



universität
wien

DIPLOMARBEIT

Titel der Diplomarbeit

Untersuchung der anxiolytischen und sedierenden Effekte
ausgewählter Naturstoffderivate im Tiermodell

verfasst von

Helga Dobernig

angestrebter akademischer Grad

Magistra der Pharmazie (Mag.pharm.)

Wien, 2013

Studienkennzahl lt.
Studienblatt:

A 449

Studienrichtung lt.
Studienblatt:

Diplomstudium Pharmazie

Betreut von:

Univ. Prof. Dr. Steffen Hering

INHALTSVERZEICHNIS

1	EINLEITUNG	1
1.1	Schlaf	1
1.1.1	Physiologische Grundlagen	1
1.1.1.1	Schlafstadien	1
1.1.1.2	Schlafregulation	2
1.1.2	Schlafstörungen	9
1.1.3	Therapie von Schlafstörungen	14
1.2	Angst	16
1.2.1	Physiologische Grundlagen	18
1.2.1.1	Wesentliche Hirnstrukturen in der Angstphysiologie	18
1.2.1.2	Serotonin (5-HT)	21
1.2.1.3	Noradrenalin (NA)	22
1.2.1.4	Corticoliberin	23
1.2.1.5	Gamma-Aminobuttersäure (GABA)	23
1.2.2	Angststörungen	24
1.2.3	Therapie von Angststörungen	27
1.3	Der GABA_A-Rezeptor	31
1.3.1	Funktion des GABA _A -Rezeptors	31
1.3.2	Formen der GABA _A -Rezeptor Aktivierung	32
1.3.3	Struktur des GABA _A -Rezeptors	33
1.3.4	Benzodiazepine	37
1.3.4.1	Wirkung der Benzodiazepine	38
1.3.4.2	Wirkungsmechanismus der BZ	39
1.3.4.3	Unerwünschte Wirkungen der BZ	40
1.3.5	Pharmakologische Profile unterschiedlicher GABA _A -Rezeptor Subtypen	41
2	METHODEN	44
2.1	Tiere	44
2.2	Injektionslösungen	44
2.3	<i>Open-Field-Test</i>	45
2.4	<i>Elevated-Plus-Maze-Test</i>	46
2.5	Statistische Analyse der Daten	47
3	PROBLEMSTELLUNG	48
4	ERGEBNISSE	50

4.1	Untersuchung der <i>in vivo</i> Wirkung HD-1	50
4.2	Untersuchung der <i>in vivo</i> Wirkung von HD-1A	52
4.3	Untersuchung der <i>in vivo</i> Wirkung von HD-2	54
4.4	Untersuchung der <i>in vivo</i> Wirkung von HD-2A	56
4.5	Untersuchung der <i>in vivo</i> Wirkung von HD-2B	58
4.6	Untersuchung der <i>in vivo</i> Wirkung von HD-2C	60
4.7	Untersuchung der <i>in vivo</i> Wirkung von HD-2D	62
5	DISKUSSION	64
6	ZUSAMMENFASSUNG	67
7	DANKSAGUNG	69
8	LITERATURVERZEICHNIS	70
9	LEBENS LAUF	78

Ich habe mich bemüht, sämtliche Inhaber der Bildrechte ausfindig zu machen und ihre Zustimmung zur Verwendung der Bilder in dieser Arbeit eingeholt. Sollte dennoch eine Urheberrechtsverletzung bekannt werden, ersuche ich um Meldung bei mir.

1 EINLEITUNG

1.1 Schlaf

Obwohl der Mensch annähernd ein Drittel seines Lebens schlafend verbringt (Wafford und Ebert, 2008) werden die Gründe für die Notwendigkeit des Schlaf immer noch diskutiert. Schlaf wird unter anderem als „*nachts regelmäßig wiederkehrender physiologischer Erholungszustand, dessen Tag/Nacht-Rhythmus mit einer veränderten Bewusstseinslage einhergeht*“, definiert (Silbernagl und Despopoulos, 2007). Seine Bedeutung für Muskelregeneration und Verarbeitung von tagsüber gesammelten Informationen (Wafford und Ebert, 2008), sowie für neuronale Plastizität, Gedächtnis-konsolidierung, Wärme- und Immunregulation ist vielfach belegt (Ebert et al., 2006). Ist der Körper während des Schlafens auch relativ inaktiv, das menschliche Gehirn bleibt weiterhin hochaktiv und durchläuft dabei verschiedene Schlafstadien (Wafford und Ebert, 2008).

1.1.1 Physiologische Grundlagen

1.1.1.1 Schlafstadien

Mittels Elektroenzephalographie (EEG) kann die Hirnaktivität im Schlaf gemessen und der Schlaf in unterschiedliche Schlafstadien eingeteilt werden. Unser Gehirn durchläuft im Schlaf 4-5 Mal einen Zyklus, der etwa 90 Minuten andauert und sich aus einer *Non-Rapid-Eye-Movement- (NREM)* Phase und einer *Rapid-Eye-Movement- (REM)* Phase zusammensetzt (Silbernagl und Despopoulos, 2007). Der *NREM*-Schlaf wird weiters in folgende Schlafstadien gegliedert:

- Stadium 1: θ -Wellen in einem Frequenzbereich von 4-7 Hertz (Hz) treten auf. Die bewusste Wahrnehmung der Umgebung nimmt ab.
- Stadium 2: ist charakterisiert durch spindelförmige Wellen (Schlafspindeln) mit einer Frequenz von 12-14 Hz und einzelne Zacken (K-Komplex). Es gibt keine bewusste Wahrnehmung mehr.
- Stadium 3

- Stadium 4

Stadien 3 und 4 sind die beiden Tiefschlafphasen, die durch δ -Wellen gekennzeichnet sind. Die Amplituden der δ -Wellen werden dabei zunehmend größer, die Frequenz nimmt hingegen ab (1-3 Hz). Dies wird auch als *Slow-Wave-Activity (SWA)* im EEG bezeichnet (Fuller et al., 2006).

Der REM-Schlaf ist im EEG durch eine hohe Frequenz und eine niedrige Amplitude gekennzeichnet und ähnelt dem Wachzustand beziehungsweise dem ersten Schlafstadium. In der REM-Phase kommt es zu schnellen Augenbewegungen (*Rapid-Eye-Movement*) und zu Atonie der Skelettmuskulatur (Fuller et al., 2006). In dieser Phase träumt der Mensch (Wafford und Ebert, 2008).

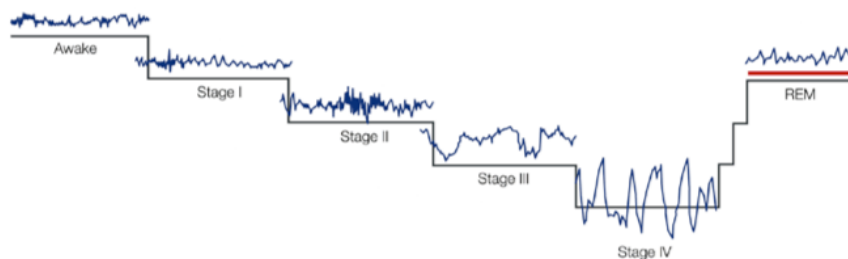


Abbildung 1: Schlafstadien im EEG

(Wafford und Ebert, 2008)

1.1.1.2 Schlafregulation

Die Steuerung von Schlaf und Wachzustand erfolgt durch Interaktion von Zellgruppen, die Erregung hervorrufen, mit Kernen, die Schlaf induzieren (Schwartz und Roth, 2008).

Das Aufsteigende Retikuläre Aktivierungssystem

Für die Aufrechterhaltung des Wachzustandes ist das aufsteigende retikuläre Aktivierungssystem (ARAS) verantwortlich (Schwartz und Roth, 2008). Neuronengruppen der *Formatio reticularis* des oberen Hirnstamm senden unspezifische, aufsteigende Impulse zum Thalamus und weiteren Bereichen des Vorderhirns (Silbernagl und Despopoulos, 2007).

Das ARAS verläuft in zwei Hauptbahnen:

1. Der erste aufsteigende Ast innerviert den Thalamus, aktiviert dabei Relaiskerne und retikuläre Nuklei des Thalamus und ist für den Informationsfluss zum zerebralen Cortex wichtig. Die Fasern entspringen dem Nucleus tegmentalis laterodorsalis und pedunculo pontinus (TLD/TPP) und beinhalten den Transmitter Acetylcholin (Ach). Diese Neuronen sind im Wachzustand und im *REM*-Schlaf am aktivsten. In der *NREM*-Phase entladen sie sich hingegen wesentlich langsamer (Saper et al., 2005 (a)); (Abb. 2, gelbe Kennzeichnung).
2. Der zweite Ast des ARAS ist monoaminerg. Dazu zählen der noradrenerge Locus coeruleus (LC), die serotonergen Raphekerne (NR), das dopaminerge ventrale periaquäduktale Grau (vPAG) und der histaminerge Nucleus tuberomammillaris (NTM). Die Projektionen verlaufen zum lateralen Hypothalamus (LH), dem basalen Vorderhirn und dem zerebralen Cortex. Im zerebralen Cortex existieren weitere afferente Fasern und zwar peptiderge Neuronen des lateralen Hypothalamus, die Melanin-konzentrierendes Hormon oder Orexin (=Hypocretin) enthalten und Neuronen des basalen Vorderhirns, die Ach oder Gamma-Aminobuttersäure (GABA) enthalten. Dieses monoaminerge Neuronennetzwerk zeigt die stärkste Entladung im Wachzustand, welche während des *NREM*-Schlafes abnimmt und in der REM-Phase zum Stillstand kommt (Saper et al., 2005 (a); Schwartz und Roth, 2008); (Abb. 1, rote Kennzeichnung).

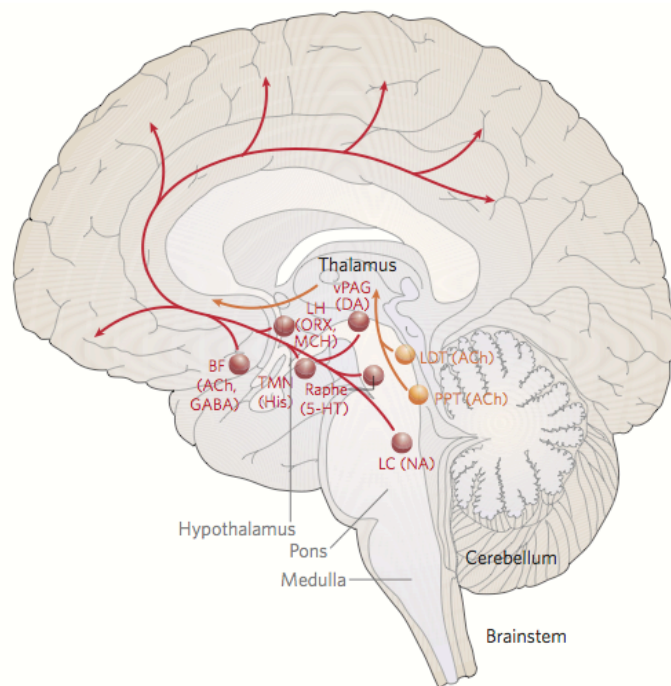


Abbildung 2: Schematische Darstellung der 2 Hauptbahnen des ARAS
(Saper et al., 2005 (a))

Der ventrolaterale präoptische Nucleus (Nucleus preopticus ventrolateralis, VLPO)

Verglichen mit der großen Anzahl an Zellgruppen, die Wachheit vermitteln, gibt es nur wenige, die die erregenden Schaltkreise hemmen und somit Schlaf erzeugen (Saper et al., 2005 (b)). Es handelt sich um die Neuronen des VLPO, welche die inhibitorischen Neurotransmitter GABA und Galanin enthalten (Sherin et al., 1998).

Der VLPO enthält 2 Arten von Neuronenpopulationen. Die erste bildet einen Cluster im „Kern“ des VLPO und innerviert die histaminergen Neuronen im NTM. Die Neuronen der zweiten Gruppe sind diffuser verteilt und projizieren stärker zum LH und zu den dorsalen wie auch medialen NR (Saper et al., 2005 (b)).

Der „Flip-Flop“ Mechanismus

Der VLPO enthält auch afferente Fasern der großen monoaminergen Systeme (Chou et al., 2002). Er kann somit wiederum von den Erregungssystemen blockiert werden. Es kommt also zur gegenseitigen Inhibition und zu scharfen Übergängen zwischen Schlaf und Wachzustand, deshalb wird in diesem Zusammenhang von einer „Flip-Flop“ Schaltung gesprochen. „Flip-Flop“ Schalter können jedoch instabil sein und zu spontanen, ungewollten Übergängen führen. Neuronen des Hypothalamus, die das Neuropeptid Orexin (=Hypocretin) enthalten, wird hierbei eine stabilisierende Rolle zugeschrieben. Die Bedeutung der Orexinneuronen für die Stabilisierung von Schlaf- und Wachzustand zeigt sich in der Schlafstörung Narkolepsie, bei der es zu plötzlichen Schlafattacken kommt und die durch einen Mangel an Orexinneuronen hervorgerufen wird. Der VLPO besitzt keine Orexin-Rezeptoren. Orexinneuronen können also den VLPO nicht direkt inhibieren, aber indem sie monoaminerge und cholinerge Systeme im Hypothalamus und im Hirnstamm aktivieren, stärken sie das Erregungssystem und dienen somit zur Aufrechterhaltung des Wachzustandes (siehe auch Abb. 2) (Saper et al., 2005 (a)).

Inhibiert werden Orexin-hältige Fasern durch schlafaktive, GABAerge Neuronen des VLPO. Außerdem werden Orexinneuronen auch durch lokale GABAerge Interneuronen reguliert. GABA Typ B (GABA_B)-Rezeptoren der Orexinneuronen sind für Stabilisierung und Konsolidierung von Schlaf- und Wachzustand bedeutend (Kilduff et al., 2008); (Abb. 3).

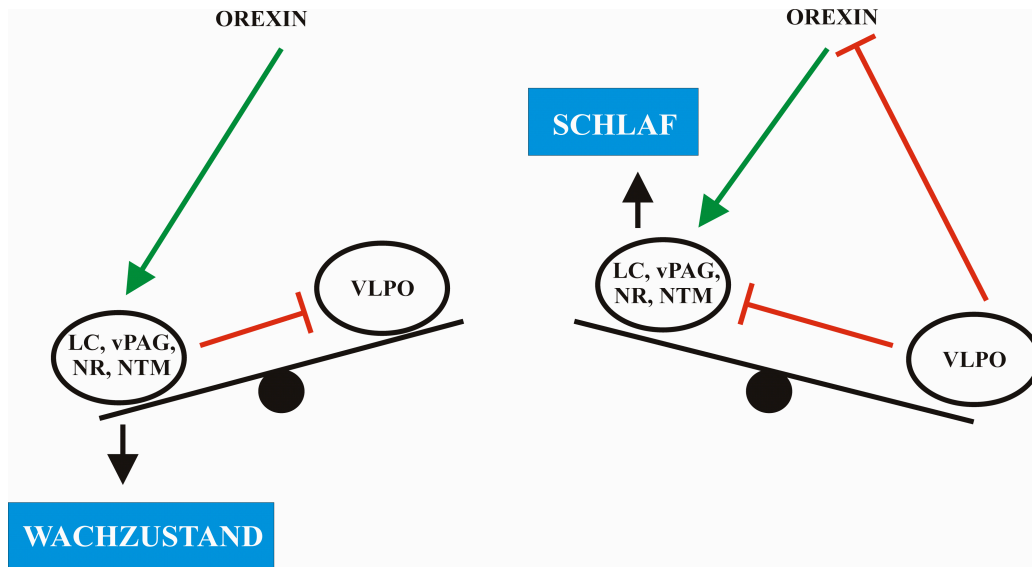


Abbildung 3: Schematische Darstellung vom Modell des „Flip-Flop“ Schalters
 LC=Locus coeruleus; vPAG=ventrales periaquäduktales Grau; NR=Raphekerne; NTM=Nucleus
 trubermamillaris; VLPO=Nucleus preopticus ventrolateralis;

(eigene Darstellung i. A. a. Saper et al., 2005 (a); Silbernagl und Despopoulos, 2007)

GABA und Schlaf

GABA ist der wichtigste inhibitorische Neurotransmitter im menschlichen Zentralnervensystem (ZNS) (Sieghart 1995; Davies et al., 1996). Zahlreiche Studien haben schon seine Bedeutung in der Schlafregulation demonstriert. Neuronen des VLPO, welche die monoaminergen Erregungszentren inhibieren, sind GABAerg (Saper et al., 2001). Nach seiner Freisetzung in den synaptischen Spalt und Bindung an GABA TYP A ($GABA_A$)-Rezeptoren, führt GABA zu einer Membranhyperpolarisation und somit zu verminderter, neuronaler Erregbarkeit.

Neben den kurzlebigen „phasischen“ hemmenden postsynaptischen Strömen (*Inhibitory Post-Synaptic Currents, IPSCs*) durch hohe GABA Konzentrationen, existiert auch eine permanente „tonische“ Inhibition, vermittelt durch extrasynaptische $GABA_A$ -Rezeptoren, die durch geringe, ständig im extrazellulären Raum vorhandene, GABA Konzentrationen ($<50\mu\text{m}$), kontinuierlich aktiviert werden. Dieser tonische Hintergrundstrom hat Einfluss auf die Erregbarkeit neuronaler Netzwerke und somit auf den Schlaf, was durch die Wirkung von Substanzen die an diesen Rezeptoren angreifen, wie Gaboxadol oder Tiagabin, veranschaulicht werden kann (Winsky-Sommerer, 2009).

Homöostatische und circadiane Schlafkontrolle

Von Borbely und Kollegen wurde 1982 ein 2-Prozess Modell eingeführt, das heute allgemein anerkannt ist. Es beinhaltet einen sogenannten homöostatischen Prozess (Prozess S) und einen sogenannten circadianen Prozess (Prozess C), die beide schlafregulierend sind.

Der homöostatische Vorgang gewährleistet, dass ein vorhandenes Schlafdefizit in weiterer Folge durch zusätzlichen Schlaf kompensiert wird (Schwartz und Roth, 2008). Das circadiane System generiert einen Rhythmus, der den homöostatischen Veränderungen im Schlafantrieb entgegenwirkt, sodass wir den Tag hindurch wach und aufmerksam bleiben können, obwohl der Schlafdruck zunimmt. Andererseits ermöglicht er es weiterzuschlafen, auch wenn die homöostatische Notwendigkeit dafür abnimmt (Franken und Dijk, 2009).

Homöostatische Regulation:

Der homöostatische Prozess repräsentiert das Schlafbedürfnis (Fuller et al., 2006). Mit andauernder Wachheit nimmt der Schlafdruck zu. Als mögliche Erklärung dafür werden eine bzw. mehrere Transmitter angesehen, deren Konzentration mit fortschreitender Dauer des Wachzustandes ansteigt. Sobald ein bestimmter Grenzwert erreicht ist, wird Schlaf induziert. Im Laufe des Schlafens sinkt die Konzentration schließlich wieder ab (Porkka-Heiskanen und Kalinchuk, 2011).

Adenosin nimmt hierbei eine Schlüsselrolle ein, da es infolge neuronaler Aktivierung freigesetzt wird. Die extrazelluläre Adenosinkonzentration steigt mit andauernder Wachheit an, vor allem im basalen Vorderhirn, im Schlaf nimmt sie wieder ab. In anderen Hirnregionen konnte dieser Vorgang nicht beobachtet werden, darum wird Adenosin die Rolle eines lokalen Somnogens zugeschrieben (Saper et al., 2005 (b)). Die zellulären Effekte von Adenosin werden über die vier G-Protein gekoppelten Adenosin-Rezeptoren (A-Rezeptoren), A1, A2a, A2b und A3, vermittelt (Landolt, 2008). Adenosin aktiviert VLPO-Neuronen über A1- und A2a-Rezeptoren, wodurch der Übergang in den Schlafzustand durch Interaktion der VLPO-Neuronen mit dem Arousalssystem gefördert wird (Saper et al., 2005 (b)).

Coffein, das zu gesteigerter Wachheit und Veränderungen im Schlaf-EEG führt, ist ein Antagonist an A-Rezeptoren. Dies bekräftigt die Annahme, dass Adenosin einen wichtigen Schlafmodulator darstellt (Landolt, 2008).

Auch Stickstoffmonoxid (NO) wurde als bedeutender Faktor in der Schlafregulation identifiziert. Ähnlich wie Adenosin steigt seine extrazelluläre Konzentration im basalen Vorderhirn an, vermittelt durch die induzierbare NO-Synthase (iNOS). Schlafentzug kann zur Expression der iNOS im Gehirn führen, denn die iNOS wird dort bei Stress und immunologischer Beanspruchung synthetisiert. Da ein Anstieg der Gewebekonzentration von NO, eine Erhöhung der Adenosin-Konzentration zur Folge hat, kann auf eine Korrelation zwischen NO und Adenosin geschlossen werden (Porkka-Heiskanen und Kalinchuk, 2011).

Weiters wurde im zerebralen Cortex eine „schlaf-aktive“ Untergruppe GABAerger Interneuronen gefunden, welche die neuronale Stickstoffmonoxidsynthase (nNOS) exprimiert. Neuronen außerhalb des Cortex, welche die nNOS ausbilden, zeigen diese Schlafaktivität nicht (Kilduff et al., 2011). „Schlaf-aktive“ nNOS Neuronen sind innerviert durch Serotonin (5-HT) und Acetylcholin (Ach), Neurotransmittersysteme, deren Rolle bei der Kontrolle von Schlaf und Wachheit schon lange bekannt ist (Kilduff et al., 2008).

Circadiane Regulation:

Die Steuerung der circadianen Rhythmen erfolgt durch den suprachiasmatischen Nucleus (SCN) des Hypothalamus, der daher auch als „biologische Uhr“ bezeichnet wird (Saper et al., 2005 (a)). Die Koordinierung durch den SCN wird durch äußere Lichteinflüsse am Tag und durch die Melatoninsekretion in der Nacht beeinflusst (Schwartz und Roth, 2008). Das Lichtsignal erhält der SCN von spezifischen Ganglienzellen in der Retina die das Photopigment Melanopsin beinhalten (Saper et al., 2005 (a)). Melatonin ist ein Hormon, das aus der Zirbeldrüse freigesetzt wird. Es beeinflusst Phasenverschiebungen im circadianen Rhythmus und fördert das Einschlafen (Wilson et al., 2010).

Der Schlaf-Wach-Rhythmus wird über mehrere Stufen reguliert, wobei der SCN, das aufsteigende Erregungssystem und der VLPO über die subparaventriculäre Zone (SPZ) und den dorsomedialen Nucleus des Hypothalamus (DMH) miteinander verbunden sind (Schwartz und Roth, 2008).

Schlaf regulierende Systeme, wie der VLPO und Orexinneuronen werden vom SCN nur wenig innerviert. Am stärksten wirkt der SCN auf die ventrale und dorsale SPV und den DMH. Auch die SPZ projiziert nur begrenzt zu VLPO, Orexinneuronen und anderen Schlaf- bzw. Wachheitszentren. Die SPZ wirkt hauptsächlich auf DMH und verstärkt somit die Signale des SCN. Der DMH beeinflusst schließlich stark die den Schlaf- bzw. Wachzustand regulierenden Systeme. Projektionen des DMH zum schlaffördernden VLPO sind vorwiegend GABAerg, jene zum exzitatorischen lateralen Hypothalamus gehen von Neuronen aus, die Glutamat und Thyreoliberin enthalten (Saper et al., 2005 (a)).

1.1.2 Schlafstörungen

Laut *ICSD-2* („*the International Classification of Sleep Disorders*“) können Schlafstörungen folgendermaßen kategorisiert werden:

1. Insomnien
2. Schlafbezogene Atmungsstörungen
3. Hypersomnien
4. Circadiane Schlaf-Wach-Rhythmusstörungen
5. Parasomnien
6. Schlafbezogene Bewegungsstörungen
7. Isolierte Symptome, offensichtliche Normvarianten, ungeklärte Probleme
8. Andere Schlafstörungen

(Thorpy, 2012)

Insomnien:

Insomnie ist die am häufigsten auftretende Schlafstörung. Trotz unterschiedlicher Definitionen ist ein wesentliches Kernelement im Vordergrund: Für Personen, die an Insomnie leiden ist der Schlaf unbefriedigend, sei es in Bezug auf das Einschlafen, das Durchschlafen oder auf Grund zu frühem Erwachens. Die Leistungsfähigkeit und das Wohlbefinden tagsüber werden beeinträchtigt. Insomnie kann somit als eine 24-Stunden-Störung bezeichnet werden.

Die *ICSD-2* nennt folgende Kriterien für die Diagnose der Insomnie:

- A) - Schwierigkeiten einzuschlafen oder durchzuschlafen
 - zu frühes Erwachen am Morgen oder
 - mangelnde Schlafqualität/nicht-erholsamer Schlaf
- B) die Probleme treten trotz vorhandener Zeit und adäquaten Umständen auf
- C) Beeinträchtigung tagsüber äußert sich auf eine oder mehrere Arten (z.B.:
Stimmungsschwankungen, verminderte Gedächtnisleistung, Kopfschmerzen,
Konzentrationsschwäche usw.)

(Wilson et al., 2010)

Insomnie beginnt häufig mit einem spezifischen Problem, wie Arbeitsverlust, einem traumatischen Ereignis oder durch Eingriffe in die Schlafgewohnheiten wie beispielsweise durch Schichtarbeit oder Nachwuchs. Manche Patienten entwickeln dabei eine chronische Insomnie. Angst vor dem Schlafen, schlechte Schlafgewohnheiten und mögliche Schwachstellen in der Regulation von Schlaf und Wachzustand spielen hierbei eine Rolle. Insomnie kann auch als Symptom einer körperlichen oder seelischen Erkrankung oder als Folge von Substanzmissbrauch auftreten. In diesen Fällen spricht man von sekundärer Insomnie (Wilson et al., 2010).

Insomnie ist durch eine konstante Hypererregung gekennzeichnet. Hirnstrukturen, wie der Thalamus, der Hirnstamm und das basale Vorderhirn, die wichtig für die Schlaf- und Wachmodulation sind, sind hier überaktiv (Schwartz und Roth, 2008). Diese Form der primären Insomnie wird als psychophysiologische Insomnie bezeichnet. Die Hypererregung zeigt sich zum Beispiel auch in erhöhter Cortisolsekretion. Die Patienten zeigen auch tagsüber eine geringere Schläfrigkeit als Patienten, die nicht an Insomnie leiden (Ebert et al., 2006).

Schlafbezogene Atmungsstörungen:

Die *ICSD-2* unterscheidet 2 Hauptformen der schlafbezogenen Atmungsstörungen:

- Zentrales Schlafapnoe Syndrom (*Central Sleep Apnea Syndrome; CSAS*):
nächtliche Episoden von Apnoen (Apnoe=Atemstillstand), ohne Obstruktion der oberen Atemwege. Ausgehend von der Ursache gibt es verschiedene Unterformen

des CSAS (z.B. primäre zentrale Schlafapnoe oder Schlafapnoe aufgrund einer anderen Erkrankung).

- Obstruktives Schlafapnoe Syndrom (*Obstructive Sleep Apnea Syndrome; OSAS*): Das OSAS ist charakterisiert durch wiederholt im Schlaf auftretende Obstruktion der oberen Atemwege. Partielle Obstruktion führt zur Hypoventilation, totale Obstruktion zu Schlafapnoen.

Da die Betroffenen infolge der Apnoen mehrmals pro Nacht erwachen, kommt es zu Tagesmüdigkeit und Konzentrationsschwierigkeiten (Banno und Kryger, 2007).

Hypertone, schnarchende Patienten, bei denen Apnoen beobachtet werden können, leiden mit großer Wahrscheinlichkeit an OSAS. Männliche Personen mit hohem *Body Mass Index (BMI)* und Halsumfang haben ein erhöhtes Risiko ein OSAS zu entwickeln (Dhand, 2010). OSAS wird daneben auch mit dem Auftreten koronarer Herzkrankheit und Diabetes mellitus Typ 2 assoziiert (Mahowald und Schenck, 2005).

Hypersomnien:

Idiopathische Hypersomnie:

Dabei handelt es sich um eine Schlafstörung zentralnervösen Ursprungs. Es kommt zu exzessiver Tagesmüdigkeit bei normaler oder verlängerter Dauer des Nachtschlafes. Der Patient schläft mehrere Stunden am Stück, der Schlaf ist jedoch nicht erholsam (Chokroverty, 2010).

Narkolepsie:

Narkolepsie ist eine relativ seltene neurologische Störung mit einer Prävalenz von 1/2000, bei der es während des Tages wiederholt zu Schlafattacken kommt. Diese treten besonders bei sitzender oder monotoner Tätigkeit auf.

Bei Narkoleptikern können außerdem folgende Symptome auftreten:

- Kataplexie: plötzlicher Verlust des Muskeltonus, meistens hervorgerufen durch emotionale Reaktionen
- Hypnagoge (beim Einschlafen) oder hypnopompe (beim Aufwachen) Halluzinationen

- Paralyse nach dem Schlaf (Lähmung des gesamten Körpers mit Ausnahme der Atemmuskulatur und der Augen)
- Automatismus (z.B. Kleidungsstücke in den Kühlschrank legen)
- Gestörter Nachtschlaf

(Mahowald und Schenck, 2005)

Circadiane Rhythmusstörungen:

Das primäre Symptom bei circadianen Rhythmusstörungen ist das Unvermögen zur gewünschten Zeit zu schlafen. Der Schlaf an sich ist ungestört, aber der Zeitraum ist unpassend. Es wird zwischen primären und sekundären circadianen Rhythmusstörungen unterschieden.

Die primären Rhythmusstörungen beruhen auf einer Fehlfunktion der biologischen Uhr, die sekundären werden durch äußere Einflüsse hervorgerufen. Zu den primären circadianen Rhythmusstörungen zählen das *Delayed Sleep Phase Syndrom (DSPS)*, bei dem der Patient sowohl sehr spät einschläft, als auch spät aufwacht und das *Advanced Sleep Phase Syndrome (ASPS)*, bei dem der Betroffene früh einschläft und früher als erwünscht wieder wach wird.

Beispiele für sekundäre circadiane Rhythmusstörungen sind durch Schichtarbeit hervorgerufene Schlafprobleme und der *Jet-Lag* (Mahowald und Schenck, 2005).

Parasomnien:

Parasomnien sind ungewöhnliche Erfahrungen oder Verhaltensauffälligkeiten im Schlaf (Matwiyoff und Lee-Chiong, 2010).

Arousalstörungen (aus dem NREM-Schlaf)

- *Schlaftrunkenheit*: plötzliches Erwachen mit anschließender Verwirrung, Desorientierung und gelegentlich unangemessenem oder gewalttätigem Verhalten.
- *Schlafterror (Pavor nocturnus)*: plötzliches Erwachen aus dem NREM-Schlaf, begleitet von lautem Schreien, Weinen, Panik und Aufregung. Es kann auch zu Gewaltakten kommen (Matwiyoff und Lee-Chiong, 2010).

- *Schlafwandeln (Somnambulie)*: beginnt meist im ersten Drittel der Schlafzeit, während des *Slow-Wave-Sleep* (Chokroverty, 2010).

REM-Schlaf assoziierte Parasomnien

- *REM-Schlaf Verhaltensstörung*: betrifft vor allem ältere Personen. Es kommt zum Verlust der für die REM-Phase charakteristischen Muskelatonie. Der Betroffene scheint aus dem Traum heraus zu handeln. Sprechen, Schreien, komplexe motorische Aktivitäten und auch gewaltsame Handlungen treten auf (Matwiyoff und Lee-Chiong, 2010).
- *Alpträume*: Alpträume sind unangenehme, furchteinflößende Träume, welche den Schlafenden aus dem REM-Stadium wecken (Matwiyoff und Lee-Chiong, 2010).

Andere Parasomnien (Beispiele):

- *Schlafbezogene Essenstörungen*
- *Schlafbezogenes Stöhnen (Katathrenie)*
- *Exploding-Head-Syndrom*

(Matwiyoff und Lee-Chiong, 2010)

Schlafbezogene Bewegungsstörungen:

- *Restless-Leg-Syndrom (RLS)*: Personen mit dem RLS verspüren einen starken Drang vor allem die Beine zu bewegen, aber auch Arme, Rumpf und Hals können betroffen sein. Symptome der Parästhesie verschlimmern sich in der Nacht und bei körperlicher Inaktivität. Erleichterung verspürt der Betroffene bei Bewegung, was es jedoch schwierig macht, einzuschlafen bzw. durchzuschlafen (Schwartz und Roth, 2008).
- *Periodische Bewegungsstörung der Gliedmaßen*
- *Schlafbezogene Rhythmische Bewegungsstörung*: tritt meist unter 18 Lebensmonaten auf und ist durch Rollen und Schaukeln des Kopfes bzw. des Körpers gekennzeichnet
- *Periodische Bewegungsstörung der Gliedmaßen*
- *Bruxismus (=Zähneknirschen)*

➤ *Nächtliche Beinkrämpfe*

(Chokroverty, 2010)

1.1.3 Therapie von Schlafstörungen

Bei den am häufigsten verschriebenen Arzneistoffen gegen Insomnie handelt es sich um Modulatoren von GABA_A-Rezeptoren (Schwartz und Roth, 2008). Von großer Bedeutung sind dabei die Benzodiazepine (BZ), die nach ihrer Markteinführung in den späten 1950-ern, rasch die Barbiturate als Mittel der Wahl ablösten. Die sogenannten Nicht-Benzodiazepin-Agonisten stellen eine Weiterentwicklung dar, weil sie durch spezifischere Interaktion mit α_1 -haltigen GABA_A-Rezeptoren weniger unerwünschte Wirkungen hervorrufen. Sie weisen gegenüber den BZ eine unterschiedliche Struktur auf (Ebert et al., 2006). Eingesetzte Vertreter dieser Substanzklasse sind Zolpidem, Zaleplon oder Zopiclon. Sie werden häufig auch als „Z-Drugs“ bezeichnet (Szabadi, 2006).

Als neue Therapiemöglichkeiten werden Mittel zur Verlängerung und Verstärkung des *Slow-Wave-Sleep* angesehen (Wafford und Ebert, 2008). Ein Beispiel hierfür ist Gaboxadol, ein GABA-Analogon, das an der Bindungsstelle für GABA angreift (Rudolph und Knoflach, 2011). Gaboxadol interagiert selektiv mit extrasynaptischen GABA_A-Rezeptoren im Thalamus (Wafford und Ebert, 2008). Die Entwicklung dieses Wirkstoffes wurde jedoch im Jahr 2007 abgebrochen, nachdem in der klinischen Phase 3 unerwartete Nebenwirkungen wie Halluzinationen und Desorientierung auftraten (Rudolph und Knoflach, 2011).

Bei leichter Insomnie kommen auch Antihistaminika wie Diphenhydramin zum Einsatz (Wafford und Ebert, 2008). Das histaminerge System, das Wachheit vermittelt entspringt dem NTM (siehe Kapitel 1.1.1.2). Es sendet vom NTM Projektionen zum zerebralen Cortex, wo es mit exzitatorischen H1-Rezeptoren interagiert. Antihistaminika der ersten Generation, welche diese Rezeptoren im Gehirn blockieren wirken daher sedierend und einige von ihnen werden als Hypnotika eingesetzt (Szabadi, 2006). Es handelt sich dabei um „Over-The-Counter“ (OTC)-Präparate (Wilson et al., 2010). Die sedierende Wirkung der Antihistaminika der ersten Generation ist dadurch möglich, dass sie die Blut-Hirn-Schranke passieren. Antihistaminika der 2. Generation wie Cetirizin und Loratadin sind hydrophil und weisen somit eine größere Selektivität für periphere H1-Rezeptoren auf. Sie

werden daher, ebenso wie die Antihistaminika der 3. Generation, welche aktive Enantiomere und Metaboliten der 2. Generation sind (z.B. Levocetirizin, Desloratadin), nicht für die Behandlung von Schlafstörungen eingesetzt, sondern dienen der Symptombehandlung von Allergien (McDonald et al., 2008).

Melatonin, ein Hormon, wird nachts aus der Epiphyse freigesetzt und ist wesentlich für die circadiane Rhythmuskontrolle im Gehirn. Niedrige Melatoninspiegel werden auch mit Insomnie in Verbindung gebracht (Wafford und Ebert, 2008). Melatonin wird bei *Jet-Lag* und milder Form von Insomnie angewandt (Szabadi, 2006), sein Nutzen als orale Medikation ist jedoch durch kurze Halbwertszeit und hohen *First-Pass*-Metabolismus stark limitiert. Ramelton ist ein Melatonin-Rezeptor-Agonist mit hoher Affinität für die Melatonin-Rezeptoren TYP 1 (MT1) und TYP 2 (MT-2) im SCN, der zur Behandlung von Insomnie verwendet wird (Ebert et al. 2006). Seine Wirksamkeit scheint im Vergleich mit anderen Hypnotika jedoch deutlich schwächer ausgeprägt zu sein (Wafford und Ebert, 2008).

Von sedierend wirkenden Antagonisten an Serotonin (5-HT)-Rezeptoren vom TYP 5-HT_{2A} und 5-HT_{2C} (Szabadi, 2006; Wafford und Ebert, 2008) und auch von Orexin-Rezeptor-Antagonisten erhofft man sich zukünftig großen Nutzen in der Pharmakotherapie von Schlafstörungen (Wafford und Ebert, 2008).

Antidepressiva und Neuroleptika kommen ebenfalls in der Therapie von Schlafstörungen zum Einsatz (Wilson et al., 2010).

Bei Parasomnien wird in erster Linie versucht, negative Einflussfaktoren, wie Coffein, Alkohol oder späte Mahlzeiten zu meiden, auf geregelte Schlafenszeiten zu achten und für die Sicherheit von Patient und Bettpartner zu sorgen. Bei schwerwiegenden, gehäuft auftretenden Ereignissen, kommen verschiedene Medikamente zum Einsatz. Für folgende Substanzen gibt es Hinweise, dass sie für die Behandlung von Parasomnien von Nutzen sind: Paroxetin und Imipramin, Clonazepam, das sich bei RBD als effektiv erwies, Serotonin (=5-Hydroxytryptamin; 5-HT) und Prazosin.

Gegen exzessive Tagesmüdigkeit werden Arzneistoffe wie Modafinil, Methylphenidat und Natriumoxybat eingesetzt. Natriumoxybat ist effektiv gegen Kataplexie, Müdigkeit und gestörtem Schlaf bei Narkolepsie. Eine Kombination mit Modafinil könnte sich als vorteilhaft gegenüber einer Modafinil-Monotherapie erweisen (Boulos und Murray, 2010).

Modafinil fördert Wachheit. Es hat sich zur Behandlung von exzessiver Müdigkeit bei Narkolepsie, des Schichtarbeitersyndroms und des *OSAS* bewährt. Armodafinil, das R-Isomer von Modafinil hat dieselbe Indikation (Ebert et al., 2006).

Alternativ zur Pharmakotherapie kann auch eine kognitive Verhaltenstherapie zum Einsatz kommen. Hierbei kommen verschiedene psychologische Techniken zum Einsatz und spezifische Probleme der Patienten sollen im Rahmen der kognitiven Verhaltenstherapie beseitigt werden. Sie wird häufig mit Schlafhygienetraining, Entspannungsübungen und Biofeedback (Kontrolle der Atmung und der Herzfrequenz), kombiniert (Wafford und Ebert, 2008). Verhaltenstherapie und Pharmakotherapie werden häufig in Kombination angewandt (Schwartz und Roth, 2008). Pflanzliche Produkte kommen ebenfalls bei Schlafstörungen zum Einsatz, es mangelt jedoch an klinischen Studien die ihre Wirksamkeit belegen. Anwendung finden unter anderem Baldrian, Hopfen, Passionsblume, Melisse. Lavendel, Kamille und Ylang-Ylang werden im Rahmen einer Aromatherapie verwendet (Wheatley, 2005).

1.2 Angst

Angst ist ein aversiver emotionaler Zustand, der hervorgerufen wird, wenn durch externe Bedrohungen das Angstsystem eines Organismus aktiviert wird. Dieses dient dazu, Gefahren zu erkennen und automatisch auf die Bedrohung mit einem bestimmten Verhalten zu reagieren. Das Angstsystem übernimmt somit biologisch wichtige Funktionen und kann für das Überleben eines Individuums entscheidend sein (Hamm und Weike, 2005). Tritt Angst jedoch unangebracht und exzessiv auf, kann von pathologischer Angst gesprochen werden (Durant et.al, 2010).

Es kann zwischen dem Zustand Angst und dem Persönlichkeitsmerkmal Ängstlichkeit unterschieden werden. Die Zustandsangst ist eine Reaktion auf eine ungewohnte Umgebung oder eine unbekannte Bedrohung (Leonardo und Hen, 2008). Die Eigenschaft Ängstlichkeit spiegelt die Tendenz einer Person wider, auf Situationen vermehrt mit Angst zu reagieren (Gross und Hen, 2004).

Die Unterschiede zwischen Furcht und Angst

Einige Wissenschaftler differenzieren auch zwischen Furcht und Angst. Barlow definierte Furcht oder Panik als eine Basisemotion, die über sympathische

Nervenfasern eine Flucht- oder Abwehrreaktion hervorruft. Angst hingegen sei in die Zukunft gerichtet und stelle eine Reaktion auf eine mögliche Bedrohung dar, die als unkontrollierbar oder nicht vorhersehbar empfunden wird. Sie resultiere aus einem komplexen Zusammenspiel aus verschiedenen negativen Emotionen und Kognitionen (Barlow, 2002; Mineka und Oehlberg, 2008).

Die folgende Tabelle zeigt Symptome bei Furcht und Angst, die sich jeweils auf einer verbal-subjektiven, einer somatogen-viszeralen und einer verhaltensbezogenen Ebene manifestieren.

	Furcht	Angst
Verbal-subjektiv	Gedanken kreisen um die unmittelbare Bedrohung	Besorgnis über eine zukünftige Bedrohung
Somatogen-viszeral	Aktivierung des Sympathikus äußert sich durch Herzklopfen, Übelkeit, Zittern und Schwitzen	Muskelanspannung
Motorisches Verhalten	Flucht	Vermeidungsverhalten

Tabelle 1: Unterscheidungsmerkmale zwischen Furcht und Angst

(eigene Darstellung i. A. a. Craske et al., 2009)

In den meisten wissenschaftlichen Arbeiten werden die Wörter Angst und Furcht synonym verwendet, was erkennen lässt, dass auch in der Angstforschung nicht immer zwischen Furcht und Angst unterschieden wird. Basierend auf der verwendeten Literatur werden die Begriffe Angst und Furcht in dieser Arbeit deshalb nicht strikt unterschieden.

Laut Alfons O. Hamm und Almut I. Weike kann das Angstsystem durch vier zentrale Merkmale charakterisiert werden.

1. *Selectivity*: Das Angstsystem wird durch bestimmte Stimuli leicht aktiviert, durch andere wiederum nicht. Welche Stimuli eine Aktivierung hervorrufen ist einerseits evolutionsbedingt, andererseits können, bedingt durch die Plastizität des Gehirns,

ursprünglich neutrale Stimuli eine Angstreaktion erzeugen, wenn sie zuvor mit einer bedrohlichen oder schmerzhaften Erfahrung assoziiert wurden.

2. *Automaticity*: Die Evolution brachte ein Angstsystem hervor, das durch einen Reiz schnell und automatisch aktiviert werden kann, ohne dass er im primären visuellen Cortex verarbeitet werden muss.
3. *Encapsulation*: Findet eine Angstreaktion statt, so kann diese meist trotz versuchter Rationalisierung nicht unter Kontrolle gebracht werden (zum Beispiel bei Phobien).
4. *Specific-Neuronal-Network*: Die Steuerung des Angstnetzwerks erfolgt durch ein spezifisches neuronales Netzwerk, welches in Folge genauer erläutert wird.

(Hamm und Weike, 2005)

1.2.1 Physiologische Grundlagen

1.2.1.1 Wesentliche Hirnstrukturen in der Angstphysiologie

Zahlreiche Hirnstrukturen sind am Angstnetzwerk beteiligt (Leonardo und Hen, 2008). Von zentraler Bedeutung ist dabei die Amygdala, eine mandelförmige Struktur (Ressler, 2010) des limbischen Systems, die bei der Regulation und dem Erlernen von Angst, sowie der Bildung eines Angstgedächtnisses eine wesentliche Rolle spielt (Hamm und Weike, 2005).

Die Amygdala ist eine Schlüsselstruktur für die Entwicklung und die Expression von konditionierter Furcht. Furchtkonditionierung bedeutet, dass ein neutraler Stimulus solange mit einem aversiven Stimulus, dem unkonditionierten Stimulus (z.B. Elektroschock), gekoppelt wird, bis es schließlich auch in Abwesenheit des aversiven Stimulus zur Furchtreaktion kommt (Davis, 1992).

Die Amygdala setzt sich aus verschiedenen Kernen zusammen, zu denen der zentrale Kern der Amygdala (CeA) und die basolaterale Amygdala (=basaler und lateraler Amygdalakern; BLA) zählen (Ehrlich et al., 2009). Ausgehend von Cortex, Thalamus und Hippocampus werden sensorische Informationen (Wu et al., 2008) zu lateralem und basalem Amygdalakern projiziert (Kim und Jung, 2006). Zwei Formen der Furchtantwort können unterschieden werden. Im Falle einer akuten Bedrohung wird sie schnell über einen direkten Weg vom sensorischen Thalamus zur Amygdala indiziert. Sie kann aber auch langsamer über das Thalamus-Cortex-Amygdala-Netzwerk aktiviert werden, sodass

die Information über die Bedrohung durch den Cortex bewertet werden kann (Dell'Osso et al., 2010).

Der laterale und der basale Kern der Amygdala sind wichtig für die Assoziation von konditioniertem mit unkonditioniertem Stimulus. Innerhalb der Amygdala werden die Informationen dann zum CeA weitergeleitet (Kim und Jung, 2006). Außerdem projiziert der BLA zu den Bettkernen der Stria terminalis (BST), der ebenfalls eine wichtige Hirnstruktur in der Angstentstehung darstellt (Walker et al., 2009).

Der zentrale Kern kann in verschiedene Bereiche unterteilt werden, wobei dem medialen (CeA_M) und dem lateralen Teil (CeA_L) am meisten Bedeutung zukommt (Walker und Davis, 2008). Der CeA kann als bedeutendste Effektorregion der Amygdala angesehen werden, weil er zu den Hirnregionen projiziert, die unterschiedlichen Aspekte der Furchtreaktion vermitteln, wie zum Hirnstamm, Regionen im Hypothalamus und zum Cortex (Ressler, 2010). Zum Beispiel sind efferente Fasern im parabrachialem Nucleus an einem Anstieg der Respirationsrate beteiligt, oder führen über den lateralen Hypothalamus zur Sympathikusaktivierung. Projektionen zum LC scheinen dessen Reaktionen auf konditionierte Furchtreize zu modulieren (Davis, 1992). Bei Läsionen im CeA bleiben die bei der Furchtkonditionierung typischen Reaktionen aus (Ressler, 2010).

Das Modell, das die Amygdala in den Mittelpunkt des neuronalen Angst-Schaltkreises stellt, ist weitreichend anerkannt, sollte jedoch, basierend auf den Erkenntnissen zahlreicher Studien noch um den BST erweitert werden (Walker et al., 2009). Dieser, vor allem dessen lateraler Bereich, scheint als wichtiger Mediator von angstinduziertem Verhalten zu fungieren. Eine fehlerhafte Funktion dieser Hirnstruktur scheint mit pathologischen Formen von Angst verbunden zu sein (Hammack et al., 2009). Der CeA und der BST erhalten beide Informationen von der BLA und projizieren zu denselben Regionen, die zahlreiche durch Angst hervorgerufene Reaktionen regulieren (Walker et al., 2009).

Abbildung 4 zeigt einige dieser Projektionen.

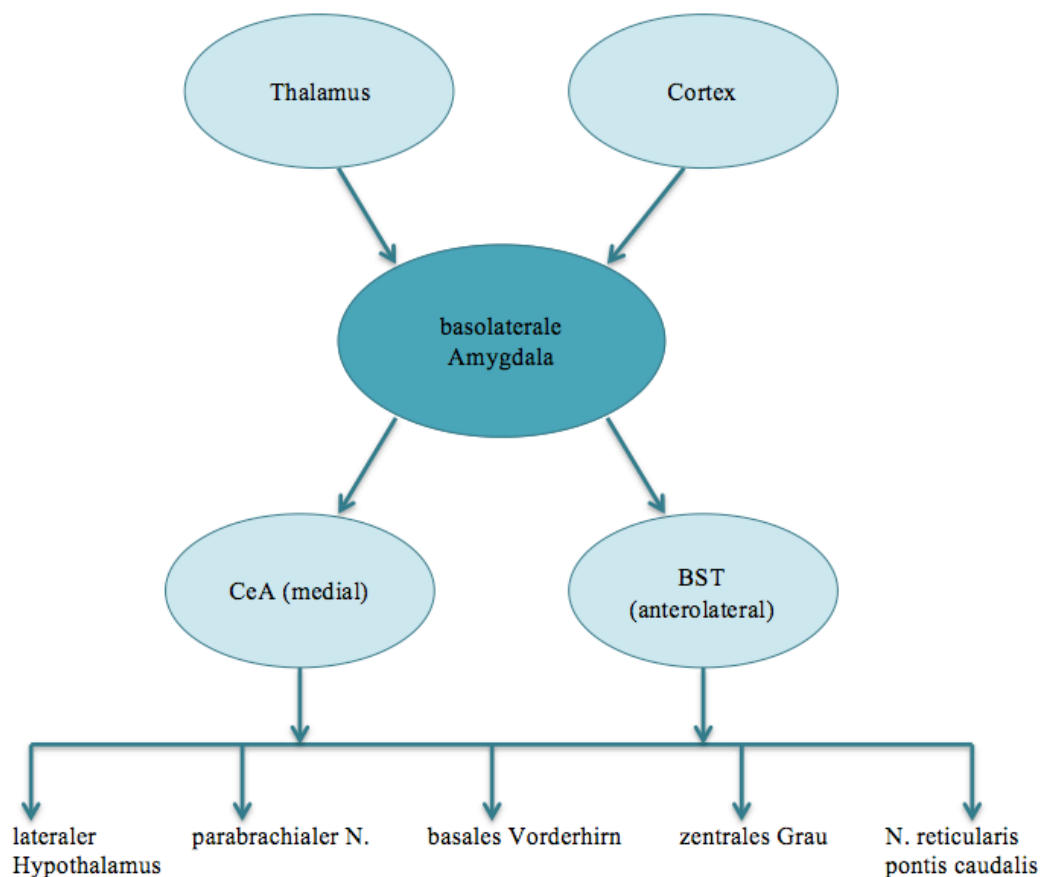


Abbildung 4: zentraler Amygdalakern und Bettkern der Stria terminalis erhalten beide Projektionen der basolateralen Amygdala. Diese wiederum projizieren beide zu denselben, die Angstreaktion modulierenden Arealen im Gehirn;

(eigene Darstellung i. A. a. ; Walker et al., 2003; Walker et al., 2009)

Der CeA und der BST üben komplementäre Funktionen aus (Walker et al., 2009). Der mediale Bereich des CeA leitet nach Aktivierung durch die BLA die schnelle Furchtantwort via Projektionen zum Hypothalamus und zum Hirnstamm ein. Der laterale Teil des Bettkern der Stria Terminalis (BST_L) hingegen, der auch von der BLA, aber auch vom lateralen Teil des CeA Projektionen erhält, steuert die langsame Antwort auf angsterzeugende Reize. Reaktionen treten infolge langanhaltender Stimulation auf und das Verhalten wird auch noch lange nach Verschwinden des Reizes beeinflusst (Walker und Davis, 2008).

Etliche Wissenschaftler definieren die kurze, durch den CeA vermittelte Reaktion als Furcht und bezeichnen die durch den BST hervorgerufene langandauernde Antwort als Angst (Davis und Shi, 1999; Walker et al., 2003).

Neben den beschriebenen, in Angst und Furcht involvierten Hirnstrukturen, gibt es auch Hinweise für eine Beteiligung des Inselcortex in der Angstphysiologie. In zahlreichen Studien konnte eine gesteigerte insuläre Aktivierung bei Personen festgestellt werden, die zu Angst neigen, deshalb wird einer abnormen Aktivierung des Inselcortex eine wichtige Rolle in der Sensibilisierung für Angst zugesprochen. Der Inselcortex ist wesentlich in den Prozess der Interozeption involviert. Unter Interozeption versteht man die Wahrnehmung von Vorgängen aus dem Körperinneren. Es gibt die Theorie, dass Personen, die dazu neigen Angst zu verspüren, interozeptive Wahrnehmungen vermehrt als gefährlich bzw. furchterregend empfinden und dass diese Tendenz hauptsächlich in einer Dysfunktion des anterioren Inselcortex begründet ist (Paulus und Murray, 2006).

1.2.1.2 Serotonin (5-HT)

Serotonin spielt eine wichtige Rolle bei vielen physiologischen Prozessen und pathologischen Zuständen, wie zum Beispiel bei Schlaf, Essen, Libido, Stimmungs- und Impulskontrolle. In der Regulation von Angst und Furcht stellt das serotonerge System ebenfalls einen bedeutenden Faktor dar. Substanzen, die in das serotonerge System eingreifen, werden zur Therapie von Angststörungen eingesetzt. Mittel erster Wahl sind Selektive Serotonin-Wiederaufnahmehemmer (*Selective Serotonin-Reuptake-Inhibitors; SSRIs*), die die Wiederaufnahme von 5-HT aus dem synaptischen Spalt blockieren und somit die serotonerge Neurotransmission und die 5-HT Rezeptorbindung beeinflussen (Akimova et al., 2009).

Die medialen Nuclei raphes und die dorsalen Nuclei raphes (DRN) stellen die zwei wichtigsten serotonergen Systeme dar und beide scheinen zur Angstmodulation beizutragen (Sandford et al., 2000).

Ob ein Mangel oder ein Überschuss von Serotonin mit pathologischer Angst verbunden ist, ist noch nicht vollständig geklärt (Durant et al., 2010). Es existiert die Annahme, dass 5-HT eine duale Rolle in der Vermittlung verschiedener Formen von Angst spielt. Freigesetztes 5-HT aus den Nervenendigungen der DRN führt in der Amygdala zu einer

Steigerung von erlerntem Angstverhalten, freigesetztes 5-HT aus den dorsalen Raphekernen, welche das dorsale Periaquäduktale Grau (dPAG) innervieren, inhibieren unkonditionierte Reaktionen auf bedrohliche Stimuli (Graeff et al., 1996).

Die unterschiedlichen Effekte von 5-HT, die sowohl inhibitorisch, wie auch exzitatorisch sind, werden über mindestens 14 Rezeptorsubtypen vermittelt (Akimova et al., 2009). Unter den verschiedenen Serotonin-Rezeptoren ist der 5-HT_{1A}-Rezeptor am besten untersucht und diesem wird auch besondere Bedeutung in der Ätiologie von Angststörungen zugeschrieben (Wu et al., 2008; Akimova et al., 2009). Die anxiolytische Wirkung resultiert aus einer Membranhyperpolarisation und verringerter neuronaler Erregbarkeit nach Aktivierung des mit Kaliumkanälen gekoppelten 5-HT_{1A}-Rezeptors (Wu et al., 2008).

1.2.1.3 Noradrenalin (NA)

Das zentrale noradrenerge System scheint bei Angststörungen ebenfalls eine Rolle zu spielen, vor allem bei Panikstörungen und posttraumatischen Belastungsstörungen (Itoi und Sugimoto, 2010). Seiner Aktivität in Hypothalamus, Amygdala und LC wird dabei am meisten Bedeutung zugeschrieben. Bei Ratten, die einer stressvollen Situation ausgesetzt waren und Angstreaktionen zeigten, konnte ein auffälliger Anstieg der NA-Freisetzung in Hypothalamus, Amygdala und LC verzeichnet werden (Tanaka et al., 2000). Die zentralen Effekte von NA werden durch postsynaptische Adrenozeptoren Typ α_1 - und β_1 und durch präsynaptische α_2 -Adrenozeptoren vermittelt, welche als Autorezeptoren an noradrenergen Nervenendigungen für die präsynaptische Inhibition der NA-Freisetzung und jener von anderen Neurotransmitter verantwortlich sind (Dell'Osso et al., 2010). Clonidin, ein α_2 -Adrenozeptor-Agonist kann die Symptome von Patienten mit Angststörungen lindern (Itoi und Sugimoto, 2010), Yohimbin hingegen, ein Antagonist am α_2 -Adrenozeptor erhöht die Verfügbarkeit von NA im synaptischen Spalt und kann zu einer Verschlimmerung der Symptome führen (Sullivan et al., 1999). Es gibt Hinweise, dass in Stresssituationen Corticoliberin (*Corticotropin Releasing Factor, CRF*) an einer gesteigerten Freisetzung von Noradrenalin beteiligt ist. Ebenso scheint Arginin-Vasopressin die vermehrte Ausschüttung von Noradrenalin zu fördern (Tanaka et al., 2000).

1.2.1.4 Corticoliberin

Es wird angenommen, dass weiters der *CRF* eine wichtige Rolle bei der Entstehung einer anhaltenden Furchtreaktion spielt (Walker und Davis, 2008). Der *CRF* beeinflusst das Verhalten bei Stress und Angst (Sahuque et al., 2006). Es handelt sich um ein Neuropeptid, das seine Effekte über zwei Rezeptorsubtypen, *Corticotropin Releasing Factor Receptor 1 (CRFR₁)* und *Corticotropin Releasing Factor Receptor 2 (CRFR₂)*, ausübt (Madaan und Wilson, 2009). *CRF* wird bei akutem Stress aus dem Hypothalamus freigesetzt und aktiviert *CRFR₁*-Rezeptoren, wodurch es zur Ausschüttung von hypophysärem Adrenocorticotropen Hormon (ACTH) kommt. ACTH führt wiederum eine Cortisolfreisetzung herbei (Mathew et al., 2008; Madaan und Wilson, 2009). Cortisol hemmt über einen negativen Rückkopplungsmechanismus die weitere Freisetzung von *CRF* und ACTH. Es gibt Hinweise dafür, dass eine gestörte Funktion der Hypothalamus-Hypophysen-Achse mit Formen pathologischer Angst in Zusammenhang steht. Auf Grund von Hinweisen auf erhöhte *CRF* Spiegel und Veränderungen in der Hypothalamus-Hypophysen-Achse wurden *CRFR₁*-Rezeptor-Antagonisten bereits als potentielle anxiolytisch wirkende Substanzen in Erwägung gezogen (Mathew et al., 2008).

CRF-haltige Neuronen befinden sich auch in Hirnstrukturen außerhalb des Hypothalamus wie unter anderem im LC, der Amygdala und im Hippocampus. Gemeinsam mit anderen Neurotransmittern nehmen sie Einfluss auf die Furchtexpression, die Vermittlung von konditionierter Angst und die Stressantwort (Lydiard, 2003).

1.2.1.5 Gamma-Aminobuttersäure (GABA)

Veränderungen im GABAergen System werden mit Angststörungen in Verbindung gebracht. Es gibt eindeutige Hinweise dafür, dass sowohl Anomalitäten der GABA-Rezeptoren, als auch ein beeinträchtigter Metabolismus von GABA bei Angststörungen eine Rolle spielen (Durant et al., 2010). Als wichtigster inhibitorischer Neurotransmitter wirkt GABA neuronaler Übererregbarkeit entgegen, welche auch als eine Triebfeder von Angststörungen angesehen wird (Lydiard, 2003). Häufig eingesetzte anxiolytisch wirkende Substanzen wie die BZ sind Modulatoren von diesem Rezeptor (Wu et al., 2008). Der GABA_A-Rezeptor setzt sich aus fünf verschiedenen Untereinheiten zusammen. Es stellte sich heraus, dass die anxiolytische Wirkung der BZ hauptsächlich GABA_A Rezeptoren mit

α_2 - bzw. α_3 - Untereinheiten zugeschrieben werden kann (Möhler, 2006). Die verschiedenen Untereinheiten des GABA_A-Rezeptors und ihre Funktionen werden in Abschnitt 1.3.5 noch genauer erläutert.

Es konnte festgestellt werden, dass NA durch Aktivierung von α_{1A} -Adrenozeptoren, die sich auf GABAergen präsynaptischen Nervenendigungen befinden, die GABAerge synaptische Transmission fördert. In Experimenten konnte als Folge von anhaltendem Stress eine Verringerung der über α_{1A} -Adrenozeptoren vermittelten Freisetzung von GABA beobachtet werden, hervorgerufen durch eine Desensibilisierung oder durch eine Downregulation der α_{1A} -Adrenozeptoren. Gesteigerte neuronale Aktivierbarkeit in der Amygdala ist ein charakteristisches Merkmal von Angststörungen wie der posttraumatischen Belastungsstörung. Die Verringerung der GABA_A-Rezeptor vermittelten inhibitorischen Transmission, verursacht durch den Verlust der α_{1A} -induzierten erleichterten Freisetzung von GABA, wird als Grund für die Übererregbarkeit der Amygdala in stressbezogenen Angststörungen angesehen (Aroniadou-Anderjaska et al., 2007).

Es konnte gezeigt werden, dass Kainat-Rezeptoren mit einer sogenannten GluR5-Untereinheit die Freisetzung von GABA in der BLA beeinflussen. Diese Rezeptoren kommen auf Interneuronen vor und ihre Aktivierung führt zu vermehrter Freisetzung von GABA. (Wu et al., 2008).

Hinweise für eine Rolle in der Angstphysiologie existieren neben den bereits genannten auch für etliche andere Substanzen wie zum Beispiel Dopamin (de la Mora et al., 2010) und einige Neuropeptide wie Substanz P, Neuropeptid Y und Galanin (Madaan und Wilson, 2009), auf die in dieser Arbeit jedoch nicht näher eingegangen wird.

1.2.2 Angststörungen

Das Verspüren von Angst ist ein normaler Bestandteil des menschlichen Daseins, exzessive oder unangemessene Angst kann jedoch zu einer belastenden Krankheit werden. Die Prävalenz von Angststörungen beträgt ca. 20% (Gross und Hen, 2004), wobei Frauen doppelt so oft betroffen sind wie Männer. Angsterkrankungen nehmen typischerweise

einen chronischen oder rezidivierenden Verlauf. Das vollständige Verschwinden der Symptome ist selten. Pathologische Angst kann zu einer erheblichen Verminderung der Lebensqualität, zu enormen persönlichem Leid und erhöhter Morbidität und Mortalität führen. Außerdem ist die hohe Prävalenz von Angsterkrankungen in der Gesellschaft eine große ökonomische Belastung. Das gleichzeitige Auftreten verschiedener Angsterkrankungen (z.B. einer Panikstörung zusammen mit einer sozialen Phobie) ist häufig und auch Komorbidität mit anderen psychiatrischen Störungen wie Depressionen oder Suchterkrankungen, die in vielen Fällen der Angststörung vorausgehen, tritt oft auf (Zwanzger und Deckert, 2007). Epidemiologische Studien ergaben, dass ungefähr 62% der Personen mit einer Angsterkrankung, die diagnostischen Kriterien einer anderen psychiatrischen Störung, meistens die einer Depression, erfüllen und vermehrt tritt Komorbidität bei Personen mit einer generalisierten Angststörung oder mit einer sozialen Phobie auf (Baldwin et al., 2005).

Zahlreiche Studien zeigen, dass sowohl genetische Faktoren als auch die Umweltfaktoren für die Ätiologie der Angsterkrankungen bedeutend sind (Gross und Hen, 2004). In Phasen erhöhter Hirnplastizität können negative Einflüsse auf den Furchtkreislauf bzw. das Angstnetzwerk einwirken und die Neigung eines Individuums zu pathologischer Angst fördern (Leonardo und Hen, 2008). Psychosoziale Faktoren wie die Beziehung zu den Eltern oder traumatische Ereignisse können Veränderungen im Gehirn erzeugen (Gross und Hen, 2004) und erhöhen das Risiko an einer Angststörung zu erkranken (Zwanzger und Deckert, 2007).

Personen, die an Angststörungen leiden, neigen dazu ihre Aufmerksamkeit selektiv auf Bedrohungen zu richten und unklare emotionale Reize negativ zu deuten.

Es herrscht die Annahme, dass sich jene Störungen, die mit intensiver Furcht und Panik einhergehen (z.B. Panikstörungen und Phobien), durch präfrontale Enthemmung der Amygdala auszeichnen und jene, die Sorgen und häufiges Nachsinnen beinhalten (z.B. die generalisierte Angststörung und Zwangsstörungen) eher durch eine Überaktivität in präfrontalen cortikalen Regionen bestimmt sind (Garner et al., 2009).

Angststörungen werden in folgende sechs Kategorien eingeteilt:

- **Generalisierte Angststörung (*Generalized Anxiety Disorder GAD*):** Die *GAD* äußert sich durch übertriebene, chronische Besorgnis über verschiedenen

Ereignisse oder Tätigkeiten. Betroffene empfinden ihre ständige Sorge als schwer kontrollierbar (Mineka und Oehlberg, 2008). Zu den körperlichen Symptomen zählen z.B. Ruhelosigkeit, Konzentrationsschwierigkeiten, Muskelverspannungen, Schlaflosigkeit und Reizbarkeit. Von einer *GAD* wird erst dann gesprochen, wenn die exzessiven, ständigen Sorgen einer Person über mehrere Monate hinweg bestehen bleiben (Baldwin et al., 2005).

- **Panikstörung:** Eine Panikstörung ist charakterisiert durch wiederkehrendes plötzliches Auftreten intensiver Angstzustände („Panikattacken“), begleitet von verschiedenen physischen und psychischen Angstsymptomen (Baldwin et al., 2005), wie Herzrasen, Übelkeit, Zittern Schwitzen und Kurzatmigkeit (Devane et al., 2005). Die Panikattacken erreichen typischerweise nach ca. 10 min ihren Höhepunkt und dauern ca. 30–45 min an. Häufig haben die Betroffenen zwischen den Episoden intensiver Angst eine gewisse Erwartungsangst, eine erneute Attacke zu erleiden, wodurch sich oft das für Panikattacken charakteristische Vermeidungsverhalten entwickelt. Situationen und Orte, an denen eine Angstattacke auftreten könnte, oder von denen eine Flucht schwierig oder unangenehm erscheint (öffentliche Verkehrsmittel, Menschenmassen, etc.), werden gemieden (Baldwin et al., 2005).
- **Posttraumatische Belastungsstörung:** Die Patienten haben in ihrer Vergangenheit ein traumatisches Ereignisses erlebt, verbunden mit intensiver Angst, Hilflosigkeit oder Horror. Es kommt zum Wiedererleben der traumatischen Erfahrung in Form von Flashbacks oder Alpträumen. Situationen und Aktivitäten, die in Zusammenhang mit dem traumatischen Erlebnis stehen werden gemieden. Charakteristisch sind ein erhöhter physischer Erregungszustand, Schreckhaftigkeit und Schlafstörungen (Baldwin et al., 2005).
- **Soziale Phobie:** soziale Phobie ist gekennzeichnet durch dauerhafte, unbegründete Angst vor sozialen Situationen. Betroffene haben die Befürchtung sich bei Kontakt mit anderen Menschen peinlich oder beschämend zu verhalten und missgünstig beurteilt zu werden (Baldwin et al., 2005).

- **Spezifische Phobie:** Unter einer spezifischen Phobie versteht man eine übermäßige und irrationale Furcht vor bestimmten Objekten oder gewissen Situationen, die infolgedessen gemieden werden (Mineka und Oehlberg, 2008).
- **Zwangsstörung:** Bei einer Zwangsstörung kommt es zu wiederkehrenden Zwangsvorstellungen und Zwangshandlungen welche die Lebensqualität erheblich beeinträchtigen. Die Zwangsvorstellungen sind persistierende, unpassende Gedanken die Angst hervorrufen. Die betroffene Person fühlt sich zu Zwangshandlungen genötigt, um Angst und Qual zu lindern (Gross und Hen, 2004).

1.2.3 Therapie von Angststörungen

Zur Behandlung von Angsterkrankungen werden sowohl psychotherapeutische, als auch medikamentöse Maßnahmen angewandt. Oft wird eine Kombination der beiden Therapiemethoden empfohlen.

Kognitive Verhaltenstherapie

Das wichtigste psychotherapeutische Verfahren stellt die kognitive Verhaltenstherapie dar. Aufklärung über das Krankheitsbild und Erläuterung von Maßnahmen, die von den Patienten sofort umgesetzt werden können (Entspannungstrainings, Sport, verminderter Koffeinkonsum, Stressreduktion, etc.) sind wichtige Voraussetzungen für den Erfolg einer kognitiven Verhaltenstherapie.

Wesentliche Methoden der kognitiven Verhaltenstherapie sind:

- Exposition: bei der Exposition handelt sich um eine Konfrontationsbehandlung, die eine Löschung bzw. die Habituation der Angstreaktion zum Ziel hat.
- Systematische Desensibilisierung: Patienten werden angeleitet, sich mit Hilfe zuvor erlernter Entspannungsstrategien phobischen Reizen auszusetzen.
- Sorgenkonfrontation: die Sorgenkonfrontation wird bei der GAD angewandt. Ziel ist es, dass Patienten gedankliche Sprünge zwischen verschiedenen Sorgen vermeiden und stattdessen ihre Gedanken „zu Ende“ denken (Zwanzger und Deckert, 2007).

Pharmakotherapie

Antidepressiva haben sich als effektiv zur Behandlung von Angsterkrankungen erwiesen. Die Klasse der *SSRIs* sind heute Mittel der Wahl in der Therapie von Angststörungen. Vorteilhaft ist die Therapie mit Antidepressiva besonders wenn neben der Angststörung gleichzeitig eine Depression als Komorbidität vorliegt. Ein Nachteil von Antidepressiva gegenüber BZ ist, dass es zu Beginn der Therapie zu einer Verschlimmerung der Angsterkrankung kommen kann. In der Praxis begegnet man diesem Problem indem man die Medikation einschleichend dosiert. Als alternative Lösung kann am Anfang der Behandlung gleichzeitig ein BZ-Präparat verschrieben werden.

- **Benzodiazepine (BZ):** Die anxiolytische Wirkung der BZ setzt sehr rasch ein, oft schon 30 min nach der Einnahme (Nutt, 2005). Als Anxiolytika werden u.a. Alprazolam, Diazepam, Oxazepam, Clorazepam oder Lorazepam eingesetzt (Nemeroff, 2003). Ihre Effektivität in der Therapie der meisten Angststörungen ist belegt. Bei Zwangsstörungen jedoch ist die Wirksamkeit der BZ nicht sehr groß. Bei der posttraumatischen Belastungsstörung sind BZ möglicherweise sogar ineffektiv. Die schlaffördernde Wirkung der BZ kann unter Umständen von Vorteil sein, da Einschlafstörungen und verminderte Schlafqualität bei Angststörungen auftreten können. Andererseits können die sedierenden Nebenwirkungen vor allem unter Tags für einige Patienten ein Problem darstellen. BZs haben etliche Nebenwirkungen und bei Langzeitanwendung von BZ kann es zu Abhängigkeit, Toleranzentwicklung und Entzugerscheinungen kommen (Nutt, 2005).
- **Selektive Serotonin-Wiederaufnahme-Hemmer (*Selective Serotonin-Reuptake-Inhibitors; SSRIs*):** *SSRIs* sind Mittel erster Wahl in der Therapie von Angststörungen. Sie unterbinden die Wiederaufnahme von Serotonin in die Nervenendigungen, nach dessen Freisetzung in den synaptischen Spalt. *SSRIs* erzeugen somit eine Steigerung der serotonergen Neurotransmission im Gehirn (Gross und Henn, 2004). Bekannte Vertreter dieser Substanzklasse sind Paroxetin, Sertralin, Citalopram, Fluoxetin, Fluvoxamin und Escitalopram, das S-Enantiomer von Citalopram (Nutt, 2005).

SSRIs besitzen einen verzögerten Wirkungseintritt. Es kann zwei bis vier Wochen ab Behandlungsbeginn dauern, bis sich ein therapeutischer Effekt abzeichnet.

Zuerst führt die erhöhte extrazelluläre 5-HT-Konzentration zu einer verstärkten Aktivierung der präsynaptischen 5-HT-Autorezeptoren. Dies führt dazu, dass über einen negativen Feedbackmechanismus die Produktion und Freisetzung von 5-HT gedrosselt wird. Nach längerer Einnahme kommt es zu einer langsamen Desensibilisierung der somatodendritischen 5-HT_{1A}-Autorezeptoren und somit zu einer graduellen Steigerung der serotonergen Neurotransmission (Hjorth et al., 2000). *SSRIs* werden in der Regel sehr gut vertragen, jedoch sind auch sie nicht ohne Nebenwirkungen. Zu Therapiebeginn treten häufig Übelkeit, Schlafstörungen und Unruhe auf. Außerdem kann es zu einer Verschlimmerung der Angstzustände kommen. Eine anfängliche Komedikation mit BZ macht eine bessere Verträglichkeit der *SSRIs*-Behandlung und eine Kontrolle der Angstzustände bis zum Wirkungseintritt der *SSRIs* möglich (Nutt, 2005).

- **Serotonin-Noradrenalin-Wiederaufnahmehemmer (*Serotonin-Norepinephrine-Reuptake-Inhibitors; SNRIs*):** *SNRIs* sind Antidepressiva, die sowohl die Wiederaufnahme von 5-HT als auch von NA hemmen. Der erste *SNRI* war Venlafaxin. Weitere Vertreter sind Desvenlafaxin (=aktiver Metabolit von Venlafaxin), Duloxetine und Milnacipran (Dell'Osso et al., 2010).
- **Trizyklische Antidepressiva (*Tricyclic Antidepressants; TCAs*):** *TCAs* erwiesen sich schon in den 1960ern als effektive Anxiolytika, jedoch kann es einige Wochen dauern bis die Wirkung einsetzt (Nemeroff, 2003). Typische Vertreter sind Desipramin, Imipramin, Clomipramin, Amitriptylin. Sie hemmen nicht selektiv die Wiederaufnahme von NA und 5-HT in die Nervenendigungen. Es werden also auch andere Neurotransmittersysteme beeinflusst, wodurch es zum Auftreten von Nebenwirkungen kommt (Nutt, 2005). Bei *TCAs* können außerdem Wechselwirkungen mit anderen Arzneimitteln vorkommen, vor allem mit jenen, die als Cytochrom P450 2D6-Inhibitoren fungieren (Nemeroff, 2003). Bezüglich Sicherheit und Verträglichkeit sind die *TCAs* den *SSRIs* unterlegen, deshalb kommt den *TCAs* heute in der Therapie von Angststörungen eine geringere Bedeutung zu (Nutt, 2005).
- **Azapirone:** Die einzige Verbindung dieser Gruppe, deren anxiolytische Wirkung bestätigt ist, ist Buspiron. Es ist ein schwaches Anxiolytikum, das sich bei der

Behandlung der *GAD* als effektiv erwiesen hat (Nemeroff, 2003). Buspiron ist ein partieller Agonist an postsynaptischen 5-HT_{1A}-Rezeptoren (Nutt, 2005). Sedierung und Abhängigkeit treten nicht auf und es kann auch zu keiner tödlichen Überdosierung kommen (Nemeroff, 2003). Schwindel und Übelkeit zu Beginn der Therapie sind möglich (Nutt, 2005).

- **Monoaminoxidaseinhibitoren (MAO-Hemmer):** Die Monoaminoxidase (MAO) ist ein Enzym, von dem zwei Subtypen existieren, Monoaminoxidase Typ A (MAO_A) und Monoaminoxidase Typ B (MAO_B). Seine Aufgabe ist es, Monoamine zu metabolisieren (Stahl und Felker, 2008). Trotz ihrer nachweislich positiven anxiolytischen Wirkung werden MAO-Inhibitoren nur beschränkt eingesetzt, da sie ebenfalls einen verzögerten Wirkungseintritt haben und vereinzelt schwerwiegende Nebenwirkungen hervorrufen. Interaktionen mit Arzneimitteln und auch mit Nahrungsmitteln sind möglich (Nemeroff, 2003). Im Falle der Umstellung von einem MAO-Hemmer auf ein anderes Antidepressivum, sollte zwischen dem Absetzen des MAO-Inhibitors und Beginn der neuen Behandlung mindestens ein Zeitraum von 2 Wochen liegen (Nutt, 2005).

Die derzeit verfügbaren Behandlungsoptionen sind aufgrund vieler Nebenwirkungen, verzögertem Wirkungseintritt und ungenügenden Ansprechraten und Heilungserfolgen unbefriedigend. Deshalb wird weiterhin nach neuen Therapiemöglichkeiten gesucht (Madaan und Wilson, 2009).

Modulatoren der Hypothalamus-Hypophysen-Achse oder Substanzen, welche die Effekte von GABA verstärken können, sind von Interesse. Gabapentin, ein GABA-Analogon, das nicht über GABA_A-Rezeptoren wirkt und die GABA-Freisetzung aus der Glia fördert und Tiagabin, ein selektiver GABA-Wiederaufnahmehemmer, sind Beispiele für vielversprechende neue, anxiolytisch wirkende Substanzen die in das GABAerge System eingreifen (Garner et al., 2009).

Potential für die Pharmakotherapie von Angststörungen haben 5HT₁- und 5HT₂-Rezeptor-Antagonisten, Glutamat-Rezeptor-Antagonisten, Cholecystokinin-Antagonisten und Antagonisten am Rezeptor für Substanz P, sowie Agonisten an den A₁- und A₂-Rezeptoren, an Melatonin-Rezeptoren und Neuropeptid Y-Agonisten (Baldwin, 2006).

1.3 Der GABA_A-Rezeptor

GABA ist der wichtigste inhibitorische Neurotransmitter im Säugetierhirn (Sieghart, 1995). Ungefähr 20-30% der Neuronen im ZNS sind GABAerg (Rudolph und Knoflach, 2011). Die meisten der physiologischen Effekte von GABA werden über GABA_A-Rezeptoren vermittelt.

GABA_A-Rezeptoren spielen eine wichtige Rolle bei Angst, circadianem Rhythmus und Wachheit, sie sind aber auch von Belang für Ess- und Trinkverhalten, Kognition, Lernen und Gedächtnis (Sieghart et al., 1999).

Mangelhafte GABA_A-Rezeptorexpression bzw. Rezeptorfunktion spielen bei etlichen neuronalen und psychiatrischen Krankheiten eine wesentliche Rolle (D'Hulst et al., 2009), zum Beispiel bei Angststörungen (Moult, 2009). Neben dem endogenen Liganden GABA wird der GABA_A-Rezeptor auch durch den selektiven Agonisten Muscimol aktiviert, durch Bicucullin und Picrotoxin blockiert und durch zahlreiche klinisch relevante Substanzen wie beispielsweise durch Benzodiazepine, Barbiturate und Anästhetika moduliert (Sieghart, 1995).

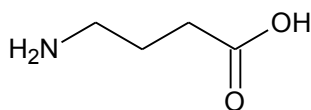


Abbildung 5: Strukturformel von GABA

1.3.1 Funktion des GABA_A-Rezeptors

Beim GABA_A-Rezeptor handelt es sich um einen ligandengesteuerten Ionenkanal. Die Bindung von GABA an die Bindungsstelle in der extrazellulären Region des Rezeptors führt über eine Konformationsänderung zur Kanalöffnung, sodass Ionen die Membran passieren können (Kash et al., 2004; Möhler, 2006; Olsen und Sieghart, 2008; D'Hulst, 2009). Der GABA_A-Kanal ist anionenselektiv (Olsen und Sieghart, 2009). Hauptsächlich erfolgt eine Permeation von Chloridionen, aber auch Bicarbonationen können passieren (Owens und Kriegstein, 2002). Die Membranverteilung dieser beiden Anionen und das Gleichgewichtspotential der Zelle sind entscheidend für die Folgen der

Rezeptoraktivierung (Farrant und Nusser, 2005). Es kann zu einer Hyperpolarisation, Depolarisation oder zu keiner Veränderung des Membranpotentials kommen (Owens und Kriegstein, 2002). In den meisten entwickelten Zellen ist das Chlorid-Gleichgewichtspotential negativer, das von Bicarbonat positiver als das Ruhemembranpotential. Da die Permeabilität von Bicarbonat geringer ist als jene von Chlorid, resultiert in den meisten Fällen ein Nettoeinstrom von Anionen. Somit kommt es zur Membranhypolarisation und zum Auftreten eines inhibitorischen postsynaptischen Potentials (IPSP) (Farrant und Nusser, 2005). Die Wahrscheinlichkeit für ein Aktionspotential (AP) in der postsynaptischen Zelle wird somit herabgesetzt, denn die Hyperpolarisation und vor allem die gesteigerte Membranleitfähigkeit erschweren es einem exzitatorischen Potential die Membran bis zum Schwellenwert zu depolarisieren (Owens und Kriegstein, 2002). Unter speziellen Bedingungen kann Rezeptoraktivierung auch eine Membrandepolarisation zur Folge haben und sogar ein AP auslösen, zum Beispiel bei erhöhter intrazellulärer Chloridkonzentration, bedingt durch veränderte Expression von Chlorid-Transportern (Olsen und Sieghart, 2008), oder durch räumlich und zeitlich gleichzeitiges Auftreten von anderen Impulsen (Winsky-Sommerer, 2009). Relevant ist diese Depolarisation in frühen Entwicklungsstadien der Neuronen. Mit fortschreitender Reifung der Neuronen, nimmt die intrazelluläre Chloridkonzentration ab und der Effekt von GABA wird zunehmend inhibitorisch (Owens und Kriegstein, 2002).

1.3.2 Formen der GABA_A-Rezeptor Aktivierung

Werden synaptische GABA_A-Rezeptoren für kurze Zeit einer sehr hohen GABA Konzentration ausgesetzt, kommt es zur sogenannten phasischen Inhibition. Die phasische Rezeptoraktivierung gewährleistet die schnelle und präzise Umwandlung präsynaptischer Aktivität in ein postsynaptisches Signal. Kommt ein AP an der Nervenendigung an, induziert ein lokaler Calciumeinstrom die Fusion synaptischer Vesikel mit der präsynaptischen Membran. Jedes einzelne dieser Vesikel entlässt daraufhin viele tausend GABA Moleküle in den synaptischen Spalt. Diese GABA-Konzentration (millimolarer Bereich) ruft eine schnelle, beinahe gleichzeitige Öffnung einer relativ geringen Anzahl von Kanälen hervor, welche an der postsynaptischen Membran gruppiert sind. Zwei Agonistenmoleküle sind für eine effiziente Öffnung der GABA_A-Rezeptor Ionenkanäle notwendig (Farrant und Nusser, 2005). Die entstehenden, charakteristischen,

inhibitorischen postsynaptischen Ströme dauern nur wenige Millisekunden an (Winsky-Sommerer 2009). Diese kurzzeitige Aktivierung wird durch die rasche Entfernung von GABA aus dem synaptischen Spalt mittels GABA-Transportern (GAT1-3) und durch Diffusion möglich. Neben der phasischen Inhibition existiert auch noch eine sogenannte tonische Inhibition, die über hochaffine extrasynaptische Rezeptoren vermittelt wird (D’Hulst et al., 2009). Die extrasynaptischen Rezeptoren werden durch sogenanntes synaptisches „Spillover“ von GABA oder nicht-vesikulärer Freisetzung von GABA aktiviert (Möhler, 2006). Für die Aktivierung der extrasynaptischen GABA_A-Rezeptoren ist eine niedrige umgebende GABA Konzentration (300 nM bis 2 µM) ausreichend (D’Hulst et al., 2009). Die tonische Inhibition generiert eine gewisse andauernde Reduktion der neuronalen Erregbarkeit (Möhler, 2007).

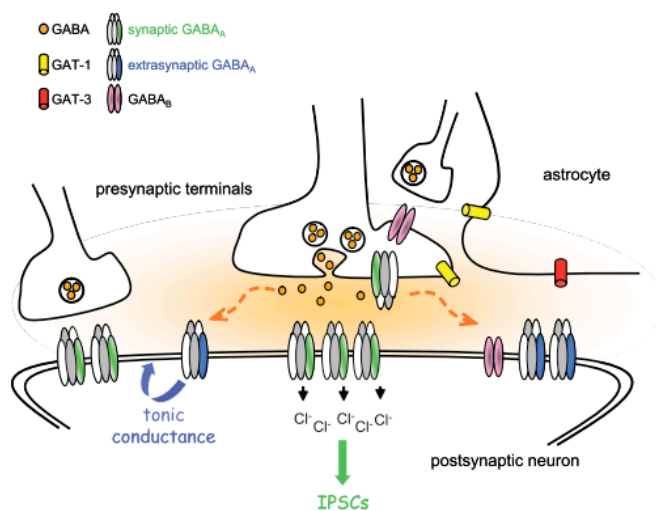


Abbildung 6: schematische Darstellung einer GABAergen Synapse und verschiedener Formen GABAerger Transmission

(Winsky-Sommerer, 2009)

1.3.3 Struktur des GABA_A-Rezeptors

Der GABA_A-Rezeptor ist Mitglied der Superfamilie der Cys-loop ligandengesteuerten Ionenkanäle (LGIC), zu der unter anderem auch die nikotinischen Acetylcholin-Rezeptoren (nAChRs), die Glycin-Rezeptoren (GlyRs) und die ionotropen 5-HT-Rezeptoren gehören (Sieghart, 1995; Barnard et al., 1998; Minier und Sigel, 2004;

Sieghart, 2006). Sie unterscheiden sich in struktureller Hinsicht von den anderen LGIC-Familien (tetrameren Glutamatrezeptoren und den trimeren Purinrezeptoren) (Winsky-Sommerer, 2009). Der GABA_A-Rezeptor ist ebenso wie die anderen Rezeptoren derselben Familie ein membrandurchspannendes Protein mit heteropentamerer Struktur. Die 5 Untereinheiten des Rezeptors bilden eine zentrale Pore, durch die die Ionenpassage stattfindet (Olsen und Sieghart, 2008).

Jede Untereinheit (50-60 kDA) besteht aus einer großen N-terminalen extrazellulären hydrophilen Domäne mit Agonisten-/Antagonisten-Bindungsstelle, einer transmembranären Domäne bestehend aus 4 α -helikalen Segmenten (M1-M4) und einer relativ kurzen C-terminalen extrazellulären Domäne. Zwischen den Segmenten M3 und M4 befindet sich eine große cytoplasmatische Schleife, die als Angriffsstelle für Proteinkinasen dient. Die Untereinheiten sind so angeordnet, dass ihre M2 Segmente die Wand der Kanalpore bilden. Folgende Abbildungen zeigen ein Modell des nAch-Rezeptors, der dem GABA_A-Rezeptor in seiner Struktur sehr ähnlich ist.

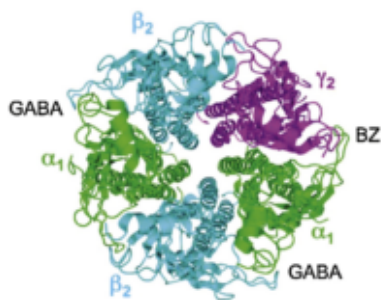


Abbildung 7: Modell des nAch-Rezeptors; Ansicht von der extrazellulären Seite der Membran

(D'Hulst et al., 2009)

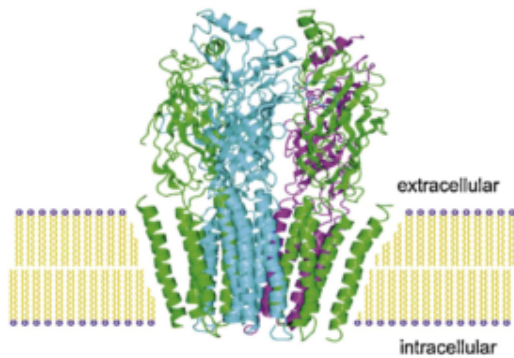


Abbildung 8: Modell eines membrandurchspannenden nACh-Rezeptors in seitlicher Ansicht

(D'Hulst et al., 2009)

Heterogenität des GABA_A-Rezeptors

Es existieren verschiedene GABA_A-Rezeptorsubtypen, die sich aus unterschiedlichen Untereinheiten (UE) zusammensetzen (Möhler, 2006). 19 Gene für GABA_A-Rezeptor Untereinheiten wurden identifiziert: α 1-6, β 1-3, γ 1-3, δ , ϵ , ρ 1-3 und θ (Simon et al., 2004). Daraus resultiert eine sehr große Zahl an Kombinationsmöglichkeiten, von denen jedoch nicht alle tatsächlich in der Natur vorkommen (Möhler, 2006). Die ρ UE formen homomere Rezeptoren in der Retina, deren Pharmakologie von jener der klassischen GABA_A-Rezeptoren abweicht. Sie sind insensitiv gegenüber Bicucullin und Baclofen und sie werden nicht durch Barbiturate oder BZ moduliert. Sie werden manchmal auch als GABA_C-Rezeptoren bezeichnet, jedoch handelt es sich um eine homomere Klasse von GABA_A-Rezeptoren (Möhler, 2006; Olsen und Sieghart, 2008).

Die jeweilige Zusammensetzung des GABA_A-Rezeptors bestimmt sein pharmakologisches Profil. Aus der großen strukturellen Diversität resultieren Unterschiede in der Kanalkinetik, der Affinität für GABA und der Desensibilisierungsrate (Möhler, 2007). GABA_A-Rezeptoren unterscheiden sich weiters in ihrem Vorkommen im Nervensystem und somit auch in ihrer Funktion, je nachdem in welche neuronalen Schaltkreise sie involviert sind (Olsen und Sieghart, 2009).

Viele GABA_A-Rezeptoren bestehen aus zwei α UE, zwei β UE und einer γ UE. Zwei Bindungsstellen für GABA werden von α und β UE gebildet (Rudolph und Knoflach, 2011) (siehe Abbildung 7). BZ und *Z-Drugs* wirken über die sogenannte Benzodiazepin-Bindungsstelle (Winsky-Sommerer, 2009). Die Benzodiazepin-Bindungsstelle wird von

einer α UE ($\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3$, oder $\alpha 5$) und einer γ Untereinheit gebildet, meistens handelt es sich um die $\gamma 2$ Untereinheit, die in ungefähr 90% der GABA_A-Rezeptoren enthalten ist. Der am häufigsten auftretende Rezeptorsubtyp setzt sich aus den Untereinheiten $\alpha 1$, $\beta 2$ und $\gamma 2$ zusammen, in den meisten Fällen in einer 2:2:1 Stöchiometrie (Tretter et al., 1997; Baumann et al., 2001).

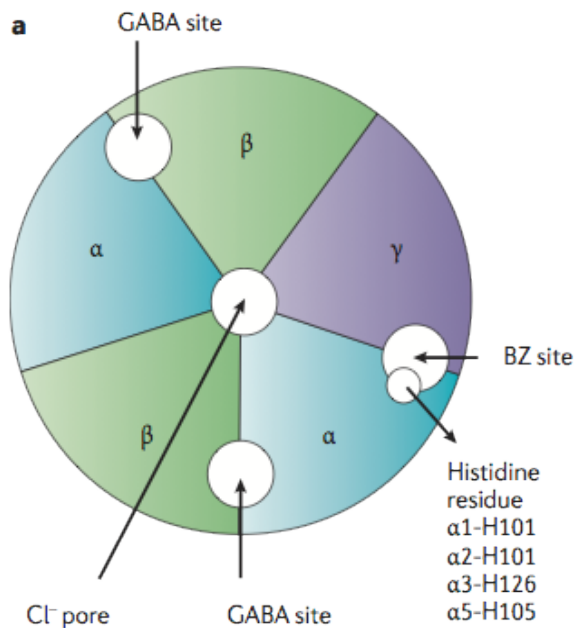


Abbildung 9: Viele GABA_A-Rezeptoren bestehen aus 2 α , 2 β und 1 γ UE, mit 2 GABA-Bindungsstellen, gebildet von α und β UE. Die BZ-Bindungsstelle wird durch eine der α - UE und eine γ UE geformt.

(Rudolph und Knoflach, 2011)

Folgende ungefähre prozentuale Verteilung verschiedener Kombinationen von UE in GABA_A-Rezeptoren liegt vor:

- 60%: $\alpha 1\beta 2\gamma 2$
- 15-20%: $\alpha 2\beta 3\gamma 2$
- 10-15%: $\alpha 3\beta n\gamma 2$
- 5%: $\alpha 4\beta n\gamma$ oder $\alpha 4\beta n\delta$
- <5%: $\alpha 5\beta 2\gamma 2$ und wahrscheinlich auch $\alpha 6\beta 2/3\gamma 2$

(Rudolph und Knoflach 2011)

Unter den α UE ist die $\alpha 1$ UE am weitesten verbreitet. Die $\alpha 2$ und die $\alpha 3$ UE weisen jedoch in Hirnarealen, in denen die $\alpha 1$ UE gar nicht oder nur in geringem Ausmaß vorkommt, besonders hohe Expressionsraten auf. Sie kommen meistens gemeinsam mit der $\beta 3$ und der $\gamma 2$ UE in den Rezeptoren vor (Möhler, 2007). GABA_A-Rezeptoren, die eine $\alpha 4$ bzw. eine $\alpha 6$ UE enthalten werden nicht durch klassische BZ moduliert (Rudolph und Knoflach, 2011). Die $\alpha 4$ und die $\alpha 6$ UE treten sehr häufig in Kombination mit der δ UE auf. Diese ist ausschließlich extra- und perisynaptisch lokalisiert (Olsen und Sieghart, 2009).

$\alpha 4\beta\delta$ und $\alpha 6\beta\delta$ -Rezeptoren weisen eine langsame und geringe Desensibilisierung auf, sowie eine hohe Affinität für GABA. Sie sind dadurch imstande, tonische Inhibition zu vermitteln und in die neuronale Erregbarkeit regulierend einzugreifen (Möhler, 2007; D'Hulst et al., 2009). Die $\alpha 5$ UE kommt selten vor, im Hippocampus zeigt sie jedoch relativ hohe Expressionsraten (15-20%) (Möhler, 2007). Sie ist extrasynaptisch lokalisiert. $\alpha 5\beta\gamma 2$ -Rezeptoren im Hippocampus vermitteln tonische Hemmung.

In der Familie der β UE ist die $\beta 2$ UE am häufigsten vertreten (Olsen und Sieghart, 2008).

Bei den γ UE wird die $\gamma 2$ UE ubiquitär im ZNS exprimiert, im Gegensatz zu der $\gamma 1$ und der $\gamma 3$ UE, deren Vorkommen auf wenige Hirnareale beschränkt ist (Pirker et al., 2000). Die $\gamma 2$ UE ist, ebenso wie ein rezeptorassoziiertes Protein namens Gephyrin, notwendig für die Culsterbildung der GABA_A-Rezeptoren an der postsynaptischen Membran (D'Hulst et al., 2009). Die δ , ϵ , π und θ UE können die γ UE im Rezeptor substituieren (Pirker et al., 2000; Owens und Kriegstein, 2002).

1.3.4 Benzodiazepine

Der GABA_A-Rezeptor ist Angriffspunkt von zahlreichen pharmakologisch und klinisch relevanten Arzneimitteln wie zum Beispiel von Benzodiazepinen, Barbituraten, Anästhetika und Neurosteroiden (Sieghart, 2000; Moulton, 2009) (Abbildung 10).

Die Interaktion der BZ mit dem GABA_A-Rezeptor ist bereits gut untersucht (Olsen und Sieghart, 2009).

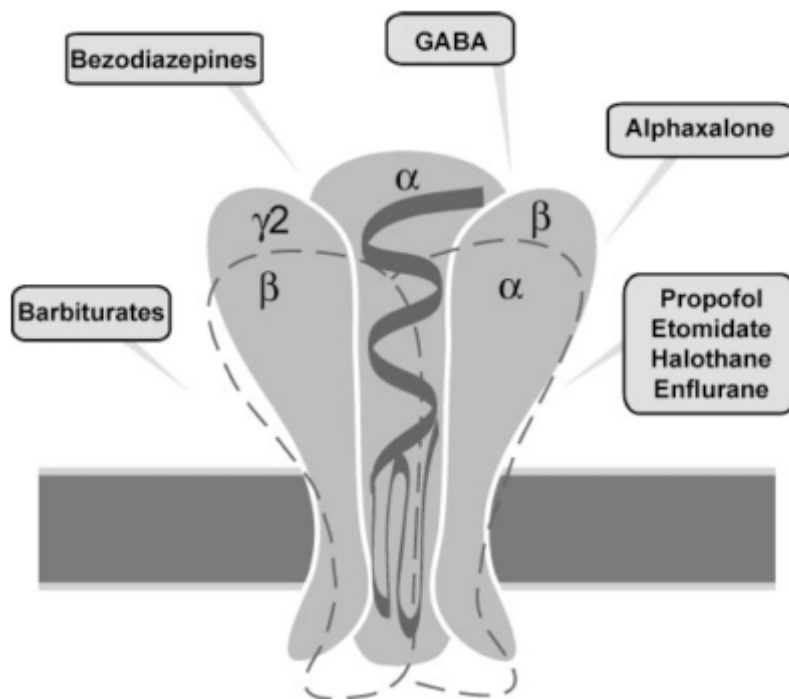


Abbildung 10: Modell des GABA_A-Rezeptors und Beispiele für Modulatoren des Rezeptors

(Rudolph und Möhler, 2004)

1.3.4.1 Wirkung der Benzodiazepine

BZs sind schon seit Jahrzehnten in klinischer Verwendung und sie zählen immer noch zu den am häufigsten eingesetzten Medikamenten in der Therapie von Schlaf- und Angststörungen (Rudolph und Knoflach, 2011).

Als sedierend-hypnotisch wirkende Substanzen ersetzten die BZ fast vollständig die seit dem frühen 20. Jahrhundert gebräuchlichen Barbiturate (López-Muñoz et al., 2011), die eine geringe therapeutische Breite, zahlreichen Nebenwirkungen und ein hohes Abhängigkeitspotential aufweisen. Heute kommen Barbiturate nur mehr in der Allgemeinanästhesie und in der Therapie von Epilepsie zur Anwendung (Nemeroff, 2003; Lopez-Munoz et al., 2011; Tan et al., 2011).

Das erste Benzodiazepin, Chlordiazepoxid, wurde von Leo Sternbach durch *Serendipity* entdeckt und 1960 erstmals unter dem Handelsnamen Librium® auf den Markt gebracht. Diazepam (Valium®) folgte im Jahr 1963 (López-Muñoz et al., 2011). Zahlreiche andere

BZ (z.B. Lorazepam, Clonazepam, Alprazolam) wurden seither entwickelt, die nach ihren pharmakokinetischen Eigenschaften in kurzwirksame, mittellang wirksame und langwirksame BZ eingeteilt werden.

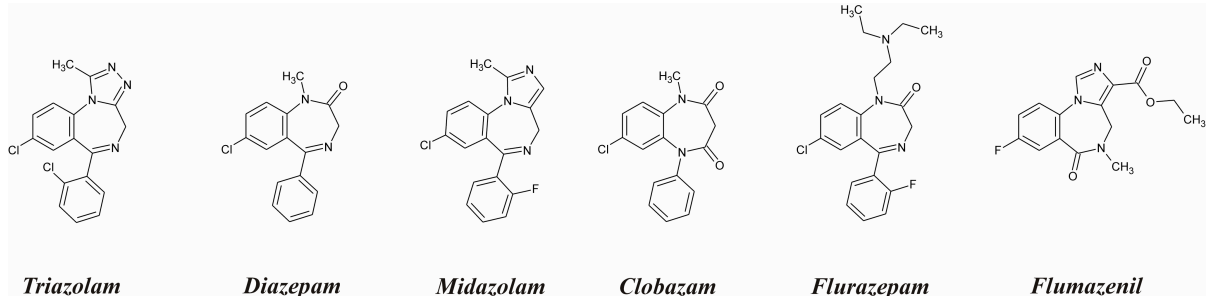


Abbildung 11: Strukturen ausgewählter BZ und des BZ-Antagonisten Flumazenil

BZ besitzen verschiedene therapeutisch nützliche Effekte. Sie wirken:

- anxiolytisch
- sedierend/hypnotisch
- muskelrelaxierend
- antikonvulsiv

Außerdem können BZ anterograde Amnesie induzieren. Aus diesem Wirkprofil ergeben sich verschiedene therapeutische Einsatzbereiche der BZ. Wie schon erwähnt, werden sie bei Schlafstörungen und Angstzuständen eingesetzt, sie finden aber auch Verwendung in der Behandlung von Muskelspasmen, Unruhezuständen, Epilepsie und als Co-Medikation in der Anästhesie, zum Beispiel zur Reduktion von psychologischen Traumata bei chirurgischen Eingriffen (Tan et al., 2011).

1.3.4.2 Wirkungsmechanismus der BZ

Therapeutisch eingesetzte BZ sind allosterische Modulatoren des GABA_A-Rezeptors. Sie verstärken die hemmende Wirkung von GABA, indem sie die GABA induzierte Öffnungsfrequenz der Chloridkanäle steigern. Somit führen sie zu einer Erhöhung der apparenten Affinität des GABA_A-Rezeptors für GABA (D'Hulst et al., 2009).

Im Gegensatz zu den Barbituraten können BZ in Abwesenheit von GABA keine Öffnung des Chloridkanals hervorrufen. Außerdem kann die Leitfähigkeit des Kanals, die durch

positive Modulation der BZ-Bindungsstelle erreicht wird, nie jene Leitfähigkeit des Kanals überschreiten, die durch hohe Konzentrationen an GABA alleine erreicht wird (Rudolph und Knoflach, 2011).

Ein Antagonist am BZ-Rezeptor ist Flumazenil (Rudolph et al., 1999).

Die Vorteile der BZ sind ihre Effektivität und Sicherheit (Wafford, 2005), der rasche Wirkungseintritt, die variablen, vorhersagbaren Halbwertszeiten und die gute Verträglichkeit (Licata und Rowlett, 2008).

1.3.4.3 Unerwünschte Wirkungen der BZ

Trotz des großen Nutzens der BZ in der Therapie verschiedener Erkrankungen, bringen sie auch einige Probleme mit sich. Aufgrund ihrer vielfältigen Wirkungen gibt es zwar ein großes Anwendungsgebiet für BZ, in den meisten Fällen sind aber nicht alle dieser Wirkungen erwünscht. Diese werden dann als Nebenwirkungen angesehen (Licata und Rowlett, 2008). Bei kurzfristigem Gebrauch stellt vor allem die psychomotorische Beeinträchtigung ein Problem dar. Zu Beginn der Behandlung, bei Dosissteigerung und bei älteren Patienten ist unter anderem mit Ataxie, Benommenheit, Konzentrationsschwierigkeiten, Muskelschwäche und Schwindel zu rechnen (Longo und Johnson, 2000). Vor allem, wenn die Betroffenen Tätigkeiten nachgehen, die besondere Aufmerksamkeit erfordern, wie das Fahren eines Autos, kann dies schwerwiegende Folgen haben (Wafford, 2005). Bei älteren Patienten ist die Einnahme von BZ mit einem erhöhten Sturzrisiko und damit mit vermehrtem Auftreten von Hüft- und Oberschenkelhalsfrakturen verbunden (Longo und Johnson, 2000). Langzeitmedikation mit BZ kann zu physischer und psychischer Abhängigkeit, sowie zu einer Toleranzentwicklung führen. Physische Abhängigkeit, die sich in einigen Wochen entwickeln kann, manifestiert sich in Entzugsserscheinungen nach Absetzen des BZ-Präparates, wie beispielsweise in Angstzuständen, Unruhe, Anspannung und Schlafstörungen. Abhängigkeit begünstigt außerdem den Missbrauch von BZ. Eine Rolle der $\alpha 1$ UE bei der BZ-Abhängigkeit wird diskutiert (Wafford, 2005).

Die missbräuchliche Anwendung von BZ ist in den meisten Fällen mit dem Missbrauch anderer Substanzen, wie z. B. Alkohol oder Opiaten, verbunden (Nemeroff, 2003; Wafford, 2005; Licata und Rowlett, 2008).

Schnelle Toleranzentwicklung ist in Bezug auf die sedierende Wirkung und den antikonvulsiven Effekt beobachtbar. Bei der anxiolytischen Wirkung kann die Toleranzentwicklung jedoch auch nach langfristiger Anwendung ausbleiben (Bateson, 2004).

Des Weiteren existieren Wechselwirkungen mit anderen Arzneistoffen, vor allem mit Inhibitoren des Cytochrom P 450 Systems, welche die Plasmakonzentration der BZ erhöhen können (Nemeroff, 2003).

1.3.5 Pharmakologische Profile unterschiedlicher GABA_A-Rezeptor Subtypen

- Die sedierende Wirkung der BZ kommt durch Interaktion mit dem am weitesten verbreiteten, $\alpha 1$ -hältigen Rezeptor Subtyp zu Stande. Substanzen wie Zaleplon oder Zolpidem, die bevorzugt mit GABA_A-Rezeptoren mit einer $\alpha 1$ UE interagieren, können daher als Sedativa eingesetzt werden (Möhler, 2007). In Studien zeigte sich, dass die durch Diazepam hervorgerufenen Veränderungen der Schlafarchitektur (Unterdrückung des *REM*-Schlafes) und der EEG-Frequenzmuster (Reduktion des *Slow-Wave-Sleep* und Erhöhung schneller β -Frequenzen) hingegen durch Wechselwirkung mit $\alpha 2$ -hältigen Rezeptoren zu Stande kommen (Tobler et al., 2001).
- Rezeptoren mit einer $\alpha 1$ UE vermitteln außerdem die durch Diazepam induzierte anterograde Amnesie und zum Teil auch die antikonvulsive Wirkung (Möhler et al., 2001; Olsen und Sieghart, 2008). Die anxiolytische Wirkung von Diazepam kommt durch Steigerung der GABAergen Neurotransmission in jenen Neuronenpopulationen zu Stande, die GABA_A-Rezeptoren mit einer $\alpha 2$ UE exprimieren. Diese Rezeptoren machen nur rund 15% der Diazepam sensitiven Rezeptoren aus (Möhler et al., 2001). Sie sind vorwiegend im cerebralen Cortex und im Hippocampus lokalisiert und kommen auch im CeA vor, einer Hirnregion in der hingegen keine $\alpha 1$ -hältigen Rezeptoren zu finden sind (Marowsky et al., 2004). Man kann daher darauf schließen, dass durch Einsatz von Anxiolytika mit einer Spezifität für die $\alpha 2$ UE, zumindest einige der Nebenwirkungen klassischer BZ, wie deren sedierende Effekte, ausbleiben (Möhler et al., 2001). Bei hoher Rezeptorbesetzung scheint auch die $\alpha 3$ UE für die anxiolytische Wirkung eine

Rolle zu spielen (Olsen und Sieghart, 2008). Die vorwiegend im Hippocampus vorkommenden $\alpha 5$ -GABA_A-Rezeptoren sind wesentlich für die Regulation von Erwerb und Expression des assoziativen Gedächtnisses (Möhler, 2006). Inverse Agonisten mit selektiver Wirkung an Rezeptoren mit einer $\alpha 5$ UE führen zu verbesserter Gedächtnisleistung (Rudolph und Möhler, 2006).

- Durch $\alpha 3$ -GABA_A-Rezeptoren unterliegt das dopaminerge System einer GABAergen inhibitorischen Regulation. Überaktivität des dopaminergen Systems wird mit der Symptomatik von Schizophrenie in Zusammenhang gebracht. Es gibt eindeutige Hinweise, dass selektive Agonisten an $\alpha 3$ -haltigen Rezeptoren geeignet sind, um die sensomotorische Verarbeitung bei Schizophrenie sowie auch bei anderen psychiatrischen Erkrankungen zu verbessern (Uwe Rudolph und Hanns Möhler, Hanns Möhler, 2007).
- Über $\beta 3$ -haltige Rezeptoren wird die immobilisierende Wirkung von Etomidat und Propofol vermittelt und jene von Enfluran, Isofluran und Halothan zumindest teilweise. Die hypnotische Wirkung von Etomidat entsteht durch Interaktion mit GABA_A-Rezeptoren die eine $\beta 2$ UE besitzen. $\beta 3$ -haltige Rezeptoren tragen ebenso zur hypnotischen Wirkung von Etomidat und auch von Propofol bei. In Studien zeigte sich, dass eine durch Etomidat und Propofol hervorgerufene Atemdepression ebenfalls durch Rezeptoren mit der $\beta 3$ Untereinheit vermittelt wird (Möhler, 2007).

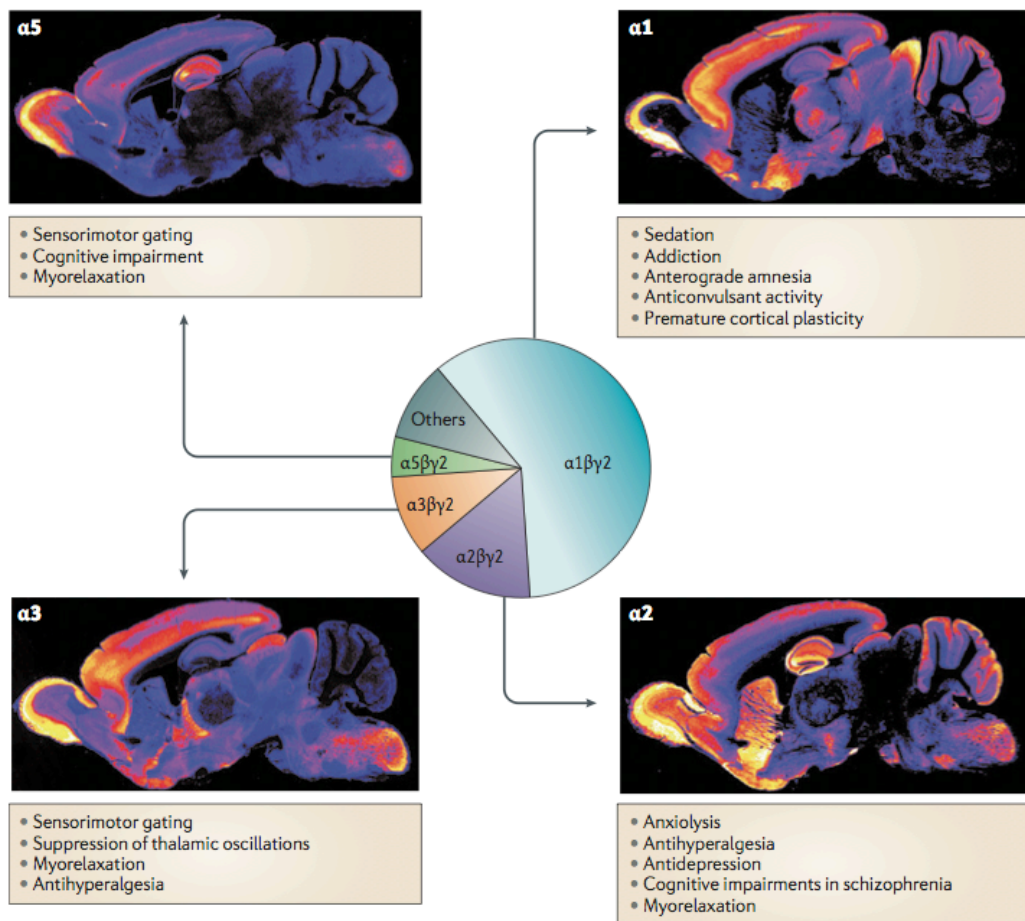


Abbildung 12: Pharmakologische Effekte und Verteilung von GABA_A-Rezeptor UE im Gehirn der Maus. Diese Abbildung zeigt die ungefähre Häufigkeit unterschiedlicher GABA_A-Rezeptor Subtypen. Die α1-UE wird im Cortex, im Thalamus, im Pallidum und im Hippocampus exprimiert. Die α2-UE kommt im Hippocampus, im Cortex, im Striatum und im Nucleus accumbens vor (nicht gezeigt). Die α3-UE ist im Cortex und im Nucleus reticularis des Thalamus exprimiert, die α5-UE im Hippocampus und tiefen Schichten des Cortex.

(Rudolph und Knoflach, 2011)

2 METHODEN¹

2.1 Tiere

Es wurden die *in vivo* Untersuchungen ausschließlich mit männlichen c57BL6/N Mäusen im Alter von 3 bis 8 Monaten durchgeführt (Charles River Laboratories, Sulzfeld, Deutschland). Die Mäuse wurden in Gruppen zu je 5 Tieren gehalten. Sie hatten freien Zugang zu Futter und Wasser. Die Haltungsbedingungen waren:

- Raumtemperatur bei $23 \pm 1^\circ \text{C}$
- Luftfeuchtigkeit $40 \pm 20 \%$
- 12-stündiger Tag/Nacht-Rhythmus (07.00 bis 19.00 Uhr).

Das Bundesministerium für Wissenschaft und Forschung genehmigte die Durchführung der Versuche unter Befolgung der europäischen Konvention zum Schutz der für experimentelle oder für andere wissenschaftliche Zwecke verwendeten Wirbeltiere ETS no.: 123 (Khom et al., 2010). Am Vortag der Versuchen wurden die Tiere abgewogen und markiert. Dann wurden sie in den Versuchsraum gebracht. Am Tag der Versuchsdurchführung wurden jeweils 30 min vor dem Test die Substanz- bzw. Kontrolllösungen intraperitoneal (i.p.) injiziert. Um eine Beeinflussung der auszuschließen, erfolgte die Injektion der Testlösungen in einem separaten Raum.

2.2 Injektionslösungen

Die Herstellung der Injektionslösungen erfolgte aus einer Stammlösung mit einer Konzentration von 1 mg/10 µl DMSO. Die Stammlösung wurde mit physiologischer Kochsalzlösung (0.9% NaCl) auf die gewünschten Konzentrationen verdünnt (siehe Abbildungen und Ergebnisteil). Alle Lösungen erhielten einen Zusatz von 3 % Polysorbat 80 um die Löslichkeit zu verbessern. Die Konzentration von DMSO betrug maximal 10%.

¹ Die hier beschriebenen Methoden findet man auch in weiteren Diplomarbeiten, die am Department für Pharmakologie und Toxikologie in der Arbeitsgruppe von Prof. Steffen Hering durchgeführt wurden (siehe z.B. Denise Luger (2012) „Untersuchung verschiedener GABA(A)-Liganden am Tiermodell in Bezug auf Anxiolyse und Sedierung“; Susanne Riedler (2010) „Charakterisierung der *in vivo* Wirkung eines Naturstoffes mithilfe verhaltenspharmakologischer Tests“ oder Daniela Hrabak (2012) „Untersuchung der anxiolytischen und sedierenden Wirkung ausgewählter GABA_A-Modulatoren im Tiermodell“.

2.3 Open-Field-Test

Der *Open-Field-* (OF) Test wurde wie von Crawley (2007) beschrieben durchgeführt. 30 min nach i.p. Injektion wurde über einen Zeitraum von 10 min das Verhalten der Mäuse in einer 50 x 50 cm großen Box getestet, die mit Infrarot-Lichtschraken ausgestattet war. Die Lichtintensität war auf 150 Lux festgelegt. Nach Empfehlung von EMPRESS (*European Mouse Phenotyping Resource of Standardised Screens*; <http://empress.har.mrc.ac.uk>) erfolgte für die Auswertung eine Gliederung der Gesamtfläche in eine Randzone (bis 8 cm von der Wand), ein Zentrum (16 % von der Gesamtfläche) und eine Zwischenzone (=die Fläche zwischen Zentrum und Randzone) (siehe Abbildung 13). Die Aufzeichnung und Auswertung der Versuche erfolgte automatisch mittels ActiMot2 (TSE-Systems, Bad Homburg, Deutschland).

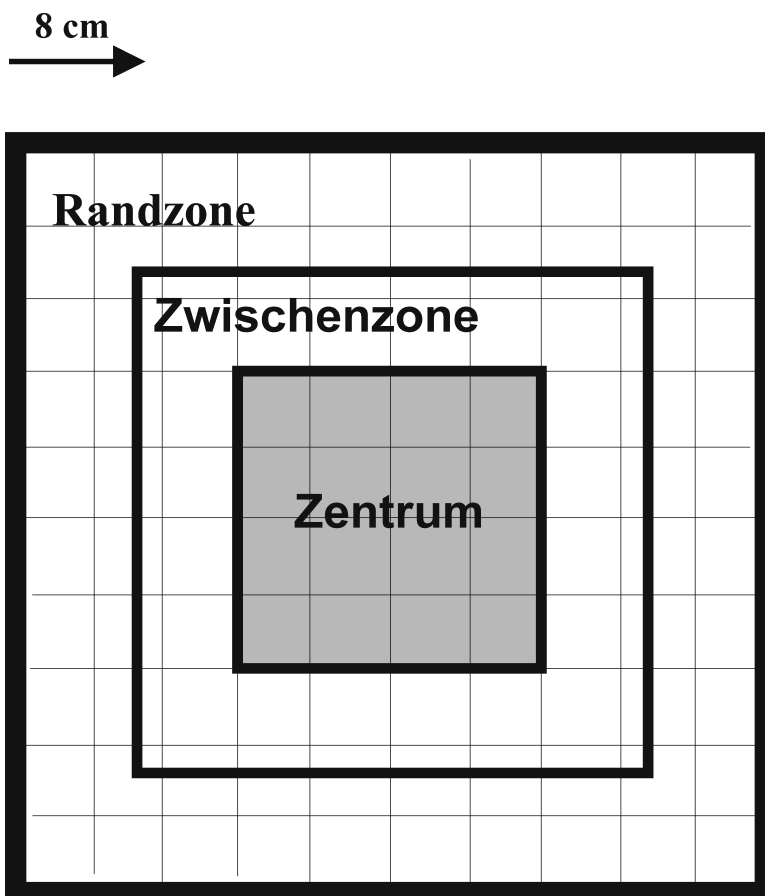


Abbildung 13: Schematische Darstellung des OF, unterteilt in ein Zentrum (16% der Gesamtfläche), eine Zwischenzone und in eine Randzone

2.4 Elevated-Plus-Maze-Test

Der *Elevated-Plus-Maze- (EPM)* Test ist das am häufigsten eingesetzte Tiermodell in der Angstforschung (Hogg, 1996).

Das Verhalten der Mäuse wurde 30 min nach i.p. Injektion über einen Zeitraum von 5 min auf einer plusförmigen Testapparatur in 1 m Höhe beobachtet. Die Testapparatur besteht aus 2 geschlossenen Armen (GA; 5x30 cm; Höhe der geschlossenen Arme 10 cm) und zwei offenen Armen (OA; 5x30 cm), sowie einer dazwischenliegenden neutralen Zone (NA; 5x5 cm; siehe Abbildung 14). Zu Testbeginn wurden die Mäuse mit dem Gesicht in einen OA schauend, in der NA platziert. Die Lichtintensität war dabei auf 180 Lux eingestellt. Die Aufzeichnung und Auswertung der Versuche erfolgte automatisch mittels VideoMot2 (TSE-Systems, Bad Homburg, Deutschland).

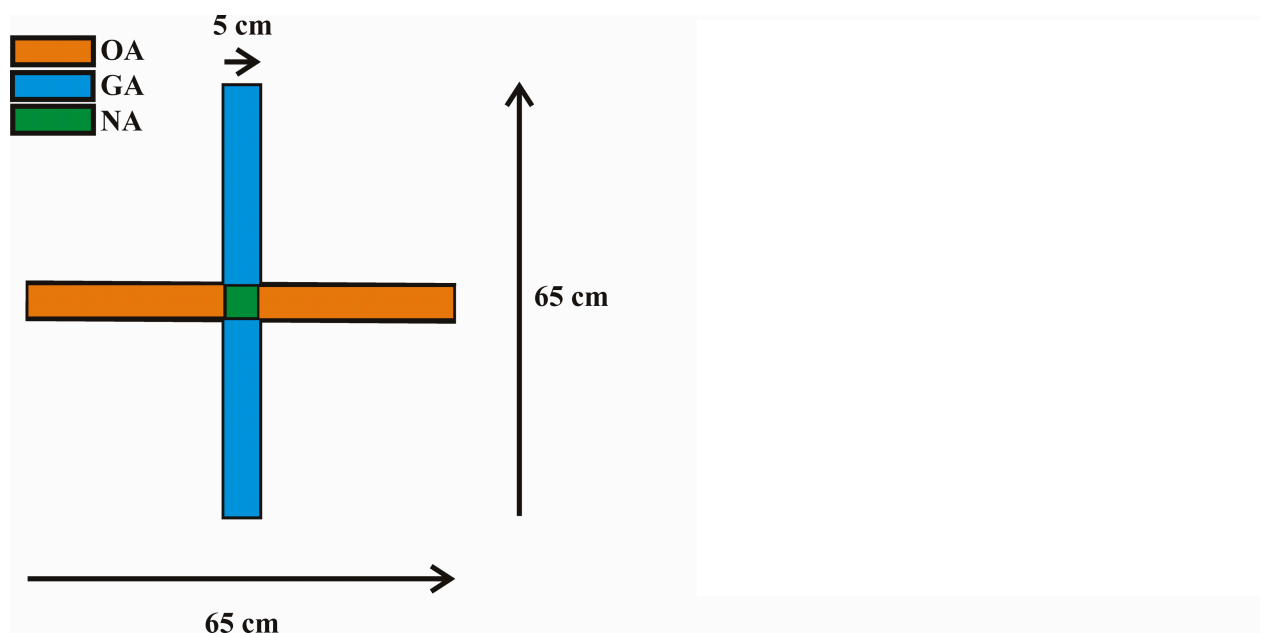


Abbildung 14: Schematische Darstellung des *EPM*

2.5 Statistische Analyse der Daten

Die Feststellung statistischer Unterschiede zwischen Kontrollgruppe und Verumgruppe erfolgte mittels Einweg-ANOVA (Bonferroni-Test; Origin MicroCal). p-Werte $<0,05$ gelten als statistisch signifikant. Alle Werte werden als Mittelwert $\pm SEM$ angegeben.

3 PROBLEMSTELLUNG

Der GABA_A-Kanal ist ein wichtiges Arzneimitteltarget in der Pharmakotherapie von Schlaf- und Angststörungen. In den 1960ern und 1970ern waren die BZ die am häufigsten verschriebenen Arzneimittel. BZ sind jedoch trotz ihrer großen therapeutischen Breite nicht unbedenklich (Wafford, 2005). Bei kurzfristigem Gebrauch stellen vor allem Benommenheit, Konzentrationsschwierigkeiten, Muskelschwäche und Schwindel ein Problem dar (Longo und Johnson, 2000). Die längerfristige Einnahme von BZ kann physische Abhängigkeit und nach abruptem Absetzen Entzugssymptome hervorrufen. Missbräuchliche Anwendung von BZ ist meistens verbunden mit dem Missbrauch anderer Substanzen wie Opioiden und Alkohol, wobei es zu fatalen Überdosierungen kommen kann. Außerdem kommt es zur Toleranzentwicklung gegenüber den Wirkungen der BZ.

Das Bewusstsein über die zahlreichen Nachteile dieser Arzneimittelgruppe, ließ die Zahl der Verschreibungen von BZ zurückgehen. Trotzdem werden sie aus Mangel an besseren Alternativen noch relativ häufig angewendet. Es herrscht Bedarf nach neuen Arzneimitteln, die den BZ überlegen sind, ein günstigeres Nebenwirkungsprofil aufweisen und die nicht mit der Gefahr von Abhängigkeit und Toleranzentwicklung behaftet sind (Wafford, 2005).

Da die verschiedenen Effekte der BZ durch unterschiedliche Subtypen des GABA_A-Rezeptors vermittelt werden, versucht man subtyp-selektive Arzneistoffe zu entwickeln, da man sich von diesen, im Vergleich zu den relativ unspezifisch wirkenden BZ, weitaus weniger Nebenwirkungen erwartet (Rudolph und Knoflach, 2011).

HD-1 und HD-2 konnten als subtyp-selektive GABA_A-Rezeptor Modulatoren identifiziert werden.

HD-1 und das Derivat HD-1A

Im Rahmen meiner Diplomarbeit sollte nun erstmals die Wirkung von HD-1 und des Derivats HD-1A im Tiermodell untersucht werden. Dafür wurde das Verhalten männlicher c57BL6/N Mäuse 30 min nach Applikation von Kontrolllösung (=Saline) bzw. nach Injektion von HD-1 (0.1 mg/kg, 0.3 mg/kg und 1mg/kg Körpergewicht (KGW)) bzw. von HD-1A (0.1 mg/kg, 0.3 mg/kg, 1 mg/kg, 3 mg/kg und 10 mg/kg Körpergewicht (KGW)) für 5 min im *Elevated-Plus-Maze-(EPM)* Test mittels VideoMot2 analysiert. Zur

Feststellung eines möglichen anxiolytischen bzw. sedierenden Effekts wurden die Zeit in den offenen Armen (OA), die Anzahl der Besuche der OA bzw. der geschlossenen Arme (GA) und die zurückgelegte Gesamtstrecke nach Applikation von HD-1 bzw. HD-1A mit der Kontrollgruppe verglichen.

HD-2 und Derivate von HD-2

Die anxiolytische Wirkung von HD-2 konnte bereits in früheren Untersuchungen gezeigt werden. Die Auswirkung verschiedener Strukturmodifikationen der Leitstruktur HD-2 auf die *in vivo* Wirkung sollte im Rahmen meiner Diplomarbeit untersucht werden. Dafür wurde das Verhalten männlicher c57BL6/N Mäuse 30 min nach Applikation von Kontrolllösung (=Saline) bzw. nach Injektion der jeweiligen Substanz (HD-2 bzw. HD-2-Derivate 3 mg/kg, 10 mg/kg oder 30 mg/kg Körpergewicht (KGW) für 10 min im *Open-Field-Test- (OF)* Test mittels ActiMot2 analysiert. Zur Auswertung eines möglichen anxiolytischen bzw. sedierenden Potentials wurden die zurückgelegte Gesamtstrecke, die Anzahl der *Rearings*, die Zeit im Zentrum, die Anzahl der Besuche des Zentrums, die *Rearings* im Zentrum und die Zeit und Strecke in der Randzone (RZ) herangezogen.

4 ERGEBNISSE

Die Ergebnisse der Versuche sind in den Tabellen 2-16 zusammenfassend illustriert.

4.1 Untersuchung der *in vivo* Wirkung HD-1

Wie in Abb. 15 gezeigt, verbrachte die Kontrollgruppe 29.6 ± 2.8 % der Gesamtzeit in den OA des *EPM* (n=38). Ab einer Dosis von 0.3 mg/kg Körpergewicht (KGW)* HD-1 konnte bei der Verumgruppe eine signifikante Zunahme der Zeit in den OA im Vergleich zur Kontrollgruppe beobachtet werden (43.0 ± 4.2 , n=22, $p < 0.01$). Bei einer Dosis von 1 mg/kg HD-1 war der Effekt ebenso signifikant; $p < 0.01$ (siehe Abb. 15).

*Alle in dieser Arbeit angegebenen Dosierungen beziehen sich auf das Gesamtgewicht der Maus.

Die OA des *EPM* wurden von der Salinegruppe 12 ± 1 Mal besucht (n=38). Dieselbe Besuchszahl der OA wurde bei einer Dosis von 0.1 mg/kg HD-1 registriert (n=12). Bei einer Dosis von 0.3 mg/kg HD-1 betrug die Besuchszahl der OA 14 ± 1 (n=22) und bei 1 mg/kg HD-1 13 ± 1 (n=16).

Im Vergleich zur Kontrollgruppe (14 ± 1 ; n=38) wurde bei einer Dosis von 0.3 mg/kg HD-1 ein signifikanter Rückgang der Besuche der GA beobachtet (11 ± 1 , n=22, $p < 0.01$). Bei einer Dosis von 1 mg/kg war die Anzahl der Besuche der GA ebenfalls signifikant niedriger als in der Kontrollgruppe; $p < 0.05$ (siehe Tabelle 2).

Die Kontrollgruppe legte im *EPM* eine Gesamtstrecke von 1304 ± 32 cm zurück (n=38). Ein Rückgang der zurückgelegten Gesamtstrecke war nur bei einer Dosis von 1 mg/kg HD-1 beobachtbar. Sie war mit 1083 ± 60 cm signifikant niedriger als jene der Vergleichsgruppe (n=16, $p < 0.01$).

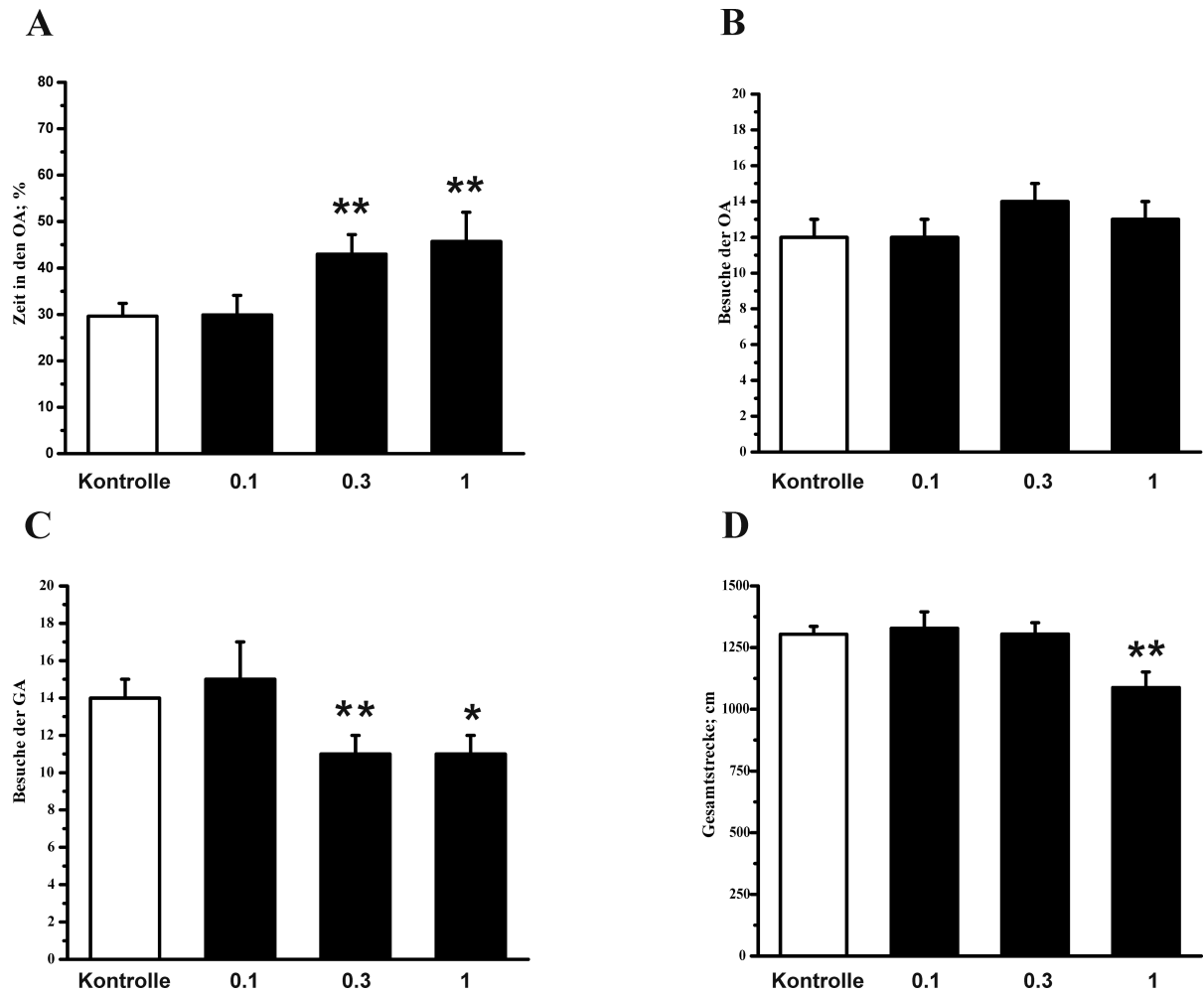


Abbildung 15: Effekt von HD-1 bei den angegebenen Dosen (alle Dosen in mg/kg KGW), 30 min nach i.p. Injektion im EPM auf (A) die Zeit in den OA, (B) die Anzahl der Besuche in den OA, (C) die Anzahl der Besuche in den GA, (D) die Gesamtstrecke; Jeder Balken stellt den Mittelwert und den Standarderror von mind. 8 Tieren dar. (*) bedeutet statistisch signifikant ($p < 0.05$).

	Zeit in den OA	Besuche der OA	Besuche der GA	Gesamtstrecke
Saline n=38	29.6 ± 2.8	12 ± 1	14 ± 1	1304 ± 32
0.1 mg/kg HD-1 n=12	29.9 ± 4.2	12 ± 1	15 ± 2	1328 ± 67
0.3 mg/kg HD-1 n=22	43.0 ± 4.2	14 ± 1	11 ± 1	1305 ± 46
1 mg/kg HD-1 n=16	45.7 ± 6.3	13 ± 1	11 ± 1	1083 ± 60

Tabelle 2: Zusammenfassung des Effekts der angegebenen Dosen HD-1 auf die folgenden Parameter im EPM: Zeit in den OA in %; Besuche der OA; Besuche der GA; Gesamtstrecke in cm; n.....Anzahl der getesteten Tiere

4.2 Untersuchung der *in vivo* Wirkung von HD-1A

Alle Tiere der getesteten Verumgruppen verbrachten mehr Zeit in den OA des *EPM* als die Kontrollgruppe, die sich 29.6 ± 2.8 % der Zeit in den OA aufhielt ($n=38$). Ab einer Dosis von 0.3 mg/kg HD-1A war der Effekt signifikant (42.6 ± 3.5 %, $n=19$, $p<0.01$). Mit der Erhöhung der Dosis stieg die verbrachte Zeit in den OA weiter an bis zu einem maximalen Wert von 63.0 ± 6.9 % bei einer Dosis von 3 mg/kg HD-1A ($n=13$, $p<0.01$). Abermalige Dosiserhöhung auf 10 mg/kg HD-1A führte zu keiner weiteren Steigerung des Effekts (siehe Abb. 16).

Die Kontrollgruppe besuchte 12 ± 1 Mal die OA des *EPM* ($n=38$). Die Anzahl der Besuche war bei einer Dosierung von 0.1 mg/kg HD-1A signifikant höher, verglichen mit der Kontrollgruppe (17 ± 2 , $n=10$, $p<0.01$). Ebenfalls signifikant erhöht im Vergleich zur Salinegruppe war die Besuchszahl der OA nach Applikation von 0.3 mg/kg HD-1A ($n=19$, $p<0.01$) und nach Gabe von 1 mg/kg HD-1A ($n=11$, $p<0.05$). In diesen beiden Gruppen wurden jeweils 16 ± 1 Besuche beobachtet. Bei einer Dosis von 3 mg/kg HD-1A ging die Anzahl der Besuche der OA wieder zurück und betrug 12 ± 2 ($n=13$). Nach Gabe von 10 mg/kg HD-1A wurden 15 ± 2 Besuche der OA beobachtet ($n=14$).

Bezüglich der Besuchszahl der GA konnte verglichen mit der Kontrollgruppe (14 ± 1 , $n=38$) ab einer Dosis von 0.3 mg/kg HD-1A eine Erniedrigung festgestellt werden. Diese Erniedrigung der Besuchszahl der GA war nach Gabe von 0.3 mg/kg HD-1A ($n=19$, $p<0.05$) sowie nach Gabe von 3 mg/kg HD-1A ($n=13$, $p<0.01$) und 10 mg/kg HD-1A ($n=14$, $p<0.01$) signifikant (siehe Tab. 3).

Die zurückgelegte Gesamtstrecke betrug in der Kontrollgruppe 1304 ± 32 cm ($n=38$). Nach Applikation von 0.1 mg/kg HD-1A legten die Mäuse eine Strecke von 1312 ± 50 cm im *EPM* zurück ($n=10$). Nach Gabe von 0.3 mg/kg HD-1A betrug die Gesamtstrecke 1285 ± 58 cm ($n=19$). Applikation von 1 mg/kg HD-1A führte zu einer signifikanten Reduktion der Gesamtstrecke (1119 ± 67 , $n=11$, $p<0.01$). Ebenfalls signifikant geringer war die gemessene Laufstrecke (1050 ± 82 cm, $n=13$) auch bei einer Dosis von 3 mg/kg HD-1A ($p<0.01$). Bei einer Dosis von 10 mg/kg HD-1A konnte hingegen kein signifikanter Effekt im Vergleich zur Salinegruppe festgestellt werden (siehe Abb. 16).

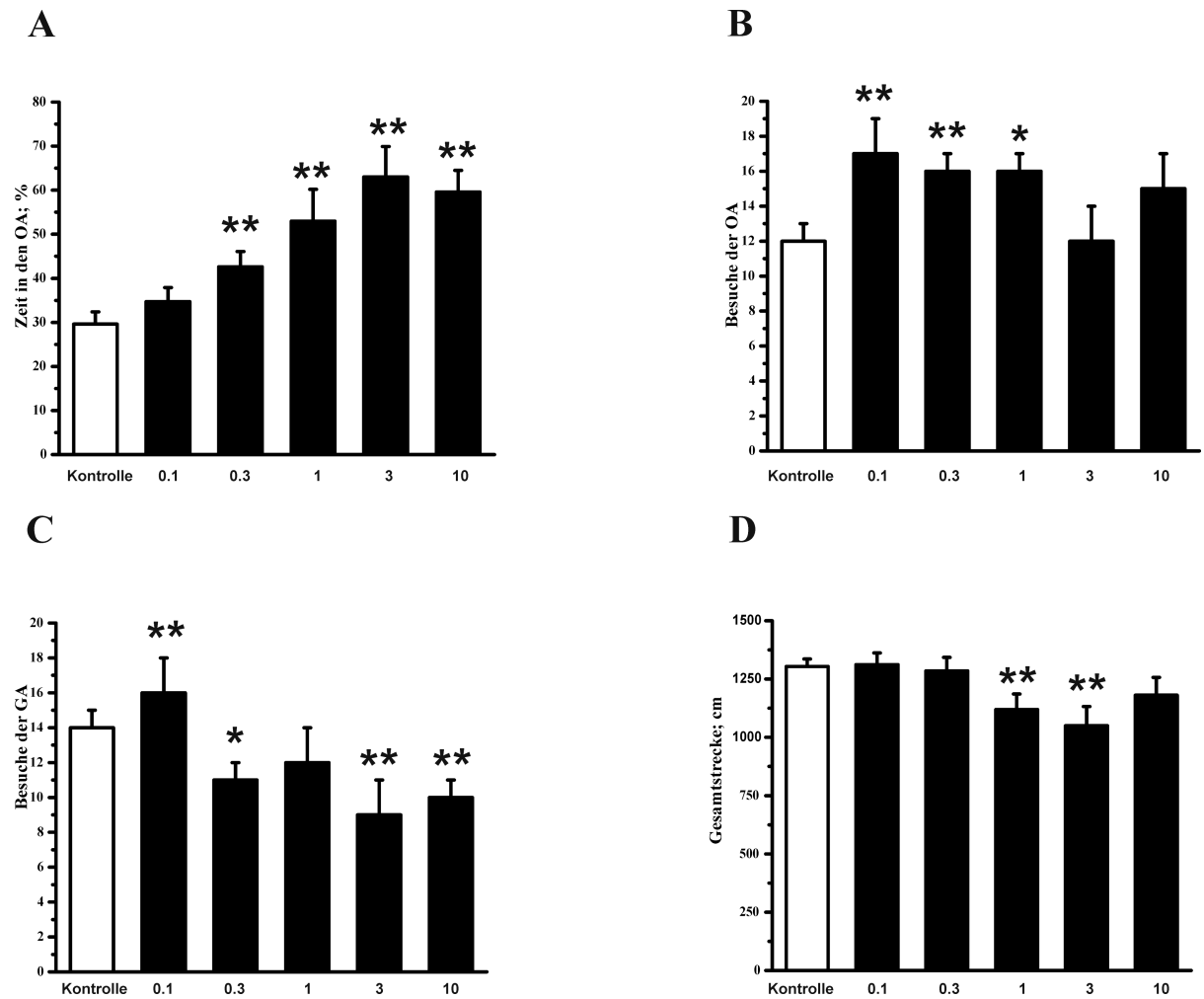


Abbildung 16: Effekt von HD-1A bei den angegebenen Dosen (alle Dosen in mg/kg KGW), 30 min nach i.p Injektion im *EPM* auf **(A)** die Zeit in den OA, **(B)** die Anzahl der Besuche in den OA, **(C)** die Anzahl der Besuche in den GA, **(D)** die Gesamtstrecke; Jeder Balken stellt den Mittelwert und den Standarderror von mind. 8 Tieren dar. (*) bedeutet statistisch signifikant ($p < 0.05$).

	Zeit in den OA	Besuche der OA	Besuche der GA	Gesamtstrecke
Saline n=38	29.6 ± 2.8	12 ± 1	14 ± 1	1304 ± 32
0.1 mg/kg HD-1A n=10	34.7 ± 3.2	17 ± 2	16 ± 2	1312 ± 50
0.3 mg/kg HD-1A n=19	42.6 ± 3.5	16 ± 1	11 ± 1	1285 ± 58
1 mg/kg HD-1A n=11	53.0 ± 7.2	16 ± 1	12 ± 2	1119 ± 67
3 mg/kg HD-1A n=13	63.0 ± 6.9	12 ± 2	9 ± 2	1050 ± 82
10 mg/kg HD-1A n=14	59.6 ± 4.9	15 ± 2	10 ± 1	1181 ± 76

Tabelle 3: Zusammenfassung des Effekts der angegebenen Dosen HD-1A auf die folgenden Parameter im EPM: Zeit in den OA in %; Besuche der OA; Besuche der GA; Gesamtstrecke in cm; n.....Anzahl der getesteten Tiere

4.3 Untersuchung der *in vivo* Wirkung von HD-2

Wie in Abb.17 gezeigt, betrug die zurückgelegte Gesamtstrecke der Kontrollgruppe im OF 39.0 ± 1.7 m (n=16). Applikation der unterschiedlichen Dosen HD-2 (3 mg/kg, 10 mg/kg und 30 mg/kg) zeigte keinen signifikanten Effekt auf die Gesamtstrecke ($p > 0.05$).

Im Vergleich zur Kontrollgruppe (Anzahl der *Rearings*: 175 ± 15, n=16) kam es bei Gabe von 3 mg/kg HD-2 zu einer Zunahme der *Rearings* (202 ± 28, n=13). Bei den Dosen 10 mg/kg HD-2 und 30 mg/kg HD-2 war die Anzahl der *Rearings* im Vergleich zur Kontrollgruppe geringer (siehe Tab. 4). Ein signifikanter Effekt im Vergleich zur Kontrollgruppe war bei keiner der getesteten Dosen zu beobachten.

Die Kontrollgruppe verbrachte 47.9 ± 5.3 s im Zentrum des OF (n=16). Im Vergleich dazu betrug die Zeit im Zentrum bei einer Dosis von 3 mg/kg HD-2 58.5 ± 12.1 s (n=13). Bei einer Dosiserhöhung auf 10 mg/kg HD-2 hielten sich die Mäuse 45.9 ± 6.2 s im Zentrum des OF auf (n=12), bei 30 mg/kg waren es 45.0 ± 8.2 s (n=12).

Bezüglich der Besuchszahl im Zentrum kam es nach Gabe von 3 mg/kg HD-2 (32 ± 3 , $n=13$), zu einem Anstieg verglichen mit der Kontrollgruppe (27 ± 2 , $n=16$). Dieser Anstieg war nicht signifikant. Die Gabe von 10 mg/kg bzw. von 30 mg/kg brachte gegenüber der Vergleichsgruppe keine Veränderung (siehe Tab. 4).

In der Kontrollgruppe kam es zu 16 ± 3 *Rearings* im Zentrum des *OF* ($n=16$). Nach Gabe von 3 mg/kg HD-2 wurden 23 ± 10 *Rearings* im Zentrum verzeichnet ($n=13$). Verglichen mit der Kontrollgruppe sank nach Applikation von 10 mg/kg HD-2 die Zahl der *Rearings* auf 8 ± 2 ($n=12$) und nach Gabe von 30 mg/kg HD-2 auf 9 ± 3 *Rearings* im Zentrum ($n=12$).

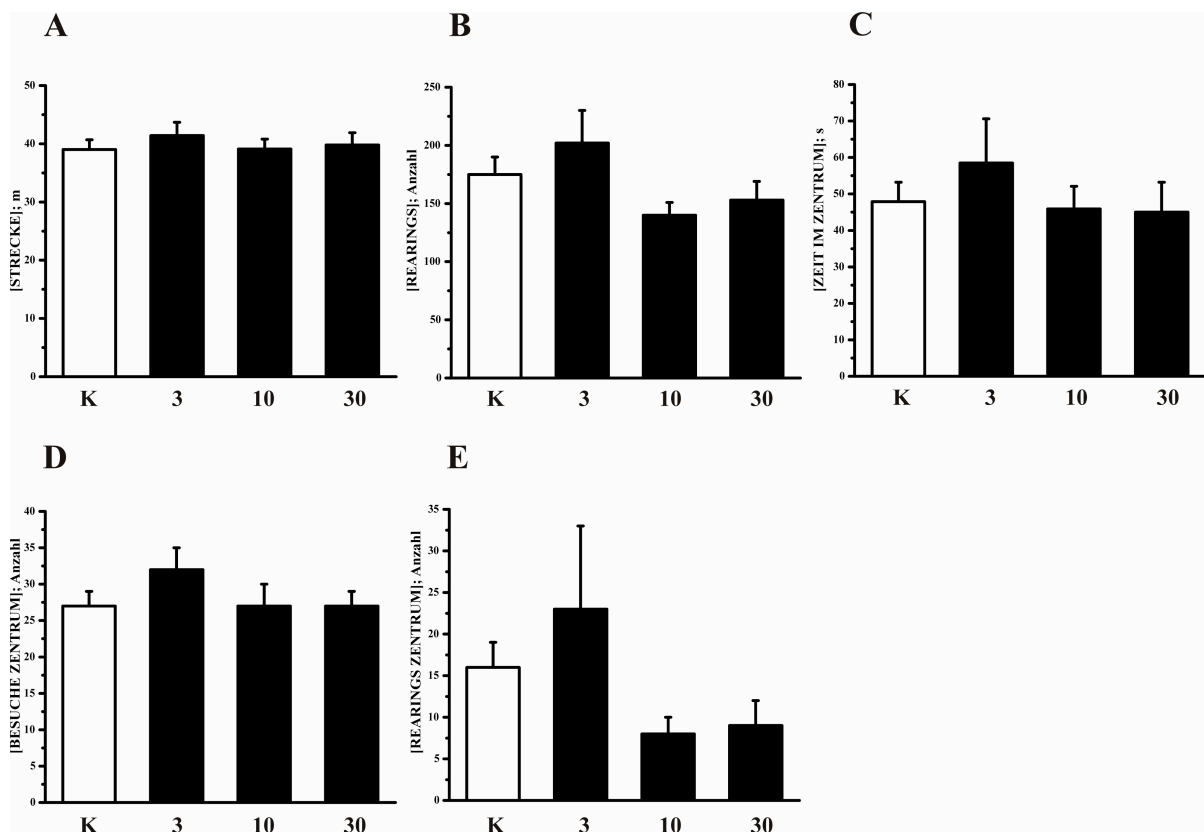


Abbildung 17: Effekt von HD-2 bei den angegebenen Dosen (alle Dosen in mg/kg KGW) 30 min nach i.p. Injektion im *OF* auf (A) die Gesamtstrecke, (B) Anzahl der *Rearings*, (C) die Zeit in Zentrum, (D) die Besuche im Zentrum und (E) die Anzahl der *Rearings* im Zentrum. Jeder Balken stellt den Mittelwert und den Standarderror von mind. 8 Tieren dar. (*) bedeutet statistisch signifikant ($p < 0.05$).

	Saline n=16	3 mg/kg HD-2 n=13	10 mg/kg HD-2 n=12	30 mg/kg HD-2 n=12
Gesamtstrecke	39.0 ± 1.7	41.4 ± 2.3	39.1 ± 1.7	39.8 ± 2.1
Anz. der <i>Rearings</i>	175 ± 15	202 ± 28	140 ± 11	153 ± 16
Zeit (Zentrum)	47.9 ± 5.3	58.5 ± 12.1	45.9 ± 6.2	45.0 ± 8.2
Besuche (Zentrum)	27 ± 2	32 ± 3	27 ± 3	27 ± 2
<i>Rearings</i> (Zentrum)	16 ± 3	23 ± 10	8 ± 2	9 ± 3

Tabelle 4: Zusammenfassung des Effekts der angegebenen Dosen HD-2 auf die folgenden Parameter im *OF*: Gesamtstrecke in m; Anzahl der *Rearings*; Zeit im Zentrum in s; Besuche im Zentrum; Anzahl der *Rearings* im Zentrum; n.....Anzahl der getesteten Tiere

4.4 Untersuchung der *in vivo* Wirkung von HD-2A

In der Kontrollgruppe betrug die zurückgelegte Gesamtstrecke 39.0 ± 1.7 m (n=16). Gabe von 3 mg/kg bzw. von 10 mg/kg HD-2A hatten keinen Effekt auf die Gesamtstrecke (siehe Abb. 18). Bei einer Dosis von 30 mg/kg HD-2A kam es jedoch zu einem signifikanten Rückgang der Gesamtstrecke (19.2 ± 2.1 m, n=13, $p < 0.01$).

Verglichen mit der Kontrollgruppe (175 ± 15 , n=16) sank nach Verabreichung von 3 mg/kg HD-2A die Anzahl der *Rearings* auf 114 ± 10 (n=11). Dieser Effekt war signifikant ($p < 0.01$). Bei einer Dosis von 10 mg/kg HD-2A betrug die Anzahl der *Rearings* 170 ± 27 (n=13). Die Applikation von 30 mg/kg HD-2A führte wiederum zu einer signifikanten Reduktion der Anzahl der *Rearings* (51 ± 15 , n=13, $p < 0.01$).

Die Kontrollgruppe verbrachte 47.9 ± 5.3 s im Zentrum des *OF* (n=16). Bei einer Dosis von 3 mg/kg HD-2A betrug die Zeit im Zentrum 54.3 ± 8.9 s (n=11) und bei einer Dosis von 10 mg/kg HD-1A verbrachten die Mäuse 55.4 ± 6.4 s (n=13) im Zentrum des *OF*. Nach Gabe von 30 mg/kg HD-2A kam es zu einer signifikanten Reduktion der Zeit im Zentrum; $p < 0.05$ (siehe Abb. 18).

In der Kontrollgruppe wurden 27 ± 2 Besuche im Zentrum verzeichnet (n=16). Wie aus Abb. 18 ersichtlich, kam es wiederum bei der höchsten getesteten Dosis zu einem

signifikanten Effekt; $p < 0.01$. Es wurden nach Gabe von 30 mg/kg HD-2A 13 ± 2 Besuche im Zentrum beobachtet ($n=13$).

In der Vergleichsgruppe kam es zu 16 ± 3 *Rearings* im Zentrum ($n=16$). Sowohl nach Gabe von 3 mg/kg HD-2A als auch nach 10 mg/kg HD-2A konnten im Vergleich zur Kontrollgruppe keine signifikanten Unterschiede bezüglich der Anzahl der *Rearings* im Zentrum festgestellt werden (siehe Abb. 18). Applikation von 30 mg/kg HD-2A führte hingegen zu einer signifikanten Abnahme der Anzahl der *Rearings* (6 ± 2 , $n=13$, $p < 0.05$).

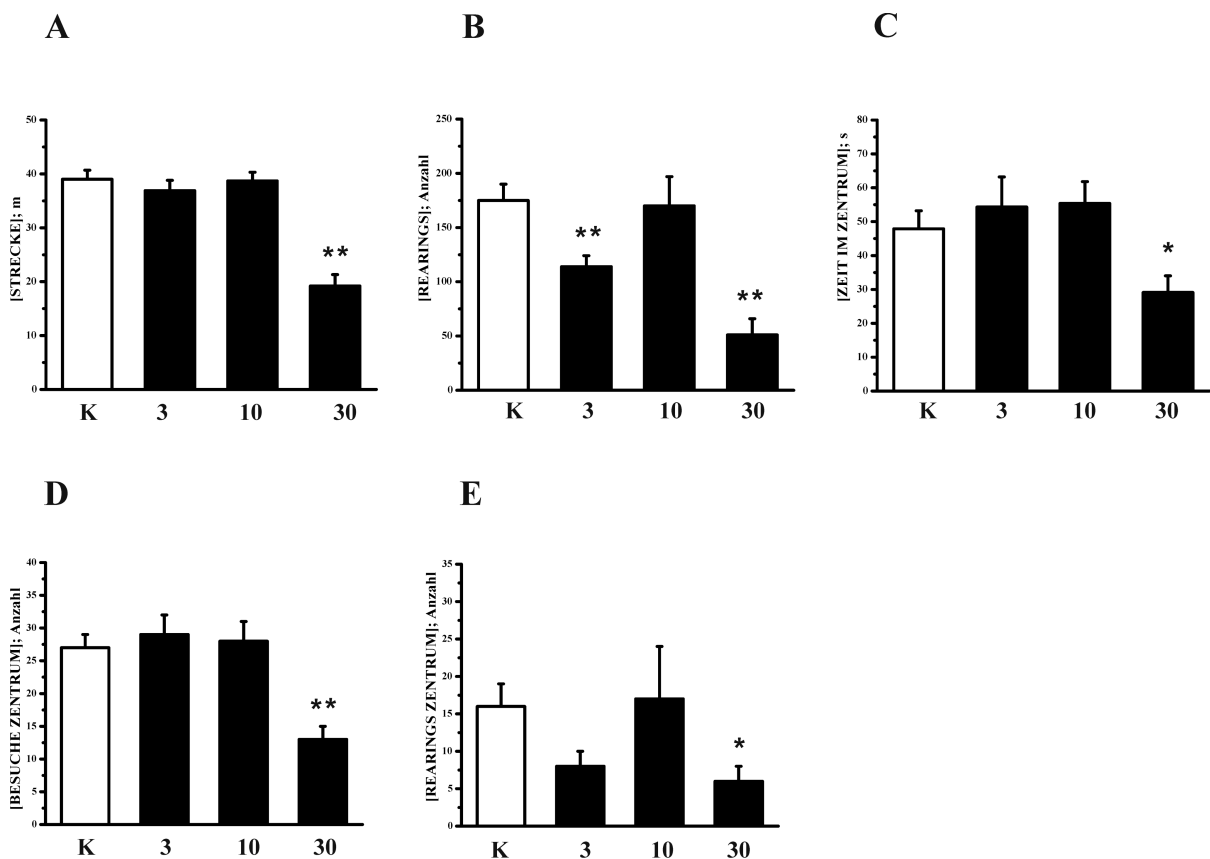


Abbildung 18: Effekt von HD-2A bei den angegebenen Dosen (alle Dosen in mg/kg KGW) 30 min nach i.p. Injektion im OF auf (A) die Gesamtstrecke, (B) Anzahl der *Rearings*, (C) die Zeit in Zentrum, (D) die Besuche im Zentrum und (E) die Anzahl der *Rearings* im Zentrum. Jeder Balken stellt den Mittelwert und den Standarderror von mind. 8 Tieren dar. (*) bedeutet statistisch signifikant ($p < 0.05$).

	Saline n=16	3 mg/kg HD-2A n=11	10 mg/kg HD-2A n=13	30 mg/kg HD-2A n=13
Gesamtstrecke	39.0 ± 1.7	36.9 ± 1.9	38.7 ± 1.6	19.2 ± 2.1
Anz. der <i>Rearings</i>	175 ± 15	114 ± 10	170 ± 27	51 ± 15
Zeit (Zentrum)	47.9 ± 5.3	54.3 ± 8.9	55.4 ± 6.4	29.1 ± 4.9
Besuche (Zentrum)	27 ± 2	29 ± 3	28 ± 3	13 ± 2
<i>Rearings</i> (Zentrum)	16 ± 3	8 ± 2	17 ± 7	6 ± 2

Tabelle 5: Zusammenfassung des Effekts der angegebenen Dosen HD-2A auf die folgenden Parameter im OF: Gesamtstrecke in m; Anzahl der *Rearings*, Zeit im Zentrum in s; Besuche im Zentrum; Anzahl der *Rearings* im Zentrum; n.....Anzahl der getesteten Tiere

4.5 Untersuchung der *in vivo* Wirkung von HD-2B

Die Salinegruppe legte im OF eine Gesamtstrecke von 39.0 m ± 1.7 m zurück (n=16). Bei einer Dosis von 3 mg/kg HD-2B waren es 36.8 ± 2.9 m (n=13). Gabe von 10 mg/kg HD-2B führte zu einem signifikanten Rückgang der Gesamtstrecke. Sie betrug 32.9 ± 1.8 m (n=11, p<0.05). Eine signifikante Abnahme wurde nach Gabe von 30 mg/kg HD-2B jedoch nicht festgestellt (siehe Abb.19).

Bezüglich der Anzahl der *Rearings* im OF kam es, verglichen mit den Kontrollmäusen (175 ± 15, n=16), zu einem Rückgang der Anzahl der *Rearings* nach Applikation der verschiedenen Dosen HD-2B. Ein signifikanter Effekt konnte jedoch bei keiner der getesteten Dosen (3 mg/kg, 10 mg/kg, 30 mg/kg) festgestellt werden (siehe Abb. 19).

Die Vergleichsgruppe verbrachte 47.9 s ± 5.3 s im Zentrum des OF (n=16). Demgegenüber verbrachten Mäuse mit einer injizierten Dosis von 3 mg/kg HD-2B 47.0 ± 11.3 s im Zentrum des OF (n=13). Verabreichung von 10 mg/kg führte zu einer Abnahme der Zeit im Zentrum auf 38.9 ± 5.3 (n=11). Nach Gabe von 30 mg/kg HD-2B betrug die Zeit im Zentrum 40.3 ± 7.6 s (n=11).

Wie in Abb. 19 dargestellt konnte bezüglich der Besuche im Zentrum kein signifikanter Unterschied im Vergleich zur Kontrollgruppe (27 ± 2 , $n=16$) festgestellt werden. Es zeigt sich jedoch ein Trend in Richtung einer Abnahme der Besuchszahl im Zentrum mit steigender Dosis (siehe Tab. 6).

In der Salinegruppe kam es zu 16 ± 3 *Rearings* im Zentrum des *OF* ($n=16$). Im Vergleich dazu kam es bei allen getesteten Dosen von HD-2B zu einer Verringerung der Anzahl der *Rearings* im Zentrum. Der Effekt war jedoch nur bei einer Dosis von 30 mg/kg HD-2B signifikant; $p<0.05$ (siehe Tab. 6).

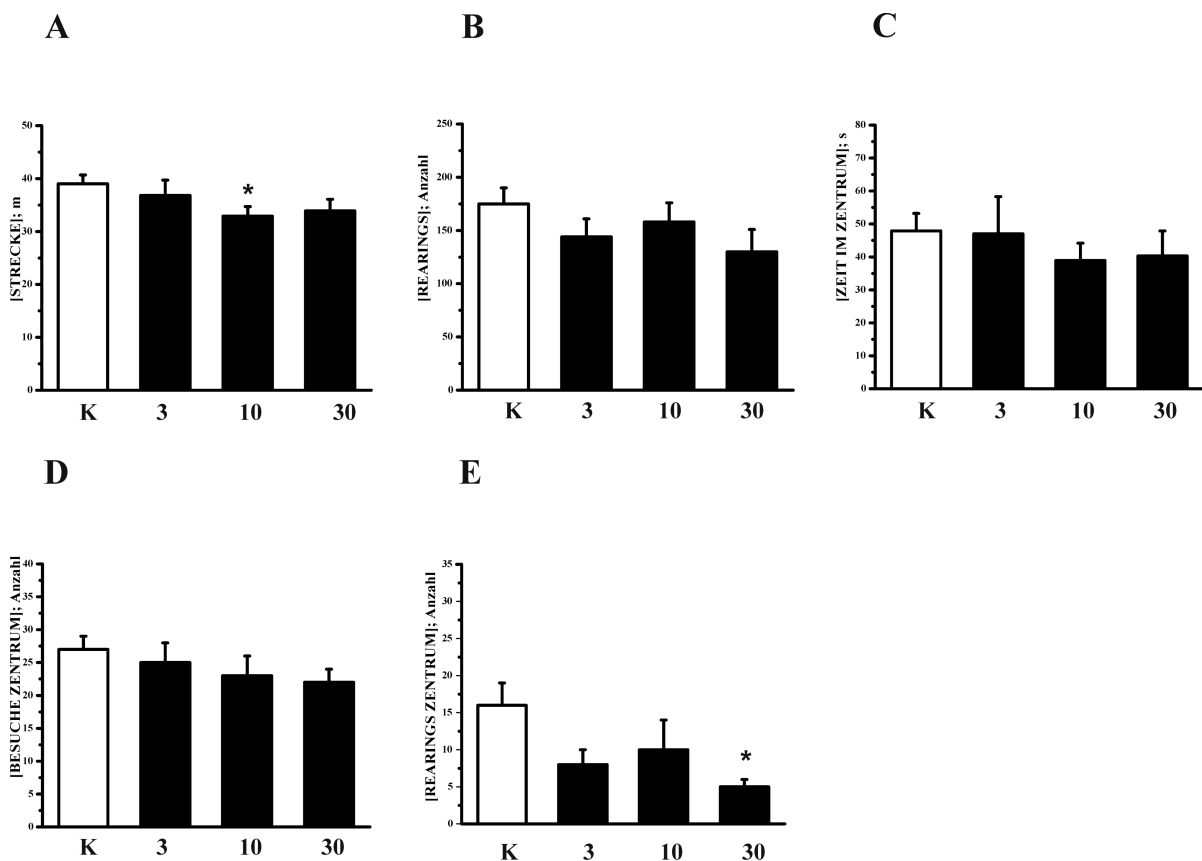


Abbildung 19: Effekt von HD-2B bei den angegebenen Dosen (alle Dosen in mg/kg KGW) 30 min nach i.p. Injektion im *OF* auf (A) die Gesamtstrecke, (B) Anzahl der *Rearings*, (C) die Zeit in Zentrum, (D) die Besuche im Zentrum und (E) die Anzahl der *Rearings* im Zentrum. Jeder Balken stellt den Mittelwert und den Standarderror von mind. 8 Tieren dar. (*) bedeutet statistisch signifikant ($p<0.05$).

	Saline n=16	3 mg/kg HD-2B n=13	10 mg/kg HD-2B n=11	30 mg/kg HD-2B n=11
Gesamtstrecke	39.0 ± 1.7	36.8 ± 2.9	32.9 ± 1.8	33.9 ± 2.2
Anz. der <i>Rearings</i>	175 ± 15	144 ± 17	158 ± 18	130 ± 21
Zeit (Zentrum)	47.9 ± 5.3	47.0 ± 11.3	38.9 ± 5.3	40.3 ± 7.6
Besuche (Zentrum)	27 ± 2	25 ± 3	23 ± 3	22 ± 2
<i>Rearings</i> (Zentrum)	16 ± 3	8 ± 2	10 ± 4	5 ± 1

Tabelle 6: Zusammenfassung des Effekts der angegebenen Dosen von HD-2B auf die folgenden Parameter im OF: Gesamtstrecke in m; Anzahl der *Rearings*, Zeit im Zentrum in s; Besuche im Zentrum; Anzahl der *Rearings* im Zentrum; n.....Anzahl der getesteten Tiere

4.6 Untersuchung der *in vivo* Wirkung von HD-2C

Die Kontrollgruppe legte im OF eine Gesamtstrecke von 39.0 ± 1.6 m zurück (n=16). Bei keiner der applizierten Dosen von HD-2C kam es zu einer nennenswerten Zu- oder Abnahme der Gesamtstrecke, verglichen mit der Salinegruppe (siehe Tab. 7).

In der Vergleichsgruppe wurden 175 ± 15 *Rearings* im OF verzeichnet (n=16). Nach Verabreichung von 3 mg/kg HD-2C kam es zu 131 ± 17 *Rearings* (n=13). Der Rückgang der Anzahl der *Rearings* war ab einer Dosis von 10 mg/kg HD-2C signifikant (123 ± 16 , n=13, $p < 0.05$) (siehe Abb. 20) Dieser Effekt war dosisabhängig. Bei einer Dosis von 30 mg/kg kam es zu 112 ± 13 *Rearings* (n=13, $p < 0.01$).

Die Zeit im Zentrum betrug in der Kontrollgruppe 47.9 ± 5.6 s (n=16). In der Verumgruppe betrug die Zeit bei einer Dosis von 3 mg/kg HD-2C 60.7 ± 12.7 s (n=13) und bei einer Dosis von 10 mg/kg HD-2C 57.6 ± 9.1 s (n=13). Mäuse, die eine Dosis von 30 mg/kg HD-2C erhalten hatten, verbrachten 56.3 ± 11.1 s im Zentrum des OF (n=13).

Wie in Abb. 20 dargestellt liegen die Besuchszahlen im Zentrum bei einer Dosis von 3 mg/kg HD-2C mit 31 ± 3 (n=13) und einer Dosis von 10 mg/kg HD-2C mit 32 ± 2 (n=13) über der registrierten Besuchszahl der Salinegruppe (27 ± 2 , n=16). Bei einer Dosis von 30

mg/kg liegt die Besuchszahl im Zentrum mit 25 ± 3 (n=13), unter jener der Kontrollgruppe. Keiner dieser Unterschiede war jedoch signifikant.

In der Kontrollgruppe kam es zu 16 ± 3 *Rearings* im Zentrum des *OF* (n=16). Bei einer Dosis von 10 mg/kg HD-2C war die Anzahl der *Rearings* im Zentrum signifikant niedriger (6 ± 2 , n=13, $p<0.05$). Ebenfalls signifikant erniedrigt im Vergleich zur Kontrollgruppe war die Anzahl der *Rearings* nach Gabe von 30mg/kg (7 ± 2 , n=13, $p<0.05$).

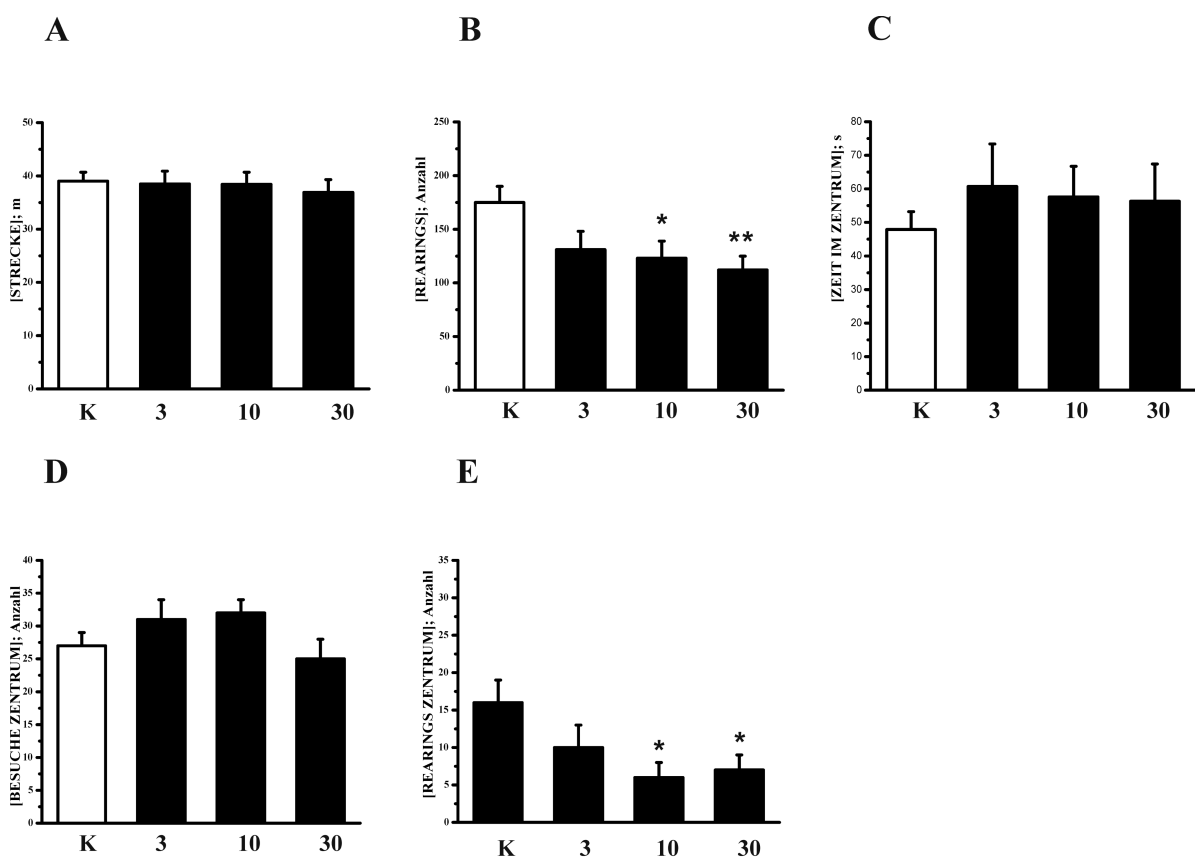


Abbildung 20: Effekt von HD-2C bei den angegebenen Dosen (alle Dosen in mg/kg KGW) 30 min nach i.p. Injektion im *OF* auf (A) die Gesamtstrecke, (B) Anzahl der *Rearings*, (C) die Zeit in Zentrum, (D) die Besuche im Zentrum und (E) die Anzahl der *Rearings* im Zentrum.

Jeder Balken stellt den Mittelwert und den Standarderror von mind. 8 Tieren dar. (*) bedeutet statistisch signifikant ($p<0.05$).

	Saline n=16	3 mg/kg HD-2C n=13	10 mg/kg HD-2C n=13	30 mg/kg HD-2C n=13
Gesamtstrecke	39.0 ± 1.7	38.5 ± 2.4	38.4 ± 2.3	36.9 ± 2.4
Anz. der <i>Rearings</i>	175 ± 15	131 ± 17	123 ± 16	112 ± 13
Zeit (Zentrum)	47.9 ± 5.3	60.7 ± 12.7	57.6 ± 9.1	56.3 ± 11.1
Besuche (Zentrum)	27 ± 2	31 ± 3	32 ± 2	25 ± 3
<i>Rearings</i> (Zentrum)	16 ± 3	10 ± 3	6 ± 2	7 ± 2

Tabelle 7: Zusammenfassung des Effekts der angegebenen Dosen von HD-2C auf die folgenden Parameter im *OF*: Gesamtstrecke in m; Anzahl der *Rearings*, Zeit im Zentrum in s; Besuche im Zentrum; Anzahl der *Rearings* im Zentrum;
n.....Anzahl der getesteten Tiere

4.7 Untersuchung der *in vivo* Wirkung von HD-2D

Die zurückgelegten Gesamtstrecken betrugen nach Applikation von HD-2D bei einer Dosis von 3 mg/kg 37.2 ± 1.8 m (n=10), bei einer Dosis von 10 mg/kg 37.0 ± 1.9 m (n=12) und bei einer Dosis von 30 mg/kg 35.1 ± 2.0 m (n=13). Die Kontrollgruppe legte eine Gesamtstrecke von 39.0 ± 1.7 m zurück (n=16).

In der Kontrollgruppe wurden 175 ± 15 *Rearings* registriert. Bei keiner der getesteten Dosen HD-2D konnten bezüglich der Anzahl der *Rearing* signifikante Unterschiede im Vergleich zur Kontrollgruppe festgestellt werden (siehe Abb. 21).

Nach Gabe von 3 mg/kg HD-2D verbrachten die Mäuse, im Vergleich zur Kontrollgruppe mehr Zeit im Zentrum. Der Unterschied war jedoch nicht signifikant. Bei Dosissteigerung kam es jedoch wieder zu einer Abnahme der Zeit im Zentrum (siehe Tab. 8).

Die Salinegruppe besuchte durchschnittlich 27 ± 2 Mal das Zentrum des *OF* (n= 16). Bei einer Dosis von 3 mg/kg HD-2D kam es zu 32 ± 3 Besuche des Zentrums (n=10). Nach Verabreichung von 10 mg/kg HD-2D entsprach die Besuchszahl im Zentrum jener der Kontrollgruppe, nach Gabe von 30 mg/kg HD-2D sank die Zahl leicht ab (siehe Abb 21).

Auch bezüglich der Anzahl der *Rearings* im Zentrum waren die Unterschiede zwischen der Salinegruppe (16 ± 3 , $n=16$) und allen getesteten Verumgruppen nicht signifikant (siehe Abb. 21).

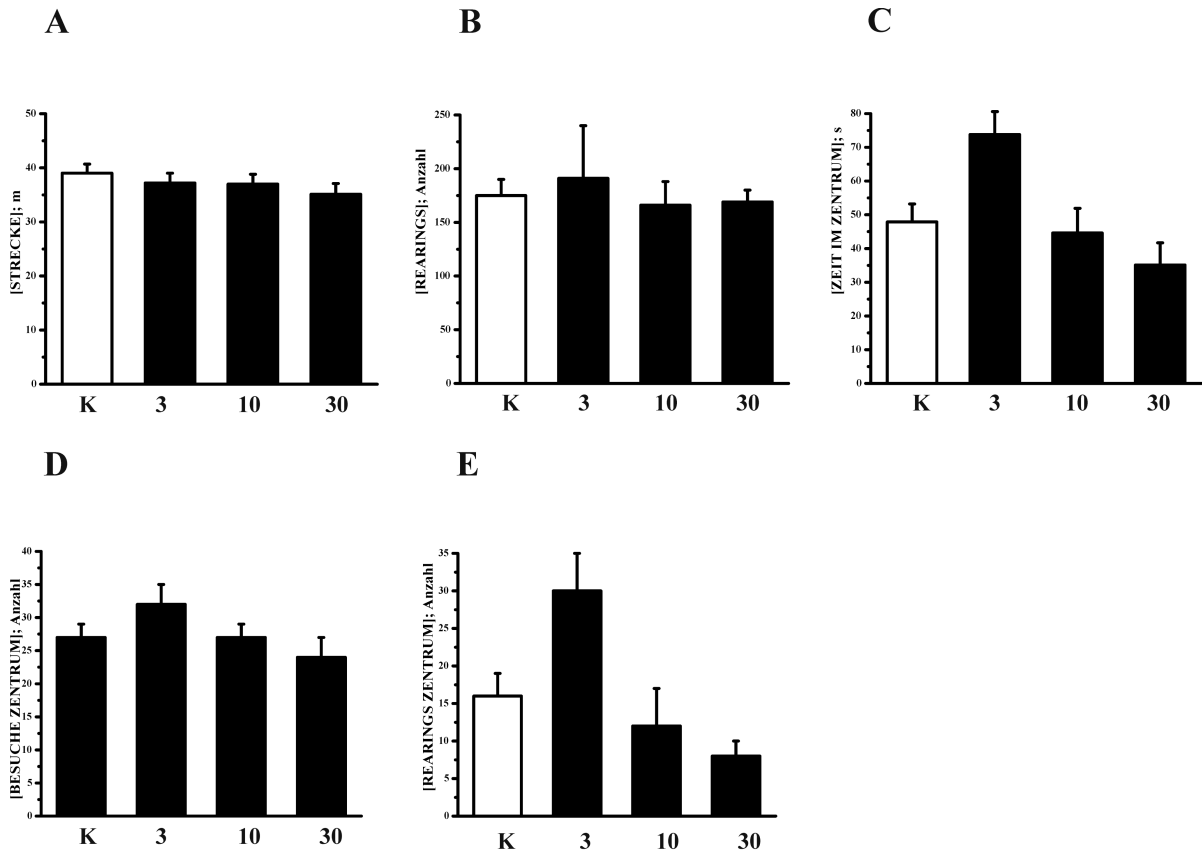


Abbildung 21: Effekt von HD-2D bei den angegebenen Dosen (alle Dosen in mg/kg KGW) 30 min nach i.p. Injektion im *OF* auf (A) die Gesamtstrecke, (B) Anzahl der *Rearings*, (C) die Zeit in Zentrum, (D) die Besuche im Zentrum und (E) die Anzahl der *Rearings* im Zentrum. Jeder Balken stellt den Mittelwert und den Standarderror von mind. 8 Tieren dar. (*) bedeutet statistisch signifikant ($p < 0.05$).

	Saline n=16	3 mg/kg HD-2D n=10	10 mg/kg HD-2D n=12	30 mg/kg HD-2D n=13
Gesamtstrecke	39.0 ± 1.7	37.2 ± 1.8	37.0 ± 1.9	35.1 ± 2.0
Anz. der <i>Rearings</i>	175 ± 15	191 ± 49	166 ± 22	169 ± 11
Zeit (Zentrum)	47.9 ± 5.3	73.8 ± 16.1	44.6 ± 7.3	35.1 ± 6.6
Besuche (Zentrum)	27 ± 2	32 ± 3	27 ± 2	24 ± 3
<i>Rearings</i> (Zentrum)	16 ± 3	30 ± 11	12 ± 5	8 ± 2

Tabelle 8: Zusammenfassung des Effekts der angegebenen Dosen von HD-2D auf die folgenden Parameter im *OF*: Gesamtstrecke in m; Anzahl der *Rearings*, Zeit im Zentrum in s; Besuche im Zentrum; Anzahl der *Rearings* im Zentrum; n.....Anzahl der getesteten Tiere

5 DISKUSSION

Schlaf- und Angststörungen sind weit verbreitete Erkrankungen. Die verschiedenen Angststörungen haben zusammen eine 12-Monats-Prävalenz von ungefähr 14% (Baldwin et al., 2005). Unter chronischer Insomnie leiden Schätzungen zufolge 10-15 % der erwachsenen Bevölkerung. Bei 25-35 % treten gelegentlich Schlafstörungen auf (Thase, 2005). Unterschiedliche Therapieoptionen zur Bekämpfung von Schlaf- bzw. Angststörungen stehen zur Verfügung, doch jede der vorhandenen Behandlungsmöglichkeiten weist Schwachpunkte auf und ist daher suboptimal. (Baldwin et al., 2005). Arzneistoffe, die an der BZ-Bindungsstelle von GABA_A-Rezeptoren angreifen werden schon seit Jahrzehnten in der Therapie eingesetzt. Sie erwiesen sich dabei als effektiv und sicher, jedoch ist ihr Nutzen begrenzt, da sie unselektiv mit den meisten GABA_A-Rezeptor Subtypen interagieren und somit auch einige unerwünschte Wirkungen hervorrufen. Da heute schon viel über die spezifischen Wirkungen der unterschiedlichen GABA_A-Rezeptor Subtypen bekannt ist, sucht man nach neuen Liganden am GABA_A-Rezeptor, die selektiv bestimmte Subtypen modulieren und erhofft sich von diesen weniger Nebenwirkungen (Dawson et al., 2005).

Zwei *in vitro* bereits als GABA_A-Rezeptor-Liganden identifizierte Substanzen (HD-1 und HD-2) und Derivate dieser Liganden sollten im Rahmen meiner Diplomarbeit untersucht werden.

Die *in vivo* Wirkung von HD-1 wurde im Rahmen meiner Diplomarbeit erstmals im Mausmodell untersucht. Dafür wurden männliche c57BL6/N Mäuse 30 min nach i.p. Injektion von HD-1 (0.1 mg/kg, 0.3 mg/kg und 1 mg/kg) 5 min lang im *EPM* beobachtet und ihr Verhalten mit jenem der Kontrollgruppe untersucht. Der *EPM* ist ein gutes System, um das anxiolytische Potential einer Substanz zu testen (Hogg, 1996; Komada et al., 2008). Mäuse weisen ein exploratives Verhalten auf, in den OA wird ihr Erkundungsdrang jedoch durch die Abneigung gegenüber offenen und erhöhten Plätzen abgeschwächt. Anxiolytisch wirkende Substanzen erhöhen die Besuchszahl und verlängern die Zeit, die die Mäuse in den OA verbringen (Komada et al., 2008). Jene Mäuse die 0.3 mg/kg HD-1 erhalten hatten, sowie jene Mäuse die 1 mg/kg HD-1 verabreicht bekamen, verbrachten signifikant mehr Zeit in den OA des *EPM* als die Kontrollgruppe, was darauf hindeutet, dass die getestete Substanz bei diesen Dosierungen eine anxiolytische Wirkung besitzt.

Höhere Dosierungen von HD-1 wurden nicht getestet, da diese bereits bei vorangegangenen Untersuchungen am Department für Pharmakologie und Toxikologie der Universität Wien massive Effekte auf die Körpertemperatur und die Aktivität hervorriefen. Die Besuchszahl der GA war nach Gabe von 0.3 mg/kg HD-1 und 1 mg/kg HD-1 signifikant erniedrigt. Möglicherweise weckten die OA stärker das Interesse der Tiere als die GA und wenn gleichzeitig die Angst vor den OA reduziert war, haben die Mäuse vermutlich auch weniger häufig den Schutz der GA gesucht. Bezüglich der zurückgelegten Gesamtstrecke im *EPM* wurde bei einer Dosis von 1 mg/kg HD-1 ein signifikanter Rückgang im Vergleich zur Salinegruppe festgestellt. Dieser Effekt ist möglicherweise auf eine Sedierung zurückzuführen. Immerhin interagiert HD-1 mit dem GABA_A-Rezeptor und daher ist eine sedierende Wirkung naheliegend. Die reduzierte Laufstrecke kann jedoch auch andere Ursachen haben. Wie bereits erwähnt, wurden bei höheren Dosierungen Effekte auf die Körpertemperatur und die Aktivität der Mäuse festgestellt. Eventuell wird die Laufaktivität auch bei 1 mg/kg durch dieselben Faktoren beeinflusst.

Im Rahmen meiner Diplomarbeit wurde auch erstmals ein Derivat von HD-1 getestet. Die Derivatisierung des Naturstoffs führte zu einer deutlich stärkeren Anxiolyse im *EPM* über einen weiten Dosisbereich. Ab einer Dosis 0.3 mg/kg HD-1A verbrachten die Mäuse signifikant mehr Zeit in den OA des *EPM* als die Kontrollgruppe. Mit der Erhöhung der Dosis stieg auch der zu beobachtende anxiolytische Effekt, bis hin zu einem maximalen Effekt bei einer Dosis von 3 mg/kg HD-1A. Gabe von 10 mg/kg HD-1A führte zu keiner weiteren Verstärkung der Anxiolyse. Anders als bei HD-1 war auch die Anzahl der Besuche in den OA bei Dosen bis zu 1 mg/kg HD-1A signifikant höher als jene der Vergleichsgruppe. Eine erhöhte Anzahl der Besuche in den OA ist eine weitere Beobachtung, die für das anxiolytische Potential von HD-1A spricht. Interessant ist, dass bei 3 mg/kg HD-1A und 10 mg/kg HD-1A die Besuchszahlen in den OA im Vergleich zur Kontrollgruppe nicht mehr signifikant höher waren. Bei diesen Dosierungen besuchten die Mäuse auch weniger häufig die GA des *EPM*. Grund für diese Effekte könnte wiederum das geringere Interesse gegenüber den GA im Vergleich zu den OA sein. Allerdings kam es bei zwei der getesteten Dosen (1 mg/kg und 3 mg/kg) auch zu einer leichten, aber signifikanten Verringerung der Gesamtstrecke verglichen mit der Salinegruppe, was bedeutet, dass eventuell auch Sedierung eine Rolle spielte, bzw. dass die Effekte auf die

Körpertemperatur und die Aktivität, die schon bei HD-1 festgestellt werden konnten, auch bei HD-1A nach Gabe höherer Dosen auftreten.

Das bedeutet, dass mit HD-1A vermutlich ein Ligand am GABA_A-Rezeptor identifiziert wurde, der anxiolytisch wirkt, ohne die stark sedierende Komponente der Benzodiazepine aufzuweisen.

Meine zweite Versuchsreihe beschäftigte sich vor allem mit Effekten von HD-2 bzw. seinen Derivaten (HD-2A, HD-2B, HD-2C, HD-2D) auf die Aktivität (Laufstrecke) der Tiere. Als Testsystem wurde zu diesem Zweck der *OF*-Test gewählt. Eine signifikante Reduktion der Laufstrecke konnte nur bei den Derivaten HD-2A und HD-2B beobachtet werden. Dies lässt vermuten, dass diese beiden Substanzen sedierend wirken. Bei HD-2A war die zurückgelegte Gesamtstrecke bei einer Dosis von 30 mg/kg im Vergleich zur Kontrollgruppe deutlich reduziert. Bei dieser Dosierung waren auch alle anderen untersuchten Parameter signifikant erniedrigt. Vor allem die deutliche Reduktion der Anzahl der *Rearings* bekräftigt die Annahme, dass die Mäuse bei dieser Dosierung von HD-2A sediert waren. Bei HD-2B war die Laufstrecke im Vergleich zur Salinegruppe nur bei einer Dosis von 10 mg/kg signifikant erniedrigt. Bezüglich der Anzahl der *Rearings* konnten keine signifikanten Effekte beobachtet werden. Allerdings zeigte sich bei HD-2B bei allen untersuchten Parametern ein Trend in Richtung einer Aktivitätsabnahme der Mäuse (siehe Abb. 19).

Ob die anderen, nicht sedierenden Substanzen eventuell eine anxiolytische Wirkung aufweisen ist eine interessante Frage, die noch ungeklärt bleibt. Bis zum jetzigen Zeitpunkt konnte im *OF* weder bei dem Naturstoff noch den Derivaten ein anxiolytischer Effekt festgestellt werden. Hierbei ist jedoch wichtig zu erwähnen, dass der *OF*- Test zwar Hinweise für eine anxiolytische Wirkung liefern kann, aber zur Untersuchung anxiolytischer Effekte noch weitere Versuche in anderen Paradigmen wie dem *EPM* oder dem *Light Dark Choice* Test durchgeführt werden sollten.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass im Rahmen meiner Diplomarbeit ein neuer Ligand am GABA_A-Rezeptor identifiziert wurde, der über einen weiten Dosisbereich anxiolytisch wirkt und dosisabhängig auch sedierende Effekte hat und dass einige der Derivate von HD-2 eine sedierende Wirkung aufweisen, während bei den anderen Derivaten keine Effekte im *OF* beobachtet werden konnten.

6 ZUSAMMENFASSUNG

Hintergrund: γ -Aminobuttersäure (GABA) ist der wichtigste inhibitorische Neurotransmitter im zentralen Nervensystem der Säugetiere. Störungen des GABAergen Systems sind mit zahlreichen Erkrankungen assoziiert. GABA Typ A (GABA_A)-Rezeptoren werden daher von vielen Arzneistoffe (z.B. Benzodiazepine, Anästhetika) moduliert. Diese interagieren meistens unselektiv mit den meisten vorkommenden Rezeptorsubtypen und weisen daher neben der therapeutischen Wirkung auch zahlreiche Nebenwirkungen auf.

Zielsetzung: 2 selektiv mit GABA_A -Rezeptor-Subtypen interagierende Substanzen (HD-1 und HD-2) und deren Derivate (HD-1A, HD-2A, HD-2B, HD-2C, HD-2D) sollten im Rahmen meiner Diplomarbeit erstmals *in vivo* getestet werden.

Methoden: Eine verhaltenspharmakologische Charakterisierung im *Elevated-Plus-Maze (EPM)*- bzw. *Open-Field (OF)*-Test wurde 30 min nach intraperitonealer Applikation der Kontroll- bzw. Verumlösungen durchgeführt.

Ergebnisse und Diskussion: Im Vergleich zur Kontrollgruppe verbrachten Tiere ab einer Dosis von 0.3 mg/kg HD-1 bzw. von 0.3 mg/kg HD-1A signifikant mehr Zeit in den offenen Armen des *EPM* (Saline: $29.6 \pm 2.8\%$, $n=38$ vs. HD-1 (0.3 mg/kg): $43.0 \pm 4.2\%$, $p < 0.01$, $n=22$ vs. HD-1A (0.3 mg/kg): $42.6 \pm 3.5\%$, $n=19$, $p < 0.01$). Beide Substanzen führten jedoch auch zu einer signifikanten Reduktion der Laufstrecke (Saline: $1304 \pm 32\text{cm}$; $n=38$ vs. HD-1 (1mg/kg): $1083 \pm 60\text{cm}$; $n=16$, $p < 0.01$ vs. HD-1A (1mg/kg): $1119 \pm 67\text{cm}$; $n=11$, $p < 0.01$) HD-1 und HD-1A konnten im *EPM* somit als anxiolytisch und auch sedierend wirksame Substanzen identifiziert werden, wobei HD-1A jedoch eine stärker ausgeprägte Anxiolyse zeigte.

Von den 5 untersuchten HD-2 Substanzen reduzierten nur HD-2A und HD-2B signifikant die zurückgelegte Laufstrecke im Vergleich zur Kontrollgruppe im *OF*-Test (Saline: $39.0 \pm 1.7\text{m}$; $n=16$ vs. HD-2A (30 mg/kg): 19.2 ± 2.1 ; $n=13$, $p < 0.01$ vs. HD-2B (10mg/kg): 32.9 ± 1.8 ; $n=11$, $p < 0.05$). Signifikante, anxiolytische Effekte konnten dabei noch von keiner Substanz beobachtet werden.

ABSTRACT

Background:

γ -aminobutyric acid (GABA) is the major inhibitory neurotransmitter in the mammalian central nervous system. A misbalance of the GABAergic neurotransmission is associated with multiple neurological disorders. GABA Type A (GABA_A)-receptors are therefore modulated by several drugs (e.g. benzodiazepines, anesthetics). These drugs interact rather unselectively with most of the occurring GABA_A receptor subtypes and displays thus besides the desired action multiple side effects.

Aims: The *in vivo* effects of 2 selectively interacting GABA_A-receptor ligands (HD-1 and HD-2) and their derivatives (HD-1A, HD-2A, HD-2B, HD-2C, HD-2D) were tested.

Methods: A behavioral characterization in the *Elevated-Plus-Maze (EPM)*- and *Open-Field (OF)*-Test, respectively, was performed 30 min after intraperitoneal application of control or drug solution.

Results and Discussion: Mice spent significantly more time in the open arms of the *EPM* after application of 0.3 mg/kg HD-1 and 0.3 mg/kg HD-1A, respectively (Saline: $29.6 \pm 2.8\%$, $n=38$ vs. HD-1 (0.3mg/kg): $43.0 \pm 4.2\%$, $p<0.01$, $n=22$ vs. HD-1A (0.3 mg/kg): $42.6 \pm 3.5\%$, $n=19$, $p<0.01$). However, both compounds also significantly reduced total ambulation (Saline: $1304 \pm 32\text{cm}$; $n=38$ vs. HD-1 (1mg/kg): $1083 \pm 60\text{cm}$; $n=16$, $p<0.01$ vs. HD-1A (1mg/kg): $1119 \pm 67\text{cm}$; $n=11$, $p<0.01$) HD-1 and HD-1A were identified as anxiolytic and sedative compounds in the *EPM* test, however, the anxiolytic effect of HD-1A was more pronounced. Only 2 out of the 5 analyzed HD-2 compounds significantly reduced total ambulation compared to the control group in the *OF*-test (Saline: $39.0 \pm 1.7\text{m}$; $n=16$ vs. HD-2A (30 mg/kg): 19.2 ± 2.1 ; $n=13$, $p<0.01$ vs. HD-2B (10 mg/kg): 32.9 ± 1.8 ; $n=11$, $p<0.05$). Significant, anxiolytic effects could not be observed.

7 Danksagung

Ich bedanke mich ganz herzlich bei Univ. Prof. Dr. Steffen Hering für die Bereitstellung des Themas und dafür, dass er mir diese Diplomarbeit ermöglicht hat. Ich möchte mich bei ihm auch für die hervorragende Betreuung und Unterstützung bedanken und dafür, dass ich ein sehr positives Bild von wissenschaftlichem Arbeiten erlangen konnte.

Besonderer Dank gilt Dr. Sophia Khom, die mich während meiner gesamten Arbeit mit viel Engagement unterstützt hat. Ich konnte sowohl im Laufe der praktischen Tätigkeit als auch beim Verfassen dieser Arbeit sehr viel von ihr lernen. Sie war sehr geduldig mit mir, hatte immer ein offenes Ohr für Fragen und gab mir immer verständliche und kompetente Erklärungen.

Ganz herzlich möchte ich mich auch bei meiner Studienkollegin Daniela Hrabak bedanken, die gemeinsam mit mir die Versuche durchgeführt hat. Sie wurde im Rahmen des Studiums zu einer sehr guten Freundin und ich hätte mir keine bessere Partnerin vorstellen können.

Ich möchte mich natürlich auch bei meiner Familie, meinen Freunden und meinem Freund dafür bedanken, dass sie immer für mich da sind, mich während meiner gesamten Studienzeit immer unterstützt haben und mein Leben bereichern.

8 Literaturverzeichnis

1. Akimova E, Lanzenberger R, & Kasper S (2009) The serotonin-1A receptor in anxiety disorders. *Biological psychiatry* 66(7):627-635.
2. Aroniadou-Anderjaska V, Qashu F, & Braga MF (2007) Mechanisms regulating GABAergic inhibitory transmission in the basolateral amygdala: implications for epilepsy and anxiety disorders. *Amino acids* 32(3):305-315.
3. Baldwin DS (2006) Evidence-based guidelines for anxiety disorders: can they improve clinical outcomes? *CNS spectrums* 11(10 Suppl 12):34-39.
4. Baldwin DS, *et al.* (2005) Evidence-based guidelines for the pharmacological treatment of anxiety disorders: recommendations from the British Association for Psychopharmacology. *Journal of psychopharmacology* 19(6):567-596.
5. Banno K & Kryger MH (2007) Sleep apnea: clinical investigations in humans. *Sleep medicine* 8(4):400-426.
6. Barlow DH (2002) *Anxiety and Its Disorders: The Nature and Treatment of Anxiety and Panic* (Guilford Press) 2 Ed p 704.
7. Barnard EA, *et al.* (1998) International Union of Pharmacology. XV. Subtypes of gamma-aminobutyric acidA receptors: classification on the basis of subunit structure and receptor function. *Pharmacological reviews* 50(2):291-313.
8. Bateson AN (2004) The benzodiazepine site of the GABAA receptor: an old target with new potential? *Sleep medicine* 5 Suppl 1:S9-15.
9. Baumann SW, Baur R, & Sigel E (2001) Subunit arrangement of gamma-aminobutyric acid type A receptors. *The Journal of biological chemistry* 276(39):36275-36280.
10. Boulos MI & Murray BJ (2010) Current evaluation and management of excessive daytime sleepiness. *The Canadian journal of neurological sciences. Le journal canadien des sciences neurologiques* 37(2):167-176.
11. Chokroverty S (2010) Overview of sleep & sleep disorders. *The Indian journal of medical research* 131:126-140.
12. Chou TC, *et al.* (2002) Afferents to the ventrolateral preoptic nucleus. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 22(3):977-990.
13. Craske MG, *et al.* (2009) What is an anxiety disorder? *Depression and anxiety* 26(12):1066-1085.

14. D'Hulst C, Attack JR, & Kooy RF (2009) The complexity of the GABAA receptor shapes unique pharmacological profiles. *Drug discovery today* 14(17-18):866-875.
15. Davies M, Bateson AN, & Dunn SM (1996) Molecular biology of the GABA(A) receptor: functional domains implicated by mutational analysis. *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library* 1:d214-233.
16. Davis M (1992) The role of the amygdala in fear and anxiety. *Annual review of neuroscience* 15:353-375.
17. Davis M & Shi C (1999) The extended amygdala: are the central nucleus of the amygdala and the bed nucleus of the stria terminalis differentially involved in fear versus anxiety? *Annals of the New York Academy of Sciences* 877:281-291.
18. Dawson GR, Collinson N, & Attack JR (2005) Development of subtype selective GABAA modulators. *CNS spectrums* 10(1):21-27.
19. de la Mora MP, Gallegos-Cari A, Arizmendi-Garcia Y, Marcellino D, & Fuxe K (2010) Role of dopamine receptor mechanisms in the amygdaloid modulation of fear and anxiety: Structural and functional analysis. *Progress in neurobiology* 90(2):198-216.
20. Dell'Osso B, Buoli M, Baldwin DS, & Altamura AC (2010) Serotonin norepinephrine reuptake inhibitors (SNRIs) in anxiety disorders: a comprehensive review of their clinical efficacy. *Human psychopharmacology* 25(1):17-29.
21. Devane CL, Chiao E, Franklin M, & Kruep EJ (2005) Anxiety disorders in the 21st century: status, challenges, opportunities, and comorbidity with depression. *The American journal of managed care* 11(12 Suppl):S344-353.
22. Dhand R (2010) Sleep disorders: diagnosis and treatment. *Respiratory care* 55(10):1389-1396.
23. Durant C, Christmas D, & Nutt D (2010) The pharmacology of anxiety. *Current topics in behavioral neurosciences* 2:303-330.
24. Ebert B, Wafford KA, & Deacon S (2006) Treating insomnia: Current and investigational pharmacological approaches. *Pharmacology & therapeutics* 112(3):612-629.
25. Ehrlich I, *et al.* (2009) Amygdala inhibitory circuits and the control of fear memory. *Neuron* 62(6):757-771.
26. Farrant M & Nusser Z (2005) Variations on an inhibitory theme: phasic and tonic activation of GABA(A) receptors. *Nature reviews. Neuroscience* 6(3):215-229.
27. Franken P & Dijk DJ (2009) Circadian clock genes and sleep homeostasis. *The European journal of neuroscience* 29(9):1820-1829.

28. Fuller PM, Gooley JJ, & Saper CB (2006) Neurobiology of the sleep-wake cycle: sleep architecture, circadian regulation, and regulatory feedback. *Journal of biological rhythms* 21(6):482-493.
29. Garner M, Möhler H, Stein DJ, Mueggler T, & Baldwin DS (2009) Research in anxiety disorders: from the bench to the bedside. *European neuropsychopharmacology : the journal of the European College of Neuropsychopharmacology* 19(6):381-390.
30. Graeff FG, Guimaraes FS, De Andrade TG, & Deakin JF (1996) Role of 5-HT in stress, anxiety, and depression. *Pharmacology, biochemistry, and behavior* 54(1):129-141.
31. Gross C & Hen R (2004) The developmental origins of anxiety. *Nature reviews. Neuroscience* 5(7):545-552.
32. Hamm AO & Weike AI (2005) The neuropsychology of fear learning and fear regulation. *International journal of psychophysiology : official journal of the International Organization of Psychophysiology* 57(1):5-14.
33. Hammack SE, *et al.* (2009) The response of neurons in the bed nucleus of the stria terminalis to serotonin: implications for anxiety. *Progress in neuro-psychopharmacology & biological psychiatry* 33(8):1309-1320.
34. Hjorth S, *et al.* (2000) Serotonin autoreceptor function and antidepressant drug action. *Journal of psychopharmacology* 14(2):177-185.
35. Hogg S (1996) A review of the validity and variability of the elevated plus-maze as an animal model of anxiety. *Pharmacology, biochemistry, and behavior* 54(1):21-30.
36. Itoi K & Sugimoto N (2010) The brainstem noradrenergic systems in stress, anxiety and depression. *Journal of neuroendocrinology* 22(5):355-361.
37. Kash TL, Trudell JR, & Harrison NL (2004) Structural elements involved in activation of the gamma-aminobutyric acid type A (GABAA) receptor. *Biochemical Society transactions* 32(Pt3):540-546.
38. Khom S, *et al.* (2010) Valerenic acid derivatives as novel subunit-selective GABAA receptor ligands - in vitro and in vivo characterization. *British journal of pharmacology* 161(1):65-78.
39. Kilduff TS, Cauli B, & Gerashchenko D (2011) Activation of cortical interneurons during sleep: an anatomical link to homeostatic sleep regulation? *Trends in neurosciences* 34(1):10-19.
40. Kilduff TS, *et al.* (2008) New developments in sleep research: molecular genetics,

gene expression, and systems neurobiology. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 28(46):11814-11818.

41. Kim JJ & Jung MW (2006) Neural circuits and mechanisms involved in Pavlovian fear conditioning: a critical review. *Neuroscience and biobehavioral reviews* 30(2):188-202.
42. Komada M, Takao K, & Miyakawa T (2008) Elevated plus maze for mice. *Journal of visualized experiments : JoVE* (22).
43. Landolt HP (2008) Sleep homeostasis: a role for adenosine in humans? *Biochemical pharmacology* 75(11):2070-2079.
44. Leonardo ED & Hen R (2008) Anxiety as a developmental disorder. *Neuropsychopharmacology : official publication of the American College of Neuropsychopharmacology* 33(1):134-140.
45. Licata SC & Rowlett JK (2008) Abuse and dependence liability of benzodiazepine-type drugs: GABA(A) receptor modulation and beyond. *Pharmacology, biochemistry, and behavior* 90(1):74-89.
46. Longo LP & Johnson B (2000) Addiction: Part I. Benzodiazepines--side effects, abuse risk and alternatives. *American family physician* 61(7):2121-2128.
47. Lopez-Munoz F, Alamo C, & Garcia-Garcia P (2011) The discovery of chlordiazepoxide and the clinical introduction of benzodiazepines: half a century of anxiolytic drugs. *Journal of anxiety disorders* 25(4):554-562.
48. Lydiard RB (2003) The role of GABA in anxiety disorders. *The Journal of clinical psychiatry* 64 Suppl 3:21-27.
49. Madaan V & Wilson DR (2009) Neuropeptides: relevance in treatment of depression and anxiety disorders. *Drug news & perspectives* 22(6):319-324.
50. Mahowald MW & Schenck CH (2005) Insights from studying human sleep disorders. *Nature* 437(7063):1279-1285.
51. Marowsky A, Fritschy JM, & Vogt KE (2004) Functional mapping of GABA A receptor subtypes in the amygdala. *The European journal of neuroscience* 20(5):1281-1289.
52. Mathew SJ, Price RB, & Charney DS (2008) Recent advances in the neurobiology of anxiety disorders: implications for novel therapeutics. *American journal of medical genetics. Part C, Seminars in medical genetics* 148C(2):89-98.
53. Matwiyoff G & Lee-Chiong T (2010) Parasomnias: an overview. *The Indian journal of medical research* 131:333-337.

54. McDonald K, Trick L, & Boyle J (2008) Sedation and antihistamines: an update. Review of inter-drug differences using proportional impairment ratios. *Human psychopharmacology* 23(7):555-570.
55. Mineka S & Oehlberg K (2008) The relevance of recent developments in classical conditioning to understanding the etiology and maintenance of anxiety disorders. *Acta psychologica* 127(3):567-580.
56. Minier F & Sigel E (2004) Positioning of the alpha-subunit isoforms confers a functional signature to gamma-aminobutyric acid type A receptors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101(20):7769-7774.
57. Möhler H (2006) GABA(A) receptor diversity and pharmacology. *Cell and tissue research* 326(2):505-516.
58. Möhler H (2007) Molecular regulation of cognitive functions and developmental plasticity: impact of GABAA receptors. *Journal of neurochemistry* 102(1):1-12.
59. Möhler H, Crestani F, & Rudolph U (2001) GABA(A)-receptor subtypes: a new pharmacology. *Current opinion in pharmacology* 1(1):22-25.
60. Moulton PR (2009) Neuronal glutamate and GABAA receptor function in health and disease. *Biochemical Society transactions* 37(Pt 6):1317-1322.
61. Nemeroff CB (2003) Anxiolytics: past, present, and future agents. *The Journal of clinical psychiatry* 64 Suppl 3:3-6.
62. Nutt DJ (2005) Overview of diagnosis and drug treatments of anxiety disorders. *CNS spectrums* 10(1):49-56.
63. Olsen RW & Sieghart W (2008) International Union of Pharmacology. LXX. Subtypes of gamma-aminobutyric acid(A) receptors: classification on the basis of subunit composition, pharmacology, and function. Update. *Pharmacological reviews* 60(3):243-260.
64. Olsen RW & Sieghart W (2009) GABA A receptors: subtypes provide diversity of function and pharmacology. *Neuropharmacology* 56(1):141-148.
65. Owens DF & Kriegstein AR (2002) Is there more to GABA than synaptic inhibition? *Nature reviews. Neuroscience* 3(9):715-727.
66. Paulus MP & Stein MB (2006) An insular view of anxiety. *Biological psychiatry* 60(4):383-387.
67. Pirker S, Schwarzer C, Wieselthaler A, Sieghart W, & Sperk G (2000) GABA(A) receptors: immunocytochemical distribution of 13 subunits in the adult rat brain. *Neuroscience* 101(4):815-850.

68. Porkka-Heiskanen T & Kalinchuk AV (2011) Adenosine, energy metabolism and sleep homeostasis. *Sleep medicine reviews* 15(2):123-135.
69. Ressler KJ (2010) Amygdala activity, fear, and anxiety: modulation by stress. *Biological psychiatry* 67(12):1117-1119.
70. Rowlett JK, Platt DM, Lelas S, Atack JR, & Dawson GR (2005) Different GABAA receptor subtypes mediate the anxiolytic, abuse-related, and motor effects of benzodiazepine-like drugs in primates. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102(3):915-920.
71. Rudolph U, *et al.* (1999) Benzodiazepine actions mediated by specific gamma-aminobutyric acid(A) receptor subtypes. *Nature* 401(6755):796-800.
72. Rudolph U & Knoflach F (2011) Beyond classical benzodiazepines: novel therapeutic potential of GABAA receptor subtypes. *Nature reviews. Drug discovery* 10(9):685-697.
73. Rudolph U & Möhler H (2004) Analysis of GABAA receptor function and dissection of the pharmacology of benzodiazepines and general anesthetics through mouse genetics. *Annual review of pharmacology and toxicology* 44:475-498.
74. Rudolph U & Möhler H (2006) GABA-based therapeutic approaches: GABAA receptor subtype functions. *Current opinion in pharmacology* 6(1):18-23.
75. Sahuque LL, *et al.* (2006) Anxiogenic and aversive effects of corticotropin-releasing factor (CRF) in the bed nucleus of the stria terminalis in the rat: role of CRF receptor subtypes. *Psychopharmacology* 186(1):122-132.
76. Sanford JJ, Argyropoulos SV, & Nutt DJ (2000) The psychobiology of anxiolytic drugs. Part 1: Basic neurobiology. *Pharmacology & therapeutics* 88(3):197-212.
77. Saper CB, Cano G, & Scammell TE (2005) Homeostatic, circadian, and emotional regulation of sleep. *The Journal of comparative neurology* 493(1):92-98. (b)
78. Saper CB, Chou TC, & Scammell TE (2001) The sleep switch: hypothalamic control of sleep and wakefulness. *Trends in neurosciences* 24(12):726-731.
79. Saper CB, Scammell TE, & Lu J (2005) Hypothalamic regulation of sleep and circadian rhythms. *Nature* 437(7063):1257-1263. (a)
80. Schwartz JR & Roth T (2008) Neurophysiology of sleep and wakefulness: basic science and clinical implications. *Current neuropharmacology* 6(4):367-378.
81. Sherin JE, Elmquist JK, Torrealba F, & Saper CB (1998) Innervation of histaminergic tuberomammillary neurons by GABAergic and galaninergic neurons

- in the ventrolateral preoptic nucleus of the rat. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 18(12):4705-4721.
82. Sieghart W (1995) Structure and pharmacology of gamma-aminobutyric acidA receptor subtypes. *Pharmacological reviews* 47(2):181-234.
 83. Sieghart W (2000) Unraveling the function of GABA(A) receptor subtypes. *Trends in pharmacological sciences* 21(11):411-413.
 84. Sieghart W (2006) Structure, pharmacology, and function of GABAA receptor subtypes. *Advances in pharmacology* 54:231-263.
 85. Sieghart W, et al. (1999) Structure and subunit composition of GABA(A) receptors. *Neurochemistry international* 34(5):379-385.
 86. Silbernagl S & Despopoulus A (2007) *Taschenatlas Physiologie* (Thieme; Stuttgart, New York) 7 Ed p 441.
 87. Simon J, Wakimoto H, Fujita N, Lalande M, & Barnard EA (2004) Analysis of the set of GABA(A) receptor genes in the human genome. *The Journal of biological chemistry* 279(40):41422-41435.
 88. Stahl SM & Felker A (2008) Monoamine oxidase inhibitors: a modern guide to an unrequited class of antidepressants. *CNS spectrums* 13(10):855-870.
 89. Sullivan GM, Coplan JD, Kent JM, & Gorman JM (1999) The noradrenergic system in pathological anxiety: a focus on panic with relevance to generalized anxiety and phobias. *Biological psychiatry* 46(9):1205-1218.
 90. Szabadi E (2006) Drugs for sleep disorders: mechanisms and therapeutic prospects. *British journal of clinical pharmacology* 61(6):761-766.
 91. Tan KR, Rudolph U, & Luscher C (2011) Hooked on benzodiazepines: GABAA receptor subtypes and addiction. *Trends in neurosciences* 34(4):188-197.
 92. Tanaka M, Yoshida M, Emoto H, & Ishii H (2000) Noradrenaline systems in the hypothalamus, amygdala and locus coeruleus are involved in the provocation of anxiety: basic studies. *European journal of pharmacology* 405(1-3):397-406.
 93. Thase ME (2005) Correlates and consequences of chronic insomnia. *General hospital psychiatry* 27(2):100-112.
 94. Thorpy MJ (2012) Classification of sleep disorders. *Neurotherapeutics : the journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutics* 9(4):687-701.
 95. Tobler I, Kopp C, Deboer T, & Rudolph U (2001) Diazepam-induced changes in sleep: role of the alpha 1 GABA(A) receptor subtype. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98(11):6464-6469.

96. Tretter V, Ehya N, Fuchs K, & Sieghart W (1997) Stoichiometry and assembly of a recombinant GABAA receptor subtype. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 17(8):2728-2737.
97. Wafford KA (2005) GABAA receptor subtypes: any clues to the mechanism of benzodiazepine dependence? *Current opinion in pharmacology* 5(1):47-52.
98. Wafford KA & Ebert B (2008) Emerging anti-insomnia drugs: tackling sleeplessness and the quality of wake time. *Nature reviews. Drug discovery* 7(6):530-540.
99. Walker DL & Davis M (2008) Role of the extended amygdala in short-duration versus sustained fear: a tribute to Dr. Lennart Heimer. *Brain structure & function* 213(1-2):29-42
100. Walker DL, Miles LA, & Davis M (2009) Selective participation of the bed nucleus of the stria terminalis and CRF in sustained anxiety-like versus phasic fear-like responses. *Progress in neuro-psychopharmacology & biological psychiatry* 33(8):1291-1308.
101. Walker DL, Toufexis DJ, & Davis M (2003) Role of the bed nucleus of the stria terminalis versus the amygdala in fear, stress, and anxiety. *European journal of pharmacology* 463(1-3):199-216.
102. Wheatley D (2005) Medicinal plants for insomnia: a review of their pharmacology, efficacy and tolerability. *Journal of psychopharmacology* 19(4):414-421.
103. Wilson SJ, *et al.* (2010) British Association for Psychopharmacology consensus statement on evidence-based treatment of insomnia, parasomnias and circadian rhythm disorders. *Journal of psychopharmacology* 24(11):1577-1601.
104. Winsky-Sommerer R (2009) Role of GABAA receptors in the physiology and pharmacology of sleep. *The European journal of neuroscience* 29(9):1779-1794.
105. Wu LJ, Kim SS, & Zhuo M (2008) Molecular targets of anxiety: from membrane to nucleus. *Neurochemical research* 33(10):1925-1932.
106. Zwanzger P & Deckert J (2007) [Anxiety disorders. Causes, clinical picture and treatment]. *Der Nervenarzt* 78(3):349-359; quiz 360.

9 Lebenslauf

Persönliche Daten:

Vor- und Zuname: Helga Dobernig
E-mail: h.dobernig@gmail.com

Ausbildung:

Oktober 2006 - Juli 2013: Pharmaziestudium an der Universität Wien
September 2009: 3-wöchige TCM Summerschool in Chengdu
1998-2006: Bundesrealgymnasium Neunkirchen; Abschluss: Matura

Praktische Erfahrung:

Mai 2011-Juli 2013 10-stündige Tätigkeit in der Apotheke an der Kaiserstrasse
Wintersemester 2012: Tutorstelle für das Praktikum „Pharmakologie und Toxikologie 1“ des Departments für Pharmakologie und Toxikologie
Juli 2010: 1-monatiges Praktikum in der „Heiland Apotheke“, Wr. Neustadt
Wintersemester 2010: Tutorstelle für das Praktikum „Magistrale Arzneimittelherstellung“ des Departments für pharm. Technologie und Biopharmazie

Sprachkenntnisse: Deutsch, Muttersprache
Englisch, fließend
Spanisch, gute Kenntnisse
Russisch, Grundkenntnisse
Latein, Grundkenntnisse