

Wirkung von Hypericum auf die Melatonin- Tagesperiodik des Dsungarischen Zwerghamsters (*Phodopus sungorus*)

Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)

dem
Fachbereich Biologie
der Philipps-Universität Marburg
vorgelegt von

Isabel Klier
aus Gießen

Marburg/Lahn 2000

Vom Fachbereich Biologie der Philipps-Universität
als Dissertation am 30.10.2000 angenommen.

Erstgutachter: Prof. Dr. Gerhard Heldmaier

Zweitgutachter: Prof. Dr. Uwe Homberg

Tag der mündlichen Prüfung am 10.11.2000

Abkürzungsverzeichnis

aMT6s	6-Sulphatoxymelatonin bzw. 6-Hydroxymelatonin-Sulfat
ANOVA	<i>Analysis of variance</i> , Varianzanalyse
ATP	Adenosintriphosphat
cAMP	cyklisches Adenosinmonophosphat
GCS	Ganglion cervicale superior
HIOMT	Hydroxyindol-O-Methyltransferase
HTE	Hypericum-Trockenextrakt
MEZ	Mitteleuropäische Zeit
n	Anzahl der Meßpunkte
NAT	N-Acetyltransferase
NPY	Neuropeptid Y
r	Produkt-Moment-Korrelationskoeffizient nach PEARSON
R	Rang-Korrelationskoeffizient nach SPEARMAN
RIA	<i>Radioimmunoassay</i> , Radioimmunologischer Nachweis
SCN	<i>Nucleus suprachiasmaticus</i>
SEM	Mittlerer Fehler des Mittelwertes

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG	1
<hr/>		
2	MATERIAL UND METHODEN	8
2.1	Versuchstiere und Haltungsbedingungen	8
2.2	Herstellung des Futters	8
2.2.1	Dosierung des Johanniskraut-Extraktes	8
2.2.2	Futterzubereitung	10
2.3	Bestimmung des 6-Sulphatoxymelatonins im Urin	10
2.3.1	Sammlung der Urinproben	10
2.3.2	Radioimmunologischer aMT6s-Nachweis	12
2.4	Gewebe-Aufarbeitung	13
2.5	Bestimmung der NAT-Aktivität	13
2.6	Bestimmung des Plasma-Melatoningehaltes	13
2.7	Messung des Fellindex	13
2.8	Bestimmung des Reproduktionsstatus	14
2.8.1	Messung des Testisindex	14
2.8.2	Bestimmung des Zyklusstadiums	15
2.9	Experimente	15
2.9.1	Wirkung von Johanniskraut im Langtag	15
2.9.1.1	Wirkung von Johanniskraut auf die aMT6s-Exkretion	15
2.9.1.2	Zeitverlauf der Johanniskraut-Wirkung	16
2.9.1.3	Dosisabhängigkeit der Johanniskraut-Wirkung	16
2.9.1.4	Einfluß von Johanniskraut auf die Melatonin-Synthese	16
2.9.2	Wirkung von Johanniskraut im Kurztag	16
2.9.3	Wirkung von Johanniskraut während der Kurztaganpassung	17
2.10	Auswertung und Statistik	17
<hr/>		
3	ERGEBNISSE	19
3.1	Wirkung von Johanniskraut im Langtag	19
3.1.1	Wirkung von Johanniskraut auf Futteraufnahme und Körpergewicht	19
3.1.2	Wirkung von Johanniskraut auf die aMT6s-Exkretion	20
3.1.3	Zeitverlauf der Johanniskraut-Wirkung	30

3.1.4	Dosisabhängigkeit der Johanniskraut-Wirkung	37
3.1.5	Unwirksamer Johanniskraut-Extrakt	42
3.1.6	Einfluß von Johanniskraut auf die Melatonin-Synthese	43
3.1.6.1	Einfluß von Johanniskraut auf die NAT-Aktivität	43
3.1.6.2	Einfluß von Johanniskraut auf die Melatonin-Konzentration im Plasma	47
3.2	Wirkung von Johanniskraut im Kurztag	51
3.2.1	Wirkung von Johanniskraut auf Futteraufnahme und Körpergewicht	51
3.2.2	Wirkung von Johanniskraut auf die aMT6s-Exkretion	52
3.3	Wirkung von Johanniskraut während der Kurztaganpassung	57
3.3.1	Wirkung von Johanniskraut auf Futteraufnahme und Körpergewicht	57
3.3.2	Wirkung von Johanniskraut auf die aMT6s-Exkretion	58
3.3.3	Wirkung von Johanniskraut auf den Körpergewichtsverlauf	62
3.3.4	Wirkung von Johanniskraut auf den Verlauf der Fellumfärbung	63
3.3.5	Wirkung von Johanniskraut auf den Gonadenstatus	64
4	<u>DISKUSSION</u>	65
4.1	Verabreichung des Hypericum-Trockenextraktes über das Futter	65
4.2	Wirkung von Hypericum auf die Melatonin-Tagesperiodik	68
4.2.1	Wirkung von Hypericum auf die aMT6s-Exkretion	68
4.2.2	Unwirksamer Johanniskraut-Extrakt	73
4.2.3	Wirkung von Hypericum auf die Melatonin-Synthese	74
4.3	Wirkung von Hypericum im Kurztag	78
4.4	Mögliche Wirkmechanismen von Hypericum	81
4.5	Rolle der Melatonin-Amplitude	85
4.6	Effekt von Hypericum auf die Melatonin-Tagesperiodik als antidepressives Wirkprinzip?	89
4.7	Perspektiven	89
5	<u>ZUSAMMENFASSUNG</u>	91
6	<u>LITERATURVERZEICHNIS</u>	94

1 Einleitung

Melatonin ist ein Hormon, das bei der Wahrnehmung der Photoperiode eine wichtige Rolle spielt (Übersicht bei REITER 1981). Der tägliche Licht-Dunkel-Wechsel wird über das Auge wahrgenommen und im Körper durch die Produktion von Melatonin in ein Hormonsignal umgesetzt. Gebildet wird dieses Hormon hauptsächlich im Pinealorgan (*Epiphysis cerebri*), einer dorsalen Ausstülpung des Zwischenhirndaches. Die Melatonin-Synthese beginnt mit der Aufnahme der essentiellen Aminosäure Tryptophan aus dem Blut in die Pinealocyte, wo es dann in mehreren Schritten zu Melatonin umgesetzt wird (Abb. 1). Reguliert wird dieser Syntheseweg direkt durch den Licht-Dunkel-Wechsel. Die Photoperiode wird über die Retina wahrgenommen und diese Information wird dann über den retinohypothalamischen Trakt zum *Nucleus suprachiasmaticus* (SCN) weitergeleitet. Von dort gelangt sie über das Brustmark bis zum oberen Halsganglion (*Ganglion cervicale superior*, GCS). Von dort gehen postganglionäre sympathische Nervenfasern aus, die schließlich im Pinealorgan enden. Während der Dunkelheit wird an diesen synaptischen Nervenenden an der Pinealocyte der Neurotransmitter Noradrenalin freigesetzt. Durch die Interaktion dieses Neurotransmitters mit β -adrenergen Rezeptoren an der Pinealocytenmembran wird über die Produktion des 'second messengers' cAMP die Synthese des Enzyms N-Acetyltransferase (NAT) stimuliert. Dieses Enzym katalysiert die Acetylierung von Serotonin zu Acetylserotonin und ist das Schlüsselenzym der Melatonin-Synthese (KLEIN und WELLER 1970). Acetylserotonin wird anschließend durch ein weiteres Enzym, die Hydroxyindol-O-Methyltransferase, in Melatonin umgewandelt. Das Melatonin gelangt in den Blutkreislauf und agiert hauptsächlich an zentralen, hochaffinen Bindungsstellen im Hypothalamus und der Adenohypophyse (VANECEK et al. 1987, Übersicht bei BITTMANN 1993). Metabolisiert wird das lipophile Melatonin in der Leber, indem es zunächst hydroxyliert, anschließend größtenteils sulfatiert und in dieser wasserlöslichen Form über die Niere ausgeschieden wird. Damit stellt die Quantifizierung des 6-Hydroxymelatonin-Sulfats (aMT6s) im Urin ein zuverlässiges Maß für die Melatoninsynthese im Pinealorgan dar.

Durch Licht kommt es innerhalb weniger Minuten zu einer Einstellung der Noradrenalin-Ausschüttung und damit zu einer raschen Hemmung der Melatonin-Synthese (KLEIN und WELLER 1972). Demzufolge unterliegt die Ausschüttung des Hormons Melatonin einem tagesperiodischen Rhythmus: Nach Eintritt der Dunkelheit

steigt der Melatoninspiegel an und fällt tagsüber wieder ab. Die Dauer der nächtlich erhöhten Melatonin-Ausschüttung spiegelt damit die Länge der Nacht wider. Melatonin ist also der neuroendocrine Übermittler der Photoperiode.

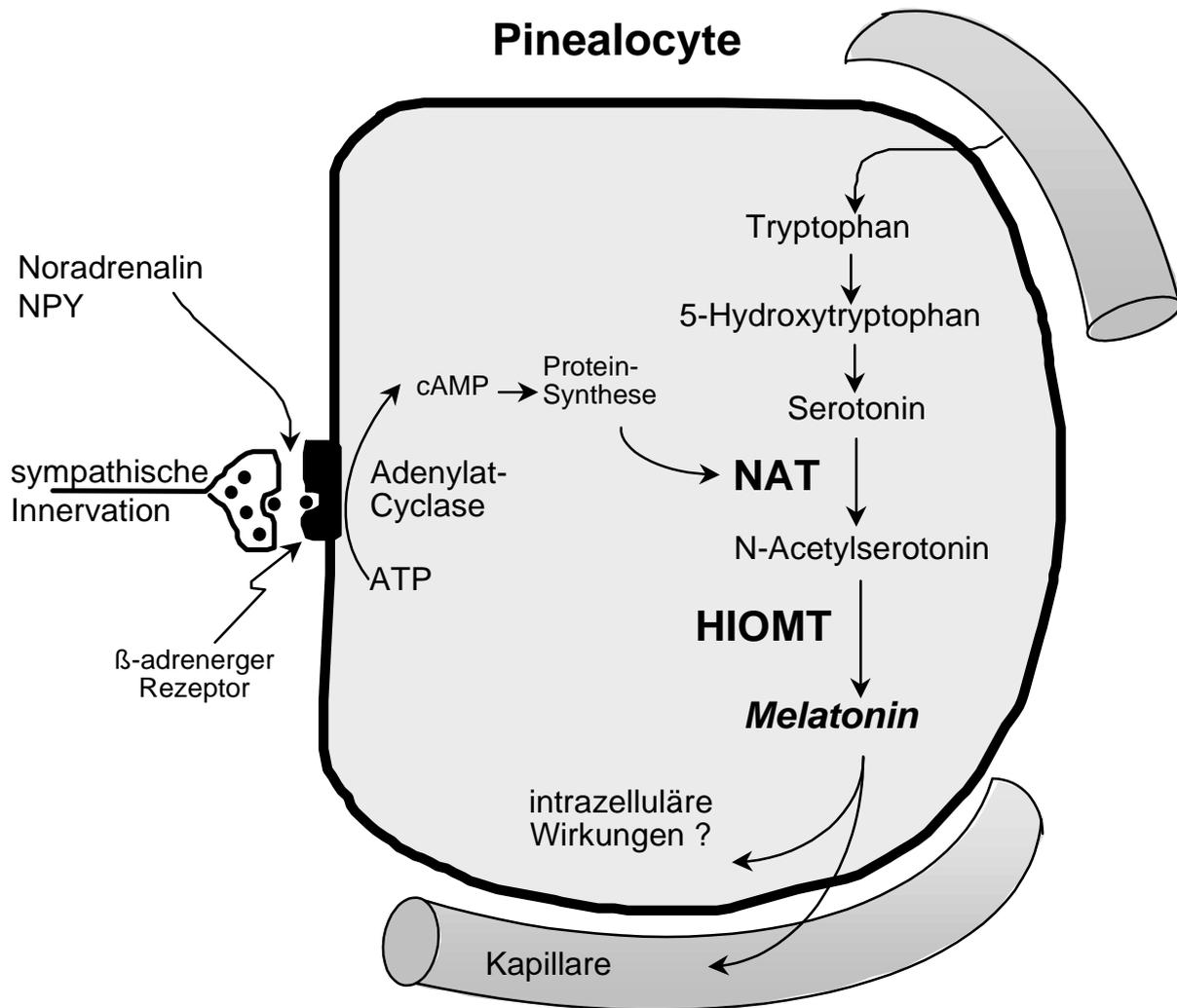


Abb. 1: Schema der Melatoninsynthese im Pinealorgan. ATP: Adenosintriphosphat; cAMP: cyclisches Adenosinmonophosphat; HIOMT: Hydroxyindol-O-Methyltransferase; NAT: N-Acetyltransferase; NPY: Neuropeptid Y.

Der Photoperiode kommt eine wichtige Bedeutung bei der Synchronisation der inneren Uhr zu. Die innere Uhr steuert verschiedene Körperfunktionen, die tagesperiodischen Schwankungen unterliegen, wie zum Beispiel den Schlaf-Wach-Rhythmus, die Körpertemperatur oder die Ausschüttung bestimmter Hormone. Die innere Uhr ist lokalisiert im Nucleus suprachiasmaticus (SCN), einem Kerngebiet des Hypothalamus. Dort werden durch einen circadian oszillierenden Schrittmacher endogene Rhythmen erzeugt. Die Periodenlänge dieser Rhythmen weicht allerdings von der durch den äußeren Licht-Dunkel-Wechsel vorgegebenen 24h-Tagesperiodik ab. Deshalb wird diese endogene Rhythmik auch als circadiane Rhythmik (von *circa diem* = ungefähr ein Tag) bezeichnet. Die endogene circadiane Rhythmik muß aber mit dem äußeren 24h-Tag synchronisiert werden, um zu gewährleisten, daß tagesperiodische Prozesse präzise ablaufen können. Diese Synchronisation erfolgt durch den Zeitgeber Licht. Über die Photoperiode wird also die innere Uhr mit der 24h-Tagesperiodik in Einklang gebracht. Außerdem werden aber auch verschiedene tagesperiodische Prozesse aufeinander abgestimmt, d. h. über die Photoperiode werden tagesperiodische Vorgänge zugleich intern synchronisiert.

Über die Wahrnehmung der Photoperiode erhält der Organismus aber nicht nur Informationen über die Tageszeit, sondern auch über die Jahreszeit, da sich der tägliche Licht-Dunkel-Wechsel im Jahresverlauf ändert. Diese Informationen sind besonders wichtig für Organismen, die starken saisonalen Veränderungen ausgesetzt sind. Eine frühzeitige Anpassung an die Jahreszeiten ist unbedingt erforderlich und für das Überleben in kalten und gemäßigten Breiten unerlässlich. Vor allem für Kleinsäuger sind solche Adaptationen von größter Wichtigkeit, da sie besonderen energetischen Belastungen ausgesetzt sind. Das physiologisch ungünstige Oberflächen-Volumen-Verhältnis kleiner Säugetiere hat einen relativ hohen Wärmeverlust über die Körperoberfläche zur Folge. Außerdem können sich Kleinsäuger im Gegensatz zu größeren Säugetieren und Vögeln den extremen Bedingungen im Winter nicht durch Abwanderung entziehen. Der in der vorliegenden Arbeit untersuchte Dsungarische Zwerg-hamster (*Phodopus sungorus sungorus*) ist in seinem natürlichen Lebensraum, der sich vom Nordwesten Chinas bis Nordwest-Sibirien erstreckt, besonders starken Temperaturschwankungen von im Sommer 40°C bis im Winter -50°C unterworfen. Diese Spezies ist somit in besonderem Maße auf rechtzeitige morphologische und physiologische Anpassungen angewiesen. So vollzieht der Dsungarische Zwergham-ster im Winter eine Umfärbung vom grau-

braunen Sommerfell in das weiße Winterfell, was mit einer Verbesserung der Isolation verbunden ist (HELDMAIER und STEINLECHNER 1981 b, HELDMAIER 1989, LOVEGROVE et al. 1991). Außerdem stellt dieser Nager nicht nur die sehr energieaufwendige Fortpflanzung ein, sondern es kommt sogar zu einer vollständigen Regression der Gonaden. Darüber hinaus reduzieren die Zwerghamster bereits im Herbst ihre Nahrungsaufnahme, was ein drastisch verringertes Körpergewicht während des Winters zur Folge hat (HELDMAIER 1989). Im Zuge der Winteranpassungen kommt es auch zu einer Steigerung der Thermogenesekapazität, die im wesentlichen auf einer Verbesserung der zitterfreien Wärmebildung basiert (Übersicht HELDMAIER et al. 1985). Weiterhin zeigen Dsungarische Zwerghamster während des Winters *daily torpor*, der sich durch eine Absenkung der Stoffwechselrate und der Körpertemperatur während einiger Stunden in der Ruhephase der Hamster kennzeichnet (HELDMAIER und STEINLECHNER 1981 a). Alle diese beschriebenen Anpassungsvorgänge erfordern eine präzise zeitliche Regulation. Ein äußerst zuverlässiges Signal für die Kontrolle jahreszeitlicher Adaptationen ist die sich im Verlauf des Jahres kontinuierlich ändernde Photoperiode. Sie ist der primäre Faktor, der für die Auslösung der Winteranpassungen bei *Phodopus* verantwortlich ist (HOFFMANN et al. 1973, HELDMAIER und STEINLECHNER 1981 a, VITALE et al. 1985, HELDMAIER und LYNCH 1986, RUF 1991). Auch für eine Reihe anderer Säugetiere ist die photoperiodische Kontrolle der Winteranpassungen bekannt (Übersichten bei HOFFMANN 1979, HELDMAIER und LYNCH 1986, HELDMAIER et al. 1989).

Bei *Phodopus*, wie auch bei einigen anderen Arten, wurde nachgewiesen, daß die Dauer der nächtlich erhöhten Melatoninsynthese der kritische Parameter ist, der die Länge der Nacht reflektiert und die jahreszeitlichen Anpassungen auslöst (BITTMANN et al. 1983, CARTER und GOLDMANN 1983 a und 1983 b, STEINLECHNER et al. 1987, BARTNESS und GOLDMANN 1988, WAYNE et al. 1988, MAYWOOD et al. 1990 und 1991). Welche Bedeutung andere Parameter, wie zum Beispiel die Amplitude des nächtlichen Melatonin-Signals haben, ist bisher nicht geklärt. Mit der Anpassung an kurze Photoperiode ist nämlich nicht nur eine Verlängerung der Dauer des nächtlich erhöhten Melatoninspiegels verbunden, sondern auch eine drastische Erhöhung der Melatonin-Amplitude (ILLNEROVA et al. 1984). Damit unterliegt also auch die Melatonin-Amplitude einer Regulation durch die Photoperiode. Es gibt aber unabhängig vom Effekt der Photoperiode auch einen Einfluß der Umgebungstemperatur auf die Amplitude des Melatonin-Signals. So

reagierten Dsungarische Zwerghamster, die in langer Photoperiode gehalten und für 24h einer Umgebungs-temperatur von 5°C ausgesetzt wurden, mit einem dramatischen Anstieg (140%) ihrer Signalamplitude im Vergleich zu thermoneutralen Bedingungen (STIEGLITZ et al. 1994). Weiterhin ist bekannt, daß sich die Melatonin-Amplitude im Verlauf des Alterns verringert (REITER et al. 1980, HOFFMANN et al. 1985, GORE 1998). Es gibt folglich eine Reihe von Faktoren, die die Amplitude des Melatonin-Signals beeinflussen können. Welche Rolle allerdings die Melatonin-Amplitude spielt und wie sie reguliert wird, ist bisher völlig unklar.

Es gibt aber Hinweise darauf, daß die Amplitude des Melatoninsignals durch eine Behandlung mit Johanniskraut beeinflusst werden könnte. In einer Publikation von Demisch et al. (1990) wird nach 3-wöchiger Johanniskraut-Einnahme eine Erhöhung des nächtlichen Plasma-Melatonin-Spiegels beim Menschen beschrieben.

Johanniskraut (*Hypericum perforatum*) ist eine seit mehr als 2500 Jahren bekannte und sehr beliebte Heilpflanze. Sie findet Verwendung bei der Wundheilung bei Verbrennungen, hat eine starke Hemmwirkung auf die Vermehrung einiger Retroviren, vor allem aber wird Johanniskraut gegen Depressionen eingesetzt. Die antidepressive Wirksamkeit dieser Arzneipflanze konnte inzwischen in zahlreichen Placebo-kontrollierten Doppelblindstudien zweifelsfrei nachgewiesen werden (ERNST 1995, VOLZ und HÄNSEL 1995, LINDE et al. 1996, VOLZ 1997). Dagegen sind sowohl die für die Wirkung verantwortlichen Inhaltsstoffe, als auch die Wirkungsweise von Johanniskraut bis heute nicht geklärt. Die Inhaltsstoffgruppen von Johanniskraut umfassen Phenylpropanoide, Flavonol-Derivate, Biflavone, Proanthocyanidine, Xanthone, Phloroglucinole, einige Aminosäuren, Naphtodianthron, Gerbstoffe und ätherische Öle (NAHRSTEDT et al. 1997). Alle diese Naturstoffklassen sind in Johanniskraut mit einigen bis vielen Einzelsubstanzen vertreten. Das chemische Wirkprinzip konnte aber bisher keiner bestimmten Substanz zugeschrieben werden, vielmehr gilt es als erwiesen, daß die Wirksamkeit durch die Interaktion mehrerer Inhaltsstoffe zustande kommt (HÖLZL et al. 1994). Eine weitere gesicherte Erkenntnis ist, daß der Wirkmechanismus von Johanniskraut mit der Beeinflussung des Neurotransmitterstoffwechsels im Gehirn zusammenhängt (MÜLLER et al. 1998). Vor allem Serotonin und Noradrenalin, aber auch Dopamin scheinen hierbei eine wichtige Rolle zu spielen. Der genaue Wirkmechanismus ist allerdings noch unklar.

Als Nebenwirkung von Johanniskraut ist seit langem der sogenannte Hypericismus bekannt, eine durch *Hypericum* hervorgerufene Lichtempfindlichkeit. Bereits dieser Befund deutet auf einen Zusammenhang zwischen *Hypericum* und der Bedeutung des Lichts oder der Photoperiode hin. Weiterhin gelten die Beeinflussung der Neurotransmitter Serotonin und Noradrenalin als mögliche Wirkmechanismen der *Hypericum*-Wirkung; beide Substanzen spielen auch eine Rolle für die Melatonin-Tagesperiodik. Darüber hinaus können Depressionen als eine Erkrankung der circadianen Rhythmik angesehen werden (WEHR und GOODWIN 1981, WEHR und WIRZ-JUSTICE 1982). So treten beispielsweise die Symptome von Depressionen in tagesperiodischen Schwankungen auf. Außerdem sind Depressionen häufig mit Abnormalitäten des Schlaf-Wach-Rhythmus verbunden (WALDMANN 1973, WEHR et al. 1985). Eine Sonderform der Depression, die sogenannte 'Winterdepression' oder SAD (seasonal affective disorder), tritt - wie der Name schon sagt - saisonal während der Wintermonate auf und deutet so auf einen Zusammenhang mit der Photoperiode und der inneren Uhr hin. Ein weiteres Argument für eine Beziehung zwischen Depressionen und der circadianen Rhythmik stellt die erfolgreiche Behandlung dieser Erkrankung durch Lichttherapie dar (Übersicht bei TERMAN et al. 1989). Desweiteren ist bekannt, daß synthetische Antidepressiva den Melatoninrhythmus beeinflussen (VAN REETH et al. 1999).

Diese vielfältigen Indizien lassen vermuten, daß die antidepressive Wirkung von Johanniskraut mit dem photoperiodischen Informationstransfer oder der neurobiologischen Umsetzung in die Melatoninsynthese in Zusammenhang gebracht werden kann (HÖLZL et al. 1994). Gesicherte Erkenntnisse zur Johanniskraut-Wirkung auf die Melatonin-Tagesperiodik liegen aber erstaunlicherweise nicht vor.

Wie schon erwähnt ist die Photoperiode für den Dsungarischen Zwerghamster der primäre Zeitgeber für die Synchronisation der circadianen Rhythmik und der Auslöser saisonaler Anpassungsvorgänge. Dieser Kleinsäuger gehört also zu den stark photoperiodisch reagierenden Arten und ist außerdem innerhalb der Nagetiere eines der am besten untersuchten Tiermodelle in der Pineal-Forschung. Da der Melatonin-Rhythmus zweifellos ein geeigneter Index für die Funktion der inneren Uhr ist, liegt es nahe, die Wirkung von Johanniskraut auf die Melatonin-Tagesperiodik des Dsungarischen Zwerghamsters zu untersuchen, um der zentralen Fragestellung nachzugehen, ob es einen Effekt dieser Arzneipflanze auf die innere Uhr gibt. Wird durch die Fütterung von *Hypericum*-Trockenextrakt der Melatonin-Rhythmus

Dsungarischer Zwerghamster verändert? Wenn ja, auf welche Parameter der Melatonin-Tagesperiodik wirkt sich Johanniskraut aus und wie werden diese Parameter beeinflusst? Gibt es bezüglich der Wirkung geschlechtsspezifische Unterschiede? Einen weiteren Schwerpunkt stellte die Untersuchung der Hypericum-Wirkung im Zeitverlauf und deren Dosisabhängigkeit dar. Einen anderen wesentlichen Aspekt der Studie betraf die Frage, ob es Wechselwirkungen zwischen der Photoperiode und der Hypericum-Wirkung gibt, also ob sich zum Beispiel Johanniskraut im Kurztag anders auswirkt als im Langtag. Außerdem galt es zu klären, ob eine Veränderung der Melatonin-Tagesperiodik durch Hypericum-Fütterung den Verlauf der Kurztag-Akklimatisation Dsungarischer Zwerghamster beeinflusst.

2 Material und Methoden

2.1 Versuchstiere und Haltungsbedingungen

Alle in der vorliegenden Arbeit verwendeten Dsungarischen Zwerghamster (*Phodopus sungorus sungorus*) stammten aus der Zuchtkolonie der Arbeitsgruppe Stoffwechselphysiologie der Philipps-Universität Marburg. Die Hamster wurden in Räumen gehalten, in denen eine konstante Umgebungstemperatur von $23 \pm 1.5^\circ\text{C}$ herrschte und die Photoperiode durch Kunstlicht vorgegeben wurde. Es bestehen zwei verschiedene Zuchtstämme, von denen einer unter einer im Jahresverlauf wechselnden Licht-Dunkel-Phase (der natürlichen Photoperiode entsprechend) gehalten wird (Naturtagzucht), während der andere unter einer konstanten Photoperiode von 16 h Licht (Licht an um 4.00 Uhr MEZ) und 8 h Dunkel gehalten wurde (Langtagzucht)¹. Die Zuchtpaare wurden in mit Sägespaneinstreu versehenen Macrolonkäfigen (40×25×15 cm) zusammengesetzt und mit Futter (Hamster-Zuchtdiät, Altromin 7014) und Wasser *ad libitum* versorgt. Zusätzlich erhielten die Zuchtpaare wöchentlich einen halben Apfel und ca. 50 g Magerquark. Jungtiere verblieben bis zum 21. Lebenstag bei den Eltern, wurden anschließend ein bis zwei Wochen in Geschwistergruppen ohne die Eltern gehalten, bevor sie dann in Macrolonkäfige (22×17×15 cm) vereinzelt wurden.

Für die Versuche wurden ausschließlich adulte Hamster beiderlei Geschlechts in einem Alter von 3-12 Monaten herangezogen. Bei der Gruppeneinteilung wurde auf Homogenität der Geschlechterverteilung und des Körpergewichts geachtet. Während der Versuche wurden die Zwerghamster in klimatisierten Räumen unter künstlicher Beleuchtung gehalten.

2.2 Herstellung des Futters

2.2.1 Dosierung des Johanniskraut-Extraktes

Bei der Berechnung der Johanniskraut-Dosis für den Zwerghamster wurde von der für den Menschen empfohlenen Tagesdosis von 900 mg Extrakt ausgegangen. Diese Dosierung wurde über die Beziehung der Stoffwechselrate zum Körpergewicht

¹ Aus welcher der beiden Zuchten die Versuchstiere jeweils stammten, geht aus der Beschreibung der einzelnen Experimente hervor.

auf den Hamster umgerechnet. Dazu wurde zunächst der Grundumsatz des Menschen und der des Dsungarischen Zwerghamsters nach Brody (1964) ermittelt:

$$B = (a \times W^{0.75}) \times 4.184$$

wobei **B** = Grundumsatz (J)
W = Körpergewicht (kg),
a = Proportionalitätsfaktor (=70)

Wenn man von einem durchschnittlichen Körpergewicht des Menschen von 70 kg und des Hamsters von 0.035 kg ausgeht, erhält man für den Menschen einen Grundumsatz von 7087.83 J pro Tag und für den Hamster einen Wert von 23.70 J. Die für den Menschen empfohlene Tagesdosis von 900 mg HTE entspricht also einem Grundumsatz von 7087.83 J, dann entspricht für den Dsungarischen Zwerghamster eine Dosierung von 3 mg HTE pro Tag dem Grundumsatz von 23.70 J. Da die durchschnittliche Futteraufnahme des Zwerghamsters im Langtag etwa 3.6 g beträgt (Becker 1981), wurde der Johanniskraut-Trockenextrakt² mit dem Futter im Verhältnis 1:1200 gemischt (833 mg HTE/kg Futter). Darüber hinaus wurden weitere Dosierungen von 1.5 mg, 6 mg und 10 mg eingesetzt. Auf die jeweils verwendete Dosis wird bei der Beschreibung der einzelnen Versuche hingewiesen.

Insgesamt wurden für die verschiedenen Experimente drei unterschiedliche Chargen HTE verwendet, von denen sich allerdings einer als unwirksam erwies. Für alle Versuche zur Wirkung von HTE auf die aMT6s-Exkretion wurde Extrakt-Charge Nr. 96356 eingesetzt. Nur für die Versuche zur Wirkung von HTE auf die Melatonin-Synthese wurde zunächst Extrakt-Charge Nr. 99865 verwendet, die aber keinerlei Wirkung zeigte. Daraufhin wurde für diese Experimente Extrakt-Charge Nr. 98070818 verwendet.

² Die verwendeten HTEe wurde von der Firma Bionorica Arzneimittel aus Neumarkt zur Verfügung gestellt.

Tab.1: Zusammensetzung der einzelnen Hypericum-Extrakt-Chargen.

Extrakt-Charge Nr.	96356	99865^a	98070818
Hyperforin (%^b)	0.773	2.465	3.400
Hypericin (%^b)	0.045	0.151	0.194
Pseudohypericin (%^b)	0.155	0.209	0.263

^a unwirksam

^b Der Gehalt der einzelnen Inhaltsstoffe wurde per HPLC von der Firma Bionorica bestimmt; die Prozentangaben beziehen sich auf Massenprozent.

2.2.2 Futterzubereitung

Hamster-Zuchtdiät (Altromin 7014) wurde als Futtermehl von Altromin bezogen, in trockenem Zustand mit dem Pflanzenextrakt vermengt und dann mit wenig Wasser angerührt. Die Mischung wurde in Aluminium-Eiswürfelbereiter gefüllt und im Trockenschrank für 48 h bei 60°C getrocknet. Die so erhaltenen festen Futterbrocken, die durchschnittlich 10-15 g wogen, wurden den Hamstern direkt in den Käfig gelegt.

Das Kontrollfutter wurde auf die gleiche Weise, allerdings ohne die Zugabe von Johanniskraut-Trockenextrakt hergestellt.

2.3 Bestimmung des 6-Sulphatoxymelatonins im Urin

2.3.1 Sammlung der Urinproben

Die Methode der fraktionierten Urinsammlung wurde von STIEGLITZ et al. (1995) erstmals beschrieben. Die Hamster wurden in speziell angefertigten Stoffwechsellkäfigen mit Plastikgitterboden gehalten und hatten freien Zugang zu Futter, Wasser und einer an der Außenwand des Plexiglaskäfigs angebrachten Schlafbox (Abb. 2). Urin, Kot und Futterreste fielen durch den Gitterboden in einen Trichter, der sich zunächst verengt, dann aber wieder erweitert. Durch diese Konstruktion wurde eine Trennung von Urin und festen Bestandteilen erreicht, da der

Urin an der Außenwand des Trichters entlang lief und sich in einem Aufsatz sammelte. Kot und Futterreste fielen dagegen von der engsten Stelle des Trichters direkt in einen Auffangbehälter. Der Urin wurde über Silikonschläuche in 3h-Intervallen von einer Peristaltikpumpe abgesaugt und an einen Fraktionssammler weitergeleitet. Gleichzeitig wurden Schläuche und Aufsätze von einer Perfusorpumpe mit *Aqua bidest.* durchspült, um Urinreste aus der Anlage zu waschen. Pumpe, Fraktionssammler und Perfusor wurden von einer Zeitschaltuhr gesteuert, so daß eine automatische Urinsammlung von bis zu acht Individuen gleichzeitig möglich war. Die Zwerghamster verblieben zur Erstellung eines aMT6s-Tagesprofils jeweils für 27 h in der Urinsammelanlage; zu Beginn jeder Urinsammlung erhielten sie ein Stück Salatgurke.

Das Volumen der einzelnen Urinproben wurde bestimmt, bevor sie bei 2500 g für 5 min zentrifugiert wurden, um Verunreinigungen wie Kot, Haare oder Futterreste abzutrennen. Anschließend wurde ein Aliquot des Überstandes bei -70°C eingefroren.

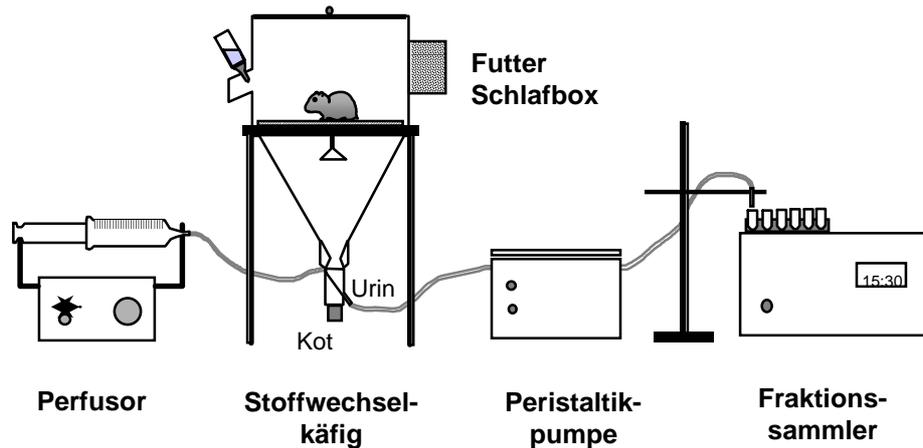


Abb. 2: Anlage zur automatischen Sammlung des Urins Dsungarischer Zwerghamster. Sechs Stoffwechsellkäfige sind über Silikonschläuche mit einer Peristaltikpumpe verbunden, die den angesammelten Urin in 3h-Intervallen zu einem Fraktionssammler leitet. Zusätzlich durchspült eine Perfusorpumpe das System mit *Aqua bidest.* Aus: STIEGLITZ et al. 1995, verändert.

2.3.2 Radioimmunologischer aMT6s-Nachweis

Der Radioimmunoassay (RIA) für aMT6s wurde von ARENDT et al. (1985) für menschlichen Urin entwickelt und von ALDHOUS und ARENDT (1988) in abgewandelter Form ausführlich beschrieben. Die Methode wurde von STIEGLITZ et al. (1995) mit geringfügigen Änderungen auf Hamsterurin angewendet und in dieser Form übernommen.

Die Urinproben wurden vor dem Assay entsprechend der zu erwartenden Menge an endogenem aMT6s verdünnt. Außerdem wurde eine bekannte Menge an radioaktiv markiertem aMT6s und eine begrenzte Menge Antikörper zugegeben. Das endogene und das radioaktive aMT6s konkurrieren um die Bindungsstellen des Antikörpers. Mit einer Aktivkohle-Suspension wurden die nicht an Antikörper gebundenen Antigene absorbiert und durch Zentrifugation sedimentiert. Der Überstand (gebundene Antigen-Antikörper-Komplexe) wurden verworfen und die Radioaktivität des Sediments im γ -Strahlungszähler gezählt. Die Menge an radioaktiv markierten freien aMT6s-Molekülen im Sediment war direkt proportional der Menge an gebundenem endogenem aMT6s.

2.4 Gewebe-Aufarbeitung

Die Hamster wurden nachts zwischen 2.00 und 3.00 Uhr MEZ unter schwachem Rotlicht (Philips Dunkelkammer-Lampe; E27PF712E) dekapitiert. Das austretende Blut wurde gesammelt und auf Eis gestellt. Das Pinealorgan wurde entnommen und sofort auf einen mit Trockeneis gekühlten Spatel plaziert. Anschließend wurden die Blutproben bei 4°C mit 2500 g für 15 min zentrifugiert. Plasma und Pinealorgane wurden bis zur weiteren Aufarbeitung bei -70°C gelagert.

2.5 Bestimmung der NAT-Aktivität

Die NAT ist das Schlüsselenzym der Melatoninsynthese, da es den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt der N-Acetylierung von Serotonin zu N-Acetylserotonin katalysiert. Die Aktivität dieses Enzyms ist in vitro im Pinealorgan meßbar. Diese Methode wurde von DEGUCHI und AXELROD (1972) etabliert und von STEINLECHNER (1984) leicht modifiziert. Dem Gewebe-Homogenat wird Tryptamin als Substrat zugesetzt. Durch Zugabe von ¹⁴C-Acetyl-Coenzym A entsteht bei der enzymatischen Acetylierung ¹⁴C-Acetyltryptamin als Produkt. Das Produkt wird mit Chloroform extrahiert, evaporiert und in einem Szintillationszähler gezählt. Die Aktivität der NAT wird in nmol gebildetem Acetyltryptamin pro Pinealorgan und Stunde angegeben.

2.6 Bestimmung des Plasma-Melatoningehaltes

Der Melatonin-Gehalt im Blutplasma wurde von der Firma Stockgrand Ltd. mittels eines Radio-Immuno-Assays bestimmt, der für Melatonin im menschlichen Blutplasma entwickelt wurde (nach FRASER et al. 1983). Das Meßprinzip entspricht dem zuvor für aMT6s beschriebenen RIA.

2.7 Messung des Fellindex

Der Verlauf der Fellumfärbung des Dsungarischen Zwerghamsters vom graubraunen Sommerfell in das weiße Winterfell wurde dokumentiert, indem die Fellfarbe der Hamster regelmäßig bestimmt und den von FIGALA et al. (1973) definierten 6 Färbungsstufen (oder Fellindices) zugeordnet wurde (Abb. 3).

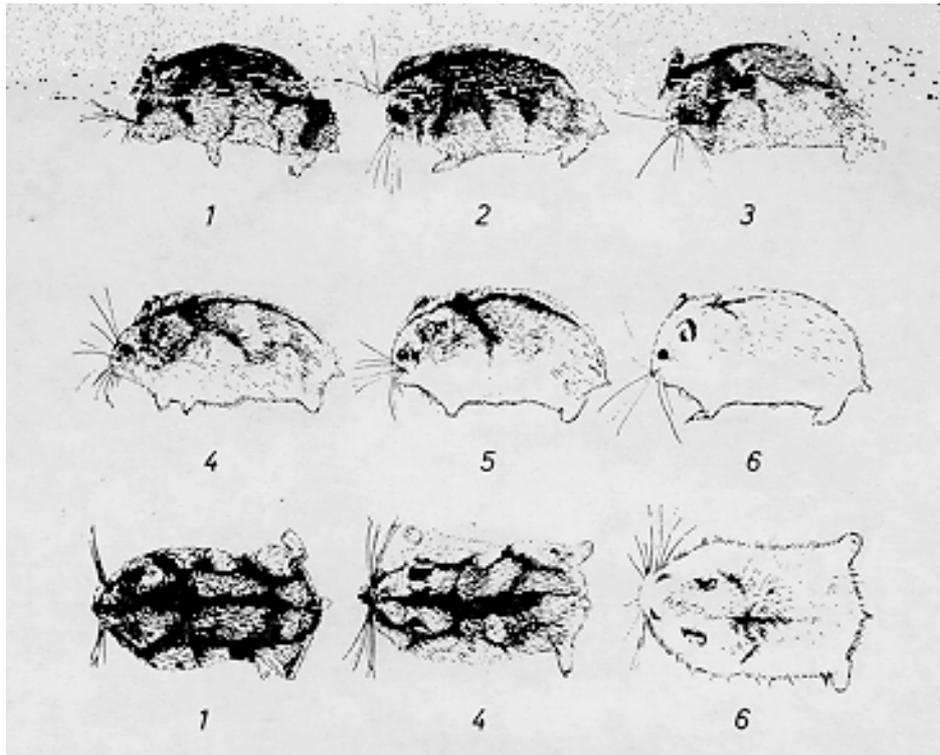


Abb. 3: Fell-Färbungsstufen des Dsungarischen Zwerghamsters während der Anpassung an kurze Photoperiode mit den zugehörigen Fellindices; in den oberen beiden Reihen in Seitenansicht (Index 1-6); in der untersten Reihe in Aufsicht von oben (Fellindex 1, 4 und 6). Aus: FIGALA et al. 1973.

2.8 Bestimmung des Reproduktionsstatus

2.8.1 Messung des Testisindex

Der Reproduktionsstatus männlicher Zwerghamster kann durch das Vermessen des Scrotums von außen bestimmt werden. Dazu erhielten die Hamster eine leichte Inhalationsnarkose mit Halothan® (1-4%, Zeneca, Planckstadt). Die Gonadenregion wurde mit 70 % Ethanol befeuchtet, bevor Länge und Breite jedes Hoden mit Hilfe einer Schieblehre vermessen wurde. Die Meßwerte beider Hoden wurden jeweils gemittelt und daraus der Testisindex durch Multiplikation von Länge und Breite errechnet. Dieser Index korreliert sowohl mit dem Hodengewicht, als auch mit der Anzahl der enthaltenen Spermien und ist damit ein zuverlässiger Indikator für die Reproduktionsfähigkeit eines Individuums (HOFFMANN 1973).

2.8.2 Bestimmung des Zyklusstadiums

Der Reproduktionsstatus der Weibchen wurde über das Zellbild der Vaginalschleimhaut ermittelt. In regelmäßigen Abständen wurde den Hamstern ein Vaginalabstrich entnommen. Dazu wurde mit einer Pipette 10 µl lauwarmes Leitungswasser äußerlich auf die Vagina gegeben und wieder aufgezogen. Die Spitze der Pipette war mit einem Stück Silikonschlauch überzogen, um Verletzungen zu vermeiden. Das aufgezogene Wasser, das nun Zellen der Vagina enthielt, wurde auf einen Objektträger getropft und luftgetrocknet. Danach erfolgte eine 10-minütige Fixierung in 100% Ethanol/Methanol-Lösung (Verhältnis 1:1). Anschließend wurde der Objektträger mit *Aqua bidest.* abgespült und erneut getrocknet. Es folgte eine Färbung für 10 min in einer Giemsa-Puffer-Lösung. Zuvor wurde die Giemsa-Lösung (Merck) mit Phosphatpuffer (0.02 M KH_2PO_4 ; 0.04 M Na_2HPO_4 ; pH 7.4) im Verhältnis 1:10 verdünnt. Die verdünnte Lösung wurde anschließend filtriert, um ausfallende Farbkristalle abzusondern. Nach Entnahme aus dem Färbegrad wurde der Objektträger nochmals mit *Aqua bidest.* abgespült und luftgetrocknet. Nach dieser Färbung konnte das Zellbild der Vaginalabstriche mit Hilfe eines Lichtmikroskops bei 50- bis 400-facher Vergrößerung dargestellt werden. Konnte anhand des charakteristischen Zellbildes das jeweilige Zyklusstadium (Proöstrus, Östrus, Metöstrus oder Diöstrus) eindeutig definiert werden, so wurde das entsprechende Tier als zyklisch eingestuft und mit dem Index 3 bezeichnet. Wenn zwar im Vaginalabstrich noch Zellen erkennbar waren, dieses Zellbild aber nicht mehr einem definierten Zyklusstadium entsprach, wurde dieser Abstrich als Index 2

Wochen Kontrollfutter *ad libitum* und wurden an einzelnen Versuchstagen einer Urinsammlung unterzogen. Insgesamt wurden von jedem Tier 3 aMT6s-Tagesprofile gesammelt. Anschließend wurden sie mit Johanniskraut-Futter (Dosis: 3 mg HTE pro Tag und Hamster) *ad libitum* gefüttert. Am 3. Tag der HTE-Fütterung wurde von den Zwerghamstern erneut Urin gesammelt.

2.9.1.2 Zeitverlauf der Johanniskraut-Wirkung

Dieses Experiment diente der Untersuchung des zeitlichen Verlaufes der Hypericum-Wirkung auf die aMT6s-Exkretion. Die Versuchsbedingungen entsprachen denen des Langtag-Versuches, allerdings wurden die Dsungarischen Zwerghamster über einen Zeitraum von 4 Wochen mit Johanniskraut behandelt. Zu verschiedenen Zeitpunkten der HTE-Fütterung wurden Urinsammlungen vorgenommen.

2.9.1.3 Dosisabhängigkeit der Johanniskraut-Wirkung

Vier Gruppen von Zwerghamstern wurden unter Langtag-Versuchsbedingungen für 7 Tage mit unterschiedlichen Hypericum-Dosierungen behandelt. Vorher wurden von allen Gruppen 3 aMT6s-Profilen unter Kontrollfütterung erstellt; am 7. Tag der HTE-Fütterung wurde nochmals Urin gesammelt. Außer der bisher verwendeten Tagesdosis von 3 mg HTE pro Hamster wurden 3 weitere Dosierungen von 1.5 mg, 6 mg und 10 mg HTE pro Tag und Tier eingesetzt. Die Haltungsbedingungen sind in Tabelle 1 dargestellt. (mg)9T 3e

Weibchen) aus der Naturtagzucht im November aus dem Zuchtraum in einen Tierhaltungsraum umgesetzt. Die Hamster wurden einem konstanten Licht-Dunkel-Wechsel ausgesetzt, der der natürlichen Photoperiode zu diesem Zeitpunkt entsprach (Licht von 7-17 Uhr). Ansonsten wurde wie in dem zuvor geschilderten Langtag-Experiment verfahren.

2.9.3 Wirkung von Johanniskraut während der Kurztaganpassung

Mit Hilfe dieses Experimentes sollte die Frage geklärt werden, ob Johanniskraut den Verlauf der morphologischen und physiologischen Winteranpassungen des Dsungarischen Zwerghamsters beeinflusst. Dazu wurden zwei Gruppen von jeweils 10 Hamstern der Langtagzucht entnommen und zunächst weiterhin unter langer Photoperiode bei einer Umgebungstemperatur von 23°C gehalten. Es wurden innerhalb von 2 Wochen von jedem Tier 3 aMT6s-Tagesprofile gesammelt, bevor eine der beiden Gruppen mit Johanniskraut gefüttert wurde (Tagesdosis: 3mg HTE/Hamster). Am 3. Tag der HTE-Behandlung wurde erneut Urin gesammelt, bevor die Photoperiode auf Kurztag (10 h Licht;14 h Dunkel; Licht an um 7.00 Uhr MEZ) umgestellt wurde. Während des gesamten Versuchszeitraumes wurden in regelmäßigen Abständen Körpergewicht, Fellindex und Testisindex bzw. Zyklusstadium der Zwerghamster bestimmt. 12 Wochen nach Umstellung der Photoperiode wurde ein weiteres Mal ein aMT6s-Tagesprofil aufgenommen.

2.10 Auswertung und Statistik

Bei der Darstellung des Mittelwertes wurde als Streuungsmaß der mittlere Fehler des Mittelwertes (SEM) angegeben. Die relativen Darstellungen der aMT6s-Exkretion wurden erstellt, indem für jedes Einzeltier das aMT6s-Maximum unter Fütterung von Kontrollfutter als 100% definiert wurde und alle anderen Meßwerte des Hamsters auf diesen Maximalwert bezogen wurden. Vor der Anwendung statistischer Testverfahren wurden die Daten zunächst nach PEARSON und STEPHENS auf Normalverteilung sowie nach BARTLETT auf Homogenität der Varianzen geprüft. Zum Vergleich zweier normalverteilter Stichproben wurde für unabhängige Daten der Student-t-Test und für abhängige Daten der Student-t-Test für Paardifferenzen verwendet. Für den Vergleich mehrerer Stichproben wurde je nach Voraussetzung eine ein- oder zweifaktorielle Varianzanalyse (ANOVA) mit oder ohne Meßwiederholungen durchgeführt. Der Zusammenhang zwischen zwei Parametern

wurde bei normalverteilten Daten durch Berechnung des Produkt-Moment-Korrelationskoeffizienten (r) nach PEARSON, bei nicht normalverteilten Daten durch Berechnung des Rang-Korrelationskoeffizienten (R) nach SPEARMAN getestet. Das Signifikanzniveau wurde bei allen Verfahren auf $p < 0.05$ festgelegt. Signifikante Unterschiede wurden in den Abbildungen durch ein Stern-Symbol (*) gekennzeichnet. Die in dieser Arbeit angewandten statistischen Verfahren wurden mit Hilfe des Programmes Sigma Stat 2.0 durchgeführt.

3 Ergebnisse

3.1 Wirkung von Johanniskraut im Langtag

Die in diesem Kapitel zusammengefaßten Versuche sollten die Frage klären, ob die Fütterung von Hypericum-Trockenextrakt die Melatonin-Tagesperiodik Dsugarischer Zwerghamster beeinflußt und ob es diesbezüglich Unterschiede zwischen Männchen und Weibchen gibt. Eine mögliche Wirkung sollte näher charakterisiert werden, indem der zeitliche Verlauf und die Dosisabhängigkeit dieses Effekts untersucht wurden.

3.1.1 Wirkung von Johanniskraut auf Futteraufnahme und Körpergewicht

Die Fütterung von HTE-haltigem FutterD0.00832 5.2(ctterD0e. Ei)5.4n Ze. Eitchar vts ts Tc.4(g)

Tab. 2: Körpergewicht, Futtermittelaufnahme und HTE-Dosis von männlichen (n=8) und weiblichen (n=8) Zwerghamstern. Aufgeführt sind die Mittelwerte \pm SEM der letzten 3 Tage der Kontrollfütterung und der 3-tägigen HTE-Fütterung. Es ergaben sich keine signifikanten Unterschiede (Student-t-Test für Paardifferenzen).

	Körpergewicht		Futtermittelaufnahme		HTE-Dosis	
	Männchen	Weibchen	Männchen	Weibchen	Männchen	Weibchen
Kontrolle	35.25 \pm 1.17	33.49 \pm 1.49	3.50 \pm 0.28	3.34 \pm 0.28	-	-
HTE-Fütterung	35.49 \pm 1.22	33.53 \pm 1.51	3.47 \pm 0.17	3.61 \pm 0.21	2.89 \pm 0.14	3.01 \pm 0.18

3.1.2 Wirkung von Johanniskraut auf die aMT6s-Exkretion

Die aMT6s-Exkretion von Dsungarischen Zwerghamstern ließ ohne die Wirkung von Johanniskraut eine ausgeprägte Tagesrhythmik mit erhöhten Nacht- und niedrigen Tagwerten erkennen. Tagsüber wurden nur äußerst geringe Mengen an aMT6s ausgeschieden, während nach Eintreten der Dunkelphase die aMT6s-Exkretion deutlich anstieg und nach Beginn der Lichtphase wieder rapide abfiel. Obwohl alle Zwerghamster diese prononcierte Tagesperiodik in der aMT6s-Exkretion zeigten, gab es erhebliche Unterschiede zwischen aMT6s-Tagesprofilen verschiedener Individuen. Vor allem hinsichtlich der Amplitude waren beträchtliche Unterschiede zwischen einzelnen Hamstern zu erkennen; aber auch die Lage des Maximums und die Dauer der aMT6s-Exkretion unterschieden sich (Abb. 4).

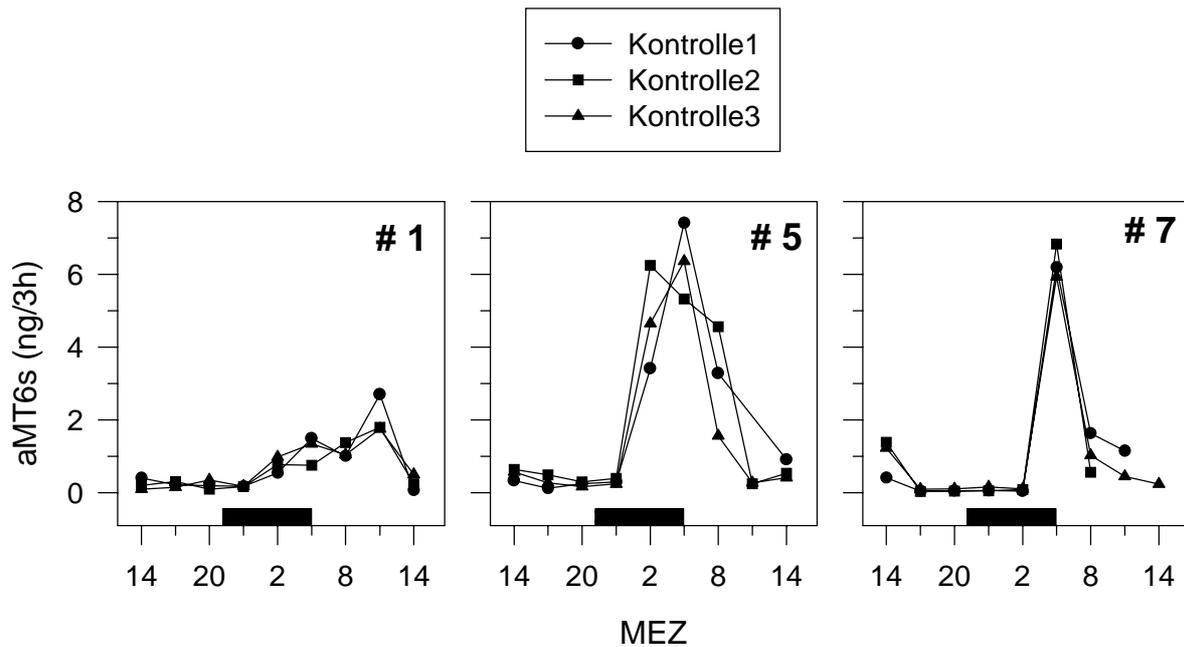


Abb. 5: Jeweils drei aMT6s-Tagesprofile von drei verschiedenen Zwerghamstern unter Fütterung von Kontrolldiät, jeweils in 2-tägigem Abstand erfaßt. Die schwarzen Balken auf der x-Achse kennzeichnen die Dunkelphase.

Die 3-tägige Johanniskraut-Fütterung bewirkte eine Reduktion der nächtlichen aMT6s-Exkretion. Die Reaktion der Hamster auf die Hypericum-Fütterung fiel aber individuell unterschiedlich aus (Abb. 6). Während zum Beispiel bei Tier#19 der Anstieg der aMT6s-Exkretion durch Johanniskraut nur leicht verzögert und kaum gesenkt wurde, reagierte Tier#13 mit einer so drastischen Reduktion, daß die nächtlichen aMT6s-Level fast nicht mehr von den Tagwerten zu unterscheiden waren. Tier#5 zeigte unter Fütterung von Kontrolldiät nur ein verhältnismäßig niedriges Maximum der aMT6s-Ausscheidung von 1.62 ng/3h; dieser Maximalwert wurde durch dreitägige Johanniskraut-Fütterung jedoch noch deutlich um 45.7% auf 0.88 ng/3h gesenkt. Bei Tier#18 ist die aMT6s-Exkretion um 2.00 Uhr MEZ nach Hypericum-Wirkung gegenüber der entsprechenden Kontrollprobe sogar erhöht. In dem darauffolgenden 3h-Intervall fiel die aMT6s-Ausscheidung allerdings von zuvor 2.69 ng/3h auf 0.85 ng/3h nach Johanniskraut-Fütterung ab.

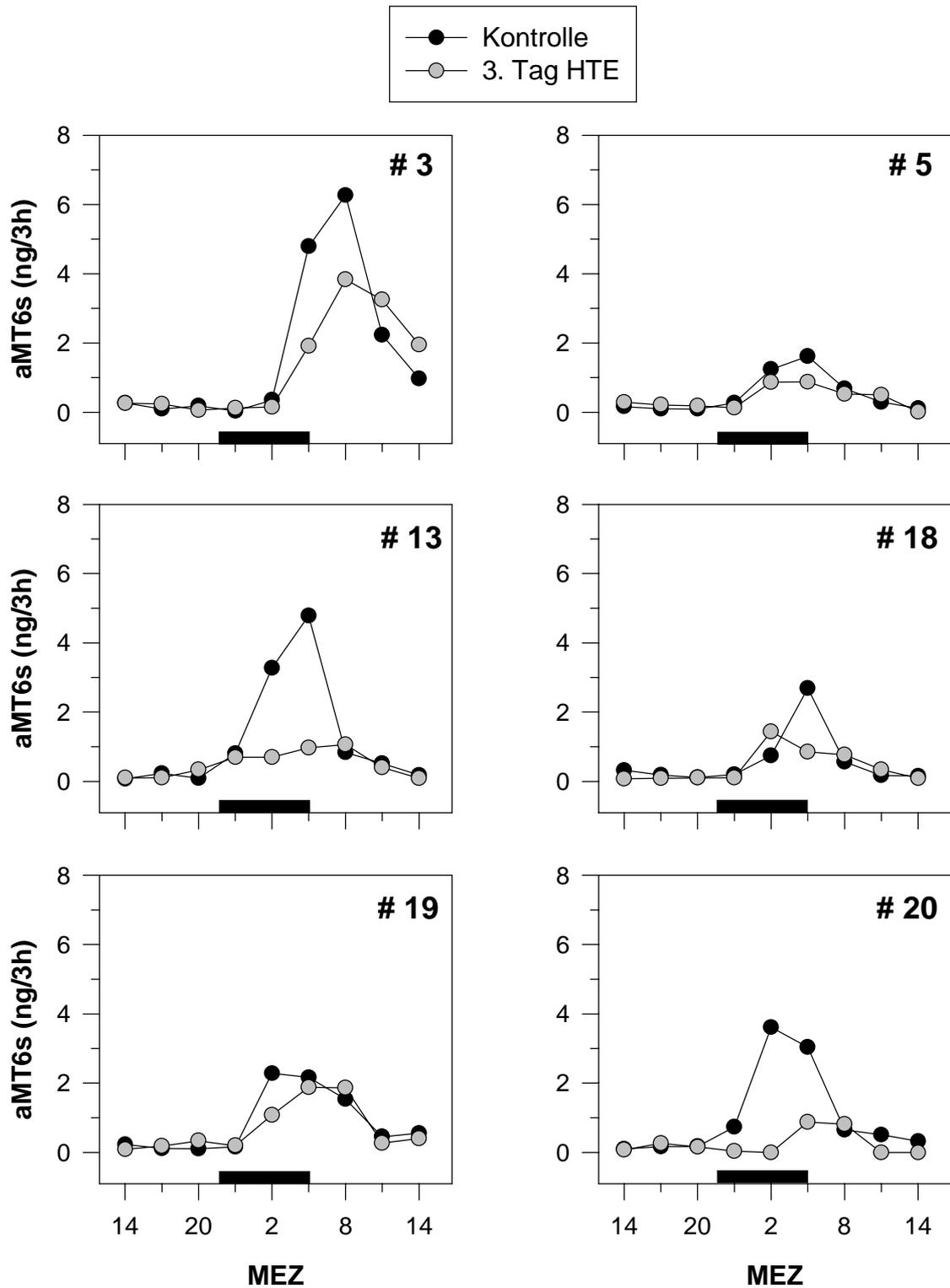


Abb. 6: Exemplarische Darstellung individueller aMT6s-Profile vor (schwarze Symbole) und nach 3-tägiger Hypericum-Wirkung (graue Symbole) im Langtag von 6 Einzeltieren. Die schwarzen Balken auf der x-Achse markieren die Dunkelphase.

Auch wenn die Reaktionen auf die HTE-Fütterung individuell variierten, bewirkte Hypericum bei allen Zwerghamstern eine Erniedrigung der aMT6s-Exkretion, was bei der Betrachtung der Mittelwerte der aMT6s-Ausscheidung im Tagesverlauf deutlich wird (Abb. 7). Während der Fütterung von Kontrolldiät zeigten alle Hamster - wie bereits erwähnt - eine ausgeprägte Tagesrhythmik der aMT6s-Exkretion mit erhöhten Nachtwerten, während tagsüber nahezu kein aMT6s ausgeschieden wurde. In den Urinfraktionen von 2.00 Uhr und 5.00 Uhr MEZ war der überwiegende Teil der gesamten Tagesmenge an aMT6s enthalten, und zwar bei Männchen und Weibchen. Zwischen 2.00 Uhr und 5.00 Uhr MEZ erreichte auch die Mehrheit aller Hamster ihr tägliches Maximum der aMT6s-Exkretion.

Nach 3 Tagen Fütterung der Johanniskraut-Diät war sowohl bei männlichen als auch bei weiblichen Zwerghamstern eine deutliche Reduktion der nächtlichen aMT6s-Ausscheidung zu verzeichnen. Es war zwar noch eine Tagesperiodik erkennbar, jedoch mit drastisch gesenkten nächtlichen Maximalwerten. Insbesondere der aMT6s-Gehalt der Urinproben um 2.00 und um 5.00 Uhr MEZ wurde durch Johanniskraut erheblich reduziert. Die aMT6s-Exkretion der Männchen sank um 2.00 Uhr um 25.2% und um 5.00 Uhr um 39.1%; während der 2.00 Uhr-Wert der Weibchen um 42.8% und der 5.00 Uhr-Wert um 47.2% erniedrigt wurde.

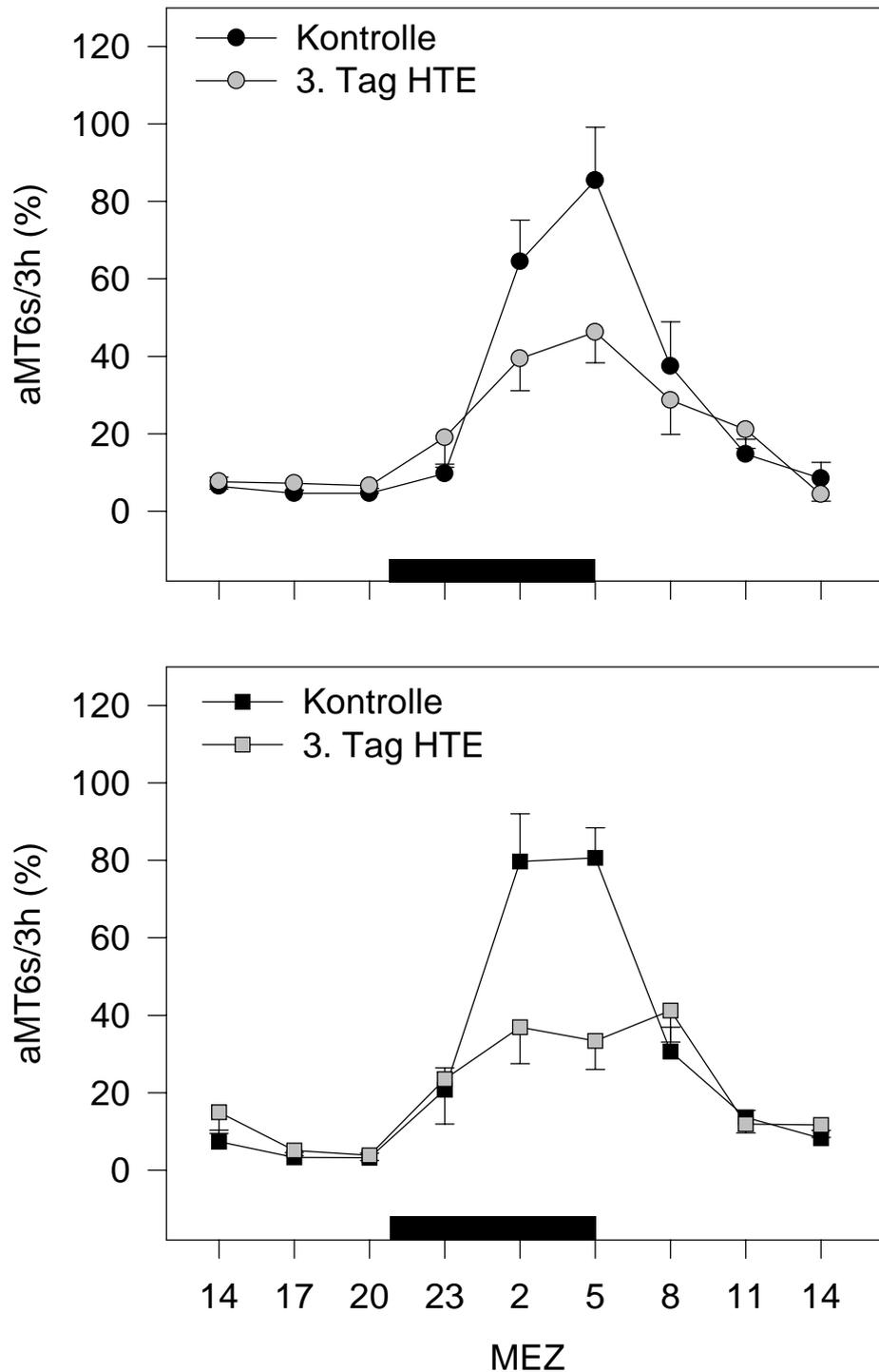


Abb. 7: Tagesprofile der aMT6s-Exkretion von Männchen (oben; n=8) und Weibchen (unten; n=8) unter Kontroll-Fütterung (schwarze Symbole) und am 3. Tag HTE-Fütterung (graue Symbole) im Langtag. Dargestellt sind relative Mittelwerte \pm SEM. Die schwarzen Balken auf der x-Achse markieren die Dunkelphase. Effekt der Zeit für Männchen $p < 0.001$, für Weibchen $p = 0.005$; Effekt der Behandlung für Männchen $p = 0.016$, für Weibchen $p = 0.015$; Interaktion zwischen den Faktoren Zeit und Behandlung für Männchen $p = 0.011$, für Weibchen $p = 0.043$ (Zweifaktorielle ANOVA für Meßwiederholungen).

Johanniskraut hatte in den hier gezeigten Ergebnissen keine Wirkung auf die Dauer der nächtlich erhöhten aMT6s-Exkretion, wenn man die Dauer als die Zeitspanne nächtlich erhöhter aMT6s-Exkretion definiert. Der Beginn des aMT6s-Anstiegs nach Eintritt der Dunkelheit lag mit und ohne Wirkung von Hypericum im Mittel bei 23.00 Uhr MEZ, um 11.00 Uhr bzw. spätestens um 14.00 Uhr MEZ erreichten die Hamster sowohl vor als auch nach Johanniskraut-Fütterung das Ende der nächtlich erhöhten aMT6s-Exkretion. Bei einzelnen Zwerghamstern hatte es aber den Anschein, als ob die Phase der nächtlich erhöhten aMT6s-Exkretion unter Hypericum-Wirkung leicht nach hinten, also in den Tag hinein, verschoben würde. Sowohl der Anstieg als auch das Absinken der aMT6s-Ausscheidung verzögerte sich (Abb. 6, Tier#3, Tier#19, Tier#20); und zwar insofern, als daß der erste während der Dunkelphase erhöhte aMT6s-Wert durch Hypericum immens erniedrigt wurde, wohingegen der darauffolgende Wert wieder näher an dem entsprechenden Kontrollwert lag. Die aMT6s-Level um 11.00 und um 14.00 Uhr lagen bei Tier#3 nach 3-tägiger Johanniskraut-Fütterung sogar über denen des Kontroll-Rhythmus. Bei Tier#20 verschob sich überdies das Erreichen des Maximalwertes um ein 3h-Intervall. Eine solche Phasenverschiebung beschränkte sich aber, wie schon erwähnt, auf einzelne Individuen.

Die aMT6s-Ausscheidung am Tage wurde durch Hypericum-Fütterung nicht beeinflußt; auch unter Johanniskraut-Behandlung wurden während der Lichtphase keine nennenswerten Mengen an aMT6s ausgeschieden. Der generelle Tagesverlauf der aMT6s-Exkretion wurde also durch die 3-tägige Hypericum-Behandlung nicht maßgeblich verändert; die Menge des nächtlich exkretierten aMT6s wurde jedoch wesentlich erniedrigt.

Das Maximum der aMT6s-Exkretion fiel bei den Männchen nach 3-tägiger Johanniskraut-Fütterung von 3.08 ± 0.59 ng/3h auf nur noch 1.48 ± 0.37 ng/3h ($p=0.0047$); bei den Weibchen wurde das Maximum ebenfalls signifikant von 3.31 ± 0.54 ng/3h auf 1.85 ± 0.47 ng/3h ($p=0.0083$) gesenkt (Abb. 8). Entsprechend niedriger fiel auch die 24h-Produktion von aMT6s nach Hypericum-Fütterung aus; sie erreichte bei männlichen Hamstern unter Fütterung von Kontrolldiät im Mittel 6.44 ± 1.33 ng/24h und wurde durch Hypericum auf 4.69 ± 1.08 ng/24h erniedrigt. Bei weiblichen Zwerghamstern bewirkte Johanniskraut einen Abfall der aMT6s-Tagesmenge von 7.41 ± 0.72 ng/24h auf 5.42 ± 0.88 ng/24h. Die Reduktion der aMT6s-Tagesproduktion war allerdings nur bei den Weibchen signifikant ($p=0.033$), bei ihren

männlichen Artgenossen dagegen bewirkte Hypericum keine signifikante Senkung der aMT6s-Tagesproduktion ($p=0.39$).

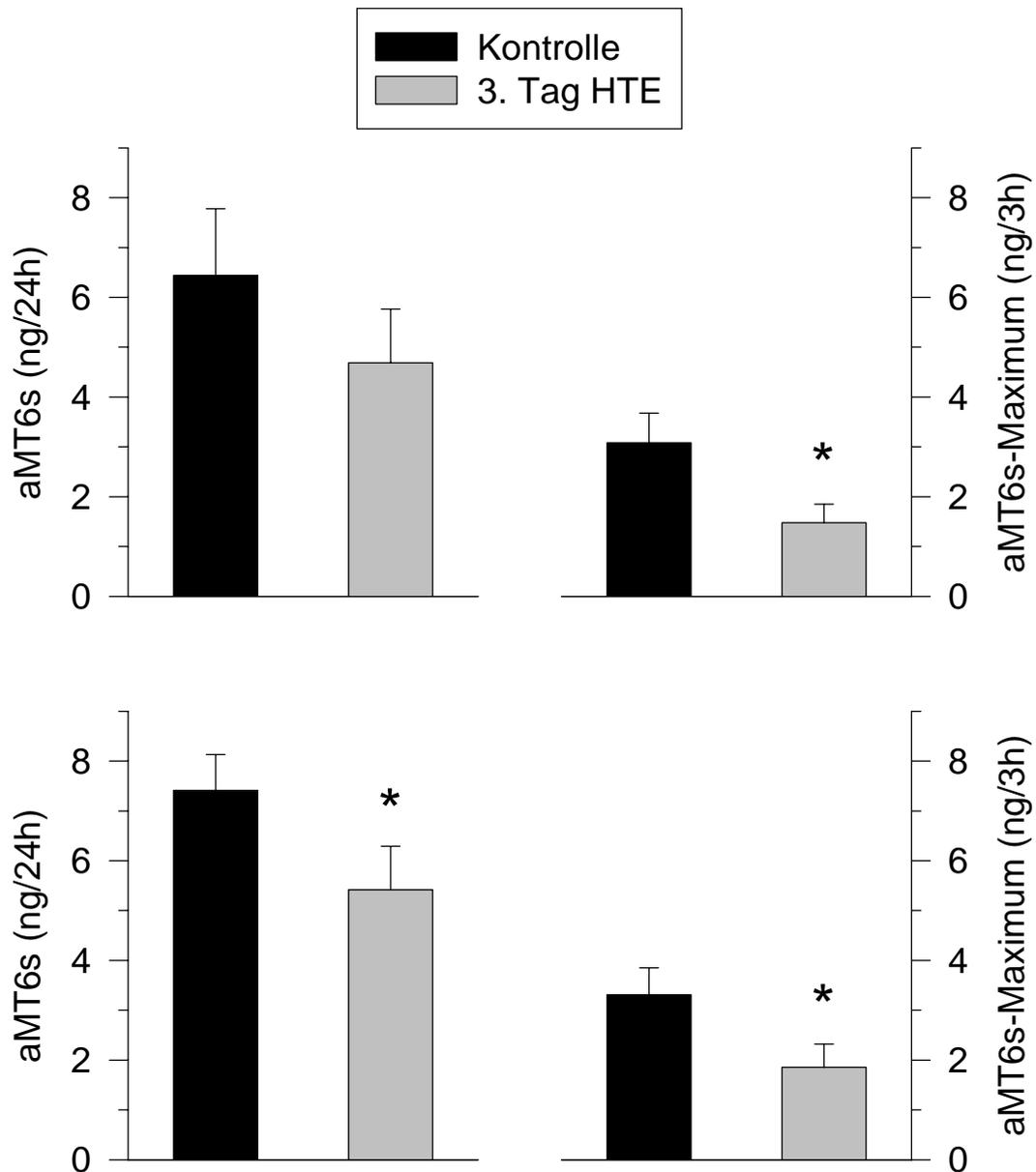


Abb. 8: Änderung der aMT6s-Tagesproduktion (links) und des aMT6s-Maximums (rechts) nach 3-tägiger Johanniskraut-Fütterung bei männlichen (oben, $n=8$) und weiblichen (unten, $n=8$) Dsungarischen Zwerghamstern im Langtag. Die schwarzen Balken geben die Mittelwerte \pm SEM unter Kontrollfütterung wieder; die grauen Balken zeigen die Mittelwerte \pm SEM unter Hypericum-Fütterung. Signifikante Unterschiede sind mit einem * gekennzeichnet ($p < 0.05$, Student-t-Test für Paardifferenzen)

Zwischen dem Maximum und der 24h-Produktion von aMT6s zeigte sich bei den hier untersuchten Langtaghamstern folgender Zusammenhang: Je höher das Maximum der aMT6s-Exkretion, desto höher ist auch die gesamte Tagesproduktion von aMT6s (Abb. 9). Diese Beziehung erklärt sich dadurch, daß bei unter langer Photoperiode gehaltenen Hamstern das nächtliche aMT6s-Maximum einen relativ großen Anteil an der 24h-Produktion von aMT6s hat. So war das aMT6s-Maximum der hier untersuchten männlichen Zwerghamster mit $61.1 \pm 14.9\%$ an der 24h-Produktion beteiligt; bei den Weibchen hatte das aMT6s-Maximum einen Anteil von $43.5 \pm 3.6\%$ an der Tagesproduktion.

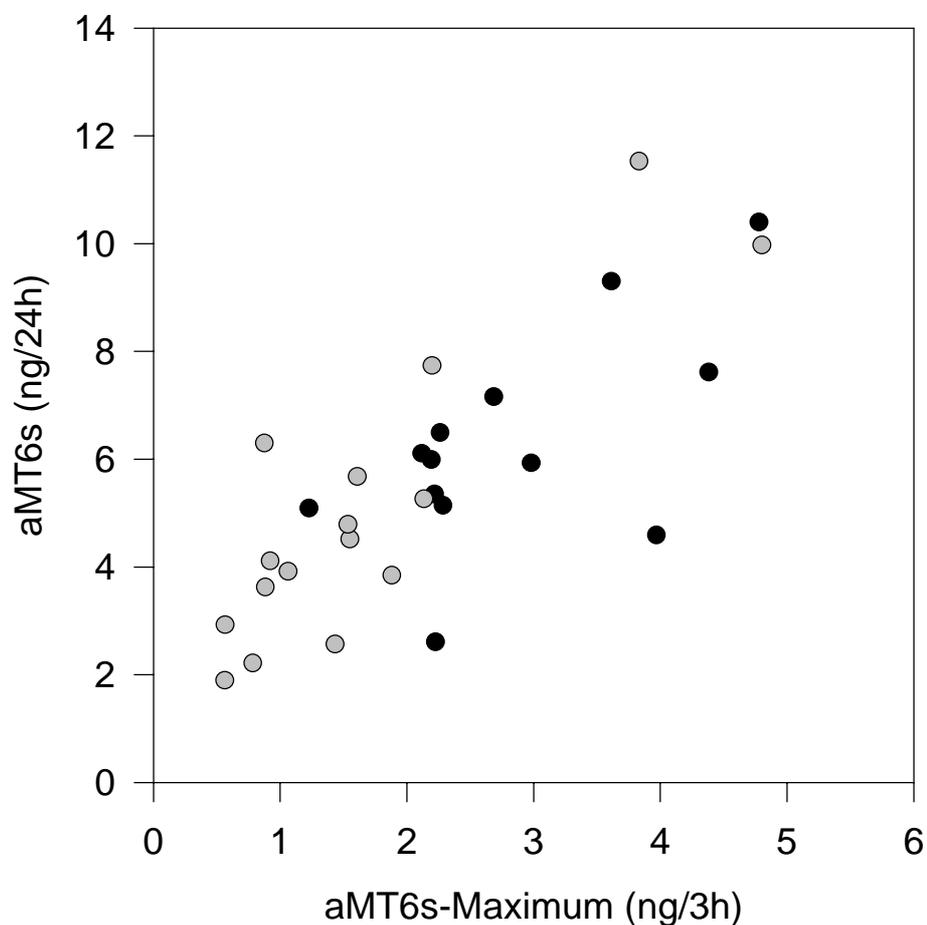


Abb. 9: Korrelation zwischen dem Maximum und der 24h-Produktion von aMT6s von im Langtag gehaltenen Dsungarischen Zwerghamstern unter Fütterung von Kontrollfutter (schwarze Symbole; n=16) und nach 3-tägiger HTE-Fütterung (graue Symbole; n=16); $R=0.726$; $p<0.0001$).

Die Differenz des aMT6s-Maximums unter Kontroll-Fütterung und des Maximums unter Hypericum-Fütterung ist abhängig vom jeweiligen Absolutwert unter Kontrollbedingungen (Abb. 10 links; $r=0.66$; $p=0.0054$). Je höher also das Kontroll-Maximum, desto stärker fällt auch die Reduktion durch Johanniskraut aus. Für den Zusammenhang zwischen der Änderung der Tagesproduktion durch Hypericum und der absoluten 24h-Produktion unter Kontrollbedingungen gilt das gleiche: Die absolute Änderung der Tagesproduktion zeigt eine Abhängigkeit von dem Niveau der Kontroll-Tagesproduktion (Abb. 10 rechts; $r=0.74$; $p=0.0012$).

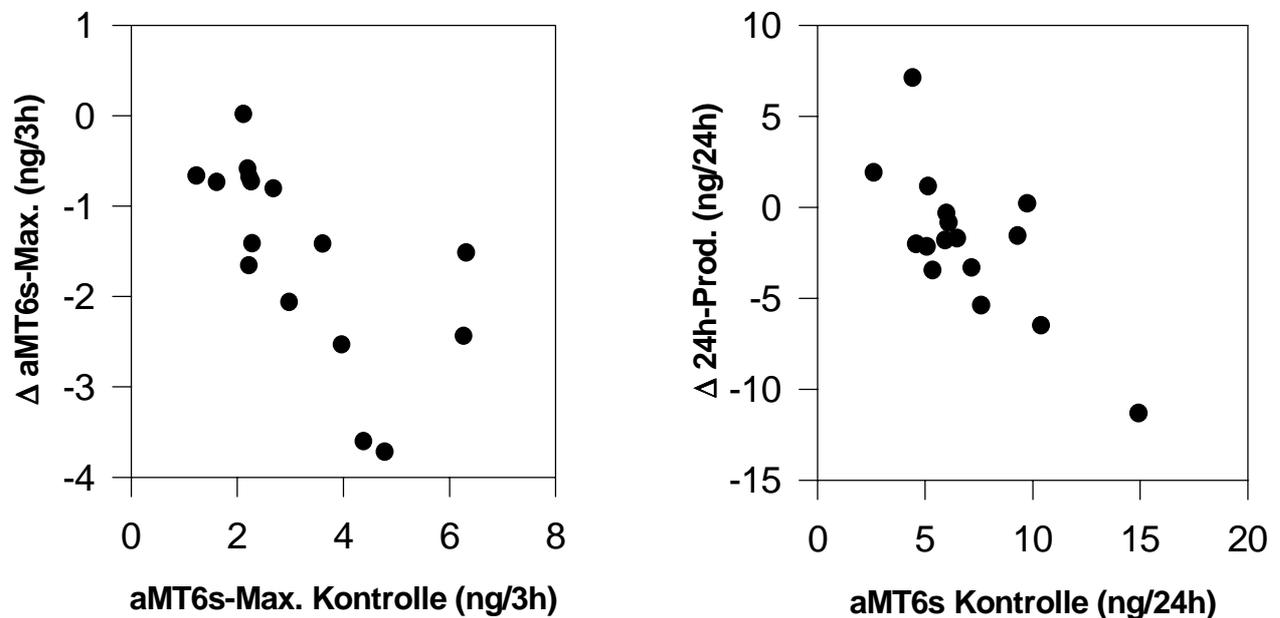


Abb. 10: Änderung des aMT6s-Maximums nach 3 Tagen Hypericum-Fütterung in Abhängigkeit vom aMT6s-Maximum unter Fütterung von Kontrolldiät (links; $n=16$; $r=0.660$; $p=0.0054$) und Änderung der aMT6s-Tagesproduktion nach dreitägiger Johanniskraut-Behandlung in Abhängigkeit von der aMT6s-Tagesproduktion unter Fütterung von Kontrollfutter (rechts; $n=16$; $r=0.735$; $p=0.0012$).

3.1.3 Zeitverlauf der Johanniskraut-Wirkung

Nachdem der Effekt einer 3-tägigen HTE-Fütterung auf das aMT6s-Tagesprofil, die aMT6s-Maxima und der aMT6s-Tagesproduktion eingehend analysiert waren, sollte nun der zeitliche Verlauf der Hypericum-Wirkung über mehrere Wochen verfolgt werden.

Betrachtet man sich den Verlauf der Hypericum-Wirkung über einen längeren Zeitraum, so kann man erkennen, daß das Maximum der nächtlichen aMT6s-Ausscheidung innerhalb der ersten Tage der Johanniskraut-Behandlung kontinuierlich abnahm (Abb. 11). Ab dem 3. Tag der Hypericum-Fütterung war das Maximum der Männchen und Weibchen signifikant niedriger als das Kontrollmaximum. Nach 6 Tagen betrug das aMT6s-Maximum bei männlichen Zwerghamstern nur noch $46.42 \pm 6.71\%$ des Maximums unter Kontrollfütterung; das Maximum der Weibchen sank in 5 Tagen auf nur $21.11 \pm 12.48\%$ des Kontrollniveaus.

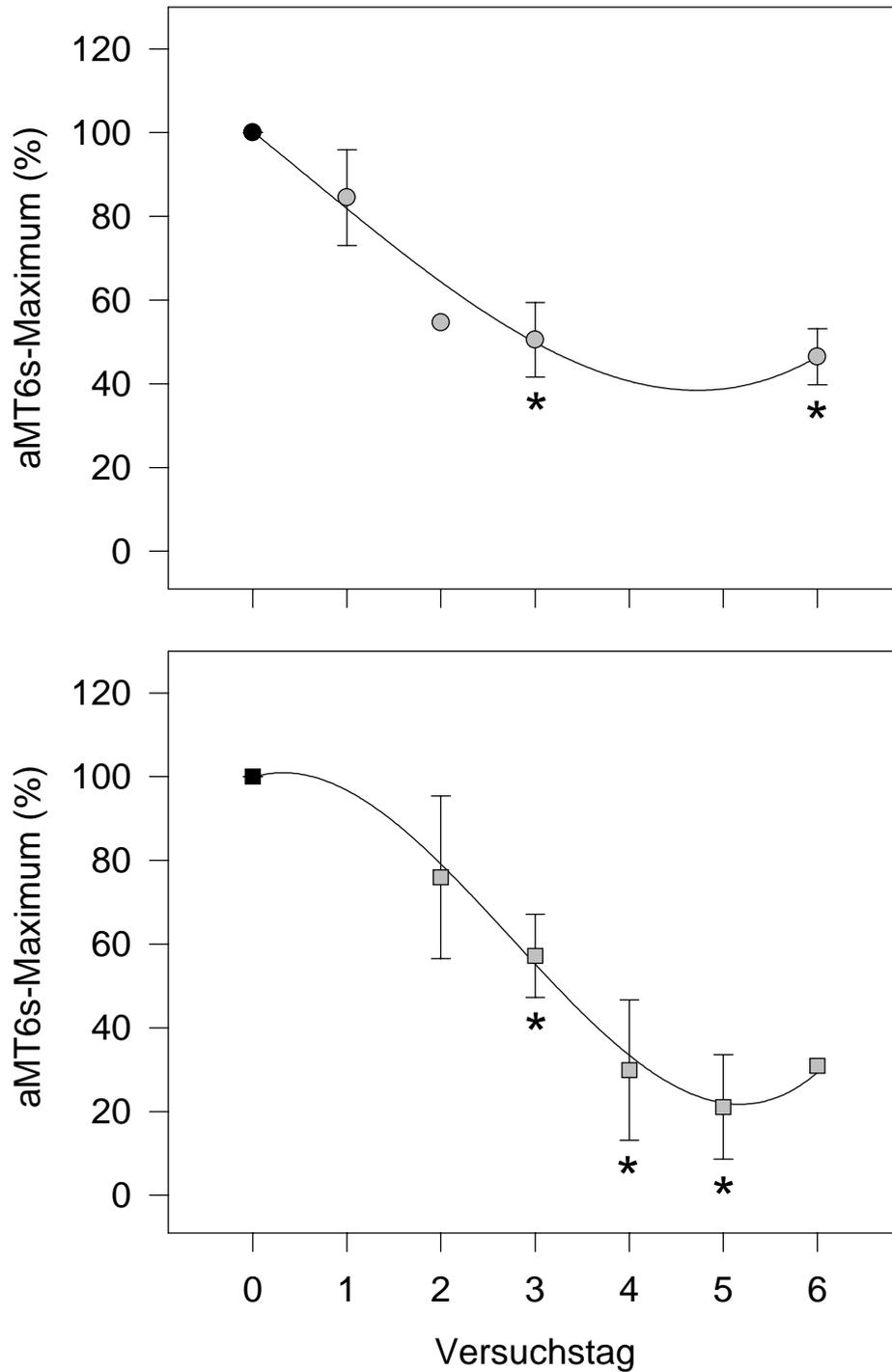


Abb. 11: Relative Änderung des aMT6s-Maximums während der ersten 6 Tage der Johanniskraut-Fütterung. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM; in der oberen Abbildung von männlichen und in der unteren von weiblichen Zwerghamstern (zur Anzahl der Versuchstiere siehe Tab. 3). * $p < 0.05$; einfaktorische ANOVA.

Nach dieser anfänglich so deutlichen Reduktion der aMT6s-Exkretion stieg das Maximum jedoch nach einer Woche Johanniskraut-Fütterung sowohl bei den Männchen als auch bei den Weibchen wieder an (Abb. 12). Männliche Hamster erreichten nach 18-tägiger Behandlung Werte, die nahe an den Ausgangswerten unter Kontrollbedingungen lagen; das aMT6s-Maximum weiblicher Hamster lag bereits nach 15 Tagen sogar leicht über dem Kontrollniveau.

Im Anschluß daran konnte aber bei männlichen und weiblichen Zwerghamstern erneut eine Abnahme im aMT6s-Maximum festgestellt werden. Der Maximalwert der aMT6s-Exkretion betrug bei den Weibchen nach 21 Tagen Hypericum-Behandlung im Mittel 63.14%, bei Männchen nach 34 Tagen 30.67% des Kontrollmaximums.

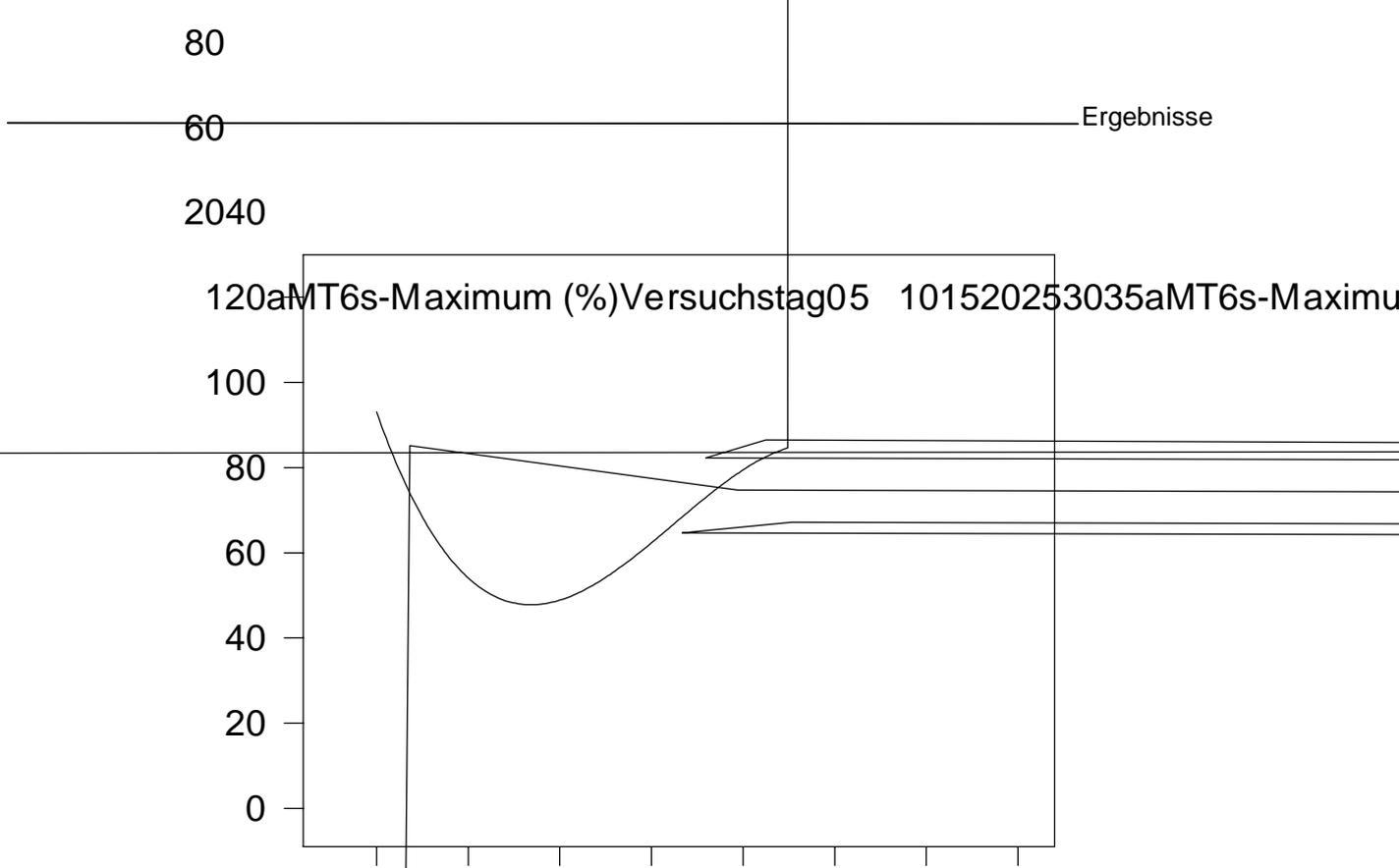


Abb. 12: Relative Änderung des aMT6s-Maximums im Verlauf der Johanniskraut-Fütterung über mehrere Wochen. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM der Männchen (oben) und der Weibchen (unten); zur Anzahl der Versuchstiere siehe Tab. 3. Angewandte Statistik siehe Abb. 11.

Die Hypericum-Wirkung auf die 24h-Produktion von aMT6s zeigt einen ähnlichen Zeitverlauf (Abb. 13). Allerdings war bei männlichen Hamstern am ersten Tag der HTE-Fütterung zunächst eine Zunahme der aMT6s-Tagesproduktion zu erkennen, bevor sie an den folgenden Tagen unter das Kontrollniveau abfiel. Signifikant reduziert wurde die aMT6s-Tagesproduktion aber nur bei den Weibchen nach 3, 4 und 5 Tagen der Johanniskraut-Fütterung ($p < 0.05$). Auch die 24h-Produktion von aMT6s stieg nach der anfänglichen Reduktion während der 2. Woche der Hypericum-Fütterung zunächst wieder an, bevor sie im Anschluß daran erneut absank, wie dies bereits für den Zeitverlauf des aMT6s-Maximums beschrieben wurde. Die aMT6s-Tagesproduktion lag bei den Weibchen am 21. Tag der Johanniskraut-Wirkung wieder signifikant unter dem Kontrollwert ($p < 0.05$).

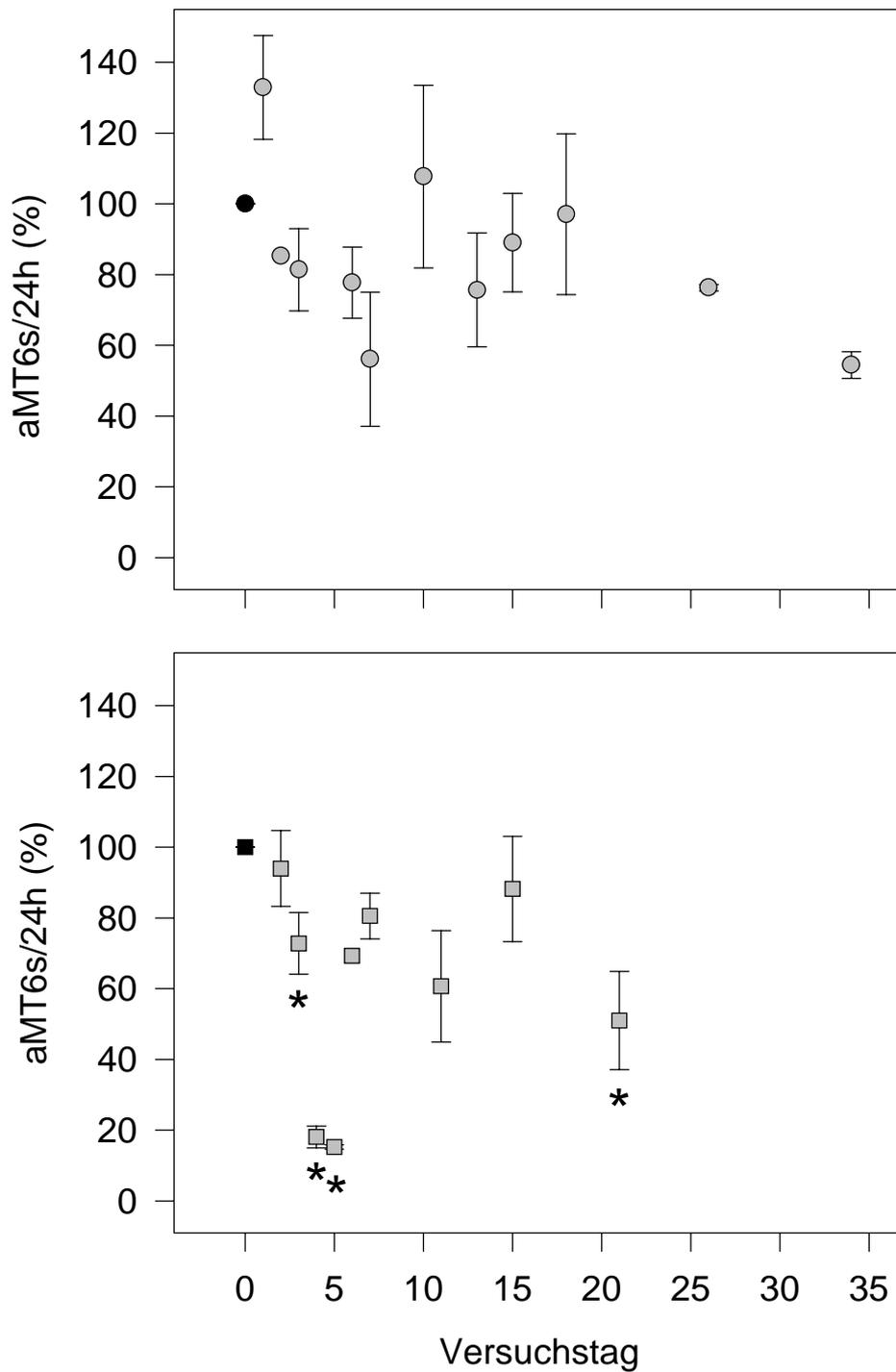


Abb. 13: Relative Änderung der aMT6s-Tagesproduktion der Männchen (obere Abbildung) und der Weibchen (untere Abbildung) im Zeitverlauf der Hypericum-Fütterung. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM; zur Anzahl der Versuchstiere siehe Tab. 3. * $p < 0.05$; einfaktorielle ANOVA.

Tab. 3: Anzahl der Meßpunkte, aus denen sich die einzelnen Mittelwerte \pm SEM der Abb. 11, 12 und 13 zusammensetzen.

Männchen

Versuchstag	Abb. 11/12	Abb. 13
0	8	8
1	3	3
2	1	1
3	8	8
6	4	4
7	5	5
10	3	3
13	5	5
15	2	3
18	5	5
26	1	3
34	1	3

Weibchen

Versuchstag	Abb. 11/12	Abb. 13
0	8	8
2	3	3
4	2	2
5	2	2
6	1	0
7	4	4
11	3	3
13	5	5
15	3	3
21	3	3

3.1.4 Dosisabhängigkeit der Johanniskraut-Wirkung

Die bisher vorgestellten Ergebnisse dokumentieren eine klare Wirkung von Hypericum auf die aMT6s-Exkretion Dsungarischer Zwerghamster. Im folgenden Experiment wurde der Frage nachgegangen, ob diese Wirkung abhängig ist von der verabreichten Johanniskraut-Dosierung.

Bereits die 7-tägige Fütterung der niedrigsten HTE-Dosis von 1.5 mg/Tag verursachte eine beachtliche Erniedrigung des aMT6s-Maximums (Abb. 14), die nur knapp die Signifikanzschwelle verfehlte ($p=0.056$). Hypericum-Dosierungen von 3, 6 und 10 mg/Tag führten zu einer signifikanten Erniedrigung des aMT6s-Maximums gegenüber den Kontroll-Maxima ($p<0.05$). Die Änderung der 24h-Produktion von aMT6s nach Johanniskraut-Fütterung ist für alle verwendeten Dosierungen signifikant (Abb.14).

Tab. 4: Gruppengröße und Signifikanzniveaus der Experimente zur Dosisabhängigkeit der Hypericum-Wirkung.

	1.5 mg	3.0 mg	6.0 mg	10.0 mg
Gruppengröße	n = 7	n = 16	n = 11	n = 6
Maximum	p = 0.056	p < 0.001	p = 0.018	p < 0.001
24h-Prod.	p = 0.004	p < 0.001	p = 0.006	p < 0.001

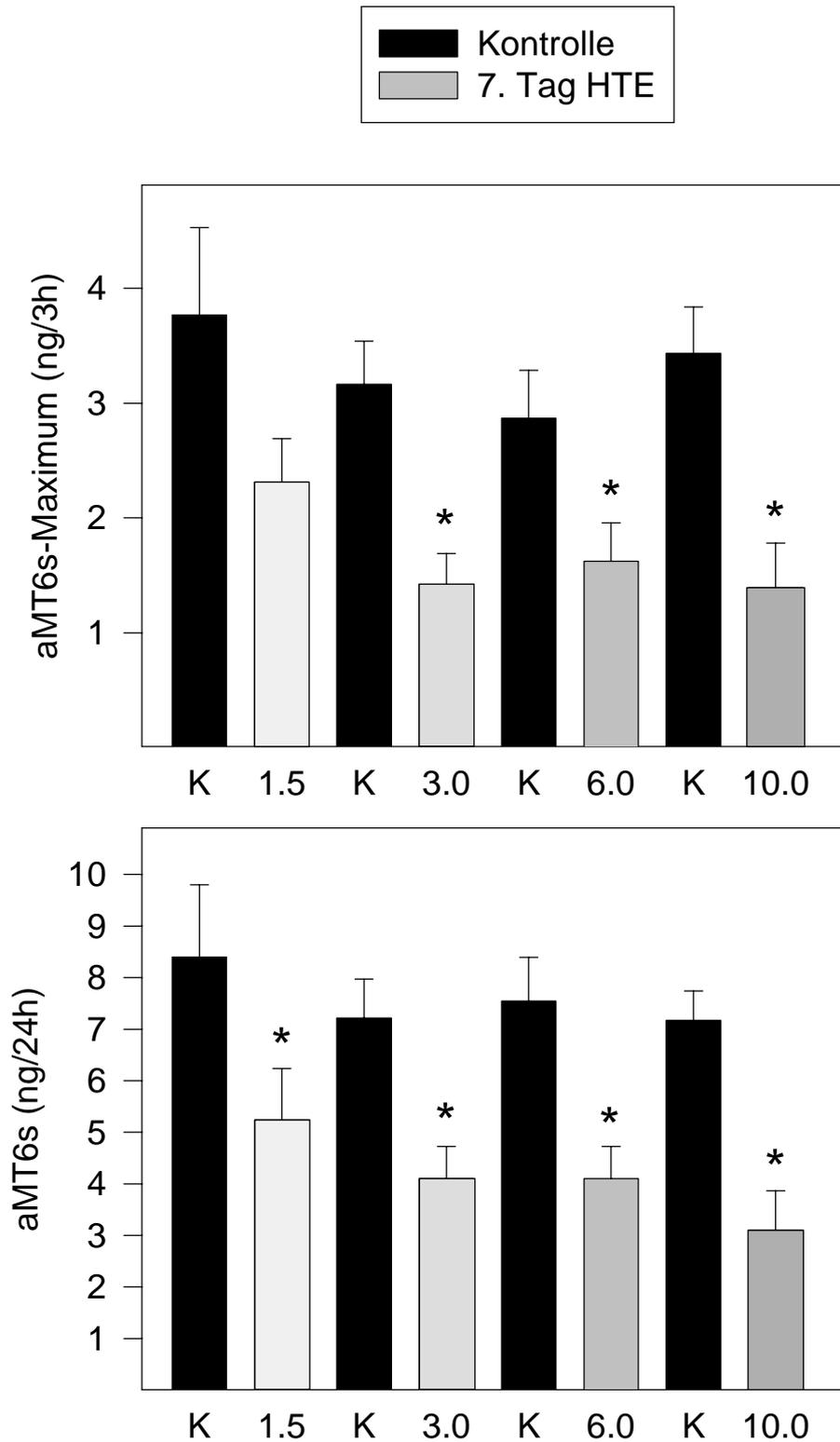


Abb. 14: Wirkung von Johanniskraut auf das aMT6s-Maximum (oben) und die 24h-Produktion (unten) in Abhängigkeit von der HTE-Dosierung. Die schwarzen Balken zeigen die jeweiligen Kontrollmittelwerte \pm SEM, die grauen Balken die entsprechenden Werte nach einer Woche HTE-Fütterung der jeweiligen Dosierung; * $p < 0.05$, Student-t-Test für Paardifferenzen. Zur Anzahl der Versuchstiere siehe Tab. 4.

Vor allem die Erniedrigung der Tagesproduktion von aMT6s durch Hypericum zeigt eine deutliche Dosisabhängigkeit (Abb.15, unten). Während die Tagesproduktion von Hamstern, die 1.5 mg HTE pro Tag erhielten, nur um $37.5\pm 7.9\%$ reduziert wurde, sank die 24h-Produktion von Zwerghamstern, die mit 10 mg HTE pro Tag gefüttert wurden, um $58.9\pm 7.4\%$. Zwischen den Dosierungen von 3 mg und 6 mg ergab sich allerdings keinerlei Unterschied in der HTE-Wirkung auf die aMT6s-Tagesproduktion; sie wurde jeweils um 41.6% gesenkt. Bei der Betrachtung der Hypericum-Wirkung auf das aMT6s-Maximum (Abb. 15, oben) fällt auf, daß auch hier die deutlichste Absenkung, nämlich $62.3\pm 6.8\%$, durch die höchste Johanniskraut-Dosis von 10.0 mg hervorgerufen wurde, wohingegen die Fütterung von 3.0 mg und 1.5 mg das Maximum in geringerem Ausmaß reduzierte. Die Verabreichung von 3 mg HTE pro Tag führte zu einem um $50.4\pm 8.2\%$ niedrigeren aMT6s-Maximum; eine Dosis von 1.5 mg reduzierte das Maximum um $32.0\pm 11.5\%$. Dagegen bewirkte die Fütterung mit 6.0 mg HTE eine Senkung um $37.6\pm 10.5\%$, die zwar damit etwas stärker ausfiel als die durch die 1.5 mg-Dosis, jedoch war diese Erniedrigung wiederum geringer als die durch die 3 mg-Dosis.

Die absoluten Einzelwerte des aMT6s-Gehaltes im Urin Dsungarischer Zwerghamster in Abhängigkeit von der verabreichten HTE-Dosis zeigten einen statistisch hochsignifikanten Zusammenhang zwischen dem aMT6s-Gehalt im Urin und der verabreichten Dosis an HTE (Abb. 16), und zwar sowohl für die Änderung des Maximums ($R=-0.563$; $p<0.001$), als auch für die Änderung der Tagesproduktion ($R=-0.588$; $p<0.001$).

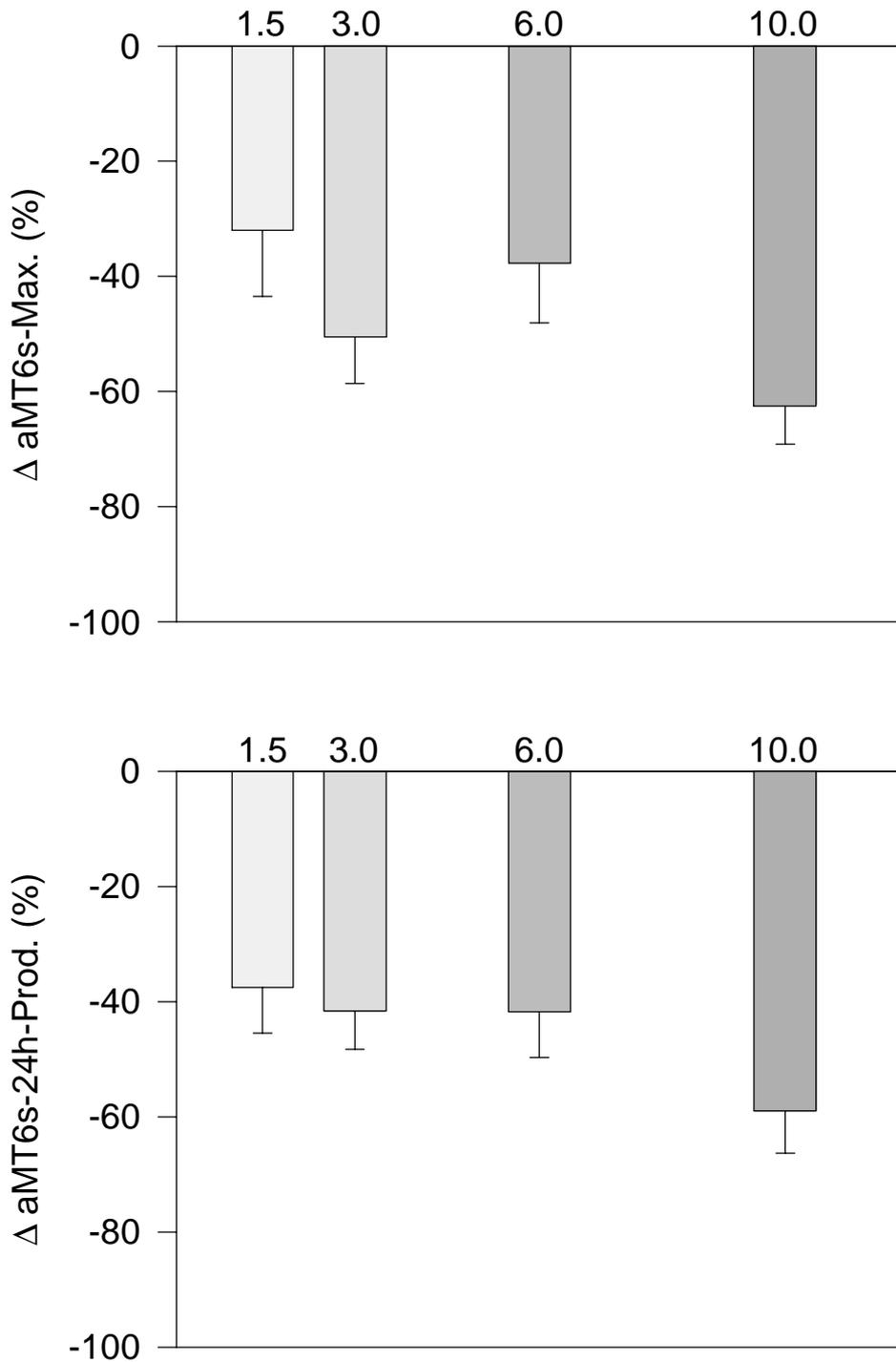


Abb. 15: Relative Änderung des aMT6s-Maximums (oben) und der 24h-Produktion (unten) nach einer Woche HTE-Fütterung gegenüber dem Kontrollrhythmus in Abhängigkeit von der Hypericum-Dosis; dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM. Zur Anzahl der Versuchstiere siehe Tab. 4.

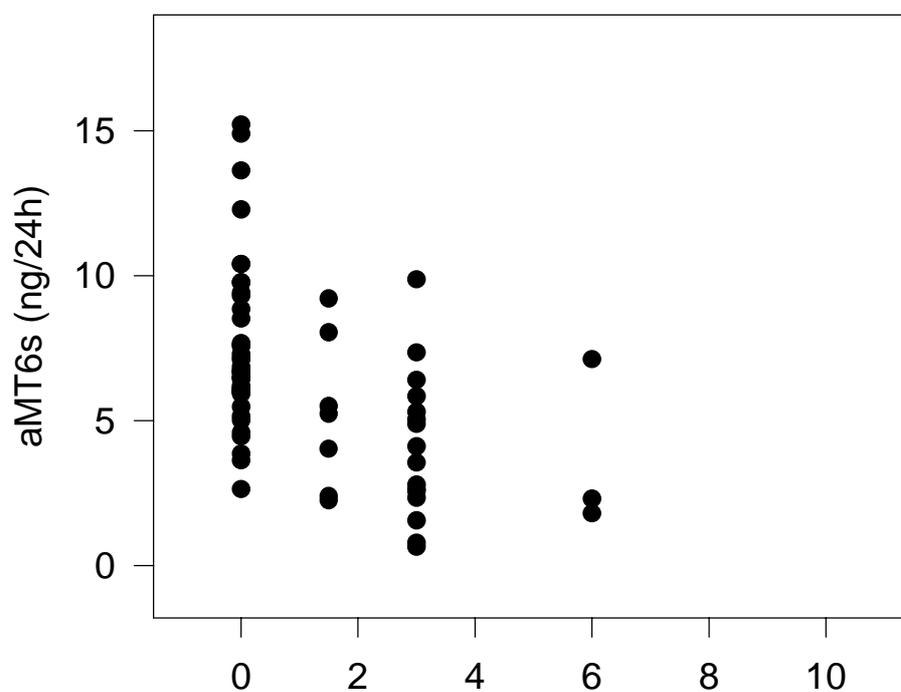


Abb. 16: aMT6s-Maximum (oben; $R=-0.563$; $p<0.001$) und aMT6s-Tagesproduktion (unten; $R=0.588$; $p<0.001$) in Abhängigkeit von der HTE-Dosis. Zur Anzahl der Versuchstiere siehe Tab. 4.

3.1.5 Unwirksamer Johanniskraut-Extrakt

Außer dem in den bisher gezeigten Studien verwendeten Extrakt wurde eine weitere Charge von Hypericum-Trockenextrakt eingesetzt (siehe Tab. 1), die sich jedoch als unwirksam erwies. Der Extrakt zeigte bei einer Dosierung von 10 mg/Tag pro Hamster weder nach 3, noch nach 5 Tagen HTE-Fütterung einen Effekt auf die aMT6s-Exkretion (Abb. 17), obwohl er sich in der Herstellungsweise nicht von dem wirksamen Extrakt unterschied. Auch die Futterzubereitung und alle anderen Versuchsbedingungen wurden nicht verändert.

Abb. 17: Tagesprofile der aMT6s-Exkretion unter Fütterung von Kontrolldiät (schwarze Kreise), nach 3-tägiger (graue Vierecke) und nach 6-tägiger HTE-Fütterung (graue 1

3.1.6 Einfluß von Johanniskraut auf die Melatonin-Synthese

In den vorangegangenen Versuchen wurde der Einfluß von Hypericum auf das Hauptabbauprodukt des Melatonins untersucht. Nun stellt sich aber die Frage, ob durch HTE-Fütterung nicht nur das Abbauprodukt von Melatonin, sondern auch Melatonin selbst bzw. die Melatonin-Synthese beeinflusst wird. Zur Klärung dieser Frage wurde zum einen die Aktivität des Schlüsselenzyms der Melatonin-Synthese, der N-Acetyltransferase, und zum anderen der Melatonin-Gehalt des Blutplasmas von unbehandelten und mit Johanniskraut gefütterten Zwerghamstern verglichen.

3.1.6.1 Einfluß von Johanniskraut auf die NAT-Aktivität

Es ergaben sich keine wesentlichen Unterschiede in der NAT-Aktivität zwischen der Kontrollgruppe und den mit Hypericum behandelten Hamstern (Abb. 18). Es hat zwar den Anschein, als ob die NAT-Aktivität der HTE-Gruppe leicht höher liegt als die der Kontrollen, dieser Effekt ist allerdings statistisch nicht signifikant ($p=0.112$).

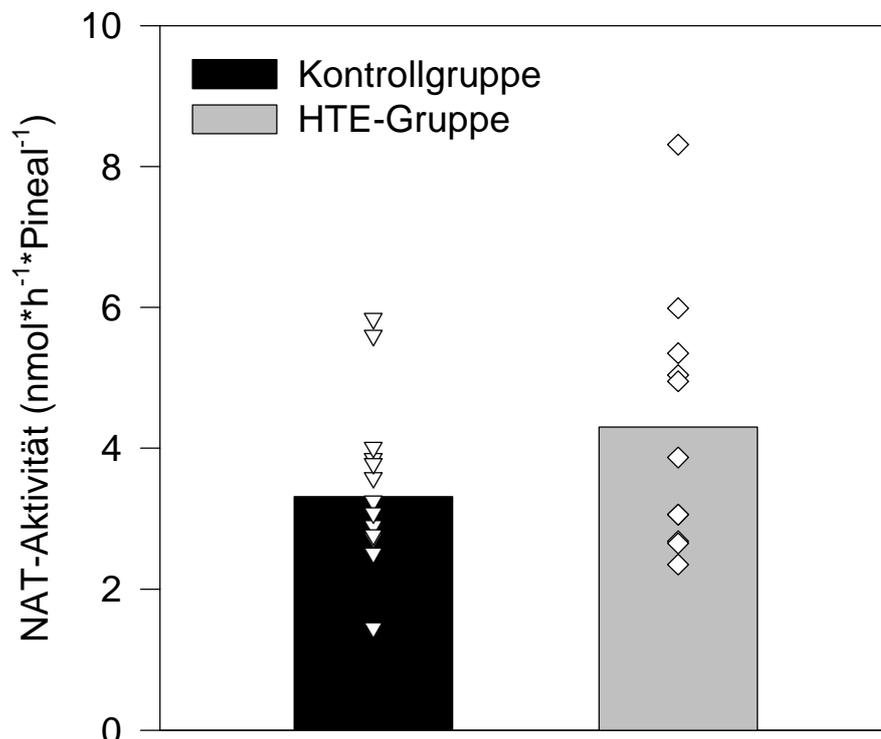


Abb. 18: Dargestellt ist der Vergleich der Mittelwerte der NAT-Aktivität zwischen der Kontrollgruppe (schwarzer Balken; $n=15$) und der für 7 Tage mit Johanniskraut gefütterten Gruppe (grauer Balken; $n=11$). Die Symbole zeigen die jeweiligen Einzelwerte, aus denen sich der entsprechende Mittelwert zusammensetzt. Es ergab sich kein signifikanter Unterschied ($p=0.112$; Student-t-Test).

Obwohl Hypericum also keinen Effekt auf die NAT-Aktivität zeigt, die aMT6s-Exkretion jedoch stark erniedrigt, stellt sich die Frage nach einem möglichen Zusammenhang beider Parameter. Da beide Größen aber nicht gleichzeitig erfaßt werden können, lassen sie sich nur indirekt in Beziehung setzen. Dazu wurden aMT6s-Tagesprofile der Hamster am Tag vor der Tötung aufgenommen und die Maxima dieser aMT6s-Tagesrhythmen in Abhängigkeit von der in der darauffolgenden Nacht gemessenen NAT-Aktivität jedes Hamsters dargestellt. In Anbetracht der sehr geringen Tag-zu-Tag-Variabilität der individuellen aMT6s-Exkretion erschien dies jedoch durchaus vertretbar.

In Abb. 19 ist dieser Zusammenhang für alle im Rahmen dieser Studien untersuchten Zwerghamster unter Fütterung von Kontrolldiät zu sehen, also ohne Einfluß von Johanniskraut (schwarze Symbole). Die weißen Symbole dagegen zeigen denselben Zusammenhang für Hamster, die mit einem Hypericum-Trockenextrakt gefüttert wurden, der sich als unwirksam erwies. Wie man deutlich erkennen kann, korrelieren beide Parameter; hinsichtlich dieses Zusammenhangs gibt es aber keinen prägnanten Unterschied zwischen den Kontrolltieren (Steigung der Regression: 0.9456) und den mit dem unwirksamen HTE gefütterten Zwerghamstern (Steigung der Regression: 1.1190).

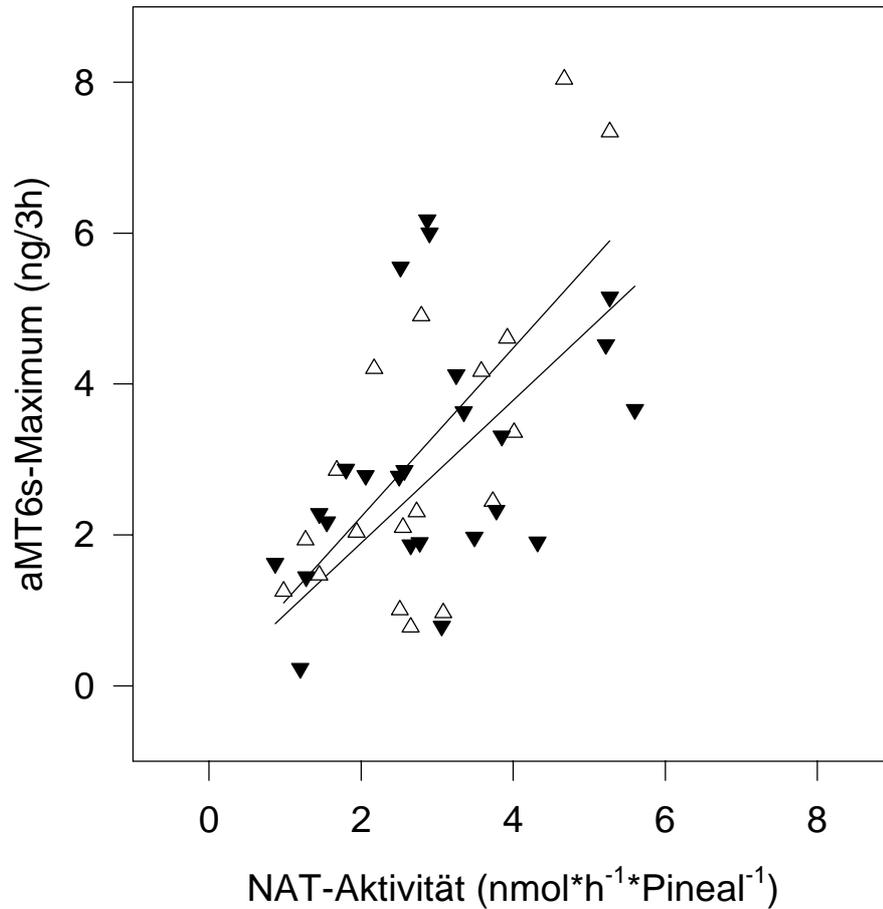


Abb. 19: Zusammenhang zwischen dem Maximum der aMT6s-Exkretion und der NAT-Aktivität Dsungarischer Zwerghamster unter Kontrollbedingungen (schwarze Symbole; n=24; r=0.428; p=0.037) und nach 7-tägiger Fütterung mit einem unwirksamen HTE (Chargen-Nr. 99865; weiße Symbole; n=18; r=0.717; p<0.001).

Die Frage war nun, wie dieser Zusammenhang unter Fütterung eines wirksamen Hypericum-Extraktes aussieht. Abb. 20 zeigt diese Beziehung für die bereits in Abb. 19 gezeigten Kontrolltiere im Vergleich zu den mit wirksamem HTE gefütterten Hamstern, deren NAT-Aktivität in Abb. 18 dargestellt wurde.

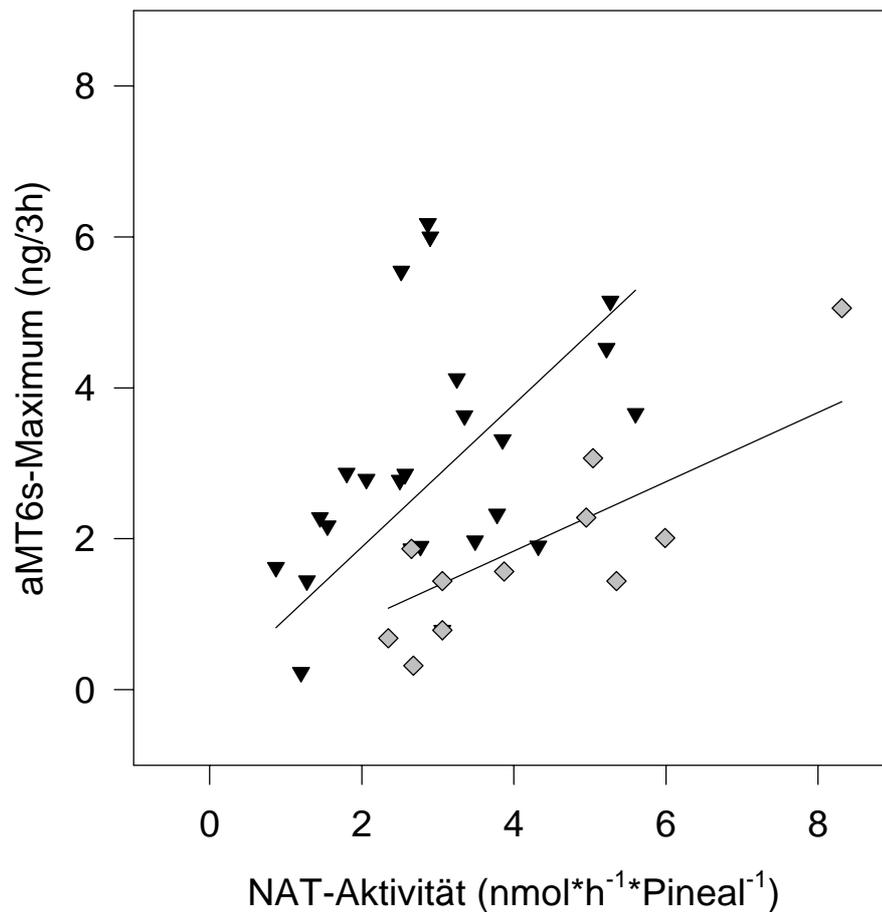


Abb. 20: Abhängigkeit des aMT6s-Maximums von der in der folgenden Nacht bestimmten NAT-Aktivität der Kontrollgruppe (schwarze Symbole; $n=24$; $r=0.428$; $p=0.037$) und der HTE-Gruppe nach 7-tägiger Johanniskraut-Fütterung (Chargen-Nr. 98070818; graue Symbole; $n=11$; $r=0.857$; $p<0.001$).

Diese beiden Gruppen unterscheiden sich bezüglich der Beziehung zwischen dem aMT6s-Maximum und der NAT-Aktivität. Die NAT-Aktivität streute nach einer Woche Johanniskraut-Fütterung zwar in demselben Maße wie ohne die Wirkung des Pflanzenextraktes, allerdings liegen die entsprechenden aMT6s-Maxima der HTE-Gruppe niedriger als die der Kontrollgruppe. Die Regression, die die Abhängigkeit dieser beiden Parameter beschreibt, kennzeichnet sich innerhalb der mit Johanniskraut behandelten Hamster durch eine geringere Steigung (0.4593) als die vergleichbare Regression der Kontrolltiere (0.9456). Daraus folgt, daß das aMT6s-Maximum auch unter Johanniskraut-Fütterung mit der NAT-Aktivität korreliert, daß aber der NAT-Aktivität bei Hamstern unter Hypericum-Einwirkung ein niedrigeres Maximum der aMT6s-Exkretion entspricht als bei unbehandelten Zwerghamstern. Anders gesagt, weisen die mit HTE behandelten Hamster bei vergleichbarem aMT6s-Maximum eine höhere NAT-Aktivität auf als Kontrolltiere.

3.1.6.2 Einfluß von Johanniskraut auf die Melatonin-Konzentration im Plasma

Hamster, die über einen Zeitraum von 7 Tagen mit Hypericum gefüttert wurden, zeigten eine signifikant niedrigere Plasma-Melatonin-Konzentration als Tiere, die mit Kontrollfutter gefüttert wurden (Abb. 21; $p=0.0166$). Die Kontrollgruppe erreichte im Mittel einen Melatonin-Gehalt von 40.17 ± 4.3 pg pro ml Blutplasma, dagegen betrug die Melatonin-Konzentration der HTE-Gruppe nur durchschnittlich 28.00 ± 1.2 pg/ml Plasma. Durch die Wirkung von Johanniskraut wurde also nicht nur die nächtliche aMT6s-Exkretion, sondern auch der Melatonin-Spiegel im Plasma Dsungarischer Zwerghamster drastisch reduziert.

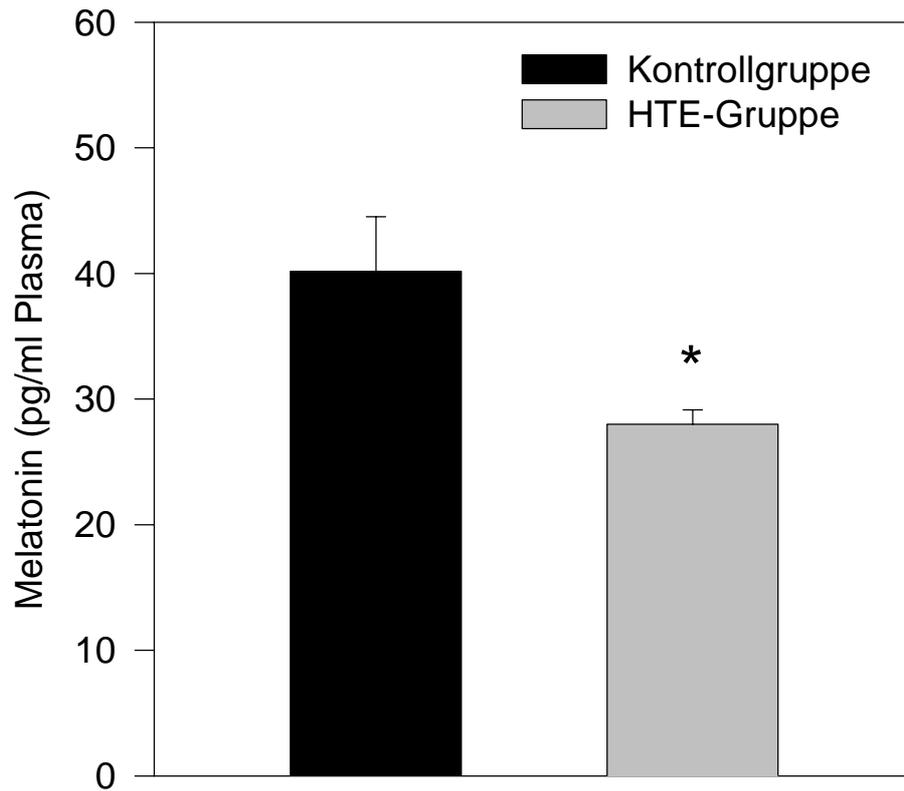


Abb. 21: Melatonin-Gehalt im Plasma von Zwerghamstern unter Fütterung von Kontrollfutter (schwarzer Balken; n=12) und der HTE-Gruppe nach 7-tägiger Hypericum-Fütterung (grauer Balken; n=11). Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM; $p=0.0166$, Student-t-Test.

Entsprechend der Erwartung zeigt sich eine signifikante Korrelation zwischen der aMT6s-24h-Produktion und der Plasma-Melatonin-Konzentration in der darauffolgenden Nacht (Abb. 22).

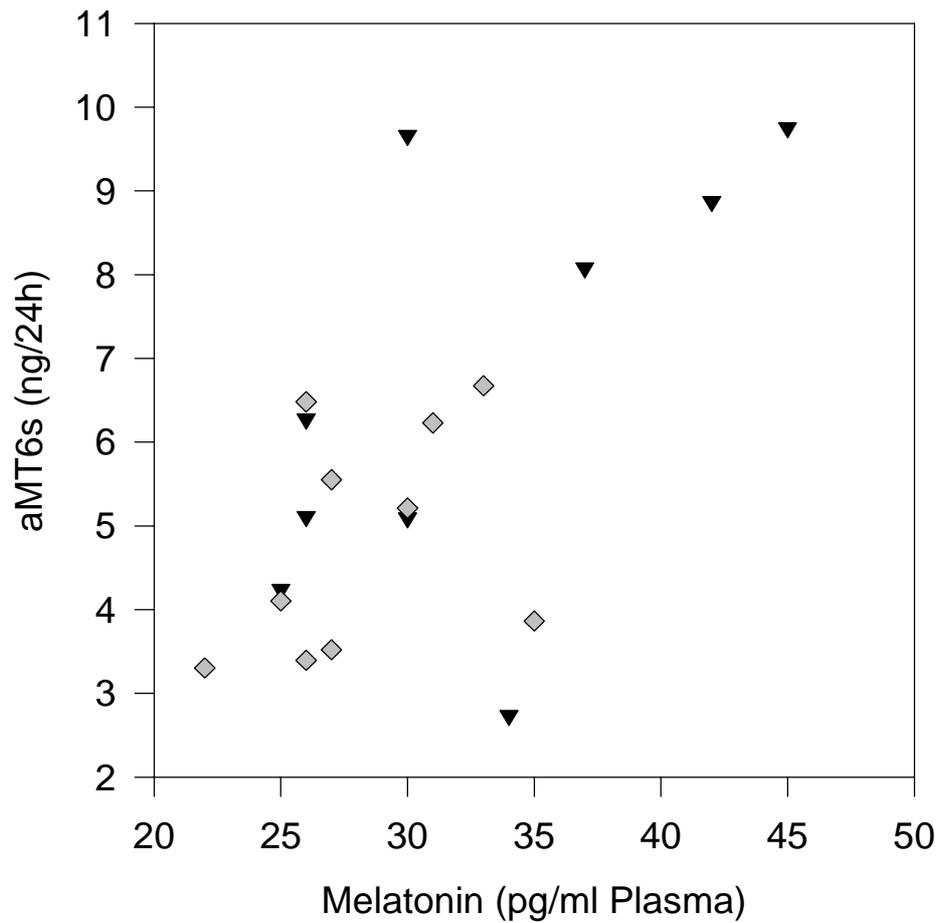


Abb. 22: Zusammenhang zwischen der aMT6s-24h-Produktion und der Plasma-Melatonin-Konzentration der Kontrollgruppe (schwarze Symbole) und der HTE-Gruppe (graue Symbole). Es ergab sich eine signifikante Korrelation ($n=19$, $r=0.614$; $p=0.0052$).

Wenn man sich dagegen den Zusammenhang zwischen der Plasma-Melatonin-Konzentration und der NAT-Aktivität betrachtet (Abb. 23), korrelieren diese Parameter nur unter Kontrollbedingungen ($p=0.00174$), nicht jedoch unter HTE-Fütterung ($p=0.172$).

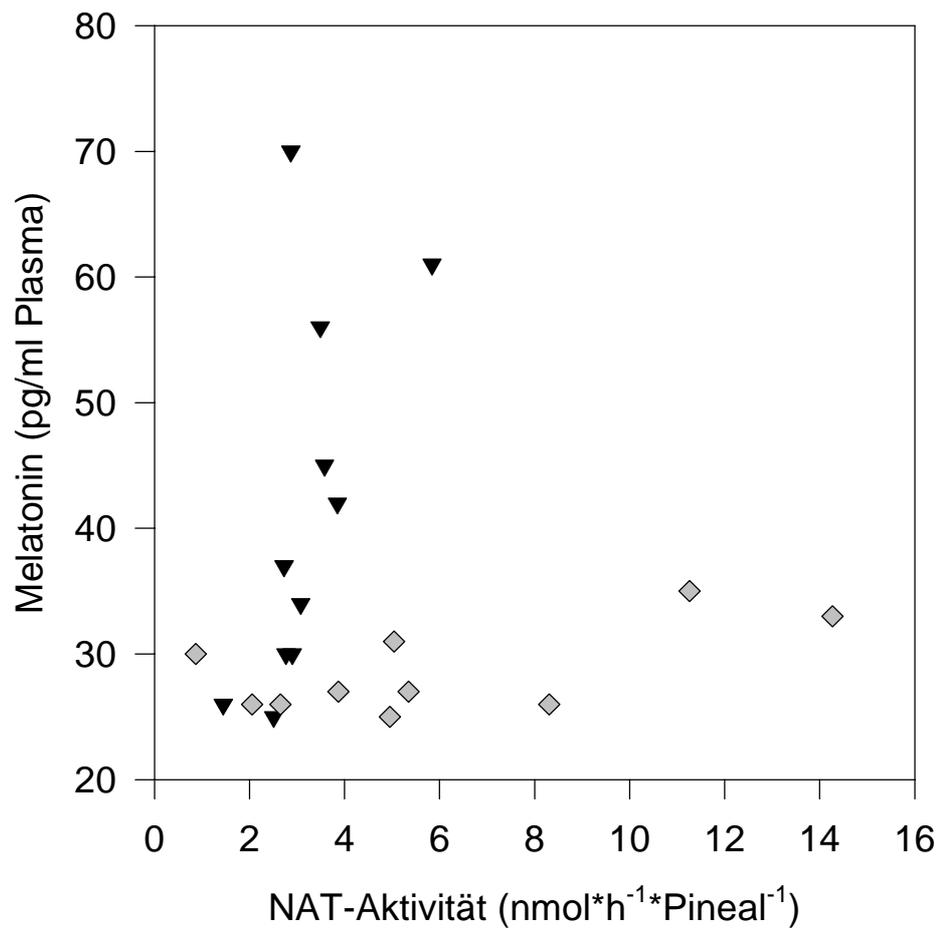


Abb. 23: Zusammenhang zwischen dem Plasma-Melatonin-Spiegel und der NAT-Aktivität Dsungarischer Zwerghamster unter Fütterung von Kontrolldiät (schwarze Symbole; $n=10$; $r=0.852$; $p=0.00174$) und unter HTE-Fütterung (graue Symbole; $n=10$; $R=0.455$; $p=0.172$).

3.2 Wirkung von Johanniskraut im Kurztag

Die Johanniskraut-Wirkung auf die Melatonin-Tagesperiodik konnte bei im Langtag gehaltenen Hamstern eindeutig nachgewiesen werden. Das Ziel des hier vorgestellten Experimentes war die Beantwortung der Frage, ob sich Hypericum auch bei unter kurzer Photoperiode gehaltenen Hamstern auf das aMT6s-Tagesprofil auswirkt.

3.2.1 Wirkung von Johanniskraut auf Futteraufnahme und Körpergewicht

Auch bei kurztag-adaptierten Zwerghamstern wirkte sich Hypericum weder auf die Futteraufnahme, noch auf das Körpergewicht aus (Tab. 5). Das Körpergewicht der Männchen lag bei 26.45 g unter Kontrollfütterung und während der dreitägigen HTE-Fütterung bei 26.32 g. Bei den Weibchen war nach der Futterumstellung nur eine leichte Körpergewichtsabnahme (etwa 1 g) festzustellen, und zwar von 27.18 g unter Kontrollbedingungen auf 26.22 g nach HTE-Fütterung. Die tägliche Futteraufnahme der Männchen lag durchschnittlich bei 2.4 ± 0.21 g während der Hypericum-Fütterung; sie nahmen damit 2.0 ± 0.17 mg HTE auf. Die Weibchen hatten einen Futtermittelverbrauch von 2.17 ± 0.29 g pro Tag und nahmen somit im Mittel 1.81 ± 0.24 mg HTE zu sich.

Tab. 5: Körpergewicht, Futteraufnahme und HTE-Dosis von männlichen (n=6) und weiblichen (n=6) Zwerghamstern im Kurztag. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM der letzten 3 Tage der Kontrollfütterung (schwarze Balken) und der 3-tägigen HTE-Fütterung (graue Balken). Es ergaben sich keine signifikanten Unterschiede (Student-t-Test für Paardifferenzen).

	Körpergewicht		Futteraufnahme		HTE-Dosis	
	Männchen	Weibchen	Männchen	Weibchen	Männchen	Weibchen
Kontrolle	26.45 \pm 1.13	27.18 \pm 2.31	2.52 \pm 0.19	2.51 \pm 0.26	-	-
HTE-Fütterung	26.32 \pm 1.95	26.22 \pm 2.20	2.40 \pm 0.21	2.17 \pm 0.29	2.00 \pm 0.17	1.81 \pm 0.24

3.2.2 Wirkung von Johanniskraut auf die aMT6s-Exkretion

Auch in der Gruppe kurztagadaptierter Zwerghamster gab es - wie bereits für die Langtaghamster beschrieben - individuell große Unterschiede im Verlauf des aMT6s-Tagesrhythmus unter Fütterung von Kontrollfutter, während verschiedene Tagesprofile eines Einzeltieres sehr konstant blieben.

Die Tagesprofile von Tier #8 und Tier #10 erreichen nur verhältnismäßig niedrige Spitzenwerte im Vergleich zu anderen Kurztagtieren (Abb. 24). Der zweigipflige Verlauf der Tagesprofile von Tier #3, Tier #6 und Tier #8 wurde bei im Kurztag gehaltenen Hamstern mehrfach beobachtet.

Tier #3, Tier #5 und Tier #6 zeigen alle eine Erniedrigung der aMT6s-Exkretion um 23.00 Uhr durch Johanniskraut, wie sie auch in der Darstellung der Mittelwerte in Abb. 25 zum Ausdruck kommt. Bei Tier #7 lässt sich durch Hypericum-Wirkung eine Verzögerung des Anstiegs der aMT6s-Exkretion und damit auch eine Verschiebung des Maximums um 3 h nach hinten beobachten, wie dies auch vereinzelt bei im Langtag gehaltenen Zwerghamstern festzustellen war (vgl. Abb. 6).

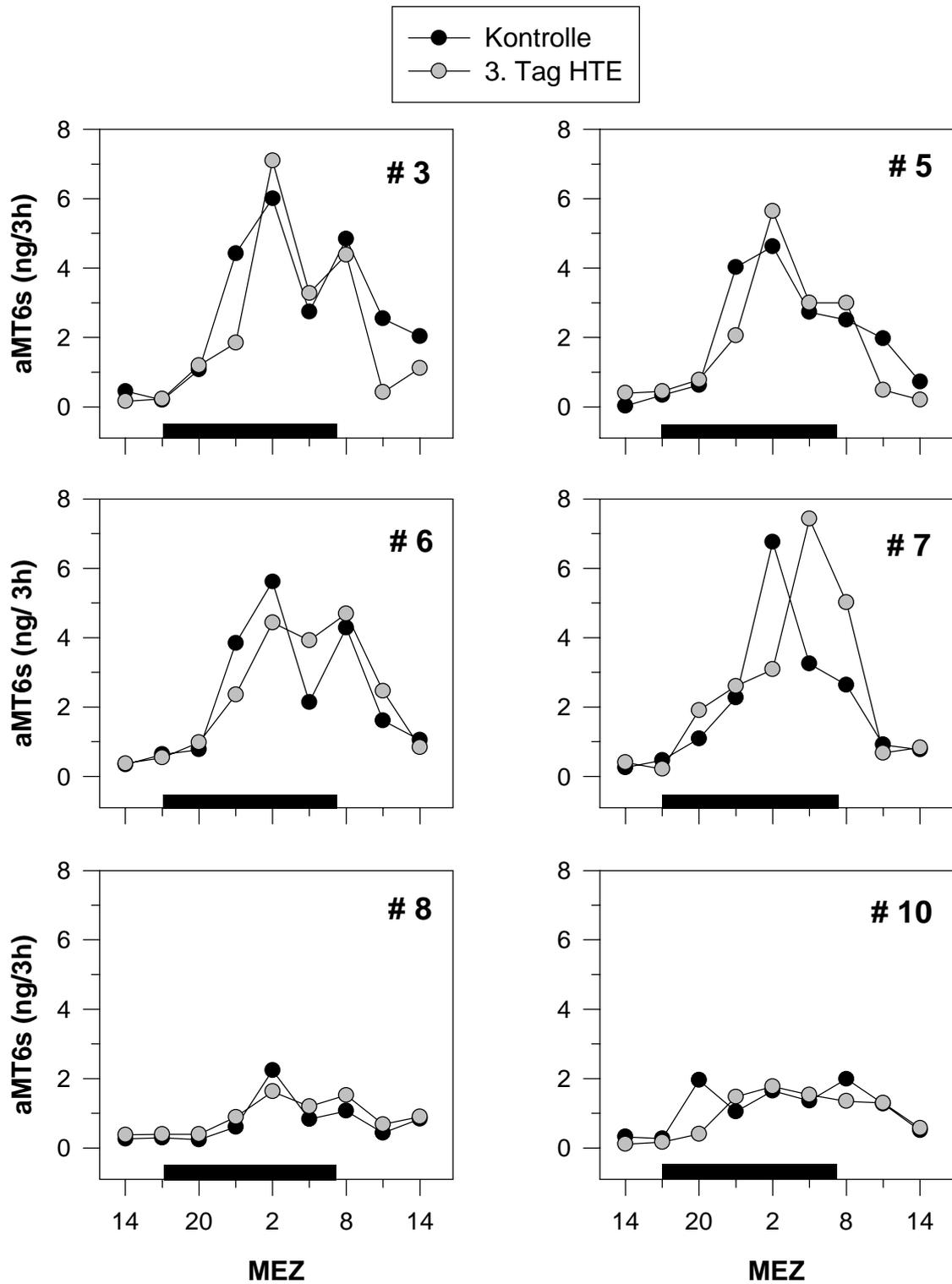


Abb. 24: Exemplarische Darstellung individueller aMT6s-Profile vor (schwarze Symbole) und nach 3-tägiger Hypericum-Wirkung (graue Symbole) im Kurztag von 6 Einzeltieren. Die schwarzen Balken auf der x-Achse markieren die Dunkelfase.

Kurztagadaptierte Zwerghamster zeigten unter Kontrollfütterung, wie auch die zuvor beschriebenen Langtagtiere, eine ausgeprägte Tagesrhythmik in der aMT6s-Ausscheidung (Abb. 25), allerdings mit wesentlich höheren nächtlichen Maximalwerten. Während die langtagadaptierten Hamster durchschnittliche Maxima von 3.2 ng/3h (siehe Abb. 8) erreichten, kamen Kurztagtiere auf Maxima von 5.32 ng/3h (Abb. 26). Aber nicht nur die Maxima unterschieden sich zu den Langtagtieren, sondern auch die Dauer der aMT6s-Exkretion während der Nacht. Durch die wesentlich längere Dunkelphase verlängerte sich auch die Zeitspanne der erhöhten aMT6s-Ausscheidung. Nach Erreichen des Maximums 6 bis 9 h nach Beginn der Dunkelperiode blieb die aMT6s-Ausscheidung während der gesamten Nacht auf hohem Niveau und sank erst nach Tagesanbruch wieder ab. Während sich im Langtag die Zeitspanne der nächtlich erhöhten aMT6s-Exkretion zwischen 23.00 Uhr und 11.00 Uhr MEZ erstreckte, wiesen Kurztaghamster zwischen 20.00 Uhr und 14.00 Uhr MEZ erhöhte aMT6s-Exkretion auf. Dementsprechend höher war auch die gesamte Tagesmenge an ausgeschiedenem aMT6s bei den kurztagadaptierten Hamstern im Vergleich zu Langtaghamstern. Zwerghamster, die in kurzer Photoperiode gehalten wurden, produzierten im Mittel 19.91 ng aMT6s in 24h (Abb. 26), wohingegen im Langtag gehaltene Hamster nur 6.93 ng/24h ausschieden (Abb. 8).

Nach 3-tägiger Johanniskraut-Fütterung ließ sich bei den Kurztaghamstern keine gravierende Veränderung des aMT6s-Tagesprofils erkennen (Abb. 25). Bei männlichen und weiblichen Zwerghamstern schien *Hypericum* keinen Effekt zu zeigen, der mit der im Langtag beobachteten Wirkung vergleichbar wäre. Die nächtlichen Maximalwerte wurden nicht signifikant erniedrigt. Allerdings wurde der Anstieg der aMT6s-Exkretion nach Eintritt der Dunkelheit bei Zwerghamstern beiderlei Geschlechts durch die Behandlung mit Johanniskraut verzögert. Der aMT6s-Wert um 23.00 Uhr MEZ erreichte bei den Männchen nach *Hypericum*-Fütterung noch 64.7% des Kontrollwertes; der entsprechende Wert der Weibchen wurde auf 52.94% des Kontrollwertes zu diesem Zeitpunkt verringert.

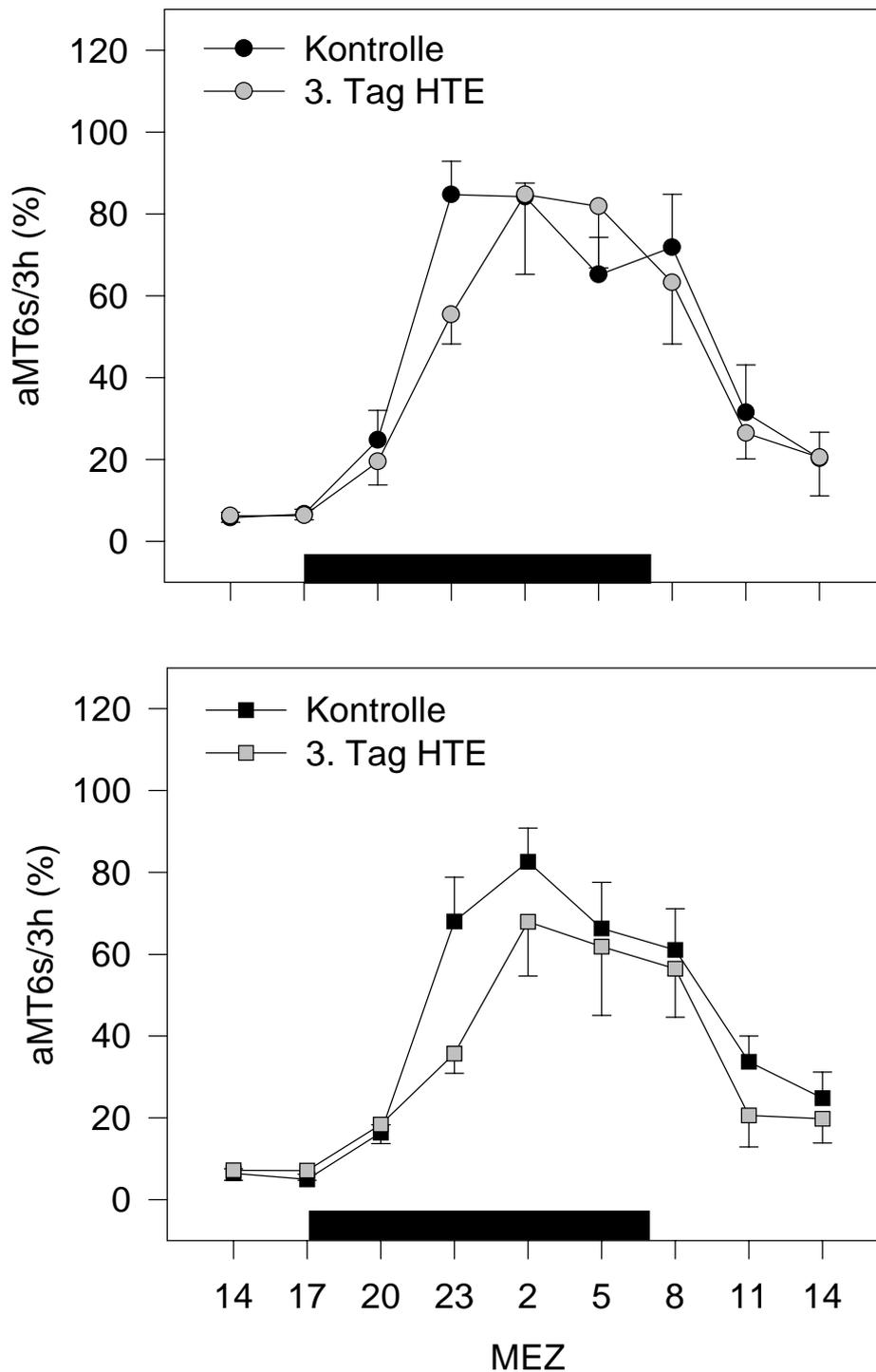


Abb. 25: Tagesprofile der aMT6s-Exkretion von Männchen (oben; n=6) und Weibchen (unten; n=6) unter Kontroll-Fütterung (schwarze Symbole) und am 3. Tag HTE-Fütterung (graue Symbole) im Kurztag. Dargestellt sind relative Mittelwerte \pm SEM. Die schwarzen Balken auf der x-Achse kennzeichnen die Dunkelphase. Effekt der Zeit für Männchen und Weibchen $p < 0.001$; Effekt der Behandlung n. s. (zweifaktorielle ANOVA für Meßwiederholungen).

Johanniskraut zeigte in kurzer Photoperiode jedoch weder auf die Maxima, noch auf die 24h-Produktion von aMT6s eine statistisch signifikante Wirkung (Abb. 26). Allerdings zeichnete sich zumindest eine leichte Absenkung der aMT6s-Tagesproduktion durch HTE-Fütterung ab; und zwar bei männlichen und weiblichen Zwerghamster.

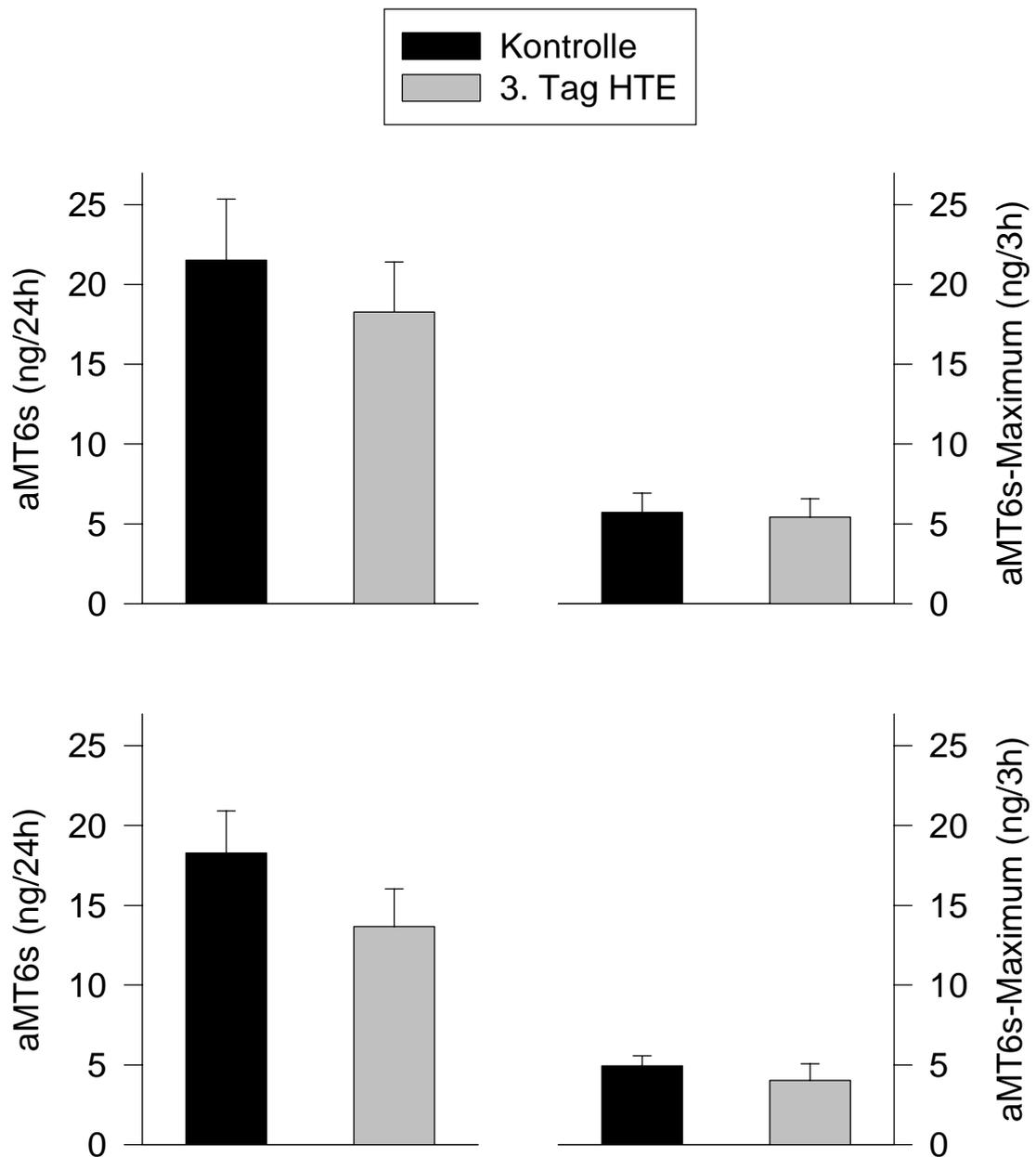


Abb. 26: Änderung der aMT6s-Tagesproduktion (links) und aMT6s-Maximums (rechts) nach dreitägiger Johanniskraut-Fütterung bei männlichen (oben, n=6) und weiblichen (unten, n=6) Dsungarischen Zwerghamster im Kurztag. Die schwarzen Balken geben die Mittelwerte \pm SEM unter Kontrollfütterung wieder; die grauen Balken zeigen die Mittelwerte \pm SEM unter Hypericum-Fütterung. Es ergaben sich keine signifikanten Unterschiede.

3.3 Wirkung von Johanniskraut während der Kurztaganpassung

Zwar konnte bei an Kurztag adaptierten Hamstern keine klare Johanniskraut-Wirkung detektiert werden, dennoch ist fraglich, ob eine längerfristige Fütterung des Pflanzenextraktes die morphologischen und physiologischen Anpassungsvorgänge Dsungarischer Zwerghamster an kurze Photoperiode beeinflusst. Die in diesem Kapitel beschriebenen Experimente beinhalten die Untersuchung einer möglichen Hypericum-Wirkung auf die aMT6s-Exkretion, das Körpergewicht, die Fellumfärbung und den Gonadenstatus männlicher und weiblicher Hamster während der Kurztaganpassung.

3.3.1 Wirkung von Johanniskraut auf Futteraufnahme und Körpergewicht

Wie bereits bei dem Langtagexperiment beschrieben, zeigte Hypericum während der 3-tägigen Fütterung im Langtag auch bei den hier untersuchten Zwerghamstern keinerlei Effekt auf die tägliche Futteraufnahme oder das Körpergewicht (nicht abgebildet). Männliche Hamster nahmen bei einem mittleren Körpergewicht von 37.08 ± 0.96 g im Mittel 3.92 ± 0.27 g HTE-Futter und somit eine Hypericum-Dosis von 3.27 mg pro Tag auf; die durchschnittliche Futteraufnahme der Weibchen betrug bei einem Körpergewicht von 31.56 ± 1.47 g 3.46 ± 0.38 g pro Tag, wodurch sie täglich 2.88 mg HTE zu sich nahmen.

Während der Kurztagexposition nahm die tägliche Futteraufnahme entsprechend der Erwartung ab (Abb. 27). Sie betrug während der gesamten Zeit im Langtag durchschnittlich 3.23 ± 0.10 g und sank im Kurztag auf 2.46 ± 0.07 g. In kurzer Photoperiode nahmen die Zwerghamster also nur noch im Mittel 2.05 mg HTE pro Tag auf. In der Futteraufnahme bestand während des gesamten Versuchszeitraumes kein maßgeblicher Unterschied zwischen der Kontrollgruppe und der HTE-Gruppe.

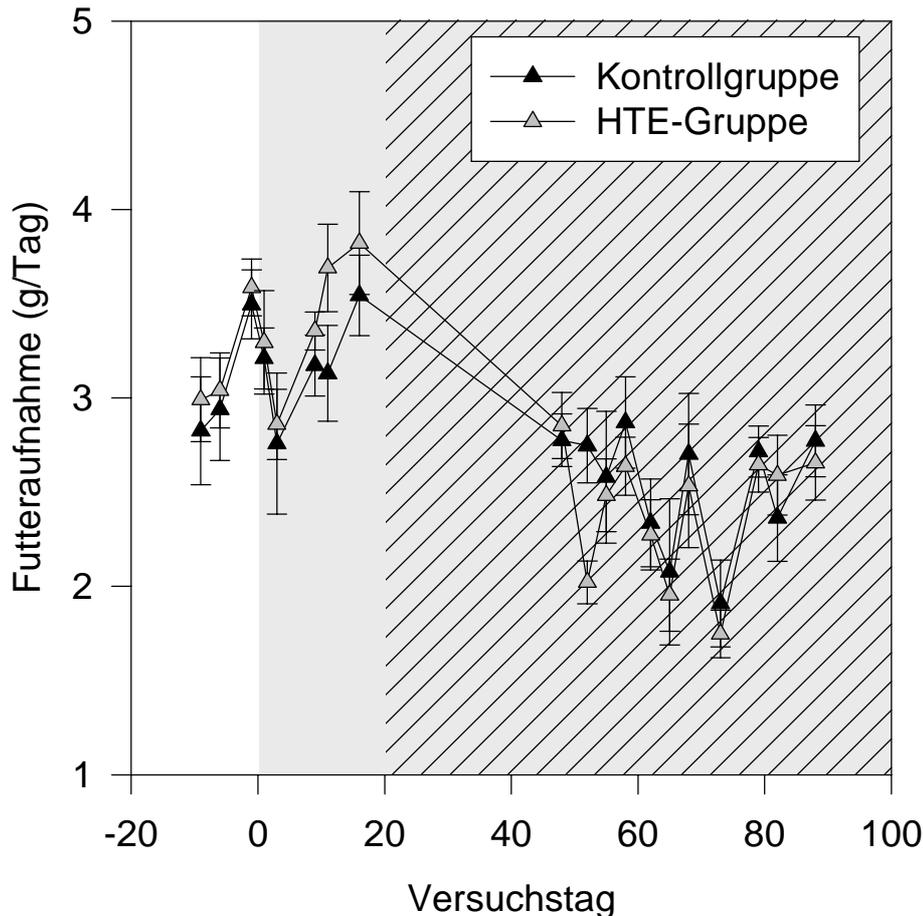


Abb. 27: Zeitverlauf der Futtermittelaufnahme der Kontrollgruppe (schwarze Symbole; n=10) und der HTE-Gruppe (graue Symbole; n=10). Grau hinterlegt ist der Zeitraum der Johanniskraut-Fütterung der HTE-Gruppe; die Zeitspanne in kurzer Photoperiode ist schraffiert.

3.3.2 Wirkung von Johanniskraut auf die aMT6s-Exkretion

Die aMT6s-Exkretion der in diesem Versuchsdurchgang untersuchten Zwerghamster wurde durch 3-tägige Hypericum-Fütterung im Langtag ebenfalls erniedrigt (Abb. 28), wie dies bereits in dem Experiment unter 3.1.2 beschrieben wurde. Allerdings fiel die Reduktion der aMT6s-Ausscheidung durch Johanniskraut bei den Weibchen nicht so beachtlich aus wie in dem zuvor erwähnten Langtagexperiment. Während die weiblichen Zwerghamster dort sogar stärker reagierten als die männlichen, war bei den hier untersuchten Weibchen nur eine verhältnismäßig geringe Reduktion durch Hypericum-Fütterung festzustellen. Innerhalb der Männchen zeigte Johanniskraut eine sichtlich stärkere Wirkung auf die aMT6s-Exkretion, die durchaus mit den Ergebnissen des Langtagexperimentes vergleichbar ist.

68 Tage nach der Umstellung von Langtag auf kurze Photoperiode zeigten alle Hamster ein typisches Kurztagprofil der aMT6s-Exkretion mit hoher Amplitude und verlängerter Signaldauer (Abb. 29), wie auch die unter 3.2 beschriebenen Kurztagtiere. An dem hier gezeigten 88. Versuchstag ergab sich kein maßgeblicher Unterschied im Tagesprofil der aMT6s-Exkretion zwischen Kontrollgruppe und den seit dem Versuchstag 0 mit Hypericum gefütterten Zwerghamstern. Lediglich bei den Männchen der HTE-Gruppe war die aMT6s-Ausscheidung um 20.00 und um 2.00 Uhr MEZ gegenüber dem entsprechenden Wert der Kontrollgruppe erniedrigt. Innerhalb der Gruppe der weiblichen Zwerghamster waren hingegen keine prägnanten Unterschiede im Tagesprofil der aMT6s-Exkretion zwischen Kontrollgruppe und HTE-Gruppe erkennbar.

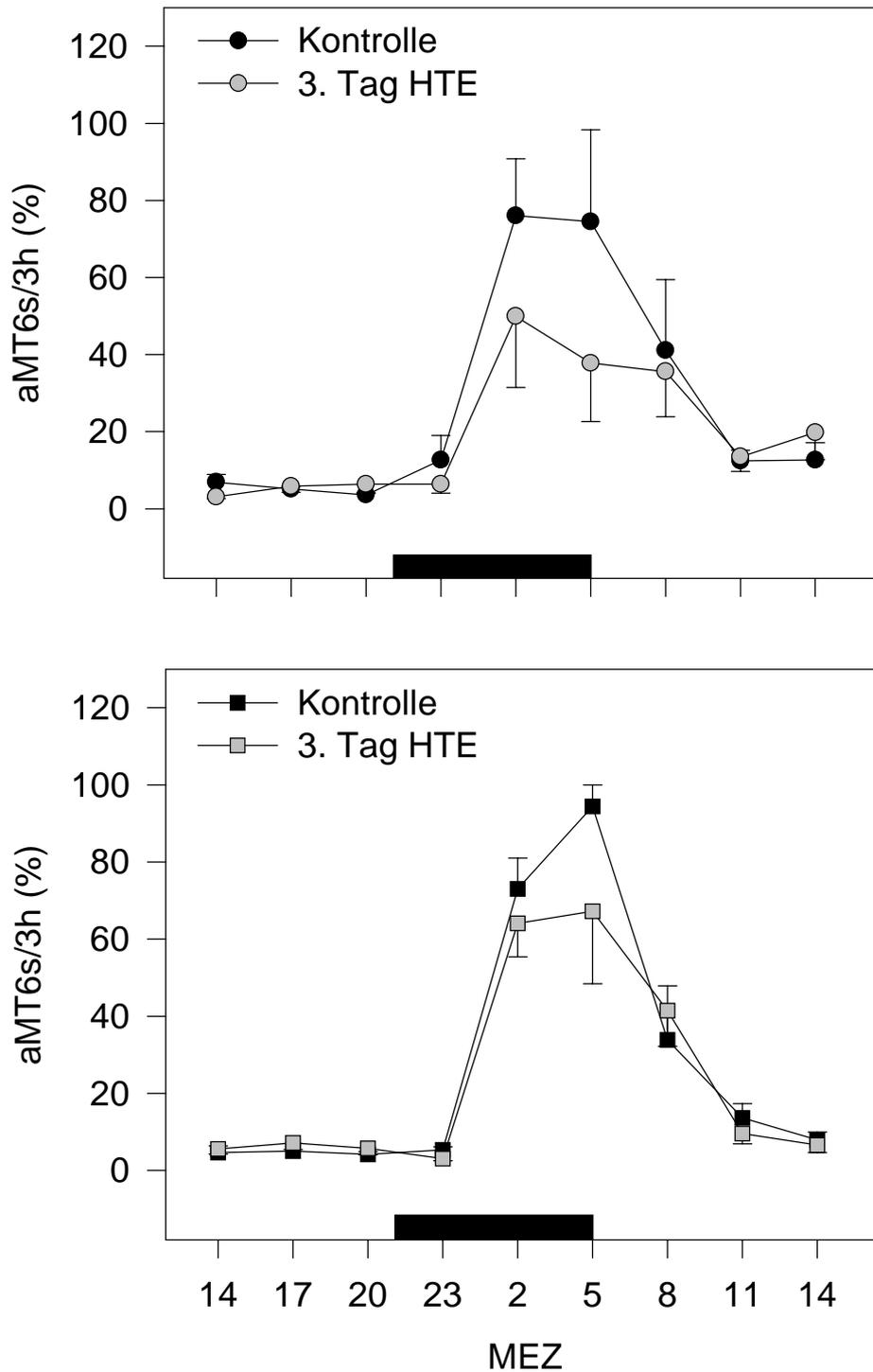


Abb. 28: aMT6s-Tagesprofile der Männchen (oben, n=5) und Weibchen (unten, n=5) vor der Fütterung mit Johanniskraut (schwarze Symbole) und am 3. Tag der Johanniskraut-Behandlung (graue Symbole). Dargestellt sind relative Mittelwerte \pm SEM. Die schwarzen Balken symbolisieren die Dunkelphase. Effekt der Zeit für Männchen und Weibchen $p < 0.001$; Effekt der Behandlung für Männchen $p = 0.003$, für Weibchen n. s. (zweifaktorielle ANOVA für Meßwiederholungen).

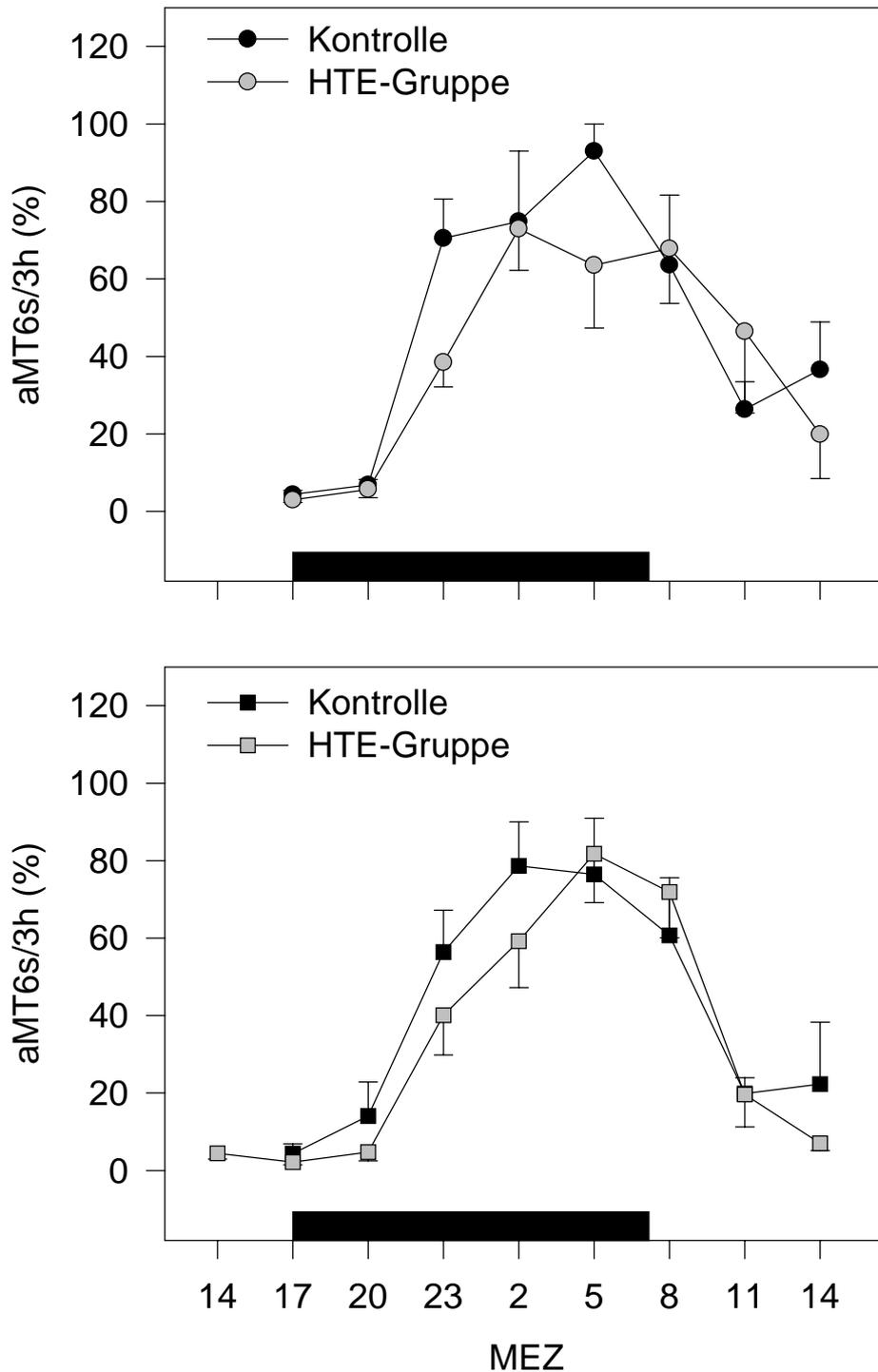


Abb. 29: aMT6s-Tagesprofile von Männchen (oben) und Weibchen (unten) am 88. Tag der Hypericum-Fütterung und dem 68. Tag in kurzer Photoperiode. Die schwarzen Symbole zeigen die jeweiligen Kontrollgruppen; die grauen Symbole zeigen die mit Johanniskraut gefütterten Hamster (jeweils $n=10$). Dargestellt sind relative Mittelwerte \pm SEM. Die schwarzen Balken markieren die Dunkelperiode. Effekt der Zeit für Männchen und Weibchen $p<0.001$; Effekt der Behandlung n. s. (zweifaktorielle ANOVA für unabhängige Daten).

3.3.3 Wirkung von Johanniskraut auf den Körpergewichtsverlauf

Das Körpergewicht aller beobachteten Hamster nahm in den ersten Tagen des Versuches zunächst noch allmählich zu, erreichte während der Johanniskraut-Behandlung unter Langtagbedingungen einen relativ konstanten Maximalwert von im Mittel etwa 35 g und begann nach drei Wochen der Kurztagexposition abzunehmen (Abb. 30). Diese Körpergewichtsreduktion hielt bis zum Ende des Versuches an, abgesehen von dem kurzfristigen geringfügigen Anstieg zwischen dem 60. und 70. Versuchstag.

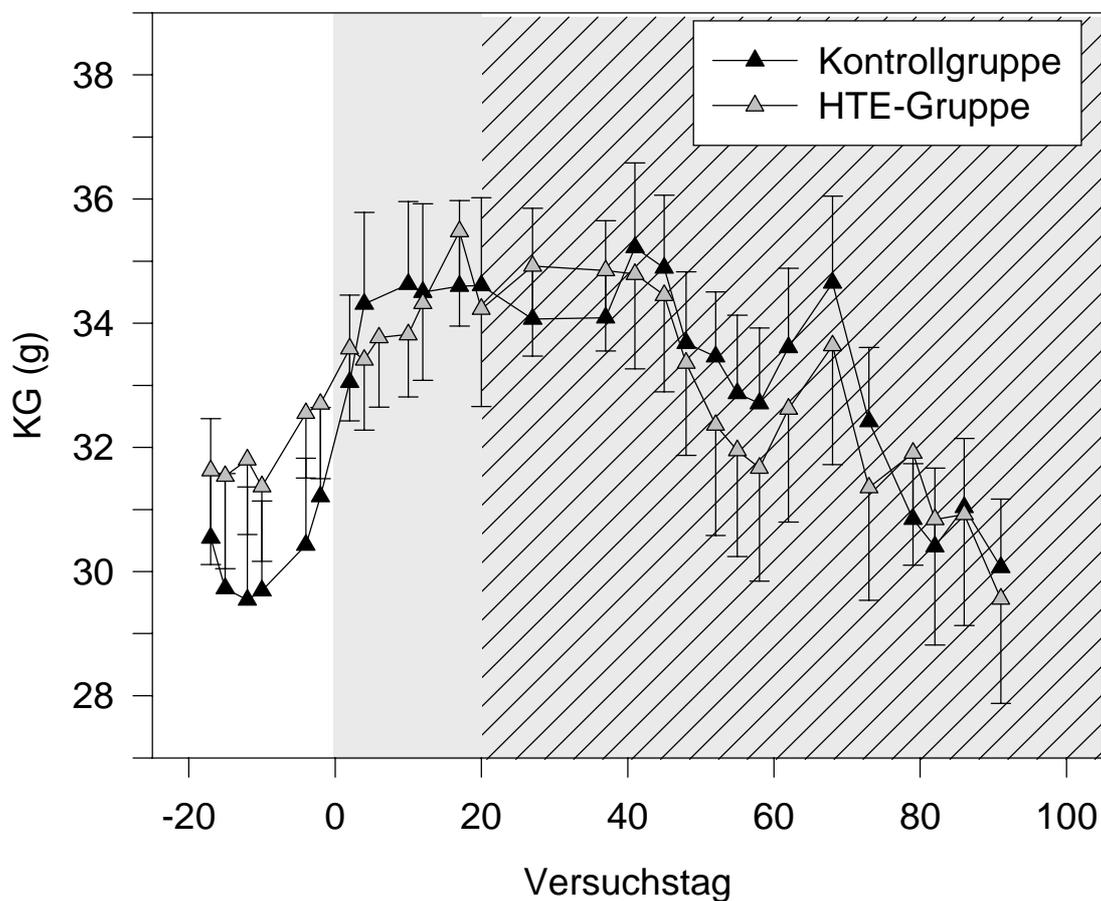


Abb. 30: Änderung des Körpergewichtes der Kontrollgruppe (schwarze Symbole; n=10) und der HTE-Gruppe (graue Symbole; n=10) im Verlauf der Anpassung an kurze Photoperiode. Der Tag, an dem die HTE-Gruppe mit Hypericum gefüttert wurde, wurde als Tag 0 definiert. Der Zeitraum der Hypericum-Fütterung der HTE-Gruppe ist grau hinterlegt; bis zum 20. Versuchstag wurden die Tiere im Langtag gehalten; anschließend wurden beide Gruppen unter kurzer Photoperiode gehalten. Der Zeitraum, in dem die Hamster im Kurztag gehalten wurden, ist schraffiert.

Nach 10 Wochen im Kurztag hatten die Hamster ein mittleres Körpergewicht von ca. 30 g erreicht. Hypericum wirkte sich in keiner Weise auf den Verlauf des Körpergewichtes aus (Abb. 30). Es ergaben sich keinerlei Unterschiede zwischen der Kontrollgruppe und den mit Johanniskraut gefütterten Zwerghamstern.

3.3.4 Wirkung von Johanniskraut auf den Verlauf der Fellumfärbung

Ebenso unbeeinflusst blieb der Verlauf der Fellumfärbung (Abb. 31); es ergaben sich keine wesentlichen Unterschiede zwischen Johanniskraut-behandelten Hamstern und unbehandelten Kontrolltieren. Der Fellindex stieg unter Hypericum-Fütterung analog dem der Kontrollgruppe.

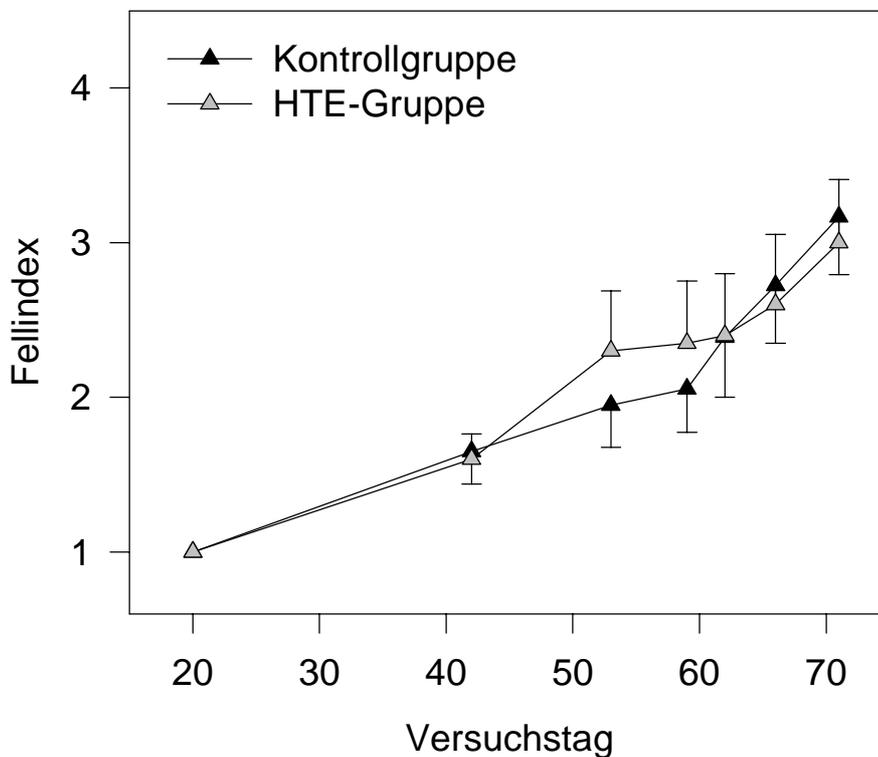


Abb. 31: Änderung des Fellindex der Kontrollgruppe (schwarze Symbole; n=10) und der HTE-Gruppe (graue Symbole; n=10) im Verlauf der Kurztaganpassung; ab Versuchstag 20 wurden die Dsungarischen Zwerghamster unter kurzer Photoperiode gehalten.

3.3.5 Wirkung von Johanniskraut auf den Gonadenstatus

Desweiteren hatte Hypericum keine Auswirkungen auf den Gonadenstatus während der Kurztaganpassung (Abb. 32). Die Hodenregression der Männchen verlief unter Johanniskraut-Fütterung zeitgleich mit der von unbehandelten Männchen. Auch die mit Hypericum gefütterten Weibchen wurden im gleichen Zeitintervall azyklisch wie die Weibchen unter Kontrollfütterung.

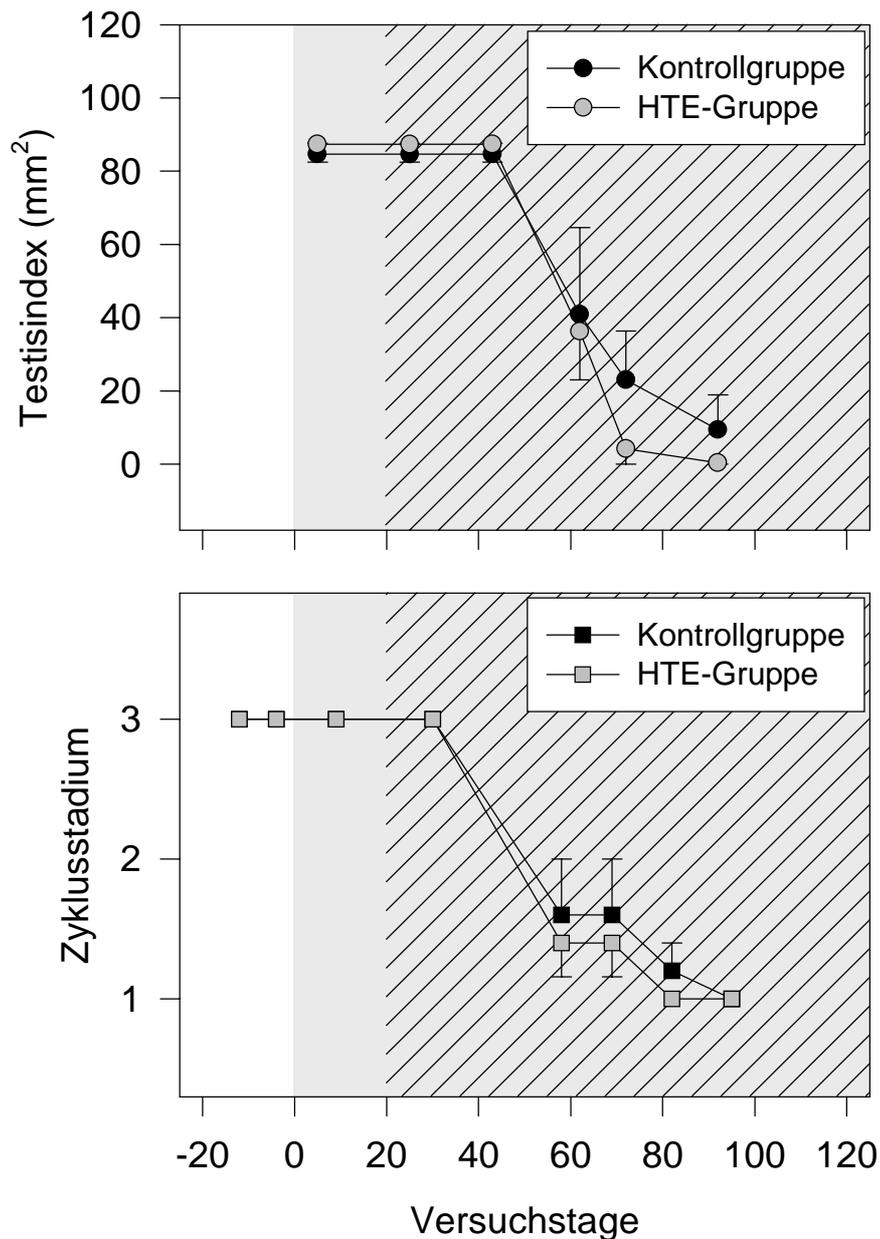


Abb. 32: Änderung des Testisindex (oben) und des Zyklusstadiums (unten) von Kontrollgruppe (schwarze Symbole; jeweils n=10) und HTE-Gruppe (graue Symbole; jeweils n=10) im Verlauf der Kurztaganpassung. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM. Die grau hinterlegte Fläche markiert den Zeitraum der Hypericum-Fütterung der HTE-Gruppe; die schraffierte Fläche den Zeitraum in kurzer Photoperiode.

4 Diskussion

Bevor auf die zentrale Fragestellung nach der Wirkung von Johanniskraut auf die Melatonin-Tagesperiodik Dsungarischer Zwerghamster eingegangen werden kann, soll zunächst die Eignung der Methode der HTE-Fütterung diskutiert werden.

4.1 Verabreichung des Hypericum-Trockenextraktes über das Futter

Die Herstellung des HTE-Futters, speziell das Anrühren mit Wasser und die anschließende Trocknung für 48 h bei 60°C, könnte eine Veränderung oder sogar Zerstörung einzelner Inhaltsstoffe des Trockenextraktes zur Folge gehabt haben. So ist beispielsweise Hyperforin sehr instabil und oxidationsanfällig und ist bei dieser Art der Zubereitung wahrscheinlich größtenteils zerstört worden. Flavonoide und Hypericine dagegen sind äußerst stabil und dürften im Futter in jedem Falle noch enthalten gewesen sein. Welche Wirkstoffe allerdings tatsächlich in welchen Mengen nach der Zubereitung noch enthalten waren, ist nicht bekannt. Es war nach Auskunft der Firma Bionorica leider nicht möglich, das HTE-Futter auf seine Zusammensetzung hin zu analysieren. Wegen der verhältnismäßig geringen Wirkstoffkonzentrationen im Futter wären immens große Futtermengen nötig gewesen, um einzelne Komponenten des HTE nachweisen zu können. Die deutliche Wirkung dieses HTE-Futters auf die Melatonin-Tagesperiodik beweist allerdings, daß in jedem Falle noch ausreichende Mengen an entscheidenden Wirkstoffen enthalten gewesen sein müssen.

Die Verabreichung von HTE über das Futter birgt den Nachteil in sich, daß keine exakt definierte und für alle Hamster gleiche Menge an HTE appliziert werden kann. Die Menge des aufgenommenen HTE richtet sich vielmehr nach der Futteraufnahme jedes einzelnen Hamsters und variiert sowohl zwischen verschiedenen Individuen, als auch von Tag zu Tag. Außerdem ist die Zeit, zu der die Hamster das Futter aufnehmen, nicht genau bestimmbar. Da die hier untersuchte Spezies nachtaktiv ist, kann man aber davon ausgehen, daß sich der größte Teil ihrer täglichen Freßaktivität auf die Dunkelphase beschränkt. Die Dauer der Nacht betrug bei den hier untersuchten Langtaghamstern 8 h und für Phodopus wurde gezeigt, daß die Freßaktivität in langer Photoperiode gegen Ende der Nacht deutliche Maxima erreicht (RUF et al. 1990; RUF 1991), so daß der Zeitraum der HTE-Aufnahme bei im Langtag gehaltenen Hamstern noch vergleichsweise eng gefaßt ist. Dagegen

erstreckt sich die Dauer erhöhter Freßaktivität bei Kurztaghamstern aber über die komplette Dunkelphase (RUF et al. 1990, RUF 1991), also einen Zeitraum von 16 h. Wann welcher Hamster wieviel HTE zu sich genommen hat, läßt sich mit dieser Methode also nicht detailliert nachvollziehen.

Im Vergleich dazu wäre dagegen bei einer Injektion eines Hypericum-Extraktes in flüssiger Form sowohl eine einheitlich festgelegte Dosis, als auch der exakte Zeitpunkt der Verabreichung definiert. Allerdings würde eine Injektion den Körper in kürzester Zeit mit einer relativ hohen HTE-Dosis überschwemmen, wohingegen durch die Methode der HTE-Fütterung die Tagesdosis an HTE allmählich aufgenommen wird, also während mehrerer Freßphasen über eine längere Zeitspanne. Darüber hinaus wäre eine tägliche Injektion mit erheblichem Streß für die Zwerghamster verbunden, dessen Folgen für die Versuchstiere und die Meßparameter nicht abzusehen wären.

Der entscheidende Vorteil der HTE-Verabreichung über das Futter liegt also darin, daß diese Methode nicht invasiv und mit keinen extremen Belastungen oder Streß für die Zwerghamster verbunden war. So hatte die Umstellung von Kontrollfutter auf HTE-haltige Diät keinerlei Auswirkungen auf die Futteraufnahme und das Körpergewicht der Hamster. Auch wenn durch die Verabreichung des HTE über das Futter keine exakte Dosierung möglich war, konnte doch zumindest die individuelle Tagesdosis durch die Messung der täglichen Futteraufnahme verhältnismäßig genau ermittelt werden. Die im Rahmen dieser Experimente gemessene mittleren Futteraufnahme von 3.615 g pro Tag bei im Langtag gehaltenen Zwerghamstern stimmte mit dem für die Dosisberechnung vorausgesetzten Erfahrungswert von 3.6 g sehr genau überein. Dadurch entsprach die tatsächlich aufgenommene HTE-Menge der veranschlagten 3 mg-Dosierung mit durchschnittlich 3.0125 mg pro Tag im Langtag fast exakt der errechneten 'Sollmenge'. Außerdem wurde durch die HTE-Fütterung eine auf das Körpergewicht bezogene Johanniskraut-Dosierung erreicht, da die tägliche Futteraufnahme hochsignifikant mit dem Körpergewicht der Dsungarischen Zwerghamster korrelierte (Abb. 33).

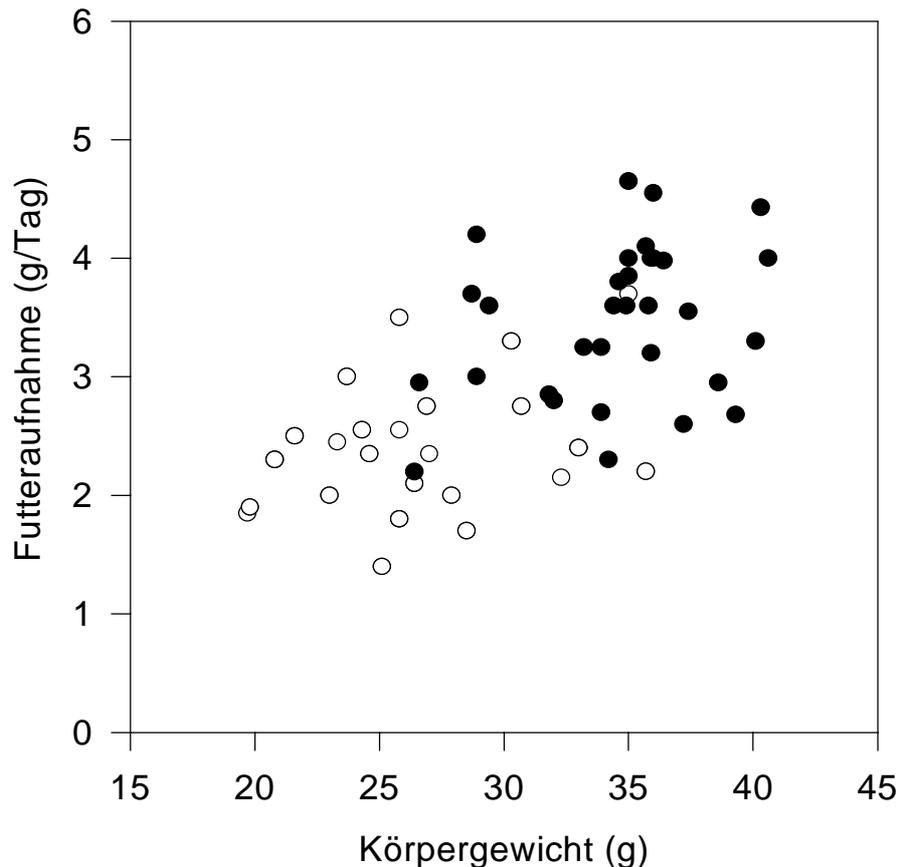


Abb. 33: Korrelation der täglichen Futteraufnahme und des Körpergewichts von Dsungarischen Zwerghamstern im Langtag (schwarze Symbole; n=32) und im Kurztag (weiße Symbole; n=24); $R=0.636$; $p<0.001$.

Ein weiterer Vorzug der HTE-Fütterung besteht in der vorwiegend auf die Nacht beschränkten Futteraufnahme von *Phodopus*, was bedeutet, daß sich dadurch auch die HTE-Aufnahme auf die Dunkelperiode und damit den Zeitraum der Melatonin-Produktion konzentriert. Es ist bekannt, daß der Großteil der Inhaltsstoffe von Johanniskraut nach oraler Applikation sehr schnell resorbiert wird und innerhalb der ersten 1 bis 3 Stunden im Blut und im Gehirn nachweisbar ist (Übersicht bei HÖLZL et al. 1994). Das Johanniskraut gelangt demzufolge unmittelbar während der Melatonin-Sekretion in den Organismus.

Insgesamt erwies sich die Methode der HTE-Fütterung also durchaus als geeignet, um die Beeinflussung der Melatonin-Tagesperiodik durch Johanniskraut zu untersuchen.

4.2 Wirkung von Hypericum auf die Melatonin-Tagesperiodik

4.2.1 Wirkung von Hypericum auf die aMT6s-Exkretion

Die Quantifizierung der aMT6s-Exkretion ist eine geeignete Methode zur indirekten Erfassung der Melatonin-Produktion im Pinealorgan Dsungarischer Zwerghamster (STIEGLITZ et al. 1995). Es handelt sich hierbei um eine nicht-invasive Methode, die es erlaubt, wiederholte Messungen an ein und demselben Individuum vorzunehmen, so daß mehrere aMT6s-Tagesrhythmen jedes einzelnen Hamsters sowohl vor als auch nach der Hypericum-Fütterung aufgenommen werden konnten. Aufgrund der erheblichen interindividuellen Variation des aMT6s-Tagesprofils lag darin ein entscheidender Vorteil dieser Methode. Anders als punktuelle Messungen der Plasma-Melatonin-Konzentration oder der NAT-Aktivität kann der aMT6s-Gehalt im Urin in 3h-Intervallen im Tagesverlauf verfolgt werden, wohingegen oben genannte Parameter von jedem Tier nur einmal und auch nur zu einem einzigen Zeitpunkt bestimmt werden können.

Unter Fütterung von Kontrolldiät zeigten alle untersuchten Zwerghamster charakteristische aMT6s-Tagesprofile, die der jeweiligen Photoperiode, in der die Hamster gehalten wurden, entsprachen und sich mit früheren Messungen deckten (STIEGLITZ et al. 1994). So zeigten im Langtag gehaltene Hamster der vorliegenden Arbeit eine nächtlich erhöhte aMT6s-Ausscheidung mit einer Amplitude von im Mittel 3.20 ng/3h, die fast exakt der von STIEGLITZ ermittelten Amplitude von 3.23 ng/3h entsprach. Im Vergleich dazu wiesen Zwerghamster in kurzer Photoperiode eine deutlich höhere aMT6s-Ausscheidung mit einer mittleren Amplitude von 5.32 ng/3h auf. Die in der oben zitierten Studie von STIEGLITZ untersuchten Dsungarischen Zwerghamster zeigten im Kurztag eine etwas höhere mittlere Amplitude von 6.80 ng/3h. Wegen der starken individuellen Variation vor allem in der Amplitude der aMT6s-Exkretion ist diese Differenz allerdings nicht verwunderlich.

Die Wirkung von Johanniskraut auf die aMT6s-Exkretion äußerte sich vor allem in der drastischen Erniedrigung der Menge des nächtlich ausgeschiedenen aMT6s bei im Langtag gehaltenen Zwerghamstern, wie sie in Kapitel 3.1.2 beschrieben wurde. Die aMT6s-Exkretion während des Tages erfuhr durch die HTE-Fütterung keinerlei Veränderungen. Dieser Befund war zu erwarten, da die Melatonin-Produktion durch Licht direkt gehemmt wird und deshalb tagsüber weder mit noch ohne Hypericum-

Wirkung nennenswerte Mengen an aMT6s ausgeschieden werden können. Ein Anstieg des Melatoningehalts am Tage kann nur durch Stimulation β -adrenerger Rezeptoren durch synthetische β -Rezeptor-Agonisten wie zum Beispiel Isoproterenol erzielt werden (STEINLECHNER et al. 1984). Anhand der gezeigten Ergebnisse war auch kein Effekt von Hypericum auf die Dauer (hier definiert als die Zeitspanne der Erhöhung der ausgeschiedenen aMT6s-Menge über Tagesniveau) und den Phasenverlauf der nächtlichen aMT6s-Ausscheidung festzustellen. Dies ist jedoch ebensowenig verwunderlich, da die Dauer der nächtlichen Melatonin-Produktion aus oben dargelegten Gründen strikt durch die Photoperiode vorgegeben ist. Die Synthese von Melatonin ist also überhaupt nur während der Dunkelheit möglich; deshalb hätte sich eine mögliche Wirkung von Johanniskraut auf die Dauer der aMT6s-Exkretion ausschließlich in einer Verkürzung der aMT6s-Exkretionsphase während der Nacht ausdrücken können. Eine solche Verkürzung der nächtlichen aMT6s-Ausscheidung, entweder durch eine erst später einsetzende oder aber durch eine früher endende aMT6s-Exkretion, konnte jedoch mit den hier angewandten Methoden nicht festgestellt werden. Der Urin der Hamster wurde in Zeitintervallen von 3 h gesammelt, was bedeutet, daß geringfügige Veränderungen der Dauer der aMT6s-Ausscheidung damit jedoch nicht detektiert werden können. Eine Beeinflussung der Exkretionsdauer wäre nur dann zu erkennen, wenn sie sich in den in 3h-Intervallen gesammelten Urinproben manifestieren würde. Es wäre von Vorteil, die Zeitintervalle der Urinsammlung zu verkürzen, um eine präzisere zeitliche Auflösung des aMT6s-Exkretionsprofils zu erhalten. Das dürfte allerdings insofern mit Schwierigkeiten verbunden sein, als daß das Urinvolumen der Hamster dazu vermutlich nicht ausreichen würde. Bei den in dieser Arbeit im 3h-Takt gesammelten Urinproben schwankte das Volumen von z. T. nur unter 100 μ l bis über 3 ml.

Allerdings wurde bereits bei der Beschreibung der Ergebnisse daraufhin gewiesen, daß bei einigen Individuen durch Hypericum eine leichte Verzögerung des Anstiegs der aMT6s-Ausscheidung hervorgerufen wurde. Diese Verzögerung bedeutete aber keine Verkürzung der Dauer, da sich auch das morgendliche Absinken der aMT6s-Ausscheidung verzögerte. Zum Teil verschob sich dadurch sogar der Zeitpunkt der maximalen aMT6s-Exkretion um ein 3h-Intervall nach hinten. Es stellt sich dabei die Frage, ob diese nicht bei allen Zwerghamstern beobachtete Phasenverschiebung der aMT6s-Exkretion eine Folge der Hypericum-Behandlung war oder vielleicht andere Ursachen hatte. Bei der in diesen Studien angewandten fraktionierten Urinsammlung ergibt sich das Problem, daß ein Zwerghamster beispielsweise während der letzten

Minuten eines Sammelintervalls in der Dunkelperiode Urin abgibt, während derselbe Hamster in der folgenden Nacht nicht mehr gegen Ende des gleichen Sammelintervalls, dafür aber im nächsten Meßintervall vermehrt Urin abgibt. Die Urinabgabe der Hamster verteilt sich also zufällig auf das 3h-Raster. Dadurch könnte also allein durch eine 'verspätete Urinabgabe' eine Phasenverschiebung der aMT6s-Ausscheidung zustande kommen. Allerdings hätten sich so auch Phasenverschiebungen nach vorne ergeben müssen, was jedoch nicht der Fall war. Außerdem traten die beschriebenen Phasenverschiebungen ausschließlich nach der HTE-Fütterung auf, unter Kontrollbedingungen blieben die von einem Hamster gemessenen aMT6s-Tagesprofile sehr konstant. Die beobachteten Phasenverschiebungen der nächtlichen aMT6s-Exkretion dürften aufgrund der angeführten Argumente also durchaus der HTE-Wirkung zuzuschreiben sein.

Die Fütterung der Hypericum-Diät führte bereits nach 3 Tagen zu einem markanten Abfall des aMT6s-Maximums und damit auch der 24h-Produktion von aMT6s. Da das Maximum der aMT6s-Exkretion bei im Langtag gehaltenen Hamstern einen relativ großen Anteil an der Tagesproduktion hat, korrelierten beide Parameter erwartungsgemäß. Bezüglich der drastischen Reduktion der Amplitude der nächtlichen aMT6s-Exkretion durch HTE gab es keine auffälligen geschlechtsspezifischen Unterschiede. Hypericum scheint sich demzufolge in gleicher Weise auf männliche wie auf weibliche Zwerghamster auszuwirken. Die Erniedrigung des aMT6s-Maximums durch HTE war aber von der Höhe des Kontroll-

erniedrigte Umgebungstemperatur führt bei *Phodopus* innerhalb der ersten Woche zu einer drastischen Erhöhung der aMT6s-Tagesproduktion, also einem gegenteiligen Effekt von *Hypericum*. Aber auch diese Erhöhung der aMT6s-Exkretion durch Kälte sinkt anschließend wieder ab und erreicht nach 17 Tagen Ausgangsniveau. Beide Effekte verlaufen also zeitlich analog, allerdings spiegelbildlich, was dafür sprechen würde, daß für beide Wirkungen die gleichen Regulationsmechanismen verantwortlich sind. Das Signal einer veränderten Melatonin-Amplitude wird also, unabhängig von der Richtung dieser Änderung, auf die gleiche Weise verarbeitet. Der Vergleich mit der Wirkung der Kälteexposition beweist außerdem, daß die durch Johanniskraut hervorgerufene Reduktion der aMT6s-Amplitude kein unspezifischer Effekt, sondern ein gezielt regulierter Prozeß ist.

Im weiteren Verlauf der HTE-Wirkung zeichnet sich ab, daß sich die aMT6s-Amplitude erneut erniedrigt. Eine Dokumentation der Johanniskraut-Wirkung über eine Zeitspanne von weit mehr als vier Wochen wäre nötig, um Aufschluß über die Langzeitwirkung von *Hypericum* auf die aMT6s-Exkretion zu erlangen.

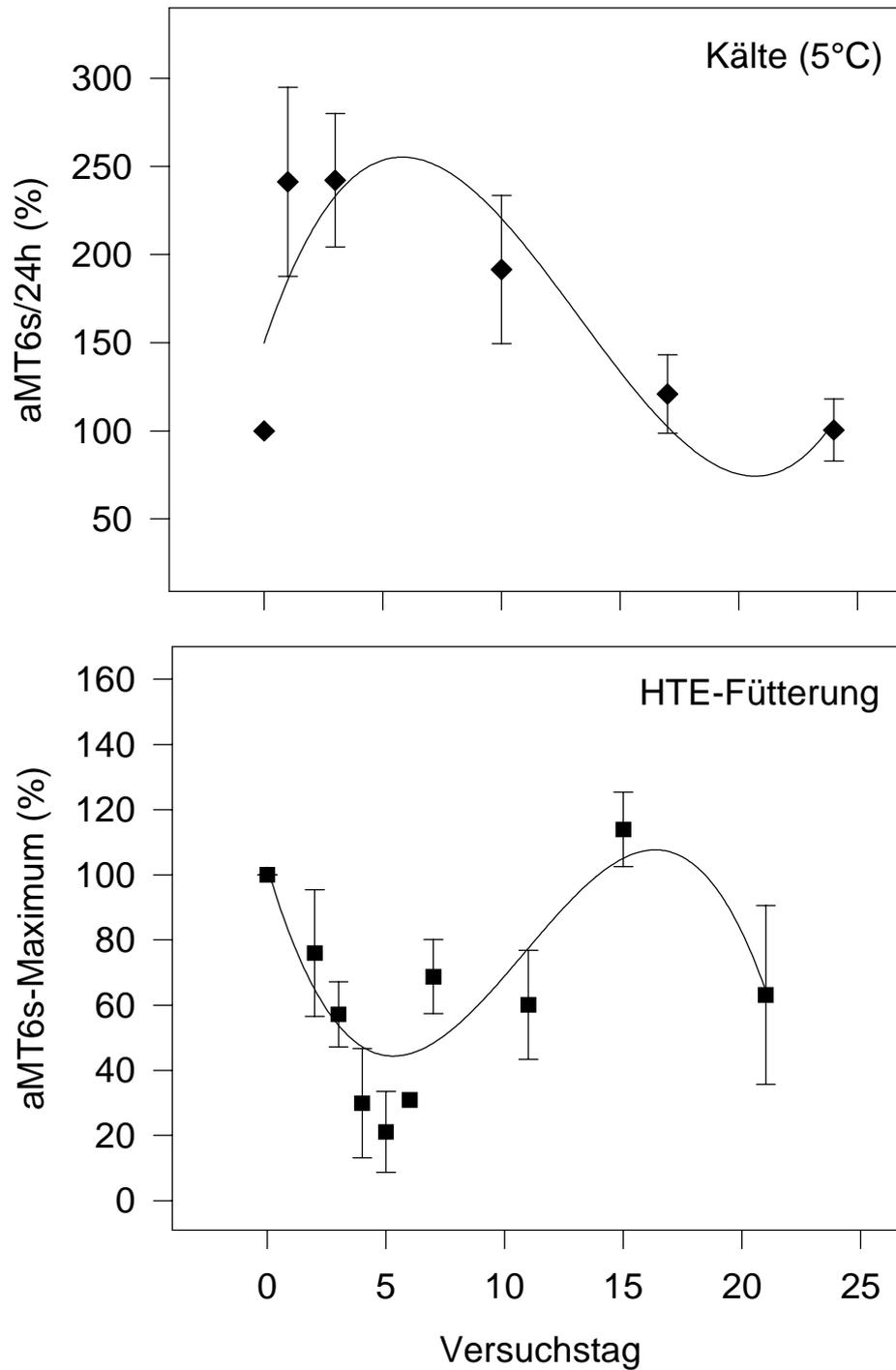


Abb. 34: Zeitverlauf der aMT6s-Tagesproduktion bei Kälteexposition (oben, n=6; nach Daten von KLIER und STIEGLITZ, unveröffentlicht) im Vergleich zum zeitlichen Verlauf der Hypericum-Wirkung auf das aMT6s-Maximum (unten, n=8). Dargestellt sind jeweils relative Mittelwerte \pm SEM.

Aufgrund der Methode der HTE-Fütterung konnten den Dsungarischen Zwerghamstern keine exakt definierten Mengen an HTE verabreicht werden, was besonders die Untersuchung einer Dosis-Antwort-Beziehung komplizierte. Um so erstaunlicher sind die klaren Resultate, die unter diesen erschwerten Bedingungen gewonnen wurden. Zum einen lassen sie den Schluß zu, daß Johanniskraut schon in sehr geringen Mengen wirksam ist, da bereits die geringste Dosierung von 1.5 mg pro Tag eine deutliche Absenkung der nächtlichen aMT6s-Exkretion bewirkte. Vor allem aber ist die Wirkung von Hypericum auf die aMT6s-Exkretion abhängig von der verabreichten HTE-Dosis; sowohl die Wirkung auf das aMT6s-Maximum, als auch die Wirkung auf die 24h-Produktion korrelieren hochsignifikant mit der HTE-Dosis. Je mehr Johanniskraut ein Hamster erhält, desto stärker wird seine nächtliche aMT6s-Exkretion erniedrigt.

4.2.2 Unwirksamer Johanniskraut-Extrakt

Einer der drei verwendeten Hypericum-Trockenextrakte erwies sich als unwirksam. Diese Extrakt-Charge zeigte weder eine Wirkung auf die aMT6s-Exkretion, noch auf die NAT-Aktivität der Zwerghamster. Das Herstellungsverfahren dieses Extraktes, die Futterzubereitung und alle anderen Versuchsbedingungen wurden jedoch nicht verändert. Warum dieser Extrakt im Gegensatz zu den beiden anderen verwendeten keine vergleichbaren Effekte auf die aMT6s-Exkretion zeigte, kann nicht geklärt werden. An Inhaltsstoffen wurde nur der Gehalt an Hypericinen und Hyperforin bestimmt. Es ist aber nicht klar, ob diese Inhaltsstoffe auch für die Wirkung verantwortlich sind. Anfänglich wurde Hypericin für die antidepressive Wirkung von Johanniskraut-Extrakt verantwortlich gemacht (SUZUKI et al. 1984, STAFFELDT et al. 1993). Inzwischen gilt diese Ansicht jedoch als überholt; heute wird Hyperforin als ein der Wirkung zugrunde liegender Inhaltsstoff angesehen (CHATTERJEE et al. 1998, LAAKMANN et al. 1998). Der Hyperforingehalt des HTE-Futters dürfte aber nur noch sehr gering gewesen sein, da Hyperforin sehr instabil ist und bei der Prozedur der Futterzubereitung wahrscheinlich größtenteils zerstört worden ist. Außerdem kann Hyperforin sicher nicht der einzige wirksame Inhaltsstoff sein; die Wirksamkeit von Johanniskraut beruht wahrscheinlich eher auf einer Interaktion verschiedener Inhaltsstoffe.

Die Tatsache, daß der für die meisten Experimente dieser Arbeit verwendete Extrakt im Vergleich zu dem unwirksamen sogar wesentlich weniger Hyperforin und

Hypericine enthielt, aber dennoch deutliche Effekte auf die aMT6s-Exkretion zeigte, könnte bedeuten, daß es eine optimale Hyperforin- bzw. Hypericin-Dosis geben könnte. Wenn dieser jeweilige Optimalwert überschritten wird, nimmt die Wirksamkeit ab. Desweiteren zeigt der Vergleich der Zusammensetzung der Extrakte, daß weder Hypericine, noch Hyperforin allein für die Wirkung von HTE auf die Melatonin-Tagesperiodik verantwortlich sein können. Es muß also auf jeden Fall andere entscheidende Wirkstoffe geben, in deren Gehalt sich beide Extrakte unterscheiden.

4.2.3 Wirkung von Hypericum auf die Melatonin-Synthese

Wie oben erwähnt, stellt die Ausscheidung des Melatonin-Metaboliten aMT6s ein zuverlässiges Maß für die Melatonin-Synthese im Pinealorgan Dsungarischer Zwerghamster dar. Diese Aussage ist allerdings nur für unbehandelte Hamster bewiesen. Wie sich der Zusammenhang zwischen Melatonin-Produktion und aMT6s-Exkretion unter dem Einfluß von Hypericum verhält, ist nicht bekannt. Der Befund, daß HTE-Fütterung die aMT6s-Exkretion erniedrigt, gibt also nicht unbedingt eine direkte Information über die Melatonin-Synthese im Pinealorgan. Um die Beeinflussung der Melatonin-Synthese durch Johanniskraut beurteilen zu können, wurde zusätzlich die Aktivität der N-Acetyltransferase gemessen. Dieses Enzym trägt die Schlüsselrolle im Syntheseweg des Melatonins, da es den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt der Reaktionskaskade katalysiert und liefert somit direkte Informationen über die Produktion von Melatonin. Wie in dieser Arbeit erstmals gezeigt werden konnte, korrelierte das aMT6s-Maximum unter Kontrollbedingungen signifikant mit der NAT-Aktivität; und das, obwohl beide Parameter nicht gleichzeitig, sondern an zwei aufeinanderfolgenden Tagen erfaßt werden mußten. Außerdem stellt die NAT-Aktivitätsbestimmung nur eine punktuelle Messung dar, die von jedem Zwerghamster nur ein einziges Mal und nur zu einem Zeitpunkt ermittelt werden kann. Da aber auch die Aktivität der NAT einem circadianen Rhythmus unterliegt (STEINLECHNER et al. 1987), ist nicht sicher, ob die jeweils gemessene NAT-Aktivität immer dem nächtlichen Maximum entsprach. Aus der Arbeit von STEINLECHNER et al. geht hervor, daß Dsungarische Zwerghamster unter entsprechenden Langtagbedingungen etwa 5 h nach Beginn der Dunkelphase die maximale NAT-Aktivität erreichen. Aufgrund dieses Befundes wurde der Zeitraum festgelegt, in dem die Pinealorgane der Hamster präpariert wurden. Da die Dunkelphase um 21.00 MEZ einsetzte, wurden die Zwerghamster zwischen 2.00 Uhr und 3.00 Uhr MEZ getötet. Aus eigenen Vorversuchen bestätigte

sich, daß früher präparierte Hamster eine eher niedrigere NAT-Aktivität im Pinealorgan aufwiesen (Abb.35).

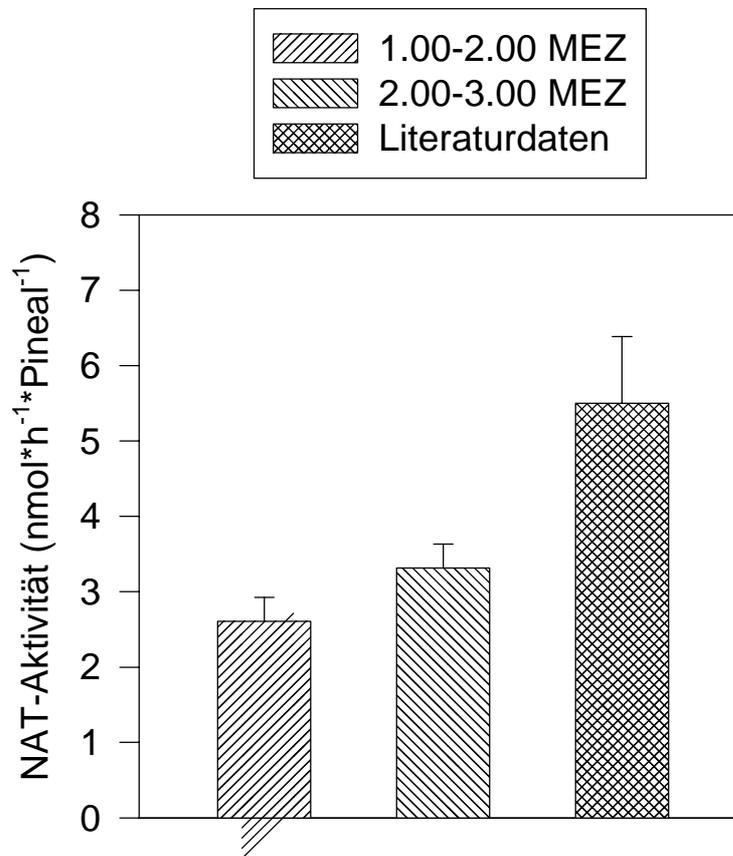


Abb. 35: NAT-Aktivität im Pinealorgan Dsungarischer Zwerghamster in Abhängigkeit vom Präparationszeitraum und im Vergleich zu Literaturdaten von STEINLECHNER et al. 1987. Der linke Balken gibt den Mittelwert \pm SEM der zwischen 1.00 Uhr und 2.00 Uhr MEZ Zeit getöteten Hamster an (n=17); der mittlere Balken den der zwischen 2.00 Uhr und 3.00 Uhr MEZ präparierten Hamster (n=15) und der rechte Balken den der Daten nach STEINLECHNER et a. 1987 (n=5).

Die durchschnittliche NAT-Aktivität der in dieser Arbeit untersuchten Hamster betrug $3.3 \pm 0.32 \text{ nmol} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{Pineal}^{-1}$ und lag damit zwar unter dem von STEINLECHNER et al. ermittelten Maximum von ca. $5.5 \pm 0.88 \text{ nmol} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{Pineal}^{-1}$ bei einem Licht-Dunkel-Wechsel von 16:8. Aber in Anbetracht der auch hier auftretenden recht großen individuellen Schwankungsbreite, die auch in Abb. 35 offenkundig wird, liegt die hier bestimmte mittlere NAT-Aktivität doch nahe an dem in der erwähnten Studie gemessenen Maximum. Außerdem war die Gruppengröße der von STEINLECHNER et al. ermittelten Daten im Vergleich zu den in dieser Arbeit untersuchten Hamstern sehr gering (n=5). Zusätzlich unterstreicht die bereits angesprochene Korrelation

zwischen dem nächtlichen aMT6s-Maximum und der NAT-Aktivität der darauffolgenden Nacht, daß die Messung der Enzymaktivität der NAT unter Fütterung von Kontrolldiät als zuverlässiger Parameter für die Melatoninsynthese gelten kann.

Aus der 7-tägigen HTE-Fütterung resultierten jedoch keine signifikanten Veränderungen der NAT-Aktivität. Aufgrund des für unbehandelte Hamster bewiesenen Zusammenhangs der aMT6s-Ausscheidung und der Melatonin-Produktion im Pineal hätte man aber erwarten können, daß die NAT-Aktivität durch Hypericum ebenfalls erniedrigt würde. Es gab zwar tatsächlich auch unter HTE-Fütterung einen signifikanten Zusammenhang zwischen dem aMT6s-Maximum und der NAT-Aktivität, die Beziehung beider Parameter unterschied sich jedoch von der unter Kontrollbedingungen durch eine geringere Steigung der Regressionsgerade. Das bedeutet, daß Zwerghamster bei gleichem aMT6s-Maximum unter HTE-Fütterung eine höhere NAT-Aktivität aufweisen als Kontrolltiere. Anders ausgedrückt entspricht die gleiche NAT-Aktivität bei HTE-gefütterten Zwerghamstern einem niedrigeren aMT6s-Maximum als bei unbehandelten Hamstern. Johanniskraut beeinflusste also nur die aMT6s-Ausscheidung, nicht aber die NAT-Aktivität. Setzt man nun voraus, daß die NAT-Aktivität ein verlässlicher Indikator der Melatonin-Produktion im Pinealorgan ist, würde dieser Befund bedeuten, daß Hypericum die aMT6s-Exkretion, nicht aber die Melatonin-Synthese beeinflusst.

Entscheidend für die Frage, an welcher Stelle Johanniskraut in den Melatonin-Stoffwechsel eingreift, war vor allem die Bestimmung des Melatonin-Gehaltes im Blutplasma der Dsungarischen Zwerghamster. Wie die unter 3.1.5.2 beschriebenen Ergebnisse belegen, hatte die HTE-Fütterung eine prägnante Erniedrigung des nächtlichen Plasma-Melatoninspiegels zur Folge. Den Erwartungen entsprechend zeigte sich eine signifikante Korrelation von aMT6s-Tagesproduktion und Plasma-Melatonin-Konzentration, und zwar sowohl unter HTE-Einwirkung als auch unter Fütterung von Kontrollfutter. Beide Parameter wurden durch Hypericum deutlich erniedrigt; der Zusammenhang zwischen der aMT6s-24h-Produktion und der Plasma-Melatonin-Konzentration blieb jedoch unverändert und folgte den gleichen Gesetzmäßigkeiten wie unter Kontrollbedingungen. Eine solche Beziehung zwischen dem Melatoningehalt im Plasma und der aMT6s-Tagesproduktion konnte bereits von STIEGLITZ et al. 1994 gezeigt werden und fand in den hier ermittelten Daten

Bestätigung. Einen entsprechenden Zusammenhang fanden übrigens auch NOWAK et al. (1987) beim Menschen.

Der Melatoningehalt im Blutplasma korrelierte auch mit der NAT-Aktivität im Pinealorgan; allerdings nur unter Fütterung von Kontrolldiät. Da Zwerghamster unter HTE-Fütterung insgesamt nur sehr geringe Plasma-Melatonin-Konzentrationen aufwiesen, ergab sich kein Zusammenhang mit der NAT-Aktivität mehr. Die Korrelation beider Parameter unter Kontrollfütterung bezeugt aber nochmals die zuvor diskutierte Schlüsselrolle der NAT für die Melatoninsynthese. Bei unbeeinflussten Zwerghamstern ist die Messung der NAT-Aktivität unter den gegebenen Umständen also in jedem Falle ein verlässliches Maß für die Melatonin-Produktion und würde daher eher gegen eine Beeinflussung der Melatoninsynthese durch Johanniskraut sprechen. Ob das Resultat eines durch Hypericum erniedrigten Plasma-Melatonin-Gehaltes trotzdem aus einer durch HTE inhibierten Syntheseleistung zustande kommt, oder ob die Reduktion der Plasma-Melatonin-Konzentration andere Ursachen hat, muß nach wie vor offen bleiben. Dieses Ergebnis läßt aber in jedem Falle den Schluß zu, daß dem Organismus nach Hypericum-Behandlung deutlich weniger im Blut zirkulierendes Melatonin zur Verfügung stand als ohne die Einwirkung von HTE. Die möglichen Folgen eines erheblich reduzierten Melatoninspiegels und einer ebenfalls erniedrigten aMT6s-Amplitude sollen im Zusammenhang mit der Rolle der Melatonin-Amplitude diskutiert werden.

Durch die vorliegende Arbeit konnte erstmals gezeigt werden, daß Johanniskraut eine beachtliche Wirkung auf die Melatonin-Tagesperiodik Dsungarischer Zwerghamster hat, die sowohl durch einen deutlich erniedrigten nächtlichen Plasma-Melatoninspiegel, als auch durch eine drastisch reduzierte Amplitude der aMT6s-Exkretion im Urin deutlich wird.

Über den Effekt dieses Pflanzenextraktes auf die Melatonin-Tagesperiodik gibt es bisher nur eine einzige Veröffentlichung, in der behauptet wird, daß eine 3-wöchige Einnahme von Hypericum-Tropfen beim Menschen eine Erhöhung des nächtlichen Plasma-Melatonin-Spiegels bewirkt (DEMISCH et al. 1990). Die in der zitierten Arbeit suggerierte Erhöhung fiel aber insgesamt äußerst gering aus und war ohnehin nur um 0.30 Uhr und um 0.45 Uhr statistisch signifikant. Ein weiteres Manko dieser Studie ist die Tatsache, daß ausschließlich Gruppen-Mittelwerte ohne jegliche

Angaben über die Streuung der einzelnen Meßwerte abgebildet werden. Dieser Befund erscheint also sehr zweifelhaft und bedürfte dringend einer Überprüfung. Wenn man aber von der eher unwesentlichen Erhöhung des Plasma-Melatonin-Spiegels einmal absehen würde, hieße das, daß sich nach einer 3-wöchigen Hypericum-Behandlung der Melatonin-Tagesgang im menschlichen Plasma nicht maßgeblich verändert hätte.

Die hier dokumentierten Untersuchungen zum Effekt von Johanniskraut-Extrakt auf die Melatonin-Tagesperiodik des Dsungarischen Zwerghamsters beweisen zuverlässig eine Erniedrigung der aMT6s-Amplitude und des Plasma-Melatonin-Spiegels nach einer Woche Hypericum-Fütterung. Im weiteren Verlauf des Behandlungszeitraumes stieg die aMT6s-Amplitude wieder an und erreichte nach 2 bis 3 Wochen wieder Kontrollniveau. In dieser Hinsicht würden sich also beide Studien entsprechen, indem nach einer 3-wöchigen Hypericum-Behandlung weder bei Menschen, noch bei Dsungarischen Zwerghamstern Auswirkungen auf die Melatonin-Tages-periodik festzustellen waren.

4.3 Wirkung von Hypericum im Kurztag

Bei Zwerghamstern, die unter kurzer Photoperiode gehalten wurden, ließ sich keine Wirkung von Hypericum detektieren, die der im Langtag vergleichbar gewesen wäre. Bis auf die geringfügige Verzögerung des aMT6s-Anstiegs scheinen Kurztaghamster keine Reaktion auf die HTE-Fütterung zu zeigen. Das könnte zum einen dadurch zu erklären sein, daß die Futteraufnahme dieser Hamster niedriger war als die der Langtagtiere, so daß sie auch weniger Hypericum zu sich nahmen. Unter Berücksichtigung der reduzierten Futteraufnahme von unter kurzer Photoperiode gehaltenen Hamstern hätte man in diesem Experiment ein stärker konzentriertes HTE-Futter verwenden können. Da aber bei im Langtag gehaltenen Dsungarischen Zwerghamstern bereits eine Tagesdosis von 1.5 mg pro Tier das Maximum der aMT6s-Exkretion effektiv erniedrigte, hätte man trotz der verminderten Futteraufnahme unter kurzer Photoperiode eine Wirkung erwartet. Immerhin nahmen die Kurztaghamster mit durchschnittlich 1.91 mg sogar noch etwas mehr HTE pro Tag auf. Außerdem lag auch das Körpergewicht der Kurztaghamster unter dem der langtagadaptierten Zwerghamster. Wenn man sich die tägliche HTE-Aufnahme pro g Körpergewicht statt pro Hamster betrachtet (Abb. 36), läßt sich kein gravierender Unterschied zwischen Langtag- und Kurztaghamstern erkennen. Zwerghamster, die

unter kurzer Photoperiode gehalten wurden, nahmen mit 0.076 mg HTE pro g Körpergewicht nur geringfügig weniger auf als ihre im Langtag gehaltenen Artgenossen, die 0.084 mg/ g KG zu sich nahmen.

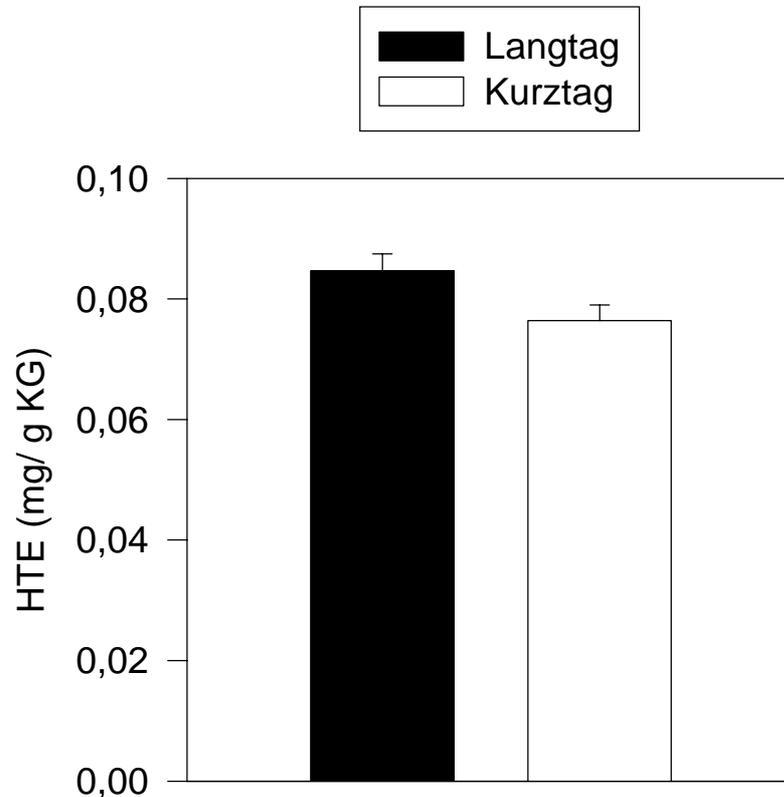


Abb. 36: Tägliche HTE-Aufnahme pro g Körpergewicht von im Langtag (schwarzer Balken; n=32) und im Kurztag (weißer Balken; n=24) gehaltenen Dsugarischen Zwerghamstern. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM.

Andererseits liegt sowohl die Signalamplitude als auch die gesamte Tagesmenge der aMT6s-Exkretion bei im Kurztag gehaltenen Zwerghamstern deutlich höher als im Langtag. So betrug das aMT6s-Maximum langtagadaptierter Hamster 3.2 ng/3h, während Kurztagtiere Maxima von im Mittel 5.32 ng/3h erreichten. Die aMT6s-Tagesproduktion betrug im Langtag 6.93 ng/24h, im Kurztag lag sie dagegen mit 19.91 ng/24h fast 3 Mal so hoch. Die im Kurztag veränderte Reaktion auf die Johanniskraut-Fütterung könnte also mit dem deutlich höheren aMT6s-Level in Verbindung gebracht werden.

Auch während der Kurztagadaptation zeigte *Hypericum* keine statistisch signifikante Wirkung auf den Verlauf der Fellumfärbung, der Futteraufnahme und des Körpergewichts, sowie der Gonadenregression des Dsungarischen Zwerghamsters, obwohl Johanniskraut bei denselben Hamstern zuvor im Langtag eine deutliche Reduktion der aMT6s-Amplitude bewirkte. Allerdings ist der entscheidende Faktor, der die Auslösung der Winteranpassungen beim Dsungarischen Zwerghamster bestimmt, nicht die Amplitude, sondern die Dauer der nächtlichen Melatonin-Produktion (BITTMANN et al. 1983, CARTER und GOLDMANN 1983 a und 1983 b, STEINLECHNER et al. 1987, BARTNESS und GOLDMANN 1988, WAYNE et al. 1988, MAYWOOD et al. 1990 und 1991). Trotzdem hätte man aber einen modulierenden Einfluß der Johanniskraut-Fütterung erwarten können. Nach Umstellung auf Kurztag konnten aber keine deutlichen Effekte des Pflanzenextraktes mehr detektiert werden. Die im Langtag so klare HTE-Wirkung verlor sich also nach Änderung der Photoperiode.

Allerdings zeigt sich vor allem im Zeitraum zwischen Versuchstag 50 und 70 doch zumindest die Tendenz zu einer *Hypericum*-Wirkung. Obwohl das Körpergewicht der HTE-Gruppe vorher fast immer über dem der Kontrollgruppe lag, sinkt es im besagten Zeitraum unter die Werte der Kontrollgruppe. Auch der Fellindex scheint bei der HTE-Gruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe etwas schneller anzusteigen (zwischen Versuchstag 50 und 60). Ebenso liegen die Werte des Testisindex und des Zyklusstadiums der HTE-Gruppe ab dem 60. Versuchstag unter denen der Kontrollgruppe. Diese Befunde könnten darauf hinweisen, daß sich eine *Hypericum*-Behandlung mit einer höheren Dosis eventuell beschleunigend auf die Anpassungsvorgänge an kurze Photoperiode auswirken könnte. Zur Bestätigung dieser Hypothese müßten allerdings weiterführende Untersuchungen angestellt werden.

In jedem Falle aber wirkte sich die *Hypericum*-Fütterung im Kurztag anders aus als bei langtagadaptierten Hamstern. Offensichtlich wird also die Wirkung der Johanniskraut-Fütterung durch die Photoperiode moduliert. Da jedoch die Kurztag-Akklimatisation bei *Phodopus* mit drastischen physiologischen Umstellungen des Organismus verbunden ist, ist der Befund einer veränderten Sensitivität gegenüber der *Hypericum*-Behandlung im Kurztag nicht verwunderlich. Auch andere Faktoren, wie z. B. die Leptin-Sensitivität werden bei *Phodopus* durch die Anpassung an kurze Photoperiode verändert (KLINGENSPOR et al. 2000). Leptin wird von Adipocyten

sezerniert und reflektiert den Körperfettgehalt. Damit spielt Leptin eine wichtige Rolle für die Körpergewichtsregulation. Während das Körpergewicht im Kurztag reduziert wird, nimmt die Leptin-Sensitivität zu. Auch die Sensitivität der Hypothalamus-Hypophysen-Achse für die negative Rückkopplungswirkung von Testosteron wird beim Hamster durch Anpassung an kurze Photoperiode erhöht (ELLIS und TUREK 1979). So ist im Kurztag schon ein relativ geringer Testosteron-Spiegel ausreichend, um die Gonadotropin-Produktion zu hemmen, während im Langtag die Sensitivität so stark erniedrigt ist, daß auch bei erhöhtem Testosteron-Spiegel Gonadotropine produziert werden.

Die aMT6s-Exkretion ist im Kurztag deutlich höher als im Langtag (sowohl die Dauer, als auch die Amplitude), während die Sensitivität gegenüber Hypericum offenbar erniedrigt ist. Der erhöhte aMT6s-Level im Kurztag könnte demnach eine geringere Empfindlichkeit gegenüber der Hypericum-Wirkung bedeuten; es wären also höhere HTE-Dosierungen nötig, um einen den Langtagbedingungen entsprechenden Effekt zu erzielen. Die neuroendokrinen Mechanismen, die im Zentralnervensystem zu einer Modulation der Hormonsensitivitäten führen, sind nicht bekannt.

4.4 Mögliche Wirkmechanismen von Hypericum

Daß Johanniskraut einen Effekt auf den Melatonin-Stoffwechsel hat, steht inzwischen außer Frage. Fraglich ist aber, an welcher Stelle des Melatonin-Metabolismus Hypericum eingreift. Wird die Synthese oder die Metabolisierung von Melatonin beeinflusst?

Als Index für die Melatonin-Synthese wurde die Enzymaktivität der NAT im Pinealorgan gemessen; desweiteren wurde Melatonin selbst im Plasma bestimmt und zusätzlich die Tagesrhythmik der aMT6s-Exkretion im Urin. Während die NAT-Aktivität unverändert blieb (Abb.37; durch ein Minuszeichen symbolisiert), wurden sowohl der Plasma-Melatonin-Spiegel, als auch die aMT6s-Exkretion durch Johanniskraut-Fütterung erniedrigt (Abb. 37; durch einen nach unten zeigenden Pfeil gekennzeichnet). Welche Ursache könnte diesen Befunden zugrunde liegen? Wie lassen sich die gewonnenen Resultate interpretieren?

Die Reduktion des Melatonin-Spiegels im Blutplasma Dsungarischer Zwerghamster nach Hypericum-Fütterung könnte durch eine Hemmung der Melatonsynthese zu erklären sein. Die Aktivität des Schlüsselenzyms dieses Syntheseweges wurde aber

durch *Hypericum* nicht beeinflusst, was dieser These zunächst widersprechen würde. Die NAT spielt zweifelsfrei eine zentrale Rolle im Syntheseweg von Melatonin. So konnte im Rahmen dieser Arbeit gezeigt werden, daß die Messung der NAT-Aktivität einen zuverlässigen Parameter für die Melatonin-Tagesperiodik darstellt. Sie korreliert unter Kontrollbedingungen sowohl mit dem aMT6s-Maximum, als auch mit der Plasma-Melatonin-Konzentration. Allerdings gelten diese Ergebnisse ausschließlich für unbehandelte Zwerghamster; wie sich das für HTE-gefütterte Hamster verhält, ist nicht geklärt. Man sollte darüber hinaus nicht außer Acht lassen, daß die NAT-Aktivität *in vitro* gemessen wurde; das Resultat kann deshalb nicht ohne weiteres auf den Organismus übertragen werden. Andererseits könnte aber zum Beispiel auch die Aktivität der HIOMT oder eines anderen Enzyms der Melatoninsynthese durch HTE gehemmt werden. Ein weiterer Erklärungsansatz bestünde in der Annahme, daß die Aufnahme von Tryptophan aus dem Blut in die Pinealocyte durch Johanniskraut inhibiert werden könnte. Allerdings liegt das Pinealorgan Dsungarischer Zwerghamster außerhalb der Blut-Hirn-Schranke, so daß Tryptophan diese nicht passieren muß. Trotzdem könnte durch HTE die Tryptophanaufnahme behindert oder aber auf andere Art und Weise die Tryptophanverfügbarkeit beeinträchtigt werden. So könnte zum Beispiel Tryptophan an anderer Stelle verstärkt aufgenommen werden. Alle genannten Möglichkeiten würden jedenfalls einen erniedrigten Plasma-Melatonin-Spiegel und eine erniedrigte aMT6s-Ausscheidung verursachen, ohne die NAT-Aktivität zu verändern.

Wenn aber die durch *Hypericum* unveränderte NAT-Aktivität als Indiz einer unbeeinflussten Melatoninsynthese interpretiert würde, müßten alternative Wirkmechanismen, die der Synthese nachgeschaltet sind, für die gesenkte Plasma-Melatonin-Konzentration nach HTE-Fütterung verantwortlich sein. So könnte man zum Beispiel in Betracht ziehen, daß Melatonin unter Johanniskrautwirkung nicht mehr zum Großteil zu aMT6s metabolisiert würde, sondern stattdessen zu 6-Hydroxy-melatonin-Glucuronid. Dieses Endprodukt der Melatonin-Verstoffwechslung entsteht normalerweise nur zu einem geringen Prozentsatz. Bei der Hausmaus werden beispielsweise 70-80% des Melatonins zu aMT6s abgebaut, wohingegen nur etwa 5% des hydroxylierten Melatonins an Glucuronsäure konjugiert ausgeschieden werden (KOPIN et al. 1961). Das Verhältnis von Sulfat zu Glucuronid ist aber artspezifisch und für den Dsungarischen Zwerghamster nicht genau bekannt. STIEGLITZ et al. (1994) ermittelten für diese Spezies aMT6s-Mengen zwischen 58% und 77%. Durch HTE-Fütterung könnte das Verhältnis beider Endprodukte aber

zugunsten des Glucuronids verschoben werden, was eine erniedrigte aMT6s-Exkretion bei unbeeinflusster NAT-Aktivität zur Folge hätte. Die durch *Hypericum* signifikant erniedrigte Plasma-Melatonin-Konzentration Dsungarischer Zwerghamster ließe sich jedoch nur damit erklären, daß nicht nur vermehrt 6-Hydroxymelatonin-Glucuronid entsteht, sondern der Melatonin-Abbau insgesamt drastisch verstärkt werden müßte. Durch einen potenzierten Abbau des Pinealhormons zu Glucuronid käme sowohl ein niedrigerer Melatonin-Spiegel im Plasma zustande, als auch eine reduzierte aMT6s-Ausscheidung, während die NAT-Aktivität im Pinealorgan unverändert bliebe. Diese Interpretationsmöglichkeit liefert also ebenfalls eine geeignete Erklärung für die im Rahmen dieser Studie gewonnenen Resultate. Ob *Hypericum* letztendlich die Melatonsynthese hemmt oder aber den Melatonin-Metabolismus forciert, konnte aber anhand der hier angestellten Untersuchungen nicht eindeutig geklärt werden und muß daher offen bleiben.

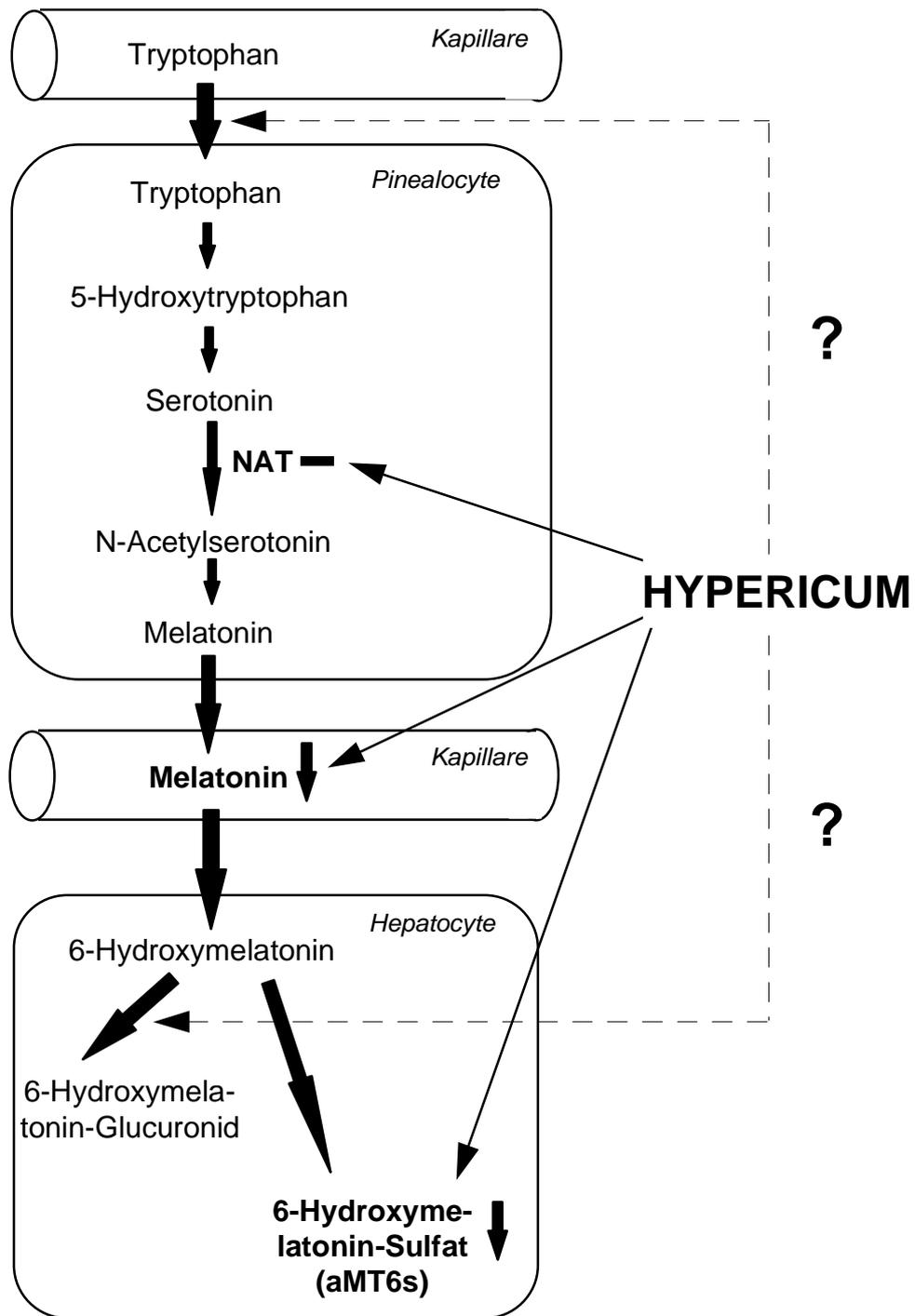


Abb. 37: Schema zu den Wirkungen und den möglicherweise zugrunde liegenden Wirkmechanismen von Hypericum auf die Melatonin-Tagesperiodik des Dsungarischen Zwerghamsters (NAT: N-Acetyltransferase).

4.5 Rolle der Melatonin-Amplitude

Welche Bedeutung könnte die durch HTE-Fütterung erzielte Erniedrigung der Plasma-Melatonin-Konzentration und der aMT6s-Exkretion für den Organismus haben? Welche Funktion kommt der Amplitude des Melatoninsignals zu, und durch welche Faktoren wird sie reguliert?

Daß sich die Melatonin-Amplitude Dsungarischer Zwerghamster im Kurztag erhöht, ist bekannt. Aber nicht nur die Photoperiode beeinflusst die Signal-Amplitude; es gibt noch andere Faktoren, die diesen Parameter regulieren. So führt Kälteexposition im Langtag zu einer Erhöhung der Melatonin-Amplitude; zum einen durch erhöhte NAT-Aktivität (STIEGLITZ et al. 1994), zum anderen auch durch erhöhte aMT6s-Exkretion (STIEGLITZ et al. 1994; eigene Daten, unveröffentlicht). Die Umgebungstemperatur ist also in der Lage, die Melatonin-Amplitude unabhängig von der Photoperiode zu beeinflussen. Hypericum zeigt einen gegenteiligen Effekt auf die Melatonin-Amplitude; sie wird im Langtag drastisch erniedrigt. Es wäre nun interessant zu klären, ob sich beide Wirkungen gegenseitig aufheben. Beide Effekte unterscheiden sich allerdings hinsichtlich der NAT-Aktivität. Kälte induziert eine erhöhte NAT-Aktivität, während durch Hypericum-Fütterung dagegen die NAT-Aktivität unverändert bleibt. Daraus läßt sich schließen, daß beide Wirkungen verschiedenen Regulationsmechanismen unterliegen.

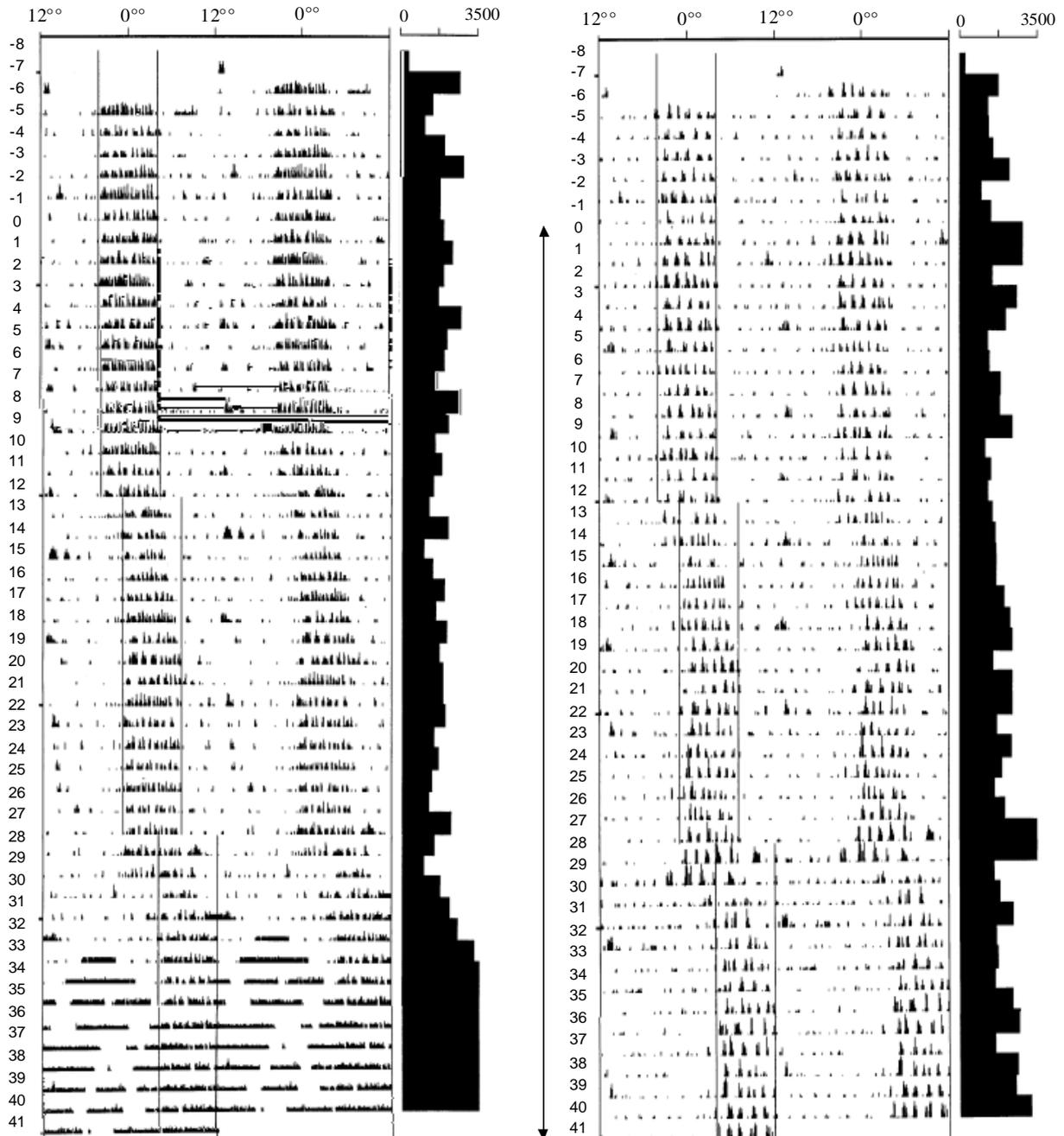
Durch HTE-Fütterung wurde die im Blut zirkulierende Melatonin-Menge maßgeblich reduziert. Da Melatonin als Hormon der inneren Uhr eine wichtige Rolle für die circadiane Rhythmik spielt, lag die Frage nahe, ob die durch Johanniskraut verminderte Melatonin-Amplitude Folgen für den Verlauf der Körpertemperatur und die lokomotorische Aktivität Dsungarischer Zwerghamster haben könnte. Beide Parameter werden von der inneren Uhr gesteuert und weisen ein ausgeprägtes tagesperiodisches Muster auf. Zur Klärung dieser Frage wurden in einer Studie von PATZELT und KLIER (bisher unveröffentlicht) sowohl die Körpertemperatur durch intraperitoneal implantierte Temperaturtransmitter, als auch die lokomotorische Aktivität mittels Infrarot-Bewegungsmelder vor und während einer HTE-Fütterung im Langtag kontinuierlich aufgezeichnet. Der Verlauf der Körpertemperatur blieb durch Hypericum unbeeinflusst; es zeigte sich aber während der Hypericum-Fütterung eine erniedrigte lokomotorische Aktivität gegenüber der Kontrollfütterung, die durch einen verzögerten Aktivitätsbeginn nach Eintreten der Dunkelphase zustande kam,

während Dauer und Ende der Aktivitätsphase unverändert blieben. Diese Wirkung von HTE erinnert an den ebenfalls leicht verzögerten Anstieg in der aMT6s-Exkretion durch Johanniskraut, die in der vorliegenden Arbeit dokumentiert wurde und sich im gerade beschriebenen Experiment erneut bestätigte. HTE-Fütterung wirkt sich also in vergleichbarer Weise auf die Melatonin-Tagesperiodik und die lokomotorische Aktivität Dsungarischer Zwerghamster aus, was auf einen direkten Zusammenhang beider Parameter schließen läßt. Demnach könnte also die Melatonin-Amplitude eine Rolle für die Regulation der lokomotorischen Aktivität spielen. Wenn eine durch Johanniskraut erniedrigte Melatonin-Amplitude eine reduzierte lokomotorische Aktivität zur Folge hat, müßte eine erhöhte Melatonin-Amplitude eine gesteigerte lokomotorische Aktivität hervorrufen. Wie schon erwähnt, bedingt Kälte eine Erhöhung der Melatonin-Amplitude. Der Hypothese entsprechend zeigt sich unter Kälteexposition tatsächlich eine Steigerung der lokomotorischen Aktivität (RUF et al. 1990).

Zum anderen könnte die Melatonin-Amplitude aber auch eine Rolle für die Synchronisation der circadianen Rhythmik spielen. Der Schrittmacher der inneren Uhr hat eine Periodenlänge, die von der äußeren 24h-Tagesperiodik abweicht. Über die Wahrnehmung der Photoperiode und der Produktion des Pinealhormons Melatonin wird dieser endogene circadiane Rhythmus mit dem 24-Tag synchronisiert. Die Amplitude des Melatoninsignals könnte ein Maß für die Intensität des Entrainments der endogenen Rhythmen sein: je höher der Melatoninspiegel, desto starrer der Rhythmus, je geringer aber die Melatonin-Amplitude, desto flexibler wäre die endogene Rhythmik. Ein solcher Interpretationsansatz ließe sich bekräftigen, indem die Wirkung einer HTE-Fütterung bei Phasenverschiebungen der Photoperiode untersucht würde. Der Hypothese zufolge müßte eine HTE-Fütterung Dsungarischer Zwerghamster die Anpassung an einen Phasensprung des Licht-Dunkel-Wechsels begünstigen.

Durch ein entsprechendes Experiment von PATZELT und KLIER (bisher unveröffentlicht) ließ sich oben angestellte Vermutung tatsächlich beweisen (Abb. 38). Die lokomotorische Aktivität einer Kontrollgruppe und einer mit HTE gefütterten Gruppe (6 mg/Tag) wurde durch Infrarot-Bewegungsmelder kontinuierlich aufgezeichnet. Zunächst wurden alle untersuchten Zwerghamster einer um 3 h nach hinten verschobenen Photoperiode ausgesetzt, der sowohl mit HTE-gefütterte als auch unbehandelte Hamster in ihrem lokomotorischen Aktivitätsmuster folgen

konnten. Durch einem erneuten Phasenshift um 5 h nach hinten wurde jedoch bei 7 von 8 Zwerghamstern, die mit Kontrolldiät gefüttert wurden, die circadiane Rhythmik zerstört, während alle mit HTE gefütterten Hamster ihr Aktivitätsmuster auch diesem



5-h-Phasensprung anpassen konnten.

Abb. 38: Doppelplot-Darstellung der lokomotorischen Aktivität im Verlauf der verschiedenen Phasenverschiebungen, exemplarisch von einem Kontrollhamster (links) und einem mit HTE gefütterten Hamsters (rechts); der Zeitraum der HTE-Fütterung ist durch den schwarzen Pfeil markiert. In der ersten Zeile sind die Meßwerte von Stunde 0-48 aufgetragen; in der zweiten Zeile Stunde 24-72 usw.; die senkrechten schwarzen Linien markieren die Dunkelphase. Die

schwarzen Balken geben die Gesamtaktivität pro Tag wieder. Nach Daten von PATZELT und KLIER, unveröffentlicht.

Eine erniedrigte Melatonin-Amplitude erleichtert also die Resynchronisation nach einem Phasensprung. Ähnliche Effekte werden in der Literatur durch Melatonin-Behandlung beschrieben; so zum Beispiel von HAU und GWINNER (1994) bei Hausspatzen und von MARUMOTO et al. (1996) bei Ratten. Beide Spezies konnten durch implantierte Melatonin-Pumpen Phasensprüngen der Photoperiode leichter folgen als unbehandelte Kontrolltiere. Auf den ersten Blick scheinen diese Ergebnisse im Widerspruch zu den Ergebnissen des Phasensprung-Experimentes bei Dsungarischen Zwerghamstern zu stehen, da die Hausspatzen und Ratten durch eine kontinuierliche Zufuhr von Melatonin resynchronisiert wurden, die Hamster dagegen durch eine Erniedrigung der Melatonin-Amplitude. Allerdings bewirken beide Effekte eine Abschwächung des Melatoninsignals, zum einen durch eine drastische Erhöhung und damit Überlagerung des Melatoninrhythmus, zum anderen durch eine starke Erniedrigung der Melatonin-Amplitude und damit Unterdrückung des Melatoninrhythmus (Abb. 39). Durch beide Wirkungen wird also die Oszillation des endogenen Rhythmus gesenkt und damit die Sensitivität des circadianen Systems gegenüber Zeitgeber-Stimuli erhöht.

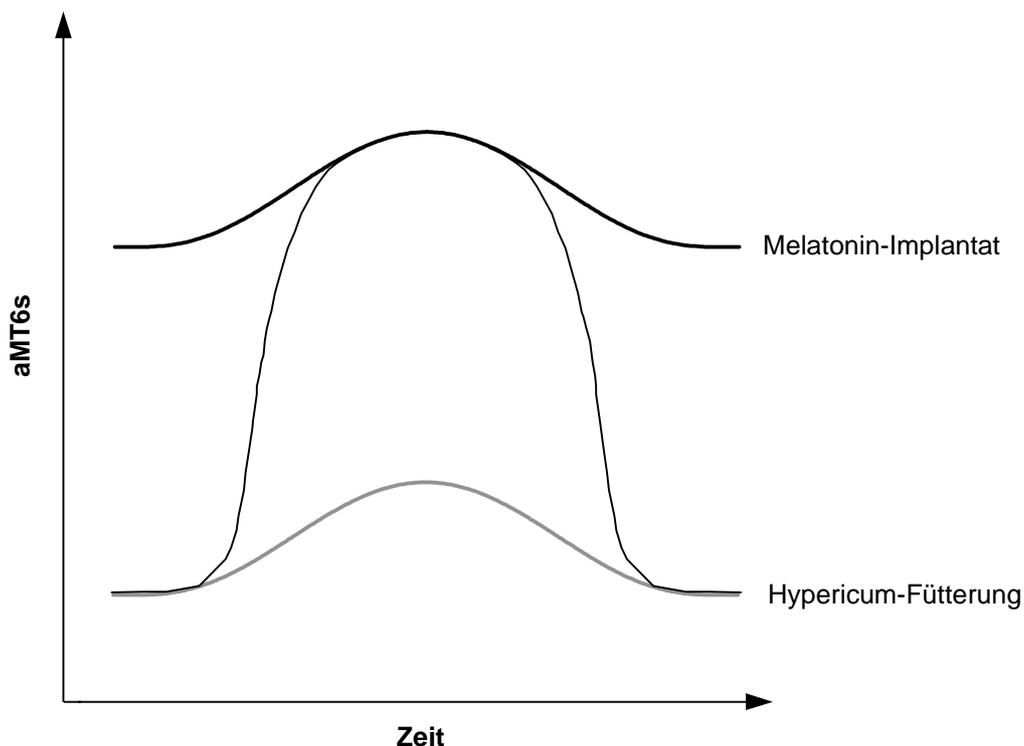


Abb. 39: Schema zur Wirkung der Johanniskraut-Fütterung im Vergleich zu einer Melatonin-Implantation. Die dünne schwarze Linie kennzeichnet den Verlauf der aMT6s-Exkretion unter Kontrollbedingungen, die dickere graue Linie den Verlauf nach Hypericum-Fütterung und die dickere schwarze Linie nach Implantation einer Melatonin-Pumpe.

4.6 Effekt von Hypericum auf die Melatonin-Tagesperiodik als antidepressives Wirkprinzip?

Wie in der Einleitung bereits dargelegt, gibt es eine Reihe überzeugender Argumente, die Depressionen mit einer Störung der inneren Uhr in Verbindung bringen. Wie könnte in diesem Zusammenhang die Wirkung von Johanniskraut auf die Melatonin-Tagesperiodik interpretiert werden? Beruht auf diesem Effekt auf das zentrale Hormon der inneren Uhr vielleicht sogar die antidepressive Wirkung der Heilpflanze?

Bei depressiven Patienten scheint die Synchronisation der endogenen Rhythmen mit dem äußeren 24h-Tag gestört zu sein. Wenn man der antidepressiven Wirksamkeit von Hypericum die Erniedrigung der Melatonin-Amplitude zugrunde legt, könnte das bedeuten, daß eine gesenkte Melatonin-Amplitude eine Resynchronisation erleichtern würde. Die zuvor gezeigten Resultate des Phasensprung-Experimentes bei Dsungarischen Zwerghamstern bestätigen die Annahme, daß die Erniedrigung der Melatonin-Amplitude durch Johanniskraut eine Anpassung an eine veränderte Photoperiode erleichtert. Auf die gleiche Weise könnte auch die Resynchronisation des endogenen Rhythmus depressiver Patienten mit der 24h-Tagesperiodik ermöglicht werden. Das wiederum würde bedeuten, daß die Erniedrigung der Melatonin-Amplitude Grundlage des antidepressiven Wirkmechanismus von Hypericum sein könnte.

4.7 Perspektiven

Wie zuvor ausführlich dargelegt, ist die Rolle der Melatonin-Amplitude bislang nicht geklärt. Auch über die Regulation der Signal-Amplitude ist wenig bekannt. Die hier dokumentierte klare Erniedrigung der Melatonin-Amplitude durch Johanniskraut macht es möglich, weiterführende Experimente zu kreieren, die zur Aufklärung der Funktion der Melatonin-Amplitude und deren Regulation beitragen.

Die Effekte von Hypericum auf die Melatonin-Tagesperiodik, die in dieser Arbeit charakterisiert wurden, könnten zur Qualitätssicherung von Johanniskraut-Präparaten herangezogen werden. Wenn man davon ausgeht, daß die Erniedrigung des Plasma-Melatonin-Spiegels und der aMT6s-Exkretion durch Hypericum-Behandlung Indices für die Effektivität der Pflanzenzubereitungen sind, könnte im Tierexperiment schnell und zuverlässig die Qualität einzelner Chargen getestet

werden. Ein im Rahmen dieser Arbeit verwendeter HTE erwies sich als unwirksam, obwohl er sich bezüglich des Herstellungsverfahrens nicht von den wirksamen Extrakten unterschied und außerdem auf bestimmte Inhaltsstoffe standardisiert wurde. Diese Tatsache bedeutet, daß die bisher angewandten Methoden zur Qualitätssicherung unzureichend sind. Darüber hinaus werden Johanniskraut-Präparate von zahlreichen Herstellern angeboten, die sich hinsichtlich des Herstellungsverfahrens und der Herkunft des Pflanzenmaterials unterscheiden, was eine absolut zuverlässige Qualitätsprüfung unerlässlich macht. Da aber weder die für die Wirkung von Johanniskraut verantwortlichen Inhaltsstoffe, noch die Wirkmechanismen bekannt sind, wurde eine sichere Standardisierung der Pflanzenextrakte bisher enorm erschwert. Die in der vorliegenden Arbeit gezeigte Wirkung von Hypericum auf Melatonin könnte nun als Kriterium für die Wirksamkeit der Hypericum-Präparate herangezogen werden und somit eine einfache und verlässliche Qualitätssicherung ermöglichen.

Wenn man die Wirkung von Johanniskraut auf die Melatonin-Tagesperiodik mit der antidepressiven Wirkung dieser Heilpflanze in Verbindung bringt, bestätigt sich darin der in der Einleitung dargelegte Zusammenhang zwischen dem Krankheitsbild von Depressionen und einer Störung der circadianen Rhythmik und gibt damit Anlaß zu medizinischen und chronobiologischen Forschungsprojekten in dieser Hinsicht.

5 Zusammenfassung

Melatonin ist der neuroendokrine Übermittler der Photoperiode, die eine wichtige Rolle bei der Synchronisation circadianer Rhythmen spielt. Circadiane Rhythmen werden über die Wahrnehmung der Photoperiode zum einen intern aufeinander abgestimmt und zum anderen mit dem 24h-Tag synchronisiert. Der tägliche Licht-Dunkel-Wechsel spielt außerdem eine zentrale Rolle bei der Winteranpassung von Kleinsäugetieren wie dem Dsungarischen Zwerghamster (*Phodopus sungorus*). Dabei ist die Dauer der nächtlichen Melatonin-Sekretion das Signal, das die Länge der Nacht codiert und damit auch der entscheidende Faktor, der für die Auslösung der Winteranpassungen verantwortlich ist. Welche Bedeutung der Amplitude des Melatonin-Signals zukommt und wie sie reguliert wird, ist bisher nicht geklärt.

Ein Hinweis darauf, daß Johanniskraut (*Hypericum perforatum*) die Melatonin-Amplitude beim Menschen beeinflussen könnte, gab Anlaß dazu, diesen Hinweis am Dsungarischen Zwerghamster zu überprüfen und dadurch sowohl die Funktion der Melatonin-Amplitude als auch die Wirkungsweise von Johanniskraut zu untersuchen. Dazu wurde den Hamstern Hypericum-Trockenextrakt (HTE) in unterschiedlichen Dosierungen über das Futter verabreicht und die Exkretion des Hauptabbauproduktes von Melatonin (aMT6s) im Urin bestimmt. Desweiteren wurde die Aktivität des Schlüsselenzyms der Melatonin-Synthese, der N-Acetyltransferase (NAT), im Pinealorgan gemessen. Außerdem wurde der Melatoninspiegel im Blutplasma bestimmt. Dabei sollten auch die Fragen geklärt werden, ob es geschlechtsspezifische Unterschiede einer möglichen Hypericum-Wirkung auf die Melatonin-Tagesperiodik gibt und ob es Wechselwirkungen zwischen der Photoperiode und der Hypericum-Wirkung gibt.

Die Verabreichung von HTE über das Futter hatte zwar den Nachteil, daß keine exakt definierte und für alle Hamster gleiche Menge an HTE appliziert werden konnte. Im Gegensatz zu Injektionen stellte die Methode der HTE-Fütterung allerdings eine nicht-invasive Alternative dar, die mit keinerlei Streß für die Zwerghamster verbunden war. Außerdem stellte sich heraus, daß die tatsächlich über das Futter aufgenommene HTE-Dosis fast exakt der errechneten Sollmenge entsprach. Vor allem die klaren Resultate belegen, daß die HTE-Fütterung eine geeignete Methode war.

Die 3-tägige Fütterung einer Tagesdosis von 3 mg HTE führte bei im Langtag gehaltenen Dsungarischen Zwerghamstern zu einer Reduktion der Melatonin-Amplitude um etwa 50%. Dabei wurde sowohl das aMT6s-Maximum, als auch die gesamte aMT6s-Tagesproduktion drastisch erniedrigt. Außerdem konnte bei einzelnen Hamstern eine leichte Phasenverschiebung des aMT6s-Rhythmus in den Morgen beobachtet werden. Auf die Dauer der nächtlichen aMT6s-Ausscheidung und die aMT6s-Exkretion am Tage konnten keine Auswirkungen von Johanniskraut festgestellt werden. Auch gab es keine geschlechtsspezifischen Unterschiede bezüglich der Hypericum-Wirkung; die Fütterung von HTE wirkte sich in gleichem Maße auf männliche wie auf weibliche Zwerghamster aus.

Der Zeitverlauf der Johanniskraut-Wirkung zeichnete sich durch eine kontinuierliche Erniedrigung des aMT6s-Maximums während der ersten Woche der HTE-Fütterung aus. Nach 6 Tagen Hypericum-Fütterung wurde das aMT6s-Maximum um mehr als 60% gesenkt. Nach Erreichen dieses Minimums stieg die aMT6s-Amplitude wieder an, bis sie nach etwa 2-3 Wochen erneut das Kontrollniveau erreichte. Die Wirkung von Hypericum auf die 24h-Produktion von aMT6s zeigte einen analogen Zeitverlauf. Es hat den Anschein, als ob nach der anfänglichen Reduktion der aMT6s-Amplitude adaptive Prozesse greifen, die diese Wirkung reversibel machen.

Außer der 3 mg-Dosierung wurden weitere HTE-Mengen von 1.5 mg, 6 mg und 10 mg eingesetzt, um zu prüfen, ob die Wirkung von Johanniskraut auf die Melatonin-Tagesperiodik dosisabhängig ist. Die Resultate ergaben sowohl für das aMT6s-Maximum, als auch für die aMT6s-Tagesproduktion einen statistisch hochsignifikanten Zusammenhang zwischen HTE-Dosis und -Wirkung. Das Ausmaß der Erniedrigung der aMT6s-Exkretion hängt also von der verabreichten Johanniskraut-Menge ab. Diese dosisabhängige Wirkung könnte zukünftig als wichtiges Kriterium für die Wirksamkeit von Hypericum-Präparaten gelten.

Die 7-tägige Fütterung einer Tagesdosis von 10 mg HTE hatte keine Auswirkungen auf die NAT-Aktivität im Vergleich zu unbehandelten Hamstern. Die erniedrigte aMT6s-Amplitude resultiert also nicht aus einer durch Hypericum gehemmten NAT-Aktivität; der Angriffsort von Johanniskraut muß daher an einer anderen Stelle der Reaktionskaskade der Melatonin-Synthese oder -Metabolisierung liegen. Ein Vergleich des Plasma-Melatonin-Spiegels beider Gruppen ergab jedoch eine signifikante Erniedrigung durch HTE-Fütterung gegenüber den mit Kontrolldiät

gefütterten Hamstern. Obwohl also das Schrittmacherenzym der Melatonin-Synthese durch Johanniskraut unbeeinflusst bleibt, steht dem Organismus nach HTE-Einwirkung deutlich weniger im Blut zirkulierendes Melatonin zur Verfügung. Johanniskraut verringert demzufolge nicht nur das Hauptabbauprodukt des Melatonins im Urin, sondern auch Melatonin selbst im Blutplasma.

Bei im Kurztag gehaltenen Zwerghamstern zeigte eine 3-tägige HTE-Fütterung von 3 mg pro Tag keine Effekte, die mit der im Langtag dokumentierten Wirkung vergleichbar wären. Lediglich eine leichte Verzögerung des nächtlichen aMT6s-Anstiegs konnte festgestellt werden. Auch eine längerfristige HTE-Fütterung während der Kurztaganpassung beeinflusste in keiner Weise den Verlauf der Körpergewichtsreduktion, der Fellumfärbung und der Gonadeninvolution. Diese Befunde sprechen dafür, daß es in der Tat zu Wechselwirkungen zwischen Hypericum und der Photoperiode kommt, wodurch sich der Extrakt dieser Heilpflanze also unter verschiedenen Licht-Dunkel-Wechseln unterschiedlich auswirkt. Die in kurzer Photoperiode deutlich erhöhte Melatonin-Amplitude scheint gegenüber der im Langtag gezeigten drastischen Erniedrigung durch Johanniskraut resistent zu sein.

In dieser Arbeit konnte erstmals gezeigt werden, daß Johanniskraut die Melatonin-Tagesperiodik Dsungarischer Zwerghamster beeinflusst. Die Charakterisierung dieser Wirkung ist ein Beitrag zur Aufklärung der bisher unbekanntenen Wirkmechanismen von Johanniskraut. Es gibt eine Reihe überzeugender Argumente dafür, daß die Wirkung von Johanniskraut etwas mit dem photoperiodischen Informationstransfer zu tun haben muß. Die drastische Erniedrigung der Melatonin-Amplitude durch Hypericum könnte Grundlage der antidepressiven Wirkung des Pflanzenextraktes sein. Darüber hinaus macht das in der vorliegenden Arbeit etablierte Testverfahren es möglich, die Wirksamkeit von Johanniskraut-Extrakten einfach und zuverlässig im Tiermodell zu bestimmen. Außerdem können anhand der dosisabhängigen Hypericum-Wirkung auf die aMT6s-Exkretion - wie bereits erwähnt - verschiedene Extrakte und Chargen verglichen und standardisiert werden.

6 LITERATURVERZEICHNIS

ALDHOUS ME, ARENDT J (1988) Radioimmunoassay for 6-sulphatoxymelatonin in urine using an iodinated tracer. *Ann. Clin. Biochem.* 25:298-303.

ARENDT J, BOJKOWSKI C, FRANEY C, WRIGHT J, MARKS V (1985) Immunoassay of 6-hydroxymelatonin sulphate in human plasma and urine: abolition of the urinary 24-hour rhythm with atenolol. *J Clin Endocrinol Metab* 60:1166-1173.

BARTNESS TJ, GOLDMAN BD (1988) Peak duration of serum melatonin and short-day responses in adult Siberian hamsters. *Am J Physiol* 255:R812-R822.

BECKER (1981) Einfluß der Photoperiode auf die Kontrolle des Körpergewichtes beim Dsungarischen Hamster (*Phodopus sungorus*). Diplomarbeit, Johann-Wolfgang-Goethe-Universität Frankfurt am Main, unveröffentlicht.

BITTMAN EL, DEMPSEY RJ, KARSCH FJ (1983) Pineal melatonin secretion drives the reproductive response to daylength in the ewe. *Endocrinology* 113:2276-2283.

BITTMANN EL (1993) The sites and consequences of melatonin binding (uenc :2270.002

- CHATTERJEE SS, BHATTACHARYA SK, WONNEMANN M, SINGER A, MÜLLER WE (1998) Hyperforin as a possible antidepressant component of hypericum extracts. *Life Science* 63 (6):499-510.
- DEGUCHI T, AXELROD J (1972) Sensitive assay for serotonin N-acetyltransferase activity in rat pineal. *Anal Biochem* 50:174-179.
- DEMISCH L (1990) Influences of nocturnal light impulses of different intensities on melatonin secretion before and after subchronic administration of Hyperforat in healthy volunteers. Vth Colloq of EPSG, book of abstract no. 138.
- ELLIS GB und TUREK FW (1979) Time course of the photoperiod-induced change in sensitivity of the hypothalamic-pituitary axis to testosterone feedback in castrated male hamsters. *Endocrinology* 104:625-630.
- ERNST E (1995) St. John's wort, an anti-depressant? A systematic, criteria-based review. *Phytomedicine* 2:67-71.
- FIGALA J, HOFFMANN K, GOLDAU G (1973) Zur Jahresperiodik beim Dsungarischen Zwerghamster *Phodous sungorus* (Pallas). *Oecologia* 12:89-118.
- FRASER S, COWEN P, FRANKLIN M, FRANEY C, ARENDT J (1983) Direct radioimmunoassay for melatonin in plasma. *Clinical Chem* 29 (2):396-397.
- GORE AC (1998) Circadian rhythms during aging. In: MOBBS CV, HOF PR (eds) *Functional Endocrinology of Aging* 29:127-165, *Interdiscipl Top Gerontol*. Karger, Basel.
- HAU M und GWINNER E (1995) Continuous melatonin administration accelerates resynchronization following phase shifts of a light-dark-cycle. *Physiol Behav* 58 (1):89-95.

- HELDMAIER G (1989) Seasonal acclimation of energy requirements in mammals: functional significance of body weight control, hypothermia, torpor and hibernation. In: WIESER W, KNAIGER E (Hrsg) Energy Transformations in Cells and Organisms, pp 130-139. Thieme, Stuttgart.
- HELDMAIER G, BÖCKLER H, BUCHBERGER A, LYNCH GR, PUCHALSKI W, STEINLECHNER S, WIESINGER H (1985) Seasonal acclimation and thermogenesis. In: GILLES R (Hrsg) Circulation, Respiration and Metabolism. Current Comparative Approaches, pp 490-501, Springer Verlag.
- HELDMAIER G, LYNCH GR (1986) Pineal involvement in thermoregulation and acclimatization. Pineal Research Reviews 4:97-139.
- HELDMAIER G, STEINLECHNER S (1981a) Seasonal control of energy requirements for thermoregulation in the Djungarian hamster (*Phodopus sungorus*), living in natural photoperiod. J Comp Physiol B 142:429-437.
- HELDMAIER G, STEINLECHNER S (1981b) Seasonal pattern and energetics of short daily torpor in the Djungarian hamster *Phodopus sungorus*. Oecologia 48:265-270.
- HELDMAIER G, STEINLECHNER S, RUF T, WIESINGER H, KLINGENSPOR M (1989) Photoperiod and thermoregulation in vertebrates: body temperature rhythms and thermogenic acclimation. J Biol Rhythms 4 (2):1-15.
- HOFFMANN K (1973) The influence of photoperiod and melatonin on testis size, body weight and pelage colour in the Djungarian hamster (*Phodopus sungorus*). J. Comp. Physiol. 85:267-282.
- HOFFMANN K (1979) Photoperiodic effects in the Djungarian Hamster: one minute of light during darktime mimics influence of long photoperiods on testicular recrudescence, body weight and pelage colour. Experientia 35:1529-1530.

- HOFFMANN K, ILLNEROVA H, VANECEK J (1985) Comparison of melatonin rhythms young, adult and old Djungarian hamsters (*Phodopus sungorus*) under long and short photoperiods. *Neurosci Lett* 56:39-43.
- HÖLZL J, SATTLER S, SCHÜTT H (1994) Johanniskraut: eine Alternative zu synthetischen Antidepressiva? *Pharmazeutische Zeitschrift* 46:3959-3977.
- ILLNEROVA H, HOFFMANN K, VANECEK J (1984) Adjustment of pineal melatonin and N-acetyltransferase rhythms to change from long to short photoperiod in the Djungarian hamster *Phodopus sungorus*. *Neuroendocrinology* 38:226-231.
- KLEIN DC und WELLER JL (1970) Indole metabolism in the pineal gland: a circadian rhythm in N-acetyltransferase. *Science* 169:1093-1095.
- KLEIN DC und WELLER JL (1972) Rapid light-induced decrease in pineal serotonin N-acetyltransferase activity. *Science* 177:532-533.
- KLINGENSPOR M, NIGGEMANN H, HELDMAIER G (2000) Modulation of leptin sensitivity by short photoperiod acclimation in the Djungarian hamster, *Phodopus sungorus*. *J Comp Physiol B* 170:37-43.
- KOPIN IJ, PARE CMB, AXELROD J, WEISSBACH H (1961) The fate of melatonin in animals. *J Biol Chem* 236:3072-3075.
- LAAKMANN G, SCHULE C, BAGHAI T, KIESER M (1998) St. John's wort in mild to moderate depression: the relevance of hyperforin for the clinical efficacy. *Pharmacopsychiatry* 31 (Suppl), 102-107.
- LINDE K, RAMIREZ G, MULROW CD, PAULS A, WEIDENHAMMER W, MELCHART D (1996) St. John's Wort for depression: an overview and meta-analysis of randomized clinical trials. *Br Med J* 313:253-258.
- LOVEGROVE BG, HELDMAIER G, RUF T (1991) Perspectives of endothermy revisited: the endothermic temperature range. *J Therm Biol* 16 (4):185-209.

- MARUMOTO N, MURAKAMI N, KURODA H, MURAKAMI T (1996) Melatonin accelerates reentrainment of circadian locomotor activity rhythms to new light-dark-cycles in the rat. *Jpn J Physiol* 46 (4):347-351.
- MAYWOOD ES, BUTTERY RC, VANCE GHS, HERBERT J, HASTINGS MH (1990) Gonadal responses of the male Syrian hamster to programmed infusions of melatonin are sensitive to signal duration and frequency but not to signal phase nor to lesions of the suprachiasmatic nuclei. *Biol Reprod* 43:174-182.
- MAYWOOD ES, LINDSAY JO, KARP J, POWERS JB, WILLIAMS LM, TITCHENER L, EBLING FJP, HERBERT J, HASTINGS MH (1991) Occlusion of the melatonin-free interval blocks the short day gonadal response of the male Syrian hamster to programmed melatonin infusions of necessary duration and amplitude. *J Neuroendocrinology* 3:331-336.
- MÜLLER WE, SINGER A, WONNEMANN M, ROLLI M, SCHÄFER C, HAFNER U (1998) Wirkungen von standardisiertem Johanniskrautextrakt (LI 160) in biochemischen Modellen antidepressiver Wirksamkeit. *Psychopharmacotherapie* 8:40-45.
- NAHRSTEDT A, BUTTERWECK V (1997) Biological active and other constituents of the herb of *Hypericum perforatum* L. *Pharmacopsychiatry* 30: 129-134.
- NOWAK R, MCILLEN IC, REDMAN J, SHORT RV (1987) The correlation between serum and salivary melatonin concentrations and urinary 6-hydroxymelatonin sulphate excretion rates: two non-invasive techniques for monitoring human circadian rhythmicity. *Clin Endocrinol* 27:445-452.
- REITER RJ (1981) The mammalian pineal gland: structure and function. *Am J Anat* 162:287-313.
- REITER RJ, RICHARDSON BA, JOHNSON LY, FERGUSON BN, DINH DT (1980) Pineal melatonin rhythm: reduction in aging Syrian hamsters. *Science* 210:1372.

- RUF T (1991) Torpor beim Dsungarischen Zwerghamster (*Phodopus sungorus*) und der Hirschmaus (*Peromyscus maniculatus*): Saisonalität, Tagesperiodik und Energetik. Dissertation, Philipps-Universität Marburg.
- RUF T, KLINGENSPOR M, HELDMAIER G (1990) Jahreszeitliche Anpassung beim Dsungarischen Zwerghamster: die tagesperiodische Synchronisation von lokomotorischer Aktivität, Futteraufnahme und Torpor. Verh Dtsch Zool Ges: 549-550.
- STAFFELDT B, KERB R, BROCKMÖLLER J, PLOCH M, ROOTS I (1993) Pharmakokinetik von Hypericin und Pseudohypericin nach oraler Einnahme des Johanniskraut-Extraktes LI 160 bei gesunden Probanden. Nervenheilkunde 12:331-338.
- STEINLECHNER S, BUCHBERGER A, HELDMAIER G (1987) Circadian rhythms of pineal N-acetyltransferase activity in the Djungarian hamster, *Phodopus sungorus*, in response to seasonal changes in natural photoperiod. J Comp Physiol A 160:593-597.
- STEINLECHNER S, CHAMPNEY TH, HOUSTON ML, REITER RJ (1984) Simultaneous determination of N-acetyltransferase activity, hydroxyindole-O-methyltransferase activity and melatonin content in the pineal gland of the Syrian hamster. Poc Soc Exp Biol Med 175:93-97.
- STIEGLITZ A, GWINNER K, SPIEGELHALTER F, WICHEREK M, HELDMAIER G (1994) Urinary 6-sulphatoxymelatonin as an index of pineal function in the Djungarian hamster: influence of photoperiod and ambient temperature. In: MÖLLER M and PEVET P (eds) Advances in Pineal Research 8:285-291. John Libbey and Co., London.
- STIEGLITZ A, SPIEGELHALTER F, KLANTE G, HELDMAIER G (1995) Urinary 6-sulphatoxymelatonin excretion reflects pineal melatonin secretion in the Djungarian hamster (*Phodopus sungorus*). J Pineal Res 18:69-76.

- SUZUKI O, KATSUMATA Y, OYA M, BLADT S, WAGNER H (1984) Inhibition of monoamine oxidase by hypericin. *Planta Med* 3:272-274.
- TERMAN M, TERMAN JS, QUITKIN FM, MCGRATH JW, STEWART JW, RAFFERTY B (1989) Light therapy for seasonal affective disorder. *Neuropsychopharmacology* 2:1-22.
- VAN REETH O, OLIVARES E, ZHANG Y, TRIPATHI B, TUREK FW (1999) Chronobiotic effects of gepirone, a potential antidepressant with 5HT_{1a} receptor partial agonist properties. *Behavioural Pharmacology* 10:119-130.
- VANECEK J, PAVLIK A, ILLNEROVA H (1987) Hypothalamic melatonin receptor sites revealed by autoradiography. *Brain Res* 435:359-362.
- VITALE PM, DARROW JM, DUNCAN MJ, SHUSTAK CA, GOLDMANN BD (1985) Effects of photoperiod, pinealectomy and castration on body weight and daily torpor in Djungarian hamsters (*Phodopus sungorus*). *J Endocrinology* 106:367-375.
- VOLZ HP (1997) Controlled clinical trials of Hypericum extracts in depressed patients- an overview. *Pharmacopsychiatry* 30:72-76
- VOLZ HP, HÄNSEL R (1995) Hypericum (Johanniskraut) als pflanzliches Antidepressivum. *Psychopharmakotherapie* 2: 61-67.
- WALDMANN H (1973) Schlafdauer und psychopathologische Tagesrhythmik bei Depressiven. In: JOVANOVIĆ VJ (Hrsg.) *Die Natur des Schlafes*. G. Fischer, Stuttgart.
- WAYNE NL, MALPAUX B, KARSCH FJ (1988) How does melatonin code for daylength in the ewe: duration of nocturnal melatonin release or coincidence with a light-entrained sensitive period? *Biol Reprod* 39:66-75.
- WEHR TA and GOODWIN FK (1981) Biological rhythms and psychiatry. In: ARIETY S and BRODIE HKH (eds) *American Handbook of Psychiatry* 7 (2nd edn):46-74, Basic Books, New York.

WEHR TA and WIRZ-JUSTICE A (1982) Circadian rhythm mechanisms in affective illness and in antidepressant drug action. *Pharmacopsychiatry* 15:31-39.

WEHR TA, SACK DA, DUNCAN WC (1985) Sleep and circadian rhythms in affective patients isolated from external time cues. *Psychiatry Res* 15:327-339.