

Aus dem Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Medizinischen Akademie
Magdeburg (Direktor: Prof. Dr. med. habil. H. MATTHIES)

Die Beeinflussung der Wirkung von Serotonin und Noradrenalin auf eine bedingte Fluchtreaktion der Ratte durch ihre Antagonisten

H. MATTHIES, J. SCHMIDT, H. KRÜGER und R. HORENBURG

(Eingegangen am 9. 2. 1970)

Zusammenfassung

1. Am Stabsprung-Test wurde die Beeinflussung einer bedingten Reaktion nach peripherer und intrazerebraler Applikation von Noradrenalin (NA) und Serotonin (5-HT) durch Lysergsäurediäthylamid (LSD), 2-Brom-Lysergsäurediäthylamid (BOL), 1-Methyl-Lysergsäurebutanolamid (UML), Dihydroergotamin (DHE) und Dichlorisoprotorenol (DCI) untersucht.
2. Die Verlängerung der Reaktionszeit der Ratten nach s.c. als auch nach intrazerebraler Applikation von 5-HT wird durch i.p. Injektion von LSD, UML oder BOL aufgehoben; dabei zeigt BOL eine fünffach schwächere Wirkung als LSD und UML.
3. Die Wirkung von 5-HT kann durch die beiden adrenergen Antagonisten nicht aufgehoben werden.
4. Die Verlängerung der Reaktionszeit nach s.c. Applikation von NA wird durch DCI und DHE aufgehoben, wobei DCI in der angewandten Dosierung im Gegensatz zu den anderen Antagonisten bereits selbst eine Reaktionszeitverlängerung hervorruft.
5. Die 5-HT-Antagonisten vermögen gleichfalls die NA-Wirkung aufzuheben; dabei erweist sich aber BOL doppelt so stark wirksam, wie LSD und UML.

Einleitung

Die Hemmung bedingter Reaktionen nach parenteraler Applikation von Noradrenalin (NA) oder Serotonin (5-HT) konnte von verschiedenen Autoren [4, 5, 6, 8, 11] sowie in eigenen Untersuchungen nachgewiesen werden. Im Hinblick auf die geringe Permeabilität der Blut-Hirn-Schranke für diese biogenen Amine erhebt sich die Frage, inwieweit diese Wirkungen auf einen peripheren oder einen zentralen Angriff zurückzuführen sind. In der vorliegenden Arbeit werden die Ergebnisse von Untersuchungen mitgeteilt, in denen wir durch intrazerebrale Applikation der biogenen Amine und durch die Beeinflussung ihrer Wirkung durch Antagonisten eine Klärung dieser

Abkürzungen: siehe Zusammenfassung

Frage zu erreichen versuchten. Außerdem war durch die Art der Antagonisten-Wirkung eine Charakterisierung etwaiger peripherer oder zentraler Angriffspunkte zu erwarten.

Methodik

Als Versuchstiere dienten weiße weibliche Ratten (Wistar) aus eigener Koloniezucht im Gewicht von 100 bis 200 g. Zur Ausarbeitung eines bedingten Fluchtreflexes benutzten wir die Stabsprung-Methode in Anlehnung an COOK und WEIDLEY [1]. Als unbedingter Reiz diente ein Strom von 60 V und 50 Hz, der den Tieren über einen metallischen Bodenrost verabfolgt wurde, als bedingter Reiz ein Summton von 210 Hz. Der unbedingte Reiz wurde während der Ausarbeitung der Reaktion 1/2 bis 1 sec. im Versuch 2 sec nach dem bedingten Reiz gegeben. Die Ratte konnte der Wirkung des unbedingten Reizes durch einen Sprung an einen in der Mitte des Käfigs hängenden Stab entgehen. Die Zeit vom Beginn des bedingten Reizes bis zu dem Augenblick, da sie mit allen vier Extremitäten am Stab hing, wurde als Reaktionszeit gemessen. Die Ausarbeitung der bedingten Reaktion galt als abgeschlossen, wenn der Mittelwert von 10 aufeinanderfolgenden Reaktionszeiten unter 0,6 sec lag. Fünf Ratten bildeten eine Versuchsgruppe; vor jedem Versuch wurde der Gruppenmittelwert aus 10 Reaktionen je Tier, also aus 50 Sprüngen, ermittelt und gleich 100% gesetzt. Die Versuche wurden begonnen, wenn sich nach 2–3 Wochen Einarbeitungszeit eine Konstanz der Reaktionszeiten eingestellt hatte.

NA und 5-HT wurden s.c. oder intrazerebral nach der Methode von HALEY und McCORMICK [3] appliziert, die Reaktionszeiten wurden jeweils 15, 30, 60, 90 und 120 min nach Applikation der biogenen Amine gemessen. Die Wirkung der Antagonisten wurde im Wirkungsmaximum der unbeeinflussten Aminwirkung verglichen. Die i.p. Applikation der Antagonisten erfolgte 15 min vor Applikation der Amine.

Die Wiederverwendung der Tiere einer Versuchsgruppe erfolgte frühestens nach 4 Wochen, um die in anderen Versuchen beobachtete Toleranzerscheinung auszuschließen.

Die Signifikanzberechnung erfolgte mittels *t*-Test.

Folgende Substanzen wurden in Versuchen verwendet: 5-HT: 5-Hydroxytryptamin-creatininsulfat (Fluka); NA: Noradrenalinbitartrat (VEB Berlin-Chemie); LSD: Lysergsäurediäthylamid (Forschungsinstitut für Pharmazie und Biochemie, Prag, CSSR); BOL: 2-Brom-Lysergsäurediäthylamid, UML: 1-Methyl-Lysergsäurebutanolamid (Forschungsabteilung der Sandoz AG Basel); DHE: Dihydroergotamin; DCI: Dichlorisoproterenol.

Wir möchten an dieser Stelle für die Überlassung der Serotonin-Antagonisten danken.

Ergebnisse

Die s.c. Injektion von 5 mg 5-HT/kg verlängert die Reaktionszeiten im Stabsprung-Test signifikant ($p < 0,01$) um durchschnittlich 250%. Das Maximum der Wirkung wird 30 min nach Injektion erreicht, die Rückkehr zu den Ausgangswerten erfolgt nach etwa 150 min. Die Tiere zeigen einen herabgesetzten Muskeltonus. Um einen etwa gleichen Effekt durch intrazerebrale Injektion zu erreichen, waren 30–40 µg notwendig. Wir wählten für die Versuche eine Dosis von 40 µg. Das Wirkungsmaximum tritt bereits nach 15 min ein. Auch bei dieser Applikationsart zeigten die Tiere einen herabgesetzten Muskeltonus.

3,3 mg NA/kg führten ebenfalls zu einer signifikanten Verlängerung der Reaktionszeit mit einem Wirkungsmaximum von 30 min nach der Injektion, die Wirkung war aber schwächer als nach 5 mg/kg 5-HT. Auch nach NA-Applikation war ein verminderter Muskeltonus und ein apathisches Verhalten der Tiere zu beobachten.

Bereits 3,3 µg NA führten nach intrazerebraler Injektion zu starken Verlängerungen der Reaktionszeiten, die Wirkung erreichte wie bei intrazerebraler Injektion von 5-HT ihr Maximum schon nach 15 min; die Tiere wirkten leicht sediert.

Die i.p. Injektion von 0,2 mg LSD/kg, 1,0 mg BOL/kg oder 0,2 mg UML/kg beeinflusste die Reaktionszeiten nicht. Die Tiere zeigten lediglich eine leichte Unruhe und Schreckhaftigkeit bei ungewohnten Geräuschen und beim Anfassen, besonders nach LSD.

Auch 10 mg DCI/kg war ohne Wirkung auf den Stabsprung-Test, hingegen führte 1,0 mg DHE/kg zu einer Verlängerung der Reaktionszeiten um durchschnittlich 250%.

Wurde den Versuchstieren 15 min vor der s.c. Applikation von 5 mg 5-HT/kg entweder 0,1 mg LSD/kg oder 0,1 mg UML/kg i.p. injiziert, so war auch im vorher beobachteten Maximum der 5-HT-Wirkung keine signifikante Reaktionszeitverlängerung mehr zu beobachten. BOL war in dieser Dosierung wirkungslos, erst eine Erhöhung der Dosis auf 0,5 mg/kg führte zu einer signifikanten Abschwächung der 5-HT-Wirkung (Abb. 1).

Die sehr starke Verlängerung der Reaktionszeit nach intrazerebraler Injektion von 40 µg 5-HT konnte durch die gleichen Dosen der Serotonin-Antagonisten nicht vollständig aufgehoben werden. Zwar war die Abschwächung signifikant gegenüber den Werten bei alleiniger intrazerebraler

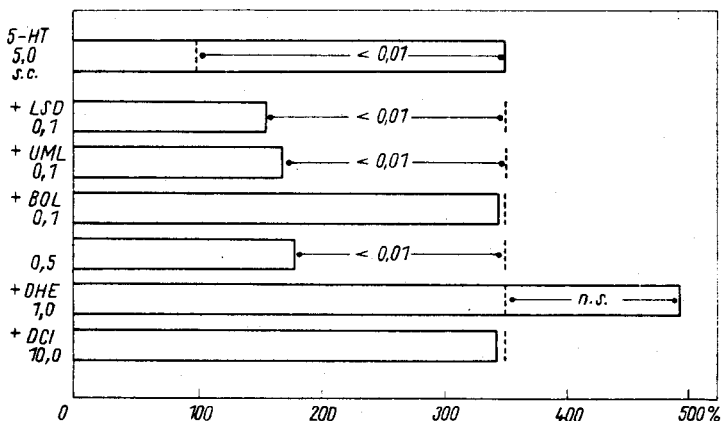


Abb. 1. Beeinflussung der Verlängerung der Reaktionszeit im Stabsprungtest der Ratte durch s.c. verabfolgtes 5-Hydroxytryptamin nach Applikation von Serotonin- und Noradrenalin-Antagonisten. Dosisangaben in mg/kg.

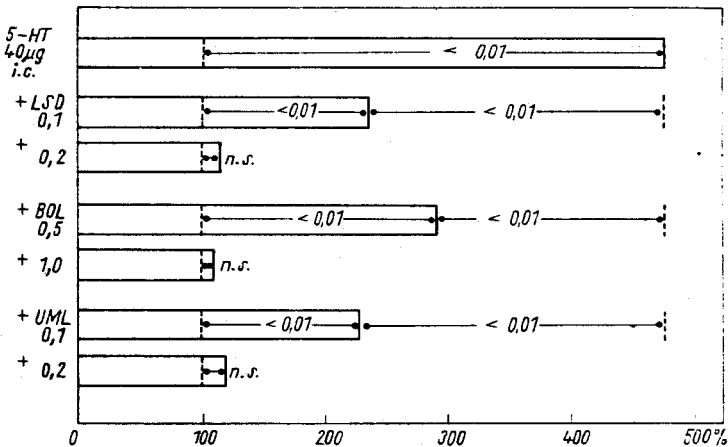


Abb. 2. Beeinflussung der Verlängerung der Reaktionszeit im Stabsprungtest der Ratte durch 5-Hydroxytryptamin intrazerebral nach Applikation von Serotonin- und Noradrenalin-Antagonisten. Dosisangaben in mg/kg.

5-HT-Injektion, dennoch war die Reaktionszeit in jedem Falle auch noch signifikant länger gegenüber den Kontrollwerten vor dem Versuch. Erst eine Verdoppelung der Dosierung der Serotonin-Antagonisten bewirkte eine vollständige Aufhebung der 5-HT-Wirkung (Abb. 2). Trotz der vollständigen Aufhebung der Reaktionszeitverlängerung durch die Serotonin-Antagonisten waren der herabgesetzte Muskeltonus und die leichte Sedation nicht merklich beeinflußt worden.

Die Applikation von 1,0 mg DHE/kg 15 min vor s.c. Applikation von 5 mg 5-HT/kg führte zu keiner Abschwächung der reaktionszeitverlängernden Wirkung von 5-HT; die sogar auftretende weitere Verstärkung der 5-HT-Wirkung war wegen der relativ großen Streuung nicht signifikant. Auch DCI in einer Dosierung von 10 mg/kg beeinflusste die Wirkung einer s.c. Injektion von 5 mg 5-HT/kg nicht.

Auch die Reaktionszeitverlängerung nach 3,3 mg NA/kg konnte durch die Serotonin-Antagonisten aufgehoben werden, BOL zeigte sich hierbei eher stärker wirksam als LSD und UML (Abb. 3). Im Gegensatz zu den Versuchen mit der s.c. Applikation von 5-HT waren aber DHE und DCI in der Lage, die Reaktionszeitverlängerung nach 3,3 mg NA/kg zu verhindern.

Diskussion

Die Untersuchungen über die Beeinflussung bedingter Reaktionen durch 5-HT und NA wurden von den meisten Autoren durchgeführt, um weitere Aufschlüsse über die Beteiligung dieser biogenen Amine an zentralnervösen Prozessen zu erlangen. Wenn auch übereinstimmend eine Hemmung bedingter Reaktionen durch 5-HT oder NA beobachtet wurde, konnte doch aus den Ergebnissen nicht ohne weiteres auf eine direkte zentrale Wirkung

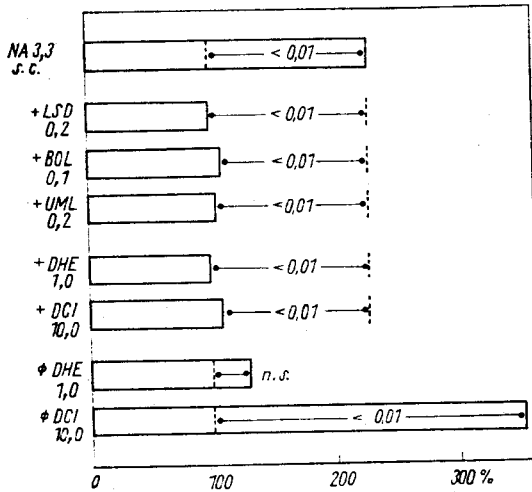


Abb. 3. Beeinflussung der Verlängerung der Reaktionszeit im Stabsprungtest der Ratte durch s.c. verabfolgtes Noradrenalin nach Applikation von Serotonin- und Noradrenalin-Antagonisten. Dosisangaben in mg/kg.

geschlossen werden. Einmal konnte die Wirkung infolge der peripheren Applikation auch über periphere afferente oder efferente Abschnitte des Nervensystems zustande kommen, und diese Möglichkeit war umso mehr in Betracht zu ziehen, als sich die Blut-Hirn-Schranke als relativ schwer durchlässig für die biogenen Amine erwiesen hatte. Zum anderen konnte nicht ausgeschlossen werden, daß die Beeinflussung der bedingten Reaktion durch eine Wirkung auf die Hirndurchblutung hervorgerufen wird.

Über Art und Ausmaß der Wirkungen von 5-HT und NA auf die Hirndurchblutung bestehen sehr widersprechende Ansichten. FORBES et al. [2] beobachteten je nach Applikation eine Dilatation oder Konstriktion der Hirngefäße. SCHNELLBÄCHER [10] fand hingegen keine wesentlichen Veränderungen der Hirndurchblutung. Wir selbst konnten zeigen, daß sowohl das dilatierend wirkende Isoproterenol, als auch das konstriktorisch wirkende NA bei intrazerebraler Injektion zur Verlängerung der Barbituratnarkose führen, bzw. zur Verlängerung der Reaktionszeit im Stabsprungtest der Ratte [9]. Auch ROTBALLER [7] kommt zu der Auffassung, daß eventuelle Wirkungen dieser Amine auf die Hirngefäße in weitem Umfang durch kreislaufregulatorische Prozesse ausgeglichen werden, so daß eine ausreichende Hirndurchblutung gewährleistet bleibt. Auch bei einem Vergleich der Wirkungen peripherer und zerebraler Applikationen ergaben sich keine Unterschiede, die auf die besondere Rolle von Kreislaufwirkungen beim Zustandekommen der Wirkung auf bedingte Reaktionen hinweisen.

Im Hinblick auf die, wenn auch für verschiedene Hirnregionen unterschiedlich wirksame, Blut-Hirn-Schranke für biogene Amine kann die direkte zentrale Wirkung von 5-HT und NA bei peripherer Applikation zumindest

in Frage gestellt werden. Auf Grund der Übereinstimmung der Ergebnisse bei peripherer und zerebraler Applikation können wir annehmen, daß geringe Mengen die Schranke doch passieren. Auch das langsame Erreichen des Wirkungsmaximums nach peripherer Applikation im Vergleich zum schnellen Wirkungseintritt nach intrazerebraler Injektion spricht für einen direkten zentralen Angriff auch bei peripherer Gabe.

Aus unseren Versuchsergebnissen geht hervor, daß die Wirkung von 5-HT sowohl bei peripherer als auch bei intrazerebraler Applikation die durch i.p. Gabe von LSD, UML und BOL aufgehoben werden kann. Dabei erweisen sich LSD und UML annähernd wirkungsgleich, während BOL eine fünf-fach höhere Dosis verlangt. Die Verdoppelung der Dosierung der Antagonisten in den Versuchen bei intrazerebraler 5-HT Injektion hängt mit der etwas stärkeren Wirkung der gewählten 5-HT-Dosis bei intrazerebraler Applikation und der Absicht zusammen, die Reaktionszeitverlängerung nach 5-HT nicht nur signifikant herabzusetzen, sondern vollständig aufzuheben. Die Ergebnisse sprechen also für das Vorliegen eines serotoniner-gen Mechanismus im ZNS, über den eine Verzögerung oder Hemmung des Ablaufs der bedingten Reaktion auszulösen ist. Gleichzeitig geht hervor, daß die untersuchten Antagonisten in der Lage sind, bei peripherer Applikation diesen zentralen serotoniner-gen Mechanismus zu hemmen. Im Gegensatz dazu konnten weder der α -Blocker DHE noch der β -Blocker DCI in Dosen, welche die NA-Wirkung aufheben, die Wirkungen von 5-HT auf die bedingte Reaktion beeinflussen.

Die Wirkung von NA auf die bedingte Reaktion bei peripherer Applikation ließ sich sowohl durch den α -Blocker DHE als auch durch den β -Blocker DCI aufheben. Dieser Befund erscheint zunächst wenig befriedigend, da man geneigt ist, eine Spezifität zu erwarten. Allerdings sind für beide Blocker Dosierungen gewählt worden, die im Hinblick auf ihre Eigenwirkung nicht einheitlichen Bedingungen genügen.

Die Wirkungen von NA auf die bedingte Reaktion wird aber nicht nur, wie erwartet wurde, durch die adrenergen Antagonisten, sondern auch durch die 5-HT-Antagonisten aufgehoben. Diese Wirkung könnte entweder dadurch geklärt werden, daß über einen Angriff an serotoniner-gen Systemen der Effekt des NA funktionell ausgeglichen wird, oder dadurch, daß die 5-HT-Antagonisten, wie an der glatten Muskulatur, auch recht starke antagonistische Wirkung an adrenergen neuronalen Rezeptoren entfalten. Der Vergleich der wirksamen Dosen spricht für die zweite Interpretation: Während bei der Beeinflussung der zentralen 5-HT-Wirkung das BOL eine fünf-fach höhere Dosis zur Erzielung des Effekts benötigte als LSD und UML, erweist sich BOL gegenüber der zentralen NA-Wirkung als mindestens doppelt so wirksam wie die beiden anderen Antagonisten.

Dieser Befund scheint uns im Hinblick auf die mögliche Deutung der Wirkungsmechanismen von Interesse, die für die zentralen Eigenwirkungen dieser Antagonisten in Betracht gezogen werden.

Literatur

- [1] COOK, L. u. E. WEIDLEY: *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **66**, 740 (1957)
- [2] FORBES, H. S., K. H. FINLEY u. G. J. NASON: *Archs Neurol. Psychiat.*, Chicago **30**, 957 (1933)
- [3] HALEY, T. J. u. W. G. McCORMICK: *Br. J. Pharmac. Chemother.* **12**, 12 (1957)
- [4] JATZEK, S. u. J. SCHMIDT: *Pharmakologie, Forschung und Fortschritte* (= Verhandlungen der Gesellschaft für experimentelle Medizin der DDR, Bd. 5). Steinkopff, Dresden u. Leipzig 1964, S. 154
- [5] KOSMAN, M. E. u. R. W. GERORD: *J. cell comp. Physiol.* **48**, 506 (1955)
- [6] MATTHIES, H. u. W. POHLE: *Acta biol. med. germ.* **7**, 617 (1961)
- [7] ROTBALLER, A. B. in: *Symposium on Catecholamines*. Bethesda, Maryland, 1958 S. 494. Williams and Wilkins, Baltimore 1959
- [8] SCHMIDT, J.: *Acta biol. med. germ.* **10**, 343 (1963)
- [9] SCHMIDT, J. u. H. MATTHIES: *Acta biol. med. germ.* **7** 443 (1961)
- [10] SCHNELLBÄCHER, F.: *Dt. med. Wschr.* **80**, 1646 (1955)
- [11] CHOUPLEN, S.: *Psychopharmakologia* **1**, 140 (1959)

Summary

H. MATTHIES, J. SCHMIDT, H. KRUEGER and R. HORENBURG: The influence on the action of serotonin and noradrenaline upon conditional response of escape in rat, exerted by their antagonists

1. The pole-climb test was used to investigate the influence of lysergic acid diethylamide (LSD), 2-bromolysergic acid diethylamide (BOL), 1-methyllysergic acid butanolamide (UML), dihydroergotamine (DHE), and dichloroisoprotorenol (DCI) on the conditional response following peripheral and intracerebral administration of noradrenaline and serotonin (5-HT).
2. The delay in the rat's response both after subcutaneous and intracerebral administration of 5-HT is balanced by intraperitoneal injection of LSD, UML, and BOL, the latter showing five times weaker an effect than LSD and UML.
3. The action of 5-HT cannot be cancelled by both adrenergic antagonists.
4. The lag in response caused by subcutaneous application of noradrenaline is eliminated by DCI and DHE. DCI alone caused an increase in the time of response, contrary to the other antagonists.
5. The antagonists of 5-HT also can inhibit the action of noradrenaline. BOL proved to be twice as effective as LSD and UML.