universität wien

DIPLOMARBEIT

Titel der Diplomarbeit

Untersuchung der anxiolytischen und sedierenden Wirkung ausgewählter $GABA_A$-Modulatoren im Tiermodell

Verfasserin

Daniela Hrabak

angestrebter akademischer Grad

Magistra der Pharmazie (Mag.pharm.)

Wien, 2012

Studienkennzahl lt. Studienblatt:	A 449
Studienrichtung lt. Studienblatt:	Diplomstudium Pharmazie
Betreuerin / Betreuer:	Univ. Prof. Dr. Steffen Hering

Inhaltsverzeichnis

1 Molekulare Grundlagen der Wirkung von Anxiolytika und Sedativa 5

1.1 Allgemeine Grundlagen der Angst 5

1.1.1 Physiologische Rolle der Angst 5
1.1.2 Beteiligte Strukturen im Gehirn 6
1.1.3 Neurotransmitter und Hormone 7
1.1.4 Klassifizierung von Angststörungen 8
1.1.5 Therapie von Angststörungen 9
1.2 Allgemeine Grundlagen des Schlafs 11

1.2.1 Physiologische Rolle des Schlafs 11
1.2.2 Regulation des Schlafs und beteiligte Neurotransmitter 12
1.2.3 Klassifizierung von Schlafstörungen 14
1.2.4 Therapie von Schlafstörungen 18
1.3 γ-Aminobuttersäure als inhibitorischer Neurotransmitter 20

1.4 $GABA_A$ Rezeptoren 23

1.4.1 Funktion und Struktur des $GABA_A$ Rezeptors 23
1.4.2 Die GABA-Bindungsstelle 26
1.4.3 Modulatoren von $GABA_A$ Rezeptoren 27
1.4.3.1 Benzodiazepine 27
1.4.3.2 Barbiturate 31
1.4.3.3 Steroide und Anästhetika 31
1.4.3.4 Diverse andere Modulatoren von $GABA_A$ Rezeptoren 33

1.5 Baldrian 34

1.6 Pfeffer 36

2 Problemstellung und Zielsetzung 38

3 Methoden 39

3.1 Tiere 39

3.2 Injektionslösungen 39

3.3 Open-Field-Test (OF) 39

3.4 Elevated-Plus-Maze Test (EPM) 40

3.5 Statistische Analyse der Daten 41

4 Ergebnisse 42

4.1 Untersuchung der Wirkung von Piperin und des Piperin-Derivats (7) im Elevated-Plus-Maze (EPM) Test 42

4.1.1 Verbrachte Zeit in den offenen Armen (%) 42
4.1.2 Anzahl der Besuche in den OA und GA des EPM 42
4.1.3 Laufstrecke 43

4.2 Untersuchung der Wirkung von Valerensäure (VA) und ausgewählten VA-Derivaten im Open-Field-Test (OF) 47
4.2.1 Laufstrecke 47
4.2.2 Zeit im Zentrum 48
4.2.3 Rearings 48
4.2.4 Rearings im Zentrum 49
5 Diskussion 56
5.1 Piperin und Derivat (7) 56
5.2 Valerensäure und Valerensäure-Derivate 57
6 Zusammenfassung 59
7 Lebenslauf 60
8 Literaturverzeichnis 61
9 Danksagung 68

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 Molekulare Grundlagen der Wirkung von Anxiolytika und Sedativa

1.1 Allgemeine Grundlagen der Angst

Anders als im Deutschen gibt es im Englischen zwei Begriffe für Angst: „anxiety“ und „fear“. Häufig werden diese Begriffe umgangssprachlich synonym verwendet, dennoch ist es vor allem im wissenschaftlichen Kontext wichtig, diese zu unterscheiden: so beschreibt der Begriff „anxiety“ das Verhalten, das in Situationen hervorgerufen wird, in denen die Gefahr unbekannt ist. Entweder weil die Umstände neu sind, oder weil der Angstauslöser (zum Beispiel der Angreifer) nur in der Vergangenheit anwesend war, aber sich jetzt nicht länger in der Umgebung aufhält. Dagegen ist „fear“ mit Verteidigungsstrategien verbunden, die als Antwort auf akute Gefahr beobachtet werden. Tiere gehen dieser Situation entweder aus dem Weg oder sie werden bewegungsunfähig („freezing“), vor allem dann, wenn ihnen kein Ausweg mehr offen scheint (Graeff, 2007; Möhler, 2012).
Humane Krankheitsbilder zeigen Parallelen zu beiden Begriffen. Zum einen bei Phobien wie zum Beispiel Furcht vor Spinnen oder Schlangen, die auf sehr direkte Stimuli beruhen, zum anderen gibt es Patienten mit Genereller Angststörung oder Panikstörungen, bei denen es zu Angstsymptomen ohne Vorhandensein von entsprechenden Stimuli kommt (Graeff, 2007).

1.1.1 Physiologische Rolle der Angst

Angst vor bedrohlichen Situationen ist ein Schutzmechanismus der Natur. Bei Menschen wird Angst neben emotionalen Aspekten von der Aktivierung des autonomen Nervensystems und typischer Abwehrhaltung begleitet. Während Angst in vielen Situationen des Lebens das Individuum schützt, kommt es bei übermäßiger bzw. unangemessener Angst zu erheblichen Belastungen im Alltag (Gordon und Hen, 2004). Menschen, die an Angststörungen leiden, sind häufig durch überschießende, emotionale und physische Symptome beeinträchtigt. Einer kürzlich publizierten Studie (Wittchen et al., 2011) zufolge, leiden etwa 10-20% aller Erwachsenen einmal in ihrem Leben an einer Angststörung. In diesen Fällen von unangemessener Angst (pathologischer Angst) kann es zu lang andauernden Angstzuständen kommen. Als Folge leiden die betroffenen Personen unter chronischem Stress (Gordon und Hen, 2004).

Bereits 1929 wurden Angstreaktionen von Walter Cannon als „fight and flight“-Reaktionen bezeichnet. Dabei wird der Körper durch Erhöhung des Sympathikustonus in „Kampf- und Fluchtbereitschaft“ versetzt. Dies führt unter anderem zu einer vermehrten Adrenalin-Ausschüttung, erhöhtem Muskeltonus und erhöhter Herz- und Atmungsfrequenz. Wenn der Stress länger andauert, wird diese Reaktion durch Ausschüttung weiterer Hormone (z.B.: ACTH) verstärkt (Lydiard, 2003).

Gray et al. teilen die Angstreaktion in vier Phasen ein (Bracha et al., 2004):
Die erste Phase der Angstreaktion wird als "freezing" oder „stop, look and listen“ bezeichnet. In dieser Phase ist man wachsam und in Alarmbereitschaft. Verhaltensforscher weisen auf die Wichtigkeit dieser Phase für das Überleben hin. Beutetiere, die während einer bedrohlichen Situation erstarren, werden weniger leicht entdeckt, weil Säugetiere primär bewegte Objekte zuerst wahrnehmen. Das Ziel der zweiten Phase der Angstreaktion ist die Flucht („flight“) vor dem bedrohlichen Stimulus. In der nächsten, dritten Phase kommt es erst zur Konfrontation mit dem Stimulus („fight“). Die vierte und letzte Phase stellt die sogenannte „tonic immobility“ dar, das Objekt stellt sich tot. Diese Phase wird auch als „fright“ bezeichnet und bietet die letzte Möglichkeit einer drohenden, tödlichen Gefahr zu entrinnen (Bracha et al., 2004). Daneben resultieren Angstverhalten bzw. Angststörungen häufig auch aus negativen Erfahrungen (Fendt und Fanselow, 1999). Man spricht dann von einer Pawlow’schen Konditionierung (Fendt und Fanselow, 1999).

1.1.2 Beteiligte Strukturen im Gehirn

Eine zentrale Rolle bei der Entstehung von Emotionen und somit auch der Angst spielt das limbische System (Sandford et al., 2000). Innerhalb des limbischen Systems liegt die Amygdala, die vor allem beim Auftreten von angsterzeugenden Stimuli starke Aktivität aufweist (Garner et al., 2009; Möhler, 2012). Grundsätzlich kann man die Amygdala somit als zentralen Schaltkreis der Angstverarbeitung sehen, der in Kommunikation mit den unterschiedlichsten Gehirnarealen (Kortex, Striatum, Mittelhirn, Hirnstamm (Locus coereleus), etc.) steht. Diesen Gehirnarealen kommen verschiedene Aufgaben zu, die sich in unserem Angstverhalten widerspiegeln. Wie in Abbildung 1 beschrieben, haben zum Beispiel Hirnstamm und Hypothalamus Einfluss auf autonome Funktionen (wie Erstarren oder Erschrecken) oder der Hippocampus auf Gedächtniskonsolidierung. (Gordon und Hen, 2003; Sandford et al., 2000; Abbildung 1).

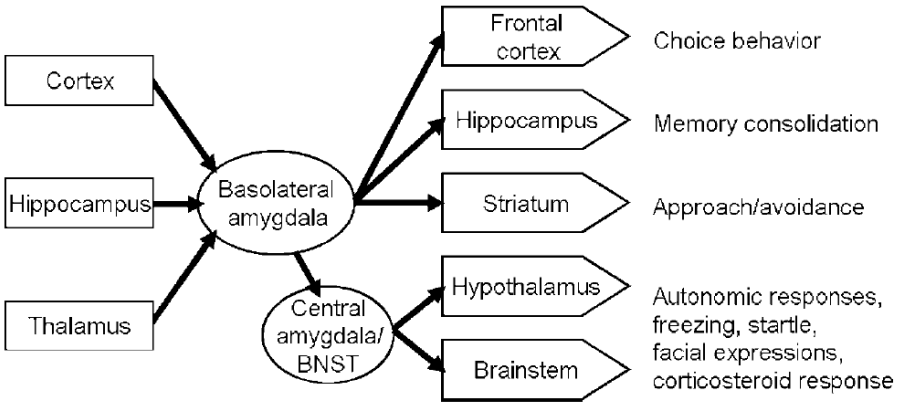


Abbildung 1: Schematische Darstellung der Gehirnareale, die am Angstsystem beteiligt sind (Gordon und Hen, 2004)

1.1.3 Neurotransmitter und Hormone

Die wichtigsten Neurotransmitter, die bei der Entstehung von Angst eine Rolle spielen, sind γ-Aminobuttersäure (GABA), Serotonin (5-HT) und Noradrenalin. So konnte gezeigt werden, dass eine Erhöhung der Konzentration von Noradrenalin bzw. eine Verringerung der GABA- oder Serotonin-Konzentration im ZNS Angst und Panik hervorrufen bzw. dass Substanzen, die das GABAerge, das noradrenerge oder serotonerge System modulieren, erfolgreich in der Therapie von Angststörungen eingesetzt werden können (Sandford et al., 2000).

Das noradrenerge System ist insbesondere bei Panikstörungen von Bedeutung (Gordon und Hen, 2004). So ruft zum Beispiel eine erhöhte Freisetzung von Noradrenalin (z.B. hervorgerufen durch Kokain) Angst und Panik hervor; gleiche Effekte können auch nach Einnahme von Amphetaminen beobachtet werden. (Sandford et al., 2000).
Neben den oben genannten Neurotransmittern spielen auch hormonelle Effekte über die Hypothalamus-Hypophysen-Nebennieren-Achse (HPA) eine wichtige Rolle bei der Angstentstehung. In dieser Achse übernimmt vor allem das Neuropeptidhormon Corticotropin-releasing-hormon (CRH) eine wichtige Aufgabe (Gordon und Hen, 2004). In einer akuten Stresssituation wird CRH vom paraventrikulären Nucleus des Hypothalamus (PVN) freigesetzt. Dadurch wird eine Reaktionskaskade ausgelöst: Adrenocorticotropin Hormon (ACTH) wird von der Hypophyse ins Blut ausgeschüttet und gelangt so über endokrinen Weg zur Nebenniere, wo es die adrenerge Synthese vorantreibt und Cortisol („Stresshormon“) freisetzt.

Überaktivität der HPA (wie z.B. in extremen Angstsituationen) führt zu chronischer Hypercortisolämie, einem Zustand, der mit Absterben von Neuronen des Hippocampus assoziiert ist. Dies kann bleibende Störungen im Gehirn hervorrufen. So konnte festgestellt werden, dass Kriegsveteranen, die an Posttraumatischer Stressstörung leiden, ein um 8% verringertes Volumen des Hippocampus aufweisen (Lydiard, 2003).
Durch einen negativen Feedbackmechanismus kann wiederum Cortisol die HPA-Aktivität inhibieren.
Eine weitere, wichtige Rolle spielen auch Cholecystokinin, Laktat und CO_2 (Sandford et al., 2000).

1.1.4 Klassifizierung von Angststörungen

Wie bereits zuvor erwähnt, leiden etwa 10-20% der Bevölkerung einmal während ihres Lebens an einer Angststörung (Baldwin et al., 2005; Wittchen et al., 2011). Angststörungen werden häufig chronisch, völliges Abklingen der Symptome ist selten. Meist dauern die Störungen Jahre an und führen zu Distress, reduzierter Lebensqualität und sogar erhöhter Mortalität (Baldwin et al., 2005; Garner et al., 2009). Weiters konnte gezeigt werden, dass Angststörungen familiär gehäuft auftreten. Personen mit Verwandten (erster Verwandtschaftsgrad), die Angststörungen aufweisen, leiden vier bis sechs Mal öfter an einer Angststörung als Personen ohne Vorbelastung. Zwillingsstudien haben ebenfalls bestätigt, dass der Großteil aller Angststörungen erblich bedingt ist (Gordon und Hen, 2004).
Prozentuell leiden mehr Frauen als Männer an Angststörungen (Baldwin et al., 2005; Nutt, 2005). Weiters gibt es Hinweise, dass eine starke Korrelation zwischen Angststörungen und Depression besteht (Baldwin et al., 2005; Nemeroff, 2003).

Derzeit werden Angststörungen von der American Psychiatric Association (DSM IV, 1994) bzw. der World Health Organisation, (ICD-10, 1992) in sechs Gruppen unterteilt
(Baldwin et al., 2005; Möhler, 2012; Nemeroff, 2003; Nutt, 2005):

Panikstörung: Sie ist durch wiederkehrende, unerwartete Panikattacken (diskontinuierliche Perioden starker Angst oder Unbehagen) gekennzeichnet, die ihren Höhepunkt meist nach zehn Minuten erreicht und um die 30-40 Minuten andauert (Baldwin et al., 2005). Die entstehende Panik ist von einer gesteigerten, kardiorespiratorischen Reaktion des Körpers begleitet

(Johnson et al., 2010). Zusätzlich entwickeln 2/3 aller Patienten, die an Panikstörungen leiden, Agoraphobie (Baldwin et al., 2005).

Generalisierte Angststörung (GAD): Sie ist durch extreme, lang anhaltende (einige Monate) und für Nichtbetroffene unbegründete Angst vor unterschiedlichsten Dingen charakterisiert. Patienten leiden unter physischen/psychischen Angstsymptomen (Kopfschmerz, Konzentrationsstörungen, Schlafstörungen, Erschöpfung, etc.) (Baldwin et al., 2005; Nutt, 2005).

Soziale Phobie: Patienten mit sozialer Phobie haben das Gefühl beobachtet zu werden und fürchten sich davor, den Erwartungen anderer nicht zu entsprechen. Sie versuchen belastenden Situationen (z.B. vor einer Gruppe von Menschen zu sprechen) aus dem Weg zu gehen. Wenn sie sich der Herausforderung dennoch stellen, verspüren sie Unbehagen und leiden an den resultierenden Angstsymptomen.

Posttraumatische Belastungsstörung (PTSD): Diese Angststörung entwickelt sich aufgrund einer schweren Traumatisierung (z.B. Unfall, Missbrauch) innerhalb der ersten sechs Monate nach dem Ereignis. Patienten, die an PTSD leiden, leiden unter heftiger Angst, wiederkehrenden Erinnerungen an das Trauma (Flashbacks) und Albträumen. Zusätzlich versuchen sie Situationen und Aktivitäten zu vermeiden, die sie mit dem Vorfall in Verbindung bringen (Baldwin et al., 2005).

Zwangsstörung: Patienten legen zwanghafte Verhaltensweisen an den Tag, wie zum Beispiel häufiges, übertriebenes Hände waschen. Meistens sind diese Zwänge zeitintensiv und beeinflussen das tägliche Leben (Baldwin et al., 2005; Nutt, 2005).

Phobien: Sie sind durch übertriebene, unangemessene Angst vor einzelnen Personen, Tieren (z.B. Mäuse, Spinnen), bestimmten Objekten (z.B. Lifte, Flugzeuge) oder Situationen gekennzeichnet. Patienten, die an Phobien leiden, versuchen so gut wie möglich den angsterzeugenden Stimuli aus dem Weg zu gehen (Baldwin et al., 2005).

1.1.5 Therapie von Angststörungen

Angststörungen werden mit Verhaltenstherapien (Nutt, 2005), phytotherapeutisch (Lakhan und Vieira, 2010) und mit Psychopharmaka behandelt. Zu den am häufigsten eingesetzten Wirkstoffgruppen gehören:

Antidepressiva

Erstmalig wurden Antidepressiva zur Therapie von Angststörungen in den 1950er Jahren verwendet. Früh konnte gezeigt werden, dass Imipramin das Auftreten von Panikattacken

reduziert oder Monoaminooxidase (MAO)-Hemmer erfolgreich gegen Phobien eingesetzt werden können (Nutt, 2005). Im Vordergrund steht heute aber aufgrund besserer Verträglichkeit der Einsatz von „Selektiven-Serotonin-Wiederaufnahme-Hemmern“ (SSRI; Citalopram, Fluoxetin, Fluvoxamin, Paroxetin, Sertralin und Escitalopram) und Serotonin-Noradrenalin-Wiederaufnahme-Hemmern (SNRI; Venlafaxin) (Baldwin et al., 2005; Nutt, 2005). Ihr Einsatz sollte auf eine Dauer von 12-30 Monaten beschränkt sein, wobei in den letzten Monaten die Therapie ausschleichend beendet werden sollte (Nutt, 2005). Häufig -problematisch hinsichtlich der Compliance des Patienten- kommt es am Beginn der Therapie zu einer paradoxen Erhöhung der Angst. Empfohlen wird daher eine kurzzeitliche Kombination mit vorwiegend anxiolytisch wirkenden Benzodiazepinen (Clonazepam, Alprazolam) (Argyropoulos et al., 2000).

Neben den SSRI bzw. SNRI werden gelegentlich auch noch tricyclische Antidepressiva verwendet, welche aber trotz guter Wirksamkeit zahlreiche unerwünschte, andere Wirkungen zeigen.

Benzodiazepine

Siehe auch Kapitel 1.4.3.1 Benzodiazepine; Benzodiazepine zeichnen sich durch einen schnell eintretenden, anxiolytischen Effekt aus; zusätzlich sind sie auch bei Schlafstörungen -häufig mit Angststörungen vergesellschaftet- wirksam. Jedoch führen sie rasch zu Abhängigkeit und Toleranzentwicklung (Nutt, 2005; Rudolph und Knoflach, 2011). Nach abruptem Absetzen kann es darüberhinaus zu Entzugserscheinungen wie Angst und Unruhe kommen (Nemeroff, 2003).

5-HT_{1A} Rezeptor Agonisten

Buspiron ist ein partieller Agonist von postsynaptischen 5-HT_{1A} Rezeptoren und ein Antagonist von postsynaptischen 5-HT_2 Rezeptoren. Buspiron wird vor allem bei GAD und Panikstörungen eingesetzt (Nutt, 2005). Es dauert 2-3 Wochen, bis sich die anxiolytische Wirkung aufbaut. Buspiron wird generell gut vertragen, hat eine große therapeutische Breite, induziert scheinbar keine Toleranz noch Abhängigkeit und es weist keine Interaktion mit Alkohol auf (Sandford, 2000). Gelegentlich tritt am Beginn der Therapie Übelkeit und/oder Schwindel auf (Nutt, 2005).

1.2 Allgemeine Grundlagen des Schlafs

Der Schlaf ist ein wesentlicher Teil unseres Lebens und ein natürlicher, gesunder Schlaf sehr wichtig für unsere Lebensqualität. Zunehmend wächst auch die Erkenntnis über die physiologische Bedeutsamkeit des Schlafs zur Regeneration und zur Entwicklung des Gehirns und des Gedächtnisses (Zimmerman et al., 2008).
An der häufigsten Schlafstörung, der Insomnie, leiden weltweit etwa 10% aller Erwachsenen (Léger und Ogrizek, 2012).

1.2.1 Physiologische Rolle des Schlafs

Menschen verbringen ungefähr ein Drittel ihres Lebens schlafend (Wafford und Ebert, 2008). Während des Schlafs kommt es zu einer Verarbeitung und Festigung von Informationen, die man während des Tages gesammelt hat. Schon im ersten Jahrhundert vor Christus, kommentierte ein römischer Rhetoriker Quintilian, die Vorteile des Schlafs: „Was zuerst nicht wiederholt werden kann, ist sogleich am nächsten Tag zusammengefügt; und die Zeit, welche oft mit Vergesslichkeit assoziiert wird, hilft das Gedächtnis zu stärken.“ (Stickgold, 2005). Aber im Schlaf werden nicht nur Erinnerungen gefestigt, sondern auch Proteine synthetisiert und Gewebe erneuert. Obwohl der Körper während der Schlafphase inaktiv ist, ist das Gehirn noch immer sehr aktiv. Diese Aktivität kann mittels eines Elektroenzephalografen gemessen und aufgezeichnet werden (Wafford und Ebert, 2008).
Während des Schlafs durchwandert man verschiedene Phasen, die sich im EEG widerspiegeln. Diese Phasen können grundsätzlich in rapid-eye-movement (REM), gekennzeichnet durch rasche Augenbewegungen, und non-rapid-eye-movement (non-REM) eingeteilt werden (Chokroverty, 2010; Porkka-Heiskanen und Kalinchuk, 2010; Sehgal und Mignot, 2011; Stickgold, 2005; Wafford und Ebert, 2008). REM und non-REM Schlaf wechseln einander in 90 Minuten Abständen ab (Sehgal und Mignot, 2011). Der non-REM Schlaf ist durch geringe Frequenz und schrittweisen Anstieg der Amplitude der elektrischen Aktivität charakterisiert. Die non-REM Phase kann man wiederum in leichten (Stufe 1,2) und tiefen Schlaf (Stufe 3,4) unterteilen. REM Schlaf hingegen ist durch hohe Frequenz der Gehirnströme mit geringer Amplitude gekennzeichnet. In dieser Phase ist das Gehirn sehr aktiv, ähnlich dem Wachzustand. Man weiß auch, dass wir in diesen Phasen träumen und man nimmt an, dass in den Traumphasen im Wachzustand Erlebtes verarbeitet wird (Wafford und Ebert, 2008). Der Tief-

schlaf, auch slow wave sleep (SWS) genannt, ist vermutlich für die Konsoliderung des Gedächtnisses wichtig (Stickgold und Walker, 2007).

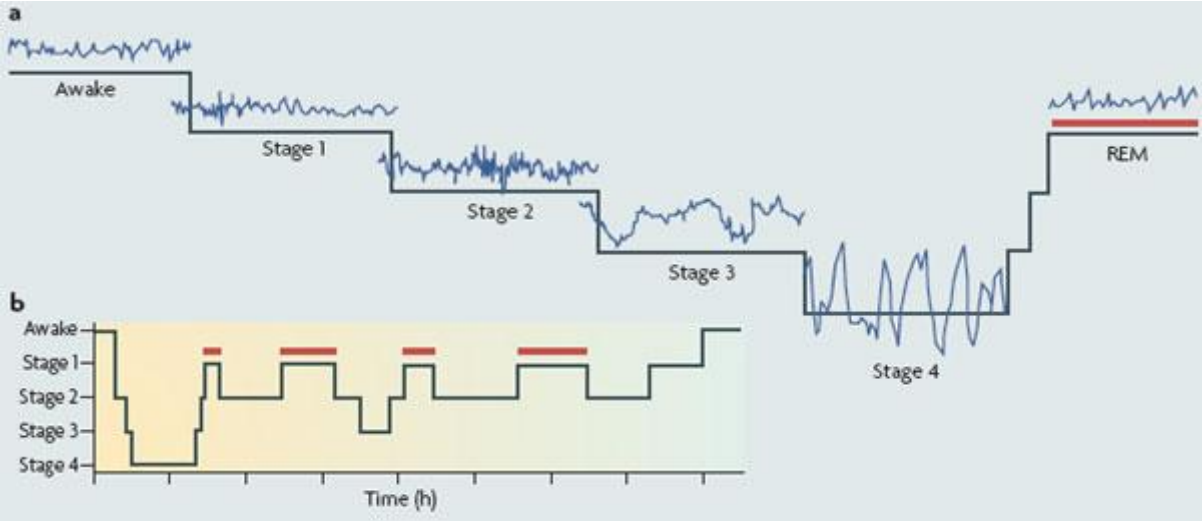


Abbildung 2: Schlafphasen (Wafford und Ebert, 2008)

1.2.2 Regulation des Schlafs und beteiligte Neurotransmitter

1916 forschte Baron von Economo, ein Wiener Neurologe, an einer speziellen Erkrankung, einem neuen Typ von Enzephalitis. Die Patienten schliefen übermäßig lange, bis zu 20 Stunden oder mehr pro Tag, und erwachten nur kurz um zu essen oder zu trinken. Die kognitiven Funktionen waren normal, dennoch entdeckte Economo Läsionen am Kontaktpunkt von Mittel- und Zwischenhirn (Saper et al., 2005). Er vermutete, dass es ein aufsteigendes, erweckendes/erregendes System („ascending arousal system“) gibt, das im Hirnstamm lokalisiert ist und das Vorderhirn wach hält. Erst später stellte sich heraus, dass er Recht behalten sollte (Saper et al., 2005; Schwartz und Roth, 2008). Im Laufe des 20. Jahrhunderts wurden die Mechanismen des Schlafs und seiner Regulation genauer aufgeklärt. Inzwischen weiß man, dass der Schlaf-Wach-Rhythmus eine sehr komplexe Angelegenheit ist und dass eine Vielzahl von neuronalen Systemen im Gehirn beteiligt ist (Saper et al., 2005).

Beteiligte Neurotransmittersysteme

An der Regulation vom Schlaf sind viele verschiedene Neurotransmittersysteme beteiligt (Sehgal und Mignot, 2011; Schwartz und Roth, 2008). Lange Zeit dachte man, Adenosin sei der wichtigste Neurotransmitter, da Koffein wachhält, indem es Adenosin Rezeptoren (A_1 und A_{2a}) antagonisiert (Bjorness und Greene, 2009; Sehgal und Mignot, 2011).

Knockout von A1-Rezeptoren zeigte aber keine grundlegenden Auswirkungen auf den Schlaf. Daraus konnte geschlossen werden, dass neben Adenosin noch weitere Neurotransmitter an der Schlafregulation beteiligt sind: Histamin, Dopamin, Acetylcholin, Serotonin und Noradrenalin, die den Wachzustand aufrechterhalten und GABA, welche schlaffördernd wirkt (Porrka-Heiskanen und Kalinchuk, 2010; Saper et al., 2005; Sehgal und Mignot, 2011; Wafford und Ebert, 2008).

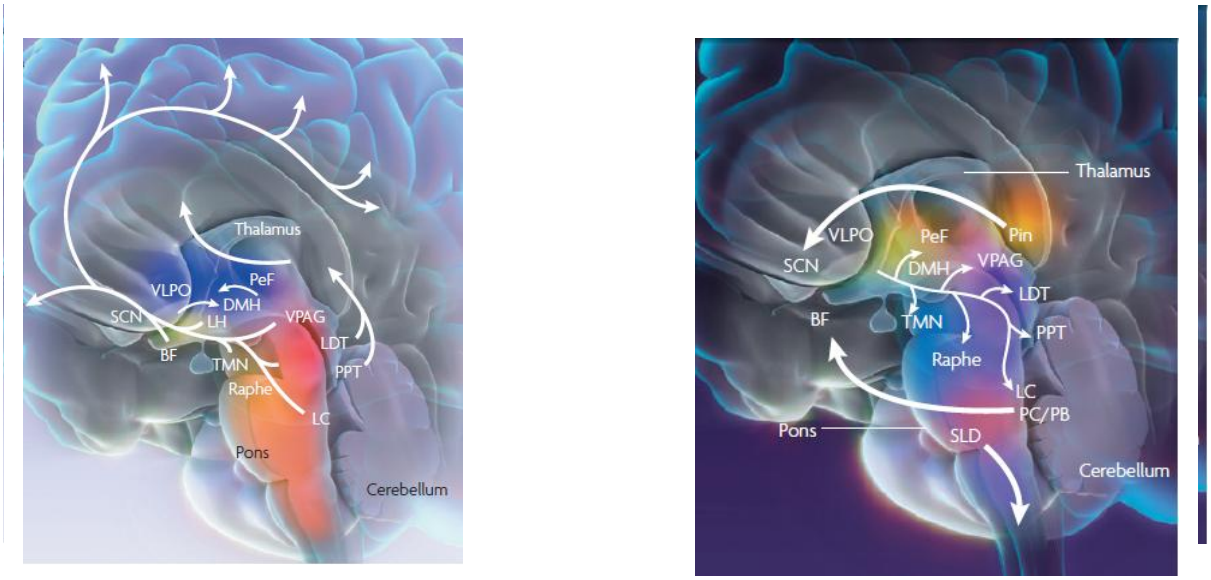


Abbildung 3: Darstellung der an der Schlafregulation beteiligten Gehirnareale (Wafford und Ebert, 2008)

VLPO („Flip Flop“) System

Eine Zellgruppe ist für die Induktion des Schlafs von besonderer Bedeutung: die Kerne des ventrolateralen präoptischen Areals (VLPO). Die VLPO schickt hemmende Signale an alle wichtigen Zellgruppen im Hypothalamus und im Hirnstamm, die am Wachzustand beteiligt sind. Die Neuronen der VLPO sind während des Schlafs hoch aktiv und beinhalten γ-Aminobuttersäure (GABA) und das Neuropeptid Galanin (Ebert et al., 2006; Saper et al., 2005; Sehgal und Mignot, 2011; Schwartz und Roth, 2008).

Während der Wachphase hemmen die für den Wachzustand zuständigen monoaminergen Zellgruppen die VLPO. Die für den Wachzustand notwendigen Zellgruppen sind dagegen hoch aktiv, wenn das VLPO System unterdrückt wird. Auf der anderen Seite ist das VLPO System ebenfalls in der Lage die für den Wachzustand notwendigen Zellgruppen zu hemmen. Im Schlaf ist es also umgekehrt: das VLPO System ist hoch aktiv und die für den Wachzustand notwendigen Zellgruppen sind gehemmt. Dadurch entsteht ein Schaltsystem, das für eine sehr klare Unterscheidung zwischen Wachzustand und Schlafzustand sorgt (siehe Abbildung 4). Dieses System ist allerdings sehr anfällig für ein plötzliches und ungewolltes Um-

schalten. Für mehr Stabilität sorgt, dass die für den Wachzustand nötigen Zellgruppen durch das Neuropeptid Orexin stimuliert werden. Die Orexin produzierenden Neuronen sind im Wachzustand sehr aktiv. Das VLPO System verfügt jedoch über keine Rezeptoren für Orexin, wird also nicht von Orexin gehemmt. Andererseits werden die Orexin produzierenden Zellen im Schlafzustand sehr wohl von VLPO gehemmt (Saper et al., 2005).

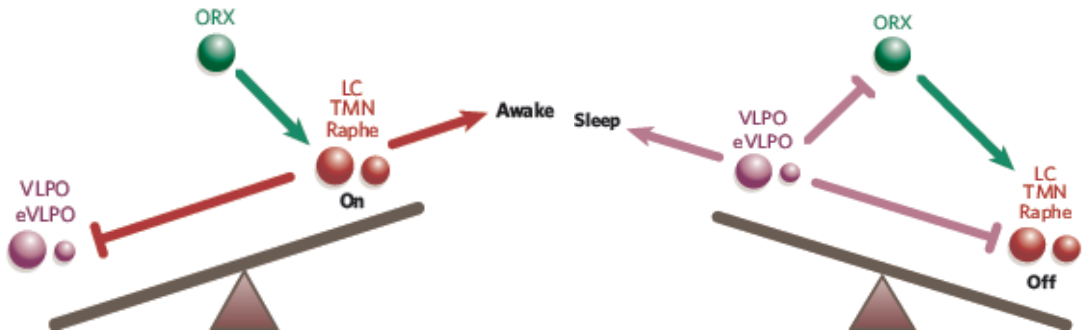


Abbildung 4: VLPO System (Saper et al., 2005)

Auch die Homöostase, der Circadiane Rhythmus und der Tages Zyklus haben Einfluss auf das System (Saper et al., 2005; Schwartz und Roth, 2008).

1.2.3 Klassifizierung von Schlafstörungen

Schlafstörungen treten häufig auf. Das „National Center of Sleep Disorders Research" zeigt, dass mehr als 40 Millionen Menschen in den Vereinigten Staaten von chronischen Beschwerden aufgrund verminderten/vermehrten Schlafs betroffen sind. Rund 35% davon haben unter anderem Schwierigkeiten einzuschlafen, den Schlaf aufrechtzuerhalten oder in der Früh aufzustehen. Bei 10% kommt es dadurch zu deutlicher Beeinträchtigung im normalen Tagesablauf (Chokroverty, 2010).

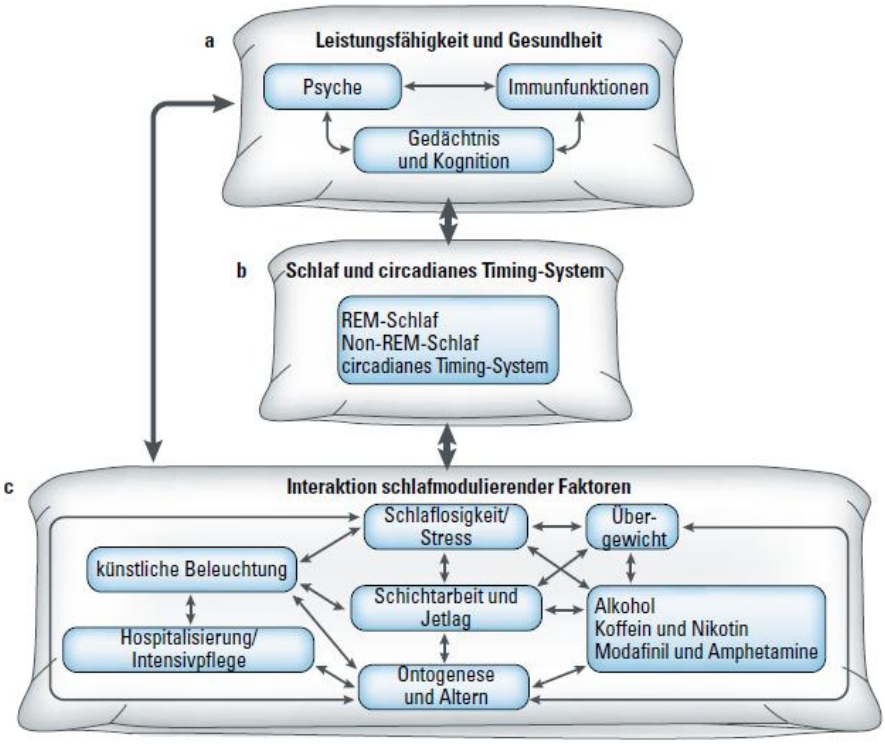


Abbildung 5: Faktoren, die Schlaf, Gesundheit und Leistungsfähigkeit beeinflussen (Foster und Wulff, 2005)

Um die so vielfältigen Schlafstörungen klassifizieren zu können, wurde die „International classification of sleep disorders“ (ICSD) von der American Sleep Disorder Assoziation (ASDA) ins Leben gerufen. Weiters gibt es das DSM IV System (Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders), das eine gekürzte, übersichtliche Einteilung aller Schlafstörungen enthält (Richert und Baran, 2003).

Nach DSM IV lassen sich Schlafstörungen in zwei Gruppen unterteilen: in primäre und sekundäre Schlafstörungen, wobei die sekundären als Folge einer psychischen Störung oder einer körperlichen Erkrankung gesehen werden können. Bei den primären Schlafstörungen handelt es sich hingegen um Störungen der physiologischen Mechanismen, die den Schlaf-Wach-Rhythmus steuern (Röschke und Mann, 1998).

Grundsätzlich teilt man die primären Schlafstörungen in Dyssomnien und Parasomnien ein (Richert und Baran, 2003).

Dyssomnien beinhalten Schlafstörungen wie (Richert und Baran; 2003):

- Insomnie
- Hypersomnie

- Schlafapnoe
- Narkolepsy

Parasomnien hingegen sind schlafbegleitende Störungen, die den Schlaf beeinträchtigen (Chokroverty, 2010; Mahowald und Schenck, 2005; Richert und Baran; 2003; Wilson et al. 2010). Dazu zählen zum Beispiel:

- Schlafwandeln
- Pavor nocturnus (Schlafangst)
- Albträume
- Bettnässen

DYSSOMNIEN

Insomnie

Insomnie ist die Schlafstörung, die die Bevölkerung am häufigsten betrifft. Mehr als 1/3 aller Erwachsenen leiden zeitweise an Insomnie und 2-6% nehmen daher schlafinduzierende Medikamente ein (Ebert et al., 2006; Ramakrishnan und Scheid, 2007; Wilson et al., 2010). Patienten, die an Insomnie leiden, haben Probleme einzuschlafen oder den Schlaf aufrecht zu erhalten. Sie klagen über unzureichenden Schlaf, der entweder zu kurz bzw. nicht erholsam genug ist, oder immer wieder unterbrochen wird (Wilson et al., 2010). Manchmal kommt es auch zu Kombinationen dieser Faktoren.

Die Insomnie kann man wiederum in zwei Kategorien einteilen. Die akute Insomnie, die weniger als 30 Tage andauert, sowie die chronische Insomnie, die durch eine Dauer von 30 Tagen oder länger gekennzeichnet ist. Häufig ist die Insomnie eine Begleiterscheinung anderer Erkrankungen. Nur 15-20% der Patienten mit chronischer Insomnie haben keine andere zusätzliche Diagnose (Ramakrishnan und Scheid, 2007). Daher sollten zu allererst physische (Schmerz, Herz oder Lungenkrankheiten), neurologische (Parkinson, etc.) oder psychische Störungen (wie Depressionen oder Angststörungen) ausgeschlossen werden. Häufig tritt Insomnie gepaart mit einer Depression auf (Ebert et al., 2006; Wilson et al., 2010).

Vom Schlafdefizit kann sich der Körper nur schwer erholen, wodurch vor allem das tägliche Leben beeinträchtigt wird (Wilson et al., 2010). Akute Schlaflosigkeit steht häufig in engem Zusammenhang mit Stress oder neurologischen Erkrankungen, aber auch der Einnahme von bestimmten Medikamenten, Drogen oder Alkohol. In einigen, wenigen Fällen ist keine Ursache zu finden (Chokroverty, 2009).

Hypersomnie

Unter Hypersomnie versteht man ein erhöhtes Schlafbedürfnis bzw. eine erhöhte Schläfrigkeit, wobei rund 4-6% der Bevölkerung davon betroffen sind (Dauvilliers und Buguet, 2005). Die Ursachen können sehr unterschiedlich sein (Dauvilliers und Buguet, 2005).

Obstruktives Schlafapnoe Syndrom (OSAS)

Von OSAS spricht man, wenn während des Schlafs mindestens fünf Atemstillstände auftreten oder wenn der Atemfluss auf maximal 50% des Ausgangwertes im Rahmen von EDS (Excessive Daytime Sleepiness) sinkt (Chrokroverty, 2010). OSAS ist mit einer Prävalenz von 4% bei Männern und 2% bei Frauen die häufigste Schlafstörung (Chokroverty, 2010; Mahowald und Schenck, 2005; Richert und Baran, 2003). Mit zunehmendem Alter steigt die Häufigkeit der Erkrankung. Die Ursachen von OSAS können sehr unterschiedlich sein, aber die Hauptursache stellt eine Relaxation der Schlundmuskulatur dar (Azagra-Calero, 2011).

Narkolepsie

Narkolepsie ist eine seltene neurologische Erkrankung, an der rund 0,026% der Bevölkerung leiden (Dauvilliers und Buguet, 2005). Die Hauptsymptome der Narkolepsie sind unter anderem Schlafattacken, Kataplexie (Verlust der Muskelkontrolle) und Schlaflähmungen. Die klassische Schlafattacke wird durch das unwiderstehliche Verlangen nach Schlaf in allen möglichen Situationen charakterisiert (Mahowald und Schenck, 2005; Dauvilliers und Buguet, 2005). Diese Schlafanfälle können von wenigen Sekunden bis zu einigen Minuten dauern. Danach fühlen sich die Patienten grundsätzlich erholt (Dauvilliers und Buguet, 2005). Die Frequenz der Attacken kann stark variieren, von täglich bis monatlich. Narkolepsie dauert das ganze Leben an, es kann höchstens zu zeitlichen Rückgängen oder Schwankungen kommen (Chokroverty, 2010).

PARASOMNIEN

Schlafwandeln

Der Schlafwandler zeigt komplexe Verhaltensmuster, die aus dem Tiefschlaf heraus beginnen (also nicht mit Träumen zusammenhängen) und zum Aufstehen und Herumgehen führen (Hoban, 2010). Die Patienten sind während der Episode nur schwer erweckbar; nach dem Aufwachen besteht eine vollständige Amnesie bezüglich der ausgeführten Handlungen. Hauptsäch-

lich leiden Kinder (1-17%) unter dieser Schlafstörung (Mahowald und Schenck, 2005). 10-jährige sind am häufigsten betroffen (Hoban, 2010).

Nachtangst (Pavor nocturnus)

Nachtangst tritt während des tiefen non-REM Schlafs auf, häufig im ersten Drittel der Schlafphase (Chokroverty, 2010). Oft erwacht die Person mit einem Schrei und Zeichen intensiver Angst (Jammern, Stöhnen und leises Weinen) (Mahowald und Schenck, 2005). Vor allem sind Kinder betroffen, wobei sie meist keine bzw. wenig Erinnerung an das Ereignis haben (Hoban, 2010).

Nächtliche Albträume

Albträume entstehen während der REM-Phase vor allem in der zweiten Hälfte der Schlafphase. Auch hier sind besonders Kinder betroffen (Hoban, 2010). Die Häufigkeit von Albträumen nimmt mit dem Alter ab, ältere Personen haben sehr selten bis keine Albträume. Weiters können Albträume als Nebenwirkung nach Einnahme von Antiparkinsonia, Anticholinergika und β-Blockern auftreten (Chokroverty, 2010).

Schlafbezogene Essstörungen

Häufig leiden Frauen im Alter zwischen 20 und 30 an schlafbezogenen Essstörungen. Während des Schlafs treten Phasen auf, in denen man unbeabsichtigt isst und trinkt. Manchmal legt der Patient ganz eigene Essgewohnheiten an den Tag. Er konsumiert ungenießbare Substanzen wie gefrorene Tiefkühlpizza, rohes Fleisch oder Katzenfutter. Die Ursache ist bislang unbekannt (Chokroverty, 2010).

1.2.4 Therapie von Schlafstörungen

Experten empfehlen vor allem für die häufigste Schlafstörung, die Insomnie, nicht primär eine Pharmakotherapie (Ramakrishnan und Scheid, 2007; Chokroverty, 2010). Entspannungsübungen sowie kognitive Verhaltenstherapien (cognitive behavioural therapy (CBT)) stehen im Fokus der Behandlung (Wafford und Ebert, 2008; Wilson et al., 2010). CBT kann dem individuellen Schlafproblem des Patienten zugeschnitten und durch Schlafhygiene oder Biofeedbackmethoden (z.B. bewusstes Kontrollieren der Atmung oder der Herzfrequenz) unterstützt werden. Kognitives Training und Psychotherapie können weiters helfen, wenn Ängste oder Sorgen Grund der Schlafstörung sind (Wafford und Ebert, 2008). Auch moderater Sport

kann die Schlafqualität verbessern und führt in manchen Fällen zu einem vergleichbaren Effekt wie bei Einnahme von Benzodiazepinen (Ramakrishnan und Scheid, 2007).

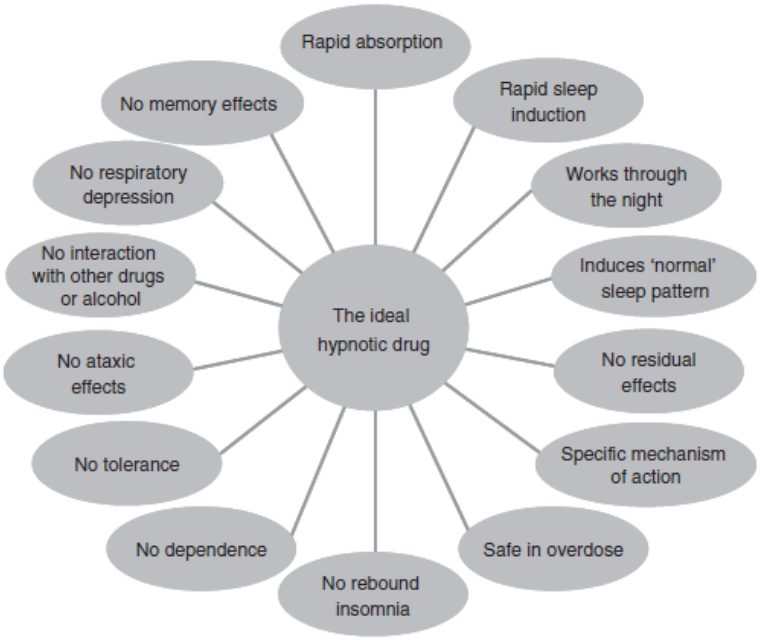


Abbildung 6: Anforderungen an ein ideales Schlafmittel (Wilson et al, 2010)

Das ideale Schlafmittel sollte alle Kriterien in Abbildung 6 erfüllen. Da es schier unmöglich scheint, alle Punkte zu erfüllen, legt man Augenmerk auf die schrittweise Verbesserung uns bereits bekannter Hypnotika (Wilson et al., 2010). Wichtig ist, die Schlafqualität und -quantität zu verbessern ohne gravierende Nebenwirkungen mit sich zu bringen („hang over" etc.) (Ramakrishnan und Scheid, 2007).

Die meisten Hypnotika greifen am GABAergen System an (Wilson et al., 2010; Sieghart, 2006). Zu ihnen zählen:

- Benzodiazepine
- „Z-drugs" (Zolpidem, Zopiclon, Zaleplon)

Benzodiazepine gehören zu den am häufigsten verwendeten Hypnotika (Möhler, 2002). 1960 wurde das Benzodiazepin Chlordiazepoxid eingeführt, 1963 folgte Diazepam (besser bekannt unter dem Markennamen Valium®) und schon bald ersetzten sie die Barbiturate (geringe therapeutische Breite und hohes Abhängigkeitspotential) in ihrem Einsatzgebiet als Schlafmittel. In den 70igern und 80igern kam es sogar zu Rekordverschreibungen (Wafford und Ebert, 2008). Wie Barbiturate greifen auch sie an $GABA_A$ Kanälen an, führen zu einem inhibitori-

schen postsynaptischen Potential und induzieren somit unter anderem Schlaf (näheres dazu im Kapitel $GABA_A$ Rezeptor Modulatoren).

Neu entwickelte $GABA_A$ Rezeptor Modulatoren wie ZOLPIDEM, ZALEPLON und ZOPICLON sind derzeit führend in der Therapie von Schlafstörungen (Ebert et al., 2006; Wafford und Ebert, 2008). Die Gründe für die Entwicklung der „Z-drugs" liegen vor allem in ihrer Pharmakokinetik. Man wollte Arzneimittel mit einer kürzeren Halbwertszeit und daraus resultierend geringeren Nebenwirkungen (z.B. „hang-over") entwickeln. Arzneistoffe mit einer Halbwertszeit von mehr als 6 Stunden neigen dazu, einen hang-over am Morgen zu induzieren, da auch tagsüber ausreichende Mengen des Arzneistoffs im Gehirn verbleiben. Dieser unerwünschte Effekt tauchte vor allem bei den ersten Benzodiazepinen wie Nitrazepam auf, was zu Sedierung und Tagesmüdigkeit führte. Die sehr kurze Halbwertszeit von den „Z-drugs" macht es möglich, die Hypnotika fünf Stunden vor der gewünschten Zeit des Erwachens einzunehmen, ohne ein Risiko eines hang-overs einzugehen (Wilson et al., 2010). Der Nachteil, den diese Medikamente zweifelsohne mit sich bringen, ist, dass sie den Schlaf während der Nacht nicht aufrecht erhalten können, was vor allem bei Patienten mit Durchschlafstörungen nicht außer Acht zu lassen ist. (Ebert et al., 2006; Wilson et al., 2010)

Weitere Behandlungsmethoden

Daneben werden viele Phytopharmaka (Baldrianwurzel, Passionsblume, Hopfen, Melisse, Lavendel, Orangenblüte) und Melatonin als Schlafmittel verwendet (Ebert et al., 2006; Ramakrishnan und Scheid, 2007; Wheatley, 2005).

Auch Antihistaminika der 1. Generation (z.B. Diphenhydramin) können bei leichter Insomnie eingesetzt werden. Kurzfristig können auch sie Schlafprobleme verbessern, lösen jedoch häufig Nebenwirkungen wie Tagesschläfrigkeit aus und führen ebenfalls zu Toleranzentwicklung. Somit sind auch sie nicht für den längeren Gebrauch empfohlen (Wafford und Ebert, 2008). In den letzten Jahren wurden vor allem Antidepressiva wie Trazodon oder Nefazodon (Serotoninwiederaufnahmehemmer) in der Therapie von Schlafstörungen eingesetzt. Sie erwiesen sich vor allem bei Schlafstörungen, die mit einer Depression einhergehen, als wirksam (Wafford und Ebert, 2008).

1.3 γ-Aminobuttersäure als inhibitorischer Neurotransmitter

γ- Aminobuttersäure (GABA) wurde erstmals Anfang des 19. Jahrhunderts in Bakterien entdeckt. Rund 40 Jahre vergingen, bis man GABA auch im Gehirn von Säugetieren fand

(Awapara et al., 1950). Bereits 1967 konnte gezeigt werden, dass GABA ein wichtiger inhibitorischer Neurotransmitter in der Großhirnrinde ist und darüber hinaus seine Wirkung über die Bewegung von Chloridionen auslöst (Henschel et al., 2008). Heute ist bestätigt, dass GABA der wichtigste inhibitorische Neurotransmitter ist und rund zwanzig Prozent aller Neuronen GABAerg sind (Ebert et al., 2006; Henschel et al., 2008; Olsen und Sieghart, 2009; Treiman, 2001; Kopp et al., 2010).

Für die kortikale Erregung bzw. Hemmung ist die Balance zwischen inhibitorischen und exzitatorischen Neurotransmittern essentiell. Der wichtigste exzitatorische Neurotransmitter Glutamat und der wichtigste inhibitorische Neurotransmitter GABA unterscheiden sich strukturell nur durch eine Carboxylgruppe (Petroff, 2002). GABA entsteht aus Glutamat durch eine Decarboxylierung, katalysiert vom Enzym Glutaminsäuredecarboxylase (GAD), welches beinahe ausschließlich in GABAergen Neuronen vorkommt. Wichtig für die Funktion von GAD ist das Vorhandensein vom Cofaktor Pyridoxalphosphat (Vitamin B6), daher kann ein Vitamin B6-Mangel zu verminderter GABA-Synthese führen, was wiederum häufig in erhöhter Krampfneigung und mentaler Retardierung resultiert (D'Hulst et al., 2009). Neuronen und Gliazellen beinhalten die sog. GABA Transporter 1-3 (GAT 1-3), die GABA schließlich aus dem synaptischen Spalt wieder entfernen (D'Hulst et al., 2009).

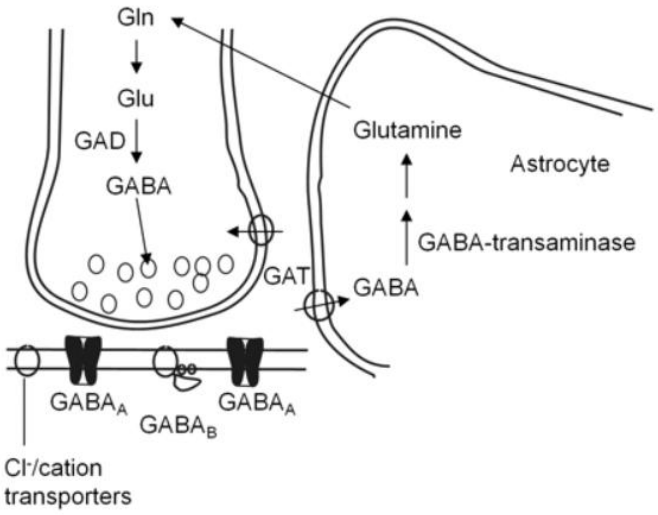


Abbildung 7: Schematische Darstellung einer Synapse und der Umwandlung von Glutamat zu GABA bzw. GABA zu Glutamat (Uusi-Oukari und Korpi, 2010)

GABA aktiviert zwei unterschiedliche Typen von Rezeptoren (Dawson et al., 2005; Olsen und Sieghart, 2008; Henschel et al., 2008):

- ionotrope $GABA_A$ Rezeptoren
- metabotrope $GABA_B$ Rezeptoren

Beide Klassen von GABA-aktivierten Rezeptoren sind an der Regulation von Gefühlen, Schmerz, des Muskeltonus und der Wahrnehmung beteiligt. Weiters spielt der $GABA_B$ Rezeptor eine wichtige Rolle bei Epilepsie, verschiedensten Schmerzzuständen, oder bei Refluxösophagitis (GERD). Daher sind $GABA_B$ und $GABA_A$ Rezeptoren wichtige Ziele für eine große Gruppe klinisch verwendeter Arzneimittel (z.B. Benzodiazepine, Baclofen; Winsky-Sommerer, 2009; Rudolph und Knoflach, 2011; D'Hulst et al., 2009; Cryan und Kaupmann, 2005)

$GABA_B$ Rezeptor

Der $GABA_B$ Rezeptor gehört zu den metabotropen Rezeptoren und ist ein G-Protein gekoppelter Rezeptor. $GABA_B$ Rezeptoren bestehen aus zwei Untereinheiten, $GABA_B$ (1) und $GABA_B$ (2). Alle derzeit bekannten $GABA_B$ Rezeptor Agonisten und kompetitiven Antagonisten binden nur an die $GABA_B$ (1) Untereinheit, wohingegen die $GABA_B$ (2) Untereinheit essentiell für die Kopplung des G-Proteins ($G_{i/0}$) ist (Padgett und Slesinger, 2010). Zwei $GABA_B$ (1) Isoformen sind derzeit im ZNS bekannt $GABA_B$ (1a) und $GABA_B$ (1b), welche sich nur am N-Terminus unterscheiden (Cryan und Kaupmann, 2005).

$GABA_B$ Rezeptoren kommen im Gehirn in den unterschiedlichsten Zelltypen vor, darunter auch in Interneuronen und Gliazellen. Im limbischen System sind sie an der Regulation von Emotionen beteiligt. $GABA_B$ Rezeptoren können sowohl prä- als auch postsynaptisch lokalisiert sein. Präsynaptisch vorkommende $GABA_B$ Rezeptoren hemmen nicht nur die Freisetzung von GABA, sondern auch die Freisetzung von einigen anderen Neurotransmittern wie zum Beispiel Glutamat. Sie unterdrücken den Calcium-Einstrom spannunsgsabhängiger Calcium-Kanäle. Postsynaptisch vorkommende $GABA_B$ Rezeptoren aktivieren K^+ Kanäle und führen dadurch zu einem inhibitorischen postsynaptischen Potential (IPSP) (Cryan und Kaupmann, 2005; Treiman, 2001).

Baclofen, ein GABA-Analogon, wurde erstmals im Jahre 1962 von Heinrich Keberle synthetisiert und ist der wichtigste $GABA_B$ Agonist. Baclofen wird klinisch vor allem als Muskelrelaxans bei Spasmen nach Rückenmarksverletzungen oder Multipler Sklerose verwendet (Lioresal®) (Beard et al., 2003).

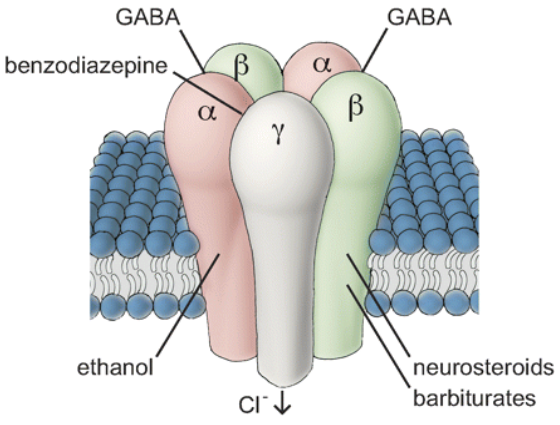
1.4 $GABA_A$ Rezeptoren

$GABA_A$ Rezeptoren sind die wichtigsten, inhibitorischen Neurotransmitterrezeptoren im Gehirn von Säugetieren (D'Hulst et al., 2009; Ernst et al., 2005; Uusi-Oukari und Korpi, 2010; Zaugg et al., 2010). Die Bindung von GABA an den $GABA_A$ Rezeptor führt zu einer Öffnung der Kanalpore, wodurch negativ geladene Chloridionen ins Zellinnere strömen und so zu einer Hyperpolarisation führen (Farrant und Nusser, 2005; Meldrum und Rogawski, 2007; Olsen und Sieghart, 2008). Dadurch entsteht das sogenannte inhibitorische, postsynaptische Potential (IPSP), wodurch die Wahrscheinlichkeit, dass die Neuronen feuern, verringert wird (d'Hulst et al., 2009).

1.4.1 Funktion und Struktur des $GABA_A$ Rezeptors

$GABA_A$ Rezeptoren gehören zur Familie der Liganden-gesteuerten Ionenkanäle wie auch der nikotinerge Acetylcholin Rezeptor (nAChR), der 5-Hydroxytryptamin Typ 3 Rezeptor (5-HT_3) oder auch der Glycin Rezeptor (Goetz et al., 2007). Während nACh- und 5-HT_3 Rezeptoren kationenselektive Kanäle sind, und daher auch exzitatorische Transmission vermitteln, sind $GABA_A$ und Glycin Rezeptoren anionenselektiv und vermitteln inhibitorische Neurotransmission.

$GABA_A$ Rezeptoren sind pentamere Komplexe, die sich aus 19 verschiedenen Untereinheiten (derzeit bekannt sind: α_{1-6}, β_{1-3}, γ_{1-3}, δ, ε, θ, π, ρ_{1-3}) zusammensetzen können (Ebert et al., 2006; Simon et al., 2004; Rudolph und Knoflach, 2011; Möhler, 2006; Zaugg et al., 2009), wobei die meisten $GABA_A$ Rezeptoren zwei α, zwei β und eine γ Untereinheit beinhalten (Baumann et al., 2002; Sieghart und Sperk, 2002, Rudolph und Knoflach, 2011).



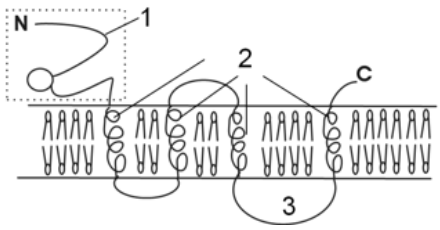


Abbildung 8: Schematische Darstellung eines $GABA_A$ Rezeptoren mit vermuteten Bindungsstellen diverser Modulatoren. Darstellung einer $GABA_A$ Rezeptor Untereinheit **(**Uusi-Oukari und Korpi, 2010).

Jede Untereinheit (siehe auch Abbildung 8) hat eine lange extrazelluläre N-terminale Domäne und einen kurzen, extrazellulären C-Terminus. Weiters besitzt jede Untereinheit des $GABA_A$ Rezeptors 4 α helikale, transmembranäre Domänen (TM1-TM4) und zwischen TM3 und TM4 einen großen, intrazellulären loop. Die meisten Agonisten bzw. Liganden binden an die N-terminale Domäne. Die TM2 Domänen aller Untereinheiten bilden die Kanalpore (Henschel et al., 2008). Typisch für $GABA_A$ Rezeptoren ist auch ein sog. Cys-loop in der N-terminale Domäne (daher auch die Bezeichnung „Cys-Loop Rezeptoren“). Jede der fünf Untereinheiten besitzt extrazellulär eine charakteristische Sequenz von 13 Aminosäuren, die von zwei Cysteinen eingeschlossen ist (Miller und Smart, 2010). Durch eine kovalente Bindung zwischen diesen beiden Cysteinen (Disulfidbrücke) entsteht dieser vorher erwähnte geschlossene loop (Sine und Engel, 2006; Goetz et al., 2007; Olsen und Sieghart, 2008).

Untereinheiten

Wie vorher schon erwähnt, bestehen $GABA_A$ Kanäle aus fünf Untereinheiten, die aus einem Repertoire von 19 Untereinheiten unterschiedlich zusammengesetzt sein können: $\alpha_{1\text{-}6}$, $\beta_{1\text{-}3}$, $\gamma_{1\text{-}3}$, δ, ε, θ, π, $\rho_{1\text{-}3}$. (Uusi-Oukari und Korpi, 2010; Rudolph und Knoflach, 2011, Möhler, 2006). Die vielen Splice-Varianten mit einbezogen, könnten deutlich mehr als 10.000 verschiedene Kombinationen gebildet werden (McKernan and Whiting, 1996). Über 2000 unterschiedliche $GABA_A$ Rezeptoren könnten allein gebildet werden, wenn nur zwei α, zwei β und eine beliebige dritte Untereinheit kombiniert werden würden (Möhler, 2006). Trotzdem können nicht alle Untereinheiten wahllos miteinander kombiniert werden (Sieghart, 2006).
Die meisten $GABA_A$ Rezeptoren sind aus 2α, 2β und einer γ Untereinheit (Verhältnis 2:2:1) zusammengesetzt, wobei die vier α und β Untereinheiten abwechselnd angeordnet sind und durch die γ Untereinheit komplettiert werden (siehe Abbildung 8) (Sieghart, 2006). Seltener beinhalten $GABA_A$ Rezeptoren δ, ε oder π Untereinheiten, die die γ Untereinheit ersetzen können. Die θ Untereinheit ist wiederum ein Ersatz für die β Untereinheit (Sieghart, 2006; Winsky-Sommerer, 2009). Insgesamt betrachtet, treten weniger als 20 Untereinheit Kompositionen häufig auf, wobei $\alpha_1\beta_{2/3}\gamma_2$, $\alpha_2\beta_3\gamma_2$ und $\alpha_3\beta_3\gamma_2$ zu den drei häufigsten Kombinationen zählen (Möhler, 2006; Morlock und Czajkowski, 2011). Interessanterweise hat das regionale Vorkommen im Gehirn Einfluss auf die Zusammensetzung der Rezeptoren (Rudolph und Knoflach, 2011).

Untereinheiten-Kombination	Regionales Vorkommen	Vorkommen in %
$\alpha_1\beta_2\gamma_2$	Cortex (Schicht I-VI), Thalamus, Pallidum, Hippocampus, Amygdala, Substantia nigra, etc.	60%
$\alpha_2\beta_3\gamma_2$	Cortex (Schicht I-IV), Hippocampus, Striatum, Hypothalamus, Amygdala, etc.	15-20%
$\alpha_3\beta_n\gamma_2$	Cortex, Hippocampus, Nucleus reticularis, Thalamus, Hirnstamm, Locus Coreleus, etc.	10-15%
$\alpha_5\beta_3\gamma_3$	Cortex, Hippocampus, Amygdala, Hypothalamus, etc.	Weniger als 5%
$\alpha_6\beta_{2/3}\gamma_2\delta$	Cerebellum	Weniger als 5%

Tabelle 1: Häufigkeit und regionales Vorkommen verschiedener $GABA_A$ Untereinheit Kombinationen (adaptiert nach Möhler, 2006; Winsky-Sommerer, 2009)

Die Zusammensetzung des $GABA_A$ Rezeptors ist deshalb von so großer Bedeutung, da über die verschiedenen Untereinheiten unterschiedliche Wirkungen hervorgerufen werden (Abbildung 9). Zum Beispiel wird die sedierende Wirkung von Benzodiazepinen über die α_1 Untereinheit vermittelt und über die α_2 Untereinheit Anxiolyse. An der Toleranzentwicklung sind sogar zwei Untereinheiten beteiligt, nämlich α_1 und α_5 (siehe auch Kapitel Benzodiazepine) (Möhler, 2006). Verschiedene Untersuchungen legen nahe, dass es in Zukunft möglich sein sollte, mit für Untereinheiten-selektiven Substanzen spezifische Wirkungen hervorzurufen. Zum Beispiel sollte es so möglich sein, anxiolytische von sedativer Wirkung zu trennen (Rudoph und Knoflach 2011).

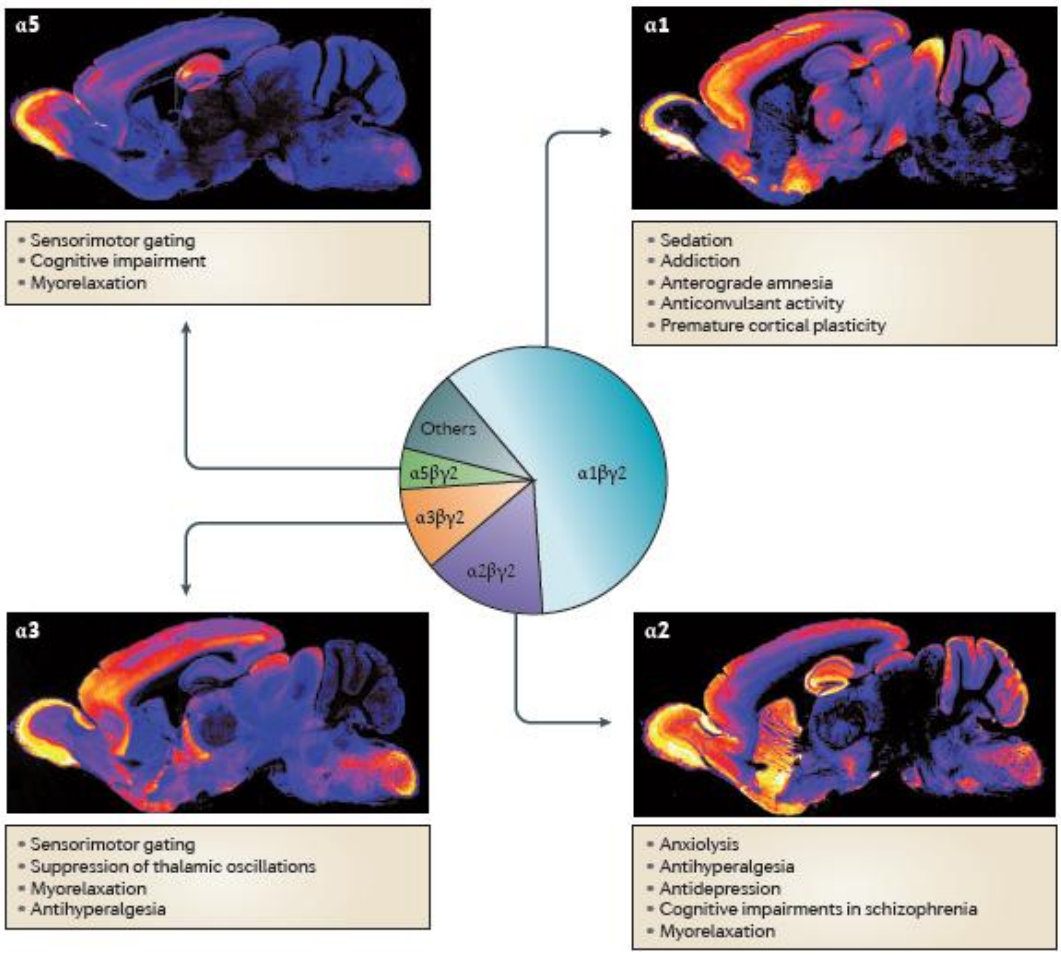


Abbildung 9: Pharmakologische Effekte und Verteilung der $GABA_A$ Rezeptor α Untereinheiten im Hirn von Maus (Rudolph und Knoflach, 2011)

1.4.2 Die GABA-Bindungsstelle

Es gibt zwei Bindungsstellen für GABA an $GABA_A$ Rezeptoren, die jeweils extrazellulär zwischen einer α und einer β Untereinheit liegen (Uusi-Oukari und Korpi, 2010; Rudolph und Knoflach, 2011; Goetz et al., 2007). Jede Bindungsstelle wird durch sechs „loops" gebildet. Loop A, B und C gehören zur β Untereinheit auf der + Seite und loop D, E und F sind auf der α Untereinheit an der - (komplementären) Seite lokalisiert (Ernst et al., 2003). Essentiell für die Bindung von GABA an $GABA_A$ Rezeptoren sind unter anderem (am Beispiel $\alpha_1\beta_2$ Rezeptoren; Boileau, 2002):

loop D: Phe_{64}, Arg_{66}, Ser_{68}

loop E: Arg_{119}, Ile_{120}

} α_1 Untereinheit

loop B: Tyr_{157}, Thr_{160}

loop C: Thr_{202}, Ser_{204}, Tyr_{205}, Arg_{207}, Ser_{209}

} β_2 Untereinheit

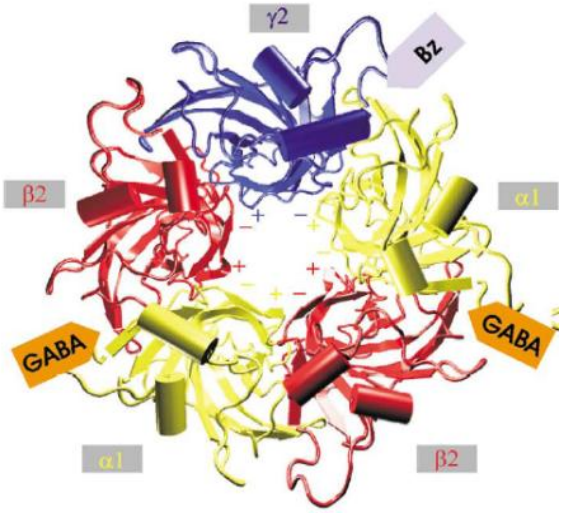


Abbildung 10: Schematische Darstellung der GABA Bindungsstelle (Ernst et al., 2003)

1.4.3 Modulatoren von $GABA_A$ Rezeptoren

$GABA_A$ Rezeptoren werden von einer Vielzahl klinisch relevanter Arzneistoffe (z.B. Benzodiazepine), aber auch von diversen anderen Substanzen (z.B. Alkohol) moduliert (Ernst et al., 2005; Rudolph und Knoflach, 2011; Winsky-Sommerer, 2009)

1.4.3.1 Benzodiazepine

Benzodiazepine sind allosterische Modulatoren von $GABA_A$ Rezeptoren, d.h. sie erhöhen durch eine Konformationsänderung die apparente Affinität des Rezeptors für GABA (Anwesenheit von GABA für die Wirkung daher essentiell), führen zu einer gesteigerten Kanalöffnungsfrequenz und in weiterer Folge zu einem erhöhten Chlorideinstrom bzw. einer geringeren Erregbarkeit (Henschel et al., 2008; Tan et al., 2011).

1957 wurde das erste Benzodiazepin Chlordiazepoxid (Librium) von L.H. Sternbach und Randall synthetisiert (Gerecke, 1983; Tan et al., 2011; Nemeroff, 2003). Wie in Abbildung 12 dargestellt, besteht die Grundstruktur aus einem Diazepin Ring (Ring B), wobei die zwei Stickstoffatome meist in Position 1 und 4 angeordnet sind, und einem annelierten Benzen

Ring (Ring A). An Position 5 hängt typischerweise eine Phenylgruppe (Ring C) (Rudolph und Knoflach, 2011).

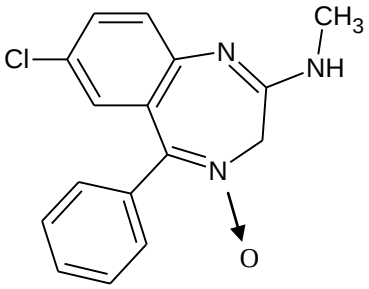
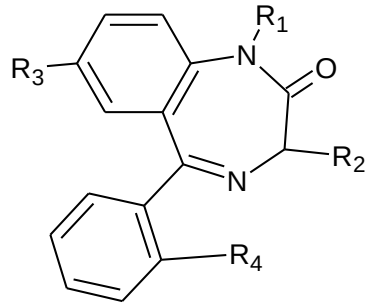


Abbildung 11: Chlordiazepoxid

Mit der Zeit stellte sich heraus, dass weder die Methylaminogruppe in Position 2, noch das Oxid am Stickstoffatom in Position 4 eine Notwendigkeit für die Wirkung darstellen. In Anlehnung daran, wurden weitere Benzodiazepine synthetisiert wie zum Beispiel Diazepam, das eine drei- bis zehnfache Wirkstärke von Chlordiazepoxid besitzt (Nemeroff, 2003). (Abbildung 11) Essentiell für die Wirksamkeit ist der elektronegative Substituent in Position 7. Die Wirkstärke steigt, wenn Halogene (F, Cl) in Position 2‘ vorhanden sind, und sinkt bei Halogenen in Position 4‘. In Position 1 scheint eine Methylgruppe die biologische Aktivität der Benzodiazepine zu steigern (Gerecke; 1983).



Benzodiazepine	R1	R2	R3	R4
Diazepam	CH3	H	Cl	H
Oxazepam	H	OH	Cl	H
Lorazepam	H	OH	Cl	Cl
Nitrazepam	H	H	NO2	H

Abbildung 12: Benzodiazepin (5-Phenyl-1,3-dihydro-2H-1,4-benzodiazepin-2on) Analoga

Weiters kann auch der Benzen Ring A durch einen Thiophen, Pyrazol oder Pyridin Ring ersetzt werden, ohne dass dabei die Wirkstärke sinkt. Im Ring B können die beiden Stickstoffatome von Position 1,4 auf 1,5 gewechselt werden, wie es bei Clobazam der Fall ist. (Abbildung 12). Der Ring C kann auch durch eine 2 Pyridyl- oder Cyclohexenylgruppe ersetzt werden (Gerecke; 1983).

Seit der Entdeckung von Chlordiazepoxid wurden rund 30 weitere Benzodiazepine (Oxazepam, Clorazepat, Lorazepam, Alprazolam, Clonazepam, etc.) für die klinische Verwendung registriert (Tan et al., 2011). Früh verdrängten sie aufgrund ihrer größeren therapeutischen Breite die Barbiturate (vor allem als Schlafmittel). In den 70igern und 80igern kam es sogar zu Rekordverschreibungen (Wafford und Ebert, 2008) und heute zählen sie noch immer zu den am häufigsten verschriebenen Arzneimitteln (Rudolph und Knoflach, 2011).

Die Wirkung von Benzodiazepinen zeigt sich in vielen verschiedenen Bereichen: Sie wirken nicht nur sedierend-hypnotisch (verkürzen den Schlafeintritt), sondern auch anxiolytisch, muskelrelaxierend und antikonvulsiv (Rudolph und Knoflach, 2011; Tan et al., 2011; Möhler, 2011). Weiters induzieren Benzodiazepine anterograde Amnesie, was zumeist als unerwünschter Nebeneffekt auftritt, in einigen wenigen Situationen (z.B. ambulante Eingriffe) aber auch von Vorteil sein kann (Tan et al., 2011).

Grundsätzlich gelten Benzodiazepine -wenn in Monotherapie eingesetzt- als sichere Medikamente und sollten vor allem für Kurzzeittherapien genutzt werden (Tan et al., 2011). Ihre Langzeitverwendung wird kontrovers diskutiert, da es zu Toleranzentwicklung und physischer Abhängigkeit kommen kann (Rudolph und Knoflach, 2011) Wie die meisten Substanzen, die Abhängigkeit hervorrufen, führen auch Benzodiazepine zu einem erhöhten Dopaminspiegel im mesolimbischen, dopaminergen System (Belohnungssystem) (Tan et al., 2011). Beim abrupten Absetzen der Benzodiazepine können Entzugserscheinungen wie Angst oder Ruhelosigkeit auftreten (Nemeroff, 2003).

Benzodiazepine binden zwischen der α und γ Untereinheit des $GABA_A$ Kanals, also räumlich von der GABA Bindungsstelle (zwischen α und β) getrennt. Erwiesenermaßen ist ein Histidin Rest (H101) innerhalb der α_1 Untereinheit bzw. gleichermaßen in α_2, α_3 und α_5 Untereinheit (H101, H126, H105) für die Benzodiazepin Wirkung essentiell. $GABA_A$ Rezeptoren, die α_4 oder α_6 Untereinheiten beinhalten, werden nicht von Benzodiazepinen moduliert, da sie anstelle des Histidins einen Arginin-Rest in der korrespondierenden Position tragen (Tan et al., 2011; Henschel et al., 2008). Für die Bindung der Benzodiazepine ist das Vorhandensein einer γ_2 Untereinheit mit einem Phenylalaninrest an der Position 77 essentiell (Wingrove et al, 1997).

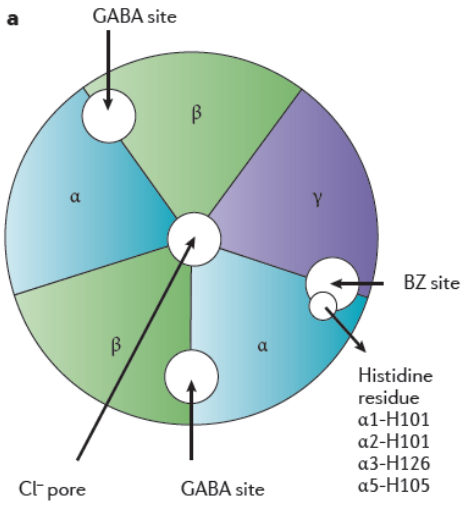


Abbildung 13: Bindungsstellen von GABA und Benzodiazepinen am $GABA_A$ Rezeptor (Rudolph und Knoflach 2011)

Die Wirkungen der Benzodiazepine korrelieren mit dem Vorhandensein spezifischer α-Untereinheitenisoformen (Rudolph und Knoflach, 2011; Tan et al., 2011; Möhler, 2006).

α_1 Untereinheit: Sedierung, Amnesie, antikonvulsiv, Abhängigkeit

α_2 Untereinheit: Anxiolyse, Muskelrelaxation

α_3 Untereinheit: Muskelrelaxation

α_5 Untereinheit: Muskelrelaxation, Amnesie

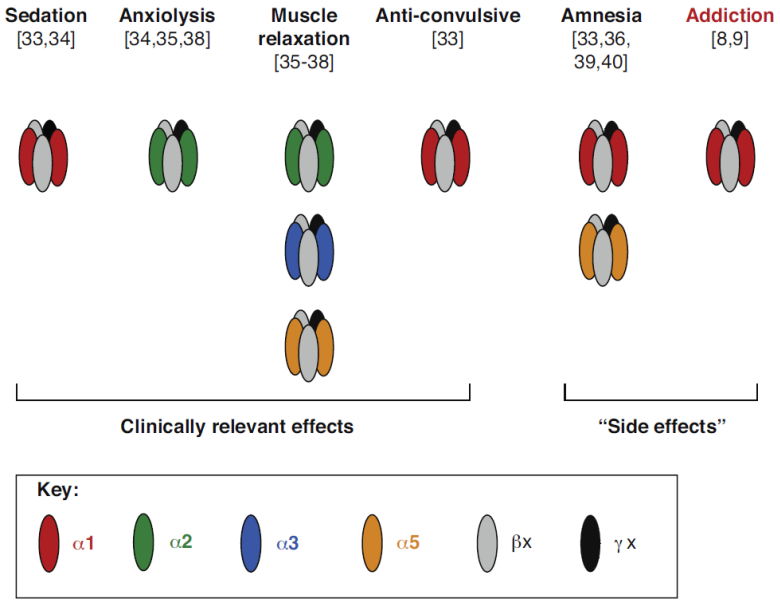


Abbildung 14: Einteilung der Rezeptoren und ihrer zugeordneten Wirkungen (Tan et al., 2011)

Man könnte versuchen, durch Molekül-modelling die Selektivität für spezifische Untereinheiten zu erhöhen und so die unerwünschten Wirkungen der Benzodiazepine zu vermindern (Rudolph und Knoflach, 2011; Tan et al., 2011; Möhler, 2006).

1.4.3.2 Barbiturate

Eine weitere Arzneistoffgruppe, die den $GABA_A$ Kanal modulieren, sind die Barbiturate (Phenobarbital, Pentobarbital, etc.). Sie wurden früher häufig zur Behandlung von Angststörungen, Schlaflosigkeit, Muskelspasmen, etc. eingesetzt. Obwohl sie heutzutage fast vollkommen von den Benzodiazepinen ersetzt worden sind, finden sie noch immer als Anästhetika (kurz wirkende: u.a. Thiopental) und Antikonvulsiva (lang wirkende: u.a. Phenobarbital) Verwendung (López-Muñoz et al., 2005; Tan et al., 2011). Barbiturate wurden von den Benzodiazepinen abgelöst wegen der leichten Überdosierbarkeit der Barbiturate (geringe therapeutische Breite). In niedrigen Konzentrationen (µM) wirken sie als positiv allosterische Modulatoren, aber in höheren Konzentrationen (ab 50 µM) (Henschel et al., 2008) können sie den $GABA_A$ Kanal direkt ohne Anwesenheit von GABA öffnen, was leicht zu einer Überdosis führen kann. Interessanterweise beeinflussen sie nicht die Kanalöffnungsfrequenz, sondern die Dauer der Kanalöffnung (Henschel et al., 2008; Sieghart; 2006). Überdosierung kann sich unter anderem in Verwirrtheit, Albträumen, Halluzinationen, Lethargie und Atemlähmung äußern (Ramakrishnan und Scheid, 2007). Ein weiterer Grund für das bevorzugte Einsetzen von Benzodiazepinen ist das hohe Abhängigkeitspotential der Barbiturate (Tan et al., 2011).

1.4.3.3 Steroide und Anästhetika

Einige Steroide, wie das Anästhetikum Alphaxalon oder die sedativ, anxiolytisch und antikonvulsiv wirkenden 3α hydroxylierten, 5α oder 5β reduzierten Metabolite von Progesteron und Deoxycorticosteron potenzieren bereits im nM Bereich GABA-induzierte Chloridionenströme (Sieghart; 2006).

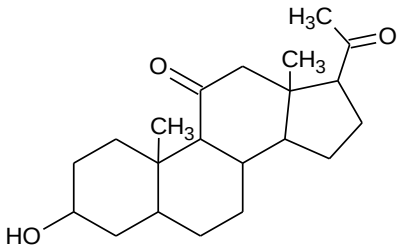
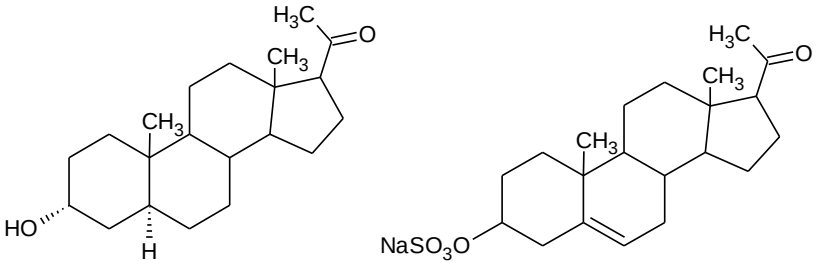


Abbildung 15: Alphaxalon

Bei Konzentrationen > 1µM, öffnen diese Steroide (wie die Barbiturate) den $GABA_A$ Kanal direkt, was auf mindestens zwei verschiedene Steroid Bindungsstellen am $GABA_A$ Rezeptor hinweist. Anders als BZ (erhöhen Kanalöffnungsfrequenz) oder Barbiturate (erhöhen Dauer der Kanalöffnung) können Steroide beides erhöhen, die Kanalöffnungsfrequenz und auch die Dauer der Chlorid Kanal Öffnung (Sieghart, 2006).
Gegenteilig wirken hingegen sulfatierte Neurosteroide wie z.B. Pregnenolonsulfat. Sie sind nicht-kompetitive Antagonisten an $GABA_A$ Rezeptoren, führen zu Exzitation und induzieren daher in weiterer Folge Angst und Krampanfälle (Sieghart, 2006).
Es gibt Hinweise, dass Großteils $GABA_A$ Rezeptoren mit einer δ Untereinheit von Neurosteroiden moduliert werden, da die Steroidwirkung bei Mäusen, denen GABA Rezeptoren mit einer δ Untereinheit fehlen, stark reduziert ist (Sieghart, 2006).



3α-OH-5α- Pregnan-20on

Pregnenolonsulfat

Abbildung 16: Links ein $GABA_A$ Kanal aktivierendes Progesteron Derivat; rechts das $GABA_A$ Kanal antagonisierende Pregnolonsulfat

Zusätzlich zu den anästhetisch wirkenden Steroiden, Barbituraten und ähnlichen Substanzen wie Etomidat oder Etazolat, gibt es eine Reihe weiterer Anästhetika verschiedenster chemischer Klassen, die alle den $GABA_A$ Kanal modulieren. Die Inhalationsanästhetika Isofluran, Enfluran oder Halothan steigern in niedrigen und hohen Konzentrationen (µM Bereich) und die Anästhetika Chlormethiazol oder Propofol in niedrigen µM Konzentrationen den $GABA_A$ Chloridionenfluss. In hohen µM Konzentrationen kann der $GABA_A$ Kanal wieder direkt geöffnet werden (Sieghart, 2006).

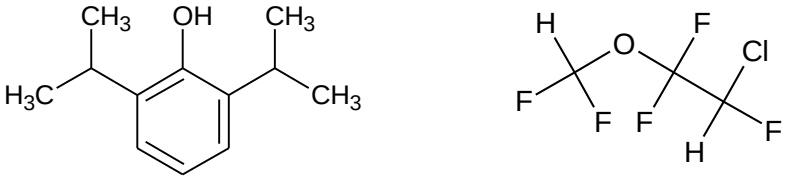


Abbildung 17: Propofol und Enfluran

Studien zeigen, dass die β Untereinheit eine wichtige Rolle bei der Bindung von Anästhetika spielt (Henschel et al., 2008).

1.4.3.4 Diverse andere Modulatoren von $GABA_A$ Rezeptoren

Loreclezol

Loreclezol ist ein Antiepileptikum, das seine Wirkung über die β Untereinheit des $GABA_A$ Rezeptors hervorruft. Loreclezol hat eine 300-fach höhere Affinität für β_2 und β_3 beinhaltende Rezeptoren, verglichen mit β_1 beinhaltenden Rezeptoren. Diese Selektivität ist über eine einzelne Aminosäure (Asparagin) in der TM2 der β Untereinheit bestimmt (Wingrove, 1994; Sieghart, 2006). Eine Mutationen in der β_1 Untereinheit (Serin 290 → Asn) führt zu einer Steigerung der Wirkung von Loreclezol und umgekehrt führt eine Mutation in den β_2 und β_3 Untereinheiten (Asn →Ser) zu einem Wirkungsverlust.

Nicht nur Loreclezol, sondern auch Etomidat oder Furosemid wirken am $GABA_A$ Kanal selektiv über $\beta_{2/3}$ Untereinheiten (Sieghart, 2006).

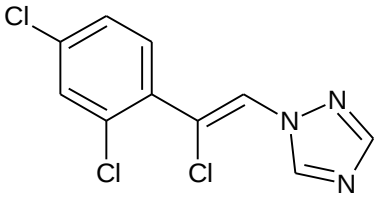


Abbildung 18: Loreclezol

Mefenaminsäure

Mefenaminsäure zeigt *in vivo* prokonvulsive und antikonvulsive Effekte und in vitro eine aktivierende bzw. inhibierende Wirkung auf $GABA_A$ Rezeptoren (Halliwell, 1999). Sie weist verschiedenste Wirksamkeit und Wirkstärke bei $GABA_A$ Rezeptoren mit β_2 oder β_3 Untereinheiten auf, während sie β_1 beinhaltende Rezeptoren antagonisiert (Sieghart 2006).

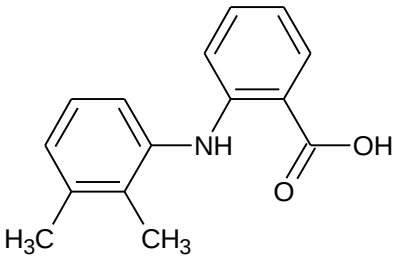


Abbildung 19: Mefenaminsäure

Furosemid

Furosemid gehört zur Gruppe der Schleifendiuretika und blockiert den $Na^+/2Cl^-/K^+$ Kotransporter in der Henle Schleife der Niere. Es antagonisiert aber auch selektiv, reversibel und nichtkompetitiv den Chloridionenfluss von $GABA_A$ Rezeptoren. Die Wirkung ist vom Vorhandensein von α_6 und $\beta_{2/3}$ Untereinheiten (wie oben schon erwähnt) abhängig (Korpi und Lüddens, 1997).

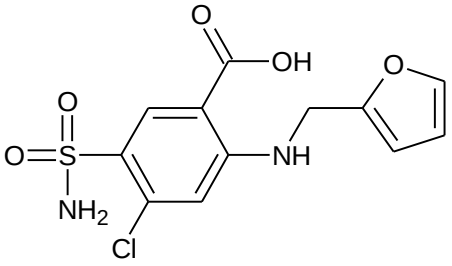


Abbildung 20: Furosemid

1.5 Baldrian

Baldrian (Valeriana) ist eine mehrjährige, krautige Pflanze, die in Europa, Nordamerika und Asien heimisch ist (Ang-Lee et al., 2001; Hadley und Petry, 2003). Sie wird ungefähr 50 bis 100 cm hoch, hat gefiederte Blätter, kleine, rosa-weiße Blüten und einen unangenehmen Geruch (Eadie, 2004). Heutzutage sind mehr als 200 verschiedene Valeriana-Spezies bekannt, medizinisch verwendet wird jedoch ausschließlich Valeriana officinalis (Wheatley, 2005), der auch in vielen Pharmakopöen (Deutsch, Japanisch, Chinesisch, Britisch, Schweiz, Europa, etc.) aufscheint (Gao und Björk, 2000). Verwendet wird die Wurzel (Valerianae radix), meist in Form eines Wasser- oder Ethanol-Extrakts (Gao und Björk, 2000; Hadley und Petry, 2003). Mehr als 100 Inhaltsstoffe des Baldrians sind bereits bekannt. Gehalt und Zusammensetzung hängen stark von saisonalen Bedingungen ab, ebenso von der geographischen Herkunft, dem Klima und den Methoden der Kultivierung. Daneben ist auch die Art der Extraktion für die spätere Zusammensetzung von entscheidender Bedeutung (Gao und Björk, 2000).

Die Baldrianwurzel enthält zwischen 0,3 und 0,7% ätherisches Öl, das vor allem Monoterpene (u.a. Borneol und Bornylester, Camphen, Campher, 1,8-Cineol, p-Cymen, Myrcen) und Sesquiterpene (z.B. L-Bisabolol, Valeranon, Valerenal, Valerenol und Valerenolester) beinhaltet. Daneben findet man auch die schwer flüchtigen Sesquiterpensäuren, Acetoxyvalerensäure und Valerensäure (0,08-0,3%) sowie

Hydroxyvalerensäure. Der charakteristische Geruch des Baldrians stammt von der Isovaleriansäure, die auch als Zersetzungsprodukt der Valepotriate entsteht. Weiters findet man im Baldrian Valepotriate, labile Verbindungen (siehe auch Abbildung 21), als deren Hauptabbauprodukte geringe Mengen Baldrinale entstehen, aber auch undefinierte Polymerisate. Die schonend getrocknete Droge enthält 0,5-2% Valepotriate mit Valtrat als Hauptkomponente (50-80%). Weitere Inhaltsstoffe der Baldrianwurzel sind u.a. Mono- und Diepoxylignane, geringe Mengen Alkaloide, Phenolcarbonsäuren, Aminosäuren (z.B. GABA, Tyrosin, Arginin und Glutaminsäure), kurzkettige Carbonsäuren, freie Fettsäuren und Kohlenhydrate ((Eadie, 2004; Länger und Kubelka, 2001).

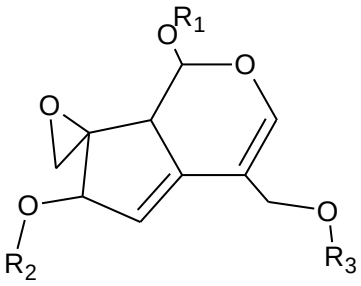


Abbildung 21: Valepotriate: Valtrate: R_1= Isovaleryl, R_2= Isovaleryl, R_3= Acetyl; Isovaltrate: R_1= Isovaleryl, R_2= Acetyl, R_3= Isovaleryl

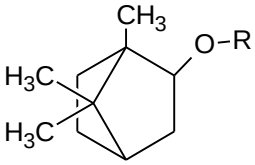


Abbildung 22: Bornyl-Derivate: Bornyl Acetate: R= CH_3CO

Die ersten Beschreibungen von Baldrian als Heilmittel gehen bereits auf das Jahr 55 vor Christus (Dioskurides) zurück. Damals fand Baldrian als Diuretikum und als Arznei zur Regulation des Zyklus Verwendung. Die Anwendung von Baldrian als Heilmittel zieht sich weiter durch das ganze Mittelalter bis heute. Er wurde unter anderem als verdauungsförderndes, spasmolytisches Mittel bei Bauchkrämpfen, als Expectorans, bei Kopfschmerzen und Übelkeit eingesetzt (Eadie, 2011). Im Jahre 1592 berichtete Fabio Colanna, der selbst an Epilepsie litt, über die Heilung seiner Krankheit durch die Verwendung von Baldrianwurzel, was vor allem im 18./19. Jahrhundert zum häufigen Einsatz der Wurzel bei Epilepsie führte (Eadie,

2011). Heutzutage ist Baldrian einer der populärsten Arzneidroge in der Behandlung von Angst- und Schlafstörungen (Yuan et al., 2004; Murphy et al., 2010).

Zubereitungen aus Baldrian und auch einzelne Inhaltsstoffe wurden bereits zahlreich *in vitro* und *in vivo* getestet. Unter anderem wurden so $GABA_A$, $5\text{-}HT_{5a}$ und Adenosin (A_1) Rezeptoren als Targets identifiziert (Dietz et al., 2005; Sichardt et al, 2007). Daraus kann man schließen, dass mehrere Mechanismen bzw. mehrere Inhaltsstoffe an der Wirkung des Baldrians beteiligt sind. Neben Iridoiden (vor allem Valepotriaten), Lignanen, Flavonoiden, dem Monoterpen Borneol, das vor allem im ätherischen Öl vorherrschend ist, spielen vor allem die Sesquiterpencarbonsäuren eine wichtige Rolle. Valerensäure wurde als Untereinheiten-spezifischer, positiver Modulator von $GABA_A$ Rezeptoren identifiziert (Khom et al., 2007). Die Modulation von $GABA_A$ Rezeptoren (siehe entsprechende Kapitel 1.4.3) lässt *in vivo* unter anderem anxiolytische und antikonvulsive Wirkung vermuten, wobei die anxiolytische Wirkung bereits an Mäusen gezeigt wurde (Benke et al., 2009; Khom et al., 2010).
Viele verschiedene Komponenten ethanolischer Baldrianextrakte steigern einerseits durch Stimulation der Glutamat Decarboxylase (Bildung von GABA aus Glutamat) und andererseits durch Hemmung der GABA Transaminase (Abbau von GABA) den GABA Level im Gehirn (Awad et al., 2007).

1.6 Pfeffer

Pfeffer (Piper) ist eine Gattung der Familie der Piperaceae (Pfeffergewächse) (Mehmood und Gilani, 2010; Pedersen et al., 2009). Der Pfefferstrauch ist eine Kletterpflanze und in Südindien heimisch. Die Frucht des schwarzen Pfeffers (piper nigrum) ist dunkelrot, wenn sie ausgereift ist. Geerntet werden jedoch die grünen, noch unreifen Beeren. Nach der Ernte werden sie kurz in kochendes Wasser getaucht, um die Zellwände der Frucht aufzubrechen. Danach werden die gekochten Körner einige Tage in der Sonne getrocknet. Der Samen schrumpft und wird schwarz (faltige Kugel von 5 mm Durchmesser) (Aggarwal und Kunnumakkara, 2009).
Pfeffer ist eines der häufigsten verwendeten Gewürze weltweit. Schon 2000 vor Christus fand er in der indischen Küche Verwendung. Er wird wegen seines stechenden, scharfen Geschmacks geschätzt, der auf das Alkaloid Piperin zurückzuführen ist (Aggarwal und Kunnumakkara, 2009). Piperin (1-Piperoylpiperidin) ist das Hauptalkaloid des Pfeffers und Aktivator der transient receptor potential vanilloid 1 (TRPV1) Kanäle, die 1997 auch als Wir-

kort des Capsaicins (Inhaltsstoff des Chilis) identifiziert wurden (McNamara et al., 2005; Wattanathorn et al., 2008; Correa et. al, 2010). Die neuronal vorkommenden TRPV1 Kanäle sind Kationenkanäle, die nach Bindung von Piperin zu einem Anstieg von intrazellulärem Calcium führen und Wärme bzw. Schmerz vermitteln (Correa et al., 2010; McNamara et al., 2005; Okumura et al., 2010).

Pfeffer findet aber nicht nur als Gewürz Verwendung. Er ist bekannt für seine vielseitigen Verwendungsmöglichkeiten in der Volksmedizin (Mehmood und Gilani, 2010; siehe Abbildung 23).

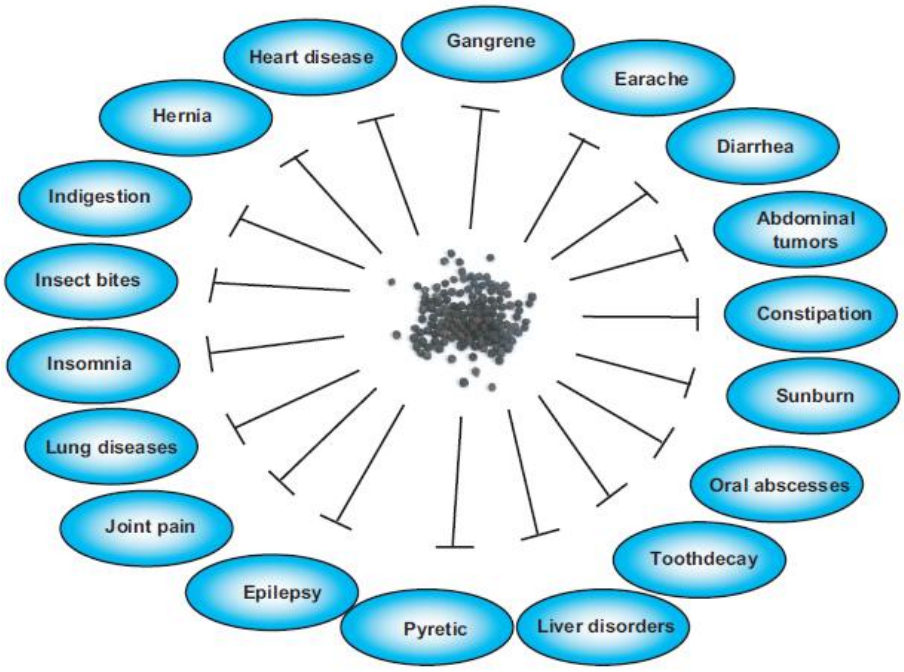


Abbildung 23: Einsatzgebiete des Pfeffers (Aggarwal und Kunnumakkara, 2009)

Die Wurzel des Pfefferstrauches hat vor allem in Afrika eine lange Tradition als Schlaf induzierendes Mittel und die asiatische Volksmedizin setzt Pfefferkörner als Antiepileptika, Sedativa und Anxiolytika ein. Diese Indikationen des Pfeffers werden durch die Tatsache unterstützt, dass Piperin als Modulator des $GABA_A$ Rezeptors identifiziert wurde (Pedersen et al. 2009; Zaugg et al., 2009). Die Bindungsstelle ist jedoch noch unbekannt (Pedersen et al., 2009; Zaugg et al., 2009). Weiters steigert Piperin den Speichelfluss, die Sekretion des Ptyalins und regt die Leber zur Gallensäureproduktion an (Srinivasan, 2007). Zusätzlich zeichnet sich Piperin durch seine antibakteriellen, analgetischen, antihypertensiven, antioxidativen und antitumoralen Eigenschaften aus (Aggarwal und Kunnumakkara, 2009).

2 Problemstellung und Zielsetzung

Modulatoren von $GABA_A$ Rezeptoren sind wichtige Arzneistoffe in der Therapie von Epilepsie, von Schlaf- und Angststörungen oder werden auch bei Muskelspasmen eingesetzt. Ihr Einsatz ist aber mit dem Auftreten von zahlreichen Nebenwirkungen assoziiert. Wie in Kapitel 1.4.3.1 bereits erwähnt, werden die unterschiedlichen Wirkqualitäten der Benzodiazepine über verschiedene Rezeptor-Subtypen vermittelt. Daher hofft man heute, Arzneistoffe entwickeln zu können, die Subtyp-selektiv modulieren und daher *in vivo* nur noch die gewünschte Wirkung ohne etwaige Nebenwirkungen erzeugen.

In vorhergehenden Untersuchungen konnten am Department für Pharmakologie und Toxikologie, Universität Wien, zwei Naturstoffe (Valerensäure und Piperin) *in vitro* als untereinheitenspezifische $GABA_A$ Rezeptor Modulatoren identifiziert werden (Khom et al., 2007; Zaugg et al., 2010). Im Rahmen meiner Diplomarbeit sollte daher erstmals eine ausführliche *in vivo* Untersuchung dieser beiden Naturstoffe und einiger, ausgewählter Derivate durchgeführt werden:

Valerensäure (VA), Valerensäure-Amid (VA-A) und Valerensäure-Ethylamid (VA-EA) zeigten schon in früheren Untersuchungen *in vivo* anxiolytische Wirkung (Khom et al, 2010). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte nun eine detailierte Charakterisierung von VA und 4 Derivaten (VA-1, VA-3, VA-5 Vund VA-7) in Abhängigkeit von der verabreichten Dosis (3 mg/kg Körpergewicht (KG), 10 mg/kg KG und 30 mg/kg KG) durchgeführt werden. Die Wirkung sollte im Open-Field-Test (OF) 30 Minuten nach intraperitonealer (i.p.) Applikation untersucht und mit dem Verhalten von Kontrolltieren verglichen werden.

Ebenso sollte die Wirkung von Piperin und einem Piperin Derivat **(7)** an Mäusen nach intraperitonealer Applikation im Elevated-Plus-Maze (EPM) Test untersucht werden und mit dem Verhalten von Kontrolltiere (physiologische Kochsalzlösung) verglichen werden. Piperin und **(7)** wurden bei Dosen von 0,1 mg/kg Körpergewicht (=KG); 0,3 mg/kg KG und 1 mg/kg KG getestet, **(7)** zusätzlich bei den Dosen 3 mg/kg KG und 10 mg/kg KG.

3 Methoden

3.1 Tiere

Für die *in vivo* Untersuchungen wurden ausschließlich männliche c57Bl6/N Mäuse im Alter von 3 bis 6 Monaten verwendet (Charles River Laboratories, Sulzfeld, Deutschland). Die Mäuse wurden in Gruppen zu je 5 Tieren gehalten und hatten freien Zugang zu Futter und Wasser. Die Haltungsbedingungen waren: Raumtemperatur bei 23 ± 1° C; Luftfeuchtigkeit 40 ± 20 % und ein 12-stündiger Tag/Nacht/Rhythmus (07.00 bis 19.00 Uhr).

Die Durchführung der Versuche wurde vom Bundesministerium für Wissenschaft und Forschung unter Befolgung der europäischen Konvention zum Schutz von für experimentelle oder andere wissenschaftliche Zwecke verwendeten Wirbeltieren ETS no.: 123 genehmigt (Khom et al., 2010). Am Vortag der Versuche wurden die Tiere gewogen, markiert und in den Versuchsraum gebracht. 30 min vor dem Test wurden die Substanz- bzw. Kontrolllösungen ip. injiziert. Die Injektion der Testlösungen erfolgte in einem Vorbereitungsraum, um die anderen Tiere nicht zu stören.

3.2 Injektionslösungen

Die Injektionslösungen wurden aus Stammlösungen von jeweils 1 mg Substanz in 10 µl DMSO bereitet. Diese wurden mit physiologischer Kochsalzlösung (0.9% NaCl) auf die gewünschte Konzentration (siehe Abbildungen und Ergebnisteil) verdünnt. Zur Verbesserung der Löslichkeit wurde allen Lösungen 3% Polysorbat 80 zugesetzt und die DMSO-Konzentration betrug in der fertigen Lösung maximal 10%.

3.3 Open-Field-Test (OF)

Der Open-Field-Test wurde wie von Crawley beschrieben (2007) durchgeführt. 30 min nach intraperitonealer (i.p.) Injektion wurde das Verhalten der Mäuse über einen Zeitraum von 10 min in einer 50 x 50 cm Box getestet. Die Box war mit Infrarot-Lichtschranken ausgestattet, die Lichtintensität wurde auf 150 Lux eingestellt. Nach Empfehlung von EMPRESS (European Mouse Phenotyping Resource of Standardised Screens; http://empress.har.mrc.ac.uk) wurde die Gesamtfläche für die Auswertung in eine Randzone (bis 8 cm von der Wand), ein Zentrum (16 % von der Gesamtfläche) und die Fläche zwischen diesen Zonen = Zwischenzone unterteilt (siehe Abbildung 24). Die Aufzeichnung und Auswertung der Versuche erfolgte automatisch mittels ActiMot2 (TSE-Systems, Bad Homburg, Deutschland).

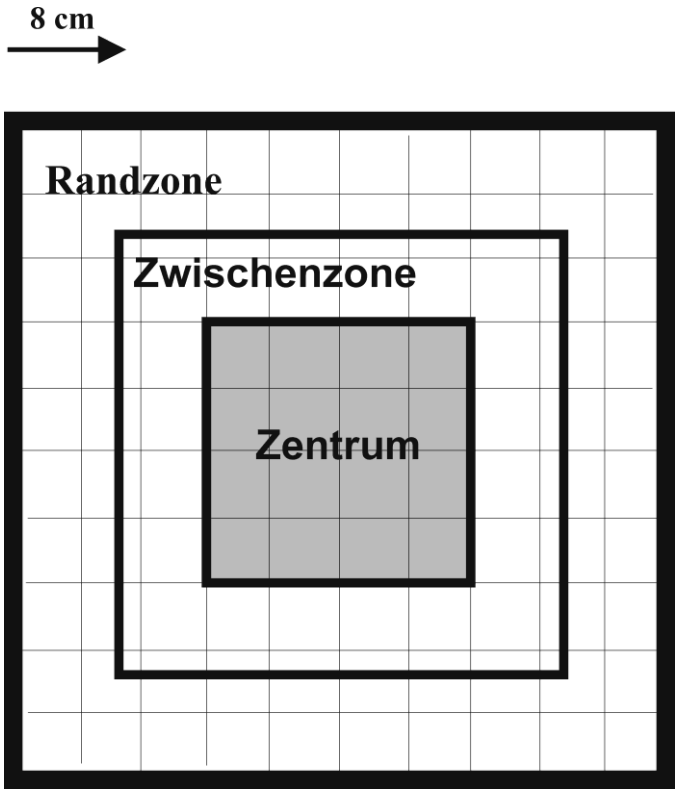


Abbildung 24: Schematische Darstellung des OF mit Einteilung der Fläche in Rand-, Zwischenzone und Zentrum (16% der Gesamtfläche)

3.4 Elevated-Plus-Maze Test (EPM)

Der Elevated-Plus-Maze Test ist in der Angstforschung das am häufigsten verwendete Tiermodel (Hogg, 1996). Der Test ist schnell und einfach durchzuführen. 30 min nach i.p. Injektion wurde das Verhalten der Mäuse über einen Zeitraum von 5 min auf einer plusförmigen Testapparatur in einem Meter Höhe beobachtet. Die Testapparatur besteht aus zwei offenen Armen (OA; 5x30cm), 2 geschlossenen Armen (GA; 5x30cm; Höhe der geschlossenen Arme 10 cm) und einer dazwischenliegenden neutralen Zone (NA; 5x5cm; siehe Abbildung 25). Die Mäuse wurden am Beginn des Tests in die NA in einen OA schauend gesetzt. Die Lichtintensität war dabei auf 180 Lux festgelegt. Die Aufzeichnung und Auswertung der Versuche erfolgte automatisch mittels VideoMot2 (TSE-Systems, Bad Homburg, Deutschland).

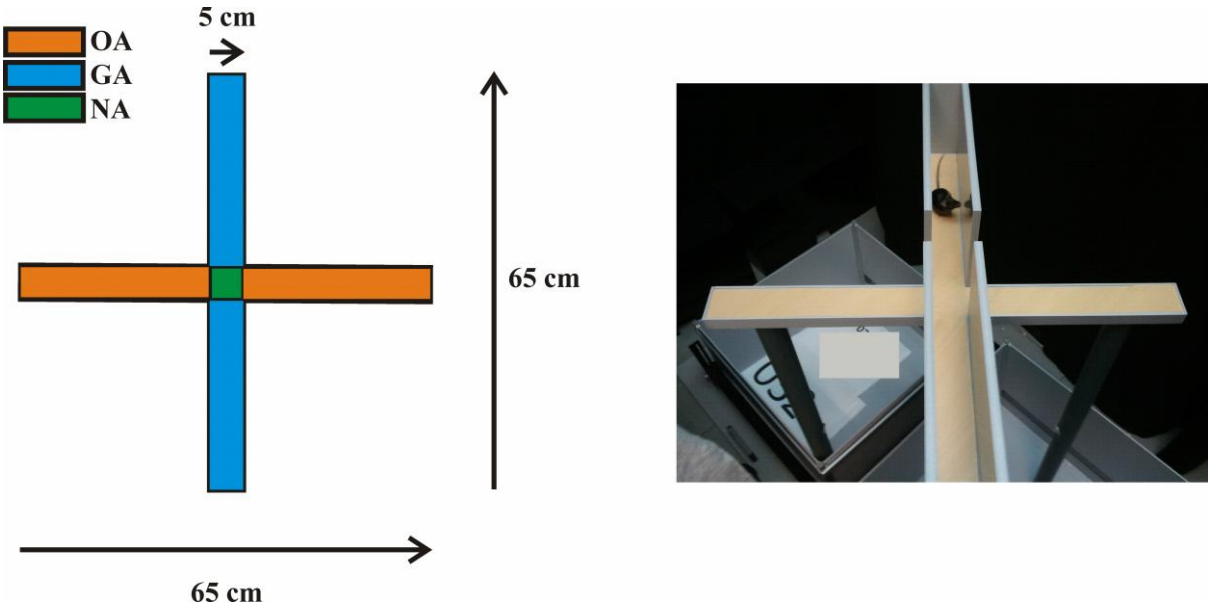


Abbildung 25: Schematische Darstellung des EPM Tests und Foto der Versuchsapparatur

3.5 Statistische Analyse der Daten

Für den Vergleich von Kontrollgruppe und Verumgruppe wurde der Student‘s t-Test herangezogen. Der Vergleich mehrerer Gruppen erfolgte mittels Einweg-ANOVA (Microsoft Office; Origin MicroCal). p-Werte <0,05 gelten als statistisch signifikant. Alle Werte werden als Mittelwert ± SEM angegeben.

4 Ergebnisse

4.1 Untersuchung der Wirkung von Piperin und des Piperin-Derivats (7) im Elevated-Plus-Maze (EPM) Test

Im Rahmen meiner Diplomarbeit sollte zum ersten Mal die *in vivo* Wirkung des kürzlich identifizierten $GABA_A$ Rezeptor Modulators Piperin (Zaugg et al., 2010) 30 Minuten nach intraperitonealer (i.p.) Applikation in einem Mausmodell (EPM) untersucht werden. Danach sollte die Wirkung des neu synthetisierten Derivats **(7)** ebenfalls im Tiermodell untersucht und mit den Effekten von Piperin verglichen werden.

4.1.1 Verbrachte Zeit in den offenen Armen (%)

Wie in Abbildung 26 gezeigt, verbrachten Mäuse der Kontrollgruppe 29,6 ± 2,8% (n=38) der Gesamtzeit in den offenen Armen (OA) des EPM. Kein Unterschied zur Kontrollgruppe konnte für Mäuse, denen 0,1 mg/kg KG Piperin injiziert worden war, beobachtet werden. Erste signifikante Effekte zeigte die Applikation von 0,3 mg/kg KG Piperin: Diese Mäuse verbrachten 43 ± 4,2% der Gesamtzeit in den OA (n=22; $p<0,05$). Saturation des Effekts wurde bei Applikation von 1 mg/kg KG erreicht (45,7 ± 6,3%; n=16; $p<0,05$).

Ähnliche Effekte konnten bei **(7)** beobachtet werden (siehe Abbildung 26): Mäuse, die mit 0,1 mg/kg KG **(7)** behandelt wurden, verbrachten 18,1 ± 4,3% der Gesamtzeit in den OA des EPM (n=14; $p<0,05$). Deutlich mehr Zeit verbrachten Tiere in den OA nach Applikation von 0,3 mg/kg KG (38,1 ± 5,1%; n=21) und 1 mg/kg KG (42,2 ± 6,1%; n=15) im Vergleich zur Kontrollgruppe. Ein weiterer signifikanter Effekt konnte bei einer Dosierung von 3 mg/kg KG gemessen werden (46,5 ± 6,6%; n=14; $p<0,05$; vergleiche Tabelle 2).

Interessanterweise kam es nach Applikation von 10 mg/kg KG aber zu keiner weiteren Zunahme der in den OA verbrachten Zeit, sondern im Gegensatz zu einer signifikant kürzeren Aufenthaltszeit in den OA im Vergleich zu den Kontrollmäusen (14,8 ± 5,6%; n=13; $p<0,05$).

4.1.2 Anzahl der Besuche in den OA und GA des EPM

Weiters wurde im Rahmen des EPM-Tests die Anzahl der Besuche der offenen und geschlossenen Arme untersucht. Hier zeigte sich, dass eine Applikation unterschiedlicher Dosierungen beider Substanzen (**(7)** und Piperin) keinen signifikanten Effekt ($p>0,05$) auf die Anzahl der Besuche der OA induzierte, mit Ausnahme der höchsten getesteten Dosierung von **(7)**. Hier

kam es zu einer deutlichen Reduktion der Besuche der OA, verglichen mit der Kontrollgruppe (Kontrollgruppe: 12,0 ± 0,8 Besuche; n=38 vs. 10 mg/kg KG **(7)**: 7,8 ± 1,1 Besuche; n=13; $p<0,01$) (siehe Abbildung 26 und Tabelle 3).

Es konnten keine signifikanten Änderungen der Anzahl der Besuche der geschlossenen Arme nach Gabe von Piperin und **(7)** in nahezu allen Dosierungen beobachtet werden. Lediglich 1 mg/kg KG **(7)** führte zu einer signifikanten Reduktion der Anzahl der Besuche der GA verglichen mit der Kontrollgruppe (Kontrollgruppe: 13,9 ± 0,7 Besuche; n=38; 1 mg/kg KG **(7)**: 10,5 ± 1,3 Besuche; n=15; $p<0,05$) (siehe Abbildung 27 und Tabelle 4).

4.1.3 Laufstrecke

Während des Versuches legte die Kontrollgruppe eine durchschnittliche Gesamtstrecke von 1304,2 ± 31,6 cm (n=38) zurück. Wie in Abbildung 27 dargestellt, konnte kein Effekt auf die Gesamtstrecke nach Applikation von 0,1 und 0,3 mg/kg KG Piperin beobachtet werden. Dagegen kam es nach Gabe von 1 mg/kg KG Piperin zu einer signifikanten Reduktion der Laufstrecke (1083,4 ± 60,2 cm; n=16; $p<0,01$).

Interessanterweise legten Mäuse, die mit 0,1 mg/kg KG **(7)** behandelt wurden, ebenfalls eine signifikant kürzere Laufstrecke (1132,0 ± 37,6 cm; n=14; $p<0,01$) zurück. Im Gegensatz dazu konnte bei Mäusen, die mit 0,3 mg/kg KG, mit 1 mg/kg KG und mit 3 mg/kg KG **(7)** (1258,2 ± 58,2 cm; n=21), (1181,0 ± 57,3 cm; n=15) und (1307,0 ± 78,7 cm; n=14) behandelt wurden, kein Effekt auf die Laufstrecke beobachtet werden. Eine weitere signifikante Verringerung der Laufstrecke wurde hingegen bei 10 mg/kg KG gemessen (1067,1 cm ± 59,4; n=13; $p<0,01$) (siehe Tabelle 5).

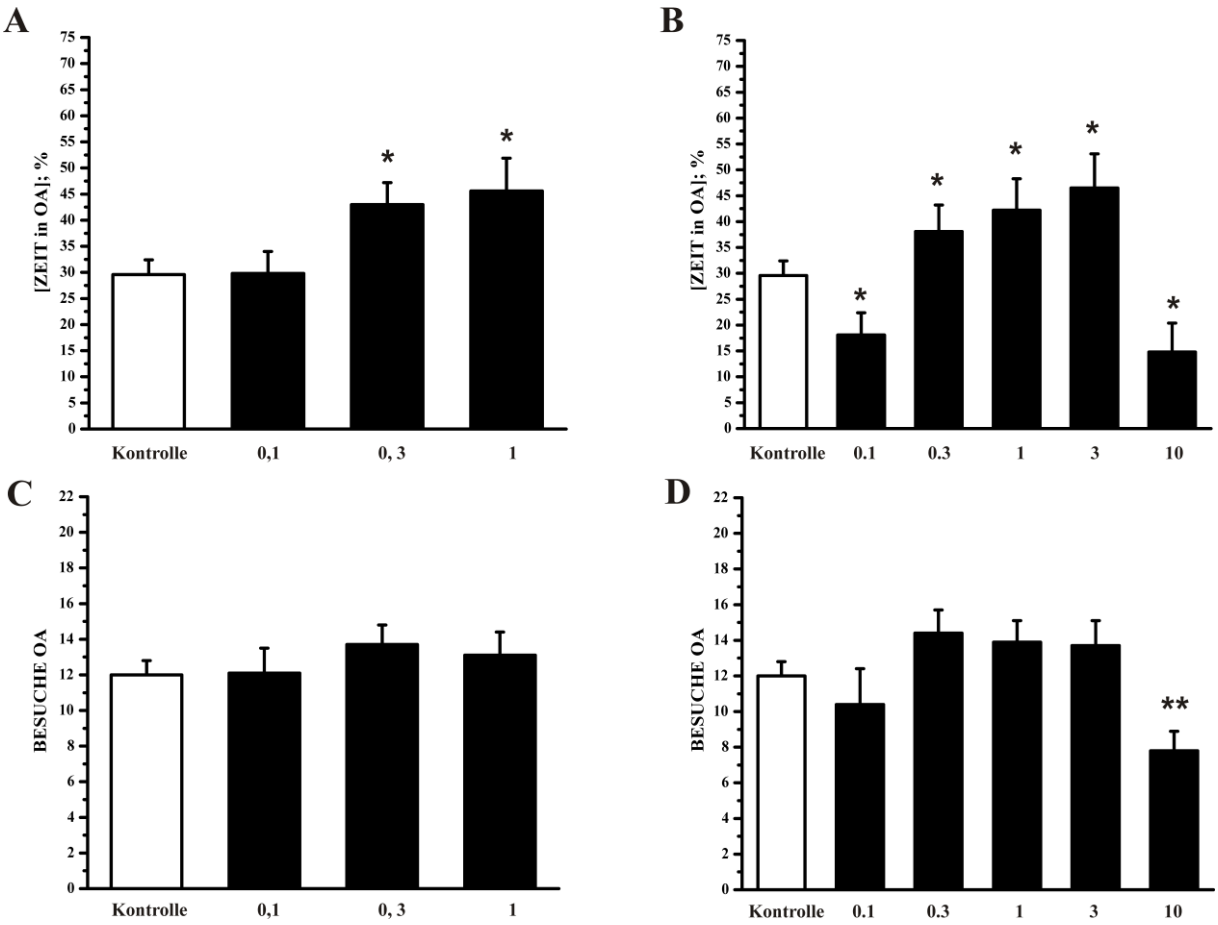


Abbildung 26: Effekt von Piperin (**A,C**) und seinem Derivat **(7)** (**B,D**) auf das Verhalten von c57Bl/6N Mäusen im EPM Test. Die Balken in den oberen zwei Diagrammen zeigen die Mittelwerte der Aufenthaltsdauer (% der Gesamtzeit des Versuchs) der Tiere bei den angegebenen Dosen Piperin (**A**; schwarze Balken), **(7)** (**B**; schwarze Balken) in den offenen Armen (OA) des EPM im Vergleich zur Kontrollgruppe (weißer Balken). Die Balken in den unteren beiden Diagrammen zeigen die Anzahl der Besuche der Tiere in den OA bei den angegebenen Dosen Piperin (**C**; schwarze Balken) bzw. **(7)** (**D**; schwarze Balken) im Vergleich zur Kontrollgruppe (weißer Balken). Die abgebildeten Werte sind Mittelwerte ± SEM von mindestens 10 Versuchstieren. (*) bedeutet statistisch signifikant ($p<0.05$); (**) bedeutet statistisch signifikant ($p<0.01$).

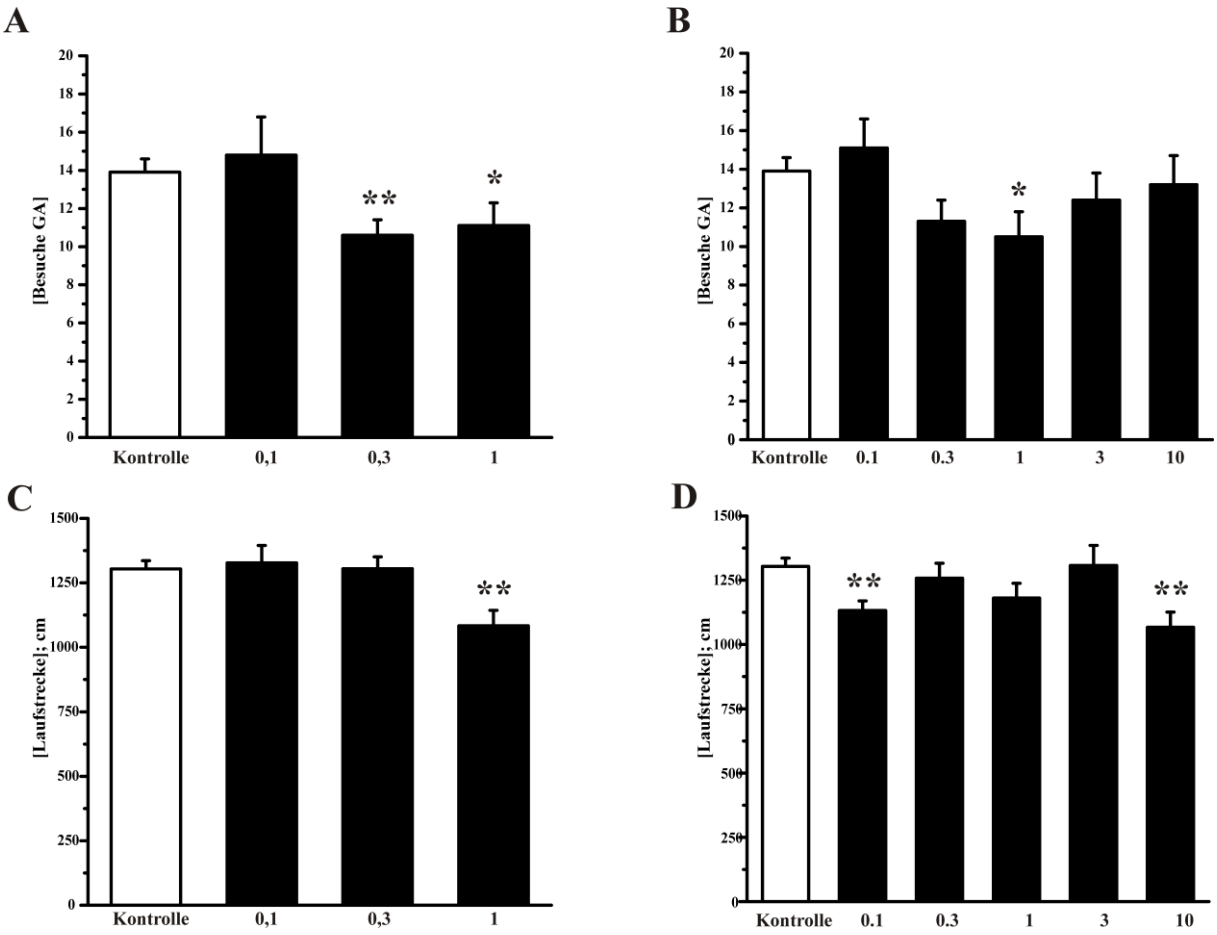


Abbildung 27: Effekt von Piperin (**A,C**) und seinem Derivat **(7)** (**B,D**) auf das Verhalten von c57Bl/6N Mäusen im EPM Test. Die Balken in den oberen beiden Diagrammen zeigen die Anzahl der Besuche der geschlossenen Arme (GA) nach Applikation der angegebenen Dosen Piperin (**A**; schwarze Balken) bzw. **(7)** (**B**; schwarze Balken) im Vergleich zur Kontrollgruppe (weißer Balken). Die Balken in den unteren beiden Diagrammen zeigen die zurückgelegte Gesamtstrecke bei den angegebenen Dosen Piperin (**C**; schwarze Balken) bzw. **(7)** (**D**; schwarze Balken) im Vergleich zur Kontrollgruppe (weißer Balken) im EPM Test. Die abgebildeten Werte sind Mittelwerte ± SEM von mindestens 10 Versuchstieren. (*) bedeutet statistisch signifikant ($p<0.05$); (**) bedeutet statistisch signifikant ($p<0.01$).

Piperin (mg/kg KG)	Zeit % in OA	Anzahl der Versuchstiere	(7) (mg/kg KG)	Zeit in % in OA	Anzahl der Versuchstiere
0 (=Kontrolle)	29,6 ± 2,8	38			
0.1	29,8 ± 4,2	12	0,1	18,1 ± 4,3	14
0,3	43,0 ± 4,2	22	0,3	38,1 ± 5,1	21
1	45,7 ± 6,3	16	1	42,2 ± 6,1	15
			3	46,5 ± 6,6	14
			10	14,8 ± 5,6	13

Tabelle 2: Zeit (%), die die Tiere nach Applikation der angegebenen Dosen in den OA des EPM verbrachten. KG...Körpergewicht

Piperin (mg/kg KG)	Anzahl der Besuche der OA	Anzahl der Versuchstiere	(7) (mg/kg KG)	Anzahl der Besuche der OA	Anzahl der Versuchstiere
0 (=Kontrolle)	12,0 ± 0,8	38			
0,1	12,1 ± 1,4	12	0,1	10,4 ± 2,0	14
0,3	13,7 ± 1,1	22	0,3	14,4 ± 1,3	21
1	13,1 ± 1,3	16	1	14,0 ± 1,2	15
			3	13,7 ± 1,4	14
			10	7,8 ± 1,1	13

Tabelle 3: Anzahl der Besuche der OA nach Applikation der angegebenen Dosen (KG...Körpergewicht)

Piperin (mg/kg KG)	Anzahl der Besuche in GA	Anzahl der Versuchstiere	(7) (mg/kg KG)	Anzahl der Besuche in GA	Anzahl der Versuchstiere
0 (=Kontrolle)	13,9 ± 0,7	38			
0,1	14,8 ± 2,0	12	0,1	15,1 ± 1,5	14
0,3	10,6 ± 0,8	22	0,3	11,3 ± 1,1	21
1	11,1 ± 1,2	16	1	10,5 ± 1,3	15
			3	12,4 ± 1,4	14
			10	13,2 ± 1,5	13

Tabelle 4: Anzahl der Besuche der GA nach Applikation der angegebenen Dosen (KG...Körpergewicht)

Piperin (mg/kg KG)	Laufstrecke in cm	Anzahl der Versuchstiere	(7) (mg/kg KG)	Laufstrecke in cm	Anzahl der Versuchstiere
0 (=Kontrolle)	1304,2 ± 31,6	38			
0,1	1327,7 ± 66,8	12	0,1	1132,0 ± 37,6	14
0,3	1304,5 ± 46,3	22	0,3	1258,2 ± 58,2	21
1	1083,4 ± 60,2	16	1	1181,0 ± 57,3	15
			3	1307,0 ± 78,7	14
			10	1067,1 ± 59,4	13

Tabelle 5: Im EPM zurückgelegte Strecke (cm) nach Applikation der angegebenen Dosen (KG...Körpergewicht)

4.2 Untersuchung der Wirkung von Valerensäure (VA) und ausgewählten VA-Derivaten im Open-Field-Test (OF)

Im Rahmen meiner Diplomarbeit wurden auch erstmalig Valerensäure und 4 Derivate (VA-1, VA-3, VA-5 und VA-7) 30 Minuten nach intraperitonealer Applikation im OF getestet.

4.2.1 Laufstrecke

Wie in Abbildung 28 A-E (weißer Balken) gezeigt, legte die Kontrollgruppe eine Gesamtstrecke von durchschnittlich 39,0 ± 1,7 m (n=16) im OF zurück.

Bei allen untersuchten Dosen Valerensäure (VA) konnten keine signifikanten Unterschiede bezüglich der zurückgelegten Laufstrecke festgestellt werden (Kontrolle: 39,0 ± 1,7m; n=16 vs. 3 mg/kg KG VA: 41,4 ± 2,3m; n=13; 10 mg/kg KG VA: 39,1 ± 1,7m; n=12; 30 mg/kg KG VA: 39,8 ±2,1m; n=12; $p>0.05$; siehe Abbildung 28 A).

Gleiches gilt auch für Mäuse, denen 3 mg/kg KG VA-1 verabreicht wurden (Kontrolle: 39,0 ± 1,7m; n=16 vs. 3 mg/kg KG VA-1: 40,4 ± 2,1m; n= 10; $p>0.05$). Dagegen legten Mäuse, die mit 10 mg/kg KG VA-1 (22,0 ± 3,1m; n=14; $p<0,01$) und 30 mg/kg KG (20,7 ± 23m; n=12; $p<0,01$) eine signifikant kürzere Strecke im Vergleich zur Kontrollgruppe zurück.

Wie in Abbildung 28 C illustriert, wurden für VA-3 ähnliche Ergebnisse erhalten. Die zurückgelegte Laufstrecke von Mäusen, die mit 3 mg/kg KG VA-3 behandelt wurde, unter-

schied sich nicht signifikant (p>0,05) von der der Kontrollgruppe (Kontrolle: 39,0 ± 1,7m; n=16 vs. 3 mg/kg KG VA-3 35,7 ± 1,4m; n=13; p>0,05). Dagegen führten Applikationen von 10 bzw. 30 mg/kg KG VA-3 zu einer signifikanten Reduktion der Laufstrecke (10 mg/kg KG VA-3: 32,8 ± 1,8m, n=12; p<0,05 und 30 mg/kg KG VA-3: 29,7 ± 2,0m; n=12; p<0,01).
Hingegen führte die Verabreichung von VA-5 und VA-7 (3 mg/kg KG VA-5: 38.0 ± 2,1m; n=12; 10 mg/kg KG VA-5: 38,6 ± 1,6m; n=13; 30 mg/kg KG VA-5: 39,0 ± 2,2m; n=10; p>0,05; 3 mg/kg KG VA-7: 37,2 ± 1,8m; n=10; 10 mg/kg KG VA-7: 37,0 ± 1,9m; n=12; 30 mg/kg KG VA-7: 35,1 ±2,0m; n=13; p>0,05;) zu keiner signifikanten Änderung der Laufstrecke im Vergleich zur Kontrollgruppe (Abbildung 28 D und Abbildung 28 E).

4.2.2 Zeit im Zentrum

Die Kontrollgruppe verbrachte während des Versuches durchschnittlich 47,9 ± 5,3s (n=16) im Zentrum des OF (siehe Abbildung OF 24).
Wie in Abb. 29 A-E dargestellt, unterschied sich die Zeit, die Mäuse nach Applikation der untersuchten VA-Derivate (3-30 mg/kg KG) im Zentrum des OF verbrachten, nicht signifikant von der der Kontrollmäuse.
Ein Trend zu einem längeren Aufenthalt im Zentrum konnte lediglich bei Mäusen, die mit 3 mg/kg KG VA (58,8 ± 12,1s; n=13), 3 mg/kg KG VA-1 (58,9 ± 17,4s; n=10) und 10 mg/kg KG VA-1 (69,0 ± 10,9s; n=14), 3 mg/kg KG VA-5 (59,9 ± 11,8s; n=12) und vor allem bei 3 mg/kg KG VA-7 (73,8 ± 16,1s; n=10) im Vergleich zur Kontrollgruppe beobachtet werden.

4.2.3 Rearings

Die Kontrollgruppe richtete sich innerhalb der Versuchszeit durchschnittlich 175,3 ± 15,1mal (n=16) auf.
Wie in Abb. 30 A gezeigt, kam es zu keiner signifikanten Beeinflussung der Anzahl der Rearings (=vertikale Aktivität, Aufrichten des Tieres) nach Applikation von allen Dosierungen VA (3-30 mg/kg KG), lediglich Mäuse, die mit 3 mg/kg KG VA behandelt worden war, zeigten einen Trend zu verstärkter vertikaler Aktivität (202,2 ± 27,7 Rearings; n=13; p>0,05). Bei höheren Dosen dagegen kam es wieder trendmäßig zu weniger Rearings (Kontrolle: 175,3 ± 15,1 Rearings; n=16; vs. 10 mg/kg KG VA: 139,6 ± 10,8 Rearings; n=12 und 30 mg/kg KG VA: 152,8 ± 16,5 Rearings; n=12; siehe Abbildung 30).

Eine leichte Reduktion ($p>0,05$) der Zahl der Rearings konnte nach Applikation von 3 mg/kg KG VA-1 (140,1 ± 14,8 Rearings; n=10) beobachtet werden. Eine signifikante, starke Abnahme der Rearings zeigte sich dann nach Applikation von 10 mg/kg KG und 30 mg/kg KG VA-1 (10 mg/kg KG: 58,6 ± 14,1 Rearings; n=14; $p<0,01$ und 30 mg/kg KG: 47,2 ± 7,1 Rearings; n=12; $p<0,01$; siehe Abbildung 30 B).

Wie in Abbildung 30 C ersichtlich, induzierte bei Verabreichung von VA-3 lediglich eine Dosis von 30 mg/kg KG (111,1 ± 16,4 Rearings; n=12; $p<0,01$) eine signifikante Reduktion der Anzahl der Rearings, während sich bei niedrigeren Dosierungen keine signifikanten Effekte zeigten.

Die Applikation von VA-5 bewirkte hingegen bei allen Dosierungen keinen signifikanten Effekt auf die Anzahl der Rearings (Kontrollgruppe: 175,3 ± 15,1 Rearings; n=16 vs. 3 mg/kg KG VA-5: 143,9 ± 17,3; n=12; 10 mg/kg KG VA-5: 163,8 ± 13,7; n=13; 30 mg/kg KG VA-5: 191,8 ± 22,9; n=10; $p>0,05$; Abbildung 30 D).

Keine signifikante Änderung der Anzahl der Rearings zeigte sich ebenfalls nach Applikation von VA-7, lediglich bei Behandlung mit 3 mg/kg KG VA-7 zeigte sich ein Trend zu mehr Rearings (191,0 ± 49,0; n=10; siehe Abb. 30 E).

4.2.4 Rearings im Zentrum

Wie man der Abbildung 31 entnehmen kann, richteten sich die Versuchstiere durchschnittlich 15,6 ± 3,3mal (n=16) im Zentrum des OF auf.

Bei Dosen von 3 mg/kg KG Valerensäure kam es zu einer Erhöhung der Anzahl der Rearings im Zentrum auf 22,9 ± 10,1mal (n=13; $p>0,05$), jedoch zeigte sich bei Dosen von 10 mg/kg KG eine signifikante Reduktion der Rearings im Vergleich zur Kontrollgruppe (Kontrollgruppe: 15,6 ± 3,3 Rearings, n=16 vs. 10 mg/kg KG VA: 7,7 ± 1,7 Rearings, n=12). Eine verminderte vertikale Aktivität konnte auch bei der höchsten Dosis VA gemessen werden (30 mg/kg KG: 8,8 ±3,5 Rearings; n=12).

Bei Applikation von VA-1 konnten bei einer Dosis von 3 mg/kg KG und 10 mg/kg KG keine signifikanten Effekte im Vergleich zur Kontrollgruppe beobachtet werden (Kontrollgruppe: 15,6 ± 3,3 Rearings, n=16; vs. 3 mg/kg KG VA-1: 7,2 ±3,1; n= 10; 10 mg/kg KG VA-1: 12,2 ± 3,6 Rearings; n=14; $p>0,05$). Bei der höchsten Dosierung von VA-1 (30 mg/kg KG) kam es hingegen zu einer signifikanten ($p<0,01$) Reduktion der durchschnittlichen Anzahl der Rearings im Zentrum, nämlich auf 1,7 ± 0,5 Rearings (n=12).

Bei Verwendung von VA-3 konnte bei allen Dosierungen eine Verringerung der vertikalen Aktivität beobachtet werden, bei 3 mg/kg KG VA-3 signifikant im Vergleich zur Kontrollgruppe (Kontrollgruppe: 15,6 ± 3,3 Rearings, n=16 vs. 3 mg/kg KG VA-3: 7,5 ± 2,0 Rearings; n= 12; $p<0,05$)

Keine signifikanten Änderungen der Anzahl der Rearings im Zentrum zeigte sich bei allen Dosierungen von VA-5 (3 mg/kg KG VA-5: 12,3 ± 3,8 Rearings; n=12; 10 mg/kg KG VA-5: 10,7 ± 3,0 Rearings; n=13; 30 mg/kg KG VA-5: 15,1 ± 7,2 Rearings; n=10).

Zu einer erhöhten vertikalen Aktivität der Mäuse kam es nach Injektion von 3 mg/kg KG VA-7 im Vergleich zur Kontrollgruppe (Kontrollgruppe: 15,6 ± 3,3 Rearings, n=16 vs. 3 mg/kg KG VA-7: 29,6 ± 11,0 Rearings; n=10; $p>0,05$). Im Gegensatz dazu konnte bei höheren Dosen VA-7 eine Abnahme der Anzahl der Rearings im Zentrum beobachtet werden (10 mg/kg KG VA-7: 11,9 ± 5,3; n=12; 30 mg/kg KG VA-7: 7,6 ± 2,2; n=13).

Getestete Substanzen	Laufstrecke in m	Zeit im Zentrum	Rearings	Rearings im Zentrum	Anzahl der Versuchstiere
Kontrolle	39,0 ± 1,7	47,9 ± 5,3	175,3 ± 15,1	15,6 ± 3,3	16
VA 3 mg/kg	41,4 ± 2,3	58,8 ± 12,1	202,2 ± 27,7	22,9 ± 10,1	13
VA 10 mg/kg	39,1 ± 1,7	46,0 ± 6,2	139,6 ± 10,8	7,7 ± 1,7	12
VA 30 mg/kg	39,8 ± 2,1	45,0 ± 8,2	152,8 ± 16,5	8,8 ± 3,5	12
VA-1 3 mg/kg	40,4 ± 2,1	58,9 ± 17,4	140,1 ± 14,8	7,2 ± 3,1	10
VA-1 10 mg/kg	22,0 ± 3,1	69,0 ± 10,9	58,6 ± 14,1	12,2 ± 3,6	14
VA-1 30 mg/kg	20,7 ± 2,3	44,0 ± 12,0	47,2 ± 7,1	1,7 ± 0,5	12
VA-3 3 mg/kg	35,7 ± 1,4	36,6 ± 4,9	184,5 ± 14,8	7,5 ± 2,0	13
VA-3 10 mg/kg	32,8 ± 1,8	36,3 ± 9,1	168,8 ± 15,8	8,1 ± 2,5	12
VA-3 30 mg/kg	29,7 ± 2,0	39,9 ± 8,8	111,1 ± 16,4	6,1 ± 3,7	12
VA-5 3 mg/kg	38,0 ± 2,1	59,9 ± 11,8	143,9 ± 17,3	12,3 ± 3,8	12
VA-5 10 mg/kg	38,6 ± 1,6	47,0 ± 5,6	163,8 ± 13,7	10,7 ± 3,0	13
VA-5 30 mg/kg	39,0 ± 2,2	49,4 ± 10,6	191,8 ± 22,9	15,1 ± 7,2	10
VA-7 3 mg/kg	37,2 ± 1,8	73,8 ± 16,1	191,0 ± 49,0	29,6 ± 11,0	10
VA-7 10 mg/kg	37,0 ± 1,9	44,6 ± 7,3	165,8 ± 22,0	11,9 ± 5,3	12
VA-7 30 mg/kg	35,1 ± 2,0	35,1 ± 6,6	168,9 ± 11,0	7,6 ± 2,2	13

Tabelle 6: Laufstrecke in m, Zeit im Zentrum, Anzahl der Rearings, Anzahl der Rearings im Zentrum nach Applikation der angegebenen Substanzen in unterschiedlichen Dosierungen; die Dosierungen beziehen sich auf 1kg Körpergewicht der Maus

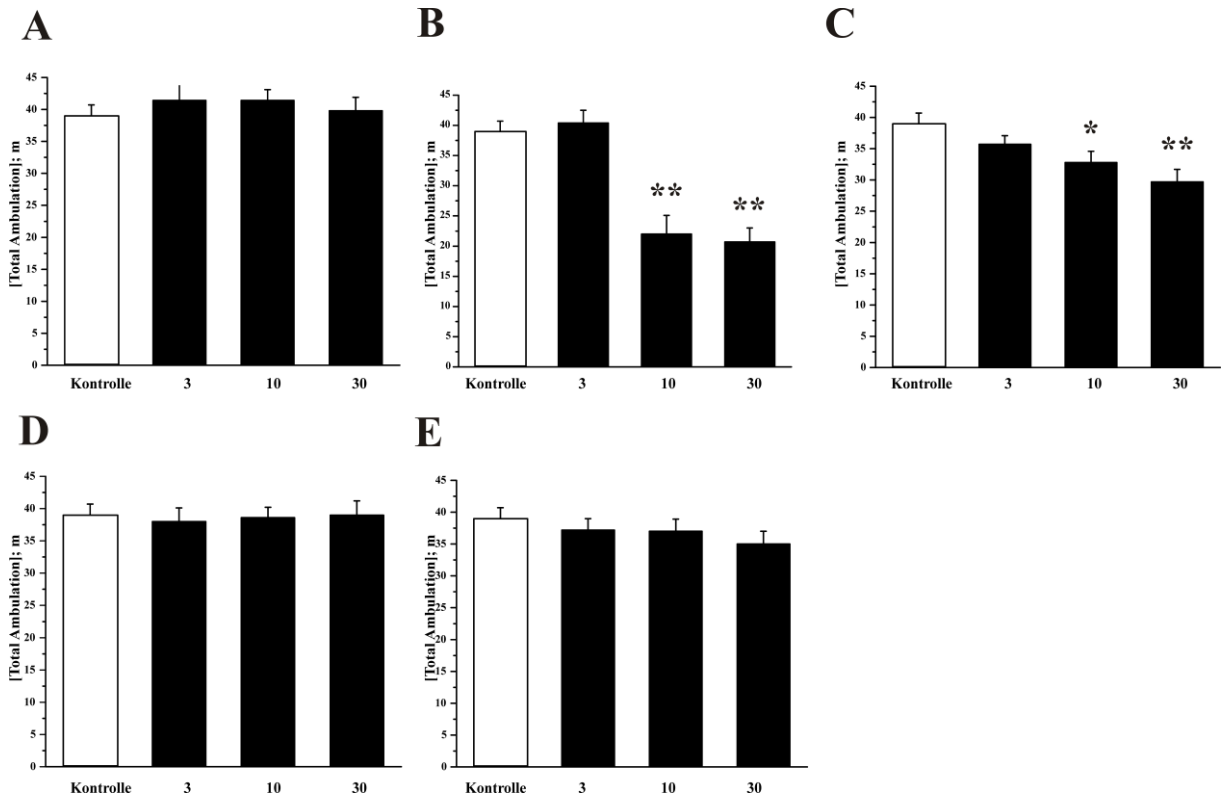


Abbildung 28: Effekt von Valerensäure und ausgewählter Derivate auf die gesamte Laufstrecke von c57Bl/6N Mäusen im OF. Die Balken zeigen die gesamte, zurückgelegte Strecke (m) nach Applikation der angegebenen Dosen VA (A; schwarze Balken), VA-1 (B; schwarze Balken), VA-3 (C; schwarze Balken), VA-5 (D; schwarze Balken) und VA-7 (E; schwarze Balken), im Vergleich zur Kontrollgruppe (weißer Balken). Die abgebildeten Werte sind Mittelwerte ± SEM von mind. 10 Versuchstieren. (*) bedeutet statistisch signifikant ($p<0.05$); (**) bedeutet statistisch signifikant ($p<0.01$).

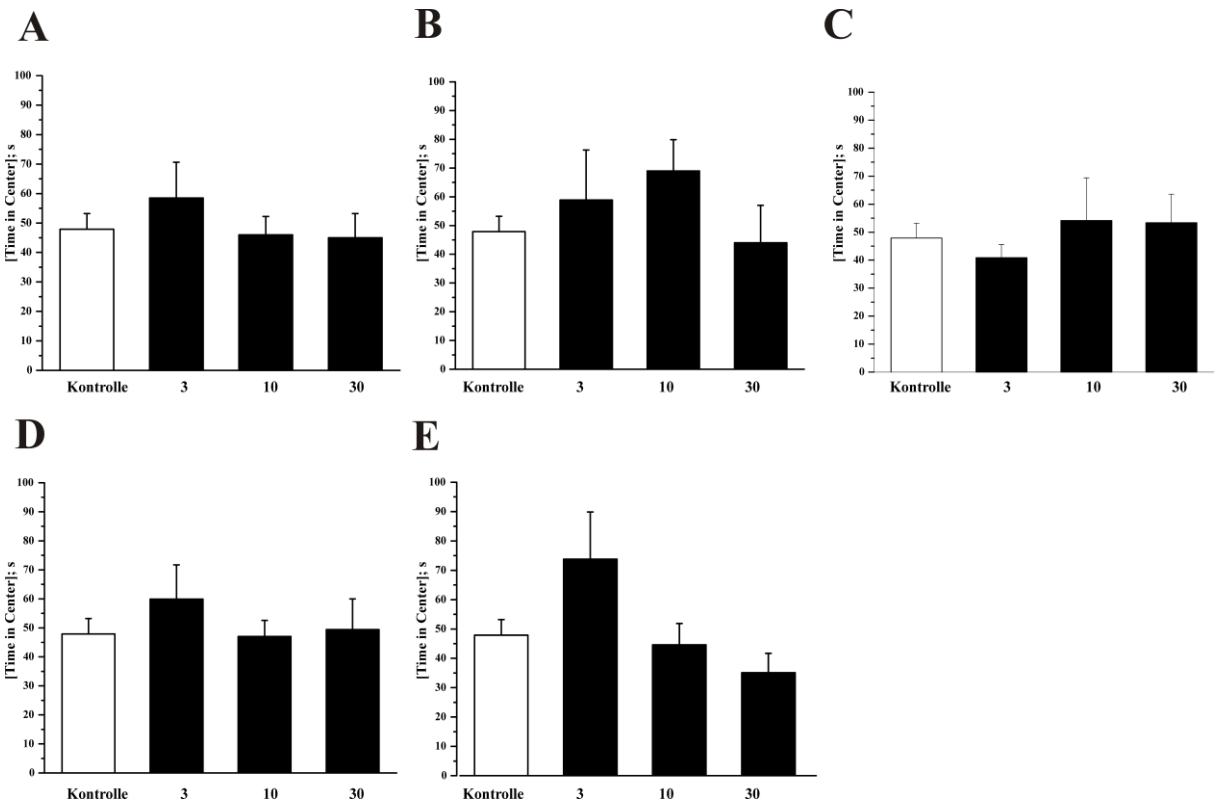


Abbildung 29: Effekt von Valerensäure und ausgewählter Derivate auf die von c57Bl/6N Mäusen im Zentrum des OF verbrachte Zeit. Die Balken zeigen die Zeit m Zentrum (s) nach Applikation der angegebenen Dosen VA (A; schwarze Balken), VA-1 (B; schwarze Balken), VA-3 (C; schwarze Balken), VA-5 (D; schwarze Balken) und VA-7 (E; schwarze Balken), im Vergleich zur Kontrollgruppe (weißer Balken). Die abgebildeten Werte sind Mittelwerte ± SEM von mind. 10 Versuchstieren. (*) bedeutet statistisch signifikant ($p<0.05$); (**) bedeutet statistisch signifikant ($p<0.01$).

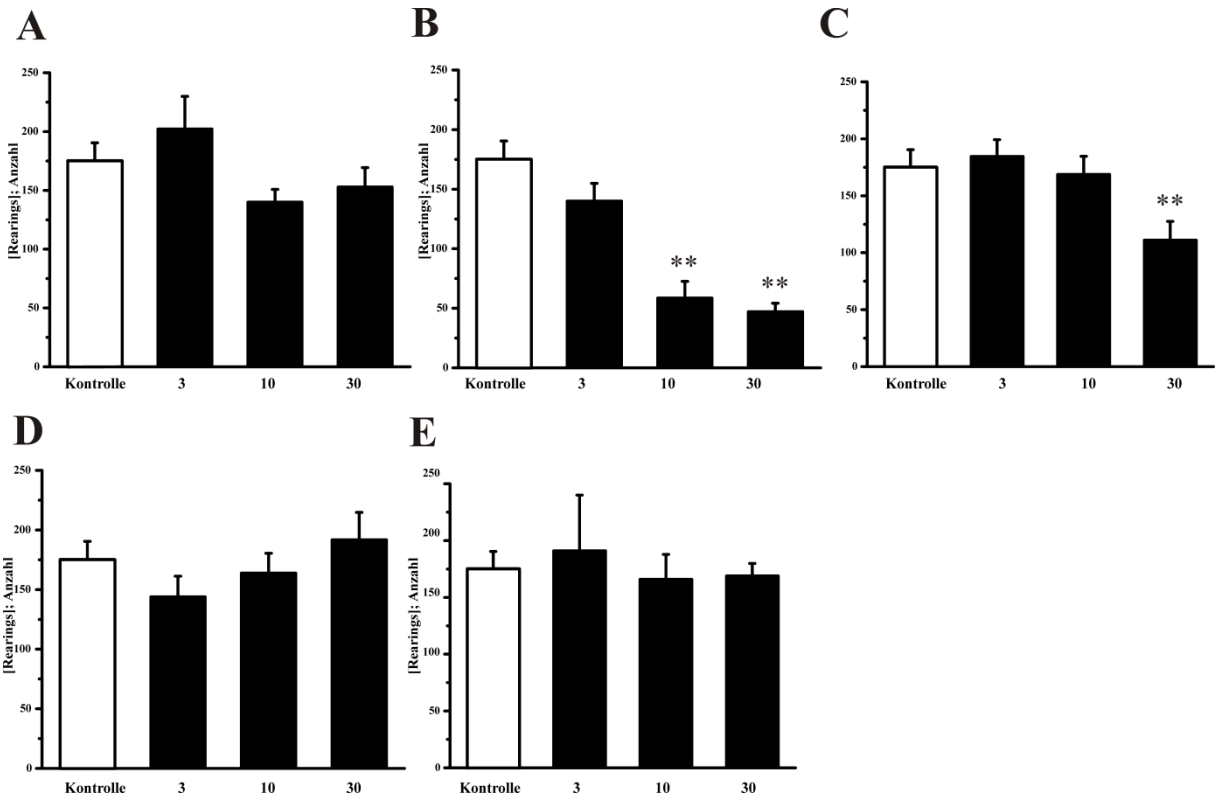


Abbildung 30: Effekt von Valerensäure und ausgewählter Derivate auf die Anzahl der Rearings von c57Bl/6N Mäusen. Die Balken zeigen die Anzahl der Rearings nach Applikation der angegebenen Dosen VA (A; schwarze Balken), VA-1 (B; schwarze Balken), VA-3 (C; schwarze Balken), VA-E5 (D; schwarze Balken) und VA-7 (E; schwarze Balken), im Vergleich zur Kontrollgruppe (weißer Balken). Die abgebildeten Werte sind Mittelwerte ± SEM von mind. 10 Versuchstieren. (*) bedeutet statistisch signifikant ($p<0.05$); (**) bedeutet statistisch signifikant ($p<0.01$).

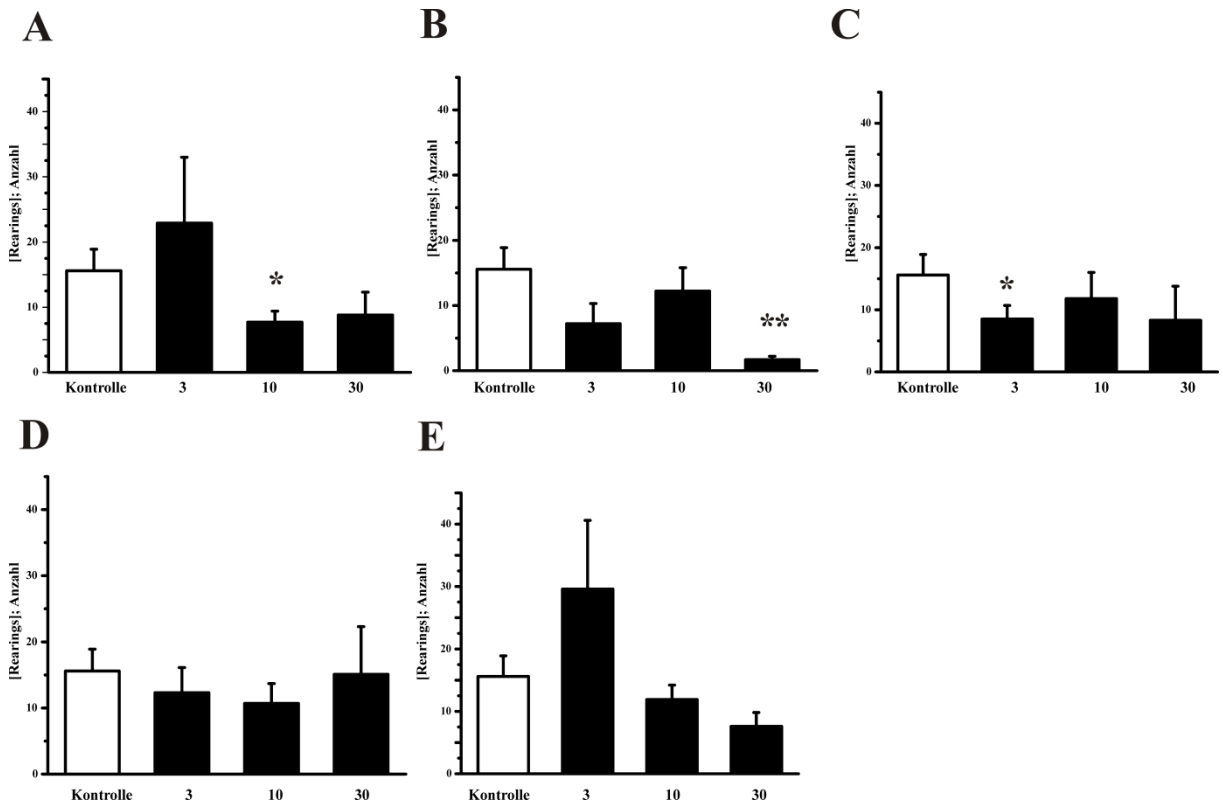


Abbildung 31: Effekt von Valerensäure und ausgewählter Derivate auf die Anzahl der Rearings von c57Bl/6N Mäuse im Zentrum. Die Balken zeigen die Anzahl der Rearings im Zentrum nach Applikation der angegebenen Dosen VA (A; schwarze Balken), VA-1 (B; schwarze Balken), VA-3 (C; schwarze Balken), VA-5 (D; schwarze Balken) und VA-7 (E; schwarze Balken), im Vergleich zur Kontrollgruppe (weißer Balken). Die abgebildeten Werte sind Mittelwerte ± SEM von mind. 10 Versuchstieren. (*) bedeutet statistisch signifikant ($p<0.05$); (**) bedeutet statistisch signifikant ($p<0.01$).

5 Diskussion

5.1 Piperin und Derivat (7)

Im Rahmen meiner Diplomarbeit wurde zum ersten Mal die *in vivo* Wirkung von Piperin 30 Minuten nach intraperitonealer Applikation (i.p.) in einem Mausmodell (EPM-Test) untersucht. Danach wurde die Wirkung des neu synthetisierten Derivats **(7)** ebenfalls im Tiermodell untersucht und mit den Effekten von Piperin verglichen.

Wie in Abbildung 26 ersichtlich, verbrachten Mäuse ab Dosen von 0,3 mg/kg KG Piperin signifikant mehr Zeit in den offenen Armen des EPM verglichen mit der Kontrollgruppe, was als anxiolytisches Verhalten gedeutet werden kann. Weiters konnte bei einer Dosis von 1 mg/kg KG Piperin eine signifikante Reduktion der Laufstrecke beobachtet werden. Prinzipiell ließe ein solcher Effekt (verkürzte Laufstrecke im Vergleich zur Kontrollgruppe) auf sedierende Eigenschaften der Substanz schließen, zumal Piperin die Aktivität von $GABA_A$ Rezeptoren potenziert und $GABA_A$ Modulatoren *in vivo* daher meist auch zu einer Sedierung führen. Piperin ist jedoch kein selektiver Ligand von $GABA_A$ Rezeptoren, sondern greift neben zahlreichen anderen Targets auch an TRPV1 Kanälen an. Diese Kanäle sind für die Vermittlung von Wärme und Schmerz verantwortlich (Correa et al., 2010; McNamara et al., 2005; Okumara et al., 2010). Daher könnte die reduzierte Aktivität der Mäuse auch als Hinweis auf Aktivierung von TRPV1 Kanälen sein: Dies würde bedeuten, dass sich die Tiere aufgrund gesteigertem Schmerzempfinden und veränderter Körpertemperatur weniger bewegten. Nichtsdestotrotz kann man eine $GABA_A$ vermittelte Reduktion der Laufstrecke, z.B. Sedierung, nicht ausschließen. Dieser Fragestellung sollte in weiteren Untersuchungen noch nachgegangen werden.

Wie Piperin zeigte sein Derivat **(7)** in den Dosen von 0,3 mg/kg KG und 1 mg/kg KG anxiolytische Wirkung. Die Mäuse verbrachten signifikant mehr Zeit in den offenen Armen des EPM verglichen mit der Kontrollgruppe. Anders als bei Piperin war der maximale Effekt von **(7)** bei 1 mg/kg KG noch nicht erreicht, daher wurden auch höhere Dosierungen untersucht.

Eine weitere Steigerung des anxiolytischen Effekts konnte nach Injektion von 3 mg/kg KG **(7)** erreicht werden. Interessanterweise kam es nach Applikation von 10 mg/kg KG zu keiner weiteren Steigerung der anxiolytischen Wirkung, sondern zu einem dramatischen Abfall der Anxiolyse (siehe Abbildung 26). Diese Gruppe verbrachte signifikant weniger Zeit in der OA im Vergleich zur Kontrollgruppe. Dies würde bedeuten, dass **(7)** in niedrigen Dosierungen zwar anxiolytisch, in höheren (ab 10 mg/kg KG) dagegen anxiogen wirkt. Eine andere Erklärung für das Ergebnis könnte eine veränderte Grundaktivität der Mäuse sein: Um die Anzahl

der Versuchstiere möglichst gering zu halten, wurden die Tiere mehrfach verwendet. Zwischen den einzelnen Versuchen lag ein testfreies Intervall von mindestens 14 Tagen. In dieser Zeit sollten einerseits bereits applizierte Substanzen vollständig eliminiert sein, andererseits sollte die Maus den Versuchsablauf vergessen haben und somit wie eine neue Maus zu verwenden sein. Daher kann man das Ergebnis von 10 mg/kg KG **(7)** auch dahingehend interpretieren, dass entweder Gedächtniseffekte das Verhalten der Tiere negativ beeinflusst haben oder **(7)** möglicherweise eine lange Halbwertszeit hat und die hohe Dosis bis zum nächsten Versuch noch nicht vollkommen abgebaut war.
Um eine endgültige Einschätzung des anxiolytischen Potentials von **(7)** zu treffen, sollten daher noch weitere Versuche mit unbehandelten Mäusen unternommen werden.
So lässt sich zusammenfassend
sagen, dass durch Derivatisierung von Piperin ein neuer Ligand von $GABA_A$ Rezeptoren entstand, der anxiolytisch, aber nicht sedierend wirkt.

5.2 Valerensäure und Valerensäure-Derivate

Im Rahmen meiner Diplomarbeit wurden auch erstmalig Valerensäure und einige Derivate (VA-1, VA-3, VA-5 und VA-7) 30 Minuten nach intraperitonealer Applikation im OF getestet.
In vorhergehenden Untersuchungen konnten anxiolytische Effekte von VA (Benke et al., 2008; Khom et al., 2007) und zwei Derivaten VA-EA und VA-A bei 3 mg/kg KG bereits gezeigt werden (Khom et al., 2010). VA und VA-A wurden zusätzlich noch detaillierter untersucht: Hierbei war auffällig, dass beide Substanzen in höherer Dosierung keine anxiolytische Aktivität zeigten. Mäuse, die mit VA-A behandelt worden waren, zeigten dabei eine signifikant reduzierte, motorische Aktivität, die durch eine geringere Zahl der Besuche der geschlossenen Arme und auch eine kürzere Gesamtlaufstrecke gekennzeichnet war. Im Gegensatz dazu kam es bei Behandlung mit VA zu keiner signifikanten Änderung der Laufstrecke. Daraus kann man ableiten, dass bei VA-A eventuell die anxiolytische Wirkung durch eine parallel dazu auftretende Sedierung überdeckt wurde, während der „Verlust“ der anxiolytischen Potenz von VA bei höheren Dosierungen zum jetzigen Zeitpunkt noch nicht bekannt ist (Khom et al., 2010). Eine mögliche Erklärung liefern die damals durchgeführten *in vitro* Experimente mit in *Xenopus laevis* exprimierten $GABA_A$ Rezeptoren: Auch hier kam es in höheren Konzentrationen zu einem massiven Verlust der Wirksamkeit von VA. *In vitro* wurde dieser Verlust der Aktivität über einen möglichen „open-chanel-block“ von $GABA_A$ Rezepto-

ren durch VA erklärt (Khom et al., 2007; Khom et al., 2010). Ob dies auch in vivo stattfindet, wäre zwar naheliegend, ist aber noch nicht untersucht worden.

Dies bedeutet, dass VA nicht sediert, andere VA-Derivate möglicherweise aber doch. Daher wurden in meiner Diplomarbeit (und in der Diplomarbeit von Kollegin cand.Mag.pharm. Helga Dobernig) verschiedene VA-Derivate untersucht. Hierbei war auffällig, dass nur VA-1 und VA-3 sedierend wirkten. VA-5, das sich von VA-3 nur durch eine weitere Methylgruppe unterscheidet, zeigte keinen Effekt auf die motorische Aktivität der Tiere. VA-7 zeigte bei den untersuchten Dosierungen ebenfalls keinen Effekt auf die Laufstrecke, führte aber zu einer (nicht signifikanten) Erhöhung der Zeit im Zentrum. Dies bedeutet, dass basierend auf diesen Untersuchung von den untersuchten VA-Derivaten nur VA-7 Potential als Anxiolytikum zeigt. Eine weitere interessante Beobachtung war, dass in Abhängigkeit von der Größe des Moleküls, ähnlich wie in *in vitro* Untersuchungen, auch *in vivo* die sedierende Wirkkomponente stark abgenommen hat.

So lässt sich zusammenfassend sagen, dass basierend auf diesen Untersuchungen noch keine genaue Aussage getroffen werden kann, welches der VA-Derivate am ehesten Potential zur Entwicklung eines Anxiolytikums zeigt. Als Sedativum käme vor allem VA-1 in Frage. Jedoch sind hierfür definitiv noch weitere Untersuchungen erforderlich.

6 Zusammenfassung

HINTERGRUND: γ-Aminobuttersäure (GABA) ist der wichtigste inhibitorische Neurotransmitter im zentralen Nervensystem (ZNS) der Säugetiere**.** Bindung von GABA an den GABA Typ A ($GABA_A$) Rezeptor führt zu einer Öffnung der Kanalpore, wodurch negativ geladene Chloridionen ins Zellinnere strömen und so zu einer Hyperpolarisation führen. $GABA_A$ Rezeptoren werden von einer Vielzahl klinisch relevanter Arzneistoffe (z.B. Benzodiazepine, Anästhetika) moduliert. Neben diesen Substanzen greifen aber auch zahlreiche Naturstoffe wie z.B. Piperin oder Valerensäure am $GABA_A$ Rezeptor an.

ZIELSETZUNG: Im Rahmen meiner Diplomarbeit sollte erstmals eine *in vivo* Untersuchung von Piperin, Valerensäure und einiger, ausgewählter Derivate (VA-1, VA-3, VA-5 und VA-7 und einem Piperinderivat **(7))** durchgeführt werden.

METHODEN: Verhaltenspharmakologische Charakterisierung von $GABA_A$ Rezeptor Liganden 30 min nach intraperitonealer Applikation im EPM und OF Test.

ERGEBNISSE UND DISKUSSION:

Piperin und Derivat **(7)** konnten als anxiolytisch wirkende Substanzen im EPM identifiziert werden, wobei der Effekt von Derivat **(7)** stärker ausgeprägt war. Zusätzlich zeigte Derivat **(7)** keine Beeinträchtigung der Aktivität der Tiere.

Valerensäure, die in vorherigen Untersuchungen bereits als anxiolytisch wirkender Ligand von $GABA_A$ identifiziert wurde (Khom et al., 2010), zeigte auch im OF keine Sedierung.

Nach Applikation von 10 bzw. 30 mg/kg KG VA-1 und VA-3 kam es zu einer signifikanten Reduktion der Aktivität der Mäuse, während kein Effekt von VA-5 und VA-7 beobachtet werden konnte. Daraus kann man schließen, dass VA-5 und VA-7 vermutlich Anxiolyse ohne begleitende Sedierung vermitteln. VA-1 und VA-3 scheinen anxiolytisch und sedierend zu wirken.

Zahlreiche, vertiefende Untersuchungen zur Wirkung der VA-Derivate sind noch notwendig.

7 Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name: Daniela Hrabak

Geburtsdatum: 3.9.1987

Geburtsort: Linz

Ausbildung:

1994 Volksschule Harbach

1998 Gymnasium WRG Körnerstraße (2004: Kindergartenpraktikum)

2006 Studium Pharmazie an der Universität Wien

2007 Ferialpraxis St. Markus Apotheke in Linz

2009 TCM Summerschool in Chengdu

Ferialpraxis Resch Apotheke in Linz

2010 Ferialpraxis St. Markus Apotheke

1. Diplomprüfung am: 16.5.2008

2. Diplomprüfung am: 27.4.2012

8 Literaturverzeichnis

Aggarwal B, Kunnumakkara A. 2009. Molecular Targets and Therapeutic Uses of Spices: Modern Uses for Ancient Medicine.

Ang-Lee MK, Moss J, Yuan CS. 2001. Herbal medicines and perioperative care. Jama 286:208-216.

Argyropoulos SV, Sandford JJ, Nutt DJ. 2000. The psychobiology of anxiolytic drug. Part 2: Pharmacological treatments of anxiety. Pharmacol Ther 88:213-227.

Awad R, Levac D, Cybulska P, Merali Z, Trudeau VL, Arnason JT. 2007. Effects of traditionally used anxiolytic botanicals on enzymes of the gamma-aminobutyric acid (GABA) system. Can J Physiol Pharmacol 85:933-942.

Awapara J, Landua AJ, Fuerst R, Seale B. 1950. Free gamma-aminobutyric acid in brain. J Biol Chem 187:35-39.

Azagra-Calero E, Espinar-Escalona E, Barrera-Mora JM, Llamas-Carreras JM, Solano-Reina E. 2011. Obstructive Sleep Apnea Syndrome (OSAS). Review of the literature. Med Oral Patol Oral Cir Bucal.

Baldwin DS, Anderson IM, Nutt DJ, Bandelow B, Bond A, Davidson JR, den Boer JA, Fineberg NA, Knapp M, Scott J, Wittchen HU. 2005. Evidence-based guidelines for the pharmacological treatment of anxiety disorders: recommendations from the British Association for Psychopharmacology. J Psychopharmacol 19:567-596.

Baumann SW, Baur R, Sigel E. 2002. Forced subunit assembly in alpha1beta2gamma2 GABAA receptors. Insight into the absolute arrangement. J Biol Chem 277:46020-46025.

Beard S, Hunn A, Wight J. 2003. Treatments for spasticity and pain in multiple sclerosis: a systematic review. Health Technol Assess 7:iii, ix-x, 1-111.

Benke D, Barberis A, Kopp S, Altmann KH, Schubiger M, Vogt KE, Rudolph U, Möhler H. 2009. GABA A receptors as in vivo substrate for the anxiolytic action of valerenic acid, a major constituent of valerian root extracts. Neuropharmacology 56:174-181.

Bjorness TE, Greene RW. 2009. Adenosine and sleep. Curr Neuropharmacol 7:238-245.

Boileau AJ, Newell JG, Czajkowski C. 2002. GABA(A) receptor beta 2 Tyr97 and Leu99 line the GABA-binding site. Insights into mechanisms of agonist and antagonist actions. J Biol Chem 277:2931-2937.

Bracha HS, Ralston TC, Matsukawa JM, Williams AE, Bracha AS. 2004. Does "fight or flight" need updating? Psychosomatics 45:448-449.

Chokroverty S. 2010. Overview of sleep & sleep disorders. Indian J Med Res 131:126-140.

Correa EA, Hogestatt ED, Sterner O, Echeverri F, Zygmunt PM. 2010. In vitro TRPV1 activity of piperine derived amides. Bioorg Med Chem 18:3299-3306.

Crawley J. 2007. What's wrong with my mouse: Behavioral Phenotyping of Transgenic and Knockout. 544.

Cryan JF, Kaupmann K. 2005. Don't worry 'B' happy!: a role for GABA(B) receptors in anxiety and depression. Trends Pharmacol Sci 26:36-43.

Dauvilliers Y, Buguet A. 2005. Hypersomnia. Dialogues Clin Neurosci 7:347-356.

Dawson GR, Collinson N, Atack JR. 2005. Development of subtype selective GABAA modulators. CNS Spectr 10:21-27.

D'Hulst C, Atack JR, Kooy RF. 2009. The complexity of the GABAA receptor shapes unique pharmacological profiles. Drug Discov Today 14:866-875.

Dietz BM, Mahady GB, Pauli GF, Farnsworth NR. 2005. Valerian extract and valerenic acid are partial agonists of the 5-HT5a receptor in vitro. Brain Res Mol Brain Res 138:191-197.

Eadie MJ. 2004. Could valerian have been the first anticonvulsant? Epilepsia 45:1338-1343.

Ebert B, Wafford KA, Deacon S. 2006. Treating insomnia: Current and investigational pharmacological approaches. Pharmacol Ther 112:612-629.

Ernst M, Brauchart D, Boresch S, Sieghart W. 2003. Comparative modeling of GABA(A) receptors: limits, insights, future developments. Neuroscience 119:933-943.

Ernst M, Bruckner S, Boresch S, Sieghart W. 2005. Comparative models of GABAA receptor extracellular and transmembrane domains: important insights in pharmacology and function. Mol Pharmacol 68:1291-1300.

Farrant M, Nusser Z. 2005. Variations on an inhibitory theme: phasic and tonic activation of GABA(A) receptors. Nat Rev Neurosci 6:215-229.

Fendt M, Fanselow MS. 1999. The neuroanatomical and neurochemical basis of conditioned fear. Neurosci Biobehav Rev 23:743-760.

Foster RG, Wulff K. 2005. The rhythm of rest and excess. Nat Rev Neurosci 6:407-414.

Gao XQ, Bjork L. 2000. Valerenic acid derivatives and valepotriates among individuals, varieties and species of Valeriana. Fitoterapia 71:19-24.

Garner M, Möhler H, Stein DJ, Mueggler T, Baldwin DS. 2009. Research in anxiety disorders: from the bench to the bedside. Eur Neuropsychopharmacol 19:381-390.

Gerecke M. 1983. Chemical structure and properties of midazolam compared with other benzodiazepines. Br J Clin Pharmacol 16 Suppl 1:11S-16S.

Goetz T, Arslan A, Wisden W, Wulff P. 2007. GABA(A) receptors: structure and function in the basal ganglia. Prog Brain Res 160:21-41.

Gordon JA, Hen R. 2004. Genetic approaches to the study of anxiety. Annu Rev Neurosci 27:193-222.

Graeff FG. 2007. [Anxiety, panic and the hypothalamic-pituitary-adrenal axis]. Rev Bras Psiquiatr 29 Suppl 1:S3-6.

Hadley S, Petry JJ. 2003. Valerian. Am Fam Physician 67:1755-1758.

Halliwell RF, Thomas P, Patten D, James CH, Martinez-Torres A, Miledi R, Smart TG. 1999. Subunit-selective modulation of GABAA receptors by the non-steroidal anti-inflammatory agent, mefenamic acid. Eur J Neurosci 11:2897-2905.

Henschel O, Gipson KE, Bordey A. 2008. GABAA receptors, anesthetics and anticonvulsants in brain development. CNS Neurol Disord Drug Targets 7:211-224.

Hoban TF. 2010. Sleep disorders in children. Ann N Y Acad Sci 1184:1-14.

Hogg S. 1996. A review of the validity and variability of the elevated plus-maze as an animal model of anxiety. Pharmacol Biochem Behav 54:21-30.

Johnson PL, Truitt W, Fitz SD, Minick PE, Dietrich A, Sanghani S, Traskman-Bendz L, Goddard AW, Brundin L, Shekhar A. 2010. A key role for orexin in panic anxiety. Nat Med 16:111-115.

Khom S, Baburin I, Timin E, Hohaus A, Trauner G, Kopp B, Hering S. 2007. Valerenic acid potentiates and inhibits GABA(A) receptors: molecular mechanism and subunit specificity. Neuropharmacology 53:178-187.

Khom S, Strommer B, Ramharter J, Schwarz T, Schwarzer C, Erker T, Ecker GF, Mulzer J, Hering S. 2010. Valerenic acid derivatives as novel subunit-selective GABAA receptor ligands - in vitro and in vivo characterization. Br J Pharmacol 161:65-78.

Kopp S, Baur R, Sigel E, Möhler H, Altmann KH. 2010. Highly potent modulation of GABA(A) receptors by valerenic acid derivatives. ChemMedChem 5:678-681.

Korpi ER, Luddens H. 1997. Furosemide interactions with brain GABAA receptors. Br J Pharmacol 120:741-748.

Lakhan SE, Vieira KF. 2010. Nutritional and herbal supplements for anxiety and anxiety-related disorders: systematic review. Nutr J 9:42.

Länger R, Kubelka W. 2001. Phytokodex.

Leger D, Ogrizek P. 2012. [Review on sleep and awakening disorders.]. Rev Med Interne.

Lopez-Munoz F, Ucha-Udabe R, Alamo C. 2005. The history of barbiturates a century after their clinical introduction. Neuropsychiatr Dis Treat 1:329-343.

Lydiard RB. 2003. The role of GABA in anxiety disorders. J Clin Psychiatry 64 Suppl 3:21-27.

Mahowald MW, Schenck CH. 2005. Insights from studying human sleep disorders. Nature 437:1279-1285.

McKernan RM, Whiting PJ. 1996. Which GABAA-receptor subtypes really occur in the brain? Trends Neurosci 19:139-143.

McNamara FN, Randall A, Gunthorpe MJ. 2005. Effects of piperine, the pungent component of black pepper, at the human vanilloid receptor (TRPV1). Br J Pharmacol 144:781-790.

Mehmood MH, Gilani AH. 2010. Pharmacological basis for the medicinal use of black pepper and piperine in gastrointestinal disorders. J Med Food 13:1086-1096.

Meldrum BS, Rogawski MA. 2007. Molecular targets for antiepileptic drug development. Neurotherapeutics 4:18-61.

Miller PS, Smart TG. 2010. Binding, activation and modulation of Cys-loop receptors. Trends Pharmacol Sci 31:161-174.

Möhler H. 2011. The GABA system in anxiety and depression and its therapeutic potential. Neuropharmacology 62:42-53.

Möhler H. 2006. GABA(A) receptor diversity and pharmacology. Cell Tissue Res 326:505-516.

Möhler H, Fritschy JM, Rudolph U. 2002. A new benzodiazepine pharmacology. J Pharmacol Exp Ther 300:2-8.

Morlock EV, Czajkowski C. 2011. Different residues in the GABAA receptor benzodiazepine binding pocket mediate benzodiazepine efficacy and binding. Mol Pharmacol 80:14-22.

Murphy K, Kubin ZJ, Shepherd JN, Ettinger RH. 2010. Valeriana officinalis root extracts have potent anxiolytic effects in laboratory rats. Phytomedicine 17:674-678.

Nemeroff CB. 2003. Anxiolytics: past, present, and future agents. J Clin Psychiatry 64 Suppl 3:3-6.

Nemeroff CB. 2003. The role of GABA in the pathophysiology and treatment of anxiety disorders. Psychopharmacol Bull 37:133-146.

Nutt DJ. 2005. Overview of diagnosis and drug treatments of anxiety disorders. CNS Spectr 10:49-56.

Okumura Y, Narukawa M, Iwasaki Y, Ishikawa A, Matsuda H, Yoshikawa M, Watanabe T. 2010. Activation of TRPV1 and TRPA1 by black pepper components. Biosci

Biotechnol Biochem 74:1068-1072.

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. Pharmacol Rev 60:243-260.

Olsen RW, Sieghart W. 2009. GABA A receptors: subtypes provide diversity of function and pharmacology. Neuropharmacology 56:141-148.

Padgett CL, Slesinger PA. 2010. GABAB receptor coupling to G-proteins and ion channels. Adv Pharmacol 58:123-147.

Pedersen ME, Metzler B, Stafford GI, van Staden J, Jager AK, Rasmussen HB. 2009. Amides from Piper capense with CNS activity - a preliminary SAR analysis. Molecules 14:3833-3843.

Petroff OA. 2002. GABA and glutamate in the human brain. Neuroscientist 8:562-573.

Porkka-Heiskanen T, Kalinchuk AV. 2010. Adenosine, energy metabolism and sleep homeostasis. Sleep Med Rev 15:123-135.

Ramakrishnan K, Scheid DC. 2007. Treatment options for insomnia. Am Fam Physician 76:517-526.

Richert AC, Baran AS. 2003. A review of common sleep disorders. CNS Spectr 8:102-109.

Röschke J, Mann K. 1998. Schlaf und Schlafstörungen. C.H.Beck.

Rudolph U, Knoflach F. 2011. Beyond classical benzodiazepines: novel therapeutic potential of GABAA receptor subtypes. Nat Rev Drug Discov 10:685-697.

Sandford JJ, Argyropoulos SV, Nutt DJ. 2000. The psychobiology of anxiolytic drugs. Part 1: Basic neurobiology. Pharmacol Ther 88:197-212.

Saper CB, Scammell TE, Lu J. 2005. Hypothalamic regulation of sleep and circadian rhythms. Nature 437:1257-1263.

Schwartz JR, Roth T. 2008. Neurophysiology of sleep and wakefulness: basic science and clinical implications. Curr Neuropharmacol 6:367-378.

Sehgal A, Mignot E. 2011. Genetics of sleep and sleep disorders. Cell 146:194-207.

Sichardt K, Vissiennon Z, Koetter U, Brattstrom A, Nieber K. 2007. Modulation of postsynaptic potentials in rat cortical neurons by valerian extracts macerated with different alcohols: involvement of adenosine A(1)- and GABA(A)-receptors. Phytother Res 21:932-937.

Sieghart W. 2006. Structure, pharmacology, and function of GABAA receptor subtypes. Adv Pharmacol 54:231-263.

Sieghart W, Sperk G. 2002. Subunit composition, distribution and function of GABA(A) re-

ceptor subtypes. Curr Top Med Chem 2:795-816.

Simon J, Wakimoto H, Fujita N, Lalande M, Barnard EA. 2004. Analysis of the set of GABA(A) receptor genes in the human genome. J Biol Chem 279:41422-41435.

Sine SM, Engel AG. 2006. Recent advances in Cys-loop receptor structure and function. Nature 440:448-455.

Srinivasan K. 2007. Black pepper and its pungent principle-piperine: a review of diverse physiological effects. Crit Rev Food Sci Nutr 47:735-748.

Stickgold R. 2005. Sleep-dependent memory consolidation. Nature 437:1272-1278.

Stickgold R, Walker MP. 2007. Sleep-dependent memory consolidation and reconsolidation. Sleep Med 8:331-343.

Tan KR, Rudolph U, Luscher C. 2011. Hooked on benzodiazepines: GABAA receptor subtypes and addiction. Trends Neurosci 34:188-197.

Treiman DM. 2001. GABAergic mechanisms in epilepsy. Epilepsia 42 Suppl 3:8-12.

Uusi-Oukari M, Korpi ER. 2010. Regulation of GABA(A) receptor subunit expression by pharmacological agents. Pharmacol Rev 62:97-135.

Wafford KA, Ebert B. 2008. Emerging anti-insomnia drugs: tackling sleeplessness and the quality of wake time. Nat Rev Drug Discov 7:530-540.

Wattanathorn J, Chonpathompikunlert P, Muchimapura S, Priprem A, Tankamnerdthai O. 2008. Piperine, the potential functional food for mood and cognitive disorders. Food Chem Toxicol 46:3106-3110.

Wheatley D. 2005. Medicinal plants for insomnia: a review of their pharmacology, efficacy and tolerability. J Psychopharmacol 19:414-421.

Wilson SJ, Nutt DJ, Alford C, Argyropoulos SV, Baldwin DS, Bateson AN, Britton TC, Crowe C, Dijk DJ, Espie CA, Gringras P, Hajak G, Idzikowski C, Krystal AD, Nash JR, Selsick H, Sharpley AL, Wade AG. 2010. British Association for Psychopharmacology consensus statement on evidence-based treatment of insomnia, parasomnias and circadian rhythm disorders. J Psychopharmacol 24:1577-1601.

Wingrove PB, Thompson SA, Wafford KA, Whiting PJ. 1997. Key amino acids in the gamma subunit of the gamma-aminobutyric acidA receptor that determine ligand binding and modulation at the benzodiazepine site. Mol Pharmacol 52:874-881.

Wingrove PB, Wafford KA, Bain C, Whiting PJ. 1994. The modulatory action of loreclezole at the gamma-aminobutyric acid type A receptor is determined by a single amino acid in the beta 2 and beta 3 subunit. Proc Natl Acad Sci U S A 91:4569-4573.

Winsky-Sommerer R. 2009. Role of GABAA receptors in the physiology and pharmacology

of sleep. Eur J Neurosci 29:1779-1794.

Wittchen HU, Jacobi F, Rehm J, Gustavsson A, Svensson M, Jonsson B, Olesen J, Allgulander C, Alonso J, Faravelli C, Fratiglioni L, Jennum P, Lieb R, Maercker A, van Os J, Preisig M, Salvador-Carulla L, Simon R, Steinhausen HC. 2011. The size and burden of mental disorders and other disorders of the brain in Europe 2010. Eur Neuropsychopharmacol 21:655-679.

Yuan CS, Mehendale S, Xiao Y, Aung HH, Xie JT, Ang-Lee MK. 2004. The gamma-aminobutyric acidergic effects of valerian and valerenic acid on rat brainstem neuronal activity. Anesth Analg 98:353-358, table of contents.

Zaugg J, Baburin I, Strommer B, Kim HJ, Hering S, Hamburger M. 2010. HPLC-based activity profiling: discovery of piperine as a positive GABA(A) receptor modulator targeting a benzodiazepine-independent binding site. J Nat Prod 73:185-191.

Zimmerman JE, Naidoo N, Raizen DM, Pack AI. 2008. Conservation of sleep: insights from non-mammalian model systems. Trends Neurosci 31:371-376.

9 Danksagung

Ich möchte mich ganz herzlich bei Univ. Prof. Dr. Steffen Hering bedanken, erstens dafür, dass er die Arbeit ermöglicht und mir das Vertrauen geschenkt hat, die Arbeit durchzuführen und zweitens für die stets gute Betreuung und Unterstützung. Ich bedanke mich bei ihm auch dafür, dass mir durch die gute Integration in das Team und die Diskussionen zur Thematik ein sehr positives Bild von wissenschaftlicher Arbeit vermittelt wurde, das mir für zukünftige Entscheidungen eine wertvolle Unterstützung und auch Vorbild sein wird.

Weiters möchte ich mich bei Prof. Dr. Mihovilovic und Dipl. Ing. Maximilian Haider für die Synthese der Valerensäure Derivate bedanken und auch bei allen anderen Mitarbeitern des Pharmakologischen Instituts, die direkt oder indirekt bei meine Diplomarbeit mitgeholfen haben.

Besonderer Dank gilt Dr. Sophia Khom, die mir immer mit Rat und Tat weitergeholfen hat, sehr engagiert an die Sache herangegangen ist und auch wirklich geduldig mit mir war. Sie hat mich vor allem gelehrt Ergebnisse zu interpretieren, die richtigen Fragen zu stellen, diese in Versuchskonzepte umzusetzen und mir vor allem bei der Interpretation der unterschiedlichen Verhaltensweisen der Mäuse geholfen. Sie hat mir beigebracht Ergebnisse schriftlich darzustellen und die Grundlagen vermittelt, wie man eine wissenschaftliche Arbeit erstellt. Insbesondere ihre – aus meiner Sicht – hohe fachliche Kompetenz und Sicherheit habe ich sehr bewundert und war mir eine große Stütze beim Verfassen dieser Arbeit.

Ein sehr persönlicher und freundschaftlicher Dank gilt meiner Studienkollegin Helga Dobernig, die mit mir gemeinsam die Versuche durchgeführt hat und mich Tag ein Tag aus ertragen musste. Ich hätte mir keine bessere Partnerin vorstellen können, weil wir uns perfekt ergänzen konnten.

Zu guter Letzt möchte ich mich noch bei meinen Eltern, meinen Großeltern und meinem jahrelangen Freund Günther bedanken, die mir immer Halt gaben, jederzeit ein offenes Ohr für mich hatten und mich immer in meinem Tun unterstützt haben. Es war meine Familie, die mir all dies ermöglicht und den richtigen Weg gezeigt hat.