Universitätsklinik Ulm
Kinder- und Jugendpsychiatrie
Amtierender Leiter: Prof. Dr. med. J.M. Fegert

Universität Ulm
Institut für Anatomie und Zellbiologie
Amtierender Leiter: Prof. Dr. med.Tobias M. Böckers

Wirkung von Johanniskrautextrakt im Vergleich zu Fluoxetin auf sich entwickelnde Neurone *in vitro*

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin
der Medizinischen Fakultät der Universität Ulm

vorgelegt von
Felicia Kehrle
geboren in Biberach/Riß

Im Jahre 2014

Amtierender Dekan:	Prof. Dr. Thomas Wirth
1. Berichterstatter:	Prof. Dr. A. G. Ludolph
2. Berichterstatter:	Prof. Dr. T. M. Böckers
Tag der Promotion:	17.12.2015

MEINER FAMILIE

So eine Arbeit wird eigentlich nie fertig,
man muss sie für fertig erklären,
wenn man nach Zeit und Umständen
das Mögliche getan hat.

Johann Wolfgang von Goethe,
Italienische Reise, 1787

INHALTSVERZEICHNIS

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS III

1. Einleitung 1

1.1. Die unipolare Depression 1

1.2. Fluoxetin 8

1.3. Johanniskraut (Hypericum perforatum L.) 12

1.4. Ziel der Arbeit 16

2. Material und Methoden 18

2.1. Materialien 18

2.2. Methoden der Zellkultur 19

2.3. Herstellung der applikationsfähigen Testsubstanzen 22

2.4. Zytotoxizitätstest mittels MTT-Assay 26

2.5. Immunzytochemie 27

2.6. Versuchsplanung und -durchführung 30

2.7. Darstellung der Messergebnisse und statistische Analyse ..30

3. Ergebnisse 34

3.1. Viabilität 34

3.1.1. Wirkung von Fluoxetin auf die Zellviabilität 34

3.1.2. Wirkung von Johanniskrautextrakt auf die Zellviabilität.....40

3.1.3. Rescue-Versuch 47

3.2. Morphologie 48

3.2.1. Wirkung von Fluoxetin auf die Zellmorphologie hippocampaler und kortikaler Primärzellen.....48

3.2.2. Wirkung von Johanniskrautextrakt auf die Zellmorphologie hippocampaler und kortikaler Primärzellen 48

3.2.3. Effekt von Johanniskrautextrakt auf die Anzahl der Neuriten und Synapsen hippocampaler Zellen 53

4. Diskussion 55

4.1. Fluoxetin 55

4.1.2. Viabilität 55

4.1.2. Morphologie 57

4.2. Johanniskrautextrakt 58

4.2.1. Viabilität 58

4.2.2. Morphologie 59

4.3. Limitationen 61

5. Zusammenfassung 64

6. Literaturverzeichnis 66

7. Anhang 81

7.1. Versuchsplanung 81

7.2. Regressionskurven MTT-Assays 83

7.3. Deskription 84

8. Danksagung 97

9. Lebenslauf 98

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

ACTH	Adrenocorticotropes Hormon
AMPA	α-Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazol-Propionsäure
Aqua dest.	Aqua destillata
BDNF	*Brain derived neurotrophic factor*
BSA	Rinderserum Albumin Fraktion V
cAMP	zyklisches Adenosin-Monophosphat
CRF	Corticotropin-freisetzender Faktor
CRH	Corticotropin-freisetzendes Hormon
DAPI	4'-6-Diamidino-2-phenylindol
DDD	definierte Tagesdosis
DGKJP	Deutsche Gesellschaft für Kinder- und Jugendpsychiatrie, Psychosomatik und Psychotherapie
DGPPN	Deutsche Gesellschaft für Psychiatrie, Psychotherapie und Nervenheilkunde
DIV	Tage in Kultur (*days in vitro*)
DMEM	modifiziertes Eagle Medium nach Dulbecco Dulbecco's
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	*deoxyribonucleic acid*
DNase	Desoxyribonuklease
DSM	*Diagnostic and statistical manual of mental disorders*
EC_{50}	mittlere effektive Konzentration
EDTA	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
EMA	Europäische Arzneimittelagentur
EMEA	Europäische Arzneimittelagentur, seit 2009 mit EMA abgekürzt
EU	Europäische Union
FKS	fötales Kälberserum
GABA	gamma-Aminobuttersäure
HPA-Achse	Hypothalamus-Hypophysen-Nebennieren-Achse

HBSS	Hank‘s balancierte Salzlösung
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HPLC	High-performance liquid chromatography
ICD	Internationalen Klassifikation der Krankheiten und verwandter Gesundheitsprobleme
IUPAC	International Union of Pure and Applied Chemistry
MAP-2	Mikrotubulus-assoziiertes Protein 2
MEM	*Minimum essential medium*
MeOH	Methanol
MRT	Magnetresonanztomographie
MTT	3 [4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5-Diphenyltetrazolium Bromid
N	Normal
NaCl	Natriumchlorid
$Na_2HPO_4 \cdot 2H_20$	Dinatriumhydrogenphosphat
$NaH_2PO_4 \cdot H_20$	Natriumdihydrogenphosphat
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
PBS	Phosphat gepufferte Salzlösung
Pen/Strep	Penicillin Streptomycin
PFA	Paraformaldehyd
PLL	Poly-L-Lysin
RT	Raumtemperatur
SERT	Serotonintransporter
SNRI	Selektiver Noradrenalin-Wiederaufnahmehemmer
SSNRI	Selektiver Serotonin-Noradrenalin-Wiederaufnahmehemmer
SSRI	Selektiver Serotonin-Wiederaufnahmehemmer
Upm	Umdrehungen pro Minute
WHO	Weltgesundheitsorganisation

1. Einleitung

Psychische Erkrankungen rücken mehr denn je in das Bewusstsein der Öffentlichkeit. 2005 veröffentlichte die Europäische Union ein „green paper“ zur Verbesserung der psychischen Gesundheit der Bevölkerung, in dem deutlich gemacht wird, wie wichtig psychische Gesundheit nicht nur für jeden einzelnen, sondern auch für die europäische Wirtschaft ist. So werden die volkswirtschaftlichen Kosten, die durch depressive Erkrankungen entstehen, von der EU-Kommission auf 120 Milliarden jährlich geschätzt (Winkler 2008). Nicht nur Erwachsene, auch Kinder und Jugendliche sind immer häufiger von psychischen Erkrankungen betroffen. 2-4 % der Kinder und bis zu 8 % der Jugendlichen in westlichen Ländern erfüllen die DSM-IV-Diagnosekriterien (bzw. seit Sommer 2013 DSM-V) für eine Depression. Die Prävalenz erreicht bis zu 25 % gegen Ende der Adoleszenz (Birmaher et al., 1996, Kessler et al., 2001, Merikangas et al., 2009). Zur Behandlung der Depression werden verschiedene Psychopharmaka eingesetzt, deren Wirkmechanismus bislang nicht vollständig geklärt ist. In Hinblick auf die Pharmakotherapie von Depressionen im Kindes- und Jugendalter wird häufig nicht berücksichtigt, dass das Gehirn bis ins dritte Lebensjahrzehnt von Maturierungsprozessen geprägt ist und im Vergleich zu einem ausgereiften Gehirn unterschiedlich auf diese Medikamente reagieren kann (Bylund und Reed, 2007).
In dieser Arbeit sollen vor allem die Wirkmechanismen der beiden Antidepressiva Fluoxetin und Johanniskraut in einem *in vitro*-Modell untersucht und diskutiert werden. Besonderes Augenmerk soll auf die Entwicklungsabhängigkeit der Wirkung gelegt werden.

1.1. Die unipolare Depression

Das Wort „Depression“ leitet sich ab vom Lateinischen „Deprimere“, das „niederdrücken“, „herabdrücken“ bedeutet. In seiner ursprünglichen Bedeutung ist damit „bedrückte Stimmung“ gemeint. Für die klinische Diagnose einer depressiven Störung müssen verschiedene Diagnosekriterien erfüllt sein. In der Internationalen

Klassifikation der Krankheiten und verwandter Gesundheitsprobleme (International Classification of diseases, ICD-10) sind die Kriterien im Kapitel über affektive Störungen aufgeführt. Auch das Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders (DSM-IV/-V), das Klassifikationssystem der American Psychiatric Association, führt im Kapitel über affektive Störungen Diagnosekriterien für unterschiedliche Ausprägungen von depressiven Störungen auf. Die Bezeichnungen im Klassifikationssystem ICD-10 lauten: „depressive Episode“ (F.32) und „rezidivierende depressive Störung“ (F.33) (Lieb, 2008). Je nach Ausprägung der Symptome spricht man von einer leichten (F32.0), mittelgradigen (F32.1) oder schweren depressiven Episode ohne (F32.2) oder mit (F32.3) psychotischen Symptomen. Die Erkrankung zeichnet sich aus durch

- lang anhaltende depressive Stimmung (mindestens zwei Wochen kontinuierlich bestehend),
- Verlust von Interesse und Freudlosigkeit,
- verminderte Energie und erhöhte Ermüdbarkeit.

Für die Diagnose leichte bis mittelgradige depressive Episode müssen laut ICD-10 zwei dieser typischen Symptome erfüllt sein, sowie zwei bis drei weniger typische Symptome. Für schwere depressive Episoden müssen alle drei typischen Symptome erfüllt sein, zusätzlich mindestens vier weniger typische. Dazu zählen:

- Konzentrations- und Aufmerksamkeitsprobleme,
- Verlust von Selbstvertrauen und Selbstwertgefühl,
- Schuld- und Wertlosigkeitsgefühle,
- negatives Zukunftsdenken,
- Selbstverletzung,
- suizidale Handlungen oder Suizidgedanken,
- Schlafstörungen und
- Appetitverlust.

Somatische Symptome wie zu frühes Erwachen, Morgentief, psychomotorische Hemmung oder Agitiertheit, Appetitverlust, Gewichtsverlust, Libidoverlust sind häufig (Leitlinien DGPPN 2009) und führen bei den ersten ärztlichen Besuchen oft zu einer Fehldiagnose (Mitchell et al., 2009). Die Diagnose wird rein klinisch gestellt, es gibt keinen „Biomarker“ für eine depressive Störung. Zur weiteren Sicherung der Diagnose und zur Erfassung des Schweregrades können verschiedene Fragebögen und strukturierte Interviews eingesetzt werden, die die Symptome

systematisch und quantitativ erfassen. Die klinischen Symptome einer Depression können mit unterschiedlichem Entwicklungsstand variieren und sich bei Kindern und Jugendlichen von Erwachsenen unterscheiden, die Kardinalsymptome sind meist ähnlich. Deshalb werden für Kinder und Jugendliche dieselben Diagnoseschlüssel und -kriterien wie für Erwachsene eingesetzt. Problematisch für die Diagnosefindung bei Kindern können jedoch eine Verleugnungstendenz und Schamgefühle sein. Hilfreich in diesem Fall sind Verhaltensbeobachtungen und Fremdeinschätzung, z.B. Eltern- und Lehrerurteil.
Wie bereits oben erwähnt, gibt es keine Biomarker. Die Labordiagnostik dient lediglich zum Ausschluss organischer Ursachen einer depressiven Symptomatik (z.B. Hypothyreose, Anämie etc.). Aufgrund möglicher chronischer Über- oder auch Unterforderung, die mit ursächlich sein können, wird eine orientierende Intelligenzdiagnostik empfohlen (Leitlinien DGKJP 2007, in aktueller Leitlinie der DGKJP zur Behandlung der Depression im Kindes- und Jugendalter von 2013 wird nicht mehr auf Diagnostik eingegangen).

1.1.1. Epidemiologie

Psychische Störungen zählen zu den zehn führenden „burden of disease“ (Krankheitslast) in Ländern mit hohem Einkommen (Murray und Lopez, 2002). Unter den psychischen Erkrankungen nimmt die unipolare Depression den größten Stellenwert ein. Sie ist die häufigste Ursache für „years of life lived with disability“ (YLD) (Lopez AD et al., 2006). Das macht die Depression zu einer Volkskrankheit. Weltweit sind 121 Mio. Menschen betroffen und sie ist nach den Herz-Kreislauferkrankungen das zweithäufigste Leiden in den westlichen Industrienationen (World Health Report Mental Health 2001, WHO, Murray und Lopez, 2002). Die WHO schätzt, dass bereits im Jahre 2020 die Depression weltweit die zweithäufigste und in entwickelten Regionen die häufigste Ursache für Arbeitsunfähigkeit sein wird (Murray und Lopez, 1996; Murray und Lopez, 2002, Bylund und Reed, 2007). In Deutschland liegt die 12-Monats-Querschnittsprävalenz der 18- bis 65-Jährigen bei rund 11 % (Wittchen et al., 2010). Die Lebenszeitprävalenz beträgt ca. 10-18 %. Das Risiko, an einer Depression zu erkranken, ist für Frauen höher als für Männer (Fava und Kendler, 2000). Wie bereits einleitend erwähnt, erfüllen 2-4 % der Kinder und bis zu 8 % der Jugendlichen in westlichen Ländern die Kriterien

des DSM-IV für eine Depression. Eine depressive Episode kann rezidivieren und bis ins Erwachsenenalter als rezidivierende depressive Störung bestehen bleiben. Unbehandelte Betroffene entwickeln oft weitere psychiatrische Erkrankungen wie Substanzmissbrauch oder eine Persönlichkeitsstörung (Kessler et al., 2001).

1.1.2. Ätiologie

Monoaminmangel-Hypothese

Als Ursache für depressive Störungen wurde lange Zeit die Monoaminmangel-Hypothese postuliert. Demzufolge führt ein Mangel oder ein Ungleichgewicht der monoaminergen Neurotransmitter Serotonin, Noradrenalin und Dopamin im Gehirn zur Depression (Manji et al., 2001). Da die Medikamente, die zur Behandlung der Depression eingesetzt werden, die Konzentration der besagten Neurotransmitter im synaptischen Spalt anheben, erschien diese Hypothese plausibel. Mittlerweile wird die Monoaminmangel-Hypothese jedoch immer mehr in Frage gestellt. Während selektive Serotonin- und/oder Noradrenalinwiederaufnahmehemmer (SSRI, SNRI, SSNRI) die Monoamintransporter bereits innerhalb weniger Minuten nach Medikamenteneinnahme blockieren und umgehend zum Anstieg der Konzentration der Neurotransmitter um 100-300 % im synaptischen Spalt führen, zeigt sich die klinische Wirkung erst nach zwei bis vier Wochen (Delgado, 2004, Nestler et al., 2002). Sekundäre, adaptive Prozesse auf Genexpressionsebene werden mittlerweile als Erklärungsansatz für den verspäteten klinischen Wirkeintritt angenommen (Mill und Petronis, 2007, Catapano und Manji, 2007). Nur 60-90 % der Patienten profitieren von einer Therapie mit SSRI oder SSNRIs, während 40 % auf Placebogabe ansprechen (Henn und Vollmayr, 2004). Deshalb werden noch andere Mechanismen, die der Depression ursächlich zu Grunde liegen könnten, diskutiert.

Stresshypothese

Durch Stress wird im Hypothalamus das Corticotropin-releasing Hormon (CRH) bzw. der Corticotropin Releasing Factor (CRF) gebildet. Dadurch wird die Hypophyse stimuliert und sie produziert Adrenocorticotropes Hormon (ACTH). ACTH führt zur Ausschüttung von Kortisol aus der Nebennierenrinde. Kortisol wird im Hippocampus an Glukokortikoidrezeptoren gebunden. Dies führt zu einer hem-

menden Wirkung auf den Hypothalamus, wodurch eine negative Rückkopplung gegeben ist. Besteht, wie bei chronischem Stress, eine länger anhaltende Hyperkortisolämie, kommt es zu einer Desensitivierung von Glucokotikoidrezeptoren im Hippocampus. Infolgedessen wird die Expression neurotropher Faktoren wie brain-derived-neurotrophic factor (BDNF) reduziert (Nestler et al., 2002, Aan het Rot et al., 2009). Durch chronischen Stress werden außerdem extrem hohe Glutamatspiegel erreicht. Glutamat ist ein exzitatorisch wirkender Neurotransmitter. Hohe Glutamatspiegel führen zu einer Überaktivierung von NMDA (N-Methyl-D-Aspartat)-Rezeptoren auf Neuronen und Gliazellen. In der Folge erhöht sich der intrazelluläre Calciumspiegel deutlich. Das führt wiederum dazu, dass BDNF vermindert gebildet wird (Sanacora et al., 2008). BDNF spielt eine wichtige Rolle bei der Maturierung der Neurone während der Entwicklung, beim Wachstum von Neuronen und für die synaptische Plastizität. Außerdem stimuliert es die Transkription von Genen, die im Serotoninmetabolismus eine Rolle spielen. Wird durch die Hyperkortisolämie und/oder die glutamaterge Exzitotoxizität die Transkription von BDNF gehemmt, führt dies zur Atrophie des Hippocampus, wie in Bildgebungsstudien detektierbar war (Duman 2004). Durch den Zelluntergang von Neuronen im Hippocampus und der Amygdala verringert sich der hemmende Einfluss auf den Hypothalamus (siehe Abb.1). Wie diese Atrophie zellbiologisch genau zu Stande kommt, ist noch nicht vollständig geklärt. In Tiermodellen gibt es deutliche Hinweise, die zu der Annahme führen, dass apoptotische Prozesse der hippocampalen Zellen hierfür ursächlich sind. Auch exzitotoxisch bedingter Zelltod durch glutamaterge Überstimulation wird als möglicher Grund diskutiert. Des Weiteren wird davon ausgegangen, dass es auch durch verminderte Neurogenese zur Atrophie des Hippocampus kommt (Lee et al., 2010). Für strukturelle Veränderungen in der Amygdala, im präfrontalen Kortex und in anderen Gehirnregionen könnten ähnliche kortisolvermittelte Effekte ursächlich sein (Aan het Rot et al., 2009).

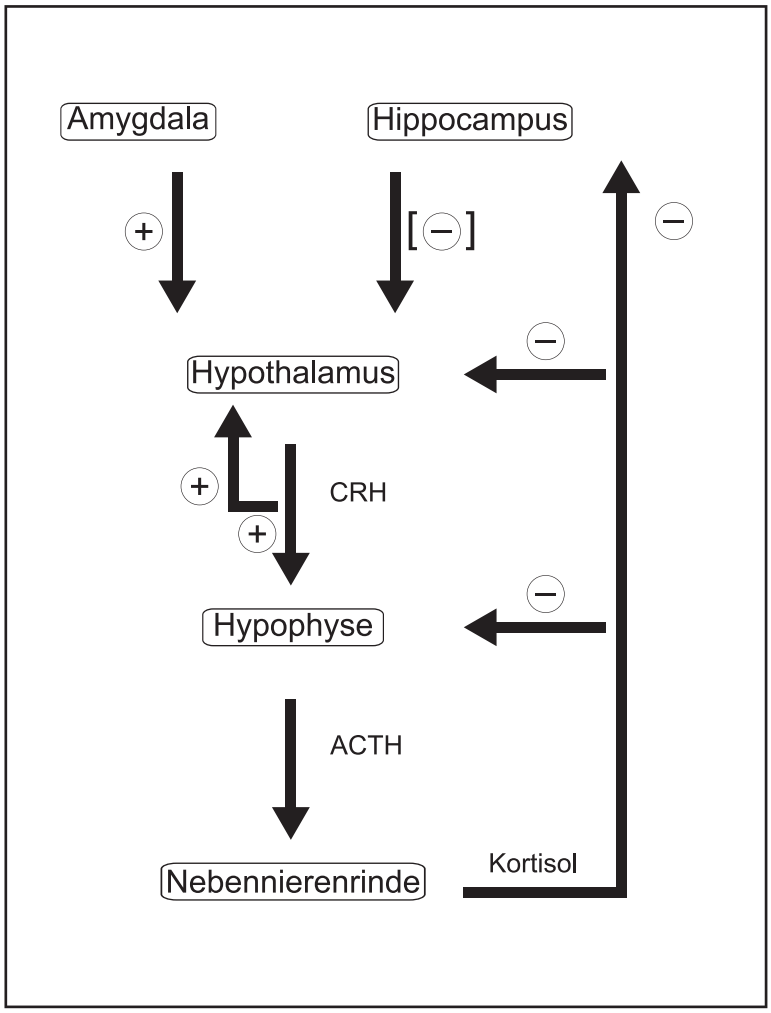

Abb. 1: Hypothalamus-Hypophysen-Nebennieren-Achse, nach Aan het Rot et al., 2009. CRH: Corticotropin releasing Hormon, ACTH: Adrenocorticotropes Hormon.
Durch akuten Stress wird das System über den Hypothalamus direkt aktiviert oder indirekt über die Amygdala. Im Hypothamalus wird CRH freigesetzt, das in der Hypophyse dazu führt, dass ACTH freigesetzt wird. Dies stimuliert wiederum die Nebenniere in der-Ausschüttung des Stress-Hormons Kortisol, das viele Organe einschließlich des Gehirns beeinflusst. Hier ist besonders der Hippocampus von Bedeutung. Die Aktivierung von Glukokortikoid-Rezeptoren im Hippocampus führt dazu, dass es zu einer Hemmung der Hypothalamus-Hypophysen-Nebennieren-Achse kommt. Die eckige Klammer zeigt den Effekt chronischen Stresses: Wenn der Hippocampus chronischem Stress ausgesetzt wird, verringern sich die Glukokortikoidrezeptoren und die Hemmung kann so nicht mehr stattfinden. Bei an Depression erkrankten Patienten konnten diese Veränderungen festgestellt werden.

Genetik

Genetische Vulnerabilität kann die Entstehung von depressiven Störungen bedingen. Verwandte ersten Grades depressiver Patienten haben gegenüber Menschen ohne Depressionserkrankungen in der Familie ein bis zu 3-fach erhöhtes Risiko, ebenfalls eine depressive Episode zu entwickeln. Aus Zwillingsstudien lässt sich ableiten, dass die Heritabilität bei 37 % liegt (Sullivan et al., 2000). Eine familiäre Vulnerabilität wird besonders für schwere, lang anhaltende depressive Episoden,

die häufig wiederkehren und sich schon in jungem Alter ohne Einwirkung äußerer Einflüsse manifestieren, in Zusammenhang gebracht (Kendler et al, 1999). Mögliche Gene, die an der Entstehung der Krankheit beteiligt sein können, sind beispielsweise Gene, die für am Monoaminstoffwechsel beteiligte Proteine wie den Serotonintransporter, die Monoaminoxidase A, die Tryptophanhydroxylase 1, aber auch für BDNF u.a. kodieren. Polymorphismen der genannten Gene können das Risiko für eine „Major Depression“ erhöhen.

Umweltfaktoren

Durch Gen-Gen- oder Gen-Umwelt-Interaktionen kann es zur Manifestation einer depressiven Störung kommen. Belastende Lebensereignisse wie Tod des Partners, Verlust des Arbeitsplatzes, Scheidung aber auch Missbrauch und Misshandlung in der Kindheit scheinen als „Umwelt“-Faktoren eine große Rolle zu spielen (Aan het Rot et al., 2009, Kendler et al., 2001, Caspi et al., 2003).
Ein wichtiger Faktor für die Entwicklung einer depressiven Störung im Kindesalter stellt wahrscheinlich die psychische Gesundheit der Mutter dar (Beardslee et al., 1998, Weissmann et al., 1997 und 2006). Im Unterschied dazu stehen im Jugendalter scheinbar weitere belastende Lebensereignisse als auslösende Faktoren im Vordergrund (Gentile, 2010).

Es liegt nahe zu postulieren, dass die Ursache der unipolaren Depression multifaktoriell bedingt ist, da kein Modell die Genese vollständig erklärt.

1.1.3. Therapie

Zur Therapie der Depression kommen bei Erwachsenen verschiedene Möglichkeiten in Frage: Psychotherapie, medikamentöse Therapie und Elektrokrampftherapie, letztere ist sehr schweren, mit psychotischem Erleben einhergehenden, oder therapieresistenten Fällen vorbehalten (Fava und Kendler, 2000). Die Kombination aus Psychotherapie und medikamentöser Therapie scheint die höchste Wirksamkeit zu haben (Mann, 2005; Nestler et al., 2002). Zur medikamentösen Therapie werden folgende Substanzen eingesetzt:

- Tri- (und tetrazyklische) Antidepressiva (TZA) bzw. nichtselektive Monoamin-Wiederaufnahme-Inhibitoren (NSMRI)
- Selektive Serotonin-Wiederaufnahme-Inhibitoren (SSRI)

- Monoaminoxidase (MAO)-Inhibitoren (MAOI)
- Selektive Serotonin-/Noradrenalin-Wiederaufnahme-Inhibitoren (SSNRI)
- Selektive Noradrenalin-Rückaufnahme-Inhibitoren (SNRI)
- Selektiver Noradrenalin-Dopamin-Rückaufnahme-Inhibitor (Bupropion);
- Melatonin-Rezeptor-Agonist (MT1/MT) und
- Serotonin 5-HT2C-Rezeptor-Antagonist (Agomelatin).

Weiterhin existieren nicht klassifizierte Antidepressiva (Trazodon), Lithiumsalze und Phytopharmaka (Johanniskraut) (Leitlinien DGPPN 2009).
Die einzige für Kinder ab 8 Jahren zugelassene Substanz ist in Deutschland Fluoxetin. Diese Substanz konnte als einzige synthetische Substanz in kontrollierten Studien signifikante antidepressive Effekte bei Kindern und Jugendlichen hervorrufen (March et al., 2001). Andere SSRIs werden *off-label* eingesetzt. Für Kinder ab 12 Jahren sind zusätzlich Johanniskrautpräparate zugelassen (Borchard-Tuch, 2008, Fegert, 2012). Fluoxetin und Johanniskraut werden als bei Kindern und Jugendlichen angewandte Antidepressiva in dieser Arbeit näher untersucht.

1.2. Fluoxetin

Historisches

Fluoxetin ist ein Selektiver Serotonin-Wiederaufnahme Inhibitor (SSRI), der erstmals 1974 beschrieben wurde. Es war der zweite zugelassene SSRI nach Zimelidin (Wong et al., 1995/erratum 1997, Owens, 2004). Das Patent wurde dem Konzern Eli Lilly 1975 erteilt. 1988 wurde das Medikament unter dem Namen Prozac® in den USA eingeführt. Seitdem hat das Präparat insbesondere in den USA und Großbritannien eine Erfolgsgeschichte als „Wundermittel“ durchlaufen. Es gilt aufgrund seiner antriebssteigernden Wirkung auch als Yuppie-Droge. In den USA wird die Anzahl der Prozac®-Konsumenten auf 20 Millionen geschätzt.
In Deutschland war der Stoff unter dem Namen Fluctin® zwei Jahre später erhältlich. Laut Arzneimittelverordnungsreport 2007 wurden in Deutschland im Jahre 2007 272,2 Millionen definierter Tagesdosen (DDD) an selektiven Serotonin-Wiederaufnahmehemmern (SSRI) verordnet. Davon entfielen 37,1 Millionen DDD auf den Wirkstoff Fluoxetin (Kaunzinger et al., 2008).

Chemische Daten

Fluoxetin ist ein fast weißes, kristallines Pulver. Der IUPAC-Name lautet: (RS)-N-Methyl-3-phenyl-3-(4-trifluormethyl phenoxy)propylamin. Die molare Masse beträgt 309,33 g*mol^{-1}, die Summenformel lautet $C_{17}H_{18}F_3NO$ (Abb. 2).

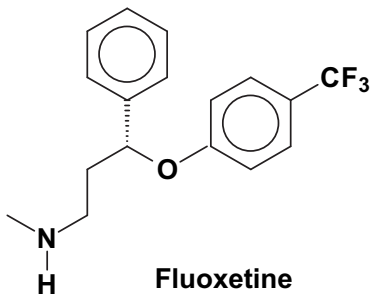

Abb. 2: Strukturformel Fluoxetin [Nencetti et al., 2011]

Indikationen und Dosierung

Fluoxetin wird bei Erwachsenen eingesetzt bei folgenden ICD-10 Diagnosen:
F 32 (Depressive Episode, F 42 (Zwangsstörungen) und F 50 (Bulimie)
Die Indikationen für Kinder ab 8 Jahren und Jugendliche für den SSRI sind mittelgradige bis schwere depressive Episoden (Kölch et al., 2008, Lilly Fachinformation Fluctin®, Stand November 2009, EMEA, 2006).
Die Dosierung liegt bei Kindern bei 10-20 mg/d. Der therapeutische Wirkspiegel wird mit 100 bis 300 µg/l (Kootstra-Ros et al., 2006) angegeben.

Wirkmechanismen

Als selektiver Serotonin-Wiederaufnahmeinhibitor (SSRI) hemmt Fluoxetin die Wiederaufnahme von Serotonin in das präsynaptische Neuron über die Inhibition des präsynaptischen Transportermoleküls. Die Inhibitionskonstante K_i liegt bei 0,008 µM. In deutlich höherer Dosierung kann Fluoxetin auch die Noradrenalin- (K_i = 0,25 µM) bzw. Dopamin- (K_i = 4,5 µM) Wiederaufnahme hemmen (Wong et al., 1995). Die im menschlichen Serum gemessenen Fluoxetinkonzentrationen liegen noch etwas höher bei etwa 1 µM (Kölch et al., 2012). Die Hemmung der Wiederaufnahme erfolgt bereits wenige Minuten nach der Medikamenteneinnahme (Lee et al., 2010, Manji et al., 2001). Der klinische Effekt lässt sich jedoch frühestens

nach zwei bis vier Wochen beobachten (Nestler et al., 2002, Delgado, 2004, Ampuero et al., 2010). Daraus lässt sich schließen, dass die Transporterinhibition nicht die einzige Wirkung darstellen kann. Es wird davon ausgegangen, dass nachgeschaltete Mechanismen auf Genregulationsebene den klinischen Effekt steuern.

Fluoxetin kann bei einer Anwendung über längere Zeit im Tierexperiment mit Ratten, hier beispielsweise über 21 Tage, die Zellproliferation im Hippocampus steigern (Kodama et al., 2004, Malberg et al., 2000) und dazu führen, dass das bei depressiven Patienten verringerte Hippocampusvolumen zunimmt. Dies geschieht vermutlich durch antiapoptotische und sogar Neurogenese-fördernde Prozesse (Vollmayr et al., 2007, Fuchs et al., 2007). Die Arbeitsgruppe um Malberg postulierte 2000, dass die im Hippocampus durch längerfristige Fluoxetinbehandlung neu entstandenen Zellen zu reifen Neuronen maturieren und in die bestehenden neuronalen Schaltkreise eingegliedert werden, wodurch die funktionelle Kapazität dieser Struktur vergrößert wird. Diese Prozesse scheinen sowohl durch *second messenger* wie cAMP und damit Aktivierung des nachgeschalteten Signalweges über Genregulation als auch durch direkte Aktivierung der Serotonintransporter eingeleitet zu werden (Duman et al., 1998).

Die Substanz scheint aber auch sowohl in neuronalen Primärzellen als auch in Tumorzelllinien den programmierten Zelltod (=Apoptose) auslösen zu können (Schaz et al., 2010, Lee et al, 2010, Cloonan und Williams, 2010). Cloonan und Williams konnten nachweisen, dass bei einer Fluoxetinkonzentration von 50 µM 60-70 % der Tumorzellen durch Apoptose absterben. Dies geschah sowohl Caspasen-abhängig als auch -unabhängig. Fluoxetin führte zu einem erhöhten Calciumeinstrom in die Tumorzellen, wodurch der alternative Apoptoseweg getriggert wurde.

Bei Jugendlichen zeigte sich in klinischen Beobachtungen kurze Zeit nach Beginn einer SSRI-Therapie eine erhöhte Suizidalität, weshalb es 2004 eine Blackbox-Warnung der FDA gab (Gentile, 2010, Whittington et al., 2004). Da dies besonders Jugendliche betraf, stellt sich die Frage, ob durch die verstärkten cerebralen Maturierungsprozesse in der Adoleszenz Fluoxetin andere Wirkungen verursacht als im Kindes- und späteren Erwachsenenalter. Möglicherweise kann Fluoxetin das Pruning und Sprouting der Neurone beeinflussen. Unterschiedliche Arzneimittelwir-

kungen können auch auf jeweils unterschiedliche Relationen von Körperfett zu Körperwasser bei Kindern, Jugendlichen und Erwachsenen zurückzuführen sein und sind dosisabhängig. Auch ist der Stoffwechsel altersabhängig unterschiedlich weit entwickelt. Beispielsweise ist die Enzymaktivität der Cytochrom P 450 Enzyme, die unter anderem für die Verstoffwechselung von Fluoxetin verantwortlich sind, je nach Alter unterschiedlich gut ausgebildet. Weiterhin variiert die Nierenfunktion und die damit verbundene Clearance stark, abhängig vom Alter (Kearns et al., 2003).

1.3. Johanniskraut *(Hypericum perforatum L.)*

Historisches



Abb. 3: Blühendes Johanniskraut [1].

...„das sol ietlicher arzt wissen / das got ein groß arcanum in das kraut gelegt hat / alein von wegen der geister und dollen fantasien / die den menschen in verzweiflung bringen - und nicht durch den teufel / sondern durch natur / wan got zu allen krankheiten arznei beschaffen / wie sie sind / alein das der arzt lerne / such und wisse / in welchen ein ietliches sei.“

*(*Aus: „*Von den natürlichen Dingen“* von Paracelsus, 1525. zitiert nach *Frohn, 2007)*



Abb. 4: Johanniskraut [2].

Johanniskraut zählt zu den am längsten bekannten Heilkräutern in Europa. Schon vor mehr als 2000 Jahren in der Antike und später im Mittelalter fand es Verwendung. Hippokrates, Plinius und auch Galen beschrieben es im Zusammenhang mit Behandlungen teuflischer Besessenheit (Czygan 2003, Reichling et al., 2003, Saller et al., 2003).

Allgemeines

Das Kraut ist eine gelb blühende, in ganz Europa, Westasien und Nordafrika heimische Pflanze und zählt zu den Hartheugewächsen (Linde 2009, Wurglics und Schubert-Zsilavecz 2006, Pahlow 1993). Sie wird zwischen 20 und 80 cm hoch und wächst bevorzugt auf trockenen Böden (Reichling et al., 2003). Der Name „Johanniskraut“ rührt vermutlich daher, dass die Pflanze um den 24. Juni, dem Namenstag Johannes des Täufers, zu blühen beginnt (Langosch et al., 2002). Es wird auch „Johannisblut“ genannt, denn wenn man die Blüten zwischen den Fingern zerreibt, tritt ein dunkelroter Saft aus (Frohn 2007). Der botanische Name der Pflanze lautet *Hypericum perforatum*. Der Gattungsname *Hypericum* setzt sich aus den griechischen Begriffen „*Hype*r“ = über und „*eikon*“ = Bild zusammen. Angeblich stammt die Bezeichnung daher, dass das Kraut in der Antike über Götterbilder gehängt wurde um vor bösen Geistern zu schützen. Der Artname „*perforatum*“ bedeutet „durchlöchert“. Hält man ein Blatt der Pflanze gegen das Licht, meint man punktförmige Löcher zu erkennen. In Wirklichkeit sind diese Löcher Drüsen, die ätherisches Öl und Harz enthalten und demzufolge lichtdurchlässiger sind als andere Stellen des Blattes (Czygan 2003, Bilia et al, 2002, Di Carlo et al., 2001).

Inhaltsstoffe, die aus dem blühenden Kraut extrahiert werden konnten, sind unter anderem Naphthodianthrone (Hypericin, Pseudohypericin), Xanthone, Phenolcarbonsäuren (Chlorgensäure, Kaffeesäure, Ferulasäure, Gentisinsäure), Flavonoide (Rutin, Quercetin, Hyperosid, Biapigenin), Acylphloroglucinderivate (Hyperforin, Adhyperforin), Procyanidine, Gerbstoffe und ätherisches Öl.

Anwendungsgebiete

Die Anwendungsgebiete für Johanniskraut sind in der historischen, volkstümlichen Medizin weit gefächert. In verschiedenen Darreichungsformen wie äußerlich angewendetes Johanniskrautöl, Tinkturen, Tees und wässrig-alkoholische Extrakte

finden sie Verwendung bei der Behandlung von Wunden, Durchfällen, Schleimhautschäden, Malaria, Hautinfektionen und Neuralgien (Saller et al. 2003, Butterweck 2003).

In unserer Zeit erlebt die traditionsreiche Heilpflanze aufgrund ihrer antidepressiven Wirkung eine Renaissance. Es wird auch „Prozac® aus dem Königreich der Pflanzen“ (Di Carlo et al., 2001) oder „natürliches Prozac®“ (Zanoli, 2004) genannt (Anmerkung: „Prozac®“ ist der amerikanische Handelsname für Fluoxetin). Seit Jahrzehnten werden zur Behandlung von leichten bis mittelschweren Depressionen wässrig-alkoholische Johanniskrautextrakte eingesetzt. 2003 wurden in Deutschland über 100 Millionen definierte Tagesdosen verschrieben (Daily defined doses, DDD) (Wurglics und Schubert-Zsilavecz 2006), die insgesamt abgegebene Menge wird auf das Doppelte geschätzt. Auch in der Kinder- und Jugendpsychiatrie werden sie sehr häufig verschrieben (Kölch et al., 2006, Kölch et al., 2010, Fegert, 2012). Eine Untersuchung des Allensbachinstitutes aus dem Jahr 2010 konnte zeigen, dass mehr als zwei Drittel der Deutschen schon einmal auf Naturheilmittel zurückgegriffen haben. Noch vor dreißig Jahren traf dies gerade einmal für die Hälfte der deutschen Bevölkerung zu. In dieser Studie konnte auch erhoben werden, dass die Befragten das Risiko von Nebenwirkungen naturheilkundlicher Medikamente deutlich geringer einstufte als das chemisch-pharmazeutischer Arzneimittel. (IfD Allensbach, 2010)

Dosierung

Der übliche Dosierungsbereich von Johanniskrautextrakt liegt bei 200-1200 mg/Tag je nach Präparat (Röder et al., 2004).

Das in dieser Arbeit untersuchte Neuroplant® Aktiv, Filmtabletten Dr. Willmar Schwabe wird in der Regel mit 600 mg/Tag dosiert (Fachinformation Neuroplant® Aktiv).

Wirkmechanismen

Der klinische antidepressive Effekt von Johanniskrautpräparaten scheint auf der Transporterblockade verschiedener Monoamintransporter zu beruhen.

In vitro bewirken Johanniskrautextrakte eine Hemmung der synaptosomalen Aufnahme der Neurotransmitter Serotonin, Noradrenalin, Dopamin, γ-Aminobuttersäure (GABA) und L-Glutamat, sowie eine Blockade der Monoaminoxidase (But-

terweck, 2003). Verantwortlich für die Wirkung scheinen sowohl die beiden Einzelkomponenten Hypericin und Hyperforin (s. Abb. 5) als auch der Gesamtextrakt mit weiteren Bestandteilen wie beispielsweise Flavonoiden, Rutosid und Procyanidinen als Vielstoffgemisch zu sein (Reichling et al., 2003).

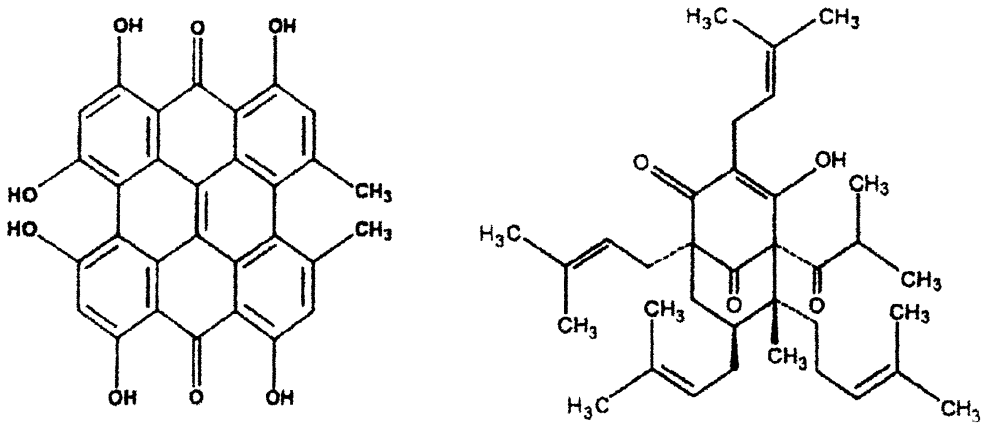

Abb. 5: Strukturformeln von Hypericin (links) und Hyperforin (rechts). [Hostanska et al., 2003]

Zusätzlich zur Transporterblockade wurde beobachtet, dass die beiden Bestandteile Hyperforin und Hypericin synergistisch inhibitorisch auf das Leukämiezellwachstum wirken (Hostanska et al., 2003, Reichling et al., 2003). Hostanska et al. konnten zeigen, dass Hyperforin in einer Dosierung von 10 µM (entspricht 5 µg/ml) zu einer Apoptoserate von 68 % der behandelten Zellen führt. Den maximalen apoptotischen Effekt erzielte eine Hyperforinkonzentration von 50 µM. In höheren Dosierungen (100 µM) nahm der Anteil apoptotischer Zellen zugunsten nekrotischer Zellen ab. Bei 200 µM konnte keine Toxizität beobachtet werden, es kam weder zur Apoptose noch zur Nekrose der Zellen. Ein Erklärungsansatz für diese Beobachtung oder ein möglicher zugrunde liegender Mechanismus für die fehlende Toxizität hoher Hyperforinkonzentrationen wird durch die Arbeitsgruppe nicht weiter erläutert. In weitergehenden Experimenten konnte die Arbeitsgruppe zeigen, dass die durch Hyperforin verursachten Apoptosevorgänge Caspasen-abhängig sind.

Die halbmaximale Konzentration, die für die antiproliferative Aktivität, bezogen auf Leukämiezellen (ca. 15-20 µM) und neuronale Zellen (etwa 100 µM), benötigt wurde, lag höher als für die neurochemische Aktivität in Bindungsstudien. In letztgenannten Untersuchungen lag die halbmaximale Hemmkonzentration für die sy-

naptosomale Wiederaufnahme der Neurotransmitter zwischen 80 nM und 800 nM (Reichling et al., 2003).

1.4. Ziel der Arbeit

Bis dato fand in der Psychopharmakologie wenig Berücksichtigung, dass die Maturierung des Gehirns bis ins dritte Lebensjahrzehnt anhält und deshalb Kinder anders auf Psychopharmaka reagieren als Jugendliche und Jugendliche anders reagieren als Erwachsene. Für die Zulassung von Psychopharmaka wird in den USA seit den 1990er Jahren, in der EU erst seit etwa 10 Jahren gefordert, auch Entwicklungseffekte zu untersuchen und Kinder und Jugendliche in die klinischen Studien einzuschließen (Kölch et al., 2010).

In der Gehirnentwicklung wird dem Serotoninstoffwechsel eine entscheidende Rolle zugeschrieben (Ansorge et al., 2004). Sowohl Fluoxetin als auch Johanniskrautextrakt wirken auf den Serotoninstoffwechsel. Die genauen Wirkmechanismen dieser bei Kindern und Jugendlichen eingesetzten Antidepressiva sind jedoch nicht vollständig bekannt. Außerdem existieren nur wenige Daten über die Auswirkungen der Medikamente auf das sich entwickelnde Gehirn. In *in vitro*- und tierexperimentellen Studien lassen sich zellbiologische Effekte der applizierten Substanzen untersuchen.

In dieser *in vitro*-Studie sollte untersucht werden, ob der bereits von der Arbeitsgruppe gezeigte Apoptose-induzierende Effekt von Fluoxetin (Schaz et al., 2010) vom Entwicklungsstadium der neuronalen Zellen abhängig ist. Außerdem sollte erforscht werden, ob sich für Johanniskraut ähnliche Effekte beobachten lassen. Die interessierenden Parameter hierfür waren die Viabilität und die Morphologie der Zellen nach mehrtägiger Behandlung mit dem jeweiligen Medikament in unterschiedlichen Entwicklungsstadien.

Hypothesen:

1. Abhängig vom Entwicklungsstadium reagieren primäre neuronale Zellen *in vitro* unterschiedlich auf die Behandlung mit der getesteten Substanz. Je weniger ausgereift die neuronalen Zellen, desto sensibler reagieren sie auf die Zufuhr der Substanz Fluoxetin und des Substanzgemisches Johanniskrautextrakt.

2. Die Wirkmechanismen sind dosisabhängig, das heißt höhere Dosen zeigen stärkere Effekte als niedrigere Dosen.
3. Kortikale und hippocampale neuronale Zellen reagieren unterschiedlich auf die applizierten Substanzen.

2. Material und Methoden

2.1. Materialien

2.1.1. Chemikalien und biochemische Reagenzien

Die eingesetzten Chemikalien der Firma Sigma-Aldrich (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim) waren von analytischem Reinheitsgrad. Die Herkunft von Produkten anderer Firmen wird bei der Erwähnung im Methodenteil angegeben.

2.1.2. Verbrauchsmaterialien

Combi-Tipps (Eppendorf, Hamburg)
Deckgläschen 13 mm (VWR, Darmstadt)
Gefrierröhrchen 1,8 ml (Nunc, Wiesbaden)
Neubauer-Zählkammer (Brand, Wiesbaden)
Objektträger (Thermo Scientific, Menzel-Gläser, Braunschweig)
Parafilm (Roth, Karlsruhe)
Petrischalen 94 mm (greiner bio-one, Frickenhausen)
Pipettenspitzen 5 µl, 10 µl, 100 µl, 200 µl, 1 ml (Eppendorf, Hamburg)
Reaktionsgefäße 0,5 ml, 1,5 ml, 2 ml (Eppendorf, Hamburg)
Sterilfilter 0,2 µm cellulose acetate (VWR, Darmstadt)
Spritzen 2 ml (Braun Meisungen AG, Meisungen)
Zellkulturflaschen 25 cm^2 und 75 cm^2 (Nunc, Wiesbaden)
Zellkulturplatten 24 und 96 well (Nunc, Wiesbaden)
Zentrifugen-Falcons 15 ml und 50 ml (Nunc, Wiesbaden)

2.1.3. Geräte

Bechergläser (50, 100, 500, 1000 ml; Schott, Mainz)
Eismaschine (Ziegra, Isernhagen)
Heraeus-Zentrifuge (Heraeus-Kendro, Hanau)
Inkubator (37 °C- Zellkultur; Heraeus-Kendro, Hanau)

Kühlschrank (Liebherr, Ochsenhausen)
Mehrkanalpipette 300 (Eppendorf, Hamburg)
Messpipetten AR-Glas 5 ml, 10 ml (BLAUBRAND®, Wertheim)
Mikroskop (Zeiss, Oberkochen)
Multipette plus (Eppendorf, Hamburg)
Pasteurpipetten (WU, Mainz)
Pipettboy (Hirschmann, Eberstadt)
Pipetten (P10; P20; P100; P200; P1000; Eppendorf, Hamburg)
Spektrophotometer (Multiscan RC-352; Labsystems Helsinki, Finnland)
Sterilbank Hera Safe (Heraeus-Kendro, Hanau)
Thermomixer (Eppendorf, Hamburg)
Tiefkühlschrank (Liebherr, Ochsenhausen)
Tischzentrifuge Biofuge pico (Heraeus-Kendro, Hanau)
Vortex/Starkschüttler Heidolph REAX top (Heidolph, Kelheim)
Stickstoffbehälter Cryo 200 (Forma Scientific Inc., Ohio, USA)

2.1.4. Elektronische Datenverarbeitungsprogramme

Adobe CS 5 Photoshop® (Adobe Systems Software Ireland Limited, Dublin, Irland)
Adobe CS 5 Illustrator® (Adobe Systems Software Ireland Limited, Dublin, Irland)
AxioVision® Rel. 4.7 (Zeiss, Oberkochen)
ImageJ Version 1.43
Microsoft® Excel 2007 (Microsoft Corporation, Redmond, Washington, USA)
SigmaPlot ® 11 (Systat Software Inc., San Jose, Kalifornien, USA)
SAS® für PC Version 9.2 (SAS Institute GmbH, Heidelberg)
pages ´09, Version 4.1 (Apple Inc., Cupertino, Kalifornien, USA)

2.2. Methoden der Zellkultur

Die Kultivierung aller Zellen erfolgte unter sterilen Bedingungen bei 37 °C, einer wassergesättigten Atmosphäre von Luft und 5 % CO_2.

2.2.1. Kultivierung eukaryotischer Zelllinien

In dieser Arbeit wurden *Human embryonic kidney* (HEK-293)-Zellen verwendet. Es handelt sich hierbei um menschliche embryonale Nierenzellen, die mit dem Adenovirus 5 transformiert wurden. Allerdings weisen diese Zellen Charakteristika unreifer Neurone auf, weshalb sie sich hier besonders als Vergleichszellen eignen (Shaw et al., 2002). Die Zelllinie stammt aus der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ Braunschweig). Die Kultivierung der HEK-293-Zellen erfolgte in MEM (GIBCO, Karlsruhe), das mit 10 % FKS (fötales Kälberserum, Hyclone, Logan, USA) angereichert wurde. Die Arbeiten wurden steril durchgeführt.
Zweimal pro Woche, bevor die HEK-293-Zellen Konfluenz erreichten, wurden die Zellen passagiert. Dabei wurden die Zellen mit PBS (ohne Ca^{2+} und Mg^{2+}, GIBCO, Karlsruhe) gewaschen und mittels Trypsin/EDTA (Biochrom AG, Berlin) bei 37 °C vom Boden der Kulturflasche abgelöst. Bei der Zugabe von MEM (supplementiert) wurden die Zellen im Verhältnis 1:5, sowie 1:10 für ein Backup in eine neue Flasche passagiert.

2.2.2. Einfrieren eukaryotischer Zelllinien

Gewaschene und anschließend trypsinierte HEK-293-Zellen wurden zentrifugiert (1500 Upm, 2 min, RT). Das Zellpellet wurde in Einfriermedium (MEM mit 20 % FKS, 10 % DMSO und 1 % PenStrep) zu 1.000.000 Zellen/ml resuspendiert. 1 ml Aliquots wurden in Gefrierröhrchen überführt und stufenweise mit Hilfe eines Cryogefäßes (Nalgene, Neerijse, B) auf -70 °C heruntergekühlt. Die weitere Lagerung der Zelllinie erfolgte über flüssigen Stickstoff bei -196 °C.

2.2.3. Auftauen eukaryotischer Zelllinien

Aliquots gefrorener Zellsuspensionen wurden in auf 37 °C vorgewärmtem MEM aufgetaut und resuspendiert. Nach Zentrifugation (1500 Upm, 2 min, RT) wurde der Überstand abgesaugt, die Zellen in MEM (10 % FKS) resuspendiert und anschließend in Kultur gebracht. Nach 24 h wurde ein Mediumwechsel durchgeführt.

2.2.4. Gewinnen von hippocampalen und kortikalen Primärneuronen

Die in dieser Arbeit verwendeten Zellen sind primäre neuronale Zellen eines Auszuchtstammes. Sie wurden der trächtigen Ratte an Embryonaltag 18 (E 18) entnommen. Die natürliche Geburt der Tiere erfolgt an E 21. Zur Gewinnung von embryonalen Zellen wurden trächtige CD-Ratten (Crl:CD(SD), Charles River) an (E18) sakrifiziert. Die Embryone wurden entnommen und dekapitiert. Nach der Präparation der Gehirne wurden diese in eine mit HBSS (PAA, Cölbe) gefüllte Petrischale gelegt. Unter einem Binokular (Schott, Mainz) wurden nach Entfernung der Dura mater die Hippocampi sowie die präfrontalen Kortizes entnommen und diese in je ein 15 ml Falcon mit HBSS überführt. Es wurden alle Hippocampi und Kortizes, die von einem Muttertier stammten, zusammen weiterverarbeitet. Alle weiteren Arbeitsschritte erfolgten unter der Sterilbank. Nach zweiminütigem Zentrifugieren bei Raumtemperatur und 1500 Upm wurde der HBSS-Überstand abgesaugt. Das Zellpellet wurde mit 1800 µl HBSS und 200 µl 2,5 % Trypsinlösung (Biochrom AG, Berlin) überschichtet und für 15 Minuten bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde ein weiteres Mal unter den obigen Bedingungen zentrifugiert und der Überstand abermals abgesaugt. Im nächsten Schritt wurde den Zellen 1600 µl HBSS und 400 µl 0,05 % DNAse I-Lösung zugesetzt, sodass die Endkonzentration der DNAse I-Lösung 0,01 % betrug. Die Inkubation erfolgte für 10 Minuten bei Raumtemperatur. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt bei den oben angegebenen Bedingungen wurde der Überstand abgesaugt und mit der Auflösung des Gewebeverbandes begonnen. Dazu wurden die Zellen in 10 ml DMEM (GIBCO, Karlsruhe) (supplementiert) aufgenommen und 10-fach durch eine 10 ml Glaspipettenspitze (BLAUBRAND®, Wertheim) gezogen. Danach wurde mit der Zellsuspension in einer 5 ml Glaspipettenspitze (BLAUBRAND®, Wertheim) ebenso verfahren. Nach der Bestimmung der Zellzahl mit Hilfe einer Neubauer Zählkammer (Brand, Wertheim) wurde die Zellsuspension auf das gewünschte Endvolumen eingestellt und auf mit Poly-L-Lysin (0,5 mg/ml; Sigma-Aldrich, Taufkirchen) (s.u.) beschichteten Platten kultiviert. Nach 24 h wurde das DMEM vollständig durch Neurobasalmedium (GIBCO, Karlsruhe) (supplementiert) ersetzt.

Poly-L-Lysin:	5 mg	Poly-L-Lysin
	ad 100ml	HBSS Puffer
DMEM supplementiert:	10 %	FKS [v/v]
	2 %	B 27 [v/v]
	1 %	Glutamin [v/v]
	1 %	Penicillin/Streptomycin [v/v]
Neurobasal supplementiert:	2 %	B 27 [v/v]
	1 %	Glutamin [v/v]
	1 %	Penicillin/Streptomycin [v/v]

2.3. Herstellung der applikationsfähigen Testsubstanzen

2.3.1. Fluoxetin

Fluoxetin (Sigma-Aldrich, Taufkirchen) wurde unter sterilen Bedingungen vollständig in Aqua dest. gelöst und in folgenden Konzentrationen appliziert: 1 µM, 5 µM, 10 µM, 20 µM, 30 µM, 40 µM, 50 µM und 75 µM. Kontrollsubstanz war das Lösungsmittel Aqua dest.. Die im Serum gemessenen Konzentrationen von Fluoxetin betragen etwa 1 µM (Koelch et al., 2012), im menschlichen Gehirn konnten spektroskopisch Konzentrationen von bis zu 36 µM gemessen werden (Karson et al., 1993).

2.3.2. Johanniskrautextrakt

Die als antidepressiv wirksam diskutierte Komponente des Johanniskrautextraktes ist Hyperforin. Bei dem verwendeten Johanniskrautextrakt handelt es sich um das Präparat Neuroplant *AKTIV*® (Schwabe, Karlsruhe). Der Extrakt trägt die Bezeichnung WS® 5570 und ist auf den Hyperforingehalt standardisiert. Dadurch kann trotz der pflanzlichen Herkunft des Produktes, das vielen natürlichen Schwankungen unterliegt, der Gehalt an Hyperforin von Charge zu Charge konstant gehalten werden.
Gekennzeichnet ist er durch folgende analytische Daten:

Hyperforin	4,5 %
Gesamt-Hypericin	0,24 %
Rutin	3,0 %

In einer Studie von Laakmann et al. (1998) wurde herausgefunden, dass ein Extrakt mit 5 % Hyperforin eine signifikant effektivere antidepressive Wirkung aufweisen konnte, als ein Extrakt mit nur 0,5 % Hyperforin, weshalb dieses Präparat gewählt wurde. Der Extrakt wurde nach dem Hyperforingehalt eingewogen. Hyperforin ist lichtempfindlich und nicht wasserlöslich. Deshalb wurde der Stoff in Methanol und Dimethylsulfoxid (MeOH/DMSO) im Mischverhältnis 9:1 zur Lösung gebracht. Um ihn applizieren zu können, wurde er unter sterilen Bedingungen und lichtgeschützt in einem Gemisch von Methanol/DMSO (9:1) suspendiert und 5 min gevortext. Anschließend wurde für 5 min bei 5000 Upm und Raumtemperatur zentrifugiert. Der Zentrifugatüberstand wurde sterilfiltriert und mit dem Lösungsmittel MeOH/DMSO (9:1) auf die gewünschten Konzentrationen von Hyperforin herunterverdünnt.
Laut Herstellerangaben liegt die im Serum gemessene therapeutische Dosis von Hyperforin bei 0,3 µg/ml. Die untersuchten Konzentrationen wurden im diesem Bereich gewählt. Außerdem wurden auch sehr hohe Konzentrationen von maximal 25 µg/ml angewandt um herauszufinden, was bei möglicher Überdosierung beobachtet werden kann. Verwendet wurden Hyperforinkonzentrationen von 0,1 µg/ml, 0,3 µg/ml, 1 µg/ml, 3 µg/ml, 10 µg/ml, 15 µg/ml und 25 µg/ml. Als Kontrollen wurden sowohl Aqua dest. als auch das Lösungsmittel MeOH/DMSO (9:1) eingesetzt.
Da sowohl Methanol als auch DMSO zelltoxisch sind, wurde vorab getestet, inwiefern sich das verwendete Lösungsmittel auf die Viabilität der untersuchten Zellen auswirkt. Aus Abb. 6 wird ersichtlich, dass bereits das Lösungsmittel allein zu einer Viabilitätsabnahme aller untersuchten Zellen um etwa 25-35 % im Vergleich zur Wasserkontrolle führt. Aus diesem Grund wurde bei den nachfolgenden Experimenten das Lösungsmittel aus Methanol/DMSO als Kontrollsubstanz verwandt und die Viabilitätswerte darauf bezogen.

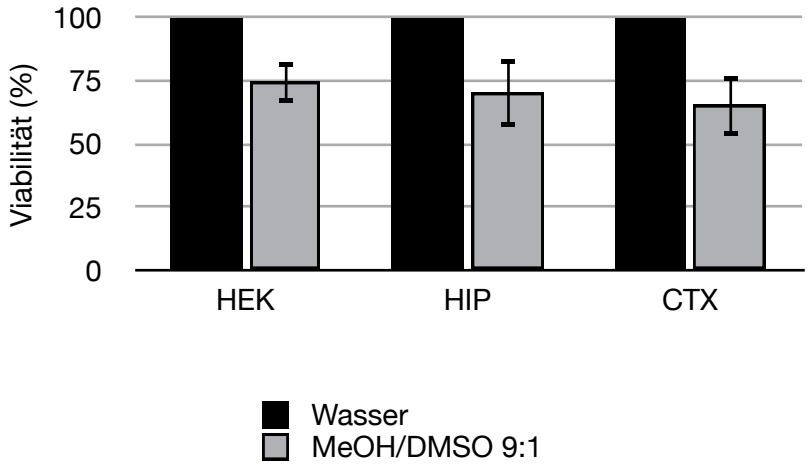

Abb. 6: Einfluss von MeOH/DMSO (9:1) auf die Viabilität von HEK-293-Zellen und primärer neuronaler Zellen im Vergleich zur Wasserkontrolle.
HEK: *human embryonic kidney cells*; HIP: hippocampale Primärzellen; CTX: kortikale Primärzellen; MeOH: Methanol; DMSO: Dimethylsulfoxid.
Alle drei Zellarten wurden für 72 h mit Wasser bzw. mit MeOH/DMSO (9:1) behandelt. Es zeigt sich, dass allein das Lösungsmittel, in dem die relevanten Bestandteile des Johanniskrautextraktes gelöst bzw. suspendiert wurden, die Viabilität der Zellen im Vergleich zur Wasserkontrolle (100 %) um 25-35 % herabsetzt (*n=9*).

2.3.3. Behandlung der Zelllinien

Unter sterilen Bedingungen wurden 96-well Zellkulturplatten mit Hilfe der 8-Kanalpipette (P30-300 µl; Eppendorf, Hamburg) mit 75 µl Poly-L-Lysin/well überschichtet. Dabei wurden nur die inneren 60 Wells beschichtet, die Vertiefungen der äußeren Reihen wurden zum Schutz vor Verdunstung mit HBSS befüllt (s. Abb. 23 im Anhang). Nach Inkubation der Platten für 1 h bei 37 °C wurde der PLL-Überstand abgenommen, die Platten wurden dreimal mit Aqua dest. und einmal mit HBSS (PAA, Cölbe) gewaschen und bis zum Gebrauch steril gelagert.
Die HEK-293-Zellen wurden wie in 2.2.1 beschrieben vom Boden der Zellkulturflaschen gelöst, in ein 50 ml Falcon überführt und davon 10 µl der Zellsuspension in die Neubauer Zählkammer gegeben, mit Hilfe dieser wurde die Zellzahl bestimmt. Der Rest der Zellsuspension wurde im 50 ml Falcon zentrifugiert (1500 Upm, 2 min, RT).
Nach Zentrifugation wurde der Überstand abgesaugt und dann mit soviel Medium aufgefüllt, das pro 1 ml Zellsuspension 1 Mio. Zellen enthalten waren. In 60 Wells der 96-well Platte wurden mit Hilfe der 8-Kanalpipette je 200 µl der Zellsuspension gegeben. Für ein Wachstum der Zellen über 3 Tage 30 000 Zellen pro ml ausgesät, für ein Wachstum über 4 Tage 20 000 Zellen pro ml.

Die HEK-293-Zellen wurden nach einem Wachstum auf 96-well-Platten von 3 oder 4 Tagen für 24, 48, 72 oder 96 h mit unterschiedlichen Hyperforinkonzentrationen behandelt. Auf der 96-well Platte wurden in willkürlicher Reihenfolge 2 Reihen (1 Reihe≙6 Wells; pro Well 10 µl) mit Kontrollen (MeOH/DMSO 9:1 bzw Aqua dest.) und jeweils eine Reihe mit der jeweiligen Substanzkonzentration behandelt. Danach wurden die behandelten Zellen für die entsprechende Behandlungszeit inkubiert.

2.3.4. Behandlung der primären hippocampalen und kortikalen neuronalen Zellen mit Johanniskrautextrakt und Fluoxetin

Zunächst wurden 96-well Zellkulturplatten wie in 2.3.3. beschrieben mit 75 µl Poly-L-Lysin und 24-well Zellkulturplatten mit 13 mm Deckgläschen mit 500 µl Poly-L-Lysin überschichtet. Nach Inkubation der Platten für eine Stunde bei 37 °C wurde das Poly-L-Lysin abgenommen und die Platten 3-mal mit Aqua dest. und einmal mit HBSS gewaschen und bis zum Gebrauch steril gelagert. Die hippocampalen und kortikalen neuronalen Zellen wurden in die 96-well Platten mit einer Endkonzentration von 175 000 Zellen/ml und in die 24-well Platten mit einer Endkonzentration von 80 000 Zellen/ml gegeben. Nach 24 h wurde das DMEM in den 24-well Platten vollständig und in den 96-well Platten 150 µl des DMEM durch Neurobasalmedium (GIBCO, Karlsruhe), supplementiert, (s.o.) ersetzt, um das Wachstum von Gliazellen weitgehend zu unterdrücken.

An den Tagen *in vitro* (DIV) 0, 5, 10, 21 wurden die 96-well und 24-well Zellkulturplatten für 72 h mit verschiedenen Hyperforin- oder Fluoxetinkonzentrationen behandelt. Auf der 96-well Platte wurden in willkürlicher Reihenfolge 2 Reihen (1 Reihe≙6 Wells; pro Well 10 µl) mit Kontrollen (MeOH/DMSO (9:1) bzw. Aqua dest.) und jeweils eine Reihe mit der jeweiligen Substanzkonzentration behandelt. Danach wurden die behandelten Zellen für 72 h zurück in den Brutschrank gestellt. Auf der 24-well Platte wurden 15 bzw. 12 Deckgläschen mit jeweils 25 µl Johanniskrautextrakt unterschiedlicher Hyperforinkonzentrationen oder Fluoxetin in verschiedenen Konzentrationen behandelt.

Hyperforin: je 3 Deckgläschen mit 0,3 µg/ml, 3 µg/ml, 25 µg/ml, Wasserkontrolle und MeOH/DMSO-Kontrolle

Fluoxetin: je 3 Deckgläschen mit 10 µM, 20 µM, 75 µM und Kontrolle.

2.3.5. „Rescue“-Versuch

Nach Beobachtung des Kurvenverlaufs der Zellviabilitätskurve bei Behandlung der untersuchten Zellen mit Johanniskrautextrakt (s. Ergebnisteil, Kapitel 3.1.2.) wurde ein sog. „Rescue-Versuch“ durchgeführt. Ziel war es, herauszufinden, ob HEK-293-sowie kortikale Zellen in der Lage sind, ihre Viabilität durch Auftitrieren der Hyperforinkonzentration zu steigern.
Für dieses Experiment wurden die Zellen auf 96-well-Platten ausgesät wie oben beschrieben (s. 2.3.2 bzw. 2.3.3.). Die HEK-293-Zellen wurden wie in 2.2.1 beschrieben vom Boden der Zellkulturflaschen gelöst und auf die 96-well-Platten gesät. Für ein Wachstum der Zellen über 3 Tage wurden 30 000 Zellen pro ml ausgesät, für ein Wachstum über 4 Tage 20 000 Zellen pro ml. Die Behandlung erfolgte für die HEK-293-Zellen 3 bzw. 4 Tage nach Aussaat, bei den kortikalen Zellen an DIV 5. Die Erstbehandlung wurde durchgeführt mit Hyperforinkonzentrationen von 1, 3 und 25 µg Hyperforin/ml. Nach einer Inkubationszeit von 72 h wurde die Hyperforinkonzentration in der Hälfte der mit 1 und 3 µg Hyperforin/ml behandelten Wells auf insgesamt 25 µg Hyperforin/ml erhöht (Rescue). Die andere Hälfte der Wells sowie die Wells, die bereits zu Beginn eine Konzentration von 25 µg Hyperforin/ml erhielten, wurden nur mit Vehikel behandelt (Kontrolle). 24 h nach dieser zweiten Behandlung wurde ein MTT-Assay durchgeführt.

2.4. Zytotoxizitätstest mittels MTT-Assay

Der MTT-Assay (MTT = 3 [4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5-Diphenyltetrazolium Bromid) dient der Bestimmung der metabolischen Aktivität von Zellen durch Reduktion eines Ammoniumsalzes (Ludolph et al., 2006). Bei intakten Zellen erfolgt die Reduktion des gelben Farbstoffes durch mikrosomale Enzyme, die reduzierte Pyridinnukleotide (NAD, NADP) benötigen. Außerdem kann Succinat über die Succinatdehydrogenase als Elektronendonor agieren (Berridge et al., 1996). Die Menge des gebildeten blauen Formazanfarbstoffes ist proportional zur Anzahl lebender Zellen. Die Farbstoffintensität wird mittels ELISA kolorimetrisch bestimmt (Mosmann, 1983).
Für Experimente mit den Zelllinien wurden 30 000 bzw. 20 000 Zellen/ml in 96-well Zellkulturplatten ausgesät und drei bzw. vier Tage kultiviert. Anschließend erfolgte die Behandlung mit Fluoxetin oder Johanniskrautextrakt. Am Ende der Behand-

lungsdauer wurden mit der Multipette (Eppendorf, Hamburg) in jedes Well 20 µl MTT-Lösung (100 mg MTT gelöst in 20 ml 1 mM HEPES in PBS) pipettiert und anschließend 90 min bei 37° C inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde der Zellüberstand abgenommen und die Platten 10 min im Trockenschrank bei 65 °C getrocknet. Nach dem Trocknen wurden pro Well 100 µl 2-Propanol zugegeben um den Farbstoff aus den Zellen herauszulösen.
Anschließend wurde im Spektrophotometer (Mutiscan RC-351; Labsystem Helsinki, Finnland) die Extinktion bei einer Wellenlänge von 570 nm gegen den Referenzwert von 620 nm gemessen.

2.5. Immunzytochemie

Nach Abnahme des Mediums wurden die Zellen auf den Deckgläschen einmal mit PBS gewaschen und dann 10 min bei 37 °C mit 4 % PFA fixiert. Anschließend wurde das PFA abgenommen und die Zellen dreimal für jeweils 5 min mit PBS gewaschen. Die weiteren Schritte erfolgten in einer feuchten Kammer. Zuerst wurde 30 min bei RT mit der Blockierlösung inkubiert, dann wurde der 1. Antikörper, verdünnt in Blockierlösung, für 1 h zugegeben. Im nächsten Schritt wurden die Zellen wieder dreimal für jeweils 5 min mit PBS gewaschen. Mit dem 2. Antikörper, ebenfalls verdünnt in Blockierlösung, wurden die Zellen für 1 h im Dunkeln inkubiert. Nach erneutem Waschen mit PBS wurde für 1 min DAPI 1:2000 verdünnt in PBS auf die Zellen gegeben. Anschließend wurde noch einmal in PBS und Aqua dest. gewaschen bevor die Zellen in einer Vekta Mount™-Lösung (Vector Laboratories, Burlingham) eingedeckelt und bei Raumtemperatur im Dunkeln gelagert wurden.

Primäre Antikörper:
Anti-Bassoon mouse (Stressgen/Biomol, Hamburg) 1:800
Anti-Bassoon rabbit (Synaptic Systems, Göttingen) 1:1000

Anti-MAP2 mouse (Chemicon International, Hofheim) 1:500
Anti-MAP2 rabbit (Chemicon International, Hofheim) 1:1000

Sekundäre, Fluoreszenz-gekoppelte Antikörper:
Alexa Fluor 488 Anti-Kaninchen (Molecular Probes, Eugene, USA) 1:1000
Alexa Fluor 568 Anti-Maus (Molecular Probes, Eugene, USA) 1:1000
Alexa 568 gekoppeltes Phalloidin (Molecular Probes, Eugene, USA) 1:600

Fluoreszenzfarbstoff für die Anfärbung des Zellkerns: DAPI 1:2000

PFA 4 %:
20 g Paraformaldehyd (PFA) wurden zusammen mit 200 ml Aqua dest. auf 60 °C erwärmt und bis zur Löslichkeit mit 5N NaOH versetzt. Die klare Lösung wurde abgekühlt, in Reaktionsgefäße zu 1 und 2 ml gefüllt und bei -20 °C gelagert.

2x PBS:

5,736 g	$Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$
0,6 g	$NaH_2PO_4 \cdot H_2O$
9,0 g	NaCl
ad 500 ml	Aqua dest.

10x PBS pH 7,4:

80,0 g	NaCl
2,4 g	KH_2PO_4
14,4 g	Na_2HPO_4
2 g	KCl
ad 1000 ml	Aqua dest.

Blockierlösung:

2,0 g	BSA
1,0 ml	Pferdeserum
1,0 ml	Triton X 10 %
ad 100 ml	1x PBS

2.5.1. Morphologische Analyse

Die Immunfluoreszenzbilder wurden in der 400 x Vergrößerung mit dem Fluoreszenzmikroskop (Axioskop, Zeiss, Oberkochen) und der AxioVision Rel.4.7 Software (Zeiss, Oberkochen) aufgenommen.
Die Auszählung der Neuriten und die Bestimmung der Synapsendichte hippocampaler Neurone erfolgte verblindet.

2.5.2. Bestimmung der Anzahl der Neuriten

Die Anzahl der Neuriten eines Neurons wurde an Anti-MAP-2 gefärbten Neuronen bestimmt. Die Zellen wurden mittig im Bildausschnitt platziert und bei 400 x Vergrößerung mit dem Fluoreszenzmikroskop (Axioskop, Zeiss, Oberkochen) und der AxioVision Rel. 4.7 Software (Zeiss, Oberkochen) aufgenommen. Zur Auszählung der Neuriten wurden die Aufnahmen mit Image J geöffnet und die Primär-, Sekundär- und Tertiärneuriten dort verschieden farbig markiert und damit voneinander unterschieden und ausgezählt. Es wurde definiert: ein primärer Neurit geht direkt vom Zellkörper ab, ein sekundärer Neurit geht von einem primären Neurit ab, ein tertiärer Neurit geht von einem sekundären Neurit ab (Ludolph et al., 2006). Es wurden zu jedem Behandlungszeitpunkt insgesamt 10 Zellen (5 behandelte Zellen im Vergleich zu Kontrollzellen) ausgewertet.

2.5.2 Bestimmung der Synapsendichte

Die Synapsen der Neurone wurden nach der Fluoreszenz-Immunfärbung mit Bassoon an fünf primären Neuriten (je DIV 0, 5, 10 und 21) ausgezählt. Die Länge des untersuchten Neuriten-Abschnitts wurde mit Hilfe der Image J 1.43 Software gemessen. Die Synapsendichte wurde aus dem Quotienten der Anzahl der Synapsen und der Länge des Abschnitts ermittelt und als Synapsenanzahl/10 µm angegeben.
Es wurden jeweils n=5 Zellen pro Behandlungszeitpunkt ausgezählt.

2.6. Versuchsplanung und -durchführung

Eine tabellarisch dargestellte Zusammenfassung der Versuchsplanung und -durchführung ist dem Anhang zu entnehmen (s. Kapitel 7.1).
Insgesamt wurden für die MTT-Assays sowohl bei den Zelllinien als auch bei den primären hippocampalen und kortikalen Zellen jeweils sechs Platten ausgewertet. Bei den Primärzellen setzen sich die Wiederholungen so zusammen, dass für jeden Behandlungszeitpunkt jeweils aus drei Ratten 2 Platten ausgewertet wurden.

2.7. Darstellung der Messergebnisse und statistische Analyse

Die Ergebnisse der Experimente der MTT-Assays sind als Prozente der mit Vehikel behandelten Kontrollen dargestellt. Als Formel diente hierbei: Zellviabilität (%)= (OD(Testwell)/OD(Kontrollwell)) x 100 %. Es werden Boxplots gezeigt, die durch das Programm SAS Version 9.2 für PC erstellt wurden. Des weiteren werden die 95 %-Konfidenzintervalle des Vergleiches unterschiedlicher Viabilitätswerte an unterschiedlichen Behandlungstagen und Medikamenten-konzentrationen gezeigt. Mittels SigmaPlot® wurde die mittlere effektive Konzentration (EC_{50}) berechnet. Dazu wurde die Gleichung für logistische Funktionen für 3 Parameter verwendet und Regressionskurven erstellt. Diese Kurven sind im Kapitel 7.2. im Anhang zu finden.

2.7.2. Statistische Analyse

Einführung

Ziel dieser Arbeit ist es, eine Aussage darüber zu treffen, ob die Wirkung der beiden untersuchten Antidepressiva Fluoxetin und Johanniskrautextrakt entwicklungsabhängig erfolgt. Das heißt, es soll untersucht werden, ob weniger weit entwickelte neuronale Primärzellen auf die Behandlung mit dem jeweiligen Medikament in Bezug auf die Zellviabilität, Neurito- und Synaptogenese anders reagieren als weiter entwickelte.
Die vorliegende Arbeit ist mehrteilig und vorrangig deskriptiv und explorativ ausgerichtet.

Deskription: Es wurden 6 Wiederholungen, verteilt auf 3 Tiere, und pro Konzentration je 8 Beobachtungen durchgeführt. Die Beobachtung erfolgte zu 4 verschiedenen Zeitpunkten.

Zur Beschreibung der Daten werden geeignete statistische, einschließlich graphische Mittel eingesetzt. Die stetigen Parameter Viabilität, Neuritenanzahl und Synapsendichte werden vorrangig parameterfrei mit Minimum, 1. Quartil, Median, 3. Quartil und Maximum (Min, Q1, Median, Q3, Max) und parametrisch mit Mittelwert und Standardabweichung (MW ± s) dargestellt sowie unter Verwendung von 95 %-Konfidenzintervallen (95 % KI) beschrieben bzw. verglichen. Eine Darstellung erfolgt mittels Boxplots (von min bis max).

Qualitative Merkmale, wie z.B. Zellytp, Zellalter am Behandlungszeitpunkt werden mit absoluten bzw. relativen Häufigkeiten dargestellt.

Induktion:

Für den gleichzeitigen (multiplen) Vergleich zwischen einer stetigen Zielgröße, z. B. der Viabilität und mehreren Einflussgrößen, wie z. B. Zelltyp, Zellalter zum Behandlungszeitpunkt, Medikamentenkonzentration, werden hier gemischte lineare Modelle als Verallgemeinerung von Regressions- und varianzanalytischen Modellen gerechnet. Mit diesem Verfahren kann man den linearen Zusammenhang zwischen Zielgröße und den Einflussgrößen erfassen, der sich allgemein mit nachstehender Formel 1 darstellen lässt:

Formel 1: $\mathbf{E(Y) = \beta 0 + \beta 1X1 + \beta 2X2 + ...+ \beta nXn + \varepsilon}$

E(Y)	(Erwartungswert der) Zielgröße
ßo	Y-Achsenabschnitt, Intercept
ß1...ßn	Regressionskoeffizienten
X1...Xn	Einflussgrößen
ε	Zufallsfehler, Restvariabilität

Diese Modelle erlauben die gleichzeitige Berücksichtigung sowohl von Co-Variaten (stetige Einflussgrößen) als auch Faktoren (qualitative Merkmale). Darüber hinaus erlauben sie z.B.:

- Die Berechnung von festen (fixen) und zufälligen (random) Effekten. Die zufälligen Effekte lassen eine verallgemeinerte Aussage zu, da versucht wird, über die konkret vorliegenden Daten hinaus eine Abhängigkeit zwischen Einfluss- und Zielgröße zu erfassen

- Die Berücksichtigung von Wechselwirkungen zwischen den Einflussgrößen

Gemischte lineare Modelle setzen die Unabhängigkeit der Einflussgrößen untereinander und die Homogenität der Varianzen bezüglich der Zielgröße, sowie eine Normalverteilung der Residuen voraus. Residuen stellen die Differenzen aus den beobachteten und den mit dem Modell berechneten Werten für die Zielgröße dar.

Die Berechnungen werden mit SAS®, Version 9.2 für PC durchgeführt. Bei der Vielzahl der für eine Zielgröße (z. B. Viabilität) zu berechnenden Modelle muss entschieden werden, welches dieser Modelle die Daten letztendlich am besten beschreibt:

- Beim Vergleich mehrerer gemischter linearer Modelle (Proc Mixed) wird diese Entscheidung anhand des Akaike-Maßes (AIC) getroffen, welches die Zufälligkeit der Datenstruktur beschreibt und gleichzeitig die Anzahl der in das Modell eingehenden Parameter berücksichtigt. Bei einem Vergleich verschiedener Modelle untereinander beschreiben kleinere Werte für den AIC ein an die Datenstruktur besser angepasstes Modell.

- Innerhalb eines Modells wird anhand der p-Werte (Pr > |t| in Solution for Fixed Effects der Proc. Mixed) entschieden, ob für einen Faktor mit einem Einfluss auf die Zielgröße gerechnet werden kann, wobei p-Werte < 0,01 (1 %) einen gesicherten, p-Werte < 0,05 (5 %) einen möglichen und p-Werte ≤ 0,1 (10 %) einen vagen Einfluss anzeigen (können).

Der Einfluss von Zelltyp, Behandlungstag, Medikamentenkonzentration auf die Viabilität

Der Einfluss der (Co-Variablen und) Faktoren auf die Zellviabilität primärer neuronaler Zellen *in vitro* wird mit Hilfe von gemischten linearen Modellen untersucht.
Allgemeine Überlegungen zu den zu berechnenden gemischten linearen Modellen:

Zielgröße:	Gemessener Mittelwert für die Zellviabilität.
Einflussgrößen:	Zelltyp, Zellalter (DIV), Medikamentenkonzentration, Tier
Wechselwirkung:	Medikamentenkonzentration, Zellalter

In allen berechneten Modellen werden nur fixe Effekte berücksichtigt. Verallgemeinerte Aussagen über die beobachteten Daten hinaus, wie diese durch zufällige Effekte geschätzt werden könnten, machen inhaltlich bei den Faktoren Zelltyp aber auch bei der Medikamentenkonzentration und dem Zellalter am Behandlungs-

zeitpunkt keinen Sinn. Denn es liegt keine ausreichende Information darüber vor, ob der Effekt dieser Parameter auf die Viabilität im jeweils vorgegebenen Intervall auch linear ist.

Das liegt auch unter anderem daran, dass die Konzentration der applizierten Substanz als klassierter Wert in die Analyse mit eingeht und somit keine stetige Größe darstellt. Aus diesem Grund können Aussagen immer nur für einen bestimmten Konzentrationswert getroffen werden.

Über die Verwendung von Zellen eines Tieres für mehrere Versuche wurde versucht, den Einfluss von entsprechenden Faktoren zu verhindern. Da aus labortechnischen Gründen jedoch die Versuche teilweise wiederholt werden mussten, werden diese Faktoren in den statistischen Modellen dahingehend berücksichtigt, dass die Auswertung unverbunden erfolgte

3. Ergebnisse

3.1. Viabilität

3.1.1. Wirkung von Fluoxetin auf die Zellviabilität

Primäre hippocampale Zellen

Primäre hippocampale Neurone wurden an DIV 0, 5, 10 und 21 für 72 h mit den Fluoxetinkonzentrationen 1 µM, 5 µM, 10 µM, 20 µM, 30 µM, 40 µM, 50 µM und 75 µM behandelt. An DIV 5 wurde die Konzentration 1 µM nicht untersucht.

Für die Behandlung an DIV 0 ergab sich das in Abb. 7A gezeigte Bild: Mit zunehmender Fluoxetinkonzentration nahm die Viabilität der hippocampalen Zellen ab. Besonders deutlich wurde dies zwischen 10 µM und 20 µM. Die mittlere effektive Konzentration (EC_{50}), das heißt, die Fluoxetinkonzentration, bei der 50 % der Zellen *in vitro* zugrunde gegangen sind, beträgt 13,89 µM. Bei höheren Fluoxetinkonzentrationen lag die Viabilität im Mittel zwischen 20 und 30 %.

Nach Behandlung hippocampaler Primärzellkulturen zum Behandlungszeitpunkt DIV 5 ließ sich folgendes beobachten (s. Abb. 7B): Mit ansteigender Fluoxetinkonzentration nahm die Viabilität der hippocampalen Zellen ab. Zwischen 10 µM und 20 µM schien es einen Schwellenwert zu geben. Die EC_{50} betrug 11,08 µM. Ab einer Konzentration von 30 µM und höher lag der Median der Viabilität zwischen 12 und 13 %.

Die an DIV 10 mit Fluoxetin behandelten hippocampalen Primärzellkulturen hatten das in Abb. 7C dargestellte Resultat. Im Vergleich zu den an früheren Tagen *in vitro* behandelten hippocampalen Zellen war die Viabilität nach Behandlung mit niedrigen Fluoxetinkonzentrationen (1 µM und 5 µM) höher und überstieg z.T. sogar die Viabilität der Kontrollzellen. Der Median lag bei den Konzentrationen ab 30 µM und höher bei um die 10 %. Sie waren damit geringer als zum Behandlungszeitpunkt DIV 0. Die berechnete EC_{50} lag bei 16,13 µM.

Das Ergebnis der an DIV 21 behandelten pimären hippocampalen Zellen wird aus Abb. 7D ersichtlich. Die Viabilitätsabnahme konnte hier erst bei höheren Fluoxetinkonzentrationen beobachtet werden als bei den früheren Behandlungszeitpunkten und sank nicht genauso weit ab wie zu den anderen Zeitpunkten. Die EC_{50} lag mit 29,41 µM deutlich über den EC_{50}-Werten zu den anderen Behandlungszeitpunkten. Bei 30 µM Fluoxetin lag die Viabilität noch bei 52 %. Ab 40 µM wurden Viabilitätswerte zwischen 10 und 20 % erreicht.

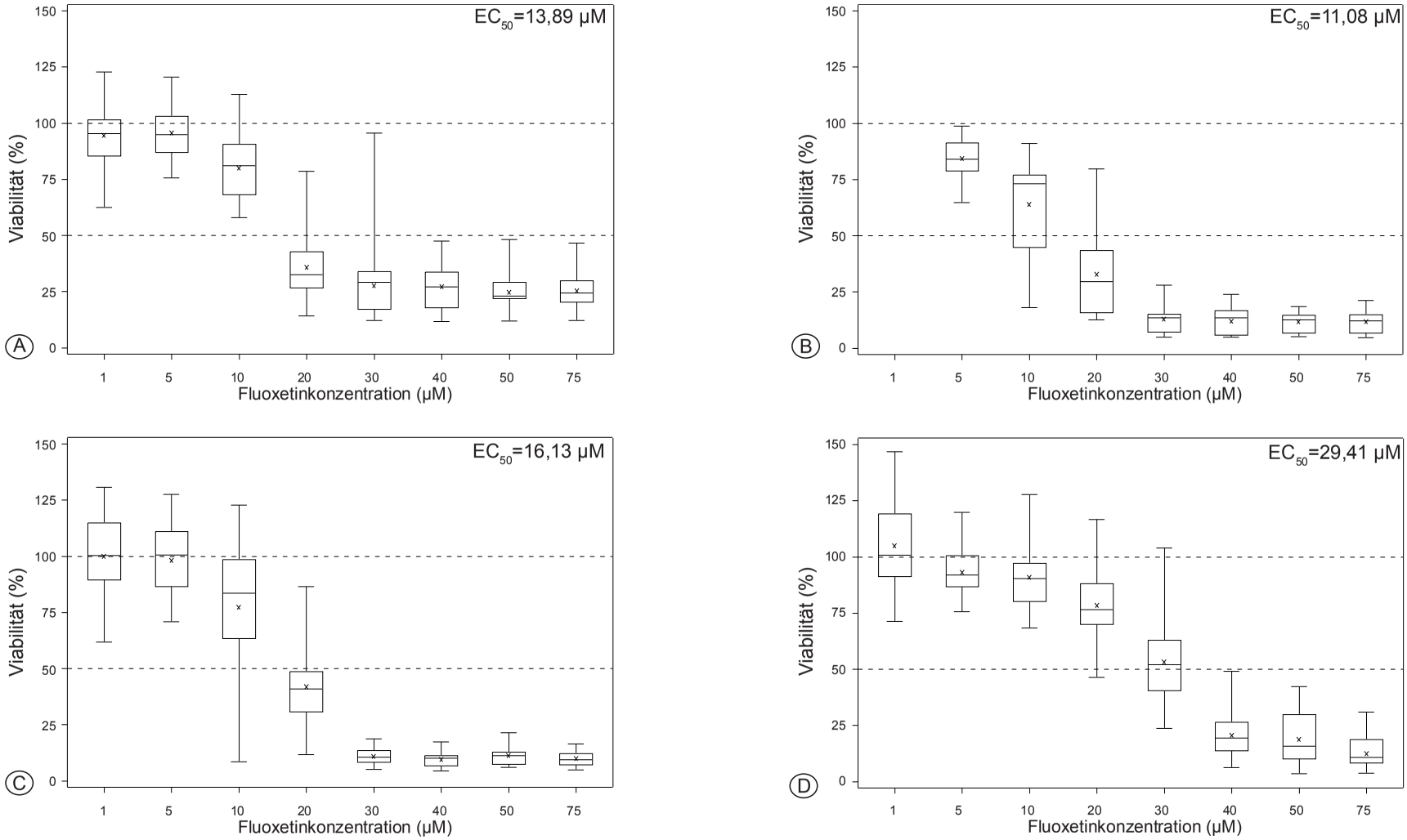

Abb. 7: Wirkung verschiedener Fluoxetinkonzentrationen auf die Viabilität hippocampaler Primärzellkulturen an DIV 0 (A), DIV 5 (B), DIV 10 (C) und DIV 21 (D).
DIV: *day in vitro*. EC_{50}: mittlere effektive Konzentration. Behandlungsdauer: 72 h. Die Viabilität der internen Kontrolle beträgt 100 %. Gezeigt sind Boxplots mit Angabe von Minimum, 1. Quartil, Median, 3. Quartil und Maximum. Steigende Fluoxetinkonzentrationen führten an allen DIV zur Viabilitätsabnahme. An DIV 0 (A) lag die Viabilität bei Konzentrationen von 30 µM und höher im Mittel zwischen 20 und 30 %. Ab einer Fluoxetinkonzentration von 30 µM und höher lag der Median der Viabilität an DIV 5 (B) knapp unter 15 %. Für an DIV 10 behandelte Zellen (C) lag der Viabilitäts-Median ab 30 µM Fluoxetin bei um die 10 %. An DIV 21 lagen die Viabilitätswerte erst ab Fluoxetinkonzentrationen von 40 µM und höher unter der 50 %-Marke (*n jeweils =6*).

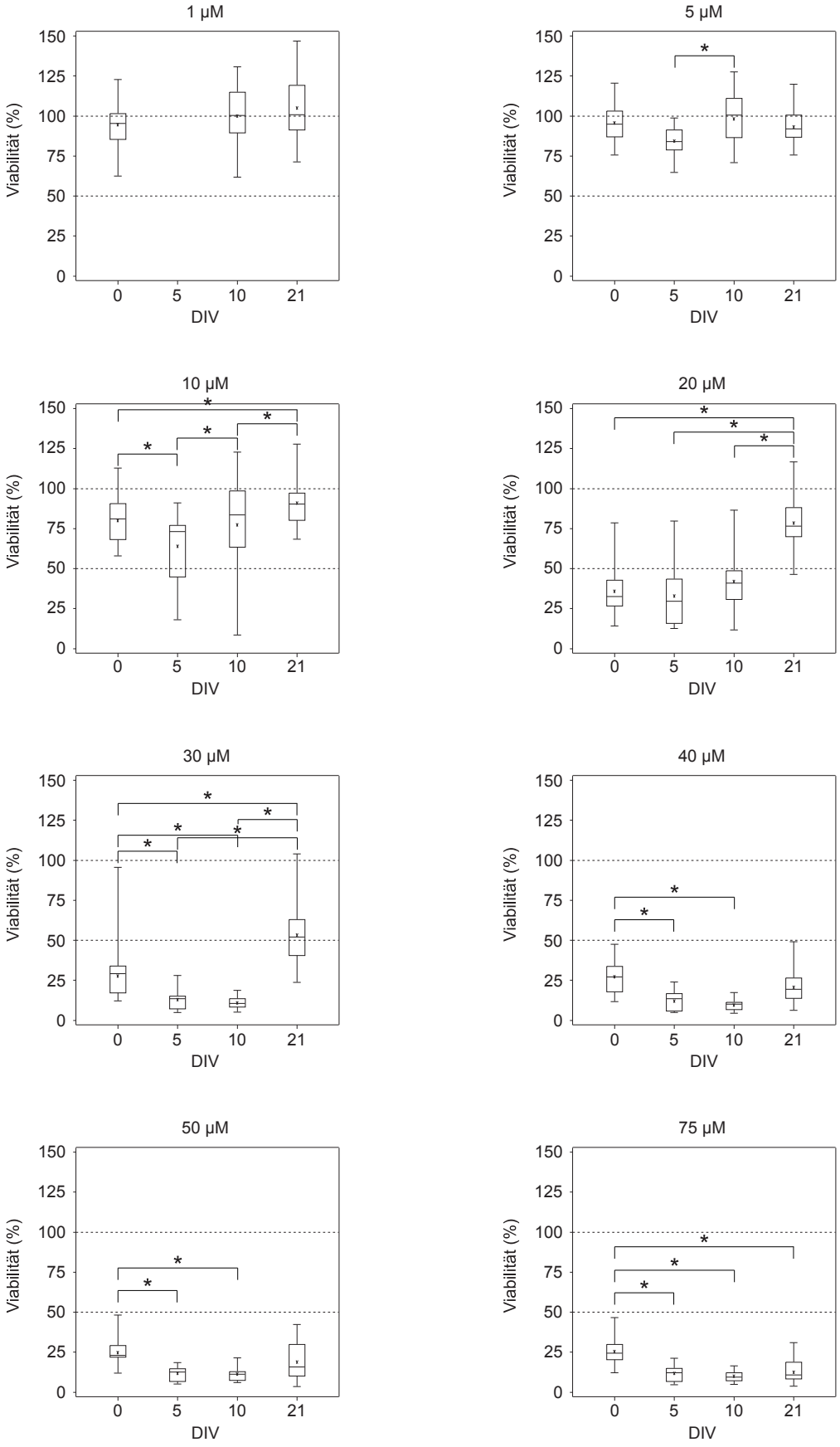

Abb.8: Wirkung verschiedener Konzentrationen von Fluoxetin auf die Viabilität hippocampaler Primärzellkulturen unterschiedlicher DIV im Vergleich
DIV: *day in vitro*. Behandlungsdauer je 72 h. Die Viabilität der internen Kontrolle beträgt 100 %. Gezeigt sind Boxplots mit Angabe von Minimum, 1. Quartil, Median, 3. Quartil und Maximum. Auswertung mit SAS Proc. mixed. * p-Wert < 0,05 (*n jeweils=6*).

Primäre kortikale Zellen

Primäre kortikale Neurone wurden an DIV 0, 5, 10 und 21 für 72 h mit den Fluoxetinkonzentrationen 1 µM, 5 µM, 10 µM, 20 µM, 30 µM, 40 µM, 50 µM und 75 µM behandelt.

Abb. 9A zeigt das Ergebnis der an DIV 0 behandelten kortikalen Zellen. Die Viabilität sank mit steigender Fluoxetinkonzentration bis auf 32 % als geringsten Median. Die EC_{50} betrug 8,22 µM.

In Abb. 9B wird das Ergebnis der Behandlung kortikaler Zellen mit Fluoxetin an DIV 5 gezeigt. Die EC_{50} betrug hier 13,71 µM. Die Viablilität blieb bei Fluoxetinkonzentrationen von 30 µM und höher auf einem ähnlich niedrigen Niveau bei Werten zwischen 14 und 15 %. Höhere Konzentrationen führten nicht zu einer weiteren Viabilitätsabnahme.

An DIV 10 konnte folgendes Bild beobachtet werden (siehe Abb. 9C): Die Behandlung mit niedrigen Fluoxetinkonzentrationen führte teilweise zu einer höheren Viabilität als die der Kontrollzellen. Mit steigender Dosis sank die Viabilität jedoch ab und erreichte ab einer Konzentration von 30 µM und höher nur noch Werte zwischen 12 und 14 %. Die EC_{50} betrug 9,85 µM.

Für die Behandlung an DIV 21 lassen sich folgende Aussagen treffen (s. Abb. 9D): Die minimalen Viabilitätswerte bei Behandlung mit hohen Fluoxetin-konzentrationen ab 30 µM lagen zwischen 7 und 12 %. Die EC_{50} lag mit 16,34 µM höher als an anderen Behandlungstagen.

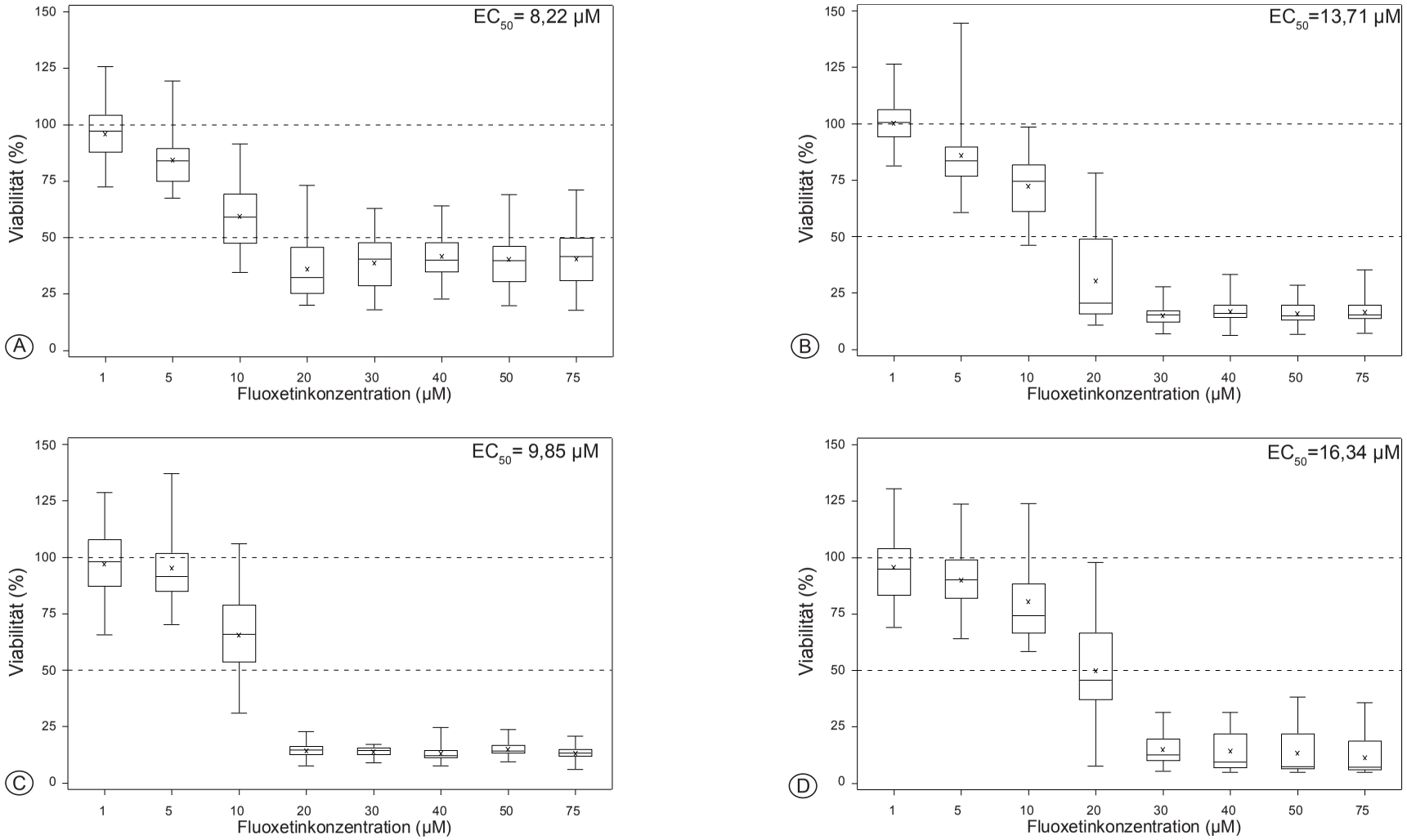

Abb. 9: Wirkung verschiedener Fluoxetinkonzentrationen auf die Viabilität kortikaler Primärzellkulturen an DIV 0 (A), DIV 5 (B), DIV 10 (C) und DIV 21 (D).
DIV: *day in vitro*. EC_{50}: mittlere effektive Konzentration. Behandlungsdauer: 72 h. Die Viabilität der internen Kontrolle beträgt 100 %. Gezeigt sind Boxplots mit Angabe von Minimum, 1. Quartil, Median, 3. Quartil und Maximum. Steigende Fluoxetinkonzentrationen führten an allen DIV zur Viabilitätsabnahme. An DIV 0 (A) sanken die Viabilitätsmittelwerte nicht unter 30 %. An DIV 5 (B) zeigte sich ab 30 µM kein weiteres Absinken mehr. Die Viabilität lag bei diesen Konzentrationen im Mittel zwischen 14 und 15 %. DIV 10 (C) zeigt, dass ab 30 µM Fluoxetin die Viabilität bei um die 12 % lag und nicht weiter absank. Die minimalen Viabilitätswerte nach Behandlung an DIV 21 mit hohen Fluoxetinkonzentrationen ab 30 µM lagen zwischen 7 und 12 % (*n jeweils =6*).

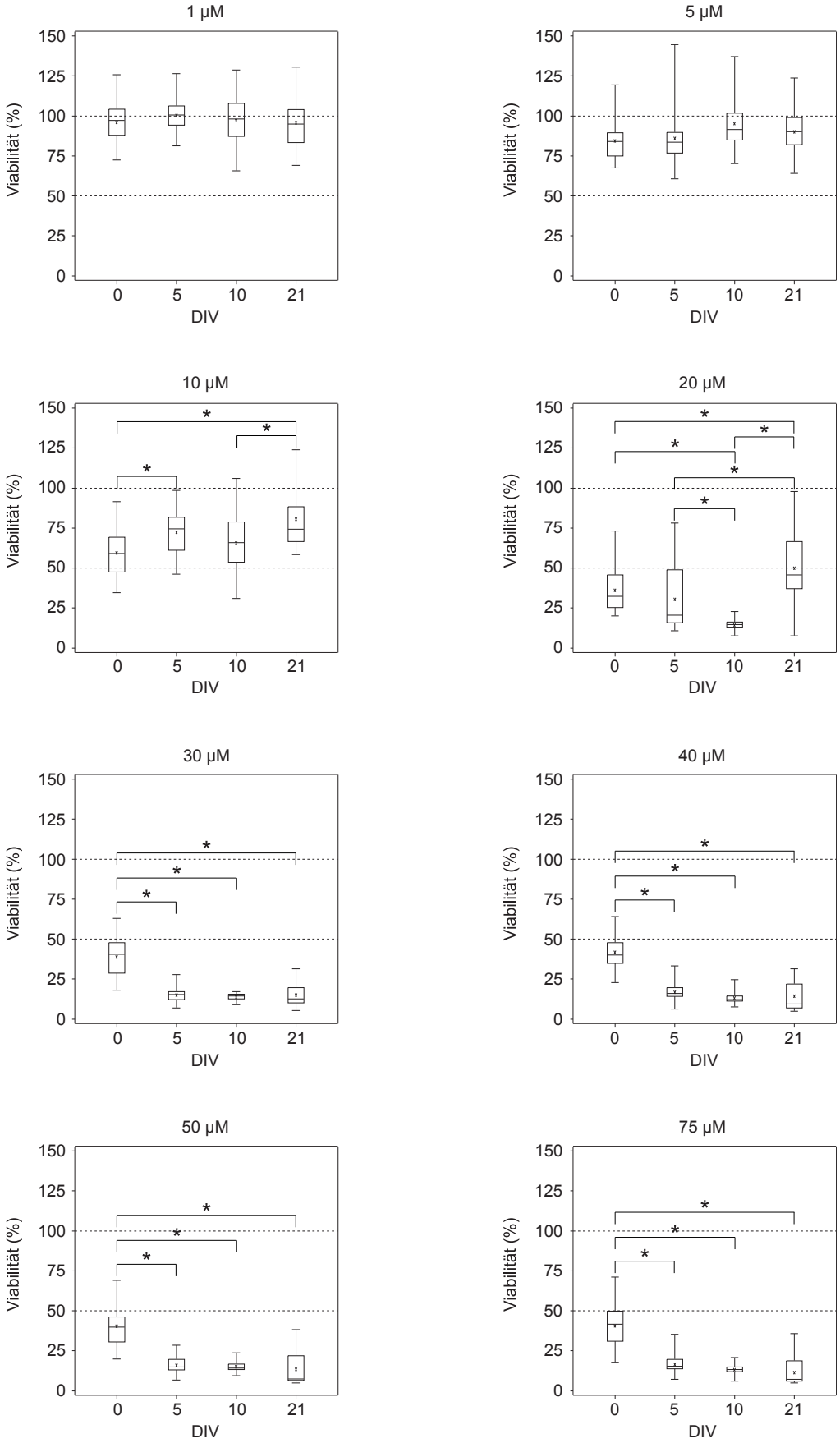

Abb.10: Wirkung verschiedener Konzentrationen von Fluoxetin auf die Viabilität kortikaler Primärzellkulturen unterschiedlicher DIV im Vergleich

DIV: *day in vitro*. Behandlungsdauer je 72 h. Die Viabilität der internen Kontrolle beträgt 100 %. Gezeigt sind Boxplots mit Angabe von Minimum, 1. Quartil, Median, 3. Quartil und Maximum. Auswertung mit SAS Proc. mixed. * p-Wert < 0,05 (*n jeweils=6*).

3.1.2. Wirkung von Johanniskrautextrakt auf die Zellviabilität

HEK-293-Zellen

HEK-293-Zellen wurden für 24 bis 96 h mit unterschiedlichen Konzentrationen Johanniskrautextrakt, standardisiert nach der Hyperforinkonzentration, der Hauptwirkkomponente des Substanzgemisches behandelt. Die Viabilität der HEK-293-Zellen sank mit steigender Hyperforinkonzentration bis etwa 3 µg/ml, bei höheren Hyperforinkonzentrationen stieg sie erneut an. Mit zunehmender Behandlungsdauer nahmen die Minima der Kurve geringere Werte an und die Standardabweichungen wurden kleiner (Abb. 11).

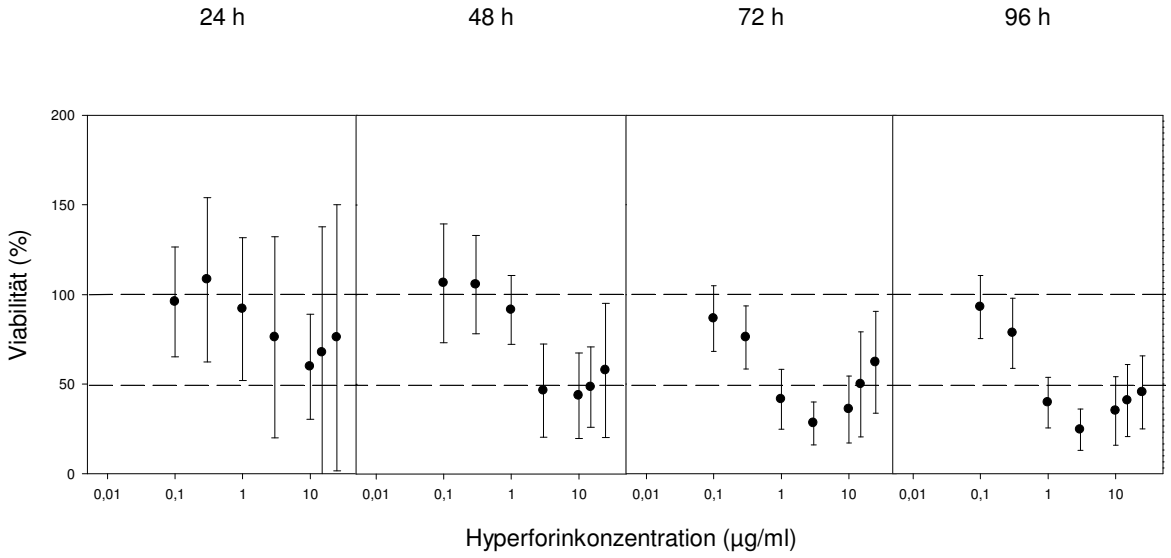

Abb.11: Wirkung verschiedener Hyperforinkonzentrationen auf die Viabilität von HEK-293-Zellen bei unterschiedlich langer Behandlungsdauer.
Die Viabilität der internen Kontrolle liegt bei 100 %. Mit zunehmender Behandlungsdauer sank das Viabilitätsminimum ab. Dargestellt als Mittelwert mit Standardabweichung (*n*=*6*).

Primäre hippocampale Zellen

Hippocampale Primärzellen wurden nach unterschiedlich langer Kulturzeit (DIV 0, 5, 10 und 21) für 72 h mit Hyperforinkonzentrationen von 0,1 bis 25 µg/ml behandelt. Mit zunehmender Konzentration sank die Viabilität ab, bevor sie ab Konzentrationen von 3 µg Hyperforin/ml wieder anstieg. Je älter die Zellkultur bei Behandlung war, desto tiefer sank die Viabilität insgesamt ab und desto weniger stieg sie mit höheren Hyperforinkonzentrationen wieder an. Die an DIV 0 behandelten hip-

pocampalen Zellen zeigten das in Abb. 12A dargestellte Ergebnis. Der Median der geringsten Viabilität lag bei 55,7 % und einer Hyperforinkonzentration von 3 µg/ml. Abbildung 12B zeigt das Ergebnis der Johanniskraut-Behandlung hippocampaler Zellen an DIV 5. Es wird deutlich, dass auch zu diesem Zeitpunkt die geringste Viabilität bei 3 µg Hyperforin/ml erreicht wurde. In niedrigeren Dosierungen überstieg die Viabilität die der Kontrollzellen, die nur mit dem Vehikel behandelt wurden.

Wurden hippocampale Zellen an DIV 10 mit Johanniskrautextrakt behandelt, sah die Graphik folgendermaßen aus (s. Abb 12C): Die Viabilität erreichte bei einer Hyperforinkonzentration von 3 µg/ml einen Median von 19,6 %. Ein geringerer Wert für die Viabilität wurde durch keine andere Konzentration erreicht. Sie lag nach Behandlung mit der höchsten Hyperforinkonzentration (25 µg/ml) bei knapp 42 %.

In der folgenden Abbildung 12D ist das Ergebnis der an DIV 21 mit Johanniskrautextrakt behandelten hippocampalen Zellen dargestellt. Es wird deutlich, dass sich die Viabilität nach Behandlung mit Hyperforinkonzentrationen ab 1 µg/ml und höher im Median um Werte zwischen 13 und 23 % gruppierte. Bei 3 µg/ml war die Viabilität auch hier am geringsten mit einem Median von 13,29 %. Jedoch lagen die Mediane bei 1 µg/ml mit 13,42 % und bei 10 mg/ml mit 16,22 % kaum davon entfernt.

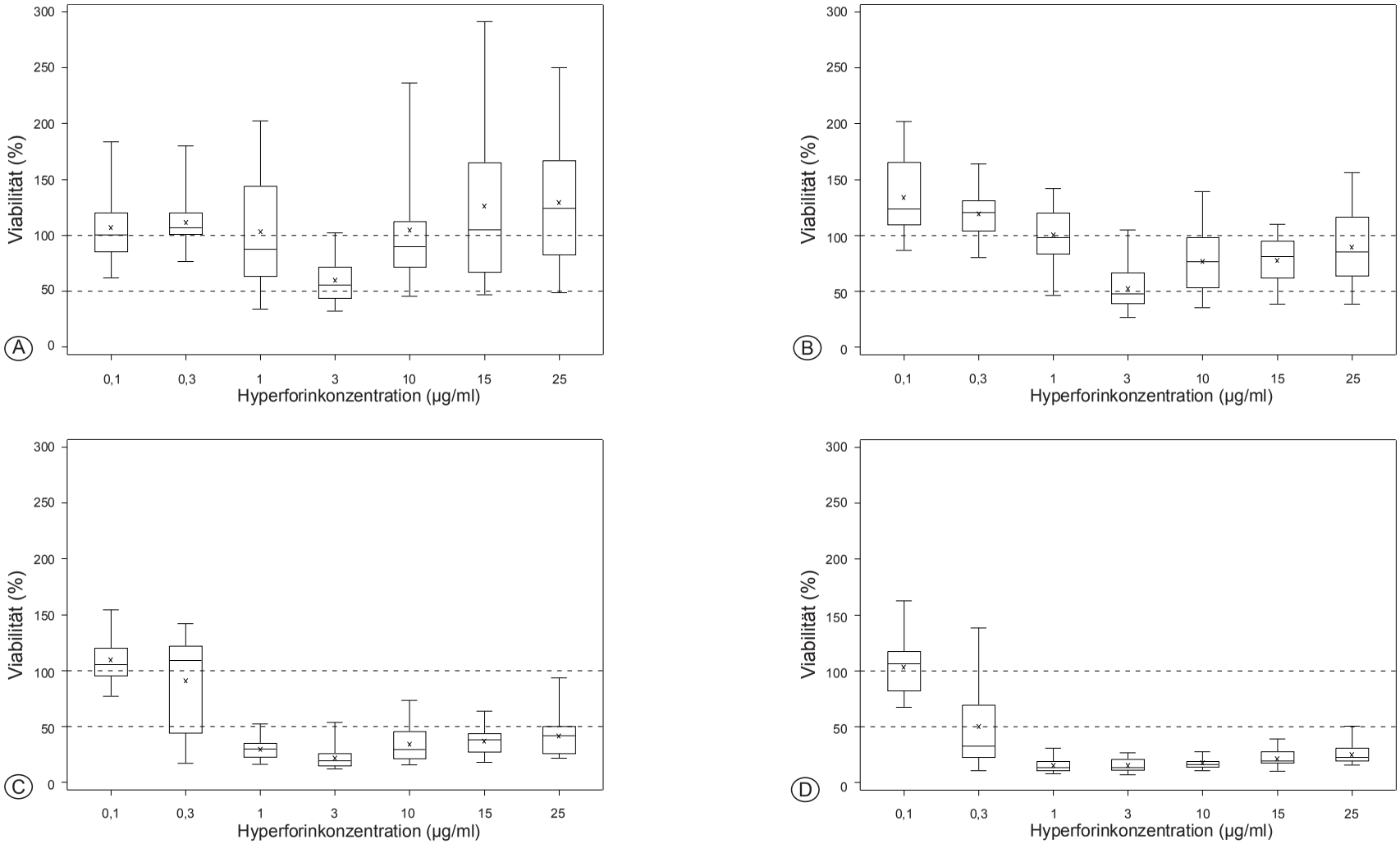

Abb. 12: Wirkung verschiedener Hyperforinkonzentrationen auf die Viabilität hippocampaler Primärzellkulturen an DIV 0 (A), DIV 5 (B), DIV 10 (C) und DIV 21 (D).
DIV: *day in vitro*. Behandlungsdauer: 72 h. Die Viabilität der internen Kontrolle beträgt 100 %. Gezeigt sind Boxplots mit Angabe von Minimum, 1. Quartil, Median, 3. Quartil und Maximum. An DIV 0 (A) war die Viabilität bei einer Hyperforinkonzentrationen von 3 µg/ml am geringsten (Median 55,7 %). Höhere Konzentrationen führten nicht zu einem weiteren Absinken der Viabilität. Auch an DIV 5 (B) zeigte sich die geringste Viabilität nach Behandlung mit 3 µg/ml Hyperforin durch einen Median von 47 %. An DIV 10 (C) war die Viabilität mit etwa 20 % nach Behandlung mit 3 µg/ml Hyperforin am geringsten. An DIV 21 (D) lagen ab einer Hyperforinkonzentration von 1 µg/ml die Viabilitätsmediane zwischen 13 und 23 %. (*n jeweils =6*).

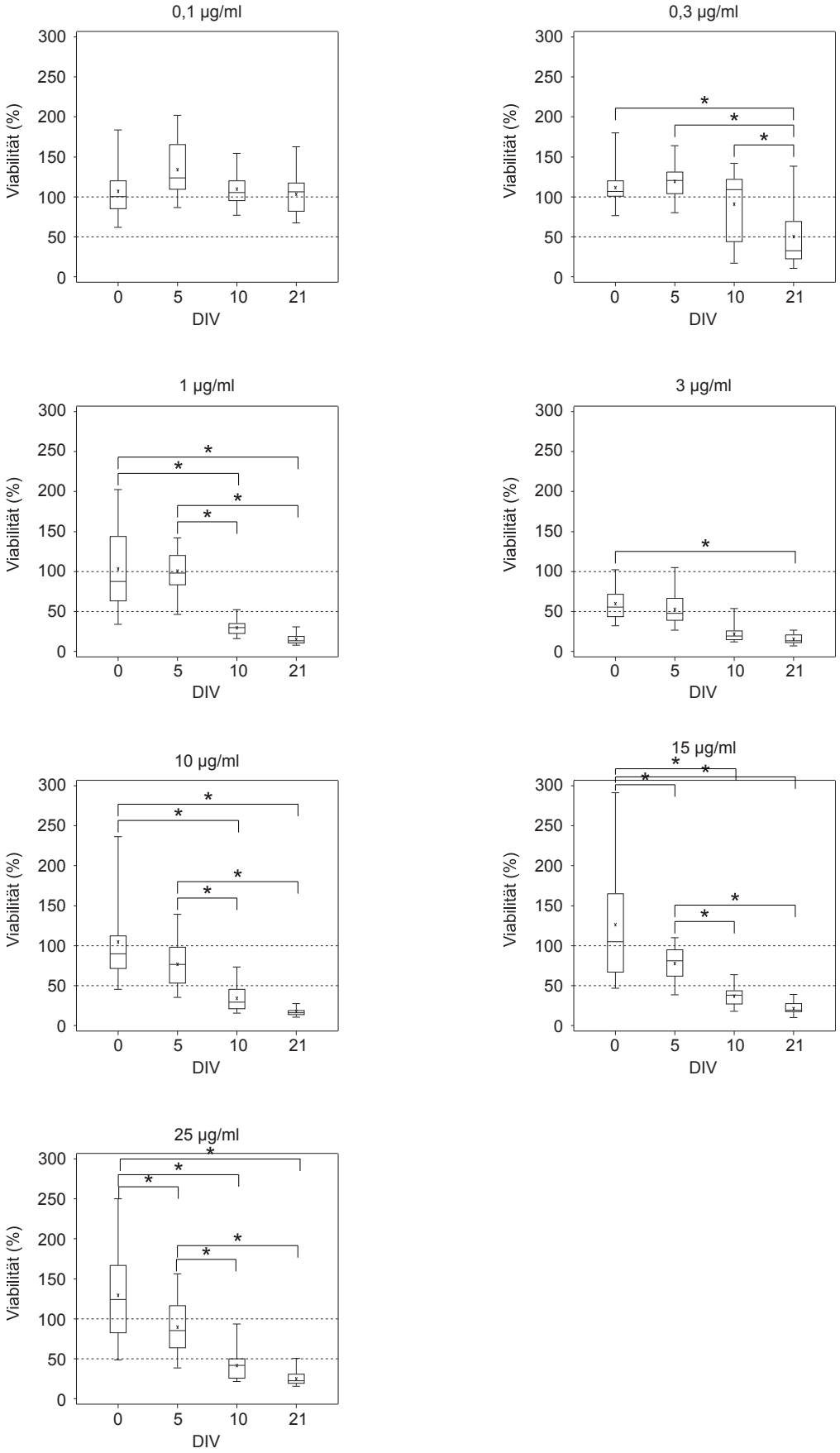

Abb. 13: Wirkung verschiedener Hyperforinkonzentrationen auf die Viabilität hippocampaler Primärzellkulturen unterschiedlicher DIV im Vergleich

DIV: *day in vitro.* Behandlungsdauer je 72 h. Die Viabilität der internen Kontrolle beträgt 100 %. Gezeigt sind Boxplots mit Angabe von Minimum, 1. Quartil, Median, 3. Quartil und Maximum. Auswertung mit SAS Proc. mixed. * p-Wert < 0,05 (*n jeweils=6*).

Primäre kortikale Zellen

Primäre kortikale Neurone wurden nach unterschiedlich langer Kultivierungsdauer (0, 5, 10 und 21 d) mit Johanniskrautextrakt (0,1 bis 25 µg Hyperforin/ml) behandelt. Bei Behandlung an DIV 0 und 5 erreichen die Zellen Viabilitätswerte, die über der Viabilität der Kontrollen liegen. Je länger die Zellen vor Behandlung in Kultur sind, desto geringer ist die Viabilität der Zellen. An DIV 21 gibt keinen Viabilitätsanstieg mit höheren Hyperforinkonzentrationen.

Die an DIV 0 mit Johanniskrautextrakt behandelten primären kortikalen Zellen lieferten das in Abb. 14A dargestellte Ergebnis. Die geringste Viabilität wurde bei einer Hyperforinkonzentration von 3 µg/ml mit einem Median von 57,6 % erreicht. Mit ansteigenden Hyperforinkonzentrationen stiegen die Viabilitätswerte. Bei der höchsten untersuchten Konzentration (25 µg Hyperforin/ml) wurde der höchste Viabilitätswert mit einem Median von 114,6 % verzeichnet. Die Behandlung kortikaler Primärzellkulturen mit Johanniskrautextrakt an DIV 5 zeigt das in Abb. 14B dargestellte Bild. Hier wurde bei einer Hyperforinkonzentration von 1 µg/ml der geringste Viabilitätswert erreicht. Der Median betrug 74,9 %, der Median der Viabilität für 3 µg/ml lag bei 76,3 %. Bei weiter ansteigenden Hyperforinkonzentrationen stieg die Viabilität auf einen Median von 147,2 % bei 25 µg/ml. Auch in sehr niedrigen Konzentrationen wie 0,1 und 0,3 µg/ml lagen die gemessenen Viabilitätswerte mit 123 und 108 % über den Werten der Kontrollzellen.

Die Zellen, die an DIV 10 mit Johanniskrautextrakt behandelt wurden, zeigten insgesamt geringere Viabilitäten als Zellen, die an früheren DIV behandelt wurden. Abb. 14C zeigt das Ergebnis graphisch dargestellt. Es lässt sich daraus ablesen, dass in den beiden niedrigen Konzentrationen 0,1 und 0,3 die 100 %-Marke nur ganz knapp überschritten wurde. Die geringste Viabilität wurde bei 3 µg/ml mit einem Median von 34 % erreicht und lag damit deutlich unter der 50 %-Marke. Bei höheren Konzentrationen erreichten die Viabilitäten zwar noch Werte über 34 %, der höchste Wert mit einem Median von 59,5 % ergab sich bei einer Hyperforinkonzentration von 25 µg/ml und lag damit nicht mehr über der Viabilität der Kontrollzellen. Wurden die kortikalen Primärzellkulturen an DIV 21 mit Johanniskrautextrakt behandelt, lagen bis auf die mit 0,1 µg/ml Hyperforin behandelten Zellen alle Viabilitäts-Mediane unter 50 %. Die Werte für Konzentrationen zwischen 0,3 und 15 µg/ml lagen zwischen 23 und 30 % (siehe Abb. 14D).

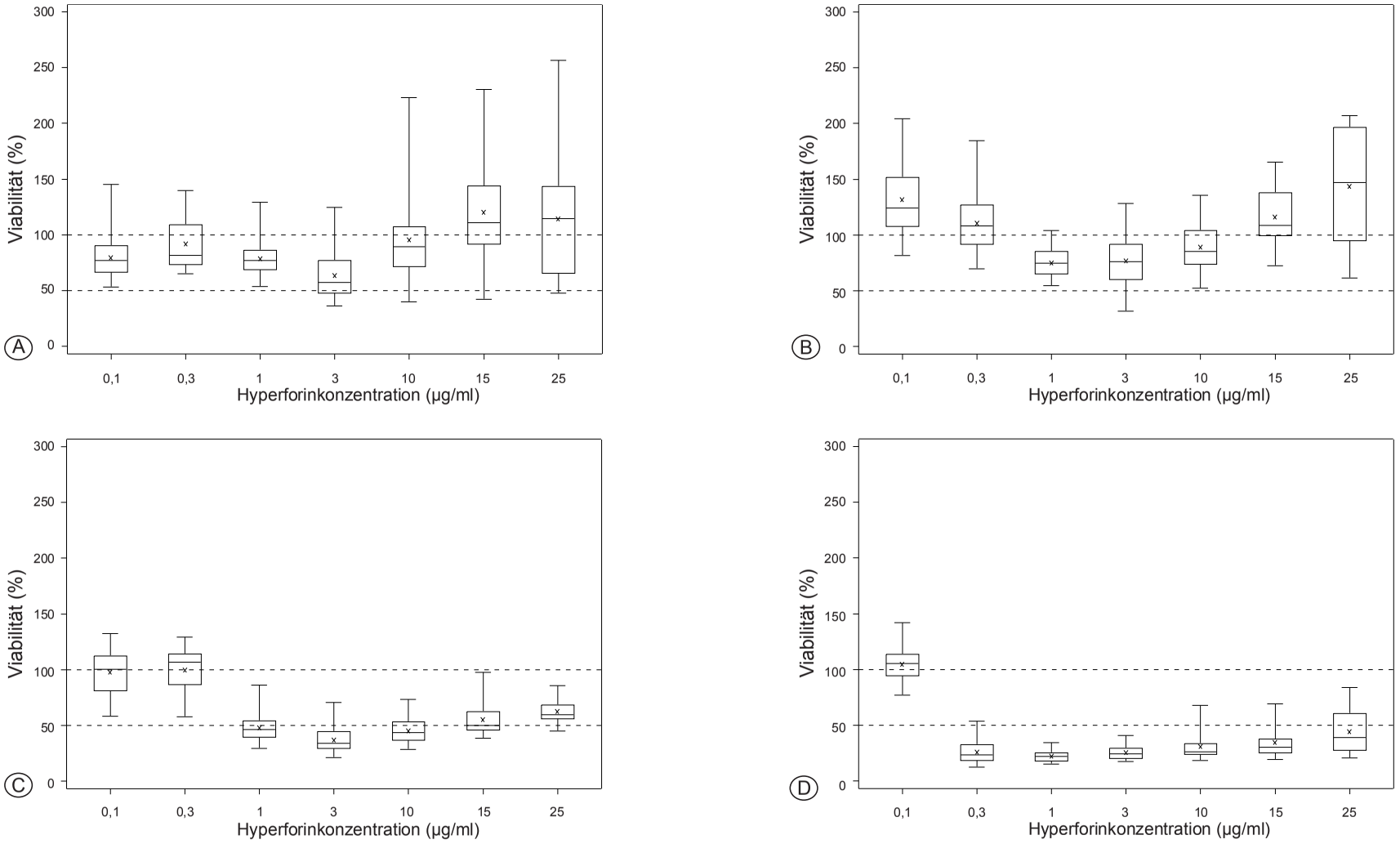

Abb. 14: Wirkung verschiedener Hyperforinkonzentrationen auf die Viabilität kortikaler Primärzellkulturen an DIV 0 (A), DIV 5 (B), DIV 10 (C) und DIV 21 (D).
DIV: *day in vitro*. Behandlungsdauer: 72 h. Die Viabilität der internen Kontrolle beträgt 100 %. Gezeigt sind Boxplots mit Angabe von Minimum, 1. Quartil, Median, 3. Quartil und Maximum. Die Behandlung mit Johanniskrautextrakt führte zur Viabilitätsabnahme der Zellen. Die Viabilitätsmediane unterschritten an DIV 0 (A) die 50 %-Marke nicht. An DIV 5 (B) und an DIV 10 (C) zeigte sich die geringste Viabilität bei 3 µg/ml Hyperforin. Leichter Anstieg der Viabilität bei Behandlung mit steigenden Hyperforinkonzentrationen. An DIV 21 (D) lagen alle Viabilitätsmediane bis auf den der mit 0,1 µg/ml Hyperforin behandelten Zellen unter 50 %. (*n jeweils =6*).

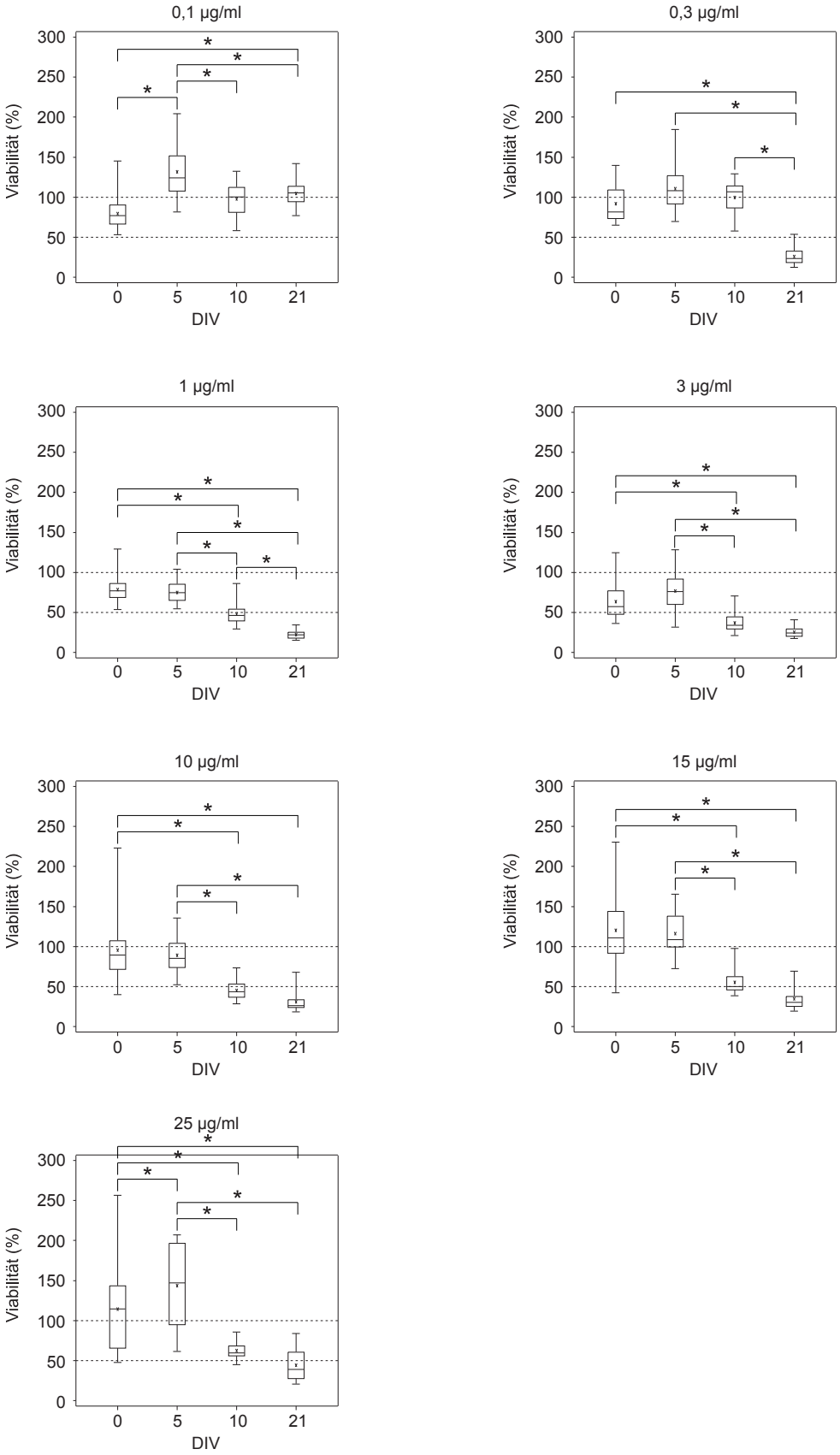

Abb. 15: Wirkung verschiedener Hyperforinkonzentrationen auf die Viabilität kortikaler Primärzellkulturen unterschiedlicher DIV im Vergleich
DIV: *day in vitro.* Behandlungsdauer je 72 h. Die Viabilität der internen Kontrolle beträgt 100 %. Gezeigt sind Boxplots mit Angabe von Minimum, 1. Quartil, Median, 3. Quartil und Maximum. Auswertung mit SAS Proc. mixed. * p-Wert < 0,05 (*n jeweils=6*).

3.1.3. Rescue-Versuch

Nach Beobachtung des u-förmigen Kurvenverlaufs der Zellviabilitätskurve bei Behandlung der untersuchten Zellen mit Johanniskrautextrakt wurde ein sog. „Rescue-Versuch“ durchgeführt. Ziel war es, herauszufinden, ob HEK-293-sowie kortikale Zellen in der Lage sind, ihre Viabilität durch Auftitrieren der Hyperforinkonzentration zu steigern.

Es zeigte sich, dass sich die Viabilität der „Rescue“-behandelten Zellen auf das Viabilitätsniveau der mit 25 µg Hyperforin/ml behandelten Zellen steigern ließ. Dieser Effekt ließ sich sowohl für die HEK-293-Zelllinie als auch für kortikale Primärzellkulturen beobachten. Allerdings war das Ergebnis nicht signifikant.

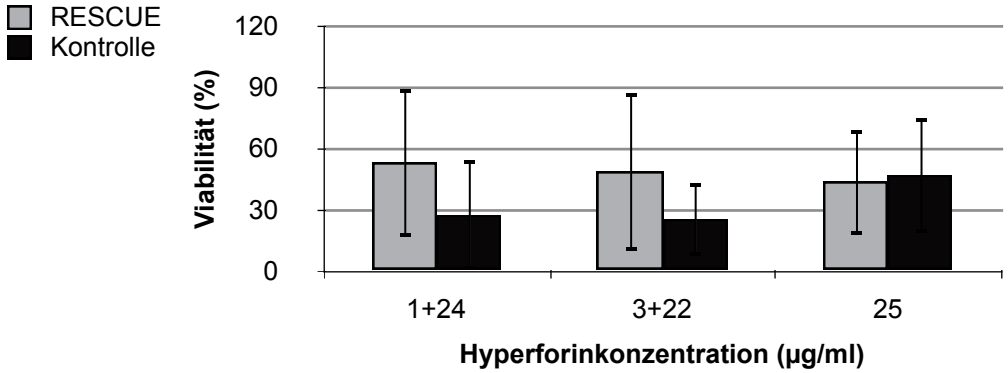

Abb. 16: Viabilität von HEK-293-Zellen nach „Rescue“-Behandlung mit Johanniskrautextrakt
30 000 bzw. 20 000 HEK-293-Zellen/ml wurden 3 bzw. 4 Tage nach Aussaat behandelt. Die Erstbehandlung wurde durchgeführt mit Hyperforinkonzentrationen von 1, 3 und 25 µg Hyperforin/ml. Nach einer Inkubationszeit von 72 h wurde die Hyperforinkonzentration in der Hälfte der mit 1 und 3 µg Hyperforin/ml behandelten Wells auf insgesamt 25 µg Hyperforin/ml erhöht. Die andere Hälfte der Wells sowie die Wells, die bereits zu Beginn eine Konzentration von 25 µg Hyperforin/ml erhielten, wurden nur mit Vehikel behandelt. Die anschließende weitere Inkubationszeit betrug 24 h.
Die Viabilität der „Rescue“-behandelten Zellen ließ sich auf das Viabilitätsniveau der schon zu Beginn mit 25 µg Hyperforin/ml behandelten Zellen steigern (*n=6*).

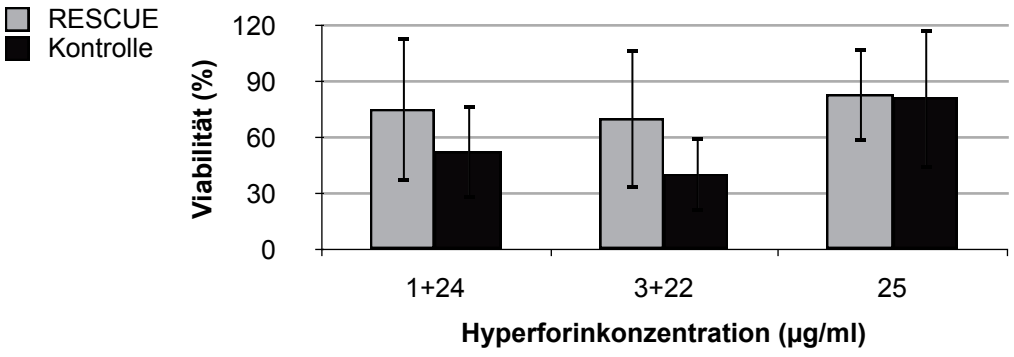

Abb. 17: Viabilität kortikaler Primärzellkultur nach „Rescue“-Behandlung mit Johanniskrautextrakt
Kortikale Zellen (175 000/ml) wurden an DIV 5 für 72 h mit Hyperforinkonzentrationen von 1, 3 und 25 µg/ml behandelt. Anschließend wurde die Konzentration von Hyperforin in der Hälfte der Wells auf 25 µg/ml erhöht. Die andere Hälfte, sowie die Zellen, die schon zu Beginn mit 25 µg Hyperforin/ml behandelt wurden, erhielten zum zweiten Behandlungszeitpunkt nur das Vehikel. Die weitere Inkubationszeit betrug 24 h.
Die Viabilität der „Rescue“-behandelten Zellen näherte sich dem Viabilitätsniveau der schon zu Beginn mit 25 µg Hyperforin/ml behandelten Zellen an. (*n=6*)

3.2. Morphologie

Zur Analyse der Zellmorphologie wurden die untersuchten Zellen nach Fixierung immunhistologisch gefärbt.
Die Kontrollzellen zeigen, dass sowohl die Netzwerkdichte als auch die Synapsenanzahl mit zunehmendem Zellalter steigen. Die Zellen wachsen folglich auch *in vitro* und verändern ihre Morphologie.

3.2.1. Wirkung von Fluoxetin auf die Zellmorphologie hippocampaler und kortikaler Primärzellen

Die Behandlung der Zellen mit Fluoxetin führte mit zunehmenden Konzentrationen zur Degeneration der neuronalen Strukturen. Die Synapsen und Dendriten der Neurone wurden reduziert und bei Konzentrationen zwischen 20 und 50 µM kam es sogar zum Zelluntergang (s. Abb. 18 und 19).

3.2.2. Wirkung von Johanniskrautextrakt auf die Zellmorphologie hippocampaler und kortikaler Primärzellen

Johanniskrautextrakt führte bei den behandelten Zellen zur Reduktion der Synapsen und Dendriten. Bei hohen Hyperforinkonzentrationen war dieser Effekt deutlich zu sehen. Hier führte er zum Zelluntergang. Man konnte jedoch bereits in niedrigen Konzentrationen von Hyperforin (0,3 µg/ml) erahnen, dass eine Veränderung der Synapsenanzahl begann (s. Abb. 20 und 21). Aufgrund dessen wurden exemplarisch hippocampale Zellen aller untersuchten Altersstufen näher betrachtet. Es wurden Synapsen und Neuriten der mit 0,3 µg Hyperforin/ml behandelten Zellen ausgezählt und mit Kontrollen verglichen. Dabei wurde deutlich, dass die Neuritenanzahl vergleichbar war, die Synapsenanzahl aber durch die Behandlung mit Johanniskrautextrakt verringert wurde (siehe Abb. 22).

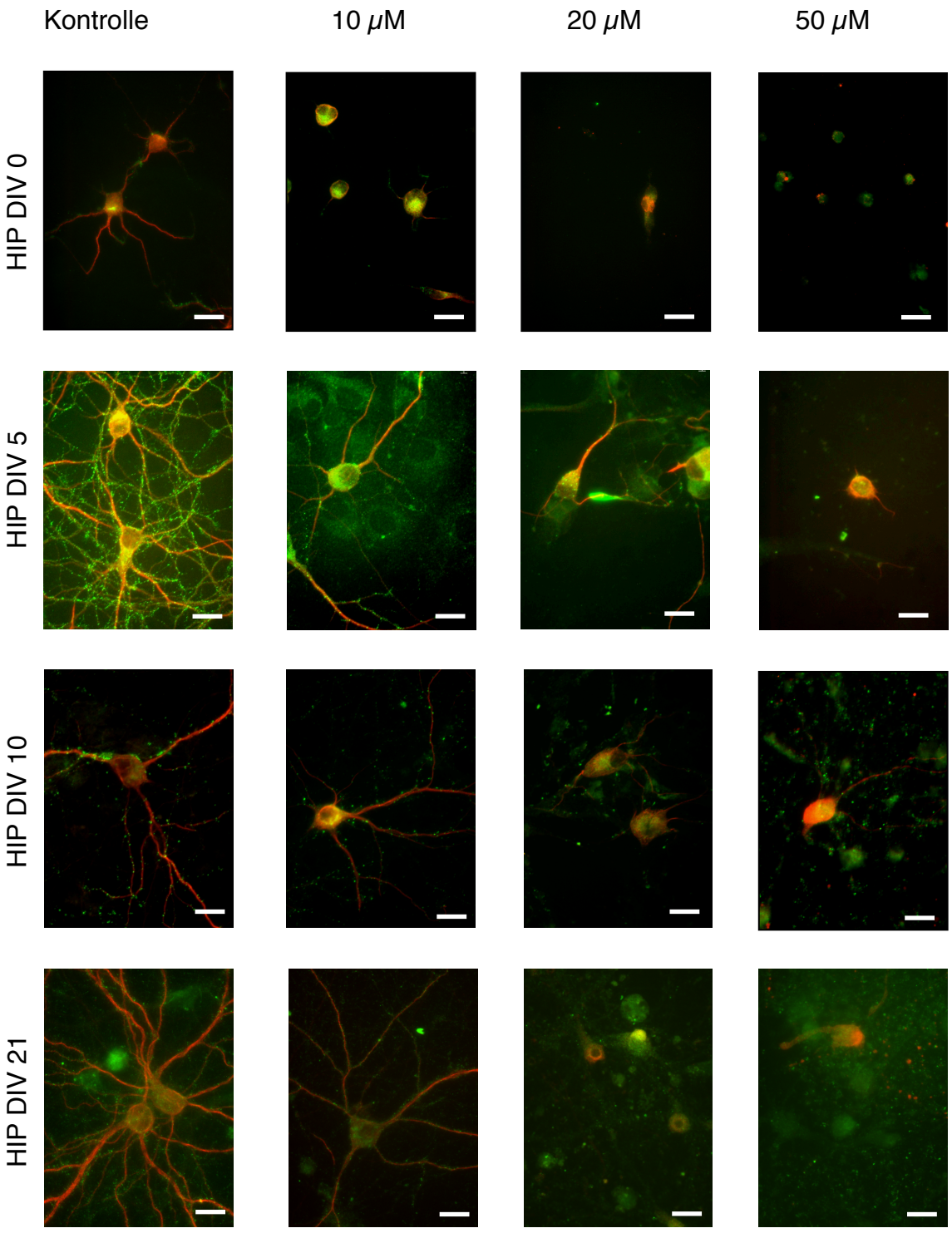

Abb. 18: Einfluss von Fluoxetin auf die Morphologie hippocampaler Primärzellen.
DIV: *day in vitro*; HIP: hippocampale Primärzellen
Mit zunehmender Kulturdauer stieg die Anzahl der Neuriten (rot, MAP-2) sowie der Synapsen (grün, Bassoon) der Kontrollzellen. 72-stündige Behandlung mit Fluoxetin führte bei niedrigen Konzentrationen zu einer Reduktion der Neuriten und Synapsen, in hohen zum Zelluntergang (*Maßstabsbalken ≙ 20 µm*).

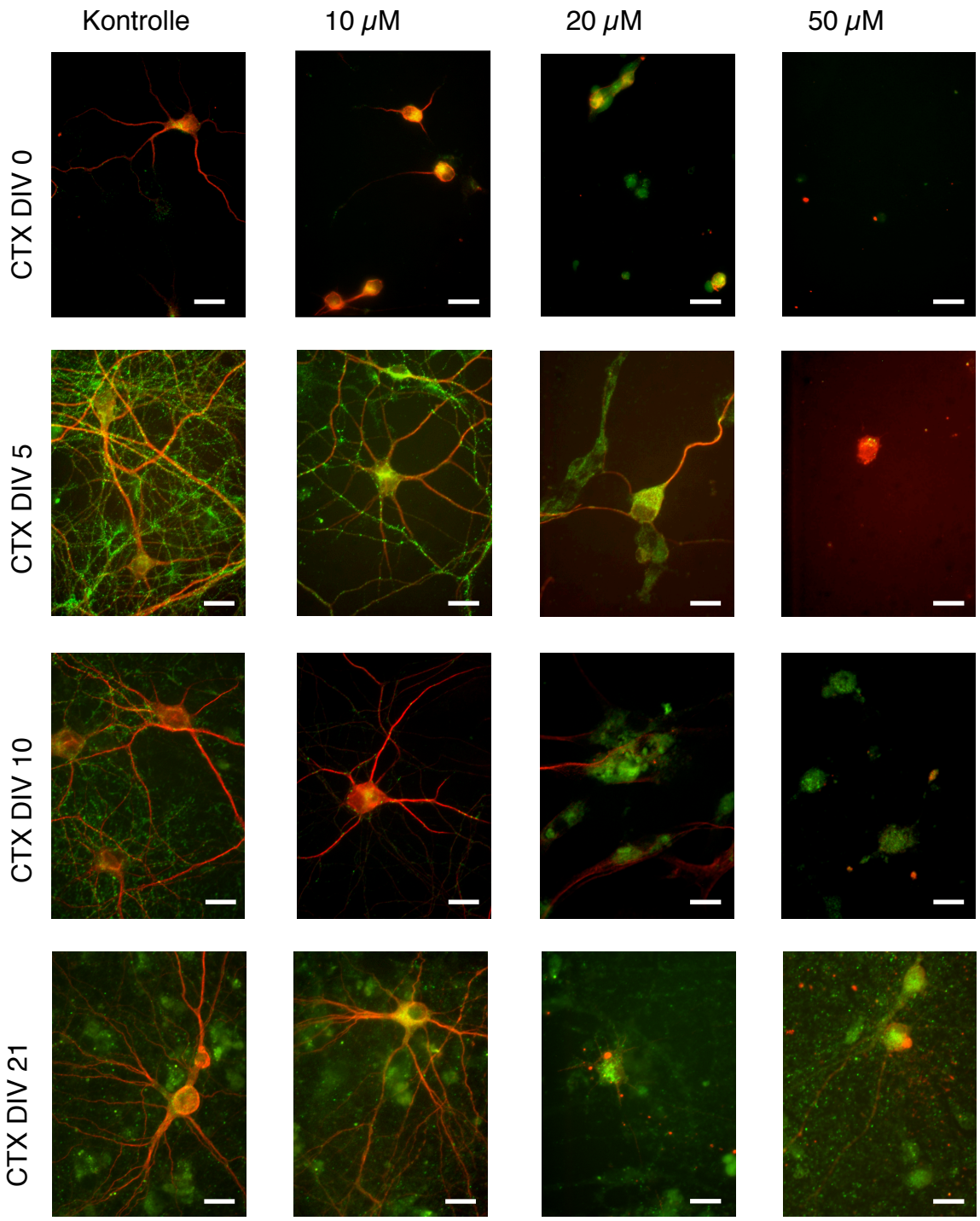

Abb.19: Einfluss von Fluoxetin auf die Morphologie kortikaler Primärzellen.
DIV: day in vitro; CTX: kortikale Primärzellen
Mit zunehmender Kulturdauer stieg die Anzahl der Neuriten (rot, MAP-2) sowie der Synapsen (grün, Bassoon) der Kontrollzellen. 72-stündige Behandlung mit Fluoxetin führte bei niedrigen Konzentrationen zu einer Reduktion der Neuriten und Synapsen, in hohen zum Zelluntergang (*Maßstabsbalken ≙ 20 µm*).

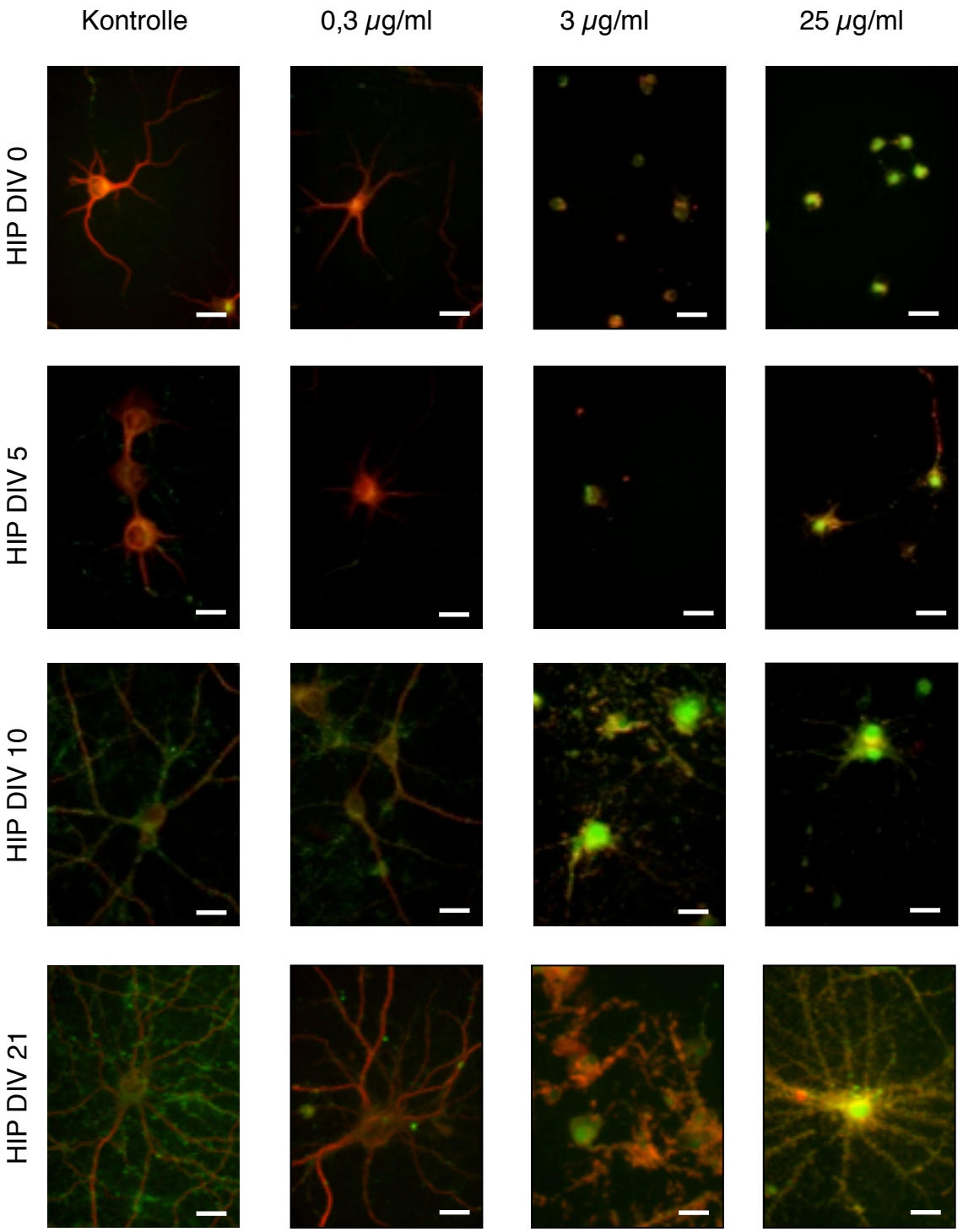

Abb. 20: Einfluss von Johanniskrautextrakt auf die Morphologie hippocampaler Primärzellen.
DIV: *day in vitro*; HIP: hippocampale Primärzellen
Mit zunehmender Kulturdauer nahm das neuronale Netzwerk zu und die Anzahl der Synapsen stieg. 72-stündige Behandlung mit Johanniskrautextrakt führte zur Degeneration der neuronalen Strukturen. In höheren Hyperforinkonzentrationen kam es zum Zelluntergang (*Maßstabsbalken ≙ 20 µm*).

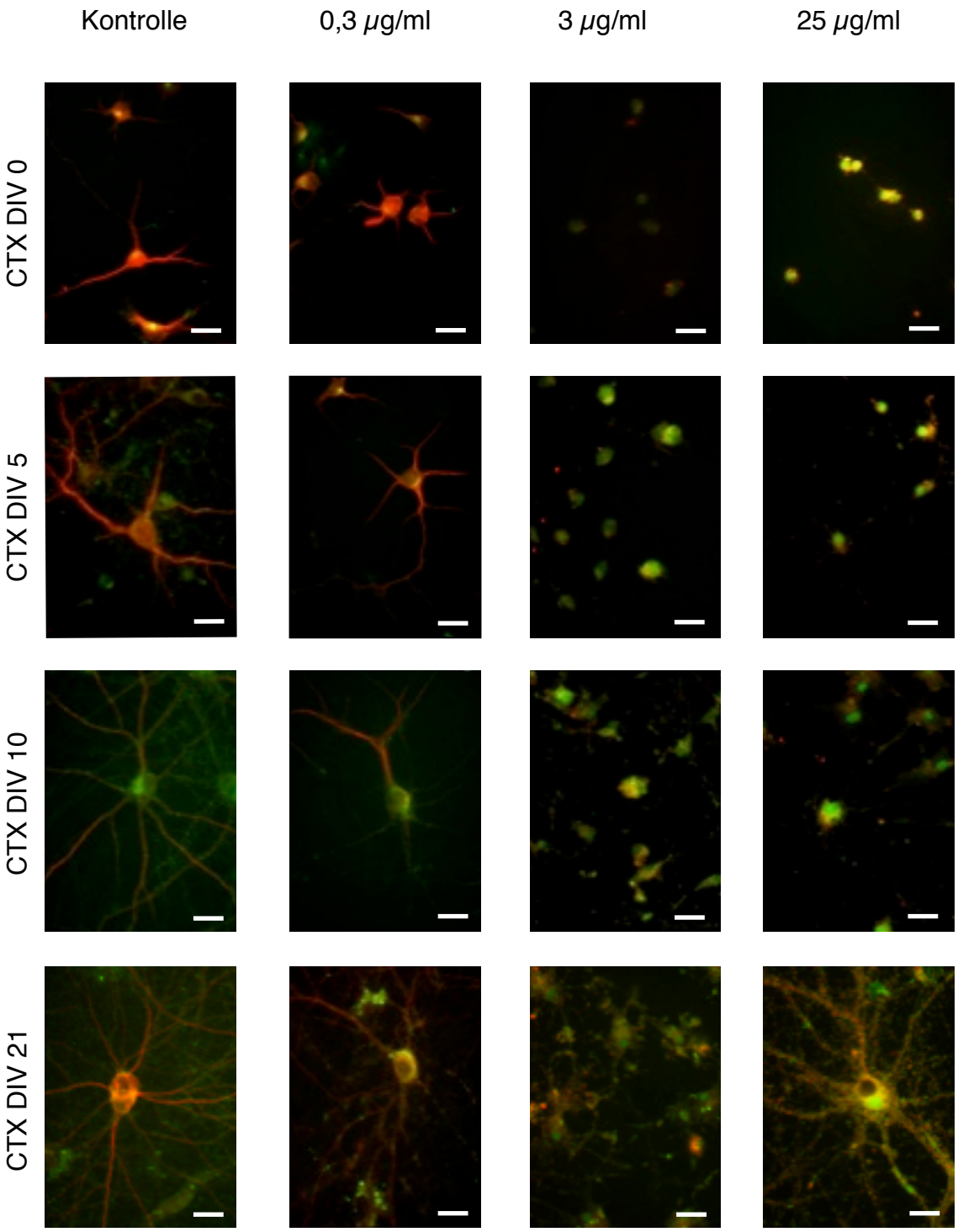

Abb. 21: Einfluss von Johanniskrautextrakt auf die Morphologie kortikaler Primärzellen.
DIV: *day in vitro*; CTX: kortikale Primärzellen
Mit zunehmender Kulturdauer nahm das neuronale Netzwerk zu und die Anzahl der Synapsen stieg. 72-stündige Behandlung mit Johanniskrautextrakt führte zur Degeneration der neuronalen Strukturen. In höheren Hyperforinkonzentrationen kam es zum Zelluntergang (*Maßstabsbalken ≙ 20 µm*).

3.2.3. Effekt von Johanniskrautextrakt auf die Anzahl der Neuriten und Synapsen hippocampaler Zellen

Aufgrund der Beobachtung, die in 3.2.2. beschrieben wurde, wurden exemplarisch Neuriten und Synapsen hippocampaler Zellen, die an DIV 0, 5, 10 bzw. 21 mit Johanniskrautextrakt (0,3 µg Hyperforin/ml) behandelt wurden, nach immunhistologischer Färbung ausgezählt. 0,3 µg Hyperforin/ml entspricht dem therapeutischen Wirkspiegel. Aus Abb. 22 geht hervor, dass sich die Neuritenzahl der behandelten Zellen im Vergleich zu den Neuriten der Kontrollzellen kaum veränderten. Die Synapsendichte (Synapsenanzahl/10 µm) der behandelten Zellen war hingegen deutlich geringer als die der Kontrollzellen und betrug nur noch etwa 50 % im Vergleich zur Kontrolle. Die statistische Analyse zur Überprüfung der Entwicklungsabhängigkeit in Abb. 22 zeigt, dass es in Hinblick auf die Neuritenzahl zwischen DIV 0 und 10, DIV 5 und 10 und DIV 5 und 21 keine signifikanten Unterschiede gab, die Vergleiche der anderen Tage erwiesen sich als signifikant. Die Analyse der Synapsendichte ergab, dass die Synapsenanzahl insgesamt mit ansteigendem Zellalter zum Behandlungszeitpunkt zunahm. Dies zeigt das Wachstum und die Weiterentwicklung der Zellen im *in vitro*-Modell. Abb. 22 zeigt außerdem, dass sich die Werte im Vergleich der unterschiedlichen Behandlungstage signifikant unterschieden mit einer Ausnahme, nämlich DIV 0 und DIV 5, was keinen signifikanten Unterschied darstellt.

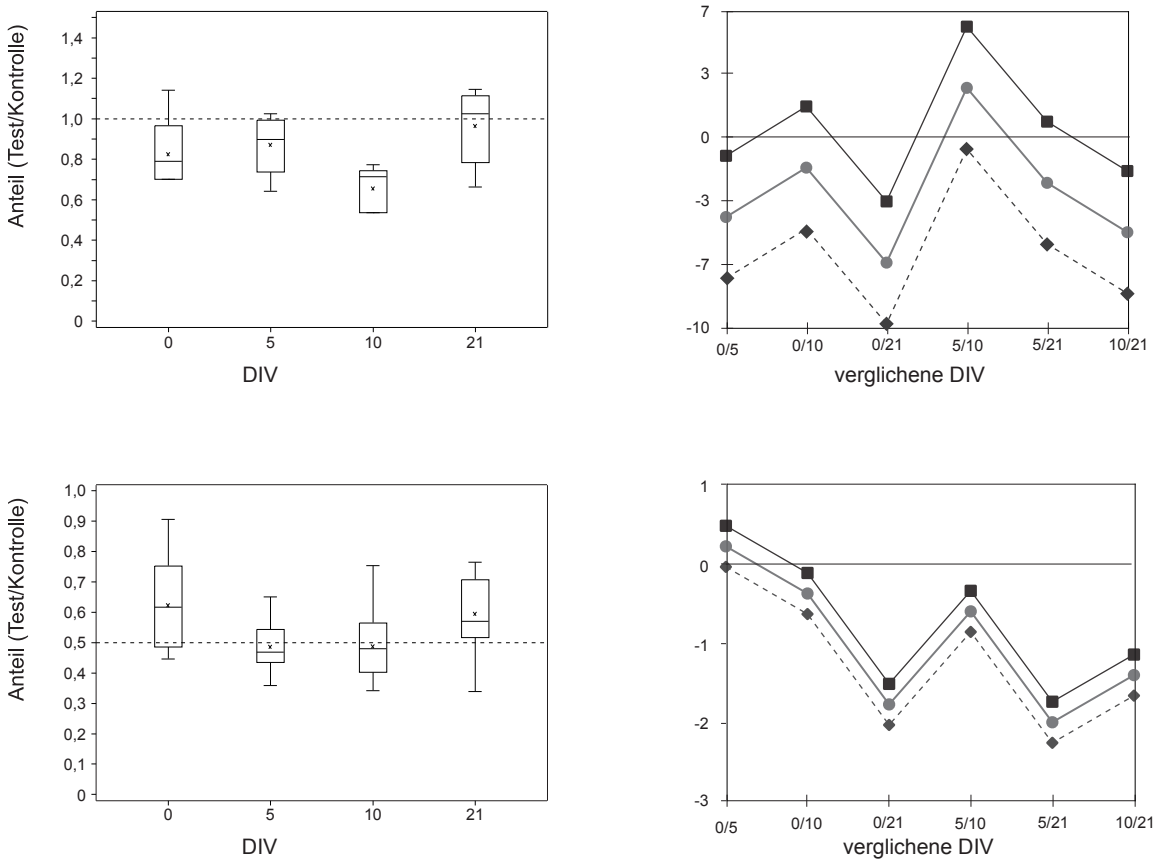

Abb. 22: Behandlung hippocampaler Primärzellen mit 0,3 µg/ml Hyperforin über 72 Stunden zu unterschiedlichen Behandlungszeitpunkten (DIV).
DIV: *day in vitro*.
Oben dargestellt Neuritenanzahl, unten Synapsendichte. Links jeweils Anzahl von Neuriten/Synapsendichte bezogen auf Kontrolle (= 100 % =1), dargestellt als Boxplots. Rechts oben Vergleich der Neuritenanzahl, rechts unten Vergleich der Synapsendichte an den unterschiedlichen Behandlungstagen, gezeigt ist jeweils 95 %-Konfidenzintervall. Quadrate: Maximum, Punkte: Mittelwert, Rauten; Minimum. Signifikanter Unterschied für Werte, die die Null nicht mit einschließen. DIV: days in vitro, *(n=5)*.
Die Anzahl der Neuriten wurde im Vergleich zur Kontrolle durch 72-stündige Behandlung mit Johanniskrautextrakt mit einer Hyperforinkonzentration von 0,3 µg/ml nicht wesentlich beeinflusst (*n=5*).
Durch 72-stündige Behandlung mit Johanniskrautextrakt nahm die Synapsendichte der hippocampale Zellen im Vergleich zur Kontrolle um etwa 50 % ab (*n=5*)

4. Diskussion

4.1. Fluoxetin

4.1.2. Viabilität

Fluoxetin wirkt konzentrationsabhängig viabilitätsmindernd auf alle untersuchten Zellen. Dieser Effekt findet sich zu allen Entwicklungszeitpunkten. In dieser *in vitro* Studie konnte keine eindeutige lineare Entwicklungsabhängigkeit/Altersabhängigkeit detektiert werden. Mittels Applikation der Substanz auf HEK- und HEK-SERT-Zellen konnte von unserer Arbeitsgruppe gezeigt werden, dass die beschriebene Wirkung der Substanz unabhängig vom Serotonintransporter ist (Schaz et al., 2010).

Die Untersuchung der Zellviabilität primärer Neurone ergab, dass Fluoxetin dosisabhängig gleichermaßen zu einer Minderung der Viabilität sowohl hippocampaler als auch kortikaler neuronaler Zellen führt. Dieser Effekt ließ sich zu allen untersuchten Entwicklungszeitpunkten nachweisen. Die Hypothese, dass weniger weit entwickelte Zellen empfindlicher auf Fluoxetin reagieren könnten als weiter entwickelte, ließ sich nicht bestätigen. Vielmehr das Gegenteil scheint der Fall zu sein. Für die Zellen, die an DIV 21 behandelt wurden, ließen sich insgesamt statistisch signifikant geringere Viabilitätswerte registrieren als für Zellen, die bereits an DIV 0 behandelt wurden.

Vor allem die kortikalen Zellen, die an DIV 0 mit Fluoxetin behandelt wurden, unterscheiden sich in höheren Fluoxetinkonzentrationen (30 bis 75 µM) signifikant ($p < 0,05$) von jenen, die an DIV 5, 10 oder 21 mit Fluoxetin behandelt wurden. In den niedrigen Konzentrationen 1 µM und 5 µM hängt der Effekt von Fluoxetin nicht signifikant vom Zellalter ab. Bei 10 µM und 20 µM Fluoxetin lassen sich signifikante Unterschiede zwischen den Behandlungen an DIV 0 und DIV 21 sowie zwischen DIV 10 und DIV 21 beobachten.

Für die hippocampalen Zellen ließ sich dieser Sachverhalt in der statistischen Analyse nicht genauso deutlich nachweisen. Statistisch signifikante Unterschiede zeigten sich hier bei 10, 20, 30 und 75 µM zwischen Zellen, die an DIV 0, und den hippocampalen neuronalen Zellen andererseits an DIV 21 behandelt wurden. Bei Be-

handlung mit 40 µM und 50 µM Fluoxetin zeigen sich signifikante Unterschiede von DIV 0 gegenüber DIV 5 und DIV 10.

Der Vergleich der Viabilität kortikaler Zellen, die an DIV 5 und DIV 10 behandelt wurden, ergibt nur für eine Konzentration, nämlich 20 µM einen statistisch signifikanten Unterschied. Für die hippocampalen Zellen lässt sich im Vergleich zwischen den Behandlungszeitpunkten DIV 5 und DIV 10 für die Behandlung mit 5 und 10 µM Fluoxetin ein signifikanter Unterschied nachweisen (p<0, 05).
Für beide Zellarten gilt, dass sie sich zwischen DIV 0 und DIV 5, sowie zwischen DIV 0 und DIV 10 in Fluoxetinkonzentrationen ab 30 µM signifikant voneinander unterscheiden.
Beiden Zellarten ist gemeinsam, dass sich für Fluoxetinkonzentrationen zwischen 10 und 20 µM unabhängig vom Entwicklungsstand ein Prozess abspielt, der unwiderruflich zur Viabilitätsminderung führt. Die Zellen, die eine Konzentration von 30 µM überleben, überleben auch Konzentrationen von 75 µM. Wir können davon ausgehen, dass die Abnahme der Zellviabilität aller untersuchten Zellen durch apoptotische Vorgänge bedingt ist (Schaz *et al.*, 2010).
Welche Signalkaskaden im Detail diese Alterationen hervorrufen bleibt weiter zu untersuchen. Fluoxetin wirkt in klinisch relevanten Konzentrationen in kortikalen neuronalen Zellkulturen mit einer Inhibitionskonstante (IC_{50}) von 10,51 µM als direkter NMDA-Antagonist (Szasz *et al.,* 2007) und in noch höheren Konzentrationen dosisabhängig GABA-mimetisch (Robinson *et al.*, 2003). Auch für das strukturell sehr ähnliche Atomoxetin, das sich von Fluoxetin nur durch das Fehlen einer Trifluorkohlenstoff ($=CF_3$)-Gruppe unterscheidet, konnte unsere Arbeitsgruppe einen NMDA-Antagonismus nachweisen (Ludolph et al., 2010). Vor allem in unreifen, maturierenden Ratten-Neuronen führen NMDA-Antagonisten/GABA-mimetisch wirkende Substanzen zum Zelluntergang durch Apoptose (REF). In späteren Entwicklungsstadien geht von NMDA-Antagonisten eine neuroprotektive Wirkung aus (Parsons 2007, Hardingham und Bading 2003). Der Entwicklungsabschnitt, in der die Neurone besonders vulnerabel gegenüber dem neurotoxischen Effekt der NMDA-Blockade sind, fällt mit der Synaptogenese zusammen. Beim Menschen findet diese Periode zwischen dem letzten Schwangerschaftstrimenon und den ersten drei Lebensjahren statt (*period* of *rapid growth,* brain *growth spurt* synaptogenesis *period*); Ikonomidou et al.,1999, 2000, 2001 und 2009). Fluoxetin ist das

am häufigsten in der Schwangerschaft eingenommene Antidepressivum und als einziges Antidepressivum für die Behandlung von Depressionen bei Kindern und Jugendlichen ab 8 Jahren zugelassen. Aus diesem Grund muss hier besonderen Wert darauf gelegt werden, dass vor der Verordnung mögliche Risiken gegenüber dem zu erwartenden Benefit abgewogen werde, da nicht sicher ausgeschlossen werden kann, dass die in Tierexperimenten und in *in vitro* Studien dargestellten Ergebnisse auch beim Menschen *in vivo* eine Rolle spielen. In der Literatur wurden bereits bei Neugeborenen, deren Mütter in der Schwangerschaft Antidepressiva einnahmen, postnatale Auffälligkeiten beschrieben, die als Entzugssymptome gedeutet werden. Diese äußern sich unter anderem in Unruhe, geringem Muskeltonus, Atemproblemen, Hypoglykämien und erhöhter Anfallsbereitschaft (Moses-Kolko et al., 2005, Wisner et al., 1999).

4.1.2. Morphologie

Auch *in vitro* lässt sich mit zunehmendem Zellalter eine Zellentwicklung mit neuronaler Netzwerkbildung und Synaptogenese beobachten. Durch die Behandlung mit Fluoxetin wird mit steigender Konzentration das neuronale Netzwerk zunehmend zerstört oder in seiner Entwicklung gehemmt und die Anzahl der Synapsen reduziert. Xu et al. (2010) beschreiben, welche Effekte dieser Beobachtung möglicherweise zugrunde liegen: Fluoxetin führt in klinisch relevanten Konzentrationen innerhalb von Minuten nach Applikation dosisabhängig zu einem Kollaps der Wachstumskegel und einer Einziehung der Neuriten sowohl serotoninerger als auch nicht-serotoninerger Neurone. Als mögliche Ursache hierfür wird ein erniedrigter intrazellulärer Calciumspiegel diskutiert, wodurch es zur verzögerten Ausbildung von Zytoskelettproteinen und Wachstumskegeln kommt. Aus o. g. Arbeit geht außerdem hervor, dass Fluoxetin das Auswachsen von Neuriten in Wirbeltieren und wirbellosen Tieren beeinträchtigt. „Chronische“ Fluoxetinbehandlung (über 18 Stunden) hatte bei Ratten zur Folge, dass der Anteil des acetylierten Alpha-Tubulins, das eine Untereinheit der Mikrotubuli darstellt, verringert wurde und Fluoxetin somit zu einem instabileren Zytoskelett führte (Bianchi *et al.* 2009).

4.2. Johanniskrautextrakt

4.2.1. Viabilität

Reaktive Veränderungen von HEK-293-Zellen nehmen mit steigender Applikationsdauer von Johanniskrautextrakt zu (s. Kurvenverlauf Abb. 11). Diese Kurve erreicht ein Minimum bei Behandlung mit Johanniskrautextrakt, der einen Hyperforingehalt von 3 µg/ml aufweist (Die im menschlichen Serum gemessenen Wirkspiegel von Hyperforin liegen laut Hersteller bei 0,3 µg/ml.).

Primäre neuronale Rattenzellen reagieren auf die Johanniskrautbehandlung in ähnlicher Art und Weise wie HEK-293-Zellen. Je jünger die Zellen zum Behandlungszeitpunkt sind, desto inhomogener sind die Ergebnisse. Für Zellen, die an DIV 0 behandelt wurden, finden sich bei hohen Hyperforinkonzentrationen sogar höhere Viabilitätswerte als in den unbehandelten Kontrollzellen. Nicht gänzlich auszuschließen sind Schädigungen der Kontrollzellen durch unbekannte Einflüsse. Man kann jedoch auch postulieren, dass in frühen Entwicklungsstadien neurogenetische Effekte von Hyperforin überwiegen.

Je länger die primären neuronalen Zellen zum Behandlungszeitpunkt kultiviert waren (DIV 10 und 21), desto geringer fallen die Viabilitätswerte insgesamt aus (s. Kurvenverlauf Abb. 12 (C) und (D) sowie 14 (C) und (D)). Der Effekt von Johanniskrautextrakt auf primäre neuronale Zellen scheint somit abhängig vom Entwicklungsstadium der Zellen zu sein. Zu diesen späten Behandlungszeitpunkten sinkt die Viabilität schon bei relativ geringen Hyperforinkonzentrationen von 0,3 µg/ml (DIV 21) bzw. 1 µg/ml (DIV 10) unter die 50 %-Marke.

An DIV 21 steigt die Viabilität bei höheren Hyperforinkonzentrationen als 3 µg/ml nicht mehr wie bei den DIV 0-Zellen an.

Statistisch zeigen die Viabilitätswerte hippocampaler und kortikaler Zellen beim Vergleich von DIV 0 und DIV 21 für nahezu alle Hyperforinkonzentrationen signifikante Unterschiede ($p < 0,05$). Kortikale Zellen sprechen mit deutlicheren entwicklungsabhängigen Unterschieden auf Johanniskrautextrakt an als hippocampale Zellen. (s. Abb. 13 und 15). Ein Grund hierfür könnte sein, dass kortikale Zellen früher ausreifen (etwa gegen DIV 5) und damit ihre Funktionalität früher erlangen, und beispielsweise das Apoptoseprogramm abrufen können (Lesuisse und Martin,

2002) als hippocampale Zellen, die ihren Entwicklungshöhepunkt erst zwischen DIV 14 und DIV 25 erreichen (Bertrand et al., 2011).
Die Viabilitätsabnahme der hier untersuchten Zellen nach Behandlung mit Johanniskrautextrakt könnte möglicherweise, ähnlich wie bei Fluoxetin, durch apoptotische Prozesse bedingt zu sein. In menschlichen Krebszellen wirkt Hyperforin in Synergie mit Hypericin, einem weiteren Bestandteil von Johanniskrautextrakt, in einer Dosierung von 10 µM (=5 µg/ml) über eine Caspasenaktivierung apoptotisch (Hostanska et al, 2003, Schempp et al., 2002).
Johanniskraut ist ein Wirkstoffgemisch, die Konzentration wurde von uns wie in der klinischen Behandlung auch nach dem Substanzgehalt des Hyperforins berechnet
Die ansteigende Viabilitätskurve bei hohen Hyperforinkonzentrationen könnte bei den hohen Johanniskrautdosen auf verstärkte Wirkung anderer Einzelsubstanzen zurückzuführen sein. Diese Substanzen scheinen antiapoptotische oder sogar zellproliferative Eigenschaften aufzuweisen. Hostanska et al. (2003) beobachteten bei höheren Hyperforinkonzentrationen (200 µM, entspricht 100 µg/ml) keine Apoptose durch Caspasenaktivierung mehr und konnten keine Toxizität mehr nachweisen.

Auf Grund der primär beobachteten Viabilitätskurve wurde ein „Rescue-Versuch“ durchgeführt. Hier zeigte sich, dass die Viabilität der HEK-293-Zellen und der kortikalen Zellen (DIV 5), die anfangs mit niederen Hyperforinkonzentrationen (1 µg/ml bzw. 3 µg/ml) behandelt wurden und geringe Viabilität aufwiesen, durch eine Zugabe von Johanniskrautextrakt (Endkonzentration des Hyperforin 25 µg/ml) eine Viabilitätszunahme erfahren. Daraus lässt sich schließen, dass Hyperforin in hohen Konzentration proliferative Effekte haben könnte oder aber, dass andere Bestandteile des Johanniskrautextraktes, die proliferativ wirken, in diesen hohen Dosen überwiegen.

4.2.2. Morphologie

Die Synapsendichte hippocampaler Zellen, die mit Johanniskrautextrakt behandelt wurden (0,3 µg Hyperforin/ml), ist für alle beobachteten Behandlungszeitpunkte (mit Ausnahme von DIV 0 verglichen mit DIV 5) signifikant geringer als die der unbehandelten Kontrollen ($p < 0,05$). Für Fluoxetin wurde dieser Effekt von Xu et al.

2010 beschrieben. Die Arbeitsgruppe sah einen verringerten intrazellulären Calciumspiegel als Ursache für den Kollaps von Wachstumskegeln und der Einziehung von Neuriten an. Hyperforin als Bestandteil des Johanniskrautextraktes kann den intrazellulären Calciumspiegel erhöhen. Dies geschieht dosisabhängig und unabhängig vom extrazellulären Calciumspiegel.
Für glatte Muskelzellen konnte dies bereits gezeigt werden. Die mittlere effektive Konzentration (EC_{50}) lag mit 1,5 µg/ml höher als bei der hier exemplarisch untersuchten Konzentration von 0,3 µg/ml (Koch et al., 2001). Leuner et al (2013) konnten zeigen, dass Hyperforin die Morphologie der dendritschen Dornen hippocampaler Pyramidenzellen über spezielle Calciumkanäle verändern kann. Dass ein zu hoher, aber auch ein zu niedriger intrazellulärer Calciumspiegel sich negativ auf das Auswachsen von Wachstumskegeln auswirkt, haben Kater und Miller bereits 1991 beschrieben.

Die Hemmung der Aufnahme der Monoamine Serotonin Dopamin und Noradrenalin in Synaptosomen durch Hyperforin erfolgt mit einer Inhibitionskonstante IC_{50} von 0,4 bis 0,6 µg/ml und unabhängig von einer direkten Bindung des Stoffes an den jeweiligen Monoamintransporter (Roz et al., 2002). Somit ist dieser Effekt eine nicht-kompetitive Hemmung. Es wird eine Verringerung des extrazellulären pH-Wertes sowie ein Anstieg der intrazellulären Natriumkonzentration diskutiert. Als Folge dessen kommt es zu einer Beeinträchtigung der H^+-ATPase, die die treibende Kraft der Aufnahme monoaminerger Vesikel ist (Chatterjee et al., 2001, Koch et al., 2001, Zanoli 2004, Leuner et al., 2007). Des weiteren wirkt Hyperforin NMDA-antagonistisch in *in vitro*-Studien, wodurch der Calcium-Einstrom in die Zelle blockiert wird. *In vivo* konnte dieser Effekt nicht nachgewiesen werden (Kumar et al., 2006).
Langosch et al. (2002) konnten in elektrophysiologischen Untersuchungen an Hippocampusschnitten von Meerschweinchen zeigen, dass Johanniskrautextrakte über AMPA- und GABA-Rezeptoren exzitatorisch wirken.
Dieser Effekt war jedoch weder für Hyperforin noch für Hypericin als Einzelsubstanz nachweisbar.

Da es sich bei Johanniskraut um ein Vielstoffgemisch handelt, ist dessen Wirkung vielschichtiger und komplexer als die Wirkung von Fluoxetin, einer chemisch her-

gestellten Reinsubstanz. Beiden Substanzen ist gemeinsam, dass sie Apoptose induzieren können. Dies konnte für Fluoxetin unter anderem von unserer Arbeitsgruppe gezeigt werden (Schaz et al., 2010). Für Johanniskraut lässt sich durch die in dieser Arbeit dargestellten Beobachtungen und andere Studien postulieren, dass dieses Substanzgemisch *in vitro* zu Apotose und anderen neuroplastischen Veränderungen führen kann (Hostanska et al., 2003, Reichling et al., 2003; Kehrle et al. 2009 und 2009). Dies geschieht dosis- und entwicklungsabhängig. Der Effekt ist bei beiden Medikamenten unabhängig vom Serotonintransporter (Schaz et al., 2010, Roz et al., 2002).

Als „Naturprodukt“ wird die Wirkung von Johanniskraut oftmals unterschätzt. Die Rezeptfreiheit, insbesondere für die Applikation im Kindes- und Jugendalter, sollte unserer Meinung nach überdacht werden, auch wenn der Datentransfer von *in vitro*-Studien auf die Klinik sehr limitiert ist.

4.3. Limitationen

Diese Arbeit ist eine *in vitro*-Studie. Die Experimente erfolgten an primären neuronalen Zellen aus Rattenembryonen, die im Inkubator kultiviert wurden. Umwelteinflüsse unter diesen Laborbedingungen sind nur sehr schwer vergleichbar mit den Einflüssen, denen neuronale Zellen *in vivo* ausgesetzt sind. Außerdem wachsen Zellen *in vitro* sehr viel schneller als *in vivo*, so dass die ausgewählten Zeitpunkte nicht exakt bestimmten Entwicklungsstadien *in vivo* zugeordnet werden können.

Die neuronalen Zellen stammen aus Ratten eines Auszuchtstammes. Während dieses Modell näher an der Realität liegen mag, ist die Genetik hierbei weiter gestreut als bei Inzuchtstämmen. Untersuchungen an letzteren könnten unter Umständen durch einen einheitlicheren Genpool deutlichere Ergebnisse erbringen.

Die Versuchsanordnung erfolgte unverbunden, da die verbundene Anordnung aufgrund der begrenzten Zellanzahl eines Versuchstieres technisch nicht möglich war.

Hyperforin, die Hauptwirkkonstante des Substanzgemisches Johanniskraut ist sowohl hitze- als auch lichtempfindlich (Zanoli, 2004). Die Experimente wurden möglichst ohne Lichteinfluss und unter einer Temperatur von maximal 37 °C im Brutschrank durchgeführt. Um nachzuweisen, ob die errechneten und ausgewogenen Dosierungen am Ende des Experiments noch vorhanden waren, wurde in Zusammenarbeit mit der Abteilung für Klinische Pharmakologie und Phytopharmako-

logie der Hyperforingehalt mittels einer HPLC verblindet untersucht (Daten hier nicht gezeigt). Aufgrund des aufwändigen Verfahrens konnte dies nur stichprobenhaft erfolgen. In den untersuchten Proben war der Hyperforingehalt jeweils konstant.

Deutlich wurde in diesen *in vitro*-Versuchen, dass

- entwicklungsabhängige Effekte *in vitro* nur sehr limitiert darstellbar sind.
- Untersuchungen aufgrund der limitierten Neuronanzahl, die man pro fetalem Gehirn gewinnen kann, quasi im „cross over"-Vergleich erfolgen müssen.
- Kortikale und hippocampale neuronale Zellen *in vitro* auch ohne Applikation fraglich neurotoxischer Substanzen nur wenige Wochen überleben. Dieser Zeitraum erscheint zu kurz, um wesentliche Unterschiede bezüglich konzentrationsabhängiger Effekte zu detektieren.

Um nun zu den Ausgangshypothesen zurückzukommen kann folgendes festgehalten werden:

1. Die untersuchten primären neuronalen Zellen *in vitro* reagieren abhängig vom Entwicklungsstadium unterschiedlich auf die Behandlung mit der getesteten Substanz. Allerdings nicht wie angenommen so, dass weniger ausgereifte Zellen sensibler reagieren als in der Maturierung fortgeschrittenere Zellen. Die Ergebnisse zeigen eher das Gegenteil: je länger die Zellen vor der Behandlung kultiviert wurden und je weiter differenziert sie zum Zeitpunkt des Kontaktes mit der jeweiligen Substanz sind, desto sensibler ist die Reaktion. Auch in der Literatur findet man ähnliche Beobachtungen, für Gliazellen (Astrozytenkulturen) konnte besipielsweise nachgewiesen werden, dass 7 Tage alte Kulturen eine höhere Resistenz gegenüber hypoxischen Bedingungen aufweisen als ausdifferenzierte Kulturen mit 21 Tagen *in vitro* (Paul, 2007). Ein Erklärungsansatz hierfür könnte sein, dass die sehr jungen und unreifen Zellen noch nicht die endgültige Proteinausstattung haben und in ihrer Funktionalität eingeschränkt sind, so dass sie noch nicht in der Lage sind, ihr Apoptoseprogramm vollständig zu aktivieren.
2. Die Wirkmechanismen sind dosisabhängig. Höhere Dosen der beiden untersuchten Substanzen zeigen stärkere Effekte als niedrigere Dosen. Für Johanniskrautextrakt trifft dies bis zu einer Konzentration von 3 µg Hyperforin/ml zu,

bei höheren Konzentrationen ist der Effekt der Behandlung geringer, was möglicherweise am Substanzgemisch liegt.

3. Kortikale und hippocampale neuronale Zellen reagieren unterschiedlich auf die applizierten Substanzen. Dies wurde ausschließlich deskriptiv dargestellt und kann so nur für die Behandlung mit Johanniskrautextrakt beobachtet werden. Möglicherweise reifen kortikale Zellen schneller aus als hippocampale Zellen, so dass die volle Funktionalität zu einem früheren Zeitpunkt gegeben ist, was sich in der Empfindlichkeit der Zellen gegenüber der Substanzen auswirkt.

Ausblick:

Diese Studie konnte allererste Anhalte dafür geben, dass die neuronale Entwicklung die Wirkung der untersuchten Antidepressiva Fluoxetin und Johanniskrautextrakt im *in vitro*-System beeinflusst.

Weitere *in vivo* Untersuchungen zu Fluoxetin und dem chemisch sehr verwandten Stoff Atomoxetin, der bei ADHS-Patienten eingesetzt wird, konnten bereits erfolgen. Veränderungen auf Protein- und Genebene der Zellen konnten dargestellt werden (Udvardi et al., 2012 und Udvardi 2014).

Aus den Ergebnissen einer *in vitro*-Studie kann selbstverständlich nicht direkt auf Wirkmechanismen *in vivo*, insbesondere im Menschen, geschlossen werden. Weitere tierexperimentelle Untersuchungen in Kombination mit funktioneller Bildgebung (PET, SPECT, MR-Spektroskopie, fMRT) unter Therapie könnten verifizieren, ob Effekte auf Zellwachstum, Dendritenbildung etc. auch *in vivo* detektierbar sind und für die klinische Wirkung eine Rolle spielen.

5. Zusammenfassung

Seit Jahrhunderten werden in Deutschland bei depressiven Störungen Johanniskrautextrakte eingesetzt. Wegen der guten Verträglichkeit und der hohen Akzeptanz von Phytopharmaka in der Allgemeinbevölkerung werden sie auch in der Behandlung von Kindern und Jugendlichen häufig verwendet. Zudem sind sie rezeptfrei erhältlich. Der genaue biologische Wirkmechanismus von Johanniskraut ist wie der anderer Antidepressiva allerdings nur unvollständig verstanden. Hyperforin und Hypericin, die Hauptbestandteile des Johanniskraut, scheinen wie die selektiven Serotoninwiederaufnahmehemmer (SSRI) eine inhibitorische Wirkung auf präsynaptische Transporterproteine, insbesondere Serotonin- und Dopamintransporter, zu besitzen. Zahlreiche neuere Studien, insbesondere für den SSRI Fluoxetin, legen nahe, dass die klinische Wirkung der Antidepressiva nicht nur auf der Beeinflussung des monoaminergen Transmitterspiegels beruht, sondern auch Effekte auf die Viabilität und die neuronale Plastizität eine wesentliche Rolle spielen. Unter anderem konnte auch von unserer Arbeitsgruppe bereits gezeigt werden, dass der SSRI Fluoxetin im *in vitro* Zellsystem apoptotische Prozesse beeinflusst, wobei hier N-Methyl-D-Aspartat (NMDA)-antagonistische und gamma-Aminobuttersäure (GABA)-mimetische Effekte eine Rolle zu spielen scheinen.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Wirkung von Johanniskrautextrakt mit der von Fluoxetin in neuronalen Zellkulturen verglichen und untersucht, ob die Wirkung auf Viabilität und Plastizität dieser beiden antidepressiv wirkenden Substanzen auf maturierende Neurone (1.) dosisabhängig und (2.) abhängig vom Entwicklungsstand ist.

Hierfür wurden neuronale Primärkulturen aus fetalem Kortex und Hippocampus aus Ratte von Tag 0 bis 21 *in vitro* (Tag 0, 5, 10, 21; *day in vitro* (DIV)) mit verschiedenen Konzentrationen des Substanzgemisches Johanniskrautextrakt (0,1; 0,3; 1; 3; 10; 15; 25 µg/ml, standardisiert nach der Hauptwirkkonstante Hyperforin) bzw. Fluoxetin behandelt. Als Kontrollzellen wurde eine Zelllinie ((*Human Embryonic Kidney)* HEK-293-Zellen) verwendet. Die Viabilität der behandelten Zellen wurde mittels der Aktivitätsbestimmung der mitochondrialen Dehydrogenase kolorimetrisch ermittelt (3 [4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5-Diphenyltetrazolium Bromid-

Assay (MTT-Assay)). Die Morphologie der Zellen wurde mittels Immunhistologie untersucht. Außerdem wurde in den hippocampalen neuronalen Primärkulturen die Entwicklung von Neuriten und Synapsen, die mit Johanniskrautextrakt behandelt wurden, quantifiziert.

Die beiden untersuchten Antidepressiva zeigen dosisabhängig Auswirkungen im *in vitro* Versuchssystem auf die Viabilität und Morphologie. Mit steigender Fluoxetinkonzentration von 1, 5, 10, 20, 30 40, 50 und 75 µM nimmt die Viabilität der hippocampalen und kortikalen Zellen *in vitro* und der Kontrollzelllinie ab. Johanniskrautextrakt führt bei den untersuchten Zellen nach Behandlung mit niedrigen Hyperforinkonzentrationen (0,3 bis 3 µg/ml) zu einer Abnahme der Viabilität um maximal 50-87 %. Höhere Konzentrationen jedoch lassen die Viabilität nicht weiter abfallen. Die Viabilität nach Behandlung mit Johanniskrautextrakt ist höher, wenn die Behandlung an frühen Entwicklungstagen (DIV 0 und 5) erfolgte.

Durch Fluoxetin kommt es mit ansteigender Dosis zur Degeneration der Neurone und zum Untergang des neuronalen Netzwerkes ab 10-20 µM. Johanniskrautextrakt führt in klinisch relevanten Dosen an allen untersuchten Zeitpunkten zu einer Reduktion der Synapsendichte bei unveränderter Neuritenzahl.

Der zugrunde liegende Mechanismus dieser Effekte muss weiter geklärt werden.

Möglicherweise lassen sich die Alterationen der morphologischen Merkmale der neuronalen Zellen in Zusammenschau mit der aktuellen Literatur über Veränderungen des Calciumspiegels und des pH-Wertes erklären. Ein konstanter Calciumspiegel ist wichtig für die Aussprossung von Synapsen. Wird dieser durch die untersuchten Medikamente erhöht oder verringert, ist die Synaptogenese beeinträchtigt.

Die hier präsentierten Ergebnisse beziehen sich ausschließlich auf die hier beschriebenen Bedingungen dieser *in vitro*-Studie. Inwiefern sich die Ergebnisse auf *in vivo* Bedingungen übertragen lassen muss in tierexperimentellen Studien kontrolliert werden. Aktuell ist offen ob die hier detektierten Effekte in der Behandlung von Kindern und Jugendlichen eine Rolle spielen. Es konnte gezeigt werden, dass sowohl das Substanzgemisch Johanniskrautextrakt als auch die Substanz Fluoxetin auf Zellebene Effekte unabhängig von den Monoamintransportern hervorrufen.

6. Literaturverzeichnis

1. *Aan het Rot M, Mathew SJ, Charney DS: Neurobiological mechanisms in major depressive disorder. Cand Med Assoc J 180: 305-313 (2009).*

2. *Ampuero E, Rubio FJ, Falcon R, Sandoval M, Diaz-Veliz G, Gonzalez RE, Earle N, Dagnino-Subiabre A, Aboitiz F, Orrego F, Wyneken U: Chronic fluoxetine treatment induces structural plasticity and selective changes in glutamate receptor subunits in the rat cerebral cortex. Neuroscience 169: 98-108 (2010).*

3. *Ansorge MS, Zhou M, Lira A, Hen R, Gingrich JA: Early-life blockade of the 5-HT Transporter alters emotional behaviour in adult mice. Science 306: 879-891 (2004).*

4. *Apparsundaram S, Stockdale DJ, Henningsen RA, Milla ME, Martin RS: Antidepressants targeting the serotonin reuptake transporter via a competitive mechanism. J Pharmacol Exp Ther. 327: 982-990 (2008).*

5. *Beardslee WR, Versage EM, Gladstone TR: Children of affectively ill parents: a review of the past 10 years. J Am Acad Child Adolesc Psychiatry 37: 1134-1142 (1998).*

6. *Berrigde MV, Tan AS, McCoy KD, Wang R: The biochemical and cellular basis of cell proliferation assays that use tetrazolium salts. Biochemica 4: 14-19 (1996).*

7. *Bertrand SJ, Aksenova MV, Aksenov MY, Mactutus CF, Booze RM: Endogenous amyloidogenesis in long-term rat hippocampal cell cultures. BMC Neuroscience 12: 38 (2011).*

8. *Bianchi M, Shah AJ, Fone KC, Atkins AR, Dawson LA, Heidbreder CA, Hows ME, Hagan JJ, Marsden CA: Fluoxetine administration modulates the cytoskeletal microtubular system in the rat hippocampus. Synapse, 63: 359–364 (2009).*

9. *Bilia AR, Gallori S, Vincieri FF: St John‘s wort and depression Efficacy, safety and tolerability-an update. Life Sciences. 70: 3077-3096 (2002).*

10. *Birmaher B, Ryan ND, Williamson DE, Brent DA, Kaufman J, Dahl RE, Perel J, Nelson B Childhood and adolescent depression: a review of the past 10 years. Part I. J Am Child Adolesc Psychiatry 35: 1427-1439 (1996).*

11. *Borchard-Tuch C: Depression: Wenn Kindern nichts mehr Freude macht. Pharmazeutische Zeitung online, Ausgabe 16/2008 http://www.pharmazeutische-zeitung.de/index.php?id=5490 (22.10.2014)*

12. *Butterweck V: Mechanism of action of St John’s Wort in depression What is known? CNS Drugs 17: (539-563) (2003).*

13. *Bylund DB, Reed AL: Childhood and adolescent depression: why do children and adults respond differently to antidepressant drugs? Neurochem Int. 51: 246-253 (2007).*

14. *Caspi A, Sugden K, Moffitt TE, Taylor A, Craig IW, Harrington H, McClay J, Mill J, Martin J, Braithwaite A, Poulton R: Influence of life stress in depression: moderation by a polymorphism in the 5-HTT gene. Science 301: 386-389 (2003).*

15. *Catapano LA, Manji HK: G protein-coupled receptors in major psychiatric disorders. Biochimica et Biophysica acta (BAA) -Biomembranes 1768: 976-993 (2007).*

16. *Chatterjee SS, Biber A, Weibezahn C.: Stimulation of glutamate, aspartate and gamma-aminobutyric acid release from synaptosomes by hyperforin.Pharmacopyschiatry 34: 511-519 (2001).*

17. *Cloonan SM, WIlliams DC: The antidepressants maprotiline and fluoxetine induce type II autophagic cell death in drug-resistant Burkitt's lymphoma. Int J Cancer 128: 1712-1723 (2011).*

18. *Czygan FC: Kulturgeschichte und Mystik des Johanniskrauts. Pharm unserer Zeit 32: 184-190 (2003).*

19. *Delgado PL: How antidepressants help depression: mechanisms of action and clinical response. J Clin Psychiatry 65: 25-30 (2004).*

20. *DGPPN, BÄK, KBV, AWMF, AkdÄ, BPtK, BApK, DAGSHG, DEGAM, DGPM, DGPs, DGRW (Hrsg) für die Leitliniengruppe Unipolare Depression. S3-Leitlinie/Nationale Versorgungsleitlinie Unipolare Depression-Kurzfassung, 1. Auflage 2009. DGPPN, ÄZQ, AWMF - Berlin, Düsseldorf 2009.*

21. *Di Carlo G, Borrelli F, Ernst E, Izzo AA: St John‘s wort: Prozac from the plant kingdom. Trends Pharmacol Sci 6: 292-297 (2001).*

22. *Dt.Ges.f. Kinder- und Jugendpsychiatrie und Psychotherapie u.a. (Hrsg.): Leitlinien zur Diagnostik und Therapie von psychischen Störungen im Säuglings-, Kindes- und Jugendalter. Deutscher Ärzte Verlag, 3. überarbeitete Auflage 2007 - ISBN: 978-3-7691-0492-9, S. 57 - 71.*

23. *Dt.Ges.f. Kinder- und Jugendpsychiatrie und Psychotherapie u.a. (Hrsg.): Leitlinie Behandlung von depressiven Störungen bei Kin-*

dern und Jugendlichen 2013. http://www.awmf.org/uploads/tx_szleitlinien/028-043l_S3_Depressive_Störungen_bei_Kindern_Jugendlichen_2013-07.pdf (letzter Aufruf 22. Oktober 2014)

24. *Duman RS: Novel therapeutic approaches beyond the serotonin receptor. Biol Psychiatry 44: 324-335 (1998).*

25. *Duman RS: Depression: A case of neuronal life and death? Biol Psychiatry 56: 140-145 (2004).*

26. *Duman RS, Monteggia LM: A neurotrophic model for stress-related mood disorders. Biol Psychiatry 59: 1116-1127 (2006).*

27. *Fava M, Kendler KS: Major depressive disorder. Neuron 28: 335-341 (2000).*

28. *Fegert JM: Therapie. In: Fegert JM, Eggers C, Resch F: Psychiatrie und Psychotherapie der Kindes- und Jugendalter, 2. Auflage, Springer Verlag 2012, S. 211-214.*

29. *Frohn B: Klostermedizin. 1. Auflage, Komet Verlag GmbH Köln (2007) S. 80-82.*

30. *Fuchs E: Neurogenesis in the adult brain: is there an association with mental disorder? Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci 257: 247-249 (2007).*

31. *Fulda S, Friesen C, Los M, Scaffidi C, Mier W, Benedict M, Nunez G, Krammer PH, Peter ME, Debatin KM: Betulinic acid triggers CD95 (APO-1/Fas)- and p53- independent apoptosis via activation of caspases in neuroectodermal tumors. Cancer Res 57: 4956-4964 (1997).*

32. *Gentile S: Antidepressant use in children and adolescents diagnosed with major depressive disorder: what can we learn from published data? Reviews on Recent Clinical Trials, 5: 63-75 (2010).*

33. *Hardingham GE, Bading H: The Yin and YANG of NMDA receptor signalling. Trends in Neurosciences, 26: 81-89 (2003).*

34. *Henn FA, Vollmayr B: Basic Pathophysiological Mechanisms in Depression: What are they and how might they affect the course of the illness? Pharmacopsychiatry 37: 152-156 (2004).*

35. *Hirano K, Kimura R, Sugimoto Y, Yamada J, Uchida S, Kato Y, Hashimoto H, Yamasa S: Relationship between brain serotonin transporter binding, plasma concentration and behavioural effect of selective serotonin reuptake inhibitors. Br J Pharmacol 144: 965-602 (2005).*

36. *Hostanska K, Reichling J, Bommer S, Weber M, Saller R.: Hyperforin a constituent of St John‘s wort (Hypericum perforatum L.) extract induces apoptosis by triggering activation of caspases and with hypericin synergistically exerts cytotoxicity towards malignant cell lines. Eur J Pharm Biopharm 56: 121-132 (2003).*

37. *Ikonomidou C, Bosch F, Miksa M, Bittigau P, Vöckler J, Dikranian K, Tenkova TI, Stefovska V, Turski L, Olnex JW: Blockade of NMDA receptors and apoptotic neurodegeneration in the developing brain. Science 283: 70-74 (1999).*

38. *Ikonomidou C, Stefovska V, Turski L: Neuronal death enhanced by N-methyl-D-asparate antagonists. Proc Natl Acad Sci U S A 23: 12885-12890 (2000).*

39. *Ikonomidou C, Bittigau P, Koch C, Genz K, Hoerster F, Felderhoff-Mueser U, Tenkova T, Dikranian K, Olney JW: Neurotransmitters and apotosis in the developing brain. Biochemical Pharmacology 62: 401-405 (2001).*

40. *Ikonomidou C: Triggers of apoptosis in the immature brain. Brain and Development 31: 488-492 (2009).*

41. *Karson CN, Newton JE, Livingston R, Jolly JB, Cooper TB, Springg J, Komoroski RA: Human brain fluoxetine concentration. J Neuropsychol 5: 322-329 (1993).*

42. *Kaunzinger A, Grötsch P, Bohlmann K, Schubert-Zsilavecz M. Schnell freisetzende Fluoxetin-20 mg-Filmtabletten im Vergleich. Pharmazeutische Zeitung online, Ausgabe 36/2008 http://www.pharmazeutische-zeitung.de/index.php?id=6619 (22.10.2014).*

43. *Kearns GL, Abdel-Rahman SM, Alander SW, Blowey DL, Leeder JS, Kauffman RE: Developmental phyrmacology- drug disposition, action and therapy in infants and children. N Engl J Med 349: 1157-1167 (2003).*

44. *Kehrle F, Schaz U, Böckers T, Kölch M, Fegert J, Ludolph AG: Entwicklungsabhängige Wirkung von Johanniskraut auf maturierende Neurone in vitro. (unveröffentlichte Daten; Posterpräsentation beim Kongress der DGPPN in Berlin 2009).*

45. *Kehrle F, Schaz U, Udvardi P, Kölch M, Fegert JM, Ludolph AG: Wirkung von Johanniskrautextrakt auf sich entwickelnde Neurone in vitro. (unveröffentlichte Daten; Posterpräsentation beim Kongress der DGKJP in Hamburg 2009).*

46. *Kendler KS, Gardner CO, Prescott CA: Clinical characteristics of major depression that predict risk of depression in relatives. Arch Gen Psychiatry 56: 322-327 (1999).*

47. *Kendler KS, Thornton LM, Gardner CO: Genetic risk, number of previous depressive episodes, ans stressful life events in predicting onset of major depression. Am J Psychiatry 158: 582-586 (2001).*

48. *Kessler RC, Avenevoli S, Merikangas KR: Mood disorders in children and adolescents: An epidemiologic perspective. Biol Psychiatry 49: 1002-1014 (2001).*

49. *Kessler RC, Berglund P, Demler O, Jin R, Koretz D, Merikangas KR, Rush AJ, Walters EE, Wang PS: The epidemiology of major depressive disorder: Results from the National Comorbidity Survey Replication (NCS-R). J Am Med Assoc 289: 3095-3105 (2003).*

50. *Kessler RC, Coccaro EF, Fava M, Jaeger S, Jin R, Walters E: The prevalence and correlates of DSM-IV intermittent explosive disorder in the National Comorbidity Survey Replication. Arch Gen Psychiatry 63: 669-678 (2006).*

51. *Kessler RC, Berglund P, Demler O, Jin R, Merikangas KR, Walters EE: Lifetime prevalance and age-onset distributions of DSM-IV disorders in the national comorbidity survey replication. Arch Gen Psychiatry; 62: 593-602 (2005).*

52. *Kessler RC, Amminger GP, Aguilar-Gaxiola S, Alonso J, Lee S, Ustun TB: Age of onset of mental disorders: a review of recent literature. Curr Opin Psychiatry 20: 359-364 (2007).*

53. *Koch E, Chatterjee SS: Hyperforin stimulates intracellular calcium mobilisation and enhances extracellular acidification in DDT_1-MF2 smooth muscle cells. Pharmacopsychiatry 34:70-73 (2001).*

54. *Kodama M, Fujioka T, Duman RS: Chronic olanzapine or fluoxetine administration increases cell proliferation in hippocampus and prefrontal cortax in adult rat. Biol Psychiatry 56: 570-580 (2004).*

55. *Kootstra-Ros JE, Van Weelden MJM, Hinrichs JWJ, De Smet PAGM, van der Weide J: Therapeutic drug monitoring of antidepressants and cytochrome P450 genotyping in general practice. Journal of Clinical Pharmacology, 46: 1320-1327 (2006).*

56. *Kölch M, Bücheler R, Fegert JM, Gleiter CH. Johanniskraut - eine evidenzbasierte Alternative in der Behandlung kindlicher und juveniler Depressionen. Psychopharmakotherapie 13: 95-99 (2006).*

57. *Kölch M, Ludolph AG; Fegert JM: Antidepressant use in minors. European Psychiatric Review 2008, 63-66.*

58. *Kölch M, Plener PL, Ludolph AG, Fegert JM: Psychotrope Medikation bei Minderjährigen in Deutschland - Eine pharmakoepidemiologische Betrachtung. Psychopharmakologie 17: 112-118 (2010).*

59. *Kölch M, Pfalzer AK, Kliegl K, Rothenhöfer S, Ludolph AG, Fegert JM, Burger R, Mehler-Wex C, Stingl J, Taurines R, Egberts K, Gerlach M: Therapeutic drug monitoring of children and adolescents treated with fluoxetine. Pharmacopsychiatry 45: 72-76 (2012).*

60. *Kumar V, Mdzinarishvili A, Kiewert C, Abbruscato T, Bickel U, Van der Schyf CJ, Klein J: NMDA receptor-antagonistic properties of Hyperforin, a constituent of St. John‘s Wort. J Pharmacol Sci 102: 47-54 (2006).*

61. *Laakmann G, Schüle C, Baghai T , Kieser M. St John‘s wort in mild to moderate depression: the relevance of hyperforin for the clinical efficacy. Pharmacopsychiatry 31: 54-59 (1998).*

62. *Langosch JM, Zhou XY, Heinen M, Kupferschmid S, Chatterjee SS, Nöldner M, Walden J: St John‘s wort (Hypericum perforatum) modulates evoked potentials in guinea pig hippocampal slices vie AMPA and GABA receptors. Eur Neuropsychopharmacol. 12: 209-216 (2002).*

63. *Lee CS, Kim YJ, Jang ER, Kim W, Myung SC: Fluoxetine induces apoptosis in ovarian carcinoma cell line OVCAR-3 through reactive oxygen species-dependent activation of nuclear factor-kappaB. Basic Clin Pharmacol Toxicol. 106: 446-453 (2010).*

64. *Lee S, Jeong J, Kwak Y, Ki Park, S Depression research: where are we now? Molecular Brain 3: 8 (2010).*

65. *Lesuisse C, Martin LJ: Long-Term Culture of Mouse Cortical Neurons as a Model for Neuronal Development, Aging and Death. J Neurobiol 51 (1): 9-23 (2002).*

66. *Leuner K, Kazanski V, Müller M, Essin K, Henke B, Gollasch M, Harteneck C, Müller WE: Hyperforin - a key constituent of St. John‘s Wort specifically activates TRPC6 channels. The FASB Journal 21: 4101-4111 (2007).*

67. *Leuner K, Li W, Amaral MD; Rudolph S, Calfa G, Schuwald AM, Harteneck C, Inoue T, Pozzo-Miller L: Hyperforin modulates dendritic spine morphology in hippocampal pyramidal neurons by activating Ca^{2+}-permeable TRPC6 channels, Hippocampus 23: 40-52 (2013).*

68. *Lieb K.:Affektive Störungen. In: Lieb K, Frauenknecht S, Brunnhuber S: Intensivkurs Psychiatrie und Psychotherapie, 6. Auflage, Urban und Fischer Verlag (2008) S.147-158.*

69. *Lopez AD, Mathers CD, Ezzati M, Jamison DT, Murray CJL: Global and regional burden of disease and risk factors, 2001: systematic analysis of population health data. Lancet; 367: 1747-1757 (2006).*

70. *Ludolph AG, Schaz U, Storch A, Liebau S, Fegert JM, Böckers TM: Methylphenidate exerts no neurotoxic, but neuroprotective effects in vitro. J Neural Transm 113: 1927-1934 (2006).*

71. *Ludolph AG, Udvardi PT, Schaz U, Henes C, Adolph O, Weigt HU, Fegert JM, Böckers TM, Föhr KJ: Atomoxetine acts as an NMDA receptor blocker in clinically relevant concentrations. British Journal of Pharmacology 160: 283-291 (2010).*

72. *Malberg JE, Eisch AJ, Nestler EJ, Duman RS: Chronic antidepressant treatment increases neurogenesis in adult rat hippocampus. J. Neurosci. 20: 9104–9110 (2000).*

73. *Manji HK, Drevets WC, Charney DS: The cellular neurobiology of depression. Nat Med 7: 541-547 (2001).*

74. *Mann JJ: The medical management of depression. N Engl J Med 353: 1819-1834 (2005).*

75. *March J, Silva S, Petrycki S, Curry J, Wells K, Fairbank J, Burns B, Domino M, McNulty S, Vitiello B, Severe J; Treatment for Adolescents With Depression Study (TADS) Team: Fluoxetine, Cognitive-Behavioral Therapy, and their combination for adolescents with Depression: Treatment for Adolescents with Depression Study (TADS) Randomized Controlled Trial. Treatment for Adolescents With Depression Study Team. J Am Med Assoc. 292(7):807-820 (2004).*

76. *Merikangas KR, Nakamura EF, Kessler RC: Epidemiology of mental disorders in children and adolescents. Dialogues Clin Neurosci.11: 7-20 (2009).*

77. *Mill J, Petronis A: Molecular studies of major depressive disorder: the epigenetic perspective. Mol Psychiatry 12: 799-814 (2007).*

78. *Mitchell AJ, Vaze A, Rao S: Clinical diagnosis of depression in primary care: a meta-analysis. Lancet 374: 609-619 (2009).*

79. *Moses-Kolko, EL, Bogen D, Perel J, Bregar A, Uhl K, Levin B, Wisner KL: Neonatal signs after late in utero exposure to serotonin reuptake inhibitors. Literature review and implications for clinical applications. J Am Med Assoc 293: 2372-2383 (2005).*

80. *Mosmann T: Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. Journal of Immunological Methods, 65: 55-63 (1983).*

81. *Murray CJL und Lopez AD: Evidence-based health policy-lessons from the global burden of disease study. Science 274: 740-743 (1996).*

82. *Murray, CJL.; Lopez, AD. World Health Report 2002: Reducing risks, promoting healthy life. Geneva, Switzerland: World Health Organization; 2002.*

83. *Nencetti S, Mazzoni MR, Ortore G, Lapucci A, Giuntini J, Orlandini E, Banti I, Nuti E, Lucacchini A, Giannaccini G, Rossello A: Synthesis, molecular docking and binding studies of selective serotonin transporter inhibitors. Eur Journal of Medicinal Chemistry 46: 825-834 (2011).*

84. *Nestler EJ, Barrot M, DiLeone RJ, Eisch AJ, Gold SJ, Monteggia LM : Neurobiology of depression. Neuron 34: 13-25 (2002).*

85. *Nicoletti I, Migliorati G, Pagliacci MC, Grignani F, Riccardi C: A rapid and simple method for measuring thymocyte apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. J Immunol Methods 139: 271–279 (1991).*

86. *Owens MJ: Selectivity of antidepressants: from the monoamine-hypothesis of depression to the SSRI revolution and beyond. J Clin Psychiatry 65: 5-10 (2004).*

87. *Pahlow (1993): Das große Buch der Heilpflanzen, Gräfe und Unzer-Verlag, S. 175-177.*

88. *Parsons CG, Stöffler A, Danysz W: Memantine: a NMDA receptor antagonist that improves memory by restoration of homeostasis in the glutamatergic sytem- too little activation is bad, to much is even worse. Neuropharmacology 53: 699-723 (2007).*

89. *Paul C: Expression und Wirkung von Erythropoietin ß bei Astrozyten unter normoxischen und hypoxischen Bedingungen. Med. Dissertation Universität Tübingen (2007).*

90. *Reichling J, Hostanska K, Saller R: Johanniskraut (Hypericum perforatum L.) - Vielstoffgemische kontra phytogene Einzelstoffe. Forsch Komplementärmed Klass Naturheilkd 10: 28–32 (2003).*

91. *Robinson RT, Drafts BC, Fisher JL: Fluoxetine increases $GABA_A$ receptor activity through a novel modulatory site. J Pharmacol Exp Ther 304: 978-984 (2003).*

92. *Roz N, Mazur Y, Hirshfeld A, Rehavi M. Inhibition of vesicular uptake of monoamines by hyperforin. Life Sciences 71: 2227-2237 (2002).*

93. *Röder C, Schaefer M, Leucht S: Meta-Analyse zu Wirksamkeit und Verträglichkeit der Behandlung der leichten und mittelschweren Depression mit Johanniskraut. Fortschr Neurol Psychiat 72: 330-343 (2004).*

94. *Saller R, Melzer J, Reichling J: Johanniskraut (Hypericum perforatum): Ein plurivalenter Rohstoff für traditionelle und moderne Therapie. Forsch Komplementärmed Klass Naturheilkd 10: 33-40 (2003).*

95. *Sanacora G, Zarate CA, Krystal J, Manji HK: Targeting the glutamatergic system to develop novel, improved therapeutics for mood disorders. Nat Rev Drug Discov.7: 426-437 (2008).*

96. *Schaz U, Föhr KJ, Liebau S, Fulda S, Koelch M, Fegert JM, Boeckers TM, Ludolph AG (2010) Dose-dependent modulation of apoptotic processes by fluoxetine in maturing neuronal cells: an in vitro study. World J Biol Psychiatry. 12: 89-98 (2010).*

97. *Schempp CM, Kirkin V, Simon-Haarhaus B, Kersten A, Kiss J, Termeer CC, Gilb B, Kaufmann T, Borner C, Sleeman JP, Simon JC. Inhibition of tumour cell growth by hyperforin, a novel anticancer drug from St John‘s wort that acts by induction of apoptosis. Oncogene 21: 1242-1250 (2002).*

98. *Shaw G, Morse S, Ararat M, Graham FL: Preferential transformation of human neuronal cells by human adenoviruses and the origin of HEK 293 cells. The FASEB Journal 16: 869-871 (2002).*

99. *Sullivan PF, Neale MC, Kendler MS: Genetic epidemiology of major depressive disorder: review and meta-analysis. Am J Psychiatry 157: 1552-1562 (2000).*

100. *Szasz BK, Mike A, Karoly R, Gerevich Z, Illes P, Vizi ES, Kiss JP: Direct inhibitory effect of fluoxetine on N-methyl-D-aspartate receptors in the central nervous system. Biol Psychiatry 62: 1303-1309 (2007).*

101. *Udvardi PT, Föhr K, Dreyhaupt J, Fegert JM, Böckers TM, Ludolph AG: Atomoxetine affects synaptic composition in rodents in an age-dependent manner. (unveröffentlichter Befund; Poster beim 55th Annual Meeting der American Academy of Child and Adolescent Psychiatry 2012 in San Francisco).*

102. *Udvardi PT: Pre- and postnatal effects of atomoxetine hydrochloride on maturing neurons in the rat brain. Dissertation zum Dr. rer. nat. Universität Ulm (2014).*

103. *Vollmayr B, Mahlstedt MM, Henn FA: Neurogenesis and depression: what animal models tell us about the link. Eur Arch Psychitatry Clin Neurosci 257: 300-303 (2007).*

104. *Weissman MM, Warner V, Wickamaratne P, Moreau P, Olfson M: Offspring of depressed parents: 10 years later. Arch Gen Psychiatry 54: 932-940 (1997).*

105. *Weissman MM, Wickamaratne P, Nomura P, Pilowsky D, Verdeli H Offspring of depressed parents: 20 years later. Am J Psychiatry 163: 1001-1008 (2006).*

106. *Winkler K: Europa bündelt Kräfte gegen Depression. Innovationsreport 29.10.2008*
http://www.innovations-report.de/html/berichte/medizin_gesundhe

it/europa_buendelt_kraefte_gegen_depression_121221.html (22.10.2014)

107. Wisner KL, Gelenberg AJ, Leonard H, Zarin D, Frank E: Pharmacologic treatment of depression during pregnancy. J Am Med Assoc 282: 1264-1269 (1999).

108. Wittchen HU, Jacobi F, Klose M, Ryl L: Gesundheitsberichterstattung des Bundes, Robert Koch-Institut in Zusammenarbeit mit dem Statistischen Bundesamt Heft 51 Seite 19 September 2010 Depressive Erkrankungen Berlin: Robert Koch-Institut ISBN 978-3-89606-205-5 ISSN 1437-5478 Link: http://www.rki.de/DE/Content/Gesundheitsmonitoring/Gesundheitsberichterstattung/GBEDownloadsT/depression.pdf?__blob=publicationFile(22.10.2014)

109. Wurglics M und Schubert-Zsilavecz M: Hypericum perforatum: a ‚modern' herbal antidepressant. Pharmacokinetics of active ingeredients. Clin Pharmacokinet 45: 449-468 (2006).

110. Zanoli P: Role of hyperforin in the pharmacological activities of St. John's Wort. CNS Drug Rev, 10: 203-218 (2004).

Internetquellen:

http://www.ifd-allensbach.de/uploads/tx_studies/7528_Naturheilmittel_2010.pdf
S. 18 (22.10.2014)
EMEA 2006
http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Referrals_document/Prozac_6_12/WC500013228.pdf
(22.10.2014)

Bildquellen:

[1]: http://www.schwabe.de/schwabe/Arzneipflanzen/Johanniskraut/Botanik.php

[2]: Stern 2009, Verlag Gruner und Jahr, Hamburg. Nr. 13 (19.03.2009) S. 11

7. Anhang

7.1. Versuchsplanung

Tab. 1: Versuchsplanung MTT-Assays. HEK: *human embryonic kidney cells*, hSERT: humaner Serotonintransporter, rSERT: Ratten-Serotonintransporter, HIP: hippocampale Primärzellen, CTX: kortikale Primärzellen, DIV: *day in vitro*, h: Stunden. *): Daten in dieser Arbeit nicht gezeigt, #): nur für HEK-Zellen durchgeführt.

	Fluoxetin	Johanniskrautextrakt
Konzentrationen	(µM) 1, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 75	(µg/ml Hyperforin) 0,1; 0,3; 1; 3; 10;15;25
Zelllinien	HEK, HEK-hSERT*), HEK-rSERT*)	HEK
Behandlungsdauer	72 h	24 h#), 48 h #), 72 h, 96 h #)
Primärzellkulturen	HIP, CTX	HIP, CTX
Behandlungstage	DIV 0, 5, 10, 21	DIV 0, 5, 10, 21
Behandlungsdauer	72 h	72 h
Wiederholungen	je n=6	je n=6

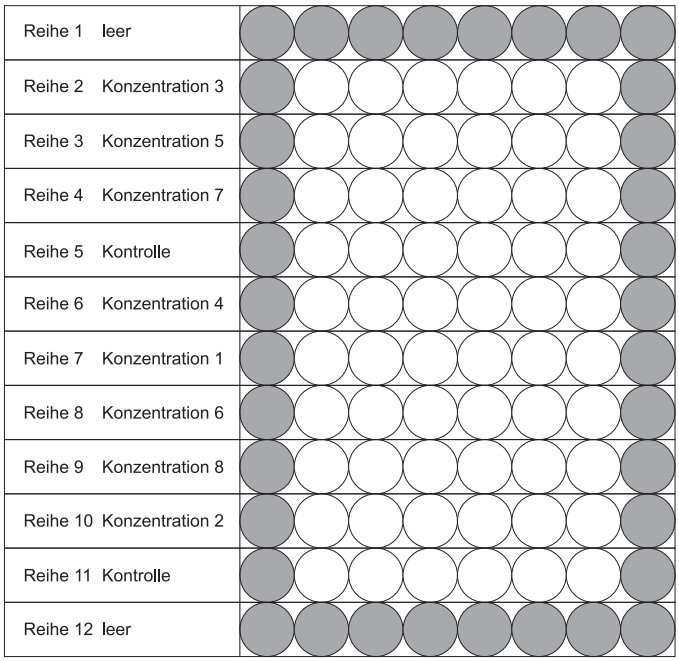

Abb. 23: Schematische Darstellung einer 96-Well-Platte
Auf die 96-well Zellkulturplatten wurden nach oben aufgeführtem Schema in die inneren Wells die jeweils zu untersuchenden Zellen ausgesät. Die äußeren Reihen wurden nicht verwendet, jedoch zum Schutz vor Verdunstung mit HBSS (Hank'S balancierter Salzlösung) befüllt. Anschließend wurde reihenweise mit dem jeweils untersuchten Medikament behandelt. Die Reihenfolge der Anordnung der einzelnen Medikamentenkonzentrationen wurde bei jeder Untersuchung willkürlich gewählt.

Tab. 2: Versuchsplanung Immunzytochemie
HEK: *human embryonic kidney cells*, HIP: hippocampale Primärzellen, CTX: kortikale Primärzellen, DIV: *day in vitro, **): Daten in dieser Arbeit nicht gezeigt.

	Fluoxetin	Johanniskraut
Konzentrationen	(μM) 10, 20, 50	(μg/ml Hyperforin) 0,3; 3; 25
Zellen	HEK*), HIP, CTX	HEK*), HIP, CTX
Behandlungstage	DIV 0, 5, 10, 21	DIV 0, 5, 10, 21
Behandlungsdauer	72 h	72 h

Tab. 3: Bestimmung von Neuritenanzahl und Synapsendichte
HIP: hippocampale Primärzellen, DIV: *day in vitro*.

	Johanniskraut
Konzentration	0,3 μg Hyperforin/ml
Zellen	HIP
Behandlungstage	DIV 0, 5, 10, 21
Behandlungsdauer	72 h

7.2. Regressionskurven MTT-Assays

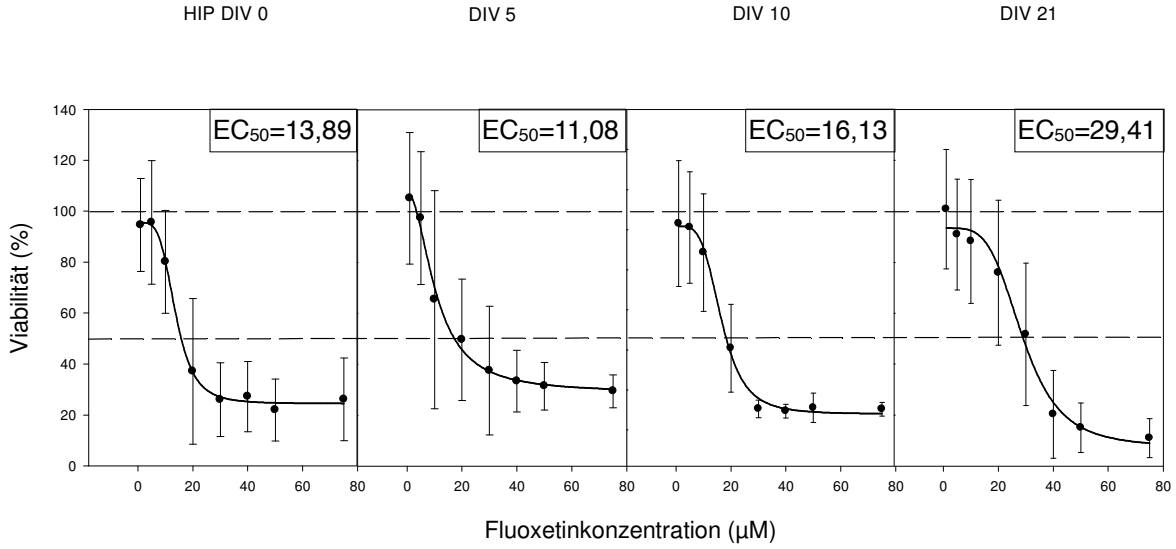

Abb.24: Wirkung verschiedener Konzentrationen von Fluoxetin auf die Viabilität hippocampaler Primärzellkulturen DIV: *day in vitro,* EC_{50}: mittlere effektive Konzentration
Die Hippocampi embryonaler Ratten wurden an Embryonaltag 18 (E18) entnommen. Anschließend wurden die Zellen (175 000/ml) unterschiedlich lange in Kultur gehalten. Die Behandlung erfolgte für 72 h. Mittels SigmaPlot® wurden über die Gleichung für logistische Funktionen für 3 Parameter Regressionskurven generiert und die mittlere effektive Konzentration (EC_{50}) errechnet. Die Viabilität der internen Kontrolle beträgt 100 %. Steigende Fluoxetinkonzentrationen führen zu einer Viabilitätsabnahme an allen untersuchten Behandlungszeitpunkten. Die größte Abnahme der Viabilität ist an DIV 21 zu beobachten (*n=6*).

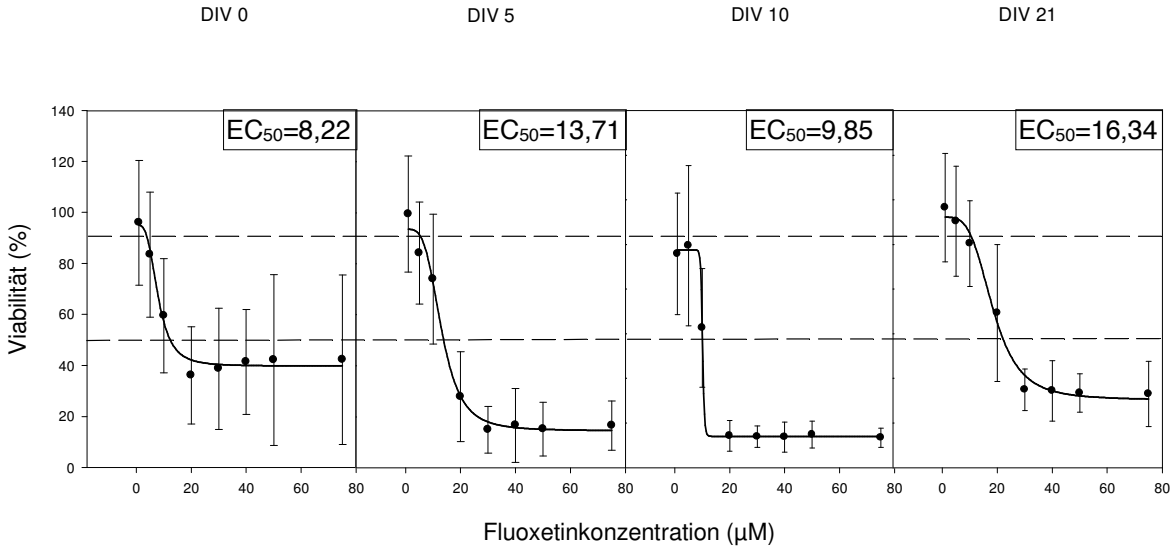

Abb.25: Wirkung verschiedener Fluoxetinkonzentrationen auf die Viabilität kortikaler Primärzellkulturen.DIV: *day in vitro,* EC_{50}: mittlere effektive Konzentration
Die präfrontalen Kortizes embryonaler Ratten wurden an Embryonaltag 18 (E18) entnommen. Anschließend wurden die Zellen (175 000/ml) unterschiedlich lange in Kultur gehalten. Die Behandlung erfolgte für 72 h. Mittels SigmaPlot® wurden über die Gleichung für logistische Funktionen für 3 Parameter Regressionskurven generiert und die mittlere effektive Konzentration (EC_{50}) errechnet. Die Viabilität der internen Kontrolle beträgt 100 %. Zunehmende Fluoxetinkonzentrationen haben bei allen dargestellten Behandlungszeitpunkten eine Viabilitätsabnahme zur Folge. Die geringsten Viabilitätswerte ergeben sich hier bei Fluoxetinkonzentrationen zwischen 20 µM und 75 µM an DIV 10 (*n=6*).

7.3. Deskription

Deskription der erhobenen Daten, tabellarisch dargestellt

Tab. 4: Statistik: Deskription für Fluoxetin, durchgeführt mit SAS® für PC, Version 9.2.
Zelltyp „1“: hippocampale Zellen, Zelltyp „2“: kortikale Zellen, N: Anzahl, nMiss: Anzahl fehlender Werte, MW: Mittelwert, s: Standardabweichung, Min: Minimum, Q1: 1. Quartil, Q3: 3. Quartil, Max: Maximum

Zelltyp 1

Konzentration	Tag	Tier								Total	
		1		2		3		4			
		N	%	N	%	N	%	N	%	N	%
1	0	6	0.3	12	0.5	12	0.5	6	0.3	36	1.6
	5	12	0.5	12	0.5	12	0.5		0.0	36	1.6
	10	12	0.5	12	0.5	12	0.5		0.0	36	1.6
	21	11	0.5	12	0.5	12	0.5		0.0	35	1.5
5	0	6	0.3	12	0.5	12	0.5	6	0.3	36	1.6
	5	12	0.5	12	0.5	12	0.5		0.0	36	1.6
	10	12	0.5	12	0.5	12	0.5		0.0	36	1.6
	21	12	0.5	12	0.5	12	0.5		0.0	36	1.6
10	0	6	0.3	12	0.5	12	0.5	6	0.3	36	1.6
	5	12	0.5	12	0.5	12	0.5		0.0	36	1.6
	10	12	0.5	12	0.5	12	0.5		0.0	36	1.6
	21	11	0.5	12	0.5	12	0.5		0.0	35	1.5
20	0	6	0.3	11	0.5	12	0.5	6	0.3	35	1.5
	5	12	0.5	12	0.5	12	0.5		0.0	36	1.6
	10	12	0.5	12	0.5	12	0.5		0.0	36	1.6
	21	11	0.5	12	0.5	12	0.5		0.0	35	1.5
30	0	6	0.3	12	0.5	12	0.5	6	0.3	36	1.6
	5	12	0.5	12	0.5	12	0.5		0.0	36	1.6
	10	12	0.5	12	0.5	12	0.5		0.0	36	1.6
	21	12	0.5	12	0.5	12	0.5		0.0	36	1.6
40	0	6	0.3	12	0.5	12	0.5	6	0.3	36	1.6
	5	12	0.5	12	0.5	12	0.5		0.0	36	1.6
	10	12	0.5	12	0.5	12	0.5		0.0	36	1.6
	21	11	0.5	12	0.5	12	0.5		0.0	35	1.5
50	0	6	0.3	12	0.5	12	0.5	6	0.3	36	1.6
	5	12	0.5	12	0.5	11	0.5		0.0	35	1.5
	10	12	0.5	12	0.5	12	0.5		0.0	36	1.6
	21	12	0.5	12	0.5	12	0.5		0.0	36	1.6

Zelltyp 1

Konzentration	Tag	Tier								Total	
		1		2		3		4			
		N	%	N	%	N	%	N	%	N	%
75	0	6	0.3	11	0.5	12	0.5	6	0.3	35	1.5
	5	12	0.5	12	0.5	12	0.5		0.0	36	1.6
	10	12	0.5	12	0.5	12	0.5		0.0	36	1.6
	21	12	0.5	12	0.5	12	0.5		0.0	36	1.6
gesamt		332	14.5	382	16.7	383	16.8	48	2.1	1145	50.2

2

Konzentration	Tag	Tier								Total	
		1		2		3		4			
		N	%	N	%	N	%	N	%	N	%
1	0	12	0.5	12	0.5	12	0.5		0.0	36	1.6
	5	12	0.5	12	0.5	11	0.5		0.0	35	1.5
	10	12	0.5	12	0.5	12	0.5		0.0	36	1.6
	21	11	0.5	12	0.5	12	0.5		0.0	35	1.5
5	0	12	0.5	12	0.5	12	0.5		0.0	36	1.6
	5	12	0.5	12	0.5	10	0.4		0.0	34	1.5
	10	12	0.5	10	0.4	12	0.5		0.0	34	1.5
	21	12	0.5	12	0.5	11	0.5		0.0	35	1.5
10	0	12	0.5	12	0.5	12	0.5		0.0	36	1.6
	5	12	0.5	11	0.5	12	0.5		0.0	35	1.5
	10	12	0.5	12	0.5	12	0.5		0.0	36	1.6
	21	12	0.5	12	0.5	12	0.5		0.0	36	1.6
20	0	12	0.5	12	0.5	12	0.5		0.0	36	1.6
	5	12	0.5	12	0.5	11	0.5		0.0	35	1.5
	10	12	0.5	12	0.5	12	0.5		0.0	36	1.6
	21	12	0.5	12	0.5	12	0.5		0.0	36	1.6
30	0	12	0.5	12	0.5	12	0.5		0.0	36	1.6
	5	11	0.5	12	0.5	12	0.5		0.0	35	1.5
	10	12	0.5	12	0.5	12	0.5		0.0	36	1.6
	21	12	0.5	12	0.5	12	0.5		0.0	36	1.6
40	0	12	0.5	12	0.5	11	0.5		0.0	35	1.5
	5	11	0.5	12	0.5	12	0.5		0.0	35	1.5
	10	12	0.5	12	0.5	12	0.5		0.0	36	1.6
	21	12	0.5	12	0.5	12	0.5		0.0	36	1.6
50	0	12	0.5	11	0.5	13	0.6		0.0	36	1.6
	5	12	0.5	12	0.5	12	0.5		0.0	36	1.6
	10	12	0.5	12	0.5	12	0.5		0.0	36	1.6

2

Konzentration	Tag	Tier								Total	
		1		2		3		4			
		N	%	N	%	N	%	N	%	N	%
	21	12	0.5	12	0.5	12	0.5		0.0	36	1.6
75	0	12	0.5	11	0.5	12	0.5		0.0	35	1.5
	5	12	0.5	12	0.5	12	0.5		0.0	36	1.6
	10	12	0.5	12	0.5	12	0.5		0.0	36	1.6
	21	12	0.5	12	0.5	10	0.4		0.0	34	1.5
gesamt		381	16.7	379	16.6	377	16.5		0.0	1137	49.8

Deskription, getrennt nach Zelltyp, für Konzentration und Tag bzw. für Tag und Konzentration

1

Konzentration	Tag	Viabilität								
		N	nMiss	MW	s	Min	Q1	Median	Q3	Max
1	3	36	0	94.58	12.641	62.4	85.5	95.42	101.6	122.8
	8	0	36	-	-	-	-	-	-	-
	13	36	0	100.03	17.801	61.9	89.6	100.35	114.9	130.7
	24	35	0	104.92	17.666	71.4	91.3	100.72	119.1	146.8
5	3	36	0	95.62	11.849	75.6	87.0	94.92	103.0	120.5
	8	36	0	84.31	8.530	64.7	78.8	83.98	91.2	98.9
	13	36	0	98.23	15.702	70.8	86.5	100.66	111.0	127.5
	24	36	0	93.26	10.835	75.7	86.8	92.01	100.6	119.9
10	3	36	0	80.08	14.050	58.0	68.2	80.97	90.5	112.9
	8	36	0	64.04	20.514	18.1	44.7	73.13	76.9	91.1
	13	36	0	77.34	30.094	8.6	63.4	83.64	98.5	122.8
	24	35	0	90.94	13.353	68.3	80.1	90.31	97.2	127.8
20	3	35	0	35.85	14.694	14.2	26.6	32.67	42.7	78.5
	8	36	0	32.99	19.965	12.6	15.9	29.59	43.5	79.8
	13	36	0	41.94	16.018	11.7	30.8	41.01	48.6	86.6
	24	35	0	78.47	15.546	46.4	70.0	76.62	88.0	116.6
30	3	36	0	27.77	14.353	12.1	17.2	29.22	33.9	95.5
	8	36	0	12.92	5.601	4.9	7.2	13.47	15.2	27.9
	13	36	0	10.99	3.362	5.2	8.2	10.65	13.4	18.7
	24	36	0	53.28	18.266	23.7	40.5	52.06	63.0	103.9
40	3	36	0	27.20	9.459	11.7	17.7	27.09	33.7	47.6
	8	36	0	12.03	5.423	4.8	5.8	13.49	16.8	23.9
	13	36	0	9.57	2.973	4.5	6.7	10.20	11.2	17.4
	24	35	0	20.74	10.109	6.2	13.8	19.36	26.4	49.2
50	3	36	0	24.70	7.719	11.9	21.8	23.08	29.2	48.2
	8	35	0	11.70	4.371	5.2	6.8	12.56	14.5	18.4
	13	36	0	11.42	4.046	6.0	7.5	11.34	12.8	21.4
	24	36	0	18.80	11.767	3.5	10.0	15.83	29.9	42.4
75	3	35	0	25.30	7.879	12.1	20.2	24.37	29.9	46.6
	8	36	0	11.91	4.660	4.8	6.7	12.11	14.8	21.3
	13	36	0	9.90	2.951	5.0	7.2	9.45	12.2	16.4
	24	36	0	12.47	6.416	3.9	8.2	10.79	18.7	31.0

2

Konzentration	Tag	Viabilität								
		N	nMiss	MW	s	Min	Q1	Median	Q3	Max
1	3	36	0	95.98	11.238	72.5	87.9	97.21	104.2	125.8
	0	35	0	100.31	10.107	81.4	94.2	100.67	106.2	126.4
	5	36	0	97.16	15.096	65.7	87.2	98.09	107.9	128.8

2

Konzentration	Tag	Viabilität								
		N	nMiss	MW	s	Min	Q1	Median	Q3	Max
	21	35	0	95.67	14.005	69.0	83.3	94.81	103.9	130.6
5	0	36	0	84.44	12.026	67.5	75.1	83.98	89.4	119.4
	5	34	0	85.94	16.268	60.6	76.8	83.66	89.7	144.5
	10	34	0	95.31	15.557	70.1	85.0	91.49	101.7	137.0
	21	35	0	90.02	11.965	64.2	82.0	90.05	99.1	123.6
10	0	36	0	59.50	13.831	34.6	47.6	58.98	69.3	91.6
	5	35	0	72.32	12.140	46.1	61.2	74.61	81.8	98.6
	10	36	0	65.59	15.380	31.0	53.7	66.00	78.8	106.0
	21	36	0	80.42	17.922	58.5	66.5	74.38	88.3	123.9
20	0	36	0	36.13	14.532	20.0	25.4	32.37	45.7	73.0
	5	35	0	30.31	19.538	10.8	15.9	20.47	48.8	78.2
	10	36	0	14.38	3.515	7.5	12.6	14.73	16.1	22.8
	21	36	0	49.94	23.567	7.7	37.1	45.69	66.6	97.8
30	0	36	0	38.71	11.955	18.1	28.7	40.51	47.8	62.9
	5	35	0	15.03	4.280	6.9	12.2	15.29	17.2	27.7
	10	36	0	13.96	2.125	8.9	12.5	14.47	15.7	17.2
	21	36	0	14.92	6.382	5.4	10.1	12.69	19.7	31.4
40	0	35	0	41.79	9.549	22.9	34.8	40.03	47.8	64.1
	5	35	0	16.75	6.465	6.3	14.2	15.94	19.6	33.1
	10	36	0	13.28	3.926	7.7	11.2	12.11	14.4	24.6
	21	36	0	14.40	8.762	5.0	7.0	9.37	22.0	31.4
50	0	36	0	40.41	12.874	19.9	30.5	39.87	46.2	69.2
	5	36	0	15.89	5.232	6.8	13.1	14.81	19.6	28.5
	10	36	0	14.94	2.819	9.4	13.3	14.14	16.6	23.6
	21	36	0	13.40	10.072	4.9	6.5	7.48	21.8	38.3
75	0	35	0	40.71	13.065	17.9	31.0	41.63	49.9	71.2
	5	36	0	16.55	5.283	7.2	13.7	15.34	19.7	35.2
	10	36	0	13.26	2.929	6.1	11.9	13.38	14.9	20.7
	21	34	0	11.33	8.067	4.9	6.0	7.14	18.7	35.7

Deskription, getrennt nach Zelltyp, für Konzentration und Tag bzw. für Tag und Konzentration

1

Tag	Konzentration	Viabilität								
		N	nMiss	MW	s	Min	Q1	Median	Q3	Max
0	1	36	0	94.58	12.641	62.4	85.5	95.42	101.6	122.8
	5	36	0	95.62	11.849	75.6	87.0	94.92	103.0	120.5
	10	36	0	80.08	14.050	58.0	68.2	80.97	90.5	112.9
	20	35	0	35.85	14.694	14.2	26.6	32.67	42.7	78.5
	30	36	0	27.77	14.353	12.1	17.2	29.22	33.9	95.5
	40	36	0	27.20	9.459	11.7	17.7	27.09	33.7	47.6
	50	36	0	24.70	7.719	11.9	21.8	23.08	29.2	48.2
	75	35	0	25.30	7.879	12.1	20.2	24.37	29.9	46.6
5	1	0	36	-	-	-	-	-	-	-
	5	36	0	84.31	8.530	64.7	78.8	83.98	91.2	98.9
	10	36	0	64.04	20.514	18.1	44.7	73.13	76.9	91.1
	20	36	0	32.99	19.965	12.6	15.9	29.59	43.5	79.8
	30	36	0	12.92	5.601	4.9	7.2	13.47	15.2	27.9
	40	36	0	12.03	5.423	4.8	5.8	13.49	16.8	23.9
	50	35	0	11.70	4.371	5.2	6.8	12.56	14.5	18.4
	75	36	0	11.91	4.660	4.8	6.7	12.11	14.8	21.3
10	1	36	0	100.03	17.801	61.9	89.6	100.35	114.9	130.7
	5	36	0	98.23	15.702	70.8	86.5	100.66	111.0	127.5
	10	36	0	77.34	30.094	8.6	63.4	83.64	98.5	122.8
	20	36	0	41.94	16.018	11.7	30.8	41.01	48.6	86.6
	30	36	0	10.99	3.362	5.2	8.2	10.65	13.4	18.7
	40	36	0	9.57	2.973	4.5	6.7	10.20	11.2	17.4
	50	36	0	11.42	4.046	6.0	7.5	11.34	12.8	21.4
	75	36	0	9.90	2.951	5.0	7.2	9.45	12.2	16.4
21	1	35	0	104.92	17.666	71.4	91.3	100.72	119.1	146.8
	5	36	0	93.26	10.835	75.7	86.8	92.01	100.6	119.9
	10	35	0	90.94	13.353	68.3	80.1	90.31	97.2	127.8
	20	35	0	78.47	15.546	46.4	70.0	76.62	88.0	116.6
	30	36	0	53.28	18.266	23.7	40.5	52.06	63.0	103.9
	40	35	0	20.74	10.109	6.2	13.8	19.36	26.4	49.2
	50	36	0	18.80	11.767	3.5	10.0	15.83	29.9	42.4
	75	36	0	12.47	6.416	3.9	8.2	10.79	18.7	31.0

2

Tag	Konzentration	Viabilität								
		N	nMiss	MW	s	Min	Q1	Median	Q3	Max
0	1	36	0	95.98	11.238	72.5	87.9	97.21	104.2	125.8
	5	36	0	84.44	12.026	67.5	75.1	83.98	89.4	119.4
	10	36	0	59.50	13.831	34.6	47.6	58.98	69.3	91.6
	20	36	0	36.13	14.532	20.0	25.4	32.37	45.7	73.0
	30	36	0	38.71	11.955	18.1	28.7	40.51	47.8	62.9
	40	35	0	41.79	9.549	22.9	34.8	40.03	47.8	64.1
	50	36	0	40.41	12.874	19.9	30.5	39.87	46.2	69.2
	75	35	0	40.71	13.065	17.9	31.0	41.63	49.9	71.2
5	1	35	0	100.31	10.107	81.4	94.2	100.67	106.2	126.4
	5	34	0	85.94	16.268	60.6	76.8	83.66	89.7	144.5
	10	35	0	72.32	12.140	46.1	61.2	74.61	81.8	98.6
	20	35	0	30.31	19.538	10.8	15.9	20.47	48.8	78.2
	30	35	0	15.03	4.280	6.9	12.2	15.29	17.2	27.7
	40	35	0	16.75	6.465	6.3	14.2	15.94	19.6	33.1
	50	36	0	15.89	5.232	6.8	13.1	14.81	19.6	28.5
	75	36	0	16.55	5.283	7.2	13.7	15.34	19.7	35.2
10	1	36	0	97.16	15.096	65.7	87.2	98.09	107.9	128.8
	5	34	0	95.31	15.557	70.1	85.0	91.49	101.7	137.0
	10	36	0	65.59	15.380	31.0	53.7	66.00	78.8	106.0
	20	36	0	14.38	3.515	7.5	12.6	14.73	16.1	22.8
	30	36	0	13.96	2.125	8.9	12.5	14.47	15.7	17.2
	40	36	0	13.28	3.926	7.7	11.2	12.11	14.4	24.6
	50	36	0	14.94	2.819	9.4	13.3	14.14	16.6	23.6
	75	36	0	13.26	2.929	6.1	11.9	13.38	14.9	20.7
21	1	35	0	95.67	14.005	69.0	83.3	94.81	103.9	130.6
	5	35	0	90.02	11.965	64.2	82.0	90.05	99.1	123.6
	10	36	0	80.42	17.922	58.5	66.5	74.38	88.3	123.9
	20	36	0	49.94	23.567	7.7	37.1	45.69	66.6	97.8
	30	36	0	14.92	6.382	5.4	10.1	12.69	19.7	31.4
	40	36	0	14.40	8.762	5.0	7.0	9.37	22.0	31.4
	50	36	0	13.40	10.072	4.9	6.5	7.48	21.8	38.3
	75	34	0	11.33	8.067	4.9	6.0	7.14	18.7	35.7

Tab. 5: Statistik: Deskription für Fluoxetin, durchgeführt mit SAS® für PC, Version 9.2.
Zelltyp „1“: hippocampale Zellen, Zelltyp „2“: kortikale Zellen, N: Anzahl, nMiss: Anzahl fehlender Werte, MW: Mittelwert, s: Standardabweichung, Min: Minimum, Q1: 1. Quartil, Q3: 3. Quartil, Max: Maximum.

Zelltyp 1 (HIPPOCAMPUS)											
Konzentration	Tag	Tier								Total	
		1		2		3		4			
		N	%	N	%	N	%	N	%	N	%
0.1	0	11	0.6	12	0.6	11	0.6		0.0	34	1.7
	5	12	0.6	12	0.6	12	0.6		0.0	36	1.8
	10	12	0.6	12	0.6	12	0.6		0.0	36	1.8
	21	11	0.6	11	0.6	12	0.6		0.0	34	1.7
0.3	0	11	0.6	12	0.6	12	0.6		0.0	35	1.8
	5	12	0.6	12	0.6	12	0.6		0.0	36	1.8
	10	12	0.6	12	0.6	12	0.6		0.0	36	1.8
	21	11	0.6	12	0.6	12	0.6		0.0	35	1.8
1	0	11	0.6	12	0.6	12	0.6		0.0	35	1.8
	5	10	0.5	12	0.6	11	0.6		0.0	33	1.7
	10	12	0.6	12	0.6	12	0.6		0.0	36	1.8
	21	12	0.6	12	0.6	12	0.6		0.0	36	1.8
3	0	12	0.6	12	0.6	12	0.6		0.0	36	1.8
	5	12	0.6	12	0.6	12	0.6		0.0	36	1.8
	10	12	0.6	12	0.6	12	0.6		0.0	36	1.8
	21	12	0.6	12	0.6	12	0.6		0.0	36	1.8
10	0	12	0.6	12	0.6	12	0.6		0.0	36	1.8
	5	12	0.6	11	0.6	12	0.6		0.0	35	1.8
	10	11	0.6	13	0.7	12	0.6		0.0	36	1.8
	21	11	0.6	12	0.6	12	0.6		0.0	35	1.8
15	0	11	0.6	12	0.6	12	0.6		0.0	35	1.8
	5	12	0.6	11	0.6	12	0.6		0.0	35	1.8
	10	12	0.6	12	0.6	12	0.6		0.0	36	1.8
	21	11	0.6	12	0.6	12	0.6		0.0	35	1.8
25	0	12	0.6	12	0.6	12	0.6		0.0	36	1.8
	5	12	0.6	11	0.6	12	0.6		0.0	35	1.8
	10	12	0.6	12	0.6	12	0.6		0.0	36	1.8
	21	12	0.6	12	0.6	12	0.6		0.0	36	1.8
gesamt		325	16.4	333	16.8	334	16.9		0.0	992	50.1

Zelltyp 1										
Konzentration	Tag	Viabilität								
		N	nMiss	MW	s	Min	Q1	Median	Q3	Max
0.1	0	34	0	107.17	29.472	61.7	85.4	100.32	119.9	183.5
	5	36	0	134.02	35.637	86.8	109.6	123.54	165.4	202.1
	10	36	0	109.50	17.298	77.2	95.2	105.57	120.0	154.2
	21	34	0	103.50	22.374	67.2	82.1	106.31	117.4	162.5
0.3	0	35	0	111.38	18.379	76.8	100.7	106.86	119.9	180.1
	5	36	0	119.22	19.490	80.3	104.1	120.45	130.9	164.0
	10	36	0	91.07	42.412	16.9	44.0	108.83	121.8	141.9
	21	35	0	50.38	37.784	10.9	22.6	32.72	69.0	138.1
1	0	35	0	103.27	50.685	33.9	63.1	87.70	143.7	202.5
	5	33	0	100.62	24.685	46.3	83.2	98.13	119.9	142.1
	10	36	0	29.72	8.637	16.0	22.6	29.99	35.0	52.4
	21	36	0	15.30	5.818	7.9	10.8	13.41	18.9	30.7
3	0	36	0	59.65	19.087	32.1	43.5	55.74	71.6	102.1
	5	36	0	52.69	18.552	26.7	38.8	47.65	66.4	105.1
	10	36	0	21.71	8.998	12.0	14.9	19.61	25.9	53.6
	21	36	0	15.64	5.983	7.0	11.2	13.29	20.8	26.7
10	0	36	0	113.76	77.154	45.6	71.5	89.76	112.2	344.0
	5	35	0	76.83	26.663	35.6	53.0	76.58	98.3	139.5
	10	36	0	34.37	15.912	15.9	21.4	29.35	45.4	73.4
	21	35	0	17.54	4.724	10.7	14.1	16.22	18.9	27.7
15	0	35	0	157.94	127.242	46.6	67.0	104.78	185.2	513.7
	5	35	0	77.68	19.185	38.4	62.1	81.27	95.0	109.8
	10	36	0	36.97	10.997	18.2	27.3	38.01	43.8	63.7
	21	35	0	21.49	7.006	10.1	17.4	19.44	27.7	39.3
25	0	36	0	164.40	126.017	48.8	82.5	124.24	166.5	517.3
	5	35	0	89.39	30.039	38.4	63.9	85.14	116.3	156.0
	10	36	0	41.51	16.391	21.7	25.9	41.88	50.2	93.7
	21	36	0	25.30	8.188	15.6	19.4	22.67	31.0	50.3

Zelltyp 2										
Konzentration	Tag	Viabilität								
		N	nMiss	MW	s	Min	Q1	Median	Q3	Max
0.1	0	36	0	79.57	17.941	53.4	66.4	77.22	90.3	145.2
	5	35	0	131.78	30.555	81.8	107.7	123.97	151.8	204.4
	10	33	0	98.02	19.170	58.2	81.1	100.27	112.2	132.5
	21	35	0	104.68	15.107	76.9	94.2	105.56	113.5	141.8
0.3	0	34	0	91.98	23.163	65.2	73.2	81.81	108.9	139.9
	5	34	0	110.68	25.867	69.9	91.8	108.15	126.9	184.7
	10	35	0	99.87	19.798	58.0	86.5	106.68	114.3	129.1
	21	35	0	26.12	9.926	12.4	18.6	23.46	32.7	53.9
1	0	36	0	78.40	14.757	53.8	68.8	76.99	86.0	129.0
	5	36	0	74.87	11.930	54.8	65.2	74.91	85.0	103.9
	10	36	0	47.73	11.601	29.3	39.6	46.35	54.2	86.1
	21	36	0	22.42	5.190	15.3	18.0	22.15	25.4	34.3
3	0	35	0	63.72	21.086	36.2	47.7	57.57	77.2	124.6
	5	35	0	76.58	23.597	31.5	60.0	76.34	91.8	128.1
	10	36	0	37.00	10.467	21.3	29.6	33.98	44.4	70.5
	21	36	0	25.61	6.377	17.7	20.3	24.28	29.5	41.1
10	0	34	0	95.41	40.987	39.8	71.6	89.17	107.4	222.8
	5	33	0	89.28	19.701	52.4	73.9	85.15	103.9	135.8
	10	36	0	45.38	10.104	28.5	36.7	43.65	53.5	73.3
	21	36	0	31.18	11.797	18.6	23.9	26.44	33.6	67.8
15	0	36	0	120.26	41.106	42.1	91.7	110.92	143.9	230.5
	5	35	0	116.28	25.981	72.3	99.6	108.77	137.7	165.5
	10	36	0	55.24	14.192	38.5	45.9	49.90	62.5	97.6
	21	36	0	34.89	13.496	19.3	25.5	30.28	37.8	69.2
25	0	36	0	114.14	51.752	47.8	65.8	114.57	143.5	256.6
	5	34	0	143.41	47.688	61.6	94.9	147.16	196.3	206.9
	10	36	0	62.51	9.571	45.2	56.1	59.53	68.5	85.9
	21	36	0	44.52	18.883	20.9	27.5	38.96	60.4	83.9

1										
Tag	Konzentration	Viabilität								
		N	nMiss	MW	s	Min	Q1	Median	Q3	Max
0	0.1	34	0	107.17	29.472	61.7	85.4	100.32	119.9	183.5
	0.3	35	0	111.38	18.379	76.8	100.7	106.86	119.9	180.1
	1	35	0	103.27	50.685	33.9	63.1	87.70	143.7	202.5
	3	36	0	59.65	19.087	32.1	43.5	55.74	71.6	102.1
	10	36	0	113.76	77.154	45.6	71.5	89.76	112.2	344.0
	15	35	0	157.94	127.242	46.6	67.0	104.78	185.2	513.7
	25	36	0	164.40	126.017	48.8	82.5	124.24	166.5	517.3
5	0.1	36	0	134.02	35.637	86.8	109.6	123.54	165.4	202.1
	0.3	36	0	119.22	19.490	80.3	104.1	120.45	130.9	164.0
	1	33	0	100.62	24.685	46.3	83.2	98.13	119.9	142.1
	3	36	0	52.69	18.552	26.7	38.8	47.65	66.4	105.1
	10	35	0	76.83	26.663	35.6	53.0	76.58	98.3	139.5
	15	35	0	77.68	19.185	38.4	62.1	81.27	95.0	109.8
	25	35	0	89.39	30.039	38.4	63.9	85.14	116.3	156.0
10	0.1	36	0	109.50	17.298	77.2	95.2	105.57	120.0	154.2
	0.3	36	0	91.07	42.412	16.9	44.0	108.83	121.8	141.9
	1	36	0	29.72	8.637	16.0	22.6	29.99	35.0	52.4
	3	36	0	21.71	8.998	12.0	14.9	19.61	25.9	53.6
	10	36	0	34.37	15.912	15.9	21.4	29.35	45.4	73.4
	15	36	0	36.97	10.997	18.2	27.3	38.01	43.8	63.7
	25	36	0	41.51	16.391	21.7	25.9	41.88	50.2	93.7
21	0.1	34	0	103.50	22.374	67.2	82.1	106.31	117.4	162.5
	0.3	35	0	50.38	37.784	10.9	22.6	32.72	69.0	138.1
	1	36	0	15.30	5.818	7.9	10.8	13.41	18.9	30.7
	3	36	0	15.64	5.983	7.0	11.2	13.29	20.8	26.7
	10	35	0	17.54	4.724	10.7	14.1	16.22	18.9	27.7
	15	35	0	21.49	7.006	10.1	17.4	19.44	27.7	39.3
	25	36	0	25.30	8.188	15.6	19.4	22.67	31.0	50.3

2

Tag	Konzentration	Viabilität								
		N	nMiss	MW	s	Min	Q1	Median	Q3	Max
0	0.1	36	0	79.57	17.941	53.4	66.4	77.22	90.3	145.2
	0.3	34	0	91.98	23.163	65.2	73.2	81.81	108.9	139.9
	1	36	0	78.40	14.757	53.8	68.8	76.99	86.0	129.0
	3	35	0	63.72	21.086	36.2	47.7	57.57	77.2	124.6
	10	34	0	95.41	40.987	39.8	71.6	89.17	107.4	222.8
	15	36	0	120.26	41.106	42.1	91.7	110.92	143.9	230.5
	25	36	0	114.14	51.752	47.8	65.8	114.57	143.5	256.6
5	0.1	35	0	131.78	30.555	81.8	107.7	123.97	151.8	204.4
	0.3	34	0	110.68	25.867	69.9	91.8	108.15	126.9	184.7
	1	36	0	74.87	11.930	54.8	65.2	74.91	85.0	103.9
	3	35	0	76.58	23.597	31.5	60.0	76.34	91.8	128.1
	10	33	0	89.28	19.701	52.4	73.9	85.15	103.9	135.8
	15	35	0	116.28	25.981	72.3	99.6	108.77	137.7	165.5
	25	34	0	143.41	47.688	61.6	94.9	147.16	196.3	206.9
10	0.1	33	0	98.02	19.170	58.2	81.1	100.27	112.2	132.5
	0.3	35	0	99.87	19.798	58.0	86.5	106.68	114.3	129.1
	1	36	0	47.73	11.601	29.3	39.6	46.35	54.2	86.1
	3	36	0	37.00	10.467	21.3	29.6	33.98	44.4	70.5
	10	36	0	45.38	10.104	28.5	36.7	43.65	53.5	73.3
	15	36	0	55.24	14.192	38.5	45.9	49.90	62.5	97.6
	25	36	0	62.51	9.571	45.2	56.1	59.53	68.5	85.9
21	0.1	35	0	104.68	15.107	76.9	94.2	105.56	113.5	141.8
	0.3	35	0	26.12	9.926	12.4	18.6	23.46	32.7	53.9
	1	36	0	22.42	5.190	15.3	18.0	22.15	25.4	34.3
	3	36	0	25.61	6.377	17.7	20.3	24.28	29.5	41.1
	10	36	0	31.18	11.797	18.6	23.9	26.44	33.6	67.8
	15	36	0	34.89	13.496	19.3	25.5	30.28	37.8	69.2
	25	36	0	44.52	18.883	20.9	27.5	38.96	60.4	83.9

Zelltyp 2											
Konzentration	Tag	Tier 1		2		3		4		Total	
		N	%	N	%	N	%	N	%	N	%
0.1	0	6	0.3	12	0.6	6	0.3	12	0.6	36	1.8
	5	12	0.6	11	0.6	12	0.6		0.0	35	1.8
	10	11	0.6	11	0.6	11	0.6		0.0	33	1.7
	21	11	0.6	12	0.6	12	0.6		0.0	35	1.8
0.3	0	5	0.3	12	0.6	5	0.3	12	0.6	34	1.7
	5	12	0.6	10	0.5	12	0.6		0.0	34	1.7
	10	12	0.6	12	0.6	11	0.6		0.0	35	1.8
	21	12	0.6	11	0.6	12	0.6		0.0	35	1.8
1	0	6	0.3	12	0.6	6	0.3	12	0.6	36	1.8
	5	12	0.6	12	0.6	12	0.6		0.0	36	1.8
	10	12	0.6	12	0.6	12	0.6		0.0	36	1.8
	21	12	0.6	12	0.6	12	0.6		0.0	36	1.8
3	0	6	0.3	12	0.6	5	0.3	12	0.6	35	1.8
	5	11	0.6	12	0.6	12	0.6		0.0	35	1.8
	10	12	0.6	12	0.6	12	0.6		0.0	36	1.8
	21	12	0.6	12	0.6	12	0.6		0.0	36	1.8
10	0	5	0.3	12	0.6	5	0.3	12	0.6	34	1.7
	5	11	0.6	11	0.6	11	0.6		0.0	33	1.7
	10	12	0.6	12	0.6	12	0.6		0.0	36	1.8
	21	12	0.6	12	0.6	12	0.6		0.0	36	1.8
15	0	6	0.3	12	0.6	6	0.3	12	0.6	36	1.8
	5	12	0.6	12	0.6	11	0.6		0.0	35	1.8
	10	12	0.6	12	0.6	12	0.6		0.0	36	1.8
	21	12	0.6	12	0.6	12	0.6		0.0	36	1.8
25	0	6	0.3	12	0.6	6	0.3	12	0.6	36	1.8
	5	12	0.6	10	0.5	12	0.6		0.0	34	1.7
	10	12	0.6	12	0.6	12	0.6		0.0	36	1.8
	21	12	0.6	12	0.6	12	0.6		0.0	36	1.8
gesamt		288	14.6	328	16.6	287	14.5	84	4.2	987	49.9

8. Danksagung

Herrn Prof. Dr. med. Jörg Fegert gilt mein Dank für die Möglichkeit, in seiner Abteilung promovieren zu können.
Ganz herzlich möchte ich mich bei meiner Doktormutter Frau Prof. Dr. med. Andrea Ludolph bedanken, die mir dieses spannende Thema überlassen hat und mich in der langen Zeit von der Laborarbeit bis zur fertigen Dissertation unterstützt hat. Vielen Dank für die Betreuung, deine Hilfe und die Ermöglichung der Teilnahme an Kongressen, liebe Andrea!
Des Weiteren möchte ich mich ganz herzlich bei Herrn Prof. Dr. med. Tobias Böckers bedanken, in dessen Labor ich meine Experimente durchführen konnte und der stets ein offenes Ohr für mich hatte.
Auch Dr. Ulrike Schaz, die für einen Teil der Zeit meiner Dissertation meine Betreuerin war, sowie meinen Labormitstreitern Carolin Henes und Patrick Udvardi, möchte ich ganz herzlich danken für die gegenseitige Unterstützung, die Zusammenarbeit und den freundschaftlichen Umgang.
Ganz herzlichen Dank auch an alle anderen Mitarbeiter des Instituts für Anatomie und Zellbiologie, die mich freundlich in ihr Team aufgenommen haben und durch ihre motivierenden Gespräche, guten Ratschläge und ihre Hilfsbereitschaft für eine gute Arbeitsatmosphäre sorgten.
Dr. Bettina Danner, die mich jederzeit bei allem, was mit Statistik zu tun hatte, unterstützt hat, gilt mein herzlicher Dank.
Nicht zuletzt möchte ich mich ganz besonders bei meinen Eltern bedanken, ohne die weder das Studium noch die Dissertation und das dafür aufgebrachte Freisemester möglich gewesen wären. Danke auch an meine Oma Hilde, meine Geschwister Anja, Fabiana und David. Vielen Dank an meine Freunde, die mich stets motivieren konnten, wenn es gerade weniger gut lief. Ohne euch alle hätte ich die Arbeit vermutlich nicht fertiggestellt! Schön, dass es euch gibt!

9. Lebenslauf

Der Lebenslauf wurde aus Gründen des Datenschutzes entfernt

Publikationen:

Kehrle F, Schaz U, Böckers T, Kölch M, Fegert J, Ludolph AG: Entwicklungsabhängige Wirkung von Johanniskraut auf maturierende Neurone *in vitro*. Posterpräsentation beim Kongress der DGPPN in Berlin 2009

Kehrle F, Schaz U, Udvardi P, Kölch M, Fegert JM, Ludolph AG: Wirkung von Johanniskrautextrakt auf sich entwickelnde Neurone *in vitro.* Posterpräsentation beim Kongress der DGKJP in Hamburg 2009