

# **Zentrale cholinerge Wirkungen von Hyperforin, einem Inhaltsstoff des Johanniskrauts**

Dissertation  
zur Erlangung des Grades  
„Doktor der Naturwissenschaften“

am Fachbereich Pharmazie  
der Johannes Gutenberg-Universität  
in Mainz

Marie-Luise Buchholzer  
Apothekerin, geboren in Agnetheln

Mainz, 2002

Dekan:

1. Berichterstatter:

2. Berichterstatter:

Tag der mündlichen Prüfung:

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1	<b>Das Phytopharmakon <i>Hypericum perforatum</i> L.</b>	<b>1</b>
1.1.1	Botanik und historische Aspekte	1
1.1.2	Inhaltsstoffe des Johanniskrauts	2
1.1.3	Pharmakologie und präklinische Daten	3
1.1.3.1	<i>In vitro</i> -Befunde am Modellsystem der Neurotransmitteraufnahme	3
1.1.3.2	Ionenhomöostase, Neurotransmitter-Freisetzung, andere Effekte	4
1.1.3.3	Rezeptor-Bindungs-Studien	5
1.1.3.4	Tierverhaltensmodelle	6
1.1.3.5	Weitere relevante Inhaltsstoffe	6
1.1.4	Klinik zur antidepressiven Wirksamkeit von <i>Hypericum</i>	7
1.2	<b>Zentrales cholinerges System</b>	<b>9</b>
1.2.1	Aufbau des zentralen cholinergen Systems	9
1.2.2	Neurochemie cholinergischer Synapsen und deren Funktion	10
1.2.2.1	Acetylcholin <i>de-novo</i> -Synthese und Freisetzung	10
1.2.2.2	Neuronale Aufnahme von Cholin	12
1.2.3	Sonderstellung des Acetylcholins in der Neurotransmission	14
1.2.4	Implikationen des zentralen cholinergen Systems bei neurodegenerativen Erkrankungen	15
1.2.4.1	Der Morbus Parkinson als Beispiel zentraler cholinergischer Dysfunktion	15
1.2.4.2	Die Senile Demenz vom Alzheimer-Typ (SDAT) als Beispiel zentraler cholinergischer Dysfunktion	19
1.3	<b>Zielsetzung der Arbeit</b>	<b>23</b>
<b>2</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>25</b>
2.1	<b><i>In vivo</i>-Experimente und biologische Präparate</b>	<b>25</b>
2.1.1	Versuchstiere	25
2.1.2	Mikrodialysetechnik in Ratten	25
2.1.2.1	Konstruktion der Mikrodialysesonden	25
2.1.2.1.1	Eingesetzte Materialien	26
2.1.2.1.2	Technik des Sondenbaus	26
2.1.2.2	Narkose	28
2.1.2.2.1	Equithesin-Zusammensetzung	28
2.1.2.2.2	Herstellung, Dosierung und Applikation	28
2.1.2.3	Implantation der Sonde	29
2.1.2.4	Mikrodialyse-Versuchsordnung	33
2.1.2.4.1	Geräte und Apparaturen	33
2.1.2.4.2	Verwendete Perfusionsschläuche	33
2.1.2.4.3	Zusammensetzung der Perfusionsflüssigkeit	33
2.1.2.4.4	Versuchsaufbau	33

2.1.2.5	Versuchsdurchführung	36
2.1.2.6	Überprüfung der Lage der implantierten Sonde	36
2.1.2.7	<i>In vitro</i> -Wiederfindungsrate von ACh im Perfusat	37
2.1.3	Entnahme von Cerebrospinalflüssigkeit	38
2.1.4	Gewinnung und Aufbereitung von Rumpflut	38
<b>2.2</b>	<b>Bestimmung der Cholinaufnahme</b>	<b>39</b>
2.2.1.1	Lösungen, Präparationsbesteck, Geräte	39
2.2.1.2	Synaptosomen-Präparation aus Rattencortices	40
2.2.1.3	Hochaffine und niedrigaffine [ <sup>3</sup> H]-Cholin-Aufnahme in Synaptosomen, biochemische Methode	41
2.2.1.4	Eingesetzte Substanzen	42
2.2.1.5	Experimente mit vorgeschalteter Depolarisation	43
2.2.1.6	Experimente mit gleichzeitiger Depolarisation	43
2.2.2	Proteinbestimmung	43
<b>2.3</b>	<b>HPLC-Bestimmungen mit elektrochemischer Detektion</b>	<b>44</b>
2.3.1	Bestimmung von ACh und Ch im Dialysat mittels HPLC	44
2.3.1.1	HPLC-Pufferzusammensetzung	44
2.3.1.2	Pufferherstellung	44
2.3.1.3	Beschreibung der HPLC-Bestimmungsmethode	45
2.3.2	Quantifizierung des Hyperforins in aCSF, CSF und Plasma	47
2.3.2.1	HPLC-ECD-Methode	47
2.3.2.2	Stabilität von Hyperforin in aCSF	48
<b>2.4</b>	<b>Verhaltensversuche</b>	<b>48</b>
2.4.1	Bestimmung der motorischen Aktivität von Mäusen	48
2.4.2	Modifizierter Irwin-Test	49
<b>2.5</b>	<b>Statistik</b>	<b>50</b>
<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>51</b>
<b>3.1</b>	<b>Lagerstabilität von Hyperforin in wässrigen Lösungen</b>	<b>51</b>
3.1.1	Lichtgeschützte Lagerung bei 4 °C	52
3.1.2	Lichtexponierte Aufbewahrung bei Raumtemperatur	52
<b>3.2</b>	<b>Wirkungen des Hyperforins auf die synaptosomale Cholinaufnahme <i>in vitro</i></b>	<b>53</b>
3.2.1	Prinzip der HACU-Bestimmungs-Methode	54
3.2.2	Hemmung des HACU durch Hyperforin	55
3.2.3	Konzentrations-Wirkungs-Beziehung der HACU-Hemmung durch Hyperforin	58
3.2.4	Veränderung der HACU-Aktivität durch Depolarisation	59
3.2.4.1	Wirkungen von Hyperforin nach vorgeschalteter Depolarisation	59
3.2.4.2	Gleichzeitige Depolarisation und Hyperforin-Einwirkung	60
3.2.4.3	Einfluss von Inhibitoren Calcium-abhängiger Kinasen auf die depolarisationsinduzierte HACU-Aktivität	61
3.2.4.4	Simultane Depolarisation und RO31-/ KN62-Einwirkung	62
3.2.5	Beeinflussung des HACU durch andere Agenzien	64

<b>3.3</b>	<b>Extrazelluläre ACh- und Cholin-Konzentrationen im Striatum <i>in vivo</i></b>	<b>64</b>
3.3.1	Lokale Hyperforin-Applikation über die Mikrodialysesonde	64
3.3.2	Striatale cholinerge Parameter nach systemischer Hyperforin-Applikation	68
<b>3.4</b>	<b>Hippokampales extrazelluläres ACh und Ch <i>in vivo</i> nach systemischer Hyperforin-Gabe</b>	<b>71</b>
<b>3.5</b>	<b>Hyperforin-Plasmaspiegel</b>	<b>74</b>
<b>3.6</b>	<b>Hyperforin in der Cerebrospinalflüssigkeit</b>	<b>75</b>
<b>3.7</b>	<b>Verhaltensexperimente mit Hyperforin an Mäusen</b>	<b>76</b>
<b>3.8</b>	<b>Verhaltensexperiment mit Hyperforin an Ratten</b>	<b>78</b>
<b>4</b>	<b>Diskussion</b>	<b>79</b>
<b>4.1</b>	<b>Methodische Aspekte</b>	<b>79</b>
4.1.1	Mikrodialyse-Technik und andere <i>in vivo</i> -Bestimmungsmethoden	79
4.1.2	Aspekte der Mikrodialyse-Versuchsdurchführung	80
4.1.3	Methodische Aspekte der HPLC-Analytik	85
<b>4.2</b>	<b><i>In vitro</i>-Experimente</b>	<b>85</b>
4.2.1	Stabilität von Hyperforin in aCSF	85
4.2.2	Inhibitorische Effekte von Hyperforin auf das zentrale cholinerge System: HACU-Hemmung	87
4.2.2.1	Befunde aus der Literatur	87
4.2.2.2	Befunde der vorliegenden Arbeit	89
4.2.2.3	Eigene Ergebnisse zur depolarisationsinduzierten Stimulation des HACU	92
<b>4.3</b>	<b>Duale Modulation striataler cholinergischer Parameter durch Hyperforin <i>in vivo</i></b>	<b>95</b>
4.3.1	Depressorische Wirkung auf das cholinerge System nach lokaler Gabe	95
4.3.2	Stimulatorische Wirkung auf das striatale cholinerge System	97
4.3.2.1	Lokale Infusion niedriger Hyperforin-Konzentrationen	97
4.3.2.2	Systemische Applikation von Hyperforin	101
<b>4.4</b>	<b>Stimulation des hippokampalen cholinergen Systems durch Hyperforin <i>in vivo</i></b>	<b>104</b>
<b>4.5</b>	<b>Therapeutische Implikationen</b>	<b>106</b>
4.5.1	Pharmakokinetische Überlegungen	106
4.5.2	Morbus Parkinson	108
4.5.3	Senile Demenz vom Alzheimer-Typ (SDAT)	109
4.5.4	Zusammenfassende Betrachtung und Ausblick	110
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>111</b>
<b>6</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>113</b>
<b>7</b>	<b>Abbildungsverzeichnis</b>	<b>114</b>
<b>8</b>	<b>Tabellenverzeichnis</b>	<b>116</b>
<b>9</b>	<b>Bibliographie</b>	<b>117</b>

# 1 Einleitung

Johanniskrautextrakt findet in der therapeutischen Anwendung von leichten bis mittelschweren depressiven Zuständen zunehmend Akzeptanz und ist eines der umsatzstärksten Phytopharmaka auf dem deutschen Arzneimittelmarkt (Schulz *et al.*, 1999). Der Fokus experimenteller Studien war zunächst auf das Aufdecken von Mechanismen ausgerichtet, wie sie von klassischen Antidepressiva bekannt sind. Trotz Isolierung und Strukturaufklärung der Johanniskraut-Inhaltsstoffe sind die Fraktionen pharmakologisch und toxikologisch unzureichend charakterisiert und bislang konnte keine direkte Zuordnung des Wirkprinzips zu einer chemisch definierten Einzelsubstanz oder Stoffgruppe erfolgen. Die Kenntnis der wirksamkeitsbestimmenden Substanz und die Klärung der zugrundeliegenden pharmakologischen Wirkprinzipien ist wesentliche Prämisse für eine rationale therapeutische Anwendung eines Phytopharmakons. Aktuelle experimentelle und klinische Befunde ordnen dem bislang am besten charakterisierten Inhaltsstoff Hyperforin das pharmakologisch aktive Wirkprinzip zu (Chatterjee *et al.*, 1998a und 1998b; Laakmann *et al.*, 1998; Müller *et al.*, 1998).

## 1.1 Das Phytopharmakon *Hypericum perforatum* L.

### 1.1.1 Botanik und historische Aspekte

Die offizinelle Pflanze *Hypericum perforatum* L. ist ein Vertreter der Familie der Hypericaceae (syn. Guttiferae, Clusiaceae, Johanniskraut-, Hartheugewächse). Die Herkunft des botanischen Namens *Hypericum* leitet sich vom griechischen „*hyper*“ (auf, über) und „*ereikon*“ (Heide) ab. Die Artbezeichnung „*perforatum*“ weist auf die - aufgrund der kugeligen Exkretbehälter - durchscheinend punktierten Blätter hin (Wichtl, 1997). Die deutschen Bezeichnungen „Johanniskraut“ und Synonyme deuten auf die Blütezeit um den Johannistag (24. Juni; Walpurgis-, Sonnenwendkraut), auf den rot pigmentierten Saft der Blüten (Herrgottsblut, Blutkraut), auf die mitunter stark verholzten Stengel (Tüpfel-, Hartheu) und seine Verwendung als Bierwürzmittel hin (Feld-, Waldhopfenkraut).

Die vielfältige Nutzung als Arzneipflanze lässt sich bis in die Antike zurückverfolgen, mit der ersten Erwähnung bei Plinius dem Älteren 23-79 n. Chr. (Czygan, 1993). 77 n. Chr. dokumentierte Dioskurides die arzneiliche Anwendung von Johanniskraut-

Arten bei fiebrigen Erkrankungen, zur Diureseförderung und Wundbehandlung. Im Sinne eines Psychotherapeutikums findet eine *Hypericum*-Abkochung bei Paracelsus (1493-1541) erstmals Anwendung bei Verstimmungen und Angstzuständen. *Hypericum perforatum* L. wurde 1941 in das Ergänzungsbuch des Deutschen Arzneibuchs (DAB 6) als *Hyperici herba* und 1979 in den Deutschen Arzneimittel Codex (DAC) aufgenommen. Von der Kommission E des früheren Bundesgesundheitsamtes (BGA) aufgrund von traditionellem Erkenntnismaterial positiv bewertet und durch die Monographie „*Hyperici herba*“ erfasst, wurden ölige Zubereitungen innerlich bei dyspeptischen Beschwerden, psychovegetativen Störungen, depressiven Verstimmungszuständen, und äußerlich zur Behandlung von Verletzungen, leichten Verbrennungen, Myalgien empfohlen (veröffentlicht im Bundesanzeiger Nr. 43 vom 2.3.1984). Die Aufnahme von Johanniskraut-Trockenextrakt in das Europäische Arzneibuch (Ph. Eur.) ist für dieses Jahr (2002) vorgesehen (Franz, 2001).

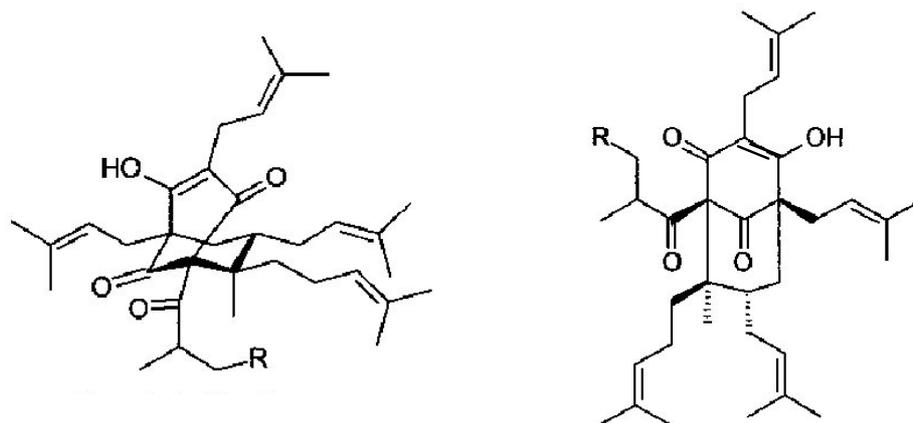
### 1.1.2 Inhaltsstoffe des Johanniskrauts

Das bisher bekannte Inhaltsstoffspektrum von *Hypericum perforatum* L. umfasst diverse Einzelstoffe: Neben den charakteristischen Phloroglucinolen (Hauptvertreter: Hyperforin und Adhyperforin) und den Naphthodianthronen sind auch Flavonoide, Biflavonoide, Tannine, Xanthone, ätherisches Öl u.a. enthalten. (siehe Tabelle 1.1; Hölzl *et al.*, 1994; Nahrstedt und Butterweck, 1997).

Prenylierte Phloroglucinole	Naphthodianthrone	Flavonoide 2-4 %	Proanthocyanidine (PC) 12 %	Weitere Inhaltsstoffe
Hyperforin 2 - 4.5 %  Adhyperforin 0.8 - 1.9 %	Hypericin 0.15 - 0.3 %  Pseudohypericin	Hyperosid 0.9 % Rutosid 1.6 % Quercitrin 0.3 % <b>Biflavonoide</b> Biapigenin 0.5 % Amantoflavon 0.05 %	Catechin- und Epi- Typ  <b>Oligomere PC (OPC)</b> Procyanidin B2 6.5 - 9 %	Xanthone Anthocyane Kaffeensäure Chlorogensäure Ätherische Öle

**Tabelle 1.1: Inhaltsstoffe des Johanniskrauts (Stoffgruppen und Einzelsubstanzen)**

Hagenström entdeckte 1955 eine stark antibakterielle Wirkung in öligen Johanniskraut-Auszügen. Gurevich *et al.*, (1971) ordneten diese Eigenschaft dem stickstofffreien Acylphloroglucinol Hyperforin zu und beschrieben erstmals die Charakterisierung und Isolierung von Hyperforin (Strukturformel siehe Abb. 1.1).



**Abbildung 1.1: Strukturformel von Hyperforin**

Das Vorkommen von Hyperforin ist charakteristisch für die Gattung *Hypericum perforatum* L. Die chemische Struktur von Hyperforin  $R = H$  ( $C_{35}H_{52}O_4$ ) wurde 1975 aufgeklärt: es besteht aus einem Phloroglucinol-Gerüst, das mit lipophilen Isoprenketten ausgestattet ist. Das Grundgerüst ist in der planaren Darstellung (rechts) veranschaulicht. Nomenklatur: 5-(2-Methyl-1-oxo-propyl)-6-exo-methyl-1,3-endo,7-exo-tris-(3-methylbut-2-enyl)-6-endo-(4-methyl-pent-3-enyl)-bicyclo[3.3.1]-nonan-2,4,9-trion. Die Substanz ist ausschließlich in den oberirdischen Teilen der Pflanze enthalten: zu 2 % in Blüten und Knospen und in Mengen bis zu 4.5 % in unreifen Früchten (Maisenbacher und Kovar, 1992). Die Autoren charakterisierten auch ein Methylanaloges des Hyperforins, das Adhyperforin  $R = CH_3$  (in Blüten und Stengeln zu 0.8 - 1.9 %). Rücker *et al.* (1995) isolierten aus Stengeln und Blättern das Hydroperoxycadiforin, ein Sesquiterpenderivat des Hyperforins mit einer Hydroperoxygruppe.

### 1.1.3 Pharmakologie und präklinische Daten

Johanniskraut gehört mittlerweile zu den bestuntersuchten Phytopharmaka. Neuere experimentelle Studien decken auf, wie die Inhaltsstoffe des Johanniskrauts auf molekularer Ebene wirken, allen voran die am besten charakterisierte, vermutlich wirksamkeitsbestimmende Komponente Hyperforin.

#### 1.1.3.1 *In vitro*-Befunde am Modellsystem der Neurotransmitteraufnahme

In dem therapeutisch vielversprechenden Inhaltsstoff Hyperforin konnte ein Transmitteraufnahme-hemmendes Prinzip identifiziert werden. Die Hemmung der Monoaminaufnahme bildet die Grundlage der klassischen Hypothese zur Entstehung der Depression („Monoaminmangel-Hypothese“) sowie zum Wirkungsmechanismus synthetischer Antidepressiva. In Analogie zu den bekannten Antidepressiva fand man eine Hemmung der neuronalen Aufnahme der Neurotransmitter Noradrenalin (NA), Serotonin (5-HT) und Dopamin (DA) durch den Johanniskraut-Extrakt in Synaptosomen mit halbmaximalen Hemmkonzentrationen von 2  $\mu\text{g/ml}$  (Rolli *et al.*, 1995; Müller *et al.*, 1997). Chatterjee *et al.* (1998b) und Müller *et al.* (1998) erklären diesen synaptischen biochemischen Mechanismus ausschließlich durch den

Inhaltsstoff Hyperforin. Chatterjee *et al.* (1998b) deckten Mechanismen auf, durch die sich Hyperforin von den Standard-Antidepressiva unterscheidet und die Hinweise für einen neuartigen Wirkungsmechanismus sind. Die zusätzliche Hemmung der neuronalen Aufnahme der Aminosäuretransmitter GABA und L-Glutamat werden auch hauptverantwortlich dem Hyperforin zugeschrieben (siehe Tabelle 1.2).

Dieser Effekt wird nicht durch eine direkte Bindung an die Transportproteine der neuronalen Membran bewirkt, sondern beruht auf einer bisher einzig für Hyperforin nachgewiesenen Erhöhung der intrazellulären Natriumionenkonzentration (Müller *et al.*, 2001). Dies wurde in Studien an humanen Thrombozyten und kortikalen Maus-Synaptosomen gezeigt (Singer *et al.*, 1999). Aus der Erhöhung der intrazellulären Na<sup>+</sup>-Konzentration resultiert eine Reduktion des transmembranären Natriumgradienten (extrazellulär *versus* intrazellulär), der wiederum die treibende Kraft für die Transportproteine der Monoamine und Aminosäuren darstellt (Lester *et al.*, 1994). Dies erklärt, dass Hyperforin unselektiv sehr viele unterschiedliche neuronale Transportmechanismen hemmen kann. Befunde über funktionelle Effekte auf relevante Neurotransmittersysteme gibt es aus Untersuchungen an striatalen Synaptosomen der Ratte (siehe Tabelle 1.2), an kortikalen Synaptosomen der Maus, an humanen Thrombozyten und intakten Astrozyten der Ratte (Chatterjee *et al.*, 1998b; Müller *et al.*, 1998; Singer *et al.*, 1999; Neary und Bu, 1998; s. Tabelle 4.2).

Die Vergleichsdaten zur Hemmwirkung von Hyperforin auf alle fünf Neurotransmitter-Systeme in striatalen Ratten-Synaptosomen sind in der Tabelle 1.2 wiedergegeben.

Neurotransmitter	Noradrenalin	Dopamin	GABA	Serotonin	L-Glutamat
IC <sub>50</sub>	80 nM 0.04 µg/ml	102 nM 0.05 µg/ml	184 nM 0.09 µg/ml	205 nM 0.1 µg/ml	830 nM 0.4 µg/ml

**Tabelle 1.2: IC<sub>50</sub>-Werte für die Hemmung der Neurotransmitter-Aufnahme durch reines Hyperforin in striatalen Ratten-Synaptosomen *in vitro*, (Chatterjee *et al.*, 1998b)**

Die Potenz der Inhibition für Hyperforin ergibt die Anordnung: NA ≥ DA > GABA ≥ 5-HT >> L-Glutamat.

### 1.1.3.2 Ionenhomöostase, Neurotransmitter-Freisetzung, andere Effekte

In den molekularen Mechanismus, über den Hyperforin zu einer Zunahme der intrazellulären Na<sup>+</sup>-Konzentration führt, sind vermutlich Na<sup>+</sup>-Protonen-Austauscher (als Folge einer initialen intrazellulären pH-Senkung) und/oder epitheliale Amilorid-sensitive Natriumkanäle involviert (Singer *et al.*, 1999; Wonnemann *et al.*, 2000). Der Mechanismus dürfte in komplexer Weise Veränderungen verschiedener intra-

zellulärer Ionen inklusive pH und Calcium einschließen (Chatterjee *et al.*, 2001). Hyperforin moduliert spannungsgesteuerte  $\text{Ca}^{2+}$ -,  $\text{Na}^+$ - und  $\text{K}^+$ -Ströme neuronaler Gewebe (Chatterjee *et al.*, 1999b), sowie die Eigenschaften spannungsabhängiger Calcium-Kanäle vom P-Typ (Fisunov *et al.*, 2000). Diese Befunde werden auch im Zusammenhang mit der Stimulierung der Neurotransmitter-Freisetzung (L-Glu, GABA und Aspartat aus kortikalen Ratten-Synaptosomen) diskutiert (Chatterjee *et al.*, 2001). Gobbi *et al.* (1999) beobachteten einen transporterunabhängigen, freisetzenden Effekt von Hyperforin, eine reserpinähnliche Depletion der 5-HT-Speichervesikel kortikaler Synaptosomen.

*In vivo*-Experimente einer Push-Pull-Studie von Kaehler *et al.* (1999) zeigten, dass Hyperforin die extrazelluläre Konzentration verschiedener Neurotransmitter wie 5-HT, DA, NA, L-Glu im *Locus Coeruleus* der Ratte erhöht. Aus einer Mikro dialyse-Studie an Ratten, denen ein hyperforinreicher  $\text{CO}_2$ -Extrakt des Johanniskrauts appliziert wurde, geht hervor, dass die extrazellulären Konzentrationen von Dopamin im Striatum und im *Nucleus accumbens* erhöht werden (Di Matteo *et al.*, 2000).

### 1.1.3.3 Rezeptor-Bindungs-Studien

Hyperforin-haltige Extrakte und Hyperforin zeigen an noradrenergen und serotonergen Synapsen auch auf anderer biochemischer Ebene ähnliche Effekte wie klassische Antidepressiva. Von Müller *et al.* (1997 und 1998) wurde gezeigt, dass Hyperforin und Hyperforin-haltige Extrakte zu einer adaptiven Veränderung von Rezeptorstrukturen führen. Die subchronische Behandlung von Ratten resultiert - in Analogie zu den klassischen Antidepressiva (Leonard, 1993) - in einer signifikanten Abnahme der kortikalen  $\beta$ -Rezeptoren-Dichte ( $\beta$ -down-Regulation) und anders als nach Gabe von trizyklischen Antidepressiva in einer signifikanten Zunahme (*up*-Regulation) der kortikalen postsynaptischen 5-HT<sub>2a</sub>-Rezeptoren- und 5-HT<sub>1a</sub>-Autorezeptoren-Dichte. Diese adaptiven Veränderungen werden als Folge der veränderten Konzentration der Neurotransmitter im synaptischen Spalt diskutiert. Sie korrelieren in ihrem Zeitverlauf mit dem Auftreten der antidepressiven Wirksamkeit nach einer Wirklatenz von 2-3 Wochen. Diese Parallele gilt als weiterer Hinweis für einen analogen biochemischen Wirkungsmechanismus der synthetischen Antidepressiva und des Extraktes (Teufel-Mayer und Gleitz, 1997; Müller *et al.*, 1998).

Hyperforin ruft charakteristische Änderungen auf Neurotransmitter-, Ionenhomöostase- und Rezeptorebene hervor (siehe 1.1.3.1, 1.1.3.2 und 1.1.3.3); aufgrund der vielfältigen Mechanismen, werden ihm bereits Einsatzmöglichkeiten zugesprochen, die über die primäre antidepressive Anwendung hinausgehen (siehe 1.1.3.4).

#### **1.1.3.4 Tierverhaltensmodelle**

Ein neuartiger Wirkungsmechanismus von Hyperforin könnte für die verschiedenen verhaltenspharmakologischen Wirkqualitäten des Extraktes verantwortlich sein, nämlich Entfaltung antidepressiver und zudem anxiolytischer Eigenschaften im Tierexperiment (Vandenbogaerde *et al.*, 2000) sowie Verbesserung von Lern- und Gedächtnisleistungen (Kumar *et al.*, 2000; Klusa *et al.*, 2001). Verhaltenspharmakologische Studien belegen eine gute Korrelation zwischen der Wirksamkeit verschiedener Extrakte in Modellen für antidepressive Wirksamkeit (Porsolt-Test, erlernte Hilflosigkeit, passives Vermeidungsverhalten) und deren Hyperforin-Gehalt. Hydroalkoholische Extrakte, hyperforinreiche Extrakte und Hyperforin führten zu ähnlichen Verhaltensänderungen wie unter Gabe von Standardantidepressiva (Chatterjee *et al.*, 1998; Bhattacharya *et al.*, 1998; Misane und Ögren, 2001).

#### **1.1.3.5 Weitere relevante Inhaltsstoffe**

Reines Hyperforin und Hyperforin-reiche Extrakte erwiesen sich in biochemischen und tierexperimentellen Untersuchungen als deutlich wirksamer als andere Extrakte. Für keinen anderen Inhaltsstoff von *Hypericum perforatum* L. gibt es eine vergleichbar gute wissenschaftliche Datenlage. Hinweise darauf, dass die Wirksamkeit von Johanniskraut durch das Zusammenwirken verschiedener Inhaltsstoffe zustande kommt (Simmen *et al.*, 2001) sind Grundlage neuer pharmakologischer Untersuchungen, die sich mit der systematischen Prüfung anderer interessanter Inhaltsstoffe (Procyanidine, Flavonoide, Biflavonide, Naphthodianthrone) mit möglicher antidepressiver Aktivität befassen (Butterweck *et al.*, 2000). Es ist vorgeschlagen worden, dass nach derzeitigem Stand des Wissens der gesamte Extrakt als therapeutisch wirksames Prinzip, als „Wirkstoff“ angesehen werden sollte, wenngleich Hyperforin unter einer Vielzahl pharmakologisch aktiver Inhaltsstoffe bisher am besten dokumentiert ist (Simmen *et al.*, 2001).

Inhaltsstoffe	Pharmakologische Effekte
<b>Acylphloroglucinole</b> ●Hyperforin ●Adhyperforin	●Neurotransmitteraufnahme-Hemmung, Beeinflussung intrazellulärer Ionenkonzentrationen von Na <sup>+</sup> , Ca <sup>2+</sup> und H <sup>+</sup> (Müller <i>et al.</i> , 1998, Müller <i>et al.</i> , 2001); ●antibakterielle Wirkung (Gurevich <i>et al.</i> , 1971; Reichling <i>et al.</i> , 2001)
<b>Naphthodianthrone</b> ●Hypericin	●MAO-A-Hemmung (Suzuki <i>et al.</i> , 1984) von Sparrenberg <i>et al.</i> (1993) relativiert; ●antivirale Aktivität, Proteinkinase C- und NF-κB-Inhibition (Bourne <i>et al.</i> , 1999; Takahashi <i>et al.</i> , 1989; Bork <i>et al.</i> , 1999) in hohen in vivo irrelevanten Konzentrationen
<b>Biflavonoide</b> ●Biapigenin ●Amentoflavon	●antiphlogistisch, antioxidativ, spasmolytisch, MAO-A-/COMT-(Catecholamin-o-Methyl-Transferase)-Hemmung; im Bereich μM – mM, ≈ 3-6 x höhere Konzentrationen als die nach oraler Extrakt-Gabe im humanen Blutplasma (Thiede und Walper, 1994)
<b>Oligomere Procyanidine (OPC)</b> ●Procyanidin B2	●Koronardurchblutung gesteigert, positiv inotrope Wirkung (Melzer <i>et al.</i> , 1991) ●Löslichkeitserhöhung von Hypericinen (Butterweck <i>et al.</i> , 1998)

**Tabelle 1.3: Inhaltsstoffe des Johanniskrauts und deren pharmakologische Effekte**

Aus der Vielzahl berichteter Wirkungen ist die Hypothese postuliert worden, dass die antidepressive Wirksamkeit von Johanniskraut auf dem Zusammenspiel mehrerer Wirkmechanismen beruhe, trotz der aktuell lückenhaften wissenschaftlichen Dokumentation Hyperforin-unabhängiger Effekte.

Den **Hypericinen**, die als wirkungsrelevante Leitsubstanzen deklariert wurden und lange als antidepressive Hauptwirkstoffe galten, ist nach bisherigen Erkenntnissen hingegen keine Bedeutung beizumessen. Ihnen wurde die Eigenschaft der Monoaminoxidase MAO-A- und MAO-B-Hemmung zugeschrieben (Suzuki *et al.*, 1984), jedoch lagen die halbmaximalen Hemmkonstanten von 120 - 370 μg/ml Extrakt (> 200 μM; Extrakt LI 160, 0,3 % Hypericin-standardisiert) nicht im therapeutisch relevanten Dosisbereich (Müller *et al.*, 1997; Sparrenberg, 1993).

### 1.1.4 Klinik zur antidepressiven Wirksamkeit von *Hypericum*

Nach heutigem Kenntnisstand ist Hyperforin die bedeutsamste Wirkkomponente von *Hypericum*, für die auf relevanten pharmakologischen Ebenen eine Wirkqualität (vgl. 1.1.3) belegt werden konnte, die auf eine entsprechende antidepressive Wirkung am Menschen schließen lässt (Chatterjee *et al.*, 1998a und 1998b; Dimpfel *et al.*, 1998).

Die Entstehung der Depression wird pathobiochemisch und pharmakologisch mit einem Katecholamin- und/oder Serotonin-Mangel an spezifischen Rezeptoren im ZNS in Verbindung gebracht („Monoaminmangel-Hypothese“; NA, DA, 5-HT). Die aktuellen Daten sprechen dafür, dass affektive Erkrankungen wohl kaum auf die Störung nur eines Transmittersystems oder gar eines Rezeptors, sondern eher auf eine Dysbalance multipler Transmittersysteme zurückzuführen sind. Die klassischen Antidepressiva erhöhen initial die Transmitter-Konzentrationen im synaptischen Spalt über eine Hemmung der neuronalen Wiederaufnahme (NA, 5-HT) oder Monoaminoxidase-Hemmung (MAO-A). Folgen der Konzentrationsveränderungen der Neurotransmitter und ihrer Metabolite im Gehirn sind adaptive Veränderungen prä- und postsynaptischer Rezeptorsysteme, die zeitparallel mit der antidepressiven Wirkung

auftreten: Die  $\beta$ -Rezeptoren-Dichte an der noradrenergen Synapse nimmt ab, die 5-HT<sub>2a</sub>-Rezeptoren-Dichte an der serotoninerger Synapse ebenfalls, während die 5-HT<sub>1a</sub>-Rezeptoren-Dichte zunimmt (Müller *et al.*, 1999). Diese und darüber hinausgehende Wirkungsmechanismen werden für *Hypericum perforatum* L. diskutiert.

Eine Vielzahl klinischer Placebo- und Referenzsubstanz-kontrollierter Studien zeigen die therapeutische Effizienz und gute Verträglichkeit von Hypericum-Extrakt-Fertigpräparaten in der Kurzzeitbehandlung milder bis moderater depressiver Episoden (Linde *et al.*, 1996; Volz 1997; Kaul 2000; Greeson *et al.*, 2001; Di Carlo *et al.*, 2001). Insgesamt besitzt der Johanniskraut-Extrakt eine über Placebo hinausgehende antidepressive Wirkung und ist in der klinischen Wirksamkeit den synthetischen Antidepressiva Imipramin (Philipp *et al.*, 1999; Vorbach *et al.*, 1997), Amitriptylin (Wheatley, 1997), Sertralin (Brenner *et al.*, 2000) und Fluoxetin (Volz und Laux, 2000) scheinbar ebenbürtig; der erbrachte Wirksamkeitsnachweis gilt lediglich für die Anwendung bei milden bis moderaten depressiven Zuständen und für die Dosierung ab 600 mg/d Extrakt. Eine kürzlich publizierte Placebo- und Referenzsubstanz-kontrollierte Studie (JAMA, April 10 - 2002, Vol 287, No. 14) relativiert die Schlussfolgerungen früherer Studien, denn die Effizienz des Extraktes bei moderaten Depressionen konnte nicht bestätigt werden. Die Aussagekraft der klinischen Studien wird häufig wegen umfassender Einbeziehung subjektiver Kriterien im Gegensatz zu standardisierten objektiven Maßstäben und aufgrund methodischer Mängel kritisiert (Greeson *et al.*, 2001). Nur wenige Studien erfüllen die Vorgaben der Richtlinien zur klinischen Prüfung von Antidepressiva (Volz, 1997): i.) definierte Indikationsstellung gemäß ICD 10 (*International Statistical Classification of Diseases*, 10. Revision) und Klassifizierung des Erkrankungsgrades nach Standardkriterien ii.) Studiendauer von Minimum 6 Wochen iii.) Studien zur Dosisfindung. Zu den Schwächen im Studiendesign kommt hinzu, dass diese Studien von zum Teil unterschiedlichsten Extrakten ausgehen.

Zur Charakterisierung der antidepressiv relevanten Inhaltsstoffe wurde eine placebo-kontrollierte Vergleichsstudie mit einem 5%igen Hyperforin-reichen und einem 0.5%igen Hyperforin-armen Extrakt durchgeführt, in welcher ein Dosis-Effekt für Hyperforin bestätigt werden konnte und der Hyperforin-reiche Extrakt der Placebogabe signifikant als antidepressive Medikation überlegen war (Laakman *et al.*, 1998). Pharmakokinetische Untersuchungen am Menschen mit einem 5%igen Hyperforin-haltigen Hypericum-Extrakt in den üblichen therapeutischen Dosierungen ergaben, dass die Hyperforin-Plasmaspiegel im Bereich der für die synaptische Aufnahme-

hemmung relevanten Konzentrationen lagen (Biber *et al.*, 1998). In einer Humanstudie konnte nach Extrakt-Gabe eine Induktion spezifischer und für SSRI's typische Änderungen im Elektorencephalogramm (EEG) beobachtet werden. Vergleichende EEG-Untersuchungen zeigten eine schnelle Zunahme im Alpha-Band-Bereich, die dem Hyperforin zuzuordnen war (Schellenberg *et al.*, 2001). Dimpfel *et al.* (1998) beobachteten analoge Änderungen auch in Tierstudien.

Maßgeblicher Vorteil gegenüber den klassischen Antidepressiva ist das überzeugende Sicherheitsprofil der Hypericum-Präparate mit geringerem Nebenwirkungspotential, guter Verträglichkeit und hoher Akzeptanz auf Seiten der Patienten. Neben den nach Placebogabe beobachteten Nebenwirkungen und der Photosensibilisierung werden in jüngster Zeit vermehrt solche diskutiert, die auf eine Aktivierung des hepatischen Cytochrom P-450-Systems und auf eine Beeinflussung des P-Glykoproteins zurückzuführen sind: Absenkung der Serumkonzentrationen von Antikoagulantien, oralen Kontrazeptiva, Theophyllin, Cyclosporin und Digoxin (Nöldner, 2001).

## **1.2 Zentrales cholinerges System**

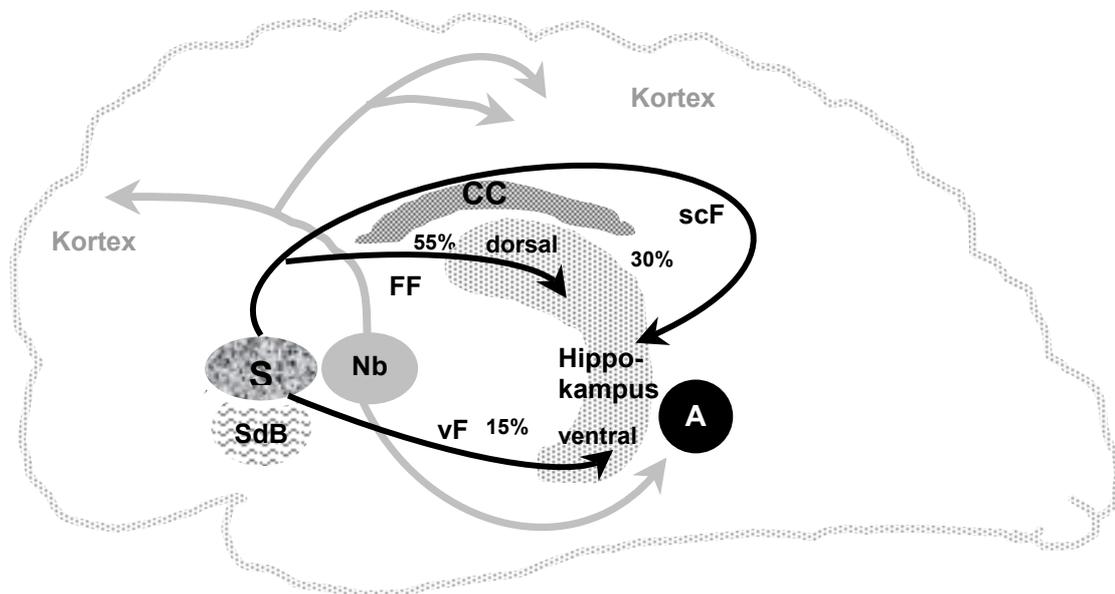
Acetylcholin ist einer der prominentesten und am besten untersuchten Transmitter des Nervensystems. Periphere cholinerge Neurone finden sich im postganglionären Parasympathikus, postganglionär bei der sympathischen Schweißdrüseninnervation und im Darmnervensystem. Ebenfalls cholinerg sind alle präganglionären autonomen Neurone und die Motoneurone der quergestreiften Muskulatur (Butcher und Woolf, 1986); beide Neuronengruppen gehören bereits zum zentralen cholinergen System.

### **1.2.1 Aufbau des zentralen cholinergen Systems**

Wichtige zentrale cholinerge Systeme sind die Projektionsneurone im basalen Vorderhirn, die Interneurone des Corpus Striatum und die cholinergen Neurone im Hirnstamm (Bigl und Arendt, 1991).

Im basalen Vorderhirn befinden sich die Zellkörper zweier zentraler cholinergischer Bahnen: Zum einen die septo-hippokampale cholinerge Bahn, die vom medialen Septum ausgehend zum Hippokampus verläuft, und zum anderen die Bahn, die vom *Nucleus basalis* (*Nucleus basalis Meynert* beim Menschen) ausgehend, den Kortex

und die Amygdala innerviert. Beide Projektionen sind bei neurodegenerativen Erkrankungen gleichermaßen betroffen (Arendt *et al.*, 1989).



**Abbildung 1.2: Darstellung des zentralen cholinergen Systems in einem schematischen Sagittalschnitt**

Die großzelligen basalen Vorderhirnkerne (mediales Septum «S», *Nucleus basalis* «Nb», *Nucleus tractus diagonalis Broca* «SdB») sind Bestandteil des limbischen Systems. Die septo-hippokampalen Fasern (↷) gliedern sich in dorsale und ventrale Projektionen. 85 % der Fasern innervieren den dorsalen Hippokampus. Diese teilen sich in die supracallosalen Fasern («scF», 30 % der septo-hippokampalen Fasern), die oberhalb des *Corpus callosum* («CC») verlaufen, und in die infracallosal verlaufende *Fimbria Fornix* («FF», 55 % der septo-hippokampalen Fasern, die außer cholinergen auch GABAerge Fasern enthält). Ventral («vF») verlaufen 15 % der septohippokampalen Projektion, durch und über die Amygdala («A») (Milner und Amaral, 1984; Amaral und Kurz, 1985). Die Zellkörper der septo-hippokampalen Projektionen liegen im medialen Septum («S») und der *Stria diagonalis Broca* («SdB»). Der limbische Kortex und die Amygdala («A») sind Zielgebiete cholinergischer Projektionen (↶), die vom *Nucleus basalis* («Nb») ausgehen. Darstellung modifiziert nach Gage und Björklund (1986) sowie Butcher und Woolf (1986).

## 1.2.2 Neurochemie cholinergischer Synapsen und deren Funktion

Die cholinergen Neurone spielen eine Rolle bei Vorgängen wie Lernen, Gedächtnisbildung, Aufmerksamkeit, bei der motorischen Aktivität, bei der Temperaturregulation und dem Schlaf-Wach-Rhythmus (Bigl und Arendt, 1991) und sind durch den Neurotransmitter Acetylcholin (ACh) charakterisiert.

### 1.2.2.1 Acetylcholin *de-novo*-Synthese und Freisetzung

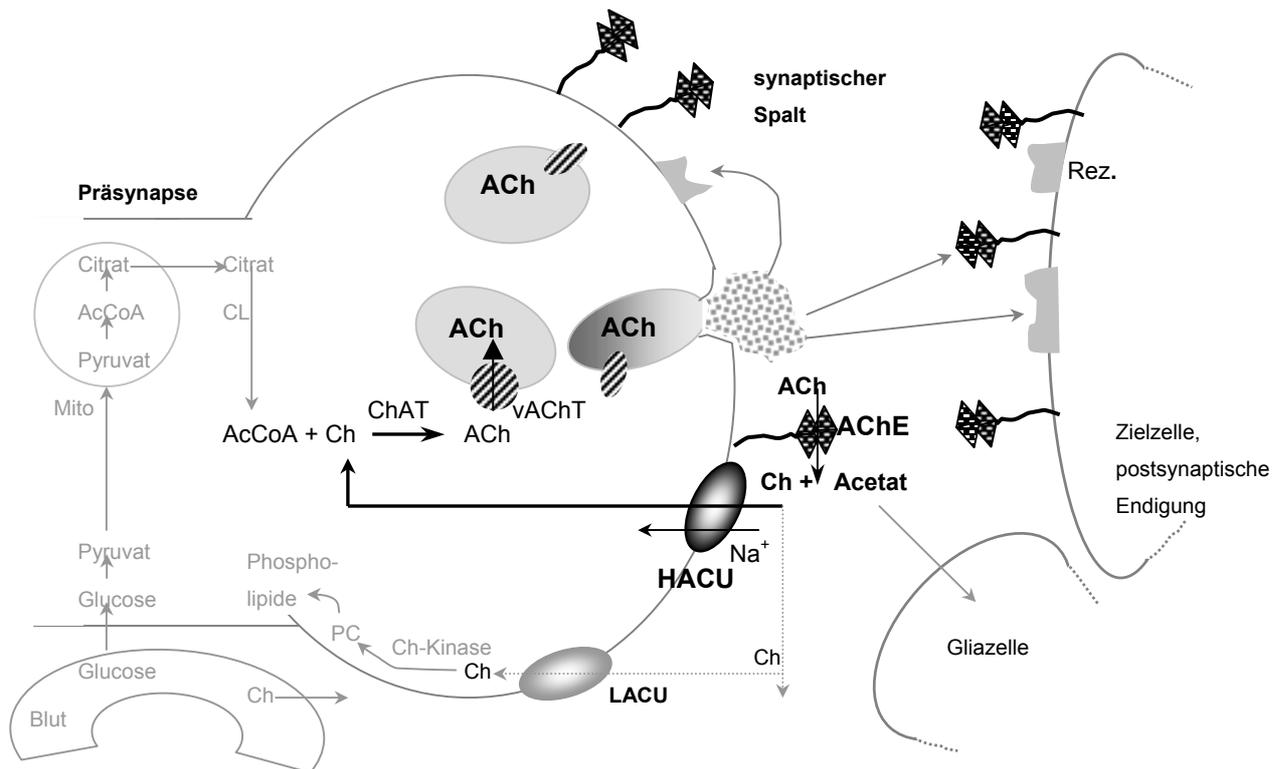
Die ACh-Synthese erfolgt im Zytosol der präsynaptischen cholinergen Nervenendigung unter Katalyse durch die Cholinacetyltransferase (ChAT) aus Cholin

(Ch) und Acetyl-Coenzym-A (AcCoA). Zytosolisches ACh wird über den vesikulären ACh-Transporter (vAChT) in synaptische Vesikel aufgenommen. Ein eintreffendes Aktionspotential, das durch spannungsabhängige Natrium-Kanäle getragen wird, depolarisiert die präsynaptische Membran, N-Typ-Calcium-Kanäle öffnen sich und der konsekutive Ca-Einstrom ins Axoplasma führt zu einer Verschmelzung der Speichervesikel mit der Membran. Auf diese Weise wird der Transmitter exozytotisch in den synaptischen Spalt freigesetzt. ACh diffundiert zur postsynaptischen Membran, wo es durch Bindung an cholinerge Rezeptoren (muskarinische  $M_1$ -Rezeptoren, Gehirn) eine rezeptorvermittelte Zellantwort auslöst, um dann wieder in den synaptischen Spalt zurückzukehren. Gleichwohl kann das ACh auch an präsynaptisch lokalisierte Rezeptoren ( $M_2$ -Rezeptoren) binden. Sie verhindern durch Autoinhibition rückkoppelnd eine überschüssende ACh-Ausschüttung (siehe Abbildung 1.3).

Die Beendigung der Signalübertragung erfolgt durch Hydrolyse des ACh mittels der membranassoziierten, globulär im Extrazellulärraum (EZR) vorliegenden Acetylcholinesterase (AChE, E.C. 3.1.1.7). Dieses Enzym ist sowohl prä- als auch postsynaptisch in der Membran verankert. Aus der hydrolytischen Spaltung gehen Ch und Acetat hervor (Starke, 1996). Ch wird über zwei Carrier aus dem Extrazellulärraum (EZR) in die präsynaptische Endigung aufgenommen: über den hochaffinen (*high affinity choline uptake*, HACU) und den niedrigaffinen Cholintransporter (*low affinity choline uptake*, LACU) (Blusztajn und Wurtman, 1983; Dowdall und Simon, 1973). Im neuronalen Gewebe wird ungefähr die Hälfte des freigesetzten Ch über den HACU zellulär aufgenommen, während der Rest über Diffusion verlorengeht.

Das in das cholinerge Neuron transportierte Ch kann durch die ChAT (E.C. 2.3.1.6) zur Resynthese von ACh verwendet werden (Yamamura und Snyder, 1973). Die ChAT synthetisiert aus Ch und AcCoA das ACh unter Freisetzung von Coenzym A (CoA). Die ChAT wird vermutlich auch bei gesteigerter ACh-Synthese nicht produktinhibiert, da das ACh umgehend über den vesikulären Transporter in die Speichervesikel geschleust wird. Die ChAT ist in den cholinergen Terminalen lokalisiert (Suzuki *et al.*, 1991) und liegt vor allem im Zytoplasma gelöst, aber auch an die Zellmembran assoziiert vor (Wurtman *et al.*, 1981).

Die cholinerge Neurotransmission ist in der Abbildung 1.3 veranschaulicht.



**Abbildung 1.3: Schematische Darstellung der cholinergen Neurotransmission im ZNS; Kreislauf des Cholins**

Die Vorgänge sind im Abschnitt 1.2.2 erläutert. Das Acetyl-Coenzym A (AcCoA) entsteht im wesentlichen in der mitochondrialen Matrix durch glykolytischen Abbau von Glucose bzw. durch oxidative Decarboxylierung von Pyruvat; AcCoA wird *via* Citratzyklus zu Citrat konvertiert (Browning und Schulmann, 1968). Citrat verlässt die Mitochondrien (Mito) über den Tricarboxylat-Carrier und wird im Cytoplasma von der ATP-Citrat-Lyase (CL) erfaßt, dabei entsteht AcCoA und daneben Oxalacetat. Das im Cytoplasma aus AcCoA und Cholin (Ch) mittels der Cholinacetyl-Transferase (ChAT) synthetisierte Acetylcholin (ACh) wird mit Hilfe eines elektrochemischen Protonengradienten, der von einer vesikulären Protonen-ATP-ase aufrecht erhalten wird (Toll und Howard, 1980), in die synaptischen Vesikel geschleust (vesikulärer ACh-Transporter, vAChT). Nach exozytotischer Freisetzung wird das ACh mittels der Acetylcholinesterase (AChE) zu Cholin und Acetat hydrolysiert. Über die Transporter HACU bzw. LACU (hoch- bzw. niedrigaffiner Cholin-carrier) wiederaufgenommenes Cholin kann entweder für die Bildung von ACh (Neurotransmission) zur Verfügung stehen oder zu Phosphatidylcholin (PC, Aufbau der Nervenzellmembran) umgewandelt werden.

In der präsynaptischen Membran sind Autorezeptoren lokalisiert. Diese regulieren die Freisetzung des ACh. Stimulation der muskarinischen Autorezeptoren ( $M_2/M_{4(Ratte)}$ , Hippokampus) bei hohen ACh-Konzentrationen im synaptischen Spalt führen zu einer Hemmung der ACh-Freisetzung. Stimulation nikotinischer Autorezeptoren hingegen führt im Sinne einer positiven Modulation in einigen Hirnregionen zu einer Steigerung der ACh-Freisetzung. Neben cholinergen Autorezeptoren besitzen cholinerge Neurone Heterorezeptoren (Starke *et al.*, 1989); dazu gehören  $GABA_B$ - und  $5-HT_{1B}$ -Rezeptoren, über welche eine Hemmung der ACh-Freisetzung vermittelt wird.

### 1.2.2.2 Neuronale Aufnahme von Cholin

Die Verfügbarkeit von Vorstufen Ch und AcCoA ist ein geschwindigkeitsbestimmender Schritt der ACh-Biosynthese (Freeman und Jenden, 1976). Ch kann auf zwei Arten bereitgestellt werden: i.) Neonatal und kaum im adulten Gehirn wird es intra-

neuronal durch Methylierung von membranständigem Phosphatidylethanolamin zu Phosphatidylcholin mit anschließender Hydrolyse zu Cholin gebildet (Blusztajn *et al.*, 1987), wobei die cholinerge Synapse ihren Cholinbedarf durch Eigensynthese jedoch nicht decken kann; ii.) der überwiegende Anteil des Cholins wird aus dem Extrazellulärraum (EZR) über Ch-Carrier mit hoher und niedriger Affinität aufgenommen.

### **HACU**

Typisch für die cholinergen Terminalen ist der *high affinity choline uptake* (HACU), der über einen Natrium-Gradienten angetrieben und durch Hemicholinium-3 selektiv blockiert wird (Kuhar und Murrin, 1978; Guyenet *et al.*, 1973). Die Beobachtung, dass der HACU fast ausschließlich auf den Nervenendigungen cholinergere Neurone gefunden wurde, stützt die Annahme, dass der HACU der Wiederaufnahme des nach enzymatischer Hydrolyse von ACh freigesetzten Cholins dient (Blusztajn und Wurtman, 1983; Dowdall und Simon, 1973; Yamamura und Snyder, 1973). Der Transporter ist bei physiologischen Ch-Konzentrationen im EZR (ca. 5  $\mu\text{M}$ ; Tucek, 1993) annähernd gesättigt, da der  $K_T$  ca. 1 - 2  $\mu\text{M}$  beträgt (Tucek, 1978). Die Aktivität des Transporters kann moduliert werden: Bei Stimulation der ACh-Freisetzung wurde eine Steigerung des Cholin-Transportes beobachtet (Simon *et al.*, 1976; Antonelli *et al.*, 1981; Kuhar und Murrin, 1978). Jenden *et al.* (1976) konnten an Synaptosomen zeigen, dass die Aktivität des HACU umgekehrt proportional zu dem intrasynaptosomalen ACh-Gehalt ist. Synaptosomen sind als präparativ von Axonen abgetrennte Synapsenköpfchen, deren Membran sich an der Bruchstelle wieder schließt, definiert. Die postulierte direkte Kopplung von HACU und ChAT (Lefresne *et al.*, 1975) konnte nicht eindeutig nachgewiesen werden (Kuhar und Murrin, 1978). Experimentelle Ergebnisse wiesen vielmehr auf eine indirekte kinetische Kopplung hin, die sich aus den kinetischen Eigenschaften des HACU und der ChAT (siehe Abschnitt 1.2.2.1) erklären ließ: Mit einem  $K_M$ -Wert für Cholin von 0.3 - 1.2 mM (White und Wu, 1973) und einer Ch-Konzentration im Zytoplasma von ca. 50  $\mu\text{M}$  unter physiologischen Bedingungen, ist die ChAT nicht substratgesättigt; ein erhöhtes Ch-Angebot im Zytoplasma hätte eine gesteigerte ACh-Synthese zur Folge.

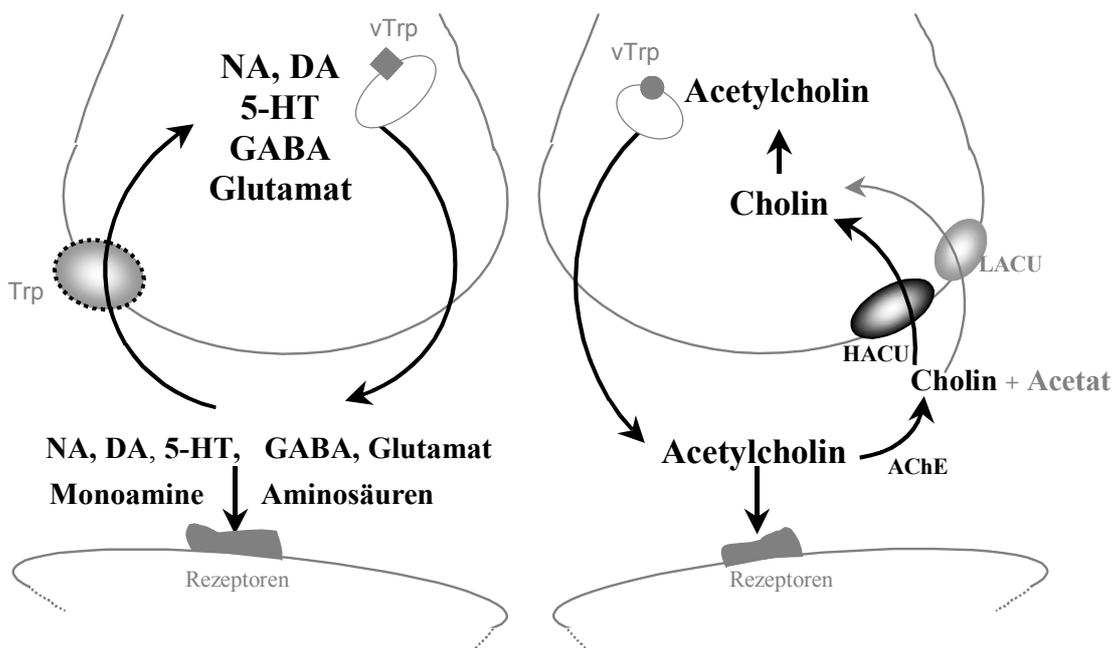
### **LACU**

Der LACU (*low affinity choline uptake*) ist ein auf cholinergen Neuronen, Gliazellen und nicht-cholinergen Nervenzellen, überwiegend somatisch und axonal lokalisierter, niedrigaffiner Cholin-Carrier mit einem  $K_T$ -Wert von 30-200  $\mu\text{M}$  (Blusztajn und Wurtman, 1983). LACU dient vor allem der Ch-Aufnahme zur Synthese cholinhaltiger

Membranlipide und transportiert Ch bei hohen extrazellulären Ch-Konzentrationen, bei denen der HACU schon gesättigt ist (Tucek, 1990).

### 1.2.3 Sonderstellung des Acetylcholins in der Neurotransmission

ACh ist unter den klassischen Neurotransmittern der einzige der neben Abdiffusion im wesentlichen durch enzymatische Spaltung inaktiviert wird. Das cholinerge Neuron muss zur Funktionserfüllung - stete und rapide Feuerungsrate - eine schnelle Resynthese von ACh durchführen (vergleiche Abschnitt 1.2.2.1). Die cerebrale Umsatzrate von Neurotransmittern in der Ratte ist 6 nmol/min, d.h., der Gesamtgewebebegehalt des ACh (20nmol/g) wird binnen 3 - 4 Minuten vollständig umgesetzt; die Umsatzrate des ACh im ZNS ist demnach 10 - 100 x höher als die aller anderen Transmitter und höher als in peripheren cholinergen Synapsen (Haubrich u. Chippendale, 1977; Tucek, 1978).



**Abbildung 1.4: Freisetzung und Inaktivierung von Neurotransmittern am Beispiel von Acetylcholin, den Katecholaminen Noradrenalin und Dopamin (NA und DA), dem Indolamin Serotonin (5-HT) und den Aminosäuren GABA und Glutamat**

Nähere Erläuterungen zur cholinergen Transmission siehe Abschnitt 1.2.2.1, Abbildung 1.3. Der linke Teil der Abbildung veranschaulicht die monoaminerge, glutamaterge und GABAerge Transmission. Neurotransmitter, mit Ausnahme von ACh und der Peptide, werden nach Exozytose wieder in die Nervenendigung aufgenommen. Die entsprechenden Transporter (Trp), die eine hohe Affinität für ihre Substrate besitzen, beziehen ihre Energie aus dem Natrium-Gradienten und dem Membranpotential über der Plasmamembran. Für die vesikuläre Aufnahme sind andere Transporter (vTrp) verantwortlich, die ihre Energie aus dem elektrochemischen Protonen-Gradienten über der Vesikelmembran beziehen.

Die Abbildung 1.4 veranschaulicht die prinzipiellen Unterschiede zwischen der cholinergen Transmission einerseits und der Neurotransmission von NA, DA, 5-HT, GABA und Glutamat andererseits.

Monoamine und Aminosäuren werden durch zelluläre Aufnahme des intakten Moleküls in die Präsynapse inaktiviert. Die Aufnahme erfolgt über spezifische membranständige Transporter. Im Gegensatz hierzu wird die Wirkung von freigesetztem Acetylcholin im synaptischen Spalt durch rapide hydrolytische Spaltung mittels AChE terminiert. Das Hydrolyse-Produkt Cholin wird in die präsynaptische Endigung transportiert und steht somit als Vorstufe für die *de novo*-Synthese von ACh zur Verfügung. Die zwei Mechanismen der Cholinaufnahme (HACU und LACU) sind in Abschnitt 1.2.2.2 beschrieben worden. Die Besonderheit des cholinergen Systems besteht demnach in der Wiederaufnahme der Neurotransmitter-Vorstufe.

### **1.2.4 Implikationen des zentralen cholinergen Systems bei neurodegenerativen Erkrankungen**

Die cholinergen Projektionsneurone im basalen Vorderhirn sind bei Lernleistungen und Gedächtnisfunktionen beteiligt und bei der Alzheimerschen Demenz typischerweise degeneriert. Der Morbus Alzheimer ist also Ausdruck eines cholinergen Defizits (siehe Abschnitt 1.2.4.2).

Der Morbus Parkinson hingegen ist die Folge eines cholinergen Übergewichts, im wesentlichen auf einer Enthemmung der cholinergen Interneurone des Striatums beruhend und in motorischen Dysfunktionen resultierend (Bigl und Arendt, 1991; siehe Abschnitt 1.2.4.1).

#### **1.2.4.1 Der Morbus Parkinson als Beispiel zentraler cholinergischer Dysfunktion**

Der Morbus Parkinson (idiopathisches Parkinson-Syndrom, Schüttellähmung, *Paralysis agitans*) ist eine progrediente neurodegenerative Stammganglien-Erkrankung. Die Krankheit ist durch die Symptome Tremor, Hypokinese und Rigor charakterisiert. Der Londoner Arzt James Parkinson beschrieb das Krankheitsbild erstmals in einer 1817 veröffentlichten Studie. Die Prävalenz steigt ab dem 60. Lebensjahr exponentiell an, so dass ca. 1 - 1.5 % der über 60jährigen von einer Funktionsstörung der Bewegungsabläufe betroffen sind. Die Diagnose erfolgt mittels neurologischer Untersuchung durch bildgebende Verfahren wie CT, MRT und PET.

Den Basalganglien kommt eine besondere Bedeutung bei der Kontrolle und Modulation von Bewegungsimpulsen zu. Zu diesen Kernen rechnet man den *Globus pallidus*, das *Putamen*, den *Nucleus caudatus*, die *Substantia nigra*, den *Nucleus subthalamicus*, den Thalamus und den *Nucleus ruber* (siehe Abbildung 1.5).

**Strukturen der Basalganglien**

<b>Striatum</b>	dorsal	<i>Nucleus caudatus</i> , Putamen
	ventral	<i>Nucleus accumbens</i>
<b>Pallidum</b>	dorsal	<i>Globus pallidus pars lateralis</i> und <i>pars medialis</i>
	ventral	<i>Tuberculum olfactorium</i> , <i>Substantia innominata pars subcommisuralis</i>
<b>Clastrum Amygdala</b>		
funktionell zugehörig (nicht entwicklungsgeschichtlich): <i>Substantia nigra pars reticulata</i> und <i>pars compacta</i> , <i>Nucleus subthalamicus</i> , <i>Nucleus reticularis thalami</i> , <i>Nucleus ruber</i>		

**Abbildung 1.5: Anatomische Gliederung der Stamm-/Basalganglien, Pathophysiologie**

Die Parkinson'sche Erkrankung betrifft das Gebiet der Basalganglien. Striatum, Pallidum, *Nucleus subthalamicus* und *Substantia nigra* zählen zu den Basalganglien. Das *Corpus Striatum* umfasst das Striatum und den *Globus pallidus*. Die *Substantia nigra* besteht aus 2 Teilen: der DA-haltigen *Pars compacta* und der DA-freien *Pars reticulata*. Die Basalganglien sind in der Funktion mit dem Thalamus, dem Hirnstamm, der Hirnrinde (sensomotorischer und präfrontaler Kortex), dem Rückenmark und mit monoaminergen Zellgruppen des Mittelhirns (ventrales Tegmentum, retrorubrale Areale, dorsale Raphekerne) verschaltet. Die Basalganglien greifen modulierend und kontrollierend in das motorische System ein. Die Kerne erfüllen als Schaltzentrum die Funktion der Parallelverarbeitung der Information aus unterschiedlichen sub- und kortikalen Arealen und der Informationszusammenführung, -selektion und -reorganisation (über zahlreiche parallel geschaltete Schleifen). Als „Inputstation“ fungiert das Striatum (kotrono-striatale Projektion, exzitatorische glutamaterge Neurone der gesamten Hirnrinde). Des weiteren erhält das Striatum Projektionen vom Thalamus, von der *Substantia nigra pars compacta*, von den Raphe-Kernen und dem *Locus coeruleus*. Die „Outputstation“ der Basalganglien bilden die inhibitorischen GABA-ergen Neurone des *Globus pallidus* und der *Substantia nigra pars reticularis*. Die hypokinetischen Krankheitsbilder der Basalganglien sind auf den Verlust des Dopamins als Folge der Degeneration des *Pars compacta* zurückzuführen.

Die *Substantia nigra* ist das Kerngebiet, das am meisten in Mitleidenschaft gezogen ist. Neuropathologisch findet sich eine Degeneration der zum Striatum projizierenden dopaminergen Neuronen in der *Substantia nigra pars compacta* mit Verminderung des Dopamingehaltes sowie hyalinen Einschlusskörperchen (Lewy-Körperchen) in den verbleibenden Nervenzellen. Durch neuronale Verbindungen zwischen den Kernen entsteht ein kompliziertes Netzwerk. Durch eine Störung in diesem Regelmechanismus wird die ausgewogene Steuerung der willkürlichen Bewegungsabläufe

behindert. Die wichtigsten Botenstoffe, welche die Verbindung zwischen den Kernen aufrecht erhalten, sind Dopamin, ACh und GABA. Höchste ACh-Konzentration findet man im Striatum (Putamen und *Nucleus caudatus*), höchste DA-Konzentration in der *Substantia nigra pars compacta*. Das DA-ACh-Transmittersystem ist beim Gesunden genau ausbalanciert. Eine Verschiebung dieses Gleichgewichts führt z.B. zu Parkinsonismus, da im sensiblen Gleichgewicht der Mediatoren des Gehirns eine wichtige Komponente fehlt: DA, als hemmender Botenstoff.

### **Das Striatum als Modell zur Untersuchung cholinergischer Parameter**

Der neuronale Aufbau des Striatums ermöglicht Untersuchungen der cholinergen Transmission. Das Striatum enthält folgende Neuronen-Zelltypen: i.) Mit etwa 3 %, ACh-enthaltender und einer Anzahl von  $6 \times 10^5$ ,  $50 \times 20 \mu\text{m}$  großen cholinergen Interneuronen besitzt das Striatum die dichteste cholinerge Innervation des Gehirns; ii.) des weiteren finden sich mittelgroße Interneurone und dornentragende Projektionsneurone, GABA und Substanz P oder Enkephalin enthaltend, mit einem Durchmesser von  $12 - 20 \mu\text{m}$  (>70 % bei Primaten, >90 % bei der Ratte).

### **Medikamentöse Therapie und andere Behandlungsstrategien**

Morbus Parkinson zeichnet sich durch ein funktionelles Übergewicht an ACh gegenüber DA aus und ist ein hypokinetisch-hypertones Syndrom. Dies stellt auch den Ansatzpunkt für die medikamentöse Therapie dar: Nämlich entweder die DA-Konzentration zu erhöhen oder die ACh-Wirkungen zu blockieren. Zur symptomatischen medikamentösen Parkinson-Therapie stehen heutzutage 3 Klassen von Pharmaka zur Verfügung: Dopaminergika, Anticholinergika und Glutamat-/NMDA-Rezeptor-Antagonisten (siehe Tabelle 1.4).

Neben der medikamentösen Therapie, die den Schwerpunkt der Behandlung des Morbus Parkinson darstellt, spielen moderne operative Behandlungskonzepte eine noch untergeordnete Rolle. Folgende Strategien in der chirurgischen Behandlung werden verfolgt: i.) die Transplantation dopamin-produzierender Zellen in das Striatum, ii.) die intrathekale Applikation von neurotrophen Faktoren und iii.) strukturelle und funktionelle Läsion überaktiver Kerngebiete der Basalganglien (Kupsch *et al.*, 1996; Lindwall, 1997). Derzeit wird allogenes fetales Mittelhirngewebe transplantiert und stereotaktisch in das Striatum des Patienten eingebracht. Intrathekal verabreichtes GDNF (*glial cell-line derived neurotrophic factor*) soll auf die nigralen dopaminergen Neurone protektiv wirken (Aebischer *et al.*, 1996). Durch

stereotaktische Thermokoagulation oder hochfrequente elektrische Stimulation (*deep-brain stimulation*) werden dem Striatum nachgeschaltete Kerngebiete des Gehirns strukturell und funktionell ausgeschaltet. Diese Behandlungsstrategie basiert auf der durch tierexperimentelle Daten gestützten Modellvorstellung, dass der striatale DA-Mangel zu einer pathologischen Übererregung subkortikaler Kerngebiete (*Globus pallidus internus* und *Nucleus subthalamicus*) führt (Kupsch *et al.*, 1996; Limousin *et al.*, 1995).

<b>Dopaminergika</b>	L-DOPA (Substitutionstherapie) plus Decarboxylase-Hemmstoff * *Benserazid *Carbidopa <b>Dopaminagonisten</b> : Bromocriptin, Lisurid, Pergolid, Dihydrocyprien, Pramipexol, Ropinirol, Cabergolin <b>Monoaminoxidase-B-Hemmstoff (MAO-B-Inhibitoren)</b> : Selegilin
<b>Anticholinergika</b>	Biperiden, Benztropin, Trihexyphenidyl, Bornaprin, Procyclidin, Metixen
<b>NMDA-Rez.-Antagonisten</b>	Amantadin, Memantin, Budipin
<b>COMT-Hemmer</b>	Entacapon, Tolcapon

**Tabelle 1.4: Antiparkinson-Medikamente, Beispiele wichtiger Substanzen**

Die erste medikamentöse Behandlung des Parkinson-Syndroms wurde Mitte des 19. Jahrhunderts in Form von Belladonna-Präparaten eingeführt. Etwa 100 Jahre später wurden die ersten synthetischen Anticholinergika in das Therapieschema aufgenommen. Ehringer und Hornykiewicz stellten 1960 fest, dass die motorischen Störungen auf einem Verlust dopaminerger Neurone in der *Substantia nigra* beruhen. Birkmayer und Barbeau bereiteten 1961 dem klinischen Einsatz von L-DOPA (zunächst intravenös) den Weg. Im Jahre 1969 wurde die orale L-DOPA-Therapie eingeführt.

Aufgelistet sind die verschiedenen Stoffklassen und Wirkstoffe. Die medikamentöse Antiparkinson-Therapie ist meistens eine Kombinations-Therapie. Medikamente unterschiedlichen Wirkaspektes können zusammen verabreicht werden. L-DOPA (*Levodopa*, L-3,4-Dihydroxyphenylalanin) wird im Gehirn zu DA umgewandelt und wirkt so dem DA-Mangel entgegen. Dopamin (DA) entsteht durch Decarboxylierung der Aminosäure Dihydroxyphenylalanin (DOPA) mittels der L-DOPA-Decarboxylase (DDC). L-DOPA wiederum wird aus Tyrosin unter Beteiligung der Tyrosinhydroxylase gebildet. Die Substitution des DA-Defizits in der *Substantia nigra* durch L-DOPA ermöglicht eine effektive Therapie des Morbus Parkinson. L-DOPA kann im Gegensatz zu DA die Blut-Hirn-Schranke passieren und wird im dopaminergen Neuron durch die zytosolische Decarboxylase zu DA umgebaut. Um die Umwandlung von L-DOPA zu DA in der Körperperipherie zu verhindern, wird dieser Vorläufer mit einem nicht ins Gehirn penetrierenden Decarboxylase-Hemmstoff (siehe \*) kombiniert. Diese symptomatische Behandlung ermöglicht eine zufriedenstellende Besserung der Symptome für einen Zeitraum von 5-10 Jahren. Die DA-Agonisten führen zu einer verstärkten Sensitivität an spezifischen Bindungsstellen für DA im Gehirn. Sie werden als Monotherapie oder im Kombination mit anderen Parkinson-Medikamenten eingesetzt werden, vor allem mit L-DOPA. Selegilin ist das derzeit am häufigsten verordnete Medikament. Es hemmt das Enzym MAO-B, das die oxidative Desaminierung von DA bewirkt. Selegilin wird üblicherweise mit L-DOPA kombiniert angewendet. Durch die Anticholinergika wird die vorherrschende Imbalance zwischen DA und ACh abgefangen, die Akinese jedoch nicht beeinflusst. Amantadin stimuliert als NMDA-Antagonist die DA-Freisetzung im Gehirn und wirkt funktionell anticholinerg. COMT-(Catechol-O-Methyl-Transferase)-Hemmer inhibieren ein hepatisches Enzym, das am Abbau von DA zu 3-Methoxytryptamin beteiligt ist. Diese Wirkstoffe werden meistens mit L-DOPA zusammen verabreicht.

#### **1.2.4.2 Die Senile Demenz vom Alzheimer-Typ (SDAT) als Beispiel zentraler cholinergischer Dysfunktion**

Der Morbus Alzheimer ist die häufigste Demenzform in den Industrieländern und macht etwa die Hälfte aller Demenzen aus (Chui, 1989). Der Symptomenkomplex der SDAT umfasst Einschränkungen des Gedächtnisses, des Denkens, der Wahrnehmung, der Orientierung, der Motorik, der Sprache und Schrift, des Verhaltens sowie der Persönlichkeit (Zilles *et al.*, 1995). Die Alzheimer Krankheit tritt in 90 % der Fälle sporadisch auf und wird meist erst im hohen Alter manifest. In etwa 10 % der Fälle bricht die Erkrankung wesentlich früher aus und zeigt eine familiäre Häufung, was auf eine genetische Komponente schließen lässt (vermehrte Produktion von  $\beta$ -Amyloid; Price *et al.*, 1998). Die Ursachen der Krankheit sind unbekannt; es werden Hypothesen diskutiert, die toxische, infektiöse, immunologische, metabolische, hormonelle, genetische und Umwelt-Faktoren berücksichtigen. Die Diagnose wird durch Testung der geistigen Fähigkeiten gestellt (subjektive Kriterien) und aus der Untersuchung des Nervensystems mit Hilfe moderner nuklearmedizinischer bildgebender Verfahren des Gehirns (objektive Kriterien: CT, MRT, PET, SPECT).

#### **Pathologie der Alzheimerschen Krankheit**

##### **Neuropathologische Veränderungen**

Anatomischer und pathologisch-histologischer Ausdruck der SDAT ist die Degeneration und progrediente Schädigung subkortikaler Kerngebiete\* und kortikaler Hirnareale (mittlerer Temporallappen, temporoparietalen Assoziationskortex; Wilcock *et al.*, 1988; Arnold *et al.*, 1991). Die von der Neurodegeneration erfassten Nervenzellen der basalen Vorderhirnkerne Septum\* und *Nucleus basalis Meynert\** strahlen breit gefächert cholinerge Nervenbahnen zum Hippokampus und zur Rinde des Vorderhirns ab, deren Überträgerstoff das ACh ist (siehe Abb. 1.2; Whitehouse *et al.*, 1982; Terry, 1985). Anders als im cholinergen System ist die Degeneration von serotonergen, noradrenergen, sowie dopaminergen Neuronen wenig ausgeprägt (Kurz und Lauter, 1987). Das serotonerge System ist mit einer Reduktion der Neuronendichte im dorsalen Raphe-Kern und einer Abnahme der 5-HT-Konzentrationen im Kortex und Hippokampus betroffen (Cross *et al.*, 1986). Beim noradrenergen System wurde eine verringerte Neuronenzahl im *Locus coeruleus* gefunden (Price *et al.*, 1986); häufig sind die DA-Spiegel in den Basalganglien vermindert (Allard *et al.*, 1990).

### **Morphologische Aspekte**

Typisch für die senile Demenz vom Alzheimer Typ (SDAT) sind bestimmte histologische und strukturelle Veränderungen: i.) Cytoplasmatische Einschlüsse von überwiegend abnorm hyper-phosphoryliertem Tau-Protein (Alzheimer-Fibrillen, *tangles*); ii.) extrazelluläre faserige  $\beta$ -Amyloid-Peptid-Anhäufungen (neuritische, Amyloid-Plaques) und iii.) verknäuelte Nervenfortsätze (Terry, 1985; Kurz und Lauter, 1987). Die aufgeführten Parameter gelten als zweifelsfreie histologische Kriterien zur Bestätigung der klinischen Diagnose durch eine pathologische Untersuchung *post mortem*. Die kugelförmigen A $\beta$ -Ablagerungen (bis 0.2 mm; A $\beta$ -Kettenlänge 40 bis 42 Aminosäuren) sind mikroskopisch erkennbar und wurden bereits 1904 von Alois Alzheimer als sichtbares Kennzeichen der SDAT entdeckt.

### **Mutationen und SDAT-Genese**

Drei Gene, die mit dem Auftreten der Krankheit verbunden sind, konnten identifiziert werden: i.) das Gen mit der genetischen Information für das Amyloid-Vorläuferprotein (APP, *amyloid precursor protein*), auf dem Chromosom 21, ii.) das Präsenilin-1-Gen auf Chromosom 14 und iii.) das Präsenilin-2-Gen auf Chromosom 1 (Price *et al.*, 1998). Das 1987 entdeckte APP spielt in der Alzheimer-Pathogenese eine zentrale Rolle. Der APP-Metabolismus kann auf einem sekretorischen ( $\alpha$ -Sekretase-Spaltung, gefolgt von  $\gamma$ -Sekretase-Proteolyse) und einem lysosomalen Weg ( $\beta$ - und anschließende  $\gamma$ -Sekretase-Spaltung) durch spezifische Prozessierung erfolgen (Golde *et al.*, 1993). Auf dem sekretorischen, nicht amyloidogenen Weg entstehen sezernierte, lösliche, neurotrophische und -protektive Spaltprodukte.

### **Amyloid Cascade Hypothesis**

Ein funktioneller Zusammenhang zwischen den neuropathologischen (Neurodegeneration) und den morphologischen ( $\beta$ -Amyloid) Veränderungen im Gehirn von Patienten mit SDAT ist umstritten (Neve und Robakis, 1998). Hardy und Higgins postulierten 1992 die Amyloid-Kaskade-Hypothese, die besagt, dass die neurotoxischen A $\beta$ -Agglomerate für den Neuronenuntergang verantwortlich sind. Hinweise auf eine gegenseitige Beeinflussung sind die Steigerung der APP-Bildung nach Zerstörung der Ursprungsregion der cholinergen Projektionsneurone im Basalhirn (Auld *et al.*, 1998; Lin *et al.*, 1998) und die Abnahme von ChAT-exprimierenden Zellen nach Injektion des  $\beta$ -Amyloid-Peptides in den *Nucleus basalis* (Pepeu *et al.*, 1996). Vermutlich führt  $\beta$ -Amyloid zu einer Destabilisierung bestimmter

Neurone, folglich zu Entgleisungen des intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Gleichgewichts (Kruman *et al.*, 1999) und Radikalbildung (Mark *et al.*, 1996; Markesbery, 1997). Über den  $\text{Ca}^{2+}$ -Spiegel wird der Phosphorylierungsgrad des tau-Proteins reguliert; dessen Hyperphosphorylierung und Ablagerung als Neurofibrillen verursacht den Nervenzelluntergang durch nekrotischen oder apoptotischen Zelltod (Cotman, 1998; Terry, 1996). Die Erforschung der Amyloidablagerungen eröffnet die Möglichkeit, neue - frühzeitig kausal und präventive - Therapieansätze zu finden.

### **Cholinerge Hypothese der SDAT**

Gedächtnisschwäche sowie hippocampales und kortikales cholinerges Defizit, wie es bei der SDAT auftritt, stehen in einem kausalen Zusammenhang (Collerton, 1986; Coyle *et al.*, 1993). Dieser wird als „cholinerge Hypothese“ der Demenzerkrankung bezeichnet (Bartus *et al.*, 1982). Das zentrale cholinerge System, insbesondere die septo-hippocampale Bahn, besitzt eine Schlüsselfunktion für Lern- und Gedächtnisprozesse. Hippokampus und Neokortex, als Zielgebiete cholinergischer Projektion aus den basalen Vorderhirnkernen, weisen bei Alzheimer drastische neurochemische Veränderungen auf: Reduktion der ChAT-Aktivität (um 20-50 %), des HACU und der AChE, sowie der Menge an endogenem ACh (Davies und Maloney, 1976; Sims *et al.*, 1983; Quirion, 1993). Die ChAT-Reduktion korreliert mit dem Schweregrad der Demenz (Perry *et al.*, 1978; Ruberg *et al.*, 1990). Weitere Hinweise auf einen Zusammenhang zwischen cholinergischer Dysfunktion und den Symptomen der SDAT lieferten folgende Studien: Verschlechterung der Lern- und Gedächtnisleistungen von gesunden jungen Probanden nach Scopolamin-Gabe (muskarinischer Antagonist) konnten durch AChE-Hemmstoffe aufgehoben werden (Collerton, 1986). Die Blockade dopaminergischer oder noradrenerger Rezeptoren hatte keinen Einfluß auf das Lernverhalten (Bartus *et al.*, 1982; Kurz und Lauter, 1987). Die Schlüsselrolle des zentralen cholinergen Systems bei kognitiven Prozessen wird auch durch tierexperimentelle Studien bestätigt, aus denen hervorgeht, dass cholinerge Antagonisten die Lernleistung beeinträchtigen (Bartolini *et al.*, 1996) und cholinerge Agonisten eine Verbesserung hervorrufen (Scali *et al.*, 1997). In tierexperimentellen Transplantationsstudien konnte gezeigt werden, dass nach Läsion cholinergischer Projektionen (Deinnervation des Kortex oder des Hippokampus) die auftretenden Gedächtnisdefizite (Greene *et al.*, 1994) durch Implantation von fetalem cholinergem Nervengewebe in den Hippokampus oder in den *Nucleus basalis* behoben werden konnten (Arendt *et al.*, 1989).

## Der Hippokampus als Modell zur Untersuchung cholinergischer Transmission

Der Hippokampus ist eine C-förmige Struktur, Teil des limbischen Systems, welches eine Rolle bei verschiedenen komplexen Verhaltensvorgängen spielt. Der Hippokampus stellt anatomisch den medialen Rand der Endhirnhemisphären, des cerebralen Kortex dar, wo sich das kortikale Blatt einrollt und übereinanderlegt. Er ist Zielgebiet cholinergischer Projektionen aus dem medialen Septum (vgl. Abbildung 1.2).

## Therapieansätze

Ein Zusammenhang zwischen der Reduktion cholinergischer Funktionen im Septum und *Nucleus basalis* und in den Zielgebieten ihrer cholinergen Projektion (Kortex und Hippokampus) und der Symptomatik des SDAT gilt als gesichert (Bartus *et al.*, 1982). Diese Erkenntnis war die Grundlage eines wichtigen therapeutischen Ansatzpunktes, nämlich der Verstärkung der Funktion von noch intakten ACh-freisetzenden Neuronen durch Verlangsamung der hydrolytischen Spaltung des ACh's (Bartus *et al.*, 1982). Die Hemmung des Inaktivierungsmechanismus führt zu einer vermehrten Verfügbarkeit des Neurotransmitters an den synaptischen Kontaktstellen. Zum Einsatz kommen AChE-Hemmer (siehe Tabelle 1.5).

<b>AChE-Hemmstoffe</b>	Rivastigmin, Donepezil, Tacrin, Galanthamin
<b>ACh-Präkursoren</b>	Cholin und Phosphatidylcholin führen vermutlich zu einer gesteigerten ACh-Synthese (Präkursoren-Hypothese; Wurtman <i>et al.</i> , 1987)
<b>M<sub>1</sub>-/M<sub>3</sub>-Rez.-Agonisten</b>	Stimulieren als Liganden postsynaptische Rezeptoren
<b>M<sub>2</sub>-Rez.-Antagonisten</b>	ACh-Freisetzung durch Blockade präsynaptischer Autorezeptoren gesteigert
<b>Nikotinische Agonisten</b>	Steigerung der ACh-Freisetzung durch Stimulation präsynaptischer nikotinischer Rezeptoren

**Tabelle 1.5: Cholinerge Therapieansätze bei der Alzheimerschen Demenz**

Da die Lern- und Gedächtnisstörungen bei der SDAT auf eine cholinerge Hypofunktion im Hippokampus und Kortex zurückzuführen sind, zielen die Behandlungsstrategien auf eine Verbesserung der cholinergen Neurotransmission ab. AChE-Hemmer haben sich als wirksam erwiesen, jedoch ohne einen langfristigen therapeutischen Erfolg vorzuweisen. Sie verzögern lediglich den Krankheitsverlauf um 1 - 2 Jahre bei Verbesserung von Gedächtnis und Konzentrationsfähigkeit (Aschoff, 1988; Kurz *et al.*, 1986). Dennoch stellen sie eine wertvolle Ergänzung zu den schon vorhandenen Nootropika dar: Piracetam, Pyritinol, Nimodipin, Nicergolin, *Ginkgo-biloba*-Extrakt. Sie entfalten ihre Wirkung vermutlich über Membranstabilisierung, Radikalschutz, Apoptosehemmung, Neuroprotektion, verbesserte Neurotransmitterfreisetzung und Rezeptorbereitstellung. Das Ziel heutiger Behandlungsverfahren ist, das Fortschreiten der Erkrankung zu verlangsamen und die Begleitsymptome (Depression, Schlafstörungen, Angstsymptome) zu unterdrücken.

### 1.3 Zielsetzung der Arbeit

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, erstmals die Interaktion des Hyperforins mit dem cholinergen System zu untersuchen.

Durch die Untersuchung cholinergischer Parameter sollten Hinweise auf den molekularen Wirkungsmechanismus von Hyperforin gefunden werden. Denn das cholinerge System bietet die einzigartige Möglichkeit, zwischen der diskutierten unselektiven Aufnahmehemmung und einem möglichen facilitierenden Effekt auf die Transmitterfreisetzung zu unterscheiden, wie unter 1.1.3.1, 1.1.3.2 und 1.2.3 beschrieben.

Da Hyperforin den transmembranären Natriumgradienten verringert, war zu erwarten, dass es  $\text{Na}^+$ -abhängige Transportsysteme im Allgemeinen inhibiert; entsprechend wäre auch eine Hemmung der  $\text{Na}^+$ -abhängigen hochaffinen Cholinaufnahme (**HACU**, *high affinity choline uptake*) denkbar. Da der HACU an die Acetylcholin-(ACh)-Synthese funktionell gekoppelt (Kuhar und Murrin, 1987; Tucek, 1984) und die *de novo* ACh-Synthese demnach direkt HACU-abhängig ist, würde demzufolge eine Inhibition des HACU durch Hyperforin in einer Modulation der cholinergen Neurotransmission resultieren. Eine **Cholin-Aufnahme-Hemmung** würde in einer Verringerung der ACh-Freisetzung resultieren, während ein **Freisetzungseffekt** eine Steigerung der extrazellulären ACh-Konzentrationen zur Folge hätte. Dahingegen werden die extrazellulären Monoamin- und Aminosäure-Level über beide Mechanismen gesteigert.

Ausgehend von dieser Arbeitshypothese sollte die Wirkung von Hyperforin

- erstens *in vitro* auf die HACU-Aktivität an kortikalen Synaptosomen im biochemischen Modell,
- zweitens *in vivo* auf die **striatalen** und **hippokampalen** cholinergen Parameter Acetylcholin und Cholin im EZR mittels Mikrodialyse-Technik am Rattenmodell,
- drittens in Tierverhaltensmodellen an Ratte und Maus untersucht werden;
- ergänzend dazu sollten der Zeitverlauf der Konzentration im Plasma der Ratte bestimmt und Stabilitätsdaten ermittelt werden.

Striatum und Hippokampus waren in dieser Studie von besonderem klinischen Interesse, da sie die von der Neurodegeneration bei Morbus Parkinson bzw. Alzheimer funktionell betroffenen Gehirnstrukturen sind.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 *In vivo*-Experimente und biologische Präparate

#### 2.1.1 Versuchstiere

Für die Mikrodialyseexperimente wurden männliche Sprague-Dawley-Ratten (SD-Ratten) der Firma Charles River (Sulzfeld, Deutschland) verwendet. Die Versuchstiere wurden mit bis zu 4 Tieren pro Käfig in einem Tierstall, bei einer konstanten Temperatur von 22 °C, bei 70 % Luftfeuchtigkeit und in einem 12-stündigen Hell- / Dunkelrhythmus gehalten. Standardfutter Altromin<sup>®</sup>1320 sowie Trinkwasser standen den Tieren *ad libitum* zur Verfügung. Zum Zeitpunkt der Versuche wogen die SD-Ratten 270-320 g und waren 7 - 10 Wochen alt.

#### 2.1.2 Mikrodialysetechnik in Ratten

Die Mikrodialyse ist eine minimal invasive Methode zur kontinuierlichen Gewinnung von wasserlöslichen und frei diffusiblen Substanzen aus dem Extrazellulärraum von Geweben. Mit Hilfe dieser Technik wurden die ACh- und Ch-Konzentration im Extrazellulärraum des ventralen Striatums und des ventralen Hippokampus´ adulter SD-Ratten bestimmt. Hierzu wurde eine I-förmige, konzentrische, selbstkonstruierte Sonde mit einer Austauschlänge von 3.5 mm und einer molekularen Durchlässigkeitsgrenze von 10.000 Da in das Ziel-Hirnareal der narkotisierten Ratte implantiert (vgl. Abbildung 2.4).

##### 2.1.2.1 Konstruktion der Mikrodialysesonden

Die bei der Mikrodialyse eingesetzten Sonden wurden nach einer modifizierten Vorschrift von Westerink und de Boer (Universität Groningen) in Eigenbau hergestellt. Das Prinzip der Sonden wurde von Santiago und Westerink (1990) veröffentlicht. Ein schematischer Bauplan der Mikrodialysesonde ist in Abbildung 2.1 dargestellt. Es handelt sich hierbei um I-förmige Sonden mit parallel verlaufendem Zu- und Abstrom der artifiziellen Cerebrospinalflüssigkeit (aCSF).

### 2.1.2.1.1 Eingesetzte Materialien

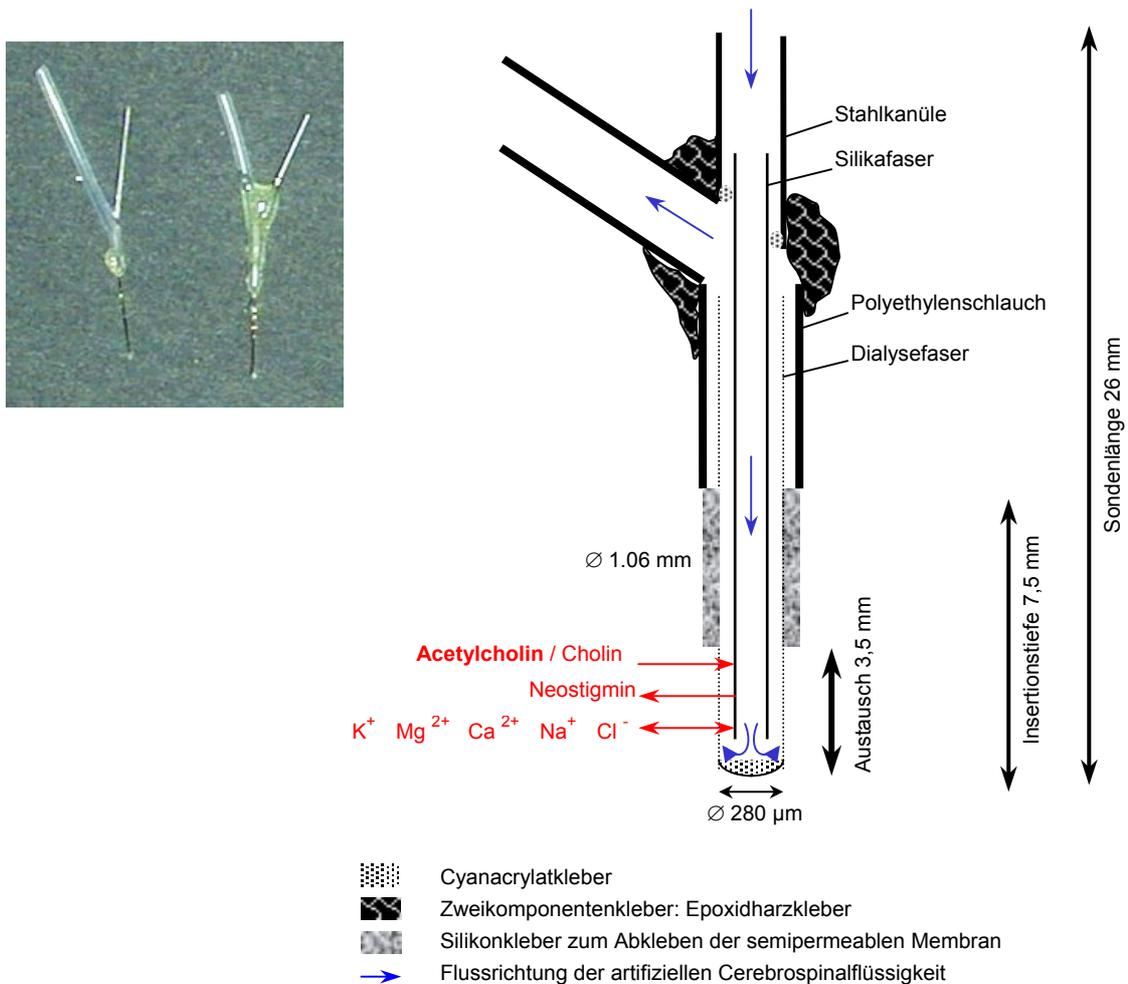
- Polyethylenschläuche (Innen-/Außendurchmesser: 0.38 mm ID, 1.09 mm OD, Portex, UK)
- Silikafasern (Quarzglaskapillaren, 150.0 µm OD, 74.0 µm ID, Polymicro Technologies INC)
- Kanülen (*Sterican<sup>®</sup> B/Braun Luer Lock 25Gx5/8"*)
- Dialysefasern aus Nierenfiltratkassetten (Polyacrylnitril-Polymethallylsulfonat; 240 µm ID, 256 µm OD, *Filtral 16, AN69<sup>®</sup> HF*, Hospal Medizintechnik, Nürnberg; *cut off*: 10 kDa)
- Cyanacrylatkleber (Pattex «Blitz Gel», Henkel, Düsseldorf)
- Epoxidharzkleber (2-Komponenten-Kleber: «*plus „sofortfest“*», UHU, Bühl)
- Silikonkautschuk (704 RTV spezial transparent, IBF GmbH, München)
- Utensilien: Skalpell, Baumwollhandschuhe, Pinzette, Markierstift

### 2.1.2.1.2 Technik des Sondenbaus

In ein 2 cm langes Polyethylenschlauchstück wurde ca. 0.5 cm weit die Kanüle gesteckt, der Schlauch mit der Kanülenspitze durchstoßen und an dieser Stelle abgeknickt. Die Kanüle wurde zunächst im Schlauch belassen. In ihre Spitze wurde eine 2 cm lange Silikafaser eingeführt und durch langsames Herausziehen der Kanüle diese Silikafaser durch das Loch und somit in den Schlauch gezogen. Die Silikafaser ragte nun an zwei Stellen aus dem Schlauch heraus; an der Knickstelle des Schlauches, durch dessen Loch die Faser gezogen wurde, und aus dem unteren Ende des Schlauches. Die Silikafaser wurde soweit herausgezogen, dass sie 7.5 mm aus dem Ende des Schlauches herausragte. Dieses Maß ergibt sich daraus, dass das zu untersuchende ventrale Striatum und der ventrale Hippokampus in ihrer dorso-ventralen Ausdehnung, von der Hirnoberfläche aus gemessen, mindestens 7.5 mm tief liegen. (vgl. Kapitel 2.1.2.3 Dorso-Ventral-Wert). Die Silikafaser wurde mit Cyanacrylatkleber an der Knickstelle des Schlauches festgeklebt. Von einer Kanüle wurde sowohl die Spitze als auch das Plastikende mit Luer-Lock-Anschluß abgesägt, so dass ein 11 mm langes Metallrohr erhalten wurde. Dieses wurde über das obere Ende der Silikafaser bis zur Knickstelle des Schlauches geschoben und dort mit Cyanacrylatkleber befestigt.

Nach einer Stunde wurde mit Baumwollhandschuhen - um einer möglichen Quellung der Faser durch Berührung vorzubeugen - eine Dialysefaser aus der Nierenfiltratkassette entnommen. Die Membran wurde vorsichtig über das untere Ende der Silikafaser gezogen und bis zur Knickstelle unter den Schlauch geschoben, um sie dann direkt am Ende der Silikafaser mit einem Skalpell zu

kappen. Die Dialysefaser wurde anschließend wieder ein Stück (einige mm) von der Silikafaser heruntergezogen und ihre untere Öffnung mit einem Tropfen Cyanacrylatkleber verschlossen. Sobald der Kleber gut getrocknet war, wurde die Dialysefaser soweit wie möglich wieder zurückgeschoben und am Ende des PE-Schlauches durch Betupfen mit Cyanacrylatkleber abgedichtet.



**Abbildung 2.1: Schematischer Aufbau einer Mikrodialysesonde zur Implantation in das ventrale Striatum der Ratte**

Die Fotografie zeigt zwei Sonden: Sonde im Rohbau und ohne den stabilisierenden Zweikomponentenkleber (links) und mit (rechts). Ihre Orientierung entspricht der skizzierten Sonde (rechts). Die Mikrodialysesonde wurde mit einer künstlichen Cerebrospinalflüssigkeit (aCSF, vgl. Kapitel 2.1.2.4.3) perfundiert. Die Zufuhr der aCSF geschieht über eine Metallkanüle; ihre Flussrichtung ist mit den blauen Pfeilen angedeutet. Die Perfusionslösung weist die gleiche Ionenzusammensetzung auf wie der Extrazellulärraum (EZR). Die Diffusionsverhältnisse sind rot dargestellt: K<sup>+</sup> -, Mg<sup>2+</sup> -, Ca<sup>2+</sup> -, Na<sup>+</sup> - und Cl<sup>-</sup> -Ionen befinden sich im Gleichgewicht, dahingegen diffundieren alle Moleküle, die nicht in gleicher Konzentration vorliegen, entlang des Konzentrationsgefälles durch die semipermeable Membran. Neostigmin in einer Konzentration von 1 µM in der aCSF diffundiert durch die Dialysemembran in den EZR, ACh und Ch hingegen aus dem EZR in die Perfusionsflüssigkeit. Der Austauschraum, der sich über eine Länge von 3,5 mm erstreckt, wird von der Dialysemembran begrenzt, welche Makromoleküle mit einem Molekulargewicht > 10.000 Da ausschließt. Die rücklaufende Flüssigkeit wurde über den Ausführschenkel (links) in einem ausführenden Schlauch gesammelt.

Mit einem Fein-Markierstift wurde die Austauschfläche eingezeichnet. Durch Auftragen eines dünnen Silikonkleber-Films wurden die Poren der Dialysemembran im oberen Teil verschlossen, so dass nur noch 3.5 mm des unteren Endes der Membran dialysefähig blieben. Die Austauschfläche kann durch Bestreichen mit Silikonkleber beliebig begrenzt und die Sonde somit an unterschiedliche Hirnareale angepasst werden. Zum Abschluss wurde ein Tropfen Epoxidharzkleber auf die Verbindungsstelle zwischen Polyethylenschlauch und Metallrohr gegeben, um die notwendige mechanische Stabilität der Sonde zu gewährleisten.

Die fertiggestellten Sonden wurde trocken, staubfrei und vor direkter Sonneneinstrahlung geschützt bis zum Tag Ihrer Verwendung aufbewahrt. Sie wurden 2 Tage bis 4 Wochen nach ihrer Fertigstellung verwendet.

### **2.1.2.2 Narkose**

Während aller Operationen waren die jeweiligen Versuchstiere mit Equithesin narkotisiert, einer Lösung, die das Barbiturat-Narkotikum Pentobarbital, das Hypnotikum Chloralhydrat, Magnesiumsulfat zur Entkrampfung, sowie Ethanol enthält.

#### **2.1.2.2.1 Equithesin-Zusammensetzung**

- 8.1 ml Nembutal<sup>®</sup> (entsprechend 0.486 g Pentobarbital; Lösung der Firma Sanofi mit 6 g Pentobarbital / 100ml; erhältlich über die *Wirtschaftsgenossenschaft deutscher Tierärzte e.G.*, Dreyerstr. 8, 30169 Hannover)
- 2.1 g Chloralhydrat (Trichloracetaldehydat, Merck)
- 0.15 g Magnesiumsulfat (Merck)
- 19.8 ml Propylenglykol (Sigma)
- 5.0 ml Ethanol absolut (Merck)
- 15 ml Aqua purificata (Millipore<sup>®</sup>-Qualität)

#### **2.1.2.2.2 Herstellung, Dosierung und Applikation**

Das Gemisch aus Feststoffen und Flüssigkeiten wurde homogenisiert und unter Verwendung eines 0.22 µm Spritzenvorsatzfilters Minisart<sup>®</sup> NML (Sartorius) sterilfiltriert. Die Lösung konnte 6 Monate im Kühlschrank aufbewahrt werden. Zur Narkoseeinleitung wurden 2.3 ml/kg Equithesin (entsprechend einer Initialdosis von 11,2 mg/kg Pentobarbital, respektive 48,3 mg/kg Chloralhydrat) i.p. injiziert.

Falls die erforderliche Narkosetiefe nicht erreicht wurde, wurden in Abständen von 10 Minuten weitere 0.5 ml/kg der Lösung appliziert. Die Gesamtmenge betrug höchstens 3.3 ml/kg i.p., entsprechend einer Dosis von 16.0 mg/kg Pentobarbital bzw. 69,3 mg/kg Chloralhydrat.

### 2.1.2.3 Implantation der Sonde

#### Geräte und Operations-Utensilien:

- Stereotaktisches Instrument : Stoelting, Chicago, USA
- Kaltlichtquelle, zweiarmig, KL 1500 Schott
- Carbogen-Befluter (*Carbogen* 95 % O<sub>2</sub>, 5 % CO<sub>2</sub>)
- Wasserstoffperoxid-Lösung, 3 %
- Scandicain® : 1 % Mepivacain-HCl , ASTRA, Wedel
- Bohrmaschine: Dremel® Multi Mod. 395Type5 Code32, Konijnenberg 60, Breda-NL
- Kronenbohrer: *Meisinger 224RF018*
- Spiral-Bohrer : *Meisinger 203006*
- Instrumentenschale, Chromnickelstahl-Klingen und Skalpellgriff (Merck), kleine (Moskito-) und große Gefäßklemmen, Tupfer, Lupe, chirurgische Feisschere, gebogene Feinspitzen-Pinzette mit Spezialschliff, gerade und stumpfe Pinzetten, Wattestäbchen, Präzisions-Markierstift, OP-Abdecktuch
- Plastikzylinder, aus Pipettenspitzen geschnitten
- schnellhärtender mineralischer Dentalzement, Harvard Dental GmbH, Berlin
- Petrischale und Mischplatte zum Anmischen des Zementes



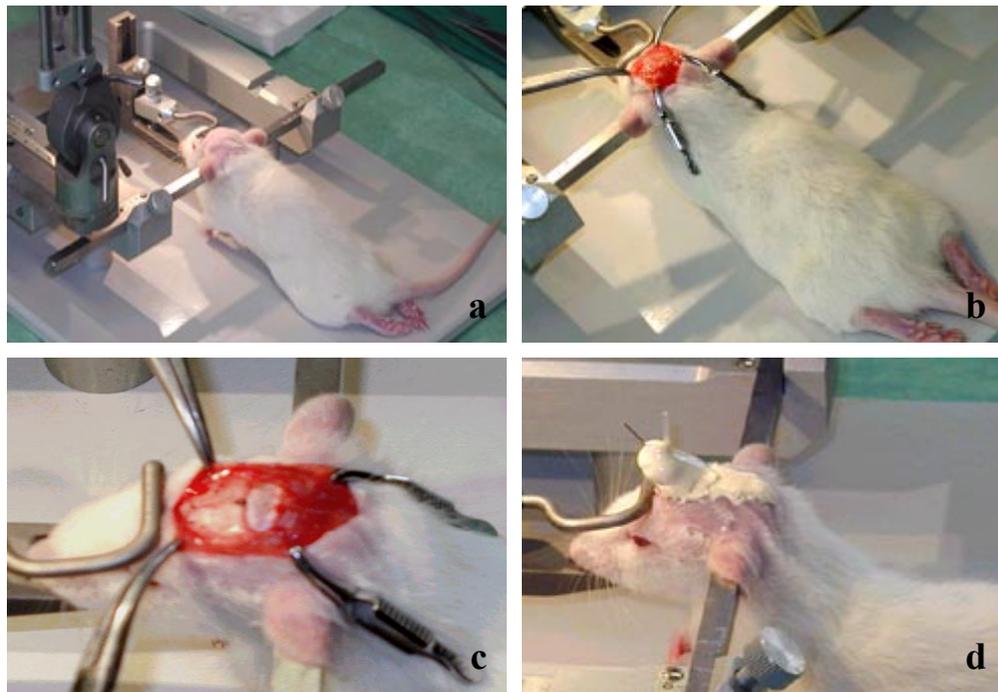
**Abbildung 2.2: Operationstisch**

Das stereotaktische Instrument (links) und das Instrumentarium (rechts) sind dargestellt.

Die Versuchstiere wurden vormittags (ca. 9.00 h) aus dem Rattenstall geholt und im Labor in einen Plexiglaskäfig gesetzt, um sich bis zu der am Folgetag stattfindenden OP an die neue Umgebung zu akkommodieren.

Die Narkose wurde durch intraperitoneale Injektion von Equithesin (Zusammensetzung vgl. Abschnitt 2.1.2.2.1) eingeleitet. Die Kopfhaare wurden abrasiert und die Haut mit 70 %igem Ethanol desinfiziert. Sobald das Toleranzstadium erreicht war, das Tier also auf Kneifen mit einer Pinzette in den Hinterlauf nicht mehr reagierte, wurde der Kopf in das stereotaktische Instrument eingespannt (vgl. Abbildung 2.3.a). Drei Fixationspunkte sind hierbei entscheidend: *anterior* die eingehakten Schneidezähne und *lateral* - jeweils links und rechts - die in den Ohrmuscheln am Schädelknochen befestigten Halterungen. Mit einem Skalpell wurde in der Mitte der Schädeldaches eine ca. 2 cm lange sagittale Inzision, über den Augen beginnend und hinter den Ohren endend, gesetzt. Mit Gefäß- und Moskitoklemmen wurden die beiden Hautlappen seitwärts gelegt (vgl. Abbildung 2.3.b). Von der freipräparierten Schädeldecke konnten die Kopfhäute mit Skalpell und Tupfer entfernt und somit ein trockenes Operationsareal erhalten werden. Blutungen wurden per Drucktamponade gestoppt. Das Betupfen mit 3%iger Wasserstoffperoxid-Lösung ließ die Schädelknochen und Hirnfissuren gut erkennen (vgl. Abbildung 2.3.c). In die Mitte der linken Schädelplatte wurde mit Hilfe eines Hartmetall-Spiralbohrers ein Loch mit einem Durchmesser von ca. 0.5 mm Durchmesser gebohrt, in das anschließend mit einem Schraubenzieher eine Stahlschraube gedreht wurde. Um die gewünschte Stelle für die Insertion der Sonde in das ventrale Striatum zu finden, wurde eine Sonde im Sondenhalter befestigt und ihre Position mit Hilfe der Justierschrauben so eingestellt, dass sie sich genau über dem Punkt Bregma (siehe Abbildung 2.4) befand. Der Ausgangspunkt Bregma bezeichnet den Schnittpunkt der drei Hirnfissuren. Von Bregma ausgehend und auf den Angaben aus dem Atlas von Paxinos und Watson (1986) basierend, wurden die folgenden Koordinaten für die Implantation der Sonde in das ventrale Striatum verwendet: *anterior-posterior*: AP +0.2 mm, *lateral*: L -2.8 mm und *dorso-ventral*: DV -7.5 mm. In einer getrennten Versuchsreihe wurde für die Implantation der Sonde in den ventralen Hippokampus von dem Punkt Lambda (siehe Abbildung 2.4) ausgegangen; als Referenz für die Koordinaten AP +3.5 mm, L -5.1 mm, DV -7.5 mm diente oben genannter Atlas des Rattenhirns.

Unter stereotaktischer Kontrolle wurden die Koordinaten für die jeweilige *anterior-posteriore* sowie die *laterale* Lokalisation der Sonde mit den Justierschrauben eingestellt und die Position mit einem Feinmarkierstift eingezeichnet. Anschließend wurde - diesen Punkt mit dem Hartmetall-Kronenbohrer zentrierend - ein rundes Plättchen des Schädelknochens mit einem Durchmesser von 2 mm entfernt.



**Abbildung 2.3: Implantation der Sonde**

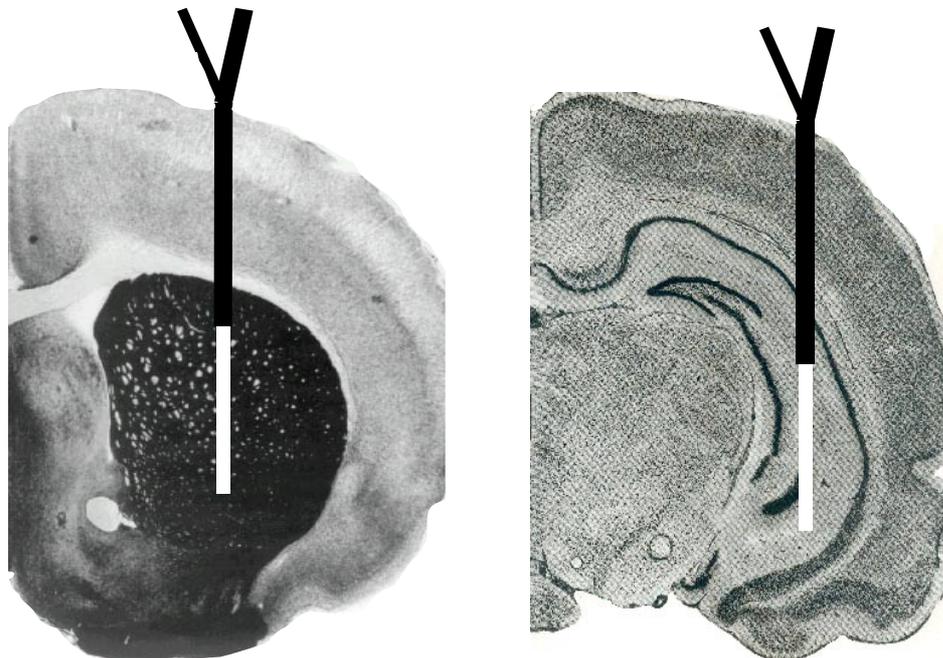
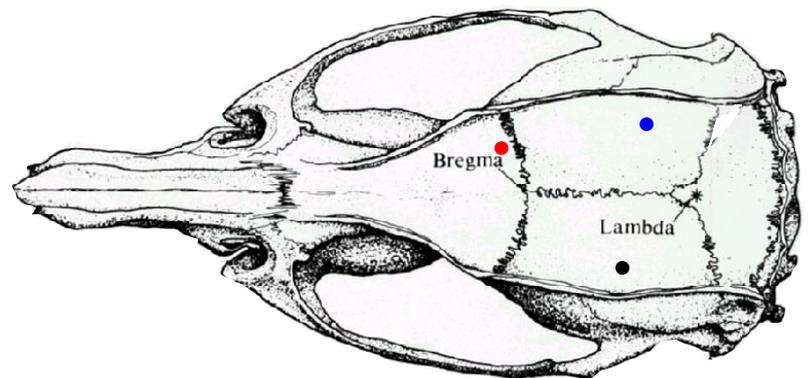
a.) Das narkotisierte Tier wurde in das stereotaktische Instrument eingespannt, b.) anschließend mittels eines Skalpell eine sagittale Zäsur gesetzt und c.) die Schädeldecke freipräpariert, so dass die Hirnfissuren gut zu erkennen waren. Bild d.) zeigt die nach koordinatenkonformer Insertion mit Dentalzement fixierte Sonde.

Die einzusetzende Sonde wurde unter Lupenbetrachtung mit physiologischer Kochsalzlösung auf ihre Funktionsfähigkeit überprüft und wieder in den Sondenhalter eingespannt. Daraufhin wurde sie langsam auf die beim Bohren intakt gebliebene *Dura mater* herabgesenkt (Nullpunkt). Vor der Insertion wurde die Dura mit einer feinen sterilen Kanüle angeritzt und die eventuelle Blutung mit einem Wattestäbchen unter leichtem Druck gestillt. Vom Nullpunkt ausgehend wurde die Sonde 7.5 mm tief in das Gehirn eingeführt. Sie konnte mit Hilfe der Skala auf der dorso-ventralen Achse des stereotaktischen Instrumentes sachte auf die gewünschte Tiefe hinabgefahren werden.

Ein kleiner Plastikzylinder wurde aus Stabilitätsgründen um die Sonde auf den Schädelknochen plaziert und mit zunächst niedrigviskosem Dentalzement ausgefüllt, um die Sonde direkt zu fixieren. Die Schraube und die gesamte freigelegte Schädelregion, die Hautlappen miterfassend, wurden einzementiert, was die Stabilität weiter erhöhte.

**Abbildung 2.4: Dorsale Ansicht eines Rattenschädels nach Paxinos und Watson (1986).**

Bregma und Lambda sind durch die Hirnfissuren definiert und bezeichnen Schnittpunkte dieser drei Linien. Eingezeichnet sind die Punkte für die Lokalisation der Sonde im ventralen Striatum (•) und im ventralen Hippokampus (•) und für die Positionierung der Schraube in der kontralateralen Schädelplatte.



**Abbildung 2.5: Lokalisation der Sonde im ventralen Striatum und im ventralen Hippokampus in einer Darstellung des Rattenhirns im Koronalschnitt.**

Die Abbildungen aus dem Atlas „The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates“ von George Paxinos und Charles Watson (1986) zeigen 40 µm dicke Gewebeschnitte im Bereich des Striatums (links, Bregma +0.2 mm) und des Hippokampus (rechts, Bregma -5.2 mm), die einer Acetylcholinesterase-Färbung unterzogen wurden (Koelle und Friedenwald, 1949; Lewis, 1961). Eingezeichnet sind die Mikrodiyalysesonden (Austauschflächen weiß dargestellt) in den entsprechenden Hirnarealen.

Der Sondenhalter wurde entfernt, sobald der erste Zement trocken und fest war. In den Bereich der Sondengabelung konnte der Dentalzement daraufhin - da besser zugänglich - heranmodelliert werden.

Nach der Operation wurde das Versuchstier aus der Halterung befreit und die Sonde mit artifizieller CSF (siehe Kapitel 2.1.2.4.3) perfundiert, um sie nach erfolgter Implantation nochmals auf ihre Durchlässigkeit zu überprüfen.

## 2.1.2.4 Mikrodialyse-Versuchsordnung

### 2.1.2.4.1 Geräte und Apparaturen

- Versuchstiergefäß: transparenter Plastikkäfig
- Präzisionspumpe: *Havard Apparatus Syringe infusion pump 22*, South Natick USA
- Glas-Präzisionsspritze: 1 ml Gastight® #1001 Hamilton, Deutschland
- Sammelgefäße: 1.5 ml Eppendorf Reaktionsgefäße Plastibrand®, BRAND
- Fraktionssammler:
  - *BIO-RAD Model 2110 Fraction Collector*
  - *2112 Redivac Fraction collector*, LKB Bromma

### 2.1.2.4.2 Verwendete Perfusionsschläuche

- 90 cm lange, kleinumige Zugangs- und Abgangsschläuche: 0.28 mm ID / 0.61 mm OD, *Sims Portex Limited fine bore non-sterile polyethylene tubing*, Smiths Ind. Medical Systems, Hythe/ Kent, England UK
- Adapter, als Verbindungsstück zwischen Sonde und Perfusionsschlauch, Länge 5 mm:
  - auf Sonden-Einfuhrschenkel (Kanüle): PE-Schlauch *Ismatec Tygon R3607*, ID 0.38 mm wall 0.9 mm (Glattbrugg-Zürich)
  - auf Sonden-Ausfuhrschenkel: *Ismatec Tygon R3607*, ID 0.38 mm wall 0.9 mm und *Ismatec 70534-08 SC 008*, ID 0.76 mm, wall 0.86 mm (Glattbrugg-Zürich)

### 2.1.2.4.3 Zusammensetzung der Perfusionsflüssigkeit

- |            |                  |         |
|------------|------------------|---------|
| ■ 147.0 mM | Natriumchlorid   | (Roth)  |
| ■ 4.0 mM   | Kaliumchlorid    | (Merck) |
| ■ 1.2 mM   | Magnesiumchlorid | (Merck) |
| ■ 1.2 mM   | Calciumchlorid   | (Merck) |

### 2.1.2.4.4 Versuchsaufbau

Die Mikrodialyse-Versuche wurden am ersten und zweiten Tag nach der Implantation der Sonde an wachen, freibeweglichen Versuchstieren durchgeführt. Zu späteren Zeitpunkten besteht die Gefahr der Ergebnisverfälschung durch die

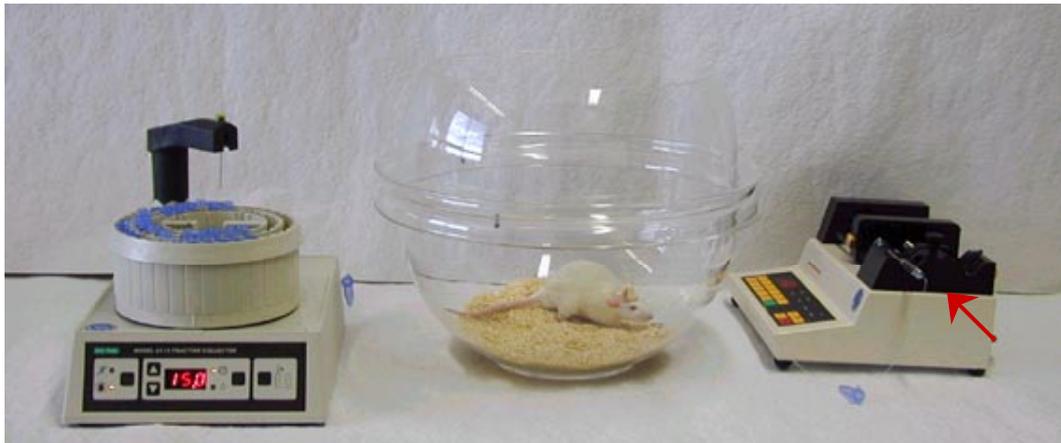
verstärkt auftretende reaktive Gliosis rund um die Dialysemembran. Den Ratten wurde demnach eine 18-20stündige Erholungsphase gewährt; gleichwohl ist dieses Zeitfenster für die Restitution der im Insertionsareal beschädigten und somit durchlässigen Blut-Hirn-Schranke wichtig (Benveniste *et al.*, 1987).

Über die Dauer der Versuche befanden sich die Ratten in abgerundeten Plastikbehältern (vergleiche Abbildung 2.6), bei unbegrenzt zur Verfügung stehendem Trinkwasser und Futterkarenz. Die Tiere zeigten normales Verhalten: Trinken, Putzen, Neugier (siehe Abbildung 2.7).

Die verwendete aCSF (Zusammensetzung siehe Kapitel 2.1.2.4.3) entsprach in ihrer Qualität bezüglich Osmolarität, ionaler Zusammensetzung und pH-Wert der des EZR. Dieser Perfusionslösung wurde kurz vor Beginn des Versuches Neostigmin 1  $\mu\text{M}$  (Sigma Co. Deisenhofen, Deutschland) zugesetzt, um die biochemischen Prozesse bis zu 1 mm im Umfeld der Sonde - zwecks Erhöhung der analytischen Nachweisgrenze des ACh - zu manipulieren: Neostigmin hemmt die AChE und verhindert somit die hydrolytische Spaltung des ACh im Diffusionszylinder. Ein Neostigmin-Zusatz ist notwendig, da - trotz hoher Nachweisempfindlichkeiten des mit der „microbore“-Technik arbeitenden HPLC-Gerätes (siehe Abschnitt 2.3.1.3) - ein Nachweis von ACh im EZR des Striatums oder des Hippokampus´ unter den gegebenen Bedingungen i.d.R. nicht möglich war (Dialyse-Prinzip: Möglichkeiten und Grenzen der Technik siehe Diskussion).

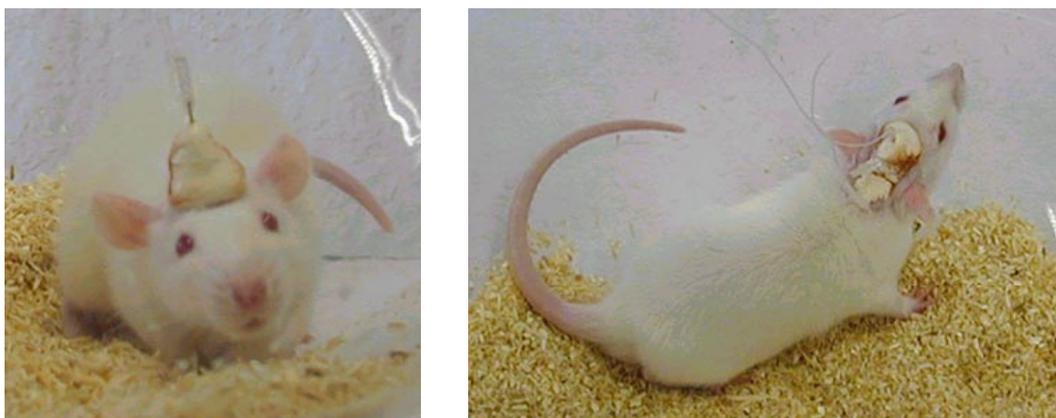
Mit Hilfe der Präzisionspumpe wurde die aCSF mit einer Geschwindigkeit von 2  $\mu\text{l}/\text{min}$  durch den 90 cm langen PE-Zugangsschlauch in die Sonde befördert. An der Dialysemembran fand ein Stoffaustausch entlang des Konzentrationsgefälles zwischen EZR und der Perfusionsflüssigkeit statt (vgl. Abbildung 2.1); als treibende Kraft für die passive Diffusion dienten die Unterschiede der Stoffkonzentrationen benachbarter Kompartimente. Dabei konnten Moleküle mit einem Molekulargewicht unter 10 kDa (molekulare Durchlässigkeitsgrenze der Dialysemembran) diese Membran passieren. Das Dialysat wurde aus dem 90 cm langen Ausgangsschlauch in Eppendorfgläsern, die sich in einem automatischen Probensammler befanden, kontinuierlich aufgefangen (vergleiche Abbildung 2.6). Die Perfusate wurden im Abstand von 15 Minuten fraktioniert gesammelt und die so erhaltenen Proben bis zur Quantifizierung (siehe Abschnitt 2.3.1.3) des dialysierten ACh und Ch tiefgekühlt aufbewahrt.

Zu Beginn eines jeden Versuches oder Versuchsabschnittes wurde der Eingangsschlauch mit der jeweiligen Perfusionsflüssigkeit gespült und befüllt. Die Passagezeit vom Sondenausgang über den Ausgangsschlauch zum Auffanggefäß betrug 15 Minuten. Die Zeitachsen der Abbildungen im Ergebnisteil dieser Arbeit wurden um diesen Wert korrigiert.



**Abbildung 2.6: Versuchsaufbau eines Mikrodialyseexperimentes**

Eine Präzisionspumpe (rechts im Bild) befördert die Perfusionslösung (aus einer Hamilton-Glasspritze, roter Pfeil) mit einer niedrigen Flussrate von 2  $\mu\text{l}/\text{min}$  durch einen Polyethylenschlauch in die implantierte Sonde, die am Vortag in das Tier implantiert wurde. Das Dialysat fließt dann über den abführenden Schenkel der Sonde in einen Ausgangsschlauch aus Polyethylen, an dessen Ende es mit Hilfe eines Probensammlers (links im Bild) fraktioniert aufgefangen werden kann; Zeitauflösung 15 Minuten, gesammeltes Perfusat ca. 30  $\mu\text{l}$ . Das Versuchstier befand sich während des Experimentes in einem Plexiglasgefäß, war wach und konnte sich frei bewegen.



**Abbildung 2.7: Ausschnittsvergrößerung, SD-Ratten im Plastikkäfig während des laufenden Versuches**

Die Experimente wurden am 1. und 2. Tag nach der Implantation der Sonde am wachen, freibeweglichen Tier durchgeführt. Die Sonde wurde mit Dentalzement (weiß im Bild) auf der freipräparierten Schädeldecke fixiert (vgl. Kapitel 2.1.2.3). Zu sehen sind zuführender und abführender Polyethylen-Perfusionsschlauch.

### **2.1.2.5 Versuchsdurchführung**

Die Mikrodialyse-Experimente fanden zwischen 9.00 und 19.00 Uhr an zwei aufeinanderfolgenden Tagen statt. Den Versuchstieren stand kein Futter, jedoch Wasser *ad libitum* zur Verfügung.

Im Vorlauf wurde die Sonde zwecks Equilibrierung ein bis zwei Stunden lang perfundiert. Danach wurden zunächst 6 Perfusat-Fractionen gesammelt, die zur Ermittlung des basalen ACh- und Ch-Effluxes dienten. Unterschieden sich die Konzentrationen von 5-6 aufeinanderfolgenden Proben um weniger als 10 %, so wurde aus diesen der Mittelwert errechnet und als Basalwert für den ACh- bzw. Ch-Gehalt im Dialysat betrachtet.

Die nach Gabe der zu testenden Substanz gemessenen ACh- und Ch-Konzentrationen wurden in Prozent des Basal-Effluxes ausgedrückt, welcher als 100 % definiert wurde. Die zu untersuchende Substanz Hyperforin (siehe Abschnitt 2.2.1.4) wurde unmittelbar vor dem Experiment gelöst und entweder in physiologischer Kochsalzlösung in Dosen von 1 und 10 mg/kg i.p. injiziert oder in Neostigmin-haltiger aCSF in Konzentrationen von 10, 30 und 100 µM lokal durch die Sonde appliziert. Kochsalzinjektionen (0.9 % NaCl) dienten als Kontrollen.

Die ACh- und Ch-Gehalte der Mikrodialyseproben wurden direkt per HPLC (Hochleistungsflüssigkeitschromatographie, siehe Kapitel 2.3.1.3) bestimmt.

Die experimentellen Ansätze dieser Studie entsprachen den maßgeblichen Richtlinien der zuständigen Behörde (Bezirksregierung Rheinland-Pfalz) und wurden genehmigt (Aktenzeichen 177-07/991-30).

### **2.1.2.6 Überprüfung der Lage der implantierten Sonde**

Nach Beendigung des zweiten Versuchstages wurden die Tiere mit Pentobarbital oder Diethylether (Merck, Darmstadt) tief narkotisiert und per Dekapitation getötet. Die Kopfhaut wurde aufgeschnitten, die Schädeldecke mit Schere und Pinzette entfernt und danach das Gehirn mit einem Minispatel herausgeschält. Mit einer Rasierklinge wurden Schnitte in Sondennähe angefertigt.

Die Position der Sonde wurde visuell bzw. makroskopisch überprüft. Nur Ergebnisse von Versuchstieren mit richtiger Lokalisation der Sonde wurden in die Auswertung aufgenommen.

### 2.1.2.7 *In vitro*-Wiederfindungsrate von ACh im Perfusat

Die ACh-Konzentration im Dialysat liegt – methodisch bedingt – unter den tatsächlichen absoluten Konzentrationen im EZR, da während der Perfusion nur ein teilweiser Ausgleich der Konzentrationen beider Kompartimente (Perfusat, EZR) stattfindet.

Die Wiederfindungsrate hängt von der Bauweise der Sonde (bei gleicher Konstruktionsweise gleiche Ausbeute), von den Membraneigenschaften, der Austauschlänge, den physiko-chemischen Eigenschaften der interessierenden Substanz, den Diffusionseigenschaften der Substanz im Gewebe und von der Flussgeschwindigkeit der aCSF durch die Sonde ab (Benveniste und Hüttemeier, 1990). Um eine Aussage darüber treffen zu können, wie das Verhältnis zwischen der tatsächlichen endogenen ACh-Konzentration im EZR des Gehirns und seiner Konzentration im Dialysat ist, wurde die Wiederfindungsrate, die sogenannte „*in vitro recovery*“, bestimmt.

Die relative Ausbeute wurde stichprobenartig ermittelt. Hierzu wurde eine Sonde in eine Perfusionslösung (37 °C) getaucht, die 0.1 oder 1 µM ACh enthielt; perfundiert wurde sie mit ACh-freier aCSF bei einer Geschwindigkeit von 2 µl/min. Aus der die Sonde umgebenden Lösung gelangen die diffundierenden Moleküle nicht quantitativ in das Perfusat. Nach einer Stunde Vorlaufzeit wurden viertelstündlich Proben des Perfusates gesammelt und mittels HPLC (siehe 2.3.1.3) analysiert.

Die Wiederfindungsrate ist definiert als das Verhältnis zwischen der Konzentration dieser Substanz im Dialysat und ihrer Konzentration in der Umgebungslösung (Benveniste und Hüttemeier, 1990). Unter *in vivo*-Bedingungen entspricht die letztgenannte Konzentration der extrazellulären Konzentration der Substanz. Die Wiederfindungsrate der Mikrodialyse mit Striatum-Sonden betrug für ACh 27-34 % und für Ch 32-34 %; bei einer 1 µM Umgebungslösung befanden sich im Dialysat demnach 270-340 nM ACh bzw. 320-340 nM Ch. Diese Daten für die *in vitro recovery* von ACh sind vergleichbar mit denen käuflich erworbener (Benveniste, 1989) und anderer, selbst gebauter Mikrodialysesonden (Damsma *et al.*, 1987; Toide *et al.*, 1989).

### 2.1.3 Entnahme von Cerebrospinalflüssigkeit

Die Versuchstiere wurden gewogen, mit 10 mg/kg i.p. Hyperforin (siehe 2.2.1.4) behandelt und nach einer bzw. zwei Stunden (jeweils n=4) mit Pentobarbital (40-80 mg/kg i.p.) anästhesiert.

Die Cerebrospinalflüssigkeit (CSF) wurde durch Punktierung der *Cisterna cerebello medullaris* nach einer Vorschrift von Chou und Levy (1981) gewonnen. Nach Sagittalschnitt und durch stumpfe Trennung der Nackenmuskeln mittels zweier flacher Pinzetten wurde die Punktionsstelle, die Membran über der Cisterna magna, freipräpariert. Zur Punktierung wurde der Kopf des Versuchstieres rechtwinklig nach unten gebeugt. Die CSF-Gewinnung erfolgte in waagerechter Haltung des Kopfes, *per* Insertion einer 14-gauge Kanüle, an deren Ende ein dünner Plastikschauch befestigt war, über den ca. 50-100 µl farbloses CSF-Punktat in eine 1ml-Luer-Lock-Spritze (Braun) aufgezogen wurden.

Die Abwesenheit von Blut konnte routinemäßig durch optische Kontrolle bestätigt werden. Die CSF wurde ohne weitere Aufarbeitung der HPLC-Analytik unterzogen (siehe Abschnitt 2.3.2.1).

### 2.1.4 Gewinnung und Aufbereitung von Rumpfblood

Den Versuchstieren wurde eine Dosis von 10 mg/kg Hyperforin i.p. appliziert. Nach 30, 60 und 120 Minuten (jeweils n=4) wurden sie dekapitiert und unter Vorlage von Heparin in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß entblutet.

Das aufgefangene Mischblut (arterielles und venöses Blut) wurde zur Herstellung von Plasma sofort bei Raumtemperatur, 800 x g 10 Minuten zentrifugiert. Ein Aliquot des Überstandes, des Plasmas, wurde mit zwei Volumina eisgekühlten 96%igen Ethanol zur Fällung der Plasmaproteine versetzt, intensiv gemischt und das Präzipitat 10 min bei 12000 x g abzentrifugiert. Ein definiertes Volumen des Überstandes wurde durch Evaporation unter Stickstoffbegasung zur Trockne eingedampft, der Rückstand in mobiler Phase (siehe Abschnitt 2.3.2.1) aufgenommen und der in diesem Extrakt interessierende Analyt Hyperforin mittels HPLC und elektrochemischer Detektion (vgl. 2.3.2.1) umgehend bestimmt.

## 2.2 Bestimmung der Cholinaufnahme

Die Experimente zur Untersuchung der hochaffinen Cholinaufnahme wurden an Synaptosomen durchgeführt. Synaptosomen sind von einer geschlossenen Membran umgebene Partikel, die den präsynaptischen Endigungen von neuronalen Zellen entsprechen; sie entstehen bei dem Vorgang des Homogenisierens durch Abreißen der Nervenendigungen vom Axon und Wiederverschmelzung der Membranenden. Neben präsynaptischen Vesikeln enthalten sie auch funktionstüchtige Mitochondrien zur ATP-Produktion und weisen gelegentlich anheftende postsynaptische Membranen auf. Synaptosomen sind metabolisch kompetent, betreiben Zellatmung, nehmen Glukose und Sauerstoff auf und halten durch Ionenpumpen in der Membran die Konzentrationen von Natrium und Calcium in der Zelle niedrig und die Kalium-Konzentration hoch. Das Synaptosomen-Membranpotential entspricht dem normalen Membranpotential (-70 mV) und die Inkubation in depolarisierenden Medien ruft einen Calcium-Einstrom hervor, gefolgt von einer Neurotransmitterfreisetzung (Whittaker, 1992). Seit ihrer Entdeckung 1958 durch Whittaker und Mitarbeiter wurden verschiedene Methoden zur Gewinnung möglichst homogener Fraktionen etabliert (Whittaker, 1992). Die in der vorliegenden Arbeit angewendete Methode ist im Abschnitt 2.2.1.2 erläutert.

### 2.2.1.1 Lösungen, Präparationsbesteck, Geräte

- HEPES-Saccharose-Puffer: 320 mM Saccharose (Merck, Darmstadt), 10 mM HEPES-Base (N-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-N'-2-ethansulfonsäure, Merck, Darmstadt), pH-Wert von 7.2-7.4 nach Begasung mit *Carbogen* (95% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub>)
- Krebs-Ringer-Puffer, KRP: 122 mM NaCl, 4.9 mM KCl, 1.3 mM CaCl<sub>2</sub>, 15.8 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1.2 mM MgSO<sub>4</sub>, 11.1 mM Dextrose, (Merck, Darmstadt), pH-Wert von 7.2-7.4 nach Begasung mit *Carbogen* (95% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub>)
- modifizierte KRP-Lösungen: pH-Wert von 7.2-7.4 nach Begasung mit *Carbogen*
  - Natrium-freie KRP: Na wurde isotonisch durch Saccharose 252 mM und Trisphosphat 15.8 mM ersetzt
  - Hemicholinium-3-haltige KRP: enthielt 1 µM Hemicholinium-3 (HC-3, von Sigma Co., Deisenhofen, Deutschland erworben)
  - *62mM-K<sup>+</sup>-KRP*: 65 mM NaCl (die Konzentration wurde verringert, um Isoosmolarität zu gewährleisten), 62 mM KCl, 1.3 mM CaCl<sub>2</sub>, 15.8 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1.2 mM MgSO<sub>4</sub>, 11.1 mM Dextrose (Merck, Darmstadt)

- Präparationsbesteck: Schere, kleiner Spatel, stumpfe Pinzette, Mikrolöffelspatel, Skalpell, Rasierklinge, Haarpinsel
- Eisbadeinsätze für Reaktionsgefäße, eisgefüllte Polyurethanwanne, darin Becherglas und Petrischale mit Carbogen-begaster KRP, in KRP getränktes Filterpapier auf eisgefüllter Petrischale, konischer Glas-Homogenisator
- Heraeus-Zentrifuge (P<sub>1</sub>-Fraktion); Ultrazentrifuge: Beckmann L-8-70 M mit „fixed angle“-Rotor Ti 70 (P<sub>2</sub>-Fraktion)
- (Tarier-) Analysenwaage vom Typ *sartorius analytic*, Sartorius GmbH Göttingen

### 2.2.1.2 Synaptosomen-Präparation aus Rattencortices

Das Versuchstier, eine SD-Ratte (Gewicht 270-320 g), wurde morgens um 9.00 h aus dem Tierstall geholt (Haltung wie unter 2.2.1 beschrieben).

Nach Dekapitation des Tieres wurde die Kopfhaut aufgeschnitten, die Schädeldecke freipräpariert und mit einer Schere und einer flachen stumpfen Pinzette aufgebrochen. Das Gehirn konnte dann mit einem Mikrolöffelspatel aus der Schädelgrube herausgeschält werden.

Auf einem mit kalter (4 °C) KRP getränktem Filterpapier wurde das Gehirn mit einem Skalpell in Hemisphären getrennt und eine Gehirnhälfte sofort in eisgekühlter und mit *Carbogen* (siehe 2.2.1.1) äquilibrierter KRP zwischengelagert, während der Kortex der anderen Hälfte mit Hilfe einer Rasierklinge in dünnen Schnitten abpräpariert wurde.

Die Kortexstückchen, etwa 150 mg, wurden dann nach einer Methode von Murrin und Kuhar (1976) als Synaptosomen aufgearbeitet. Die Gewebeschnitte wurden sofort mit einem feinen Haarpinsel in einen mit Saccharose-HEPES-Puffer beschickten konischen Homogenisator überführt. Das Homogenat wurde bei 1000 x g, 4 °C, 10 Minuten lang zentrifugiert, das erste *Pellet* (P<sub>1</sub>-Fraktion) verworfen, der Überstand (S<sub>1</sub>-Fraktion, *supernatant*) auf drei Ultrazentrifugengläser verteilt und bei 17.000 x g, 4 °C weitere 10 Minuten zentrifugiert.

Die resultierenden P<sub>2</sub>-Synaptosomen-*Pellets* wurden somit von dem Saccharose-Puffer getrennt. Diese drei P<sub>2</sub>-Fraktionen wurden mittels einer Pasteurpipette mit leichten Hüben in je einem definierten Volumen normaler KRP bzw. Natrium-freier KRP bzw. HC-3-haltiger KRP sorgfältig rehomogenisiert und für die HACU-Bestimmung, wie im folgenden Abschnitt 2.2.1.3 beschrieben, verwendet.

### 2.2.1.3 Hochaffine und niedrigaffine [<sup>3</sup>H]-Cholin-Aufnahme in Synaptosomen, biochemische Methode

Die Bestimmung des **High Affinity Choline Uptake** (HACU) und des **Low Affinity Choline Uptake** (LACU) wurde in synaptosomalen Präparationen von Sprague-Dawley-Rattencortices (Gewinnung des biologischen Materials im Abschnitt 2.2.1.2 erläutert) nach einer von Murrin und Kuhar (1976) beschriebenen Methode durchgeführt.

Die Gewebeproben wurden in drei verschiedenen Lösungen aufgenommen: in normaler KRP, in Natrium-freier KRP und in HC-3-haltiger KRP. Je P<sub>2</sub>-Synaptosomenfraktion wurden zwei [<sup>3</sup>H]-Cholinaufnahme-Parallelbestimmungen und eine Proteinbestimmung (siehe Kapitel 2.2.2) durchgeführt. Die Aliquots wurden im temperierten Wasserbad bei 37 °C mit entsprechendem Puffer oder mit Testsubstanz enthaltender KRP und anschliessend - für die Messung der Cholinaufnahme - mit 50nM [<sup>3</sup>H]-Cholin ([Methyl-<sup>3</sup>H]-Cholinchlorid von DuPont-NEN, Bad Nauheim, Deutschland bezogen) bei 30 °C exakt 5 Minuten inkubiert. Die [<sup>3</sup>H]-Cholinaufnahme, als energieabhängiger Transportprozess, wurde durch Stellen der Proben auf Eis und sofortiges Hinzufügen eisgekühlter KRP gestoppt. Nach der Zentrifugation bei 1400 x g, 1 °C und 10 min wurden die *Pellets* drei Mal gewaschen (alternierend resuspendiert und zentrifugiert bei 1400 x g, 10 min und 4 °C) und daraufhin zur Membransolubilisierung mit Methanol (Merck) versehen. Anschließend wurden sie in Szintillationsgläsern mit Szintillationsflüssigkeit gemischt.

Die in die Synaptosomen inkorporierte Radioaktivität wurde im Szintillationszähler *Packard Liquid scintillation analyzer 1600 CA* gemessen.

Der **Low Affinity Choline Uptake** (LACU) wurde in Inkubationen mit Natrium-freier KHB oder in Gegenwart von 1 µM HC-3 bestimmt und als [<sup>3</sup>H]-Cholin-Aufnahme (dpm/mg Protein/ 5 min) ausgedrückt.

Der **High Affinity Choline Uptake** (HACU) ist äquivalent mit dem Natrium-abhängigen bzw. Hemicholinium-3-sensitiven Anteil der Cholinaufnahme und definiert sich als Differenz von [<sup>3</sup>H]-Cholin-Gesamtaufnahme, bei mit normaler KRP inkubierter P<sub>2</sub>-Fraktion, minus LACU.

### 2.2.1.4 Eingesetzte Substanzen

Das Hyperforin-Natrium-Salz wurde von der Firma Schwabe Karlsruhe zur Verfügung gestellt und aus *Hypericum perforatum*, Johanniskraut, wie in Chatterjee *et al.* (1999a) beschrieben, gewonnen.

Hyperforin wurde unmittelbar vor dem Versuch in Puffer gelöst und 15 Minuten vor der [<sup>3</sup>H]-Cholin-Zugabe hinzugefügt. Hyperforin wurde in Konzentrationen von 1-100 µM eingesetzt.

Folgende Substanzen wurden in den Versuchen den Inkubationen zugesetzt:

<b>Ro-31-8220</b> 1 µM	Proteinkinase-C-Inhibitor, in DMSO gelöst (Endkonzentration 1 %, V/V), eine äquivalente Menge DMSO (Dimethylsulfoxid, Sigma, Deisenhofen) wurde den Kontroll-Inkubationen hinzugefügt;
<b>KN62</b> 1 µM	Calcium/Calmodulin-Kinase-II-Hemmstoff, in DMSO gelöst (Endkonzentration 1 %, V/V), eine äquivalente Menge DMSO wurde den Kontroll-Inkubationen hinzugefügt;
<b>DbcGMP</b> 100 µM	zyklisches N <sub>2</sub> ,2'-O-Dibutyrylguanosin-3'5'-Monophosphat-Na-Salz, zellpermeables, hydrolysestabiles cGMP-Analogon und Protein-Kinase-G-Aktivator
<b>L-NMMA</b> 100 µM	N <sup>G</sup> -Monomethyl-L-Arginin, kompetitiver, unselektiver Inhibitor aller drei NO-Synthase-Isoformen; IC <sub>50</sub> = 3.3 µM für neuronale NOS (Rattenhirn)
<b>W7</b> 10 µM	N-(6-Aminohexyl)-5-chloro-1-naphthalin-sulfonamid HCl; unspezifischer Calmodulin-Antagonist, Inhibitor der Calcium/Calmodulin abhängigen Phosphodiesterase, IC <sub>50</sub> = 51 µM
<b>TFP</b> 10 µM	Trifluoroperazin-Dihydrochlorid; D <sub>2</sub> -Antagonist und Calmodulin-Antagonist, weiterhin Hemmstoff der Calcium/Calmodulin-abhängigen Phosphodiesterase; gelöst in DMSO (Endkonzentration 1 %, V/V)
(Calbiochem, Schwalbach, Deutschland)	

### 2.2.1.5 Experimente mit vorgeschalteter Depolarisation

Die P<sub>2</sub>-Fraktion wurde in einem Hoch-Kalium-Puffer  $62mM-K^+$ -KRP aufgenommen. Es folgte eine 15minütige Vorinkubation der Synaptosomen bei 37 °C in diesem depolarisierenden Medium, woraufhin bei 1400 x g, 1 °C, 10 Minuten lang zentrifugiert, der Überstand verworfen, das Sediment in HEPES resuspendiert und nochmals zentrifugiert wurde. Anschließend wurden die *Pellets* in einem definierten Volumen physiologischer KRP-Lösung dispergiert und die Aliquots für die Wirkstoffinkubationen (Hyperforin, KN-62, Ro 31-8220) und die darauffolgende HACU-Bestimmung (Zugabe des radioaktiven [<sup>3</sup>H]-Cholins) verwendet. Die Wirkstoffe waren über die Dauer der [<sup>3</sup>H]-Cholinaufnahme präsent.

### 2.2.1.6 Experimente mit gleichzeitiger Depolarisation

In diesen Versuchen fand eine 15minütige Inkubation des P<sub>2</sub> *Pellets* mit depolarisierender  $62mM-K^+$ -KRP und dem jeweiligen Wirkstoff (Hyperforin, KN-62, Ro 31-8220) statt. Das anschließende Zentrifugieren und das Waschen mit HEPES erfolgte gemäß dem unter Abschnitt 2.2.1.3 beschriebenen Protokoll. Vor der Zugabe des [<sup>3</sup>H]-Cholins wurde das *Pellet* in physiologischer KRP resuspendiert, wodurch die Wirkstoffe während der [<sup>3</sup>H]-Cholin-Inkubation nicht mehr präsent waren.

## 2.2.2 Proteinbestimmung

Die Bestimmung des Gesamtproteingehaltes der luftgetrockneten P<sub>2</sub>-Synaptosomen-*Pellets* (siehe Kapitel 2.2.1.3) erfolgte nach der Methode von Lowry *et al.* (1951). Das in den Fraktionen enthaltene Protein wurde nach Zugabe von 1,5 ml 1N Natronlauge in einer Übernachtinkubation herausgelöst. Nach der Zentrifugation am Folgetag wurden 50 µl-Aliquots dieser Lösungen mit Wasser im Verhältnis 1:20 verdünnt und der Proteingehalt der Proben ermittelt. Die Methode beruht auf einer Reaktion der Proteine mit Molybdätophosphat (Folin-Ciocalteu-Reagenz) in kupferhaltiger alkalischer Lösung unter Ausbildung eines blauen Farbkomplexes, dessen Extinktion photometrisch (Shimadzu UV-visible recording Spectrophotometer) bei 750 nm gemessen wurde. Zur Quantifizierung der Proben wurde jeweils eine Eichgerade mit Rinderserumalbumin als Standard (10-80 µg/ml BSA, Sigma, Deisenhofen) und Daten aus Doppelbestimmungen erstellt.

## 2.3 HPLC-Bestimmungen mit elektrochemischer Detektion

### 2.3.1 Bestimmung von ACh und Ch im Dialysat mittels HPLC

#### 2.3.1.1 HPLC-Pufferzusammensetzung

- NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>-Monohydrat, 29 mM (4.002 g/l) (Merck, Darmstadt)
- Natriumacetat-Trihydrat, 22 mM (2.994 g/l) (Merck, Darmstadt)
- EDTA (Titriplex III, Äthylendinitrilotetraessigsäure) 0.373 mM (120 mg/l) (Merck, Darmstadt)
- *Kathon*, 5 ml/l; eine 1 % (v/v) Verdünnung der 1,5 % (w/v) *ProClin<sup>TM</sup> 150 Microbiocide, reagent for use as a preservative for chromatographic testing* (5-Chloro-2-methyl-4-isothiazolin-3-on, 2-Ethyl-4-isothiazolin-3-on) (Rohm und Haas)

#### 2.3.1.2 Pufferherstellung

- Waage: Kern 440-47 (max 1200g , d=0,1 g) Kern&Sohn GmbH, Albstadt
- Analysenwaage: *sartorius analytic*, Sartorius GmbH Göttingen
- Ultraschallbad: Branson 5200
- Magnetrührer: Heidolph
- PH-Meter: *INO-LAB ph level-1*
- Vakuumpumpe: KNF Neuberger, Type N 022 AN.18, D-79112 Freiburg
- Woulffsche Flasche: 1000 ml, Rottenberg G, Schott Duran
- Vakuumfiltrationseinheit: 2-L-Filtratflasche, Schott Duran
- Membranfilter: Schleicher&Schuell RC58, 0.2µM, Ø 50 mm, Dassel, Germany

Die Pufferlösung (Zusammensetzung siehe 2.3.1.1) wurde als 4-Liter-Ansatz hergestellt, um den Betrieb von zwei HPLC-Anlagen eine Woche lang durchgehend zu gewährleisten.

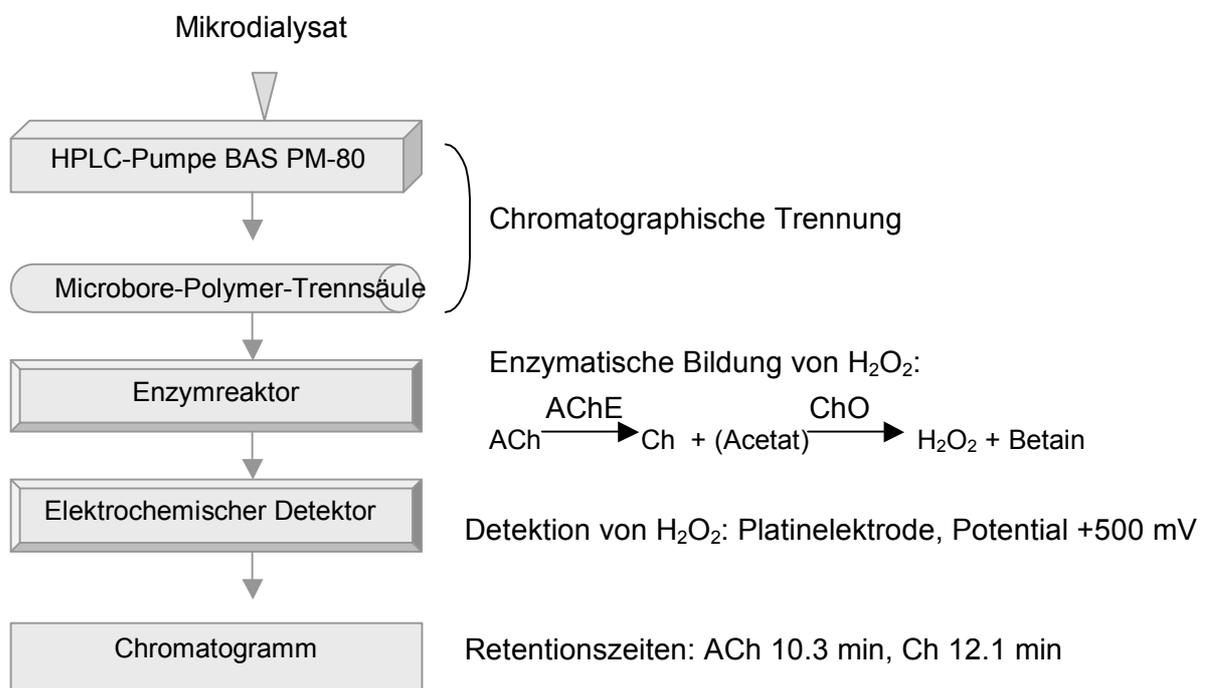
Durch den Zusatz von ProClin<sup>®</sup> (siehe 2.3.1.1) blieb die Lösung solange keimfrei. Ihr pH-Wert wurde mit 5 N Natronlauge auf 8.4 eingestellt.

Nach Homogenisierung wurde der Puffer unter Vakuum durch einen 2 µm-Membranfilter filtriert und anschließend 20 Minuten lang im Ultraschallbad entgast.

### 2.3.1.3 Beschreibung der HPLC-Bestimmungsmethode

Für die Analyse kleinster Mengen von ACh und Ch im Perfusat eignet sich die HPLC-Technik (Hochleistungsflüssigkeitschromatographie) am besten (Potter und Hanin, 1988). Eine hochsensitive Analytik stand zur Verfügung; es wurde ein HPLC-System mit elektrochemischer Detektion verwendet, das im Einzelnen aus Folgendem bestand:

- Injektor: CMA/200 Refrigerated Microsampler, Axel Semrau GmbH&Co, Sprockhövel; (Software: CMA/200Left System)
- Pumpe: PM-80 *Solvent Delivery System*, BAS
- Trennsäulen: *BAS SepStik Microbore column*, ID 1 mm, UNIJET Ach/Ch 1 x 530 mm Bioanalytical System Inc., Kent (USA)
- Enzymreaktor: immobilisierte AChE ( E.C.3.1.1.7) und Cholinoxidase (ChO, E.C.1.1.3.17)
- Detektor: LC-4C *amperometric detector*, BAS, Axel Semrau, Sprockhövel
- Schreiber: Kipp&Zonen BD40
- ACh- und Ch-Standard: Acetylcholin-Chlorid, Cholinchlorid, kristallin, Sigma, Deisenhofen



**Abbildung 2.8: Schema der HPLC-Bestimmung von Acetylcholin und Cholin mittels elektrochemischer Detektion**

Die auf der *Microbore*-Säule getrennten und dann eluierten Substanzen werden im Enzymreaktor in einer enzymatischen Hydrolyse (ACh) und anschließender Oxidation (Ch) zu Wasserstoffperoxid umgewandelt, welches an der Platinelektrode (Arbeitsspannung + 0.5 V) zu einer detektierbaren Änderung des Stromflusses führt.

Eine hohe Nachweisempfindlichkeit von ACh im fmol-Bereich kann durch die Verwendung von Trennsäulen sehr geringen Innendurchmessers erreicht werden (1 mm, „microbore“-Technik) (Kissinger und Shoup, 1990).

Das Prinzip der Methode entspricht der in der Abbildung 2.8 beschriebenen Anordnung. Der Trennsäule war ein Enzymreaktor nachgeschaltet, der mit immobilisierter Acetylcholinesterase (AChE) und Cholinoxidase (ChO) beladen war. Als Eluent diente der unter Abschnitt 2.3.1.1 beschriebene Puffer.

Der Druck betrug 200-250 bar bei einer Flussrate von 0.13 ml/min. Das Dialysat konnte - da proteinfrei - ohne weitere Aufarbeitung auf die Trennsäule gebracht werden; aus denen im HPLC-*Vial* vorliegenden 10 µl wurden automatisch jeweils 5 µl injiziert, wonach ACh und Ch voneinander getrennt werden konnten.

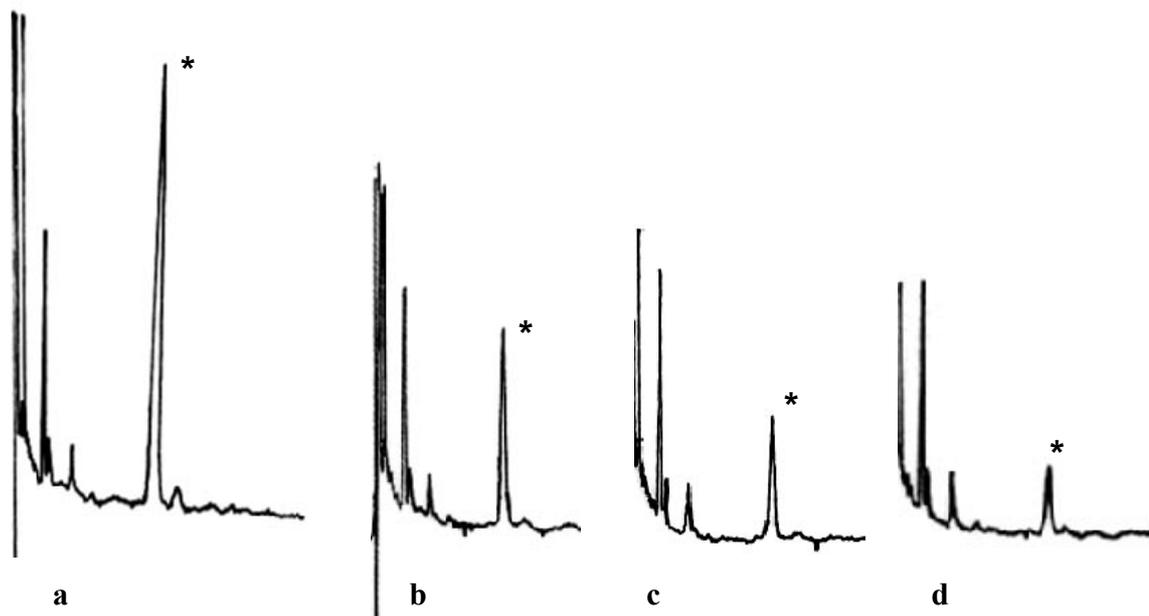
Im nachgeschalteten Enzymreaktor wurde das als erstes eluierte ACh durch die immobilisierte AChE zu Cholin und Acetat hydrolysiert; Cholin wurde durch die Cholinoxidase zu Wasserstoffperoxid und Betain oxidiert. Das H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> führte an einer nachgeschalteten Platinelektrode, deren Arbeitsspannung +0.5 V betrug, zu einer detektierbaren Änderung der Stromstärke. Diese war im Bereich zwischen 10 fmol und 3 pmol proportional zu den in den Proben enthaltenen ACh-Konzentrationen. Bei oben genannter Flussrate ergaben sich Retentionszeiten von 10.3 Minuten für ACh und 12.1 Minuten für Ch.

Die Nachweisgrenze lag bei 5-10 fmol für ACh. Diese Bestimmungsmethode eignet sich besonders ACh und Ch, die weder elektroaktiv sind noch *via* UV- oder Fluoreszenz-Absorption detektiert werden können.

## 2.3.2 Quantifizierung des Hyperforins in aCSF, CSF und Plasma

### 2.3.2.1 HPLC-ECD-Methode

Der Hyperforingehalt in den aCSF-, Plasma- und CSF-Punktat-Proben (siehe Abschnitte 2.1.3, 2.1.4 und 2.1.2.4.3) wurde mittels HPLC, unter Verwendung einer *Gynkotek 300C* Präzisionspumpe, einer *Eurospher-100 C8 Vertex* Säule (125 x 4 mm; Knauer, Berlin, Deutschland) und eines bei 1.0 V betriebenen elektrochemischen Detektors *Biometra EP-30* bestimmt. Die Datenaufzeichnung erfolgte anhand des Kipp&Zonen-Schreibers *Type BD 111*. Das Fließmittel setzte sich folgendermaßen zusammen: 72 Teile Acetonitril (HPLC-Reinheitsgrad, Merck, Darmstadt), 24 Teile Wasser, 4 Teile Methanol (HPLC-Qualität, Merck) und 25 mM Perchlorsäure (Merck). Bei einer Flussrate von 0.5 ml/min betrug die Hyperforin-Retentionszeit 8.1 Minuten, das Detektionslimit lag bei 1.0 µg/ml.



**Abbildung 2.9** Typische Chromatogramme von Hyperforin (Peak sternmarkiert)

- a.) 0.625 ng Hyperforin o.c. (*on column*, Schleifenvolumen 20 µl), Peakhöhe 99 mm
- b.) 0.3125 ng o.c., Peakhöhe 50.5 mm
- c.) 0.156 ng o.c., Peakhöhe 28.5 mm
- d.) 0.078 ng o.c., Peakhöhe 12.5 mm

### 2.3.2.2 Stabilität von Hyperforin in aCSF

Die im Abschnitt 2.3.2.1 beschriebene HPLC-ECD Methode wurde auch für die Stabilitätsbestimmung von Hyperforin in wässrigen Lösungen verwendet.

Unter Lichtabschluss und bei Lagerung im Kühlschrank erwies sich ein Substanzansatz in aCSF als ziemlich stabil (siehe Ergebnisse); die Halbwertszeit ( $t_{1/2}$ ) betrug ca. fünf Tage. Im Gegensatz hierzu zersetzte sich das Hyperforin bei Lichtexposition und Raumtemperaturlagerung schon binnen Stunden ( $t_{1/2} = 6$  h). Aus diesem Grund wurden Hyperforin-Lösungen für jedes Experiment frisch hergestellt.

## 2.4 Verhaltensversuche

### 2.4.1 Bestimmung der motorischen Aktivität von Mäusen

Die spontane lokomotorische Aktivität von adulten *Balb C/DM 2* Mäusen (Charles River, Sulzfeld, Deutschland) gleichen Geschlechts (männlich), mit einem Gewicht von ca. 22-25 g, wurde tagsüber in einem ZW 41 Laue-Elektromechanik-Motilimeter (Elmshorn, Deutschland) quantitativ erfasst.

Das Prinzip der Methode ist in der Publikation von Köppen *et al.* (1996) beschrieben worden. Jeweils 5 Mäuse wurden in einen runden Plexiglaskäfig mit einem Durchmesser von 24 cm gesetzt und dann für exakt 2 min auf eine runde Siebplatte der oben genannten Apparatur gestellt.

Die horizontalen Bewegungen der Tiere wurden anhand von 19, unter jeder Öffnung dieser Platte befindlichen, Photozellen automatisch registriert. Die Photozellen wurden von einer über dem Käfig angebrachten Lampe bestrahlt. Überquerte eine Maus eine dieser Öffnungen, wurde der Lichtstrahl unterbrochen und ein Impuls auf einen Zähler gegeben, auf dem sich die Signale summierten, die durch die gesamte Mäusegruppe ausgelöst wurden.

Die spontane lokomotorische Aktivität entspricht der Gesamtzahl der erfassten Impulse in einem definierten Zeitintervall.

Es wurden drei Versuchsgruppen à 5 Mäusen gebildet und zwar eine mit 0.9 % Kochsalzlösung behandelte und zwei weitere, denen 1 mg/kg bzw. 10 mg/kg Hyperforin i.p. appliziert wurde.

Die Aktivität jedes Kollektivs wurde bestimmt, wobei strikt darauf geachtet wurde, dass die Zeit, die jede Gruppe im Plexiglasbehälter des Messgerätes vor der eigentlichen Messung verbrachte (Vorperiode), konstant gehalten wurde, exakt 2 min dauerte und die anschließende Versuchsperiode in der 3. und 4. Minute erfolgte.

Die jeweiligen ersten Messwerte wurden ins Versuchsprotokoll eingetragen und 15 min später entweder Kochsalz oder die Testsubstanz appliziert. 30, 60 und 90 min nach der Injektion wurde die Aktivität der einzelnen Gruppen erneut bestimmt. Das Experiment wurde zwei Mal wiederholt.

Die Resultate wurden als Durchschnittswerte der Lichtstrahlunterbrechungen von drei gleich behandelten Gruppen angegeben und auch als Prozent der Aktivität der mit Kochsalz behandelten Tiere gezeigt.

#### **2.4.2 Modifizierter Irwin-Test**

Das spontane Verhalten von SD-Ratten nach intraperitonealer Gabe von Hyperforin wurde in einem nach Irwin (1966 und 1968) modifizierten Test beobachtet. Nach einer Eingewöhnungsphase von einer ½ Stunde wurden die Tiere in Einzelkäfige gesetzt und über den Zeitraum von 2 Stunden observiert.

Auf folgende äußere Erscheinungszeichen wurde geachtet: Ptosis, Exophthalmus, Tränenfluß (rötliche Färbung durch das Sekret der Harder'schen Drüse), Salivation, Fellbeschaffenheit, Durchfall, Körperhaltung, Abduktion der Extremitäten, grober Tremor.

Je 3 Tiere erhielten physiologische Kochsalzlösung i.p. (1ml/kg KG) oder 10 mg/kg i.p. Hyperforin (in 0.9 % NaCl gelöst, Applikationsvolumen 1 ml/kg KG). Alle 15 Minuten wurden alle Tiere ohne Störung einzeln betrachtet und die Symptome registriert.

## 2.5 Statistik

Die Messergebnisse der einzelnen Versuchsreihen wurden, sofern nicht anders angegeben, durch die Berechnung des Mittelwertes  $\bar{x}$  zusammengefasst und die Abweichungen davon jeweils als Standardfehler des Mittelwertes ( $SD / \sqrt{n} = SEM$ , *standard error of mean*) angegeben.

Dosis-Wirkungs-Kurven wurden mithilfe nichtlinearer Regression (einphasischer exponentieller Abfall) unter Verwendung des Computerprogrammes GraphPad Prism<sup>®</sup> kalkuliert, ebenso die  $IC_{50}$ -Werte und die Hill-Koeffizienten.

Die Ergebnisse der HACU-Experimente sind Mittelwerte  $\bar{x} \pm SEM$  aus  $n = 4-7$  unabhängigen, mit biologischem Material von jeweils unterschiedlichen Tieren durchgeführten Versuchen, wobei jeder Einzelwert das Resultat einer Doppelbestimmung ist.

Zur Überprüfung statistischer Signifikanz wurden die Ergebnisse mit Hilfe des Computerprogrammes Instat 2<sup>®</sup> GraphPad Software einer ein- oder/ zweifaktoriellen Varianzanalyse [ Ein-Weg / Zwei-Wege ANOVA, **Analysis of Variance** ] unterzogen. Vergleiche zweier Versuchsreihen wurden mit Hilfe des Student-t Tests durchgeführt (Kenakin, 1993).

Bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit unter 5 % (Wahrscheinlichkeitswert, p-Wert von unter 0.05 [ \* ] ), wurde das Ergebnis als signifikant gegenüber der Kontrolle angesehen, als hochsignifikant ein p-Wert von unter 0.01 [ \*\* ] bzw. unter 0.001 [ \*\*\* ] bezeichnet (Geigy, 1980; Sachs, 1992). Statistische Signifikanzen wurden anhand der in eckigen Klammern vermerkten dreistufigen Sternsymbolik angeordnet.

Wegen interindividueller Schwankungen wurden die Resultate in Prozent des jeweiligen Kontrollversuches (der als 100 % definiert wurde) umgerechnet und dann gemittelt.

In den Legenden der Abbildungen sind die Anzahl  $n$  der Einzelergebnisse, der Mittelwert  $\bar{x}$ , der mittlere Fehler des Mittelwertes SEM, sowie das Ergebnis der statistischen Tests wiedergegeben.

---

## 3 Ergebnisse

### 3.1 Lagerstabilität von Hyperforin in wässrigen Lösungen

Hyperforin ( $C_{35}H_{52}O_4$ ), ein Acylphloroglucinol, ist eine lipophile Verbindung, die als eine der wertbestimmenden Inhaltsstoffe von Johanniskraut betrachtet wird. Die Substanz ist oxidationsempfindlich und zersetzt sich unter dem Einfluss von Licht und Wärme (Erdelmeier, 1998). Die Stabilität von Hyperforin in unterschiedlichen Extraktionsmitteln (Extraktanteil ca. 2-4 %) differiert sehr stark. In Lösung wurde eine ausgeprägte Destabilisierung bei abnehmender Polarität des Lösungsmittels beobachtet: Hyperforin in n-Heptan zersetzte sich zu 100 % binnen 25 min (Maisenbacher und Kovar, 1991; Erdelmeier, 1998).

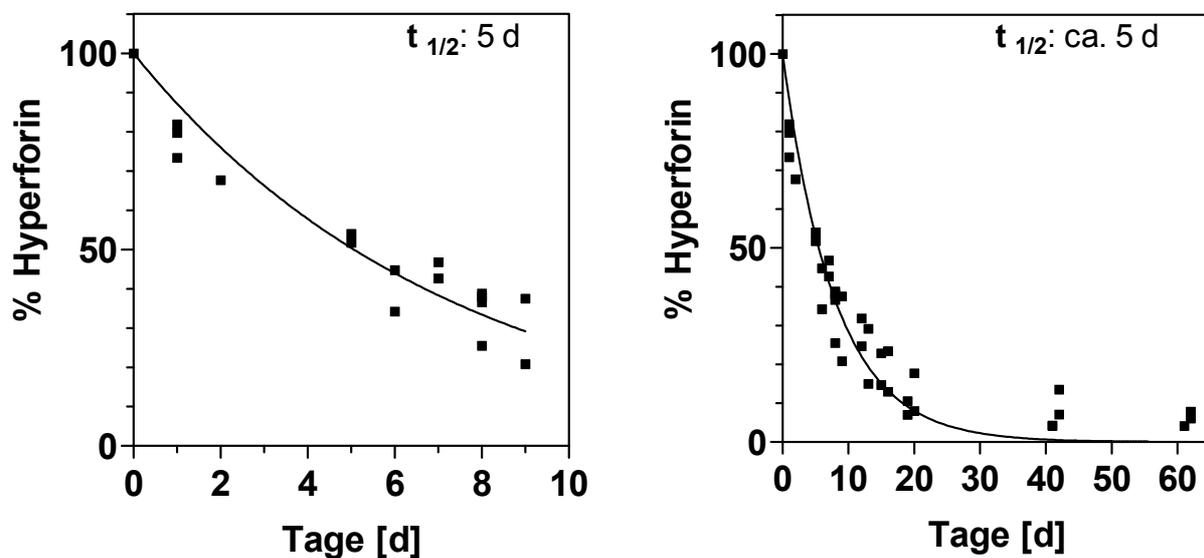
Die Struktur eines Oxidationsproduktes namens Orthoforin wurde von Orth *et al.* (1999c) aufgeklärt, ferner untersuchten Orth *et al.* (2000) die Stabilität von Hyperforin und Adhyperforin (Strukturformeln siehe Einleitung), schlugen Stabilisierungsmaßnahmen vor und wiesen den beiden Substanzen ein identisches Stabilitätsverhalten zu.

Langzeit-Stabilitätsuntersuchungen von Hyperforin in Lösung über 8 Monate ergaben, dass bei Tiefkühl-Lagerung unter Stickstoffatmosphäre keine oxidative Zersetzung zu verzeichnen war; in den getrockneten Extrakten übte die Drogenmatrix einen stabilisierenden Effekt auf Hyperforin aus (Orth, 1999a). Gray *et al.* (2000) untersuchten methanolische Auszüge hinsichtlich ihrer Hyperforin-Gehalte unter verschiedenen Lagerbedingungen: Licht- und Luftexposition führten zu einer raschen Degradation auf 7 % schon nach 120 min, wohingegen Aufbewahrung im Dunkeln und unter Luftabschluss ergab, dass die Hyperforingehalte über eine Zeit von 20 h stabil blieben.

In den folgenden Abschnitten 3.1.1 und 3.1.2 werden Ergebnisse der Untersuchung der Stabilität von Hyperforin in wässrigen Lösungen, speziell in artifizieller Cerebrospinalflüssigkeit (aCSF), vorgestellt.

### 3.1.1 Lichtgeschützte Lagerung bei 4 °C

Zur Untersuchung der Stabilität von Hyperforin in aCSF wurden 4 verschiedene Lösungen einer Konzentration von 100 µM in braunen 4-ml Probengläsern (Merck) im Kühlschrank über mehrere Tage aufbewahrt. Das residuale Hyperforin in den Ansätzen wurde mittels HPLC-ECD (siehe Methoden) bestimmt. Die Proben wurden über 9 Wochen gelagert, die Ergebnisse sind in der Abbildung 3.1 dargestellt. Die Halbwertszeit ( $t_{1/2}$ ) betrug 5 Tage.

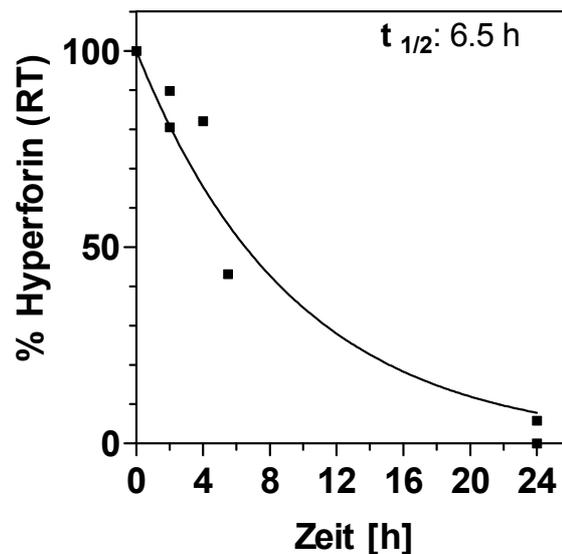


**Abbildung 3.1:** Zeitverlauf der Hyperforindegredation bei lichtgeschützter Lagerung und 4°C in aCSF

Hyperforin wurde zu 100 µM in Perfusionsflüssigkeit gelöst und die Ansätze dunkel und gekühlt über Wochen aufbewahrt. Das Hyperforin wurde mittels HPLC-ECD quantifiziert. Die Kalkulation der nichtlinearen Regression (einphasischer exponentieller Abfall) erfolgte aus den eingezeichneten Einzelwerten mithilfe des Computerprogrammes GraphPad Prism® ( $r^2 = 0.895$ , Schaubild links;  $r^2 = 0.919$ , Schaubild rechts). Die Rechtecke in den Schaubildern symbolisieren einzelne Werte.

### 3.1.2 Lichtexponierte Aufbewahrung bei Raumtemperatur

In einer zweiten Versuchsreihe wurden die Proben (100 µM Hyperforin in aCSF) unter Lichtexposition und bei Raumtemperatur (RT) gelagert, was zu einer rapiden Zersetzung der Testsubstanz führte. Die Abbildung 3.2 stellt den Zeitverlauf des Hyperforin-Abbaus unter diesen Bedingungen dar. Die  $t_{1/2}$  betrug ungefähr 6 Stunden.



**Abbildung 3.2: Abbaukinetik von Hyperforin bei Raumtemperatur und unter Lichteinwirkung**

Hyperforin (100  $\mu\text{M}$  in aCSF) wurde bei Raumtemperatur und Tageslicht stehenlassen. Hyperforin wurde mittels HPLC-ECD quantifiziert. Die Berechnung der nichtlinearen Regression (einphasischer exponentieller Abfall) erfolgte aus den eingezeichneten Einzelwerten unter Verwendung des Computerprogrammes GraphPad Prism<sup>®</sup> ( $r^2 = 0.943$ ). Die Rechtecke symbolisieren einzelne Werte.

### 3.2 Wirkungen des Hyperforins auf die synaptosomale Cholinaufnahme *in vitro*

Hyperforin gilt als der bisher am besten charakterisierte Inhaltsstoff von *Hypericum perforatum* und ist primär für die Hemmung der synaptosomalen Wiederaufnahme der Monoamine Serotonin (5-HT), Dopamin (DA) und Noradrenalin (NA) und zusätzlich für die Hemmung der neuronalen Aufnahme der Aminosäuretransmitter GABA und Glutamat verantwortlich (Müller *et al.*, 1998; Singer *et al.*, 1999; Wonnemann *et al.*, 2001). Aufgrund der unspezifischen Hemmung dieser fünf Neurotransmitter-Transporter wurden die Mechanismen untersucht, die für diese Transmittersysteme gleichermaßen wichtig sind. Es gibt Evidenzen aus *in vitro*-Experimenten für die Verringerung des transmembranären Natrium-Gradienten durch Hyperforin (Singer *et al.*, 1999). Ein solcher Effekt könnte diese einzigartige breite Hemmcharakteristik des Hyperforins erklären, nämlich die Wiederaufnahme von Neurotransmittern (DA, NA, 5-HT, Glu, GABA) in präsynaptische Endigungen über deren Natrium-abhängige Transportsysteme zum Erliegen zu bringen (Chatterjee *et al.*, 1998b; Müller *et al.*, 2001).

Die Arbeitshypothese für die folgenden *in vitro*-Versuche war daher, dass - aufgrund der Effekte von Hyperforin auf den Na<sup>+</sup>-Gradienten - diese Substanz auch auf die cholinerge Neurotransmission störend einwirken müsste. Um die Interferenz der Testsubstanz mit dem cholinergen System zu prüfen, wurde untersucht, ob sie den Natrium-abhängigen HACU (**high-affinity choline uptake**) beeinträchtigt, also die für die ACh-Synthese erforderliche Präkursoren-Zufuhr (Bereitstellung von Cholin) unterbunden wird.

### 3.2.1 Prinzip der HACU-Bestimmungs-Methode

Die in der vorliegenden Arbeit angewendete Vorschrift zur Untersuchung der hochaffinen Cholinaufnahme in die Synaptosomen basierte auf früher publizierten Methoden (Yamamura *et al.*, 1973; Mulder *et al.*, 1974; Murrin und Kuhar, 1976; Simon *et al.*, 1976). Der Methode lag eine Inkubation mit [<sup>3</sup>H]-Cholin zugrunde (siehe Methoden).

Die Differenzierung von HACU (**high-affinity choline uptake**) und LACU (**low-affinity choline uptake**) erfolgte unter Verwendung zweier Charakteristika des HACU, nämlich Natrium-Abhängigkeit und HC-3-Sensitivität (Kuhar und Murrin, 1978; Tucek, 1984). Anhand dieser zwei kennzeichnenden Kriterien konnte die HACU-Aktivität ermittelt werden:

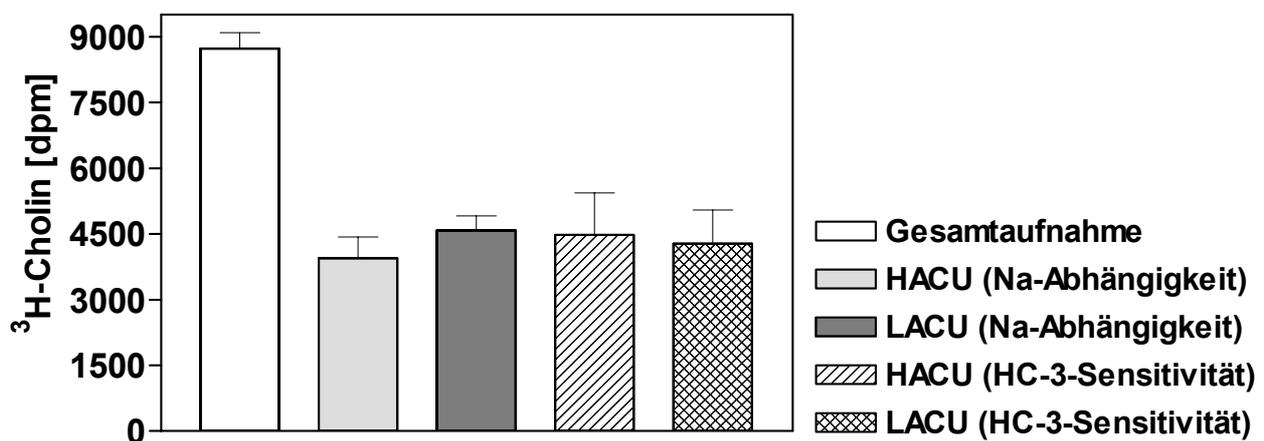
- Bei Inkubation im Natrium-freien Medium wird der Transport über dieses hochaffine, vom Natrium-Gradienten abhängige System, unterbunden, wobei die niedrigaffinen Natrium-unabhängigen *Carrier*-Systeme (u.a. LACU) aktiv bleiben.
- In Gegenwart von Hemicholinium-3 (HC-3, 1 µM), wird der HACU zu > 90 % gehemmt, die niedrigaffinen Systeme allerdings nur zu < 10 %, so dass nach Zugabe des markierten [<sup>3</sup>H]-Cholins zum Inkubationsansatz nur noch Werte für die Cholinaufnahme durch HC-3 insensitive Systeme bestimmt werden konnten, d.h. den LACU.

HC-3, ein strukturelles Analogon des Cholins, hemmt den HACU selektiv und kompetitiv mit einer Inhibitionskonstante  $K_I$  von 0.02-1 µM und ist der wirksamste Hemmstoff des HACU-Transporters (Jope, 1979).

Die Abbildung 3.3 zeigt exemplarisch die beiden Methoden im Vergleich. Die Gesamtaufnahme (Summand) setzt sich aus HACU und LACU (Addenden)

zusammen, wurde durch Inkubation der  $P_2$ -Synaptosomen in physiologischem Krebs-Ringer-Puffer (KRP) ermittelt und aus 6 Versuchsreihen als  $8731 \pm 360$  dpm bestimmt. Die LACU-Aktivität wurde entweder in Abwesenheit von Natrium ( $Na^+$ ) oder in Präsenz von  $1 \mu M$  HC-3 bestimmt. Der HACU errechnet sich aus der Differenz Gesamtaufnahme minus LACU, entspricht also dem Natrium-abhängigen und HC-3-sensitiven Anteil der Gesamt-Cholinaufnahme.

Die HACU-Säulen im Balkendiagramm 3.3 zeigen kalkulierte Werte. Bei  $Na^+$ -freier Bestimmung betrug die HACU-Aktivität  $45.2 \pm 12.2 \%$  und der LACU  $52.4 \pm 7.2 \%$  der Gesamt-Cholinaufnahme. Die Bestimmung anhand des Kriteriums der HC-3-Sensitivität ergab einen HACU-Anteil von  $51.3 \pm 21.2 \%$  und eine LACU-Fraktion von  $49 \pm 17.9 \%$ .



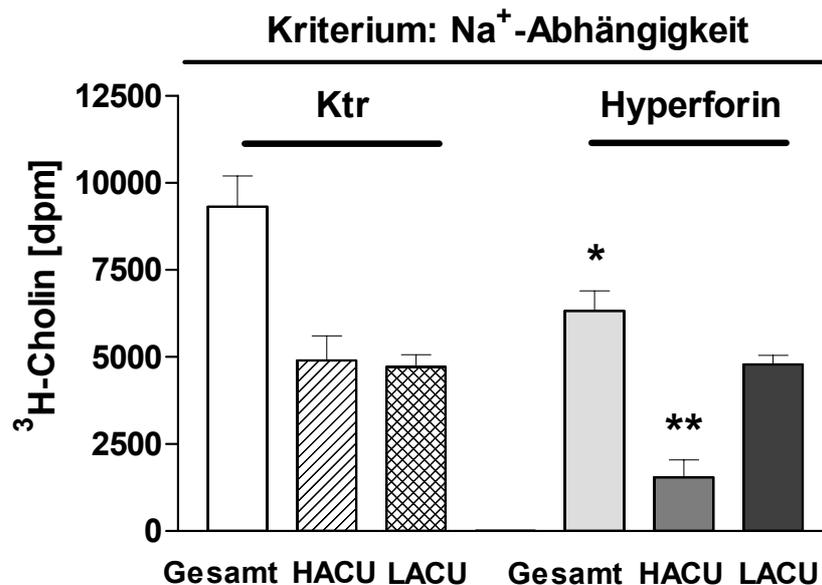
**Abbildung 3.3: Prinzip der HACU-Bestimmung, Methodenvergleich**

Die Messung des HACU erfolgte anhand zweier Methoden: Natrium-Abhängigkeit und HC-3-Sensitivität (vgl. Methoden). Drei verschiedene  $P_2$ -Synaptosomen-Fractionen wurden jeweils mit normaler KRP (Gesamtaufnahme), mit  $Na^+$ -freier KRP und mit  $1 \mu M$  HC-3 inkubiert, anschließend für exakt 5 min mit  $[^3H]$ -Cholin aufgeladen und die aufgenommene Menge radioaktiven Cholins per Szintillationsmessung bestimmt. Die Radioaktivität der einzelnen Gruppen ist auf der Ordinate in dpm/5 min angegeben: KRP (Gesamtaufnahme:  $8731 \pm 360$ ),  $Na^+$ -freie KRP (HACU:  $3946 \pm 483$ ; LACU:  $4581 \pm 330$ ) und  $1 \mu M$  HC-3 (HACU:  $4479 \pm 954$ ; LACU:  $4279 \pm 768$ ). Die gezeigten Ergebnisse sind Mittelwerte  $\pm$  SEM aus  $n = 6$  Versuchen. Die Gesamtaufnahme setzt sich summarisch aus HACU und LACU zusammen. Totalaufnahme und LACU wurden im Experiment bestimmt und die HACU-Werte hieraus rechnerisch ermittelt.

### 3.2.2 Hemmung des HACU durch Hyperforin

Die Wirkung des Hyperforins auf die Natrium-abhängige hochaffine Cholinaufnahme in die Synaptosomen wurde anhand der bereits in Abschnitt 3.2.1 beschriebenen zwei Kriterien des HACU untersucht: Natrium-Abhängigkeit und HC-3-Sensitivität.

Die Abbildungen 3.4 und 3.5 zeigen die Ergebnisse der Wirkung von 10  $\mu\text{M}$  Hyperforin auf die Aktivität des HACU. Es handelt sich hierbei um aus jeweils 2 Meßreihen zusammengefaßte Versuche (nämlich Kontroll-Inkubationen und Hyperforin-Versuchsreihen). HACU und LACU wurden zunächst durch Weglassen des Natriums unterschieden (Abbildung 3.4,  $\text{Na}^+$ -Abhängigkeit).



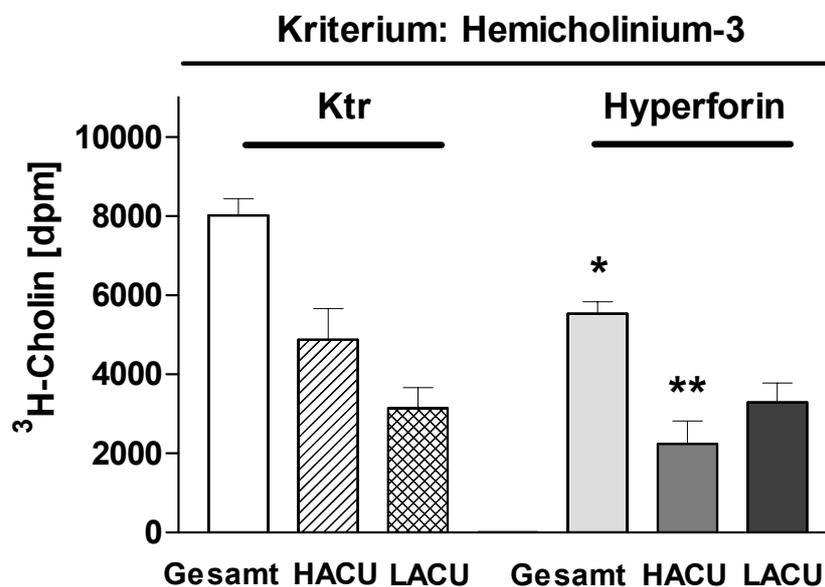
**Abbildung 3.4: Hemmung des HACU, nicht aber des LACU durch Hyperforin 10  $\mu\text{M}$ ; Bestimmung der HACU-Aktivität anhand des Kriteriums der  $\text{Na}^+$ -Abhängigkeit**

Die Abbildung vergleicht die Ergebnisse der HACU-Messung anhand des Kriteriums der  $\text{Na}^+$ -Abhängigkeit (siehe Methoden) von unbehandelten Synaptosomen (Ktr = Kontrollversuche, links) mit denen der 15minütigen Hyperforin-Inkubation (rechts). Bei den Inkubationen inkorporiertes [ $^3\text{H}$ ]-Cholin wurde per Szintillationsmessung bestimmt. Ordinate: Die [ $^3\text{H}$ ]-Cholinaufnahme ist in dpm/5 min ausgedrückt. Den Balken im Diagramm sind - von links nach rechts - folgende Werte zuzuordnen:  $9316 \pm 884$ ,  $4905 \pm 709$ ,  $4715 \pm 355$ ,  $6329 \pm 571$ ,  $1545 \pm 505$ ,  $4783 \pm 267$ . Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM aus 6 Experimenten. Die statistische Bewertung mittels einfaktorierlicher Varianzanalyse *one-way ANOVA Analysis of Variance*, gefolgt von Tukey-Kramer *multiple comparison test* (Instat 2<sup>®</sup> GraphPad Software) ergab folgende Werte: «Hyperforin Gesamt» versus «Ktr Gesamt» (\*),  $p < 0.05$ , ist signifikant verschieden; «Hyperforin HACU» ist hochsignifikant verschieden von «Ktr HACU» (\*\*),  $p < 0.01$ .

Die Analyse der Daten in Abbildung 3.4 zeigt, dass «Ktr HACU» und «Ktr LACU» an der Gesamtaufnahme in die Synaptosomen ( $\text{P}_2$ -Fraktion vom Rattencortex) einen Anteil von jeweils  $52.7 \pm 14.4 \%$  und  $50.6 \pm 7.5 \%$  einnehmen. In Anwesenheit von 10  $\mu\text{M}$  Hyperforin (Inkubationszeit 15 Minuten) wurde die Cholin-Gesamtaufnahme um  $> 30 \%$  auf  $67.9 \pm 9 \%$  ( $p < 0.05$ ) der «Ktr Gesamt» reduziert und somit signifikant verringert. HACU wurde in Gegenwart von Hyperforin um  $68 \%$  ( $p < 0.01$ )

herabgesetzt. Es folgt daraus, dass die Hyperforin-induzierte Reduktion der totalen Cholinaufnahme einzig und allein auf die Inhibition des HACU zurückzuführen war, dessen Anteil an der «Hyperforin Gesamt»-Aufnahme nur noch  $24.4 \pm 32 \%$  betrug, während «Hyperforin LACU» mit  $75.6 \pm 5.6 \%$  verglichen mit «Ktr LACU» auf unverändertem Level verharrte. Die absoluten Werte sind in der Legende der Abbildung 3.4 verzeichnet.

Analog zu der im obigen Abschnitt beschriebenen Methode wurden die Ergebnisse der Abbildung 3.5 anhand des Bestimmungskriteriums der HC-3-Sensitivität ermittelt, wobei im wesentlichen die gleichen Resultate erhalten wurden.



**Abbildung 3.5: Bestimmung des HACU in Gegenwart von Hemicholinium-3**

Dargestellt sind die Ergebnisse der HACU-Bestimmung unter Ausnutzung seiner Eigenschaft der HC-3-Sensitivität. Nach 15minütiger Inkubation mit physiologischer KRP bzw. Behandlung mit  $10 \mu\text{M}$  Hyperforin wurden die Synaptosomen mit  $[^3\text{H}]$ -Cholin exakt 5 min aufgeladen und die Radioaktivität mittels Szintillationsmessung bestimmt.  $[^3\text{H}]$ -Cholin ist in dpm/5 min angegeben. Die absoluten Werte von links nach rechts:  $8017 \pm 421$ ,  $4876 \pm 786$ ,  $3141 \pm 524$ ,  $5531 \pm 306$ ,  $2241 \pm 581$ ,  $3290 \pm 489$  sind Mittelwerte  $\pm$  SEM aus 7 Experimenten. Statistik: Einfaktorielle Varianzanalyse *one-way ANOVA Analysis of Variance*, gefolgt von Tukey-Kramer *multiple comparison test* (Instat 2<sup>®</sup> GraphPad Software) ergab folgende Werte: «Hyperforin Gesamt» versus «Ktr Gesamt» (\*),  $p < 0.05$ , signifikant verschieden; «Hyperforin HACU» ist hochsignifikant verschieden von «Ktr HACU» (\*\*),  $p < 0.01$ . Die Sternsymbole beziehen sich wie in Abbildung 3.4 auf die entsprechenden Werte der Kontrollversuche.

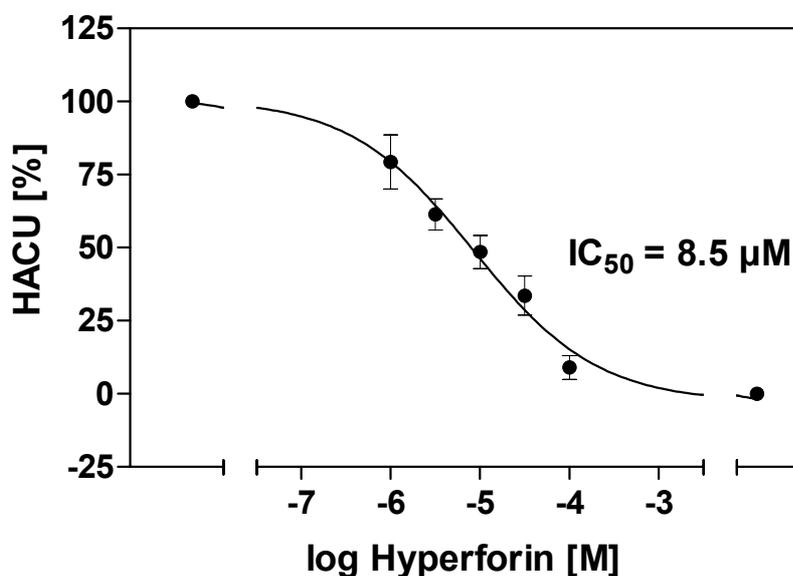
Die «Ktr Gesamt» (Abbildung 3.5) setzte sich zusammen aus  $60.8 \pm 16.1 \%$  «Ktr HACU» und  $39.1 \pm 16.6 \%$  «Ktr LACU»; die totale Cholinaufnahme in Präsenz von  $10 \mu\text{M}$  Hyperforin wurde um  $31 \%$  ( $p < 0.05$ ) auf  $68.9 \pm 5.5 \%$  der «Ktr Gesamt»

signifikant gehemmt, was wiederum (vgl. Abbildung 3.4) ausschließlich durch Reduktion des HACU (um 46 %,  $p < 0.01$ ) bedingt war, wobei das LACU-Niveau unverändert blieb. «Hyperforin Gesamt» setzte sich anteilig aus  $40.5 \pm 25.9$  % «Hyperforin HACU» und  $59.5 \pm 14.8$  % «Hyperforin LACU» zusammen.

Die Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass Hyperforin in einer Konzentration von  $10 \mu\text{M}$  die synaptosomale hochaffine Aufnahme von  $[^3\text{H}]$ -Cholin, den HACU, hochsignifikant hemmt.

### 3.2.3 Konzentrations-Wirkungs-Beziehung der HACU-Hemmung durch Hyperforin

Mit dem Ziel, die Konzentrations-Wirkungs-Beziehung zu untersuchen, wurden die Synaptosomen mit Hyperforin in Konzentrationen von  $1$ - $100 \mu\text{M}$  inkubiert.



**Abbildung 3.6: Konzentrations-Wirkungs-Beziehung der HACU-Hemmung durch Hyperforin**

Die Abbildung zeigt die konzentrationsabhängige Hemmung der  $^3\text{H}$ -Cholin-Aufnahme in kortikale Synaptosomen der Ratte durch Hyperforin. Die  $\text{P}_2$ -Synaptosomen-Fractionen wurden für 15 min mit  $1$ ,  $3$ ,  $10$ ,  $30$  und  $100 \mu\text{M}$  Hyperforin inkubiert und anschließend mit  $[^3\text{H}]$ -Cholin für exakt 5 min aufgeladen. Die über die Cholintransporter inkorporierte Radioaktivität wurde mittels Szintillationsmessung bestimmt. Ordinate: Logarithmus der Hyperforin-Konzentrationen. Abszisse: Hemmeffekt auf HACU in %. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM aus  $n = 7$  Versuchen. Die Konzentrations-Wirkungs-Beziehung wurde *per* nichtlinearer Regression (einphasischer exponentieller Abfall) mit Hilfe des Computerprogrammes GraphPad Prism<sup>®</sup> kalkuliert ( $\text{IC}_{50}$ -Wert =  $8.5 \mu\text{M}$ , Hill-Koeffizient =  $0.63$ ).

Hyperforin hemmt die synaptosomale hochaffine Aufnahme von [ $^3\text{H}$ ]-Cholin mit einer Hemmkonstante im niedrigen mikromolaren Bereich ( $\text{IC}_{50}$  von  $8.5 \mu\text{M}$ ,  $r^2 = 0.98$ ). Diese Inhibition ist konzentrationsabhängig und die Hemmkurve zeigt einen sigmoidalen Verlauf.

Die Abbildung 3.6 zeigt den Konzentrations-Wirkungs-Verlauf des inhibitorischen Effektes von Hyperforin.

### 3.2.4 Veränderung der HACU-Aktivität durch Depolarisation

Mit dem Ziel, den Hyperforin-Effekt auf den HACU nach oder während der Aktivitätsveränderung durch Depolarisation näher zu charakterisieren, wurde in den folgenden *in vitro*-Versuchen mit synaptosomalen Präparationen des Rattenkortex ( $\text{P}_2$ -Fraktion) 62mM-Kalium-haltige KRP (KRP62) als depolarisierendes Inkubationsmedium eingesetzt (siehe Methoden).

#### 3.2.4.1 Wirkungen von Hyperforin nach vorgeschalteter Depolarisation

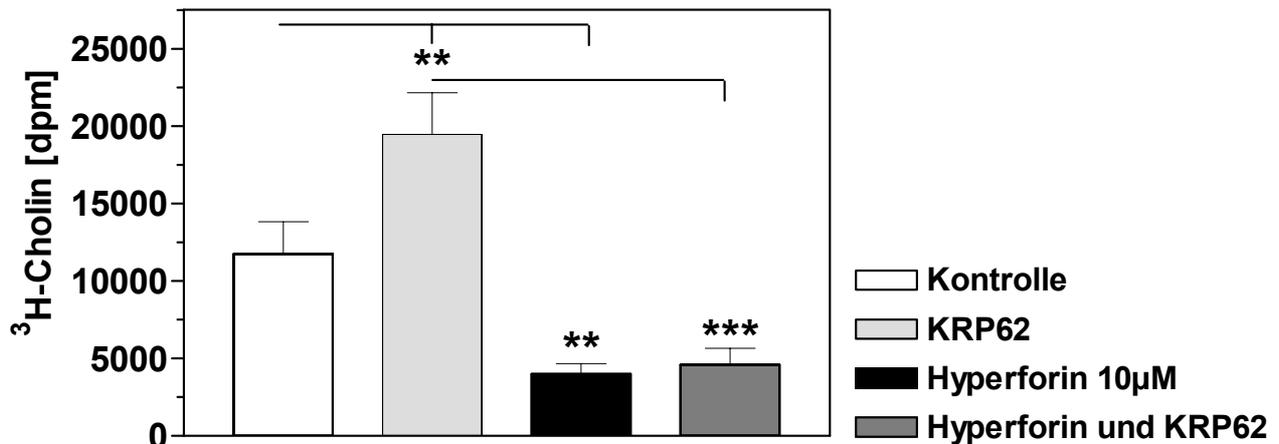
Zunächst sollte die Wirkung von Hyperforin auf die poststimulatorische Steigerung des HACU überprüft werden.

Im folgenden Experiment wurden die Synaptosomen in einer 15minütigen Inkubation mit KRP62 depolarisiert, woraufhin sich die Wirkstoffinkubation in physiologischem Medium anschloss.

Die Abbildung 3.7 zeigt, dass eine 15minütige Präinkubation der  $\text{P}_2$ -Synaptosomen-Fraktion in einem Hoch-Kalium-Puffer (KRP62) den HACU um 66 % ( $p < 0.01$ ) auf  $165.7 \pm 13.7$  % der Kontrolle steigert, ein Befund, der vorhergehende Resultate von Murrin und Kuhar (1976) bestätigt.

Die dritte Säule von links zeigt den schon bekannten Effekt der HACU-Hemmung in physiologischer Lösung, eine hochsignifikante Hemmung auf  $34.1 \pm 16.4$  % der Kontrolle.

Die durch die 62mM- $\text{K}^+$ -KRP verursachte, gesteigerte hochaffine Cholinaufnahme (im Diagramm, vierte Säule von links) wird interessanterweise durch Hyperforin hochsignifikant gehemmt: Der stimulierte HACU wurde in Anwesenheit von  $10 \mu\text{M}$  Hyperforin auf  $39 \pm 23$  % des Kontrollwertes verringert (siehe Abbildung 3.7).



**Abbildung 3.7: Initiale Depolarisation und nachfolgende Inkubation mit Hyperforin**

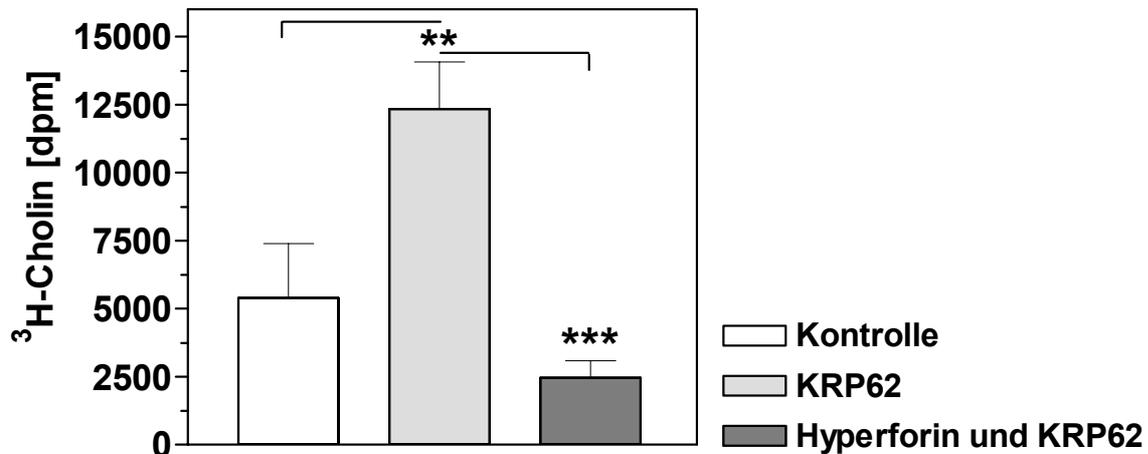
Die Synaptosomen wurden in einer 15minütigen Präinkubation mit depolarisierendem Medium (KRP62, das 62 mM Kalium enthielt) vorbehandelt, anschließend gewaschen und danach in physiologischer KRP Lösung aufgenommen; somit standen sie für die Tests zur Verfügung. Zur Cholinaufnahmemessung wurden sie mit [ $^3\text{H}$ ]-Cholin exakt 5 min aufgeladen und die Radioaktivität per Szintillationszählung bestimmt. [ $^3\text{H}$ ]-Cholin ist in dpm/5 min angegeben. Folgende absoluten Mittelwerte  $\pm$  SEM aus n=5 Experimenten wurden ermittelt: Kontrolle (11749  $\pm$  2080), KRP62 (19463  $\pm$  2676), Hyperforin 10  $\mu\text{M}$  (4004  $\pm$  660), Hyperforin und KRP62 (4586  $\pm$  1071). Die statistische Evaluation mittels zweifaktorieller Varianzanalyse (Zwei-Wege ANOVA, *repetitive measures Analysis of Variance*), gefolgt von Tukey-Kramer *multiple comparison test* (Instat 2<sup>®</sup> GraphPad Software) ergab folgende Wahrscheinlichkeitswerte: «Kontrolle» *versus* «KRP62» bzw. *versus* «Hyperforin 10 $\mu\text{M}$ » jeweils  $p < 0.01$  (\*\*), folglich hochsignifikant verschieden; «KRP62» *versus* «Hyperforin u. KRP62»  $p < 0.001$  (\*\*\*), demnach hochsignifikant verschieden. Die Sternsymbole beziehen sich auf die mit den horizontalen Zuordnungslinien angedeuteten Vergleichswerte.

### 3.2.4.2 Gleichzeitige Depolarisation und Hyperforin-Einwirkung

In diesem Versuchsansatz sollte der Frage nachgegangen werden, ob Hyperforin in den Aktivierungsmechanismus (HACU-Stimulation durch Depolarisation) involviert ist. Die Depolarisation mit KRP62 und die Wirkstoffinkubation (Hyperforin 10  $\mu\text{M}$ ) fanden gleichzeitig statt.

Die Abbildung 3.8 zeigt, dass der HACU im depolarisierenden Medium «KRP62» (bekannter Effekt, siehe 3.2.4.1) auf 228.9  $\pm$  13.9 % der Kontrolle hochsignifikant aktiviert wurde.

Bei der Hyperforin- und KRP62- Simultaninkubation wurde der HACU hochsignifikant gehemmt: Der «Hyperforin und KRP62»-Wert betrug nur noch 45.5  $\pm$  25.6 % der Kontrolle.

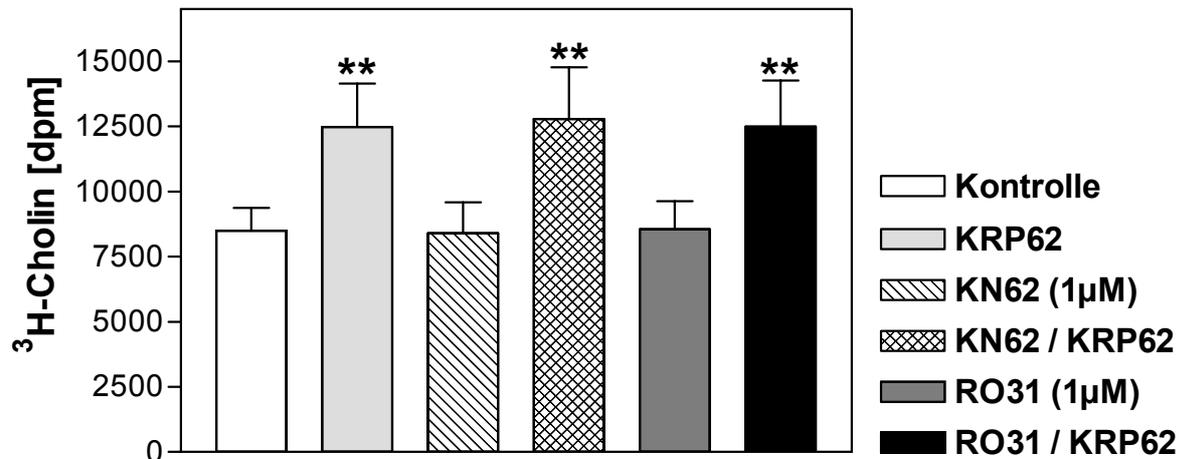


**Abbildung 3.8: Simultane Depolarisation und Inkubation mit Hyperforin**

Nach 15minütiger Inkubation mit physiologischer KRP (Säule links), depolarisierender  $62\text{mM-K}^+-\text{KRP}$  (KRP62, Mitte) und gleichzeitiger Behandlung mit KRP62 und  $10\ \mu\text{M}$  Hyperforin (rechter Balken), wurden die Synaptosomen gewaschen, daraufhin mit  $^3\text{H}$ -Cholin exakt 5 min aufgeladen und die Radioaktivität mittels Szintillationsmessung bestimmt.  $^3\text{H}$ -Cholin ist in dpm/5 min angegeben. Die absoluten Werte von links nach rechts in dpm/5 min:  $5393.8 \pm 1996$ ,  $12345.8 \pm 1723.7$ ,  $2454.8 \pm 29.1$  sind Mittelwerte  $\pm$  SEM aus 4 Experimenten. Die statistische Berechnung mittels einfaktorierter Varianzanalyse *one-way ANOVA* und anhand des Tukey-Kramer *multiple comparison tests* (InStat 2<sup>®</sup> GraphPad Software) ergab folgende Werte: «Kontrolle» versus «KRP62»,  $p < 0.01$  (\*\*); «KRP62» versus «Hyperforin u. KRP62»,  $p < 0.001$  (\*\*\*), beide Effekte hochsignifikant verschieden. Die Signifikanzsterne beziehen sich auf die mit den horizontalen Zuordnungslinien angedeutete vergleichende Betrachtung zweier Werte.

### 3.2.4.3 Einfluss von Inhibitoren Calcium-abhängiger Kinasen auf die depolarisationsinduzierte HACU-Aktivität

Zur Klärung der Frage, ob der inhibitorische Effekt des Hyperforins auf den nach Depolarisation stimulierten HACU auf einen Angriffspunkt an Kinasen zurückzuführen ist, wurden folgende Versuche durchgeführt: Eine Beteiligung der Calmodulin-Kinase II an dem Aktivierungsmechanismus des HACU durch Depolarisation wurde durch die Zugabe von KN62 ( $1\ \mu\text{M}$ ) und eine Partizipation der Protein-Kinase C in Anwesenheit von Ro31-8220 (abgekürzt RO31,  $1\ \mu\text{M}$ ) überprüft. Die Inkubation mit KN62 und RO31 schloss sich an die Präinkubation mit  $62\text{mM-K}^+$ -haltiger KRP an. Die Testsubstanzen wurden in DMSO gelöst (finale DMSO-Konzentration 1 %); eine äquivalente Menge DMSO wurde den Kontrollansätzen zum Zeitpunkt der Wirkstoffzugabe zugefügt.



**Abbildung 3.9: Vorgesaltete Depolarisation mit 62mM-Kalium-KRP und nachfolgende Behandlung mit Inhibitoren  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängiger Protein-Kinasen**

Die  $\text{P}_2$ -Synaptosomen wurden 15 min mit depolarisierendem Medium präinkubiert (KRP62, enthielt 62 mM  $\text{K}^+$ ), daraufhin gewaschen, in physiologischer Lösung aufgenommen und schließlich mit den Testsubstanzen versetzt. Zur Cholinaufnahmemessung wurden sie mit [ $^3\text{H}$ ]-Cholin exakt 5 min aufgeladen und die Radioaktivität per Szintillationszählung bestimmt. [ $^3\text{H}$ ]-Cholin ist in dpm/5 min angegeben. Folgende absoluten Mittelwerte  $\pm$  SEM aus  $n = 7$  Experimenten wurden ermittelt: Kontrolle ( $8491 \pm 859.1$ ), KRP62 ( $12467.7 \pm 1674.6$ ), KN62-1µM ( $8391.7 \pm 1193.5$ ), KN62/KRP62 ( $12782 \pm 1985.7$ ), RO31-1µM ( $8548.6 \pm 1080.5$ ), RO31/KRP62 ( $12489.6 \pm 1768$ ). Die statistische Evaluation mittels des gepaarten t-Tests des Computerprogrammes Instat 2<sup>®</sup> GraphPad Software ergab für den Vergleich zwischen der jeweils 1., 3., 5. mit der entsprechenden 2., 4., 6. Säule folgende Wahrscheinlichkeitswerte:  $p < 0.01$  (\*\*), folglich sind die Effekte hochsignifikant verschieden.

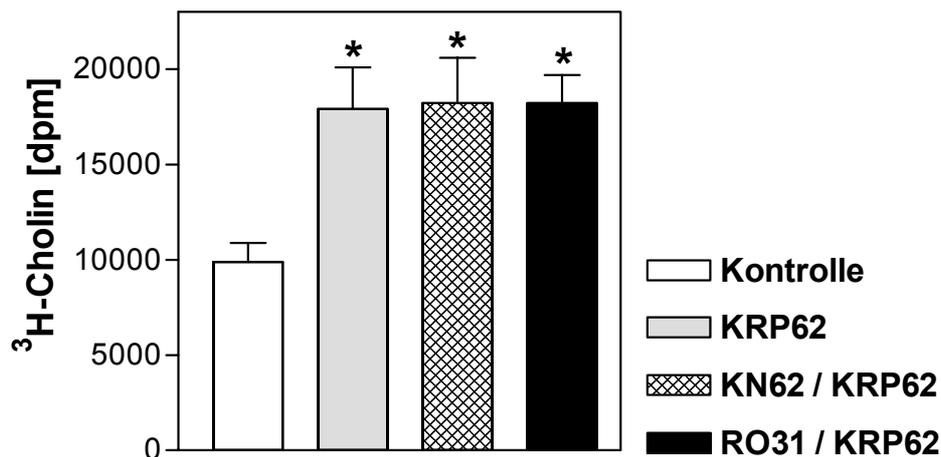
Die Werte für die Eigeneffekte der Kinase-Hemmer sind gegenüber der Kontrolle nicht signifikant verändert (siehe Abbildung 3.9):  $98.8 \pm 14.2$  % für «KN62 (1µM)» und  $100.7 \pm 12.6$  % für «RO31 (1µM)». Die stimulierten HACU-Aktivitäten sind im Vergleich zur Kontrolle einheitlich gesteigert worden: «KRP62»  $146.8 \pm 13.4$  %, «KN62/KRP62»  $150.5 \pm 15.5$  %, «RO31/KRP62»  $147.1 \pm 14.1$  %. Die Post-Depolarisations-Stimulation des HACU war in also Anwesenheit der Kinase-Hemmstoffe nicht beeinträchtigt.

#### 3.2.4.4 Simultane Depolarisation und RO31-/ KN62-Einwirkung

Zur Klärung des Aktivierungsmechanismus der depolarisationsinduzierten Aktivierung des HACU wurden die in dem Abschnitt 3.2.4.3 genannten Hemmstoffe von Calcium-abhängigen Kinasen eingesetzt.

Trotz gleichzeitiger Behandlung mit 62mM-K<sup>+</sup>-haltiger KRP und RO31 bzw. KN62 wurde eine deutliche Anregung der HACU-Aktivität beobachtet.

Folgende Steigerungen in Prozent der Kontrolle ergaben sich in diesen Experimenten: für «KRP62»  $181.2 \pm 12.1$  %, für «KN62/KRP62»  $184.3 \pm 13.1$  % und für «RO31/KRP62»  $184.3 \pm 8.1$  % (siehe Abbildung 3.10).



**Abbildung 3.10: Zeitgleiche Inkubation mit 62mM-Kalium-KRP und mit Hemmstoffen Ca<sup>2+</sup>-abhängiger Proteinkinasen**

Die P<sub>2</sub>-Synaptosomen wurden 15 min mit physiologischer KRP (Kontrolle links), mit depolarisierender 62mM-Kalium-KRP (KRP62) und KRP62 und gleichzeitig mit Kinase-Inhibitoren (KN62 bzw. RO31) behandelt, anschließend gewaschen und zur HACU-Messung mit [<sup>3</sup>H]-Cholin exakt 5 min inkubiert. Die Radioaktivität wurde mittels Szintillationszählung bestimmt. [<sup>3</sup>H]-Cholin ist in dpm/5 min angegeben. Die absoluten Werte von links nach rechts in dpm/5 min:  $9885 \pm 984.7$ ,  $17907.2 \pm 2179.7$ ,  $18215.6 \pm 2384.7$ ,  $18223 \pm 1475.4$  sind Mittelwerte  $\pm$  SEM aus 5 Experimenten. Die statistische Berechnung mittels einfaktorieller Varianzanalyse (*one-way ANOVA Analysis of Variance*, InStat 2<sup>®</sup> GraphPad Software) ergab folgenden Wahrscheinlichkeitswert für die Kontrolle *versus* Depolarisations-/Substanzeffekte:  $p = 0.012$ ,  $< 0.05$ , demnach signifikant (\*) verschieden.

Hyperforin hemmt demnach effektiv sowohl die basale als auch die depolarisationsinduzierte hochaffine Cholinaufnahme in die Synaptosomen über einen von den wichtigen synaptischen Calcium-abhängigen Protein-Kinasen unabhängigen Mechanismus.

### 3.2.5 Beeinflussung des HACU durch andere Agenzien

Dibutyryl-cGMP in einer Konzentration von 100  $\mu\text{M}$  in der Inkubation veränderte die HACU-Aktivität nicht. Das N<sup>G</sup>-Monomethyl-L-Arginin L-NMMA in einer Konzentration von 100  $\mu\text{M}$  bewirkte eine leichte, jedoch nicht signifikante Hemmung. Die unspezifischen Calmodulin-Antagonisten W7 und Trifluoroperazin-Dihydrochlorid (TFP), jeweils in einer Konzentration von 10  $\mu\text{M}$ , veränderten den HACU nicht signifikant (Daten nicht gezeigt).

## 3.3 Extrazelluläre ACh- und Cholin-Konzentrationen im Striatum *in vivo*

Aufgrund der stichhaltigen *in vitro*-Datenlage zur HACU-Hemmung durch Hyperforin wurde in den folgenden Versuchen überprüft, ob sich diese Befunde *in vivo* verifizieren lassen. Es wurden *in vivo*-Experimente zur Untersuchung der Wirkung von Hyperforin auf die striatale ACh-Freisetzung durchgeführt.

Die Untersuchungen fanden am Rattenmodell, am wachen, freibeweglichen Tier und mit Hilfe der Mikrodialyse-Technik (siehe Methoden) statt. Diese Methode eröffnete die Möglichkeit, die Auswirkungen der lokalen (*via* Sonde direkt ins Striatum; siehe Abschnitt 3.3.1) oder systemischen (siehe Abschnitt 3.3.2) Hyperforin-Applikation zu überprüfen.

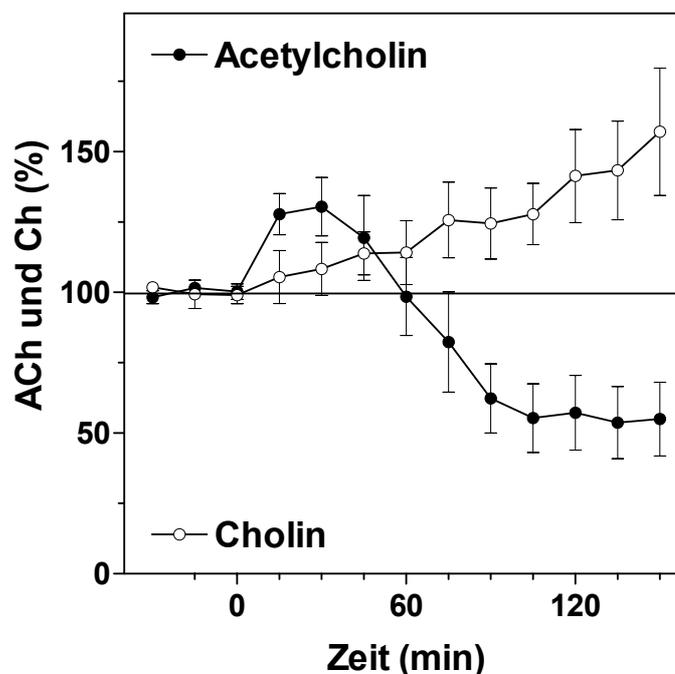
Eine wichtige Prämisse für diese Experimente war die Etablierung des hochsensitiven HPLC-Assays für ACh (siehe Methoden). Am Versuchstag erfolgte zunächst ein einstündiger Äquilibrierungsvorlauf, woraufhin die ersten 6 aufeinanderfolgenden und in ihrem Gehalt an ACh um weniger als 10 % differierenden Proben als Basalwerte gesammelt wurden (z.B. siehe Abbildungen 3.11 - 3.15: gezeigt sind die Zeitpunkte -30, -15, 0 ).

### 3.3.1 Lokale Hyperforin-Applikation über die Mikrodialysesonde

Die Mikrodialyse-Technik bietet die Möglichkeit, Wirkstoffe über die Sonde in das Hirngebiet zu infundieren und gleichzeitig die interessierenden Substanzen (in dieser Arbeit: Acetylcholin und Cholin) in der gesammelten Probe zu erfassen. Nachfolgend

vorgestellte Ergebnisse gingen aus Experimenten hervor, in denen Hyperforin lokal appliziert, also *via* Mikrodialysetsonde in das Corpus Striatum der Ratte infundiert wurde.

Die in den *in vitro*-Versuchen beobachtete HACU-Hemmung durch Hyperforin müsste in einer Verringerung der cholinergen Transmission (siehe 3.2.2) resultieren. Die folgenden Versuche zielten deshalb darauf ab, durch eine hoch konzentrierte Perfusionsflüssigkeit eine für die HACU-Hemmung ausreichende lokale Konzentration von Hyperforin in der Sondenumgebung zu erreichen. Daher wurden die Mikrodialysetsonden im folgenden Versuch mit einer **100  $\mu\text{M}$**  artifiziellen Cerebrospinalflüssigkeit (aCSF) perfundiert (siehe Abbildung 3.11).



**Abbildung 3.11: Infusion von 100  $\mu\text{M}$  Hyperforin in das Striatum**

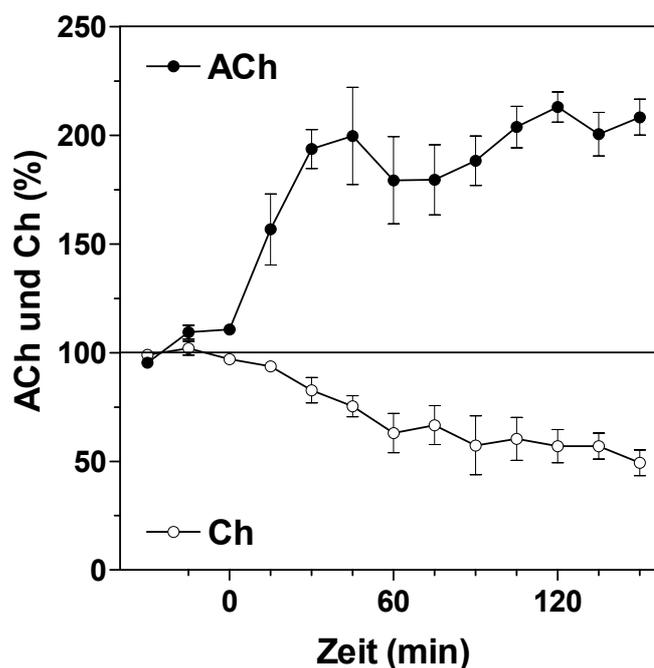
Hyperforin wurde zu 100  $\mu\text{M}$  in Neostigmin-haltiger (1 $\mu\text{M}$ ) aCSF gelöst und ab dem Zeitpunkt  $t = 0$  durch die Mikrodialysetsonde in das Striatum infundiert. Die Proben wurden viertelstündlich fraktioniert gesammelt und zur ACh- und Ch-Bestimmung der HPLC Analytik unterworfen. Die ACh- und Ch-Ausschüttungen sind in % der jeweiligen Basalefflux angegeben (ACh:  $193.4 \pm 19.8$  fmol/5  $\mu\text{l}$ ; Ch:  $3094 \pm 478$  fmol/5  $\mu\text{l}$ ; jeweils  $n = 12$ ). Die Mikrodialysewerte beziehen sich auf den Efflux der letzten 6 Werte (Zeitpunkte -30, -15 und 0 gezeigt) vor der Hyperforin-Applikation, deren Durchschnittswert als 100 % definiert wurde. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM aus 6 Experimenten.

Die Abbildung 3.11 zeigt einen klaren Befund: Die Infusion von 100  $\mu\text{M}$  Hyperforin (ab dem Zeitpunkt  $t = 0$ ) evoziert einen initialen transienten Anstieg der ACh-Freisetzung auf einen Maximalwert von  $130.4 \pm 10.4$  % des mittleren basalen

Effluxes nach 30 min, gefolgt von einem stetigen Abfall auf ein Minimum von  $53.7 \pm 12.8$  % nach 135 min.

Erwartungsgemäß hatte demnach die lokale Hyperforin-Behandlung eine signifikante Senkung der ACh-Ausschüttung um mehr als 40 % zur Folge. Parallel dazu stiegen die extrazellulären Konzentrationen von Cholin kontinuierlich an. Dieser Befund stellt ein Korrelat zu den in vitro-Ergebnissen der HACU-Hemmung durch Hyperforin dar: Reduktion der ACh-Freisetzung resultierend aus der unterbundenen Cholin-Bereitstellung und demzufolge Kumulation des Cholins im Extrazellulärraum (EZR).

In dem folgenden Versuch wurde überprüft, ob eine 3fach niedrigere lokale Hyperforin-Konzentration das Ausmaß der ACh- und Ch-Freisetzung im Striatum entsprechend den oben präsentierten Befunden verändern kann. Hyperforin, in einer Konzentration von  $30 \mu\text{M}$  in aCSF, wurde ab dem Zeitpunkt  $t = 0$  über die Sonde in das Striatum infundiert (siehe Abbildung 3.12).

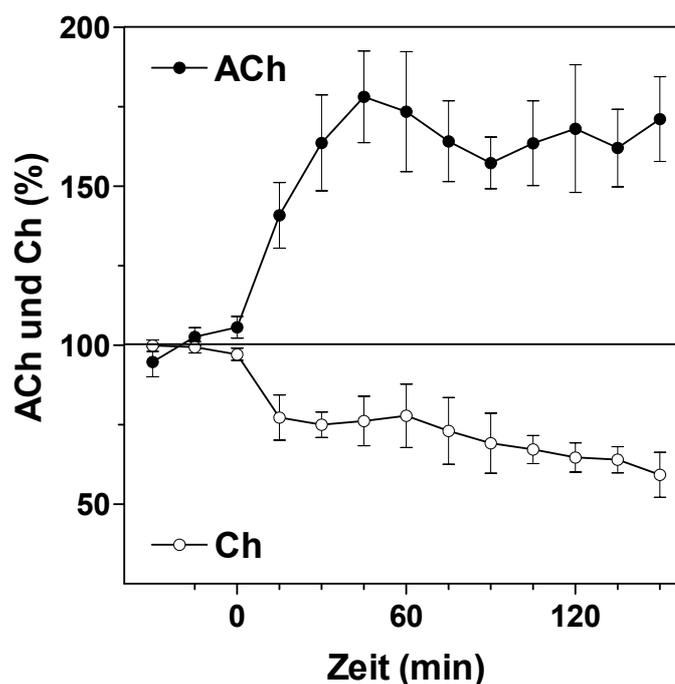


**Abbildung 3.12: Infusion von  $30 \mu\text{M}$  Hyperforin in das Striatum**

Hyperforin wurde der Perfusionslösung in einer Konzentration von  $30 \mu\text{M}$  zugesetzt und ab dem Zeitpunkt  $t = 0$  über die Sonde in das Striatum infundiert. Die Proben wurden im Abstand von 15 Minuten fraktioniert gesammelt und ohne Aufarbeitung mittels HPLC gemessen. Die ACh- und die Ch-Freisetzung sind in Prozent des Basaleffluxes angegeben. Die mittlere basale Freisetzung (ACh:  $204.2 \pm 20.9$  fmol/5  $\mu\text{l}$ ; Ch:  $3445.5 \pm 551.9$  fmol/5  $\mu\text{l}$ ; jeweils  $n = 4$ ) wurde gleich 100 % gesetzt und aus den 6 Werten (3 gezeigt) ermittelt, die am Versuchstag nach der Äquilibrationsphase (Dauer ca. 1 h) und vor der Injektion gesammelt wurden. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM aus  $n = 4$  Versuchen.

Im Gegensatz zu den Befunden nach Infusion der hohen Konzentration (Abbildung 3.11), führte die Behandlung mit 30  $\mu\text{M}$  Hyperforin innerhalb der ersten 30 Minuten bereits zu einem sprunghaften Anstieg der ACh-Freisetzung. Der maximale erzielte Anstieg lag bei ca. 215 % des Basaleffluxes für ACh. Die Substanz-Wirkung hielt über eine Dauer von 2 Stunden an. Gleichzeitig konnten nachhaltige Veränderungen der Cholinpiegel als Hyperforin-Effekt verzeichnet werden, nämlich eine deutliche Verminderung der extrazellulären Cholin-Konzentrationen um ca. 50 % (siehe Abbildung 3.12).

In der folgenden Versuchsreihe wurde die Wirkung von **10  $\mu\text{M}$**  Hyperforin in der Perfusionsflüssigkeit auf die ACh- und Ch-Freisetzung in Sondennähe untersucht. Ab dem Zeitpunkt  $t = 0$  wurde die wirkstoffhaltige aCSF in das Striatum infundiert (siehe Abbildung 3.13).



**Abbildung 3.13: Infusion von 10  $\mu\text{M}$  Hyperforin in das Striatum**

Zu dem Zeitpunkt  $t = 0$  erfolgte die Zugabe von 10  $\mu\text{M}$  Hyperforin mit der Perfusionsflüssigkeit (Neostigmin 1  $\mu\text{M}$ ) und über die Sonde in das Striatum. Die Proben wurden *per* Mikrodialyse viertelstündlich gesammelt und zur Quantifizierung des extrazellulären ACh und Ch der HPLC-Analyse unterworfen. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM aus 6 Experimenten. Die ACh-Freisetzung ist in Prozent des mittleren basalen Effluxes angegeben (ACh:  $193.4 \pm 19.8$  fmol/5  $\mu\text{l}$ ;  $n = 12$ ), ebenso der extrazelluläre Cholin-Spiegel in Prozent des Basaleffluxes (Ch:  $3094 \pm 478$  fmol/5  $\mu\text{l}$ ;  $n = 12$ ). Die Mikrodialysewerte sind bezogen auf den Efflux der letzten 6 Werte (Zeitpunkte -30, -15 und 0 gezeigt) vor der Hyperforin-Applikation, deren Durchschnittswert als 100 % definiert wurde.

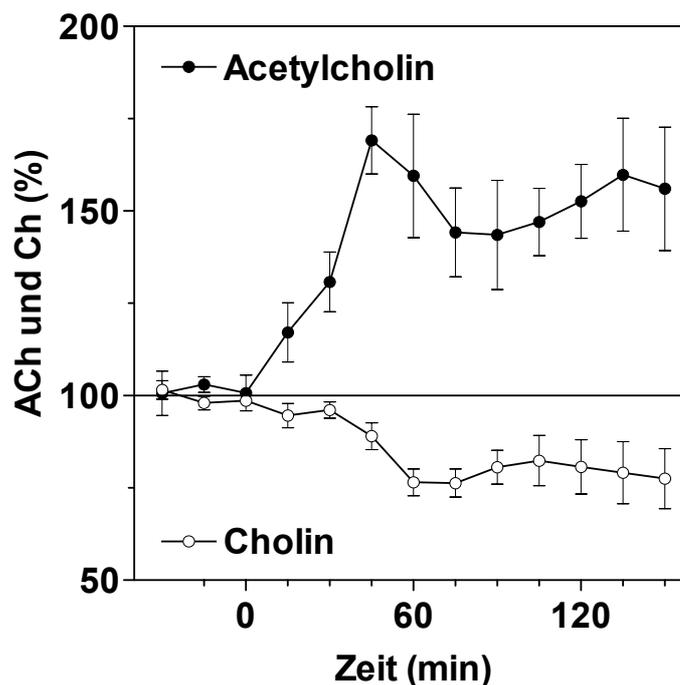
Bereits 45 min nach Beginn der Perfusion mit 10  $\mu\text{M}$  Hyperforin wurde ein Maximum der ACh-Ausschüttung erreicht; sie wurde durch den Wirkstoff auf  $178.1 \pm 14.4$  % des Basaleffluxes sprunghaft gesteigert und verweilte über den beobachteten Zeitraum von 150 Minuten auf diesem Niveau. Der maximale Anstieg der ACh-Freisetzung lag deutlich unter dem Wert der nach Infusion von 30  $\mu\text{M}$  (ca. 215 %) erzielt wurde. Parallel dazu nahmen die extrazellulären Cholin-Spiegel kontinuierlich ab und verzeichneten einen minimalen Wert von  $59.3 \pm 7.1$  % bei 150 min (siehe Abbildung 3.13).

Zusammenfassend ist festzustellen, dass lokale Infusionen von **100  $\mu\text{M}$**  Hyperforin in das *Corpus Striatum* der Ratte eine **depressorische** Wirkung auf die ACh-Freisetzung entfalten, wohingegen niedrigere lokale Hyperforin-Konzentrationen von **10 und 30  $\mu\text{M}$** , eine konzentrationsabhängige signifikante **Steigerung** der basalen ACh-Freisetzung auf Maximalwerte von etwa 178 % und 200 % des Basaleffluxes bereits nach 45 min zur Folge haben. Parallel dazu resultierte die lokale Gabe von 100  $\mu\text{M}$  Hyperforin in einer Zunahme der extrazellulären Cholin-Spiegel, während die Infusionen mit 10 und 30  $\mu\text{M}$  eine Reduktion der Ch-Freisetzung bewirkten.

### 3.3.2 Striatale cholinerge Parameter nach systemischer Hyperforin-Applikation

In den im Folgenden beschriebenen Experimenten wurde untersucht, ob der basale striatale ACh-Efflux und die extrazellulären Ch-Konzentrationen *in vivo* nach systemischer, intraperitonealer Gabe einer Bolus-Dosis Hyperforin verändert werden. Nach dem einstündigen Äquilibrierungsvorlauf wurden zunächst 6 Basalwerte gesammelt (die letzten drei sind gezeigt, siehe Abbildungen 3.14 und 3.15). Zu dem Zeitpunkt  $t = 0$  erfolgte die Substanz-Verabreichung: Hyperforin - in 0.9%iger Kochsalzlösung gelöst - wurde intraperitoneal injiziert. Das Applikationsvolumen betrug 1 ml/kg KG (Körpergewicht).

Die basale Freisetzung ist interindividuell recht unterschiedlich, weswegen die prozentuelle Steigerung der Freisetzung nicht anhand der absoluten Werte (siehe Legenden der Abbildungen), sondern relativ zum Basalefflux des jeweiligen Tieres berechnet wurde. Die Resultate der Experimente sind in den Abbildungen 3.14 und 3.15 zusammengefasst.



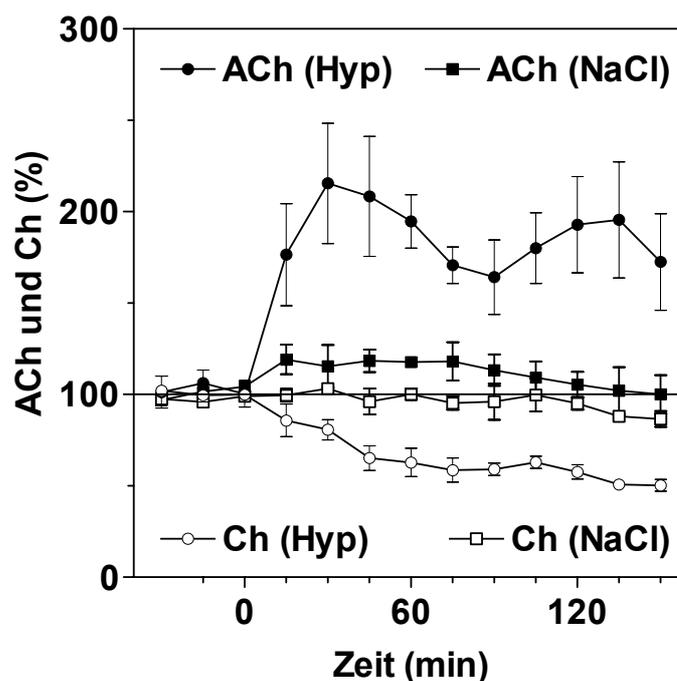
**Abbildung 3.14: Einfluss von systemisch appliziertem Hyperforin (1 mg/kg) auf die basale striatale ACh- und Ch-Freisetzung**

Zum Zeitpunkt  $t = 0$  wurden 1 mg/kg Hyperforin in physiologischer Kochsalzlösung gelöst und i.p. appliziert. Die Proben wurden *per* Mikrodialyse im Striatum im Abstand von 15 Minuten fraktioniert gesammelt und ohne Aufarbeitung zur Quantifizierung des extrazellulären ACh und Ch der HPLC-ECD Analyse unterworfen. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM aus 6 Experimenten, im Einzelnen die ACh-Freisetzung (geschlossene Kreise) und die Ch-Freisetzung (offene Kreise) in % des Basaleffluxes. Der mittlere basale Efflux (für ACh:  $195.1 \pm 26.3$  fmol/5  $\mu$ l; für Ch:  $2905 \pm 257$  fmol/5  $\mu$ l; jeweils  $n=12$ ) wurde gleich 100 % gesetzt und aus den 6 Werten (3 gezeigt) ermittelt, die am Versuchstag nach der Äquilibrationsphase (Dauer ca. 1h) und vor der Injektion gesammelt wurden.

Wie in der Abbildung 3.14 gezeigt, stieg der relative ACh-Efflux nach Injektion von 1 mg/kg i.p. in allen 6 untersuchten Tieren sofort steil an, um ca. 45 Minuten nach der Hyperforin-Applikation eine maximale Steigerung des extrazellulären ACh auf  $169.1 \pm 9.1$  % des Basaleffluxes zu erreichen und in dem beobachteten Zeitraum von 150 Minuten nicht auf das basale Niveau zurückzukehren. Zu den Zeitpunkten 75 min bzw. 150 min lagen die ACh-Spiegel immer noch deutlich über Basalefflux, nämlich bei Werten von  $144.2 \pm 12$  %, respektive  $156 \pm 16.7$  %.

Nach der Hyperforin-Injektion sanken die Cholinpiegel langsam aber stetig und erreichten ein Minimum von  $76.3 \pm 3.8$  % nach 75 min. Sie kehrten auch nach 150 min nicht auf Basalniveau zurück:  $77.5 \pm 8.1$  % (siehe Abbildung 3.14).

Zur Klärung der Frage, ob die Steigerung des extrazellulären ACh und die Verringerung des Ch im Extrazellulärraum (EZR) durch eine Hyperforin-Injektion 10fach höherer Dosis weiter verstärkt werden kann, erhielten die Versuchstiere **10 mg/kg** Hyperforin i.p. (siehe Abbildung 3.15). Die Ergebnisse zeigen, dass diese Gabe eine wesentlich stärkere Zunahme der ACh-Ausschüttung zur Folge hatte, denn schon nach 30 min wurde ein sprunghafter Anstieg auf das Maximum  $215.5 \pm 32.9$  ( $n = 6$ ) des Basaleffluxes beobachtet. Wie in der Abbildung 3.12 gezeigt, erhöhte Hyperforin über mehr als 2 h nachhaltig die ACh-Freisetzung, die nach 150 min nicht wieder auf das Basalniveau zurückkehrte. Im Gegensatz hierzu sanken die Cholinspiegel um ca 50 % und erreichten nach 150 min einen Wert von  $50.3 \pm 3.3$  %. Es zeigte sich ferner, daß nach einer NaCl-Injektion (unbehandelte Tiere) keine signifikanten Veränderungen des ACh und Ch im EZR zu verzeichnen waren.



**Abbildung 3.15: Systemische Applikation von 10 mg/kg Hyperforin; Effekte auf die striatalen ACh- und Ch-Spiegel**

Die Versuchstiere erhielten 10 mg/kg Hyperforin (in physiologischer Kochsalzlösung gelöst) oder 0.9 % NaCl-Lösung i.p. zu dem Zeitpunkt  $t = 0$ . Die Veränderungen der extrazellulären ACh- und Ch-Konzentrationen wurden *per* Mikrodialyse und HPLC bestimmt. Hierzu wurden die Proben viertelstündlich gesammelt und ohne weitere Aufreinigung der HPLC-ECD-Analytik unterworfen. In Kontrollexperimenten wurde ein Volumen von 1 ml/kg KG physiologischer Kochsalzlösung in den Bauchraum gespritzt. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM aus 6 Experimenten. Die ACh- und Ch-Effluxes werden als Veränderungen gegenüber der basalen Freisetzung (mittlere basale Effluxes: ACh:  $195.1 \pm 26.3$  fmol/5  $\mu$ l; Ch:  $2905 \pm 257$  fmol/5  $\mu$ l; von jeweils  $n = 12$ ) angegeben, die als Durchschnittswert der letzten 6 Messungen vor der Testsubstanz-Injektion als 100 % definiert wurde.

Aufgrund von Diskrepanzen zwischen den absoluten Basalausschüttungen unterschiedlicher Tiere, wurde - in Relation hierzu - die prozentuale Steigerung der Freisetzung berechnet und in der Abbildung dargestellt.

Die intraperitoneale Applikation von Hyperforin in Dosen von **1 und 10 mg/kg** hatte demnach eine konzentrationsabhängige signifikante **Steigerung** der basalen ACh-Freisetzung zur Folge, die sich in dem höheren ACh-Efflux widerspiegelte, während die Ch-Konzentrationen im EZR sanken.

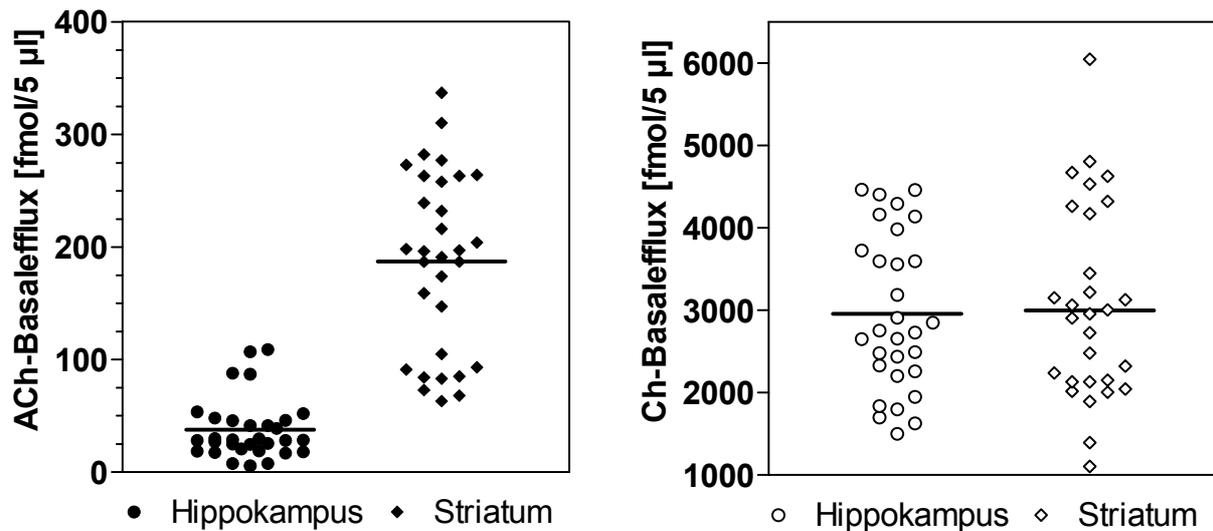
Es konnte gezeigt werden, dass die systemische Applikation von Hyperforin, ähnlich wie die lokale Gabe niedriger Konzentrationen (10 und 30  $\mu\text{M}$ , siehe 3.3.1), die striatale ACh-Ausschüttung *in vivo* stimuliert.

### **3.4 Hippokampales extrazelluläres ACh und Ch *in vivo* nach systemischer Hyperforin-Gabe**

Angesichts der *in vitro*-Befunde zur HACU-Hemmung durch Hyperforin und der Ergebnisse der *in vivo*-Experimente im Striatum wurde in den folgenden Versuchen überprüft, ob auch die hippokampale cholinerge Neurotransmission durch Hyperforin moduliert wird. Dabei interessierten vor allem systemische Hyperforin-Gaben.

Die hippokampale ACh-Freisetzung wurde ebenfalls im Rattenmodell und mit Hilfe der Mikrodialyse-Technik (siehe Methoden) untersucht. Die Etablierung einer hochsensitiven ACh-HPLC-Analytik war essentielle Voraussetzung für diese Experimente, da die hippokampalen ACh-Effluxe weit unter denen des Striatums liegen. Der Vergleich der ACh-Effluxe im Striatum und im Hippokampus zeigt, dass - in Korrelation mit der neuronalen Ausstattung des Hirnareals - die striatalen Basal-Effluxes des ACh deutlich über denen des Hippokampus' liegen (siehe Punktdiagramme in Abbildung 3.16).

Die hippokampalen Basal-Effluxes für ACh in der Ratte liegen im Mittel zwischen 30 und 50 fmol/5  $\mu\text{l}$ , die striatalen sind etwa 5 x höher mit ungefähr 190 fmol/5  $\mu\text{l}$  (Mittelwert). Die in der Fragestellung ebenfalls interessierenden Ch-Effluxes sind auch dargestellt: Im Striatum sowie im Hippokampus verzeichnen sie Werte rund 3000 fmol/ 5  $\mu\text{l}$ , liegen demnach ca. 15 respektive 75 x höher als die entsprechenden ACh-Werte.



**Abbildung 3.16: Basale ACh- und Ch-Effluxes im Hippokampus und im Striatum**

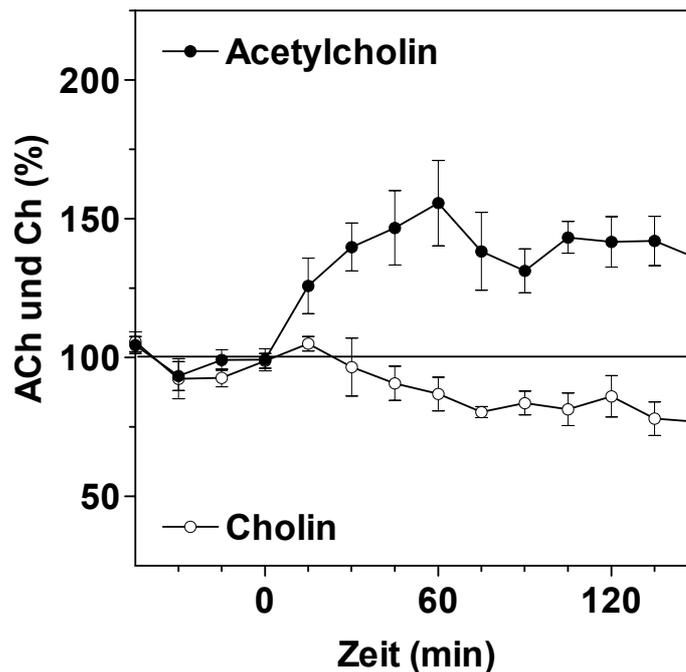
Artifizielle Cerebrospinalflüssigkeit wurde über die Sonde in den Hippokampus und in das Striatum infundiert. Die Proben wurden *per* Mikrodialyse viertelstündlich fraktioniert gesammelt und ohne Aufarbeitung der HPLC-Analytik unterworfen. Dargestellt sind die basalen Effluxes in fmol/5 µl, die als Durchschnittswerte der ersten 6 Messungen nach der Äquilibrierungsphase definiert wurden: ACh-Hippokampus  $28.5 \pm 26.9$ ; ACh-Striatum  $196 \pm 80.1$ ; Ch-Hippokampus  $2744 \pm 941.4$ ; Ch-Striatum  $2932 \pm 1228$  (ACh-Werte:  $n = 32$ ; Ch-Werte:  $n = 30$ ).

In der im Folgenden beschriebenen Versuchsreihe wurde der Einfluss von systemisch appliziertem Hyperforin auf die hippokampale ACh-Freisetzung untersucht.

Die intraperitoneale Injektion einer Dosis von 1 und 10 mg/kg Hyperforin zu dem Zeitpunkt  $t = 0$  führte zu einer konzentrationsabhängigen Stimulation der ACh-Freisetzung im Hippokampus (siehe Abbildungen 3.17 und 3.18).

Hyperforin, in einer Dosis von **1 mg/kg i.p.** und in physiologischer Kochsalzlösung gelöst, führte innerhalb der ersten 60 Minuten nach Injektion zu einem steilen Anstieg der hippokampalen ACh-Freisetzung, mit einem Wert für die maximale Steigerung von rund  $155.7 \pm 15.4$  % des Basaleffluxes ( $n = 6$ ).

Parallel dazu wurde nach der Injektion des Wirkstoffes ein Abfall der extrazellulären hippokampalen Cholin-Konzentrationen bis auf einen Wert von  $83.7 \pm 4.3$  % ( $n = 6$ ) nach 90 Minuten beobachtet (siehe Abbildung 3.17).

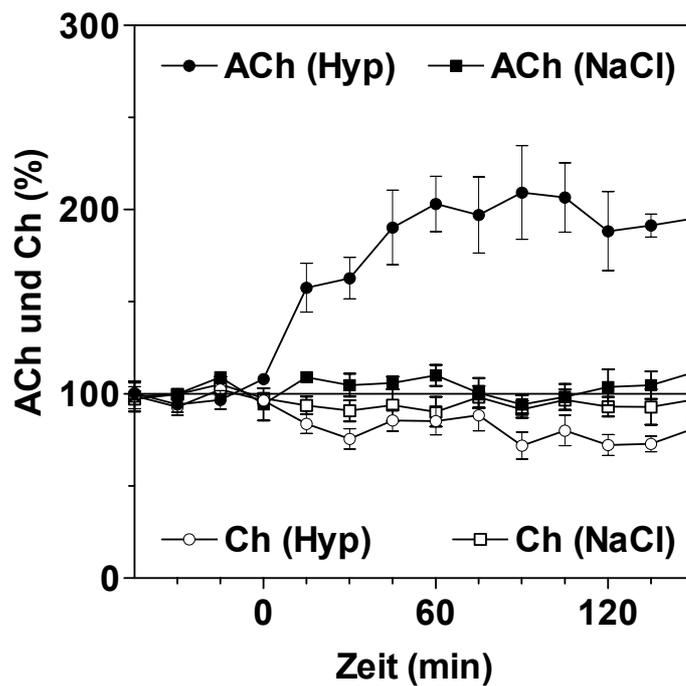


**Abbildung 3.17: Hippokampale ACh- und Ch-Spiegel nach systemischer Hyperforin-Applikation von 1 mg/kg i.p.**

Den Tieren wurde Hyperforin 1 mg/kg (in 0.9 % NaCl-Lösung) zum Zeitpunkt  $t = 0$  i.p. injiziert. In Kontrolleexperimenten wurde 0.9 % Kochsalzlösung appliziert (Daten in Abbildung 3.18 gezeigt). Das Applikationsvolumen betrug 1 ml/kg KG. Die Proben wurden *per* Mikrodialyse im Hippokampus im Abstand von 15 min fraktioniert gesammelt und zur Bestimmung der Analyten ACh und Ch der HPLC-Analytik unterworfen. Die ACh- und Ch-Freisetzung sind in % des Basaleffluxes (ACh:  $40.35 \pm 14$  fmol/5  $\mu$ l; Ch:  $2185.7 \pm 266.5$  fmol/5  $\mu$ l) abgegeben, der als Durchschnittswert der letzten 6 Messungen vor der Testsubstanz-Injektion als 100 % definiert wurde (4 Werte gezeigt). Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM aus 6 Experimenten.

Die Abbildung 3.18 zeigt die Ergebnisse der Experimente, in denen die Wirkung einer intraperitonealen Injektion von **10 mg/kg** Hyperforin auf die ACh- und Ch-Freisetzung untersucht wurde. Bereits 60 Minuten nach der Applikation des Wirkstoffes wurde für die hippokampale ACh-Ausschüttung ein Wert von  $203.1 \pm 14.9$  % des Basaleffluxes erreicht. Die ACh-Freisetzung wurde im beobachteten Zeitfenster von 150 Minuten nachhaltig gesteigert, ohne auf das Basalniveau zurückzukehren. Sie erreichte ein Plateau bei rund 200 %.

Nach der Hyperforin-Injektion sanken die hippokampalen extrazellulären Cholin-Konzentrationen von 100 % basal auf  $71.9 \pm 7.2$  % des Basaleffluxes ab (Zeitpunkt 90 Minuten,  $n = 8$ ).



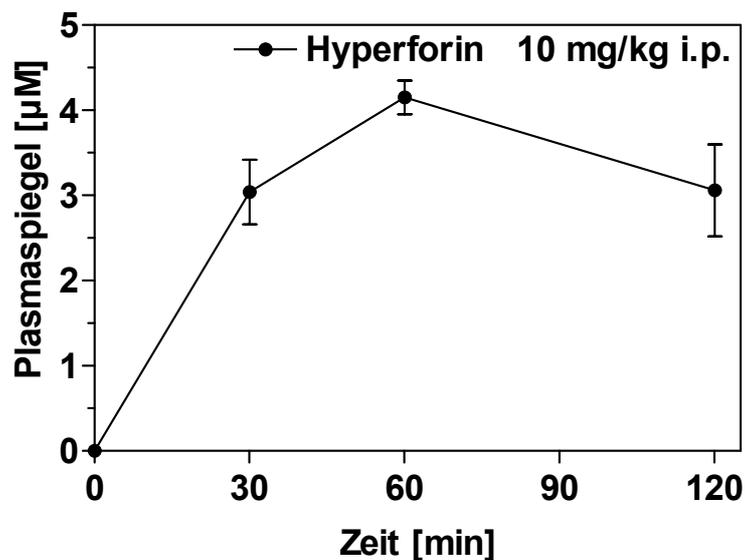
**Abbildung 3.18: Extrazelluläre hippocampale ACh- und Ch-Konzentrationen nach i.p. Applikation von 10 mg/kg Hyperforin**

Zum Zeitpunkt  $t = 0$  wurden 10 mg/kg Hyperforin (in physiologischer Kochsalzlösung gelöst) i.p. appliziert. In Kontrollexperimenten wurde ein Volumen von 1 ml/kg KG physiologischer Kochsalzlösung in den Bauchraum gespritzt. Die Proben wurden *per* Mikrodialyse im Hippokampus viertelstündlich fraktioniert gesammelt und ohne Aufarbeitung zur Quantifizierung des extrazellulären ACh und Ch in das HPLC-Gerät injiziert. Die ACh- und Ch-Effluxes werden als Veränderungen gegenüber des mittleren basalen Effluxes angegeben, der als Durchschnittswert der letzten 6 Messungen vor der Testsubstanz-Injektion als 100 % definiert wurde: Für die Dosis 10 mg/kg (ACh:  $31.6 \pm 8.8$  fmol/5  $\mu$ l; Ch:  $3467.1 \pm 315.9$  fmol/5  $\mu$ l;  $n = 8$ ) und für die Kontrollexperimente (ACh:  $47 \pm 14.2$  fmol/5  $\mu$ l; Ch:  $2345 \pm 191.7$  fmol/5  $\mu$ l;  $n = 4$ ). Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM.

### 3.5 Hyperforin-Plasmaspiegel

Hyperforin-Plasmaspiegel wurden nach systemischer intraperitonealer Gabe von 10 mg/kg und in physiologischer Kochsalzlösung gelöstem Hyperforin mittels HPLC-ECD bestimmt. Die folgende Abbildung 3.19 zeigt den zeitlichen Verlauf der Hyperforin-Plasmakonzentrationen nach Gabe von 10 mg/kg Hyperforin i.p., mit Werten im niedrigen mikromolaren Bereich.

Nach Injektion von 1 mg/kg i.p. lag das Hyperforin im Plasma unterhalb der Nachweisgrenze von ca. 1  $\mu$ M. Die Probengewinnung fand gemäß der im Methodenteil vorgestellten Vorschrift zu den Zeitpunkten 30, 60 und 120 min nach Applikation des Wirkstoffes statt.



**Abbildung 3.19: Plasmakonzentrations-Zeit-Verlauf von Hyperforin nach systemischer Applikation**

Die Abbildung zeigt den zeitlichen Verlauf der Hyperforin-Spiegel im Plasma, die nach der Bolusgabe einer Dosis von 10 mg/kg i.p. erhalten wurden (Applikationsvolumen 1 ml/kg KG). Die Versuchstiere wurden 30, 60 und 120 min nach Injektion narkotisiert, zur Rumpfbloodentnahme vorbereitet und die gewonnenen Proben für die Hyperforin-Analytik aufbereitet (siehe Methoden). Dargestellt sind folgende Mittelwerte  $\pm$  SEM: 30 min ( $3.04 \pm 0.38$ ,  $n = 4$ ), 60 min ( $4.15 \pm 0.2$ ,  $n = 6$ ) und 120 min ( $3.06 \pm 0.54$ ,  $n = 4$ ).

### 3.6 Hyperforin in der Cerebrospinalflüssigkeit

Die Konzentrationen in der CSF (Cerebrospinalflüssigkeit) entsprechen weitgehend denen im EZR (Extrazellulärraum), da zwischen diesen Kompartimenten keine Diffusionsbarrieren existieren (Tucek, 1988; Betz, 1989).

Zu bestimmten Zeitpunkten nach Behandlung der Versuchstiere mit Hyperforin wurden CSF-Proben *per* Punktion der *Cisterna Magna* und in Narkose gewonnen.

In der HPLC-ECD-Analyse zeigte sich, dass die Hyperforin-Konzentrationen 30 min, 1 h und 1.5 h nach der Injektion von 1 und 10 mg/kg i.p. unterhalb der Nachweisgrenze ( $1.0 \mu\text{g/ml}$ ) lagen.

### 3.7 Verhaltensexperimente mit Hyperforin an Mäusen

Neurochemische Veränderungen im Striatum, als Teil des extrapyramidalen motorischen Systems, führen zu tiefgreifenden Verhaltensänderungen. Die Effekte von Hyperforin auf die motorische Aktivität soll im folgenden Abschnitt im Mausmodell dargelegt werden.

Das Messprinzip des durchgeführten Motilitätstests besteht darin, dass ein Lichtstrahl-Lichtschrankensystem senkrecht zur Arena, in welche die Tiere gesetzt werden, installiert ist, was das Erfassen horizontaler Aktivität (Lokomotion = Fortbewegung) als Unterbrechung der Strahlen ermöglicht (siehe Material und Methoden).

Adulte Tiere einer Altersgruppe wurden zunächst 6 h an die Versuchsbedingungen gewöhnt und nach einer Bolus-Gabe von 1 mg/kg und 10 mg/kg Hyperforin i.p. in Gruppen à 5 Mäuse dem Motilitätstest unterzogen.

Die Injektion einer niedrigen Dosis von 1 mg/kg wies keine signifikanten Unterschiede zwischen Kontrollgruppen und den mit Hyperforin behandelten Gruppen auf.

Die Injektion einer höheren Dosis 10 mg/kg i.p. Hyperforin jedoch führte dazu, dass die Tiere in ihrer explorativen lokomotorischen Aktivität deutlich beeinträchtigt wurden: Die Anzahl der Lichtstrahlunterbrechungen betrug bereits 15 min nach Injektion von Hyperforin nur noch  $130 \pm 10.1$  ( $n = 3$  Gruppen à 5 Mäuse) im Vergleich zu  $191.7 \pm 20.6$  bei den Kontrolltieren. Die lokomotorische Aktivität war gegenüber den Kontrolltieren zu allen betrachteten Zeitpunkten signifikant reduziert.

Die Abbildung 3.20 veranschaulicht sowohl den Vergleich der Motilität der Kontrolltier-Gruppen mit der motorischen Aktivität Hyperforin-behandelter Gruppen (siehe Diagramme oben und Mitte) als auch die Signifikanz von 1 mg/kg versus 10 mg/kg Hyperforin (siehe Histogramm unten).

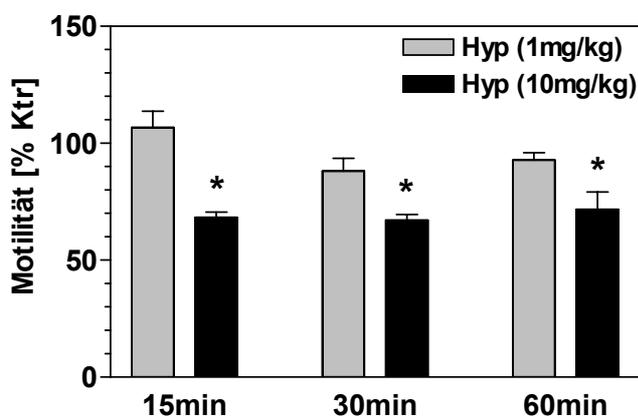
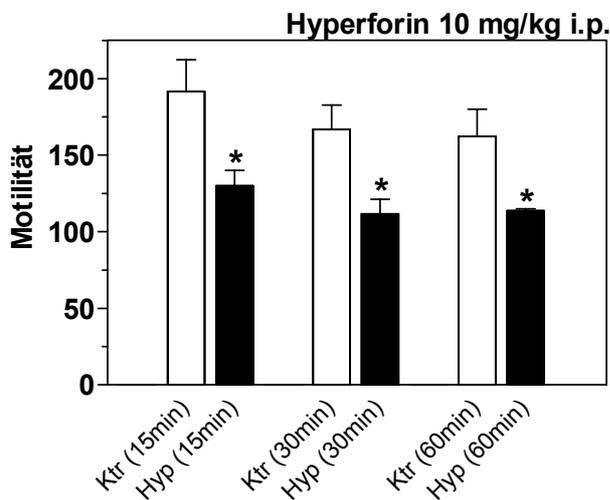
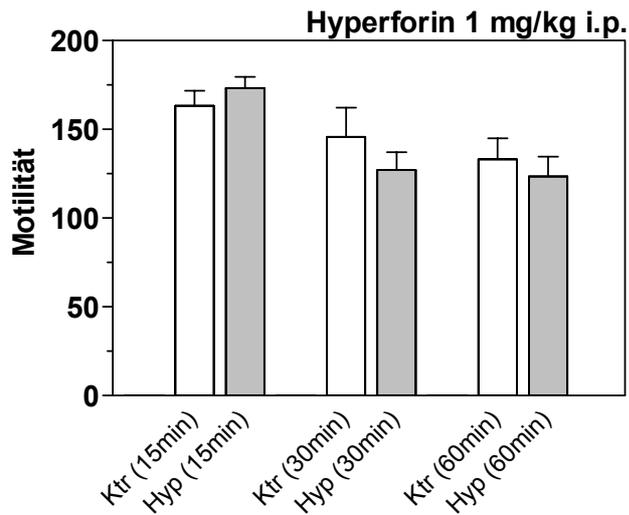


Abbildung 3.20:

### Motorische Aktivität der Mäuse nach Applikation von Hyperforin (1 mg/kg und 10 mg/kg i.p.)

Die Histogramme (oben und Mitte) zeigen die Wirkung von Hyperforin auf die spontane Motilität der Mäuse, die mit Hilfe eines Motilimeters bestimmt wurde und als Anzahl der Lichtstrahlunterbrechungen (Abszisse) innerhalb der 2-Minuten-Versuchsphase ausgedrückt ist (siehe Methoden).

Die Versuchstiere erhielten eine Injektion von 1 oder 10 mg/kg Hyperforin i.p. Den Kontrolltieren wurde physiologische Kochsalzlösung injiziert.

Die statistische Berechnung erfolgte mittels des t-Tests der InStat 2<sup>®</sup> GraphPad Software und ergab, daß zwischen den einzelnen Werten nach Gabe von 1 mg/kg i.p. kein signifikanter Unterschied besteht, jedoch nach Gabe von 10 mg/kg die Kontroll- und die Hyperforinwerte signifikant verschieden waren (p-Wert < 0.05).

Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM aus 3 Gruppen  $\times$  5 Mäuse. Resultate von links nach rechts:

**1 mg/kg i.p.** ( $163.3 \pm 8.4$ ,  $173.3 \pm 6.2$ ,  $145.7 \pm 16.2$ ,  $127 \pm 10$ ,  $133 \pm 11.9$ ,  $123.3 \pm 11.2$ )

**10 mg/kg i.p.** ( $191.7 \pm 20.6$ ,  $130 \pm 10.1$ ,  $167 \pm 15.7$ ,  $111.7 \pm 9.5$ ,  $162 \pm 17.8$ ,  $113.7 \pm 1.4$ ).

Das Histogramm (links) zeigt den Effekt von Hyperforin auf die spontane Motilität der Mäuse in einer zusammenfassenden Darstellung; Abszisse: Motilität in Prozent der Kontrolle; Ordinate: Hyperforin-Dosen und Zeitpunkte der Auswertung. Die statistische Evaluation erfolgte mittels des t-Tests des Computerprogrammes InStat 2<sup>®</sup> GraphPad Software und ergab einen p-Wert von < 0.05, demnach sind die Werte der 1 mg/kg und 10 mg/kg Dosis signifikant verschieden. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM (in % der Kontrolle) aus 3 Gruppen  $\times$  5 Mäuse.

Zusammenfassend ist also festzustellen, dass die Gabe von 10 mg/kg Hyperforin nach 15-60 min in einem signifikanten Rückgang der motorischen Aktivität in Mäusen resultierte, wogegen eine niedrigere Dosis von nur 1 mg/kg i.p. unwirksam war.

### **3.8 Verhaltensexperiment mit Hyperforin an Ratten**

Im Verhaltenstest zur Untersuchung auf procholinerge äußere Erscheinungszeichen ergab die Beobachtung von mit 10 mg/kg i.p. Hyperforin oder 0.9 % NaCl-Lösung behandelten Versuchstieren folgendes Ergebnis: Bei den Tieren, denen physiologische Kochsalzlösung i.p. appliziert wurde, konnten keine typischen cholinergen Symptome (Ptosis, Exophthalmus, Tränenfluß, Salivation, gesträubtes Fell, Durchfall, Abduktion der Extremitäten, grober Tremor; vgl. Methodenteil 2.4.2) beobachtet werden. In der Hyperforin-behandelten Gruppe waren vereinzelt Stereotypien zu beobachten, wie Schnüffeln, intensives Putzen, Knabbern, Schütteln. Bei einem Tier war nach 15 min, bei zweien nach 30 min Ptosis zu beobachten, nach 15 und 45 min gesträubtes Nackenfell bei nur einem Tier und wiederum bei einem von den drei Tieren Bisonhaltung nach 45 min.

---

## 4 Diskussion

Die vorliegende Arbeit ist die erste Studie, die sich mit den Effekten von Hyperforin, einem wirksamkeitsbestimmenden Inhaltsstoff des Johanniskrauts, auf das zentrale cholinerge System befasst. Im Vordergrund der Arbeit stand herauszufinden, ob Hyperforin den HACU im Synaptosomen-Modell *in vitro* beeinflusst und ob eine Veränderung sich auf die Acetylcholin(ACh)- und Cholin(Ch)-Konzentrationen im Extrazellulärraum *in vivo* auswirkt. Dazu wurden die ACh-Freisetzung und die Ch-Spiegel im Striatum und im Hippokampus der Ratte mittels Mikrodialyse bestimmt.

### 4.1 Methodische Aspekte

#### 4.1.1 Mikrodialyse-Technik und andere *in vivo*-Bestimmungsmethoden

Die Mikrodialysetechnik ermöglicht die kontinuierliche *in vivo*-Messung endogener und exogener frei diffusibler Substanzen in Extrazellulärräumen (EZR) verschiedener Gewebe am wachen freibeweglichen Tier. Hierbei wird das umliegende Gewebe weniger stark geschädigt als beispielsweise bei der *Push-Pull*-Technik (Westerink, 1995; Gardner *et al.*, 1993). Der Hauptunterschied zur *Push-Pull*-Methode besteht darin, dass bei der Mikrodialyse die Silikafaser, durch welche die Perfusionsflüssigkeit gepumpt wird (Zustrom), von einer semipermeablen Membran umschlossen ist und somit keinen direkten Kontakt zum Extrazellulärraum hat. Bei der *Push-Pull*-Technik hingegen wird die Perfusionsflüssigkeit aus dem inneren der zwei konzentrischen und am Ende offenen Rohre direkt in den EZR gedrückt („*Push*“) und über das äußere Rohr wieder aus dem EZR gesogen („*Pull*“). Dies erzeugt Turbulenzen in der Extrazellulärflüssigkeit, welche zu einer Gewebeschädigung führen können. Als mechanische Barriere gegenüber solchen Turbulenzen agiert die Membran der Mikrodialysesonde, da der Fluss nur innerhalb der Sonde stattfindet (Westerink, 1995). Des Weiteren unterscheiden sich die beiden Techniken in der Qualität der Proben: Mikrodialysate sind sauberere und garantiert eiweißfreie Proben.

Eine weitere Methode zur Probengewinnung aus dem EZR stellt die *Cup*-Technik dar (Moroni und Pepeu, 1984): Hierbei liegt ein an beiden Enden offener und mit artifizieller Cerebrospinalflüssigkeit (aCSF) gefüllter Plastikzylinder („*Cup*“) auf der

freigelegten weichen Hirnhaut des Kortex'. Extrazelluläre Substanzen diffundieren direkt aus dem EZR der Hirnoberfläche in die aCSF. Die *Cup*-Methode schädigt das umliegende Gewebe zwar weniger stark als die Mikrodialysetechnik, jedoch kann sie nur zur Bestimmung von Substanzen in oberflächennahen Hirnregionen, z.B. Kortex, eingesetzt werden.

Die *in vivo*-Voltammetrie (Kissinger *et al.*, 1973) erlaubt die Bestimmung oxidierbarer Substanzen im EZR, wie beispielsweise Katecholamine und Indolamine, nicht hingegen ACh.

Somit steht neben der *Push-Pull*-Technik derzeit einzig die Mikrodialysetechnik zur *in vivo*-Bestimmung von ACh zur Verfügung. Bito *et al.* (1966) beschrieben die Technik der Mikrodialyse erstmals, sie wurde seitdem stetig verbessert (Ungerstedt und Hallström, 1987) und findet derzeit in Kombination mit einer sich ebenfalls ständig verbessernden und inzwischen sehr sensitiven Analytik ein breites Anwendungsgebiet. Die Mikrodialysetechnik erlaubt die Bestimmung endogener Neurotransmitter und deren Metabolite sowie von exogen applizierten Substanzen in verschiedenen Hirnregionen und auch in peripheren Organen.

Mit Hilfe der in der vorliegenden Arbeit verwendeten Methode der Mikrodialyse wurde die Wirkung von Hyperforin nach systemischer und lokaler Applikation auf die striatale und hippokampale ACh- und Ch-Freisetzung *in vivo* untersucht. Der Neurotransmittergehalt des Mikrodialysates reflektiert die ACh-Ausschüttung der die Sonde umgebenden Synapsen, spiegelt also die Aktivität der cholinergen Neurone direkt wider.

#### **4.1.2 Aspekte der Mikrodialyse-Versuchsdurchführung**

In der vorliegenden Arbeit wurden die Mikrodialyseversuche an den zwei auf die Operation folgenden Tagen durchgeführt. Damit blieb den Versuchstieren eine 20stündige postoperative Erholungszeit, wodurch eventuelle Narkoseeffekte weitgehend ausgeschlossen werden konnten. Die Methode erlaubt die Verwendung desselben Tieres als Kontroll- und Versuchstier an den zwei konsekutiven Versuchstagen.

Die Implantation der Mikrodialysesonde schädigt das umliegende Gewebe und hat inflammatorische Reaktionen funktioneller und metabolischer Natur zur Folge sowie

Veränderungen des Blutflusses. Transmitterfreisetzung, Blutzirkulation und Sauerstoffversorgung normalisieren sich erst Stunden nach dem Eingriff wieder, die Blut-Hirn-Schranke wird infolge der Manipulation kurzzeitig permeabel. Westerink (1995) schlug demnach vor, die Experimente nicht früher als 24 Stunden nach der Sondenimplantation durchzuführen und nicht länger als 3 - 4 Tage; letzteres weil die Entzündung im umliegenden Gewebe mit der Zeit zunimmt und die basalen Neurotransmitter-Konzentrationen deutlich sinken. Dies ist darauf zurückzuführen, dass ca. 3 Tage nach Insertion das zunehmende Gliawachstum rund um die Sonde zur Ausbildung einer glialen Barriere führt und die Dialyse interessierender Substanzen aus dem EZR beeinträchtigt (Benveniste und Diemer, 1987).

Die Mikrodialyse-Experimente in der vorliegenden Arbeit wurden am Tag zwischen 9 und 19 Uhr durchgeführt, einem Zeitfenster, in dem die ACh-Freisetzung und die motorische Aktivität bei Ratten um ca. 40 % niedriger ist als nachts; denn beide Parameter sind einem zirkadianen Rhythmus unterworfen (Day *et al.*, 1991; Mizuno *et al.*, 1991 und 1994).

Ein komplizierender Faktor der Mikrodialyse ist die Notwendigkeit des Zusatzes von Acetylcholinesterase-Hemmern zur Perfusionsflüssigkeit zwecks Senkung der ACh-Hydrolyserate im Hirngewebe und damit die Konzentration des ACh im Dialysat über die analytische Nachweisgrenze „künstlich“ angehoben wird (Greaney *et al.*, 1993). Zum Einsatz kommen Neostigmin (Nilsson *et al.*, 1990; Taguchi *et al.*, 1993) und Physostigmin (Toide und Arima, 1989; Mizuno *et al.*, 1991 und 1994) in Konzentrationen von 10  $\mu\text{M}$  in den zitierten Studien. Beide sind reversible Acetylcholinesterase-Hemmer aus der Gruppe der Carbaminsäure-Derivate; anders als Physostigmin kann Neostigmin aufgrund seines quartären Stickstoffatoms die Blut-Hirn-Schranke nicht überwinden und wird daher langsamer eliminiert.

Die Mikrodialyseversuche der vorliegenden Arbeit wurden im Striatum und im Hippokampus der SD-Ratten und in Anwesenheit von lediglich 1  $\mu\text{M}$  Neostigmin vorgenommen, einer Konzentration bei der nur mit einer minimalen Hemmung der AChE zu rechnen ist. Die etablierte hochsensitive ACh-Analytik (siehe Methoden, Detektionslimit 5 - 10 fmol/5  $\mu\text{l}$ ) ermöglichte die Dialyse von ACh bei solch geringem Neostigmin-Zusatz. In den üblicherweise verwendeten Konzentrationen von  $\leq 30 \mu\text{M}$  ist es nicht notwendig, bei der HPLC-Analytik eine Vorsäule einzusetzen, um eine

---

Inhibition der im Enzymreaktor immobilisierten AChE zu verhindern (Greaney *et al.*, 1993).

Da Cholin (Ch) auch zu den Analyten gehörte, wurden bei den Mikro dialyse-Experimenten die Versuchsbedingungen Futterkarenz und Trinkwasser *ad libitum* gewählt. Cholin wird aus der Nahrung vor allem in Form von Lecithin (Phosphatidylcholin, 1.3 g/d) sowie in ungebundener Form (wenige mg/d) aufgenommen. Nach Resorption liegt Ch im Plasma zu 99 % als Phosphatidylcholin an Lipoproteine und Albumin gebunden vor; frei verfügbar sind ca. 1 %. (Klein *et al.*, 1992). Ch als geladenes Molekül kann nicht durch Diffusion ins Gehirn gelangen, sondern es wird über einen spezifischen Ch-Carrier in das Gehirn geschleust (Conford *et al.*, 1978). Da zwischen CSF und EZR keine Diffusionsbarrieren bestehen (Betz *et al.*, 1989), kann postprandial ansteigendes Ch im EZR im Versuch dialysiert werden.

Am Versuchstag wurde vor Beginn des Experimentes zunächst 30 - 60 Minuten lang mit aCSF perfundiert, damit sollten sich in Sondennähe konstante Diffusionsbedingungen einstellen und somit stabile Basalwerte der ACh-Freisetzung erhalten werden.

### **Wiederfindungsrate**

Die Perfusionsgeschwindigkeit und die Sammelzeit bestimmen das Probenvolumen und die darin enthaltene Konzentration der interessierenden Substanz und werden durch die Nachweisgrenze des analytischen Systems vorgegeben.

Niedrigere Perfusionsraten erhöhen die Wiederfindung eines Stoffes, höhere ermöglichen hingegen aufgrund der größeren Probenvolumina eine bessere Zeitauflösung bis hin zu 1minütigen Sammelintervallen. Flußraten > 10 µl/min üben Druck auf die Dialysemembran aus und können diese und umliegendes Gewebe schädigen (Benveniste und Hüttemeier, 1990). Die ACh-Konzentrationen im synaptischen Spalt werden durch steten hydrolytischen Abbau durch die AChE niedrig gehalten (im zwei- und dreistelligen fmol-Bereich).

Daher musste in dieser Arbeit zwecks ACh-Quantifizierung (limitierender Faktor) die Perfusionsgeschwindigkeit auf 2 µl/min verringert und das Sammelintervall auf 15 Minuten ausgedehnt werden, um die ACh-Konzentration im Dialysat (30 µl) über die Nachweisgrenze des HPLC-Systems zu heben. Zusätzlich wurde die AChE durch einen geringen Neostigmin-Zusatz (1 µM) partiell inhibiert (s.o.).

Die Wiederfindungsrate (*recovery*) der zu bestimmenden Substanz gibt das Verhältnis dieser Substanz im Dialysat und in der die Sonde umgebenden Lösung an (Benveniste und Hüttemeier, 1990). Üblicherweise wird sie *in vitro* in einer wässrigen Lösung bestimmt (siehe Methoden). Mit diesem Wert wird die im Dialysat gemessene Konzentration in die tatsächliche Konzentration in der entsprechenden Hirnregion umgerechnet (siehe Tabelle 4.1, die um den Wert für die *in vitro-recovery* korrigierten Basal-Effluxes von ACh und Ch). Diese Methode wird den cerebralen Verhältnissen nicht ganz gerecht, da die Diffusionskoeffizienten für bestimmte Substanzen in komplexen Medien, wie dem Hirngewebe mit interstitiellem, intrazellulärem und vaskulärem Kompartiment, niedriger sind als in wässriger Lösung. Daher sind die *in vivo*-Wiederfindungsraten i.d.R. niedriger als die *in vitro*-Wiederfindungsraten. Die nach der *in vitro*-Berechnungsmethode, welche nur Dialysatkonzentration und die *in vitro-recovery* berücksichtigt, ermittelten Konzentrationen sind demnach aller Wahrscheinlichkeit nach zu niedrig. Voraussetzung für eine bessere Annäherung an tatsächliche Hirnkonzentrationen wäre die Kenntnis der Diffusionseigenschaften der zu bestimmenden Substanz im Hirngewebe (Benveniste und Hüttemeier, 1990).

### Basalwerte

Die durchschnittlichen basalen und mit der jeweiligen *in vitro-recovery* noch nicht korrigierten hippokampalen bzw. striatalen ACh-Effluxes aus Experimenten dieser Arbeit betragen rund 30 fmol/5  $\mu$ l bzw. 196 fmol/5  $\mu$ l (jeweils n = 32, siehe Abbildung 3.16 und Tabelle 4.1). Damit lag der Basalefflux im Striatum ca. 6 x höher als im Hippokampus. Die vom basalen Vorderhirn in den Hippokampus mündenden cholinergen Projektionsfasern halten also einen wesentlich geringeren ACh-Tonus aufrecht als das dichte Netzwerk cholinergischer Interneurone des Striatums (siehe 1.2.4.1).

Die jeweiligen Ch-Effluxes liegen in derselben Größenordnung von 3 pmol/5  $\mu$ l und um ein Vielfaches höher, nämlich 75 x bzw. 15 x höher als die entsprechenden hippokampalen und striatalen ACh-Werte (siehe Tabelle 4.1).

Die mit der *in vitro*-Wiederfindungsrate (30.5 % für ACh) korrigierten ACh-Werte betragen für den Hippokampus etwa 93 fmol/ 5  $\mu$ l und für das Striatum 643 fmol/ 5  $\mu$ l (siehe Tabelle 4.1). Die hippokampalen und striatalen basalen ACh- und Ch-Effluxes mit und ohne Korrektur des Wertes um die jeweilige *in vitro*-Wiederfindungsrate sind in der folgenden Tabelle 4.1 angeführt.

Neostigmin-Zusatz 1 $\mu\text{M}$	ACh		Ch	
	Hippokampus	Striatum	Hippokampus	Striatum
Gehalt der Proben (HPLC-Injektions- volumen 5 $\mu\text{l}$ )	28.5 $\pm$ 26.9 fmol/5 $\mu\text{l}$	196 $\pm$ 80.1 fmol/5 $\mu\text{l}$	2744 $\pm$ 941.4 fmol/5 $\mu\text{l}$	2932 $\pm$ 1228 fmol/5 $\mu\text{l}$
<i>In vitro-recovery</i>	30.5 %		33 %	
Basalwerte nach Korrektur mit der <i>in vitro-recovery</i>	93.4 $\pm$ 88.1 fmol/5 $\mu\text{l}$	642.6 $\pm$ 262 fmol/5 $\mu\text{l}$	8.3 $\pm$ 2.8 pmol/5 $\mu\text{l}$	8.9 $\pm$ 3.7 pmol/5 $\mu\text{l}$
	560.4 $\pm$ 528 fmol/15 min	3855.6 $\pm$ 1572 fmol/15 min	49.8 $\pm$ 17 pmol/15 min	52.8 $\pm$ 22.2 pmol/15 min

**Tabelle 4.1: Hippokampale und striatale ACh- und Ch-Basalwerte**

Als «Gehalt der Proben» wurde die tatsächlich in den Proben befindliche Menge an ACh und Ch bezeichnet. Von dem gesammelten Dialysat von 30  $\mu\text{l}$  (bei einer Flußrate von 2  $\mu\text{l}/\text{min}$  und einer Sammelzeit von 15 Minuten) wurden nur exakt 5  $\mu\text{l}$  der HPLC-Analytik unterworfen. Deswegen sind die Mengenangaben auf dieses Volumen bezogen. Nach Korrektur der Werte (Mittelwerte  $\pm$  SEM) um die *in vitro*-Wiederfindungsrate kann eine Umrechnung auf 30  $\mu\text{l}$  entsprechend der Zeitauflösung von 15 Minuten erfolgen. Die Werte in « $\text{xmol}/15 \text{ min}$ » lassen sich mit Daten aus früheren Publikationen direkter vergleichen: Die durchschnittliche basale hippokampale ACh-Freisetzung in der Ratte betrug bei Henn *et al.* (1998) (bei einem Zusatz von 10  $\mu\text{M}$  Neostigmin und nach Korrektur um die *in vitro-recovery*) 6.6  $\pm$  0.8 pmol/15 min. Vergleichbare Basalwerte wurden auch in anderen Studien ermittelt (Toide *et al.*, 1989; Mizuno *et al.*, 1991 und 1994). Diese Werte sind um den Faktor 10 größer als der im Rahmen dieser Arbeit mit 1  $\mu\text{M}$  Neostigmin bestimmte Wert von ca. 0.6 pmol/15 min (ACh-Hippokampus).

### Herkunft des ACh

Das im hippokampalen Mikrodialysat gemessene ACh stammt aus den cholinergen Nerven terminalen der vom Septum in den Hippokampus projizierenden Neurone. Das Vorhandensein cholinergischer hippokampaler Interneurone, die ebenfalls ACh freisetzen könnten, wurde von Butcher *et al.* (1992) in immunhistochemischen Studien und von Waite *et al.* (1995) in Läsionsexperimenten, in denen eine Läsion des Septums in einer nahezu vollständigen Reduktion cholinergischer Parameter in den Projektionsgebieten wie dem Hippokampus resultierte, weitgehend widerlegt. Die neuronale Herkunft des dialysierten ACh wird dadurch belegt, dass bei Tetrodotoxin-Gabe das ACh im Mikrodialysat nahezu nicht mehr nachweisbar ist; denn als  $\text{Na}^+$ -Kanal-Blocker hemmt Tetrodotoxin die aktionspotentialabhängige Neurotransmitterfreisetzung. Die gemessene ACh-Konzentration ist im wesentlichen das Resultat aus der neuronalen Freisetzung, welche durch die Feuerungsrate der septohippokampalen Neurone und die Menge des pro Aktionspotentials freigesetzten ACh bestimmt wird, und der Abdiffusion sowie dem Abbau durch enzymatische Hydrolyse (Westerink, 1995; Moor *et al.*, 1998).

---

Das im striatalen Mikrodialysat quantifizierte ACh stammt aus 50 x 20 µm großen cholinergen Interneuronen, die etwa 3 % der striatalen Neuronenpopulation darstellen; damit besitzt das *Corpus Striatum* die dichteste cholinerge Innervation des Gehirns (siehe 1.2.4.1). Demnach werden in diesem Hirnareal die höheren ACh-Mengen im Dialysat erfasst (vgl. Tabelle 4.1).

### 4.1.3 Methodische Aspekte der HPLC-Analytik

Die HPLC-Methode zur Quantifizierung von ACh und Ch im Mikrodialysat wird durch den Einsatz von immobilisierten Enzymen im Enzymreaktor (Acetylcholinesterase und Cholinoxidase) hochspezifisch. Sie ist zugleich äußerst sensitiv durch Verwendung elektrochemischer Detektion (ECD; siehe Methoden). Mittels der enzymkatalysierten Reaktion wurden ACh und Ch zu H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> konvertiert und durch Anlegen eines entsprechend hohen Potentials von +500 mV das H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> oxidiert. ECD in Kombination mit HPLC ermöglicht eine Quantifizierung der Analyte aus geringsten Volumina biologischer Flüssigkeiten; in der vorliegenden Arbeit aus 5 µl Mikrodialysat. Enzymreaktoren, die Enzyme in immobilisierter Form enthalten, sind in der biomedizinischen Analytik bereits in den 80er Jahren zum Einsatz gekommen. Die Enzyme waren anfänglich nicht in feste Materialien eingebettet. Bei den neuen Reaktoren handelt es sich um Festphasenreaktoren, d.h., die Enzyme sind kovalent an die druckstabile Trägermatrix gebunden, was ihren Einsatz in der HPLC-Analytik bei hohen Drücken und Flußraten ermöglicht. Ein sogenannter „Biosensor“ dieses Typs wurde für die Bestimmung von ACh entwickelt (Stadler und Nesselhut, 1986) und inzwischen zu einem hochempfindlichen ACh-/Ch-Biosensor verbessert. Ein derartiger mit Acetylcholinesterase E.C. 3.1.1.7 und Cholinoxidase E.C. 1.1.3.17 beladener Biosensor wurde in der vorliegenden Arbeit verwendet.

## 4.2 *In vitro*-Experimente

### 4.2.1 Stabilität von Hyperforin in aCSF

Das Acylphloroglucinol Hyperforin gilt als ausgesprochen oxidationsempfindlich und als in bestimmten Lösungsmitteln instabil (Orth *et al.*, 1999b; vgl. Abschnitt 1.1.2, Abbildung 1.1). Mehrere Oxidationsprodukte von Hyperforin wurden nachgewiesen: U.a. monooxygeniertes Hyperforin, als Hauptoxidationsprodukt das Furohyperforin

---

(Orthoforin) und Furohyperforinhydroperoxid (Trifunovic *et al.*, 1998; Orth *et al.*, 1999b; Verrotta *et al.*, 2000; Fuzzati *et al.*, 2001). Ein Abbauprodukt oxidativer Abspaltung der Isopren-Seitenketten ist das 2-Methyl-3-buten-2-ol (Kumar *et al.*, 2000). Detaillierte Fragmentierungswege sind von Fuzzati *et al.* (2001) vorgeschlagen worden und zwar anhand von Untersuchungen mittels HPLC-ESI-MS und MS<sup>n</sup> (Elektrospray-Ionisation Massenspektrometrie). Die Autoren schrieben dem Hyperforin in protischen Lösungsmitteln eine bedeutend höhere Stabilität als in unpolaren Solvenzien wie n-Hexan zu.

Die Instabilität von Hyperforin wurde durch eigene Beobachtungen bestätigt (vgl. Abbildungen 3.1 und 3.2). Die Quantifizierung von Hyperforin in wässriger Lösung im Kontext der Stabilitätsuntersuchung und im aufbereiteten Plasma erfolgte nach einer im Rahmen dieser Arbeit etablierten HPLC-Methode mit elektrochemischer Detektion (siehe 2.3.2). Die Hyperforingehalte wurden nach einer isokratischen Methode untersucht. Das Detektionslimit lag bei 1 µg/ml (1.8 µM). Die Peakidentifizierung erfolgte durch Retentionszeitvergleich mit der Standardsubstanz Hyperforin-Reinsubstanz (98%ig, Schwabe), die in einem getrennten Lauf analysiert oder durch Zugabe einer definierten Menge in einem Doppellauf *gespiked* (Aufstockversuche) wurde. Die Peakquantifizierung erfolgte mit Hyperforin als externem Standard. Eine ähnliche HPLC-Methode - jedoch mit UV-Detektion (270 nm) - wurde auch von Chi und Franklin (1999) zur Bestimmung von Hyperforin im Blutplasma angewandt; hierbei betrug die Nachweisgrenze angeblich 0.1 µg/ml (0.17 µM).

Die Lagerstabilität von Hyperforin in aCSF wurde nach 24stündiger Lagerung bei Raumtemperatur und Tageslicht und nach 60 Tagen Lagerung im Kühlschrank bestimmt. Während der Gehalt in den bei Raumtemperatur gelagerten Proben eine Abbaukinetik mit einer Halbwertszeit von 6.5 Stunden aufwies, blieb der Gehalt in den kühl und dunkel gelagerten Proben mit einer Halbwertszeit von ca. 5 Tagen über lange Zeit stabil (siehe Abbildungen 3.1 und 3.2). Dies zeigt den stabilisierenden Effekt von Dunkelheit und Kälte. Auf der Basis dieser Stabilitätsdaten wurden die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Hyperforin-Lösungen für jedes Experiment frisch zubereitet.

Die Mikrodialyseversuche erstreckten sich über eine Dauer von 150 Minuten, in denen die Sonde mit Hyperforin in artifizieller Cerebrospinalflüssigkeit (aCSF) perfundiert wurde (siehe Abschnitt 3.3). Der Zeitverlauf der Hyperforindegredation bei

---

Raumtemperatur und Tageslichteinwirkung zeigt, dass nach 120 Minuten noch deutlich über 80 % residuales Hyperforin in der aCSF vorhanden war und somit seine Wirkung im Gehirn entfalten konnte (siehe Abbildung 3.2). Unter den Bedingungen, bei denen die Mikrodialyseversuche durchgeführt wurden, war in der Tat eine bedeutende Abnahme des Hyperforin-Gehaltes zu verzeichnen, jedoch erst nach Abschluss der jeweiligen *in vivo*-Experimente.

## 4.2.2 Inhibitorische Effekte von Hyperforin auf das zentrale cholinerge System: HACU-Hemmung

### 4.2.2.1 Befunde aus der Literatur

Die initialen Befunde zur Transmitter-Aufnahme-Hemmung durch den Johanniskrautextrakt Li-160 stammen von Rolli *et al.* (1995) und Müller *et al.* (1997). Die Autoren zeigten am Synaptosomen-Modell, dass der Extrakt die Aufnahme von Noradrenalin (NA), Serotonin (5-HT) und Dopamin (DA) mit halbmaximalen Konzentrationen von 2 µg/ml hemmt. Chatterjee *et al.* (1998b) und Müller *et al.* (1998) identifizierten im Agens Hyperforin das Transmitteraufnahme-hemmende Prinzip. Zusätzlich zur Hemmung der neuronalen Aufnahme der Transmitter NA, 5-HT und DA wurde eine Aufnahmehemmung der Aminosäureransmitter GABA und Glutamat durch Hyperforin gezeigt (Chatterjee *et al.*, 1998b).

Diese breite Hemmcharakteristik gilt als Hinweis auf einen neuartigen Wirkungsmechanismus des Hyperforins, der möglicherweise nicht mit spezifischen Bindungsstellen am Transportermolekül assoziiert ist, sondern vielmehr Mechanismen der Transporter-Aktivität im Allgemeinen involviert. Denn die klassischen Antidepressiva hemmen die neuronale Transmitteraufnahme entweder spezifisch in nur einem System (z.B. Citalopram) oder aber sie zeigen überschneidende Effekte an wenigen Transmittersystemen (z.B. Imipramin, Clomipramin, Desipramin; Müller *et al.*, 2000). Befunde aus Rezeptorbindungs-Studien wie die sehr schwache Inhibition der [<sup>3</sup>H]-Paroxetin-Bindung (Singer *et al.*, 1999) und der [<sup>3</sup>H]-Citalopram-Bindung (Gobbi *et al.*, 1999) sprechen für eine Hemmung der 5-HT-Aufnahme durch Hyperforin, die **nicht** auf einem direkten Hyperforin-Effekt auf den 5-HT-Transporter beruht.

Müller *et al.* (2001) formulierten die Hypothese, dass die unselektive Hemmung der Transmitter-Aufnahme auf einer bislang einzig für Hyperforin nachgewiesenen Erhöhung der intrazellulären  $\text{Na}^+$ -Konzentration beruht, also auf einer Verringerung des transmembranären  $\text{Na}^+$ -Gradienten. Dies sind aus Studien an humanen Thrombozyten und Maus-Synaptosomen hervorgehende Befunde (Singer *et al.*, 1999). Die folgende Tabelle 4.2 fasst die relevanten Befunde zusammen.

<p>Hemmung der Neurotransmitter-Aufnahme in striatalen <b>Synaptosomen der Ratte</b> durch</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• den hydroalkoholischen Extrakt LI 160 (5 % Hyperforin),</li> <li>• den an Hyperforin angereicherten <math>\text{CO}_2</math>-Extrakt (superkritische Extraktion mit <math>\text{CO}_2</math>, 38 %ig) und</li> <li>• durch Hyperforin Reinsubstanz.</li> </ul> <p>Die Transmitter-Aufnahmehemmung verschiedener Extrakte korrelierte mit dem Hyperforin-Gehalt in den Extrakten (Müller <i>et al.</i>, 1998; Chatterjee <i>et al.</i>, 1998; Wonnemann <i>et al.</i>, 2001).</p> <p>Die <math>\text{IC}_{50}</math>-Werte für die Hemmung der synaptosomalen Aufnahme von Neurotransmittern durch Hyperforin <i>in vitro</i> liegen im nanomolaren Bereich: 80-830 nM bzw. 40-400 ng/ml. Die Potenz der Inhibition der Wiederaufnahme der Transmitter durch Hyperforin ergibt die Anordnung: <math>\text{NA} \geq \text{DA} &gt; \text{GABA} \geq 5\text{-HT} \gg \text{L-Glutamat}</math> (Chatterjee <i>et al.</i>, 1998b, siehe Tab. 1.2; Müller <i>et al.</i>, 1998).</p>
<p>Hemmung der 5-HT-Aufnahme in kortikalen <b>Synaptosomen der Maus</b> durch Hyperforin (<math>\text{IC}_{50}</math>: 1.2 <math>\mu\text{M}</math>) ist nicht kompetitiv und erfolgt durch eine Erhöhung der intrazellulären Natriumionen-Konzentration (Singer <i>et al.</i>, 1999). Befunde von Gobbi <i>et al.</i> (1999) sprechen eher für einen reserpinähnlichen Freisetzungseffekt von 5-HT d.h. eine Speicherentleerung also einen transporterunabhängigen Mechanismus.</p>
<p>Hemmung der 5-HT-Aufnahme durch Hyperforin (<math>\text{IC}_{50}</math>: 0.9 <math>\mu\text{M}</math>) in <b>humanen Thrombozyten</b> (gelten als peripheres Modell für die neuronale 5-HT-Aufnahme) mit vergleichbaren <math>\text{IC}_{50}</math>-Werten wie in Maus-Synaptosomen und über eine Erhöhung des intrazellulären <math>\text{Na}^+</math> (Singer <i>et al.</i>, 1999)</p>
<p>Hemmung der 5-HT-Aufnahme durch Hypericum-Extrakt LI 160 in intakten <b>Astrozyten der Ratte</b> (nicht-kompetitiv; Neary und Bu, 1998)</p>

**Tabelle 4.2: Befunde über funktionelle Effekte auf relevante Neurotransmittersysteme**

Der  $\text{Na}^+$ -Gradient extrazellulär *versus* intrazellulär stellt die treibende Kraft für die Transportproteine der Monoamine NA, DA, 5-HT und der Aminosäuren GABA und Glutamat dar (Lester *et al.*, 1994). Die Autoren wiesen für alle fünf Neurotransmittersysteme die Abhängigkeit der Transmitteraufnahme von der  $\text{Na}^+$ -Gradient-Energiequelle nach.

Diese Befunde erklären, dass Hyperforin unselektiv sehr viele unterschiedliche neuronale Transportmechanismen hemmen kann. Der molekulare Mechanismus, über den Hyperforin zu einer Zunahme der intrazellulären  $\text{Na}^+$ -Konzentration führt, ist Gegenstand aktueller Forschung: Wonnemann *et al.* (2000) und Müller *et al.* (2001)

---

diskutieren eine Interaktion von Hyperforin mit epithelialen Amilorid-sensitiven  $\text{Na}^+$ -Kanälen und  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ -Austauschern (siehe Abschnitt 1.1.3.2).

Der  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ -Antiporter ist ein wichtiges System zur Regulation der intrazellulären  $\text{Na}^+$ -Konzentration, er wurde auf cerebralen Zellmembranen und Synaptosomen nachgewiesen und ist durch Amilorid spezifisch hemmbar (Sauvaigo *et al.*, 1984; Frelin *et al.*, 1988). Die Autoren Wonnemann *et al.* (2000) beobachteten, dass Amilorid-Analoga, die bekanntlich die  $\text{Na}^+$ -Leitfähigkeit beeinträchtigen, den GABA- und Glutamat-Uptake signifikant erhöhen, jedoch deren Aufnahmehemmung durch Hyperforin antagonisieren. Vermutlich ist die Aktivierung des  $\text{Na}^+$ -Protonen-Austauschs die Folge der in Synaptosomen beobachteten initialen intrazellulären pH-Senkung. Mutmaßlich resultiert hieraus die 15 Minuten nach Hyperforin-Einwirkung beobachtete intrazelluläre pH-Steigerung und Acidifizierung des Mediums (in humanen Thromozyten bzw. glatten Muskelzellen; Wonnemann *et al.*, 2000; Chatterjee *et al.*, 2001; Müller *et al.*, 2001).

Amilorid ist zusätzlich auch ein Antagonist an amiloridsensitiven epithelialen  $\text{Na}^+$ -Kanälen; eine Subklasse stellen die im Gehirn exprimierten BNC1 und BNC2 (*brain sodium channels*) dar. Die Inhibition durch Benzamil, ein Amilorid-Derivat, bewirkt eine Abschwächung des inhibierenden Effektes von Hyperforin auf die Glutamat-Aufnahme in Synaptosomen, ein Befund, wonach die aktivierende Wirkung auf amilorid-sensitive  $\text{Na}^+$ -Kanäle in den molekularen Mechanismus von Hyperforin einzuschließen ist (Garcia-Anoveros *et al.*, 1997; Wonnemann *et al.*, 2000).

#### 4.2.2.2 Befunde der vorliegenden Arbeit

Hyperforin zeichnet sich durch sein nicht-selektives Wirkprofil der Hemmung des  $\text{Na}^+$ -abhängigen Transports von Monoaminen und Aminosäuren in die präsynaptische Endigung aus (siehe Tabelle 1.2). Daher ist auch eine Hemmung der  $\text{Na}^+$ -abhängigen hochaffinen Cholinaufnahme, des **HACU** (*high affinity choline uptake*), denkbar und somit eine Modulation der cholinergen Neurotransmission. Diese Arbeitshypothese wurde durch die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen des HACU an synaptosomalen Präparationen des Rattenkortex' *in vitro* verifiziert.

---

Synaptosomen sind artifizielle präsynaptische vesikuläre Strukturen, die durch mechanische Abtrennung präsynaptischer Zellbereiche entstehen, deren Membranen sich spontan wieder schließen. Synaptosomen als *in vitro*-Modell abgelöster Synapsen besitzen die Kapazität der Transmitterfreisetzung und -speicherung präsynaptischer Endigungen, der Regulation synaptischer Funktion über präsynaptische Mechanismen und die Kapazität metabolischer Vorgänge. Sie vereinigen in sich die biochemischen, elektrophysiologischen und morphologischen Eigenschaften der Präsynapse (Whittaker, 1992).

Mit Hilfe der unter Abschnitt 2.2.1.2 beschriebenen Präparation wurden intakte Synaptosomen gewonnen, die spezifische Proteine der cholinergen Nervenendigung besitzen (HACU, AChE, ChAT). Dies gilt allerdings nur für den cholinergen Anteil der Synaptosomen (Okuda *et al.*, 2000).

Ziel der *in vitro*-Experimente war es, aufzuklären, ob Hyperforin die HACU-Aktivität in der Zellmembran der kortikalen Nervenendigungen verändert. Für diese Fragestellung sind kortikale Synaptosomen ein geeignetes Modell zur Untersuchung cholinergischer Mechanismen, denn der Kortex ist Zielgebiet cholinergischer Projektionen, die vom *Nucleus basalis* ausgehen (siehe Abbildung 1.5). Da den cholinergen Neuronen die Fähigkeit zur *de novo* Synthese von Cholin fehlt, sind sie funktionell von der Cholinaufnahme abhängig (Tucek, 1985). In Studien an cerebralen Synaptosomen konnten zwei Carrier-vermittelte Transport-Systeme für die Cholin-Aufnahme nachgewiesen werden (Yamamura und Snyder, 1973; Kuhar und Murrin, 1978):

- Der niedrigaffine Transporter **LACU** schleust Cholin  $\text{Na}^+$ -unabhängig in die Präsynapse, wurde sowohl in Neuronen als auch in Gliazellen nachgewiesen und wird durch Hemicholinium-3 (HC-3) mit einer Inhibitionskonstante  $K_I$  von ungefähr 50  $\mu\text{M}$  gehemmt.
- Das hochaffine Transportsystem für Ch, der **HACU**, ist auf cholinerge Neurone beschränkt und hier vor allen an den Nervenendigungen lokalisiert. Der biologische Sinn des HACU wird in der Sicherung der bevorzugten Versorgung der cholinergen Neurone mit Cholin als ACh-Vorstufe vermutet. Die zelluläre Aufnahme von Cholin gegen den Konzentrationsgradienten ist möglich, da der HACU energieabhängig arbeitet; er nutzt den durch die  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase aufrecht erhaltenen Natrium-Gradienten zum Cotransport mit

---

Ch. Der  $\text{Na}^+$ -Gradient und das Membranpotential unterhalten einen  $\text{Na}^+$ -gekoppelten Cholinflux. Die HC-3-Inhibition des HACU weist eine Hemmkonstante  $K_{\perp}$  von 0.02 - 1  $\mu\text{M}$  (Jope, 1979) bzw. 0.01 - 0.1  $\mu\text{M}$  (Okuda *et al.*, 2000) auf.

Die Bestimmung der HACU-Aktivität erfolgte nach der im Abschnitt 2.2.1.3 erläuterten Methode, anhand zweier den HACU kennzeichnenden Kriterien:  $\text{Na}^+$ -Abhängigkeit und HC-3-Sensitivität. Wesentlicher Bestandteil der Experimente ist die Inkubation mit [ $^3\text{H}$ ]-Cholin. Dieses wird über den HACU selektiv in die cholinergen Terminalen aufgenommen (Jope, 1979). In dieser und anderen *in vitro*-Studien zur Klärung der zugrundeliegenden pharmakologischen Wirkprinzipien von Hyperforin wurden Konzentrationen im hohen nanomolaren und niedrigen mikromolaren Bereich eingesetzt (Chatterjee *et al.* 1999b; Fisunov *et al.* 2000; Wonnemann *et al.* 2000); dementsprechend erfolgte die Hyperforin-Konzentrationswahl in den im Folgenden diskutierten *in vitro*-Experimenten.

Die im Abschnitt 3.2.2 präsentierten Ergebnisse aus Untersuchungen an synaptosomalen Präparationen des Rattenkortex' zeigen, dass Hyperforin in einer Konzentration von 10  $\mu\text{M}$  die Natrium-abhängige hochaffine Cholinaufnahme in die Synaptosomen effektiv hemmt. Dahingegen wird die Aktivität des Natrium-unabhängigen und niedrigaffinen LACU in Gegenwart von Hyperforin nicht beeinträchtigt (siehe Abbildung 3.4 und 3.5). Diese Daten sind kompatibel mit vorherigen bereits in den obigen Abschnitten erwähnten Befunden, wonach Hyperforin die zelluläre Aufnahme nicht-cholinerges Transmitter unselektiv inhibierte, und zwar durch Intervention mit der intrazellulären Natrium-Homöostase (Singer *et al.*, 1999; Wonnemann *et al.*, 2000).

**Cholin und sein hochaffines Aufnahme-System HACU müssen damit zu der Gruppe Natrium-abhängiger und durch Hyperforin modulierter Targets gerechnet werden.**

#### 4.2.2.3 Eigene Ergebnisse zur depolarisationsinduzierten Stimulation des HACU

Chatterjee und Bhatnagar (1990) und Yamada *et al.* (1991) berichteten, dass die Aktivierung des HACU ein Calcium-/Calmodulin-assoziiertes Prozess ist. Jüngste Daten weisen auf eine Interaktion von Hyperforin mit Calmodulin-abhängigen Mechanismen hin (Fisunov *et al.*, 2000; s.u.). Daher wurde in der vorliegenden Arbeit die Sensitivität der HACU-Aktivierung gegenüber der Inhibition Calcium-abhängiger Kinasen überprüft.

Die Aktivität des HACU kann durch Präinkubation der Synaptosomen in depolarisierendem Medium gesteigert werden; die Messung des HACU erfolgt in physiologischer Lösung (siehe 3.2.4). Die gebräuchlichste Methode ist die Kalium-Depolarisation mit einer 62mM Lösung (Murrin und Kuhar, 1976). Die durch Kalium evozierte Freisetzung ist eine relativ unspezifische Methode, da die Neurotransmitter-Freisetzung allgemein stimuliert wird.

Das Membran-Ruhepotential des Synaptosoms von ca. -70 mV ist im wesentlichen ein Kaliumdiffusionspotential (Tucek, 1984). Da die Membran  $K^+$ -permeabel ist, führt eine extrasynaptosomale Erhöhung der  $K^+$ -Konzentration zu einer Reduktion des Membranpotentials: Beispielsweise verringert eine ca. 60 mM  $K^+$ -Inkubationslösung das Potential auf ca. -25 mV und ruft somit eine Depolarisation hervor (Blaustein und Goldring, 1975). Die minutenlang anhaltende Aktivierung des HACU nach Depolarisation präsynaptischer Endigungen, also Erhöhung der neuronalen Aktivität (Impulskopplung) wird u.a. i.) durch eine Modulation der Aktivität existierender Carrier durch Phosphorylierung mittels der cAMP-abhängigen Proteinkinase A oder  $Ca^{2+}$ -Calmodulin-abhängiger Kinasen erklärt; ii.) denkbar wäre zudem der Mechanismus der Bereitstellung neuer Transportstellen (Chatterjee und Bhatnagar, 1990; Knipper *et al.*, 1992); iii.) als weiterer Mechanismus der Regulation des HACU wurde postuliert, dass cytoplasmatisches ACh in der Ruhephase den HACU blockiert; durch Aufnahme von ACh in die entleerten Vesikel käme es zu einer Disinhibition der Ch-Carrier (Jenden *et al.*, 1976); vi.) die HACU-Aktivierung könnte auch die Folge einer verringerten intrazellulären Ch-Konzentration als Konsequenz der verstärkten ACh-Resynthese sein (Tucek, 1993); v.) Tucek diskutiert auch die Möglichkeit der HACU-Stimulation aufgrund extrazellulär hoher Ch-Konzentrationen nach Hydrolyse des vermehrt ausgeschütteten ACh; vi.) des weiteren wird eine durch die post-

---

stimulatorische Aktivierung der  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase bedingte Hyperpolarisierung als treibende Kraft des HACU in Betracht gezogen (Tucek, 1993).

Im Versuchsansatz der Depolarisation wurden die Effekte eines Calcium-/Calmodulin-abhängigen Kinase-II-Hemmers «KN-62» und eines Protein-Kinase-C-Inhibitors «Ro 31-8220» jeweils in einer Konzentration von 1  $\mu\text{M}$  auf die stimulationsbedingte HACU-Erhöhung untersucht (vgl. 3.2.4.4).

Die  $\text{Ca}^{2+}$ -/Calmodulin-abhängige Kinase-II (CaMKII), ist eine  $\text{Ca}^{2+}$ -sensitive Multi-Substrat-Kinase, die in verschiedene neuronale Funktionen eingebunden ist. KN 62 ist ein zellpermeabler, selektiver und direkt mit der Calmodulin-Bindungsstelle des Enzyms interagierender Hemmstoff der CaMKII ( $\text{IC}_{50}$ : 0.9  $\mu\text{M}$ ).

Die Proteinkinase C (PKC) umfasst eine Gruppe von 11 Isoenzymen, die in die Signaltransduktion involviert sind und abhängig vom Zelltyp Einfluss auf die Proteinbiosynthese, das Zytoskelett oder auf die Kontrolle des Stoffwechsels nehmen. Aufgrund struktureller Unterschiede und regulatorischer Eigenschaften ergab sich die Klassifizierung in drei Gruppen: cPKC (*conventional*), nPKC (*novel, non-conventional*) und aPKC (*atypical*). Die Substanz Ro 31-8220 ist ein selektiver Inhibitor der cPKC-Isoformen (sog. *mixed PKC isoforms*;  $\alpha$ ,  $\beta\text{I}$ ,  $\beta\text{II}$ ,  $\gamma$ ), die durch u.a. durch Calcium aktiviert werden (Beltmann *et al.*, 1996; Alessi, 1997; Liu und Heckmann, 1998).

Wie in den Abschnitten 3.2.4.3 und 3.2.4.4 dargestellt, erwies sich sowohl die stimulierte HACU-Aktivität nach vorangestellter Depolarisation als auch die HACU-Aktivierung nach Depolarisation bei gleichzeitiger Wirkstoff-Inkubation als nicht sensitiv gegenüber der Inhibition der Calcium-/Calmodulin-abhängigen Kinase II oder der Protein-Kinase C (vgl. Abbildungen 3.9 und 3.10). Dahingegen inhibierte Hyperforin die nach präponierter KCl-Depolarisation stimulierte HACU-Aktivität **und** die depolarisations-induzierte HACU-Aktivierung nach Depolarisation bei simultaner Hyperforin-Einwirkung in ähnlichem Ausmaß wie den unstimulierten HACU in Synaptosomen (vgl. 3.2.4.1, 3.2.4.2, 3.2.2; Abbildungen 3.7, 3.8, 3.4 und 4.5).

Demzufolge involviert der molekulare Wirkungsmechanismus von Hyperforin anscheinend nicht die direkte Inhibition wichtiger Calcium-abhängiger Kinasen der synaptischen Endigungen. Hyperforin interferiert möglicherweise mit einem bislang unbekanntem Mechanismus der depolarisationsbedingten Stimulation des HACU. Es ist nicht auszuschließen, dass Hyperforin mit anderen wichtigen  $\text{Ca}^{2+}$ -/Calmodulin-

abhängigen Prozessen wie z.B. der Aktivierung von P-Typ-Calcium-Kanälen (Fisunov *et al.*, 2000; vgl.) interagiert und somit die depolarisations-induzierte HACU-Aktivierung beeinflusst. Denn von Fisunov *et al.* (2000) wurde berichtet, dass Hyperforin die Ionenleitfähigkeit in cerebellären Purkinje-Zellen über P-Typ-Ca-Kanäle moduliert (vergleiche 4.3.2.1). Die Autoren vermuten, dass Hyperforin ein intrazelluläres Signal generiert, welches auf P-Typ-Calcium-Kanäle übermittelt wird und zwar entweder *via* Interaktion mit dem  $\text{Ca}^{2+}_i$ -bindenden Protein Calmodulin (CaM) (Lee *et al.*, 1999) oder über CaM-aktivierte Signalwege. Die Aktivität der P-Typ-Calcium-Kanäle kann durch Feedback-Regulation über  $\text{Ca}^{2+}$ -/Calmodulin moduliert werden (Lee *et al.*, 1999). Die durch Hyperforin hervorgerufene Modulation der Spannungsabhängigkeit und der Aktivierungskinetik von P-Typ- $\text{Ca}^{2+}$ -Kanälen wird in Gegenwart des reversiblen CaM-Inhibitors Calmidazolium signifikant gehemmt. Calmidazolium hemmt die Aktivität einer Vielzahl CaM-abhängiger Enzyme u.a. die  $\text{Ca}^{2+}$ /CaM-abhängige Protein-Kinase II (CaMKII), deren mechanistische Beteiligung aufgrund durchgeführter Experimente mit dem spezifischen CaMKII-Hemmstoff KN 62 nicht gegeben zu sein scheint (siehe 3.2.4.4). Ungeklärt ist, ob weitere Calmidazolium-sensitive CaM-abhängige Kinasen in die Regulation der Aktivität von P-Typ- $\text{Ca}^{2+}$ -Kanälen durch Hyperforin involviert sind wie z.B. die  $\text{Ca}^{2+}$ /CaM-abhängige Protein-Phosphatase (Calcineurin), die Myosin-*light-chain*-Kinase, die Adenylat-Zyklase (Fisunov *et al.*, 2000).

Die mögliche Beziehung zwischen der von Fisunov beschriebenen Hyperforin-Wirkung und dem Effekt auf den transmembranären Natrium-Gradienten (Müller *et al.*, 2001) ist derzeit nicht bekannt.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde gezeigt, dass Hyperforin die hochaffine Cholinaufnahme (HACU) in Synaptosomen mit einer Hemmkonstante  $\text{IC}_{50}$  von  $8.5 \mu\text{M}$  hemmt (vgl. Abbildung 3.6). Jedoch ist bis heute nicht eindeutig geklärt, welche molekularen Mechanismen daran beteiligt sind. Der klare *in vitro*-Befund führte zu der Frage, welche Konsequenzen *in vivo* zu erwarten sind. Zur Verifizierung der HACU-Inhibition durch Hyperforin *in vivo* wurden die im Folgenden diskutierten Mikrodialyse-Experimente durchgeführt.

---

## 4.3 Duale Modulation striataler cholinergischer Parameter durch Hyperforin *in vivo*

Mit Hilfe der Mikrodialyse-Technik wurde geprüft, ob Hyperforin nach lokaler sowie systemischer Gabe die cholinerge Neurotransmission im Striatum beeinflusst. Dazu wurden Acetylcholin und Cholin im Perfusat quantifiziert.

### 4.3.1 Depressorische Wirkung auf das cholinerge System nach lokaler Gabe

Bei der Auswertung und der Interpretation der Ergebnisse über den Einfluss einer lokalen Perfusion von Hyperforin auf die striatale ACh-Freisetzung müssen Faktoren berücksichtigt werden, in denen sich die lokale Perfusion von anderen Applikationsarten unterscheidet: Hierzu gehört die Ausbildung einer uneinheitlichen lokalen Konzentration der Substanz in unmittelbarer Umgebung der Sonde im Gegensatz zu den nahezu einheitlichen Hyperforin-Konzentrationen im ZNS nach systemischer Verabreichung.

Die tatsächliche Konzentration von Hyperforin im sondennahen Gewebe hängt von folgenden Faktoren ab: i.) Von der Konzentration in der Perfusionsflüssigkeit, ii.) von der Perfusionsgeschwindigkeit, iii.) vom Abstand zur Sonde, iv.) vom Verteilungsvolumen der Substanz im Gewebe extra- und intrazellulär und v.) von der Elimination *per* Diffusion und dem vaskulärem Abtransport in das umliegende Gewebe. Die Hyperforin-Konzentration bei der lokalen Perfusion ist in unmittelbarer Umgebung der Sonde nicht einheitlich, sondern es bildet sich im Raum bis 2 mm um die Sonde ein nach allen Richtungen hin abfallender Konzentrationsgradient aus. Dies ist nach Benveniste (1989) und Benveniste und Hüttemeier (1990) auch der Bereich, aus dem Substanzen aus dem interstitiellen Raum in die Perfusionsflüssigkeit dialysiert werden wie in der vorliegenden Arbeit ACh und Ch.

Der Natrium-abhängige HACU ist funktionell mit der ACh-Synthese und der ACh-Freisetzung über das Massenwirkungsgesetz gekoppelt (Tucek, 1984). Die Korrelation der HACU-Aktivität mit der cholinergen Aktivität und die Tatsache, dass die Transportkonstante  $K_T$  des HACU mit 1-2  $\mu\text{M}$  im Konzentrationsbereich des

---

extrazellulären Cholins von 3-5  $\mu\text{M}$  im Gehirn liegt, führte zu der Hypothese, dass die hochaffine Cholinaufnahme der geschwindigkeitsbestimmende Schritt der ACh-Synthese sei (Tucek, 1985; Yamamura und Snyder, 1973; Kuhar und Murrin, 1978). Der HACU gilt als ein direktes Maß für die ACh-Freisetzung (Murrin *et al.*, 1977), denn die Aktivität des HACU ist nach Hemmung der cholinergen Transmission z.B. durch Oxotremorin, Barbiturate erniedrigt und nach Stimulation z.B. durch Atropin, Pentylentetrazol erhöht.

Erwartungsgemäß müsste eine HACU-Inhibition in einer verringerten ACh-Freisetzung und einer erhöhten extrazellulären Ch-Konzentration resultieren, da der Präkursor (Ch) für die Neusynthese des ACh nicht mehr wiederaufgenommen wird, sondern im EZR kumuliert und abdiffundiert. Die selektive Inhibition des HACU durch HC-3 führt tatsächlich zu einer Reduktion der extrazellulären ACh-Konzentrationen und resultiert in einer Erhöhung der Ch-Spiegel im EZR des Rattenstriatum *in vivo* (Ikarashi *et al.*, 1997a).

In der vorliegenden Arbeit wurde die basale ACh-Freisetzung im Striatum der Ratte bei lokaler Infusion von 100  $\mu\text{M}$  Hyperforin um ca. 50 % signifikant vermindert, obgleich zeitverzögert erst nach einem kurzen transienten Anstieg auf etwa 130 % des Basaleffluxes. Parallel zum ACh-Abfall stiegen die extrazellulären Ch-Level deutlich an (siehe Abbildung 3.11).

Es gelang also - wie im Falle der striatalen HC-3-Perfusion in der Mikrodialysestudie von Ikarashi *et al.* (1997a) - die ACh-Freisetzung durch Hyperforin zu reduzieren und die Ch-Spiegel zu erhöhen. Mit diesem Profil der striatalen ACh- und Ch-Konzentrations-Verläufe konnte die HACU-Hemmung durch Hyperforin erstmals *in vivo* belegt werden. Die reziproke Relation zwischen den extrazellulären ACh- und Ch-Konzentrationen nach pharmakologischer Manipulation des striatalen cholinergen Parameters HACU ist charakteristisch für das cholinerg dicht innervierte Striatum. Die Kumulation der Vorstufe Ch im synaptischen Spalt und die verminderte ACh-Freisetzung als Antwort auf eine unterbundene Cholin-Bereitstellung durch HACU-Inhibition können nur hier beobachtet werden. Diese enge Korrelation gibt Hinweise darauf, dass im Striatum die extrazellulären Ch-Konzentrationen in beträchtlichem Ausmaß durch die Aktivität der cholinergen Transmission bestimmt werden, die sich in der HACU-Aktivität widerspiegelt. In Hirnregionen mit spärlicher cholinerg

---

Innervation wird die Cholin-Homöostase durch andere metabolische Prozesse wie den Phosphatidylcholin-Metabolismus dominiert (Löffelholz *et al.*, 1993).

Der *in vivo*-Befund nach Infusion von 100  $\mu\text{M}$  Hyperforin ist ein direktes Korrelat zu den *in vitro*-Ergebnissen der HACU-Hemmung. Jedoch kann das Resultat nicht in quantitativem Bezug diskutiert werden, da keine exakte Angabe über die Konzentration an Hyperforin im EZR des Gehirns gemacht werden kann (es ist nicht bekannt, in welchem Maße Hyperforin die Dialysemembran passiert und wie es sich im Gewebe verteilt). Mittels Mikrodialyse ist keine Infusion *per se* möglich, sondern lediglich eine Perfusion des sondennahen Gewebes mit dem Anteil der in der aCSF gelösten Substanz, welcher die Dialysemembran passiert. Gemäß historischer Daten ist von einer extrazellulären Hyperforin-Konzentration von ca. 10 % der Infusions-Konzentration auszugehen. Diffundieren demnach 10 % des Hyperforins einer 100  $\mu\text{M}$  Perfusionslösung in das Hirngewebe, so werden im Durchschnitt 10  $\mu\text{M}$  in Sondennähe erreicht. Diese postulierte Konzentration läge nach unseren Messungen im für die HACU-Inhibition im Synaptosomen-Modell relevanten, einstelligen micromolaren Bereich ( $\text{IC}_{50}$  8.5  $\mu\text{M}$ , vgl. 3.2.3) und ist demnach kompatibel mit den inhibitorischen Effekten von Hyperforin auf die ACh-Freisetzung *in vivo*.

### **4.3.2 Stimulatorische Wirkung auf das striatale cholinerge System**

#### **4.3.2.1 Lokale Infusion niedriger Hyperforin-Konzentrationen**

In der vorliegenden Arbeit wurde nach striataler Hyperforin-Perfusion mit niedrigen Konzentrationen von 10 und 30  $\mu\text{M}$  im Gegensatz zur 100 $\mu\text{M}$ -Infusion eine konzentrationsabhängige Stimulation der ACh-Freisetzung beobachtet (vgl. 3.3.1 Abbildungen 3.12 und 3.13). Hyperforin führte zu einer signifikanten und sprunghaften Steigerung der ACh-Freisetzung im Striatum auf ca. 180 % bzw. 215 % des Basaleffluxes. Parallel dazu konnte eine Abnahme der extrazellulären Ch-Konzentrationen bis auf Werte um ca. 50 % beobachtet werden.

Dadurch wird abermals die inverse Beziehung zwischen den ACh- und Ch-Konzentrationen im EZR des Rattenstriatums (Ikarashi *et al.*, 1997a) bestätigt. Diese Autoren beobachteten nach Gabe von Atropin (3.5 mg/kg i.p.) eine sofortige Zunahme des extrazellulären ACh und eine um 20 Minuten retardierte Ch-Abnahme.

---

Diese Verzögerung ist darin begründet, dass die gesteigerte ACh-Freisetzungsrates der Veränderung des HACU vorangeht. Die verstärkte Aktivität cholinergischer Neurone nach Atropin lässt sich durch die Blockade präsynaptischer ( $M_2$ -)Muskarinrezeptoren erklären.

Ein ähnliches Profil des Konzentrationsverlaufs von ACh und Ch im EZR zeigt auch Hyperforin nach Infusion von 30  $\mu\text{M}$  (siehe Abbildung 3.12), nämlich einen rapiden ACh-Anstieg und eine retardierte Ch-Abnahme.

Die angeführten Ergebnisse sowie auch die initiale transiente Steigerung nach Infusion von 100  $\mu\text{M}$  Hyperforin (siehe 4.4.1 Abbildung 3.11) sind vermutlich die Folge eines facilitierenden Effektes des Wirkstoffes auf die ACh-Freisetzung (siehe 1.1.3.2). Dass der Anstieg der ACh-Freisetzung nach Infusion von 100  $\mu\text{M}$  Hyperforin transient war, könnte dadurch bedingt sein, dass eine gleichzeitig auftretende inhibitorische Wirkung auf den HACU diese Stimulation neutralisiert und überkompensiert. Dies erklärt den verzögerten Eintritt der Reduktion der ACh-Freisetzung, die erst eintrat, nachdem die inhibitorische Wirkung des hochkonzentrierten Hyperforins gegenüber den stimulatorischen Effekten des anflutenden Hyperforins überwog.

In den *in vivo*-Untersuchungen mit 10 und 30  $\mu\text{M}$  wurde demnach kein Korrelat zu der im *in vitro*-Versuch beobachteten Hemmung des HACU durch Hyperforin gefunden. Vermutlich wurden im perfundierten Gewebe lediglich Konzentrationen erreicht, die für eine zur Ausprägung kommenden HACU-Inhibition nicht ausreichten. Denn bis zu einer gewissen Konzentrationsstufe führt Hyperforin bei steigenden lokalen Konzentrationen zu einer graduellen Stimulation der ACh-Freisetzung, ab dieser jedoch verursacht es eine Reduktion der ACh-Ausschüttung (vgl. 4.3.1).

Die Freisetzung von ACh kann allgemein in zwei unterschiedliche Freisetzungstypen unterschieden werden: i.) „Ruhefreisetzung“ als Freisetzung bei geringer, basaler Nerventätigkeit und ii.) „stimulierte Freisetzung“ als Folge einer beschleunigten Feuerungsrate bzw. einer Depolarisation der Nervenzellmembran.

Die Hypothese zur Erklärung der stimulatorischen Wirkung von Hyperforin auf die ACh-Freisetzung stützt sich auf folgende *in vivo*- und *in vitro*-Befunde:

- In einer *in vivo*-Studie wurde mittels Push-Pull-Technik gezeigt, dass nach Hyperforin-Behandlung eine Zunahme der extrazellulären Konzentrationen von 5-HT, DA, NA, L-Glu im *Locus Coeruleus* der Ratte erfolgt (Kaehler *et al.*,

---

1999; Philippu, 2001). In Übereinstimmung damit ergab eine Mikrodialyse-Studie an Ratten, dass ein Hyperforin-reicher Extrakt die Konzentration von DA im EZR des Striatums und des *Nucleus accumbens* erhöht (Di Matteo *et al.*, 2000). Die angeführten Befunde wurden von den Autoren als *Reuptake*-Hemmung diskutiert. Es widerspricht aber dieser Interpretation, dass der Transmitter GABA - trotz ähnlicher Empfindlichkeit dieses Systems - im EZR nicht ansteigt (vgl. *in vitro*-Daten zur Aufnahme-Hemmung Tabelle 1.2).

Die Daten der vorliegenden Arbeit stützen dahingegen eine alternative Hypothese, nämlich die der Neurotransmitter-Freisetzung durch Hyperforin. Diese Hypothese stellt nicht etwa die Ergebnisse der Arbeiten von Kaehler *et al.* (1999) und Di Matteo *et al.* 2000, sondern deren Interpretation in Frage. Denn anhand der Transmittersysteme 5-HT, DA, NA, L-Glu ist *in vivo* keine Unterscheidung zwischen Aufnahme-Hemmung und einer reaktiven Freisetzung möglich, da beide Effekte in einer verstärkten serotonergen, dopaminergen, noradrenergen bzw. glutamatergen Transmission resultieren (siehe 1.2.3). Einzig in der vorliegenden Arbeit untersuchten cholinergen System ist die Unterscheidung zwischen Aufnahme-Hemmung und Freisetzung gegeben. Denn die HACU-Hemmung bewirkt eine verminderte cholinerge Transmission (siehe Abbildung 3.11), wohingegen ein Freisetzungseffekt die ACh-Ausüttung steigern würde (vgl. Abbildungen 3.12 und 3.13). Diese *in vivo*-Tierstudien und die vorliegende Mikrodialyse-Studie belegen, dass Hyperforin-Gaben eine unselektive reaktive Neurotransmitter-Freisetzung zur Folge haben, der Substanz demzufolge durchaus auch potentielle toxische Eigenschaften anhaften könnten.

- Die *in vitro*-Befunde von Gobbi *et al.* (1999) gehen mit der Theorie der Freisetzung konform: Die Autoren beobachteten nach Behandlung mit hydromethanolischem Hypericum-Extrakt (3-10 µg/ml) sowie Hyperforin (0.3-1 µg/l) eine Serotonin-(5-HT)-Freisetzung aus mit [<sup>3</sup>H]-5-HT-beladenen Synaptosomen des Rattenkortex', die nicht über den 5-HT-Transporter vermittelt war; sie diskutierten eine reserpinähnliche Wirkung in serotonergen Terminalen, d.h., eine Entleerung der 5-HT-Speichervesikel mit darauffolgendem Anstieg der zytosolischen 5-HT-Konzentrationen und einer indirekten Hemmung der 5-HT-Aufnahme in kortikale Synaptosomen.

---

Die von Gobbi *et al.* (1999) spekulierte Reserpin-Analogie wird durch aktuelle Befunde von Chatterjee *et al.* (2001) modifiziert: Hyperforin stimulierte nämlich *in vitro* die Freisetzung von Glutamat, GABA und Aspartat aus kortikalen Synaptosomen, wohingegen nach Inkubation mit Reserpin, einem Freisetzer vesikulärer Monoamine, eine solche Aminosäure-Freisetzung weder erwartet noch beobachtet wurde. In diesem *in vitro*-Modell erhöhte Hyperforin die synaptosomale  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration und verringerte initial den synaptosomalen pH, Wirkungen, welche der Eigenschaft der Transmitter-Freisetzung zugrunde liegen könnten (Chatterjee *et al.*, 2001; Koch *et al.*, 2001). Die Hemmung der Neurotransmitteraufnahme ist demnach weder der primäre noch der einzige Effekt von Hyperforin in isolierten präsynaptischen Terminalen.

Ein Einfluss von Hyperforin auf die vesikuläre 5-HT-Speicherung wurde von Uebelhack und Franke (2001) in humanen Thrombocyten bestätigt. Die Hypothese der Reuptake-Hemmung muss hiernach insoweit modifiziert werden, als sich der Angriffspunkt vom zellmembranständigen 5-HT-Transporter zur vesikulären Ebene hin verschiebt. Aus den 5-HT-Speichervesikeln freigesetztes und im Zytoplasma akkumuliertes 5-HT kann über den auswärtsgerichteten, in der Plasmamembran befindlichen 5-HT-Transporter hinausgeschleust werden. Somit gelangt 5-HT über einen nicht-vesikulären Efflux in den synaptischen Spalt. Die Transporterumkehr wird zusätzlich durch die Hyperforin-induzierte intrazelluläre  $\text{Na}^+$ -Zunahme unterstützt.

- Ein Einfluss von Hyperforin auf die Ionenleitfähigkeit neuronaler Gewebe wurde in Untersuchungen von Chatterjee *et al.* (1999b) und Krishtal *et al.* (2001) im Neuronenmodell cerebellärer Purkinje-Zellen und in isolierten hippocampalen Pyramiden-Zellen nachgewiesen: Hyperforin moduliert neuronale GABA-, AMPA- und NMDA- assoziierte Ströme, sowie spannungsgesteuerte  $\text{Ca}^{2+}$ -,  $\text{Na}^+$ -, und  $\text{K}^+$ -Ströme. Die Bedeutung dieser Befunde im Kontext der Freisetzung ist noch unklar.

Am interessantesten sind in diesem Zusammenhang Ergebnisse aus elektrophysiologischen Experimenten von Fisunov *et al.* (2000): Hyperforin moduliert in cerebellären Purkinje-Zellen die Eigenschaften spannungsabhängiger Calcium-Kanäle vom P-Typ. Hyperforin verringert den Grad der für den Einstrom von  $\text{Ca}^{2+}$  erforderlichen Depolarisation, ein Effekt, der potentiell facilitierend für die  $\text{Ca}^{2+}$ -getriggerte Neurotransmitterfreisetzung ist.

---

Neuronale hoch spannungs-abhängige Calcium-Kanäle vom P-Typ (*high-voltage-activated channels* „HVA“) sind essentielle Regulatoren der neuronalen Aktivität. Durch Kontrolle des Influxes von Calcium aus dem EZR in das Zytoplasma triggern sie die Neurotransmitter-Freisetzung, verändern die Aktionspotential-Feuerungsrates und induzieren die Genexpression von *c-fos* (Okuda *et al.*, 2000). Nach Depolarisation der Plasmamembran durch ein Aktionspotential öffnen sich die spannungsabhängigen Ca-Kanäle, die in dichter Lokalisation in den Nerven terminalen, den sogenannten „active zones“, vorkommen. Der Calciumeinstrom führt zu einem starken räumlich begrenzten Anstieg der intrazellulären  $Ca^{2+}$ -Konzentration, der die Fusion der Speichervesikel-Membran mit der Plasmamembran und somit die Transmitterabgabe auslöst.

Zusätzliche Untersuchungen sind erforderlich, um zu klären, ob eine Interaktion mit den synaptischen  $Na^+$ -Konzentrationen, dem pH-Wert oder mit der Calcium-Homöostase für die in der vorliegenden Arbeit beobachteten stimulatorischen Effekte von Hyperforin auf ACh-Freisetzung verantwortlich sind.

#### **4.3.2.2 Systemische Applikation von Hyperforin**

Voraussetzung für die Untersuchung zentraler Effekte von systemisch appliziertem Hyperforin ist seine Fähigkeit zur Passage der Blut-Hirn-Schranke. Bereits 1988 wies Ostrowski oral appliziertes  $^{14}C$ -markiertes Hyperforin im Gehirn von Mäusen nach. Die Ergebnisse nach systemischer Gabe von Hyperforin (siehe 4.3.2.2 und 4.4) bestätigen die Hirngängigkeit der Substanz, denn die Hyperforin-Wirkungen wurden durch Messungen im Gehirn festgestellt. Hyperforin ist ein apolarer Inhaltsstoff des Johanniskrautes mit einem n-Octanol-Wasser-Koeffizienten von ca. 72 (Ostrowski, 1988). Dieser Verteilungskoeffizient gilt als Maß für die Verteilung einer Substanz zwischen hydrophiler und lipophiler Phase und ermöglicht erste Voraussagen über das pharmakokinetische Verhalten einer Substanz z.B. Hirngängigkeit.

Nach systemischen Gaben werden allgemein geringere Wirkstoffkonzentrationen im Gehirn erzielt, als sie durch lokale Gaben über die Mikro dialysesonde im cerebralen Zielareal erreicht werden können. Die in dieser Arbeit verwendeten Hyperforin-Dosen wurden in Anlehnung an eine Push-Pull-Studie von Kaehler *et al.*, (1999) gewählt, aus der hervorgeht, dass Hyperforin die extrazellulären Konzentrationen von

Katecholaminen, Serotonin und Glutamat *in vivo* im *Locus Coeruleus* der Ratte nach Injektion von 10 mg/kg i.p. nachhaltig erhöht.

Nach intraperitonealer Applikation von 1 und 10 mg/kg Hyperforin stieg der striatale ACh-Efflux an, während der Cholin-Efflux abnahm (siehe Abbildungen 3.14 und 3.15). Die höhere Dosis zeigte eine stärkere Ausprägung des Effektes.

Die im Vordergrund stehende Wirkung nach systemischer intraperitonealer Applikation von Hyperforin war demnach die facilitierende Wirkung auf die ACh-Freisetzung, analog zu den Effekten nach lokaler Gabe niedriger Hyperforin-Konzentrationen (siehe 4.3.2.1). Eine Inhibition der Freisetzung konnte demnach nur nach lokaler Infusion hoher Hyperforin-Konzentrationen beobachtet werden (siehe 4.3.1).

Die Gleichheit der Ergebnisse im Striatum und im Hippokampus (siehe 3.3.2 und 3.4) nach Hyperforin-Behandlung impliziert, dass die Entfaltung eines primär freisetzenden Effektes am cholinergen Neuron den signifikanten ACh-Anstieg im EZR bedingt. Es ist jedoch auch vorstellbar, dass in diesem Befund ein indirekter Effekt zur Ausprägung kommt, vermittelt über eine Freisetzung oder Reuptake-Hemmung anderer Neurotransmitter. Dies sei im Folgenden eingehender erläutert:

Die ACh-vermittelte Neurotransmission besitzt eine entscheidende Rolle in der Kontrolle willkürlicher Bewegungen, die dem Striatum unterliegt; demgemäss finden sich in dieser Hirnregion höchste Level an ACh (Calabresi *et al.*, 2000). Ein intrinsisches neuronales Netzwerk - bestehend aus Interneuronen - repräsentiert die wichtigste ACh-Quelle im Striatum. Die cholinergen Interneurone sind vorwiegend von extrinsischen kortiko- und thalamofugalen glutamatergen Fasern innerviert. Daneben empfangen sie extrinsische dopaminerge und intrinsische glutamaterge synaptische Inputs und werden auch durch cholinerge Autoregulation moduliert (Ikarashi *et al.*, 1998).

Nach systemischer Gabe wird das Hyperforin sehr gleichmäßig im Gehirn der Ratte verteilt vorliegen. Da das Hyperforin laut *in vitro*-Daten (siehe 1.1.3.1) in niedrigen nanomolaren Konzentrationen die synaptische Aufnahme der Transmitter NA, DA, GABA, 5-HT und Glutamat hemmt, und das Striatum als Inputstation verschiedenster Projektionen fungiert (s.o.; Legende der Abb. 1.9), wären pharmakologische Mischeffekte nach systemischer Gabe denkbar, d.h., Wirkungen in verschiedenen Hirnregionen, die in das Striatum projizieren. Diese können sich aus zum Teil entgegengesetzten Einzeleffekten zusammensetzen und sich dabei aufsummieren

---

oder neutralisieren. Die vorliegenden *in vivo*-Daten (s.o.) lassen diesbezüglich keine näheren Schlussfolgerungen zu. Denn die durchgeführten *in vivo*-Versuche stellen eine qualitative, deskriptive Studie zur Untersuchung der Wirkung von systemisch appliziertem Hyperforin unter Anwendung der Endpunkte ACh und Ch dar. Auch bei lokaler Verabreichung kann es sich um einen Kombinationseffekt handeln; die lokale Applikation stellt lediglich ein im Vergleich zur systemischen Verabreichung weniger komplexes Modell dar.

Dass die im Striatum beobachtete ACh-Freisetzung durchaus auch als Resultat eines Mischeffekts angesehen werden kann, sei anhand zweier Beispiele erläutert:

- Exzitatorische kortikostriatale glutamaterge Fasern, die vermutlich Synapsen auf cholinergen Interneuronen bilden, evozieren über NMDA-vermittelte Mechanismen eine ACh-Freisetzung im Striatum (Anderson *et al.*, 1994). Diese glutamatergen Inputs gelten als wesentliche treibende Kraft striataler neuronaler Aktivität (Calabresi *et al.*, 2000). Hyperforin könnte die ACh-Freisetzung also indirekt über eine kortikale Glutamatfreisetzung beeinflussen. Eine Erhöhung der extrazellulären Glutamat-Konzentrationen *in vivo* nach systemischer Hyperforin-Behandlung wurde bislang jedoch nur im *Locus coeruleus* der Ratte beobachtet; die Autoren Kaehler *et al.* (1999) zeigten gleiches auch für 5-HT, DA und NA.
- Ein dualer dopaminergener Mechanismus der Modulation striataler ACh-Freisetzung wurde *in vivo* gezeigt, bestehend aus einer D<sub>2</sub>-Rezeptor-vermittelten Hemmung (Ikarashi *et al.*, 1997b) und einer D<sub>1</sub>-Rezeptor-vermittelten Stimulation der ACh-Freisetzung (DeBoer und Abercrombie, 1996). Mikrodialyse-Experimente weisen eine Prävalenz der D<sub>1</sub>-beteiligten Steigerung der ACh-Ausschüttung nach Gabe von indirekten DA-Agonisten nach (DeBoer und Abercrombie, 1996). Nach Gabe eines Hyperforin-reichen CO<sub>2</sub>-Extraktes konnte im Rahmen einer Mikrodialysestudie von Di Matteo *et al.* (2000) eine Erhöhung des extrazellulären DA im *Nucleus accumbens*, als Teil des ventralen Striatums (vgl. Abbildung 1.5), gezeigt werden; somit wäre durch Veränderung der dopaminergen Transmission bestimmter Hirnareale eine mittelbare Modulation der ACh-Freisetzung im Striatum denkbar.

---

**Zusammenfassend ist festzustellen, dass Hyperforin das striatale cholinerge System konzentrations- und applikationsabhängig beeinflusst: Nach systemischer Gabe und in niedrigen lokalen Konzentrationen bewirkt es eine Freisetzung des ACh, wohingegen hohe lokale Konzentrationen - aufgrund der *in vitro* belegten Ch-Aufnahme-Hemmung - eine Reduktion der ACh-Ausschüttung hervorrufen.**

#### **4.4 Stimulation des hippocampalen cholinergen Systems durch Hyperforin *in vivo***

In einer weiteren Versuchsreihe wurden die zentralen cholinergen Mechanismen im Hippokampus untersucht und zwar nach akuter systemischer Gabe von Hyperforin. Der Hippokampus spielt eine entscheidende Rolle bei Gedächtnisbildung, Lernprozessen und anderen kognitiven Leistungen (Arendt *et al.*, 1989; vgl. 1.2.4.2).

Der Hippokampus steht mit dem Hypothalamus, dem Septum und den Amygdala-Kernen in reziproker Verbindung und bezieht sensorische Information aus den assoziativen Gebieten über den entorhinalen Kortex. Des weiteren bezieht er Informationen aus dem Hirnstamm, nämlich noradrenerge Innervation aus dem *Locus coeruleus* und serotoninerge aus den *Nuclei Raphe* (vgl. 1.2.4.2 und Abbildung 1.2). Da Hyperforin mit verschiedenen synaptischen Mechanismen interferiert (siehe 1.1.3.1), können die Befunde im Hippokampus wie auch jene im Striatum auf einem pharmakologischen Mischeffekt beruhen. Die Komplexität der Einflussnahme des Hyperforins auf die striatale ACh-Freisetzung und die Hirngängigkeit der lipophilen Substanz Hyperforin wurde bereits im Abschnitt 4.3.2.2 diskutiert.

Die Wirkung von intraperitoneal appliziertem Hyperforin wurde nach Gabe von 1 mg und 10 mg/kg im Hippokampus untersucht. Bereits 30 bis 40 Minuten nach der Injektion konnte eine maximale ACh-Freisetzung von 150 bzw. 200 % relativ zum Basalwert beobachtet werden (vgl. Abbildungen 3.17 und 3.18). Diese Wirkung im Hippokampus entspricht im ACh- und Ch-Konzentrations-Verlauf dem Hyperforin-Effekt im Striatum nach systemischer Gabe. Die ACh-Freisetzung wurde in beiden Hirnarealen in gleichem Ausmaß gesteigert. Es koinzidieren weitgehend auch die Zeitpunkte der Maxima (vgl. 3.3.2 und 3.4), Hyperforin verteilt sich demnach schnell und gleichmäßig im Gehirn und entfaltet dort seine Wirkung.

Die lokalen Hyperforin-Gaben wurden bereits in dem Abschnitt 4.3 am Beispiel des Striatums diskutiert. Dieser Applikationsmodus wurde im Hippokampus nicht wiederholt, da die HACU-Hemmung mit hohen Hyperforin-Konzentrationen *in vivo* im Striatum exemplarisch gezeigt werden konnte. Die hippokampalen extrazellulären Ch-Konzentrationen werden weniger durch die Aktivität der cholinergen Transmission, sondern vielmehr durch andere metabolische Prozesse bestimmt (Ch-Einbau bzw. Ch-Freisetzung in/aus Ch-haltigen Phospholipiden). Die Experimente im Hippokampus beschränkten sich somit auf die systemische Hyperforin-Applikation, die der therapeutischen Gabe eher entspricht.

Die Hippokampus-Formation ist ein Teil des limbischen Systems und unterstützt für Wochen bis Monate das Erinnern an Fakten und Erfahrungen, bevor diese an anderen Orten des Kortex endgültig abgespeichert werden. Die im Rahmen dieser Arbeit beobachtete facilitierende und stimulatorische Wirkung von Hyperforin auf die ACh-Freisetzung im Hippokampus ist wichtig für das Verständnis der Resultate aus tierpharmakologischen Versuchen: Denn die beobachtete Verbesserung der Lernleistung kann in der Steigerung der ACh-Ausschüttung und der damit verbundenen verstärkten cholinergen Transmission begründet sein (vgl. 1.2.4.2). Tierexperimentelle Studien z.B. von Scali *et al.* 1997) und Bartolini *et al.* (1996) zeigen, dass cholinerge Agonisten die Lernleistung verbessern und cholinerge Antagonisten sie verschlechtern.

Der nach Applikation von Hyperforin beobachtete stimulatorische Effekt auf die hippokampale ACh-Freisetzung bietet eine mögliche Erklärung für das Phänomen der Verbesserung kognitiver Leistungen von Maus und Ratte im Lerntest *Passive Avoidance* (passives Vermeidungsverhalten; Klusa *et al.*, 2001). Die Autoren berichten von Lern-facilitierenden und Gedächtnis-konsolidierenden Effekten nach Extrakt- bzw.- Hyperforin-Behandlung und von einer signifikanten Abmilderung Scopolamin-induzierter Amnesie. Gleiches geht auch aus einem weiteren Tierverhaltens-Modell für Lernen und Gedächtnis hervor, in welchem Ratten nach dreitägiger Behandlung mit oral appliziertem hydroalkoholischem Hypericum-Extrakt dem Experiment der „aktiven Vermeidung“, *Active Avoidance*, unterzogen wurden. Diese Wirkung war vergleichbar mit der nach intraperitonealer Gabe von Piracetam, eines Nootropikums, in einer Dosis von 500 mg/kg, weswegen dem Hypericum-Extrakt potentielle nootropische Eigenschaften annotiert wurden (Kumar *et al.*, 2000).

---

## 4.5 Therapeutische Implikationen

### 4.5.1 Pharmakokinetische Überlegungen

Für die Bestimmung von Hyperforin in Körperflüssigkeiten, wurde im Rahmen dieser Arbeit eine neue HPLC-Methode etabliert, die sich in der Sensitivität mit früher beschriebenen Methoden vergleichbar erwies (Orth *et al.*, 1999a und 1999b, Chi und Franklin, 1999). Anders als in den zitierten Arbeiten wurde der Hyperforin-Gehalt des Plasmaisolates hier mit Hilfe elektrochemischer Detektion quantifiziert (siehe 2.3.2). Der Zeitverlauf der Hyperforin-Konzentration im Plasma der Ratte nach systemischer Gabe von Hyperforin ist in Abbildung 3.19 gezeigt. Nach intraperitonealer Applikation von 10 mg/kg Hyperforin wurden Blutspiegel von 3-5  $\mu\text{M}$  gemessen. Maximale Hyperforinspiegel traten bereits 60 Minuten nach der Hyperforin-Injektion auf. Die Plasmakonzentration betrug 2 Stunden nach Applikation noch 3  $\mu\text{M}$ . Die Hyperforin-Plasma-Spiegel nach systemischer Gabe einer niedrigeren Dosis von 1 mg /kg i.p. lagen unter der Nachweisgrenze, können jedoch aufgrund pharmakokinetischer Daten geschätzt werden (s.u.). Der Nachweis von Hyperforin in aus der *Cisterna magna* gewonnener CSF war nicht möglich, was vermutlich auf die hohe Lipophilie von Hyperforin zurückzuführen ist, welche in dem hohen Octanol-Wasser-Koeffizienten von 72 ausgedrückt ist (Ostrowski, 1988). Aufgrund dieser physiko-chemischen Eigenschaft wird Hyperforin aus dem interstitiellen, wässrigen Kompartiment CSF in zelluläre Räume sequestriert; denn lipophile Stoffe kumulieren präferentiell in membranreichen Kompartimenten, d.h., in zellulären Membranen des Gehirns (Hilgert *et al.*, 1999).

Im therapeutischen Kontext ist die Kenntnis pharmakokinetischer Parameter von grundlegender Bedeutung. Biber *et al.* (1999) zeigten in einer Humanstudie bei therapeutischer Dosierung eine lineare Pharmakokinetik von Hyperforin-haltigen Extrakten. Die Autoren ermittelten folgende pharmakokinetischen Daten für Hyperforin: Drei Stunden nach oraler Verabreichung eines wässrig-alkoholischen *Hypericum*-Extraktes, der 5 % Hyperforin enthielt, konnte in der Ratte ein mittlerer Hyperforin-Plasmaspiegel von ca. 700 nM (370 ng/ml) gemessen werden. Nach Einzel-Dosen von 300, 600 und 1200 mg des Extraktes (entsprechend 14.8, 29.6 und 59.2 mg Hyperforin) wurden beim Menschen nach 3-3.5 Stunden maximale Plasmaspiegel von 280 nM (153 ng/ml), 550 nM (302 ng/ml) und 850 nM (450 ng/ml) Hyperforin ermittelt. Die Plasmawerte nach Gabe höchster Dosen (1200 mg) weisen

---

auf eine Sättigung der Resorption hin; sie sind lediglich um den Faktor 3 statt 4 x höher als nach Verabreichung von 300 mg. Die Hyperforin-Halbwertszeit für Ratte und Mensch lag bei 6 bzw. 9-12 Stunden. Darüber hinaus zeigten Biber *et al.* (1998) dass nach siebentägiger Behandlung mit 900 mg/d eines 5%igen und eines 0.5%igen Extraktes im Plasma der Probanden maximale Hyperforin-Plasmaspiegel von ca. 450 nM (246 ng/ml) respektive 40 nM (21 ng/ml) Hyperforin erreicht wurden; es korrelieren die Applikationsdosen mit den entsprechenden Blutspiegel (Faktor 10).

Somit werden im Humanplasma Konzentrationen erreicht, die in dem Bereich liegen, in welchem *in vitro* Effekte auf die Neurotransmitter-Aufnahme, nicht jedoch auf die HACU-Aktivität festgestellt werden konnten (vgl. 4.2.2). Nach Biber *et al.* (1998) kann - bei dem derzeitigen Tagesdosisregime von 3 x 300 mg Hypericum-Extrakt - für den 5%igen Extrakt von einer im *steady-state*-Zustand effektiven Hyperforin-Plasmakonzentration von ca. 180 nM (97 ng/ml) ausgegangen werden.

In der Annahme einer linearen Kinetik von Hyperforin kann demnach nach Gabe von 1 mg/kg i.p. in der vorliegenden Arbeit von einer Plasma-Konzentration von 0.3 - 0.5 µM in der Ratte ausgegangen werden, die der therapeutischen Plasma-Konzentration von Hyperforin im Menschen entspricht (s.o.).

**Folglich würde der dominierende Effekt des Hyperforins bei therapeutischer Extrakt-Dosierung ein auf die striatale und hippokampale ACh-Freisetzung facilitierender sein. Die im Tiermodell beobachtete Hemmung der ACh-Freisetzung (siehe 4.3.1) durch Hyperforin dürfte - aufgrund der für eine HACU-Hemmung sehr hohen notwendigen Konzentrationen - keine humantherapeutische Relevanz besitzen.**

Welche Konsequenzen eine durch Hypericum-Extrakt-Behandlung induzierte Stimulation der ACh-Freisetzung im Striatum bzw. im Hippokampus - als die bei Morbus Parkinson bzw. Alzheimer funktionell betroffenen Hirnstrukturen - haben könnte, wird in den folgenden Abschnitten eingehender diskutiert.

## 4.5.2 Morbus Parkinson

Die Parkinson'sche Erkrankung zeichnet sich durch ein funktionelles Übergewicht cholinerg gegenüber dopaminergen Neuronen aus und ist ein hypokinetisch-hypertones Syndrom (siehe 1.2.4.1). Eine Steigerung der ACh-Freisetzung im Striatum könnte durch verstärkte Präponderanz von ACh gegenüber DA in Parkinsonismus resultieren.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde demnach überprüft, ob der beobachtete stimulatorische Effekt auf die ACh-Freisetzung motorische Konsequenzen hat. Daher wurde die spontane Motilität von Mäusen nach Dosen von 10 mg/kg i.p. und 1 mg/kg i.p. Hyperforin untersucht (siehe 3.7). Tatsächlich verursacht die hohe Hyperforin-Dosis eine signifikante Abnahme der spontanen lokomotorischen Aktivität; dahingegen erwies sich die niedrigere Dosis als diesbezüglich unwirksam. Des Weiteren konnten im Rahmen dieser Arbeit in einem Beobachtungs-Experiment nach Gabe von 10 mg/kg Hyperforin i.p. keine relevanten Zeichen cholinergischer Aktivierung in Ratten beobachtet werden (vgl. 3.8).

Demnach sind motorische Effekte in der Maus (vgl. 3.7) erst nach Hyperforin-Dosen beobachtet worden, die zu Plasma-Spiegeln führen, welche diejenigen weit über-treffen, die nach therapeutischer Dosierung des Extraktes beim Menschen erreicht werden. Die Relevanz der Motilitätsbeeinträchtigung nach Gabe von 10 mg/kg i.p. im Tierexperiment erscheint im Bereich der Humandosis fraglich, denn beim derzeitigen Dosisregime von 3 x 300 mg Extrakt / Tag werden Hyperforin-Humanplasmaspiegel erreicht, die denen nach 10fach niedrigerer Dosis in der Maus entsprechen. Dennoch könnte eine Überdosierung von Johanniskrautextrakten Effekte auf die Motilität haben und sollte insbesondere bei Patienten mit Störungen des motorischen Systems unter Vorbehalt angewendet werden. Diese Schlussfolgerung wird dadurch relativiert, dass Hyperforin allerdings nicht nur die Freisetzung von ACh im Gehirn erhöht, sondern auch jene von DA (Di Matteo *et al.*, 2000). Das der Parkinson'schen Erkrankung zugrundeliegende Ungleichgewicht von ACh und DA würde hierdurch nicht unbedingt verschärft werden; eingehendere Kommentare diesbezüglich wären zu spekulativ.

Warum insbesondere der Morbus Parkinson im Zusammenhang mit der Einnahme von Hypericum-Extrakt, der als antidepressives Phytopharmakon Anwendung findet, diskutiert wird, geht aus Folgendem hervor. Rund 40 % aller Morbus Parkinson-Patienten entwickeln zusätzlich eine Depression, wobei die depressiven Symptome

---

den neurologischen um Jahre vorseilen können. Es wird hierbei differenziert zwischen den Depressionen, welche direkt durch Einbußen der Gehirnaktivität, also organisch entstehen, und denjenigen, welche als Reaktion auf die motorischen Einbußen (Bradyphrenie) und die vegetativen Symptome durch das neurologische Leiden erfolgen. Aktuell spricht mehr für eine organische Depression im Rahmen des Parkinson, denn i.) die Depressivität tritt häufig bereits in der präsymptomatischen Phase auf und ist nicht mit der Schwere des Parkinson-Syndroms korreliert, ii.) bei rechtsseitigem Hemiparkinsonismus ist eine höhere Depressionsrate beschrieben worden, iii.) die Depression persistiert häufig trotz deutlicher Besserung des Parkinson-Syndroms unter entsprechender Medikation (Tom und Cummings, 1998).

#### 4.5.3 Senile Demenz vom Alzheimer-Typ (SDAT)

Die Alzheimer'sche Krankheit geht mit einer selektiven Degeneration cholinergischer Neurone im *Nucleus basalis*, dem Septum und der *Stria diagonalis Broca* einher und dadurch mit einer Verminderung der cholinergen Fasern im Hippokampus und im Kortex (Davies und Maloney, 1976). Die Folge ist eine zentrale cholinerge Hypofunktion in beiden Hirnarealen (vgl. 1.2.4.2).

Alzheimer und Depression koexistieren häufig. Bei depressiven Alzheimer-Kranken treten im Vergleich zu nichtdepressiven vermehrt degenerative Veränderungen im *Locus coeruleus*, im dorsalen *Raphe*-Kern und in der *Substantia nigra* auf. Je nach Statistik finden sich mit einer Prävalenz von 40 % depressive Symptome bei Alzheimer-Patienten, demnach werden zusätzliche antidepressive Behandlungen durchgeführt, u.a. mit Johanniskraut-Extrakt-Präparaten (Palsson *et al.*, 1999). Dies ist der klinische Hintergrund folgender Überlegungen:

In der vorliegenden Arbeit konnte in *in vivo*-Experimenten gezeigt werden, dass Hyperforin die hippokampale cholinerge Transmission stimuliert. Wenn sich die facilitierende Wirkung von Hyperforin auf die ACh-Freisetzung außer im Hippokampus auch im Kortex entfaltet, wären benigne Effekte bei Alzheimer denkbar. Die cholinerge Wirkung, die Stimulation der septohippokampalen Bahn, würde die günstigen Effekte von Hyperforin und Hypericum-Extrakt in Lern- und Gedächtnistests erklären, wie Gedächtnis-Verbesserung und -Konsolidierung und zudem Abmilderung Scopolamin-induzierter Amnesie im *passive* und *active avoidance*-Tierverhaltens-Modell (Kumar *et al.*, 2000; Klusa *et al.*, 2001).

Dies sind initiale tierexperimentelle Befunde, die dem Hyperforin antidementive Eigenschaften zuordnen und auf eine mögliche unterstützende Anwendung von Johanniskraut bei kognitiven, zentral cholinergen Dysfunktionen hinweisen. Denn die Verbesserung der cholinergen Transmission ist ein akzeptiertes therapeutisches Ziel bei dem Krankheitsbild des Morbus Alzheimer (vgl. 1.2.4.2).

#### **4.5.4 Zusammenfassende Betrachtung und Ausblick**

Die im Rahmen dieser Arbeit erhaltenen neurochemischen und verhaltenspharmakologischen Resultate zur Wirkung von Hyperforin deuten darauf hin, dass hohe Dosen von Johanniskraut-Extrakt ungünstige Effekte auf die motorische Aktivität haben könnten. Demzufolge sollten hohe Dosen des Extraktes insbesondere bei Patienten mit Erkrankungen des motorischen Systems (Morbus Parkinson) unter Vorbehalt eingesetzt werden. Dem gegenüber steht ein benigner Effekt von Hyperforin bei Morbus Alzheimer aufgrund der Verbesserung der cholinergen Transmission bei hier vorliegender cholinergischer Dysfunktion.

**Die vergleichende Analyse zeigt demnach, dass eine Johanniskraut-Extrakt-Medikation bei Morbus Parkinson eher mit Bedenken behaftet, bei Morbus Alzheimer hingegen günstig zu bewerten ist.**

Noch nicht endgültig Geklärtes lässt sich zusammenfassend festhalten: i.) Der präzise molekulare Mechanismus von Hyperforin bleibt trotz plausibler wirkmechanistischer Hinweise offen. ii.) Die Hyperforin-Konzentration am Wirkort, also im ZNS, im Menschen und in der Ratte sind noch unbekannt, im Gegensatz zu den bereits ermittelten Plasmaspiegeln. iii.) Die klinische Relevanz der im zentralen cholinergen System beobachteten Hyperforin-Wirkungen bleibt abzuwarten, denn die Mikrodialysestudie wurde in Ratten und darüber hinaus mit Reinsubstanz durchgeführt. Entsprechende klinische Studien mit Johanniskraut-Extrakt fehlen zur Zeit.

In jedem Falle sollte die in der vorliegenden Tierstudie erstmals beobachtete Interaktion von Hyperforin mit dem zentralen cholinergen System bei der Interpretation klinischer Beobachtungen im Rahmen der antidepressiven Behandlung mit Hypericum-Extrakt stärker berücksichtigt werden. Die vorliegende Arbeit versteht sich als tierexperimenteller Beitrag neuer Erkenntnisse zur Hyperforin-Wirkung auf cholinerge Parameter, womit das Wirkprofil des Hyperforins ein weiteres zentrales Transmittersystem erfasst.

## 5 Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit beschreibt die Wirkung von Hyperforin, einem Inhaltsstoff des Johanniskrauts, auf das zentrale cholinerge System im Striatum und im Hippokampus.

**Hochaffiner Cholin-Uptake (HACU):** Da der HACU  $\text{Na}^+$ -abhängig operiert und Hyperforin laut Literatur den transmembranären  $\text{Na}^+$ -Gradienten verringert, wurde an synaptosomalen Präparationen von Rattencortices *in vitro* geprüft, ob der HACU durch Hyperforin gehemmt wird. Es wurde gefunden, dass Hyperforin den HACU mit einer Hemmkonstante  $\text{IC}_{50}$  von  $8.5 \mu\text{M}$  inhibiert. Die synaptische Cholinaufnahme gehört damit zu der Gruppe  $\text{Na}^+$ -abhängiger, durch Hyperforin modulierter Targets.

**Modulation der Freisetzung von Acetylcholin (ACh):** Da die *de novo*-ACh-Synthese funktionell an die Aktivität des HACU gekoppelt ist, sollte die *in vitro* gezeigte Hemmung des HACU in einer verringerten Freisetzung von ACh resultieren. Diese Hypothese konnte *in vivo* unter Anwendung der Mikrodialyse-Technik verifiziert werden: Die lokale Infusion von  $100 \mu\text{M}$  Hyperforin in das Striatum resultierte in einer signifikanten Reduktion der ACh-Freisetzung, während die Ch-Spiegel im EZR anstiegen. Lokale Infusionen von  $10$  und  $30 \mu\text{M}$  Hyperforin in das Striatum führten hingegen zu einer konzentrationsabhängigen Stimulation der ACh-Freisetzung und zu einer simultanen Senkung der Ch-Spiegel. Auch bei systemischer Applikation von  $1$  und  $10 \text{ mg/kg}$  i.p. wurden eine erhöhte ACh-Freisetzung und eine parallele Reduktion der Ch-Spiegel gemessen; dies traf sowohl im Striatum als auch im Hippokampus zu.

**Pharmakologische Bedeutung:** Die Interaktion des Hyperforins mit zentralen cholinergen Mechanismen wurde in der vorliegenden Arbeit erstmals charakterisiert. Da das cholinerge System die Möglichkeit bietet, zwischen Aufnahme-Hemmung und Transmitter-Freisetzung zu unterscheiden, belegen die Ergebnisse eindeutig einen facilitierenden Effekt von Hyperforin auf die Transmitterfreisetzung *in vivo*. Die ermittelten Hyperforin-Plasmakonzentrationen in der Ratte ( $3\text{-}5 \mu\text{M}$  nach  $10 \text{ mg/kg}$  Hyperforin) bedeuten, dass beim derzeitigen Tagesdosisregime von  $3 \times 300 \text{ mg}$  Hypericum-Extrakt beim Menschen eine Freisetzung von ACh in zentralen cholinergen Neuronen zu erwarten ist. In Parkinson-Patienten (mit relativer cholinergischer Hyperfunktion im Striatum) wären unter dieser Therapie motilitäts-

verringerte Effekte denkbar, wie sie in der vorliegenden Arbeit im Tierexperiment beobachtet wurden. Bei Patienten mit Morbus Alzheimer (mit cholinergem Unterfunktion im Hippokampus) wäre hingegen die stimulatorische Wirkung auf die ACh-Freisetzung erwünscht. Die hier beobachtete facilitierende Wirkung von Hyperforin auf die hippocampale ACh-Freisetzung erklärt benigne Effekte von Hyperforin im Tierexperiment, in Verhaltensmodellen für Lernen und Gedächtnis. Die vergleichende Analyse der Mikrodialyse-Experimente ergab also, dass eine Medikation mit Johanniskraut als antidepressive Begleittherapie bei Morbus Parkinson eher ungünstig, bei Morbus Alzheimer jedoch günstig zu bewerten ist. Damit liefert die vorliegende Arbeit – über die neuen Erkenntnisse zu pharmakologischen Wirkmechanismen hinaus – konkrete therapeutische Empfehlungen, die nun in der klinischen Praxis zu verifizieren sind.

## 6 Abkürzungsverzeichnis

<b>ACh</b>	Acetylcholin
<b>AChE</b>	Acetylcholinesterase
<b>aCSF</b>	artifizielle <b>Cerebrospinalflüssigkeit</b>
<b>BHS</b>	Blut-Hirn-Schranke
<b>ChAT</b>	<b>Cholinacetyltransferase</b>
<b>CSF</b>	<b>Cerebrospinalflüssigkeit</b>
<b>CT</b>	Computertomographie
<b>DA</b>	Dopamin
<b>Da</b>	Dalton
<b>EZR</b>	Extrazellulärraum
<b>GABA</b>	$\gamma$ -Aminobuttersäure
<b>Glu</b>	Glutamat
<b>HEPES</b>	N-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-N`-2-ethansulfonsäure
<b>HACU</b>	Hochaffiner Cholintransporter (“ <b>high affinity choline uptake</b> ”)
<b>HPLC</b>	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
<b>5-HT</b>	5-Hydroxy-Tryptamin, Serotonin
<b>i.p.</b>	intraperitoneal(e Injektion)
<b>kDA</b>	Kilodalton
<b>KRP</b>	Krebs-Ringer-Puffer
<b>LACU</b>	Niedrigaffiner Cholintransporter (“ <b>low affinity choline uptake</b> ”)
<b>MRT</b>	Magnet-Resonanz-Tomographie
<b>NA</b>	Noradrenalin
<b>OP</b>	Operation
<b>P</b>	Pellet
<b>PET</b>	Positronen-Emissions-Tomographie
<b>Rez.</b>	Rezeptor
<b>SD</b>	Standardabweichung ( <b>standard deviation</b> )
<b>SEM</b>	mittlerer Fehler des Mittelwertes ( <b>standard error of mean</b> )
<b>SPECT</b>	<i>single photon emmissions computer tomography</i>
<b>SSRI</b>	selektive Serotonin- <i>Reuptake</i> Inhibitoren
<b>ZNS</b>	Zentralnervensystem

---

## 7 Abbildungsverzeichnis

<b>Abbildung 1.1</b>	Strukturformel von Hyperforin	<b>3</b>
<b>Abbildung 1.2</b>	Darstellung des zentralen cholinergen Systems in einem schematischen Sagittalschnitt	<b>10</b>
<b>Abbildung 1.3</b>	Schematische Darstellung der cholinergen Neurotransmission im ZNS; Kreislauf des Cholins	<b>12</b>
<b>Abbildung 1.4</b>	Freisetzung und Inaktivierung von Neurotransmittern am Beispiel von Acetylcholin, den Katecholaminen Noradrenalin und Dopamin (NA und DA), dem Indolamin Serotonin (5-HT) und den Aminosäuren GABA und Glutamat	<b>14</b>
<b>Abbildung 1.5</b>	Anatomische Gliederung der Stamm-/Basalganglien, Pathophysiologie	<b>16</b>
<b>Abbildung 2.1</b>	Schematischer Aufbau einer Mikrodialysesonde zur Implantation in das ventrale Striatum der Ratte	<b>26</b>
<b>Abbildung 2.2</b>	Operationstisch	<b>28</b>
<b>Abbildung 2.3</b>	Implantation der Sonde	<b>30</b>
<b>Abbildung 2.4</b>	Dorsale Ansicht eines Rattenschädels nach Paxinos und Watson (1986)	<b>31</b>
<b>Abbildung 2.5</b>	Lokalisation der Sonde im ventralen Striatum und im ventralen Hippokampus in einer Darstellung des Rattenhirns im Koronalschnitt	<b>31</b>
<b>Abbildung 2.6</b>	Versuchsaufbau eines Mikrodialyseexperimentes	<b>34</b>
<b>Abbildung 2.7</b>	Ausschnittsvergrößerung, SD-Ratten im Plastik Käfig während des laufenden Versuches	<b>34</b>
<b>Abbildung 2.8</b>	Schema der HPLC-Bestimmung von Acetylcholin und Cholin mittels elektrochemischer Detektion	<b>44</b>
<b>Abbildung 2.9</b>	Typische Chromatogramme von Hyperforin (Peak sternmarkiert)	<b>46</b>
<b>Abbildung 3.1</b>	Zeitverlauf der Hyperforindegredation bei lichtgeschützter Lagerung und 4 °C in aCSF	<b>51</b>
<b>Abbildung 3.2</b>	Abbaukinetik von Hyperforin bei Raumtemperatur und unter Lichteinwirkung	<b>52</b>
<b>Abbildung 3.3</b>	Prinzip der HACU-Bestimmung, Methodenvergleich	<b>54</b>
<b>Abbildung 3.4</b>	Hemmung des HACU, nicht aber des LACU durch Hyperforin 10 µM; Bestimmung der HACU-Aktivität anhand des Kriteriums der Na <sup>+</sup> -Abhängigkeit	<b>55</b>
<b>Abbildung 3.5</b>	Bestimmung des HACU in Gegenwart von Hemicholinium-3	<b>56</b>
<b>Abbildung 3.6</b>	Konzentrations-Wirkungs-Beziehung der HACU-Hemmung durch Hyperforin	<b>57</b>
<b>Abbildung 3.7</b>	Initiale Depolarisation und nachfolgende Inkubation mit Hyperforin	<b>59</b>
<b>Abbildung 3.8</b>	Simultane Depolarisation und Inkubation mit Hyperforin	<b>60</b>

---

<b>Abbildung 3.9</b>	Vorgeschaltete Depolarisation mit 62mM-Kalium-KRP und nachfolgende Behandlung mit Inhibitoren $\text{Ca}^{2+}$ -abhängiger Proteinkinasen	<b>61</b>
<b>Abbildung 3.10</b>	Zeitgleiche Inkubation mit 62mM-Kalium-KRP und mit Hemmstoffen $\text{Ca}^{2+}$ -abhängiger Proteinkinasen	<b>62</b>
<b>Abbildung 3.11</b>	Infusion von 100 $\mu\text{M}$ Hyperforin in das Striatum	<b>64</b>
<b>Abbildung 3.12</b>	Infusion von 30 $\mu\text{M}$ Hyperforin in das Striatum	<b>65</b>
<b>Abbildung 3.13</b>	Infusion von 10 $\mu\text{M}$ Hyperforin in das Striatum	<b>66</b>
<b>Abbildung 3.14</b>	Einfluss von systemisch appliziertem Hyperforin (1 mg/kg) auf die basale striatale ACh- und Ch-Freisetzung	<b>68</b>
<b>Abbildung 3.15</b>	Systemische Applikation von 10 mg/kg Hyperforin; Effekte auf die striatalen ACh- und Ch-Spiegel	<b>69</b>
<b>Abbildung 3.16</b>	Basale ACh- und Ch-Efflux im Hippokampus und im Striatum	<b>71</b>
<b>Abbildung 3.17</b>	Hippokampale ACh- und Ch-Spiegel nach systemischer Hyperforin-Applikation von 1 mg/kg i.p.	<b>72</b>
<b>Abbildung 3.18</b>	Extrazelluläre hippokampale ACh- und Ch-Konzentrationen nach i.p.-Applikation von 10 mg/kg Hyperforin	<b>73</b>
<b>Abbildung 3.19</b>	Plasmakonzentrations-Zeit-Verlauf von Hyperforin nach systemischer Applikation	<b>74</b>
<b>Abbildung 3.20</b>	Motorische Aktivität der Mäuse nach Applikation von Hyperforin (1 mg/kg und 10 mg/kg i.p.)	<b>76</b>

## 8 Tabellenverzeichnis

<b>Tabelle 1.1</b>	Inhaltsstoffe des Johanniskrauts (Stoffgruppen und Einzelsubstanzen)	<b>2</b>
<b>Tabelle 1.2</b>	IC <sub>50</sub> -Werte für die Hemmung der Neurotransmitter-Aufnahme durch reines Hyperforin in striatalen Ratten-Synaptosomen <i>in vitro</i> , (Chatterjee <i>et al.</i> , 1998b)	<b>4</b>
<b>Tabelle 1.3</b>	Inhaltsstoffe des Johanniskrauts und deren pharmakologische Effekte	<b>7</b>
<b>Tabelle 1.4</b>	Antiparkinson-Medikamente, Beispiele wichtiger Substanzen	<b>18</b>
<b>Tabelle 1.5</b>	Cholinerge Therapieansätze bei der Alzheimerschen Demenz	<b>22</b>
<b>Tabelle 4.1</b>	Hippokampale und striatale ACh- und Ch-Basalwerte	<b>83</b>
<b>Tabelle 4.2</b>	Befunde über funktionelle Effekte auf relevante Neurotransmittersysteme	<b>87</b>

## 9 Bibliographie

Aebischer P, Schluep M, Deglon N, Joseph JM, Hirt L, Heyd B, Goddard M, Hammang JP, Zurn AD, Kato AC, Regli F und Baetge EE (1996) Intrathekal delivery of CNTF using encapsulated genetically modified xenogeneic cells in amyotrophic lateral sclerosis patients. *Nature Medicine* 2, 696-699.

Alessi DR (1997) The protein kinase C inhibitors Ro 318220 und GF 109203X are equally potent inhibitors of MAPKAP kinase-1beta (Rsk-2) and p70 S6 kinase. *FEBS Lett.* 3, 121-123.

Allard M, Alafuzoff I, Carlsson A, Ericson E, Gottfries CG und Marcusson JO (1990) Loss of dopamine uptake sites labeled with [<sup>3</sup>H]-GBR-12935 in Alzheimer's disease. *Eur. Neurol.* 330, 181-185.

Amaral DG und Kurz J (1985) An analysis of the origins of the cholinergic and noncholinergic septal projections to the hippocampal formation of the rat. *J. Comp. Neurol.* 240, 37-59.

Anderson JJ, Kuo S und Chase TN (1994) Endogenous excitatory amino acids tonically stimulate striatal acetylcholine through NMDA but not AMPA receptors. *Neuroscience Lett.* 264-268.

Antonelli T, Beani L, Bianchi C, Pedata F und Pepeu G (1981) Changes in synaptosomal high affinity choline uptake following electrical stimulation of guinea-pig cortical slices: effect of atropine and physostigmine. *Br. J. Pharmacol.* 74, 525-531.

Arendt T, Allen Y, Marchbanks RM, Schugens MM, Sinden J, Lantos PL und Gray JA (1989) Cholinergic system and memory in the rat: Effects of chronic ethanol, embryonic basal forebrain brain transplants and exitotoxiclesions of cholinergic basal forebrain projection system. *Neuroscience* 33, 435-462.

Arnold SE, Hyman BT, Flory J, Damasio AR und Van Hoesen GM (1991) The topographical and neuroanatomical distribution of neurofibrillary tangles and neuritic plaques in the cerebral cortex of patients with Alzheimer's disease. *Cereb. Cortex* 1, 103-116.

Aschoff JC (1988) Alzheimer-Demenz. Wissensstand und Therapieansätze. *Med. Mo. Pharm.* 11, 361-368.

Auld DS, Satyabrata K und Quirion R (1998)  $\beta$ -amyloid peptides as direct cholinergic neuro-modulators: a missing link? *Trends Neurosci.* 21, 43-48.

Bartolini L, Casamenti F und Pepeu G (1996) Aniracetam restores object recognition impaired by age, scopolamine and nucleus basalis lesions. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 53, 277-283.

Bartus RT, Dean RL, Beer B und Lippa AS (1982) The cholinergic hypothesis of geriatric memory dysfunction. *Science* 217, 408-417.

Beltman J, McCormick F und Cook SJ (1996) The selective protein kinase C inhibitor, Ro-31-8220, inhibits mitogen-activated protein kinase phosphatase-1 (MKP-1) expression, induces c-Jun expression, and activates Jun N-terminal kinase. *J. Biol. Chem.* 25, 18-24.

Benveniste H und Diemer NH (1987) Cellular reactions to implantation of a microdialysis tube in the rat hippocampus. *Acta Neuropathol. Berl.* 74, 234-48

Benveniste H (1989) Brain microdialysis. *J. Neurochem.* 52, 1667-79.

Benveniste H und Hüttemeier PC (1990) Microdialysis - Theory and application. *Prog. Neurobiol.* 35, 195-215.

Betz AL, Goldstein GW und Katzmann R (1989) Blood-brain-cerebrospinal fluid barriers. *Basic Neurochemistry: Molecular, cellular and medical aspects*, pp. 591-606. Raven Press, New York.

- Bhattacharya SK, Chakrabarti A und Chatterjee SS (1998) Activity profiles of two hyperforincontaining hypericum extracts in behavioural models. *Pharmacopsychiatry* 31, Suppl. 1, 22-29.
- Biber A, Fischer H, Römer A und Chatterjee SS (1998) Oral bioavailability of hyperforin from hypericum extracts in rat and human volunteers. *Pharmacopsychiatry* 31, Suppl. 1, 36-43.
- Bigl V und Arendt T (1991) Cholinergic neurons of the central nervous system: morphofunctional aspects. *Acta Psychiatr. Scand.*, Suppl. 366, 7-13.
- Bito L, Davson H, Levin E, Murray M und Snider N (1966) The concentration of free amino acids and other electrolytes in cerebrospinal fluid, *in vivo* dialyse of brain and blood plasma of the dog. *J. Neurochem.* 13, 1057-1067.
- Blaustein M und Goldring J (1974) Membrane potentials in pinched-off presynaptic nerve terminals monitored with a fluorescent probe: evidence that synaptosomes have potassium diffusion potentials. *Journal of Physiology* 274, 589-615.
- Blusztajn JK und Wurtman RJ (1983) Choline and cholinergic neurons. *Science* 221, 614-620.
- Blusztajn JK, Liscovitch M und Richardson UI (1987) Synthesis of acetylcholine from choline derived from phosphatidylcholine in a human neuronal cell line. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 84, 5474-5477.
- Bork PM, Bacher S, Schmitz ML, Kaspers U und Heinrich M (1999) Hypericin as a non-antioxidant inhibitor of NF- $\kappa$ B. *Planta Med.* 65, 297-300.
- Bourne KZ, Bourne N, Reising SF, Reising L und Stanberry LR (1999) Plant products as topical microbicide candidates: assessment of *in vitro* and *in vivo* activity against herpes simplex virus type 2. *Antiviral Research* 42, 219-226.
- Brenner R, Azbel V, Madhusoodanan S und Pawlowska M (2000) Comparison of an extract of Hypericum (LI 160) and sertraline in the treatment of depression: a double blind, randomized pilot study. *Clin. Ther.* 22, 411-419.
- Browning ET und Schulmann MP (1968) [ $^{14}$ C]Acetylcholine synthesis from cortex slices of rat brain. *J. Neurochem.* 15, 1391-1405.
- Butcher LL und Woolf NJ (1986) Cholinergic systems in the central nervous system: retrospection, anatomic distribution and functions. *Dynamics of cholinergic functions* (Hrsg.: Hanin I) 1-10. Plenum Press New York und London.
- Butcher LL, Oh JD, Woolf NJ, Edwards RH und Roghani A (1992) Organization of central cholinergic neurons revealed by combined *in situ* hybridization histochemistry and choline-O-acetyltransferase immunohistochemistry. *Neurochem. Int.* 21, 429-445.
- Butterweck V, Tetereit F, Winterhoff H und Nahrstedt A (1998) Solubilized hypericin and pseudo-hypericin from *Hypericum perforatum* L. exert antidepressant activity in the forced swimming test. *Planta Med.* 64, 291-294.
- Butterweck V, Wall A, Liefländer-Wulf U, Winterhoff H und Nahrstedt A (1997) Effects of the total extract and fractions of *Hypericum perforatum* in animal assays for antidepressant activity. *Pharmacopsychiatry* 30, Suppl. 2, 117-124.
- Calabresi P, Centonze D, Gubellini P, Pisani A und Barnardi G (2000) Acetylcholine-mediated modulation of striatal function. *Trends Neurosci.* 23, 120-126.
- Chatterjee TK und Bhatnagar RK (1990)  $Ca^{2+}$ -dependent, ATP-induced conversion of the [ $^3$ H]hemicholinium-3 binding sites from high- to low-affinity states in rat striatum: effect of protein kinase inhibitors on this affinity conversion and synaptosomal choline transport. *J. Neurochem.* 54, 1500-1508.

- Chatterjee SS, Nöldner M, Koch E und Erdelmeier C (1998a) Antidepressant activity of *Hypericum perforatum* and hyperforin. *Pharmacopsychiatry* 31, Suppl. 1, 7-15.
- Chatterjee SS, Bhattacharya SK, Wonnemann M, Singer A und Müller WE (1998b) Hyperforin as possible antidepressant component of hypericum extracts. *Life Sciences* 63, 499-510.
- Chatterjee SS, Erdelmeier C und Klessing K (1999a) Stable hyperforin salts: method for producing them and their use in the treatment of Alzheimer's disease. *Int. Pat. PCT Wo 99/41220*.
- Chatterjee SS, Filippov V, Lishko P, Maximyuk O, Nöldner M und Krishtal O (1999b) Hyperforin attenuates various ionic conductance mechanisms in the isolated hippocampal neurons of rats. *Life Sciences* 65, 2395-2405.
- Chatterjee SS, Biber A und Weibezahn C (2001) Stimulation of glutamate, aspartate and gamma-aminobutyric acid release from synaptosomes by hyperforin. *Pharmacopsychiatry*. 34, Suppl. 1, 11-19.
- Chi JD und Franklin M (1999) Measurement of hyperforin a constituent of St. John's wort in plasma by high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. B*. 735, 285-288.
- Chou RC und Levy G (1981) Effect of heparin or salicylate infusion on serum protein binding and on concentrations of phenytoin in serum, brain and cerebrospinal fluid of rats. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 219, 42-48.
- Chui HC (1989) Dementia. A review emphasizing cholinopathogenic correlation and brain-behaviour relationships. *Arch. Neurol.* 23, 806-814.
- Collerton D (1986) Cholinergic function and intellectual decline in Alzheimer's disease. *Neuroscience* 19, 1-28.
- Conford EM, Braun LD und Oldendorf WH (1978) Carrier-mediated blood-brain barrier transport of choline and certain choline analogs. *J. Neurochem.* 30, 299-308.
- Cotman CW (1998) Apoptosis decision cascades and neuronal degeneration in Alzheimer's disease. *Neurobiol. Aging* 19, 1.Suppl., 29-32.
- Coyle JT, Price D und DeLong MR (1983) Alzheimer's disease: a disorder of cortical cholinergic innervation. *Science* 219, 1184-1190.
- Cross AJ, Crow TJ, Ferrier IN und Johnson JA (1986) The selectivity of the reduction of serotonin S<sub>2</sub>-receptors in Alzheimer-type dementia. *Neurobiol. Aging* 7, 3-7.
- Czygan F-C (1993) Kulturgeschichte und Mystik des Johanniskrautes. *Z. Phytother.* 14, 276-282.
- Damsma G und Fibiger HC (1991) The effects of anaesthesia and hypothermia on interstitial concentrations of acetylcholine and choline in rat striatum. *Life Sciences* 48, 2469-2474.
- Davies P und Maloney AJF (1976) Selective loss of central cholinergic neurons in Alzheimer's disease. *Lancet* 25, 1403.
- Day J, Damsma G und Fibiger HC (1991) Cholinergic activity in the rat hippocampus, cortex and striatum correlates with locomotor activity: A microdialysis study. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 38, 723-729.
- DeBoer P und Abercrombie ED (1996) Physiological release of striatal ACh in vivo: Modulation by D<sub>1</sub> and D<sub>2</sub> dopamine receptor subtypes. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 277, 775-783.
- DiCarlo G, Borrelli F, Ernst E und Izzo AA (2001) St. John's wort: Prozac from the plant kingdom. *Trends Pharmacol. Sci.* 22, 292-297.

- Di Matteo V, Di Giovanni G, Di Moscio M und Esposito E (2000) Effect of acute administration of *Hypericum perforatum*-CO<sub>2</sub> extract on dopamine and serotonin release in the rat central nervous system. *Pharmacopsychiatry* 33, 14-18.
- Dimpfel W, Schober F und Mannel M (1998) Effects of a methanolic extract and a hyperforin-enriched CO<sub>2</sub> extract of St. John's wort (*Hypericum perforatum*) on intracerebral field potentials in the freely moving rat (tele stereo-EEG). *Pharmacopsychiatry* 31, Suppl. 1, 30-35.
- Dowdall MJ und Simon EJ (1973) Comparative studies on synaptosomes: uptake of [N-Me-<sup>3</sup>H]-choline by synaptosomes from squid optic lobes. *J. Neurochem.* 21, 969-982.
- Erdelmeier CAJ (1998) Hyperforin, possibly the major non-nitrogenous secondary metabolite of *Hypericum perforatum* L. *Pharmacopsychiatry* 31, Suppl. 1, 2-6.
- Fisunov A, Lozovaya N, Tsintsadze T, Chatterjee S, Nöldner M und Krishtal O (2000) Hyperforin modulates gating of P-type Ca<sup>2+</sup> current in cerebellar Purkinje neurons. *Pflügers Arch. - Eur J. Physiol.* 440, 427-434.
- Franz G (2001) Pflanzliche Drogen in den aktuellen Arzneibüchern. *Dtsch. Apoth. Ztg.* 141, 792-802.
- Freeman JJ und Jenden DJ (1976) The source of choline for acetylcholine synthesis in the brain. *Life Sciences* 19, 949-962.
- Frelin C, Barbry P, Vigne P, Chassande O, Cragoe EJJ und Lazdunski M (1988) Amiloride and its analogues as tools to inhibit Na<sup>+</sup>- transport via the Na<sup>+</sup> channel, the Na<sup>+</sup> / H<sup>+</sup> antiport and the Na<sup>+</sup> / Ca<sup>2+</sup> exchanger. *Biochimie* 70, 1285-1290.
- Fuzzati N, Gabetta B, Strepponi I und Villa F (2001) High-performance liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry and multiple mass spectrometry studies of hyperforin degradation products. *J. Chromatogr. A.* 926, 187-198.
- Gage FH und Björklund A (1986) Compensatory collateral sprouting of aminergic systems in the hippocampal formation following partial deafferentation. *The Hippocampus*. Hrsg.: Isaacson RL und Pribram KH. Vol. 3, 33-63.
- Garcia-Anoveros J, Derfler B, Neville-Golden J, Hyman BF und Corey DP (1997) BNaC<sub>1</sub> and BNaC<sub>2</sub> constitute a new family of human neuronal sodium channels related to degenerins and epithelial sodium channels. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94, 1459-1464.
- Gardner EL, Chen J und Paredes W (1993) Overview of chemical sampling techniques. *J. Neurosci. Methods* 48, 173-197.
- Geigy (1980) *Wissenschaftliche Tabellen*, Vol.8, Teilband Statistik S.163, Basel.
- Gobbi M, Dalla Valle F, Ciapparelli C, Diomede L, Morazzoni P, Verotta L, Caccia S, Cervo L und Mennini T (1999) *Hypericum perforatum* L. extract does not inhibit 5-HT transporter in rat brain cortex. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 360, 262-269.
- Golde TE, Cai XD, Shoji M und Younkin SG (1993) Production of amyloid beta protein from normal amyloid beta-protein precursor (beta APP) and the mutated beta APP's linked to familial Alzheimer's disease. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 695, 103-108.
- Gray DE, Rottinghaus GE, Garrett HEG und Pallardy SG (2000) Simultaneous determination of the predominant Hyperforins in St. John's wort (*Hypericum perforatum* L.) by liquid chromatography. *Journal of AOAC International* 83, 944-949.
- Greaney MD, Marshall dl, Bailey BA und Acworth IN (1993) Improved method for the routine analysis of acetylcholine release *in vivo*: Quantitation in the presence and absence of esterase inhibitor. *J. Chromatogr.* 622, 125-135.

- Greene PL, Cassel J-C, Kelche C, Jeltsch H, Bratt AM und Will BE (1994) Differential behavioural effects of supracallosal and infracallosal lesions of the septohippocampal pathways: no ameliorative effects of oxotremorine or pilocarpine on radial maze performance. *Behav. Neural Biol.* 62, 4-14.
- Greeson JM, Sanford B und Monti DA (2001) St. John's wort (*Hypericum perforatum*): a review of the current pharmacological, toxicological, and clinical literature. *Psychopharmacol.* 153, 402-414.
- Gurevich AJ, Dobrynin VN, Kolosov MN, Popravko SA und Riabova ID (1971) Hyperforin, an antibiotic from *Hypericum perforatum* L. *Antibiotiki* 75, 510-513.
- Guyenet P, Lefresne P, Rossier J, Beaujouan JC und Glowinski J (1973) Inhibition by hemicholinium-3 of [<sup>14</sup>C]-acetylcholine synthesis and [<sup>3</sup>H]-choline high-affinity uptake in rat striatal synaptosomes. *Mol. Pharmacol.* 9, 630-639.
- Hardy J und Higgins GA (1992) Alzheimer's disease: the amyloid cascade hypothesis. *Science* 256, 184-185.
- Haubrich DR und Chippendale T (1977) Regulation of acetylcholine synthesis in nervous tissue. *Life Sciences* 20, 1465-1478.
- Henn C, Löffelholz K und Klein J (1998) Stimulatory and inhibitory effects of ethanol on hippocampal acetylcholine release. *Naunyn Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 357, 640-647.
- Hilgert M, Nöldner M, Chatterjee SS und Klein J (1999) KA-672 inhibits rat brain acetylcholinesterase *in vitro* but not *in vivo*. *Neuroscience Lett.* 263, 193-196.
- Hölzl J, Sattler S und Schütt H (1994) Johanniskraut: eine Alternative zu synthetischen Antidepressiva? *Pharm. Ztg.* 193, 3959-3977.
- Ikarashi Y, Takahashi A, Ishimaru H, Arai T und Maruyama Y (1997a) Relations between the extracellular concentrations of choline and acetylcholine in rat striatum. *J. Neurochem.* 69, 1246-1251.
- Ikarashi Y, Takahashi A, Ishimaru H, Arai T und Maruyama Y (1997b) Suppression of cholinergic activity via the dopamine D<sub>2</sub> receptor in the striatum. *Neurochem. Int.* 30, 191-197.
- Ikarashi Y, Takahashi A, Ishimaru H, Shiobara T und Maruyama Y (1998) The role of nitric oxide in striatal acetylcholine release induced by N-methyl-D-aspartate. *Neurochem. Int.* 33, 255-261.
- Irwin S (1966) Considerations for the pre-clinical evaluation of new psychiatric drugs: a case study with phenothiazine-like tranquilizers. *Psychopharm.* 9, 259-287.
- Irwin S (1968) Comprehensive observational assessment: A systematic, quantitative procedure for assessing the behavioural and physiologic state of the mouse. *Psychopharm.* 13, 222-257.
- Jenden DJ, Jope RS und Weiler MH (1976) Regulation of acetylcholine synthesis: does cytoplasmic acetylcholine control high affinity choline uptake? *Science* 194, 635-637.
- Jope RS (1979) High affinity choline transport and acetyl CoA production in brain and their roles in the regulation of acetylcholine synthesis. *Brain Res. Rev.* 1, 3143-344.
- Kaehler ST, Sinner C, Chatterjee SS und Philippu A (1999) Hyperforin enhances the extracellular concentrations of catecholamines, serotonin and glutamate in the rat locus coeruleus. *Neuroscience Lett.* 262, 199-202.
- Kaul R (2000) Johanniskraut-Mechanismen der antidepressiven Wirkung von Johanniskraut-Extrakt und seinen Inhaltsstoffen. *Dtsch. Apoth. Ztg.* 140, 687-701.
- Kenakin Terry (1993) *Pharmacologic Analysis of Drug-receptor Interaction*, 2. Auflage. S. 181-184, New York.

- Kissinger PT, Hart JB und Adams RN (1973) Voltammetry in brain tissue: A new physiological measurement. *Brain Res.* 55, 209-213.
- Kissinger PT und Shoup RE (1990) Optimization of LC apparatus for determinations in neurochemistry with an emphasis on microdialysis samples. *J. Neurosci. Methods* 34, 3-10.
- Klein J, Köppen A, Löffelholz K und Schmitthenner J (1992) Uptake and metabolism of choline by rat brain after acute choline administration. *J. Neurochem.* 58, 870-876.
- Klusa V, Germane S, Nöldner M und Chatterjee SS (2001) *Hypericum* extract and hyperforin: memory-enhancing properties in rodents. *Pharmacopsychiatry* 34, Suppl. 1, 61-69.
- Knipper M, Kahle C und Breer H (1991) Regulation of hemicholinium binding sites in isolated nerve terminals. *J. Neurobiol.* 23, 163-172.
- Koch E und Chatterjee SS (2001) Hyperforin stimulates intracellular calcium mobilisation and enhances extracellular acidification in DDT<sub>1</sub>-MF2 smoothmuscle cells. *Pharmacopsychiatry* 34, Suppl. 1, 70-74.
- Koelle GG und Friedenwald JS (1949) A histochemical method for localizing cholinesterase activity. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 70, 617-622.
- Köppen A, Klein J, Schmidt BH, van der Staay F-J und Löffelholz K (1996) Effects of nicotinamide on central cholinergic transmission and on spatial learning in rats. *Pharmacology Biochemistry and Behavior* Vol. 53, 783-790.
- Krishtal O, Lozovaya N, Fisunov A, Tsintsadze T, Pankratov Y, Kopanitsa M und Chatterjee SS (2001) Modulation of ion channels in rat neurons by the constituents of *Hypericum perforatum*. *Pharmacopsychiat.* 34, Suppl. 1, 74-83.
- Kruman JJ und Mattson MP (1999) Pivotal role of mitochondrial calcium uptake in neuronal cell apoptosis and necrosis. *J. Neurochem.* 72, 529-540.
- Kuhar MJ und Murrin LC (1978) Sodium-dependent, high affinity choline uptake. *J. Neurochem.* 30, 15-21.
- Kumar V, Singh PN, Muruganandam AV und Battacharya SK (2000) Effect of Indian *Hypericum perforatum* Linn on animal models of cognitive dysfunction. *J. Ethnopharmacol.* 72, 119-128.
- Kumar V, Singh PN, Muruganandam AV und Bhattacharya SK (2000) *Hypericum perforatum*: nature's mood stabilizer. *Indian J. Exp. Biol.* 38, 1077-1185.
- Kupsch A und Oertel W (1996) Operative Therapieverfahren beim idiopathischen Parkinson-Syndrom. *Psycho* 22, 37-47.
- Kurz A, Ruster P, Romero B und Zimmer R (1986) Cholinerge Behandlungsstrategien bei der Alzheimerschen Krankheit. *Nervenarzt* 57, 558-569.
- Kurz A und Lauter H (1987) Die Alzheimer'sche Krankheit. *Dtsch. Med. Wschr.* 112, 973-977.
- Laakmann G, Schule C, Baghai T und Kieser M (1998) St. John's wort in mild to moderate depression: the relevance of hyperforin for the clinical efficacy. *Pharmacopsychiatry* 31, Suppl. 1, 54-59.
- Lee A, Wong A, Gallagher D, Li B, Storm DR, Scheuer T und Catterall WA (1999) Ca<sup>2+</sup>/calmodulin binds to and modulates P/Q-type calcium channels. *Nature* 399, 155-159.
- Lefresne P, Guyenet P, Beaujouan JC und Glowinski J (1975) The subcellular localisation of ACh synthesis in rat striatal synaptosomes investigated with the use of Triton X-100. *J. Neurochem.* 25, 415-422.

- Leonard BE (1993) The comparative pharmacology of new antidepressants. *J. Clin. Psychiatry* 54, Suppl. 3, 3-15.
- Lester HA, Mager S, Quick MW und Corey JL (1994) Permeation properties of neurotransmitter transporters. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 34, 219-249.
- Lewis PR (1961) The effect of varying the conditions in the Koelle method. *Bibthca Anat.* Vol 2, Karger, Basel, 11-20.
- Limousin P, Pollak P, Benazzouz A, Hoffmann D, Broussolle E, Perret JE und Benabid AL (1995) Effect on parkinsonian signs and symptoms of bilateral subthalamic nucleus stimulation. *Lancet* 345, 91-95.
- Lin L, LeBlanc CJ, Deacon TW und Isacson O (1998) Chronic cognitive deficits and amyloid precursor protein elevation after selective immunotoxin lesions of the basal forebrain cholinergic system. *Neuroreport* 9, 547-552.
- Linde K, Ramirez G, Mulrow CD, Pauls A, Weidenhammer W und Melchart D (1996) St. John's wort for depression- an overview and meta-analysis of randomised clinical trials. *Brit. Med. J.* 313, 253-258.
- Lindvall O (1997) Neural transplantation: a hope for patients with Parkinson's disease. *Neuroreport* 29, 8-14.
- Liu WS und Heckmann CA (1998) The sevenfold way of PKC regulation. *Cell. Signal.* 10, 529-542.
- Löffelholz K, Klein J und Köppen A (1993) Choline, a precursor of acetylcholine and phospholipids in the brain. *Prog. Brain. Res.* 98, 197-200.
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL und Randall RJ (1951) *J. Biol. Chem.* 193, 265-275.
- Maisenbacher P und Kovar K-A (1992) Analysis and stability of *Hyperici Oleum*. *Planta Med.* 58, 35-8.
- Mark JR, Blane EM und Mattson MP (1996) Amyloid  $\beta$ -peptide and oxidative cellular injury in Alzheimer's disease. *Mol. Neurobiol.* 12, 211-224.
- Markesbery WR (1997) Oxidative stress hypothesis in Alzheimer's disease. *Free Radic. Biol. Med.* 23, 134-147.
- Melzer R, Fricke U und Hölzl J (1991) Vasoactive properties of procyanidines from *Hypericum perforatum* L. in isolated porcine coronary arteries. *Arzneimittelforschung* 41, 481-483.
- Milner TA und Amaral DG (1984) Evidence for a ventral septal projection to the hippocampal formation of the rat. *Exp. Brain Res.* 55, 579-585.
- Misane I und Ögren S (2001) Effects of *Hypericum perforatum* on passive avoidance in the rat: Evaluation of potential neurochemical mechanism underlying its antidepressant activity. *Pharmacopsychiatry* 34, Suppl. 1, 89-98.
- Mizuno T, Endo Y, Arita J und Kimura F (1991) Acetylcholine release in the rat hippocampus as measured by the microdialysis method correlates with motor activity and exhibits diurnal variation. *Neuroscience* 44, 607-612.
- Mizuno T, Arita J und Kimura F (1994) Spontaneous acetylcholine release in the hippocampus exhibits a diurnal variation in both young and old rats. *Neuroscience Lett.* 178, 271-274.
- Moor E, Schirm E, Jacso J und Westerink BHC (1998) Effects of neostigmine and atropine on basal and handling-induced acetylcholine output from ventral hippocampus. *Neuroscience* 82, 819-825.
- Moroni F und Pepeu G (1984) The cortical Cup-technique. In: IBRO Handbook Series: *Methods in neuroscience* (Hrsg.: Marsden), 63-79.

- Müller WE, Rolli M, Schafer C und Hafner U (1997) Effects of Hypericum extract (LI 160) in biochemical models of antidepressant activity. *Pharmacopsychiatry* 30, Suppl. 1, 102-107.
- Müller WE, Singer A, Wonnemann M, Hafner U, Rolli M und Schafer C (1998) Hyperforin represents the neurotransmitter reuptake inhibiting constituent of *Hypericum* extract. *Pharmacopsychiatry* 31, Suppl. 1, 16-21.
- Müller WE, Singer A und Wonnemann M (1999) Johanniskraut - Vom Nerventee zum Antidepressivum. *Dtsch. Apoth. Ztg.* 139, 1741-1750.
- Müller WE, Singer A und Wonnemann M (2000) Zum Wirkungsmechanismus von Johanniskraut-Extrakt. *Praxis* 89, 2111-2121.
- Müller WE, Singer A und Wonnemann M (2001) Hyperforin - antidepressant activity by a novel mechanism of action. *Pharmacopsychiatry* 34, Suppl. 1, 98-102.
- Mulder AH, Yamamura HI, Kuhar MJ und Snyder SH (1974) Release of acetylcholine from hippocampal slices by potassium depolarization: dependence on high affinity choline uptake. *Brain Res.* 70, 372-376.
- Murrin LC und Kuhar MJ (1976) Activation of high-affinity choline uptake *in vitro* by depolarizing agents. *Mol. Pharmacol.* 12, 1082-1090.
- Murrin LC, DeHaven RN und Kuhar MJ (1977) On the relationship between [<sup>3</sup>H]Choline uptake activation and [<sup>3</sup>H]Acetylcholine release. *J. Neurochem.* 29, 681-687.
- Nahrstedt A und Butterweck V (1997) Biologically active and other chemical constituents of the herb of *Hypericum perforatum* L. *Pharmacopsychiat.* 30, Suppl. 1, 129-134.
- Neary JT und Bu Y (1999) Hypericum LI 160 inhibits uptake of serotonin and norepinephrine in astrocytes. *Brain Res.* 816, 358-363.
- Neve LN und Robakis NK (1998) Alzheimer's disease: a re-examination of the amyloid hypothesis. *Trends Neurosci.* 21, 15-19.
- Nilsson OG, Kalen P, Rosengren E und Björklund A (1990) ACh release in the rat hippocampus as studied by MD is dependent on axonal impulse flow and increases during behavioural activation. *Neuroscience* 36, 325-338.
- Nöldner M (2001) Johanniskraut und Arzneimittelinteraktionen. *Dtsch. Apoth. Ztg.* 141, 3627-2630.
- Okuda T, Haga T, Kanai Y, Endou H, Ishihara T und Katsura I (2000) Identification and characterisation of the high-affinity choline transporter. *Nature Neuroscience* 3, 120-125.
- Orth HCJ (1999a) Isolierung, Stabilität und Stabilisierung von Hyperforin und Identifizierung seines Hauptabbauproduktes aus *Hypericum perforatum* L. Dissertation Eberhard-Karls Universität Tübingen.
- Orth HC, Rentel C und Schmidt PC (1999b) Isolation, purity analysis and stability of hyperforin as a standard material from *Hypericum perforatum* L. *J. Pharm. Pharmacol.* 51, 193-200.
- Orth HCJ, Hauer H, Erdelmeier CAJ und Schmidt PC (1999c) Orthofofin: The main degradation product of hyperforin from *Hypericum perforatum* L. *Pharmazie* 54, 76-77.
- Orth HCJ und Schmidt PC (2000) Stability and stabilization of hyperforin. *Pharm. Ind.* 62, 60-63.
- Ostrowski E (1988) Untersuchung zur Analytik, <sup>14</sup>C-Markierung und Pharmakokinetik phenolischer Inhaltsstoffe von *Hypericum perforatum* L. Dissertation Marburg, FRG.
- Palsson S, Aevansson O und Skoog I (1999) Depression, cerebral atrophy, cognitive performance and incidence of dementia – population study of 85-year-olds. *Br. J. Psychiat.* 174, 249-253.

- Paxinos G und Watson C (1986) *The rat brain in stereotaxic coordinates*. Academic Press, San Diego.
- Singer A, Wonnemann M and Müller WE (1999) Hyperforin, a major antidepressant constituent of St. John's wort, inhibits serotonin uptake by elevating free intracellular Na<sup>+</sup>. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 290, 1363-1368.
- Pepeu G, Giovannelli L, Casamenti F, Scali C und Bartolini L (1996) Amyloid beta-peptides injection into the cholinergic nuclei: morphological, neurochemical and behavioural effects. *Prog. Brain. Res.* 109, 273-282.
- Perry EK, Tomlinson BE, Bleses G, Bergmann K, Gibson PH und Perry EH (1978) Correlation of cholinergic abnormalities with senile plaques and mental test scores in senile dementia. *Br. Med. J.* 2., 1457-1459.
- Philipp M, Kohlen R und Hiller K-O (1999) Hypericum extract versus imipramine or placebo in patients with moderate depression: randomized multicentre study of treatment for eight weeks. *BMJ* 319, 1534-1538.
- Philipp A (2001) In vivo neurotransmitter release in the *locus coeruleus*: Effects of hyperforin, inescapable shock and fear. *Pharmacopsychiatry* 34, Suppl. 1, 111-116.
- Potter PE und Hanin I (1988) Estimation of acetylcholine und choline and analysis of acetylcholine turnover rats *in vivo*. *Handbook of Experimental Pharmacology* Vol. 86: The cholinergic synapse (Whittaker V.P., Hrsg.), pp. 103-124. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York.
- Price DL, Struble RG, Whitehouse PJ, Kitt CA, Cork LC, Walker LC und Casanova MF (1986) Alzheimer's disease: A multisystem disorder. *Res. Publ. Assoc. Res. Nerv. Ment. Dis.* 64, 209-214.
- Price DL, Sisodia SS und Borchelt DR (1998) Genetic neurodegenerative diseases: The human illness and transgenic models. *Science* 282, 1079-1082.
- Quirion R (1993) Cholinergic markers in Alzheimer's disease and the autoregulation of acetylcholine release. *J. Psychiatry Neurosci.* 18, 226-234.
- Reichling J, Weseler A und Saller R (2001) A current review of the antimicrobial activity of *Hypericum perforatum* L. *Pharmacopsychiatry* 34, Suppl 1, 116-118.
- Rolli M, Schafer C und Müller WE (1995) Effects of Hypericum extract LI 160 on neurotransmitter receptor binding and synaptosomal uptake systems. *Pharmacopsychiatry* 28, 207-210.
- Ruberg M, Mayo W, Brice A, Duyckaerts C, Hauw JJ, Simon H, LeMoal M und Agid Y (1990) Choline acetyltransferase activity and [<sup>3</sup>H]vesamicol binding in the temporal cortex of patient with Alzheimer's disease, Parkinson's disease and rats with basal forebrain lesions. *Neuroscience* 35, 327-333.
- Rücker G, Manns D, Hartmann R und Bonsels U (1995) A c<sub>50</sub>-hydroperoxide from *Hypericum perforatum*. *Arch. Pharm.* 328, 725-730.
- Sachs Lothar (1992) *Angewandte Statistik*, 7.Auflage, S 188, 208-210. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York.
- Santiago M und Westerink BHC (1990) Characterization of the *in vivo* release of dopamine as recorded by different types of intracerebral microdialysis probes. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. Rev.* 342, 407-414.
- Sauvaigo S, Vigne P, Frelin C und Lazdunski M (1984) Identification of an amiloride sensitive Na<sup>+</sup> / H<sup>+</sup> exchange system in brain synaptosomes. *Brain Res.* 301, 371-374.
- Scali C, Giovannini MG, Bartolini L, Prosperi C, Hinz V, Schmidt B und Pepeu G (1997) Effect of metrifonate on extracellular brain acetylcholine and object recognition in aged rats. *Eur. J. Pharmacol.* 325, 173-180.

- Schellenberg R, Sauer S und Dimpfel W (1998) Pharmacodynamic effects of two different *Hypericum* extracts in healthy volunteers measured by quantitative EEG. *Pharmacopsychiatry* 31, Suppl. 1, 44-53.
- Schulz V und Hänsel RR (1999) Rationale Phytotherapie. 4.Auflage. Berlin, Heidelberg: Springer.
- Simmen U, Higelin J, Berger-Büter K, Schaffner W und Lundstrom K (2001) Neurochemical studies with St. John's wort *in vitro*. *Pharmacopsychiatry* 34, Suppl. 1, 137-142.
- Simon JR, Atweth S und Kuhar MJ (1976) Sodium-dependent high affinity choline uptake: a regulatory step in the synthesis of acetylcholine. *J. Neurochem.* 26, 909-922
- Sims NR, Bowen DM, Allen SJ, Smith CCT, Neary D, Thomas DJ und Davison AN (1983) Presynaptic cholinergic dysfunction in patients with dementia. *J. Neurochem.* 40, 503-509.
- Singer A, Wonnemann M und Müller WE (1999) Hyperforin, a major antidepressant constituent of St. John's wort inhibits serotonin uptake by elevating free intracellular Na<sup>+</sup>. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 290, 1363-1368.
- Sparrenberg B (1993) MAO-inhibierende Eigenschaften von *Hypericum*-Inhaltsstoffen und Untersuchungen zur Analytik und Isolierung von Xanthonen aus *Hypericum perforatum* L. Dissertation, Marburg.
- Stadler H und Nesselhut T (1986) Simple and rapid measurement of acetylcholine and choline by HPLC and enzymatic detection. *Neurochem. Int.* 9, 127-129.
- Starke K, Göthert M und Kilbinger H (1989) Modulation of neurotransmitter release by presynaptic autoreceptors. *Physiol. Rev.* 69, 864-962.
- Starke K (1996) Grundlagen der Pharmakologie des Nervensystems. In: Forth W, Henschler D, Rummel W, Starke K, *Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie*. Spektrum Verlag Berlin.
- Suzuki O, Katsumata Y, Oya M, Bladt S und Wagner H (1984) Inhibition of monoamine oxidase by hypericin. *Planta Med.* 50, 272-274.
- Suzuki T, Kashima Y, Fujimoto K, Oohata H und Kawashima K (1991) Regional differences in extracellular choline dependency of acetylcholine synthesis in the rat brain. *Neurosci. Res.*, 71-76.
- Taguchi K, Hagiwara Y, Suzuki Y und Kubo T (1993) Effects of morphine on release of ACh in the rat striatum: an *in vivo* MD study. *Naunyn Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 347, 9-13.
- Takahashi I, Nakanishi S, Kobayashi E, Nakano H, Suzuki K und Tamaoki T (1989) Hypericin and pseudohypericin specifically inhibit protein kinase C: possible relation to their antiretroviral activity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 165, 1207-1212.
- Terry RD (1985) Alzheimer's disease. In: Davis RL, Robertson DM, *Textbook of neuropathology*. Williams and Wilkins Baltimore 1985.
- Terry RD (1996) Basis of structural Alzheimer disease and some pathogenic concepts. In: *Alzheimer Disease: From molecular biology to therapy*. Hrsg.: Becker R und Jacobini E, S. 19-23, Birhäuser Boston.
- Teufel-Mayer R und Gleitz J (1997) Effects of long-term administration of hypericum extracts on the affinity and density of the central serotonergic 5-HT<sub>1A</sub> and 5-HT<sub>2A</sub> receptors. *Pharmacopsychiatry* 30, Suppl. 2, 114-117.
- Thiede HM und Walper A (1994) Inhibition of MAO und COMT by *Hypericum* extracts and hypericin. *J. Geriatr. Psychiatry Neurol.* 7, Suppl. 1, 54-56.

- Toide K und Arima T (1989) Effects of cholinergic drugs on extracellular levels of ACh and Ch in rat cortex, hippocampus and striatum studied by brain dialysis. *Eur. J. Pharmacol.* 173, 133-141.
- Toll L und Howard BD (1980) Evidence that an ATPase and a proton-motive force function in the transport of acetylcholine into storage vesicles. *J. Biol. Chem.* 255, 1787-1789.
- Tom T und Cummings JL (1998) Depression in Parkinson's disease. Pharmacological characteristics and treatment. *Drugs Aging* 12, 55-74.
- Trifunovic S, Vajs V, Macura S, Juranic N, Djarmati Z, Jankov R und Milosavljevic S (1998) Oxidation products of hyperforin from *Hypericum perforatum* L. *Phytochemistry* 49, 1305-1310.
- Tucek S (1978) Acetylcholine synthesis of the neurons. S. 109, Halsted Press, New York.
- Tucek S (1984) Problems in the organization and control of acetylcholine synthesis in brain neurons. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 44, 1-46.
- Tucek S (1985) Regulation of acetylcholine synthesis in the brain. *J. Neurochem.* 44, 11-24.
- Tucek S (1990) The synthesis of acetylcholine: twenty years of progress. *Progr. Brain. Res.* 84, 467-477.
- Tucek S (1993) Short-term control of the synthesis of acetylcholine. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 60, 59-69.
- Uebelhack R und Franke L (2001) In vitro effects of St. John's wort extract and hyperforin on 5-HT uptake and efflux in human blood platelets. *Pharmacopsychiatry* 34, Suppl. 1, 146-148.
- Ungerstedt U und Hallström A (1987) In vivo-microdialysis – A new approach to the analysis of neurotransmitters in the brain. *Life Sciences* 41, 861-864.
- Vandenbogaerde A, Zandi P, Puia G, Truzzi, Kamuhabwa A, de Witte P, Merlevede W und Baraldi M (2000) Evidence that total extract of *Hypericum perforatum* affects exploratory behaviour and exerts anxiolytic effects in rats. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 65, 627-633.
- Verrotta L, Appendino G, Jakupovic J und Bombardelli E (2000) Hyperforin analogues from St. John's wort. *J. Nat. Prod.* 63, 412-415.
- Volz H-P (1997) Controlled clinical trials of Hypericum extract in depressed patients – an overview. *Pharmacopsychiatry* 30, Suppl. 1, 72-76.
- Volz HP und Laux P (2000) Potential treatment of subthreshold and mild depression: a comparison of St. John's wort extracts with fluoxetine. *Compr. Psychiatry* 41, 133-137.
- Vorbach EU, Arnoldt KH und Hubner WD (1997) Efficacy and tolerability of St. John's wort extract LI 160 versus imipramine in patients with severe depressive episodes according to ICD 10. *Pharmacopsychiatry* 30, Suppl. 2, 81-85.
- Waite JJ, Chen AD, Wardlow ML, Wiley RG, Lappi DA und Thal LJ (1995) 192 immunoglobulin G-saporin produces graded behavioural and biochemical changes accompanying the loss of cholinergic neurons of the basal forebrain and cerebellar Purkinje cell. *Neuroscience* 65, 463-476.
- Westerink BHC (1995) Brain microdialysis and its application for the study of animal behaviour. *Behav. Brain Res.* 70, 103-124.
- Wheatley D (1997) LI 160, an extract of St. John's wort, versus amitriptyline in mildly to moderately depressed outpatients - a controlled 6-week clinical trial. *Pharmacopsychiatry* 30, 77-80.
- White HL und Wu JC (1973) Kinetics of choline acetyltransferase (E.C.2.3.1.6) from human and other mammalian central and peripheral nervous tissues. *J. Neurochem.* 20, 297-307.

Whitehouse PJ, Price RG, Struble RG, Clark AW, Coyle JT und deLong MR (1982) Alzheimer's disease and senile dementia: loss of neurons in the basal forebrain. *Science* 215, 1237-1239.

Whittaker VP (1992) Thirty years of synaptosome research. *Journal of Neurocytology* 22, 735-742.

Wichtl M (1997) *Teedogen und Phytopharmaka*. 3. Auflage, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft Stuttgart, 309-312.

Wilcock GK, Esiri MM, Bowen DM und Hughes AO (1988) The differential involvement of subcortical nuclei in senile dementia of Alzheimer's disease. *J. Neurol. Neurosurg. Psych.* 51, 842-849.

Wonnemann M, Singer A und Müller WE (2000) Inhibition of synaptosomal uptake of [<sup>3</sup>H]-L-glutamate and [<sup>3</sup>H]-GABA by hyperforin, a major constituent of St. John's wort: the role of amiloride sensitive sodium conductive pathways. *Neuropsychopharmacol.* 23, 188-197.

Wonnemann M, Singer A, Siebert B und Müller WE (2001) Evaluation of synaptosomal uptake inhibition of most relevant constituents of St. John's wort. *Pharmacopsychiatry* 34, Suppl. 1, 148-151.

Wurtman RJ, Hefti F und Melamed E (1981) Precursor control of neurotransmitter synthesis. *Pharmacol. Rev.* 32, 315-335.

Yamada K, Saltarelli MD und Coyle JT (1991) Effects of calmodulin antagonists on sodium-dependent high-affinity choline uptake. *Brain Res.* 542, 132-134.

Yamamura HI und Snyder SH (1973) High affinity transport of choline into synaptosomes of rat brain. *J. Neurochem.* 21, 1355-1374.

Zilles K, Que M, Schleicher A, Schroeter M, Kraemer M und Witte OW (1995) Plasticity and neurotransmitter changes in Alzheimer's disease and experimental cortical infarcts. *Arneimittelforschung* 45, 361-366.

