

Fachgebiet Zoologie  
der Technischen Universität München

## **Einfluß etablierter und potentieller Hypnotika auf das Schlaf-Wach-Verhalten der Ratte**

**Anke Langebartels**

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines Doktors der Naturwissenschaften

- Dr. rer. nat. -  
genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. Hans-Rudolf Fries  
Prüfer der Dissertation: 1. Univ.-Prof. Dr. Hans-Joachim Leppelsack  
2. Hon.-Prof. Dr. Dr. Florian Holsboer,  
Ludwig-Maximilians-Universität München

Die Dissertation wurde am 27.09.2001 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt am 28.11.2001 angenommen.



---

**INHALTSVERZEICHNIS**

<b>1 EINLEITUNG</b> .....	1
<b>1.1 Schlaf</b> .....	3
<b>1.2 Der GABA<sub>A</sub>-Rezeptor</b> .....	7
<b>1.3 Zaleplon, Midazolam und Gaboxadol</b> .....	10
<b>1.4 Melatonin und Picrotoxin</b> .....	13
<b>2 METHODEN</b> .....	15
<b>2.1 Allgemein</b> .....	15
2.1.1 Versuchstiere.....	15
2.1.2 EEG-Operation.....	15
2.1.3 Gewöhnung der Tiere.....	17
2.1.4 Aufbau der Ableiteinheit.....	17
2.1.5 Datenaufnahme und –verarbeitung.....	18
<b>2.2 Zaleplon akut</b> .....	19
2.2.1 Versuchsdesign.....	19
2.2.2 Statistik.....	19
<b>2.3 Midazolam und Zaleplon subchronisch</b> .....	20
2.3.1 Versuchsdesign.....	20
2.3.2 Statistik.....	20
<b>2.4 Gaboxadol subchronisch</b> .....	21
2.4.1 Versuchsdesign.....	21
2.4.2 Statistik.....	22
<b>2.5 Melatonin und Picrotoxin</b> .....	22
2.5.1 Versuchsdesign.....	22
2.5.2 Statistik.....	23
<b>3 ERGEBNISSE</b> .....	24
<b>3.1 Zaleplon akut</b> .....	24
3.1.1 Vigilanzstadien.....	24
3.1.2 Schlafarchitektur.....	29
3.1.3 EEG Leistungsdichte während des non-REM Schlafs.....	32
3.1.4 EEG Leistungsdichte während des REM Schlafs.....	34
3.1.5 EEG Leistungsdichte während des Wachzustands.....	36
3.1.6 Muskelaktivität während des Wachzustands.....	38

<b>3.2 Midazolam und Zaleplon subchronisch</b> .....	39
3.2.1 Vigilanzstadien.....	39
3.2.2 Schlafarchitektur.....	44
3.2.3 EEG Leistungsdichte während des non-REM Schlafs .....	47
3.2.4 EEG Leistungsdichte während des REM Schlafs .....	48
3.2.5 EEG Leistungsdichte während des Wachzustands.....	48
3.2.6 Muskelaktivität während des Wachzustands.....	52
<b>3.3 Gaboxadol subchronisch</b> .....	54
3.3.1 Vigilanzstadien.....	54
3.3.2 Schlafarchitektur.....	56
3.3.3 EEG Leistungsdichte während des non-REM Schlafs .....	59
3.3.4 EEG Leistungsdichte während des REM Schlafs .....	59
3.3.5 EEG Leistungsdichte während des Wachzustands.....	59
3.3.6 Muskelaktivität während des Wachzustands.....	63
<b>3.4 Melatonin und Picrotoxin</b> .....	63
3.4.1 <i>Melatonin</i> .....	63
3.4.1.1 Gehirntemperatur.....	63
3.4.1.2 Vigilanzstadien.....	64
3.4.1.3 Schlafarchitektur.....	66
3.4.1.4 EEG Leistungsdichte während des non-REM Schlafs .....	66
3.4.2 <i>Melatonin und Picrotoxin</i> .....	67
3.4.2.1 Gehirntemperatur.....	67
3.4.2.2 Vigilanzstadien.....	68
3.4.2.3 Schlafarchitektur.....	70
3.4.2.4 EEG Leistungsdichte während des non-REM Schlafs .....	71
<b>4 DISKUSSION</b> .....	73
<b>4.1 Zaleplon akut</b> .....	73
<b>4.2 Midazolam und Zaleplon subchronisch</b> .....	75
4.2.1 <i>Midazolam</i> .....	75
4.2.2 <i>Zaleplon</i> .....	76
4.2.3 <i>Vergleich der beiden Schlafmittel</i> .....	78
<b>4.3 Gaboxadol subchronisch</b> .....	80
<b>4.4 Melatonin und Picrotoxin</b> .....	82
4.4.1 <i>Picrotoxin</i> .....	82

<i>4.4.2 Melatonin</i> .....	82
<b>4.5 Abschlußdiskussion</b> .....	84
<b>5 ZUSAMMENFASSUNG</b> .....	86
<b>6 LITERATURVERZEICHNIS</b> .....	87
<b>7 DANKSAGUNG</b> .....	96
<b>8 LEBENSLAUF</b> .....	97

## ABKÜRZUNGEN

ANOVA	"analysis of variance" = Varianzanalyse
EEG	Electroencephalogramm
EMG	Electromyogramm
GABA	" $\gamma$ -aminobutyric acid" = $\gamma$ -Aminobuttersäure
h	Stunde
Mel	Melatonin
Non-REM Schlaf	"non-rapid eye movement" Schlaf
Ptx	Picrotoxin
REM Schlaf	"rapid eye movement" Schlaf
SCN	"suprachiasmatic nucleus" = Nucleus suprachiasmaticus
SD	"standard deviation" = Standardabweichung
SEM	"standard error of the mean" = Standardfehler
SWA	"slow wave activity" = niederfrequente Aktivität im EEG
THIP	4,5,6,7-Tetrahydroisoxazolo-(5,4-c)-pyridin-3-ol = Gaboxadol
ZNS	Zentralnervensystem

## 1 EINLEITUNG

Der Mensch verbringt durchschnittlich ein Drittel seines Lebens im Schlaf. Ein Bedürfnis nach Schlaf ist allen Menschen gemeinsam, obwohl es sehr große Unterschiede im individuellen Schlafbedarf gibt. Wenn Probleme beim Ein- oder Durchschlafen auftreten, fühlt man sich schlecht und oft wird ein Arzt aufgesucht, um das Problem zu beheben. Ungeachtet der mannigfaltigen Gründe für Schlafprobleme, erfolgt die Behandlung meistens medikamentös anhand von Schlafmitteln (Hypnotika). Am häufigsten werden hierzu Mittel eingesetzt, die zur Klasse der Benzodiazepine gehören. Benzodiazepine wirken als agonistische Modulatoren am  $GABA_A$ -Rezeptor. Die Art und Beschaffenheit der Reste an der zentralen Diazepin-Struktur beeinflusst die Halbwertszeit und verschiedene andere Wirkeigenschaften der einzelnen Substanzen. Trotz deutlicher quantitativer Unterschiede zwischen den verschiedenen Benzodiazepinen sind bestimmte Wirkungen auf den Schlaf allen Vertretern dieser Substanzklasse gemeinsam. So fördern sie das Einschlafen durch Verkürzung der Einschlaf latenz, erhöhen die Gesamtschlafzeit und verringern intermediäre Wachzeiten. Sie unterdrücken jedoch den Tiefschlaf und REM Schlaf. Darüber hinaus kann die chronische Einnahme von Schlafmitteln leicht zu Toleranz und Abhängigkeit führen. So zeigen Benzodiazepine bereits nach täglicher Einnahme über wenige Wochen eine verminderte Wirkung, und bei Beendigung der Therapie können Absetzphänomene auftreten. Aus diesen Gründen wird weiter an der Entwicklung von neuen, besseren Schlafmitteln gearbeitet. Ein ideales Hypnotikum sollte die Einschlaf latenz normalisieren, nächtliche Wachzeiten verringern, den Tiefschlaf fördern, den REM Schlaf unbeeinträchtigt lassen und ein möglichst geringes Toleranz- und Abhängigkeitspotential aufweisen. Solche potentiellen neuen Schlafmittel werden zuerst im Tiermodell, meistens an Ratten, getestet. Obwohl die Ratte im Gegensatz zum Menschen ein nachtaktives Tier ist, ist die Reaktion auf Schlafmittel sehr ähnlich wie bei Menschen (Übersicht in Lancel, 1999). Besonders zu Beginn der Aktivitätsphase, wenn die Ratte normalerweise nur wenige und kurze Schlafphasen zwischen den längeren Wachphasen hat, bietet sie ein gutes Modell für die Wirkung von Schlafmitteln bei schlafgestörten Menschen. Über die Wirkung der verschiedenen Hypnotika auf den Schlaf der Ratte sind jedoch nur wenige Publikationen erschienen. Insbesondere die Entwicklung von Toleranz und das Auftreten von Absetzphänomenen sind so gut wie gar nicht dokumentiert.

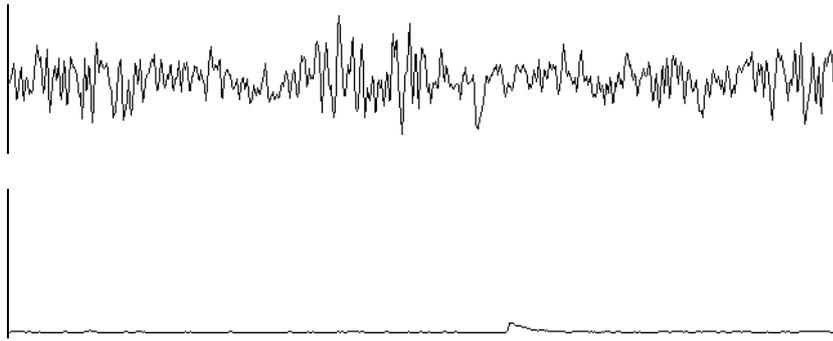
Das Ziel dieser Arbeit ist die Dokumentation der akuten und längerfristigen Effekte einiger herkömmlicher und neuer Hypnotika auf den Schlaf von Ratten. Von besonderem Interesse ist hierbei die Entwicklung von Toleranz und eventueller Absetzphänomene in Bezug auf das Schlaf-Wach-Verhalten. Es wurde ein klassisches kurzwirkendes Benzodiazepin (Midazolam), ein vor kurzem als Einschlafmittel auf den Markt gebrachter selektiver agonistischer GABA<sub>A</sub>-Rezeptormodulator (Zaleplon) und ein GABA<sub>A</sub>-Rezeptoragonist (Gaboxadol) untersucht. Aufgrund der Bindung an unterschiedliche Bindungsstellen des GABA<sub>A</sub>-Rezeptors, können differierende Wirkprofile erwartet werden. Die akute Wirkung von Midazolam und Gaboxadol (= THIP) auf den Schlaf der Ratte zu Beginn der Aktivitäts- und der Ruhephase wurde bereits ausführlich dokumentiert (Lancel et al. 1994; 1997a; Lancel & Faulhaber 1996; Lancel 1997). Über die Wirkung von Zaleplon ist jedoch noch sehr wenig bekannt und es gibt bislang keine Publikation über die Effekte von Zaleplon auf das Schlaf-EEG von Ratten. Daher sollte zunächst die akute Wirkung von Zaleplon zu verschiedenen Punkten des Tag-Nacht-Rhythmus untersucht werden. Zu diesem Zweck wurde Ratten Zaleplon in jeweils zwei verschiedenen Dosierungen zu Beginn der Aktivitätsphase und zu Beginn der Ruhephase verabreicht. Zur Erforschung der längerfristigen Effekte wurde jeweils eine, bereits in akuten Experimenten erprobte, Dosierung Zaleplon, Midazolam oder Gaboxadol zu Beginn der Aktivitätsphase über fünf Tage subchronisch verabreicht.

Auch anderen Substanzen, wie zum Beispiel dem Hormon Melatonin, wird eine schlafinduzierende Wirkung zugeschrieben. Golombek et al. (1996) postulieren eine Wirkung von Melatonin am GABA<sub>A</sub>-Rezeptor, ähnlich der von Benzodiazepinen. Zur Überprüfung dieser Hypothese wurde Ratten Melatonin in zwei verschiedenen Dosierungen verabreicht. Desweiteren wurde der Effekt der höheren Melatonin-Dosierung bei Gabe kurz nach Injektion eines GABA<sub>A</sub>-Rezeptorantagonisten (PicROTOXIN) untersucht und auch die Wirkung von PicROTOXIN alleine kontrolliert. Da Melatonin Phasenverschiebungen des Schlaf-Wach-Rhythmus hervorrufen kann, wurde in diesem Versuch die Substanz in der Mitte der Ruhephase gegeben, zu einem Zeitpunkt, an dem keine Phasenverschiebungen zu erwarten sind und der Schlafdruck bereits relativ niedrig ist.

## 1.1 Schlaf

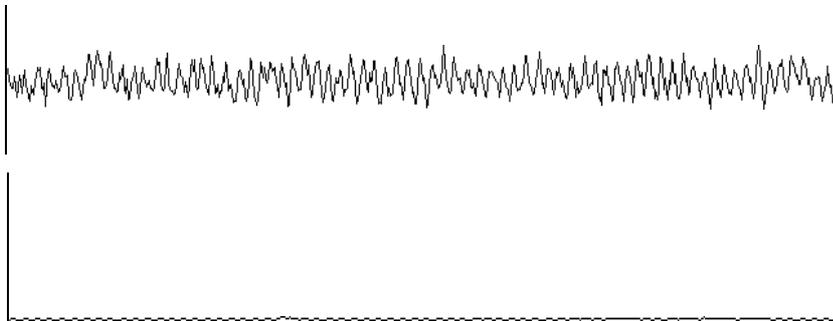
In der Mitte des 20. Jahrhunderts wurde entdeckt, daß der Schlaf nicht einheitlich ist, sondern in Abständen immer wieder Phasen mit schnellen Augenbewegungen ("rapid eye movements" = REM) auftreten, die als REM Schlaf bezeichnet wurden (Aserinsky und Kleitman 1953, Dement und Kleitman 1957). Ausgehend von dieser Beobachtung, wurde der Schlaf in solchen mit (REM Schlaf) und ohne diese Augenbewegungen (non-REM Schlaf) eingeteilt. Der non-REM Schlaf hat den größten Anteil am Schlaf (circa 75 Prozent bei erwachsenen Menschen und circa 85 Prozent bei Ratten) und ist durch das Auftreten von langsamen Wellen ("slow waves") und Spindeln im EEG gekennzeichnet. Langsame Wellen bestehen aus hochamplitudiger Aktivität im niedrigen, sogenannten Delta-Frequenzbereich (1-4 Hz). Spindeln sind Gruppen von Wellen im Sigma-Frequenzbereich (11-16 Hz), die langsam an- und abschwelen und eine Dauer von 0,5 bis 2 Sekunden haben. Der Anteil von niederfrequenter Aktivität ("slow wave activity" = SWA) und Spindeln im EEG gibt Auskunft über die Tiefe des Schlafs. So zeigten Untersuchungen mit Bestimmung der Weckschwelle bei Ratten, Katzen und Menschen, daß im leichten Schlaf Spindeln überwiegen und mit Zunahme der niederfrequenten EEG-Aktivität der Schlaf tiefer wird (Williams et al. 1964; Frederickson und Rechtschaffen 1978; Grahnstedt und Ursin 1980; Neckelmann und Ursin 1993). Beim Menschen wird der non-REM Schlaf hauptsächlich aufgrund des Anteils an langsamen Wellen und Spindeln nach Rechtschaffen und Kales (1968) in vier Stadien eingeteilt. Die Stadien 1 und 2 bezeichnen in diesem System leichten Schlaf mit (Stadium 2) oder ohne Spindeln (Stadium 1), während die Stadien 3 und 4 auch oft zusammenfassend als Tiefschlaf oder "slow wave sleep" bezeichnet werden und einen Anteil von mindestens 20 (Stadium 3) beziehungsweise 50 Prozent (Stadium 4) an langsamen Wellen und wenig Spindeln aufweisen. Bei Ratten wird der non-REM Schlaf auch teilweise aufgrund des Anteils an Delta-Wellen in leichten und tiefen non-REM Schlaf eingeteilt, jedoch stellt die Analyse der niederfrequenten Aktivität mittels einer "Fast Fourier Transformation" einen genaueren Parameter zur Abschätzung der Schlaftiefe dar. Allgemein treten während des non-REM Schlafs nur wenige Augenbewegungen auf und die Muskelaktivität ist relativ gering (siehe Abbildung 1). Im Gegensatz dazu ist der REM Schlaf durch die namensgebenden schnellen Augenbewegungen und einen sehr geringen Muskeltonus gekennzeichnet. Der geringe Muskeltonus wird durch eine aktive Inhibition der Motoneurone erreicht und es kann lediglich zum Auftreten von Zuckungen, sogenannten "twitches", kommen. Das REM Schlaf-EEG besteht überwiegend aus regelmäßigen Wellen niedriger Amplitude im Theta-Frequenzbereich (6-9 Hz) (siehe Abbildung 2). Bei Ratten kann noch ein weiteres

Schlafstadium abgegrenzt werden: der pre-REM Schlaf, auch als Zwischenstadium ("intermediate state") bezeichnet (Gottesmann 1996; Neckelmann und Ursin 1993). Dieser geht meist dem REM Schlaf voraus, kann aber auch von Wachheit gefolgt werden. Der pre-REM Schlaf ist durch langanhaltende spindelähnliche EEG-Signale mit hoher Amplitude vor einem Hintergrund von Theta-Wellen charakterisiert (siehe Abbildung 3). Der Wachzustand ist durch meist deutliche Muskelaktivität und ein EEG von überwiegend hoher Frequenz und niedriger Amplitude geprägt (siehe Abbildung 4).



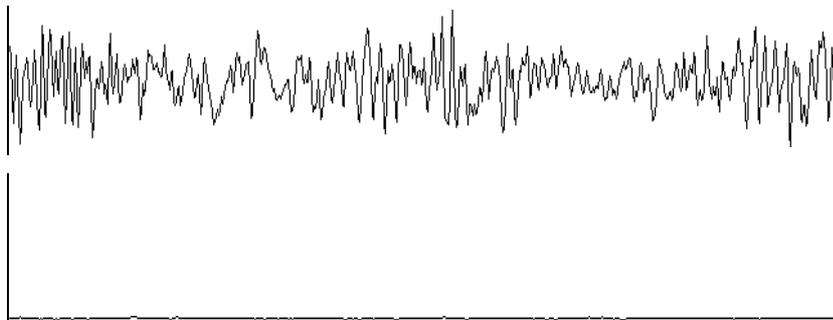
---

**Abbildung 1:** EEG (oben) und EMG (unten) bei der Ratte während des non-REM Schlafs.



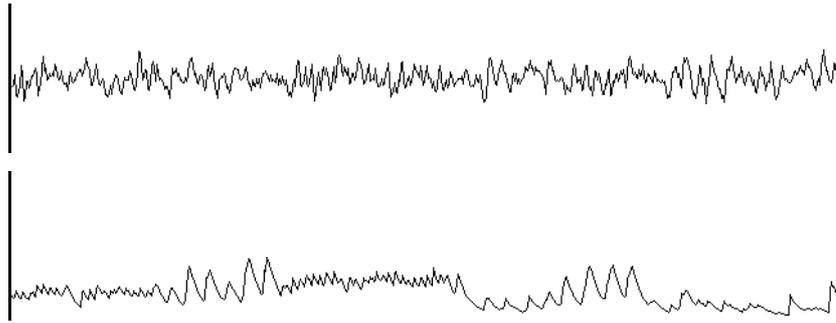
---

**Abbildung 2:** EEG (oben) und EMG (unten) bei der Ratte während des REM Schlafs.



---

**Abbildung 3:** EEG (oben) und EMG (unten) bei der Ratte während des pre-REM Schlafs.

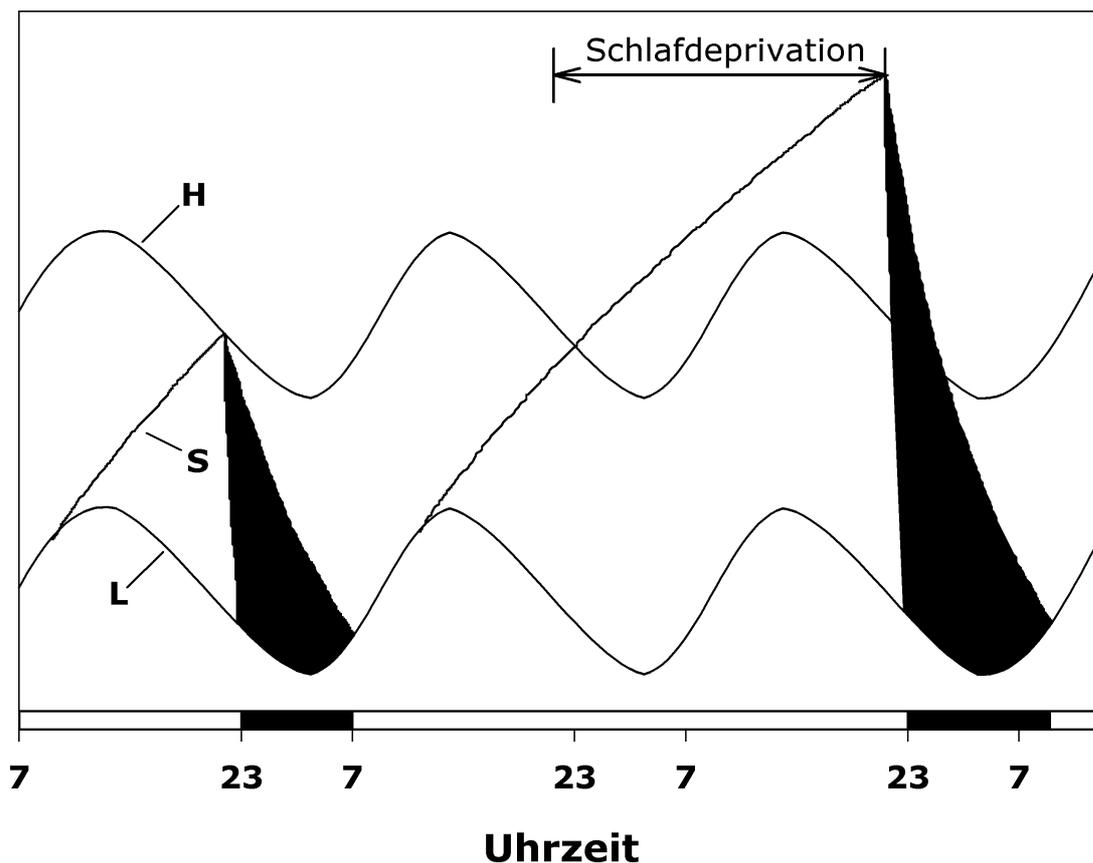


**Abbildung 4:** EEG (oben) und EMG (unten) bei der Ratte während des Wachzustands.

Im Verlauf einer Nacht erfolgen mehrere zyklische Abfolgen von non-REM und REM Schlaf, sogenannte non-REM/REM-Zyklen. Bei einem erwachsenen Menschen dauert ein solcher Zyklus im Durchschnitt etwa 90 Minuten, während er bei Tieren, wie zum Beispiel Ratten, wesentlich kürzer ist und nur wenige Minuten dauert. Im Verlauf eines non-REM/REM-Zyklus tritt zunächst leichter non-REM Schlaf auf, der langsam an Tiefe zunimmt und dann, nach einer langen Phase meist tiefen non-REM Schlafs, wieder an Tiefe verliert und von einer REM Schlafepisode gefolgt wird. Zum Beginn der Ruheperiode ist der non-REM Schlaf sehr tief und der Anteil an REM Schlaf sehr gering, während zum Ende der Ruheperiode hin der non-REM Schlaf leichter und die Dauer der REM Schlafepisoden länger wird.

Die Regulation des physiologischen Schlafs wird vor allem von der vorangegangenen Wachzeit und von der Tageszeit beeinflusst. Je länger ein Organismus wach ist, desto stärker wird im allgemeinen die Neigung einzuschlafen, der Schlafdruck nimmt zu (homöostatische Komponente). In Studien, bei denen Menschen oder Tieren der Schlaf über längere Zeit verwehrt wurde (Schlafdeprivation), zeigt sich, daß die Einschlaflatenz anschließend stark verkürzt ist, was einen hohen Schlafdruck widerspiegelt. Außerdem beeinflusst die Tageszeit die Schlafneigung (circadiane Komponente). Während der normalen Ruheperiode, d.h. beim Menschen nachts, bei der nachtaktiven Ratte tagsüber, ist die Schlafneigung höher als während der Aktivitätsperiode. Aus dem Zusammenspiel dieser Einflüsse wurde von Borbély (1982) das sogenannte Zwei-Komponenten-Modell der Schlafregulation ("two-process model of sleep regulation") entwickelt (siehe Abbildung 5). Der schlafunabhängige circadiane Prozeß C bestimmt die Oszillation eines oberen (H) und unteren (L) Schwellenwertes. Der homöostatisch regulierte schlafabhängige Prozeß S beschreibt während Wachzeiten den exponentiellen Anstieg einer Sättigungskurve bis er den oberen Schwellenwert erreicht und sinkt während des Schlafs exponentiell ab bis der untere Schwellenwert erreicht und die Schlafphase beendet wird. Prozeß C kontrolliert viele Parameter der Schlafstruktur, wie die

Schlafkontinuität und die Dauer von REM Schlafepisoden während eines 24-Stunden-Tages. Läsionsstudien zeigten, daß die circadianen Komponenten des Schlaf-Wach-Verhaltens durch den endogenen Schrittmacher im Nucleus suprachiasmaticus (SCN) des Hypothalamus reguliert werden (Mistlberger et al. 1983, Tobler et al. 1983, Cohen und Albers 1991, Trachsel et al. 1992). Der SCN erhält über verschiedene neuronale Projektionen, z.B. aus der Retina, Informationen über die Umweltbedingungen, insbesondere die Licht-Dunkel-Verhältnisse, so daß der endogene Rhythmus an exogene Bedingungen angepaßt werden kann. Die Melatonin-Sekretion des Pinealorgans ist ein wichtiges Ausgangssignal der circadianen Rhythmik, das durch den SCN bestimmt wird. Die Sekretion von Melatonin ist bei allen untersuchten Säugetieren während der Dunkelphase hoch und während der Lichtphase gering, unabhängig davon ob die Tiere tag- oder nachtaktiv sind (Übersicht in Cardinali 1981).

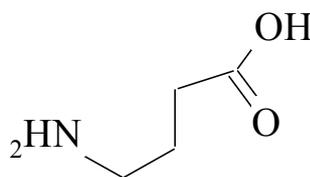


**Abbildung 5:** Zwei-Komponenten-Modell der Schlafregulation mit oberem (H) und unterem (L) Schwellenwert der circadianen Komponente C und dem homöostatisch regulierten Prozeß S während normalen Schlafs (links), Schlafdeprivation (mitte) und Erholungsschlaf (rechts). Schwarze Balken markieren Schlafphasen.

Eine Vielzahl weiterer Faktoren können den Schlaf beeinflussen, wie zum Beispiel eine Aktivierung des Immunsystems, psychiatrische Erkrankungen und stimulierende Substanzen (z.B. Koffein).

## 1.2 Der GABA<sub>A</sub>-Rezeptor

In den fünfziger Jahren entdeckten Wissenschaftler, daß die gamma-Aminobuttersäure ( $\gamma$ -amino butyric acid = GABA, Strukturformel siehe Abbildung 6) ein normaler Bestandteil des zentralen Nervensystems (ZNS) von Säugetieren ist. GABA kommt hauptsächlich im Gehirn und im Rückenmark in hohen Konzentrationen vor, während sich in anderen Geweben nur sehr geringe Mengen messen lassen (Fahn und Côté 1968; Perry et al. 1971). Zwischen 20 und 50 Prozent aller Synapsen im Gehirn werden durch GABA gehemmt, so daß es sich bei GABA um den wichtigsten zentral inhibitorischen Neurotransmitter zu handeln scheint (Bloom und Iversen 1971; Young und Chu 1990). GABA wird, katalysiert durch das ebenfalls nur im ZNS vorkommende Enzym Glutamat-Decarboxylase, aus Glutamat synthetisiert und in synaptischen Vesikeln gespeichert. Aktionspotentiale bewirken die Öffnung von präsynaptischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanälen und führen zu einem Einstrom von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen, die wiederum das Verschmelzen der GABA-Vesikel mit der Zellwand und somit eine Ausschüttung von GABA in den synaptischen Spalt bewirken. Die Wirkung des freigesetzten GABA wird hauptsächlich durch eine schnelle Wiederaufnahme ("reuptake") in die Neurone beendet.



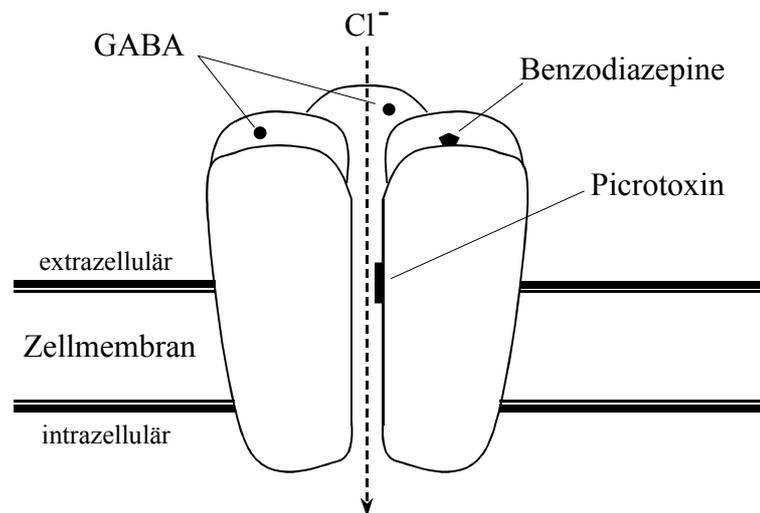
**Abbildung 6:** Strukturformel von GABA.

Im synaptischen Spalt bindet GABA an zwei Typen von membranständigen GABA-Rezeptoren, die durch ein verschiedenartiges Bindungsverhalten charakterisiert sind: den GABA<sub>A</sub>- und den GABA<sub>B</sub>-Rezeptor. Über den GABA<sub>B</sub>-Rezeptor ist noch relativ wenig bekannt. In den meisten Gehirnregionen liegen mehr GABA<sub>A</sub>- als GABA<sub>B</sub>-Rezeptoren vor. GABA<sub>A</sub>-Rezeptoren (siehe Abbildung 7) werden selektiv durch Muscimol stimuliert und

durch Picrotoxin und Bicucullin gehemmt. Sie sind direkt an selektive Cl<sup>-</sup>-Ionenkanäle gekoppelt und bewirken bei Aktivierung eine Erhöhung der Membran-Leitungsfähigkeit für Cl<sup>-</sup>. Da die Konzentration an Cl<sup>-</sup>-Ionen in Neuronen üblicherweise recht niedrig ist, führt die Aktivierung von GABA<sub>A</sub>-Rezeptoren durch GABA oder Struktur-Analoga (GABA<sub>A</sub>-Agonisten) wie Muscimol oder Gaboxadol im allgemeinen zu einem Cl<sup>-</sup>-Einstrom und somit zu einer schnellen und kurz anhaltenden Hyperpolarisation. Es wird mittlerweile allgemein angenommen, daß ein einzelner GABA<sub>A</sub>-Rezeptor mehrere GABA-Bindungsstellen unterschiedlicher Affinität besitzt. Möglicherweise ist die Affinität für GABA hoch, wenn alle Bindungsstellen unbesetzt sind, und nimmt mit zunehmender Besetzung weiterer Bindungsstellen allosterisch ab. Elektrophysiologische Experimente zeigten, daß zur Öffnung des Cl<sup>-</sup>-Kanals die Bindung mehrerer GABA-Moleküle nötig ist. Außerdem scheint der letzte GABA-Bindungsschritt von besonders niedriger Affinität zu sein, womit sichergestellt wird, daß eine Öffnung des Ionenkanals nur bei massiver Freisetzung von GABA erfolgt (Übersicht in MacDonald und Olsen 1994, Sieghart 1995).

Ein GABA<sub>A</sub>-Rezeptor besteht immer aus fünf Untereinheiten, die je nach Ort und Funktion des Rezeptors verschieden zusammengesetzt sein können. Die Untereinheiten werden in 5 Typen eingeteilt, die als  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$  und  $\rho$  bezeichnet werden. Derzeit sind 6  $\alpha$ -Isoformen ( $\alpha_1$  bis  $\alpha_6$ ), 3  $\beta$ -Isoformen ( $\beta_1$  bis  $\beta_3$ ), 3  $\gamma$ -Isoformen ( $\gamma_1$  bis  $\gamma_3$ ) und 2  $\rho$ -Isoformen ( $\rho_1$  und  $\rho_2$ ) bekannt. Außer der Bindungsstelle für GABA besitzen GABA<sub>A</sub>-Rezeptoren auch noch verschiedene separate Bindungsstellen für andere Substanzen (GABA<sub>A</sub>-Modulatoren), die in wesentlichem Maße durch die Zusammensetzung des Rezeptors aus den Untereinheiten und Isoformen bestimmt werden. So können Benzodiazepine nur an GABA<sub>A</sub>-Rezeptoren binden, die mindestens eine  $\alpha$ -,  $\beta$ - und  $\gamma$ -Untereinheit enthalten. Auch die verschiedenen Isoformen spielen für das Bindungsverhalten eine wichtige Rolle. Für die Bindung von Benzodiazepinen ist eine  $\gamma_2$ - oder  $\gamma_3$ -Untereinheit nötig. Darüber hinaus sind die Isoformen der  $\alpha$ -Einheit von großer Bedeutung, da sie die Unterteilung der GABA<sub>A</sub>-Rezeptoren in die historisch so bezeichneten Benzodiazepin-Rezeptoren 1 und 2 (BZ<sub>1</sub> und BZ<sub>2</sub>) oder auch  $\omega_1$ - und  $\omega_2$ -Subtypen des GABA<sub>A</sub>-Rezeptors ausmachen. Der  $\omega_1$ -Subtyp des GABA<sub>A</sub>-Rezeptors entsteht, wenn als  $\alpha$ -Untereinheit die  $\alpha_1$ -Isoform in Kombination mit einer  $\beta$ -Untereinheit und der  $\gamma_2$ -Isoform exprimiert wird, während die Expression einer  $\alpha_2$ -,  $\alpha_3$ - oder  $\alpha_5$ -Isoform in diesem Zusammenhang zum  $\omega_2$ -Subtypen des GABA<sub>A</sub>-Rezeptors führt. Die meisten Benzodiazepine binden unspezifisch an den  $\omega_1$ - und  $\omega_2$ -Subtypen des GABA<sub>A</sub>-Rezeptors, während einige, insbesondere neuere, Hypnotika wie Zolpidem und Zaleplon spezifisch nur an den  $\omega_1$ -

Subtypen binden. Die Benzodiazepine wie z.B. Midazolam und auch die neueren Hypnotika wie z.B. Zaleplon wirken am GABA<sub>A</sub>-Rezeptor als agonistische Modulatoren. Sie erzeugen durch ihre Bindung eine Verstärkung der Wirkung von GABA am GABA<sub>A</sub>-Rezeptor, indem sie in Anwesenheit von GABA eine erhöhte Frequenz der Öffnung des Cl<sup>-</sup>-Kanals bewirken (Study und Barker 1981, Barker et al. 1986). Möglicherweise verstärken diese Substanzen die Kopplung zwischen dem Rezeptor und dem Ionen-Kanal, so daß ein einzelnes GABA-Molekül ausreicht, um den Cl<sup>-</sup>-Kanal zu öffnen. Melatonin scheint bereits in sehr niedrigen Konzentrationen zu einer Erhöhung der Anzahl an niederaffinen Bindungsstellen zu führen (Coloma und Niles 1988). Der GABA<sub>A</sub>-Rezeptoragonist Picrotoxin bindet wahrscheinlich an eine spezifische Bindungsstelle im Inneren des Cl<sup>-</sup>-Ionenkanals und antagonisiert dort die GABA-induzierte Änderung der Leitfähigkeit (Übersicht in MacDonald und Olsen 1994).



**Abbildung 7:** Schematische Abbildung des GABA<sub>A</sub>-Rezeptors mit Bindungsstellen für GABA (und GABA-Strukturanaloga), Benzodiazepine und Picrotoxin.

### 1.3 Zaleplon, Midazolam und Gaboxadol

Seit vielen Jahren werden Benzodiazepine als Mittel der Wahl zur Behandlung der Insomnie eingesetzt. Sie induzieren den Schlaf schnell und bewirken zuverlässig einen Anstieg in der Gesamtschlafdauer und eine Verminderung des Wach-Anteils während der Nacht (Übersicht in Lancel 1999). Leider haben Benzodiazepine jedoch auch einige unerwünschte Effekte. Sie hemmen den Tiefschlaf, indem sie ein Schlafstadium mit EEG-Charakteristiken des leichten Schlafs fördern und unterdrücken den REM Schlaf, was durch die Verlängerung der REM Schlaflatenz und/oder eine Verminderung im REM Schlaf-Anteil sichtbar wird (Übersicht in Lancel 1999). Benzodiazepine können bei Einnahme über längere Zeit Toleranz und Abhängigkeitsphänomene induzieren und nach Absetzen wird häufig über mehrere Tage eine Verschlechterung des Schlafs (Rebound-Insomnie) beobachtet (Übersicht in Kales et al. 1983). Besonders Benzodiazepine mit kurzer Halbwertszeit, die oft, aufgrund der geringeren Beeinträchtigungen am folgenden Tag, solchen mit langer Halbwertszeit vorgezogen werden (Mittler 2000), rufen vermehrt Absetzsymptome hervor (Übersicht in Lader 1990).

Neue kurzwirkende, spezifisch am  $\omega_1$ -Subtyp des GABA<sub>A</sub>-Rezeptors bindende Nicht-Benzodiazepin Hypnotika, wie Zolpidem oder Zaleplon, zeigen ein abweichendes Wirkprofil. Sie scheinen ebenso effektiv in der Schlafinduktion zu sein, jedoch ein geringeres Potential für die Entwicklung von Toleranz und Absetzphänomenen zu haben (Übersicht in Holm und Goa 2000; Hurst und Noble 1999; Weitzel et al. 2000). Zaleplon (Strukturformel siehe Abbildung 8) hat eine sehr kurze Halbwertszeit von circa einer Stunde bei Ratten (Gaudreault et al. 1995) und Menschen (Beer et al. 1994). Verschiedene Humanstudien konnten keine negativen Absetzeffekte oder Toleranzentwicklung bei bis zu 12-monatiger Behandlung mit Zaleplon feststellen (Übersicht in Dooley und Plosker 2000). Der hauptsächliche Effekt von Zaleplon scheint eine Verkürzung der Schlaflatenz zu sein, die auch nach täglicher Einnahme über 4 oder 5 Wochen bestehen bleibt (Elie et al. 1999; Fry et al. 2000). Andererseits zeigten andere Studien doch eine Toleranzentwicklung bei Langzeiteinnahme und eine Schlafverschlechterung bereits im Anschluß an eine zweiwöchige Behandlung (Walsh et al. 1998; Hedner et al. 2000). Bislang wurden keine detaillierten Studien über die Wirkung von Zaleplon auf das Schlaf-Wach-Verhalten von Tieren, wie zum Beispiel Ratten, publiziert. Es wurde lediglich gezeigt, daß Zaleplon akut die Gesamtschlafdauer (Beer et al. 1997) oder den Anteil an non-REM Schlaf (Depoortere et al. 1998) erhöht und den REM Schlaf unterdrückt (Depoortere et al. 1998). Aus diesem Grund wurde zunächst eine Studie zur Untersuchung der akuten Wirkung von Zaleplon auf das Schlaf-Wach-Verhalten von Ratten durchgeführt. Um

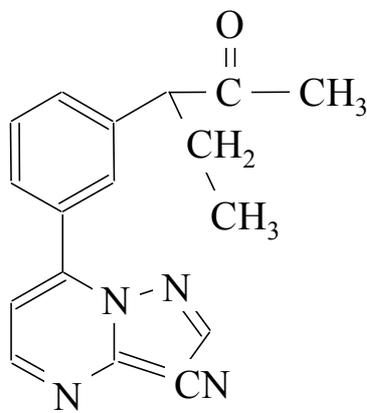
eventuelle Dosisabhängigkeiten sowie circadiane Unterschiede der Zaleplon-Effekte zu erfassen, wurden zwei Zaleplon-Dosierungen jeweils zu Beginn der Ruhephase und zu Beginn der Aktivitätsphase verabreicht (► Versuch "Zaleplon akut").

Zur Untersuchung von Toleranz und Absetzphänomenen wurde in einer zweiten Studie (► Versuch "Midazolam und Zaleplon subchronisch") die hohe Zaleplon-Dosierung über einen Zeitraum von fünf Tagen täglich verabreicht und mit dem klassischen Benzodiazepin Midazolam verglichen. Da hypnotische Effekte von Substanzen im allgemeinen während der Aktivitätsphase stärker hervortreten, wurde für diesen Versuch die Verabreichung zu Beginn der Aktivitätsphase gewählt.

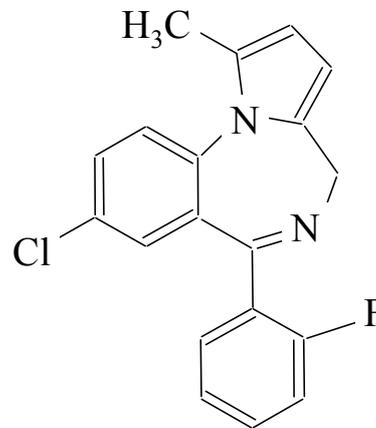
Midazolam (Strukturformel siehe Abbildung 8) ist ein klassisches Benzodiazepin mit hoher Affinität für den GABA<sub>A</sub>-Rezeptor. Die Halbwertszeit von Midazolam ist mit 1,3 bis 2,2 Stunden beim Menschen sehr kurz (Brown et al. 1979) und es löst fast keine Hangover-Effekte am nächsten Tag aus. Jedoch ist es bekannt, daß relativ schnell Toleranz gegenüber der sedativen Wirkung auftritt (Übersicht in Kales et al. 1995). Da nach Beendigung der Midazolam-Therapie auch häufig eine Rebound-Insomnie auftritt, wird es heutzutage überwiegend zur Narkose-Induktion und seltener als Schlafmittel verwendet. Bei Ratten wurde gezeigt, daß sich Toleranz gegenüber der antikonvulsiven Wirkung von Midazolam noch nicht nach der ersten, wohl aber nach der dritten Woche täglicher Gabe entwickelt (Ramsey-Williams et al. 1994). Studien zur Wirkung einer Langzeitbehandlung mit Midazolam auf das Schlaf-Wach-Verhalten fehlen jedoch noch. Für ein anderes kurzwirksames Benzodiazepin, Triazolam, wurde beschrieben, daß sich Toleranz gegenüber den sedativen und hypnotischen Effekten bei Ratten innerhalb von drei bis vier Tagen entwickelt (File 1981; Crespi 1999).

In den letzten Jahren durchgeführte Untersuchungen zeigten, daß nicht nur Benzodiazepine und andere Hypnotika, die als agonistische Modulatoren am GABA<sub>A</sub>-Rezeptor wirken, sondern auch GABA<sub>A</sub>-Rezeptoragonisten eine schlaffördernde Wirkung haben. So bewirkt die Verabreichung der GABA<sub>A</sub>-Rezeptoragonisten Muscimol oder Gaboxadol zu Beginn der Lichtphase bei der Ratte eine dosisabhängige Erhöhung des non-REM Schlaf-Anteils, die mit einer Verlängerung der non-REM Schlafepisoden und einer erhöhten SWA des non-REM Schlaf-EEG einhergeht (Lancel et al. 1996; Lancel und Faulhaber 1996). Bei Gabe zu Beginn der Aktivitätsphase übte Gaboxadol qualitativ ähnliche, jedoch deutlicher ausgeprägte Effekte

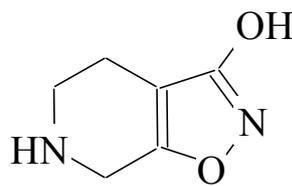
auf das Schlaf-Wach-Verhalten aus (Lancel 1997). Auch bei jungen gesunden Probanden führte Gaboxadol zu einer besseren Schlafeffizienz, förderte den Tiefschlaf, erhöhte die EEG-Leistungsdichte in den niederfrequenten Bereichen und verringerte die Aktivität im Spindel-Frequenzbereich während des non-REM Schlafs (Faulhaber et al. 1997). Gaboxadol (Strukturformel siehe Abbildung 8) hat mit circa zwei Stunden (Schultz et al. 1981) eine ähnlich kurze Halbwertszeit wie Midazolam und Zaleplon und wirkt ebenfalls am  $GABA_A$ -Rezeptor. Daher wurde es auch an fünf aufeinanderfolgenden Tagen zu Beginn der Aktivitätsphase verabreicht, um Aufschluß über sein Potential für Entwicklung von Toleranz und Absetzphänomenen zu geben (► Versuch "Gaboxadol subchronisch").



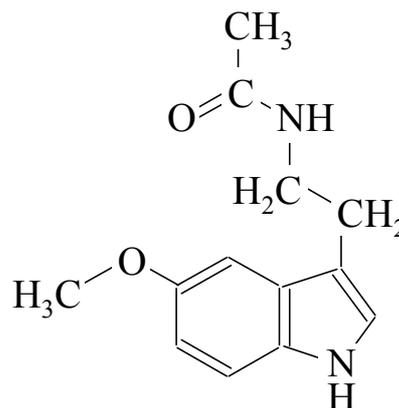
Zaleplon



Midazolam



Gaboxadol



Melatonin

**Abbildung 8:** Strukturformeln der untersuchten Substanzen.

## 1.4 Melatonin

Melatonin (Strukturformel siehe Abbildung 8) ist ein ubiquitär vorkommendes Hormon, das bei allen bislang untersuchten Säugetieren während der Dunkelphase vom Pinealorgan produziert und sezerniert wird. Es gibt viele Hinweise darauf, daß die Verabreichung von Melatonin bei Menschen, insbesondere während des Tages, schlafinduzierend wirkt. So wurde berichtet, daß Melatonin Gefühle von Müdigkeit und Schläfrigkeit fördert, die Einschlaflatenz verkürzt, die Schlafkontinuität verbessert und im non-REM Schlaf-EEG die niederfrequente Aktivität vermindert während die Aktivität im Spindel-Frequenzbereich erhöht wird (Übersicht in Dijk und Cajochen 1997; Zhdanova und Wurtman 1997). Es ist jedoch noch nicht bekannt, welche Mechanismen dieser hypnotischen Wirkung zugrunde liegen könnten. Zum einen hat Melatonin eine chronobiotische Wirkung, das heißt, es kann die Phase der in den suprachiasmatischen Nuclei (SCN) lokalisierten circadianen Uhr beeinflussen (Übersicht in Dawson und Armstrong 1996, Steinlechner 1996). Die SCN regulieren circadiane Rhythmen, wie zum Beispiel auch den Schlaf-Wach-Rhythmus, in Säugetieren (Übersicht in Dubocovich et al. 1996) und enthalten unter anderem hochaffine Melatonin-Rezeptoren (Übersicht in Dubocovich 1991). Andererseits könnte Melatonin auch eine direkte hypnotische Wirkung ausüben. Einige Studien lassen eine Interaktion von Melatonin mit dem GABA<sub>A</sub>-Rezeptorkomplex vermuten. So ergaben *in vitro*-Untersuchungen, daß Melatonin, wie auch Barbiturate, Benzodiazepine und einige Neurosteroiden, die Bindung von GABA und GABA-Analogen am GABA<sub>A</sub>-Rezeptor steigern (Coloma und Niles 1988). Außerdem wurde beschrieben, daß Melatonin den Effekt von GABA auf die Aktivität von cortikalen Neuronen potenziert (Stankov et al. 1992). Weitere Studien zeigten, daß Melatonin die Bindung von Benzodiazepinen inhibiert (Marangos et al. 1981) und der Benzodiazepin-Rezeptorantagonist Flumazenil die analgetische und anxiolytische Wirkung von Melatonin bei Ratten und Mäusen aufhebt (Golombek et al. 1991, 1993; Pierrefiche et al. 1993). Zudem sind die Effekte von Melatonin auf die Schlafneigung und die EEG-Aktivität während des Schlafs bei Menschen denen von Benzodiazepinen sehr ähnlich (Übersicht in Lancel 1999). Schließlich berichteten Garfinkel et al. (1999), daß Melatonin das Absetzen von Benzodiazepinen nach Langzeiteinnahme erleichtert.

In der vorliegenden Studie (► Versuch "Melatonin und Picrotoxin") wurde versucht die zugrundeliegenden Mechanismen der Wirkung von Melatonin auf das Schlaf-Wach-Verhalten in Ratten zu ergründen. Im Gegensatz zu Menschen sind Ratten nachtaktive Tiere, bei denen maximale Melatonin-Konzentrationen während ihrer Aktivitätsphase auftreten. GABA<sub>A</sub>-

Rezeptoragonisten und agonistische Modulatoren üben jedoch im allgemeinen während der circadianen Ruhe- und Aktivitätsphase sowohl bei Ratten als auch bei Menschen qualitativ vergleichbare Effekte auf den Schlaf aus (Nicholson und Pascoe 1988; Dijk et al. 1989; Trachsel et al. 1990; Edgar et al. 1991, 1997; Kanno et al. 1993; Lancel et al. 1997a). Sollte also Melatonin den GABA<sub>A</sub>-Rezeptor beeinflussen, so wäre in allen circadianen Phasen bei beiden Spezies eine Modulation des Schlaf-Wach-Verhaltens zu erwarten. Um die hypnotische Wirkung von Melatonin unabhängig von der chronobiotischen Aktion zu ermitteln, wurde Melatonin in pharmakologischen Dosierungen in der Mitte der Lichtphase verabreicht, da zu diesem Zeitpunkt keine phasenverschiebenden Effekte auf die circadiane Rhythmik zu erwarten sind (Armstrong 1989). Desweiteren wurde die hohe Melatonin-Dosis nach Vorbehandlung mit dem GABA<sub>A</sub>-Rezeptorblocker Picrotoxin verabreicht, um zu überprüfen, ob die Effekte von Melatonin auf das Schlaf-Wach-Verhalten durch den GABA<sub>A</sub>-Rezeptor vermittelt werden.

## 2 METHODEN

### 2.1 Allgemein

#### 2.1.1 Versuchstiere

Sämtliche Experimente wurden mit adulten männlichen Wistar-Ratten (Charles River, Sulzfeld, Deutschland) durchgeführt (siehe Abbildung 9). Die Tiere wurden über den gesamten Zeitraum von Lieferung (circa 3-4 Tage vor EEG-Operation) bis Versuchsende in klimatisierten Räumen mit einer regelmäßigen Licht- und Dunkelphase von jeweils 12 Stunden (LD 12:12, Lichtintensität 50-120 lux) gehalten. Sie erhielten Futter (Altromin 1324 Pellets, Altromin Gesellschaft für Tierernährung GmbH, Lage, Deutschland) und Wasser *ad libitum*. Nach der EEG-Operation wurden die Ratten in Plexiglas-Einzelkäfigen untergebracht.

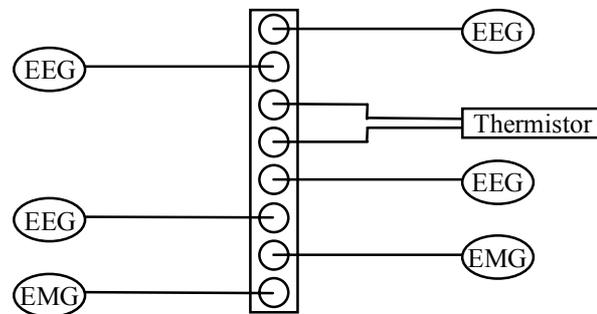


**Abbildung 9:** Wistar-Ratte nach EEG-Operation mit Kabel.

#### 2.1.2 EEG-Operation

Um die Aufzeichnung der Meßparameter zu ermöglichen, wurden jedem der Tiere in einer Operation 4 kleine Schrauben (1,2 mm Durchmesser, 3,4 mm Länge) zur Ableitung des Electroencephalogramms (EEG) implantiert. Zur Messung des Electromyogramms (EMG) dienten zwei Drähte in der Nackenmuskulatur, die mit kleinen Schrauben (siehe oben) im Schädel verankert wurden. Bei dem Versuch "Melatonin und Picrotoxin" wurde zusätzlich

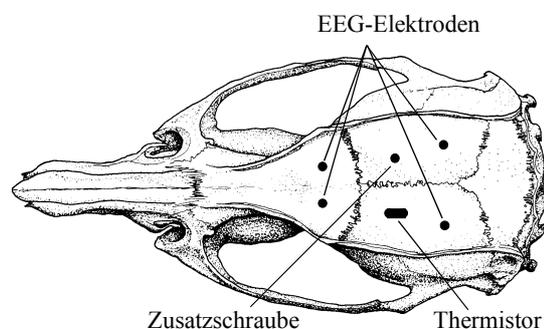
auch ein Thermistor zur Erfassung der Gehirntemperatur eingesetzt. Die an den Schrauben, beziehungsweise dem Thermistor, angelöteten Kontakte wurden in einer Buchse zusammengeführt (siehe Abbildung 10).



---

**Abbildung 10:** Schema der Buchse zum Zusammenführen der EEG- und EMG-Elektroden mit Thermistor.

Zur Operation wurden die Ratten mittels Halothan-Inhalation in eine tiefe Narkose versetzt und in eine stereotaktische Apparatur eingespannt. Nach Freipräparation der Schädeldecke wurde das Bregma bestimmt und die Koordinaten der vier EEG-Schrauben (frontal: +3,9 mm, lateral  $\pm 2$  mm; caudal: -6,4 mm, lateral  $\pm 4$  mm, relativ zum Bregma; siehe Abbildung 11) markiert. An diesen Punkten wurde die Schädeldecke durch vorsichtigen Einsatz eines Zahnarztbohrers durchbohrt. Zusätzlich wurde zwischen den beiden rechten Ableitpunkten ein Loch für eine Befestigungsschraube, sowie zwischen den beiden linken Ableitpunkten eine schmale Rinne zur epiduralen Implantation des länglichen Thermistors gebohrt (siehe Abbildung 11).



---

**Abbildung 11:** Lage der EEG-Elektroden, des Thermistors (wenn vorhanden) und der Zusatzschraube im Rattenschädel.

Nachdem sichergestellt wurde, daß keinerlei Blutungen auftraten, wurde zuerst die Befestigungsschraube und dann die vier EEG-Ableitschrauben eingedreht, so daß sie gerade die Hirnhaut (Dura mater) berührten, nicht aber das Hirn eindrückten. Für die EMG-Elektroden wurden zwei Stellen in der Nackenmuskulatur stumpf freipräpariert und jeweils zwischen den Muskelfasern eine Schraube mittels eines kleinen Lochs in der hinteren Schädeldecke verankert. Nachdem die Buchse durch einen Stift am Stereotaxen vorläufig auf dem Schädel fixiert wurde, konnte der Thermistor durch die aufgebohrte Rinne vorsichtig zwischen Hirnhaut und Schädeldecke geschoben werden. Der verbleibende Spalt in der Schädeldecke wurde mit Knochenwachs verschlossen. Anschließend wurde der gesamte Aufbau (mit Ausnahme der EMG-Elektroden) mit kalthärtendem Kunststoff (Paladur, Heraeus Kulzer GmbH, Wehrheim, Deutschland) fixiert und dadurch auch gleichzeitig elektrisch gegen das umgebende Gewebe isoliert. Nach Abtrocknen des Paladurs wurde die Kopfhaut um die Buchse herum vernäht.

### **2.1.3 Gewöhnung der Tiere**

Im Anschluß an die EEG-Operation hatten alle Tiere mindestens 21 Tage (bei dem Versuch "Melatonin und Picrotoxin" mindestens 14 Tage) Zeit, um sich von der Operation zu erholen. In dieser Zeit wurden die Ratten täglich kurz aus dem Käfig genommen und durch mehrmaliges hochheben und streicheln ("handling") an die Handhabung durch den Experimentator gewöhnt. Mindestens vier Tage vor Beginn des Experiments wurden die Tiere in die Ableitkäfige umgesetzt und im Ableitraum unter Versuchsbedingungen gehalten. Zur gleichen Zeit wurde ein flexibles gefedertes Kabel an der Buchse auf dem Kopf des Tieres fixiert und das andere Ende an einer frei drehbaren Gelenkverbindung über der Mitte des Käfigs befestigt. Auch in dieser Zeit wurden die Tiere täglich (mitsamt des Kabels) aus dem Käfig genommen und an die Prozedur der intraperitonealen Injektion gewöhnt, wobei jedoch keine Injektion durchgeführt wurde.

### **2.1.4 Aufbau der Ableiteinheit**

Alle Ableitungen wurden in einem schallgedämpften klimatisierten Faradayraum durchgeführt. Die Tiere wurden in nach oben hin offenen hohen Plexiglas-Einzelkäfigen (Ableitkäfige) untergebracht. Über jedem Käfig war ein Verstärkerkästchen positioniert, durch das die EEG-, EMG- und Thermistor-Signale des jeweiligen Tieres gefiltert, verstärkt und an den Aufnahme-Computer weitergeleitet wurden (siehe Abbildung 12).



---

**Abbildung 12:** Ratte in Ableitkäfig mit darüber befestigtem Verstärkerkästchen.

### **2.1.5 Datenaufnahme und -verarbeitung**

Das EEG wurde zwischen einer frontalen und einer occipitalen Elektrode abgeleitet während das EMG zwischen den beiden Elektroden der Nackenmuskulatur gemessen wurde. Die EEG- und EMG-Signale wurden verstärkt und gefiltert (EEG: high pass 0,3 Hz, low pass 29 Hz, 49 dB/Oktave; EMG: high pass 16 Hz, low pass 3000 Hz, 6 dB/Oktave). Die Signale für EEG, gleichgerichtetes und integriertes EMG und Gehirntemperatur wurden mit einer Abtastrate von 64 Hz digitalisiert. Zudem wurde das EEG einer "Fast Fourier Transformation" ("cosine taper") unterzogen, ein Leistungsspektrum für die Frequenzen von 0,5 bis 25 Hz in 2-Sekunden Fenstern berechnet und über die 10-Sekunden Epoche gemittelt. Dabei wurden die Frequenzbänder von 0,5 bis 5 Hz in 0,5-Hz Schritten und alle höheren Frequenzen in 1-Hz Schritten unterteilt. Ein offline-Programm (EGErA Vigilanz 2.2, S.E.A. GmbH, Köln, Deutschland) diente der Anzeige des Roh-EEG und des gleichgerichteten und integrierten EMG für die visuelle Zuordnung der Vigilanzstadien Wach, non-REM Schlaf, pre-REM Schlaf und REM Schlaf (siehe Einleitung: Schlaf) pro 10-Sekunden Epoche.

Für jeden Aufnahmezeitraum wurden die Latenz bis zum Auftreten von non-REM- und REM Schlaf, sowie die durchschnittliche Anzahl und Dauer der non-REM- und REM Schlaf Episoden bestimmt. Als Maß für die Latenzen wurden die 20. Epoche non-REM Schlaf und die 3. Epoche REM Schlaf gewählt, die sich als zuverlässige Marker erwiesen haben (Lancel et al. 1996, Lancel et al. 1997b). Desweiteren wurden für jedes 2-Stunden-Intervall die

insgesamt in jedem Vigilanzstadium verbrachte Zeit, die durchschnittliche EEG-Leistungsdichte während des non-REM Schlafs (teilweise auch während Wachheit und REM Schlaf) und die durchschnittliche Gehirntemperatur (wenn vorhanden) berechnet.

## **2.2 Zaleplon akut**

### **2.2.1 Versuchsdesign**

Dieser Versuch wurde mit 16 adulten männlichen Wistar-Ratten durchgeführt, die zu Beginn des Experiments ein durchschnittliches Körpergewicht von  $336 \pm 29$  g aufwiesen. Alle Tiere wurde in randomisierter Reihenfolge zwei Konditionen ausgesetzt, zwischen denen jeweils 8 experimentalfreie Tage lagen. Eine Kondition bestand immer aus einem Vehikeltag und einem darauf folgenden Verumtag. An jedem dieser Experimenttage wurde den Ratten eine intraperitoneale Injektionen verabreicht. Die Hälfte der Tiere erhielt die Injektion jeweils zu Beginn der Lichtphase (= Ruhephase) und die anderen 8 Ratten zu Beginn der Dunkelphase (= Aktivitätsphase). Am Vehikeltag bekamen alle Tiere pyrogenfreie Saline und am Verumtag entweder 2 oder 4 mg/kg Zaleplon (Wyeth-Pharma GmbH, Münster, Deutschland; gelöst in pyrogenfreier Saline). Anschließend wurden jeweils über 6 Stunden das EEG und EMG aufgezeichnet.

### **2.2.2 Statistik**

Die Daten für Vigilanz und Schlafarchitektur wurden normiert, indem pro Phase die Werte der Zaleplon-Kondition (2 oder 4 mg/kg) durch den Gruppen-Mittelwert der vorangehenden Vehikel-Kondition dividiert wurden. Anschließend wurden für Vigilanz und Schlafarchitektur pro Tier Mittelwerte über die beiden Vehikel-Konditionen gebildet. Statistische Vergleiche wurden pro Meßparameter mittels zweifaktorieller Varianzanalysen ("analysis of variance" = ANOVA) mit Design für wiederholte Messungen (Greenhouse-Geisser Korrektur) durchgeführt, in die "Phase" (2 Stufen: Aktivitätsphase und Ruhephase) als interindividueller und "Behandlung" (3 Stufen: Vehikel, 2 und 4 mg/kg Zaleplon) als intraindividueller Faktor eingingen. Bei Vorliegen einer Interaktion zwischen "Phase" und "Behandlung" wurden die Unterschiede zwischen den Phasen pro Behandlung mittels Tukey-Tests verglichen und Vergleiche zwischen den Zaleplon-Dosierungen getrennt nach Phase anhand von Tests mit Kontrasten betrachtet. Wenn nur ein Behandlungseffekt und kein Einfluß der Phase vorlag, wurden die Daten der Aktivitäts- und Ruhephase gemeinsam betrachtet und Zaleplon-Effekte mittels Tests mit Kontrasten berechnet. Da sich die absoluten Werte der EEG Leistungsdichte

und Muskelaktivität im Verlauf des Experiments teilweise stark verändern, wurden diese Meßparameter zum Vergleich der Wirkung der niedrigen bzw. hohen Zaleplon-Dosierung mit der jeweils vorangegangenen Vehikel-Kondition pro Tier durch den Gruppen-Mittelwert der jeweiligen Vehikel-Kondition dividiert. Zum Vergleich der beiden Dosierungen wurde pro Tier die EEG Leistungsdichte und die Muskelaktivität nach Zaleplon-Gabe als Prozentsatz der vorangegangenen Vehikel-Kondition ausgedrückt. Anschließend wurden alle Werte der EEG Leistungsdichte noch log-transformiert. Statistische Vergleiche wurden mittels zweifaktoriellen ANOVA mit Design für wiederholte Messungen (Greenhouse-Geisser Korrektur) durchgeführt, in die "Phase" (2 Stufen: Aktivitätsphase und Ruhephase) als interindividueller und "Behandlung" (je 2 Stufen: Veh2 und Zal2, Veh4 und Zal4 oder Zal2 und Zal4) als intraindividueller Faktor einging. Bei Vorliegen einer Interaktion zwischen "Phase" und "Behandlung" wurden im Anschluß Tests mit Kontrasten durchgeführt.

## **2.3 Midazolam und Zaleplon subchronisch**

### **2.3.1 Versuchsdesign**

Dieser Versuch wurde mit 24 Ratten durchgeführt, die zu Versuchsbeginn ein Körpergewicht von  $388 \pm 14$  g hatten. Die Tiere wurden zufällig in drei Gruppen (Placebo, Midazolam und Zaleplon) zu je 8 Ratten aufgeteilt. Alle Tiere erhielten an neun aufeinanderfolgenden Tagen zu Beginn der Dunkelphase eine intraperitoneale Injektion. An den ersten beiden Experimenttagen (Baseline: B1 und B2) wurde den Tieren aller drei Gruppen nur das Lösemittel (pyrogenfreie Saline) verabreicht. An den darauffolgenden fünf Tagen wurde den Tiere entweder nur Saline (Placebo-Gruppe) oder 3 mg/kg Midazolam (Midazolam-Gruppe) oder 4 mg/kg Zaleplon (Zaleplon-Gruppe) injiziert. Auf diesen fünftägigen Behandlungszeitraum folgten dann wieder zwei Tage mit Saline-Injektionen ("withdrawal" oder Absetztage: W1 und W2). An jedem der neun Experimenttage wurde im Anschluß an die Injektion über einen Zeitraum von 6 Stunden das EEG und EMG aufgezeichnet.

### **2.3.2 Statistik**

Zur besseren Vergleichbarkeit der Gruppen wurden die Daten zur Vigilanz und Schlafarchitektur normiert, indem die Einzeltierwerte jeweils durch den entsprechenden Gruppen-Mittelwert der kombinierten Baseline-Tage dividiert wurden. Da die Muskelaktivität sehr hohe interindividuelle Variabilität aufweist, wurden sämtliche Werte pro Tier in Prozent des Durchschnitts vom ersten Baseline-Tag angegeben. Die EEG-Leistungsdichte während

Wachheit, Non-REM Schlaf und REM Schlaf wurde pro Tier als Prozentsatz der durchschnittlichen Leistungsdichte im jeweiligen Vigilanzstadium während der kombinierten Baseline-Tage ausgedrückt und anschließend log-transformiert. Um eine Verringerung der Datenpunkte zu erreichen wurden jeweils die beiden Baseline-Tage (B1 und B2), sowie der zweite und dritte (T2 und T3) und der vierte und fünfte (T4 und T5) Behandlungstag zusammengefaßt. Für die EEG-Leistungsdichte wurde nur der zweite Baseline-Tag (B2) in die Analyse einbezogen. Zum Vergleich der drei Gruppen wurden die Daten der gesamten 6 Stunden nach Injektion von Placebo, Midazolam oder Zaleplon einer zweifaktoriellen Varianzanalyse (ANOVA) mit Design für wiederholte Messungen (Greenhouse-Geisser Korrektur) unterzogen, wobei "Gruppe" (3 Stufen: Placebo, Midazolam und Zaleplon) als interindividueller und "Behandlungstag" (6 Stufen: B1 + B2, T1, T2 + T3, T4 + T5, W1 und W2) als intraindividueller Faktor einging. Um die potentielle Entwicklung von Toleranzeffekten während des Behandlungszeitraums genauer zu analysieren, wurde eine separate ANOVA über die Vigilanzdaten innerhalb der ersten zwei Stunden der einzelnen Behandlungstage gerechnet, bei der "Gruppe" (3 Stufen) ein interindividueller und "Behandlungstag" (5 Stufen: T1, T2, T3, T4 und T5) ein intraindividueller Faktor war. Signifikante Effekte wurden mittels univariater F-Tests und Tests mit Kontrasten weiter verfolgt.

## **2.4 Gaboxadol subchronisch**

### **2.4.1 Versuchsdesign**

Dies Experiment wurde mit 17 adulten männlichen Wistar-Ratten durchgeführt, die zu Versuchsbeginn ein durchschnittliches Körpergewicht von  $376 \pm 14$  g aufwiesen. Das Experiment umfaßte 9 aufeinanderfolgende Tage, bestehend aus 2 Baseline-Tagen (B1 und B2), 5 Behandlungstagen (T1 bis T5) und 2 Withdrawal- oder Absetztagen (W1 und W2). An jedem Tag erhielten die Tiere 5 Minuten vor Beginn der Dunkelphase eine intraperitoneale Injektion. Die Ratten der Placebo-Gruppe ( $n = 8$ ) bekamen an allen Tagen Vehikel (pyrogenfreie Saline). Die Ratten der Gaboxadol-Gruppe ( $n = 9$ ) erhielten Vehikel an den Baseline-Tagen, 3 mg/kg Gaboxadol (Biotrend Chemikalien GmbH, Köln, Deutschland) gelöst in pyrogenfreier Saline an jedem der fünf Behandlungstag und Vehikel während der beiden Absetztage. Aufnahmen von EEG und EMG erfolgten jeweils über die ersten 6 Stunden nach Injektion.

## **2.4.2 Statistik**

Die Daten zur Vigilanz und Schlafarchitektur wurden zur besseren Vergleichbarkeit der Gruppen normiert, indem die Werte der einzelnen Tiere jeweils durch den entsprechenden Gruppen-Mittelwert der kombinierten Baseline-Tage dividiert wurden. Die Muskelaktivität (EMG) wurde immer in Prozent des Durchschnitts vom ersten Baseline-Tag des jeweiligen Tieres angegeben. Zur Normalisierung der EEG-Leistungsdichte im non-REM Schlaf wurden die Werte jedes Tieres als Prozentsatz der durchschnittlichen EEG-Leistungsdichte im selben Frequenzbereich während des gleichen Vigilanzstadiums in der gemittelten Baseline-Kondition ausgedrückt und anschließend log-transformiert. Um die Anzahl der Datenpunkte zu reduzieren wurden die Daten für die 2 Baseline-Tage (B1 und B2), sowie für den 2. und 3. (T2 und T3) und den 4. und 5. Behandlungstag (T4 und T5) für jedes Tier gemittelt. Statistische Vergleiche der beiden Gruppen wurden mittels zweifaktoriellen Varianzanalysen (ANOVA) mit Design für wiederholte Messungen (Greenhouse-Geisser Korrektur) durchgeführt, wobei "Gruppe" (2 Stufen: Placebo und Gaboxadol) ein interindividueller Faktor und "Behandlungstag" (6 Stufen: B1 + B2, T1, T2 + T3, T4 + T5, W1 und W2) ein intraindividueller Faktor war. Zur Analyse einer eventuell auftretenden Toleranzentwicklung im Verlauf der Behandlung, wurde eine ANOVA über die Daten der Vigilanz, Schlafarchitektur und EEG-Leistungsdichte während des ersten 2-Stunden-Intervalls der einzelnen Behandlungstage gerechnet, bei der "Gruppe" (2 Stufen) als interindividueller und "Behandlungstag" (5 Stufen: T1, T2, T3, T4 und T5) als intraindividueller Faktor einging. Wenn signifikante Unterschiede vorlagen, wurden die Varianzanalysen durch Tests mit Kontrasten ergänzt.

## **2.5 Melatonin und Picrotoxin**

### **2.5.1 Versuchsdesign**

Für diesen Versuch wurden 9 Ratten herangezogen, die zu Versuchsbeginn ein Körpergewicht von  $308 \pm 37$  g hatten. Jedes der Tiere wurde in randomisierter Reihenfolge 4 verschiedenen Konditionen unterzogen, zwischen denen jeweils mindestens 2 experimentfreie Tage lagen. Eine experimentelle Kondition bestand immer aus einem Vehikeltag und einem darauf folgenden Verumtag. An jedem dieser Experimenttage wurden den Ratten zwei intraperitoneale Injektionen verabreicht, die erste 5 h 45 min nach Beginn der Lichtphase und die zweite 15 min später. Am Vehikeltag bestand die erste Injektion grundsätzlich aus dem Picrotoxin-Lösemittel (pyrogenfreie Saline) und die zweite aus dem Melatonin-Lösemittel

(0,5 % Ethanol in pyrogenfreier Saline). Am Verumtag wurde entweder a) Picrotoxin-Lösemittel + 5 mg/kg Melatonin (ICN Biomedicals, Eschwege, Deutschland), b) Picrotoxin-Lösemittel + 10 mg/kg Melatonin, c) 1,5 mg/kg Picrotoxin (Sigma, Deisenhofen, Deutschland) + Melatonin-Lösemittel oder d) 1,5 mg/kg Picrotoxin + 10 mg/kg Melatonin injiziert. Im Anschluß an die zweite Injektion (d.h. 6 h nach Beginn der Lichtphase) wurden jeweils über einen Zeitraum von 6 Stunden EEG, EMG und Gehirntemperatur der Tiere aufgezeichnet.

### 2.5.2 Statistik

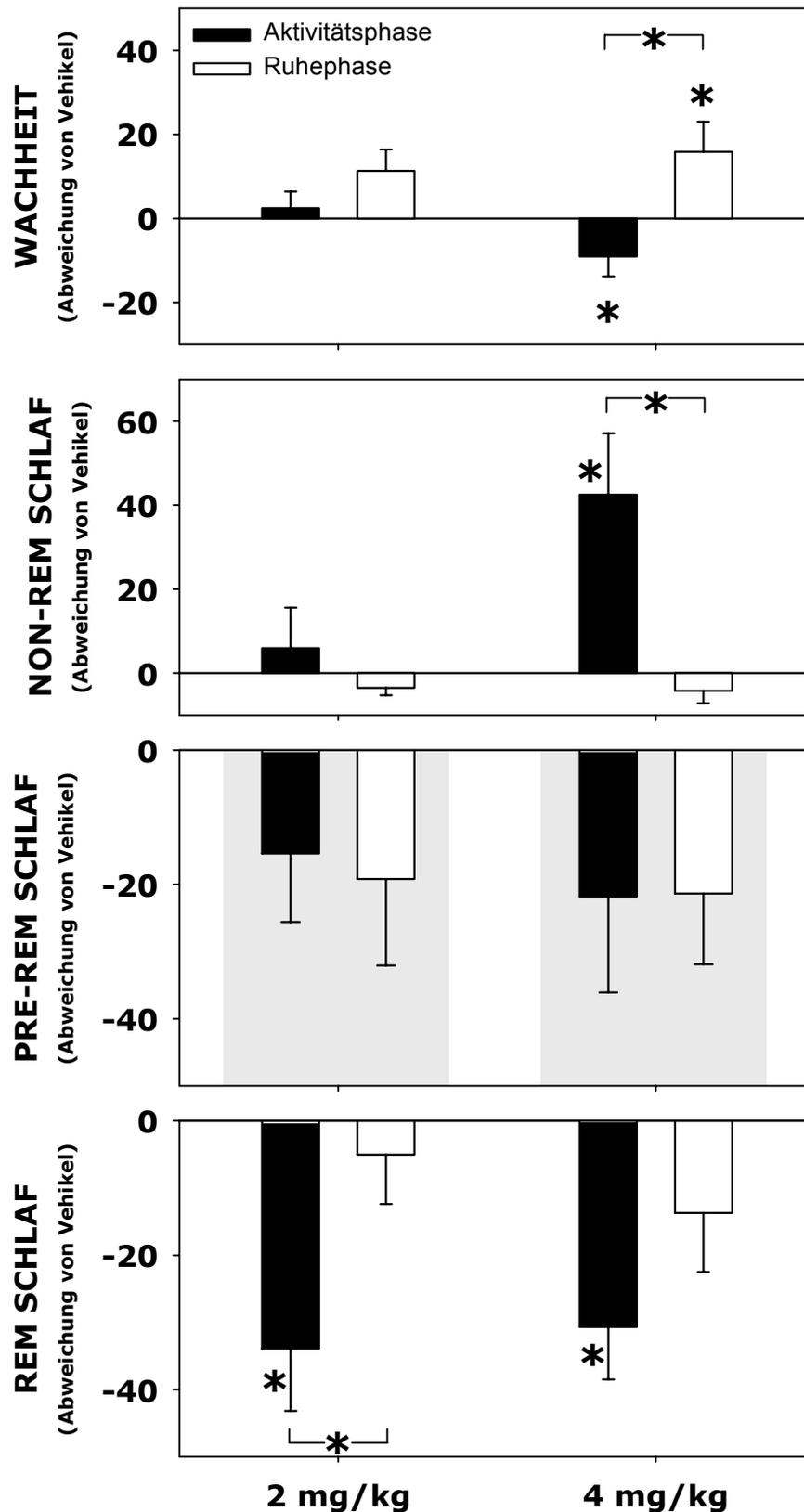
Da weder in den visuell ausgewerteten Schlafvariablen noch in der Gehirntemperatur signifikante Unterschiede zwischen den 4 Vehikeltagen vorlagen, wurden für jedes Tier Vehikel-Mittelwerte gebildet. Zur Standardisierung der Daten wurde die Gehirntemperatur jedes Tieres als Abweichung vom individuellen Vehikel-Mittelwert angegeben und die EEG-Leistungsdichte während des non-REM Schlafs wurde als Prozentsatz der durchschnittlichen Leistungsdichte im non-REM Schlaf für die entsprechende Vehikel-Periode ausgedrückt und anschließend log-transformiert. Um den Einfluß von Melatonin auf Schlafparameter und Gehirntemperatur zu analysieren, wurden die Daten der ersten 6 Stunden nach Injektion von Vehikel, 5 und 10 mg/kg Melatonin einer zweifaktoriellen Varianzanalyse (ANOVA) mit Design für wiederholte Messungen (Greenhouse-Geisser Korrektur) unterzogen, wobei "Behandlung" (3 Stufen: Vehikel, 5 und 10 mg/kg Melatonin) und "Zeit" (3 Stufen: erstes, zweites und drittes 2h-Intervall) die abhängigen Faktoren waren. Um den Einfluß von Picrotoxin auf die melatonin-induzierten Veränderungen zu bestimmen, wurden die Daten der ersten 4 Stunden nach Injektion von Vehikel, 10 mg/kg Melatonin, 1,5 mg/kg Picrotoxin und 1,5 mg/kg Picrotoxin + 10 mg/kg Melatonin mittels einer zweifaktoriellen ANOVA verglichen, wobei "Behandlung" (4 Stufen: Vehikel, Melatonin, Picrotoxin und Picrotoxin + Melatonin) und "Zeit" (2 Stufen: erstes und zweites 2h-Intervall) als abhängige Faktoren eingingen. Die Beschränkung auf die ersten 4 Stunden nach Injektion basierte auf vorherigen Erfahrungen, die zeigten, daß die Effekte von Picrotoxin relativ kurz anhalten (Lancel et al. 1999). Wenn signifikante Effekte vorlagen, wurden weitere Analysen mittels zweiseitigen verbundenen t-Tests durchgeführt.

### 3 ERGEBNISSE

#### 3.1 Zaleplon akut

##### 3.1.1 Vigilanzstadien

Die ANOVA über die normierten Vigilanzdaten der ersten 6 Stunden nach Injektion von Vehikel, 2 oder 4 mg/kg Zaleplon zu Beginn der Aktivitäts- oder Ruhephase ergab für den Wachzustand einen signifikanten Interaktionseffekt zwischen Phase und Behandlung ( $F_{2,28} = 6,8$ ;  $p = 0,004$ ; unnormierte Werte siehe Tabelle 1 und Tabelle 2). Der Vergleich zwischen Aktivitäts- und Ruhephase ergab einen signifikanten Unterschied zwischen den Phasen für die hohe Zaleplon-Dosierung. Zu Beginn der Aktivitätsphase verbrachten die Ratten nach 4 mg/kg Zaleplon signifikant weniger Zeit im Wachzustand während sie zu Beginn der Ruhephase nach dieser Zaleplon-Dosis signifikant mehr wach waren (siehe Abbildung 13 oben). Für den Anteil an non-REM Schlaf ergab die ANOVA einen signifikanten Behandlungseffekt ( $F_{2,28} = 11,9$ ;  $p = 0,001$ ) und eine signifikante Interaktion zwischen Phase und Behandlung ( $F_{2,28} = 15,6$ ;  $p = 0,0003$ ). Der Vergleich zwischen den beiden Phasen ergab einen signifikanten Unterschied für 4 mg/kg Zaleplon. Zu Beginn der Aktivitätsphase führte die Injektion der hohen Zaleplon-Dosierung zu einem signifikant erhöhten Anteil an non-REM Schlaf während der non-REM Schlafanteil zu Beginn der Ruhephase nicht beeinflusst wurde (siehe Abbildung 13 mitte oben). Für den pre-REM Schlaf ergab die ANOVA einen signifikanten Effekt der Behandlung ( $F_{2,28} = 6,5$ ;  $p = 0,01$ ). Im Vergleich zur Vehikel-Kondition verringerten beide Zaleplon-Dosierungen unabhängig von der Phase den Anteil an pre-REM Schlaf (siehe Abbildung 13 mitte unten). Für den Anteil an REM Schlaf ergab die ANOVA einen signifikanten Effekt der Behandlung ( $F_{2,28} = 11,2$ ;  $p = 0,0003$ ) und der Interaktion zwischen Behandlung und Phase ( $F_{2,28} = 3,9$ ;  $p = 0,03$ ). Der Vergleich der Aktivitäts- und Ruhephase zeigte einen signifikanten Unterschied zwischen den Phasen für die niedrige Zaleplon-Dosierung auf. Zu Beginn der Aktivitätsphase führten beide Zaleplon-Dosierungen zu signifikant weniger REM Schlaf als in der Vehikel-Kondition während der REM Schlafanteil in der Ruhephase nicht beeinflusst wurde (siehe Abbildung 13 unten).



**Abbildung 13:** Anteil der Vigilanzstadien in den ersten sechs Stunden nach Injektion von 2 oder 4 mg/kg Zaleplon zu Beginn der Aktivitätsphase oder Ruhephase, dargestellt als Abweichung von Vehikel (Mittelwerte  $\pm$  SEM,  $n = 8$ ). Signifikante Behandlungseffekte sind grau hinterlegt ( $p < 0,05$ , 2-seitiger verbundener t-Test), \*  $p < 0,05$  (2-seitiger verbundener t-Test), L\*  $p < 0,05$  (Tukey-Test).

**Tabelle 1:** Prozentualer Anteil der Vigilanzstadien in den ersten 6 Stunden nach Injektion von Vehikel, 2 oder 4 mg/kg Zaleplon zu Beginn der Aktivitätsphase.

	Vehikel		Zaleplon	
	2 mg/kg	4 mg/kg	2 mg/kg	4 mg/kg
<b>Wachzustand</b>	66,6 ± 6,5	68,3 ± 6,8	68,2 ± 7,6	62,2 ± 9,0 *
<b>Non-REM Schlaf</b>	22,4 ± 4,4	20,8 ± 5,4	23,6 ± 5,8	30,0 ± 8,9 *
<b>Pre-REM Schlaf</b>	3,9 ± 1,7	3,9 ± 1,9	3,3 ± 1,1 #	3,1 ± 1,6 #
<b>REM Schlaf</b>	7,2 ± 2,3	6,9 ± 2,6	4,8 ± 1,8 *	4,8 ± 1,6 *

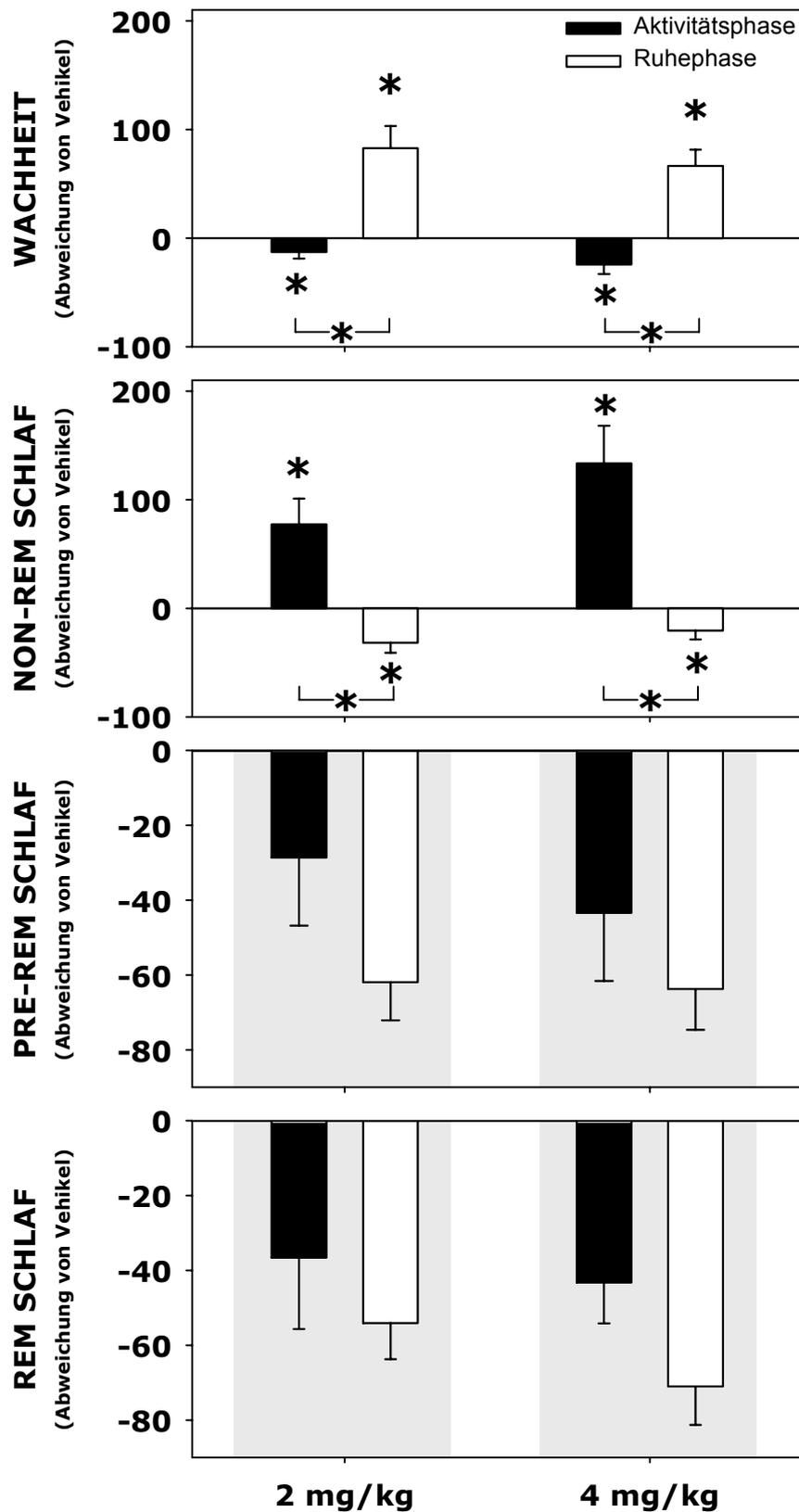
Werte sind Mittelwerte ± SD (n = 8). \* p < 0,05 (2-seitiger verbundener t-Test über normierte Werte) # p < 0,05 (2-seitiger verbundener t-Test über normierte Werte beider Phasen gemeinsam).

**Tabelle 2:** Prozentualer Anteil der Vigilanzstadien in den ersten 6 Stunden nach Injektion von Vehikel, 2 oder 4 mg/kg Zaleplon zu Beginn der Ruhephase.

	Vehikel		Zaleplon	
	2 mg/kg	4 mg/kg	2 mg/kg	4 mg/kg
<b>Wachzustand</b>	30,0 ± 7,1	28,9 ± 4,0	33,4 ± 4,3	33,5 ± 6,0 *
<b>Non-REM Schlaf</b>	56,0 ± 6,0	56,5 ± 2,5	54,0 ± 2,9	54,1 ± 4,7
<b>Pre-REM Schlaf</b>	4,3 ± 1,7	4,8 ± 1,6	3,4 ± 1,7 #	3,9 ± 1,3 #
<b>REM Schlaf</b>	9,7 ± 3,5	9,8 ± 3,4	9,2 ± 2,0	8,5 ± 2,4

Werte sind Mittelwerte ± SD (n = 8). \* p < 0,05 (2-seitiger verbundener t-Test über normierte Werte) # p < 0,05 (2-seitiger verbundener t-Test über normierte Werte beider Phasen gemeinsam).

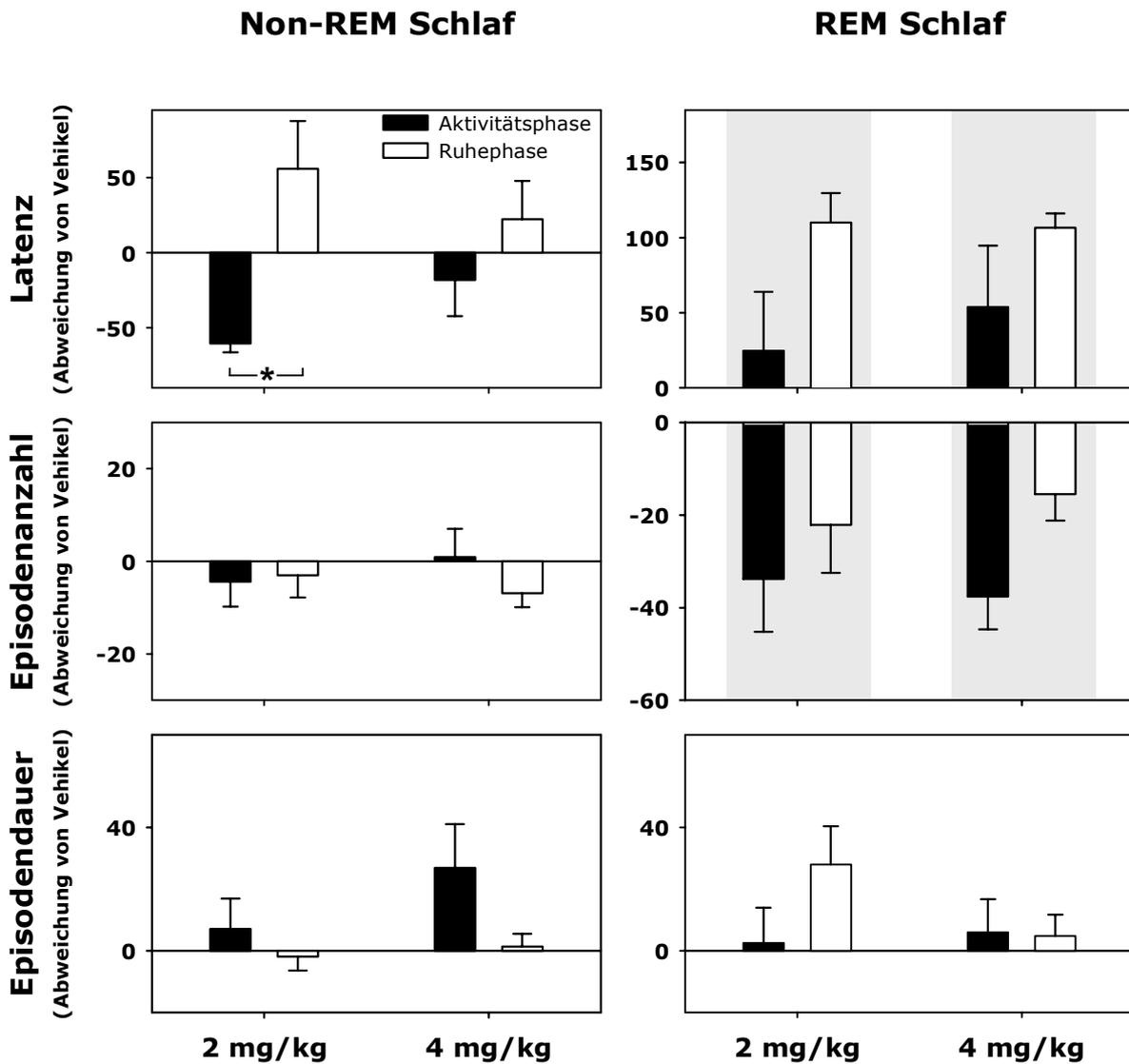
Die ANOVA über die ersten zwei Stunden nach Injektion von 2 oder 4 mg/kg Zaleplon zu Beginn der Aktivitäts- oder Ruhephase ergab für alle Vigilanzstadien signifikante Behandlungseffekte (Wachheit:  $F_{2,28} = 7,3$ ;  $p = 0,004$ ; non-REM Schlaf:  $F_{2,28} = 9,3$ ;  $p = 0,002$ ; pre-REM Schlaf:  $F_{2,28} = 25,7$ ;  $p < 0,0001$  und REM Schlaf:  $F_{2,28} = 18,6$ ;  $p < 0,0001$ ). Für die Stadien Wachheit und non-REM Schlaf wurden zudem signifikante Einflüsse der Phase (Wachheit:  $F_{1,14} = 24,5$ ;  $p = 0,0002$  und non-REM Schlaf:  $F_{1,14} = 16,1$ ;  $p = 0,001$ ) und der Interaktion zwischen Phase und Behandlung (Wachheit:  $F_{2,28} = 16,5$ ;  $p < 0,0001$  und non-REM Schlaf:  $F_{2,28} = 17,3$ ;  $p < 0,0001$ ) gefunden. Sowohl die hohe als auch die niedrige Zaleplon-Dosis zeigten unterschiedliche Wirkung auf den Anteil an Wachheit und non-REM Schlaf, wenn sie zu Beginn der Aktivitäts- oder Ruhephase verabreicht wurden. Zu Beginn der Aktivitätsphase bewirkten beide Zaleplon-Dosierungen eine Verringerung des Wach-Anteils und eine Erhöhung des non-REM Schlafanteils, während sie zu Beginn der Ruhephase den gegenteiligen Effekt ausübten (siehe Abbildung 14). Pre-REM und REM Schlaf wurden in allen Zaleplon-Konditionen unterdrückt (siehe Abbildung 14).



**Abbildung 14:** Anteil der Vigilanzstadien in den ersten zwei Stunden nach Injektion von 2 oder 4 mg/kg Zaleplon zu Beginn der Aktivitätsphase oder Ruhephase, dargestellt als Abweichung von Vehikel (Mittelwerte  $\pm$  SEM, n = 8). Signifikante Behandlungseffekte sind grau hinterlegt (p < 0,05, 2-seitiger verbundener t-Test), \* p < 0,05 (2-seitiger verbundener t-Test), \* p < 0,05 (Tukey-Test).

### 3.1.2 Schlafarchitektur

Die Analyse der Schlafarchitektur-Parameter ergab für die non-REM Schlaflatenz einen signifikanten Phaseneffekt ( $F_{1,14} = 6,6$ ;  $p = 0,02$ ) sowie eine tendentielle Interaktion zwischen Behandlung und Phase ( $F_{2,28} = 3,1$ ;  $p = 0,07$ ; unnormierte Werte siehe Tabelle 3 und Tabelle 4). Der Vergleich der zwei Phasen zeigte einen signifikanten Unterschied für die niedrige Zaleplon-Dosierung auf, da die Latenz durch Zaleplon zu Beginn der Aktivitätsphase eher verkürzt und zu Beginn der Ruhephase eher verlängert wurde (siehe Abbildung 15). Für die REM Schlaflatenz ergab die ANOVA einen signifikanten Behandlungseffekt ( $F_{2,28} = 12,2$ ;  $p = 0,0002$ ). Unabhängig von der Phase führten beide Zaleplon-Dosierungen zu einer Verlängerung der REM Schlaflatenz (siehe Abbildung 15). Die Anzahl an non-REM Schlafepisoden wurde nicht beeinflusst, während sich für die Anzahl an REM Schlafepisoden ein signifikanter Behandlungseffekt ergab ( $F_{2,28} = 17,7$ ;  $p < 0,0001$ ). Beide Zaleplon-Dosierungen bewirkten eine Verringerung der Anzahl an REM Schlafepisoden (siehe Abbildung 15). Die Dauer der REM Schlafepisoden blieb relativ unverändert. Für die Dauer der non-REM Schlafepisoden ergab sich ein Behandlungseffekt ( $F_{2,28} = 4,3$ ;  $p = 0,03$ ). Die weitere Analyse der non-REM Schlafepisodendauer ergab zwar einen signifikanten Dosis-Effekt ( $F_{2,30} = 4,1$   $p = 0,04$ ), der jedoch nur zu einem tendentiellen Effekt der hohen Zaleplon-Dosis führte ( $p < 0,06$ ).



**Abbildung 15:** Schlafarchitekturparameter nach 2 oder 4 mg/kg Zaleplon zu Beginn der Aktivitätsphase oder Ruhephase, dargestellt als Abweichung von Vehikel (Mittelwerte  $\pm$  SEM, n = 8). Signifikante Behandlungseffekte sind grau hinterlegt ( $p < 0,05$ , 2-seitiger verbundener t-Test), \* $p < 0,05$  (Tukey-Test).

**Tabelle 3:** Parameter der Schlafarchitektur in den ersten 6 Stunden nach Injektion von Vehikel, 2 oder 4 mg/kg Zaleplon zu Beginn der Aktivitätsphase.

	Vehikel		Zaleplon	
	2 mg/kg	4 mg/kg	2 mg/kg	4 mg/kg
<b>Non-REM Schlaf</b>				
Latenz (min)	43,1 ± 31,4	34,3 ± 6,9	19,7 ± 6,4	27,2 ± 26,4
Episodenanzahl	58,6 ± 10,6	55,9 ± 18,9	56,1 ± 8,8	56,4 ± 9,9
Episodendauer (min)	1,72 ± 0,26	1,78 ± 0,44	1,84 ± 0,49	2,25 ± 0,70
<b>REM Schlaf</b>				
Latenz (min)	50,6 ± 32,7	36,4 ± 8,1	61,4 ± 48,5	59,8 ± 50,1
Episodenanzahl	23,4 ± 7,3	22,5 ± 7,9	15,6 ± 7,4	13,9 ± 4,6
Episodendauer (min)	1,16 ± 0,38	1,17 ± 0,42	1,19 ± 0,38	1,24 ± 0,36

Werte sind Mittelwerte ± SD (n = 8).

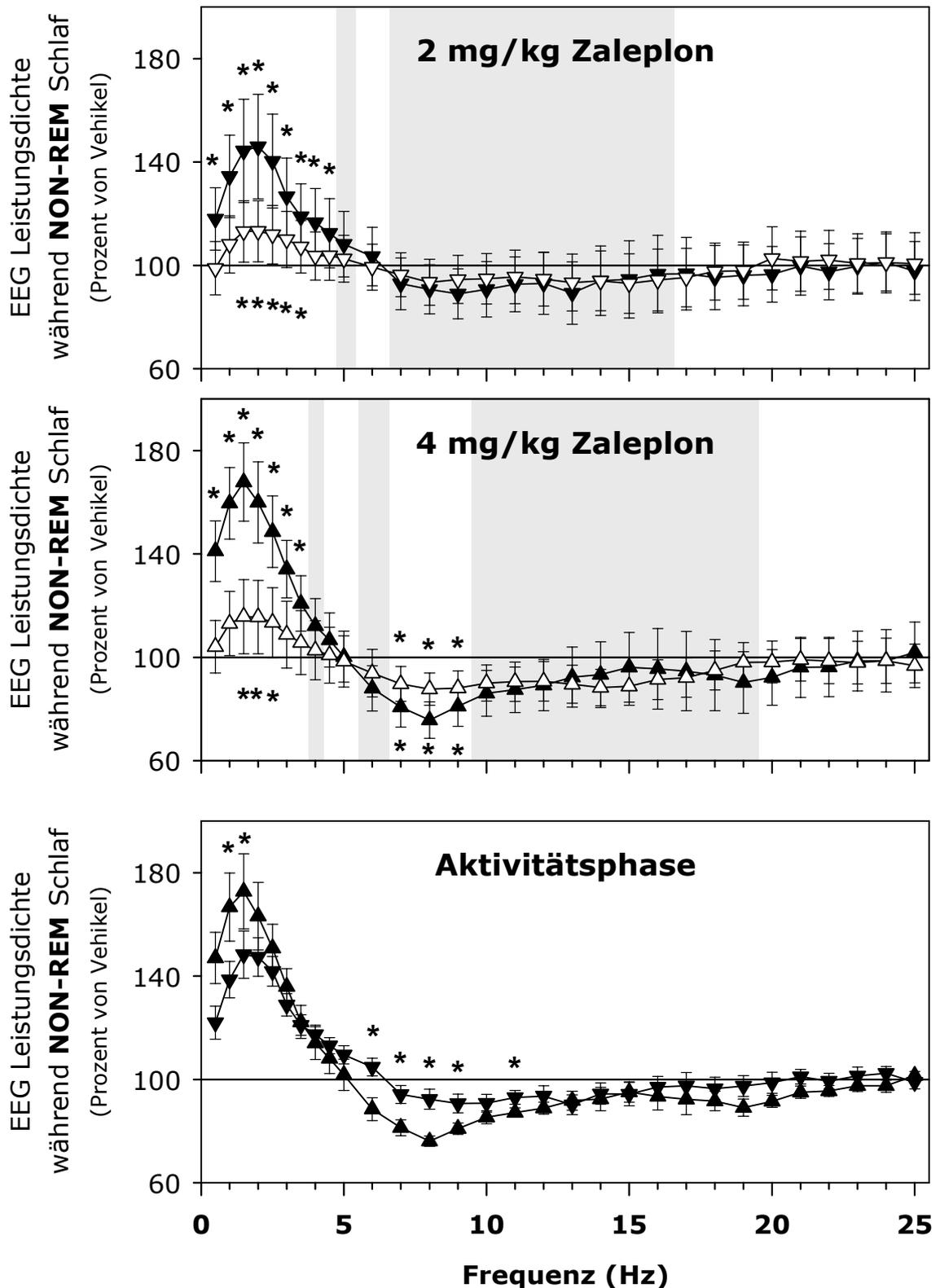
**Tabelle 4:** Parameter der Schlafarchitektur in den ersten 6 Stunden nach Injektion von Vehikel, 2 oder 4 mg/kg Zaleplon zu Beginn der Ruhephase.

	Vehikel		Zaleplon	
	2 mg/kg	4 mg/kg	2 mg/kg	4 mg/kg
<b>Non-REM Schlaf</b>				
Latenz (min)	21,4 ± 12,2	28,7 ± 10,5	35,4 ± 22,5	34,3 ± 18,0
Episodenanzahl	64,4 ± 10,8	61,6 ± 6,8	62,5 ± 8,5	57,3 ± 5,4
Episodendauer (min)	3,52 ± 0,41	3,72 ± 0,47	3,45 ± 0,47	3,77 ± 0,43
<b>REM Schlaf</b>				
Latenz (min)	47,2 ± 15,2	45,1 ± 15,0	98,0 ± 25,5	94,3 ± 12,2
Episodenanzahl	34,4 ± 9,0	30,1 ± 8,3	27,3 ± 9,5	25,1 ± 5,2
Episodendauer (min)	1,01 ± 0,25	1,17 ± 0,32	1,32 ± 0,38	1,22 ± 0,21

Werte sind Mittelwerte ± SD (n = 8).

### **3.1.3 EEG Leistungsdichte während des non-REM Schlafs**

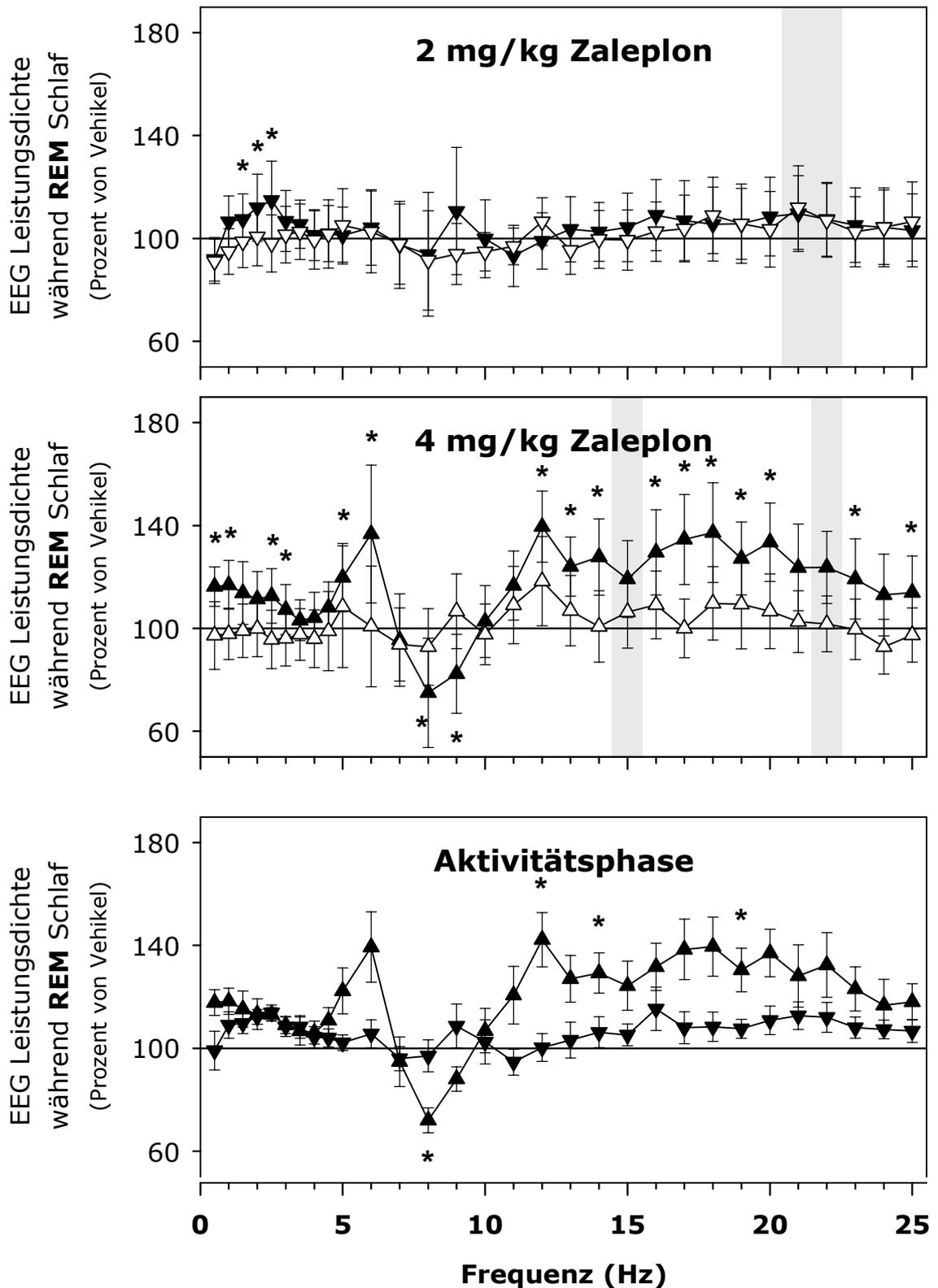
Die Analyse der EEG Leistungsdichte während des non-REM Schlafs nach Injektion von Vehikel oder 2 mg/kg Zaleplon ergab signifikante Behandlungseffekte für die Frequenzen von 1 bis 5 Hz, sowie von 7 bis 16 Hz. Für die Frequenzen von 0,5 bis 4,5 Hz errechnete sich zudem ein Interaktionseffekt zwischen Phase und Behandlung. Im Vergleich zu Vehikel führten 2 mg/kg Zaleplon zu Beginn der Aktivitätsphase zu einer signifikanten Erhöhung der Leistungsdichte in den Frequenzen von 0,5 bis 4,5 Hz, während zu Beginn der Ruhephase die Leistungsdichte in den Frequenzen von 1,5 bis 3 Hz signifikant erhöht war, jedoch in deutlich geringerem Ausmaß als zu Beginn der Aktivitätsphase (siehe Abbildung 16 oben). Im Bereich von 7 bis 16 Hz führte die niedrige Zaleplon-Dosierung zu einer leichten Verringerung der Aktivität. Die Analyse der EEG Leistungsdichte während des non-REM Schlafs nach Injektion von Vehikel oder 4 mg/kg Zaleplon ergab signifikante Behandlungseffekte für die Frequenzen von 0,5 bis 4 Hz und von 6 bis 19 Hz, sowie Interaktionseffekte zwischen Phase und Behandlung für Frequenzen von 0,5 bis 3,5 Hz und von 7 bis 9 Hz. Im Vergleich zu Vehikel führten 4 mg/kg Zaleplon zu Beginn der Aktivitätsphase zu einer signifikanten Erhöhung der EEG Leistungsdichte in den Frequenzen von 0,5 bis 3,5 Hz (siehe Abbildung 16 mitte). Zu Beginn der Ruhephase war die Erhöhung der EEG Leistungsdichte in diesem Frequenzbereich deutlich geringer und nur von 1,5 bis 2,5 Hz im Vergleich zu Vehikel signifikant. In den Frequenzen von 6 bis 19 Hz führte die hohe Zaleplon-Dosis in beiden Phasen zu einer Verringerung der EEG Leistungsdichte während des non-REM Schlafs, die jedoch zu Beginn der Ruhephase schwächer ausfiel als zu Beginn der Aktivitätsphase. Der Vergleich der EEG Leistungsdichte während des non-REM Schlafs nach Injektion von 2 oder 4 mg/kg Zaleplon ergab nur während der Aktivitätsphase signifikante Behandlungseffekte (= Dosiseffekte). In den Frequenzen von 1 bis 1,5 Hz war die Erhöhung der EEG Leistungsdichte nach 4 mg/kg Zaleplon stärker als nach 2 mg/kg und in den Frequenzen von 6 bis 9 Hz, sowie bei 11 Hz verringerten 4 mg/kg Zaleplon die Leistungsdichte stärker als 2 mg/kg Zaleplon (siehe Abbildung 16 unten).



**Abbildung 16:** EEG Leistungsdichte während des non-REM Schlafs nach Injektion von 2 oder 4 mg/kg Zaleplon zu Beginn der Aktivitätsphase (schwarze Symbole) oder Ruhephase (weiße Symbole), dargestellt als Prozentsatz der vorangegangenen Vehikel-Kondition (Mittelwerte  $\pm$  SEM,  $n = 8$ ). Signifikante Behandlungseffekte sind grau hinterlegt ( $p < 0,05$ , 2-seitiger verbundener t-Test), \*  $p < 0,05$  (2-seitiger verbundener t-Test versus Vehikel (oben und mitte) bzw. 2 versus 4 mg/kg (unten)).

### **3.1.4 EEG Leistungsdichte während des REM Schlafs**

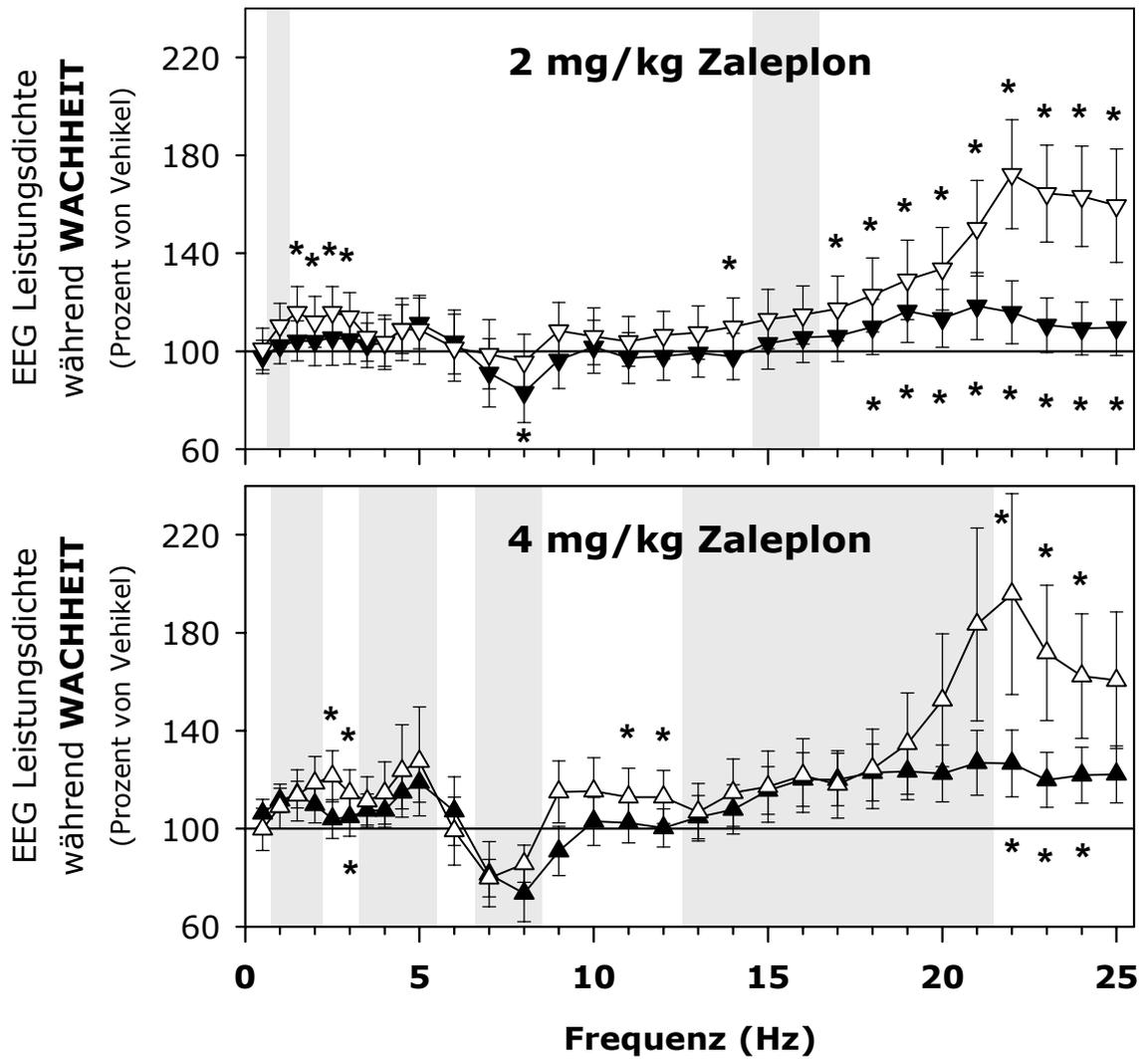
Die Analyse der EEG Leistungsdichte während des REM Schlafs nach Injektion von Vehikel oder 2 mg/kg Zaleplon ergab signifikante Behandlungseffekte für die Frequenzen von 21 bis 22 Hz, sowie Interaktionseffekte zwischen Phase und Behandlung für die Frequenzen von 1,5 bis 2,5 Hz. In den Frequenzen von 1,5 bis 2,5 Hz führte die Injektion von 2 mg/kg Zaleplon nur zu Beginn der Aktivitätsphase zu einer signifikanten Erhöhung der EEG Leistungsdichte (siehe Abbildung 17 oben). Die Analyse der EEG Leistungsdichte während des REM Schlafs nach Injektion von Vehikel oder 4 mg/kg Zaleplon ergab signifikante Behandlungseffekte für die Frequenzen von 5 bis 6 Hz, 8 Hz, 12 bis 20 Hz und 22 bis 23 Hz und Interaktionseffekte zwischen Phase und Behandlung für die Frequenzen von 0,5 bis 3 Hz, 4,5 bis 6 Hz, 8 bis 9 Hz, 12 bis 14 Hz, 16 bis 20 Hz, 22 bis 23 Hz, sowie 25 Hz. Im Vergleich zu Vehikel bewirkte die Injektion von 4 mg/kg Zaleplon nur zu Beginn der Aktivitätsphase signifikante Erhöhungen der EEG Leistungsdichte während des REM Schlafs in den Frequenzen von 5 bis 6 Hz, 12 bis 14 Hz, 16 bis 20 Hz, 23 und 25 Hz und signifikante Verringerungen der Leistungsdichte von 8 bis 9 Hz (siehe Abbildung 17 mitte). Außerdem führten 4 mg/kg Zaleplon zu Beginn der Aktivitätsphase zu einer Erhöhung der EEG Leistungsdichte in den Frequenzen von 0,5 bis 1, sowie 2,5 bis 3 Hz. Die Analyse der EEG Leistungsdichte während des REM Schlafs nach Injektion von 2 oder 4 mg/kg Zaleplon ergab nur während der Aktivitätsphase signifikante Behandlungseffekte (= Dosiseffekte). Die Verringerung der EEG Leistungsdichte bei 8 Hz sowie die Erhöhung bei 17, 19 und 24 Hz fiel nach 4 mg/kg Zaleplon signifikant stärker aus als nach 2 mg/kg (siehe Abbildung 17 unten).



**Abbildung 17:** EEG Leistungsdichte während des REM Schlafs nach Injektion von 2 oder 4 mg/kg Zaleplon zu Beginn der Aktivitätsphase (schwarze Symbole) oder Ruhephase (weiße Symbole), dargestellt als Prozentsatz der vorangegangenen Vehikel-Kondition (Mittelwerte  $\pm$  SEM,  $n = 8$ ). Signifikante Behandlungseffekte sind grau hinterlegt ( $p < 0,05$ , 2-seitiger verbundener t-Test), \*  $p < 0,05$  (2-seitiger verbundener t-Test versus Vehikel (oben und mitte) bzw. 2 versus 4 mg/kg (unten)).

### 3.1.5 EEG Leistungsdichte während des Wachzustands

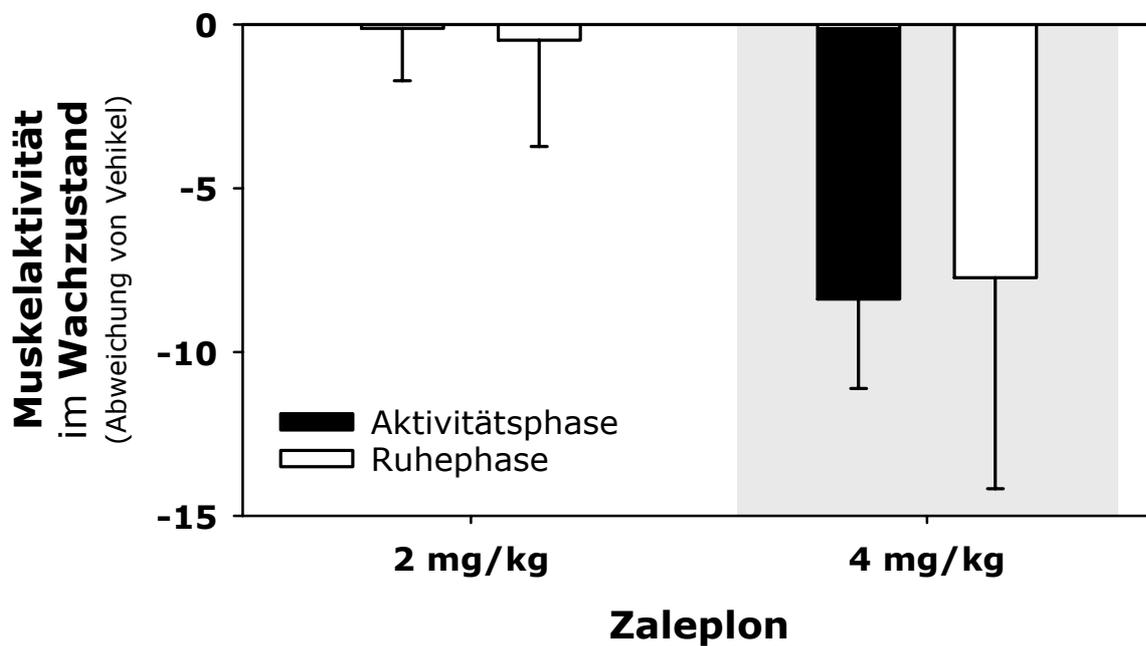
Die Analyse der EEG Leistungsdichte während des Wachzustands nach Injektion von Vehikel oder 2 mg/kg Zaleplon ergab signifikante Behandlungseffekte für die Frequenzen von 1 bis 3 Hz, 8 Hz und 15 bis 25 Hz. Signifikante Interaktionseffekte zwischen Phase und Behandlung errechneten sich für die Frequenzbänder von 1,5 bis 3 Hz, von 8 Hz und 14 Hz, sowie von 17 bis 25 Hz. Die Injektion von 2 mg/kg Zaleplon führte über beide Phasen zu einer signifikanten Erhöhung der EEG Leistungsdichte in den Frequenzen von 1 bis 3 Hz und einer Verringerung der Leistungsdichte bei 8 Hz. Allerdings war die Erhöhung in den niederfrequenten Bereichen nur während der Ruhephase signifikant verschieden von Vehikel, während sich die Leistungsdichte bei 8 Hz nur während der Aktivitätsphase signifikant von Vehikel unterschied (siehe Abbildung 18 oben). In beiden Phasen führte die niedrige Zaleplon-Dosis zu einer Erhöhung der Leistungsdichte in den Frequenzbändern  $\geq 15$  Hz. Zu Beginn der Ruhephase war die Leistungsdichte in den Frequenzen von 14 Hz, sowie von 17 bis 25 Hz signifikant erhöht während dies zu Beginn der Aktivitätsphase nur in den Frequenzen von 18 bis 25 Hz und in deutlich geringerem Ausmaß geschah (siehe Abbildung 18 oben). Die Analyse der EEG Leistungsdichte während des Wachzustands nach Injektion von Vehikel oder 4 mg/kg Zaleplon ergab signifikante Behandlungseffekte für die Frequenzen von 1 bis 5 Hz, 7 bis 8 Hz und 11 bis 25 Hz, sowie Interaktionseffekte zwischen Phase und Behandlung für die Frequenzen von 2,5 bis 3 Hz, von 9 Hz und 12 Hz und von 22 bis 24 Hz. Über beide Phasen gemeinsam führte die hohe Zaleplon-Dosis zu einer Erhöhung der EEG-Leistungsdichte in den Frequenzbändern von 1 bis 5 Hz, sowie  $\geq 11$  Hz. Im Vergleich zu Vehikel war die EEG Leistungsdichte im Wachzustand zu Beginn der Ruhephase in den Frequenzen von 2,5 bis 3 Hz, von 12 Hz und von 22 bis 24 Hz signifikant erhöht, während zu Beginn der Aktivitätsphase die Erhöhung der Leistungsdichte deutlich geringer ausfiel und nur für die Frequenzbänder von 3 Hz, sowie von 22 bis 24 Hz signifikant war (siehe Abbildung 18 unten). Die Analyse der EEG Leistungsdichte während des Wachzustands nach Injektion von 2 oder 4 mg/kg Zaleplon ergab keine deutlichen Behandlungseffekte (= Dosiseffekte).



**Abbildung 18:** EEG Leistungsdichte während des Wachzustands nach Injektion von 2 oder 4 mg/kg Zaleplon zu Beginn der Aktivitätsphase (schwarze Symbole) oder Ruhephase (weiße Symbole), dargestellt als Prozentsatz der vorangegangenen Vehikel-Kondition (Mittelwerte  $\pm$  SEM,  $n = 8$ ). Signifikante Behandlungseffekte sind grau hinterlegt ( $p < 0,05$ , 2-seitiger verbundener t-Test), \*  $p < 0,05$  (2-seitiger verbundener t-Test versus Vehikel).

### 3.1.6 Muskelaktivität während des Wachzustands

Die Analyse der Muskelaktivität (EMG) während des Wachzustands nach Injektion von Vehikel oder 2 mg/kg Zaleplon ergab keine signifikanten Effekte. Die Analyse des EMG im Wachzustand nach Verabreichung von Vehikel oder 4 mg/kg Zaleplon ergab einen signifikanten Behandlungseffekt ( $F_{1,14} = 5,3$ ;  $p = 0,04$ ). Im Vergleich zu Vehikel führte die hohe Zaleplon-Dosierung unabhängig von der Phase zu einer Verringerung der Muskelaktivität im Wachzustand (siehe Abbildung 19). Der Vergleich der beiden Dosierungen ergab keinen signifikanten Unterschied.

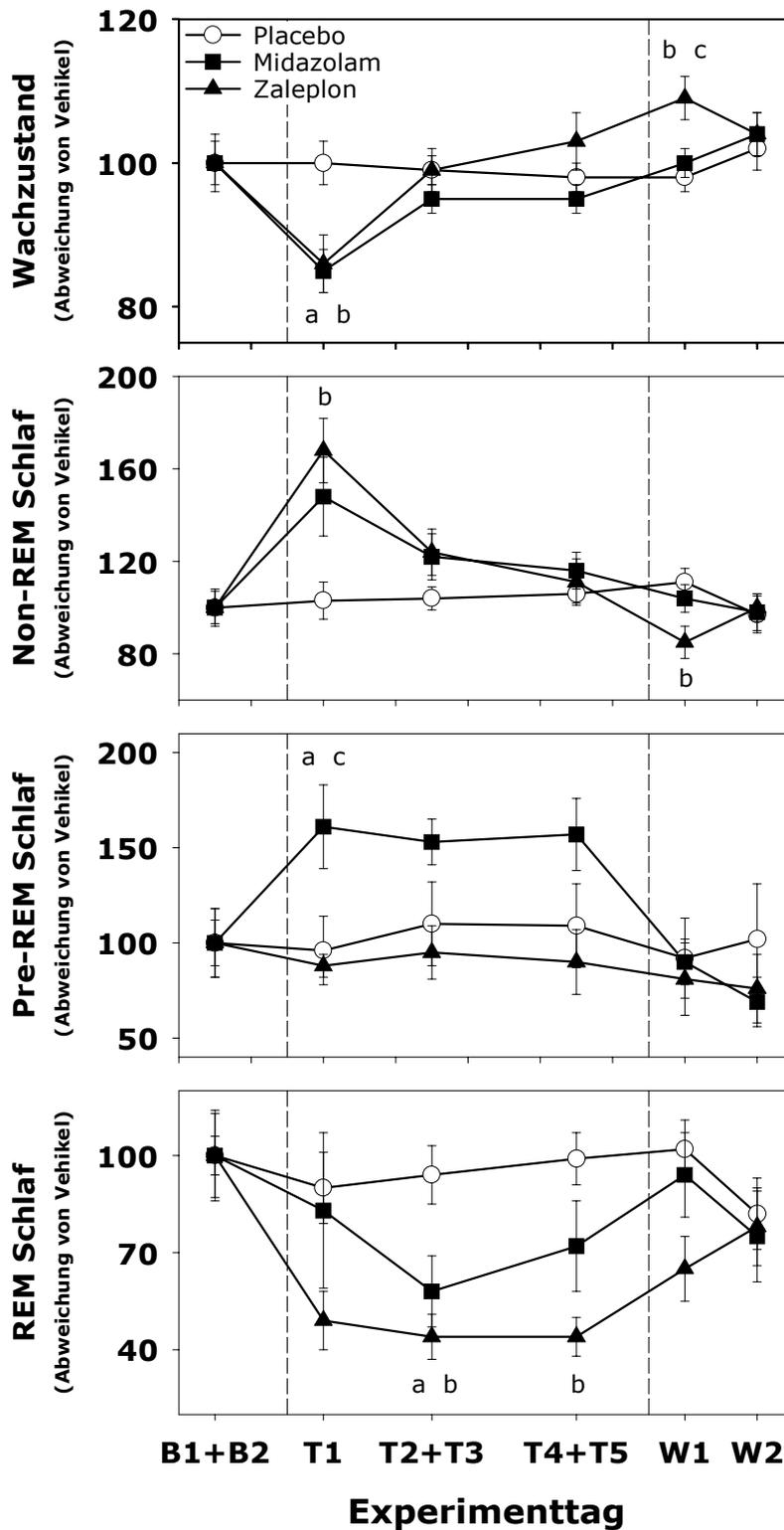


**Abbildung 19:** Muskelaktivität im Wachzustand zu Beginn der Aktivitätsphase oder Ruhephase (Mittelwerte  $\pm$  SEM,  $n = 8$ ). Signifikante Behandlungseffekte sind grau hinterlegt ( $p < 0,05$ , 2-seitiger verbundener t-Test).

## 3.2 Midazolam und Zaleplon subchronisch

### 3.2.1 Vigilanzstadien

Für alle Vigilanzstadien ergab die ANOVA über die normierten 6-Stunden Werte einen signifikanten Interaktionseffekt zwischen den Faktoren Gruppe und Kondition (Wachheit:  $F_{10,105} = 6,2$ ;  $p < 0,0001$ ; non-REM Schlaf:  $F_{10,105} = 7,0$ ;  $p < 0,0001$ ; pre-REM Schlaf:  $F_{10,105} = 5,8$ ;  $p < 0,0001$  und REM Schlaf:  $F_{10,105} = 3,4$ ;  $p = 0,006$ ), was eine Veränderung im Anteil dieser Vigilanzstadien im Verlauf des Experiments widerspiegelt (unnormierte Werte siehe Tabelle 5). Der Anteil an Wachheit unterschied sich signifikant zwischen den drei Gruppen an T1 und W1 ( $F_{2,21} = 7,2$ ;  $p = 0,004$  und  $F_{2,21} = 6,0$ ;  $p = 0,009$ , respektive). Während T1 verbrachte die Midazolam- wie auch die Zaleplon-Gruppe signifikant weniger Zeit wach als die Placebo-Gruppe (siehe Abbildung 20 oben). Ratten der Zaleplon-Gruppe waren länger wach als die beiden anderen Gruppen während W1. Auch in der Menge an non-REM Schlaf unterschieden sich die Gruppen an T1 und W1 ( $F_{2,21} = 6,1$ ;  $p = 0,008$  und  $F_{2,21} = 4,6$ ;  $p = 0,03$ , respektive). Im Vergleich zur Placebo-Gruppe verbrachten Tiere der Zaleplon-Gruppe mehr Zeit im non-REM Schlaf an T1, aber weniger während W1 (siehe Abbildung 20 mitte oben). Bezüglich des pre-REM Schlafs unterschieden sich die Gruppen nur während T1 signifikant voneinander ( $F_{2,21} = 5,6$ ;  $p = 0,02$ ), indem der Anteil im pre-REM Schlaf in der Midazolam-Gruppe den in der Placebo- und Zaleplon-Gruppe überstieg (siehe Abbildung 20 mitte unten). Für den REM Schlaf zeigten sich signifikante Gruppen-Unterschiede an T2 + T3 und T4 + T5 ( $F_{2,21} = 8,0$ ;  $p = 0,003$  an beiden Konditionen). Im Vergleich zur Placebo-Gruppe zeigten die Midazolam- und Zaleplon-behandelten Ratten signifikant weniger REM Schlaf an T2 + T3 und die Zaleplon-Tiere auch an T4 + T5 (siehe Abbildung 20 unten).



**Abbildung 20:** Anteil der einzelnen Vigilanzstadien während B1 + B2, T1, T2+T3, T4+T5, W1 und W2 in den ersten 6 Stunden nach Injektion von Vehikel, 3 mg/kg Midazolam oder 4 mg/kg Zaleplon jeweils zu Beginn der Aktivitätsphase, dargestellt als Prozentsatz des jeweiligen Gruppen-Mittelwerts während B1 + B2 (Mittelwerte  $\pm$  SEM, n = 8). a  $p < 0,05$  (2-seitiger verbundener t-Test Midazolam versus Placebo, b  $p < 0,05$  (2-seitiger verbundener t-Test Zaleplon versus Placebo, c  $p < 0,05$  (2-seitiger verbundener t-Test Midazolam versus Zaleplon).

**Tabelle 5:** Prozentualer Anteil der Vigilanzstadien in den ersten 6 Stunden nach Injektion von Vehikel, 3 mg/kg Midazolam oder 4 mg/kg Zaleplon zu Beginn der Aktivitätsphase.

	Wachzustand	Non-REM Schlaf	Pre-REM Schlaf	REM Schlaf
<b>Placebo</b>				
<b>B1 + B2</b>	72,6 ± 3,2	17,4 ± 2,2	4,7 ± 2,4	5,2 ± 1,2
<b>T1</b>	72,8 ± 5,1	18,0 ± 3,8	4,5 ± 2,4	4,7 ± 1,6
<b>T2 + T3</b>	71,8 ± 4,3	18,1 ± 3,0	5,2 ± 2,9	4,9 ± 1,6
<b>T4 + T5</b>	71,1 ± 4,0	18,6 ± 2,1	5,1 ± 3,0	5,2 ± 1,3
<b>W1</b>	71,0 ± 4,8	19,4 ± 2,9	4,3 ± 2,9	5,3 ± 1,4
<b>W2</b>	73,9 ± 5,5	17,0 ± 3,9	4,8 ± 3,9	4,3 ± 1,6
<b>Midazolam</b>				
<b>B1 + B2</b>	70,4 ± 6,2	19,7 ± 5,1	3,5 ± 1,9	6,4 ± 2,6
<b>T1</b>	60,0 ± 5,1 *	29,1 ± 9,2	5,6 ± 2,2 *#	5,3 ± 4,3
<b>T2 + T3</b>	66,9 ± 5,6	24,1 ± 5,9	5,3 ± 1,4	3,7 ± 2,3 *
<b>T4 + T5</b>	67,0 ± 5,2	22,9 ± 4,8	5,5 ± 2,0	4,6 ± 2,7
<b>W1</b>	70,5 ± 3,6 #	20,4 ± 3,3	3,2 ± 1,2	6,0 ± 2,4
<b>W2</b>	73,6 ± 6,0	19,2 ± 4,3	2,4 ± 1,3	4,8 ± 2,5
<b>Zaleplon</b>				
<b>B1 + B2</b>	68,6 ± 7,5	19,8 ± 4,2	5,0 ± 1,9	6,6 ± 2,7
<b>T1</b>	59,1 ± 7,7 *	33,3 ± 7,7 *	4,4 ± 0,9 #	3,2 ± 1,7
<b>T2 + T3</b>	67,8 ± 6,8	24,5 ± 6,2	4,8 ± 2,0	2,9 ± 1,4 *
<b>T4 + T5</b>	70,6 ± 8,0	22,0 ± 6,3	4,5 ± 2,4	2,9 ± 1,2 *
<b>W1</b>	74,9 ± 6,1 *#	16,7 ± 3,8 *	4,1 ± 2,7	4,3 ± 1,8
<b>W2</b>	71,4 ± 5,6	19,7 ± 3,4	3,8 ± 2,5	5,2 ± 2,2

Werte sind Mittelwerte ± SD (n = 8). \* p < 0,05 (2-seitiger verbundener t-Test über normierte Werte gegen Placebo) # p < 0,05 (2-seitiger verbundener t-Test über normierte Werte Midazolam versus Zaleplon).

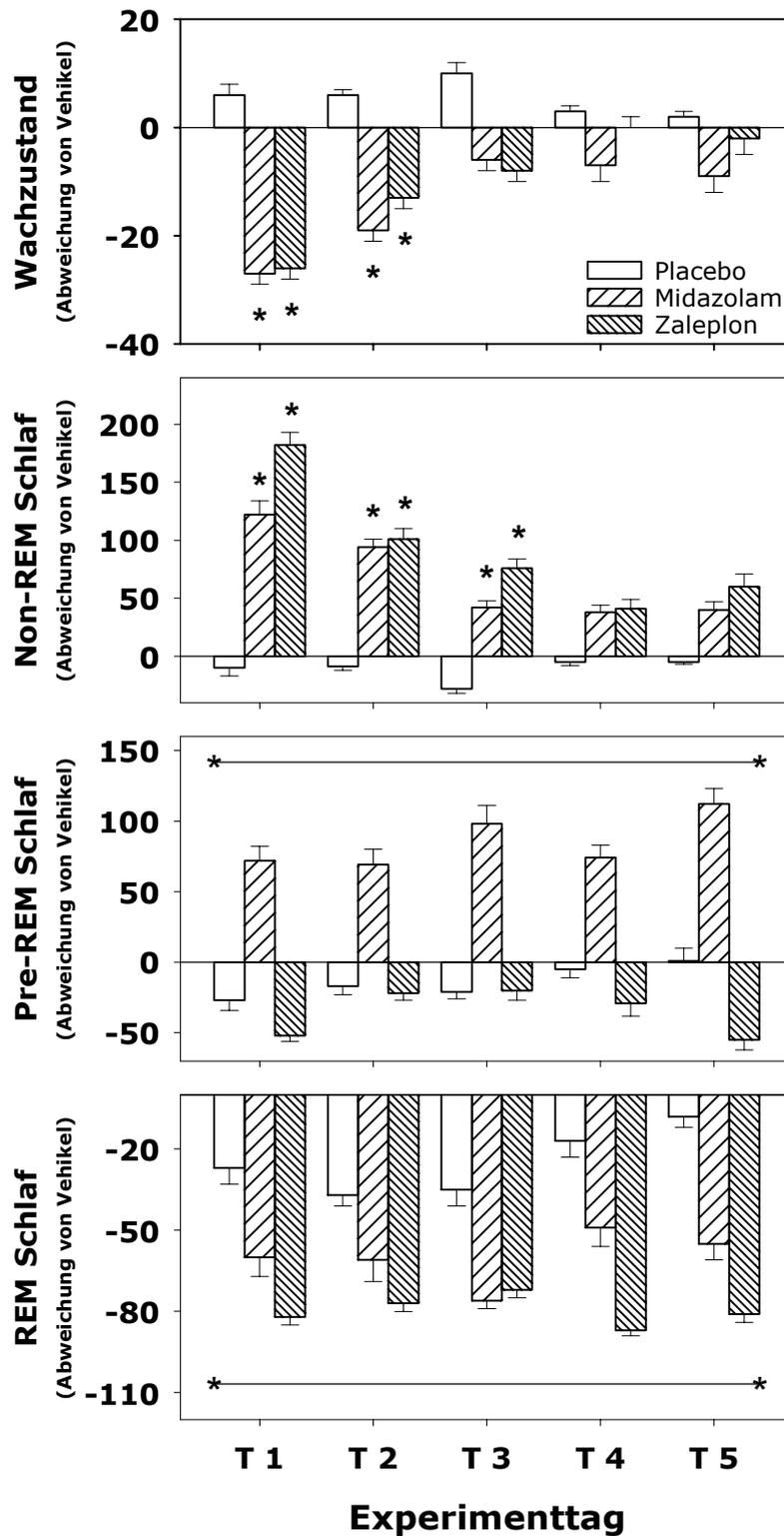
Die ANOVA über die normierten Werte der ersten 2-Stunden von jedem der fünf Behandlungstage ergab signifikante Gruppen-Effekte für alle Vigilanzstadien (Wachheit:  $F_{2,21} = 4,7$ ;  $p = 0,02$ ; non-REM Schlaf:  $F_{2,21} = 10,4$ ;  $p = 0,0007$ ; pre-REM Schlaf:  $F_{2,21} = 9,8$ ;  $p = 0,001$  und REM Schlaf:  $F_{2,21} = 6,8$ ;  $p = 0,005$ ), während eine signifikante Interaktion zwischen Gruppe und Kondition für Wachheit ( $F_{8,84} = 3,2$ ;  $p = 0,01$ ) und non-REM Schlaf ( $F_{8,84} = 3,7$ ;  $p = 0,003$ ), jedoch nicht für pre-REM oder REM Schlaf nachgewiesen wurde (unnormierte Werte siehe Tabelle 6). Univariate F-Tests ließen signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen während der ersten 2 Stunden von T1 (Non-REM:  $p = 0,0005$ ; Wachheit:  $p = 0,001$ ), T2 (Non-REM:  $p = 0,001$ ; Wachheit:  $p = 0,003$ ) und T3 (Non-REM:  $p = 0,002$ ; Wachheit:  $p = 0,05$ ), jedoch nicht mehr für T4 und T5 erkennen (siehe Abbildung

21). Verglichen mit Placebo, zeigten Ratten der Zaleplon- und der Midazolam-Gruppe signifikant mehr non-REM Schlaf während T1, T2 und T3 und weniger Wachheit während T1 und T2. Der Anteil an pre-REM Schlaf war bei den Midazolam-behandelten Ratten erhöht und der REM Schlaf war sowohl in Midazolam- als auch in Zaleplon-behandelten Tieren innerhalb der ersten 2 Stunden aller Behandlungstage unterdrückt.

**Tabelle 6:** Prozentualer Anteil der Vigilanzstadien in den ersten 2 Stunden von B1 + B2 und den einzelnen Behandlungstagen nach Injektion von Vehikel, 3 mg/kg Midazolam oder 4 mg/kg Zaleplon zu Beginn der Aktivitätsphase.

	<b>Wachzustand</b>	<b>Non-REM Schlaf</b>	<b>Pre-REM Schlaf</b>	<b>REM Schlaf</b>
<b>Placebo</b>				
<b>B1 + B2</b>	73,1 ± 6,9	16,1 ± 5,2	5,3 ± 2,2	5,6 ± 2,1
<b>T1</b>	77,6 ± 12,6	14,4 ± 8,8	3,9 ± 3,0	4,1 ± 2,7
<b>T2</b>	77,5 ± 4,2	14,6 ± 4,2	4,4 ± 2,4	3,5 ± 1,9
<b>T3</b>	80,7 ± 9,1	11,5 ± 5,2	4,2 ± 2,2	3,6 ± 2,5
<b>T4</b>	75,0 ± 8,0	15,3 ± 3,8	5,0 ± 2,7	4,6 ± 2,8
<b>T5</b>	74,2 ± 7,0	15,3 ± 3,1	5,4 ± 3,7	5,2 ± 2,0
<b>Midazolam</b>				
<b>B1 + B2</b>	69,5 ± 14,5	17,2 ± 6,9	4,1 ± 2,6	9,3 ± 7,6
<b>T1</b>	51,0 ± 11,5 *	38,1 ± 16,9 *	7,1 ± 3,4	3,7 ± 5,2
<b>T2</b>	56,0 ± 9,7 *	33,5 ± 9,6 *	7,0 ± 3,8	3,6 ± 5,7
<b>T3</b>	65,2 ± 12,6	24,4 ± 8,9 *	8,2 ± 4,2	2,2 ± 2,5
<b>T4</b>	64,4 ± 14,2	23,7 ± 8,9	7,2 ± 3,0	4,7 ± 5,0
<b>T5</b>	63,0 ± 14,4	24,0 ± 9,4	8,8 ± 3,8	4,2 ± 4,1
<b>Zaleplon</b>				
<b>B1 + B2</b>	74,6 ± 9,7	14,7 ± 5,0	5,4 ± 2,7	5,4 ± 3,1
<b>T1</b>	55,1 ± 13,9 *	41,4 ± 13,3 *	2,6 ± 1,7	1,0 ± 1,4
<b>T2</b>	65,2 ± 13,3 *	29,4 ± 11,1 *	4,2 ± 2,3	1,2 ± 1,3
<b>T3</b>	68,3 ± 11,0	25,9 ± 9,8 *	4,3 ± 3,1	1,5 ± 1,4
<b>T4</b>	74,8 ± 12,0	20,7 ± 8,8	3,8 ± 4,0	0,7 ± 1,1
<b>T5</b>	73,1 ± 15,5	23,5 ± 12,6	2,4 ± 2,9	1,0 ± 1,1

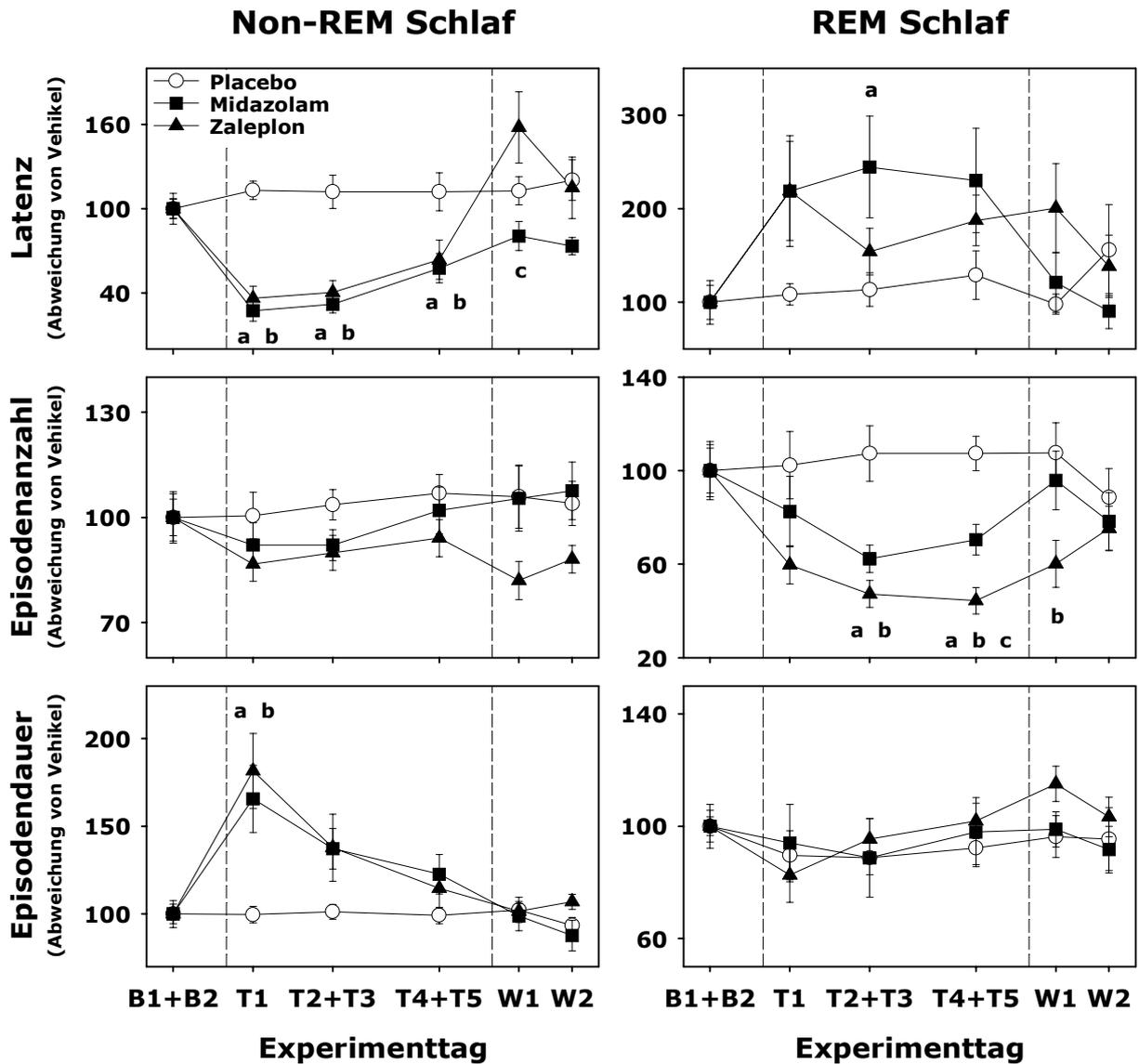
Werte sind Mittelwerte ± SD (n = 8). \* p < 0,05 (2-seitiger verbundener t-Test über normierte Werte gegen Placebo).



**Abbildung 21:** Anteil der einzelnen Vigilanzstadien während der 5 Behandlungstage (T1-T5) in den ersten 2 Stunden nach Injektion von Vehikel, 3 mg/kg Midazolam oder 4 mg/kg Zaleplon jeweils zu Beginn der Aktivitätsphase, dargestellt als Abweichung vom jeweiligen Gruppen-Mittelwert während B1+B2 (Mittelwerte  $\pm$  SEM, n = 8). \* p < 0,05 (2-seitiger verbundener t-Test versus Placebo). \*\* p < 0,05 (ANOVA, Gruppeneffekt).

### 3.2.2 Schlafarchitektur

Die Analyse der normierten Schlafarchitektur-Parameter ergab einen signifikanten Effekt der Interaktion zwischen Gruppe und Kondition für die Latenz zum non-REM Schlaf ( $F_{10,105} = 5,1$ ;  $p < 0,0001$ ), die Dauer der non-REM Schlafepisoden ( $F_{10,105} = 5,0$ ;  $p = 0,002$ ), die Latenz zum REM Schlaf ( $F_{10,105} = 2,5$ ;  $p = 0,03$ ) und die Anzahl der REM Schlafepisoden ( $F_{10,105} = 3,6$ ;  $p = 0,003$ ). Für die non-REM Schlaflatenz zeigten sich signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen an T1 ( $F_{2,21} = 39,4$ ;  $p < 0,0001$ ), T2 + T3 ( $F_{2,21} = 23,3$ ;  $p < 0,0001$ ), T4 + T5 ( $F_{2,21} = 5,5$ ;  $p = 0,02$ ) und W1 ( $F_{2,21} = 5,3$ ;  $p = 0,02$ ). Während aller Behandlungskonditionen manifestierten die Midazolam- und die Zaleplon-Gruppe gleichwertige Reduktionen in der Latenz zum non-REM Schlaf im Vergleich zur Placebo-Gruppe (siehe Abbildung 22 links, Tabelle 7). Während W1 hatten die Tiere der Zaleplon-Gruppe eine verlängerte non-REM Schlaflatenz, die im Vergleich zu Midazolam signifikant und zu Placebo tendentiell war. Während die Anzahl der non-REM Schlafepisoden nicht verändert wurde, konnten signifikante Gruppen-Unterschiede in der Dauer der non-REM Schlafepisoden an T1 beobachtet werden ( $F_{2,21} = 6,7$ ;  $p = 0,006$ ). Sowohl die Midazolam- als auch die Zaleplon-behandelten Tiere hatten am ersten Behandlungstag signifikant längere non-REM Schlafepisoden als die Ratten der Placebo-Gruppe. Für die REM Schlaflatenz ergab sich ein signifikanter Gruppen-Effekt an T2 + T3 ( $F_{2,21} = 3,5$ ;  $p = 0,05$ ), der durch eine verlängerte Latenz zum Auftreten des REM Schlafs bei den Midazolam-behandelten Ratten hervorgerufen wurde (siehe Abbildung 22 rechts, Tabelle 8). Die Anzahl der REM Schlafepisoden unterschied sich signifikant zwischen den Gruppen an T2 + T3 ( $F_{2,21} = 13,9$ ;  $p < 0,0001$ ), T4 + T5 ( $F_{2,21} = 22,9$ ;  $p < 0,0001$ ) und W1 ( $F_{2,21} = 4,3$ ;  $p = 0,03$ ). Im Vergleich zur Placebo-Gruppe hatten Tiere der Midazolam- und der Zaleplon-Gruppe weniger REM Schlafepisoden während T2 + T3 und T4 + T5 und die Zaleplon-Tiere zeigten auch weniger REM Schlafepisoden an W1. Die durchschnittliche Dauer der REM Schlafepisoden wurde durch keines der beiden Schlafmittel beeinflusst.



**Abbildung 22:** Parameter der non-REM und REM Schlafarchitektur während B1+B2, T1, T2+T3, T4+T5, W1 und W2 in den ersten 6 Stunden nach Injektion von Vehikel, 3 mg/kg Midazolam oder 4 mg/kg Zaleplon jeweils zu Beginn der Aktivitätsphase, dargestellt als Prozentsatz des jeweiligen Gruppen-Mittelwerts während B1+B2 (Mittelwerte  $\pm$  SEM,  $n = 8$ ). a  $p < 0,05$  (2-seitiger verbundener t-Test Midazolam versus Placebo), b  $p < 0,05$  (2-seitiger verbundener t-Test Zaleplon versus Placebo, c  $p < 0,05$  (2-seitiger verbundener t-Test Midazolam versus Zaleplon).

**Tabelle 7:** Variablen der non-REM Schlafarchitektur nach Injektion von Vehikel, 3 mg/kg Midazolam oder 4 mg/kg Zaleplon.

Non-REM Schlaf	Latenz (min)	Episodenanzahl	Episodendauer (min)
<b>Placebo</b>			
<b>B1 + B2</b>	30,2 ± 2,3	47,3 ± 2,3	1,85 ± 0,10
<b>T1</b>	34,2 ± 2,0	47,8 ± 4,0	1,89 ± 0,23
<b>T2 + T3</b>	33,9 ± 2,6	49,8 ± 1,9	1,79 ± 0,07
<b>T4 + T5</b>	33,9 ± 3,1	50,5 ± 2,7	1,83 ± 0,10
<b>W1</b>	34,1 ± 3,0	48,6 ± 4,6	1,70 ± 0,21
<b>W2</b>	36,4 ± 4,4	46,9 ± 4,0	1,85 ± 0,16
<b>Midazolam</b>			
<b>B1 + B2</b>	44,2 ± 3,9	55,0 ± 2,0	1,60 ± 0,07
<b>T1</b>	12,1 ± 3,3 *	53,0 ± 3,7	2,57 ± 0,35 *
<b>T2 + T3</b>	14,1 ± 2,1 *	54,3 ± 1,3	2,01 ± 0,09
<b>T4 + T5</b>	25,5 ± 4,2 *	59,2 ± 3,0	1,85 ± 0,11
<b>W1</b>	35,6 ± 4,6 #	55,8 ± 5,2	1,72 ± 0,21
<b>W2</b>	32,5 ± 2,7	55,6 ± 4,2	1,55 ± 0,14
<b>Zaleplon</b>			
<b>B1 + B2</b>	42,0 ± 4,6	53,6 ± 2,7	1,78 ± 0,07
<b>T1</b>	15,2 ± 3,6 *	49,6 ± 3,1	2,90 ± 0,28 *
<b>T2 + T3</b>	17,0 ± 3,2 *	48,8 ± 2,4	2,36 ± 0,20
<b>T4 + T5</b>	26,7 ± 5,5 *	51,4 ± 2,4	1,98 ± 0,14
<b>W1</b>	66,4 ± 10,7 #	41,9 ± 3,6	1,95 ± 0,18
<b>W2</b>	48,3 ± 9,2	47,3 ± 3,3	1,92 ± 0,12

Werte sind Mittelwerte ± SD (n = 8). \* p < 0,05 (2-seitiger verbundener t-Test über normierte Werte gegen Placebo) # p < 0,05 (2-seitiger verbundener t-Test über normierte Werte Midazolam versus Zaleplon).

**Tabelle 8:** Variablen der REM Schlafarchitektur nach Injektion von Vehikel, 3 mg/kg Midazolam oder 4 mg/kg Zaleplon.

REM Schlaf	Latenz (min)	Episodenanzahl	Episodendauer (min)
<b>Placebo</b>			
<b>B1 + B2</b>	39,9 ± 3,1	16,4 ± 1,3	1,20 ± 0,05
<b>T1</b>	43,3 ± 4,5	16,8 ± 2,4	1,06 ± 0,10
<b>T2 + T3</b>	45,3 ± 5,0	17,6 ± 1,9	1,05 ± 0,06
<b>T4 + T5</b>	51,4 ± 10,5	17,6 ± 1,2	1,09 ± 0,06
<b>W1</b>	39,1 ± 4,2	17,6 ± 4,1	1,14 ± 0,09
<b>W2</b>	62,2 ± 19,4	14,5 ± 2,0	1,13 ± 0,13
<b>Midazolam</b>			
<b>B1 + B2</b>	48,3 ± 8,7	20,8 ± 1,9	1,12 ± 0,07
<b>T1</b>	105,8 ± 28,5	17,1 ± 3,1	1,04 ± 0,15
<b>T2 + T3</b>	118,2 ± 19,3 *	12,9 ± 1,3 *	0,98 ± 0,11
<b>T4 + T5</b>	111,2 ± 18,7	14,6 ± 1,3 * #	1,08 ± 0,10
<b>W1</b>	58,6 ± 15,4	19,9 ± 2,6	1,09 ± 0,07
<b>W2</b>	43,8 ± 9,1	16,3 ± 2,6	1,01 ± 0,09
<b>Zaleplon</b>			
<b>B1 + B2</b>	59,2 ± 10,2	23,3 ± 2,5	1,01 ± 0,03
<b>T1</b>	129,7 ± 31,3	13,9 ± 1,9	0,83 ± 0,10
<b>T2 + T3</b>	91,3 ± 16,7	11,0 ± 1,1 *	0,96 ± 0,06
<b>T4 + T5</b>	110,9 ± 13,8	10,3 ± 1,1 * #	1,03 ± 0,05
<b>W1</b>	118,7 ± 28,2	14,0 ± 2,3 *	1,16 ± 0,06
<b>W2</b>	82,0 ± 19,7	17,5 ± 2,2	1,04 ± 0,07

Werte sind Mittelwerte ± SD (n = 8). \* p < 0,05 (2-seitiger verbundener t-Test über normierte Werte gegen Placebo) # p < 0,05 (2-seitiger verbundener t-Test über normierte Werte Midazolam versus Zaleplon).

### 3.2.3 EEG Leistungsdichte während des non-REM Schlafs

Die Analyse der EEG Leistungsdichte während des non-REM Schlafs ergab signifikante Interaktionseffekte zwischen Gruppe und Kondition für alle Frequenzbänder kleiner als 10 Hz, zwischen 12 und 17 Hz, sowie für Frequenzen größer als 21 Hz. Die signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen waren auf die Behandlungstage begrenzt. Im Vergleich zur Placebo-Gruppe hatten Midazolam-behandelte Ratten eine geringere Leistungsdichte im non-REM Schlaf-EEG im Bereich der höheren Delta-, sowie der Theta-Frequenzen während aller Behandlungstage und eine höhere Leistungsdichte im hohen Sigma-Frequenzbereich an T2 + T3 und T4 + T5 (siehe Abbildung 23). Im Gegensatz dazu zeigte die Zaleplon-Gruppe eine höhere EEG-Aktivität in den Delta-Frequenzen und geringere Aktivität im Theta-

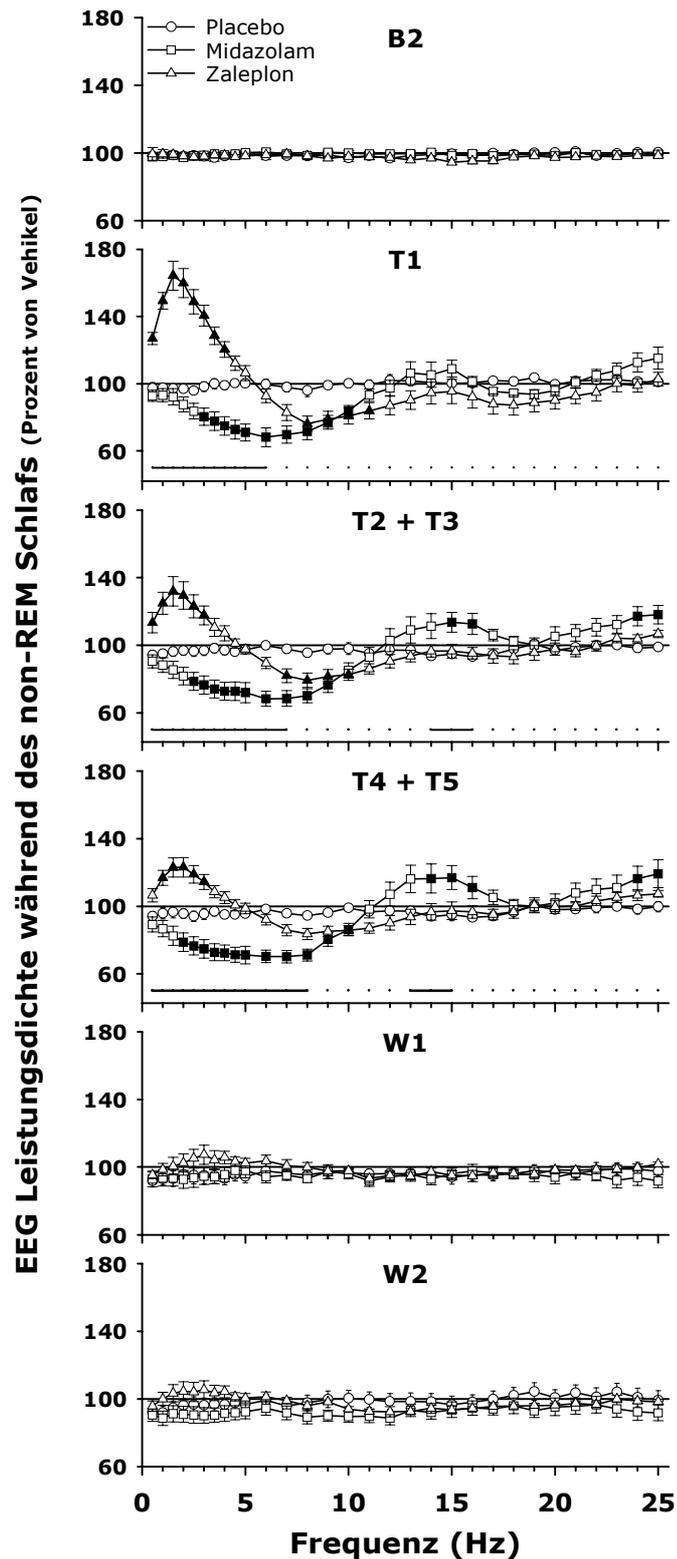
Frequenzbereich während aller Konditionen, am deutlichsten jedoch während T1 (siehe Abbildung 23).

### **3.2.4 EEG Leistungsdichte während des REM Schlafs**

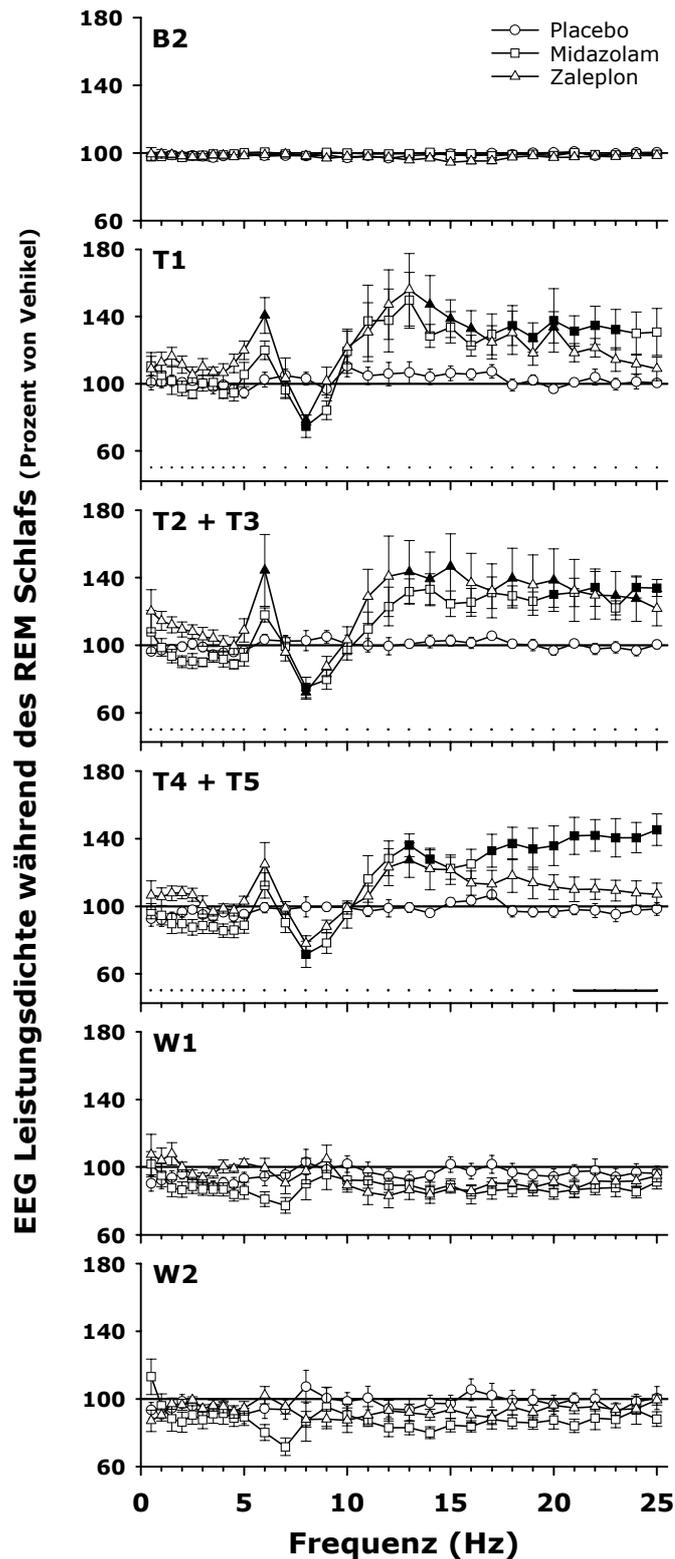
Für die EEG-Leistungsdichte während des REM Schlafs ergab die ANOVA signifikante Interaktionseffekte zwischen Gruppe und Kondition für 6 und 8 Hz, sowie für alle Frequenzbänder größer als 12 Hz. Während Baseline und den beiden Absetz-Konditionen unterschied sich die Leistungsdichte nicht zwischen den Gruppen (siehe Abbildung 24). Verglichen mit der Placebo-Gruppe hatten die Ratten der Midazolam-Gruppe im REM Schlaf-EEG eine geringere Leistungsdichte bei 8 Hz und eine höhere EEG-Aktivität bei 6 Hz (siehe Abbildung 24). Auch in den Frequenzen oberhalb von 12 Hz erhöhte Midazolam die Leistungsdichte an allen Behandlungstagen. Zaleplon bewirkte ähnliche Veränderungen, mit der Ausnahme, daß die Steigerung der hochfrequenten EEG-Aktivität an T4 + T5 größtenteils verschwunden war (siehe Abbildung 24).

### **3.2.5 EEG Leistungsdichte während des Wachzustands**

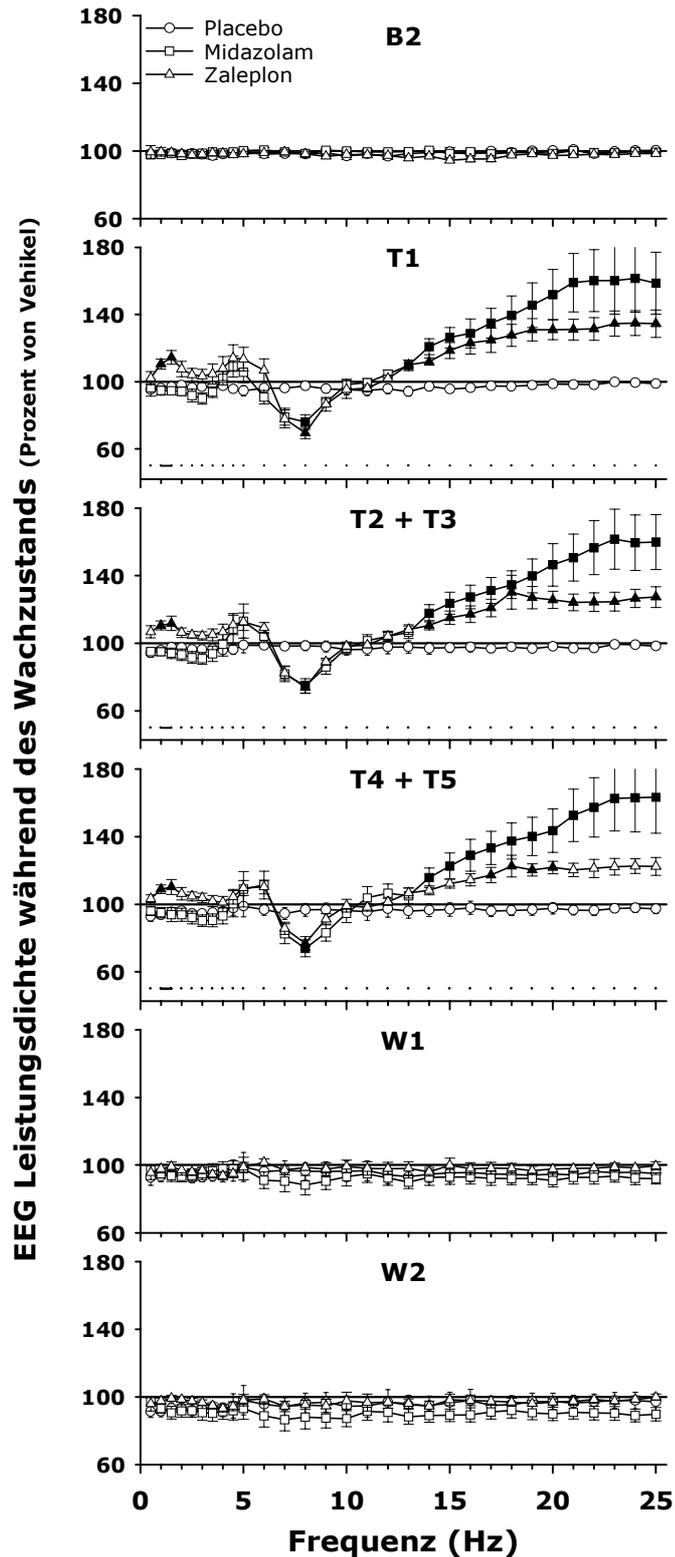
Die Analyse der EEG-Leistungsdichte während des Wachzustands dokumentierte signifikante Interaktionseffekte zwischen Gruppe und Kondition für 1,0, 1,5 und 8 Hz, sowie für alle Frequenzbänder größer als 13 Hz. Signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen traten nur in den Behandlungskonditionen auf. An allen Behandlungstagen zeigten die Zaleplon-behandelten Tiere höhere EEG-Aktivität im Frequenzbereich von 1,0 – 1,5 Hz als die Tiere der Placebo- und Midazolam-Gruppe (siehe Abbildung 25). Sowohl die Ratten der Midazolam-Gruppe als auch die Tiere der Zaleplon-Gruppe zeigten im Wachzustand eine geringere EEG-Leistungsdichte bei 8 Hz und eine höhere EEG-Aktivität in den hohen Frequenzbereichen im Vergleich zu Placebo (siehe Abbildung 25).



**Abbildung 23:** EEG-Leistungsdichte während des non-REM Schlafs während B2, T1, T2+T3, T4+T5, W1 und W2 in den ersten 6 Stunden nach Injektion von Vehikel, 3 mg/kg Midazolam oder 4 mg/kg Zaleplon jeweils zu Beginn der Aktivitätsphase, dargestellt als Prozentsatz des jeweiligen Gruppen-Mittelwerts während B1+B2 (Mittelwerte  $\pm$  SEM,  $n = 8$ ). Gefüllte Symbole bezeichnen signifikante Unterschiede zu Placebo, Linien durch die Punkte bezeichnen signifikante Unterschiede zwischen Midazolam und Zaleplon ( $p < 0,05$ , Tukey-Tests).



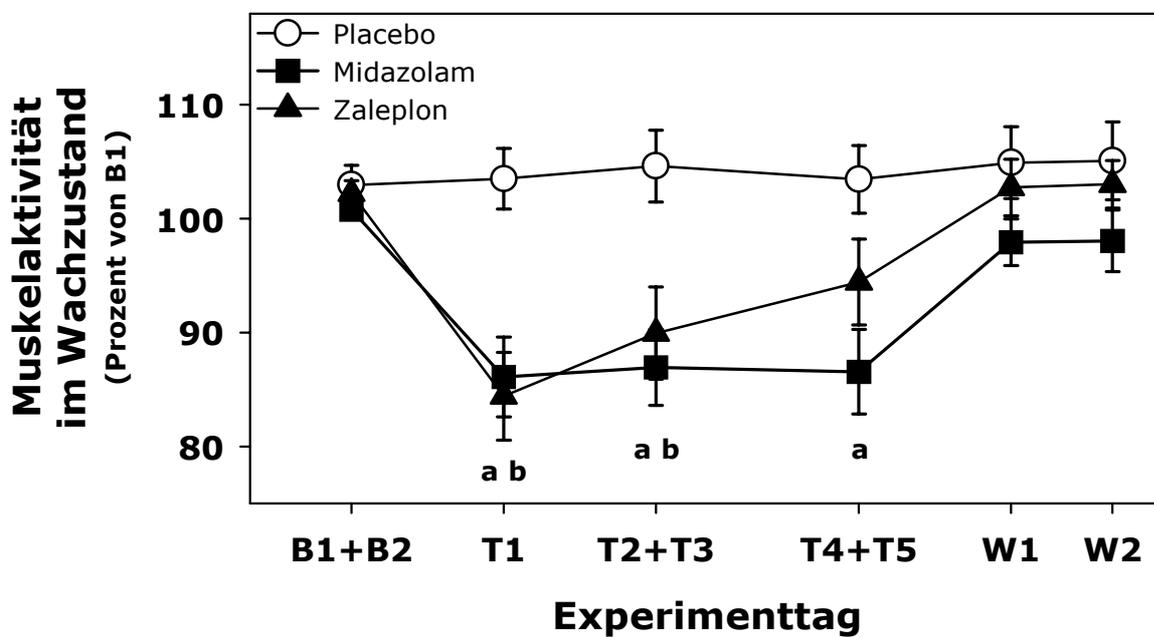
**Abbildung 24:** EEG-Leistungsdichte während des REM Schlafs während B2, T1, T2+T3, T4+T5, W1 und W2 in den ersten 6 Stunden nach Injektion von Vehikel, 3 mg/kg Midazolam oder 4 mg/kg Zaleplon jeweils zu Beginn der Aktivitätsphase, dargestellt als Prozentsatz des jeweiligen Gruppen-Mittelwerts während B1+B2 (Mittelwerte  $\pm$  SEM,  $n = 8$ ). Gefüllte Symbole bezeichnen signifikante Unterschiede zu Placebo, Linien durch die Punkte bezeichnen signifikante Unterschiede zwischen Midazolam und Zaleplon ( $p < 0,05$ , Tukey-Tests).



**Abbildung 25:** EEG-Leistungsdichte während des Wachzustands während B2, T1, T2+T3, T4+T5, W1 und W2 in den ersten 6 Stunden nach Injektion von Vehikel, 3 mg/kg Midazolam oder 4 mg/kg Zaleplon jeweils zu Beginn der Aktivitätsphase, dargestellt als Prozentsatz des jeweiligen Gruppen-Mittelwerts während B1+B2 (Mittelwerte  $\pm$  SEM, n = 8). Gefüllte Symbole bezeichnen signifikante Unterschiede zu Placebo, Linien durch die Punkte bezeichnen signifikante Unterschiede zwischen Midazolam und Zaleplon ( $p < 0,05$ , Tukey-Tests).

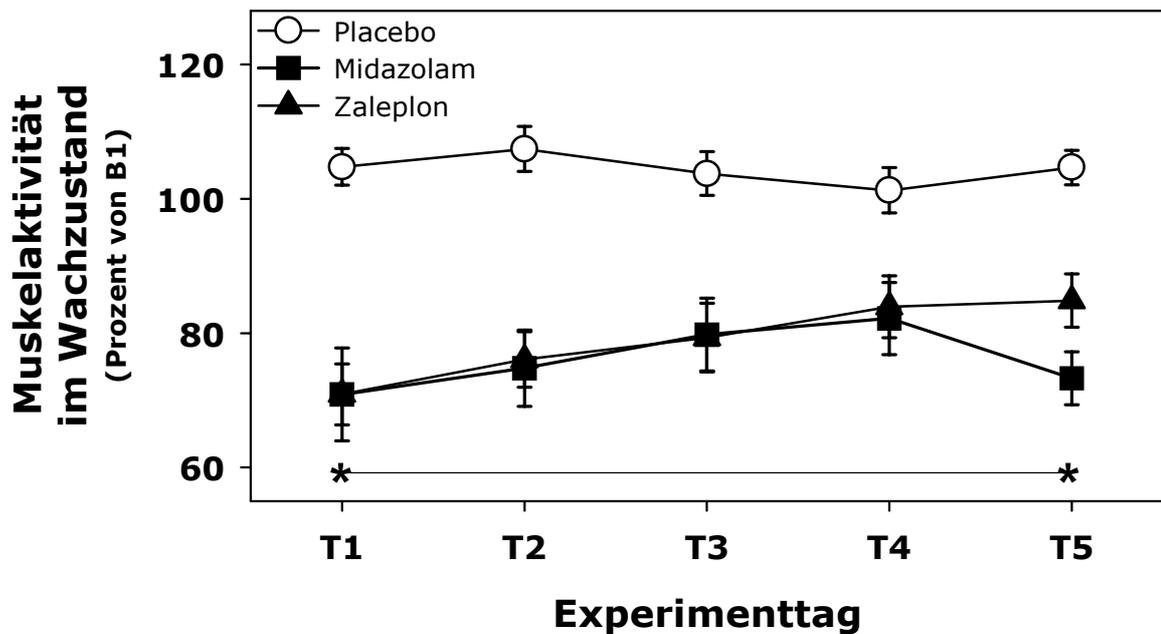
### 3.2.6 Muskelaktivität während des Wachzustands

Die Varianzanalyse über das EMG während des Wachzustands innerhalb der ersten 6 Stunden nach Injektion von Vehikel, Midazolam oder Zaleplon ergab signifikante Effekte von Gruppe ( $F_{2,20} = 5,8$ ;  $p = 0,01$ ), Behandlung ( $F_{5,100} = 22,6$ ;  $p < 0,0001$ ) und der Interaktion zwischen Gruppe und Behandlung ( $F_{10,100} = 6,2$ ;  $p < 0,0001$ ). Ratten der Midazolam-Gruppe wiesen an allen Behandlungstagen im Wachzustand signifikant niedrigere Muskelaktivität auf als Tiere der Placebo-Gruppe (siehe Abbildung 26). In der Zaleplon-Gruppe war die Muskelaktivität an T1 und T2 + T3 signifikant geringer als bei der Placebo-Gruppe und mit der Midazolam-Gruppe vergleichbar, während an T4 + T5 kein signifikanter Unterschied zur Placebo- oder Midazolam-Gruppe meßbar war (siehe Abbildung 26).



**Abbildung 26:** Muskelaktivität im Wachzustand während der ersten 6 Stunden nach Injektion von Vehikel ( $n = 8$ ), 3 mg/kg Midazolam ( $n = 8$ ) oder 4 mg/kg Zaleplon ( $n = 7$ ) an B1+B2, T1, T2+T3, T4+T5, W1 und W2, dargestellt als Prozentsatz von B1 (Mittelwerte  $\pm$  SEM). a  $p < 0,05$  (2-seitiger verbundener t-Test Placebo versus Midazolam). b  $p < 0,05$  (2-seitiger verbundener t-Test Placebo versus Zaleplon).

Die separate Analyse der ersten zwei Stunden der einzelnen Behandlungstage ergab signifikante Effekte der Gruppe ( $F_{2,20} = 13,7$ ;  $p = 0,0002$ ), jedoch keine Effekte des Behandlungstags oder Interaktionen zwischen Gruppe und Behandlungstag. Sowohl Midazolam als auch Zaleplon bewirkte in den ersten zwei Stunden aller fünf Behandlungstage ähnlich starke Reduktionen in der Muskelaktivität im Wachzustand (siehe Abbildung 27).



**Abbildung 27:** Muskelaktivität im Wachzustand in den ersten 2 Stunden während T1, T2, T3, T4 und T5 nach Injektion von Vehikel ( $n = 8$ ), 3 mg/kg Midazolam ( $n = 8$ ) oder 4 mg/kg Zaleplon ( $n = 7$ ), dargestellt als Prozentsatz der ersten 2 Stunden von B1 (Mittelwerte  $\pm$  SEM). \*\*  $p < 0,05$  (ANOVA, Gruppeneffekt)

### 3.3 Gaboxadol subchronisch

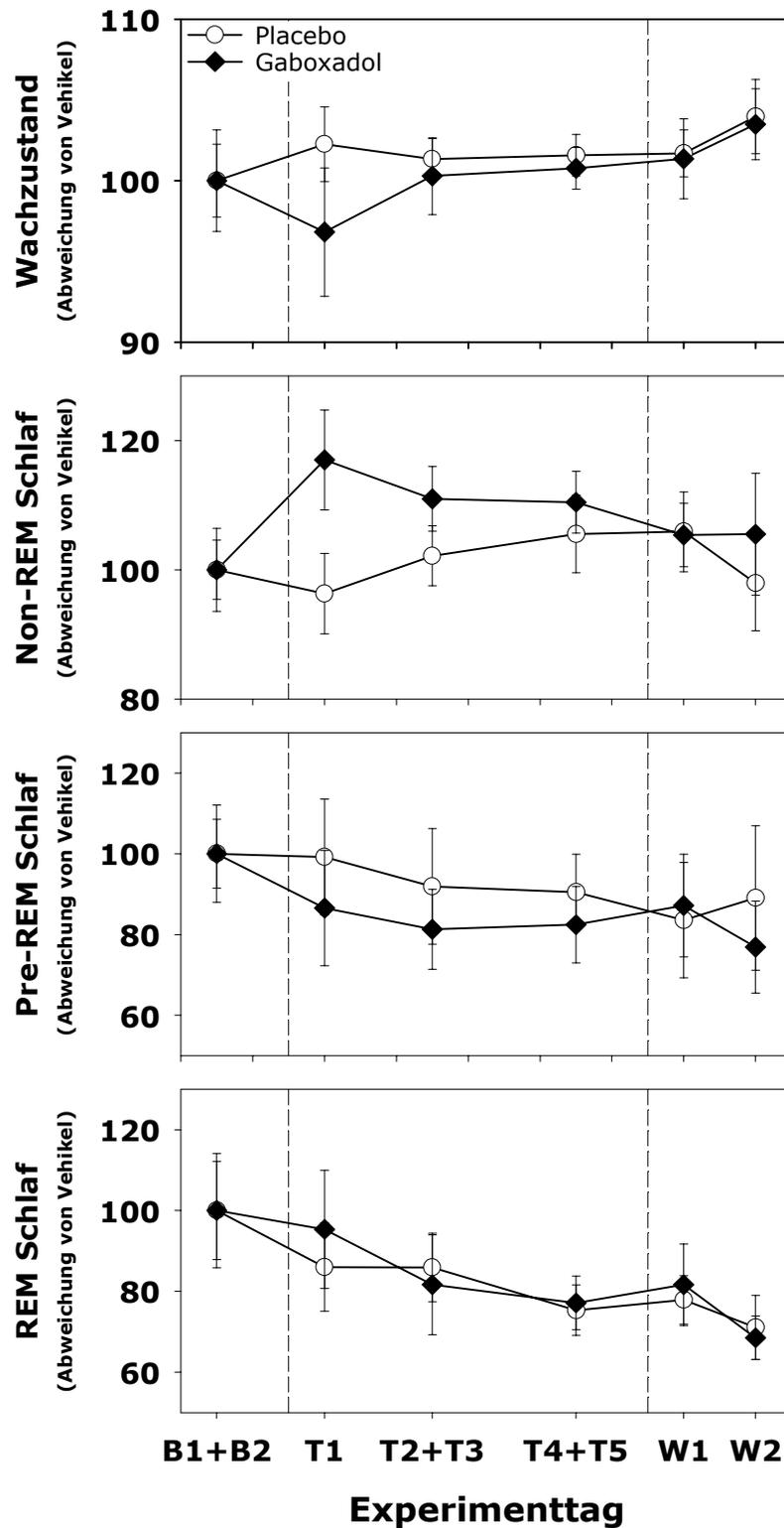
#### 3.3.1 Vigilanzstadien

Die Varianzanalyse über die normierten Werte der einzelnen Vigilanzstadien in den ersten 6 Stunden nach Injektion von Vehikel oder Gaboxadol ergab keine signifikanten Gruppen- oder Interaktionseffekte (unnormierte Werte siehe Tabelle 9). Lediglich für den REM Schlaf wurde ein signifikanter Einfluß der Kondition gefunden ( $F_{5,75} = 4,37$ ;  $p = 0,01$ ), der eine schwache gruppenunabhängige Abnahme im REM Schlaf Anteil im Verlauf des Experiments widerspiegelt (siehe Abbildung 28). Die separate Analyse der ersten 2 Stunden nach Injektion ergab keine signifikanten Gruppen-, Konditions- oder Interaktionseffekte.

**Tabelle 9:** Prozentualer Anteil der Vigilanzstadien in den ersten 6 Stunden nach Injektion von Vehikel oder 4 mg/kg Gaboxadol zu Beginn der Aktivitätsphase.

	Wachzustand	Non-REM Schlaf	Pre-REM Schlaf	REM Schlaf
<b>Placebo</b>				
<b>B1 + B2</b>	71,2 ± 5,0	17,4 ± 2,5	4,8 ± 1,5	6,6 ± 2,8
<b>T1</b>	72,8 ± 4,7	16,7 ± 3,1	4,8 ± 1,9	5,7 ± 2,1
<b>T2 + T3</b>	72,2 ± 3,2	17,7 ± 2,3	4,4 ± 2,1	5,7 ± 1,8
<b>T4 + T5</b>	72,4 ± 3,5	18,3 ± 3,0	4,3 ± 1,6	5,0 ± 1,4
<b>W1</b>	72,4 ± 2,9	18,4 ± 3,0	4,0 ± 1,9	5,2 ± 1,1
<b>W2</b>	74,1 ± 4,6	17,0 ± 3,6	4,3 ± 2,4	4,7 ± 1,5
<b>Gaboxadol</b>				
<b>B1 + B2</b>	68,8 ± 7,5	18,9 ± 4,3	5,3 ± 2,0	7,0 ± 2,9
<b>T1</b>	66,6 ± 8,2	22,2 ± 4,4	4,6 ± 2,3	6,6 ± 3,1
<b>T2 + T3</b>	69,0 ± 5,4	21,0 ± 3,2	4,3 ± 1,7	5,7 ± 2,7
<b>T4 + T5</b>	69,3 ± 3,4	20,9 ± 3,1	4,4 ± 1,6	5,4 ± 1,6
<b>W1</b>	69,7 ± 5,1	20,0 ± 2,8	4,6 ± 2,0	5,7 ± 2,1
<b>W2</b>	71,2 ± 4,5	20,0 ± 5,4	4,1 ± 1,8	4,8 ± 1,1

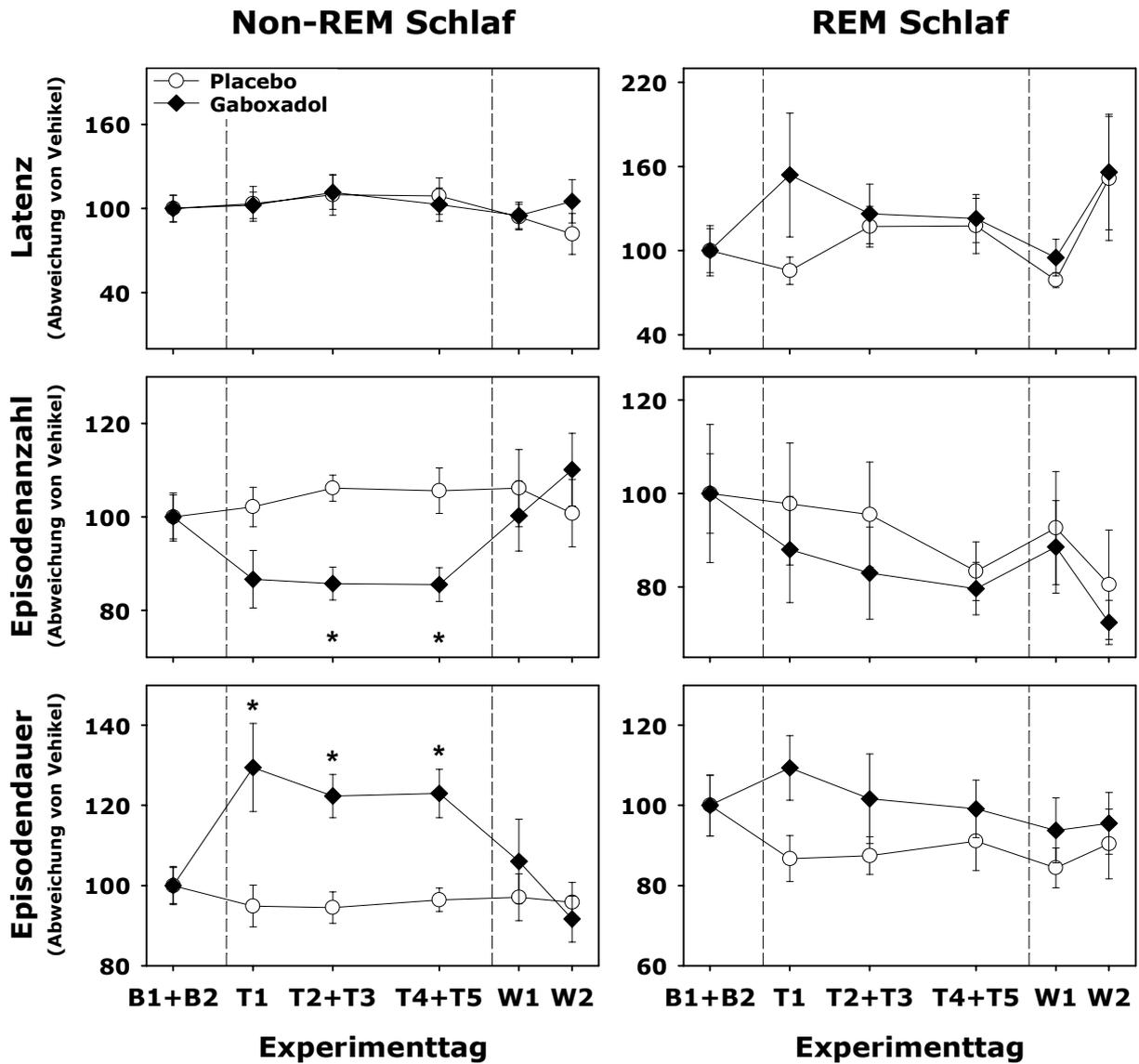
Werte sind Mittelwerte ± Standardabweichung (Placebo: n = 8, Gaboxadol: n = 9).



**Abbildung 28:** Anteil der einzelnen Vigilanzstadien während B1+B2, T1, T2+T3, T4+T5, W1 und W2 in den ersten 6 Stunden nach Injektion von Vehikel (n = 8) oder 4 mg/kg Gaboxadol (n = 9) jeweils zu Beginn der Aktivitätsphase, dargestellt als Prozentsatz des jeweiligen Gruppen-Mittelwerts während B1+B2 (Mittelwerte  $\pm$  SEM).

### 3.3.2 Schlafarchitektur

Die Analyse der non-REM Schlaflatenz ergab keine signifikanten Effekte. Für die Anzahl an non-REM Schlafepisoden zeigte die ANOVA eine signifikante Interaktion zwischen den Faktoren Gruppe und Kondition ( $F_{5,75} = 4,14$ ;  $p = 0,005$ ). Post hoc-Tests ergaben, daß die Ratten der Gaboxadol-Gruppe an den Baseline- und Absetztage eine ähnliche Anzahl an non-REM Schlafepisoden hatten wie die Tiere der Placebo-Gruppe, aber tendenziell weniger an T1 ( $p = 0,06$ ) und signifikant weniger an den anderen Behandlungstagen (siehe Abbildung 29 und Tabelle 10). Für die Länge der non-REM Schlafepisoden ergab die ANOVA einen signifikanten Effekt der Gruppe ( $F_{1,15} = 4,71$ ;  $p = 0,046$ ) und der Kondition ( $F_{5,75} = 4,78$ ;  $p = 0,005$ ) und auch eine signifikante Interaktion zwischen Gruppe und Kondition ( $F_{5,75} = 6,37$ ;  $p = 0,0008$ ). Im Vergleich zur Placebo-Gruppe hatten die Tiere der Gaboxadol-Gruppe während der Behandlungstage signifikant längere non-REM Schlafepisoden (siehe Abbildung 29 und Tabelle 10). Die Analyse der non-REM Schlafepisodenanzahl und -dauer nur über die einzelnen fünf Behandlungstage ergab signifikante Gruppeneffekte (Anzahl:  $F_{1,15} = 20,1$ ;  $p = 0,0004$ , Dauer:  $F_{1,15} = 16,9$ ;  $p = 0,0009$ ), jedoch keine signifikanten Effekte des Behandlungstages und auch keine Interaktionseffekte zwischen Gruppe und Behandlungstag. Die Analyse der REM Schlaflatenz und Schlafepisodendauer ergab keine signifikanten Effekte, aber für die Anzahl der REM Schlafepisoden trat ein signifikanter Konditionseffekt hervor ( $F_{5,75} = 3,07$ ;  $p = 0,03$ ). Unabhängig von der Gruppe nahm die Anzahl der REM Schlafepisoden im Verlauf des Experiments ab (siehe Abbildung 29 und Tabelle 11).



**Abbildung 29:** Parameter der non-REM und REM Schlafarchitektur während B1+B2, T1, T2+T3, T4+T5, W1 und W2 in den ersten 6 Stunden nach Injektion von Vehikel (n = 8) oder 4 mg/kg Gaboxadol (n = 9) jeweils zu Beginn der Aktivitätsphase, dargestellt als Prozentsatz des jeweiligen Gruppen-Mittelwerts während B1+B2 (Mittelwerte ± SEM).

**Tabelle 10:** Variablen der non-REM Schlafarchitektur nach Injektion von Vehikel oder 4 mg/kg Gaboxadol jeweils zu Beginn der Aktivitätsphase.

Non-REM Schlaf	Latenz (min)	Episodenanzahl	Episodendauer (min)
<b>Placebo</b>			
<b>B1 + B2</b>	36,1 ± 14,3	46,8 ± 6,8	1,80 ± 0,29
<b>T1</b>	37,3 ± 12,6	47,8 ± 5,5	1,70 ± 0,26
<b>T2 + T3</b>	39,6 ± 15,0	49,6 ± 7,9	1,69 ± 0,27
<b>T4 + T5</b>	39,3 ± 16,2	49,4 ± 7,6	1,73 ± 0,20
<b>W1</b>	33,9 ± 9,4	49,6 ± 10,9	1,74 ± 0,30
<b>W2</b>	29,6 ± 14,9	47,1 ± 9,5	1,71 ± 0,25
<b>Gaboxadol</b>			
<b>B1 + B2</b>	29,5 ± 9,5	48,3 ± 7,9	1,89 ± 0,33
<b>T1</b>	30,2 ± 8,3	41,9 ± 8,9	2,44 ± 0,62 *
<b>T2 + T3</b>	32,9 ± 12,1	41,4 ± 6,0 *	2,31 ± 0,38 *
<b>T4 + T5</b>	30,4 ± 14,2	41,3 ± 5,9 *	2,32 ± 0,36 *
<b>W1</b>	28,1 ± 8,3	48,4 ± 10,9	2,00 ± 0,60
<b>W2</b>	31,0 ± 13,6	53,2 ± 11,3	1,73 ± 0,33

Werte sind Mittelwerte ± SD (Placebo: n = 8, Gaboxadol: n = 9). \* p < 0,05 (2-seitiger verbundener t-Test über normierte Werte).

**Tabelle 11:** Variablen der REM Schlafarchitektur nach Injektion von Vehikel oder 4 mg/kg Gaboxadol jeweils zu Beginn der Aktivitätsphase.

REM Schlaf	Latenz (min)	Episodenanzahl	Episodendauer (min)
<b>Placebo</b>			
<b>B1 + B2</b>	54,6 ± 33,2	19,6 ± 8,4	1,25 ± 0,27
<b>T1</b>	46,8 ± 15,0	19,1 ± 7,2	1,09 ± 0,20
<b>T2 + T3</b>	64,0 ± 28,0	18,7 ± 6,6	1,10 ± 0,23
<b>T4 + T5</b>	64,2 ± 49,1	16,3 ± 5,1	1,14 ± 0,30
<b>W1</b>	43,1 ± 8,1	18,1 ± 6,7	1,06 ± 0,18
<b>W2</b>	82,8 ± 68,3	15,8 ± 6,5	1,13 ± 0,31
<b>Gaboxadol</b>			
<b>B1 + B2</b>	37,5 ± 26,0	19,9 ± 7,2	1,27 ± 0,29
<b>T1</b>	57,7 ± 49,6	17,6 ± 6,8	1,36 ± 0,30
<b>T2 + T3</b>	47,3 ± 30,3	16,6 ± 6,1	1,27 ± 0,42
<b>T4 + T5</b>	46,1 ± 28,7	15,9 ± 3,7	1,24 ± 0,29
<b>W1</b>	35,6 ± 14,7	17,7 ± 5,9	1,17 ± 0,30
<b>W2</b>	58,5 ± 46,4	14,4 ± 2,8	1,19 ± 0,29

Werte sind Mittelwerte ± SD (Placebo: n = 8, Gaboxadol: n = 9).

### 3.3.3 EEG Leistungsdichte während des non-REM Schlafs

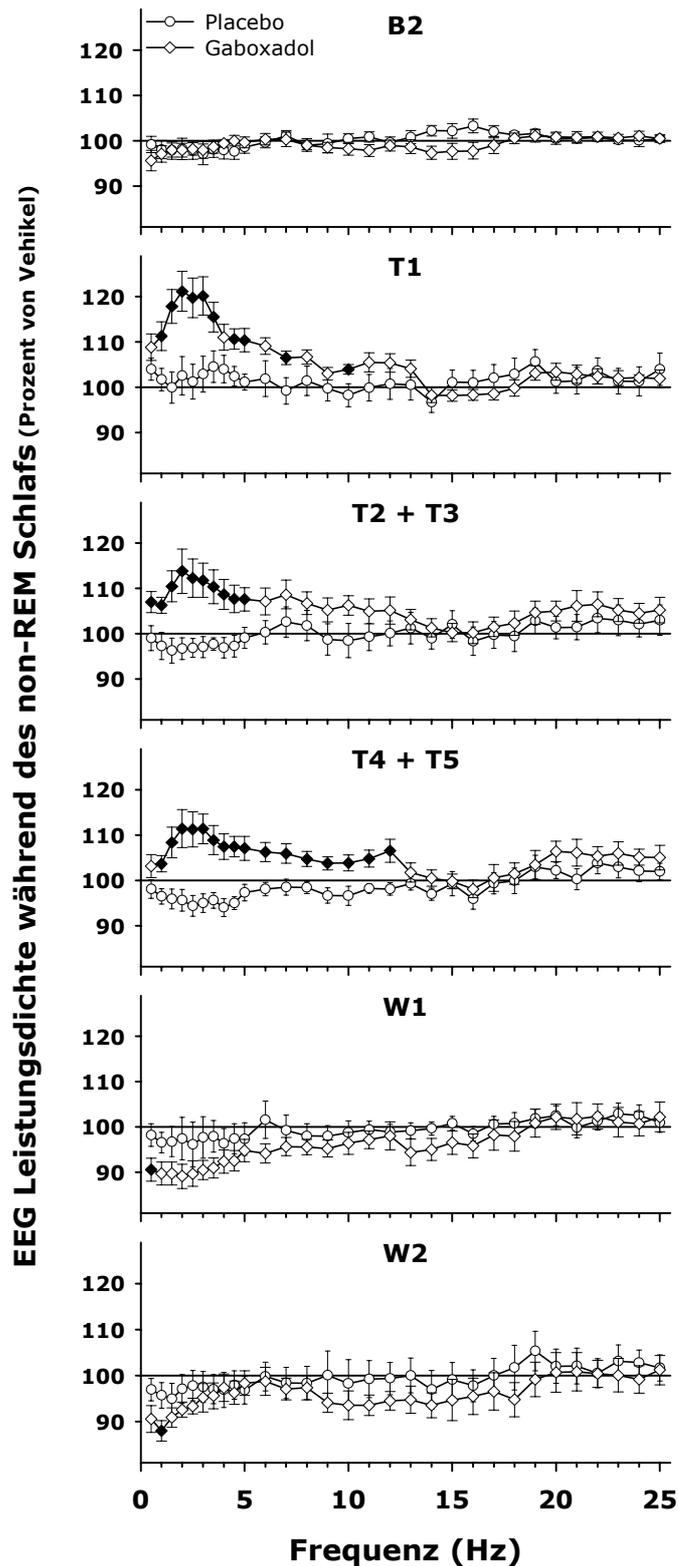
Die Analyse der EEG Leistungsdichte während des non-REM Schlafs ergab einen signifikanten Einfluß der Gruppe für die Frequenzen zwischen 1,5 und 5 Hz, der Kondition für Frequenzen  $\leq 8$  Hz und von 11 bis 12 Hz, sowie einen Interaktionseffekt zwischen Gruppe und Kondition für Frequenzen zwischen 0,5 und 7 Hz und zwischen 9 und 12 Hz. An allen Behandlungstagen hatten Ratten der Gaboxadol-Gruppe höhere Leistungsdichten in den Frequenzen  $\leq 5$  Hz, an manchen Behandlungstagen zusätzlich auch in den Frequenzen bis 11 Hz (siehe Abbildung 30). Diese Effekte wurden hauptsächlich durch große Unterschiede während des ersten 2-Stunden-Intervalls bewirkt. Mit Ausnahme der Leistungsdichte im 1-Hz-Frequenzband während W2 wurden an den Absetztagen keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen gefunden. Eine separate Varianzanalyse über die non-REM Schlaf EEG Leistungsdichte nur während der 5 Behandlungstage ergab einen signifikanten Einfluß der Gruppe für Frequenzen  $< 17$  Hz und der Kondition für Frequenzen  $< 5$  Hz, während die Interaktion zwischen Gruppe und Kondition für keines der Frequenzbänder signifikant war.

### 3.3.4 EEG Leistungsdichte während des REM Schlafs

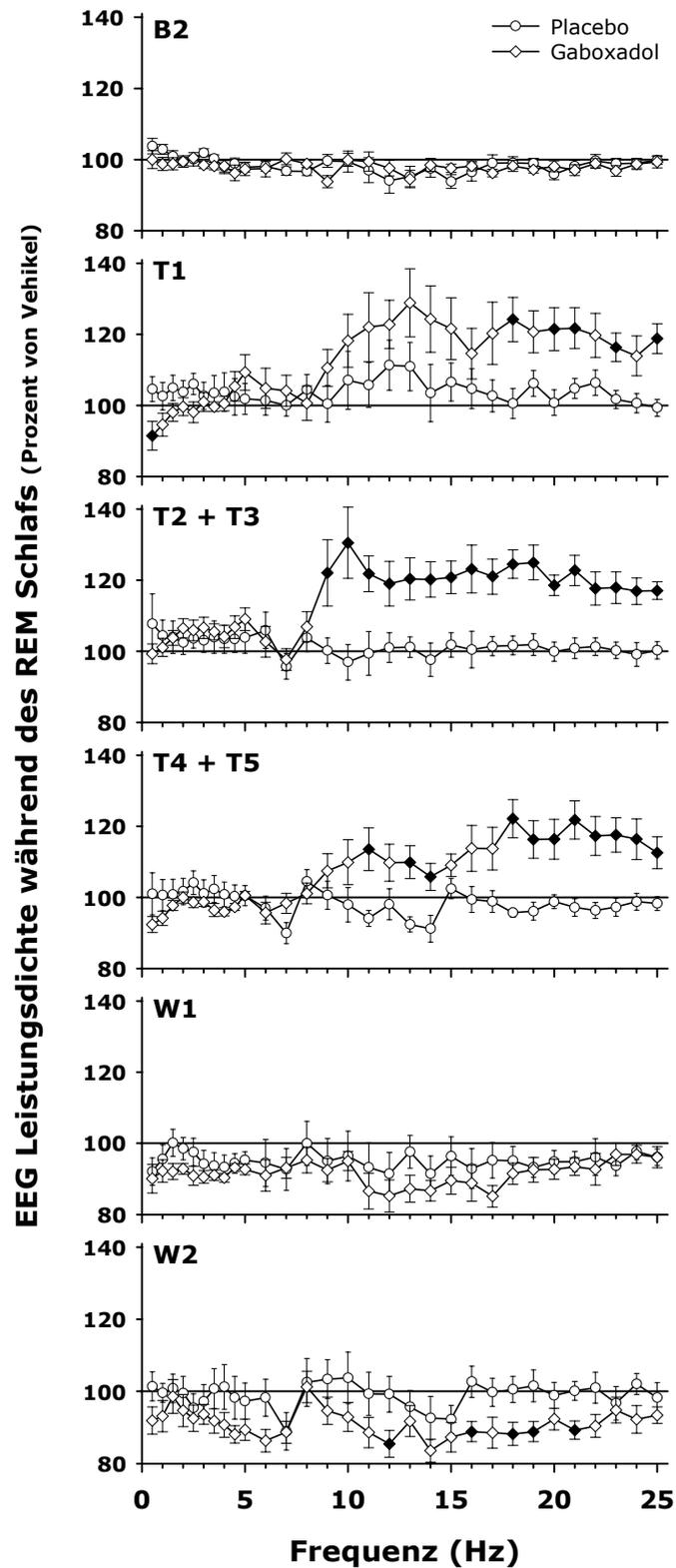
Die Analyse der EEG Leistungsdichte während des REM Schlafs ergab einen signifikanten Einfluß der Gruppe für die Frequenzen  $\geq 18$  Hz, einen Effekt der Kondition für alle Frequenzen außer 1,5 und 8 Hz, sowie einen Interaktionseffekt zwischen Gruppe und Kondition für die Frequenzen  $\geq 9$  Hz. Im Vergleich zu Tieren der Placebo-Gruppe hatten Tiere der Gaboxadol-Gruppe an den Behandlungstagen eine erhöhte Leistungsdichte im REM Schlaf-EEG in den Frequenzen  $\geq 10$  Hz (siehe Abbildung 31).

### 3.3.5 EEG Leistungsdichte während des Wachzustands

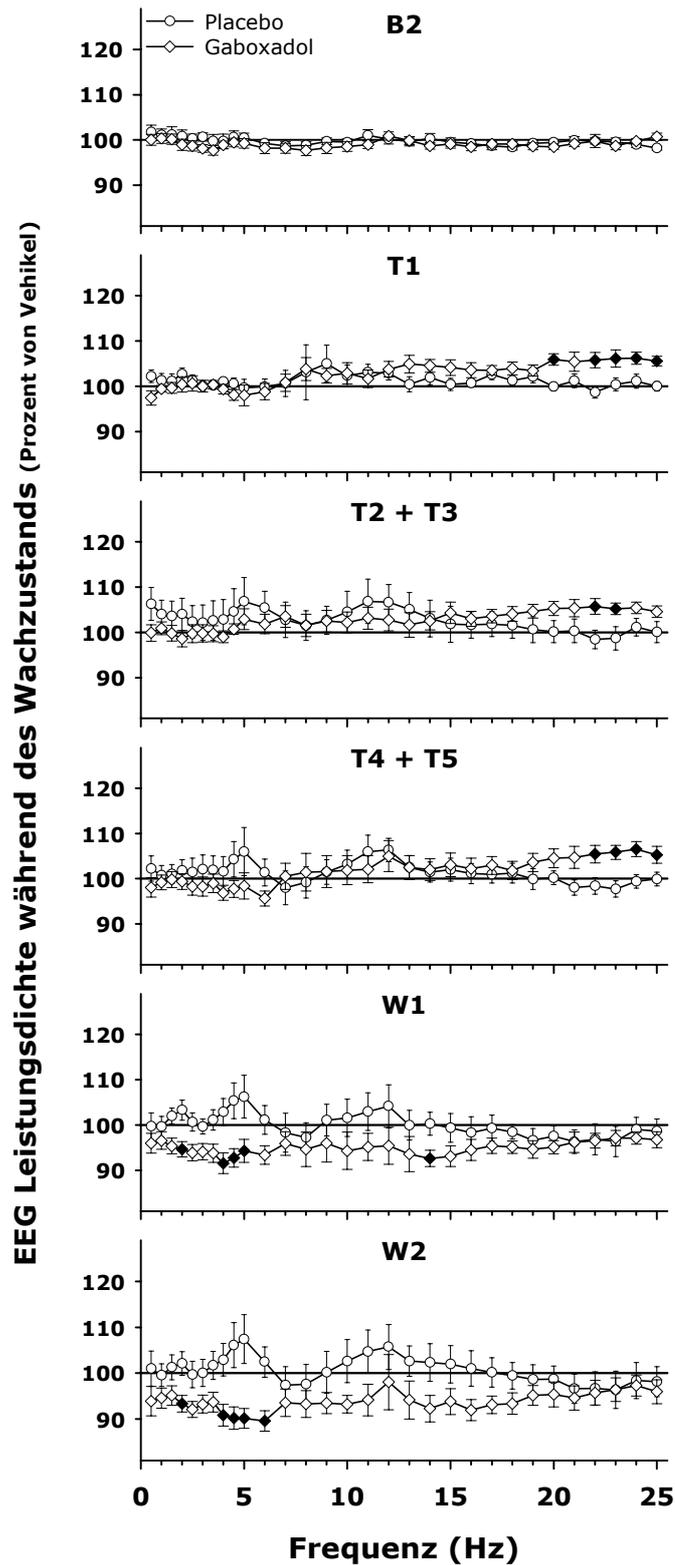
Die Analyse der EEG Leistungsdichte während des Wachzustands ergab einen signifikanten Einfluß der Gruppe für die Frequenzen von 2 Hz und von 4 bis 6 Hz und einen Effekt der Kondition für die Frequenzbänder von 1 Hz, von 2 bis 3 Hz, von 6 bis 7 Hz, sowie für alle Frequenzen  $\geq 13$  Hz. Signifikante Interaktionseffekte zwischen Gruppe und Kondition errechneten sich für die Frequenzbänder von 2 Hz, von 4 bis 6 Hz und für Frequenzen  $\geq 13$  Hz. Für die EEG-Leistungsdichte im Wachzustand konnte kein eindeutiger Effekt von Gaboxadol festgestellt werden, lediglich in einzelnen Frequenzbändern  $\geq 20$  Hz zeigte sich an den Behandlungstagen eine leichte Erhöhung der Leistungsdichte (siehe Abbildung 32).



**Abbildung 30:** EEG-Leistungsdichte während des non-REM Schlafs während B2, T1, T2+T3, T4+T5, W1 und W2 in den ersten 6 Stunden nach Injektion von Vehikel (n = 8) oder 4 mg/kg Gaboxadol (n = 9) jeweils zu Beginn der Aktivitätsphase, dargestellt als Prozentsatz des jeweiligen Gruppen-Mittelwerts während B1+B2 (Mittelwerte  $\pm$  SEM). Gefüllte Symbole bezeichnen signifikante Unterschiede zu Placebo ( $p < 0,05$ , 2-seitiger verbundener t-Test).



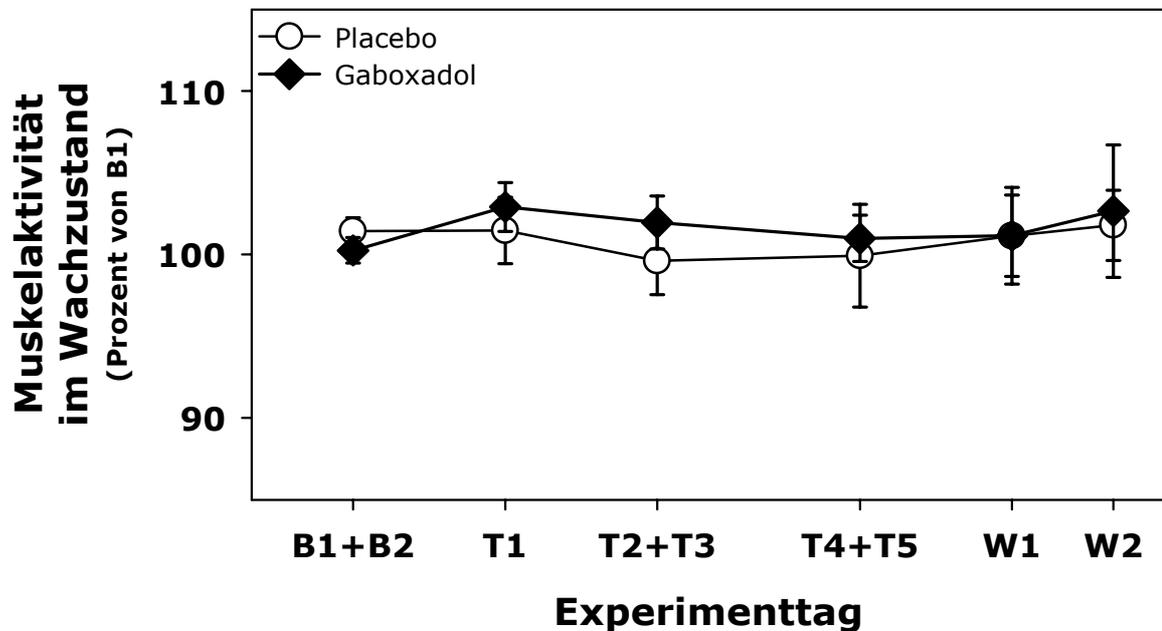
**Abbildung 31:** EEG-Leistungsdichte während des REM Schlafs während B2, T1, T2+T3, T4+T5, W1 und W2 in den ersten 6 Stunden nach Injektion von Vehikel (n = 8) oder 4 mg/kg Gaboxadol (n = 9) jeweils zu Beginn der Aktivitätsphase, dargestellt als Prozentsatz des jeweiligen Gruppen-Mittelwerts während B1+B2 (Mittelwerte  $\pm$  SEM). Gefüllte Symbole bezeichnen signifikante Unterschiede zu Placebo ( $p < 0,05$ , 2-seitiger verbundener t-Test).



**Abbildung 32:** EEG-Leistungsdichte während des Wachzustands während B2, T1, T2+T3, T4+T5, W1 und W2 in den ersten 6 Stunden nach Injektion von Vehikel (n = 8) oder 4 mg/kg Gaboxadol (n = 9) jeweils zu Beginn der Aktivitätsphase, dargestellt als Prozentsatz des jeweiligen Gruppen-Mittelwerts während B1+B2 (Mittelwerte  $\pm$  SEM). Gefüllte Symbole bezeichnen signifikante Unterschiede zu Placebo ( $p < 0,05$ , 2-seitiger verbundener t-Test).

### 3.3.6 Muskelaktivität während des Wachzustands

Die Varianzanalyse über das EMG während des Wachzustands innerhalb der ersten 6 Stunden nach Injektion von Vehikel oder Gaboxadol ergab keine signifikanten Gruppen-, Behandlungs- oder Interaktionseffekte (siehe Abbildung 33).



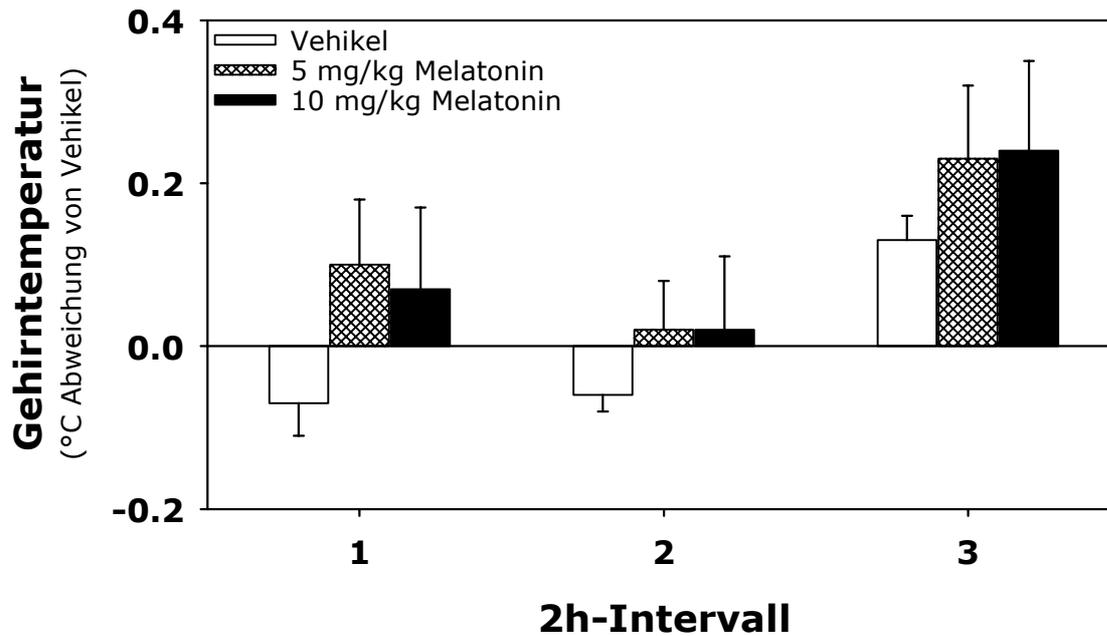
**Abbildung 33:** Muskelaktivität im Wachzustand während B1+B2, T1, T2+T3, T4+T5, W1 und W2 in den ersten 6 Stunden nach Injektion von Vehikel (n = 8) oder 4 mg/kg Gaboxadol (n = 9) jeweils zu Beginn der Aktivitätsphase, dargestellt als Prozentsatz des ersten Vehikel-Tages (Mittelwerte  $\pm$  SEM).

## 3.4 Melatonin und Picrotoxin

### 3.4.1 Melatonin

#### 3.4.1.1 Gehirntemperatur

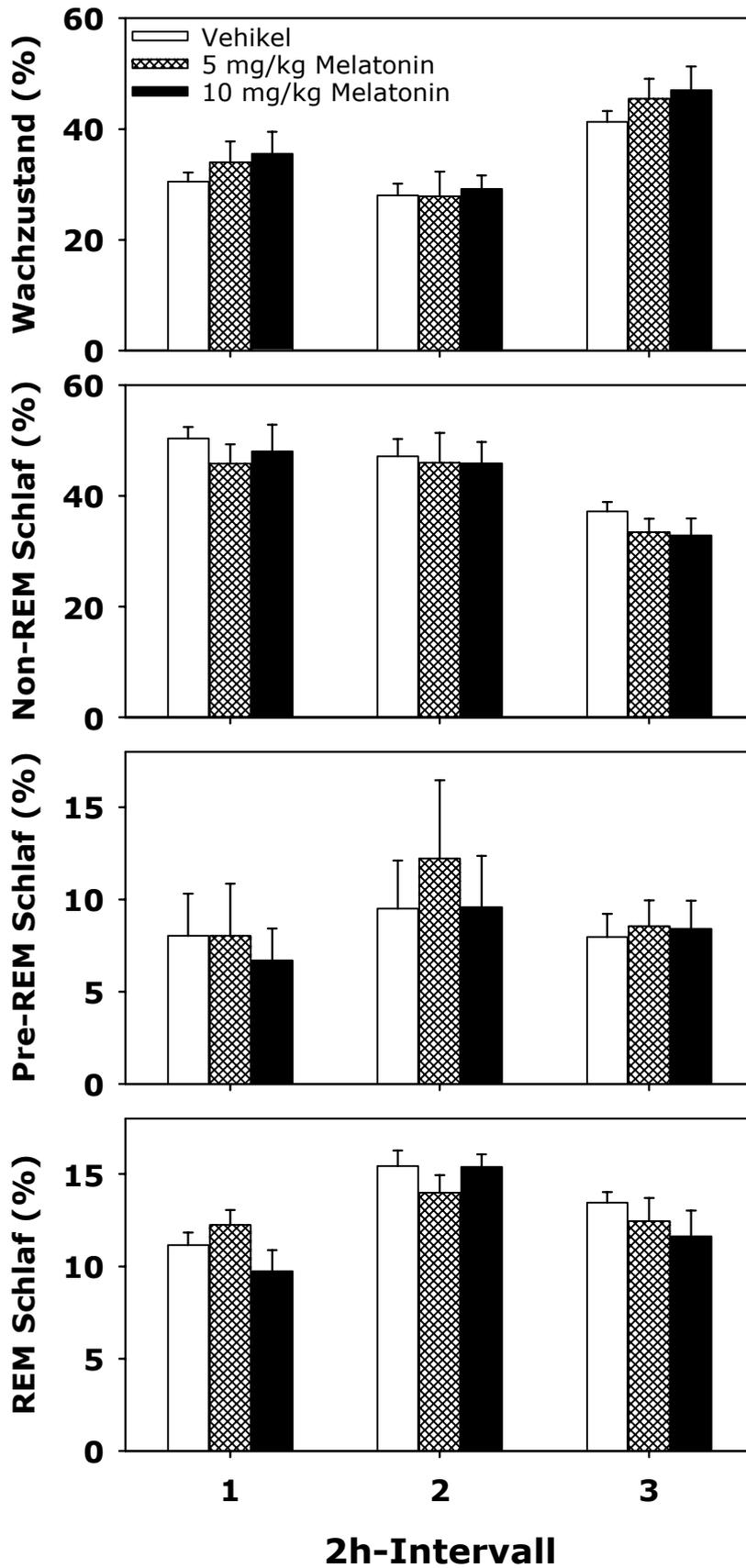
Die ANOVA über alle 2-Stunden Werte der Gehirntemperatur während der ersten 6 Stunden nach Injektion von Vehikel und den beiden Melatonin-Dosierungen ergab keine signifikanten Effekte für den Faktor Behandlung, jedoch für den Faktor Zeit ( $F_{2,14} = 7,4$ ;  $p = 0,03$ ). Paarweise Vergleiche zwischen den aufeinanderfolgenden 2-Stunden-Intervallen zeigten, daß die Gehirntemperatur unabhängig von der Behandlung vom zweiten zum dritten Intervall anstieg (siehe Abbildung 34).



**Abbildung 34:** Gehirntemperatur in den ersten drei 2h-Intervallen nach Injektion von Vehikel, 5 oder 10 mg/kg Melatonin, dargestellt als Abweichung vom 6h-Mittelwert der Vehikel-Konditionen (Mittelwerte  $\pm$  SEM, n = 8).

### 3.4.1.2 Vigilanzstadien

Die Analyse der in den einzelnen Vigilanzstadien verbrachten Zeit ergab für keines der Stadien signifikante Effekte der Behandlung. Hingegen wurde ein signifikanter Einfluß der Zeit auf den Anteil an Wachheit ( $F_{2,16} = 13,6$ ;  $p = 0,0005$ ), non-REM Schlaf ( $F_{2,16} = 12,2$ ;  $p = 0,0007$ ) und REM Schlaf ( $F_{2,16} = 12,1$ ;  $p = 0,002$ ) ermittelt. Unabhängig von der Behandlung stieg der Anteil von Wachheit und sank der Anteil von non-REM Schlaf im Verlauf der letzten beiden 2-Stunden-Intervalle, während der Anteil von REM Schlaf vom ersten zum zweiten 2-Stunden-Intervall zunahm und vom zweiten zum dritten Intervall abnahm (siehe Abbildung 35).



**Abbildung 35:** Prozentualer Anteil der einzelnen Vigilanzstadien in den ersten drei 2h-Intervallen nach Injektion von Vehikel, 5 oder 10 mg/kg Melatonin (Mittelwerte  $\pm$  SEM, n = 9).

### 3.4.1.3 Schlafarchitektur

Die Varianzanalyse der Schlaflatenzen und der durchschnittlichen Anzahl und Dauer von non-REM und REM Schlafepisoden ergab keinerlei signifikante Behandlungseffekte für Melatonin (siehe Tabelle 12).

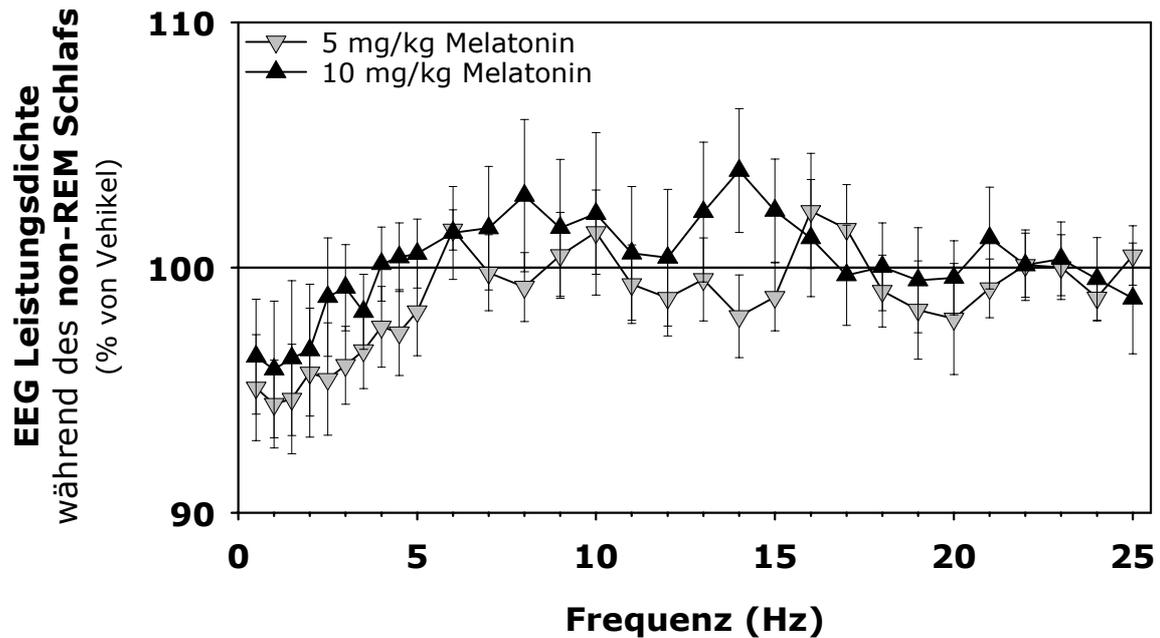
**Tabelle 12:** Parameter der Schlafarchitektur in den ersten 6 Stunden nach Injektion von 5 oder 10 mg/kg Melatonin.

	Vehikel	Melatonin	
		5 mg/kg	10 mg/kg
<b>Non-REM Schlaf</b>			
Latenz (min)	20,0 ± 7,2	21,1 ± 11,2	19,5 ± 10,4
Episodenanzahl	79,6 ± 16,2	74,4 ± 16,4	74,7 ± 16,6
Episodendauer (min)	2,62 ± 0,58	2,67 ± 0,57	2,62 ± 0,55
<b>REM Schlaf</b>			
Latenz (min)	35,5 ± 8,7	39,1 ± 13,4	41,1 ± 9,9
Episodenanzahl	36,3 ± 6,7	35,3 ± 5,7	33,3 ± 8,0
Episodendauer (min)	1,35 ± 0,17	1,33 ± 5,68	1,34 ± 0,11

Werte sind Mittelwerte ± SD (n = 9).

### 3.4.1.4 EEG Leistungsdichte während des non-REM Schlafs

Die ANOVA über die 2-Stunden EEG-Leistungsspektren im non-REM Schlaf während der ersten 6 Stunden nach Injektion von Vehikel, 5 und 10 mg/kg Melatonin ergab einen signifikanten ( $p < 0,05$ ) Zeiteffekt für die Frequenzen kleiner gleich 6 Hz und größer gleich 9 Hz. Dies reflektierte eine fortschreitende Abnahme der Leistungsdichte in den niedrigen und Zunahme in den höheren Frequenzbereichen über die Aufnahmedauer. Für die Behandlung konnte nur ein tendentieller Effekt ( $p < 0,1$ ) für die Frequenzbänder zwischen 2,5 und 3,5 Hz ermittelt werden. Im Vergleich zu Vehikel tendierten beide Melatonin-Dosierungen dazu die EEG-Leistungsdichte in den entsprechenden Frequenzbändern zu verringern (siehe Abbildung 36).

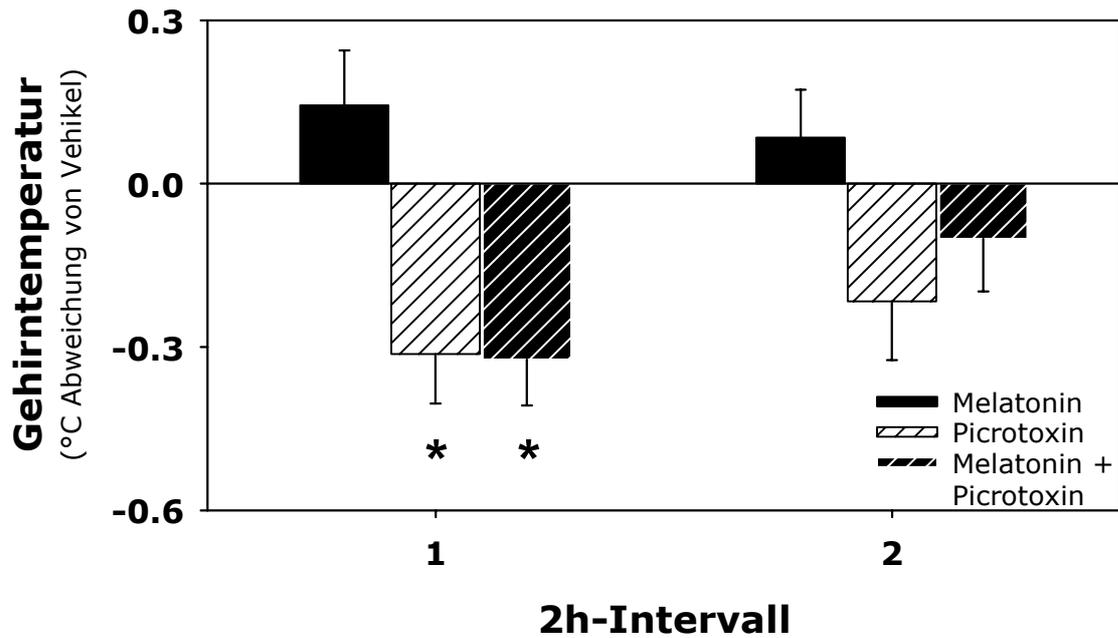


**Abbildung 36:** EEG-Leistungsdichte während des non-REM Schlafs in den ersten 6 Stunden nach Injektion von 5 oder 10 mg/kg Melatonin, dargestellt als Prozentsatz der gemittelten Vehikel-Konditionen (Mittelwerte  $\pm$  SEM,  $n = 9$ ).

### 3.4.2 Melatonin und Picrotoxin

#### 3.4.2.1 Gehirntemperatur

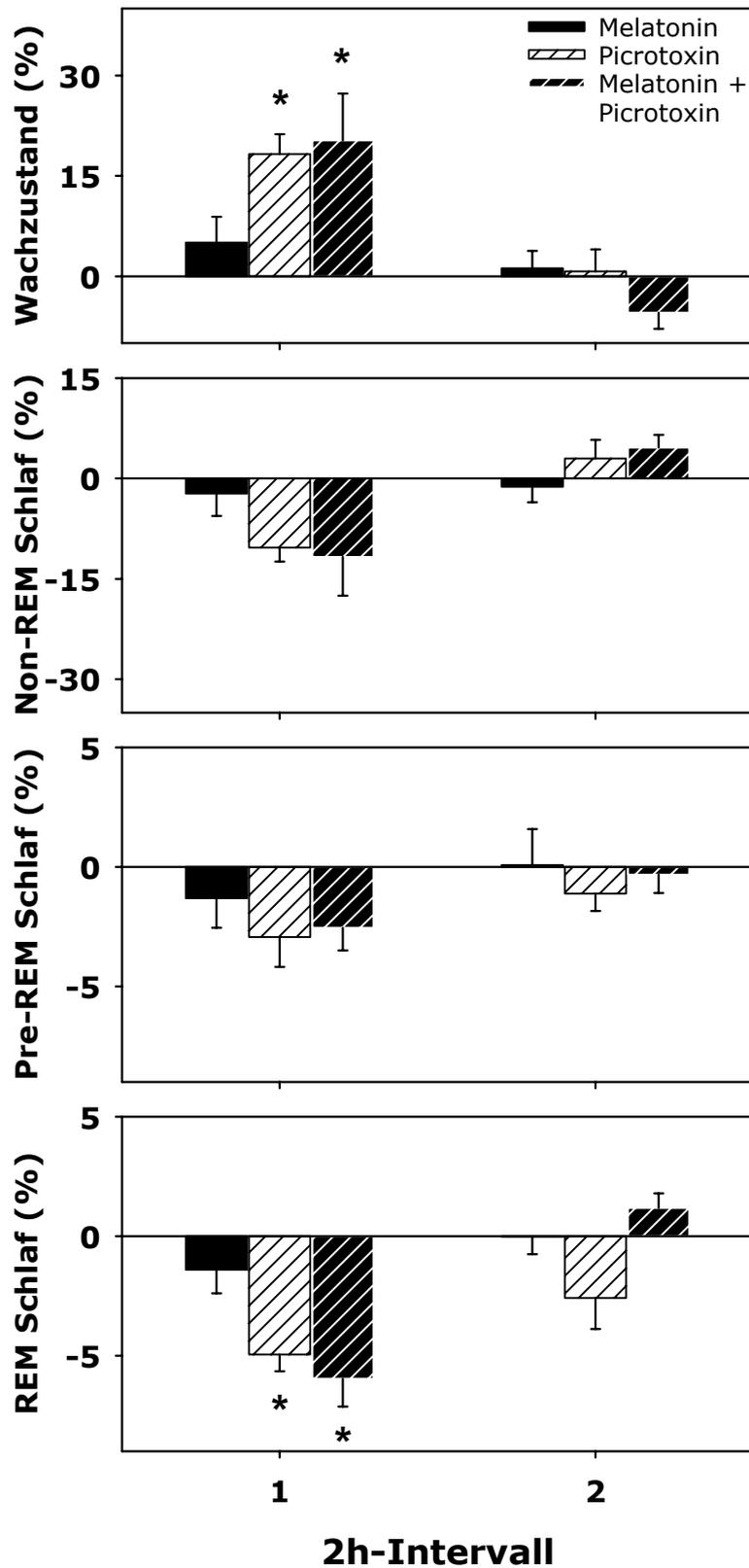
Die Analyse der 2-Stunden Gehirntemperatur-Werte während der ersten vier Stunden nach Verabreichung von Vehikel, 10 mg/kg Melatonin, 1,5 mg/kg Picrotoxin und Picrotoxin + Melatonin ergab einen signifikanten Effekt für den Faktor Behandlung ( $F_{3,21} = 4,6$ ;  $p = 0,04$ ). Im Vergleich zu Vehikel verminderte sowohl Picrotoxin alleine als auch in Kombination mit Melatonin die Gehirntemperatur insbesondere im ersten 2-Stunden-Intervall (siehe Abbildung 37). Ein direkter Vergleich zeigte, daß die durch Picrotoxin und Picrotoxin + Melatonin bedingten Verminderungen der Gehirntemperatur nicht voneinander zu unterscheiden waren.



**Abbildung 37:** Gehirntemperatur in den ersten zwei 2h-Intervallen nach Injektion von 10 mg/kg Melatonin oder 1,5 mg/kg Picrotoxin oder der Kombination aus Melatonin und Picrotoxin, dargestellt als Abweichung vom entsprechenden Wert in den gemittelten Vehikel-Konditionen (Mittelwerte  $\pm$  SEM,  $n = 8$ ). \*  $p < 0,05$  (2-seitiger verbundener t-Test).

### 3.4.2.2 Vigilanzstadien

Für das Stadium Wach ermittelte die ANOVA signifikante Effekte von Behandlung ( $F_{3,24} = 5,0$ ;  $p = 0,03$ ) und Zeit ( $F_{1,8} = 14,7$ ;  $p = 0,0005$ ) und einen Zusammenhang zwischen Behandlung und Zeit ( $F_{3,24} = 4,3$ ;  $p < 0,05$ ). Im Vergleich zu Vehikel führten Picrotoxin und Picrotoxin + Melatonin in gleichem Maße zu einer signifikanten Zunahme des Wachzustands während des ersten 2-Stunden-Intervalls (siehe Abbildung 38 oben). Für den Anteil an non-REM Schlaf konnte kein signifikanter Behandlungseffekt ermittelt werden, aber die ANOVA ergab einen tendentiellen Interaktionseffekt zwischen Behandlung und Zeit ( $F_{3,24} = 3,4$ ;  $p = 0,08$ ), der durch die deutliche Verminderung des non-REM Schlafs während des ersten 2-Stunden-Intervalls nach Gabe von Picrotoxin und Picrotoxin + Melatonin hervorgerufen wurde (siehe Abbildung 38 mitte oben). Während für den Pre-REM Schlaf kein signifikanter Behandlungseffekt ermittelt wurde, ergab die ANOVA einen signifikanten Effekt von Behandlung ( $F_{3,24} = 7,8$ ;  $p = 0,003$ ), Zeit ( $F_{1,8} = 67,8$ ;  $p < 0,0001$ ) und Behandlung in Abhängigkeit der Zeit ( $F_{3,24} = 7,8$ ;  $p = 0,002$ ) für den REM Schlaf. Im Vergleich zu Vehikel bewirkten Picrotoxin und Picrotoxin + Melatonin eine vergleichbare Suppression des REM Schlafs im ersten 2-Stunden-Intervall (siehe Abbildung 38 unten).



**Abbildung 38:** Anteil der Vigilanzstadien in den ersten zwei 2h-Intervallen nach Injektion von 10 mg/kg Melatonin, 1,5 mg/kg Picrotoxin oder der Kombination von Melatonin und Picrotoxin, dargestellt als Abweichung vom jeweiligen Wert der gemittelten Vehikel-Konditionen (Mittelwerte  $\pm$  SEM, n = 8). \* p < 0,05 (2-seitiger verbundener t-Test).

### 3.4.2.3 Schlafarchitektur

Die Analyse der Schlafarchitektur-Variablen ergab einen signifikanten Behandlungseffekt für die Latenz zum non-REM Schlaf ( $F_{3,24} = 4,1$ ;  $p < 0,05$ ), die Anzahl der non-REM Schlafepisoden ( $F_{3,24} = 5,4$ ;  $p < 0,01$ ), die Latenz zum REM Schlaf ( $F_{3,24} = 11,7$ ;  $p = 0,003$ ) und die Anzahl der REM Schlafepisoden ( $F_{3,24} = 5,6$ ;  $p = 0,02$ ), jedoch nicht für die Dauer der non-REM und REM Schlafepisoden. Im Vergleich zu Vehikel wurde durch Picrotoxin und Picrotoxin + Melatonin die Latenz zu non-REM und REM Schlaf signifikant verlängert und die Anzahl der non-REM Schlafepisoden reduziert (siehe Tabelle 13). Desweiteren führten beide Picrotoxin-Behandlungen zu einer Reduktion der Anzahl von REM Schlafepisoden, was bei Picrotoxin signifikant ( $p = 0,002$ ) und bei Picrotoxin + Melatonin tendentiell geschah ( $p = 0,08$ ). Direkte Vergleiche zwischen diesen beiden Konditionen ergaben, daß die Effekte von Picrotoxin alleine und in Kombination mit Melatonin sich nicht voneinander unterscheiden.

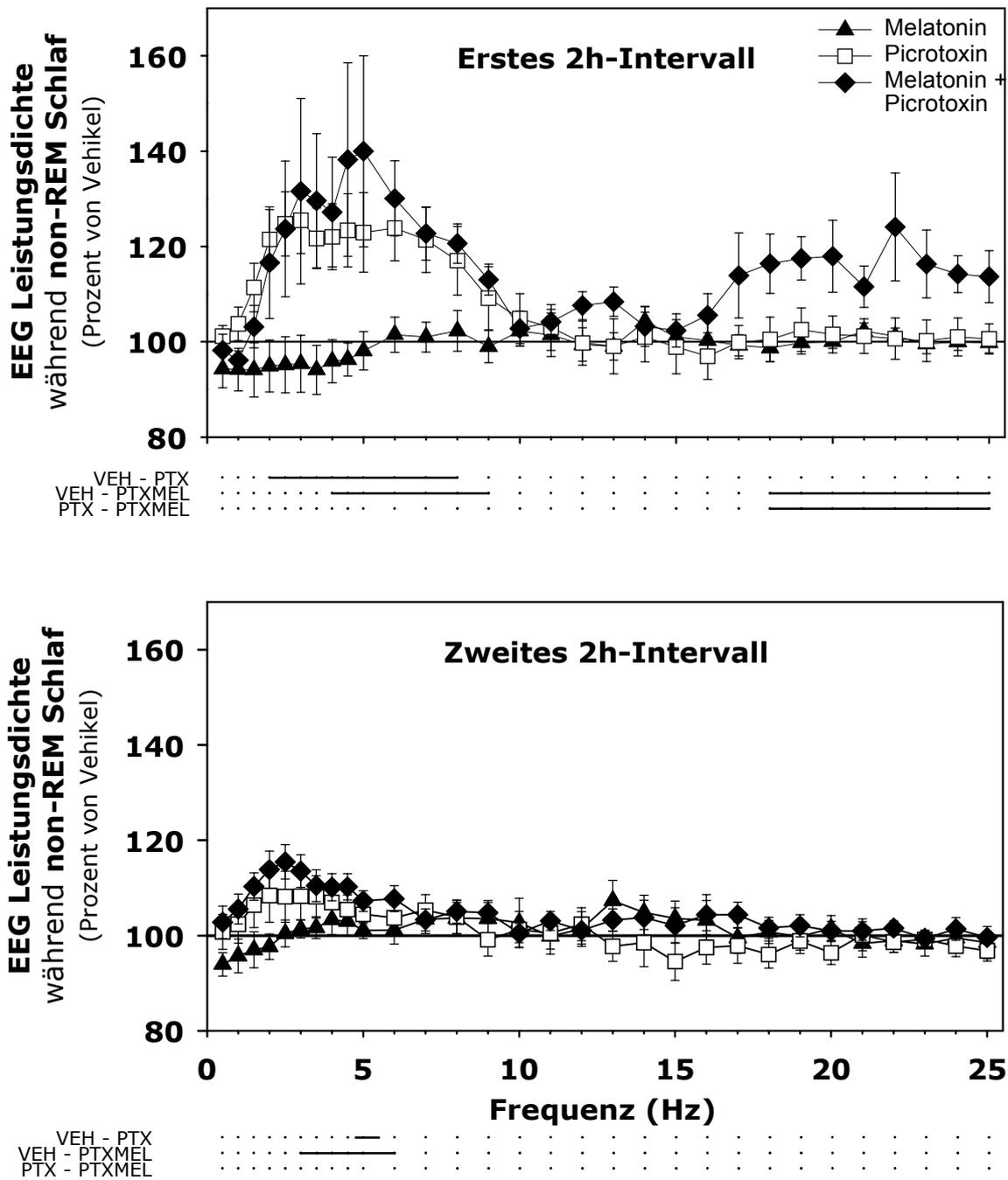
**Tabelle 13:** Parameter der Schlafarchitektur in den ersten 4 Stunden nach Injektion von Melatonin (10 mg/kg), Picrotoxin (1,5 mg/kg) oder der Kombination von Picrotoxin und Melatonin.

	Vehikel	Melatonin	Picrotoxin	Picrotoxin + Melatonin
<b>Non-REM Schlaf</b>				
Latenz (min)	20,0 ± 7,2	19,5 ± 10,4	41,9 ± 23,2 *	46,5 ± 36,1
Episodenanzahl	56,3 ± 12,0	54,8 ± 11,6	47,4 ± 11,1 *	45,1 ± 11,0 *
Episodendauer (min)	2,66 ± 0,61	2,58 ± 0,59	2,80 ± 0,60	2,92 ± 0,46
<b>REM Schlaf</b>				
Latenz (min)	35,5 ± 8,7	41,1 ± 9,9	75,0 ± 18,9 *	78,7 ± 33,4 *
Episodenanzahl	23,7 ± 4,9	22,4 ± 5,5	17,4 ± 6,0 *	20,1 ± 6,0
Episodendauer (min)	1,38 ± 0,15	1,35 ± 0,18	1,35 ± 0,24	1,34 ± 0,18

Werte sind Mittelwerte ± SD (n = 9). \*  $p < 0,05$  (2-seitiger verbundener t-Test).

#### **3.4.2.4 EEG Leistungsdichte während des non-REM Schlafs**

Die ANOVA über die EEG-Leistungsspektren im non-REM Schlaf während der ersten 4 Stunden nach Injektion von Vehikel, 10 mg/kg Melatonin, Picrotoxin und Picrotoxin + Melatonin ergab signifikante Effekte von Behandlung und Zeit für alle Frequenzen kleiner gleich 8 Hz und signifikante Interaktionseffekte zwischen Behandlung und Zeit für die Frequenzen zwischen 2,5 und 9 Hz sowie von 18 bis 25 Hz. Während die Gabe von 10 mg/kg Melatonin die EEG-Aktivität nicht signifikant beeinflusste, führten Picrotoxin und Picrotoxin + Melatonin zu einer Erhöhung der Leistungsdichte in den niedrigen Frequenzen. Diese Effekte der beiden Picrotoxin-Behandlungen waren praktisch identisch und traten hauptsächlich während der ersten 2 Stunden nach Injektion auf (siehe Abbildung 39). Außerdem wurde die EEG-Leistungsdichte in den Frequenzen größer gleich 18 Hz durch die kombinierte Gabe von Picrotoxin und Melatonin verändert. Im Vergleich zu Vehikel wie auch zu allen anderen Behandlungen führte Picrotoxin + Melatonin zu einer leichten Erhöhung der hochfrequenten Aktivität während der ersten 2 Stunden.



**Abbildung 39:** EEG-Leistungsdichte während des non-REM Schlafs in den ersten zwei 2h-Intervallen nach Injektion von 10 mg/kg Melatonin, 1,5 mg/kg Picrotoxin oder der Kombination von Melatonin und Picrotoxin, dargestellt als Prozentsatz vom jeweiligen Wert der gemittelten Vehikel-Konditionen (Mittelwerte  $\pm$  SEM, n = 9). Signifikante Unterschiede zwischen den Konditionen sind durch Linien durch die Punkte unter der jeweiligen Grafik markiert (p < 0,05, 2-seitiger verbundener t-Test). VEH = Vehikel, PTX = Picrotoxin, PTXMEL = Picrotoxin + Melatonin.

## 4 DISKUSSION

### 4.1 Zaleplon akut

Die Ergebnisse der vorliegenden Studie zeigen, daß der neuartige  $\omega_1$ -spezifische agonistische GABA<sub>A</sub>-Rezeptormodulator Zaleplon neben vielen Gemeinsamkeiten mit klassischen Benzodiazepinen auch einige deutlich abweichende Wirkungen auf das Schlaf-Wach-Verhalten der Ratte aufweist. Bei Verabreichung zu Beginn der Aktivitätsphase verkürzt Zaleplon die non-REM Schlaflatenz und verlängert in der hohen Dosis auch die non-REM Schlafepisodendauer. Dadurch wird der non-REM Schlaf gefördert und der Anteil an Wachheit und REM Schlaf verringert, wie es auch für Benzodiazepine beschrieben wurde (Lancel et al. 1994, 1997; Edgar et al. 1997; Scherschlicht & Marias 1983). Andererseits wird durch Zaleplon auch der Anteil an pre-REM Schlaf vermindert und nicht wie bei den Benzodiazepinen stark erhöht (Gandolfo et al. 1994). Im Gegensatz dazu bewirkt Zaleplon zu Beginn der Ruhephase eine Verlängerung der Wachzeit und verringert in den ersten zwei Stunden nach Injektion den Anteil an allen Schlafstadien. Dieser Effekt scheint für  $\omega_1$ -spezifische Substanzen typisch zu sein, da auch für die hauptsächlich am  $\omega_1$ -Subtyp des GABA<sub>A</sub>-Rezeptors bindende Substanz CL 218,872 bei Gabe zu Beginn der Ruhephase eine tendentielle Verlängerung der Schlaflatenz beschrieben wurde (Mendelson et al. 1987). Beobachtungen zeigen, daß die Ratten nach Gabe von Zaleplon zunächst recht aktiv sind, was zu Beginn der Ruhephase einen großen Unterschied zum normalen Verhalten darstellt. Normalerweise üben agonistische Modulatoren des GABA<sub>A</sub>-Rezeptors zu jeder Tageszeit qualitativ gleiche Effekte auf das Schlaf-Wach-Verhalten aus (Nicholson und Pascoe 1988; Dijk et al. 1989; Trachsel et al. 1990; Edgar et al. 1991, 1997; Kanno et al. 1993; Lancel et al. 1997a). Obwohl schlafanstoßende Wirkungen im allgemeinen zu Beginn der Aktivitätsphase besser zu sehen sind als zu Beginn der Ruhephase, erscheint diese eindeutig gegensätzliche Wirkung von Zaleplon sehr ungewöhnlich. Ein möglicher Grund für die Verlängerung der Wachzeit nach Zaleplon-Gabe zu Beginn der Ruhephase könnte eine initiale Aktivierung der Tiere durch die muskelrelaxierende Wirkung von Zaleplon sein, die bei Zaleplon, im Gegensatz zu Benzodiazepinen, nicht durch eine anxiolytische Wirkung kompensiert wird (Griebel et al. 1998). Außerdem entspricht die non-REM Schlaflatenz nach Zaleplon-Administration zu Beginn der Ruhephase ungefähr der spontanen Latenz zu Beginn der Aktivitätsphase, was darauf hindeutet, daß es sich nicht um einen stark aktivierenden Effekt handelt. Die REM Schlaflatenz wird durch Zaleplon sowohl zu Beginn der Ruhephase als auch zu Beginn der Aktivitätsphase verlängert und führt somit bei gleichbleibender Länge der

Episoden zu insgesamt weniger REM Schlafepisoden und einem geringeren Anteil an REM Schlaf innerhalb der sechsstündigen Aufnahmeperiode. Diese Unterdrückung des REM Schlafs ist auch ein typischer Effekt von Benzodiazepinen und wurde oft für Menschen und Ratten beschrieben (Übersicht in Monti 1981, Lancel 1999). Die durch Zaleplon hervorgerufenen Veränderungen in der EEG-Leistungsdichte waren während des non-REM und REM Schlafs besonders stark zu Beginn der Aktivitätsphase und während Wachheit zu Beginn der Ruhephase stärker ausgeprägt. Während des non-REM Schlafs führten beide Zaleplon-Dosierungen zu einer deutlichen Erhöhung der niederfrequenten EEG-Aktivität und zu einer schwachen Verringerung der Leistungsdichte im Bereich von 6 bis 19 Hz. Dies steht in absolutem Gegensatz zu den Effekten von Benzodiazepinen, die während des non-REM Schlafs die SWA senken und die Aktivität im Spindel-Frequenzbereich erhöhen (Borbély et al. 1985; Übersicht in Monti 1981, Lancel 1999). Aber auch für andere  $\omega_1$ -selektive Hypnotika wurden Erhöhungen der Leistungsdichte im niederfrequenten Bereich bzw. ein größerer Anteil an Tiefschlaf beschrieben (Alvarino et al. 1999; Hemmeter et al. 2000). Veränderungen im REM Schlaf-EEG bewirkt Zaleplon nur zu Beginn der Aktivitätsphase. Neben einer leichten Erhöhung der niederfrequenten EEG-Aktivität durch beide Zaleplon-Dosierungen erzeugt die hohe Zaleplon-Dosis eine Verlagerung der Theta-Aktivität in niedrigere Frequenzen ("Theta-Shift") und eine Erhöhung der EEG-Leistungsdichte in den Frequenzen  $\geq 12$  Hz. Auch im Wachzustand wird die Theta-Aktivität insbesondere durch die hohe Zaleplon-Dosis auf niedrigere Frequenzen verschoben und die Leistungsdichte in den hohen Frequenzbereichen erhöht. Mit Ausnahme der schwachen Förderung der SWA sind diese EEG-Effekte während REM Schlaf und Wachzustand ein typisches Merkmal von Benzodiazepinen, wurden aber bereits auch für andere  $\omega_1$ -selektive GABA<sub>A</sub>-Agonisten wie Zolpidem oder Zopiclon beschrieben (Yoshimoto et al. 1999, Edgar et al. 1991). Die Muskelaktivität im Wachzustand wird von der hohen Zaleplon-Dosierung unabhängig von der Phase verringert. Dies steht in Einklang mit anderen Studien, die eine Verringerung der lokomotorischen Aktivität durch Zaleplon bei Ratten und Mäusen zeigen (Beer et al. 1997, Sanger et al. 1996). Zusammenfassend erscheint Zaleplon in Zeiten mit geringer Schlafneigung eine Art künstliche Erhöhung des Schlafdrucks zu erzeugen, die sich in einer Förderung des non-REM Schlafs und Erhöhung der niederfrequenten EEG-Aktivität in diesem Stadium äußert. Allerdings bewirkt Zaleplon auch einige unerwünschte Effekte, wie die Unterdrückung des REM Schlafs und die in der hohen Dosierung deutlich werdende Verminderung der Muskelaktivität im Wachzustand.

## 4.2 Midazolam und Zaleplon subchronisch

### 4.2.1 Midazolam

Die Injektion von 3 mg/kg Midazolam zu Beginn der Aktivitätsphase führte zu einer Verlängerung der non-REM Schlafepisodendauer. Dadurch erhöhte sich die innerhalb der gesamten 6-Stunden Aufnahmezeit im non-REM Schlaf verbrachte Zeit, während gleichzeitig die Tiere weniger Zeit im Wachzustand verbrachten am ersten jedoch nicht an den folgenden Behandlungstagen. Während der ersten 2 Stunden von T1 war der Anteil an non-REM Schlaf deutlich erhöht und Wachheit vermindert. Dieser Effekt in den ersten 2 Stunden nahm im Lauf des Behandlungszeitraums kontinuierlich ab, bis an T4 und T5 keine signifikanten Unterschiede mehr zu erkennen waren. Im Gegensatz zu dieser Entwicklung von Toleranz blieben andere Effekte über den gesamten Behandlungszeitraum erhalten. An allen Behandlungstagen war die Latenz zum non-REM Schlaf verkürzt und die niederfrequente Aktivität während dieses Vigilanzstadiums verringert. Die Menge an pre-REM Schlaf war auch an allen Behandlungstagen innerhalb des ersten 2-Stunden-Intervalls deutlich gesteigert. Der Anteil an REM Schlaf war an allen Behandlungstagen während der ersten 2 Stunden und an T2 + T3 auch während der gesamten 6 Stunden verringert, was hauptsächlich durch eine Verlängerung der REM Schlaflatenz (signifikant an T2 + T3) und eine geringere Anzahl von REM Schlafepisoden (signifikant an T2 + T3 und T4 + T5) bewirkt wurde. Die Leistungsdichte im REM Schlaf zeigte eine Verlagerung der Theta-Aktivität in niedrigere Frequenzen und einen Anstieg in der hochfrequenten Aktivität an allen Behandlungstagen. Diese Ergebnisse stehen in Einklang mit früheren Studien über die akute Wirkung von Midazolam auf den Schlaf der Ratte. Es wurde berichtet, daß Midazolam den Anteil an pre-REM Schlaf (Gandolfo et al. 1994) oder non-REM Schlaf erhöht, letzteres insbesondere wenn pre-REM Schlaf nicht als separates Vigilanzstadium erfaßt wurde (Pieri et al. 1981, Scherschlicht & Marias 1983, Lancel et al. 1994, 1996, 1997, Depoortere et al. 1995). Alle hier zitierten Arbeiten zeigten zudem eine Verminderung des Wach-Anteils während der ersten 6 Stunden nach Injektion. Desweiteren zeigten alle Studien, in denen eine Frequenzanalyse durchgeführt wurde, daß Midazolam die niederfrequente Aktivität im non-REM Schlaf-EEG bei Ratten (Lancel et al. 1996, 1997a) und Menschen (Trachsel et al. 1990, Aeschbach et al. 1994) deutlich unterdrückt. Die Wirkung auf den REM Schlaf wird jedoch recht kontrovers beschrieben. Studien anderer Gruppen berichteten entweder von Erhöhungen im REM Schlaf oder sahen keinen Effekt der akuten Gabe von Midazolam auf den REM Schlaf bei Ratten (Radulovacki et al. 1984; Gandolfo et al. 1994; Depoortere et al. 1995), während in unserer Gruppe konsistent eine Verminderung des REM Schlaf-Anteils auftrat

(Lancel et al. 1994, 1996). Dies könnte eventuell auf einen Dosis-Effekt zurückzuführen sein, da Erhöhungen im REM Schlaf meist nach geringeren Mengen als bei uns verwendet wurden auftraten (Pieri et al. 1981, Gandolfo et al. 1994). Darauf deuten auch die Ergebnisse einer Arbeit von Scherschlicht & Marias (1983) hin, die nach intravenöser Gabe von 1 mg/kg Midazolam bei Kaninchen eine REM schlaffördernde Wirkung sahen, während 10 mg/kg den REM Schlaf unterdrückte. Darüber hinaus wird nur von sehr wenigen Gruppen der pre-REM Schlaf als separates Vigilanzstadium erfaßt, sondern meist dem REM Schlaf zugeordnet, so daß die Effekte von Midazolam auf den pre-REM Schlaf eventuell mit denen auf den REM Schlaf vermischt werden. Die Muskelaktivität im Wachzustand wurde durch Midazolam an allen Behandlungstagen sowohl im gesamten 6-Stunden Zeitraum als auch in den ersten 2 Stunden nach Injektion unterdrückt. Dies steht in Einklang mit der vorhandenen Literatur, in der durchgehend Reduktionen der lokomotorischen Aktivität nach Gabe von Benzodiazepinen beschrieben werden (Übersicht in Pieri et al. 1981, Griebel et al. 1996).

Es gibt bislang keine anderen Studien zum Einfluß wiederholter Midazolam-Gabe auf das Schlaf-Wach-Verhalten von Ratten. Jedoch zeigten Experimente mit anderen Verhaltensparametern, daß bei wiederholter Verabreichung von Benzodiazepinen, in Abhängigkeit von den untersuchten Parametern, sich unterschiedlich Toleranz entwickeln kann. So wurde beschrieben, daß die sedative Wirkung von Lorazepam und Triazolam bereits nach drei Tagen verflogen ist, während die anxiolytischen Effekte von Benzodiazepinen noch wesentlich länger anhalten (Übersicht in File 1985). Dieser Unterschied in der Toleranzentwicklung könnte auch für die in dieser Arbeit gefundenen Effekte von Midazolam gelten. Während sich auf die non-REM Schlaf fördernde Wirkung von Midazolam bereits innerhalb von drei Tagen Toleranz entwickelt, ist davon bei den Effekten auf den Anteil an pre-REM und REM Schlaf, die Verkürzung der non-REM Schlaf latenz, die Veränderungen in der EEG-Leistungsdichte und die Verringerung der Muskelaktivität im Wachzustand nichts zu erkennen.

#### **4.2.2 Zaleplon**

Die Injektion von 4 mg/kg Zaleplon zu Beginn der Aktivitätsphase erhöhte vorübergehend den Anteil an non-REM Schlaf und verringert den Wach-Anteil. Über die gesamte 6-Stunden Aufnahmeperiode war dies nur am ersten Behandlungstag signifikant, aber innerhalb der ersten zwei Stunden nach Verabreichung war der non-REM Schlaf an den ersten drei Behandlungstagen signifikant vermehrt. Auch die Dauer der non-REM Schlafepisoden war an T1 signifikant verlängert, jedoch nicht an den folgenden Behandlungstagen. Es scheint also,

als ob sich innerhalb von drei Tagen Toleranz gegenüber der schlafverlängernden Wirkung von Zaleplon entwickelt. Andererseits war die non-REM Schlaflatenz während der gesamten Behandlungsperiode verkürzt. Während aller Behandlungstage war nach Zaleplon-Gabe die niederfrequente Aktivität im non-REM Schlaf-EEG erhöht und die Menge an pre-REM Schlaf blieb unverändert. Der REM Schlaf wurde innerhalb der ersten zwei Stunden an allen fünf Behandlungstagen unterdrückt, was durch eine Verlängerung der REM Schlaflatenz (signifikant an T2 + T3) und eine reduzierte Anzahl an REM Schlafepisoden (signifikant an allen Behandlungstagen außer dem ersten) bewirkt wurde. Diese Ergebnisse stehen in Einklang mit der sehr limitierten Anzahl anderer Studien zur Wirkung von Zaleplon auf den Schlaf der Ratte. Einige kurze Veröffentlichungen legen dar, daß bereits niedrigere Dosierungen von Zaleplon, als hier verabreicht wurden, die Gesamtschlafzeit von Ratten verlängern (Beer et al. 1997) und den non-REM Schlaf fördern, während Wachheit und REM Schlaf verringert werden (Depoortere et al. 1998). Eine Spektralanalyse des EEG nach Gabe von 3 mg/kg Zaleplon bei Ratten ergab eine Erhöhung in der Beta-Aktivität (Depoortere et al. 1998), wie sie hier während Wachheit und REM Schlaf beobachtet wurde. Andererseits fanden sich in den meisten Studien zur Wirkung von Zolpidem, einem anderen  $\omega_1$ -selektiven GABA<sub>A</sub>-Rezeptoragonisten, auf das EEG die gleiche Verminderung der niederfrequenten Aktivität und Erhöhung im Spindel-Frequenzbereich, wie sie auch bei Benzodiazepinen bekannt sind (Longo et al. 1988, Brunner et al. 1991, Feige et al. 1999). Jedoch berichtete Depoortere et al. (1986) auch von verstärkter EEG-Aktivität von 2 bis 4 Hz bei Ratten nach Zolpidem-Verabreichung. Zaleplon bewirkte desweiteren eine Verringerung der Muskelaktivität im Wachzustand in den ersten 6 Stunden nach Injektion an T1 und T2 + T3. In den ersten 2 Stunden nach Injektion war dieser Effekt an allen Behandlungstagen annähernd gleich stark ausgeprägt, so daß hier möglicherweise eine Toleranzentwicklung in Bezug auf die Dauer der Zaleplon-Wirkung vorliegt. Diese Reduktion der Muskelaktivität steht in Einklang mit anderen Studien, die nach Gabe von  $\omega_1$ -selektiven Hypnotika, wie Zaleplon und Zolpidem, eine Verminderung der lokomotorischen Aktivität und motorische Defizite bei Ratten und Mäusen beschrieben (Beer et al. 1997, Sanger et al. 1996). Die hier gefundenen Ergebnisse bestätigen die frühere Beobachtung, daß die Wirkung von 10 mg/kg Zaleplon, gegeben zu Beginn der Aktivitätsphase, von Tag zu Tag stark abnimmt und nur bis zum dritten Behandlungstag signifikant ist (Depoortere et al. 1998). Dieser Befund einer schnell auftretenden Toleranzentwicklung bei Ratten steht in Kontrast zu den meisten Studien an Probanden oder Patienten, die nach täglicher Verabreichung von bis zu fünf Wochen keine Toleranz bezüglich der schlafinduzierenden Wirkung von Zaleplon demonstrierten (Elie et al.

1999, Fry et al. 2000). Trotzdem zeigten sich auch in einigen Studien an Menschen Anzeichen einer Toleranzentwicklung nach chronischer Zaleplon-Administration (Walsh et al. 1998, Fry et al. 2000). Dieser Unterschied in der Toleranzentwicklung bei Ratten und Menschen könnte jedoch möglicherweise auch auf einen verschiedenartigen Metabolismus von Zaleplon zurückzuführen sein (Beer et al. 1994).

In diesem Experiment konnten der Rebound-Insomnie ähnliche Effekte nach Absetzen der Zaleplon-Behandlung beobachtet werden. Am ersten Absetztag war die Einschlaf latenz verlängert und daher der Anteil an Wachheit erhöht und die Menge aller Schlafstadien verringert. Dies steht im Gegensatz zu den meisten Humanstudien, in denen keine signifikanten Absetzeffekte nach Beendigung der täglichen Zaleplon-Gabe berichtet wurden (Übersicht in Dooley & Plosker 2000). Jedoch führte in einer Studie von Hedner et al. (2000) das Absetzen von 10 mg Zaleplon nach täglicher Administration über zwei Wochen zu einer Rebound-Insomnie in Form einer verringerten Gesamtschlafzeit. Da Zaleplon ein recht neues Hypnotikum ist, erscheinen weitere Studien zu potentiellen Absetzeffekten nötig, um beurteilen zu können, ob diese Substanz in dieser Hinsicht wirklich den klassischen Benzodiazepinen überlegen ist.

#### ***4.2.3 Vergleich der beiden Schlafmittel***

Das nicht-selektive Benzodiazepin Midazolam und der  $\omega_1$ -selektive Benzodiazepin-Rezeptoragonist Zaleplon üben größtenteils vergleichbare Effekte auf das Schlaf-Wach-Verhalten von Ratten aus. Beide Substanzen verkürzen die Latenz zum non-REM Schlaf und verlängern die Dauer der non-REM Schlafepisoden, was eine gesteigerte Fähigkeit zum Ein- und Durchschlafen widerspiegelt. Außerdem unterdrücken sie den REM Schlaf: die Latenz zum REM Schlaf tendiert zu einer Verlängerung und daher kommen weniger REM Schlafepisoden vor. Im Vergleich der Wirkung der zwei Hypnotika auf Vigilanz und Schlafarchitektur während der fünftägigen Behandlungsperiode, erscheint als einziger Unterschied, daß Midazolam deutlich den Anteil an pre-REM Schlaf erhöht, während dieses Schlafstadium von Zaleplon nicht beeinflusst wird. Dies steht in Einklang mit anderen Studien, in denen Benzodiazepine durchgehend eine Erhöhung im pre-REM Schlaf-Anteil bewirkten, das für den  $\omega_1$ -Subtyps des GABA<sub>A</sub>-Rezeptors selektive Hypnotikum Zolpidem den pre-REM Schlaf jedoch kaum beeinflusste (Übersicht in Gottesmann et al. 1998). Nach Beendigung der Behandlung konnten Absetzeffekte, in Form von vermehrter Wachheit, verlängerter non-REM Schlaf latenz und dadurch einer niedrigeren Anzahl an non-REM

Schlafepisoden und weniger non-REM Schlaf, sowie einer weiterhin verminderten Anzahl an REM Schlafepisoden in der Zaleplon-Gruppe, jedoch nicht bei den mit Midazolam behandelten Ratten, beobachtet werden. Bei den Ratten der Midazolam-Gruppe konnte hingegen eher ein Trend zu einer anhaltenden Verkürzung der non-REM Schlaflatenz am ersten Absetztag verzeichnet werden.

Die Spektralanalyse der EEG-Leistungsdichte zeigte, daß sowohl Midazolam als auch Zaleplon die Theta-Aktivität im REM Schlaf zu niedrigeren Frequenzen verlagern (verringerte Aktivität bei 8 Hz in Zusammenhang mit erhöhter Aktivität bei 6 Hz). Im Wachzustand wird die EEG-Aktivität durch beide Substanzen im Theta-Frequenzbereich verringert und in den hohen Frequenzen ( $> 14$  Hz) verstärkt. Deutliche Unterschiede zwischen den beiden Schlafmitteln werden im non-REM Schlaf erkennbar. Während Zaleplon hauptsächlich die EEG-Aktivität im niederfrequenten Bereich (0,5 - 4 Hz) steigert, unterdrückt Midazolam die Aktivität in allen Frequenzen unterhalb von 11 Hz. Da der größte Unterschied zwischen Midazolam und Zaleplon in ihrer unterschiedlichen Selektivität für die  $\omega_1$ - und  $\omega_2$ -Subtypen des GABA<sub>A</sub>-Rezeptors besteht, ließe es sich vermuten, daß die meisten Effekte von Schlafmitteln auf Vigilanzstadien, Schlafarchitektur, spektrale Zusammensetzung der EEG-Leistungsdichte und Muskelaktivität durch den  $\omega_1$ -Subtyp des Rezeptors vermittelt werden, an den beide Substanzen binden. Nur die Förderung des pre-REM Schlafs und die Suppression der niederfrequenten Aktivität im non-REM Schlaf könnten einer Aktivierung des  $\omega_2$ -Subtyps des GABA<sub>A</sub>-Rezeptors zuzuschreiben sein, da diese Effekte nur bei dem nicht-selektiven GABA<sub>A</sub>-Rezeptoragonisten Midazolam zu beobachten sind. Diese Beobachtungen stehen jedoch fast vollständig im Gegensatz zu der Arbeit von Tobler et al. (2001), die ergab, daß Mäuse mit einem diazepam-insensitiven  $\omega_1$ -Subtypen des GABA<sub>A</sub>-Rezeptors in sehr ähnlichem Maße auf das Benzodiazepin Diazepam reagieren wie normale Tiere, woraus gefolgert wird, daß die EEG-Veränderungen und die Unterdrückung des REM Schlafs durch Benzodiazepine nicht über den  $\omega_1$ -Subtyp erfolgen. Lediglich in Bezug auf die Verminderung der Muskelaktivität zeigten auch eine Reihe anderer Studien (Rudolph et al. 1999, Tobler et al. 2001) eine spezifische Vermittlung durch den  $\omega_1$ -Subtyp. Andererseits gibt es auch Hinweise darauf, daß Zaleplon zwar mit der größten Affinität an den durch die  $\alpha_1$ -Untereinheit charakterisierten  $\omega_1$ -Subtyp des GABA<sub>A</sub>-Rezeptors bindet, jedoch in hohen Dosierungen möglicherweise auch GABA<sub>A</sub>-Rezeptoren mit einer  $\alpha_2$ -,  $\alpha_3$ - oder  $\alpha_5$ -Untereinheit ( $\omega_2$ -Subtyp) aktivieren kann (Dämgen und Lüddens 1999), so daß eine Wirkung über andere Subtypen des GABA<sub>A</sub>-Rezeptors noch nicht komplett ausgeschlossen werden kann.

Die selektive Aktivierung des  $\omega_1$ -Rezeptor-Subtyps könnte jedoch auch das Auftreten von Absetzphänomenen begünstigen, da deutliche Anzeichen einer Rebound-Insomnie nur nach Absetzen von Zaleplon, nicht jedoch nach Midazolam, zu detektieren waren. Trotzdem sind diese Ergebnisse mit Vorsicht zu behandeln. Weitere Studien sind nötig, da Berichte über die Wirkung von anderen  $\omega_1$ -selektiven Hypnotika, insbesondere am Menschen, nicht immer mit den hier dargestellten Ergebnissen über die Effekte von Zaleplon auf den Schlaf der Ratte übereinstimmen. Insbesondere die schnellere Toleranzentwicklung bei Zaleplon als bei Midazolam steht im Gegensatz zu sämtlichen Berichten von Menschen, und es ist fraglich, ob in diesem Fall die Ratte ein gutes Modell für Effekte beim Menschen ist.

### **4.3 Gaboxadol subchronisch**

Die Ergebnisse der vorliegenden Studie zeigen, daß die akuten Effekte des GABA<sub>A</sub>-Agonisten Gaboxadol auf den Schlaf der Ratte während subchronischer täglicher Gabe über 5 Tage erhalten bleiben. So bewirkte Gaboxadol an allen Behandlungstagen eine Verlängerung der non-REM Schlafepisoden, eine Erhöhung der durchschnittlichen niederfrequenten EEG-Aktivität während des non-REM Schlafs und der hochfrequenten Aktivität während des REM Schlafs. Die Persistenz dieser Effekte ist ein Anzeichen dafür, daß keine schnelle Toleranzentwicklung gegenüber der hypnotischen Wirkung von Gaboxadol stattfindet. Außerdem zeigen die vorliegenden Daten, daß die Beendigung der täglichen Gaboxadol-Gabe keinen Effekt auf das Schlaf-Wach-Verhalten hat. Dies zeigt, daß abruptes Absetzen dieser Substanz üblicherweise nicht mit negativen Rebound-Effekten assoziiert ist. Unter Baseline-Bedingungen zeigten die Tiere der Placebo- und Gaboxadol-Gruppe vergleichbare Muster im Schlaf-Wach-Verhalten. In Übereinstimmung mit der Literatur über den Schlaf von Ratten während der ersten Hälfte der Dunkelphase (Borbély und Neuhaus 1979, Lancel und Kerkhof 1989), verbrachten die Ratten wenig Zeit im non-REM und REM Schlaf, die auftretenden Schlafepisoden waren kurz und die durchschnittliche SWA während des non-REM Schlafs war relativ gering und veränderte sich nicht im Verlauf der 6-Stunden Aufnahmeperiode. In der Placebo-Gruppe veränderten sich die Schlafparameter während des Experiments kaum von Tag zu Tag, was die Stabilität des Schlaf-Wach-Verhaltens verdeutlicht. Die einzigen Ausnahmen waren eine moderate Reduktion im Anteil an REM Schlaf aufgrund einer verminderten Anzahl an REM Schlafepisoden und ein leichter Rückgang in der niederfrequenten EEG-Aktivität während des non-REM Schlafs, die in beiden Gruppen auftraten. Der letztgenannte Effekt könnte durch die Umwachsung der EEG-Elektroden mit

Bindegewebe hervorgerufen worden sein, was die Amplitude des EEG-Signals im Verlauf der Zeit verringert. Die durch die erstmalige Gaboxadol-Administration hervorgerufenen Schlafeffekte stehen in Einklang mit früheren Veröffentlichungen zur akuten Wirkung von Gaboxadol auf das Schlaf-Wach-Verhalten von Ratten (Lancel und Faulhaber 1996, Lancel 1997). Im Vergleich zur Placebo-Gruppe zeigten die mit Gaboxadol behandelten Ratten einen deutlichen Anstieg in der Dauer der non-REM Schlafepisoden, während die Latenz zum non-REM Schlaf unverändert blieb. Dieser Befund unterstützt die Annahme, daß Gaboxadol eine eher schwache Wirkung auf die Initiation des non-REM Schlafs ausübt, jedoch signifikant die Kontinuität des non-REM Schlafs erhöht. In einer Studie an gesunden jungen Probanden, die durch einen Nachmittagsschlaf einen sehr geringen Schlafdruck aufwiesen, konnte kürzlich gezeigt werden, daß Gaboxadol in diesem Fall auch der Lage ist, die Einschlaf latenz auf normale Werte zu verkürzen (Mathias et al. 2001). Die spektrale Analyse des non-REM Schlaf-spezifischen EEG zeigte, daß Gaboxadol die Leistungsdichte in den Frequenzen unterhalb von 13 Hz erhöht, was im niedrigen Frequenzbereich von 1 - 5 Hz besonders stark ausgeprägt war. Da die Weckschwelle als Zeichen der Schlaftiefe im allgemeinen parallel zur EEG-Leistungsdichte im niederfrequenten Delta-Bereich ansteigt (Williams et al. 1964, Frederickson und Rechtschaffen 1978, Grahnstedt und Ursin 1980), deutet diese Beobachtung darauf hin, daß Gaboxadol die Intensität des non-REM Schlafs steigert. Die EEG-Leistungsdichte in den niedrigen Frequenzen wurde in diversen Schlafdeprivations-Experimenten als Parameter herangezogen und scheint einen zuverlässigen Index für die Schlaf-Homöostase darzustellen (Åkerstedt und Gillberg 1986; Lancel und Kerkhof 1989; Lancel et al. 1991). Der Anteil der im Pre-REM oder REM Schlaf verbrachten Zeit, sowie die zeitliche Verteilung des REM Schlafs wurden durch Gaboxadol nicht beeinflusst. Desweiteren bewirkte die Verabreichung von Gaboxadol keine Veränderungen der Muskelaktivität im Wachzustand. Diese Ergebnisse unterstützen die Vermutung, daß sich Gaboxadol selektiv nur auf non-REM Schlafprozesse auswirkt. Interessanterweise ähneln die Effekte von Gaboxadol auf den Schlaf sehr den durch lang anhaltende Wachheit ausgelösten. Schlafentzug führt bei Ratten zu einem Anstieg der Schlafenszeit (insbesondere des non-REM Schlafs) und zu einer Verlängerung der Dauer von Schlafepisoden. Desweiteren erhöht eine Schlafdeprivation konsequent die langsamen EEG-Komponenten im non-REM Schlaf (Borbély und Neuhaus, 1979; Mistlberger et al. 1983; Borbély et al. 1984; Lancel und Kerkhof 1989; Trachsel et al. 1989). Daher erscheint Gaboxadol ein Schlafprofil mit vielen Charakteristiken des Erholungsschlafs nach Schlafentzug zu induzieren.

## **4.4 Melatonin und Picrotoxin**

### **4.4.1 Picrotoxin**

Die subkonvulsive Dosierung des GABA<sub>A</sub>-Rezeptorblockers Picrotoxin führte zu einer vorübergehenden Abnahme der Gehirntemperatur und bewirkte deutliche Veränderungen im Schlaf-Wach-Verhalten. Insbesondere verlängerte es die Einschlafzeit um  $22 \pm 2,7$  Minuten (Picrotoxin versus Vehikel) beziehungsweise  $26,5 \pm 4,1$  Minuten (Picrotoxin + Melatonin versus Vehikel). Dies führte zu einer Erhöhung des Wach-Anteils und einer damit einhergehenden Verminderung der Zeit in allen anderen Vigilanzstadien. Desweiteren förderte Picrotoxin die EEG-Leistungsdichte in den Delta- und Theta-Frequenzbereichen im Non-REM Schlaf. Diese Erhöhung der niedrigfrequenten Aktivität könnte teilweise einen "rebound"-Effekt repräsentieren, da verlängerte Wachheit bekanntermaßen die EEG-Aktivität im Non-REM Schlaf, insbesondere in den Delta- und Theta-Frequenzbereichen, erhöht (Borbély et al. 1984; Tobler und Borbély 1986). Die Effekte von Picrotoxin stehen komplett in Einklang mit früheren Veröffentlichungen (Ali et al. 1999; Lancel et al. 1999) und zeigen, daß eine Inhibition der GABA<sub>A</sub>-Rezeptorfunktion massiv die Schlafinitiation verhindert. In Einklang hiermit fördern Substanzen, die die Wirkung von GABA am GABA<sub>A</sub>-Rezeptor potenzieren, wie zum Beispiel Barbiturate, hypnotische Benzodiazepine und anästhetische Neurosteroiden, zuverlässig den Schlaf (Übersicht in Lancel 1999).

### **4.4.2 Melatonin**

Die intraperitoneale Injektion von 5 und 10 mg/kg Melatonin in der Mitte der Lichtphase beeinflusste weder die Gehirntemperatur noch das Schlaf-Wach-Verhalten. Melatonin tendierte nur dazu eine leichte Verminderung der niederfrequenten Aktivität im EEG während des Non-REM Schlafs zu bewirken. Da es zu dieser Tageszeit sehr unwahrscheinlich durch Melatonin zu einer Phasenverschiebung circadianer Rhythmen kommt (Armstrong 1989), suggerieren diese Ergebnisse, daß Melatonin keine direkte Wirkung auf das Schlaf-Wach-Verhalten der Ratte ausübt. Frühere Studien über die Effekte von Melatonin auf den Schlaf in dieser Tierart führten zu sehr widersprüchlichen Ergebnissen die von einer schlaffördernden bis zu einer schlafmindernden Wirkung reichen (Mendelson et al. 1980; Holmes und Sugden 1982; Tobler et al. 1994; Huber et al. 1998). Jedoch stehen die Ergebnisse der vorliegenden Studie in Einklang mit zwei in jüngerer Zeit erschienenen Veröffentlichungen. In einer Studie zeigte die intraperitoneale Applikation von 3 mg/kg Melatonin zu Beginn der Lichtphase keinen Einfluß auf die Gehirntemperatur oder Schlafarchitektur, führte aber zu einer leichten

Verringerung der niederfrequenten EEG-Aktivität im Non-REM Schlaf (Tobler et al. 1994). In der anderen Studie wurde die selbe Dosis Melatonin zu Beginn der Dunkelphase injiziert, und es konnten auch keine signifikanten Effekte ermittelt werden (Huber et al. 1998). Die Ergebnisse der vorliegenden und der zwei oben zitierten Studien deuten darauf hin, daß pharmakologische Dosierungen von Melatonin unabhängig von der Tageszeit kaum das Schlaf-Wach-Verhalten von Ratten beeinflussen. Melatonin führt lediglich zu einer leichten Verminderung der Leistungsdichte in den niedrigen Frequenzen des Non-REM Schlaf-EEG, was auch bei Menschen beobachtet wurde (Übersicht in Dijk und Cajochen 1997). Das Verschwinden dieses geringen Effekts in Kombination mit Picrotoxin ist der einzige Hinweis auf eine mögliche GABAerge Wirkung von Melatonin. Da Substanzen, die zu einer Verstärkung der Wirkung von GABA am GABA<sub>A</sub>-Rezeptor führen, bei Ratten und Menschen sowohl während der circadianen Ruhe- als auch Aktivitätsphase hypnotische Effekte ausüben (Nicholson und Pascoe 1988; Dijk et al. 1989; Trachsel et al. 1990; Edgar et al. 1991, 1997; Kanno et al. 1993; Lancel et al. 1997a), legen die Ergebnisse der vorliegenden Studie nahe, daß exogenes Melatonin nicht als potenter Modulator der GABA<sub>A</sub>-Rezeptorfunktion wirkt. Dieses Postulat wird weiterhin durch die Beobachtung unterstützt, daß Melatonin nicht der wachheitsfördernden Wirkung von Picrotoxin entgegenwirkt. So wurde gezeigt, daß Progesteron, welches den Schlaf hauptsächlich durch die positive Interaktion seiner neuroaktiven Metabolite Pregnanolon und Allopregnanolon mit dem GABA<sub>A</sub>-Rezeptor fördert, signifikant der durch Picrotoxin bewirkten Zunahme an Wachheit und Förderung der niederfrequenten EEG-Aktivität entgegenwirkt (Lancel et al. 1999). Der hier postulierte fehlende Einfluß von Melatonin auf die Funktion des GABA<sub>A</sub>-Rezeptors bei Ratten könnte auf den Menschen übertragbar sein, da eine in letzter Zeit erschienene Veröffentlichung zeigte, daß die schlaffördernde Wirkung von Melatonin nicht durch den Benzodiazepin-Antagonisten Flumazenil blockiert werden (Nave et al. 1996).

Die Tatsache, daß supraphysiologische Dosierungen von Melatonin kaum das Schlaf-Wach-Verhalten von Ratten beeinflussen, deutet darauf hin, daß die schlaffördernden Effekte beim Menschen wahrscheinlich nicht durch eine Modulation der GABA<sub>A</sub>-Rezeptor-vermittelten Transmission, sondern durch die chronobiotische Eigenschaft des Melatonins, Informationen über die Tageszeit zu übermitteln, hervorgerufen werden.

## 4.5 Abschlußdiskussion

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, daß das endogene Hormon Melatonin nicht als Schlafmittel im eigentlichen Sinne angesehen werden kann. Im Gegensatz zu früheren Vermutungen scheint Melatonin keine direkte Wirkung auf das Schlaf-Wach-Verhalten auszuüben. Es erscheint wahrscheinlich, daß die Berichte über eine schlafinduzierende Aktion von Melatonin, insbesondere beim Menschen während des Tages, auf eine Veränderung der circadianen Rhythmik durch die exogene Applikation von Melatonin zurückzuführen sind. Dies wird in den Veröffentlichungen der letzten Jahre zunehmend propagiert, in denen Melatonin häufig als "chronobiotische Substanz" beschrieben wird, die zur schnelleren Modulation der circadianen Rhythmik bei Phasenverschiebungen ("Jetlag") oder zur Behebung anderer Störungen des Tag-Nacht-Rhythmus (Schichtarbeit, freilaufender Rhythmus bei Blindheit, etc.) indiziert ist.

Im Gegensatz zu Melatonin können das klassische Benzodiazepin Midazolam, das  $\omega_1$ -selektive Pyrazolopyrimidin Zaleplon und der GABA<sub>A</sub>-Rezeptoragonist Gaboxadol eindeutig als Hypnotika bezeichnet werden. Alle drei Substanzen wirken am GABA<sub>A</sub>-Rezeptor und haben aufgrund ihrer spezifischen Bindungscharakteristika verschiedene Gemeinsamkeiten und Unterschiede in Hinsicht auf ihre Wirkung auf das Schlaf-Wach-Verhalten von Ratten. Midazolam und Zaleplon wirken beide als agonistische Modulatoren des GABA<sub>A</sub>-Rezeptors und steigern die Wirkung des natürlichen Agonisten GABA. Während Midazolam unspezifisch an den  $\omega_1$ - oder  $\omega_2$ -Subtyp des GABA<sub>A</sub>-Rezeptors bindet, aktiviert Zaleplon spezifisch nur den  $\omega_1$ -Subtyp. Da beide Substanzen ähnliche Halbwertszeiten haben und der hauptsächliche Unterschied zwischen ihnen in ihrer Selektivität für die Bindungsstellen des GABA<sub>A</sub>-Rezeptors besteht, erscheint es möglich, daß die den beiden Substanzen gemeinsamen schlafinduzierenden Wirkungen über die  $\omega_1$ -Bindungsstelle vermittelt werden, während die abweichenden Effekte auf den pre-REM Schlaf und das non-REM Schlaf-EEG durch Interaktion mit anderen Bindungsstellen hervorgerufen werden. Im Gegensatz zu Midazolam und Zaleplon wirkt Gaboxadol nicht als agonistischer Modulator, sondern als Agonist am GABA<sub>A</sub>-Rezeptor und bewirkt unabhängig von GABA eine Aktivierung des Rezeptors. Da Gaboxadol im Gegensatz zu GABA auch nicht sofort vom Neuron aufgenommen und somit aus dem synaptischen Spalt entfernt wird, führt es wahrscheinlich zu einer länger anhaltenden Aktivierung des GABA<sub>A</sub>-Rezeptors. Dieser Unterschied im Wirkmechanismus könnte für die verschiedenartige Wirkung von Gaboxadol im Vergleich zu Midazolam und Zaleplon verantwortlich sein. So übt Gaboxadol kaum Effekte auf den REM

Schlaf oder die Muskelaktivität aus, während die schlaffördernden Wirkungen von Gaboxadol, mit Ausnahme der fehlenden Verkürzung der Schlaflatenz, ähnlich denen der beiden agonistischen GABA<sub>A</sub>-Rezeptormodulatoren sind. Bezüglich ihres Effekts auf die Schlaflatenz unterscheiden sich alle drei Hypnotika voneinander. Während Midazolam, wie allgemein für agonistische Modulatoren des GABA<sub>A</sub>-Rezeptors üblich, zu jeder Tageszeit die Latenz zum non-REM Schlaf verkürzt (diese Studie; Lancel et al. 1996), führt Zaleplon in Abhängigkeit von der Tageszeit zu gegensätzlichen Effekten auf die non-REM Schlaflatenz. Auch für die Entwicklung der Toleranz scheint der verschiedenartige Wirkmechanismus eine Rolle zu spielen. Während die tägliche Gabe von Midazolam oder Zaleplon innerhalb von 3 Tagen zu einer Toleranz gegenüber der Verlängerung der non-REM Schlafepisodendauer, und damit auch der Erhöhung des non-REM Schlafanteils und Verminderung des Wachanteils führte, zeigten sich bei täglicher Gaboxadol-Verabreichung über 5 Tage keinerlei Anzeichen einer Toleranzentwicklung.

In der Wirkung auf die spektrale Zusammensetzung des non-REM Schlaf-EEG unterscheiden sich Midazolam und Zaleplon deutlich voneinander, während Gaboxadol und Zaleplon vergleichbare Änderungen hervorrufen. Während Midazolam die Leistungsdichte in den niedrigen Frequenzen verringert, wird diese durch Zaleplon und Gaboxadol erhöht. Allerdings scheinen die beiden Substanzen diesen Effekt auf unterschiedlichem Wege auszuüben, da Gaboxadol die SWA selektiv nur während des non-REM Schlafs erhöht, während Zaleplon dies zu einem gewissen Maß auch im Wachzustand tut.

Die Ergebnisse dieser Arbeit geben Hinweise auf die verschiedenartigen Veränderungen des Schlaf-Wach-Verhaltens durch klassische und neuartige Hypnotika mit unterschiedlicher Spezifität für Bindungsstellen des GABA<sub>A</sub>-Rezeptors. Die weitere Erforschung der Effekte von agonistischen GABA<sub>A</sub>-Rezeptormodulatoren mit verschiedener Spezifität für einzelne Subtypen sowie von GABA<sub>A</sub>-Rezeptoragonisten auf den Schlaf am Modell der Ratte scheint eine gute Methode zur Aufklärung der für die Vermittlung von hypnotischen Eigenschaften verantwortlichen Rezeptoren darzustellen. Dies würde die Entwicklung idealer Schlafmittel mit spezifischen Wirkeigenschaften deutlich voranbringen.

## 5 ZUSAMMENFASSUNG

Schlaflosigkeit (Insomnie) ist ein großes medizinisches Problem unserer Zeit, das überwiegend medikamentös behandelt wird. Am häufigsten werden hierzu zur Klasse der Benzodiazepine gehörende Schlafmittel verordnet, die jedoch neben den gewünschten schlaffördernden Effekten auch noch einige unerwünschte Nebeneffekte haben. Darum geht die Suche nach einem idealen Schlafmittel weiter, wobei die erste Charakterisierung der Effekte oftmals am Modell der Ratte erfolgt.

In dieser Arbeit wurden die akuten und subchronischen Effekte des klassischen Benzodiazepins Midazolam, des neuartigen Nicht-Benzodiazepin Hypnotikums Zaleplon, des GABA<sub>A</sub>-Agonisten Gaboxadol und des Hormons Melatonin auf das Schlaf-Wach-Verhalten der Ratte untersucht. Melatonin bewirkte in der Mitte der Ruhephase der Tiere keine deutlichen Veränderungen des Schlaf-Wach-Verhaltens, während Midazolam, Zaleplon und Gaboxadol zu Beginn der Aktivitätsphase klare schlaffördernde Effekte ausübten. Midazolam und Zaleplon erhöhten den Anteil an non-REM Schlaf und verringerten die Zeit im Wachzustand, jedoch entwickelte sich diesen Effekten gegenüber recht schnell Toleranz. Der Anteil an pre-REM Schlaf wurde nur durch Midazolam stark erhöht und der REM Schlaf wurde von Midazolam und Zaleplon unterdrückt, während Gaboxadol keine Veränderungen in diesen Schlafstadien hervorrief. Midazolam und Zaleplon verkürzten an allen Behandlungstagen die Einschlaf latenz und alle drei Schlafmittel bewirkten eine Verlängerung der non-REM Schlafepisoden, die jedoch nur bei Gaboxadol über den gesamten Behandlungszeitraum bestehen blieb. Die niederfrequente Aktivität im non-REM Schlaf-EEG wurde durch Midazolam verringert und durch Zaleplon und Gaboxadol erhöht. Während Midazolam und Zaleplon die Muskelaktivität im Wachzustand verringerten, übte Gaboxadol keinen Effekt hierauf aus.

Da sich die drei untersuchten Hypnotika hauptsächlich in ihrer Spezifität für Bindungsstellen am GABA<sub>A</sub>-Rezeptor unterscheiden, gibt diese Arbeit Hinweise auf die Vermittlung einzelner Effekte durch bestimmte Subtypen des GABA<sub>A</sub>-Rezeptors und zeigt Unterschiede und Gemeinsamkeiten in der Wirkung agonistischer GABA<sub>A</sub>-Rezeptormodulatoren (Midazolam und Zaleplon) und GABA<sub>A</sub>-Rezeptoragonisten (Gaboxadol) auf.

## 6 LITERATURVERZEICHNIS

**Aeschbach D, Dijk DJ, Trachsel L, Brunner DP und Borbély AA (1994)** Dynamics of slow-wave activity and spindle frequency activity in the human sleep EEG: effect of midazolam and zopiclone. *Neuropsychopharmacology*, 11: 237-44

**Åkerstedt T und Gillberg M (1986)** Sleep duration and the power spectral density of the EEG. *Electroencephalography & Clinical Neurophysiology*, 64: 119-22

**Ali M, Jha SK, Kaur S und Mallick BN (1999)** Role of GABA-A receptor in the preoptic area in the regulation of sleep-wakefulness and rapid eye movement sleep. *Neuroscience Research*, 33: 245-250

**Alvarino F, Monti JM, Jantos H und Monti D (1999)** Effect of SX-3228, a selective ligand for the BZ1 receptor, on sleep and waking during the light-dark cycle in the rat. *Brazilian Journal of Medical & Biological Research*, 32: 1007-14

**Armstrong SM (1989)** Melatonin and circadian control in mammals. *Experientia*, 45: 932-8

**Aserinsky E und Kleitman N (1953)** Regularly occurring periods of eye motility, and concomitant phenomena, during sleep. *Science*, 118: 273-274

**Barker JL, Harrison NL und Mariani AP (1986)** Benzodiazepine pharmacology of cultured mammalian CNS neurons. *Life Sciences*, 39: 1959-68

**Beer B, Ieni JR, Wu WH, Clody D, Amorusi P, Rose J, Mant T, Gaudreault J, Cato A und Stern W (1994)** A placebo-controlled evaluation of single, escalating doses of CL 284,846, a non-benzodiazepine hypnotic. *Journal of Clinical Pharmacology*, 34: 335-44

**Beer B, Clody DE, Mangano R, Levner M, Mayer P und Barrett JE (1997)** A review of the preclinical development of zaleplon, a novel non-benzodiazepine hypnotic for the treatment of insomnia. *Cns Drug Rev*, 3: 207-224

**Bloom FE und Iversen LL (1971)** Localizing 3H-GABA in nerve terminals of rat cerebral cortex by electron microscopic autoradiography. *Nature*, 229: 628-30

**Borbély AA und Neuhaus HU (1979)** Sleep-deprivation: Effects on sleep and EEG in the rat. *Journal of Comparative Physiology*, 133: 71-87

**Borbély AA (1982)** A two process model of sleep regulation. *Human Neurobiology*, 1: 195-204

**Borbély AA, Tobler I und Hanagasioglu M (1984)** Effect of sleep deprivation on sleep and EEG power spectra in the rat. *Behavioural Brain Research*, 14: 171-82

**Borbély AA, Mattmann P, Loeffe M, Strauch I und Lehmann D (1985)** Effect of benzodiazepine hypnotics on all-night sleep EEG spectra. *Human Neurobiology*, 4: 189-94

**Brown CR, Sarnquist FH, Canup CA und Pedley TA (1979)** Clinical, electroencephalographic, and pharmacokinetic studies of a water-soluble benzodiazepine, midazolam maleate. *Anesthesiology*, 50: 467-70

**Brunner DP, Dijk DJ, Munch M und Borbély AA (1991)** Effect of zolpidem on sleep and sleep EEG spectra in healthy young men. *Psychopharmacology*, 104: 1-5

**Cardinali DP (1981)** Melatonin. I A mammalian pineal hormone. *Endocrine Reviews*, 2: 327-46

**Cohen RA und Albers HE (1991)** Disruption of human circadian and cognitive regulation following a discrete hypothalamic lesion: a case study. *Neurology*, 41: 726-9

**Coloma FM und Niles LP (1988)** Melatonin enhancement of [3H]-gamma-aminobutyric acid and [3H]muscimol binding in rat brain. *Biochemical Pharmacology*, 37: 1271-4

**Crespi F (1999)** Cholecystokinin-B (CCK-B) receptor antagonists improve "aged" sleep: a new class of sleep modulators? *Methods & Findings in Experimental & Clinical Pharmacology*, 21: 31-8

**Dawson D und Armstrong SM (1996)** Chronobiotics - drugs that shift rhythms. *Pharmacology & Therapeutics*, 69: 15-36

**Dämgen K und Lüddens H (1999)** Zaleplon displays a selectivity to recombinant GABA(A) receptors different from zolpidem, zopiclone and benzodiazepines. *Neuroscience Research Communications*, 25: 139-148

**Dement W und Kleitman N (1957)** Cyclic variations in EEG during sleep and their relation to eye movements, body motility, and dreaming. *Electroencephalography & Clinical Neurophysiology*, 9: 673-690

**Depoortere H, Zivkovic B, Lloyd KG, Sanger DJ, Perrault G, Langer SZ und Bartholini G (1986)** Zolpidem, a novel nonbenzodiazepine hypnotic. I. Neuropharmacological and behavioral effects. *Journal of Pharmacology & Experimental Therapeutics*, 237: 649-58

**Depoortere H, Francon D, van Luijtelaa EL, Drinkenburg WH und Coenen AM (1995)** Differential effects of midazolam and zolpidem on sleep-wake states and epileptic activity in WAG/Rij rats. *Pharmacology, Biochemistry & Behavior*, 51: 571-6

**Depoortere H, Decobert M, Perrault G, Francon D und Sanger DJ (1998)** Neuropharmacological profile of zaleplon, a novel BZ1(omega1) hypnotic, in rodents. *Journal of Sleep Research*, 7: 64

**Dijk DJ, Beersma DG, Daan S und van den Hoofdakker RH (1989)** Effects of seganserin, a 5-HT<sub>2</sub> antagonist, and temazepam on human sleep stages and EEG power spectra. *European Journal of Pharmacology*, 171: 207-18

**Dijk DJ und Cajochen C (1997)** Melatonin and the circadian regulation of sleep initiation, consolidation, structure, and the sleep EEG. *Journal of Biological Rhythms*, 12: 627-35

- Dooley M und Plosker GL (2000)** Zaleplon - A review of its use in the treatment of insomnia. *Drugs*, 60: 413-445
- Dubocovich ML (1991)** Melatonin receptors in the central nervous system. *Advances in Experimental Medicine & Biology*, 294: 255-65
- Dubocovich ML, Benloucif S und Masana MI (1996)** Melatonin receptors in the mammalian suprachiasmatic nucleus. *Behavioural Brain Research*, 73: 141-7
- Edgar DM, Seidel WF und Dement WC (1991)** Triazolam-induced sleep in the rat: influence of prior sleep, circadian time, and light/dark cycles. *Psychopharmacology*, 105: 374-80
- Edgar DM, Seidel WF, Gee KW, Lan NC, Field G, Xia H, Hawkinson JE, Wieland S, Carter RB und Wood PL (1997)** CCD-3693: an orally bioavailable analog of the endogenous neuroactive steroid, pregnanolone, demonstrates potent sedative hypnotic actions in the rat. *Journal of Pharmacology & Experimental Therapeutics*, 282: 420-9
- Elie R, Ruther E, Farr I, Emilien G und Salinas E (1999)** Sleep latency is shortened during 4 weeks of treatment with zaleplon a novel nonbenzodiazepine hypnotic. *Journal of Clinical Psychiatry*, 60: 536-544
- Fahn S und Cote LJ (1968)** Regional distribution of gamma-aminobutyric acid (GABA) in brain of the rhesus monkey. *Journal of Neurochemistry*, 15: 209-13
- Faulhaber J, Steiger A und Lancel M (1997)** The GABAA agonist THIP produces slow wave sleep and reduces spindling activity in NREM sleep in humans. *Psychopharmacology*, 130: 285-91
- Feige B, Voderholzer U, Riemann D, Hohagen F und Berger M (1999)** Independent sleep EEG slow-wave and spindle band dynamics associated with 4 weeks of continuous application of short-half-life hypnotics in healthy subjects. *Clinical Neurophysiology*, 110: 1965-74
- File SE (1981)** Rapid development of tolerance to the sedative effects of lorazepam and triazolam in rats. *Psychopharmacology*, 73: 240-5
- File SE (1985)** Tolerance to the behavioral actions of benzodiazepines. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 9: 113-21
- Frederickson CJ und Rechtschaffen A (1978)** Effects of sleep deprivation on awakening thresholds and sensory evoked potentials in the rat. *Sleep*, 1: 69-82
- Fry J, Scharf M, Mangano R und Fujimori M (2000)** Zaleplon improves sleep without producing rebound effects in outpatients with insomnia. *International Clinical Psychopharmacology*, 15: 141-152
- Gandolfo G, Scherschlicht R und Gottesmann C (1994)** Benzodiazepines promote the intermediate stage at the expense of paradoxical sleep in the rat. *Pharmacology, Biochemistry & Behavior*, 49: 921-7

**Garfinkel D, Zisapel N, Wainstein J und Laudon M (1999)** Facilitation of benzodiazepine discontinuation by melatonin - A new clinical approach. *Archives of Internal Medicine.*, 159: 2456-2460

**Gaudreault J, Varin F und Pollack GM (1995)** Pharmacokinetics and anticonvulsant effect of a new hypnotic, CL 284,846, in rats. *Pharmaceutical Research*, 12: 1592-7

**Golombek DA, Escobar E, Burin LJ, De Brito Sanchez MG und Cardinali DP (1991)** Time-dependent melatonin analgesia in mice: inhibition by opiate or benzodiazepine antagonism. *European Journal of Pharmacology*, 194: 25-30

**Golombek DA, Martini M und Cardinali DP (1993)** Melatonin as an anxiolytic in rats: time dependence and interaction with the central GABAergic system. *European Journal of Pharmacology*, 237: 231-6

**Golombek DA, Pevet P und Cardinali DP (1996)** Melatonin effects on behavior: possible mediation by the central GABAergic system. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 20: 403-12

**Gottesmann C (1996)** The transition from slow-wave sleep to paradoxical sleep: evolving facts and concepts of the neurophysiological processes underlying the intermediate stage of sleep. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 20: 367-87

**Gottesmann C, Gandolfo G, Arnaud C und Gauthier P (1998)** The intermediate stage and paradoxical sleep in the rat: influence of three generations of hypnotics. *European Journal of Neuroscience*, 10: 409-14

**Grahnstedt S und Ursin R (1980)** Awakening thresholds for electrical brain stimulation in five sleep-waking stages in the cat. *Electroencephalography & Clinical Neurophysiology*, 48: 222-9

**Griebel G, Sanger DJ und Perrault G (1996)** Further evidence for differences between non-selective and BZ-1 (omega 1) selective, benzodiazepine receptor ligands in murine models of "state" and "trait" anxiety. *Neuropharmacology*, 35: 1081-91

**Griebel G, Perrault G und Sanger DJ (1998)** Limited anxiolytic-like effects of non-benzodiazepine hypnotics in rodents. *Journal of Psychopharmacology*, 12: 356-65

**Hedner J, Yaeche R, Emilien G, Farr I und Salinas E (2000)** Zaleplon shortens subjective sleep latency and improves subjective sleep quality in elderly patients with insomnia. *International Journal of Geriatric Psychiatry*, 15: 704-712

**Hemmeter U, Muller M, Bischof R, Annen B und Holsboer-Trachsler E (2000)** Effect of zopiclone and temazepam on sleep EEG parameters, psychomotor and memory functions in healthy elderly volunteers. *Psychopharmacology*, 147: 384-96

**Holm KJ und Goa KL (2000)** Zolpidem: an update of its pharmacology, therapeutic efficacy and tolerability in the treatment of insomnia. *Drugs*, 59: 865-89

**Holmes SW und Sugden D (1982)** Effects of melatonin on sleep and neurochemistry in the rat. *British Journal of Pharmacology*, 76: 95-101

- Huber R, Deboer T, Schwierin B und Tobler I (1998)** Effect of melatonin on sleep and brain temperature in the Djungarian hamster and the rat. *Physiology & Behavior*, 65: 77-82
- Hurst M und Noble S (1999)** Zaleplon. *Cns Drugs.*, 11: 387-392
- Kales A, Soldatos CR, Bixler EO und Kales JD (1983)** Rebound insomnia and rebound anxiety: a review. *Pharmacology*, 26: 121-37
- Kales A, Vgontzas AN und Bixler EO (1995)** Hypnotic drugs. *Handbook of Experimental Pharmacology*, 116: 345-385
- Kanno O, Watanabe H und Kazamatsuri H (1993)** Effects of zopiclone, flunitrazepam, triazolam and levomepromazine on the transient change in sleep-wake schedule: polygraphic study, and the evaluation of sleep and daytime condition. *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry*, 17: 229-39
- Lader M (1990)** Drug development optimization--benzodiazepines. *Agents & Actions - Supplements*, 29: 59-69
- Lancel M und Kerkhof GA (1989)** Effects of repeated sleep deprivation in the dark- or light-period on sleep in rats. *Physiology & Behavior*, 45: 289-97
- Lancel M, van Riezen H und Glatt A (1991)** Effects of circadian phase and duration of sleep deprivation on sleep and EEG power spectra in the cat. *Brain Research*, 548: 206-14
- Lancel M, Cronlein TA, Muller-Preuss P und Holsboer F (1994)** Pregnenolone enhances EEG delta activity during non-rapid eye movement sleep in the rat, in contrast to midazolam. *Brain Research*, 646: 85-94
- Lancel M und Faulhaber J (1996)** The GABAA agonist THIP (gaboxadol) increases non-REM sleep and enhances delta activity in the rat. *Neuroreport*, 7: 2241-5
- Lancel M, Cronlein TA und Faulhaber J (1996)** Role of GABAA receptors in sleep regulation. Differential effects of muscimol and midazolam on sleep in rats. *Neuropsychopharmacology*, 15: 63-74
- Lancel M (1997)** The GABA(A) agonist THIP increases non-REM sleep and enhances non-REM sleep-specific delta activity in the rat during the dark period. *Sleep*, 20: 1099-104
- Lancel M, Faulhaber J, Schiffelholz T, Mathias S und Deisz RA (1997a)** Muscimol and midazolam do not potentiate each other's effects on sleep EEG in the rat. *Journal of Neurophysiology*, 77: 1624-9
- Lancel M, Faulhaber J, Schiffelholz T, Romeo E, Di Michele F, Holsboer F und Rupprecht R (1997b)** Allopregnanolone affects sleep in a benzodiazepine-like fashion. *Journal of Pharmacology & Experimental Therapeutics*, 282: 1213-8
- Lancel M (1999)** Role of GABA(A) receptors in the regulation of sleep: Initial sleep responses to peripherally administered modulators and agonists. *Sleep*, 22: 33-42

**Lancel M, Faulhaber J, Holsboer F und Rupprecht R (1999)** The GABA(A) receptor antagonist picrotoxin attenuates most sleep changes induced by progesterone. *Psychopharmacology*, 141: 213-9

**Longo VG, Massotti M, DeMedici D und Valerio A (1988)** Modifications of brain electrical activity after activation of the benzodiazepine receptor types in rats and rabbits. *Pharmacology, Biochemistry & Behavior*, 29: 785-90

**MacDonald RL und Olsen RW (1994)** GABAA receptor channels. *Annual Review of Neuroscience*, 17: 569-602

**Marangos PJ, Patel J, Hirata F, Sondhein D, Paul SM, Skolnick P und Goodwin FK (1981)** Inhibition of diazepam binding by tryptophan derivatives including melatonin and its brain metabolite N-acetyl-5-methoxy kynurenamine. *Life Sciences*, 29: 259-67

**Mathias S, Steiger A und Lancel M (2001)** The GABA(A) agonist gaboxadol improves the quality of post-nap sleep. *Psychopharmacology*, 157: 299-304

**Mendelson WB, Gillin JC, Dawson SD, Lewy AJ und Wyatt RJ (1980)** Effects of melatonin and propranolol on sleep of the rat. *Brain Research*, 201: 240-4

**Mendelson WB, Martin JV, Perlis M und Wagner R (1987)** Sleep and benzodiazepine receptor sub-types. *Journal of Neural Transmission*, 70: 329-36

**Mistlberger RE, Bergmann BM, Waldenar W und Rechtschaffen A (1983)** Recovery sleep following sleep deprivation in intact and suprachiasmatic nuclei-lesioned rats. *Sleep*, 6: 217-33

**Mitler MM (2000)** Nonselective and selective benzodiazepine receptor agonists--where are we today? *Sleep*, 23: S39-47

**Monti JM (1981)** Sleep laboratory and clinical studies of the effects of triazolam, flunitrazepam and flurazepam in insomniac patients. *Methods & Findings in Experimental & Clinical Pharmacology*, 3: 303-26

**Nave R, Herer P, Haimov I, Shlitner A und Lavie P (1996)** Hypnotic and hypothermic effects of melatonin on daytime sleep in humans: lack of antagonism by flumazenil. *Neuroscience Letters*, 214: 123-6

**Neckelmann D und Ursin R (1993)** Sleep stages and EEG power spectrum in relation to acoustical stimulus arousal threshold in the rat. *Sleep*, 16: 467-77

**Perry TL, Berry K, Hansen S, Diamond S und Mok C (1971)** Regional distribution of amino acids in human brain obtained at autopsy. *Journal of Neurochemistry*, 18: 513-9

**Pieri L, Schaffner R, Scherschlicht R, Polc P, Sepinwall J, Davidson A, Mohler H, Cumin R, Da Prada M, Burkard WP, Keller HH, Muller RK, Gerold M, Pieri M, Cook L und Haefely W (1981)** Pharmacology of midazolam. *Arzneimittel-Forschung*, 31: 2180-201

- Pierrefiche G, Zerbib R und Laborit H (1993)** Anxiolytic activity of melatonin in mice: involvement of benzodiazepine receptors. *Research Communications in Chemical Pathology & Pharmacology*, 82: 131-42
- Radulovacki M, Sreckovic G, Zak R und Zahrebelski G (1984)** Diazepam and midazolam increase light slow-wave sleep (SWS1) and decrease wakefulness in rats. *Brain Research*, 303: 194-6
- Ramsey-Williams VA, Wu Y und Rosenberg HC (1994)** Comparison of anticonvulsant tolerance, crosstolerance, and benzodiazepine receptor binding following chronic treatment with diazepam or midazolam. *Pharmacology, Biochemistry & Behavior*, 48: 765-72
- Rechtschaffen A und Kales A (1968)** A manual of standardized terminology, techniques and scoring system for sleep stages of human subjects. National Institute of Health Publications, US Government Printing Office, 204
- Rudolph U, Crestani F, Benke D, Brunig I, Benson JA, Fritschy JM, Martin JR, Bluethmann H und Mohler H (1999)** Benzodiazepine actions mediated by specific gamma-aminobutyric acid(A) receptor subtypes. *Nature*, 401: 796-800
- Sanger DJ, Morel E und Perrault G (1996)** Comparison of the pharmacological profiles of the hypnotic drugs, zaleplon and zolpidem. *European Journal of Pharmacology*, 313: 35-42
- Scherschlicht R und Marias J (1983)** Effects of oral and intravenous midazolam, triazolam and flunitrazepam on the sleep-wakefulness cycle of rabbits. *British Journal of Clinical Pharmacology*, 16: 29S-35S
- Schultz B, Aaes-Jorgensen T, Bogeso KP und Jorgensen A (1981)** Preliminary studies on the absorption, distribution, metabolism, and excretion of THIP in animal and man using <sup>14</sup>C-labelled compound. *Acta Pharmacologica et Toxicologica*, 49: 116-24
- Sieghart W (1995)** Structure and pharmacology of gamma-aminobutyric acidA receptor subtypes. *Pharmacological Reviews*, 47: 181-234
- Stankov B, Biella G, Panara C, Lucini V, Capsoni S, Fauteck J, Cozzi B und Fraschini F (1992)** Melatonin signal transduction and mechanism of action in the central nervous system: using the rabbit cortex as a model. *Endocrinology*, 130: 2152-9
- Steinlechner S (1996)** Melatonin as a chronobiotic: PROS and CONS. *Acta Neurobiologiae Experimentalis*, 56: 363-72
- Study RE und Barker JL (1981)** Diazepam and (–)-pentobarbital: fluctuation analysis reveals different mechanisms for potentiation of gamma-aminobutyric acid responses in cultured central neurons. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 78: 7180-4
- Tobler I, Borbély AA und Groos G (1983)** The effect of sleep deprivation on sleep in rats with suprachiasmatic lesions. *Neuroscience Letters*, 42: 49-54
- Tobler I und Borbély AA (1986)** Sleep EEG in the rat as a function of prior waking. *Electroencephalography & Clinical Neurophysiology*, 64: 74-6

**Tobler I, Jaggi K und Borbély AA (1994)** Effects of melatonin and the melatonin receptor agonist S-20098 on the vigilance states, EEG spectra, and cortical temperature in the rat. *Journal of Pineal Research*, 16: 26-32

**Tobler I, Kopp C, Deboer T und Rudolph U (2001)** Diazepam-induced changes in sleep: role of the alpha 1 GABA(A) receptor subtype. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98: 6464-9

**Trachsel L, Tobler I und Borbély AA (1989)** Effect of sleep deprivation on EEG slow wave activity within non-REM sleep episodes in the rat. *Electroencephalography & Clinical Neurophysiology*, 73: 167-71

**Trachsel L, Dijk DJ, Brunner DP, Klene C und Borbély AA (1990)** Effect of zopiclone and midazolam on sleep and EEG spectra in a phase-advanced sleep schedule. *Neuropsychopharmacology*, 3: 11-8

**Trachsel L, Edgar DM, Seidel WF, Heller HC und Dement WC (1992)** Sleep homeostasis in suprachiasmatic nuclei-lesioned rats: effects of sleep deprivation and triazolam administration. *Brain Research*, 589: 253-61

**Walsh JK, Fry J, Erwin CW, Scharf M, Roth T und Vogel GW (1998)** Efficacy and tolerability of 14-day administration of zaleplon 5 mg and 10 mg for the treatment of primary insomnia. *Clinical Drug Investigation*, 16: 347-354

**Weitzel KW, Wickman JM, Augustin SG und Strom JG (2000)** Zaleplon: A pyrazolopyrimidine sedative-hypnotic agent for the treatment of insomnia. *Clinical Therapeutics*, 22: 1254-1267

**Williams HL, Hammack JT, Daly RL, Dement WC und Lubin A (1964)** Responses to auditory stimulation, sleep loss and the EEG stages of sleep. *Electroencephalography & Clinical Neurophysiology*, 16: 269-279

**Yoshimoto M, Higuchi H, Kamata M, Yoshida K, Shimizu T und Hishikawa Y (1999)** The effects of benzodiazepine (triazolam), cyclopyrrolone (zopiclone) and imidazopyridine (zolpidem) hypnotics on the frequency of hippocampal theta activity and sleep structure in rats. *European Neuropsychopharmacology*, 9: 29-35

**Young AB und Chu D (1990)** Distribution of GABA(A) and GABA(B) receptors in mammalian brain: Potential targets for drug development. *Drug Development Research*, 21: 161-167

**Zhdanova IV und Wurtman RJ (1997)** Efficacy of melatonin as a sleep-promoting agent. *Journal of Biological Rhythms*, 12: 644-650

**Teile dieser Arbeit wurden in folgenden Artikeln veröffentlicht:**

**Lancel M und Langebartels A (2000)**  $\gamma$ -aminobutyric acid<sub>A</sub> (GABA<sub>A</sub>) agonist 4,5,6,7-tetrahydroisoxazolo[4,5-c]pyridin-3-ol persistently increases sleep maintenance and intensity during chronic administration to rats. *Journal of Pharmacology & Experimental Therapeutics*, 293: 1084-1090.

**Langebartels A, Mathias S und Lancel M (2001)** Acute effects of melatonin on spontaneous and picrotoxin-evoked sleep-wake behaviour in the rat. *Journal of Sleep Research*, 10: 211-217.

## **7 DANKSAGUNG**

Mein größter Dank gilt meiner Chefin Frau PD Dr. Marike Lancel, in deren Arbeitsgruppe am Max-Planck-Institut für Psychiatrie ich diese Arbeit anfertigen konnte. Sie hatte immer ein offenes Ohr für meine Fragen und Vorschläge und stand mir stets mit wertvollen Ratschlägen und Anregungen zur Seite.

Ich danke Herrn Prof. Dr. Dr. Florian Holsboer, dem Leiter des Max-Planck-Instituts für Psychiatrie, der überhaupt diese Arbeit ermöglicht hat und sich auch als Gutachter zur Verfügung stellte.

Außerdem danke ich Herrn Prof. Dr. Hans-Joachim Leppelsack vom Fachgebiet Zoologie der TU München, der sich freundlicherweise bereit erklärt hat, die Betreuung dieser Arbeit zu übernehmen.

Den Kolleginnen und Kollegen am Max-Planck-Institut danke ich für die Unterstützung und das angenehme Arbeitsklima. Insbesondere ist Herr Dipl.-Ing. Arnold Höhne zu erwähnen, ohne den die ganze Elektronik nicht funktionieren würde, und der auch jederzeit gerne Fragen dazu beantwortet hat.

Darüber hinaus bin ich all meinen Freundinnen und Freunden dankbar, die ich auch spät abends noch anrufen konnte und die mich in Stresssituationen immer aufgebaut und unterstützt haben.

---

## 8 LEBENS LAUF

### Persönliche Daten:

Name: Langebartels  
Vorname: Anke  
Geburtsdatum: 07.11.1970  
Geburtsort: Hannover

### Schulbildung:

1977 - 1981 Grundschule am Welfenplatz, Hannover  
1981 - 1983 Orientierungsstufe Isernhagener Straße, Hannover  
1983 - 1990 Ricarda-Huch-Schule (Gymnasium), Hannover

### Studium:

10/ 1990 - 06/ 1996 Studium der Biologie in Hannover  
01.06.1996 Abschluß: Diplom-Biologin

### Berufsbezogene Tätigkeiten:

09/ 1995 - 07/ 1998 wiss. Auswertung englischsprachiger Fachartikel für die Umwelt-Dokumentation der Universität Hannover  
04/ 1996 - 06/ 1996 wiss. Hilfskraft am Institut für Physiologie der Tierärztlichen Hochschule Hannover  
seit 02/ 1997 Doktorandin am Max-Planck-Institut für Psychiatrie, München