Flächen gebracht werden (Crawley & Goodwin, 1980; Crawley, 1981). Als interne pharmakologische Validierung wurden neben den unbehandelt getesteten Tieren jeweils zwei Gruppen mitgeführt, die mit Vehikel bzw. dem anxiolytisch wirkenden Corticotropin Releasing Hormon Rezeptorsubtyp 1 (CRHR1)-Antagonisten R121919 (Keck *et al.*, 2001) behandelt wurden.

Gemäß der *Tension Reduction*-Hypothese wäre, verglichen mit den alkoholmeidenden D2-Mäusen, eine erhöhte Ängstlichkeit der alkoholpräferierenden B6-Tiere zu erwarten.

Verschiedene Gründe wurden für den deutlichen Unterschied im Alkoholkonsumverhalten von B6- und D2-Mäusen diskutiert, u.a. eine dopaminerge Unterfunktion in Neuronen des Belohnungssystems der B6-Mäuse, die auf eine verringerte Belohnungswirkung des Alkohols hinweist (Ng *et al.*, 1994; George *et al.*, 1995; Brodie & Appel, 2000), und eine Geschmacksaversion gegenüber Alkohol bei D2-Mäusen (Grahame & Cunningham, 1997). Als ein weiterer möglicher Grund wurde in der vorliegenden Arbeit der Alkoholmetabolismus zwischen den Tieren beider Stämme verglichen.

Alkoholdeprivation führt bei alkoholabhängigen Patienten zu einem negativ-affektiven Zustand. Dieser ist gekennzeichnet durch Dysphorie und das Erleben von Angstsymptomen (Linnoila, 1989; Koob, 1996). Klinische Studien zeigen, dass entzugsinduzierte Angstsymptome und Angsterkrankungen die Therapieprognosen von Alkoholikern verschlechtern und einen Rückfall auslösen können (George *et al.*, 1990; LaBounty *et al.*, 1992; Tomasson & Vaglum, 1996). Erhöhtes Angst-bezogenes Verhalten nach Alkoholdeprivation wurde wiederholt auch im Tiermodell gezeigt (File *et al.*, 1989; Baldwin *et al.*, 1991; Rassnick *et al.*, 1993; siehe auch Becker, 2000 bezüglich eines Übersichtsartikels über Tiermodelle des Alkoholentzugs). Noch vier Wochen nach dem Entzug des Alkohols verhielten sich männliche Sprague-Dawley Ratten, die zuvor über eine Flüssigdiät forciert Alkohol konsumierten, im Vergleich zur Kontrollgruppe ängstlicher auf der *Elevated Plusmaze* (Rasmussen *et al.*, 2001). Auch im in der vorliegenden Arbeit verwendeten 4-Flaschenmodell der freiwilligen Alkoholaufnahme bei Ratten führte Alkoholdeprivation zu einer erhöhten Ängstlichkeit auf der *Elevated Plusmaze*. Dieser Effekt war bei Tieren mit wiederholter Deprivationserfahrung gegenüber Ratten, denen der Alkohol zum ersten Mal entzogen wurde, noch erhöht (Hölter *et al.*, 1998).

Unklar ist, ob das rückfallartige Trinken während des Alkoholdeprivationseffekts (ADE) durch eine alkoholdeprivationsinduzierte Ängstlichkeit bedingt bzw. beeinflusst wird. Ratten,

die in einem operanten Diskriminationsparadigma trainiert wurden, die anxiogene Substanz Pentylenetetrazol (PTZ) von Saline zu unterscheiden, drückten nach Alkoholentzug den mit der Gabe von PTZ assoziierten Hebel. Die Tiere verhielten sich somit nach Alkoholentzug wie nach der Gabe der angstausslösenden Substanz PTZ. Dies weist darauf hin, dass der Alkoholentzug angststeigernd wirkte. Das Hebeldruckverhalten auf den mit PTZ assoziierten Hebel konnte durch Applikation von Alkohol oder des Anxiolytikums Diazepam unterbunden werden (Lal *et al.*, 1988). Dies zeigt, dass Alkohol während des Alkoholentzugs bei Ratten eine anxiolytische Wirkung besitzt. Alkohol könnte daher in einer Art Selbstmedikation konsumiert werden, um entzugsinduzierte Ängstlichkeit zu lösen und dies könnte zur Entstehung des ADE beitragen. Ängstlichere Individuen müssten demnach stärker von einer anxiolytischen Wirkung profitieren als weniger ängstliche. Bei weiblichen HAB/LAB-Ratten hatte die akute Gabe von Alkohol nur bei den ängstlicheren HAB, nicht jedoch bei den LAB-Ratten eine Verringerung Angst-bezogenen Verhaltens zur Folge (Henniger, 1998; Henniger *et al.*, 2002). Zudem wurde beschrieben, dass aus einer heterogenen Gruppe von Wistar-Ratten nur diejenigen eine durch Alkohol induzierte konditionierte Platzpräferenz zeigten, die zuvor auf der *Elevated Plusmaze* als ‚ängstlich‘ charakterisiert wurden, während ‚normale‘ und ‚wenig ängstliche‘ Tiere diese Platzpräferenz nicht zeigten (Blatt & Takahashi, 1999). Dies weist darauf hin, dass ängstliche Individuen sensibler für die belohnende Wirkung von Alkohol sind. Auch dies ließe sich durch eine stärkere anxiolytische Alkoholwirkung bei ängstlicheren Individuen erklären.

Der Einfluss unterschiedlicher basaler Ängstlichkeit auf den ADE wurde bei HAB/LAB-Ratten bestimmt. Sofern das Erfahren einer anxiolytischen Alkoholwirkung eine entscheidende Motivation für den erhöhten Alkoholkonsum während des ADE darstellt, wäre eventuell ein höherer ADE bei den ängstlicheren HAB-Ratten zu erwarten. In einem weiteren Experiment wurde der Einfluss des anxiolytisch wirkenden Benzodiazepins Diazepam auf den ADE von Langzeit-alkoholerfahrenen Wistar-Ratten untersucht. Hier würde man, wenn obige

Gedankengänge zuträfen, einen erniedrigten ADE bei den Diazepam-behandelten Ratten erwarten. Um mögliche unspezifische Effekte des Diazepam zu ermitteln, wurde zusätzlich der basale Alkoholkonsum von nicht-deprivierten Langzeit-alkoholerfahrenen Wistar-Ratten nach Gabe von Diazepam ermittelt.

4.2 Versuchsdurchführung

Der freiwillige Alkoholkonsum von HAB/LAB-Ratten (n=8 pro Linie) wurde im 4-Flaschenmodell (siehe Kapitel 2.3.1) untersucht. Zu Beginn der Experimente waren die Tiere 12 Wochen alt und wogen 300-400 g. Die Bestimmung des initialen Alkoholkonsums erfolgte durch tägliche Messungen an den ersten 11 Tagen nachdem den Tieren Zugang zu Wasser und Alkohol gewährt wurde. Danach wurde den Tieren der Alkohol für zwei Wochen entzogen. Nach Rückgabe der Flaschen wurde für weitere drei Tage gemessen, um das Auftreten eines ADE zu untersuchen.

Die basale Ängstlichkeit von D2- und B6-Mäusen, sowie der Einfluss des CRHR1-Antagonisten R121919 auf die basale Ängstlichkeit wurde in der *Dark/Light*-Box (siehe Kapitel 2.2.3) untersucht. Die B6- und D2-Mäuse (13 Wochen; 20-28 g) wurden in jeweils drei Gruppen eingeteilt (n=8-10 pro Gruppe). Eine Gruppe wurde unbehandelt getestet, das Verhalten der anderen beiden Gruppen wurde 30 Minuten nach Gabe von Wasser bzw. R121919 (1 mg/kg; i.g.) untersucht. Daraufhin wurde den Tieren wie in Kapitel 2.3.3 beschrieben drei Wasserflaschen gegeben, die nach einer Woche durch eine Wasser und zwei Alkoholflaschen (5% und 10%) ersetzt wurden. Für die Bestimmung des initialen Alkoholkonsums wurden täglich die Flaschen gewogen und Alkoholkonsum und -präferenz bestimmt.

Der Alkoholmetabolismus wurde bei je sechs Alkohol-naiven D2- und B6-Mäusen (18 Wochen; 24-32 g) untersucht. Um eine durch unterschiedliche Magenfülle bedingte Varianz

der Alkoholabsorption zu vermeiden, wurde das Futter von 12 bis 19 Uhr aus den Käfigen der Tiere entfernt. An dieses Procedere wurden die Mäuse über fünf Tage hinweg habituiert. Am fünften Tag ab 19 Uhr, dem Beginn der Aktivitätsphase der Tiere, wurde diesen über eine Schlundsonde 30%-iger Alkohol entsprechend einer Menge von 4 g reinem Alkohol pro kg Körpergewicht appliziert. Jeweils 15, 30, 60, 180 und 360 Minuten nach der Alkoholgabe wurde aus der Schwanzspitze eine geringe Menge Blut entnommen. Das Blut wurde in EDTA-beschichteten Röhrchen gesammelt und bis zur Bestimmung der Blutalkoholwerte (siehe Kap. 2.5.3) bei -20 °C aufbewahrt.

Der Einfluss von Diazepam auf den freiwilligen Alkoholkonsum wurde an Wistar-Ratten untersucht, die zum Zeitpunkt der Experimente mindestens fünf Monate Alkoholerfahrung im 4-Flaschenmodell der oralen Alkoholselbstverabreichung hatten. Nachdem einer Gruppe von Ratten (6 Monate; 410-475 g) die Alkoholflaschen für zwei Wochen entzogen worden waren, wurden diese in drei Subgruppen eingeteilt (n=8 pro Subgruppe). Diese wurden 30 Minuten nach einer akuten Injektion von Diazepam (0, 1 und 2 mg/kg) auf der *Elevated Plusmaze* (siehe Kapitel 2.2.2) getestet.

Einer weiteren Gruppe von Ratten (6 Monate; 435-525 g) wurde der Alkohol für zwei Wochen entzogen und der Einfluss wiederholter Diazepam-Applikation auf das Auftreten eines ADE untersucht. Dabei wurden drei Subgruppen gebildet (0, 1 und 2 mg/kg; n=9-10 pro Subgruppe). Die Diazepam-Gabe erfolgte viermal mit einem Intervall von 12 Stunden; die erste Injektion erfolgte um 6 Uhr, 30 Minuten vor Rückgabe der Alkoholflaschen.

In einer dritten Gruppe von Ratten (12 Monate; 480-610 g; n=22) wurde der Einfluss einer akuten Diazepam-Injektion auf das Hebeldruckverhalten im in Kapitel 2.3.2 beschriebenen Modell der operanten Alkoholselbstverabreichung untersucht. Über vier Wochen hinweg bekam jede Ratte jeweils 30 Minuten vor ihrer wöchentlichen operanten Sitzung in einem balancierten Design 0, 0,5, 1 und 2 mg/kg Diazepam appliziert.

Der Einfluss wiederholter Diazepam-Behandlung auf den basalen, nicht deprivierten Alkoholkonsum im Heimkäfig wurde in einer vierten Gruppe (7 Monate; 420-510 g) untersucht. Dabei wurden zwei Subgruppen gebildet (je n=8). Einer Subgruppe wurde viermal Vehikel, der zweiten Subgruppe viermal Diazepam (2 mg/kg) injiziert. Der Abstand der Applikationen betrug jeweils 12 Stunden; injiziert wurde um 6 Uhr und 18 Uhr.

4.3 Ergebnisse

4.3.1 Basaler Alkoholkonsum

4.3.1.1 HAB/LAB-Ratten

Initialer Alkoholkonsum

Der initiale freiwillige Alkoholkonsum von männlichen HAB/LAB-Ratten ist in Abb. 2 dargestellt. LAB-Tiere konsumierten im Vergleich zu HAB-Ratten tendenziell mehr Alkohol. Eine Zweifaktoren-ANOVA (Linie x Tage) erbrachte jedoch weder im Alkoholkonsum noch in der Alkoholpräferenz einen signifikanten Unterschied im Faktor Linie.

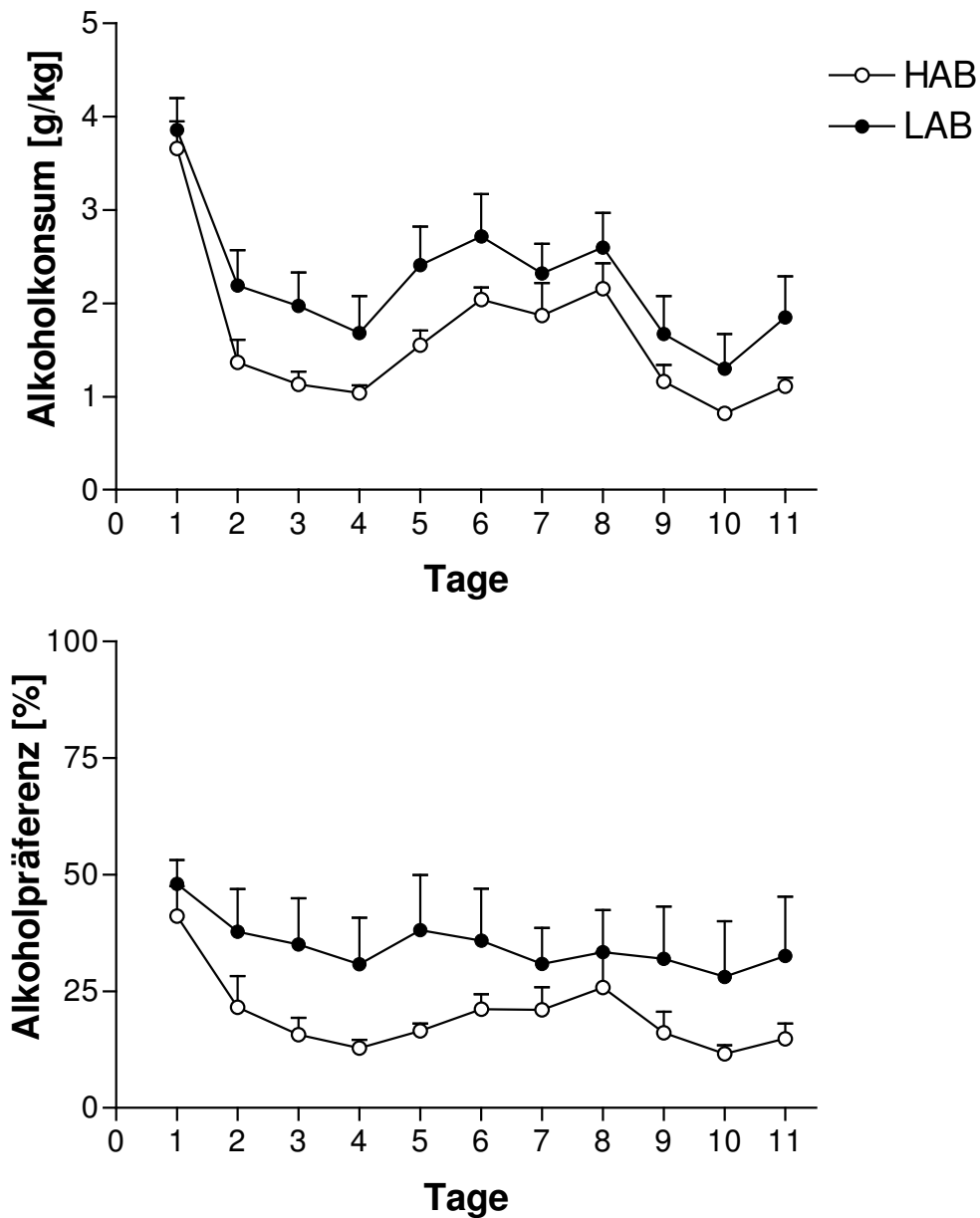


Abb. 2: Initialer Alkoholkonsum und Alkoholpräferenz von HAB/LAB-Ratten. Dargestellt sind Mittelwerte + Standardfehler. HAB = *high anxiety-related behaviour* (hohe Angstdisposition), LAB = *low anxiety-related behaviour* (niedrige Angstdisposition). n=8 pro Gruppe. Die beiden Linien unterschieden sich weder im Alkoholkonsum noch in der Alkoholpräferenz signifikant voneinander (ANOVA).

4.3.1.2 B6/D2-Mäuse

Angst-bezogenes Verhalten in der Dark/Light-Box

Die basale Emotionalität von B6- und D2-Mäusen in der *Dark/Light-Box*, sowie der Einfluss von R121919 auf Angst-bezogenes Verhalten sind in Abb. 3 dargestellt. Die unbehandelten

D2-Mäuse zeigten im Vergleich zu den unbehandelten B6-Tieren ein signifikant höheres Angst-bezogenes Verhalten: sie betraten das helle Kompartiment seltener ($t_{14}=7,3$; $p<0,001$) und verbrachten weniger Zeit darin ($t_{14}=3,9$; $p<0,01$); zudem war die Latenz bis zum ersten Eintritt in das helle Kompartiment deutlich länger ($t_{14}=3,8$; $p<0,01$). D2- zeigten im Vergleich zu B6-Mäusen eine signifikant niedrigere lokomotorische Aktivität, gemessen an der Anzahl der Eintritte in das dunkle Kompartiment ($t_{14}=2,6$; $p<0,05$). In einem separat durchgeführten Test auf lokomotorische Unterschiede im *Open Field*-Paradigma unterschieden sich B6- und D2-Mäuse jedoch nicht signifikant voneinander (Daten nicht gezeigt).

Für beide Stämme getrennt wurde mittels Einfaktoren-ANOVA (Faktor Behandlung) der Einfluss der Gabe von R121919 bzw. Vehikel auf das Verhalten in der *Dark/Light*-Box untersucht. In keinem der gemessenen Parameter gab es Unterschiede zwischen den drei Behandlungsgruppen der B6-Mäuse. Dagegen wurden bei den D2-Tieren signifikante Unterschiede deutlich. Die Gruppen unterschieden sich in der Anzahl der Eintritte in das helle Kompartiment ($F_{2,21}=4,5$; $p<0,05$), der darin verbrachten Zeit ($F_{2,21}=4,52$; $p<0,05$), sowie in der Latenz bis zum ersten Eintritt in das helle Kompartiment ($F_{2,21}=3,7$; $p<0,05$). Auch in der Anzahl der Eintritte in das dunkle Kompartiment zeigten sich signifikante Unterschiede ($F_{2,21}=4,0$; $p<0,05$). Die Lokalisation der Unterschiede durch *post hoc*-Analyse zeigte, dass in keinem der Parameter Unterschiede zwischen der unbehandelten und der Vehikelgruppe auftraten. Jedoch zeigten die mit R121919 behandelten Tiere signifikant mehr Eintritte – sowie eine kürzere Latenz bis zum ersten Eintritt – in das helle Kompartiment und verbrachten mehr Zeit darin als die basale und die Vehikelgruppe. Die R121919-behandelten D2-Mäuse hatten zudem eine höhere Anzahl der Eintritte in das dunkle Kompartiment als die basale, nicht jedoch die Vehikelgruppe.

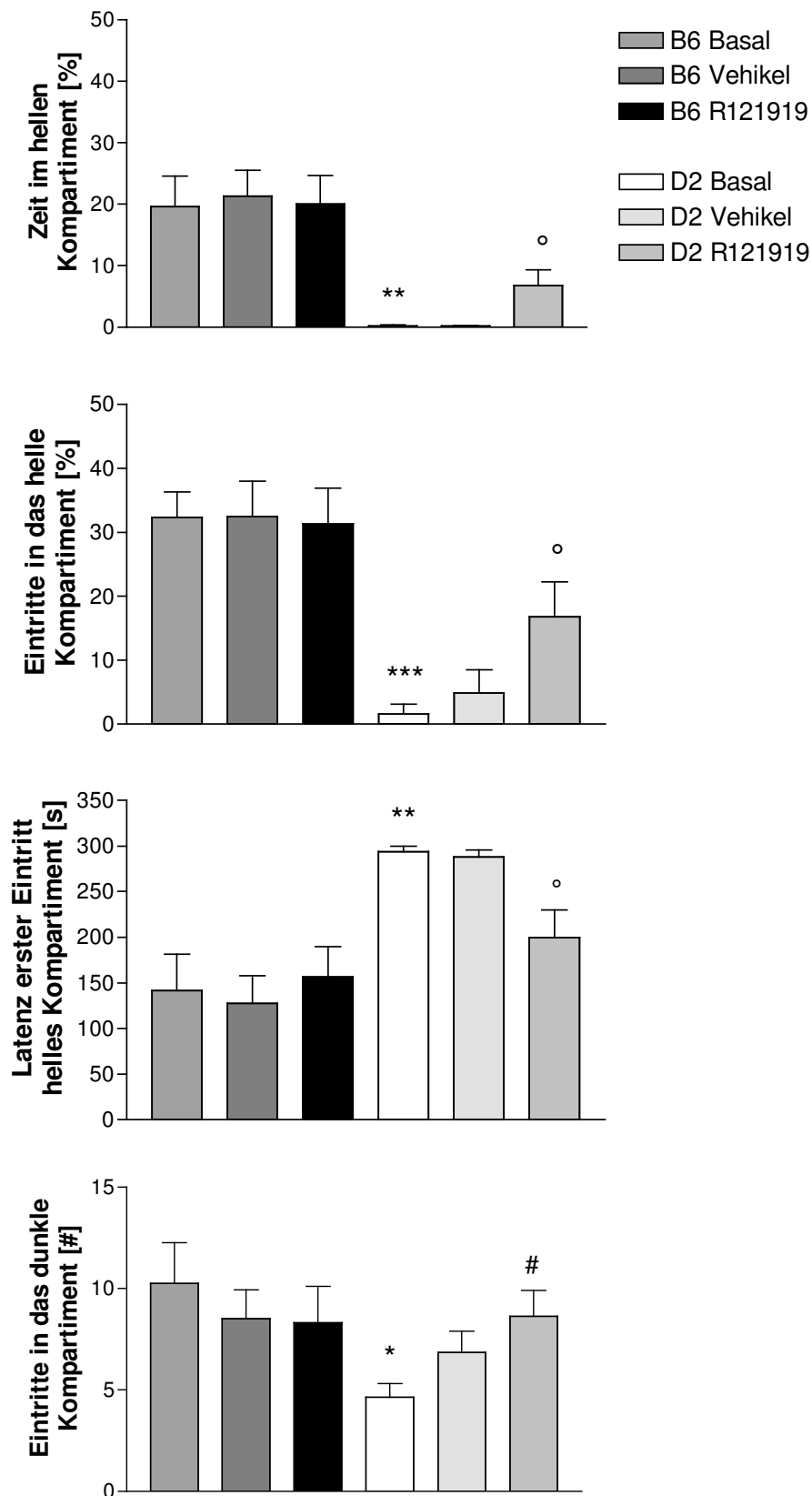


Abb. 3: Verhaltensparameter von C57BL/6JOLA^{Hsd} (B6) und DBA/2OLA^{Hsd} (D2) Mäusen in der *Dark/Light*-Box, unbehandelt (Basal) bzw. 30 min nach intra-gastraler Gabe von Vehikel oder R121919 (1 mg/kg). Dargestellt sind Mittelwerte + Standardfehler. n=8-10 pro Gruppe. * p<0,05, ** p<0,01, *** p<0,001 signifikant

gegenüber B6 Basal (Student's t-Test); ° $p < 0,05$ signifikant gegenüber D2 Basal und D2 Vehikel (Newman-Keuls-Test); # $p < 0,05$ signifikant gegenüber D2 Basal (Newman-Keuls-Test).

Initialer Alkoholkonsum

Die ersten sieben Tage der Alkoholexposition der B6- und D2-Mäuse ist in Abb. 4 dargestellt. Eine Zweifaktoren-ANOVA (Stamm x Tage) brachte höchstsignifikante Unterschiede im initialen Alkoholkonsum der zuvor im *Dark/Light-Box* Experiment unbehandelten Basalgruppen hervor: Neben einem deutlich höherem Alkoholkonsum (Faktor Stamm: $F_{1,14}=69,2$; $p < 0,0001$) zeigten die B6-Tiere auch eine klar höhere Alkoholpräferenz (Faktor Stamm: $F_{1,14}=251,6$; $p < 0,0001$). Der Einfluss der Vehikel- bzw. R121919 Behandlung im vorigen *Dark/Light-Box* Experiment wurde für beide Stämme einzeln durch Einfaktoren-ANOVA (Faktor Behandlung) ermittelt. Sowohl im Alkoholkonsum, als auch in der Alkoholpräferenz gab es in keinem der beiden Stämme signifikante Unterschiede zwischen den Behandlungsgruppen.

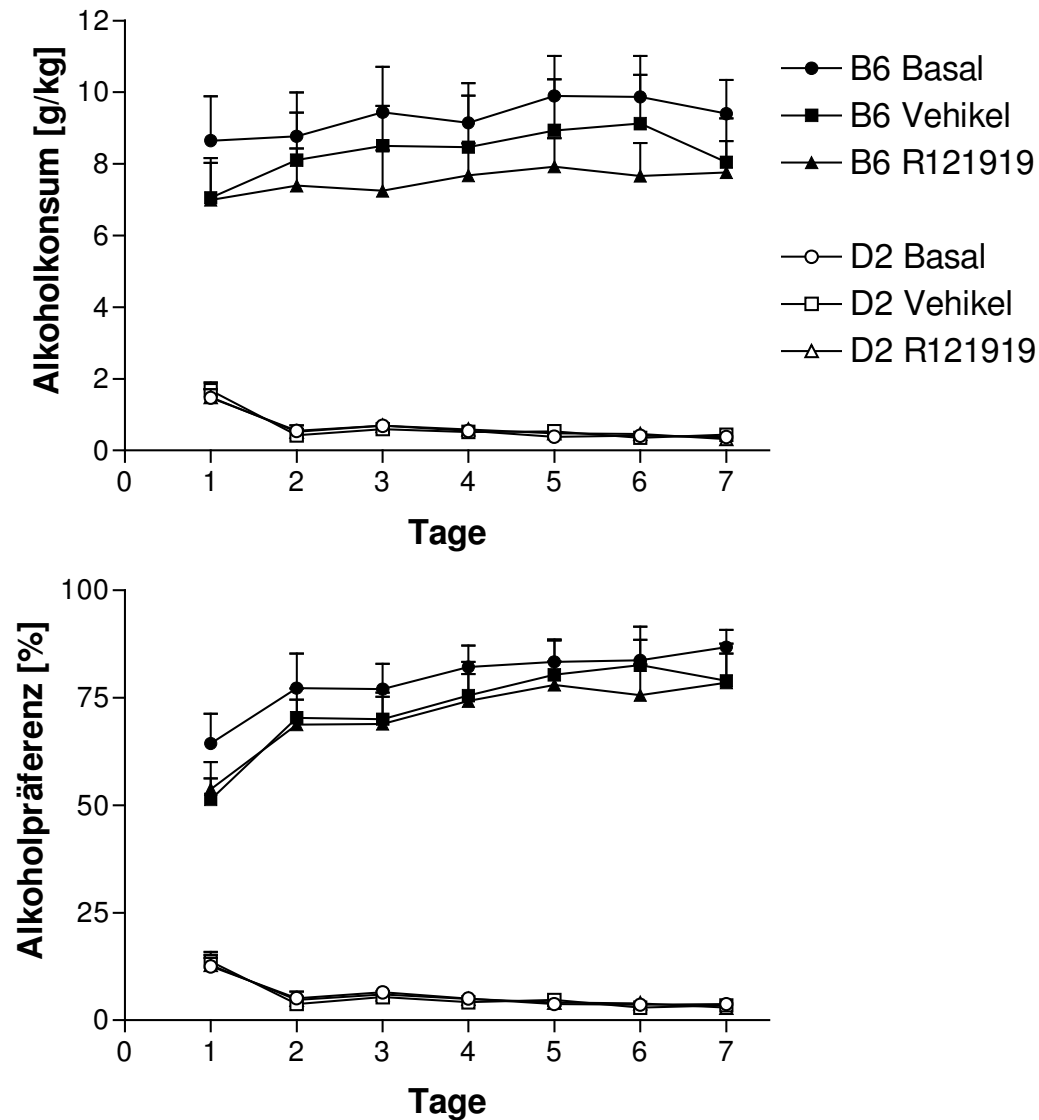


Abb. 4: Initialer Alkoholkonsum und Alkoholpräferenz von C57BL/6J OlaHsd (B6) und DBA/2 OlaHsd (D2) Mäusen. Die Tiere waren während der vorherigen Untersuchung des Angst-bezogenen Verhaltens in der *Dark/Light-Box* unbehandelt (Basal) bzw. bekamen eine intragastrale Applikation von Vehikel oder R121919 (1 mg/kg). Dargestellt sind Mittelwerte + Standardfehler. $n=8-10$ pro Gruppe. Sowohl im Alkoholkonsum als auch in der Alkoholpräferenz zeigte sich ein hochsignifikanter Unterschied zwischen den „Basal“-Gruppen beider Stämme ($p<0,0001$); die Behandlung mit Vehikel bzw. R121919 im zuvor durchgeführten *Dark/Light-Box* Experiment hatte keinen Einfluss (ANOVA).

Alkoholmetabolismus

Die Blutalkoholkonzentrationen von B6- und D2-Mäusen zu verschiedenen Zeitpunkten nach intragastraler Alkoholapplikation wurden mittels Zweifaktoren-ANOVA (Stamm x

Zeitpunkt) verglichen (Abb. 5). Die Blutalkoholwerte der D2-Mäuse waren signifikant niedriger als die der B6-Mäuse (Faktor Stamm: $F_{1,10}=7,7$; $p<0,05$). Die Interaktion der beiden Faktoren Stamm und Zeitpunkt verfehlte knapp das Signifikanzniveau ($F_{4,40}=2,6$; $p=0,053$).

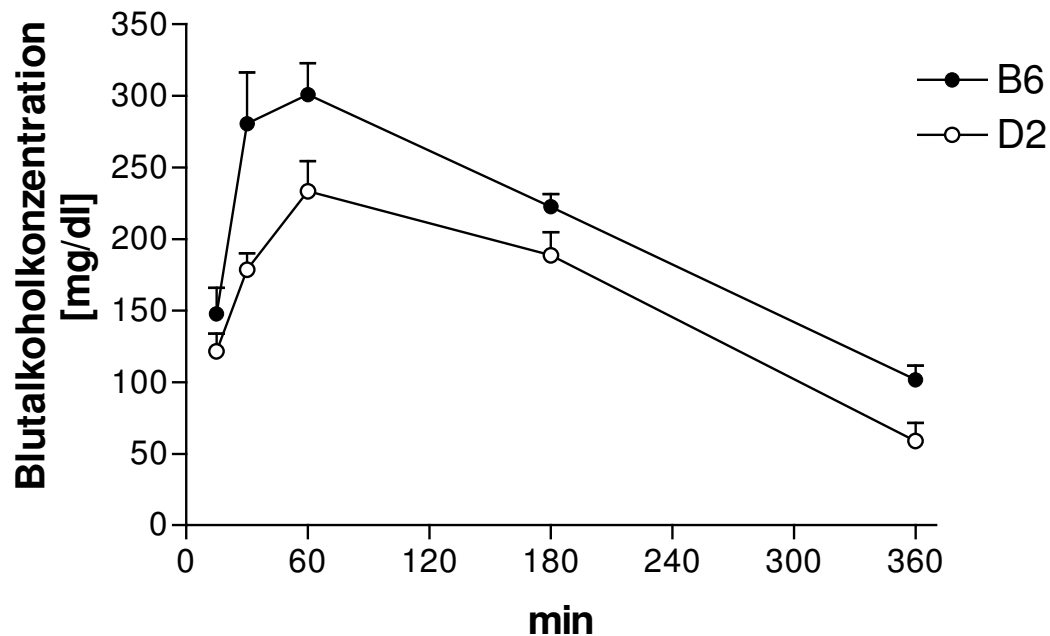


Abb. 5: Blutalkoholkonzentrationen von C57BL/6J OlaHsd (B6) und DBA/2 OlaHsd (D2) Mäusen, zu verschiedenen Zeitpunkten nach intra gastraler Gabe von Alkohol (4 g/kg). Dargestellt sind Mittelwerte + Standardfehler. $n=6$ pro Gruppe. Die Blutalkoholwerte der D2- waren signifikant niedriger als die der B6-Mäuse ($p<0,05$); die Interaktion der beiden Faktoren Stamm und Zeitpunkt verfehlte knapp das Signifikanzniveau ($p=0,053$; ANOVA).

4.3.1.3 Wistar-Ratten

Einfluss von Diazepam auf das Angst-bezogene Verhalten auf der Elevated Plusmaze

Der Einfluss von Diazepam auf das Angst-bezogene Verhalten auf der *Elevated Plusmaze* ist in Abb. 6 dargestellt. Das Experiment wurde mit acht Tieren pro Gruppe durchgeführt. Da jedoch während des Tests jeweils zwei Tiere aus der Vehikel- und der mit 1 mg/kg Diazepam behandelten Gruppe sowie drei Tiere, die mit 2 mg/kg Diazepam behandelt wurden, von der *Elevated Plusmaze* fielen, beziehen sich die folgenden Berechnungen auf Gruppengrößen von 5-6 Individuen. Eine Einfaktoren-ANOVA (Faktor Behandlung) zeigte signifikante

Unterschiede in den Parametern ‚Prozent Zeit auf den offenen Armen‘ ($F_{2,16}=4,8$; $p<0,05$) und ‚vollständige Eintritte in die offenen Arme‘ ($F_{2,16}=7,2$; $p<0,01$). *Post hoc*-Analysen ergaben, dass beide mit Diazepam behandelten Gruppen im Vergleich zur Vehikelgruppe mehr Zeit auf den offenen Armen verbrachten, bzw. mehr vollständige Eintritte in die offenen Arme zeigten. In den Parametern „Prozent Eintritte in die offenen Arme“ sowie „Latenz bis zum ersten Eintritt in einen offenen Arm“ wurde die Signifikanzgrenze knapp verfehlt ($F_{2,16}=3,2$; $p=0,07$, bzw. $F_{2,16}=3,3$; $p=0,07$). Die drei Gruppen unterschieden sich nicht in der Lokomotion, gemessen an der Anzahl der Eintritte in die geschlossenen Arme.

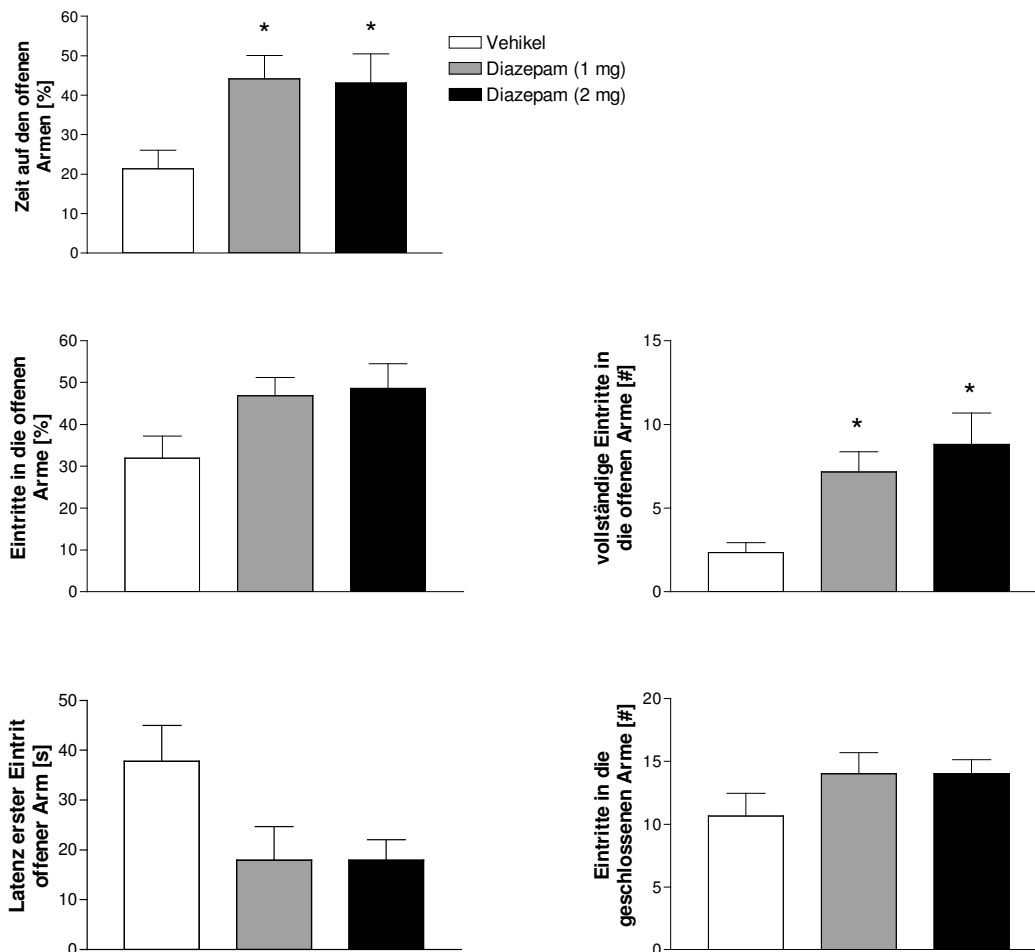


Abb. 6: Verhaltensparameter von Martinsrieder Wistar-Ratten auf der *Elevated Plusmaze*, 30 min nach intraperitonealer Gabe von Vehikel oder Diazepam (1 bzw. 2 mg/kg). Dargestellt sind Mittelwerte + Standardfehler. $n=5-6$ pro Gruppe. * $p<0,05$ signifikant gegenüber der Vehikelgruppe (Newman-Keuls-Test).

Einfluss von Diazepam auf den freiwilligen Alkoholkonsum

Die wiederholte Gabe von Diazepam (2 mg/kg) erbrachte im Vergleich zur vehikelbehandelten Kontrollgruppe keine Unterschiede im Alkoholkonsum oder der Alkoholpräferenz (Abb. 7).

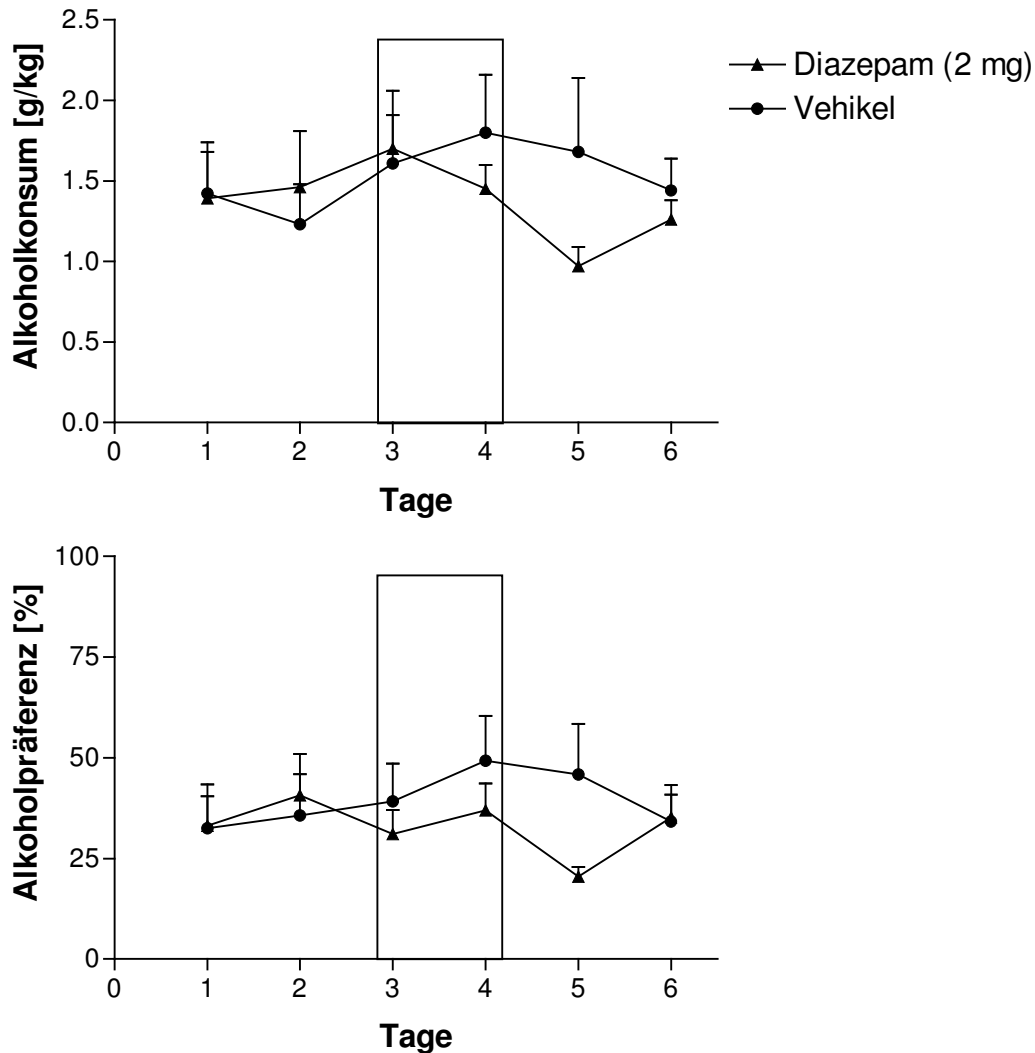


Abb. 7: Alkoholkonsum und Alkoholpräferenz Langzeit-alkoholerfahrener Martinsrieder Wistar-Ratten nach wiederholter intraperitonealer Gabe von Vehikel bzw. Diazepam (2 mg/kg). Die Tiere bekamen vier Behandlungen im Abstand von 12 Stunden (erste Injektion um 6 Uhr). Die Messpunkte, die 24 und 48 Stunden nach der ersten Injektion erhoben wurden, sind hervorgehoben. Dargestellt sind Mittelwerte + Standardfehler. $n=8-10$ pro Gruppe. Diazepam hatte keinen signifikanten Einfluss auf Alkoholkonsum und Alkoholpräferenz (ANOVA).

4.3.2 Rückfallartiger Alkoholkonsum

4.3.2.1 HAB/LAB-Ratten

ADE im Heimkäfig

Der Alkoholkonsum im Heimkäfig drei Tage vor und drei Tage nach der 14-tägigen Alkoholdeprivation wurde mittels Dreifaktoren-ANOVA (Stamm x ADE x Tage) analysiert (Abb. 8). Die Deprivation hatte signifikant erhöhten Alkoholkonsum und erhöhte Alkoholpräferenz zur Folge (Faktor ADE: $F_{1,14}=7,3$; $p<0,05$ bzw. $F_{1,14}=5,4$; $p<0,05$). Lokalisation der Unterschiede durch *post hoc*-Analyse zeigte, dass nur LAB, nicht aber HAB-Ratten nach der Deprivation einen signifikant erhöhten Alkoholkonsum sowie eine signifikant erhöhte Alkoholpräferenz aufwiesen als an den drei Tagen zuvor.

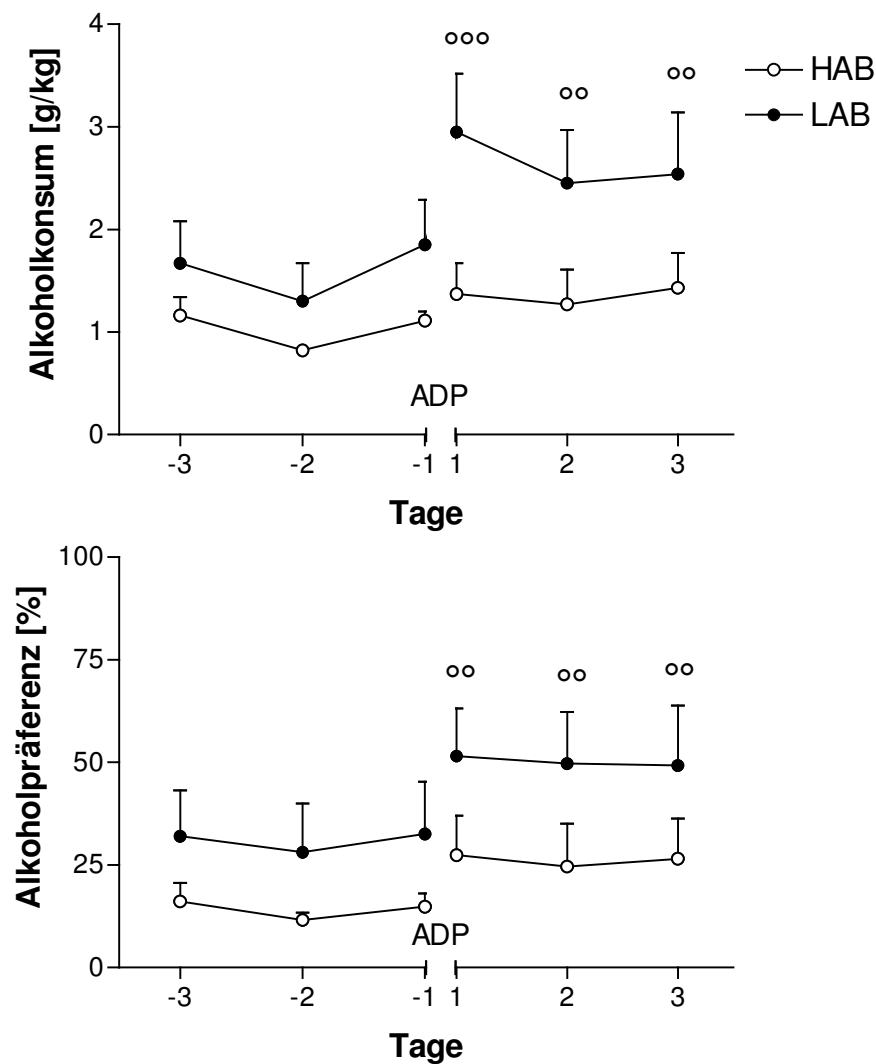


Abb. 8: Alkoholkonsum und Alkoholpräferenz von HAB/LAB-Ratten drei Tage vor und drei Tage nach einer 14-tägigen Alkoholdeprivationsphase (ADP). Dargestellt sind Mittelwerte + Standardfehler. HAB = *high anxiety-related behaviour* (hohe Angstdisposition), LAB = *low anxiety-related behaviour* (niedrige Angstdisposition). n=8 pro Gruppe. °° p<0,01, °°° p<0,001 im intraindividuellen Vergleich signifikant gegenüber allen drei Tagen vor der ADP (Newman-Keuls-Test).

4.3.2.2 Wistar-Ratten

Einfluss von Diazepam auf den ADE im Heimkäfig

Der Einfluss von Diazepam auf den ADE im 4-Flaschenmodell wurde mit einer Dreifaktoren-ANOVA (Behandlung x ADE x Tage) analysiert (siehe Abb. 9). Die Alkoholdeprivation führte zu einer signifikanten Erhöhung des Alkoholkonsums (Faktor ADE: $F_{1,22}=38,1$; $p<0,001$) und der Alkoholpräferenz (Faktor ADE: $F_{1,22}=11,3$; $p<0,01$). Durch wiederholte Diazepam-Gabe wurde der Alkoholkonsum nach der Deprivation verringert (Interaktion Behandlung x ADE: $F_{2,22}=6,6$; $p<0,01$). Eine *post hoc*-Analyse ergab, dass dieser Effekt dosisabhängig war. In der Alkoholpräferenz ergab sich keine signifikante Interaktion zwischen den Faktoren Behandlung und ADE.

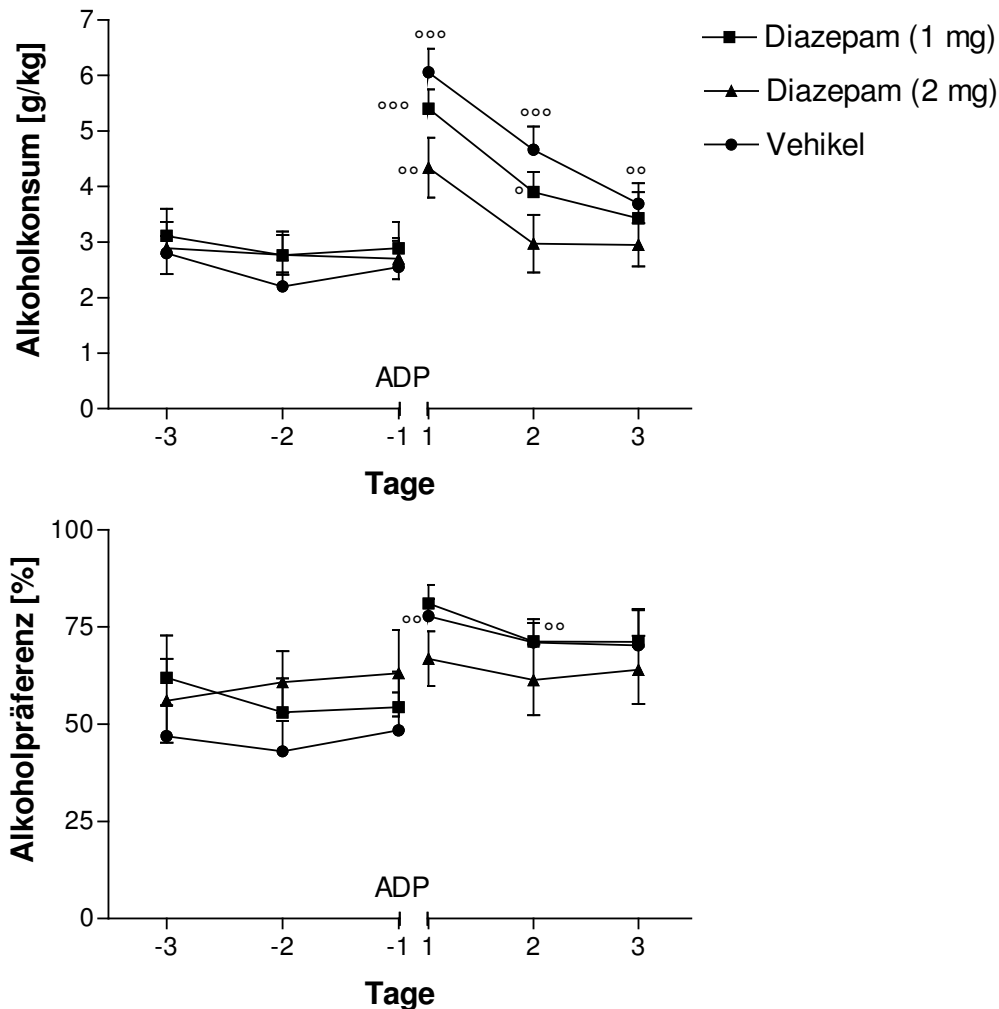


Abb. 9: Alkoholkonsum und Alkoholpräferenz Langzeit-alkoholerfahrener Martinsrieder Wistar-Ratten drei Tage vor und drei Tage nach einer 14-tägigen Alkoholdeprivationsphase (ADP). Die Tiere bekamen vier intraperitoneale Behandlungen mit Vehikel oder Diazepam (1 bzw. 2 mg/kg) im Abstand von 12 Stunden; die erste Behandlung erfolgte um 6 Uhr, 30 min vor Rückgabe der Alkoholflaschen. Dargestellt sind Mittelwerte + Standardfehler. n=9-10 pro Gruppe. ° p<0,05, °° p<0,01, °°° p<0,001 im intraindividuellen Vergleich signifikant gegenüber allen drei Tagen vor der ADP (Newman-Keuls-Test).

Einfluss von Diazepam auf den ADE unter operanten Bedingungen

Zweifaktoren-ANOVA (Behandlung x Intervalle) erbrachte weder in der ersten Stunde noch in der gesamten 23-stündigen operanten Sitzung signifikante Unterschiede im Hebeldruckverhalten für Wasser bzw. Alkohol, d.h. es war kein Einfluss der Diazepambehandlung auf den ADE nachzuweisen (Abb. 10). Dies spiegelt sich auch in dem

Befund wider, dass sich die Behandlungsgruppen weder in Alkoholkonsum und -präferenz noch in der Gesamthebeldruckaktivität während der operanten Sitzung unterschieden (Abb. 11).

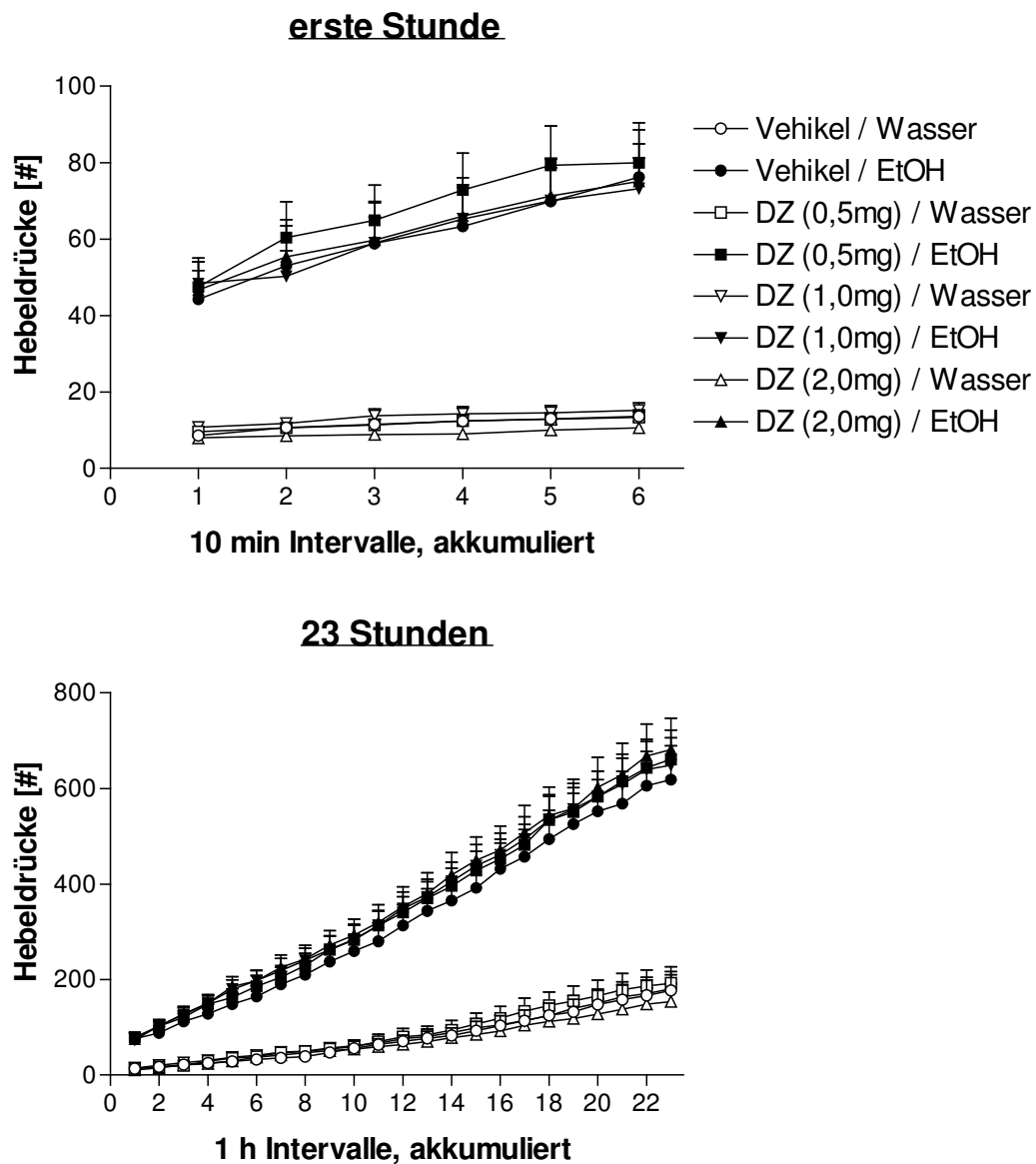


Abb. 10: Hebeldruckverhalten von Langzeit-alkoholerfahrenen Martinsrieder Wistar-Ratten für den Wasserhebel (Wasser) und den Alkoholhebel (EtOH) in operanten Boxen, 30 min nach einmaliger intraperitonealer Behandlung mit Vehikel oder Diazepam (DZ; 0,5, 1 bzw. 2 mg/kg). Dargestellt sind Mittelwerte + Standardfehler der akkumulierten Anzahl der Hebeldrücke in der ersten Stunde sowie während der gesamten 23 Stunden der Boxensitzung. $n=22$. Die Diazepam-Behandlung hatte weder während der ersten Stunde, noch während der gesamten Boxensitzung einen signifikanten Einfluss auf das Hebeldruckverhalten für Wasser bzw. Alkohol (ANOVA).

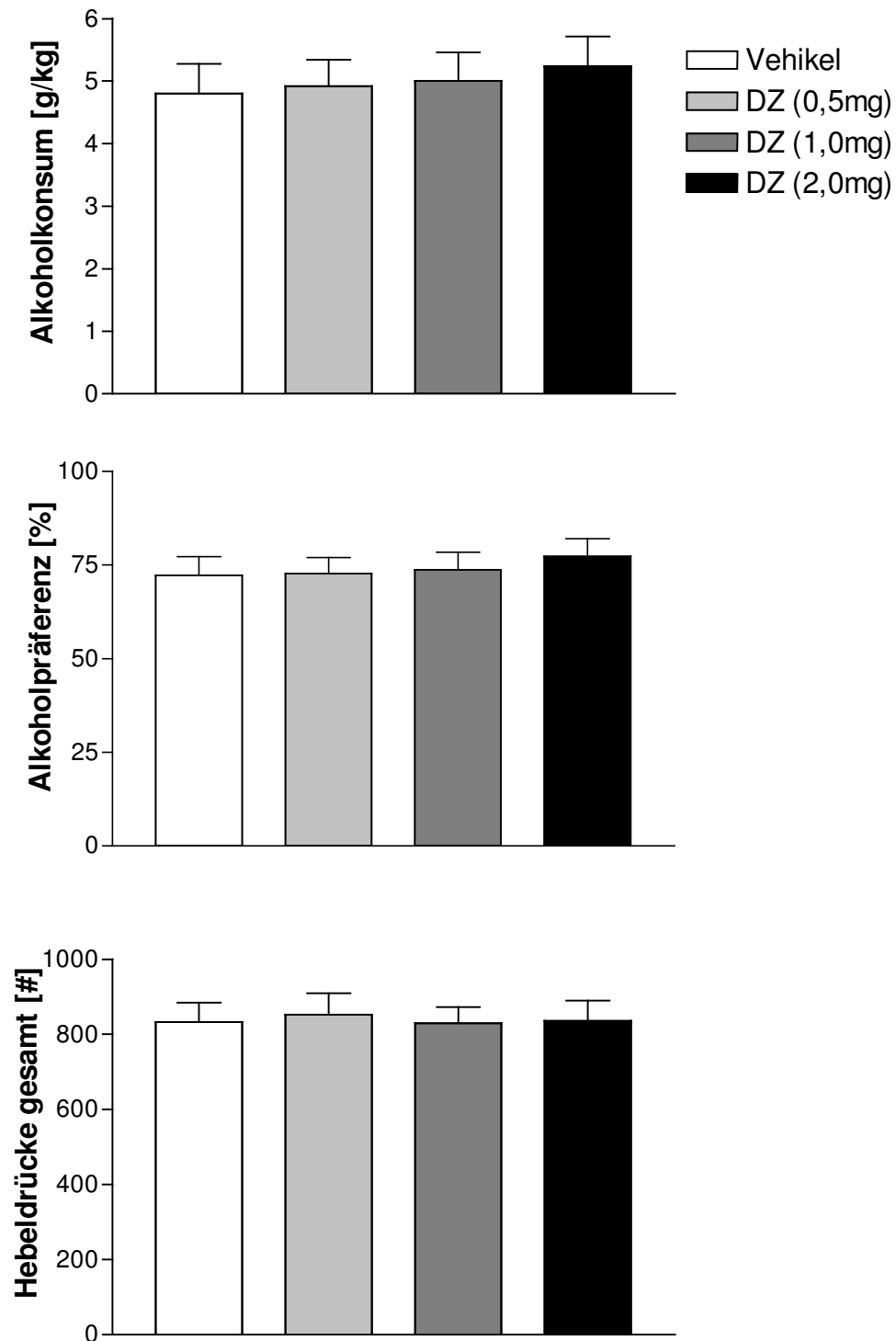


Abb. 11: Alkoholkonsum, Alkoholpräferenz und Gesamthebeldruckaktivität von Langzeit-alkoholerfahrenen Martinsrieder Wistar-Ratten in operanten Boxen, 30 min nach einmaliger intraperitonealer Behandlung mit Vehikel oder Diazepam (DZ; 0,5, 1 bzw. 2 mg/kg). Dargestellt sind Mittelwerte + Standardfehler über die gesamte Dauer der 23-stündigen Boxensitzung. n=22. Die Diazepam-Behandlung hatte keinen signifikanten Einfluss auf Alkoholkonsum, Alkoholpräferenz und die Gesamtanzahl der Hebeldrücke (ANOVA).

4.4 Diskussion

In klinischen wie tierexperimentellen Studien wurde ein Zusammenhang zwischen Angststörungen bzw. Emotionalität und Alkoholkonsum gezeigt. Verschiedene Vorschläge, diesen Zusammenhang kausal zu erklären, wurden diskutiert. So wurde von Conger (1956) in der *Tension Reduction*-Hypothese postuliert, dass der Konsum von Alkohol Angst reduziert und dieser anxiolytische Effekt zum Alkoholkonsum motiviert. Gemäß dieser Hypothese sollten ängstlichere Individuen sensibler für die anxiolytische Alkoholkonsumwirkung sein und daher eine erhöhte Prädisposition besitzen, Alkohol zu konsumieren. In der vorliegenden Studie sollte diese Annahme überprüft werden.

Zunächst wurde der freiwillige Alkoholkonsum von HAB/LAB-Ratten untersucht. Diese wurden über Generationen hinweg selektiv auf maximale Unterschiede im Angst-bezogenen Verhalten auf der *Elevated Plusmaze* gezüchtet. In weiteren Tests unkonditionierter Emotionalität wurde der stabile Unterschied im Angst-bezogenen Verhalten zwischen den beiden Linien bestätigt (Henniger, 1998; Henniger *et al.*, 2000; Ohl *et al.*, 2001). Entgegen oben genannter Annahme zeigte sich im 4-Flaschenmodell freiwilligen Alkoholkonsums ein Trend einer erhöhten Alkoholaufnahme der weniger ängstlichen LAB-Ratten. Der Unterschied war jedoch weder bezüglich des Alkoholkonsums noch der Alkoholpräferenz signifikant. Dadurch konnten die Ergebnisse einer früheren Studie des freiwilligen Alkoholkonsums bei männlichen HAB/LAB-Ratten bestätigt werden (Henniger, 1998). In dieser früheren Studie wurde zusätzlich zu Männchen der freiwillige Alkoholkonsum weiblicher HAB/LAB-Ratten untersucht. Initial konsumierten dort die weniger ängstlichen LAB-Weibchen signifikant mehr Alkohol als die ängstlicheren HAB-Weibchen (Henniger, 1998; Henniger *et al.* 2002). Da die Männchen beider Linien generell deutlich weniger Alkohol konsumierten als die Weibchen, besteht die Möglichkeit, dass die fehlende Signifikanz im Unterschied des Alkoholkonsums der Männchen auf einen Bodeneffekt (*floor effect*) zurückzuführen ist. Das Phänomen, dass männliche Ratten weniger Alkohol

konsumieren als weibliche wurde wiederholt in früheren Studien gezeigt (Li & Lumeng, 1984; Adams *et al.*, 1991; Adams, 1995; Almeida *et al.*, 1998).

Das Ergebnis dieser Studie scheint im Widerspruch zu einer Arbeit von Spanagel *et al.* (1995) zu stehen. Dort wurden aus einer „normalen“, heterogenen Gruppe von Wistar-Ratten diejenigen Individuen, die am meisten und diejenigen, die am wenigsten Angst-bezogenes Verhalten auf der *Elevated Plusmaze* zeigten, selektiert. Der Alkoholkonsum der ‚ängstlichen‘ Tiere wurde mit dem der ‚nicht ängstlichen‘ Gruppe verglichen. Im Gegensatz zu dieser Studie tranken dort die ‚ängstlichen‘ Tiere signifikant mehr Alkohol als die ‚nicht ängstlichen‘. Die gegensätzlichen Ergebnisse erklären sich eventuell durch methodische Unterschiede zwischen den Studien: Während die Ratten in dieser Studie die Wahl zwischen Wasser, 5%, 10% und 20%-igem Alkohol hatten, hatten die Tiere bei Spanagel *et al.* (1995) Zugang zu Wasser und Alkohol in ansteigenden Konzentrationen (2% und 4%-iger Alkohol) in einem 2-Flaschenparadigma. Das 4-Flaschenmodell besitzt gegenüber demjenigen mit zwei Flaschen verschiedene Vorteile. Die Auswahl von vier Lösungen ermöglicht es den Tieren individuell die jeweils bevorzugte Alkoholkonzentration zu konsumieren. Dies führt i.d.R. zu einem höheren Alkoholkonsum. Weiterhin können die Tiere über die Zeit hinweg oder nach Manipulationen ihre Präferenz zu höheren Konzentrationen verschieben. Dies ermöglicht eine vermehrte Einnahme von Alkohol bei unveränderter Menge konsumierter Gesamtflüssigkeit (Spanagel & Höller, 1999). Es ist in diesem Zusammenhang wichtig festzustellen, dass im 2-Flaschenmodell mit ansteigenden Alkoholkonzentrationen nur bei niedrigen Konzentrationen eine positive Korrelation zwischen der Ängstlichkeit auf der *Elevated Plusmaze* und dem freiwilligen Alkoholkonsum gefunden wurde. In einer Nachfolgestudie korrelierte der Konsum höherer Alkoholkonzentrationen (8% und 10%) nicht mehr mit der Ängstlichkeit (Spanagel, nicht publiziert). Es ist bekannt, dass Ratten niedrige Alkohollösungen (<6%) gegenüber höherprozentigen Lösungen vorziehen (Meisch & Lemaire, 1993). Auch in dieser Studie hatten die Tiere Zugang zu einer niedrigen Alkoholkonzentration von 5%. Diese ist mit

der 4%-igen Konzentration in der Studie von Spanagel *et al.* (1995) vergleichbar. Sowohl HAB- als auch LAB-Ratten präferierten die 5%-ige vor der 10% und 20%-igen Lösung. Während in der Studie von Spanagel *et al.* (1995) die ‚ängstlichen‘ und ‚nicht ängstlichen‘ Tiere aus einer „normalen“, heterogenen Gruppe von Wistar-Ratten selektiert wurden, wurden in dieser Studie zwei Rattenlinien verwendet, die über Jahre hinweg auf maximale Unterschiede im Angst-bezogenen Verhalten gezüchtet wurden. Infolgedessen stellt die hohe bzw. niedrige Angstdisposition der HAB- und LAB-Ratten ein klar nachgewiesenes angeborenes und weiter vererbbares Merkmal (*trait*) dar (siehe auch Wigger *et al.*, 2001). Durch die selektive Züchtung könnte die angeborene Ängstlichkeit der HAB-Ratten, im Vergleich zu den in der Spanagel-Studie verwendeten Tieren, stärker ausgeprägt sein. Möglicherweise sind freiwilliger Alkoholkonsum und angeborene Ängstlichkeit über eine umgekehrte U-Funktion miteinander verknüpft. In diesem Falle würde die hohe Ängstlichkeit der HAB-Ratten zu einem Vermeideverhalten gegenüber den unbekannten Alkohollösungen und damit, im Vergleich zu den Tieren der Spanagel-Studie, zu einem erniedrigten Alkoholkonsum führen.

Die Bestimmung des Alkoholkonsums von Tieren, die sich in ihrer angeborenen Ängstlichkeit unterscheiden, stellt eine Möglichkeit der Untersuchung des Zusammenhangs zwischen Emotionalität und freiwilligem Alkoholkonsum dar. Ein weiterer Ansatz besteht darin, umgekehrt das Angst-bezogene Verhalten von Tieren zu untersuchen, die sich deutlich in ihrem Alkoholkonsumverhalten unterscheiden. Es wurden deshalb Emotionalität und freiwilliger Alkoholkonsum von B6- und D2-Mäusen untersucht. Frühere Untersuchungen haben gezeigt, dass B6-Mäuse freiwillig große Mengen an Alkohol konsumieren, während D2-Tiere diesen eher meiden (McClearn & Rodgers, 1959; Fuller, 1964; Schneider *et al.*, 1973; Belknap *et al.*, 1993; siehe Übersichtsartikel Phillips & Crabbe, 1991). Bezüglich des Angst-bezogenen Verhaltens wurden in früheren Studien auf der *Elevated Plusmaze* inkonsistente Ergebnisse erzielt: Sowohl eine höhere als auch eine niedrigere Emotionalität

der D2- im Vergleich zu B6-Mäusen wurde gezeigt (Rogers *et al.*, 1999; Trullas & Skollnik, 1993). In der vorliegenden Studie explorierten unbehandelte D2-Mäuse das helle Kompartiment der *Dark/Light*-Box deutlich weniger, verhielten sich also ängstlicher als unbehandelte B6-Tiere. Da die D2-Tiere hier jedoch auch eine niedrigere lokomotorische Aktivität aufwiesen, kann nicht gänzlich ausgeschlossen werden, dass die geringere Exploration des hellen Kompartiments auch teilweise durch eine niedrigere Gesamtaktivität der D2-Mäuse bedingt war. In einem separat durchgeführten Test auf lokomotorische Unterschiede im *Open Field*-Paradigma unterschieden sich B6- und D2-Mäuse jedoch nicht signifikant voneinander. Dies weist darauf hin, dass die in der *Dark/Light*-Box gefundenen Unterschiede nicht durch generelle Aktivitätsunterschiede zwischen den beiden Stämmen bedingt waren.

Die *Dark/Light*-Box wurde als Testparadigma auf Unterschiede im Angst-bezogenen Verhalten extensiv validiert. So wurde gezeigt, dass die Applikation von Anxiolytika die Exploration des hellen Kompartiments signifikant erhöhte (Crawley & Goodwin, 1980; Crawley, 1981). Auch in der vorliegenden Studie führte der anxiolytisch wirkende CRHR1-Antagonist R121919 (Keck *et al.*, 2001) zu einer Erniedrigung des Angst-bezogenen Verhaltens bei D2-Mäusen. Der fehlende Einfluss von R121919 auf das Verhalten der B6-Tiere könnte auf einen Deckeneffekt (*ceiling effect*) zurückzuführen sein. Eine stärkere Auswirkung der Gabe von Anxiolytika bei ängstlicheren im Vergleich zu weniger ängstlichen Tieren wurde wiederholt gezeigt (Liebsch *et al.*, 1998a; Keck *et al.*, 2001).

Im Einklang mit früheren Studien unterschieden sich die Mäuse der beiden Stämme erheblich im initialen Alkoholkonsum. Während D2-Mäuse kaum Alkohol konsumierten, tranken B6-Tiere täglich im Durchschnitt ca. 8 g/kg. Die Tiere, die sich in der *Dark/Light*-Box weniger ängstlich verhielten, konsumierten somit deutlich mehr Alkohol als diejenigen, die mehr Angst-bezogenes Verhalten zeigten. Statistische Analysen, in denen die Individuen beider Stämme zusammen einbezogen wurden, ergaben eine hohe (negative) Korrelation zwischen

Parametern für Ängstlichkeit und freiwilligem Alkoholkonsum. Wurden jedoch Ängstlichkeit und Alkoholkonsum der Individuen für die B6- und die D2-Mäuse jeweils einzeln analysiert, so ging diese Korrelation verloren (Daten nicht gezeigt). Dies deutet darauf hin, dass der Zusammenhang zwischen Ängstlichkeit und freiwilligem Alkoholkonsum möglicherweise nicht ursächlich ist. Verschiedene Gründe für den deutlichen Unterschied im Alkoholkonsumverhalten von B6- und D2-Mäusen wurden diskutiert (siehe Kap. 4.1). In der vorliegenden Arbeit wurde als ein weiterer möglicher Erklärungsansatz für das gegensätzliche Alkoholselbstverabreichungsverhalten der Alkoholmetabolismus von B6- und D2-Mäusen untersucht. Dabei zeigte sich, dass die Blutalkoholwerte der D2-Tiere über die gesamte Untersuchungsdauer von sechs Stunden nach intragastraler Alkoholapplikation niedriger als bei B6-Mäusen lagen. In Anbetracht der Blut-Hirnschrankengängigkeit von Alkohol ist also davon auszugehen, dass nach dem Konsum einer bestimmten Menge Alkohol bei B6- mehr davon in das Gehirn gelangte und dort pharmakologisch wirksam werden konnte als bei D2-Mäusen. Wäre der Kontrast im Alkoholkonsumverhalten der beiden Stämme durch Unterschiede im Metabolismus bedingt, so würde man das Gegenteil dieses Befundes erwarten, d.h. B6- sollten weniger Alkohol konsumieren als D2-Mäuse.

Alkoholdeprivation führt bei alkoholabhängigen Patienten zu einem negativ-affektiven Zustand, gekennzeichnet durch Dysphorie und das Erleben von Angstsymptomen (Linnoila, 1989; Koob, 1996). Auch im Tiermodell wurde wiederholt erhöhtes Angst-bezogenes Verhalten nach Alkoholdeprivation gezeigt (File *et al.*, 1989; Baldwin *et al.*, 1991; Rassnick *et al.*, 1993).

Es sollte untersucht werden, ob das rückfallartige Trinken während des ADE durch eine alkoholdeprivationsinduzierte Ängstlichkeit bedingt ist, bzw. beeinflusst wird.

Zunächst wurde der Einfluss unterschiedlicher basaler Ängstlichkeit auf das Auftreten eines ADE an HAB/LAB-Ratten untersucht. Den Tieren wurde nach dem initialen 11-tägigen

Alkoholkonsum der Alkohol für zwei Wochen entzogen. Wie weiter oben ausgeführt, wäre ein erhöhter Alkoholkonsum nach Deprivation bei den ängstlicheren und daher für eine anxiolytische Alkoholwirkung sensitiveren HAB-Ratten möglich, sofern das Erfahren einer anxiolytischen Alkoholwirkung eine treibende Motivation für den erhöhten Alkoholkonsum während des ADE darstellt. Es wurde jedoch das gegenteilige Ergebnis erzielt: Ein ausgeprägter Alkoholdeprivationseffekt wurde bei den weniger ängstlichen LAB, nicht aber bei HAB-Tieren gefunden. In einer früheren Studie mit weiblichen HAB/LAB-Ratten wurde eine anxiolytische Wirkung von Alkohol bei weiblichen HAB-Ratten auf der *Elevated Plusmaze* gezeigt. Auch dort war ein ausgeprägter ADE jedoch nur bei LAB-Tieren nachweisbar (Henniger *et al.*, 2002).

Zumindest bei HAB/LAB-Ratten scheint also die anxiolytische Alkoholwirkung nicht zur Entstehung des ADE beizutragen. Eine mögliche Erklärung für den erhöhten Alkoholkonsum der LAB- im Vergleich zu den HAB-Tieren nach der Deprivation ist, dass LAB-Ratten eine aktivere *Coping*-Strategie besitzen, also mit neuen Situationen (in diesem Falle mit der Wiederverfügbarkeit der Alkoholflaschen) aktiver umgehen als HAB-Ratten. Ein aktiveres *Coping*-Verhalten der LAB- gegenüber den HAB-Tieren wurde im *Forced Swim*-Test gezeigt (Liebsch *et al.*, 1998b). Dieses Argument wird jedoch durch zwei Befunde entkräftet: Einmal unterschieden sich die Männchen – trotz eines Trends zum erhöhten Alkoholkonsum – im Gegensatz zu den Weibchen (Henniger, 1998; Henniger *et al.*, 2002) nicht signifikant im initialen Alkoholeinnahmeverhalten. Zum anderen wurde bei Weibchen gezeigt, dass sich die beiden Linien nicht generell im Umgang mit neuen Flüssigkeiten zu unterscheiden scheinen, da in einem 2-Flaschenmodell (0,01% w/v Saccharin-Lösung gegen Wasser) HAB- und LAB-Weibchen gleichermaßen die Saccharinlösung präferierten (Henniger, 1998; Henniger *et al.*, 2002).

Da die 11-tägige Zeit der Alkoholverfügbarkeit möglicherweise zu kurz war, um einen robusten ADE in beiden Linien zu induzieren, wurde sieben Monate nach der ersten

Deprivation, in denen die Tiere dauerhaft Zugang zu Alkohol hatten, der Alkohol ein zweites mal entzogen. Dabei ergab sich weder bei HAB- noch bei LAB-Ratten ein signifikanter ADE (Daten nicht gezeigt). Dies ist möglicherweise auf ein – im Vergleich zu Martinsrieder Wistar-Ratten – niedrigeres basales Alkoholeinnahmeverhalten der HAB/LAB-Ratten zurückzuführen. Deshalb wurde in einem weiteren Experiment der Einfluss des Anxiolytikums Diazepam auf den ADE in Langzeit-alkoholerfahrenen Wistar-Ratten untersucht. Zunächst wurde auf der *Elevated Plusmaze* nachgewiesen, dass die verwendete Dosis bei diesen Tieren einen anxiolytischen Effekt hatte. Dies zeigte sich darin, dass die Behandlung mit Diazepam zu einer vermehrten Exploration der offenen Arme führte, während gleichzeitig die lokomotorische Aktivität der Tiere unverändert war. In den operanten Boxen führte keine der getesteten Dosen zu einer Veränderung des Hebeldruckverhaltens für Wasser oder Alkohol. Dies weist darauf hin, dass das rückfallartige Trinken unter operanten Bedingungen nicht durch eine anxiolytische Wirkung des Alkohols motiviert scheint. Im 4-Flaschenmodell der freiwilligen Alkoholselbstverabreichung im Heimkäfig jedoch reduzierte Diazepam dosisabhängig den ADE an den ersten zwei Tagen nach Rückgabe der Alkoholflaschen. Tiere, deren Ängstlichkeit also durch Gabe des Anxiolytikums Diazepam pharmakologisch erniedrigt war, zeigten im Heimkäfig ein verringertes rückfallartiges Alkoholkonsumverhalten. Dies lässt die Interpretation zu, dass unter Heimkäfigbedingungen die Linderung von entzugsinduzierter Ängstlichkeit durch den vermehrten Konsum von Alkohol einen Faktor darstellt, der zur Entstehung des ADE beiträgt. Der erniedrigte Alkoholkonsum während des ADE nach Gabe von Diazepam lässt sich jedoch eventuell auch alternativ erklären. Invers zu ihrem verringerten Alkoholkonsum fraßen die mit Diazepam behandelten Ratten mehr Futter als die Tiere der Vehikelgruppe (Daten nicht gezeigt). In früheren Studien wurde gezeigt, dass Diazepam bei Ratten einen erhöhten Futterkonsum zur Folge haben kann (Naruse, 1994; Naruse & Ishii, 1995). Wurde aus dem Futter- und Alkoholkonsum die relative Energieaufnahme der Tiere (in kJ/kg) berechnet, so

ergab sich kein Unterschied zwischen den Behandlungsgruppen. Möglicherweise folgte der verringerte Alkoholkonsum sekundär dem höheren Futterkonsum durch das Bestreben der Tiere, ihre kalorische Energieaufnahme konstant zu halten. Diese Alternativerklärung eines eventuell unspezifischen Einflusses von Diazepam auf den Alkohol- und Futterkonsum wurde in einer Nachfolgestudie untersucht. Einer weiteren Gruppe von Langzeit-alkoholerfahrenen Ratten, die nicht alkoholdepriviert wurden, wurde wiederholt Diazepam appliziert. Hier zeigte die Gabe von Diazepam keinerlei Wirkung, weder auf den Alkohol- noch auf den Futterkonsum. Dieses Ergebnis entkräftet den alternativen Erklärungsansatz. Warum Diazepam den ADE im Heimkäfig, nicht jedoch unter operanten Bedingungen verringerte, kann momentan nicht erklärt werden.

Fasst man die Befunde zu Ängstlichkeit und freiwilligem Alkoholkonsum zusammen, so findet sich bei männlichen HAB/LAB-Ratten, die auf maximale Unterschiede im Angst-bezogenen Verhalten auf der *Elevated Plusmaze* selektiert wurden, trotz eines Trends der erhöhten Alkoholselbstverabreichung der weniger ängstlichen LAB-Ratten kein signifikanter Unterschied im freiwilligen initialen Alkoholkonsum. Ein signifikanter ADE nach zweiwöchigem Alkoholentzug zeigte sich bei LAB-, nicht aber bei HAB-Ratten. Die Gabe von Diazepam führte bei Langzeit-alkoholerfahrenen Wistar-Ratten zu einer dosisabhängigen Reduktion des ADE im Heimkäfig, nicht aber unter operanten Bedingungen. Auf das basale, nicht-deprivierte Alkoholeinnahmeverhalten hatte Diazepam keinen Einfluss. Bei zwei Mausstämmen, die sich deutlich in ihrem Alkoholkonsum unterscheiden, zeigte sich, dass die Alkohol-präferierenden B6-Mäuse in der *Dark/Light-Box* sich signifikant weniger ängstlich verhielten als die D2-Tiere, die kaum freiwillig Alkohol zu sich nahmen. In einer Analyse der Korrelation von Ängstlichkeit und freiwilligem Alkoholkonsum der Individuen separat jeweils innerhalb dieser beiden Stämme, wurde dieser Zusammenhang jedoch nicht mehr gefunden.

Die wahrscheinlichste Erklärung für diese Befunde ist, dass – zumindest bei Nagern - die Faktoren Ängstlichkeit und freiwilliger Alkoholkonsum nicht in einem engen kausalen Zusammenhang stehen. Sie werden deshalb nicht notwendigerweise coselektiert, wenn Tiere selektiv auf Unterschiede in der Emotionalität gezüchtet werden. Dies scheint auch bei Mausstämmen, die sich stark in ihrem Alkoholselbstverabreichungsverhalten unterscheiden, oder bei Rattenlinien, die auf Unterschiede in der Alkoholpräferenz gezüchtet wurden, zuzutreffen. So wurde bei sardischen sP (*sardinian alcohol-preferring*) und bei Indianapolis P (*preferring*) Alkohol-präferierenden gegenüber nicht präferierenden sNP (*sardinian non-preferring*) bzw. NP (*non-preferring*) Ratten eine erhöhte Ängstlichkeit gefunden (Colombo *et al.*, 1995; Richter *et al.*, 2000; Stewart *et al.*, 1993), während finnische Alkohol-präferierende AA-Ratten (Alko, Alcohol) in verschiedenen Studien eine erhöhte, erniedrigte oder unveränderte Emotionalität im Vergleich zu nicht-präferierenden ANA- (Alko, Nonalcohol) Ratten aufwiesen (Fahlke *et al.*, 1993; Möller *et al.*, 1997b; Tuominen *et al.*, 1990). Diese Interpretation wird gestützt durch eine Studie von Overstreet *et al.* (1997). Dort wurde eine Faktorenanalyse über 18 Verhaltensparameter von neun Paaren Alkohol-präferierender und nicht-präferierender Rattenlinien durchgeführt. Während zwei Parameter Angst-bezogenen Verhaltens, nämlich Ultraschallvokalisation sowie Defäkation im *Open Field*-Paradigma, in negativer Beziehung zum Faktor ‚Alkoholkonsum‘ standen, gab es keinen Zusammenhang zwischen diesem Faktor und Parametern, die auf der *Elevated Plusmaze* Ängstlichkeit reflektieren. Dies wurde bestätigt durch eine Studie von Viglinskaya *et al.* (1995), die auch keinen Nachweis einer konsistenten Beziehung zwischen Verhaltensweisen auf der *Elevated Plusmaze* und dem freiwilligen Alkoholkonsum fand.

Die Ansicht, dass eine erhöhte Ängstlichkeit zu einem Anstieg des Alkoholkonsumverhaltens führt, ist weit verbreitet, jedoch auch stark umstritten (siehe z.B. Übersichtsartikel Cappel & Herman, 1972). Tiermodelle können helfen, den vermeintlichen Zusammenhang zwischen

Ängstlichkeit und freiwilligem Alkoholkonsum genauer zu beleuchten. In der vorliegenden Arbeit wurde die Assoziation unkonditionierter Ängstlichkeit und Alkoholeinnahmeverhalten von Ratten und Mäusen in verschiedenen Experimenten untersucht. Dabei zeigte sich kein klarer Zusammenhang zwischen diesen beiden Parametern.

Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass bei einzelnen Individuen ein kausaler Zusammenhang zwischen der Höhe des Angstniveaus und der Menge konsumierten Alkohols besteht, bzw. dass eine andere Ausprägung der Emotionalität als die hier gemessene, z.B. erlernte (im Gegensatz zu angeborener) Ängstlichkeit zu einem erhöhten Alkoholkonsum führt. Die hier erzielten Ergebnisse – zusammengekommen mit den Resultaten weiterer Studien – weisen die *Tension Reduction*-Hypothese in ihrer generellen Aussagekraft jedoch zurück.

5. Stress und Alkoholkonsum

5.1 Einleitung

Wie in der Einleitung des vorigen Kapitels beschrieben, wurde schon in der Antike durch Hippokrates der Konsum von Alkohol als Mittel gegen Ängstlichkeit empfohlen. Noch ältere Quellen belegen die Erkenntnis eines stresslindernden Effekts von Alkohol, z.B. im Zusammenhang mit Leid. So schrieb der griechische Lyriker Alcaeus von Mytilene vor über 2500 Jahren: „Wir dürfen nicht unseren Geist der Gram beugen, ... die beste Abwehr ist genügend Wein zu mischen und diesen zu trinken“. Ähnlich schrieb Shakespeare in seinem Stück „Julius Caesar“ über die stresslindernden Eigenschaften des Alkohols: „Sprich nicht mehr von ihr. Gib mir einen Becher Wein. Darin will ich alle Lieblosigkeit begraben...“ (beide Zitate nach Sayette, 1999). In den 1940-er Jahren zeigten Masserman & Yum (1946) auf tierexperimenteller Ebene, dass konfliktinduzierter Stress bei Katzen durch die Gabe von Alkohol reduziert wurde. 1956 wurde von Conger der Einfluss von Alkohol auf das Verhalten von Ratten in einem Annäherungs-/Vermeidungskonflikt (*approach-avoidance conflict*)

gegenüber einer Futterbelohnung bzw. einem elektrischen Fußschock untersucht. Es zeigte sich, dass die Gabe von Alkohol das Verhältnis zwischen Annäherung und Vermeidung in Richtung der Annäherung verschob. Die Interpretation dieser Experimente war, dass Alkohol das durch Furcht bzw. Ängstlichkeit motivierte Vermeideverhalten der Tiere reduzierte. Es wurde daraufhin vorgeschlagen, dass einerseits diese anxiolytische Alkoholwirkung, andererseits ein positiver Alkoholeffekt auf die Verringerung konfliktinduzierter Anspannung (*tension*) zum Konsum von Alkohol motivieren könnte. Nach dieser als *Tension Reduction-Hypothese* bekannt gewordenen Theorie wird also Alkohol konsumiert um Angst zu lösen, bzw. eine Anspannung oder Stress zu lindern. Seither wurden zahlreiche klinische und human- bzw. tierexperimentelle Studien sowohl zum Zusammenhang Angst und Alkoholkonsum (siehe voriges Kapitel) als auch zur Assoziation von Stress und Alkoholkonsum durchgeführt (siehe Übersichtsartikel Piazza & le Moal, 1998; Pohorecky, 1990, 1991; Sinha, 2001). Stress ist in diesem Zusammenhang definiert als ein die Perzeption, Interpretation, Antwort und Adaptation beinhaltender Prozess, ausgelöst durch ein Ereignis, das als schädlich oder bedrohlich bewertet wird (Lazarus & Folkman, 1984).

Tiermodelle eines Stress-induzierten Anstiegs des freiwilligen Drogen- bzw. Alkoholkonsums sind ein wertvolles Mittel, um (neuro-)biologische Grundlagen der Interaktion von Stress und Drogen-/Alkoholkonsum zu studieren, sowie Möglichkeiten der pharmakologischen Intervention in der klinischen Situation zu untersuchen. Die bisherige tierexperimentelle Forschung zum Zusammenhang zwischen Stress und Drogenkonsum fokussierte sich hauptsächlich auf Opiate und Psychostimulantien (siehe Piazza & Le Moal, 1998). Es werden drei Phasen des Drogeneinnahmeverhaltens unterschieden: die Initiation, die Aufrechterhaltung (*maintenance*), d.h. das Konsumverhalten über längere Zeit bei freiem Zugang zur Droge während der Testsituation, und die Wiederaufnahme des Drogensuchverhaltens (*reinstatement*) bzw. des Drogenkonsums nach Entzug und einer Zeit der Drogenfreiheit. Sowohl bezüglich der Opiate und Psychostimulantien als auch gegenüber

Alkohol wurde die überwiegende Mehrheit der Studien zur Initiations- und Erhaltungsphase durchgeführt. Stress scheint zu einem erhöhtem Konsumverhalten von Opiaten und Psychostimulantien in der Initiations- und Aufrechterhaltungsphase zu führen (siehe Piazza & Le Moal, 1998), jedoch sind hier die Ergebnisse für Alkohol widersprüchlicher. So wurde ein erhöhter (Caplan & Puglisi, 1986; Volpicelli & Ulm, 1990; Hilakivi-Clarke & Lister, 1992; Núñez *et al.*, 1999), erniedrigter (Ng Cheong Ton *et al.*, 1983; Sprague & Maickel, 1994; van Erp & Miczek, 2001) und gleichbleibender (Fidler & Lolordo, 1996) Alkoholkonsum nach Stressexposition gezeigt.

Ein möglicher Mechanismus, einen Anstieg der Drogenselbstverabreichung nach akutem und chronischem Stress zu erklären, wurde von Piazza & Le Moal (1998) vorgeschlagen. Danach stellt eine Interaktion der Glucocorticoide Corticosteron bzw. Cortisol mit dopaminergen Neuronen des Mittelhirns das neurobiologische Substrat eines erhöhten Drogeneinnahmeverhaltens nach Stressexposition dar (siehe Abb. 12). Die zentrale Rolle der mesencephalen dopaminergen Neurone – im Speziellen die Freisetzung von Dopamin dieser Neurone im Nucleus accumbens im Vorderhirn – für Belohnungsempfinden, Motivation und Drogenwirkung wurde wiederholt beschrieben (siehe z.B. Übersichtsartikel Robinson & Berridge, 1993; Nevo & Hamon, 1995; Self, 1998; Spanagel & Weiss, 1999; Zieglängsberger & Spanagel, 1999).

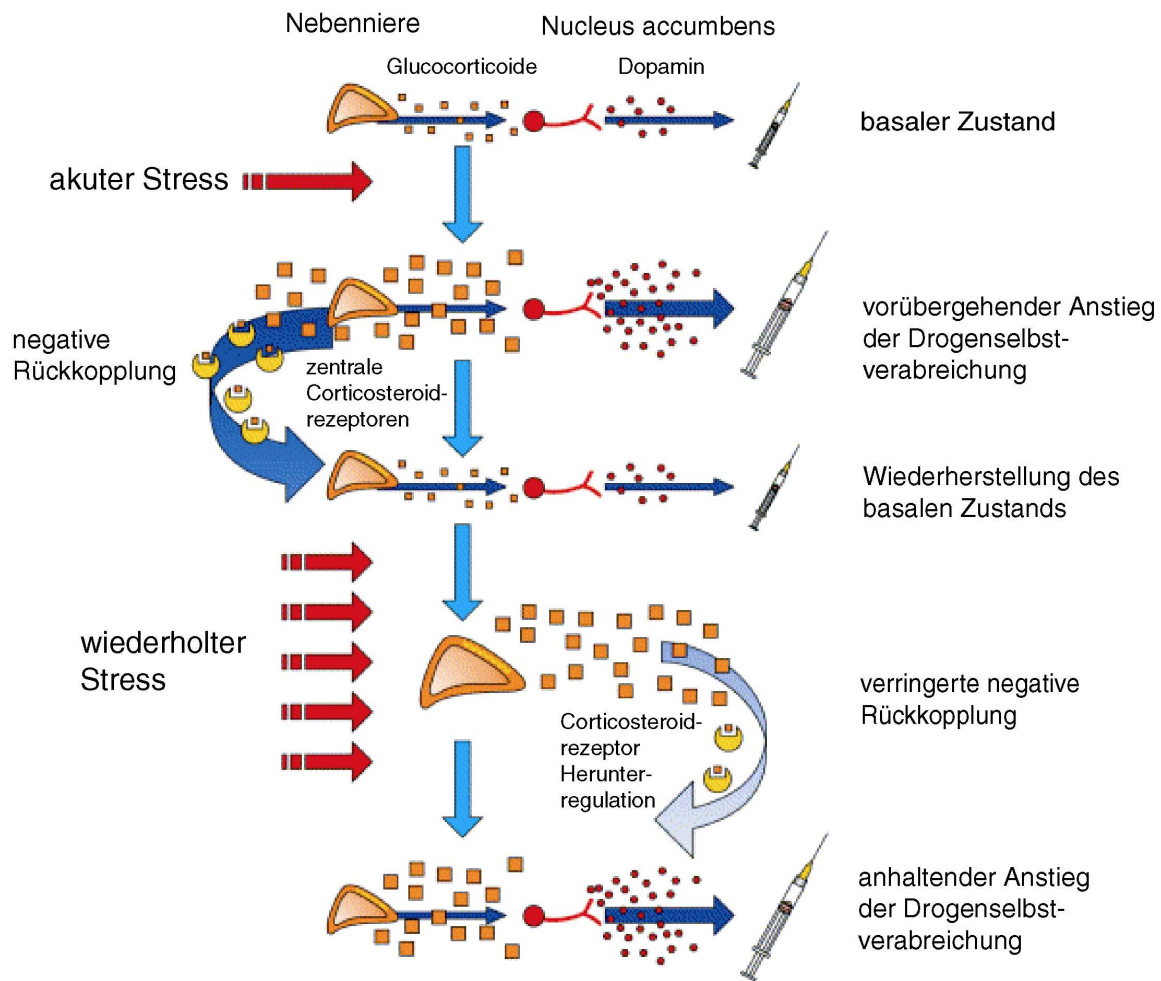


Abb. 12: Mögliche pathophysiologische Mechanismen eines Anstiegs der Drogenselbstverabreichung nach akutem und chronischem Stress (aus Piazza & Le Moal, 1998). Danach werden unter basalen Bedingungen nur wenig Glucocorticoide (orange) aus der Nebennierenrinde und Dopamin (rot) aus den mesencephalen Neuronen freigesetzt; die Sensitivität für Drogen ist gering. Ein akuter Stressor bewirkt einen Anstieg der Glucocorticoidsekretion, die wiederum eine erhöhte Ausschüttung von Dopamin zur Folge hat. Dies bewirkt eine erhöhte Sensitivität des Individuums für die verhaltensverstärkenden Drogenwirkungen und ein gesteigertes Drogeneinahmeverhalten. Durch die erhöhte Glucocorticoidausschüttung wird weiterhin ein negativer Rückkopplungsmechanismus ausgelöst, der ein Wiederabsinken dieser Hormone innerhalb von zwei Stunden bewirkt. Ein entscheidender Faktor der Aktivierung der negativen Rückkopplung ist dabei die Bindung der Glucocorticoide an Corticosteroidrezeptoren in der Hippocampusregion des Gehirnes. Durch den durch wiederholten Stress ausgelösten wiederholt bzw. dauerhaft erhöhten Glucocorticoidspiegel im Gehirn schwächt sich, möglicherweise als Folge einer verringerten Glucocorticoidrezeptordichte im Hippocampus, die negative Rückkopplung ab. Die verringerte Effektivität der negativen Rückkopplung wiederum resultiert in einer langfristig erhöhten Ausschüttung der Glucocorticoide. Dies hat eine vermehrte Aktivierung der dopaminergen Neurone im Mittelhirn und damit eine erhöhte Dopaminausschüttung im Nucleus accumbens zur Folge. Das

Ergebnis dieser Veränderungen ist eine dauerhaft erhöhte Sensitivität für die verhaltensverstärkenden Wirkungen von Drogen und damit ein gesteigertes Drogeneinnahmeverhalten (Piazza & Le Moal, 1998).

Wie bereits beschrieben, wurden zahlreiche tierexperimentelle Studien zum Einfluss von Stress auf die Initiationsphase und die Aufrechterhaltung des Alkoholkonsums durchgeführt, mit unterschiedlichen Ergebnissen. Obwohl in der klinischen Situation die Rückfallprophylaxe eines der zentralen Probleme der Behandlung alkoholabhängiger Patienten darstellt, beschäftigten sich ungleich weniger Arbeiten mit dem Einfluss von Stress auf die Wiederaufnahme von Drogensuch- (*drug seeking*) bzw. Drogeneinnahmeverhalten nach einer längeren Phase der Abstinenz, d.h. auf rückfallartiges Verhalten. Zwei Tiermodelle für rückfallartiges Verhalten wurden in der Literatur beschrieben: das *Reinstatement*-Paradigma und der Alkoholdeprivationseffekt (siehe Übersichtsartikel Lê & Shaham, 2002).

Im *Reinstatement* Modell (Lê *et al.*, 1998, 1999; Lê & Shaham, 2002) bekommen Ratten zunächst in einer *Limited Access* Prozedur im Heimkäfig zusätzlich zur Wasserflasche täglich für 30 Minuten eine Flasche mit einer Alkohollösung. Die Konzentration des Alkohols steigt an, bis zu einer Endkonzentration von 12% (v/v). Über mehrere Wochen hinweg werden die Ratten dann für 60 Minuten täglich trainiert, in operanten Boxen für 12%-igen Alkohol einen Hebel zu drücken. Die Tiere besitzen im Heimkäfig freien Zugang zu Wasser und Futter, Alkohol ist nur in den operanten Boxen verfügbar. Während der täglichen einstündigen Boxensitzung konsumieren die Ratten ca. 1 – 1,5 g Alkohol pro Kilogramm Körpergewicht. Nachdem die Tiere ein über mehrere operante Sitzungen hinweg stabiles Hebeldruckverhalten entwickelt haben, beginnt die Phase der Extinktion. Während dieser bleibt ein Hebeldruck für das Tier ohne Folgen, d.h. es wird kein Alkohol mehr dargeboten. Dies führt dazu, dass die Ratten das Hebeldruckverhalten stark verringern. Nach der Extinktion wird der Einfluss verschiedener Manipulationen, wie z.B. die Gabe pharmakologisch aktiver Substanzen oder Stressexposition, auf die Wiederaufnahme des Drogensuchverhaltens (*Reinstatement*)

untersucht. Dabei finden die Experimente unter Extinktionsbedingungen statt, d.h. auch während des eigentlichen Experiments führt ein Hebeldruck nicht zur Freisetzung von Alkohol. Die Wiederaufnahme des Hebeldruckverhaltens nach der Manipulation wird als Modell rückfallartigen Verhaltens angesehen. Es wurde gezeigt, dass Alkohol-*Priming*, d.h. die Applikation einer geringen Alkoholdosis, eine Wiederaufnahme des Hebeldruckverhaltens für Alkohol auslöste (Lê *et al.*, 1998, 1999). Ein erhöhtes Verlangen nach bzw. erhöhter Konsum von Alkohol nach Alkohol-*Priming* wurde auch bei sozialen Trinkern und Alkoholikern beschrieben (Bigelow *et al.*, 1977; Hodgson *et al.*, 1979; de Wit & Chutuape, 1993). Das durch *Priming* induzierte rückfallartige Verhalten der Ratten konnte durch die Gabe des μ -Opioidrezeptorantagonisten Naltrexon verringert werden (Lê *et al.*, 1999). Dies ist im Einklang mit klinischen Studien, die bei Alkoholikern eine Verringerung der Rückfallhäufigkeit durch Naltrexonbehandlung zeigten (O'Malley *et al.*, 1992; Volpicelli *et al.*, 1992). Das *Reinstatement*-Paradigma ist daher als Tiermodell rückfallartigen Verhaltens pharmakologisch gut validiert. Auch der Einfluss von Stress auf das rückfallartige Verhalten im *Reinstatement*-Modell wurde beschrieben (Lê *et al.*, 1998, 1999). Dabei zeigten die Ratten, nachdem sie einem Fußschockstress ausgesetzt waren, eine Wiederaufnahme des Hebeldrucks auf den mit der Alkoholgabe assoziierten Hebel, was als Indikator für Drogensuchverhalten interpretiert wird. Wurde das gleiche Experiment mit einer Saccharose anstelle der Alkohollösung durchgeführt, so zeigte sich keine Wiederaufnahme des Hebeldruckverhaltens (Lê *et al.*, 1998). Dies deutet darauf hin, dass die pharmakologische Wirkung einer Substanz entscheidend ist für die Wiederaufnahme des Suchverhaltens nach dieser Substanz. Das rückfallartige Verhalten nach Stressexposition war im Vergleich zum *Priming*-induzierten *Reinstatement* deutlich erhöht. Ähnliche Ergebnisse wurden in Studien mit Heroin und Kokain in dem gleichen Modell (Erb *et al.*, 1996; Shaham *et al.*, 1996) erzielt. Diese Forschergruppe untersuchte auch den Einfluss von Corticosteron und Corticotropin

Releasing Hormon (CRH) auf das Stress-induzierte *Reinstatement* für Heroin bzw. Kokain (Shaham *et al.*, 1997; Erb *et al.*, 1998).

Corticosteron und CRH stellen integrale Bestandteile der Stressachse dar, einer Hormonkaskade, die in Reaktion auf einen Stressor aktiviert wird. Dabei führt die Freisetzung von CRH aus hypothalamischen Neuronen zu einer erhöhten Ausschüttung von Adrenocorticotropem Hormon (ACTH) in der Hypophyse. Dies wiederum hat eine vermehrte Freisetzung von Glucocorticoiden (Corticosteron bei Nagern bzw. Cortisol beim Menschen) aus der Nebennierenrinde zur Folge. Die Aktivität der Stressachse wird über einen negativen Rückkopplungsmechanismus reguliert, indem die freigesetzten Glucocorticoide auf der Ebene des Hypothalamus sowie der Hypophyse eine verringerte Sekretion von CRH bzw. ACTH bewirken. Über die Aktivierung der Stressachse hinaus scheint CRH in extrahypothalamischen Hirnregionen Stress-induzierte Verhaltensantworten, wie z.B. erhöhte Ängstlichkeit, zu vermitteln (Heinrichs *et al.*, 1992; siehe auch Übersichtsartikel Koob & Heinrichs, 1999; Krysiak *et al.*, 2000). Als zwei dieser Regionen werden die Amygdala und der Bed Nucleus der Stria Terminalis (BNST) diskutiert (Walker & Davis, 1997). Bisher wurden drei CRH-Rezeptorsubtypen mit unterschiedlicher, teilweise überlappender regionaler Expression im zentralen Nervensystem und der Peripherie, beschrieben: CRHR1, CRHR2 α und CRHR2 β (Behan *et al.*, 1996; siehe auch Übersichtsartikel Reul & Holsboer, 2002).

Es wurde gezeigt, dass CRH, nicht jedoch Corticosteron eine zentrale Rolle für das Stress-induzierte *Reinstatement* spielte. So löste eine intracerebroventrikuläre Injektion von CRH bei Ratten ein *Reinstatement* des Suchverhaltens für Heroin aus (Shaham *et al.*, 1997), während die Applikation unspezifischer CRH-Rezeptor Antagonisten das Stress-induzierte Drogensuchverhalten für Heroin und Kokain signifikant reduzierte (Shaham *et al.*, 1997; Erb *et al.*, 1998). In einer Nachfolgestudie wurden CRH bzw. ein unspezifischer CRH-Rezeptor Antagonist lokal in distinkte Hirnareale injiziert, bevor das Kokainsuchverhalten von Ratten im *Reinstatement*-Modell getestet wurde (Erb & Stewart, 1999). Wurden die Substanzen in

den BNST appliziert, so induzierte CRH ein *Reinstatement*, während das Stress-induzierte Drogensuchverhalten nach Gabe eines CRH-Rezeptor Antagonisten verringert wurde. Injektionen dieser Substanzen in die Amygdala hatten keinen Effekt. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Aktivierung von CRH-Rezeptoren im BNST, jedoch nicht in der Amygdala, entscheidend für das Fußschock-induzierte rückfallartige Kokainsuchverhalten ist (Stewart, 2000). Experimentelle Hinweise deuten darauf hin, dass die Freisetzung von CRH im BNST direkt oder indirekt über eine erhöhte Aktivität noradrenerger Systeme im Gehirn vermittelt ist (Stewart, 2000). Es bestehen noch keine gesicherten Erkenntnisse darüber, über welchen Mechanismus, bzw. über welche neuronalen Projektionen ein erhöhter CRH-Spiegel im BNST zu einem rückfallartigen Drogensuchverhalten führt (Stewart, 2000). Auch auf das *Reinstatement* von Alkoholsuchverhalten wurde der Einfluss einer Gabe von CRH-Rezeptorantagonisten untersucht. Wie schon zuvor in den Studien mit Heroin und Kokain reduzierten die Antagonisten D-Phe-CRH und CP-154,526 gleichermaßen die Wiederaufnahme des Alkoholsuchverhaltens nach Fußschockexposition (Lê & Shaham, 2002). Da D-Phe-CRH unselektiv sowohl an CRHR1 als auch an CRHR2 bindet (Behan *et al.*, 1996), während CP-154,526 selektiv am CRHR1 bindet (Schulz *et al.*, 1996; Chen *et al.*, 1997) und beide Antagonisten eine ähnliche Wirkung zeigten, ist davon auszugehen, dass CRH das Stress-induzierte *Reinstatement* vorwiegend über den CRH-Rezeptorsubtyp 1 beeinflusst (Lê & Shaham, 2002).

Das zweite beschriebene Modell rückfallartigen Alkoholkonsums stellt der Alkoholdeprivationseffekt (ADE) dar. Der ADE ist definiert als vorübergehender Anstieg des Alkoholkonsums nach einer Deprivationsphase, er wurde in verschiedenen Tierarten - auch beim Menschen - beschrieben (Sinclair & Senter, 1967; Sinclair, 1971; Burish *et al.*, 1981). Wie in Kap. 1 erläutert, stellt der ADE ein valides Tiermodell für rückfallartigen Alkoholkonsum dar. Das *Reinstatement* und der ADE als Modelle rückfallartigen Verhaltens unterscheiden sich in einigen wesentlichen Aspekten (siehe Übersichtsartikel Lê & Shaham,

2002): Im *Reinstatement*-Paradigma haben die Tiere während der Testsituation keinen Zugang zu Alkohol, während unter ADE-Bedingungen der Alkoholkonsum gerade die Zielgröße darstellt. Im ersten Fall wird daher das *Drogensuch*verhalten der Tiere untersucht, während im zweiten Fall das *Drogeneinnahme*verhalten bestimmt wird. Als Folge stellt ein eventueller Behandlungseffekt auf den ADE eine Interaktion zwischen der Behandlung und einer möglichen Alkoholwirkung dar. Dies kann, je nach Sichtweise, als Nachteil oder als Vorteil gewertet werden: Einerseits erschwert die Interaktion eine Interpretation der Ergebnisse, andererseits spiegelt der ADE als Modell rückfallartigen Trinkens eher die Humansituation wider.

Über den Einfluss von Stress auf den ADE ist bisher nichts bekannt. Ziel der vorliegenden Studie war, den Einfluss von akutem und wiederholten Stress auf das rückfallartige Trinken Langzeit-alkoholerfahrener Ratten während des ADE im Heimkäfig und unter operanten Bedingungen zu untersuchen. Die Tiere wurden gestresst, indem sie einem akuten oder wiederholtem *Social Defeat* ausgesetzt wurden. *Social Defeat* stellt einen ethologisch relevanten Stressor hauptsächlich psychischer (im Gegensatz zu physischer) Natur dar (Koolhaas *et al.*, 1997 a). Es wurde wiederholt gezeigt, dass eine einzelne *Social Defeat*-Exposition teilweise langanhaltende Veränderungen in Verhaltens-, endokrinen und weiteren Parametern zur Folge haben kann (Merlo Pich *et al.*, 1993; Meerlo *et al.*, 1996 a,b,c; Koolhaas *et al.*, 1997b; Berton *et al.*, 1999). Zusätzlich zur Untersuchung des Effekts der Stressexposition auf rückfallartigen Alkoholkonsum wurde der Einfluss von Stress auf das basale, nicht deprivierte Konsumverhalten Langzeit-alkoholerfahrener Wistar-Ratten gemessen. Um zu bestimmen, ob ein Unterschied in der angeborenen Ängstlichkeit einen eventuellen Stresseffekt auf den basalen freiwilligen Alkoholkonsum beeinflusst, wurden auch die auf hohe und niedrige Angstdisposition gezüchteten HAB/LAB-Ratten (Liebsch *et al.*, 1998 a,b) nach Langzeit-Alkoholerfahrung einem akutem *Social Defeat*-Stress ausgesetzt und der Einfluss auf das Trinkverhalten gemessen.

In Mäusen ist der Zusammenhang zwischen Stresserfahrung und freiwilligem Alkoholkonsum nicht sehr gut untersucht. In einem weiteren Experiment wurden daher alkoholerfahrene B6- und D2-Mäuse einer Serie verschiedener Stressoren ausgesetzt und das nachfolgende freiwillige Konsumverhalten im Heimkäfig untersucht. B6- und D2-Mäuse unterscheiden sich deutlich in ihrem basalen Alkoholkonsum. Während B6-Tiere Alkohol stark präferieren, meiden D2-Mäuse diesen eher (McClearn & Rodgers, 1959; Fuller, 1964; Schneider *et al.*, 1973; Belknap *et al.*, 1993; siehe Übersichtsartikel Phillips & Crabbe, 1991). D2-Mäuse trinken zwar freiwillig deutlich weniger Alkohol als B6-Tiere, unterscheiden sich von diesen jedoch nicht in der Menge intravenös selbst-applizierten Alkohols (Grahame & Cunningham, 1997). Zudem sind sie sensibler für Alkoholeffekte bezüglich der Aktivierung dopaminerger Neurone im Belohnungssystem (Brodie & Appel, 2000), sowie der Sensitivierung lokomotorischer Stimulation nach wiederholter Alkoholinjektion (Lessov *et al.*, 2001). In einer Studie von Cabib *et al.* (2000) wurde der Einfluss einer 12-tägigen Phase einer verringerten Futterzufuhr auf die Sensitivität für die lokomotorisch stimulierende Wirkung von Amphetamin sowie der Entwicklung einer konditionierten Platzaversion gegenüber Amphetamin von D2- und B6-Mäusen untersucht. Unter basalen Umständen besitzen D2-Tiere – im Gegensatz zu B6-Mäusen – eine sehr geringe Sensitivität für die lokomotorisch stimulierende Wirkung von Amphetamin und entwickeln eine Platzaversion gegen Psychostimulantien. Nach der Phase der Futterverknappung jedoch zeigten die D2-Tiere eine starke amphetamininduzierte Platzpräferenz und waren sensibler für die stimulierende Wirkung dieser Droge. Auf das Verhalten der B6-Mäuse hatte die Futterverknappung keinen Einfluss (Cabib *et al.*, 2000). Eine reduzierte Futterversorgung stellt für die Tiere eine Stresssituation dar, und es wurde vorgeschlagen, dass der unterschiedliche Einfluss auf B6- und D2-Mäuse u.a. über eine unterschiedliche Glucocorticoidausschüttung vermittelt wurde (Cabib *et al.*, 1996, 2000). Die in der Studie von Cabib *et al.* (2000) beschriebene unterschiedliche Reaktivität auf die Futterdeprivation führte zu der Annahme, dass B6- und

D2-Mäuse eventuell ein gutes Modell darstellen, um den Einfluss von Umweltfaktoren wie Stress auf das Drogeneinnahmeverhalten zu untersuchen. Ziel dieses Experiments war es daher, zu untersuchen, ob Stressexposition das Verhalten von B6- und D2-Mäusen auch bezüglich der freiwilligen Alkoholselbstverabreichung im Heimkäfig beeinflusst. Zunächst wurde der Effekt akuten oder wiederholten *Social Defeats* auf den Alkoholkonsum festgestellt. Indem die Tiere verschiedenen weiteren Stressoren ausgesetzt wurden, wurde weiterhin untersucht, ob ein möglicher Stresseffekt stressorspezifisch ist und ob die Vorhersagbarkeit sowie der Kontext, in dem die Tiere gestresst werden, eine entscheidende Rolle in der Beeinflussbarkeit freiwilligen Trinkverhaltens spielt. Wie weiter oben ausgeführt, verringerten CRH-Antagonisten (über eine Bindung am CRHR1) das Drogensuchverhalten von Ratten für Heroin, Kokain sowie Alkohol im *Reinstatement*-Paradigma (Shaham *et al.*, 1997; Erb *et al.*, 1998; Erb & Stewart, 1999; Lê & Shaham, 2002). CRH stellt daher – zumindest für die Wiederaufnahme von Drogensuchverhalten bei Ratten – einen bedeutenden Faktor für die Interaktion zwischen Stress und Drogenkonsum bzw. Drogensuchverhalten dar. Um festzustellen, ob auch eine eventuelle Stress-induzierte Änderung des freiwilligen Alkoholkonsums der B6- und D2-Mäuse über das CRH-System beeinflussbar ist, wurde einem Teil der Tiere unmittelbar nach jeder Stressexposition der CRHR1-spezifische Antagonist R121919 (Keck & Holsboer, 2001) appliziert. Zusätzlich wurde mit Hilfe eines Trinkometersystems an einer Gruppe alkoholerfahrener B6-Mäuse der Einfluss sozialen Stresses auf das unmittelbare und kurzfristige Trinkmuster bezüglich Wasser und Alkohol untersucht.

5.2 Versuchsdurchführung

Der Einfluss wiederholten *Social Defeat*-Stresses (siehe Kapitel 2.4.1) auf den basalen Alkoholkonsum wurde bei Martinsrieder Wistar-Ratten (20 Monate; 480-630 g) untersucht, die im 4-Flaschenparadigma der freiwilligen Alkoholselbstverabreichung (siehe Kapitel 2.3.1)

über 19 Monate hinweg ununterbrochen freien Zugang zu Wasser und den drei Alkoholflaschen hatten. Das Alkoholeinnahmeverhalten zweier Gruppen wurde durch tägliche Messungen untersucht: Eine Gruppe (n=6) wurde an sechs aufeinanderfolgenden Tagen zu wechselnden Uhrzeiten je einmal einem *Social Defeat* ausgesetzt. 17 Tage nach der letzten Stressexposition wurden diese Tiere noch einmal akut durch *Social Defeat* gestresst. Eine zweite Gruppe (n=5) diente als Kontrolle und wurde nicht gestresst. Zwei Tage nach der letzten *Social Defeat*-Exposition wurden die Tiere beider Gruppen sowie Tiere einer gleich alten Kontrollgruppe (n=8), die zuvor nie gestresst worden waren und zeitlebens nur Zugang zu Futter und Wasser hatten, dem in Kap. 2.4.3 beschriebenen *Restraint*-Stress ausgesetzt. Zu Beginn des *Restraint*-Stresses wurde den Ratten aus der äußersten Schwanzspitze Blut abgenommen. Unmittelbar nach dem *Restraint* wurden die Tiere dekapitiert und Rumpfblood wurde entnommen. Um einen eventuellen Einfluss der wiederholten Stressexposition auf die Stressachsenfunktion zu bestimmen wurden in dem Blut später basale und Stress-induzierte ACTH- und Corticosteronkonzentrationen bestimmt. Es wurden zudem jeweils beide Nebennieren herauspräpariert und zusammen gewogen.

Der Einfluss von *Social Defeat* auf den ADE von Martinsrieder Wistar-Ratten im Heimkäfig wurde an Tieren untersucht, die 10 Monate Erfahrung im 4-Flaschenmodell der freiwilligen Alkoholselbstverabreichung hatten (Alter: 12 Monate; Gewicht: 470-580 g). Das Auftreten eines ADE nach 14 Tagen Alkoholentzug wurde bei drei Subgruppen untersucht: Die Tiere der wiederholt gestressten Gruppe (n=8) wurden während der Phase der Alkoholdeprivation an sechs aufeinanderfolgenden Tagen zu unterschiedlichen Zeiten jeweils einmal einem *Social Defeat*-Stress ausgesetzt. Der letzte *Social Defeat* erfolgte 30 Minuten vor der Rückgabe der Alkoholflaschen. Die akut gestresste Gruppe (n=7) wurde einmal, 30 Minuten vor Rückgabe der Alkoholflaschen, einem *Social Defeat* ausgesetzt. Ratten der Kontrollgruppe (n=8) wurden nicht gestresst. Nach zwei Wochen weiteren freien Zugangs zu Wasser und Alkohol wurden die Alkoholflaschen erneut für zwei Wochen entzogen, und das

Experiment wurde mit den selben Tieren in den selben Gruppen wiederholt. Das Alkoholeinnahmeverhalten wurde für weitere acht Tage gemessen, danach wurden die Tiere aller drei Gruppen dekapitiert. Wie oben beschrieben, wurde dabei basal und nach *Restraint-Stress* Blut für die spätere Bestimmung von ACTH und Corticosteron genommen, sowie die Nebennieren herauspräpariert und gewogen.

In einer anderen Gruppe von Ratten (13 Monate; 470-580 g) wurde der Einfluss von *Social Defeat* auf das rückfallartige Trinken unter operanten Bedingungen (siehe Kap. 2.3.2) untersucht. Diese hatten 10 Monate Erfahrung im 4-Flaschenmodell der freiwilligen Alkoholselbstverabreichung im Heimkäfig. Nach zwei Monaten wöchentlichen Trainings in den operanten Boxen wurde das Hebeldruckverhalten dreier Subgruppen untersucht: Die Tiere der wiederholt gestressten Gruppe (n=7) wurden an sechs aufeinanderfolgenden Tagen zu unterschiedlichen Zeiten jeweils einmal einem *Social Defeat*-Stress ausgesetzt. Der letzte *Social Defeat* erfolgte 30 Minuten vor Beginn der operanten Boxensitzung. Die akut gestresste Gruppe (n=8) wurde einmal, 30 Minuten vor Beginn der operanten Boxensitzung, einem *Social Defeat* ausgesetzt. Ratten der Kontrollgruppe (n=8) wurden nicht gestresst.

Die langfristige Entwicklung des Konsumverhaltens von HAB/LAB-Ratten (n=8 pro Linie) im 4-Flaschenparadigma der freiwilligen Alkoholselbstverabreichung wurde durch wöchentliche Messungen über 33 Wochen bestimmt. Nach dieser Zeit wurden die Tiere (12 Monate; 420-620 g) zweimal im Abstand von zwei Wochen einem *Social Defeat*-Stress ausgesetzt. Durch tägliche Messungen wurde der Alkoholkonsum bestimmt.

Nach der Bestimmung des initialen Alkoholkonsums und der Emotionalität (Kapitel 4.3.1.2) wurde der Einfluss verschiedener Stressoren auf das Alkoholeinnahmeverhalten von D2- und B6-Mäusen im Heimkäfig bestimmt. Nach fünfwöchiger Alkoholerfahrung im in Kap 2.3.3 beschriebenen 3-Flaschenmodell der oralen Alkoholselbstverabreichung wurden die Mäuse

(18 Wochen; 24-31 g) in der ersten experimentellen Phase dreimal akut jeweils einem *Social Defeat*-Stress (siehe Kap. 2.4.2) ausgesetzt. Zwischen den Stressexpositionen lagen zwei bzw. drei Wochen.

Drei Wochen nach dem dritten *Social Defeat* wurden die Mäuse einem Beutestress (siehe Kap. 2.4.5) ausgesetzt.

Nach weiteren zwei Wochen wurde eine repetitive *Social Defeat*-Prozedur durchgeführt, d.h. die Tiere wurden an drei aufeinanderfolgenden Tagen je einmal gestresst.

Drei Wochen danach wurde an drei aufeinanderfolgenden Tagen je ein *Forced Swim*- (Kap. 2.4.6), ein *Restraint*- (Kap. 2.4.4) und ein *Social Defeat*-Stress durchgeführt.

Vier Wochen später wurden die Mäuse an drei aufeinanderfolgenden Tagen je einem *Forced Swim*-Stress ausgesetzt.

Die Stressexpositionen wurden zu unterschiedlichen Tageszeiten durchgeführt. Unmittelbar nach jeder Stresserfahrung wurde den Tieren R121919 (1 mg/kg) bzw. Vehikel intragastral verabreicht. Die Behandlungsgruppen blieben dabei über die Dauer des gesamten Experiments gleich, d.h. Tiere, die vor der Bestimmung des Angst-bezogenen Verhaltens in der *Dark/Light*-Box (Kapitel 4.3.1.2) R121919 bzw. Vehikel verabreicht bekamen, wurde unmittelbar nach jeder Stressexposition wiederum R121919 oder Vehikel gegeben. Die im *Dark/Light*-Box Experiment unbehandelte Gruppe wurde über die Dauer des gesamten Experiments hinweg weder experimentell gestresst noch einer Behandlung unterzogen.

Der Einfluss sozialen Stresses auf das zeitnahe, detaillierte Trinkmuster wurde an acht männlichen B6-Mäusen mit einem Gewicht von 22 – 26 g untersucht. Diesen wurde in einem 2-Flaschen-Modell freier Zugang zu Futter, Wasser und 12%-igem Alkohol gewährt. Nach zwei Wochen kamen die Tiere in Trinkometer-Gitterkäfige. Für die Erfassung des Trinkmusters mit Hilfe des Trinkometers (siehe Kapitel 2.3.4) müssen die Trinkflaschen mit Metallkappen versehen sein. Da durch die Metallkappen ein relativ hoher Tropffehler entsteht und deshalb der Alkoholkonsum der Tiere (in g/kg Körpergewicht/Tag) nicht zuverlässig

ermittelt werden kann, wurde den Tieren im täglichen Wechsel neben Trinkflaschen mit Metalldeckeln, Trinkflaschen mit Glasröhrchen (siehe Kapitel 2.3.3) gegeben. Es wurde folglich täglich alternierend das Trinkmuster sowie der Alkoholkonsum der Mäuse bestimmt. Nach weiteren zwei Wochen wurde der soziale Stress (siehe Kapitel 2.4.7) zwischen 17 und 18 Uhr, also kurz vor Beginn der Aktivitätsphase der Tiere durchgeführt. Das Trinkmuster während des Stresses, drei Stunden davor und acht Stunden danach wurde mit Hilfe des Trinkometersystems aufgezeichnet und die Trinkdauer in Sekunden pro einstündigem Aufzeichnungsintervall berechnet. In einer intraindividuellen Gegenüberstellung wurden diese Daten verglichen mit den gemittelten Werten der drei Messtage davor, an denen das Trinkmuster der Mäuse bestimmt wurde.

5.3 Ergebnisse

5.3.1 Basaler Alkoholkonsum

5.3.1.1 Wistar-Ratten

Verhalten während des Social Defeats

Das Verhalten Langzeit-alkoholerfahrener Wistar-Ratten während der wiederholten *Social Defeat*-Expositionen ist in Abb. 13 dargestellt. Ein sehr hoher Anteil des Gesamtverhaltens bestand aus *Freezing* und Immobilität. Während eines Großteils der Zeit zeigten die Tiere zudem Ultraschallvokalisation. Als Kontrollgruppe wurden Wistar-Ratten im gleichen zeitlichen Muster, jedoch ohne Präsenz eines *Residents* in die *Social Defeat*-Käfige gesetzt. Diese zeigten keinerlei *Freezing* oder Ultraschallvokalisation, sondern überwiegend Explorationsverhalten (Daten nicht gezeigt). Dies zeigt, dass der *Social Defeat* ein effektiver Stressor war.

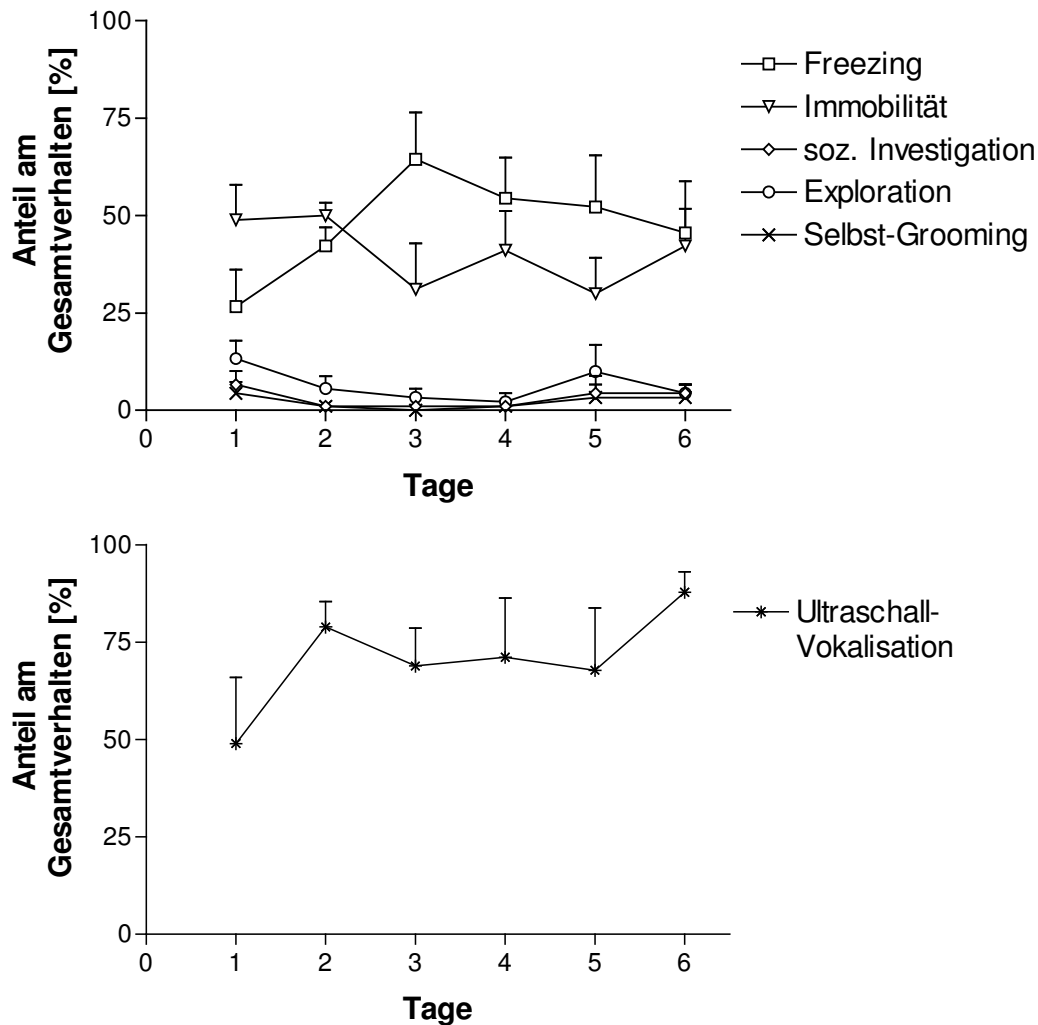


Abb. 13: Verhaltensweisen von Martinsrieder Wistar-Ratten während wiederholten *Social Defeats*. Dargestellt ist die durchschnittliche prozentuale Relation der einzelnen Verhaltensweisen bezogen auf das Gesamtverhalten während der *Social Defeat*-Exposition des jeweiligen Tages + Standardfehler. $n=6$. Als Kontrollgruppe wurden Wistar-Ratten im gleichen zeitlichen Muster, jedoch ohne Präsenz eines *Residents* in die *Social Defeat*-Käfige gesetzt. Diese zeigten keinerlei *Freezing* oder Ultraschallvokalisation, sondern überwiegend Explorationsverhalten (Daten nicht gezeigt).

Einfluss von Social Defeat auf den freiwilligen Alkoholkonsum

Abb. 14 zeigt den Einfluss der wiederholten *Social Defeat* Erfahrung auf den Alkoholkonsum im Heimkäfig. Die Messpunkte der einzelnen Tage wurden gemittelt und zu Intervallen von 5-6 Tagen zusammengefasst. Zweifaktoren-ANOVA (Gruppe x Intervalle) erbrachte keinen signifikanten Unterschied zwischen den wiederholt gestressten und den ungestressten Tieren.

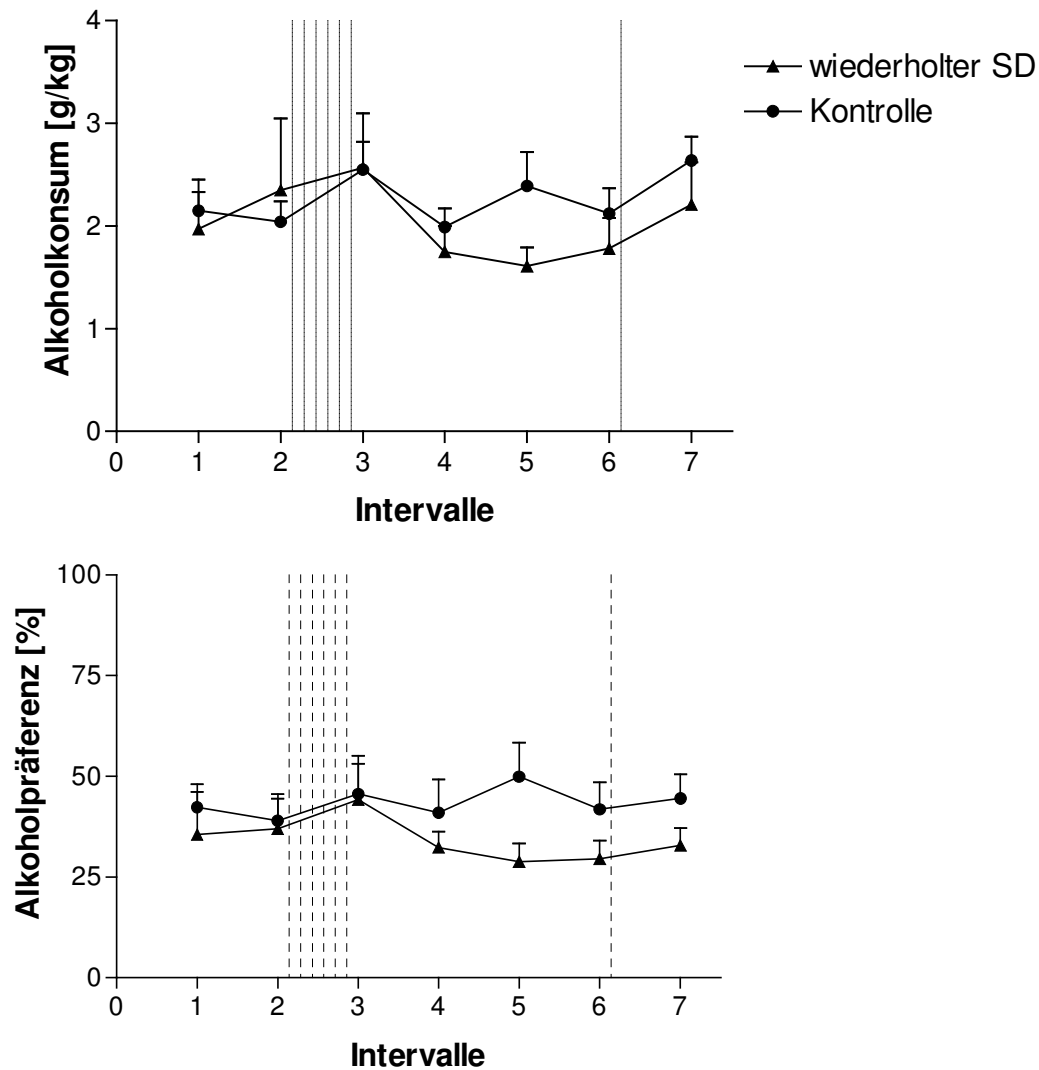


Abb. 14: Alkoholkonsum und Alkoholpräferenz Langzeit-alkoholerfahrener Martinsrieder Wistar-Ratten vor und nach wiederholter *Social Defeat* (SD) Erfahrung. Jede gestrichelte vertikale Linie stellt eine *Social Defeat*-Exposition dar. Die Messpunkte der einzelnen Tage wurden gemittelt und zu Intervallen von 5-6 Tagen zusammengefasst. Tiere der Gruppe „wiederholter *Social Defeat*“ (n=6) wurden zwischen Intervall 2 und 3 je einmal an sechs aufeinanderfolgenden Tagen sowie nach Intervall 6 einmal akut einem *Social Defeat* ausgesetzt. Tiere der Kontrollgruppe (n=5) wurden nicht gestresst. Dargestellt sind über die Tiere einer Gruppe und die Tage eines Intervalls gemittelte Werte + Standardfehler. Wiederholter *Social Defeat* hatte keinen signifikanten Einfluss auf Alkoholkonsum und Alkoholpräferenz (ANOVA).

Einfluss von Social Defeat auf die basale und Stress-induzierte Konzentration von ACTH und Corticosteron und das Gewicht der Nebennieren

Die Konzentrationen von ACTH und Corticosteron im Blut der Gruppe von Langzeit-alkoholerfahrenen Wistar-Ratten, die wiederholt *Social Defeat* ausgesetzt wurden, sowie der ungestressten Langzeit-alkoholerfahrenen Kontrollgruppe und einer ungestressten Langzeit-wassertrinkenden Kontrollgruppe, sind in Abb. 15 dargestellt. Zweifaktoren-ANOVA (Gruppe x Zeitpunkt) erbrachte einen hochsignifikanten Anstieg von ACTH und Corticosteron nach dem *Restraint*, verglichen mit davor (Faktor Zeitpunkt ACTH: $F_{1,15}=49,4$; $p<0,001$; Corticosteron: $F_{1,15}=193,6$; $p<0,001$). Zwischen den Gruppen ergab sich jedoch kein signifikanter Unterschied. Auch im Gewicht der Nebennieren zeigte sich kein Unterschied zwischen den Gruppen (Abb. 16).

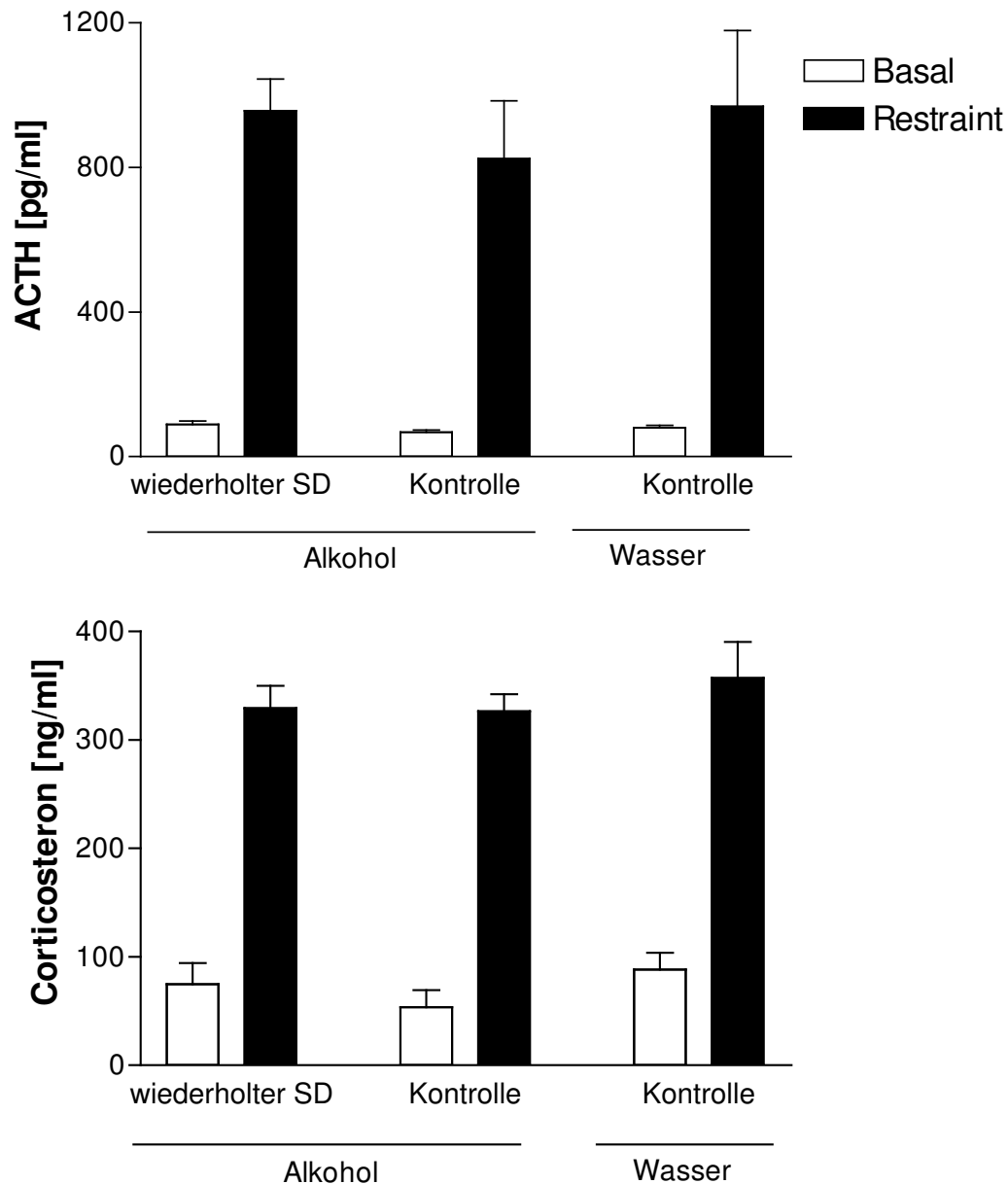


Abb. 15: Blutkonzentrationen von ACTH und Corticosteron bei Langzeit-alkoholerfahrenen bzw. Langzeit-wassertrinkenden Martinsrieder Wistar-Ratten, basal und unmittelbar nach 15-minütigem *Restraint*-Stress. Die Tiere der Gruppe „wiederholter *Social Defeat*“ (SD; n=6) wurden einem wiederholtem *Social Defeat* (an sechs aufeinanderfolgenden Tagen jeweils eine Exposition) sowie einem akuten *Social Defeat* ausgesetzt. Tiere der Alkoholkontrollgruppe (n=5) sowie der Wasserkontrollgruppe (n=8) erfuhren keinen *Social Defeat*. Dargestellt sind Mittelwerte + Standardfehler. *Restraint*-Stress führte zu einem signifikanten Anstieg von ACTH und Corticosteron ($p < 0,001$); weder basal noch nach *Restraint* unterschieden sich die drei Behandlungsgruppen „wiederholter *Social Defeat*“, „Alkoholkontrolle“ und „Wasserkontrolle“ signifikant voneinander (ANOVA).

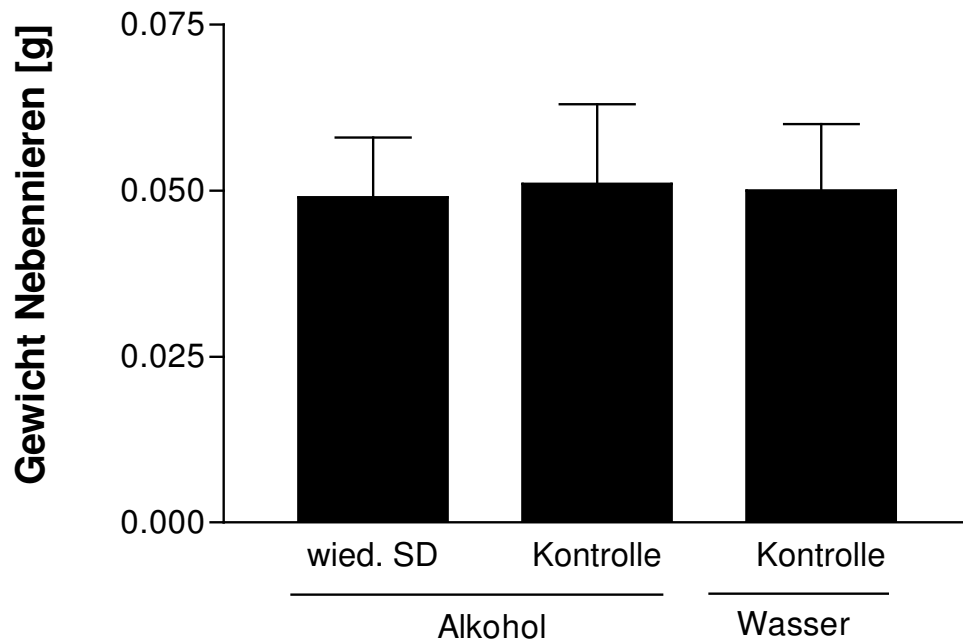


Abb. 16: Gewicht der Nebennieren Langzeit-alkoholerfahrener bzw. Langzeit-wassertrinkender Martinsrieder Wistar-Ratten. Die Tiere der Gruppe „wiederholter *Social Defeat*“ (SD; n=6) wurden im vorigen Experiment einem wiederholtem *Social Defeat* (an sechs aufeinanderfolgenden Tagen jeweils eine Exposition) sowie einem akuten *Social Defeat* ausgesetzt. Tiere der Alkoholkontrollgruppe (n=5) sowie der Wasserkontrollgruppe (n=8) wurden während des vorigen Experiments nicht gestresst. Dargestellt sind Mittelwerte + Standardfehler. Zwischen den drei Behandlungsgruppen zeigte sich kein signifikanter Unterschied im Gewicht der Nebennieren (ANOVA).

5.3.1.2 HAB/LAB-Ratten

Langzeit-Alkoholkonsum

Eine Zweifaktoren-ANOVA (Linie x Wochen) erbrachte keinen signifikanten Unterschied zwischen HAB- und LAB-Ratten im Alkoholkonsum bzw. der Alkoholpräferenz (Abb. 17).

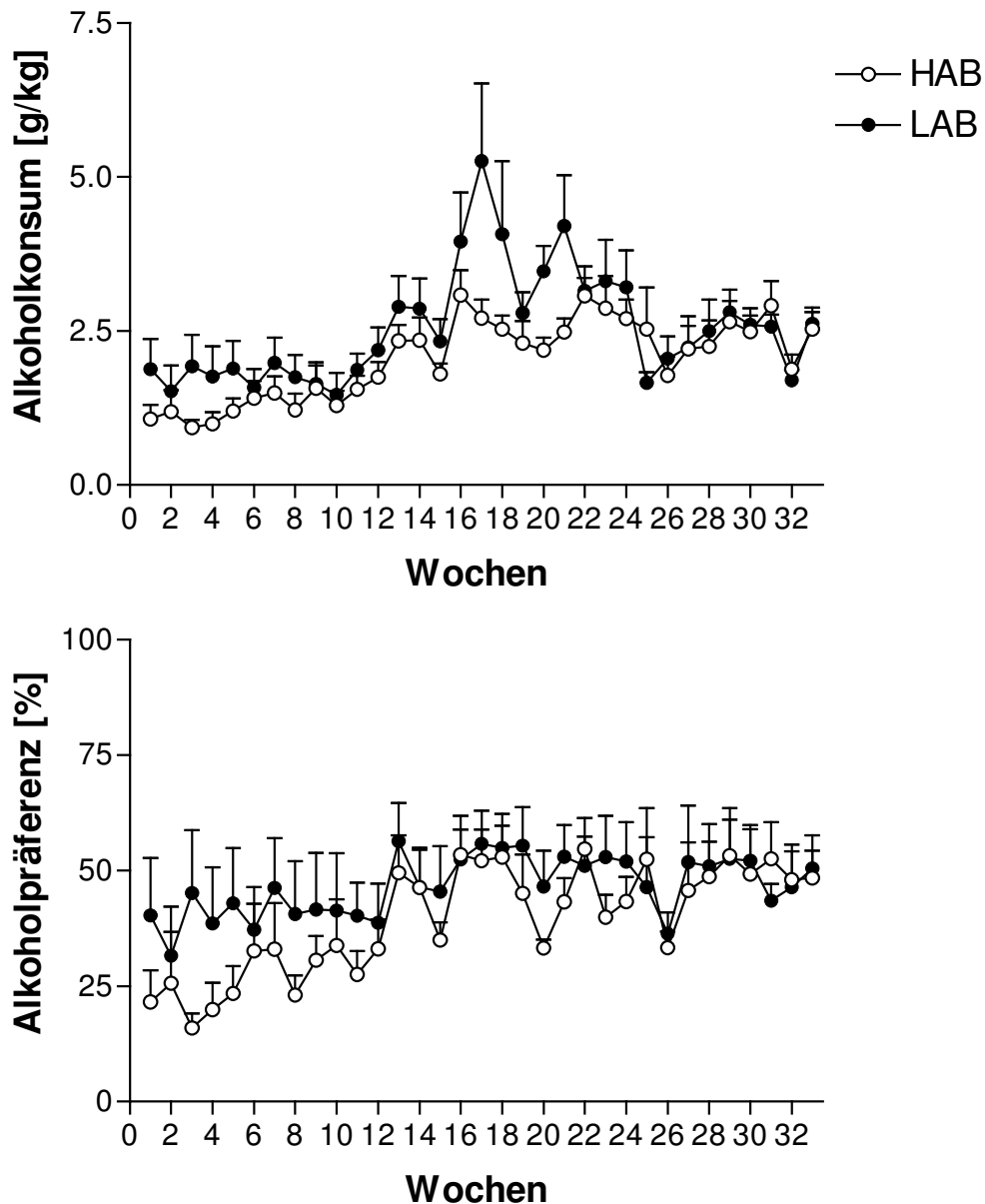


Abb. 17: Langzeit-Alkoholkonsum und Alkoholpräferenz von HAB/LAB-Ratten. Dargestellt sind Mittelwerte + Standardfehler. HAB = *high anxiety-related behaviour* (hohe Angstdisposition), LAB = *low anxiety-related behaviour* (niedrige Angstdisposition). n=8 pro Gruppe. Die beiden Linien unterschieden sich weder im Alkoholkonsum noch in der Alkoholpräferenz signifikant voneinander (ANOVA).

Verhalten während des Social Defeats

Das Verhalten der HAB/LAB-Ratten während des *Social Defeats* ist in Abb. 18 dargestellt. Die beiden Linien unterschieden sich nicht in den Parametern *Freezing*, *Exploration*, Körperpflege und Ultraschall-Vokalisation. HAB-Ratten zeigten signifikant weniger soziale

Investigation als LAB-Tiere ($p < 0,05$; Mann-Whitney U-Test). Die höhere Immobilität der HAB-Ratten verfehlte knapp die Signifikanzgrenze ($p = 0,058$). Das Verhalten der Tiere während des zweiten *Social Defeat* war ähnlich (Daten nicht gezeigt).

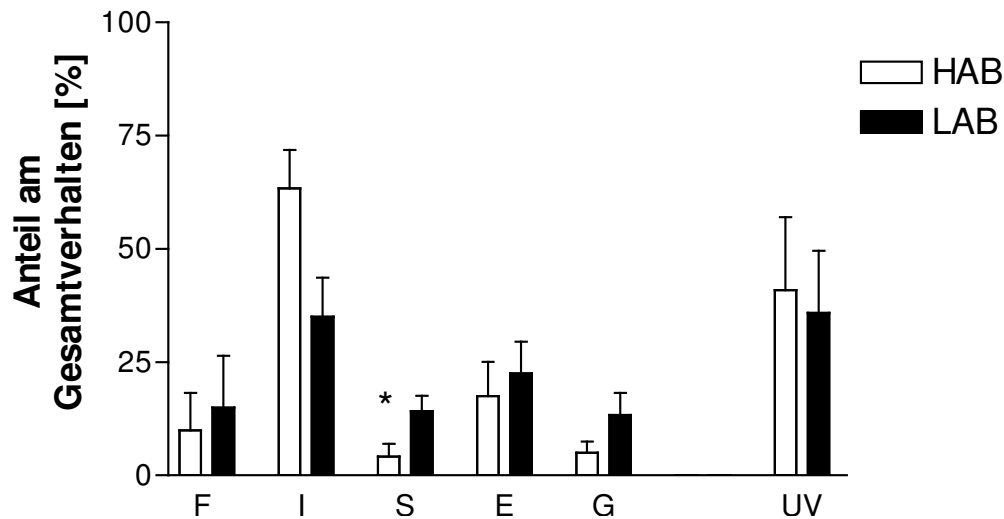


Abb. 18: Verhaltensweisen von HAB/LAB-Ratten während *Social Defeats*. Dargestellt ist der durchschnittliche prozentuale Anteil der einzelnen Verhaltensweisen am Gesamtverhalten während der 15-minütigen *Social Defeat*-Exposition + Standardfehler. HAB = *high anxiety-related behaviour* (hohe Angstdisposition), LAB = *low anxiety-related behaviour* (niedrige Angstdisposition). $n=8$ pro Gruppe. F = *Freezing*, I = Immobilität, S = Soziale Investigation, E = Exploration, G = Körperpflege (*Grooming*), UV = Ultraschallvokalisation. * $p < 0,05$ vs. LAB (Mann Whitney U-Test).

Einfluss von Social Defeat auf den freiwilligen Alkoholkonsum

Keine der beiden *Social Defeat*-Expositionen hatte bei HAB- oder LAB-Ratten einen zeitnahen signifikanten Einfluss auf den freiwilligen Alkoholkonsum. Exemplarisch sind Alkoholkonsum und -präferenz drei Tage vor und drei Tage nach dem ersten *Social Defeat* in Abb. 19 dargestellt. Auch längerfristig wurde das Alkoholeinnahmeverhalten der HAB/LAB-Ratten nicht durch *Social Defeat* beeinflusst. Abb. 20 zeigt den durchschnittlichen täglichen Alkoholkonsum vor und jeweils zwei Wochen nach den beiden *Social Defeat*-Expositionen.

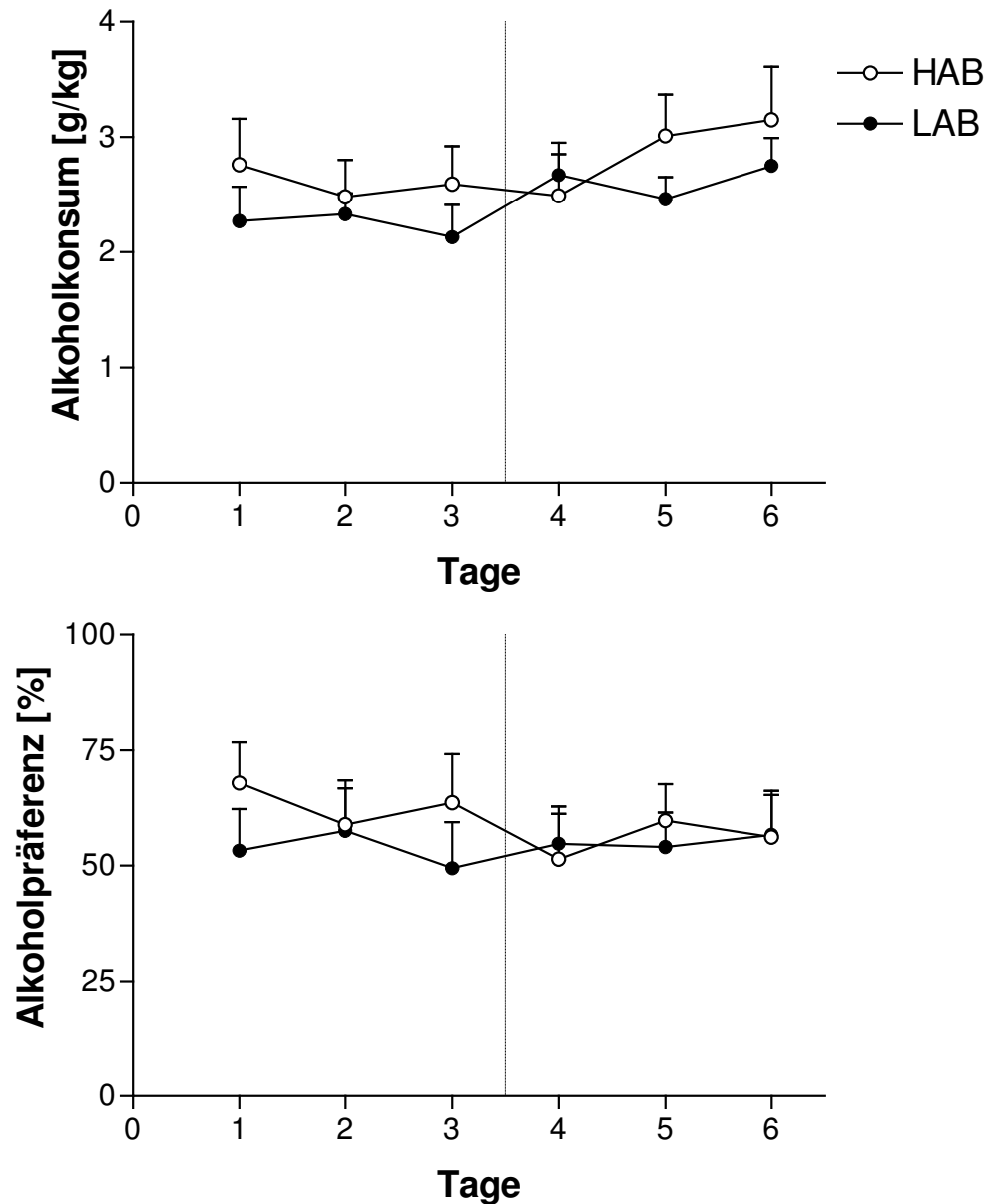


Abb. 19: Alkoholkonsum und Alkoholpräferenz Langzeit-alkoholerfahrener HAB/LAB-Ratten drei Tage vor und drei Tage nach einer *Social Defeat*-Exposition (gestrichelte Linie). Dargestellt sind Mittelwerte + Standardfehler. HAB = *high anxiety-related behaviour* (hohe Angstdisposition), LAB = *low anxiety-related behaviour* (niedrige Angstdisposition). $n=8$ pro Gruppe. *Social Defeat* hatte keinen zeitnahen signifikanten Einfluss auf Alkoholkonsum und Alkoholpräferenz von HAB- bzw. LAB-Ratten (ANOVA).

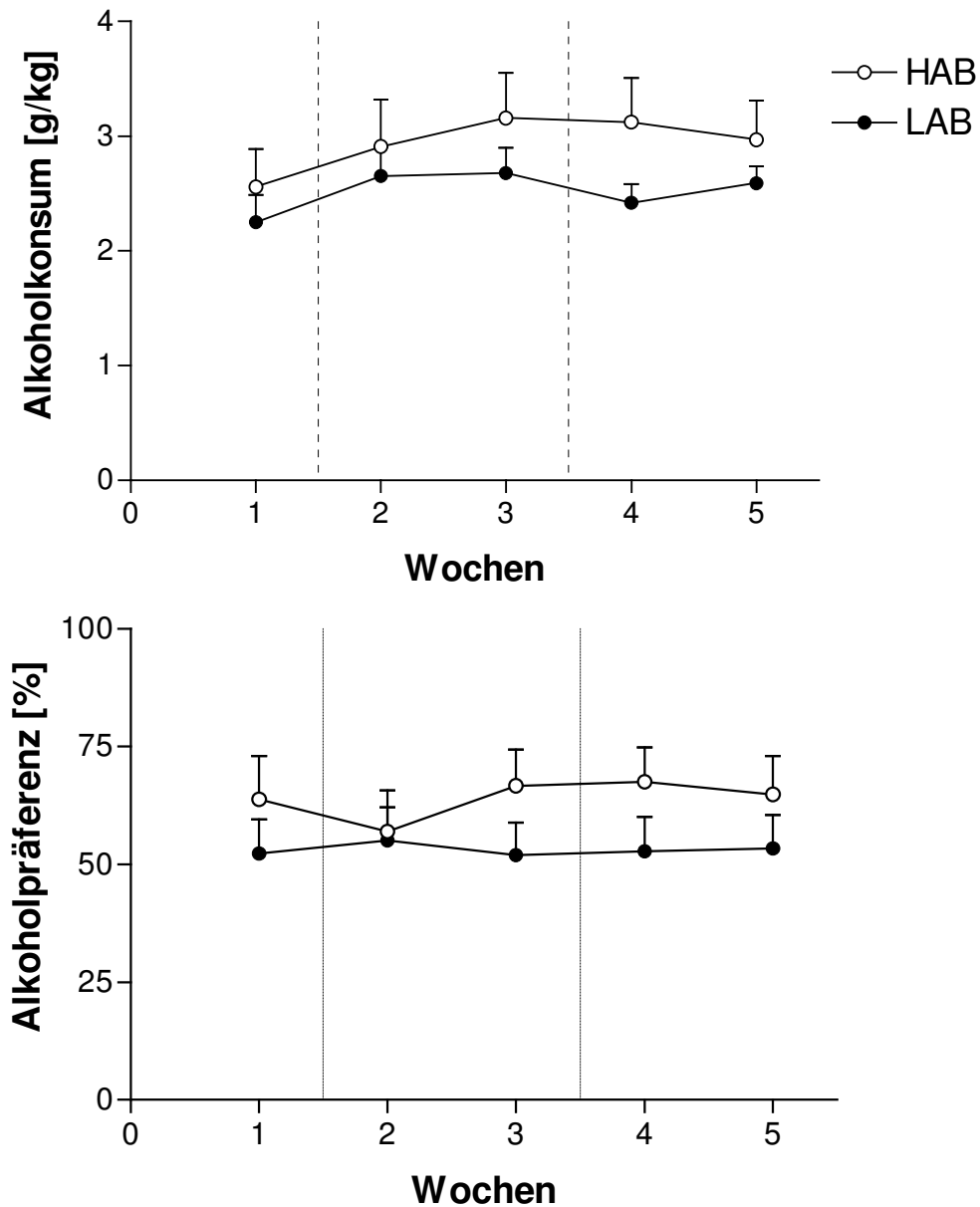


Abb. 20: Alkoholkonsum und Alkoholpräferenz Langzeit-alkoholerfahrener HAB/LAB-Ratten vor und nach zweimaliger akuter *Social Defeat*-Erfahrung. Die gestrichelten Linien stellen die Zeitpunkte der *Social Defeat*-Expositionen dar. Die Messpunkte der einzelnen Tage wurden gemittelt und zu Intervallen von sieben Tagen zusammengefasst. Dargestellt sind über die Tiere einer Gruppe und die Tage eines Intervalls gemittelte Werte + Standardfehler. HAB = *high anxiety-related behaviour* (hohe Angstdisposition), LAB = *low anxiety-related behaviour* (niedrige Angstdisposition). n=8 pro Gruppe. Die *Social Defeat*-Expositionen hatten keinen signifikanten Einfluss auf Alkoholkonsum und Alkoholpräferenz von HAB- bzw. LAB-Ratten (ANOVA).

5.3.1.3 B6/D2-Mäuse

Einfluss verschiedener Stressoren auf den freiwilligen Alkoholkonsum

Der freiwillige Alkoholkonsum von B6- und D2-Mäusen im Heimkäfig nach dem ersten, zweiten und dritten akuten *Social Defeat* ist in Abb. 21, 22 und 23 dargestellt. Alkoholkonsum und Alkoholpräferenz an den drei Tagen vor und den drei Tagen nach der Stressexposition wurden für jede der beiden Linien einzeln in einer Dreifaktoren-ANOVA (Behandlung x vor/nach Stress x Tage) untersucht. Keine der drei Stressexpositionen hatte einen signifikanten Einfluss auf das Alkoholeinnahmeverhalten der B6- oder D2-Mäuse.

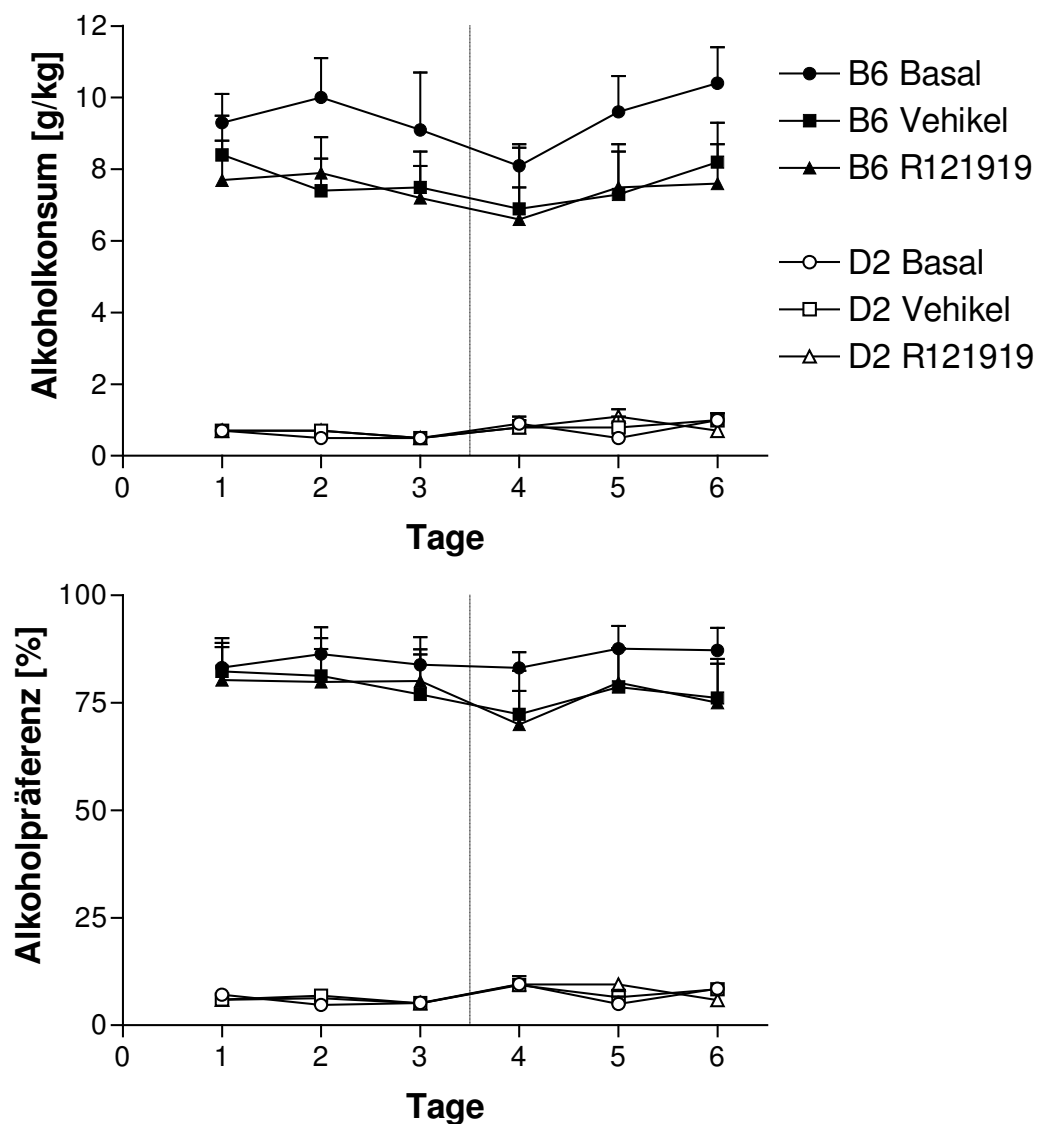


Abb. 21: Alkoholkonsum und Alkoholpräferenz von C57BL/6J OlaHsd (B6) und DBA/2J OlaHsd (D2) Mäusen vor und nach der ersten akuten *Social Defeat*-Exposition (gestrichelte Linie). Tiere der Gruppen „Basal“ blieben ungestresst, Tieren der Gruppen „Vehikel“ wurde unmittelbar nach der Stressexposition Vehikel, Tieren der

Gruppen „R121919“ der CRHR1-Antagonist R121919 (1 mg/kg, i.g.) appliziert. Dargestellt sind Mittelwerte + Standardfehler. n=8-10 pro Gruppe. Die *Social Defeat*-Exposition hatte bei keiner der drei Behandlungsgruppen der B6- bzw. D2-Mäuse einen signifikanten Effekt auf Alkoholkonsum oder Alkoholpräferenz (ANOVA).

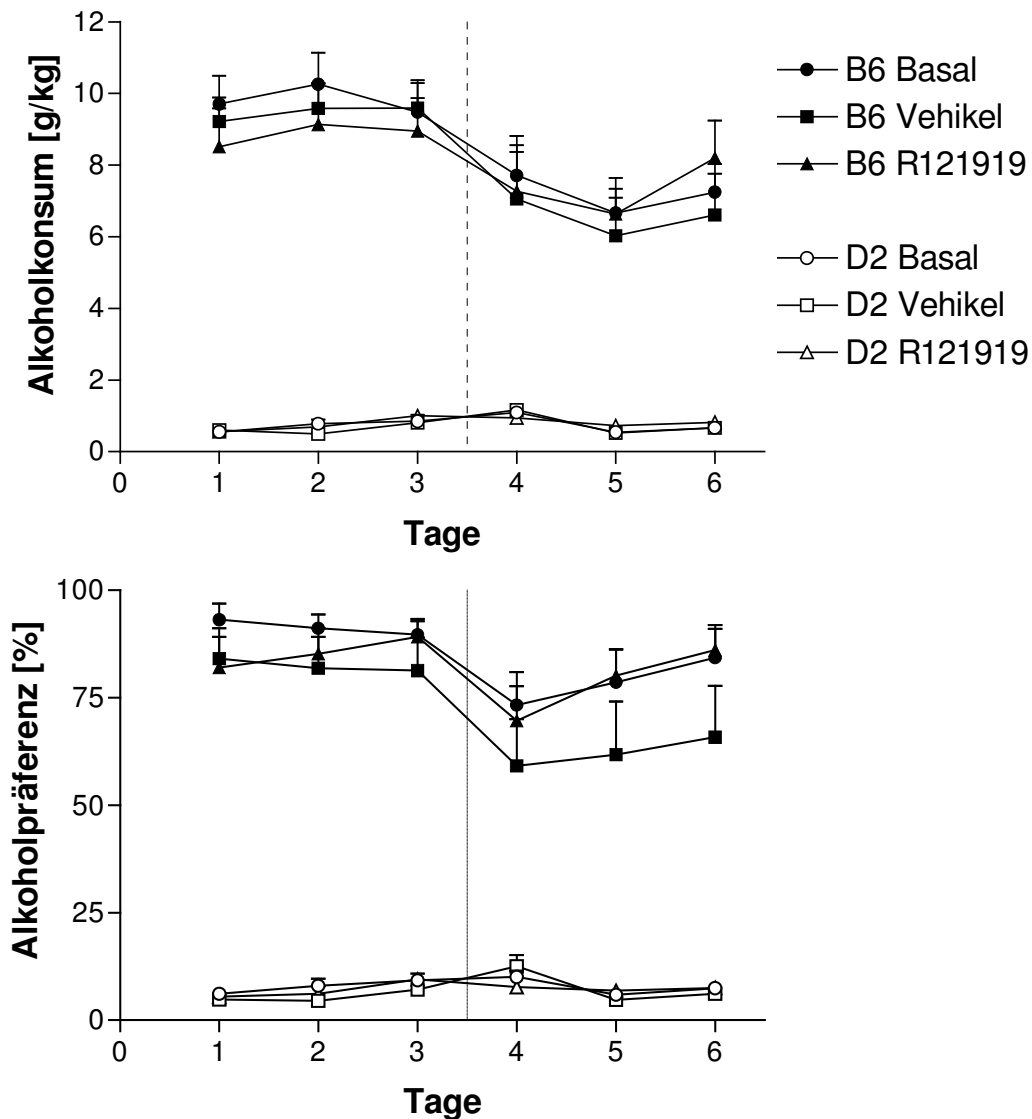


Abb. 22: Alkoholkonsum und Alkoholpräferenz von C57BL/6J0laHsd (B6) und DBA/20laHsd (D2) Mäusen vor und nach der zweiten akuten *Social Defeat*-Exposition (gestrichelte Linie). Tiere der Gruppen „Basal“ blieben ungestresst, Tieren der Gruppen „Vehikel“ wurde unmittelbar nach der Stressexposition Vehikel, Tieren der Gruppen „R121919“ der CRHR1-Antagonist R121919 (1 mg/kg, i.g.) appliziert. Dargestellt sind Mittelwerte + Standardfehler. n=8-10 pro Gruppe. Die *Social Defeat*-Exposition hatte bei keiner der drei

Behandlungsgruppen der B6- bzw. D2-Mäuse einen signifikanten Effekt auf Alkoholkonsum oder Alkoholpräferenz (ANOVA).

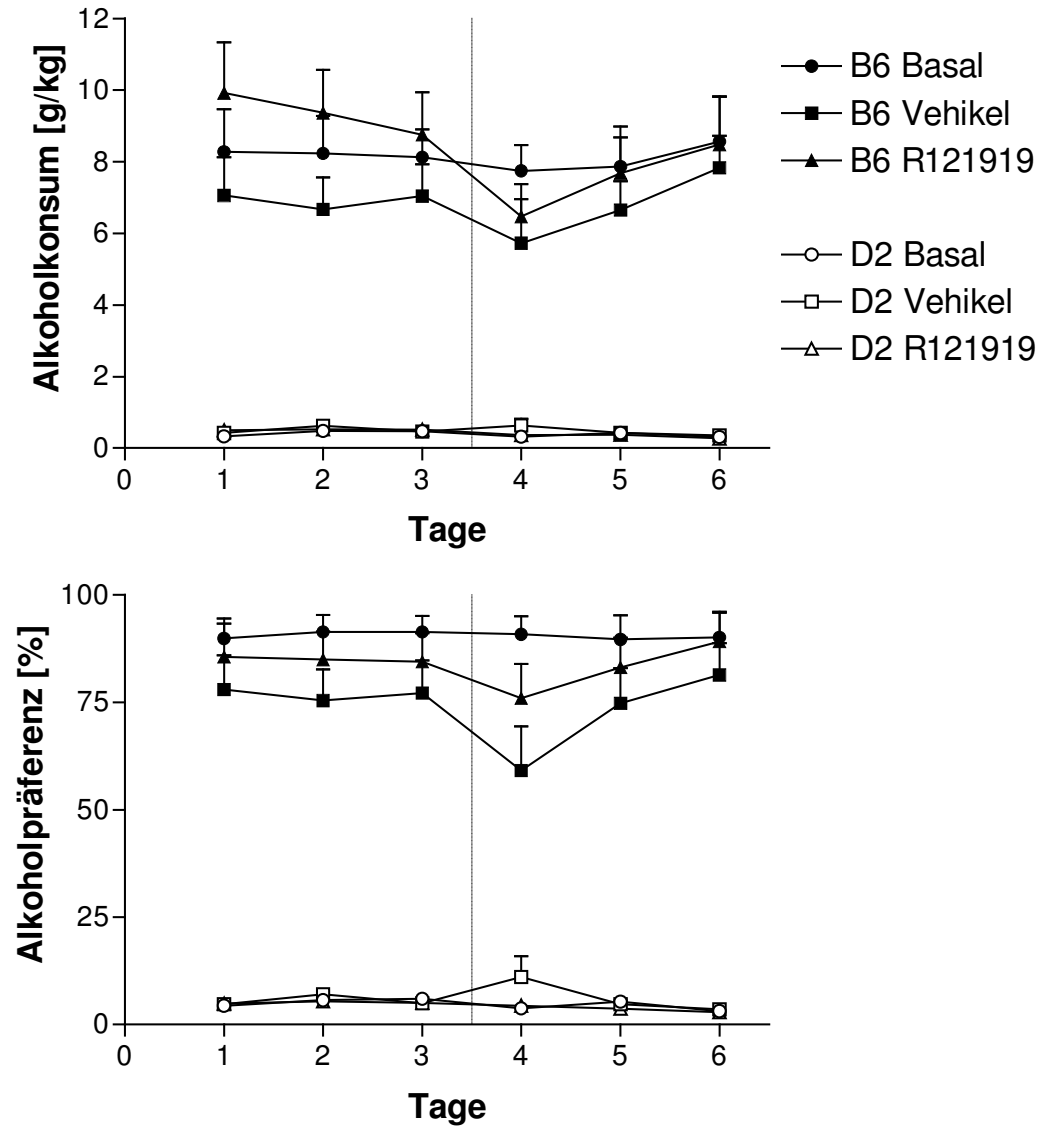


Abb. 23: Alkoholkonsum und Alkoholpräferenz von C57BL/6J OlaHsd (B6) und DBA/2J OlaHsd (D2) Mäusen vor und nach der dritten akuten *Social Defeat*-Exposition (gestrichelte Linie). Tiere der Gruppen „Basal“ blieben ungestresst, Tieren der Gruppen „Vehikel“ wurde unmittelbar nach der Stressexposition Vehikel, Tieren der Gruppen „R121919“ der CRHR1-Antagonist R121919 (1 mg/kg, i.g.) appliziert. Dargestellt sind Mittelwerte + Standardfehler. n=8-10 pro Gruppe. Die *Social Defeat*-Exposition hatte bei keiner der drei Behandlungsgruppen der B6- bzw. D2-Mäuse einen signifikanten Effekt auf Alkoholkonsum oder Alkoholpräferenz (ANOVA).

Auch akuter Beutestress hatte weder bei B6- noch bei D2-Mäusen einen signifikanten Einfluss auf Alkoholkonsum oder -präferenz (Abb. 24).

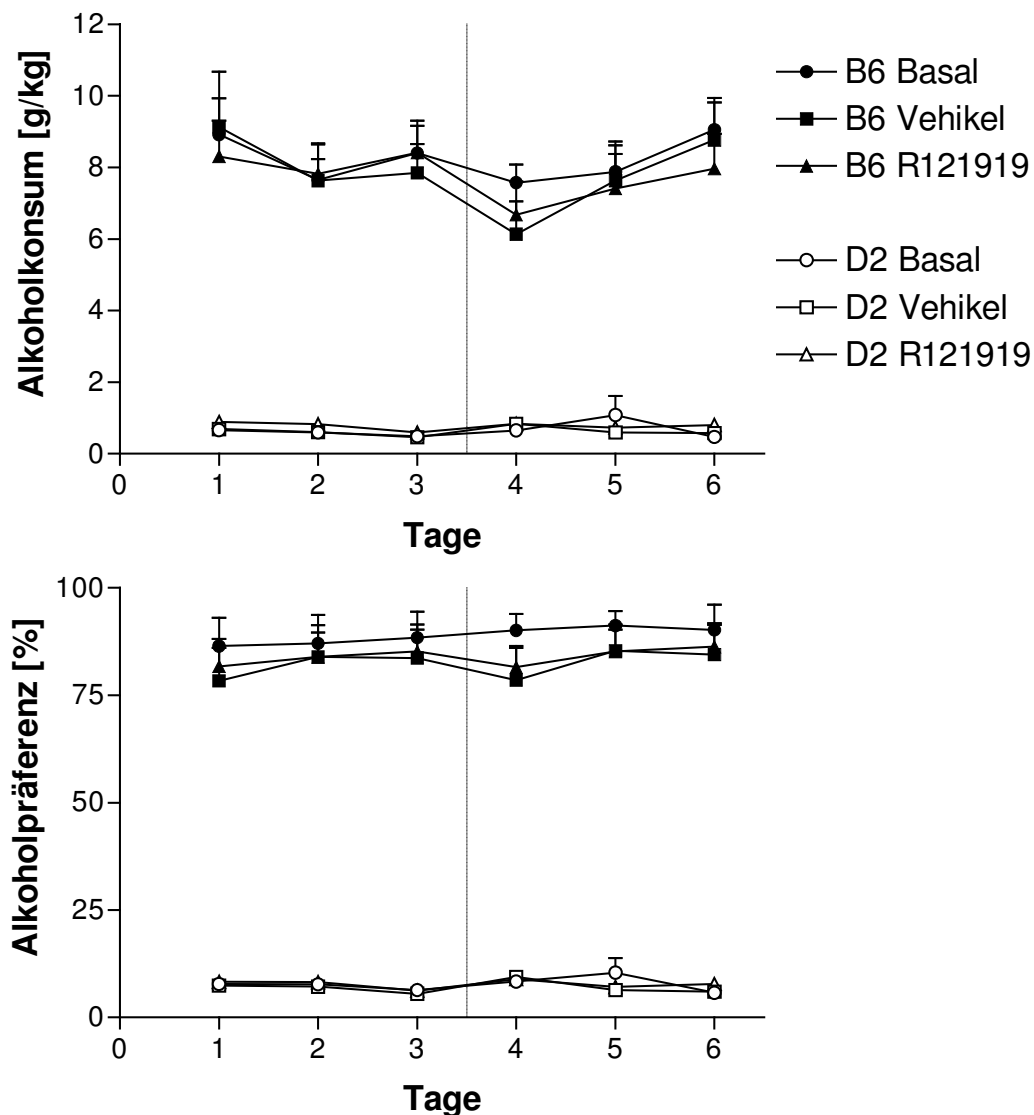


Abb. 24: Alkoholkonsum und Alkoholpräferenz von C57BL/6J OlaHsd (B6) und DBA/2J OlaHsd (D2) Mäusen vor und nach akutem Beutestress (gestrichelte Linie). Tiere der Gruppen „Basal“ blieben ungestresst, Tieren der Gruppen „Vehikel“ wurde unmittelbar nach der Stressexposition Vehikel, Tieren der Gruppen „R121919“ der CRHR1-Antagonist R121919 (1 mg/kg, i.g.) appliziert. Dargestellt sind Mittelwerte + Standardfehler. n=8-10 pro Gruppe. Die Beutestress-Exposition hatte bei keiner der drei Behandlungsgruppen der B6- bzw. D2-Mäuse einen signifikanten Effekt auf Alkoholkonsum oder Alkoholpräferenz (ANOVA).

Bei wiederholten Stressexpositionen wurden die Tiere an drei aufeinanderfolgenden Tagen jeweils einmal gestresst. Die drei Messpunkte nach der ersten, zweiten und dritten

Stresserfahrung wurden einzeln für beide Linien in einer Zweifaktoren-ANOVA (Behandlung x Tage) mit den drei Messpunkten vor dem wiederholten Stress verglichen. Wiederholter *Social Defeat* hatte in keiner der beiden Linien signifikanten Einfluss auf Alkoholkonsum oder Alkoholpräferenz (Abb. 25).

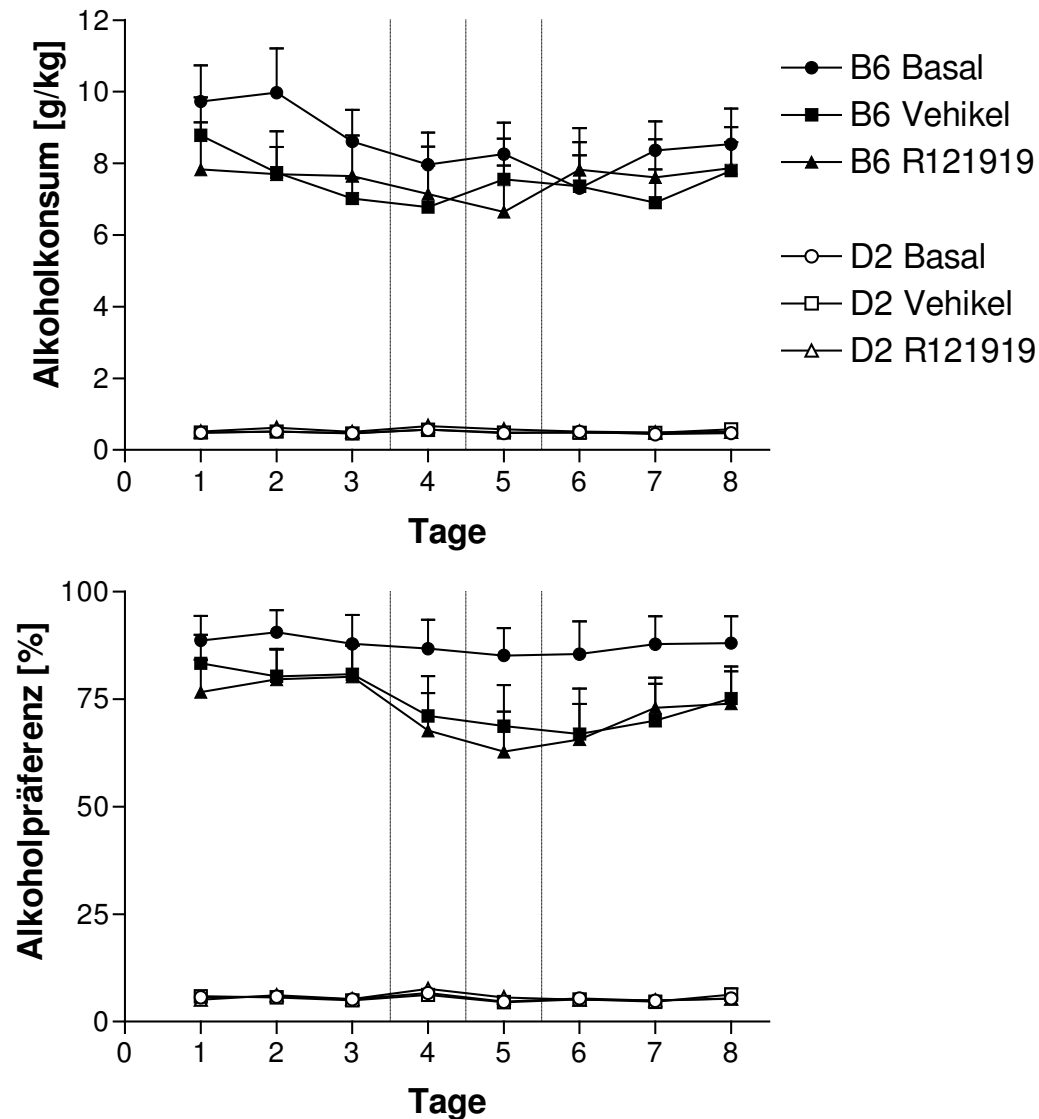


Abb. 25: Alkoholkonsum und Alkoholpräferenz von C57BL/6JolaHsd (B6) und DBA/2OlaHsd (D2) Mäusen vor und nach wiederholtem *Social Defeat*-Stress. Jede vertikale gestrichelte Linie stellt den Zeitpunkt einer Stressexposition dar. Tiere der Gruppen „Basal“ blieben ungestresst, Tieren der Gruppen „Vehikel“ wurde unmittelbar nach jeder Stressexposition Vehikel, Tieren der Gruppen „R121919“ der CRHR1-Antagonist R121919 (1 mg/kg, i.g.) appliziert. Dargestellt sind Mittelwerte + Standardfehler. n=8-10 pro Gruppe. Die wiederholte *Social Defeat*-Exposition hatte bei keiner der drei Behandlungsgruppen der B6- bzw. D2-Mäuse einen signifikanten Effekt auf Alkoholkonsum oder Alkoholpräferenz (ANOVA).

Variierter Stress verminderte vorübergehend den Alkoholkonsum von B6-Mäusen; die Gabe von R121919 nach jeder Stressexposition hatte darauf keinen Einfluss (Abb. 26). Dies wird aus der signifikanten Interaktion der beiden Faktoren Behandlung x Tage einer Zweifaktoren-ANOVA ($F_{10,125}=2,2$; $p<0,05$) und nachgeschalteter Lokalisation der Unterschiede mittels Newman-Keuls-Test ersichtlich. Die Gesamtalkoholpräferenz der B6-Tiere war nicht signifikant verändert. Die genauere Analyse der Daten offenbarte jedoch eine verringerte Präferenz für die 10%-ige Alkohollösung (Daten nicht gezeigt). Alkoholkonsum und -präferenz von D2-Mäusen wurden durch den wiederholten, unvorhersehbaren Stress nicht signifikant beeinflusst.

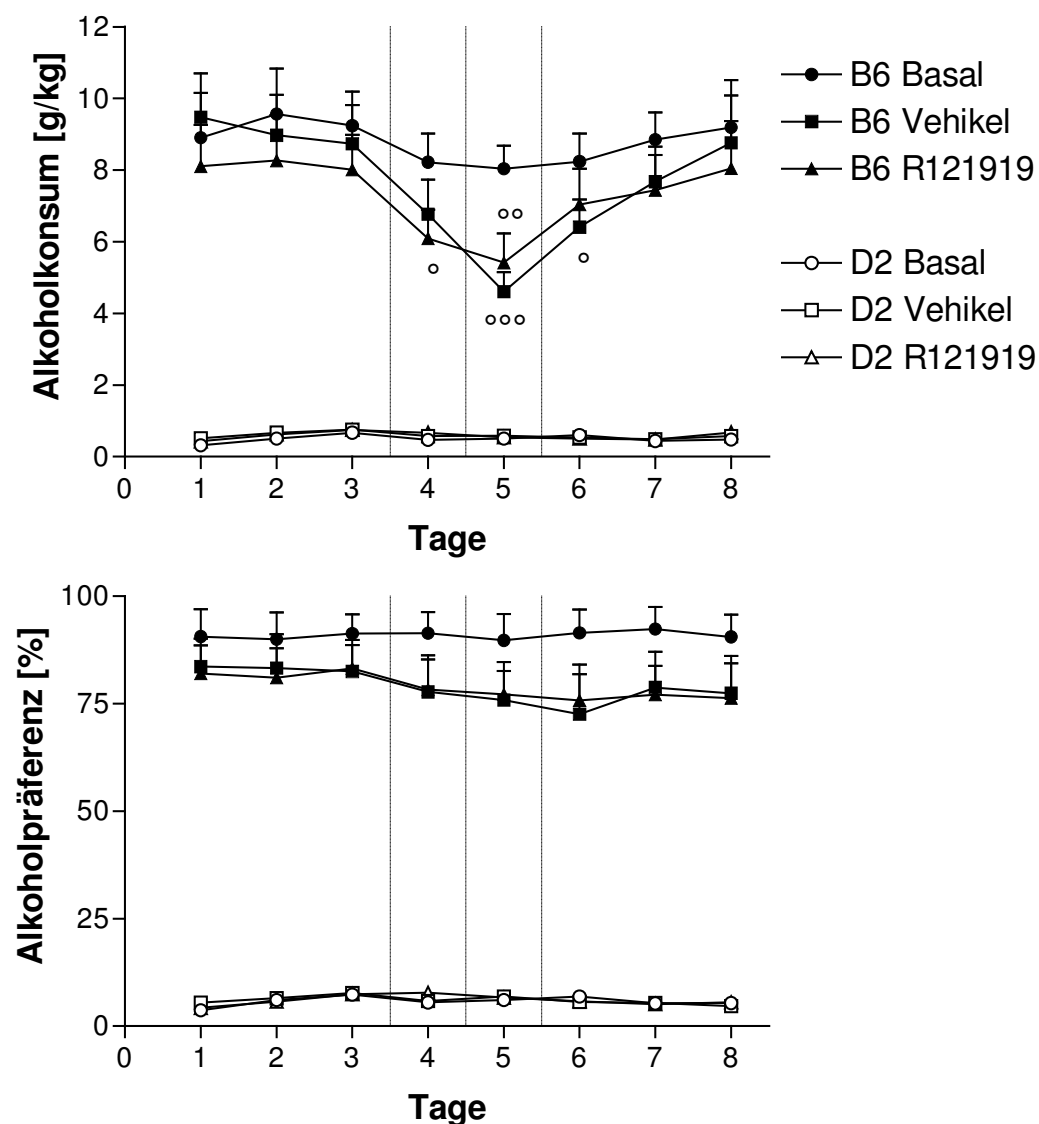


Abb. 26: Alkoholkonsum und Alkoholpräferenz von C57BL/6JolaHsd (B6) und DBA/2OlaHsd (D2) Mäusen vor und nach variiertem Stress. Jede vertikale gestrichelte Linie stellt den Zeitpunkt einer Stressexposition dar. Die Reihenfolge der Stressoren war: *Social Defeat*, *Restraint*, *Forced Swimming*. Tiere der Gruppen „Basal“ blieben ungestresst, Tieren der Gruppen „Vehikel“ wurde unmittelbar nach jeder Stressexposition Vehikel, Tieren der Gruppen „R121919“ der CRHR1-Antagonist R121919 (1 mg/kg, i.g.) appliziert. Dargestellt sind Mittelwerte + Standardfehler. n=8-10 pro Gruppe. ° p<0,05, °° p<0,01, °°° p<0,001 vs. alle drei Tage vor Beginn der variierten Stressexposition (Newman-Keuls-Test).

Auch wiederholter *Forced Swim*-Stress verringerte signifikant den Alkoholkonsum von B6-Mäusen (Behandlung x Tage: $F_{10,125}=2,7$; $p<0,01$), nicht aber deren Gesamtalkoholpräferenz. Wie nach dem variierten Stress war auch hier die Präferenz für den 10%-igen Alkohol erniedrigt (Daten nicht gezeigt). Auf das Alkoholeinnahmeverhalten von D2-Mäusen hatte *Forced Swim*-Stress keinen Einfluss (Abb. 27).

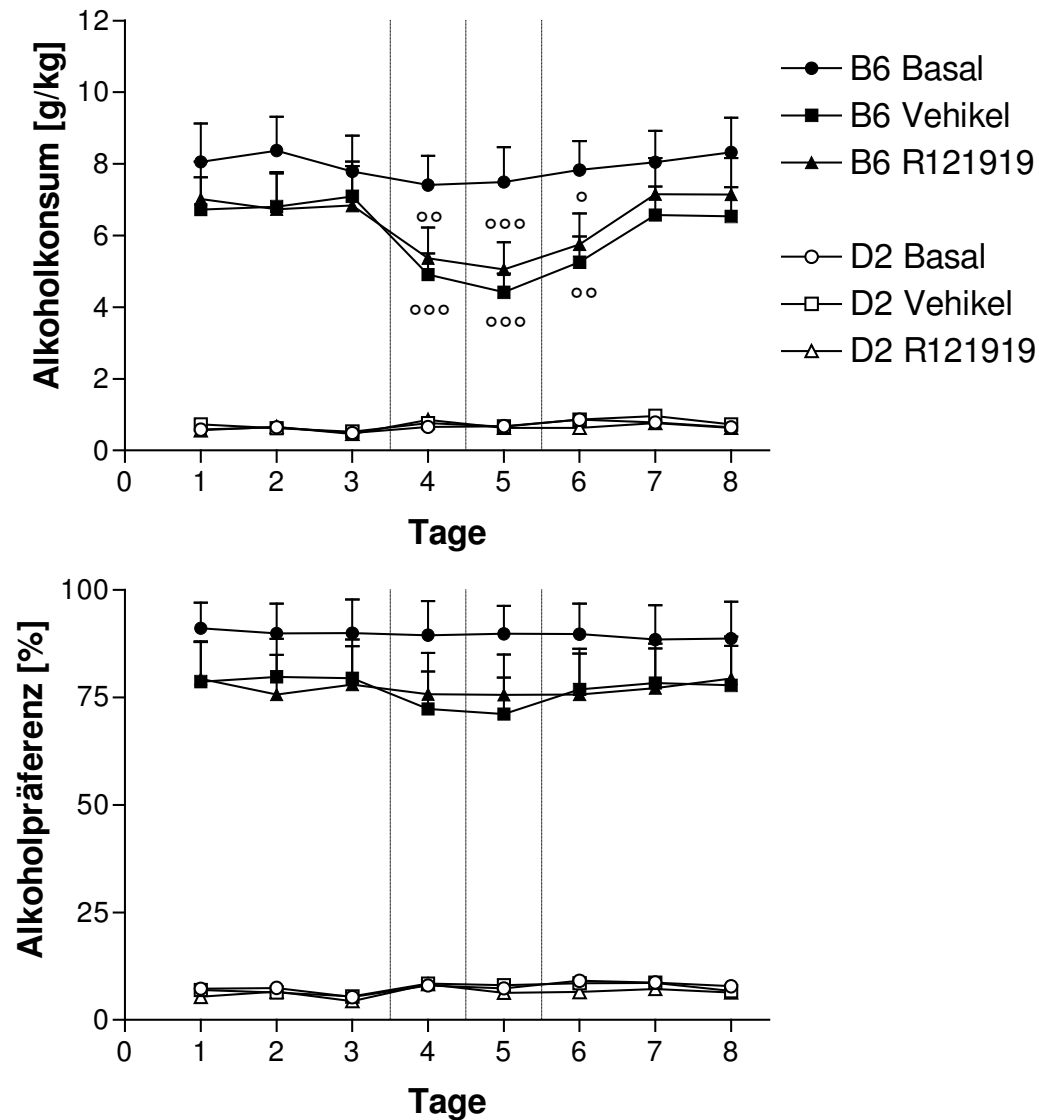


Abb. 27: Alkoholkonsum und Alkoholpräferenz von C57BL/6JolaHsd (B6) und DBA/2OlaHsd (D2) Mäusen vor und nach wiederholtem *Forced Swim*-Stress. Jede vertikale gestrichelte Linie stellt den Zeitpunkt einer Stressexposition dar. Tiere der Gruppen „Basal“ blieben ungestresst, Tieren der Gruppen „Vehikel“ wurde unmittelbar nach jeder Stressexposition Vehikel, Tieren der Gruppen „R121919“ der CRHR1-Antagonist R121919 (1 mg/kg, i.g.) appliziert. Dargestellt sind Mittelwerte + Standardfehler. $n=8-10$ pro Gruppe. ° $p<0,05$, °° $p<0,01$, °°° $p<0,001$ vs. alle drei Tage vor Beginn der wiederholten *Forced Swim*-Exposition (Newman-Keuls-Test).

Verhalten während wiederholtem Forced Swimmings

Abb. 28 zeigt das Verhalten von B6- und D2-Mäusen während wiederholter *Forced Swim*-Exposition. Als Parameter passiver *Coping*-Strategie wurde die Verhaltensweise *Floating*

analysiert. Dreifaktoren-ANOVA (Stamm x Behandlung x Durchgänge) erbrachte mehr *Floating* bei B6- als bei D2-Mäusen (Faktor Linie: $F_{1,31}=5,4$; $p<0,05$). Das *Floating* nahm über die drei Durchgänge hinweg zu (Faktor Durchgang: $F_{2,62}=29,8$; $p<0,0001$). Wie beschrieben wurden die Mäuse über das gesamte Experiment hinweg nach jeder Stressexposition mit R121919 bzw. Vehikel behandelt. Eine nicht signifikante Interaktion der Faktoren Linie x Behandlung sowie Behandlung x Durchgang deutet darauf hin, dass dabei R121919 keinen Einfluss auf das Verhalten während *Forced Swimmings* hatte. Analysiert man jedoch beide Stämme einzeln mittels Zweifaktoren-ANOVA (Behandlung x Durchgänge), so findet man bei R121919 behandelten B6-Tieren eine Verringerung des *Floatings* (Faktor Behandlung: $F_{1,18}=5,0$; $p<0,05$). Bei D2-Mäusen ergab sich keine Signifikanz im Faktor Behandlung.

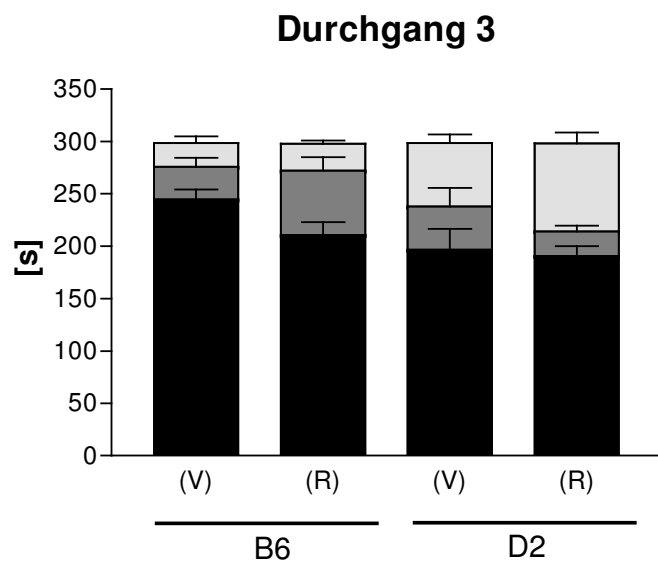
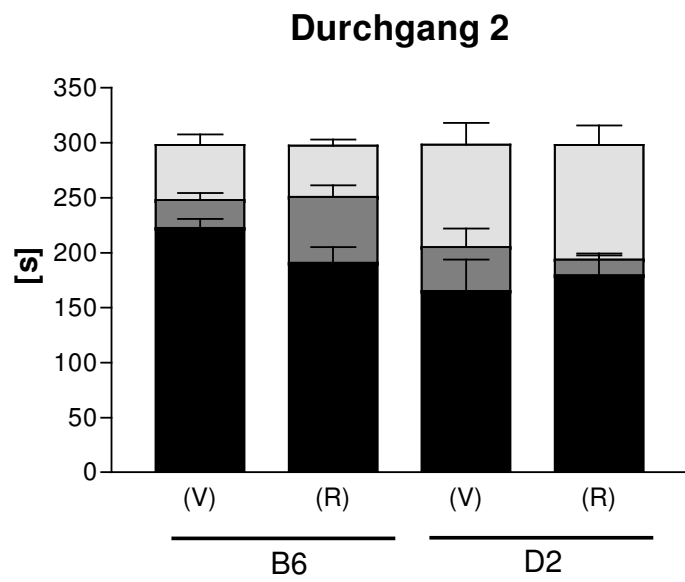
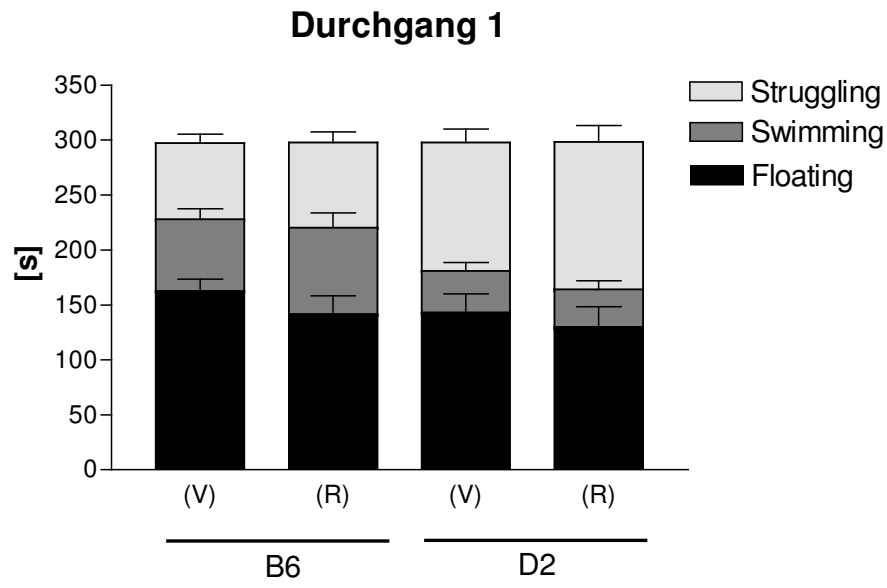


Abb. 28: Verhaltensparameter von C57BL/6JolaHsd (B6) und DBA/2OlaHsd (D2) Mäusen während wiederholter *Forced Swim*-Exposition. Tieren der Gruppen „(V)“ wurde während des gesamten Experiments zum Einfluss verschiedener Stressoren auf den freiwilligen Alkoholkonsum unmittelbar nach jeder Stressexposition Vehikel, Tieren der Gruppen „(R)“ nach jeder Stressexposition der CRHR1-Antagonist R121919 (1 mg/kg, i.g.) appliziert. Dargestellt sind Mittelwerte + Standardfehler. n=8-10 pro Gruppe. Als Parameter passiver *Coping*-Strategie wurde in einer Dreifaktoren-ANOVA die Verhaltensweise *Floating* analysiert. Über die drei Durchgänge hinweg zeigten B6- signifikant mehr *Floating* als D2-Mäuse ($p<0,05$). Bei allen Gruppen nahm das *Floating* im Verlauf der Durchgänge signifikant zu ($p<0,0001$). In einer Zweifaktoren-ANOVA wurde der Einfluss der R121919-Gabe nach jeder Stressexposition auf das *Floating*-Verhalten untersucht. Diese Behandlung hatte keinen Einfluss auf das Verhalten der D2-Mäuse, während das *Floating* der B6-Mäuse dadurch signifikant verringert war ($p<0,05$).

Langzeit-Alkoholkonsum

Der Langzeit-Alkoholkonsum der B6- und D2-Mäuse vor und nach den verschiedenen Stressexpositionen ist in Abb. 29 dargestellt. In einer Zweifaktoren-ANOVA (Linie x Intervalle) wurden zunächst Alkoholkonsum und Alkoholpräferenz der ungestressten B6- und D2-Tiere (basal) verglichen. B6-Mäuse hatten einen signifikant höheren Alkoholkonsum (Faktor Gruppe $F_{1,13}=89,0$; $p<0,0001$) und eine höhere Alkoholpräferenz $F_{1,13}=216,8$; $p<0,0001$) als D2-Mäuse. Ein Vergleich der drei Behandlungsgruppen innerhalb einer Linie durch Zweifaktoren-ANOVA (Behandlung x Intervalle) erbrachte weder im Alkoholkonsum noch in der Alkoholpräferenz signifikante Unterschiede bei B6- oder D2-Mäusen.

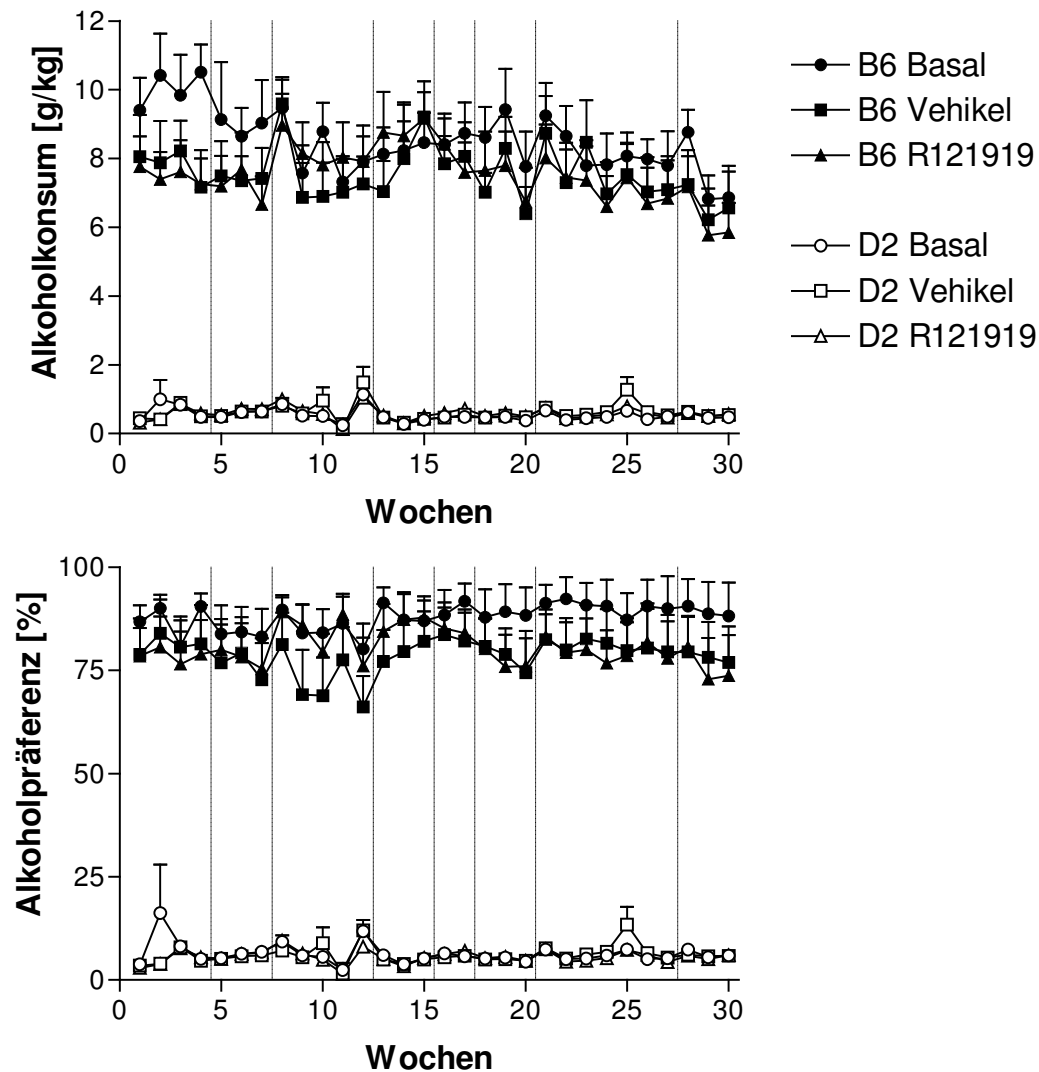


Abb. 29: Langzeit-Alkoholkonsum und Alkoholpräferenz von C57BL/6JolaHsd (B6) und DBA/2OlaHsd (D2) Mäusen während des Experiments zum Einfluss verschiedener Stressexpositionen auf den freiwilligen Alkoholkonsum. Jede vertikale gestrichelte Linie stellt den Zeitpunkt einer Stressexposition dar. Die Art und Reihenfolge der Stressoren ist im Text beschrieben. Tiere der Gruppen „Basal“ blieben während des gesamten Experiments ungestresst, Tieren der Gruppen „Vehikel“ wurde unmittelbar nach jeder Stressexposition Vehikel, Tieren der Gruppen „R121919“ der CRHR1-Antagonist R121919 (1 mg/kg, i.g.) appliziert. Dargestellt sind Mittelwerte der wöchentlichen Messungen (berechnet auf den Konsum pro Tag) + Standardfehler. $n=8-10$ pro Gruppe. Sowohl im Alkoholkonsum als auch in der Alkoholpräferenz zeigte sich ein hochsignifikanter Unterschied zwischen den „Basal“-Gruppen beider Stämme ($p<0,0001$). Der Vergleich der drei Behandlungsgruppen jeweils innerhalb der beiden Linien erbrachte keine signifikanten Unterschiede (ANOVA).

Einfluss von sozialem Stress auf das kurzfristige Wasser- und Alkoholtrinkmuster von B6-Mäusen

Das Trinkmuster nach sozialem Stress wurde bei B6-Mäusen untersucht, die zuvor vier Wochen freien Zugang zu Wasser und 12%-igem Alkohol hatten. Während dieser Zeit tranken die Tiere durchschnittlich ca. 14 g/kg täglich und hatten eine Alkoholpräferenz um 60% (Daten nicht gezeigt). Abb. 30 zeigt die Trinkdauer in einstündigen Intervallen vor, während und nach sozialem Stress. Weder auf die Trinkdauer an der Wasserflasche noch an der Alkoholflasche hatte sozialer Stress einen signifikanten Einfluss.

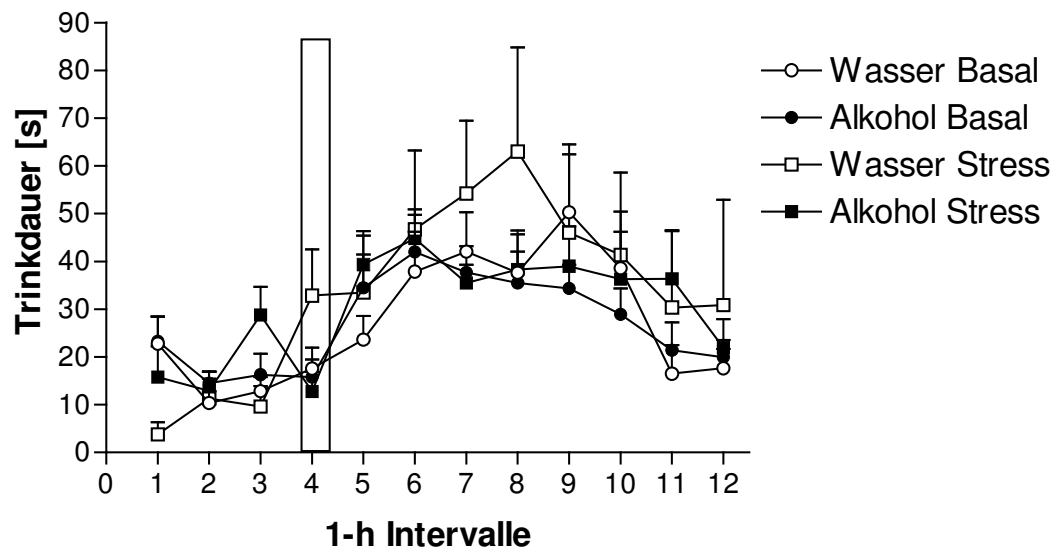


Abb. 30: Trinkmuster alkoholerfahrener C57BL/6J OlaHsd Mäuse vor, während und nach einer sozialen Stressexposition. Dargestellt ist die Trinkdauer an der Wasser- und der Alkoholflasche in Sekunden pro einstündigem Aufzeichnungsintervall + Standardfehler. Das Trinkmuster während sozialem Stress wurde in einem intraindividuellen Vergleich verglichen mit den gemittelten Werten derselben Tiere an den drei Messtagen zuvor (basal). Die Phase der Stressexposition ist durch die Einrahmung hervorgehoben. $n=8$. Der soziale Stress hatte keinen signifikanten Einfluss auf die Trinkdauer an der Wasser- bzw. der Alkoholflasche (ANOVA).

5.3.2 Rückfallartiger Alkoholkonsum

5.3.2.1. Wistar-Ratten

Verhalten während des Social Defeats

Das Verhalten der Martinsrieder Wistar-Ratten während des *Social Defeats* ist in Abb. 31 dargestellt. Die Tiere verbrachten einen Großteil der Zeit mit *Freezing* bzw. Immobilität und zeigten einen hohen Anteil an Ultraschallvokalisation. Als Kontrollgruppe wurden Wistar-Ratten im gleichen zeitlichen Muster, jedoch ohne Präsenz eines *Residents* in die *Social Defeat*-Käfige gesetzt. Diese zeigten keinerlei *Freezing* oder Ultraschallvokalisation, sondern überwiegend Explorationsverhalten (Daten nicht gezeigt). Dies zeigt, dass der *Social Defeat* ein effektiver Stressor war.

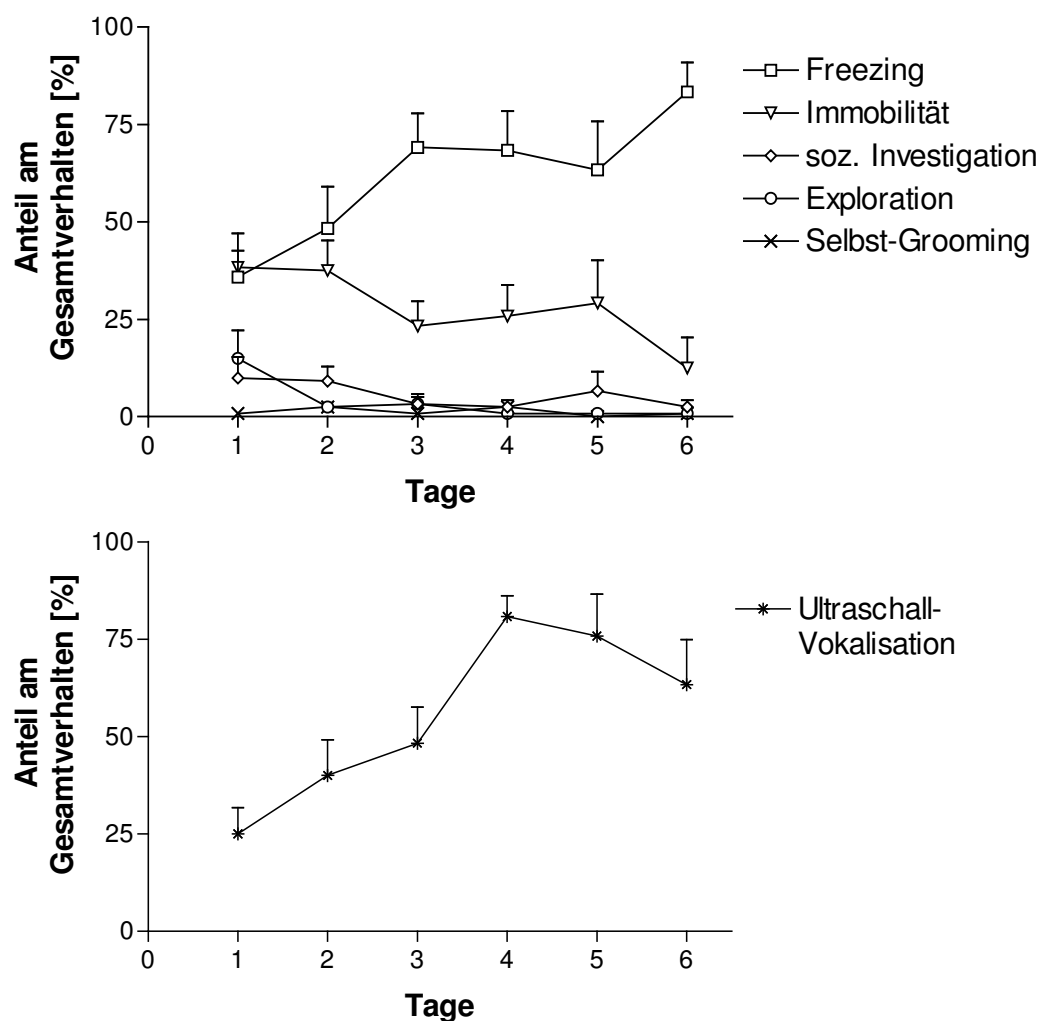


Abb. 31: Verhaltensweisen von Martinsrieder Wistar-Ratten während wiederholten *Social Defeats*. Dargestellt ist die durchschnittliche prozentuale Relation der einzelnen Verhaltensweisen bezogen auf das Gesamtverhalten während der *Social Defeat*-Exposition des jeweiligen Tages + Standardfehler. $n=6$. Als Kontrollgruppe wurden Wistar-Ratten im gleichen zeitlichen Muster, jedoch ohne Präsenz eines *Residents* in die *Social Defeat*-Käfige

gesetzt. Diese zeigten keinerlei *Freezing* oder Ultraschallvokalisation, sondern überwiegend Explorationsverhalten (Daten nicht gezeigt).

Einfluss von Social Defeat-Stress auf den ADE im Heimkäfig

Der Einfluss akuten und wiederholten *Social Defeat*-Stresses auf den ADE wurde in einer Dreifaktoren-ANOVA (Gruppe x ADE x Tage) untersucht. Die Alkoholdeprivation hatte einen signifikanten Anstieg in Alkoholkonsum (Faktor ADE: $F_{1,19}=50,3$; $p<0,0001$) und Alkoholpräferenz zur Folge ($F_{1,19}=35,2$; $p<0,0001$). Es ergab sich jedoch weder im Faktor Gruppe noch in der Interaktion der Faktoren Gruppe x ADE ein signifikanter Unterschied. Weder akuter noch wiederholter *Social Defeat* beeinflusste also das rückfallartige Trinken (Abb. 32). Eine Wiederholung dieses Experiments mit den selben Tieren in den selben Gruppen erbrachte ein ähnliches Ergebnis (Daten nicht gezeigt).

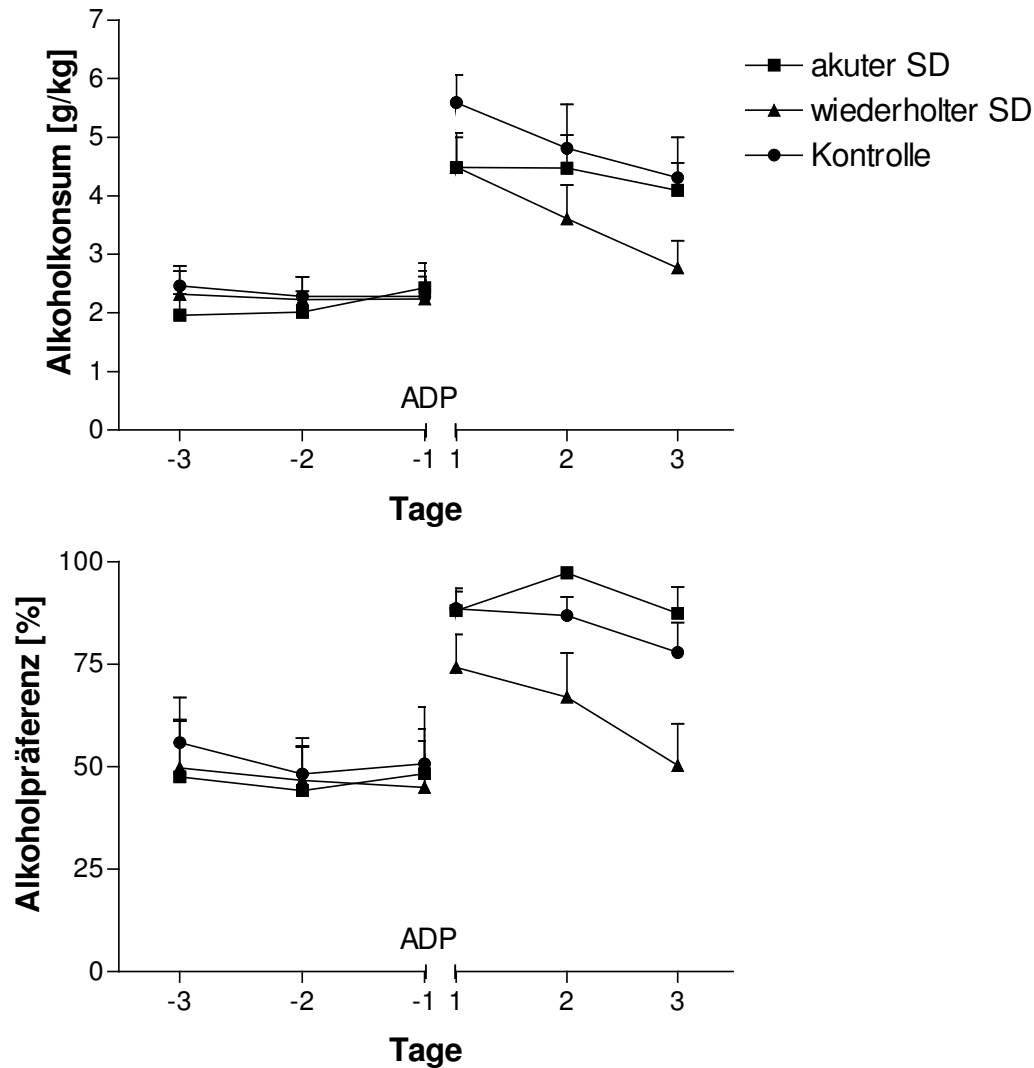


Abb. 32: Alkoholkonsum und Alkoholpräferenz Langzeit-alkoholerfahrener Martinsrieder Wistar-Ratten drei Tage vor und drei Tage nach einer 14-tägigen Alkoholdeprivationsphase (ADP). Die Tiere der Gruppe „akuter *Social Defeat*“ (SD; n=7) wurden einmal, 30 Minuten vor Rückgabe der Alkoholflaschen einem *Social Defeat* ausgesetzt. Die Tiere der Gruppe „wiederholter *Social Defeat*“ (n=8) wurden an sechs aufeinanderfolgenden Tagen jeweils einmal einem *Social Defeat*-Stress ausgesetzt. Der letzte *Social Defeat* erfolgte 30 Minuten vor Rückgabe der Alkoholflaschen. Tiere der Kontrollgruppe (n=8) wurden nicht gestresst. Dargestellt sind Mittelwerte + Standardfehler. Die ADP hatte einen signifikanten Anstieg in Alkoholkonsum und Alkoholpräferenz (jeweils $p < 0,0001$) zur Folge. Die Höhe des Anstiegs war durch die akute bzw. wiederholte *Social Defeat*-Exposition nicht signifikant beeinflusst (ANOVA).

Einfluss von Social Defeat-Stress auf die basale und Stress-induzierte Konzentration von ACTH und Corticosteron und das Gewicht der Nebennieren

Die Konzentrationen von ACTH und Corticosteron im Blut der drei Gruppen Langzeitalkoholerfahrener Wistar-Ratten wurde basal und nach *Restraint*-Stress untersucht (Abb. 33). Eine Gruppe wurde dabei zuvor akut, eine Gruppe wiederholt *Social Defeat*-Stress ausgesetzt. Die dritte Gruppe diente als zuvor ungestresste Kontrollgruppe (siehe oben). Zweifaktoren-ANOVA (Gruppe x Zeitpunkt) erbrachte einen hochsignifikanten Anstieg von ACTH und Corticosteron nach dem *Restraint* (Faktor Zeitpunkt ACTH: $F_{1,20}=149,7$; $p<0,0001$; Corticosteron: $F_{1,20}=306,8$; $p<0,0001$). Zwischen den Gruppen ergab sich jedoch kein signifikanter Unterschied. Auch im Gewicht der Nebennieren zeigte sich kein Unterschied zwischen den Gruppen (Abb. 34).

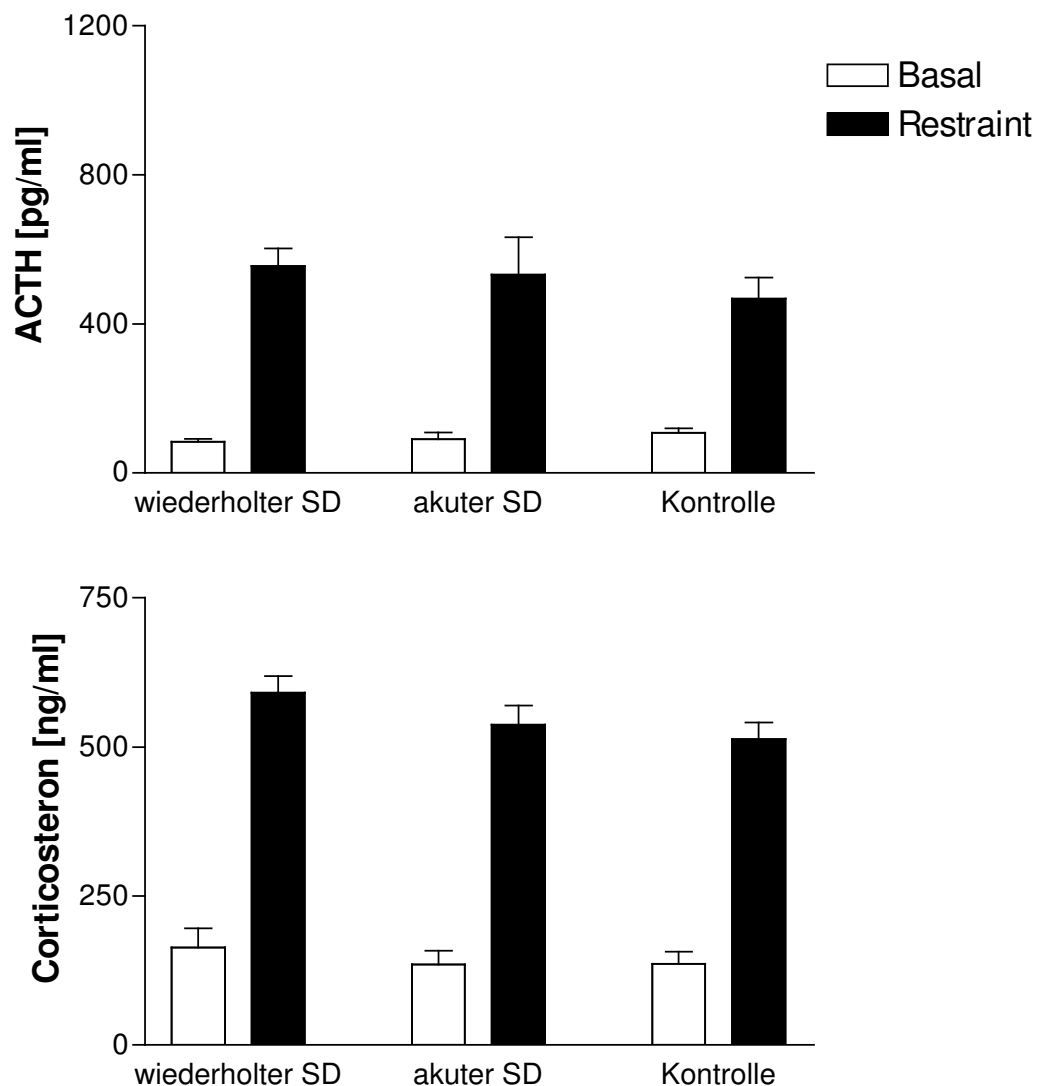


Abb. 33: Blutkonzentrationen von ACTH und Corticosteron bei Langzeitalkoholerfahrenen Martinsrieder Wistar-Ratten, basal und unmittelbar nach 15-minütigem *Restraint*-Stress. Die Tiere der Gruppe „akuter *Social*

Defeat“ (SD; n=7) wurden zuvor akut einem *Social Defeat* ausgesetzt. Die Tiere der Gruppe „wiederholter *Social Defeat*“ (n=8) wurde wiederholtem *Social Defeat* (an sechs aufeinanderfolgenden Tagen jeweils eine Exposition) ausgesetzt. Tiere der Kontrollgruppe (n=8) wurden zuvor nicht gestresst. Dargestellt sind Mittelwerte + Standardfehler. *Restraint*-Stress führte zu einem signifikanten Anstieg von ACTH und Corticosteron (jeweils $p < 0,0001$); weder basal noch nach *Restraint* unterschieden sich die drei Behandlungsgruppen „wiederholter *Social Defeat*“, „akuter *Social Defeat*“ und „Kontrolle“ signifikant voneinander (ANOVA).

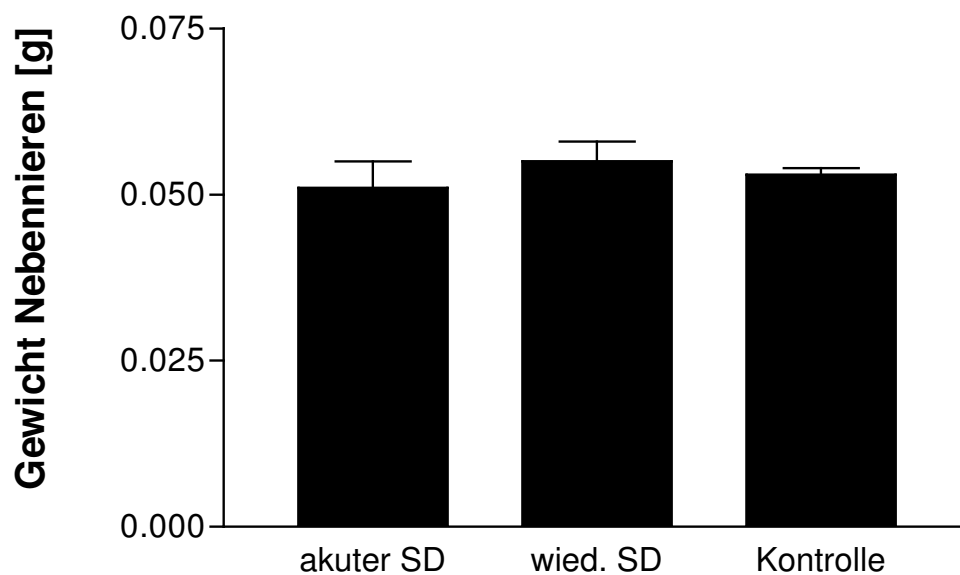


Abb. 34: Gewicht der Nebennieren Langzeit-alkoholerfahrener Martinsrieder Wistar-Ratten. Die Tiere der Gruppe „akuter *Social Defeat*“ (SD; n=7) wurden zuvor akut einem *Social Defeat* ausgesetzt. Die Tiere der Gruppe „wiederholter *Social Defeat*“ (n=8) wurden wiederholtem *Social Defeat* (an sechs aufeinanderfolgenden Tagen jeweils eine Exposition) ausgesetzt. Tiere der Kontrollgruppe (n=8) wurden zuvor nicht gestresst. Dargestellt sind Mittelwerte + Standardfehler. Zwischen den drei Behandlungsgruppen zeigte sich kein signifikanter Unterschied im Gewicht der Nebennieren (ANOVA).

Einfluss von Social Defeat-Stress auf den ADE unter operanten Bedingungen

Mittels Zweifaktoren-ANOVA (Gruppe x Intervalle) bzw. Einfaktoren-ANOVA (Faktor Gruppe) wurde der Einfluss von *Social Defeat*-Stress auf das Hebeldruckverhalten in operanten Boxen untersucht. Die akkumulierte Anzahl der Hebeldrücke über die erste Stunde und über die gesamten 23 Stunden der operanten Sitzung ist in Abb. 35 dargestellt. Weder

akuter noch wiederholter *Social Defeat*-Stress hatte einen signifikanten Einfluss in der ersten Stunde oder den gesamten 23 Stunden. Dementsprechend ergab sich kein signifikanter Unterschied in Alkoholkonsum, Alkoholpräferenz und Gesamthebeldruckaktivität während der operanten Sitzung (Abb. 36).

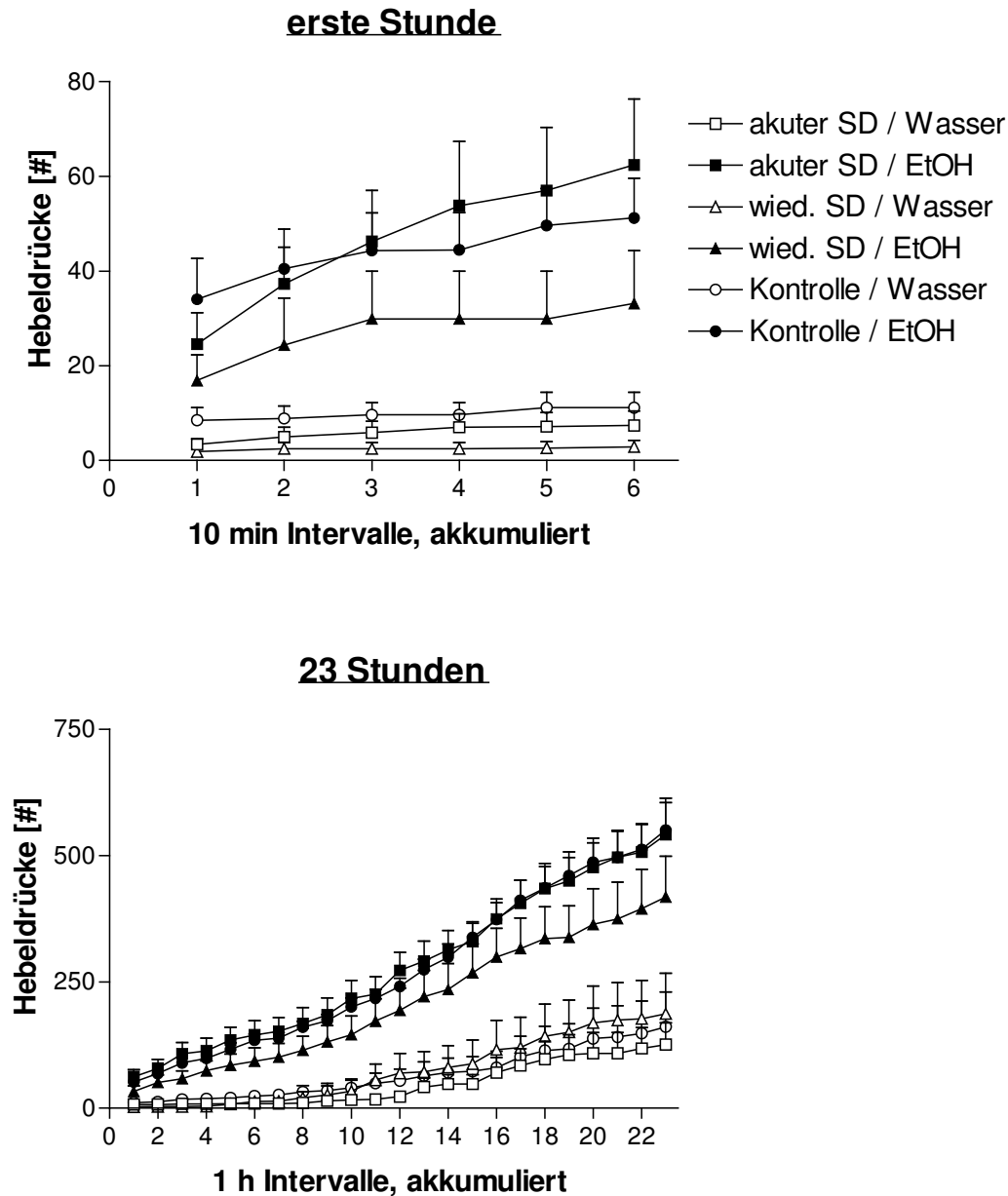


Abb. 35: Hebeldruckverhalten Langzeit-alkoholerfahrener Martinsrieder Wistar-Ratten für den Wasserhebel und den Alkoholhebel (EtOH) in operanten Boxen. Die Tiere der Gruppe „akuter *Social Defeat*“ (SD; n=8) wurden einmal, 30 Minuten vor Beginn der Boxensitzung einem *Social Defeat* ausgesetzt. Die Tiere der Gruppe „wiederholter *Social Defeat*“ (n=7) wurden an sechs aufeinanderfolgenden Tagen jeweils einmal einem *Social Defeat*-Stress ausgesetzt. Der letzte *Social Defeat* erfolgte 30 Minuten vor Beginn der Boxensitzung. Tiere der

Kontrollgruppe (n=8) wurden nicht gestresst. Dargestellt sind Mittelwerte + Standardfehler der akkumulierten Anzahl der Hebeldrücke in der ersten Stunde sowie während der gesamten 23 Stunden der Boxensitzung. Die drei Behandlungsgruppen unterschieden sich weder während der ersten Stunde, noch während der gesamten Boxensitzung signifikant im Hebeldruckverhalten für Wasser bzw. Alkohol (ANOVA).

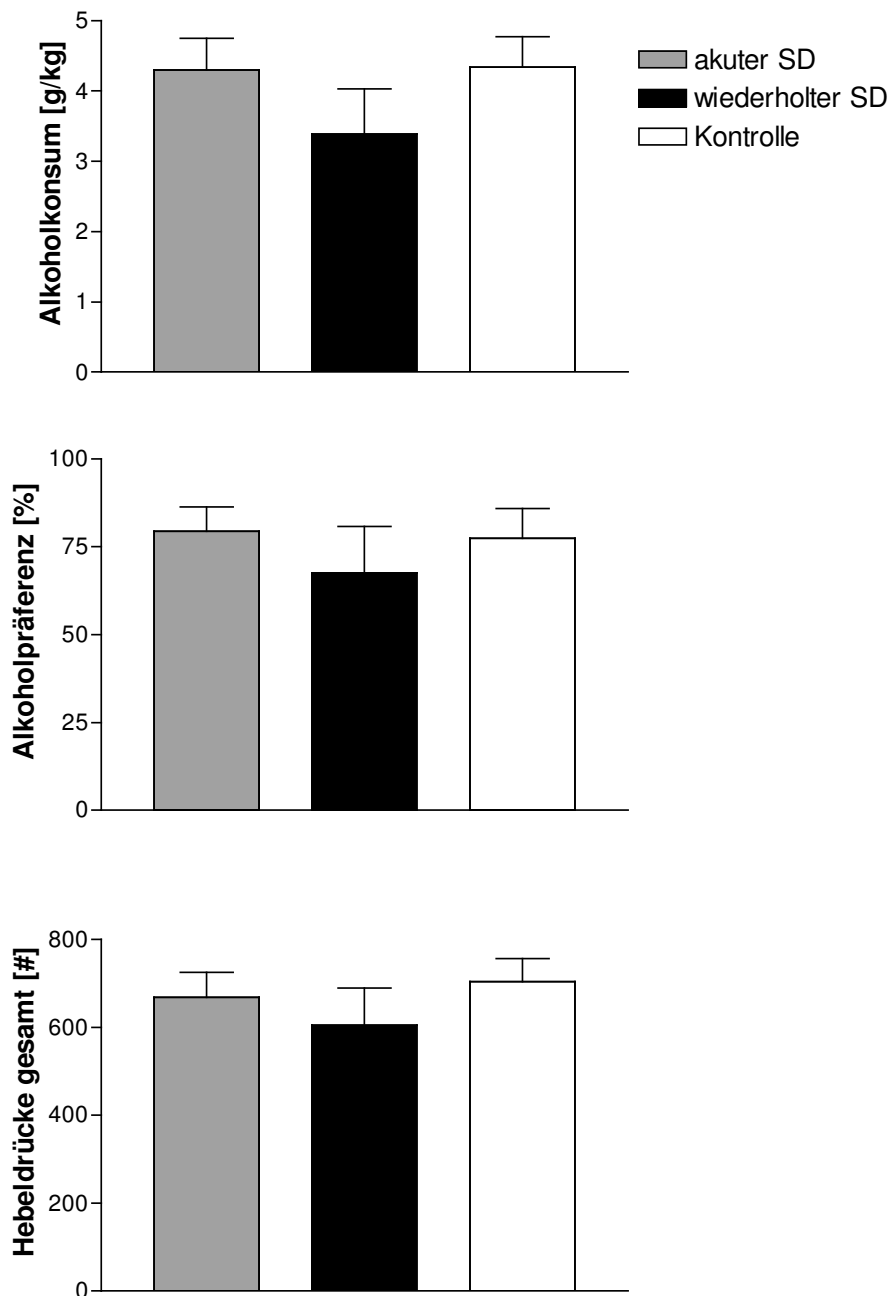


Abb. 36: Alkoholkonsum, Alkoholpräferenz und Gesamthebeldruckaktivität Langzeit-alkoholerfahrener Martinsrieder Wistar-Ratten in operanten Boxen. Die Tiere der Gruppe „akuter *Social Defeat*“ (SD; n=8) wurden einmal, 30 Minuten vor Beginn der Boxensitzung einem *Social Defeat* ausgesetzt. Die Tiere der Gruppe „wiederholter *Social Defeat*“ (n=7) wurden an sechs aufeinanderfolgenden Tagen jeweils einmal einem *Social*

Defeat-Stress ausgesetzt. Der letzte *Social Defeat* erfolgte 30 Minuten vor Beginn der Boxensitzung. Tiere der Kontrollgruppe (n=8) wurden nicht gestresst. Dargestellt sind Mittelwerte + Standardfehler über die gesamte Dauer der 23-stündigen Boxensitzung. Die drei Behandlungsgruppen unterschieden sich nicht signifikant in Alkoholkonsum, Alkoholpräferenz und Gesamtanzahl der Hebeldrücke (ANOVA).

5.4 Diskussion

Alkoholsucht ist u.a. charakterisiert durch wiederholte Rückfälle in schädliches Drogeneinnahmeverhalten, die sehr häufig selbst nach langer Zeit der Abstinenz auftreten. Das hauptsächliche Ziel der klinischen Behandlung von Alkoholismus stellt die Rückfallprophylaxe dar. Diverse Faktoren, die einen Rückfall nach einer erfolgreichen Entgiftung auslösen können, wurden diskutiert. Dazu gehören konditionierter Entzug (Weiss *et al.*, 2001), konditioniertes Verlangen nach der Droge (Koob, 2000; Weiss *et al.*, 2001), der Konsum bzw. die Applikation einer geringen Menge von Alkohol (Bigelow *et al.*, 1977; Hodgson *et al.*, 1979) sowie das Erleben von Stress (siehe unten). So wurde in verschiedenen Studien bei Personen, die – v.a. stark bedrohlichem oder chronischem psychosozialen – Stress ausgesetzt waren, eine höhere Wahrscheinlichkeit einen Rückfall zu erleiden, gezeigt (Marlatt, 1983; Brown *et al.*, 1990, 1995; Cooper *et al.*, 1992). Die genauen Mechanismen einer möglichen Kausalität zwischen Stresserfahrung und Rückfall sind nicht bekannt.

Eine Möglichkeit, diesen Zusammenhang näher zu beleuchten, ist die Untersuchung rückfallartigen Verhaltens nach Stressexposition im Tiermodell. Wie in Kap. 1 beschrieben, stellt der Alkoholdeprivationseffekt (ADE) bei Ratten ein valides Tiermodell des Rückfalls dar. Für Mäuse wurde bis dato kein valides Modell rückfallartigen Alkoholkonsums beschrieben. In der vorliegenden Studie wurde der Einfluss von akutem und wiederholtem *Social Defeat*-Stress auf den ADE Langzeit-alkoholerfahrener Martinsrieder Wistar-Ratten untersucht. Während des Stresses zeigten die *Intruder* sehr viel *Freezing*-Verhalten und Immobilität, sowie ausgeprägte Ultraschallvokalisation. Dies deutet darauf hin, dass die Tiere durch *Social Defeat* effektiv gestresst wurden. Jedoch beeinflusste weder akuter noch

wiederholter *Social Defeat* das rückfallartige Trinken im Heimkäfig oder unter operanten Bedingungen. Wiederholter bzw. akuter *Social Defeat*-Stress hatte weiterhin keinen Einfluss auf das basale, nicht-alkoholdeprivierte Alkoholeinnahmeverhalten von Langzeitalkoholerfahrenen Martinsrieder Wistar-Ratten. Auch bei HAB/LAB-Ratten, die auf maximale Unterschiede in der Angstdisposition gezüchtet wurden (Liebsch *et al.*, 1998 a,b), beeinflusste *Social Defeat* den basalen Alkoholkonsum nicht.

Verschiedene Möglichkeiten könnten den fehlenden Effekt der Stresserfahrung auf den basalen und rückfallartigen Alkoholkonsum der Tiere erklären. Trotz des hohen Anteils stressbezogenen Verhaltens, den die Tiere während der Stressexposition zeigten, könnte die Intensität der Stresserfahrung zu niedrig gewesen sein, um Änderungen im Alkoholeinnahmeverhalten zu induzieren. In einer Studie von Zelena *et al.* (1999) fand sich bei Wistar-Ratten nach vier 30-minütigen Konfrontationen mit einem aggressiven Männchen an vier aufeinanderfolgenden Tagen kein Effekt auf endokrinologische Variablen, wie das Gewicht der Nebennieren und Corticosteronspiegel im Blut, sowie auf Angst-bezogenes Verhalten auf der *Elevated Plusmaze* am fünften Tag des Experiments. In der vorliegenden Studie wurden die wiederholt gestressten Ratten an sechs aufeinanderfolgenden Tagen jeweils 15 Minuten lang *Social Defeat*-Stress ausgesetzt. Dies könnte einer ähnlichen Stressintensität wie derjenigen in der Studie von Zelena *et al.* (1999) entsprechen. Auch in der vorliegenden Studie wurde untersucht, ob die wiederholte Stressexposition zu einem Ungleichgewicht in der Ausschüttung der Stressachsenhormone führt. In früheren Arbeiten wurde gezeigt, dass das wiederholte Erleben physischen und psychischen Stresses (z.B. *Restraint*) bei Ratten zu einer erhöhten basalen Corticosteronsekretion führte, während sich die Ausschüttung von ACTH als Antwort auf den wiederholten Stressor verringerte. Auf einen neuen Stressor reagierten die Tiere hingegen mit erhöhter ACTH-Sekretion (Aguilera, 1994). In der vorliegenden Studie fand sich kein Unterschied in der basalen und stressinduzierten Konzentration von ACTH und Corticosteron im Blut sowie im Gewicht der Nebennieren

zwischen den Behandlungsgruppen. Da die letzte *Social Defeat* Episode jedoch hier mindestens eine Woche zurücklag, kann dabei die Möglichkeit nicht gänzlich ausgeschlossen werden, dass sich etwaige Veränderungen der endokrinologischen Parameter während dieser Zeit wieder normalisierten.

Der ADE ist definiert als ein vorübergehender Anstieg des Alkoholkonsums und der Alkoholpräferenz nach, verglichen mit vor einer Deprivation. Es wäre möglich, dass man unter diesen experimentellen Bedingungen an eine Grenze der Alkoholmenge stößt, die die Tiere freiwillig konsumieren. Ein weiterer Anstieg wäre dann durch Manipulationen wie z.B. Stressexposition nicht mehr zu erzielen, es würde also ein Deckeneffekt (*ceiling effect*) auftreten. Diese Überlegung wird jedoch durch mehrere Beobachtungen entkräftet. In einer Studie von Hölter *et al.* (2000) führte chronische Applikation des κ -Opioid Agonisten CI-977 im Vergleich zur Kontrollgruppe zu einem starken Anstieg des ADE. Dies zeigt, dass es möglich ist, den ADE weiter zu steigern. Weiterhin bewirkte wiederholter *Social Defeat* sowohl im Heimkäfig, als auch unter operanten Bedingungen – obwohl nicht statistisch signifikant – eher eine Verringerung als eine Steigerung des ADE. Dies ist in der Richtung des Effekts vergleichbar mit zwei kürzlich erschienenen Studien. Dort führte wiederholter *Social Defeat* zu einer deutlichen Erniedrigung des Alkoholkonsums sowohl in einem Paradigma der begrenzten Alkoholverfügbarkeit, als auch während dauerhaftem Alkoholzugang (van Erp & Miczek, 2001; van Erp *et al.*, 2001). Zudem hatte in der vorliegenden Studie wiederholter *Social Defeat* auch keinen Effekt auf den basalen, nicht deprivierten Alkoholkonsum im Heimkäfig. Dieser stellt eine Situation dar, in der klar eine Steigerung des Alkoholeinnahmeverhaltens erreicht werden kann. Der Einfluss akuten und wiederholten *Social Defeat*-Stresses auf das basale Alkoholeinnahmeverhalten wurde auch bei alkoholerfahrenen B6- und D2-Mäusen untersucht. Auch hier blieb das Konsumverhalten unbeeinflusst.

Um Alkohol in einer Art Selbstmedikation einsetzen zu können, müssen die Tiere möglicherweise zunächst die Assoziation zwischen dem Stresserlebnis und der potenziell anxiolytischen bzw. stressdämpfenden Alkoholwirkung herstellen. Da die Ratten bei der Untersuchung des Einflusses von Stress auf das rückfallartige Trinken während der Alkoholdeprivation, also während einer Phase gestresst wurden, in der sie keinen Zugang zu Alkohol hatten, besteht die Möglichkeit, dass diese Assoziation nicht geknüpft wurde und die Ratten deshalb nach Rückgabe der Alkoholflaschen bzw. während der operanten Sitzung keinen vermehrten Konsum zeigten. Um diese Hypothese zu überprüfen, wurde die Untersuchung des Einflusses von akutem und wiederholtem *Social Defeat*-Stress auf das rückfallartige Trinken Langzeit-alkoholerfahrener Wistar-Ratten im Heimkäfig und unter operanten Bedingungen mit den selben Tieren in den selben Gruppen wiederholt. Die Tiere hatten hierbei im ersten Durchgang des Experiments die Möglichkeit, eine potenziell stresslösende Wirkung von Alkohol nach Stresserlebnis zu erfahren. Die Wiederholung des Experiments brachte jedoch ein ähnliches Ergebnis, d.h. weder akuter noch wiederholter *Social Defeat*-Stress hatte einen signifikanten Effekt auf den ADE.

Der Effekt von Stress auf das Drogeneinnahmeverhalten könnte abhängig vom Kontext der Stresserfahrung sein. In einer Studie von Shalev *et al.* (2000) bewirkte Fußchockstress nur dann die Wiederaufnahme (*Reinstatement*) eines Appetenzverhaltens für Heroin, wenn der Fußchock in der Umgebung appliziert wurde, die mit der Drogenselbstverabreichung assoziiert war. Fand der Fußchock außerhalb dieser Umgebung statt, dann wurde dadurch kein *Reinstatement* ausgelöst. In der vorliegenden Studie fand die Stresserfahrung der Ratten im Heimkäfig der *Residents* statt, also außerhalb der Umgebung, in der Zugang zu Alkohol bestand. Um zu überprüfen, ob das Erleben von Stress im mit der Alkoholverfügbarkeit assoziierten Kontext den freiwilligen Alkoholkonsum beeinflusst und daher evtl. die fehlende Kontextabhängigkeit der Stressapplikation ausschlaggebend war für den fehlenden Effekt auf das Alkoholeinnahmeverhalten, wurden B6- und D2-Mäuse einem Beutestress ausgesetzt.

Dabei verblieben die Mäuse während der Stressexposition in ihrem Heimkäfig, in dem sie Zugang zu Alkohol hatten. Auch hier hatte jedoch die Stresserfahrung keine signifikante Auswirkung auf den Alkoholkonsum. In einem weiteren Experiment wurde der Einfluss von sozialem Stress auf das kurzfristige Konsumverhalten alkoholerfahrener B6-Mäuse gegenüber Wasser und Alkohol bestimmt. Auch hier fand der Stress in der mit dem Alkohol assoziierten Umgebung statt. Das zeitnahe, detaillierte Trinkmuster (in Sekunden Trinkdauer pro 1-Stunden Intervall) unmittelbar vor, während und nach dem sozialen Stress wurde mit Hilfe eines Trinkometersystems aufgezeichnet. Dieses wurde in einem intraindividuellen Vergleich dem gemittelten Trinkmuster der selben Tiere an den drei Messtagen zuvor gegenübergestellt. Auch hier ließ sich kein Einfluss der Stresserfahrung auf das Trinkmuster nachweisen. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass eine fehlende Kontextabhängigkeit der Stresserfahrung alleine keine ausreichende Erklärung für den abwesenden Effekt auf das rückfallartige Trinken der Wistar-Ratten darstellt.

Obwohl der *Social Defeat* zu unterschiedlichen Tageszeiten durchgeführt wurde, handelte es sich doch immer um den gleichen Stressor. Die Art der Stresserfahrung war daher in gewisser Weise für die Tiere „vorhersagbar“. In einer kürzlich erschienenen Studie führte chronischer, variierter und damit unvorhersehbarer Stress bei Ratten zu einem Anstieg Kokain-induzierter lokomotorischer Aktivität. Dieser Anstieg war positiv korreliert mit dem Blutcorticosteronspiegel der Tiere. Auch die dosisabhängige Entwicklung einer erhöhten bzw. erniedrigten Platzpräferenz nach Kokaingabe war durch chronischen, unvorhersehbaren Stress verstärkt. Wurde jedoch wiederholt der gleiche Stressor (*Restraint*) angewendet, so fand man diese Verstärkung der Kokainwirkung auf Aktivität und Platzpräferenz nicht (Haile *et al.*, 2001). Eventuell hätte die Anwendung verschiedener und daher weniger vorhersehbarer Stressoren eine größere Beeinflussung des rückfallartigen Trinkens bewirkt. Der Einfluss variierter Stressexposition auf das basale Alkoholeinnahmeverhalten im Heimkäfig wurde bei alkoholerfahrenen B6- und D2-Mäusen untersucht. Während das Trinkverhalten der D2-Tiere

unverändert blieb, bewirkte der variierte Stress bei B6-Mäusen eine vorübergehende Verringerung des Alkoholkonsums, während die Alkoholpräferenz unbeeinflusst war. Das bedeutet variiertes und damit weniger vorhersagbarer Stress führte tatsächlich zu einer Veränderung – allerdings einer Verringerung – des freiwilligen Alkoholkonsums. Es könnte jedoch auch möglich sein, dass weniger die Variation des Stressors, als vielmehr die Art des Stressors für einen Effekt auf das Alkoholeinnahmeverhalten ausschlaggebend war. Um dies zu untersuchen, wurden die B6- und D2-Mäuse wiederholtem *Forced Swim*-Stress ausgesetzt. *Forced Swimming* war während der zuvor durchgeführten variierten Stressreihe bei B6- und D2-Mäusen der erste Stressor. Ähnlich dem variierten Stress hatte wiederholter *Forced Swim*-Stress keinen Einfluss auf das Konsumverhalten der D2-Mäuse, während bei B6-Tieren eine vorübergehende Verringerung des Alkoholkonsums bei gleichbleibender Alkoholpräferenz auftrat. Der verringerte Alkoholkonsum der B6- Mäuse nach variiertem Stress sowie nach wiederholter *Forced Swim*-Exposition blieb durch die Gabe des CRHR1-Antagonisten R121919 nach dem jeweiligen Stressor unbeeinflusst. Eine genauere Analyse des Konsumverhaltens ergab, dass die B6-Mäuse sowohl nach der variierten Stressexposition als auch nach wiederholtem *Forced Swim*-Stress weniger 10%-igen Alkohol konsumierten, während die Präferenz für die 5%-ige Alkohollösung leicht anstieg. Der ohnehin sehr geringe Konsum von Wasser blieb unverändert. Die Tatsache, dass durch den variierten und den wiederholten *Forced Swim*-Stress selektiv weniger 10%-iger Alkohol konsumiert wurde, macht es unwahrscheinlich, dass dieser Effekt die Folge einer unspezifischen Verhaltensinhibition darstellt. Ob sich durch die Stressexposition eine vorübergehende Aversion gegen den 10%-igen Alkohol entwickelte, oder ob sich durch den Stress die belohnende Wirkung des Alkohols zeitweise verstärkte, muss offen bleiben. Ein möglicher Mechanismus der stärkeren Belohnungswirkung des Alkohols könnte eine erhöhte Dopaminausschüttung im mesolimbischen Belohnungssystem der Tiere als Folge der Stress-induzierten Corticosteronausschüttung aus der Nebennierenrinde darstellen. Die höhere

Dopaminausschüttung im Belohnungssystem von Nagern nach einer Stressexposition wurde gezeigt (Rouge-Pont *et al.*, 1988; Takahashi *et al.*, 1998; Wu *et al.*, 1999) und eine Vermittlung über Corticosteron vorgeschlagen (Piazza *et al.*, 1996; Rouge-Pont *et al.*, 1988). Da sowohl die variierte Stressexposition als auch wiederholter *Forced Swim*-Stress den freiwilligen Alkoholkonsum der B6-Mäuse verringerte, kann nicht zweifelsfrei festgelegt werden, ob die Unvorhersehbarkeit der verwendeten Stressoren, oder aber die Art des Stressors entscheidend für die Beeinflussung des Konsumverhaltens der B6-Mäuse war. Da der variierte Stress und der wiederholte *Forced Swim*-Stress die letzten Stressexpositionen in einer Reihe verschiedener Stressoren darstellten, kann auch nicht gänzlich ausgeschlossen werden, dass die Anzahl der Stressexpositionen – unabhängig von der Vorhersagbarkeit und der Art des Stressors – ausschlaggebend für den verringerten freiwilligen Alkoholkonsum der B6-Mäuse war.

Fasst man die Ergebnisse zusammen, so zeigte sich bei Langzeit-alkoholerfahrenen Martinsrieder Wistar-Ratten und HAB/LAB-Ratten kein Einfluss von akutem und wiederholtem *Social Defeat*-Stress auf den freiwilligen Alkoholkonsum im Heimkäfig. Bei den Alkohol eher meidenden D2-Mäusen hatte keiner der verwendeten Stressoren einen Einfluss auf das freiwillige Alkoholeinnahmeverhalten. Bei Alkohol-präferierenden B6-Mäusen dagegen verringerten variierte Stress und wiederholtes *Forced Swimming* – möglicherweise als Folge einer stärker belohnenden Wirkung des Alkohols – vorübergehend den freiwilligen Alkoholkonsum. Bei Langzeit-alkoholerfahrenen Martinsrieder Wistar-Ratten hatte weder akuter noch wiederholter *Social Defeat*-Stress einen Anstieg rückfallartigen Alkoholkonsums im Heimkäfig oder unter operanten Bedingungen zur Folge. Dies steht im Gegensatz zu Studien von Lê *et al.* (1998, 1999). Dort führte eine Stressexposition zu einer Wiederaufnahme des Alkoholsuchverhaltens. Die beiden Tiermodelle rückfallartigen Verhaltens unterscheiden sich jedoch in mindestens drei

wesentlichen Elementen. Möglicherweise erklärt sich der unterschiedliche Effekt von Stress auf das rückfallartige Verhalten in den beiden Tiermodellen durch einen oder mehrere dieser Unterschiede. Zum ersten wurde in den Studien von Lê *et al.* (1998, 1999) Fußschock als Stressor verwandt. In der vorliegenden Studie dagegen wurde mit Blick auf die Vergleichbarkeit zur Humansituation Wert auf einen ethologisch relevanten Stressor gelegt und *Social Defeat*-Stress verwendet. Die Untersuchungen der vorliegenden Arbeit zum Einfluss verschiedener Stressoren auf den freiwilligen Alkoholkonsum bei B6- und D2-Mäusen zeigte, dass die Art des Stressors durchaus entscheidend dafür sein kann, ob der freiwillige Alkoholkonsum dadurch beeinflusst wird (siehe oben). Die Stressexposition erfolgte zweitens in den Studien von Lê und Kollegen (1998, 1999) unmittelbar in der Kammer, in der die Tiere zuvor Zugang zu Alkohol hatten. Es bestand also im Gegensatz zu dieser Arbeit, in dem der Stress im Heimkäfig des *Residents* erlebt wurde, eine direkte Assoziation der Stresserfahrung mit dem Kontext der Drogenselbstverabreichung. In einer Studie von Shalev *et al.* (2000) wurde die Wiederaufnahme eines Heroinsuchverhaltens bei Ratten nur ausgelöst, wenn diese unmittelbar in dem zuvor mit der Droge gepaarten Kontext gestresst wurden. Fand der Fußschock außerhalb dieser Umgebung statt, so wurde kein *Reinstatement* ausgelöst. Als dritter und möglicherweise wichtigster Unterschied wird, wie schon erläutert, im *Reinstatement*-Modell das Alkoholsuchverhalten beobachtet, während in der vorliegenden Arbeit verwendeten ADE als Tiermodell rückfallartigen Alkoholkonsums das Alkoholeinnahmeverhalten untersucht wird. Ein systematischer Vergleich des Einflusses von Stress auf das Drogensuch- und das Drogeneinnahmeverhalten wurde nach Kenntnis des Autors noch nicht durchgeführt.

Als ein möglicher Faktor, der zu erhöhtem, eventuell schädlichem Alkoholkonsum führt, wird das Erleben von Stress diskutiert. Tiermodelle ermöglichen es, einerseits diese Annahme zu überprüfen, andererseits gegebenenfalls zugrundeliegende biologische Mechanismen sowie

mögliche pharmakologische Interventionen zu untersuchen. In der vorliegenden Arbeit wurde daher in verschiedenen Tiermodellen der Einfluss diverser Stressoren auf den freiwilligen Alkoholkonsum untersucht. Dabei zeigte sich kein oder nur ein sehr milder, den Alkoholkonsum verringernder Effekt. Dies zeigt, dass – zumindest im Tiermodell – kein eindeutiger Zusammenhang zwischen dem Erleben von Stress und einer freiwilligen Alkoholeinnahme besteht. Es sollte jedoch darauf hingewiesen werden, dass in einer kürzlich erschienenen Studie bei Mäusen, deren CRHR1 durch genetische Manipulation funktionell ausgeschaltet wurde, wiederholter *Social Defeat* sowie wiederholter *Forced Swim*-Stress jeweils zeitverzögert zu einem signifikanten Anstieg der freiwilligen Alkoholeinnahme führten. Der Alkoholkonsum der genetisch nicht manipulierten Wildtyp-Mäuse blieb dagegen unbeeinflusst (Sillaber *et al.*, 2002). Dies zeigt, dass – obwohl kein genereller kausaler Zusammenhang zwischen dem Erleben von Stress und Alkoholkonsum zu bestehen scheint – Stress in einzelnen Individuen, z.B. als Folge einer gestörten Stressachsenphysiologie, zu erhöhtem Alkoholeinnahmeverhalten führen kann. Möglicherweise stellen die beschriebenen CRHR1-*Knock Out*-Mäuse ein neues Tiermodell dar, an dem dieser Zusammenhang sinnvoll untersucht werden kann.

6. Zusammenfassung

Die berauschende Wirkung von Alkohol ist seit langer Zeit bekannt und wird seitdem vom Menschen genutzt. Während dabei der größte Teil der Menschen über das gesamte Leben hinweg einen unschädlichen, genussorientierten Alkoholkonsum beibehält, fallen einzelne Individuen in ein schädliches Konsummuster, indem sie Alkoholmissbrauch bzw. ein zwanghaftes süchtiges Verhalten entwickeln. Dabei spielen multiple Faktoren wie die genetische Disposition sowie eine Reihe von Umwelteinflüssen eine Rolle. Tiermodelle stellen ein wertvolles Instrument dar, die Vielzahl der angeborenen und erfahrenen Faktoren zu reduzieren und den Einfluss bestimmter Vorraussetzungen bzw. Manipulationen auf

verschiedene Phasen des Drogeneinnahmeverhaltens zu untersuchen. Ein ausgiebig charakterisiertes Paradigma des freiwilligen Alkoholkonsums ist das 4-Flaschenmodell der oralen Alkoholselbstverabreichung bei Ratten (siehe Übersichtsartikel Spanagel & Höller, 1999, 2000). Dieses Paradigma ermöglicht die experimentelle Untersuchung des initialen und langfristigen Alkoholkonsums sowie des rückfallartigen Trinkens in Form des Alkoholdeprivationseffekts (ADE). Der ADE kann dabei im 4-Flaschenmodell im Heimkäfig sowie unter operanten Bedingungen, in denen die Tiere für den Alkohol Hebel drücken, untersucht werden. Eine weitere wertvolle Möglichkeit, den Einfluss ererbter Merkmale sowie Manipulationen nicht angeborener Parameter auf den freiwilligen Alkoholkonsum zu untersuchen, stellen zwei Inzucht-Mausstämme dar, die sich erheblich in ihrer angeborenen Präferenz für alkoholische Lösungen unterscheiden: den Alkohol eher meidende D2- und alkoholpräferierende B6-Mäuse.

Zunächst wurde untersucht, ob langfristiger freiwilliger Alkoholkonsum neuroadaptive Vorgänge im Gehirn Martinsrieder Wistar-Ratten auslöst (Kap. 3). Diese konsumierten über 19 Monate hinweg (nahezu ein gesamtes Rattenleben) kontinuierlich durchschnittlich 2 g Alkohol pro Tag im 4-Flaschenmodell der oralen Alkoholselbstverabreichung. Nach dieser Zeit wurden sie dekapitiert, und frontaler Cortex, Nucleus accumbens, Striatum und Hippocampus wurden dissektiert. Mittels Immunoblotting wurde die relative Menge (bezogen auf eine gleichaltrige, wassertrinkende Kontrollgruppe) des Polypeptids der NMDA-Rezeptor-Untereinheit 2B (NR2B) in den verschiedenen Hirngebieten bestimmt. NR2B stellt eine für die inhibitorische Wirkung von Alkohol auf die NMDA-Rezeptorfunktion sensitive Untereinheit dar, die v.a. in Vorderhirnregionen exprimiert ist. Es zeigte sich bei den langfristig freiwillig Alkohol konsumierenden Ratten, eventuell als Folge einer Neuroadaptation an den dauerhaften inhibitorischen Einfluss des Alkohols auf die NMDA-Rezeptoren, eine leicht (7%) aber statistisch signifikant erhöhte Expression des NR2B-

Polypeptids im frontalen Cortex, nicht jedoch im Nucleus accumbens, Striatum oder Hippocampus. Dies steht im Einklang mit klinischer Forschung, die zeigt, dass besonders die Frontallappen des Gehirns vulnerabel für die akuten und chronischen Wirkungen von Alkohol sind (Lyvers, 2000). Die Ergebnisse zeigen einerseits, dass die Ratten im 4-Flaschenmodell der freiwilligen Alkoholselbstverabreichung eine ausreichende Menge konsumierten, um nachweisbare neuronale Adaptationen zu entwickeln, andererseits weisen sie darauf hin, dass der NR2B ein möglicher Ansatzpunkt in der Behandlung alkoholkranker Patienten darstellt.

In einer weiteren Versuchsreihe wurde der Zusammenhang angeborener sowie durch Gabe des Anxiolytikums Diazepam induzierter Unterschiede in der basalen Ängstlichkeit und dem freiwilligem Alkoholkonsum untersucht (Kap. 4). Zunächst wurde der Alkoholkonsum zweier Rattenlinien, die selektiv auf maximale Unterschiede im Angst-bezogenen Verhalten gezüchtet wurden, im 4-Flaschenmodell bestimmt. Trotz eines Trends der erhöhten Alkoholselbstverabreichung der weniger ängstlichen LAB- (*low anxiety-related behaviour*) im Vergleich mit den ängstlicheren HAB- (*high anxiety-related behaviour*) Ratten zeigte sich kein signifikanter Unterschied im initialen sowie langfristigen Alkoholkonsum. Ein ADE wurde nur bei LAB-Ratten nachgewiesen. Die Gabe von Diazepam führte bei Langzeit-alkoholerfahrenen Wistar-Ratten zu einer dosisabhängigen Reduktion des rückfallartigen Alkoholkonsums während des ADE im Heimkäfig, nicht jedoch unter operanten Bedingungen. Auf das basale, nicht deprivierte Alkoholeinnahmeverhalten hatte Diazepam keinen Einfluss. Bei zwei Mausstämmen, die sich deutlich in ihrem Alkoholkonsum unterschieden, zeigte sich, dass sich die alkoholpräferierenden B6-Mäuse in der *Dark/Light*-Box, einem Testparadigma unkonditionierter Emotionalität, signifikant weniger ängstlich verhielten als die D2-Tiere, die kaum freiwillig Alkohol zu sich nahmen. Wurden jedoch Ängstlichkeit und Alkoholkonsum der Individuen für die B6- und D2-Mäuse jeweils einzeln analysiert, so wurde dieser Zusammenhang des erhöhten Alkoholkonsums der weniger

ängstlichen Tiere nicht mehr gefunden. Eine höhere Ängstlichkeit hatte also in den verschiedenen Experimenten je nach Spezies und basalen oder rückfallartigen Bedingungen entweder einen erniedrigten oder einen unveränderten Alkoholkonsum zur Folge. Obwohl in der klinischen Situation eine Comorbidität von Angststörungen und Alkoholmissbrauch wohl dokumentiert ist, deuten die Ergebnisse der vorliegenden Studie darauf hin, dass – zumindest bei Nagern – die Faktoren Ängstlichkeit und freiwilliger Alkoholkonsum nicht in einem engen kausalen Zusammenhang stehen.

In einer dritten experimentellen Serie wurde der Einfluss verschiedener Stressexpositionen auf freiwilligen Alkoholkonsum von Martinsrieder Wistar-Ratten, B6- und D2-Mäusen untersucht (Kap. 5). Weder akuter noch wiederholter *Social Defeat*-Stress hatte einen Einfluss auf das basale oder rückfallartige Trinken Langzeit-alkoholerfahrener Martinsrieder Wistar-Ratten. Auch bei B6-Mäusen hatte weder akuter noch wiederholter *Social Defeat* einen Effekt auf den freiwilligen Alkoholkonsum im Heimkäfig. Ebenso erzielte hier akuter Beutestress keine Wirkung. Dagegen verringerten wiederholter variierter Stress sowie wiederholter *Forced Swim*-Stress – möglicherweise durch die Interaktion des Stresssystems mit dem Belohnungssystem und daraus folgend einer stärker belohnenden Wirkung des Alkohols – vorübergehend die Alkoholeinnahme bei den alkoholpräferierenden B6-Mäusen. Auf den freiwilligen Alkoholkonsum der den Alkohol eher meidenden D2-Mäuse hatte keine der Stressexpositionen einen Effekt. In der vorliegenden Studie wurde somit in unterschiedlichen Paradigmen der Einfluss diverser Stressoren auf den freiwilligen Alkoholkonsum der zweier verschiedener Spezies untersucht. Es zeigte sich kein oder nur ein sehr milder, den Alkoholkonsum verringernder Effekt. Dies weist deutlich darauf hin, dass – zumindest im Tiermodell mit Nagern – kein klarer Zusammenhang zwischen dem Erleben und den Auswirkungen von Stress und der freiwilligen Alkoholeinnahme besteht.

Die Ansicht, dass eine erhöhte Ängstlichkeit und/oder das Erleben von Stress zu einem Anstieg des Alkoholeinnahmeverhaltens und damit eventuell zu einem schädlichen, missbräuchlichen Alkoholkonsum führt, ist weit verbreitet, jedoch auch stark umstritten. Tiermodelle können einerseits helfen, diese Annahmen zu überprüfen, andererseits gegebenenfalls zugrundeliegende biologische Mechanismen sowie mögliche pharmakologische Interventionen zu untersuchen. Daher wurde in der vorliegenden Arbeit der Einfluss unterschiedlicher Ängstlichkeit, sowie die Wirkung verschiedener Stressoren auf den freiwilligen Alkoholkonsum Langzeit-alkoholerfahrener Ratten und Mäuse untersucht. Zuvor wurde bei Ratten gezeigt, dass die Tiere in dem gewählten Paradigma der freiwilligen oralen Alkoholselbstverabreichung ausreichende Mengen konsumieren, um eine nachweisbare neuroadaptive Anpassung an den Langzeit-Einfluss von Alkohol auf das zentrale Nervensystem zu entwickeln. Weder in Bezug auf Ängstlichkeit, noch auf den Einfluss von Stress ergab sich ein klarer Zusammenhang zur Menge freiwillig konsumierten Alkohols. Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass bei einzelnen Individuen – z.B. als Folge einer gestörten Funktion der Stressachse – ein kausaler Zusammenhang zwischen Ängstlichkeit oder Stresserfahrung und dem Alkoholeinnahmeverhalten besteht. Die allgemeine Annahme, dass erhöhte Ängstlichkeit bzw. das Erleben von Stress einen erhöhten Alkoholkonsum zur Folge hat, muss jedoch zurückgewiesen werden.

7. Literaturverzeichnis

Adams N. Sex differences and the effects of tail pinch on ethanol drinking in Maudsley rats. *Alcohol* 12 (1995) 463-468.

Adams N, Shihabi ZK, Blizard DA. Ethanol preference in the Harrington derivation of the Maudsley reactive and nonreactive strains. *Alcohol Clin Exp Res* 15 (1991) 170-174.

Adinoff B, Bone GHA, Linnoila M. Acute ethanol poisoning and the ethanol withdrawal syndrome. *Med Toxicol* 3 (1988) 172-196.

Aguilera G. Regulation of pituitary ACTH secretion during chronic stress. *Front Neuroendocrinol* 15 (1994) 321-350.

Almeida OFX, Shoaib M, Deicke J, Fischer D, Darwish MH, Patchev VK. Gender differences in ethanol preference and ingestion in rats - the role of the gonadal steroid environment. *J Clin Inv* 101 (1998) 2677-2685.

Baldwin HA, Rassnick S, Rivier J, Koob GF, Britton KT. CRF antagonist reverses the 'anxiogenic' response to ethanol withdrawal in the rat. *Psychopharmacology* 103 (1991) 227-232.

Baving L, Olbrich H. Angst bei Alkoholabhängigen. *Fortschr Neurol Psychiat* 64 (1996) 83-89.

Becker HC. Animal models of alcohol withdrawal. *Alcohol Res Health* 24 (2000) 105-113.

Behan DP, Grigoriadis DE, Lovenberg T, Chalmers D, Heinrichs S, Liaw C, De Souza EB. Neurobiology of corticotropin releasing factor (CRF) receptors and crf-binding protein: implications for the treatment of CNS disorders. *Mol Psychiatry* 1 (1996) 265-277.

Belknap JK, Crabbe JC, Young ER. Voluntary consumption of ethanol in 15 inbred mouse strains. *Psychopharmacology* 112 (1993) 352-358.

Berton O, Durand M, Aguerre S, Mormede P, Chaouloff F. Behavioral, neuroendocrine and serotonergic consequences of single social defeat and repeated fluoxetine pretreatment in the Lewis rat strain. *Neuroscience* 92 (1999) 327-341.

Bigelow GE, Griffiths RR, Liebson IA. Pharmacological influences upon human ethanol self-administration. In: Gross MM (Ed.) *Alcohol intoxication and withdrawal*. Plenum Press, New York (1977) 523-538.

Blatt SL, Takahashi RN. Experimental anxiety and the reinforcing effects of ethanol in rats. *Braz J Med Biol Res* 32 (1999) 457-461.

Brewster DJ. Genetic analysis of ethanol preference rats selected for emotional reactivity. *J Hered* 5 (1968) 283-286.

Brewster DJ. Ethanol preference in strains of rats selectively bred for behavioral characteristics. *J Genet Psychol* 115 (1969) 217-227.

Broadhurst PL. The Maudsley reactive and nonreactive strains of rats: a survey. *Behav Genet* 5 (1975) 299-319.

Brodie MS, Appel SB. Dopaminergic neurons in the ventral tegmental area of C57BL/6J and DBA/2J mice differ in sensitivity to ethanol excitation. *Alcohol Clin Exp Res* 24 (2000) 1120-1124.

Brown SA, Vik PW, McQuaid JR, Patterson TL, Irwin MR, Grant I. Severity of psychosocial stress and outcome of alcoholism treatment. *J Abnorm Psychol* 99 (1990) 344-348.

Brown SA, Vik PW, Patterson TL, Grant I, Schuckit MA. Stress, vulnerability and adult alcohol relapse. *J Stud Alcohol* 56 (1995) 538-545.

Bundesministerium für Gesundheit, Pressemitteilung Nr. 45 vom 19. Juni 2000.

Burish TG, Maisto SA, Cooper AM, Sobell MB. Effects of voluntary short-term abstinence from alcohol on subsequent drinking patterns of college students. *J Stud Alcohol* 42 (1981) 1013-1020.

Cabib S, Castellano C, Patacchioli FR, Cigliana G, Angelucci L, Puglisi-Allegra S. Opposite strain-dependent effects of post-training corticosterone in a passive avoidance task in mice: role of dopamine. *Brain Res* 729 (1996) 110-118.

Cabib S, Orsini C, Le Moal M, Piazza PV. Abolition and reversal of strain differences in behavioral responses to drugs of abuse after a brief experience. *Science* 289 (2000) 463-465.

Caplan MA, Puglisi K. Stress and conflict conditions leading to and maintaining voluntary alcohol consumption in rats. *Pharmacol Biochem Behav* 24 (1986) 271-280.

Cappel H, Herman CP. Alcohol and tension reduction. *Quart J Stud Alc* 33 (1972) 33-64.

Chandler LJ, Norwood D, Sutton G. Chronic ethanol upregulates NMDA and AMPA, but not kainate receptor subunit proteins in rat primary cortical cultures. *Alcohol Clin Exp Res* 23 (1999) 363-370.

Chatterton JE, Awobuluyi M, Premkumar LS, Takahashi H, Talantova M, Shin Y, Cui J, Tu S, Sevarino KA, Nakanishi N, Tong G, Lipton SA, Zhang D. Excitatory glycine receptors containing the NR3 family of NMDA receptor subunits. *Nature* 415 (2002) 793-798.

Chen YL, Mansbach RS, Winter SM, Brooks E, Collins J, Corman ML, Dunaiskis AR, Faraci WS, Gallaschun RJ, Schmidt A, Schulz DW. Synthesis and oral efficacy of a 4-(butylethylamino)pyrrolo[2,3-d]pyrimidine: a centrally active corticotropin-releasing factor1 receptor antagonist. *J Med Chem* (1997) 40 1749-1754.

Ciabarra AM, Sullivan JM, Gahn LG, Pecht G, Heinemann S, Sevarino KA. Cloning and characterization of χ -1: a developmentally regulated member of a novel class of the ionotropic glutamate receptor family. *J Neurosci* 15 (1995) 6498-6508.

Colombo G, Agabio R, Lobina C, Reali R, Zocchi A, Fadda F, Gessa GL. Sardinian alcohol-preferring rats: a genetic animal model of anxiety. *Physiol Behav* 57 (1995) 1181-1185.

Conger JJ. Reinforcement theory and the dynamics of alcoholism. *Quart J Stud Alcohol* 18 (1956) 296-305.

Cooper ML, Russell M, Skinner JB, Frone MR, Mudar P. Stress and alcohol use: moderating effects of gender, coping, and alcohol expectancies. *J Abnorm Psychol* 101 (1992) 139-152.

Crawley JN. Neuropharmacological specificity of a simple animal model for the behavioral actions of benzodiazepines. *Pharmacol Biochem Behav* 15 (1981) 695-699.

Crawley JN, Goodwin FK. Preliminary report of a simple animal model for the anxiolytic effects of benzodiazepines. *Pharmacol Biochem Behav* 13 (1980) 167-170.

Darstein M, Albrecht C, López-Francos L, Knörle R, Hölter SM, Spanagel R, Feuerstein TJ. Release and accumulation of neurotransmitters in the rat brain: acute effects of ethanol in vitro and effects of long-term voluntary ethanol intake. *Alcohol Clin Exp Res* 22 (1998) 704-709.

de Wit H, Chutuape MA. Increased ethanol choice in social drinkers following ethanol preload. *Behav Pharmacol* 4 (1993) 29-36.

Dildy JE, Leslie SW. Ethanol inhibits NMDA-induced increases in free intracellular Ca²⁺ in dissociated brain cells. *Brain Res* 499 (1989) 383-387.

Drewes KJ, Broadhurst PL. Alcohol selection by strains of rats selectively bred for behavior. *J Stud Alcohol* 40 (1979) 723-728.

Emmett-Oglesby MW, Mathis DA, Moon RTY, Lal H. Animal models of drug withdrawal symptoms. *Psychopharmacology* 101 (1990) 292-309.

Engblom CA, Courtney MJ, Kukkonen JP, Åkerman KEO. Ethanol specifically inhibits NMDA receptors with affinity for ifenprodil in the low micromolar range in cultured cerebellar granule cells. *J Neurochem* 69 (1997) 2162-2168.

Erb S, Shaham Y, Stewart J. Stress reinstates cocaine seeking behaviour after prolonged extinction and drug-free period. *Psychopharmacology* 128 (1996) 408-412.

Erb S, Shaham Y, Stewart J. The role of corticotropin-releasing factor and corticosterone in stress- and cocaine-induced relapse to cocaine seeking in rats. *J Neurosci* 18 (1998) 5529-5536.

Erb S, Stewart J. A role for the bed nucleus of the stria terminalis, but not the amygdala, in the effects of corticotropin-releasing factor on stress-induced reinstatement of cocaine seeking. *J Neurosci* 19 (RC35) (1999) 1-6.

Fadda F, Rossetti ZL. Chronic ethanol consumption: from neuroadaptation to neurodegeneration. *Prog Neurobiol* 56 (1998) 385-431.

Fahlke C, Eriksson CJ, Hard E. Audiogenic immobility reaction and open-field behavior in AA and ANA rat lines. *Alcohol* 10 (1993) 311-315.

Fidler TL, Lolordo VM. Failure to find posthock increases in ethanol preference. *Alcohol Clin Exp Res* 20 (1996) 110-121.

File SE, Baldwin HA, Hitchcott PK. Flumazenil but not nitrendipine reverses the increased anxiety during ethanol withdrawal in the rat. *Psychopharmacology* 98 (1989) 262-264.

Follesa P, Ticku MK. Chronic ethanol treatment differentially regulates NMDA receptor subunit mRNA expression in rat brain. *Mol Brain Res* 29 (1995) 99-106.

Follesa P, Ticku MK. NMDA receptor upregulation: molecular studies in cultured mouse cortical neurons after chronic antagonist exposure. *J Neurosci* 16 (1996a) 2172-2178.

Follesa P, Ticku MK. Chronic ethanol-mediated up-regulation of the N-Methyl-D-aspartate receptor polypeptide subunits in mouse cortical neurons in culture. *J Biol Chem* 271 (1996b) 13297-13299.

Freund G, Anderson KJ. Glutamate receptors in the frontal cortex of alcoholics. *Alcohol Clin Exp Res* 20 (1996) 1165-1172.

Fuller JL. Measurement of alcohol preference in genetic experiments. *J Comp Physiol Psychol* 57 (1964) 85-88.

George SR, Fan T, Ng GY, Jung SY, O'Dowd BF, Naranjo CA. Low endogenous dopamine function in brain predisposes to high alcohol preference and consumption: reversal by increasing synaptic dopamine. *J Pharmacol Exp Ther* 273 (1995) 373-379.

George DT, Nutt DJ, Dwyer BA, Linnoila M. Alcoholism and panic disorder: is the comorbidity more than coincidence? *Acta Psychiatr Scand* 81 (1990) 97-107.

Grahame NJ, Cunningham CL. Intravenous ethanol self-administration in C57BL/6J and DBA/2J mice. *Alcohol Clin Exp Res* 21 (1997) 56-62.

Gulya K, Grant KA, Valverius P, Hoffman PL, Tabakoff B. Brain regional specificity and time-course of changes in the NMDA receptor-ionophore complex during ethanol withdrawal. *Brain Res* 547 (1991) 129-134.

Haile CN, GrandPre T, Kosten TA. Chronic unpredictable stress, but not chronic predictable stress, enhances the sensitivity to the behavioral effects of cocaine in rats. *Psychopharmacology* 154 (2001) 213-220.

Heinrichs SC, Merlo Pich E, Miczek KA, Britton KT, Koob GF. Corticotropin-releasing factor antagonist reduces emotionality in socially defeated rats via direct neurotropic action. *Brain Res* 581 (1992) 190-197.

Hengartner T, Merki CM. Genussmittel – Ein kulturgeschichtliches Handbuch. Campus-Verlag, Frankfurt/Main, New York (1999).

Henniger MSH. Verhaltenspharmakologische Untersuchungen zu Alkoholkonsum und Ängstlichkeit bei Ratten. Diplomarbeit an der Fakultät für Biologie der Ludwig-Maximilians-Universität München (1998).

Henniger MSH, Ohl F, Hölter SM, Weißenbacher , Toschi N, Lörscher P, Wigger A, Spanagel R, Landgraf R. Unconditioned anxiety and social behaviour in two rat lines selectively bred for high and low anxiety-related behaviour. *Behav Brain Res* 111 (2000) 153-163.

Henniger MSH, Spanagel R, Wigger A, Landgraf R, Hölter SM. Alcohol self-administration in two rat lines selectively bred for extremes in anxiety-related behavior. *Neuropsychopharmacology* 26 (2002) 729-736.

Heyser CJ, Schulteis G, Durbin P, Koob GF. Chronic acamprosate treatment eliminates the alcohol deprivation effect while having limited effects on baseline responding for ethanol in rats. *Neuropsychopharmacology* 18 (1998) 125-133.

Hilakivi-Clarke L, Lister RG. Social status and voluntary alcohol consumption in mice: interaction with stress. *Psychopharmacology* 108 (1992) 276-282.

Himle JA, Abelson JL, Haightgou MSW, Hill EM, Nesse RM, Curtis GC. Effect of alcohol on social phobic anxiety. *Am J Psychiatry* 156 (1999) 1237-1243.

Hodgson R, Rankin H, Strickwell T. Alcohol dependence and the priming effect. *Behav Res Ther* 17 (1979) 379-387.

Hoffman PL, Rabe CS, Moses F, Tabakoff B. N-methyl-D-aspartate receptors and ethanol: inhibition of calcium flux and cyclic GMP production. *J Neurochem* 52 (1989) 1937-1940.

Hoffman PL, Tabakoff B. The role of the NMDA receptor in ethanol withdrawal. *EXS* 71 (1994) 61-70.

Hollmann M, Heinemann S. Cloned glutamate receptors. *Annu Rev Neurosci* 17 (1994) 31-108.

Hölter SM, Engelmann M, Kirschke C, Liebsch G, Landgraf R, Spanagel R. Long-term ethanol self-administration with repeated ethanol deprivation episodes changes ethanol drinking pattern and increases anxiety-related behavior during ethanol deprivation in rats. *Behav Pharmacol* 9 (1998) 41-47.

Hölter SM, Henniger MSH, Lipkowski AW, Spanagel R. Kappa-opioid receptors and relapse-like drinking in long-term ethanol-experienced rats. *Psychopharmacology* 153 (2000) 93-102.

Hölter SM, Landgraf R, Zieglgänsberger W, Spanagel R. Time course of acamprosate action on operant ethanol self-administration after ethanol deprivation. *Alcohol Clin Exp Res* 21 (1997) 862-868.

Hölter SM, Spanagel R. Effects of opiate antagonist treatment on the alcohol deprivation effect in long-term ethanol-experienced rats. *Psychopharmacology* 145 (1999) 360-369.

Hu X-J, Follesa P, Ticku MK. Chronic ethanol treatment produces a selective upregulation of the NMDA receptor subunit gene expression in mammalian cultured cortical neurons. *Mol Brain Res* 36 (1996) 211-218.

Hu X-J, Ticku MK. Chronic ethanol treatment upregulates the NMDA receptor function and binding in mammalian cortical neurons. *Brain Res Mol Brain Res* 30 (1995) 347-356.

Iorio KR, Reinlib L, Tabakoff B, Hoffman PL. Chronic exposure of cerebellar granule cells to ethanol results in increased N-methyl-D-aspartate receptor function. *Mol Pharmacol* 41 (1992) 1142-1148.

Kalodner CR, Delucia JL, Ursprung AW. An examination of the tension reduction hypothesis: the relationship between anxiety and alcohol in college students. *Addict Behav* 14 (1989) 649-654.

Kalluri HSG, Mehta AK, Ticku MK. Up-regulation of NMDA receptor subunits in rat brain following chronic ethanol treatment. *Mol Brain Res* 58 (1998) 221-224.

Keck ME, Holsboer F. Hyperactivity of CRH neuronal circuits as a target for therapeutic interventions in affective disorders. *Peptides* 22 (2001) 835-844.

Keck ME, Welt T, Wigger A, Renner U, Engelmann M, Holsboer F, Landgraf R. The anxiolytic effect of the CRH(1) receptor antagonist R121919 depends on innate emotionality in rats. *Eur J Neurosci* 13 (2001) 373-380.

Koob GF. Drug addiction: the YIN and Yang of hedonic homeostasis. *Neuron* 16 (1996) 893-896.

Koob GF. Animal models of craving for ethanol. *Addiction* 95 Suppl 2 (2000) S73-S81.

Koob GF, Heinrichs SC. A role for corticotropin releasing factor and urocortin in behavioral responses to stressors. *Brain Res* 848 (1999) 141-152.

Koolhaas JM, de Boer SF, de Ruiter AJH, Meerlo P, Sgoifo A. Social stress in rats and mice. *Acta Physiol Scand Suppl* 640 (1997a) 69-72.

Koolhaas JM, Meerlo P, de Boer SF, Strubbe JH, Bohus B. The temporal dynamics of the stress response. *Neurosci Biobehav Rev* 21 (1997b) 775-782.

Krysiak R, Obuchowicz E, Herman ZS. Role of corticotropin-releasing factor (CRF) in anxiety. *Pol J Pharmacol* 52 (2000) 15-25.

Kushner MG, Abrams K, Borchardt C. The relationship between anxiety disorders and alcohol use disorders: a review of major perspectives and findings. *Clin Psychol Rev* 20 (2000) 149-171.

Kushner MG, Sher KJ, Breitman BD. The relation between alcohol problems and the anxiety disorders. *Am J Psychiatry* 147 (1990) 685-695.

Kushner MG, Sher KJ, Wood MD, Wood PK. Anxiety and drinking behavior: moderating effects of tension-reduction alcohol outcome expectancies. *Alcohol Clin Exp Res* 18 (1994) 852-860.

LaBounty LP, atsukami D, Morgan SF, Nelson L. Relapse among alcoholics with phobic and panic symptoms. *Addictive Behaviors* 17 (1992) 9-15.

Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227 (1970) 680-685.

Lal H, Harris CM, Benjamin D, Springfield AC, Bhadra S, Emmett-Oglesby MW. Characterization of a pentylentetrazol-like interoceptive stimulus produced by ethanol withdrawal. *J Pharmacol Exp Ther* 247 (1988) 508-518.

Landgraf A, Wigger A. HAB and LAB rats as a psychopathological animal model of extremes in innate anxiety. *Behav Genet* (2002) in press.

Landgraf A, Wigger A, Holsboer F, Neumann ID. Hyper-reactive hypothalamo-pituitary-adrenocortical axis in rats bred for high anxiety-related behaviour. *J Neuroendocrinol* 11 (1999) 405-407.

Lazarus RS, Folkman S. Stress, appraisal and coping. Springer, New York (1984).

Lê AD, Poulos CX, Harding S, Watchus J, Juzysch W, Shaham Y. Effects of Naltrexone and Fluoxetine on alcohol self-administration and reinstatement of alcohol seeking induced by priming injections of alcohol and exposure to stress. *Neuropsychopharmacology* 21 (1999) 435-444.

Lê AD, Quan B, Juzytch W, Fletcher PJ, Joharchi N, Shaham Y. Reinstatement of alcohol-seeking by priming injections of alcohol and exposure to stress in rats. *Psychopharmacology* 135 (1998) 169-174.

Lê AD, Shaham Y. Neurobiology of relapse to alcohol in rats. *Pharmacol Ther* (2002) in press.

Lessov CN, Palmer AA, Quick EA, Phillips TJ. Voluntary ethanol drinking in C57BL/6J and DBA2/J mice before and after sensitization to the locomotor stimulant effects of ethanol. *Psychopharmacology* 155 (2001) 91-99.

Li T-K, Lumeng L. Alcohol preference and voluntary alcohol intakes of inbred rat strains and the National Institutes of Health heterogeneous stock of rats. *Alcohol Clin Exp Res* 8 (1984) 485-486.

Liebsch G, Linthorst CE, Neumann ID, Reul JMHM, Holsboer F, Landgraf R. Behavioral, physiological, and neuroendocrine stress responses and differential sensitivity to diazepam in two Wistar rat lines selectively bred for high- and low-anxiety-related behavior. *Neuropsychopharmacology* 19 (1998a) 381-396.

Liebsch G, Montkowski A, Holsboer F, Landgraf R. Behavioral profiles of two Wistar rat lines selectively bred for high or low anxiety-related behavior. *Behav Brain Res* 94 (1998b) 301-310.

Linnoila MI. Anxiety and alcoholism. *J Clin Psychiatry* 50 [11, Suppl] (1989) 26-29.

Lipscomb TR, Nathan PE, Wilson GT, Abrams DB. Effects of tolerance on the anxiety-reducing function of alcohol. *Arch Gen Psychiatry* 37 (1980) 577-582.

- Lovinger DM. Developmental decrease in ethanol inhibition of N-methyl-D-aspartate receptors in rat neocortical neurons: relation to the actions of ifenprodil. *J Pharmacol Exp Ther* 274 (1995) 164-172.
- Lovinger DM, White G, Weight FF. Ethanol inhibits NMDA-activated ion current in hippocampal neurons. *Science* 243 (1989) 1721-1724.
- Lyvers M. "Loss of control" in alcoholism and drug addiction: a neuroscientific interpretation, *Exp Clin Psychopharmacol* 8 (2000) 225-249.
- Magnusson KR. The aging of the NMDA receptor complex. *Front Biosci* 3 (1998) e70-80.
- Marlatt GA. Stress as a determinant of excessive drinking and relapse. In: Pohorecky LA, Brick J (Ed.). Stress and alcohol use. Elsevier, New York (1983) 279-294.
- Masserman JH, Yum KS. An analysis of the influence of alcohol on experimental neuroses in cats. *Psychosomatic Medicine* 8 (1946) 36-52.
- McClearn GE, Rodgers DA. Differences in alcohol preference among inbred strains of mice. *Q J Stud Alcohol* 20 (1959) 691-695.
- Meisch RA, Lemaire GA. Drug self-administration. In: van Harren F (Ed.). Methods in Behavioral Pharmacology. Elsevier, Amsterdam (1993) 257-300.
- Merlo Pich E, Heinrichs SC, Rivier C, Miczek KA, Fisher DA, Koob GF. Blockade of pituitary-adrenal axis activation induced by peripheral immunoneutralization of corticotropin-releasing factor does not affect the behavioral response to social defeat stress in rats. *Psychoneuroendocrinology* 18 (1993) 495-507.
- Meerlo P, De Boer SF, Koolhaas JM, Daan S, Van den Hoofdacker RH. Changes in daily rhythms of body temperature and activity after a single social defeat in rats. *Physiol Behav* 59 (1996a) 735-739.
- Meerlo P, Overkamp GJ, Benning MA, Koolhaas JM, Van den Hoofdacker RH. Long-term changes in open field behaviour following a single social defeat in rats can be reversed by sleep deprivation. *Physiol Behav* 60 (1996b) 115-119.
- Meerlo P, Overkamp GJ, Daan S, Van Den Hoofdacker RH, Koolhaas JM. Changes in behaviour and body weight following a single or double social defeat in rats. *Stress* 1 (1996c) 21-32.
- Möller C, Wiklund L, Sommer W, Thorsell A, Heilig M. Decreased experimental anxiety and voluntary ethanol consumption in rats following central but not basolateral amygdala lesions. *Brain Res* 760 (1997a) 94-101.
- Möller C, Wiklund L, Thorsell A, Hyytiä P, Heilig M. Decreased measures of experimental anxiety in rats bred for high alcohol preference. *Alcohol Clin Exp Res* 21 (1997b) 656-600.
- Moriyoshi K, Masu M, Ishii T, Shigemoto R, Mizuno N, Nakanishi S. Molecular cloning and characterization of the rat NMDA receptor. *Nature* 354 (1991) 31-37.

Mullaney JA, Trippett CJ. Alcohol dependence and phobias: clinical description and relevance. *Br J Psychiatry* 135 (1979) 565-573.

Narita M, Soma M, Narita M, Mizoguchi H, Tseng LF, Suzuki T. Implications of the NR2B subunit-containing NMDA receptor localized in mouse limbic forebrain in ethanol dependence. *Eur J Pharmacol* 401 (2000) 191-195.

Naruse T. Effects of repeated intravenous administration of diazepam on food intake in rats. *Fundam Clin Pharmacol* 8 (1994) 379-384.

Naruse T, Ishii R. Relationship between histamine receptors in the brain and diazepam-induced hyperphagia in rats. *Pharmacol Biochem Behav* 51 (1995) 923-927.

Nevo I, Hamon M. Neurotransmitter and neuromodulatory mechanisms involved in alcohol abuse and alcoholism. *Neurochem Int* 26 (1995) 305-336.

Ng GY, O'Dowd BF, George SR. Genotypic differences in brain dopamine receptor function in the DBA/2J and C57BL/6J inbred mouse strains. *Eur J Pharmacol* 269 (1994) 349-364.

Ng Cheong Ton MJ, Brown Z, Michalakeas A, Amit Z. Stress induced suppression of maintenance but not of acquisition of ethanol consumption in rats. *Pharmacol Biochem Behav* 18 (1983) 141-144.

Nishi M, Hinds H, Lu HP, Kawata M, Hayashi Y. Motoneuron-specific expression of NR3B, a novel NMDA-type glutamate receptor subunit that works in a dominant-negative manner. *J Neurosci* 21 (2001) RC185

Núñez MJ, Riveiro P, Becerra MA, De Miguel S, Quintans MR, Núñez LA, Legazpi MP, Mayán JM, Rey-Méndez M, Varela M, Freire-Garabal M. Effects of alprazolam on the free-choice ethanol consumption induced by isolation stress in aged rats. *Life Sci* 64 (1999) 213-217.

Ohl F, Toschi N, Wigger A, Henniger MSH, Landgraf R. Dimensions of emotionality in a rat model of innate anxiety. *Behav Neurosci* 115 (2001) 429-436.

O'Malley SS, Jaffe AJ, Chang G, Schottenfeld RS, Meyer RE, Rounsaville B. Naltrexone and coping skills therapy for alcohol dependence. A controlled study. *Arch Gen Psychiatry* 49 (1992) 881-887.

Overstreet DH, Halikas JA, Seredenin SB, Kampov-Polevoy AB, Viglinskaya IV, Kashevskaya O, Badishtov BA, Knapp DJ, Mormede P, Kiianmaa K, Li T-K, Rezvani AH. Behavioral similarities and differences among alcohol-preferring and -nonpreferring rats: confirmation by factor analysis and extension to additional groups. *Alcohol Clin Exp Res* 21 (1997) 840-848.

Overstreet DH, Kampov-Polevoy AB, Rezvani AH, Murelle L, Halikas JA, Janowsky DS. Saccharin intake predicts ethanol intake in genetically heterogeneous rats as well as different rat strains. *Alcohol Clin Exp Res* 17 (1993) 366-369.

Phillips TJ, Crabbe JC. Behavioral studies of genetic differences in alcohol action. In: Crabbe JC, Harris RA (Ed.). The genetic basic of alcohol and drug action. Plenum Press, New York (1991) 25-104.

Piazza PV, Le Moal M. The role of stress in drug self-administration. *Trends Pharmacol Sci* 19 (1998) 67-74.

Piazza PV, Rouge-Pont F, Deroche V, Maccari S, Simon H, Le Moal M. Glucocorticoids have state-dependent stimulant effects on the mesencephalic dopaminergic transmission. *Proc Natl Acad Sci USA* 93 (1996) 8716-8720.

Pohorecky LA. Interaction of ethanol and stress: research with experimental animals – an update. *Alcohol Alcohol* 25 (1990) 263-276.

Pohorecky LA. Stress and alcohol interaction: an update of human research. *Alcohol Clin Exp Res* 15 (1991) 438-495.

Rasmussen DD, Mitton DR, Green AJ, Puchalski S. Chronic daily ethanol and withdrawal: 2. Behavioral changes during prolonged abstinence. *Alcohol Clin Exp Res* 25 (2001) 999-1005.

Rassnick S, Heinrichs SG, Britton KT, Koob GF. Microinjection of corticotropin-releasing factor antagonist into the central nucleus of the amygdala reverses anxiogenic-like effects of ethanol withdrawal. *Brain Res* 605 (1993) 25-32.

Reul JMHM, Holsboer F. Corticotropin-releasing factor receptors 1 and 2 in anxiety and depression. *Curr Opin Pharmacol* 2 (2002) 23-33.

Richter RM, Zorrilla EP, Basso AM, Koob GF, Weiss F. Altered amygdalar CRF release and increased anxiety-like behavior in Sardinian alcohol-preferring rats: a microdialysis and behavioral study. *Alcohol Clin Exp Res* 24 (2000) 1765-1772.

Robinson TE, Berridge KC. The neural basis of drug craving: an incentive-sensitization theory of addiction. *Brain Res Brain Res Rev* 18 (1993) 247-291.

Rogers DC, Jones DN, Nelson PR, Jones CM, Quilter CA, Robinson TL, Hagan JJ. Use of SHIRPA and discriminant analysis to characterise marked differences in the behavioural phenotype of six inbred mouse strains. *Behav Brain Res* 105 (1999) 207-217.

Rouge-Pont F, Deroche V, Le Moal M, Piazza PV. Individual differences in stress-induced dopamine release in the nucleus accumbens are influenced by corticosterone. *Eur J Neurosci* 10 (1998) 3903-3907.

Sass H, Soyka M, Mann K, Zieglgänsberger W. Relapse prevention by acamprosate: results from a placebo controlled study in alcohol dependence. *Arch Gen Psychiatry* 53 (1996) 673-680.

Satinder KP. Behaviour-genetic-dependent self-selection of alcohol in rats. *J Comp Physiol Psychol* 80 (1972) 422-434.

Sayette MA. Does drinking reduce stress? *Alcohol Research & Health* 23 (1999) 250-255.

Schneider CW, Evans SK, Chenoweth MB, Berman FL. Ethanol preference and behavioral tolerance in mice: biochemical and neurophysiological mechanisms. *J Comp Physiol Psychol* 82 (1973) 466-474.

Schuckit MA, Hesselbrock V. Alcohol dependence and anxiety disorders: what is the relationship? *Am J Psychiatry* 151 (1994) 1723-1734.

Schulz DW, Mansbach RS, Sprouse J, Braselton JP, Collins J, Corman M, Dunaiskis A, Faraci S, Schmidt AW, Seeger T, Seymour P, Tingley FD 3rd, Winston EN, Chen YL, Heym J. CP-154,526: a potent and selective nonpeptide antagonist of corticotropin releasing factor receptors. *Proc Natl Acad Sci (USA)* 93 (1996) 10477-10482.

Self DW. Neural substrates of drug craving and relapse in drug addiction. *Ann Med* 30 (1998) 379-389.

Shaham Y, Funk D, Erb S, Brown T, Walker C-D, Stewart J. Corticotropin-releasing factor, but not corticosterone, is involved in stress-induced relapse to heroin-seeking in rats. *J Neurosci* 17 (1997) 2605-2614.

Shaham Y, Rajabi H, Stewart J (1996) Relapse to heroin-seeking under opioid maintenance: the effects of opioid withdrawal, heroin priming and stress. *J Neurosci* 16 (1996) 1957-1963.

Shalev U, Highfield D, Yap J, Shaham Y. Stress and relapse to drug seeking in rats: studies on the generality of the effect. *Psychopharmacology* 150 (2000) 337-346.

Sillaber I. Individuelle Sensitivität für Drogenwirkungen: Einfluß genetisch veränderter Funktionalität des Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenrinden-Systems bei Mäusen. Dissertation an der Fakultät für Biologie der Ludwig-Maximilians-Universität München (1999).

Sillaber I, Rammes G, Zimmermann S, Mahal B, Zieglgänsberger W, Wurst W, Holsboer F, Spanagel R. Enhanced and delayed stress-induced alcohol drinking in mice lacking functional CRH 1 receptors. *Science* 296 (2002) 931-933.

Sinclair JD. The alcohol deprivation effect in monkeys. *Psychonom Sci* 25 (1971) 21-22.

Sinclair JD, Senter RJ. Increased preference for ethanol in rats following alcohol deprivation. *Psychonomic Sci* 8 (1967) 11-12.

Sinha R. How does stress increase risk of drug abuse and relapse? *Psychopharmacology* 158 (2001) 343-359.

Snell LD, Nunley KR, Lickteig RL, Browning MD, Tabakoff B, Hoffman PL. Regional and subunit specific changes in NMDA receptor mRNA and immunoreactivity in mouse brain following chronic ethanol ingestion. *Mol Brain Res* 40 (1996) 71-78.

Spanagel R, Höltter SM. Long-term alcohol self-administration with repeated alcohol deprivation phases: An animal model of alcoholism? *Alcohol Alcohol* 34 (1999) 231-243.

Spanagel R, Höltter SM. Pharmacological validation of a new animal model of alcoholism. *J Neural Transm* 107 (2000) 669-680

Spanagel R, Höltér SM, Allingham K, Landgraf R, Zieglgänsberger W. Acamprosate and alcohol: I. Effects on alcohol intake following alcohol deprivation in the rat. *Eur J Pharmacol* 305 (1996) 39-44.

Spanagel R, Montkowski A, Allingham K, Stöhr T, Shoaib M, Holsboer F, Landgraf R. Anxiety: a potential predictor of vulnerability to the initiation of ethanol self-administration in rats. *Psychopharmacology* 122 (1995) 369-373.

Spanagel R, Weiss F. The dopamine hypothesis of reward: past and current status. *Trends Neurosci* 22 (1999) 521-527.

Sprague JE, Maickel RP. Effects of stress and ebitaride (Hoe-427) on free-choice ethanol consumption: comparison of Lewis and Sprague-Dawley rats. *Life Sci* 55 (1994) 873-878.

Stephenson FA. Subunit characterization of NMDA receptors. *Curr Drug Targets* 2 (2001) 233-239.

Stewart J. Pathways to relapse: the neurobiology of drug- and stress-induced relapse to drug taking. *J Psychiatry Neurosci* 25 (2000) 125-136.

Stewart RB, Gatto Gj, Lumeng L, Li TK, Murphy JM. Comparison of alcohol-preferring (P) and nonpreferring (NP) rats on tests of anxiety and for the anxiolytic effects of ethanol. *Alcohol* 10 (1993) 1-10.

Stockwell T, Hodgson R, Rankin H. Tension reduction and the effects of prolonged alcohol consumption. *Br J Addict* 77 (1982) 65-73.

Sucher NJ, Akbarian S, Chi CL, Leclerc CL, Awobuluyi M, Deitcher DL, Wu MK, Yuan JP, Jones EG, Lipton SA. Developmental and regional expression pattern of a novel NMDA receptor-like subunit (NMDAR-L) in the rodent brain. *J Neurosci* 15 (1995) 6509-6520.

Takahashi H, Takada Y, Nagai N, Urano T, Takada A. Effects of nicotine and footshock stress on dopamine release in the striatum and nucleus accumbens. *Brain Res Bull* 45 (1998) 157-162.

Tomasson K, Vaglum P. Psychopathology and alcohol consumption among treatment-seeking alcoholics: a prospective study. *Addiction* 91 (1996) 1019-1030.

Trullas R, Skolnick P. Differences in fear motivated behaviors among inbred mouse strains. *Psychopharmacology* 111 (1993) 323-331.

Tsai G, Coyle JT. The role of glutamatergic neurotransmission in the pathophysiology of alcoholism. *Annu Rev Med* 49 (1998) 173-184.

Tuominen K, Hilakivi LA, Päivärinta P, Korpi ER. Behavior of alcohol-preferring AA and alcohol-avoiding ANA rat lines in tests of anxiety and aggression. *Alcohol* 7 (1990) 349-353.

van Erp AMM, Miczek KA. Persistent suppression of ethanol self-administration by brief social stress in rats and increased startle response as index of withdrawal. *Physiol Behav* 73 (2001) 301-311.

van Erp AMM, Tachi N, Miczeck KA. Short or continuous social stress: suppression of continuously available ethanol intake in subordinate rats. *Behav Pharmacol* 12 (2001) 335-342.

Viglinskaya IV, Overstreet DH, Kashevskaya OP, Badishtov BA, Kampov-Polevoy AB, Seredenin SB, Halikas JA. To drink or not to drink: Tests of anxiety and immobility in alcohol-preferring and -nonpreferring rat strains. *Physiol Behav* 57 (1995) 937-941.

Volpicelli JR, Alterman AI, Hayashida M, O'Brien CP. Naltrexone in the treatment of alcohol dependence. *Arch Gen Psychiatry* 49 (1992) 876-880.

Volpicelli JR, Ulm RR. The influence of control over appetitive and aversive events on alcohol preference in rats. *Alcohol* 7 (1990) 133-136.

Walker D, Davis M. Double dissociation between the involvement of the bed nucleus of the stria terminalis and the central nucleus of the amygdala in startle increases produced by conditioned versus unconditioned fear. *J Neurosci* 17 (1997) 9375-9383.

Weiss F, Ciccocioppo R, Parsons LH, Katner S, Liu X, Zorrilla EP, Valdez GR, Ben-Shahar O, Angeletti S, Richter RR. Compulsive drug-seeking behavior and relapse. Neuroadaptation, stress, and conditioning factors. *Ann N Y Acad Sci* 937 (2001) 1-26.

Weiss KJ, Rosenberg DJ. Prevalence of anxiety disorders among alcoholics. *J Clin Psychiatry* 46 (1985) 3-5.

Weissmann M. Anxiety and alcoholism. *J Clin Psychiatry* 49 Suppl 10 (1988) 17-19.

Wenzel A, Scheurer L, Künzi R, Fritschy JM, Mohler H, Benke D. Distribution of NMDA receptor subunit proteins NR2A, 2B, 2C and 2D in rat brain. *Neuroreport* 7 (1995) 45-48.

Whitworth AB, Fischer F, Lesch OM, Nimmerrichter A, Oberbauer H, Platz T, Potgieter A, Walter H, Fleischhacker WW. Comparison of acamprosate and placebo in long-term treatment of alcohol dependence. *Lancet* 347 (1996) 1438-1442.

Wigger A, Loerscher P, Weissenbacher P, Holsboer F, Landgraf R. Cross-fostering and cross-breeding of HAB and LAB rats: a genetic model of anxiety. *Behav Genet* 31 (2001) 371-382.

Wilson GT. Alcohol and anxiety. *Behav Res Ther* 26 (1988) 369-381.

Winokur G, Holemon E. Chronic anxiety neurosis: clinical and sexual aspects. *Acta Psychiatr Scand* 39 (1963) 384-412.

Wirkner K, Eberts C, Poelchen W, Allgaier C, Illes P. Mechanism of inhibition by ethanol of NMDA and AMPA receptor channel functions in cultured rat cortical neurons. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 362 (2000) 568-576.

Wirkner K, Poelchen W, Köles L, Mühlberg K, Scheibler P, Allgaier C, Illes P. Ethanol-induced inhibition of NMDA receptor channels. *Neurochem Int* 35 (1999) 153-162.

Wolffgramm J, Heyne A. From controlled drug intake to loss of control: the irreversible development of drug addiction in the rat. *Behav Brain Res* 70 (1995) 77-94.

Woodruff RA Jr, Guze SB, Clayton PJ. Anxiety neurosis among psychiatric outpatients. *Compr Psychiatry* 13 (1972) 165-170.

Wu YL, Yoshida M, Emoto H, Tanaka M. Psychological stress selectively increases extracellular dopamine in the 'shell', but not in the 'core' of the rat nucleus accumbens: a novel dual-needle probe simultaneous microdialysis study. *Neurosci Lett* 275 (1999) 69-72.

Yang X, Criswell HE, Simson P, Moy S, Breese GR. Evidence for a selective effect of ethanol on N-methyl-D-aspartate responses: ethanol effects a subtype of the ifenprodil-sensitive N-methyl-D-aspartate receptors. *J Pharmacol Exp Ther* 278 (1996) 114-124.

Young R McD, Oei TPS, Knight RG. The tension reduction hypothesis revisited: an alcohol expectancy perspective. *Br J Addict* 85 (1990) 31-40.

Zelena D, Haller J, Halász J, Makara GB. Social stress of variable intensity: physiological and behavioral consequences. *Brain Res Bull* 48 (1999) 297-302.

Zieglgänsberger W, Spanagel R. Molekularbiologie der Sucht. In: Ganten D, Ruckpaul K (Ed.). *Handbuch der molekularen Medizin, Band 5, Erkrankungen des Zentralnervensystems*. Springer, Berlin, Heidelberg (1999) 237-272.

8. Danksagung

Prof. Dr. Dr. Florian Holsboer hat es mir ermöglicht, diese Dissertation am Max-Planck-Institut für Psychiatrie in München durchzuführen, wofür ich mich an dieser Stelle bedanken will. Die Leitung der Arbeitsgruppe hatten nacheinander Prof. Dr. Rainer Spanagel, Dr. Carsten Wotjak und Dr. Ingeborg Sillaber. Vielen Dank für die Betreuung, für zahlreiche Diskussionen und die Bereitschaft für Probleme stets ein offenes Ohr zu haben. Im Speziellen möchte ich mich bei Dr. Sabine Hölter und Dr. Ingeborg Sillaber bedanken, die sowohl immer hilfsbereit und bei Problemen zur Stelle waren, als auch ein Arbeitsklima schufen, in dem ich mich höchst wohl fühlte. Es hat Spaß gemacht, mit Euch das Büro zu teilen. Vielen Dank auch an Christine Bartl für die Hilfe mit allem, was die Tiere betraf und Ursula Genning für die Unterstützung im Labor, im Speziellen bei der Durchführung der RIAs.

Die Durchführung der Experimente zum Einfluss langfristigen Alkoholkonsums auf die NR2B Expression in verschiedenen Hirngebieten Martinsrieder Wistar-Ratten wurde in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Walter Zieglgänsberger durchgeführt und wäre ohne die tatkräftige Unterstützung von Dr. Gerhard Rammes, Dr. Beatrice Mahal, Barbara Hauger und Christine Hilf nicht möglich gewesen. Vielen Dank für die Hilfe.

Vielen Dank auch an die Mitarbeiter der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Rainer Landgraf, besonders an Dr. Alexandra Wigger, für die Überlassung der HAB/LAB-Ratten.

Ein herzliches Dankeschön geht an Prof. Dr. Rainer Landgraf und Prof. Dr. Peter Schlegel für die Bereitschaft, die Erst- bzw. Zweitkorrektur dieser Arbeit zu übernehmen.

Zu guter Letzt möchte ich mich natürlich auch bei meinen Eltern und meiner Großmutter bedanken für die Unterstützung in jeglicher, bei weitem nicht nur finanzieller, Hinsicht.

9. Lebenslauf

Markus. S.H. Henniger

Geburtsdatum:	21.05.1970
Geburtsort:	München, Deutschland
1976 – 1980	Grundschule Baierbrunn
1980 – 1989	Gymnasium Icking
1989 – 1990	Grundwehrdienst
1990 – 1991	Studium der an der Universität Bayreuth, Fakultät für Chemie
1991 – 1998	Studium an der Ludwig-Maximilians-Universität München, Fakultät für Biologie
1994	Diplom-Vorprüfung
1998	Diplom-Hauptprüfung
	Hauptfach: Zoologie
	Nebenfächer: Neurobiologie, Ökologie, Anthropologie/Humangenetik
1998	Anfertigung der Diplomarbeit am Max-Planck-Institut für Psychiatrie, München; Abteilung Suchtforschung
	Thema: Verhaltenspharmakologische Untersuchungen zu Alkoholkonsum und Ängstlichkeit bei Ratten
1998 – 2002	Anfertigung der Promotionsarbeit am Max-Planck-Institut für Psychiatrie, München; Abteilungen Suchtforschung, Neuronale Plastizität, Verhaltenspharmakologie
	Thema: Freiwilliger Alkoholkonsum bei Nagern: Einfluss von Emotionalität und Stress

10. Publikationen

Originalarbeiten

Henniger MSH, Spanagel R, Wigger A, Landgraf R, Höltér SM. Alcohol self-administration in two rat lines selectively bred for extremes in anxiety-related behavior. *Neuropsychopharmacology* 26 (2002) 729-736.

Ohl F, Toschi N, Wigger A, Henniger MSH, Landgraf R. Dimensions of emotionality in a rat model of innate anxiety. *Behav Neurosci* 115 (2001) 429-436.

Henniger MSH, Ohl F, Höltér SM, Weißenbacher P, Toschi N, Lörscher P, Wigger A, Spanagel R, Landgraf R. Unconditioned anxiety and social behaviour in two rat lines selectively bred for high and low anxiety-related behaviour. *Behav Brain Res* 111(2000) 153-163.

Höltér SM, Henniger MSH, Lipkowski AW, Spanagel R. Kappa-opioid receptors and relapse drinking in long-term ethanol-experienced rats. *Psychopharmacology* 153 (2000) 93-102.

Keck ME, Engelmann M, Müller MB, Henniger MSH, Toschi N, Hermann B, Rupprecht R, Neumann ID, Toschi N, Landgraf R, Post A. Repetitive transcranial magnetic stimulation induces active coping strategies and attenuates the neuroendocrine stress response in rats. *J Psychiat Res* 34 (2000) 265-76.

Übersichtsarbeiten

Sillaber I, Henniger MSH. Genetik und Drogensucht. *Biospektrum* 3/02 (2002) 252-255.

Kurzfassungen-Kongressbeiträge

Henniger MSH, Sillaber I. Voluntary ethanol consumption after experience of stress in ethanol non-preferring and -preferring mice. *Eur J Neurosci* (2002) im Druck.

Henniger MSH, Wotjak CT, Höltér SM. Social defeat stress does not alter ethanol drinking in long-term ethanol-experienced rats. *Alcoholism* 25 Suppl (2001) 21A.

Ohl F, Toschi N, Wigger A, Henniger MSH, Landgraf R. Emotional dimensions in rats bred for high- or low anxiety-related behaviour. *Eur J Neurosci* 12 Suppl 11 (2000) 321.

Henniger MSH, Höltér SM, Wigger A, Landgraf R, Spanagel R. Alcohol self-administration in two rat lines selectively bred for differences in anxiety-related behaviour. *Alcohol Alcohol* 34 (1999) 478.