

Aus der Klinik für Psychiatrie und Psychotherapie
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Veränderungen sowie Korrelation der Neurotrophine nerve growth factor (NGF) und brain-derived neurotrophic factor (BDNF) im präfrontalen Kortex, Hippocampus und Serum von Ratten nach elektrokonvulsiver Behandlung.

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Julia Ulrike Litzke

aus Berlin

Datum der Promotion: 16.6.2018

1. Einleitung

Zusammenfassung	6
Abstract	7
1.1 Depression	9
1.1.1 Epidemiologie und Ätiologie der Depression	9
1.1.2 Definition und Verlauf der Major Depression	9
1.1.3 Therapie	10
1.1.4 Depressionshypothesen	12
1.1.4.1 Monoaminhypothese	12
1.1.4.2 Stresshypothese	13
1.1.4.3 Neurotrophin-Hypothese	14
1.2 NGF	18
1.2.1 NGF-Synthese und Expression	19
1.2.2 NGF-Rezeptoren	19
1.2.3 Wirkungen von NGF	20
1.3. BDNF	22
1.3.1 BDNF-Prozessierung	22
1.3.2 Vorkommen von BDNF	23
1.3.3 Effekte von BDNF	23
1.3.4 Gegensätzliche Wirkungen von pro-BDNF und BDNF	25
1.3.5 BDNF- und NGF- Serumspiegel	25
1.3.6 Effekte antidepressiver Therapie	26
1.3.6.1 Genterapie	28
1.3.6.2 Epigenetische Modifikationen	29
1.3.6.3 Neurotrophinmimetika	29
1.3.6.4 Ausblick	30
1.3.7 BDNF nach Krampfaktivität	30
1.4 Elektrokrampftherapie	31
1.4.1 Indikationen	32
1.4.2 Durchführung	32
1.4.3 Platzierung der Elektroden	33

1.4.4 Nebenwirkungen / Komplikationen	33
1.4.5 Behandlungsfrequenz	33
1.4.6 Erhaltungs-EKT	34
1.4.7 Wirkungsweise der EKT	34
1.4.8 Strukturelle Hirnveränderungen durch EKT	35
1.5 Fragestellung der vorliegenden Arbeit	36
2. Material und Methoden	37
2.1 Einteilung der Versuchstiere, ECS-Durchführung	37
2.2 Probengewinnung	38
2.3 Vorbereitung der Proben	38
2.4 Prinzip des enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)	38
2.5 Verfahren zur Messfehlervorbeugung	39
2.6 Durchführung des NGF-ELISA	40
2.6.1 Erster Tag	40
2.6.1.1 Aufbringen der Antikörper auf die feste Phase	40
2.6.1.2 Vorbereitung der Probenansätze, Auftragung auf die Mikrotiterplatten	40
2.6.2 Zweiter Tag	41
2.6.2.1 Auftragung des 2. Antikörpers sowie Initiierung der Enzymreaktion	41
2.6.3 Dritter Tag	41
2.6.3.1 Fluorometrische Messung des Reaktionsproduktes, Auswertung	41
2.7 Durchführung des BDNF-ELISA	41
2.7.1 Erster Tag	42
2.7.1.1 Aufbringen der Antikörper auf die feste Phase	42
2.7.2 Zweiter Tag	42
2.7.2.1 Vorbereitung der Probenansätze, Auftragung auf die Mikrotiterplatten	42
2.7.3 Dritter Tag	43
2.7.3.1 Auftragung des 2. und 3. Antikörpers, Initiierung der Enzymreaktion	43
2.7.4 Vierter Tag	43
2.7.4.1 Stopp der Enzymreaktion, Messung	43
2.8. Materialien	44
2.8.1 Pufferlösungen	44
2.8.2 Ansätze	46

2.8.3 Antikörper, Zusätze	47
2.8.4 Geräte	48
2.8.5 Sonstige Materialien	48
2.9 Statistik	49
3. Ergebnisse	50
3.1 Auswirkungen der ECS- (electroconvulsive shocks) Behandlung auf die Konzentration von NGF bzw. BDNF in Hirngewebe (präfrontaler Kortex / Hippocampus) und Serum	50
3.1.1 Auswirkungen auf NGF in präfrontalem Kortex und Hippocampus	50
3.1.2 Auswirkungen auf NGF im Serum	51
3.1.3 Auswirkungen auf BDNF in präfrontalem Kortex u. Hippocampus	52
3.1.4 Auswirkungen auf BDNF im Serum	53
3.2 Ergebnisse der ANCOVA-Analyse	53
3.3 Zusammengefasste Ergebnistabellen	58
4. Diskussion	60
4.1 Methodendiskussion	60
4.2 Ergebnisdiskussion	61
4.2.1 BDNF-Veränderungen nach EKT	64
4.2.2 Korrelation der BDNF-Konzentrationen in Gewebe und Serum	66
4.2.3 BDNF und Thrombozyten	67
4.2.4 Einflussfaktoren auf die Konzentrationen von NGF und BDNF	68
4.2.5 Bedeutung der Ergebnisse und Ausblick	69
5. Literaturverzeichnis	71
6. Abkürzungsverzeichnis	88
I Eidesstattliche Versicherung	93
II Lebenslauf	94
III Publikationsliste	96
IV Danksagung	97

1.1 Zusammenfassung

Einleitung

Die Neurotrophine NGF (nerve growth factor) und BDNF (brain-derived neurotrophic factor) sind essentiell für die neuronale Plastizität, die Differenzierung, Proliferation und das Überleben von Neuronen und spielen eine bedeutende Rolle in der Pathophysiologie der Depression. Gemäß der Neurotrophin-Hypothese der Depression führt Stress zu einer Abnahme der endogenen Neurotrophinkonzentration, steht eine herabgesetzte Konzentration des Neurotrophins BDNF mit dem Vorliegen depressiver Veränderungen in Verbindung und geht antidepressive Therapie mit einer Erhöhung der BDNF-Expression einher.

Methoden

In der vorliegenden Arbeit wurden die Konzentrationen von NGF und BDNF in präfrontalem Kortex und Hippocampus sowie dem Serum von 88 männlichen Sprague-Dawley Ratten bestimmt, die zuvor einer antidepressiven Therapie in Form von ECS (electroconvulsive shocks, der Elektrokrampftherapie (EKT) bei Menschen entsprechend) ausgesetzt worden waren.

Die ECS-Applikation erfolgte entweder einmalig oder in Form einer fünfmaligen Behandlungsserie. Die Rattenhirne wurden anschließend nach jeweils unterschiedlichen Zeiträumen von drei Stunden bis vierzehn Tagen nach der letzten Anwendung entnommen und die Konzentrationen der Neurotrophine in Hirngewebe und Serum mittels ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) bestimmt.

Ergebnisse

Die Ergebnisse zeigten, dass eine einmalige ECS-Anwendung keine signifikanten Auswirkungen auf die NGF-Konzentrationen in Hirngewebe und Serum aufwies. Mehrmalige ECS führten zu einem leichten Konzentrationsanstieg von NGF im Hirngewebe (präfrontaler Kortex 1,3-fach, Hippocampus 1,2-fach), wohingegen die NGF-Serumkonzentrationen keine signifikante Veränderung zeigten.

Die BDNF-Konzentrationen im Hirngewebe waren nach einer einmaligen ECS-Anwendung leicht erhöht, zeigten dagegen nach fünf ECS-Sitzungen einen deutlichen, 72 Stunden lang anhaltenden Anstieg (präfrontaler Kortex 2,8-fach, Hippocampus 2,2-fach).

Im Serum stiegen die BDNF-Serumwerte nach einer einzelnen ECS-Behandlung für eine Zeitspanne von bis zu acht Stunden an, nach mehrmaliger Behandlung blieben die BDNF-Konzentrationen im Serum dagegen für drei Tage unverändert, zeigten aber eine Woche nach der letzten ECS-Anwendung eine signifikante Erhöhung.

Als eines der Hauptergebnisse der vorliegenden Arbeit konnte die Abhängigkeit der BDNF-Serumkonzentration vom BDNF-Gehalt im Hirngewebe dargelegt werden. Für NGF war eine solche Korrelation nicht nachzuweisen.

Die BDNF-Konzentrationen im Serum stiegen dabei nach einer Zeitverzögerung von drei Tagen nach der letzten ECS-Anwendung an und spiegelten so zeitverzögert den Anstieg des Neurotrophins im Hirngewebe wider.

Diskussion

Die Ergebnisse weisen eine Erhöhung von BDNF durch antidepressive Therapie nach. Ferner wird die Annahme unterstützt, anhand der BDNF-Konzentrationen und – Konzentrationsänderungen im Serum Rückschlüsse auf die BDNF-Konzentration im Hirngewebe ziehen zu können und so eventuell ein Ansprechen auf antidepressive Therapie, den Therapieverlauf und auch im Vorhinein die Wahrscheinlichkeit eines Ansprechens auf antidepressive Therapie überwachen und abschätzen zu können.

1.1 Abstract

Introduction

The neurotrophins NGF (nerve growth factor) and BDNF (brain-derived neurotrophic factor) are essential for neuronal plasticity, differentiation, proliferation and the survival of neurons and play a significant role in the pathophysiology of depression. According to the neurotrophin hypothesis of depression, stress leads to decreased endogenous neurotrophins.

A reduced concentration of the neurotrophin BDNF is associated with depressive symptoms, whereas antidepressant treatment leads to an increase of BDNF-expression.

Methods

In the present study, concentrations of NGF and BDNF were determined in the prefrontal cortex and hippocampus, as well as in the serum of 88 male Sprague-Dawley rats after they received ECS (electroconvulsive shocks, an animal model of electroconvulsive therapy (ECT) in humans), as antidepressant therapy. Application was carried out either singly or in the form of a

five-time treatment series. Afterwards, the rats were killed between three hours and fourteen days after the last treatment and the brains were removed. The concentrations of the neurotrophins in brain tissue and serum were determined by ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay).

Results

The results showed that a single application of ECS had no significant effect on the concentrations of NGF in the brain tissue and serum. Repeated ECS resulted in a slight increase of NGF concentration in the brain tissue (1.3 times in the prefrontal cortex, 1.2 times in the hippocampus), while NGF serum levels showed no significant change.

BDNF levels in the brain tissue were slightly increased after a single application of ECS, whereas they showed a significant, sustained increase for 72 hours after a series of five ECS (2.8 times in the prefrontal cortex, 2.2 times in the hippocampus). Serum BDNF levels increased after a single ECS treatment for a period of up to eight hours, after repeated treatment the BDNF concentrations in the serum remained unchanged for three days, but showed a significant increase one week after the last ECS application.

One of the main results of the present work is to show the correlation between BDNF concentrations in the brain tissue and those in the serum. No such correlation could be found for NGF. BDNF levels in the serum increased after a time delay of three days past the last ECS treatment thereby reflecting the increase of the neurotrophin in the brain tissue.

Discussion

The results demonstrate an increase of BDNF by antidepressant therapy. Furthermore, it seems to be justified to draw conclusions from determining BDNF concentrations and alterations of these concentrations in the serum, thus being able to determine BDNF concentrations in the brain tissue and to potentially monitor the response to antidepressant treatment, the course of therapy or even to rate the likeliness of response to antidepressive treatment.

1.1 Depression

1.1.1 Epidemiologie und Ätiologie der Depression

Depressive Störungen gehören zu den häufigsten psychischen Erkrankungen. Das Lebenszeitrisiko, an einer Depression zu erkranken, beträgt in der Normalpopulation für Männer zwischen 5 und 12%, für Frauen zwischen 10 und 25%. Sie können in jedem Lebensalter auftreten, der Erkrankungsgipfel liegt jedoch zwischen dem 25. und 30. Lebensjahr.^{1 2} Epidemiologische Daten weisen hinsichtlich der Depression auf ein Vorrücken des Ersterkrankungsalters in den letzten Jahrzehnten und ein insgesamt häufigeres Auftreten der Störung hin.^{3 4}

Für die Pathogenese der Depression scheint ein komplexes Zusammenspiel von genetischer Disposition, Veränderungen der Neurotransmission, der intrazellulären Signaltransmission, des endokrinen Systems sowie von Traumata in der Biographie ursächlich zu sein. Letztere betreffen vor allem frühkindliche, daneben auch aktuelle Belastungen.^{5 6 7 8 9}

Es wird davon ausgegangen, dass nicht ein Gen, sondern vielmehr Polymorphismen mehrerer Gene, die in Verbindung mit Umweltfaktoren gesehen werden müssen, für die komplexe Depressionsentstehung verantwortlich sind.¹⁰ Das Risiko, bei schwierigen Lebensbedingungen eine Depression zu entwickeln, ist dabei für Patienten mit einem hohen genetischen Risiko um ein Vielfaches größer als das von Patienten mit einem kleineren genetischen Risiko.¹¹

1.1.2 Definition und Verlauf der Major Depression

Eine schwere Depression, die meist einen phasenhaften Verlauf zeigt, wird als Major Depression (Definition: Box 1) bezeichnet. Die Symptome der Major Depression (im Folgenden: MD) entwickeln sich meist über Tage oder Wochen. Bei den meisten Betroffenen (2/3) kommt es anschließend zu einer vollständigen Remission der Symptome, ihre Leistungsfähigkeit erreicht wieder den Stand von vor der Erkrankung. Bei etwa 1/3 der Betroffenen aber bleiben depressive Restsymptome über Monate oder auch Jahre bestehen. Die sich an eine Episode der MD anschließende Teilremission scheint ein Prädiktor für ebenfalls unvollständige Remissionen bei folgenden depressiven Episoden zu sein. Episoden werden dann als getrennt gewertet, wenn in einem mindestens zweimonatigen Intervall die Kriterien für eine Episode einer MD nicht erfüllt sind. Bei mindestens 60% der Patienten mit einer einzelnen Episode einer MD tritt auch eine zweite Episode auf.^{12 13}

In etwa 5-10% aller Fälle sind die Kriterien einer Major Depression über einen Zeitraum von zwei oder mehr Jahren erfüllt, man spricht dann von einer chronischen Major Depression.

Die schwerwiegendste Auswirkung der Major Depression ist der versuchte oder vollendete Suizid, den etwa 15% der depressiven Patienten begehen.¹⁴ Bei allgemeinmedizinischen Patienten leiden jene mit MD häufiger unter körperlichen, beispielsweise kardiovaskulären Erkrankungen, Schmerzen und reduzierter physischer, beruflicher und sozialer Leistungsfähigkeit.^{15 10} Personen mit schweren oder chronischen körperlichen Erkrankungen haben andererseits ein erhöhtes Risiko, bis zu 25%, eine Major Depression zu entwickeln.^{15 16 17}

18 19 20 21 10

Für die Diagnose einer Major Depression müssen nach DSM-IV (Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders der American Psychiatric Association (APA))¹² wenigstens fünf der folgenden neun Symptome mindestens zwei aufeinander folgende Wochen lang an fast jedem Tag die meiste Zeit des Tages über anhalten. Mindestens eines der Symptome ist dabei entweder 1. Depressive Verstimmung oder 2. Verlust an Interesse oder Freude.

3. Deutlicher Gewichtsverlust oder Gewichtszunahme

(> 5% des Körpergewichtes in einem Monat) oder verminderter oder gesteigerter Appetit (letzteres häufig besonders auf kohlenhydrathaltige Lebensmittel).*

4. Schlaflosigkeit oder vermehrter Schlaf, Durchschlafstörungen, Früherwachen. **

5. Psychomotorische Unruhe oder Verlangsamung

6. Müdigkeit oder Energieverlust

7. Gefühle von Wertlosigkeit oder übermäßige oder unangemessene Schuldgefühle, auch mit wahnhaftem Ausmaß

8. Verminderte Denk-, Konzentrations- oder Entscheidungsfähigkeit.

9. Wiederkehrende Gedanken an den Tod (nicht nur Angst vor dem Sterben), wiederkehrende Suizidvorstellungen.

*Bei Kindern kann eine Diskrepanz zur erwarteten Gewichtszunahme auftreten.

**Manchmal kommen Betroffene nur aufgrund der Schlafstörung zur Behandlung. Es gibt Hinweise darauf, dass die Schlafveränderungen bei Patienten mit Major Depression über die klinische Remission hinaus bestehen bleiben oder bei Personen mit erhöhtem Risiko für Affektive Störungen dem Beginn der ersten Episode einer Major Depression vorausgehen können.

Box 1: Definition der Major Depression.¹²

1.1.3 Therapie

Die in dieser Arbeit vorgestellte Elektrokrampftherapie ist eine validierte nichtpharmakologische Therapieoption bei depressiver Erkrankung.²² Sie zählt neben der monoaminergen Pharmakotherapie (s.u.) und der verbreitetsten nichtpharmakologischen antidepressiven Therapie, der Psychotherapie, zu den gängigen Behandlungsmöglichkeiten der Depression.^{23 10}

Die antidepressive Therapie bewirkt bei etwa 75% der Patienten eine deutliche Besserung der Symptomatik.⁵ Die Behandlung mit den zur Verfügung stehenden Mitteln führt demzufolge aber auch bei einer nicht außer Acht zu lassenden Anzahl von Patienten zu keiner Remission.^{10 213}

Aktuell wird viel hinsichtlich neuer pharmakologischer Therapiemöglichkeiten der Depression geforscht. Zu den neuartigen Medikamenten, die momentan untersucht werden, zählen solche, die das Kortikotropin-releasing-Hormon-, Dopamin- und Glutamatsystem beeinflussen. Auch Medikamente, die auf andere Neurotransmitter, wie Gamma-Aminobuttersäure (GABA), Melatonin und Substanz P abzielen, sind in das Interesse der Forschung gerückt.^{24 10} Daneben sind Studien im Gange, die sich der personalisierten Medizin widmen, welche auf den individuell unterschiedlichen genetischen Eigenschaften hinsichtlich der Medikamentenwirkung beruht.¹⁰ Zu diesen gehören Polymorphismen, die durch allelische Abweichungen in Genen entstanden sind und beispielsweise das Serotoninsystem beeinflussen oder bestimmte Leberenzyme, die in den Pharmaka-Metabolismus involviert sind und so die Plasmakonzentration der Medikamente beeinflussen,^{10 25} sowie Gene, die in die Funktion der Hypothalamus-Hypophysen-Nebennieren-Achse und das Kortikotropin-releasing Factor- und Norepinephrinsystem eingebunden sind.^{10 25}

Daneben wurden in letzter Zeit weitere neurostimulatorische Techniken eingesetzt, auf der Grundlage von aktuellen Einblicken in die Neurobiologie der depressiven Störung. Zu ihnen gehört die elektrische Stimulation des Nervus vagus, die transkranielle Magnetstimulation des präfrontalen Kortex (da dort bei depressiven Patienten eine niedrige Aktivität gefunden wurde) und die Tiefenhirnstimulation (aufgrund der gefundenen funktionellen Beeinträchtigungen im rostralen Gyrus cinguli und ventralen Striatum, sowie der Abweichungen der kortikolimbischen Zusammenschaltung).^{26 10}

1.1.4 Depressionshypothesen

Die Modellvorstellungen zur Entstehung depressiver Störungen gehen wie bereits beschrieben von Wechselwirkungen zwischen genetischer Veranlagung, neurochemischen Veränderungen, frühkindlichen Lebensereignissen, Erfahrungen und aktuellen Belastungen aus.^{5 7 8 9} Es gibt drei Hauptkonzepte für die Pathogenese und Therapie depressiver Störungen, die miteinander in Beziehung stehen. Die Neurotrophin-Hypothese,^{27 28 29 30 31} die die Grundlage der vorliegenden Arbeit bildet, die Stress-Hypothese und die Monoamin-Hypothese.

1.1.4.1 Monoaminhypothese

Die Monoaminhypothese besagt, dass der Depression eine Dysregulation der verschiedenen monoaminergen Neurotransmittersysteme im Sinne eines Mangels zugrunde liegt. Monoaminerge Neurotransmitter, vor allem Serotonin und Noradrenalin, spielen bei der Entstehung affektiver Erkrankungen wahrscheinlich, bei deren Therapie aber nachgewiesenermaßen eine wichtige Rolle.²⁷ Denn der Wirkungsweise der meisten Antidepressiva liegt eine synaptische Konzentrationserhöhung von Serotonin oder Noradrenalin zugrunde. Dies kann durch eine Wiederaufnahmehemmung mit selektiven Serotoninwiederaufnahmehemmern (serotonin reuptake inhibitors, SSRIs), selektiven Noradrenalinwiederaufnahmehemmern (norepinephrin reuptake inhibitors, SNRIs), einer kombinierten Wiederaufnahmehemmung (trizyklische Antidepressiva) oder mit Monoaminoxidase-Inhibitoren (MAO-Hemmer), durch die der Abbau aminerges Neurotransmitter verringert wird, erreicht werden.²⁷ Ein Serotoninmangel, der zum Beispiel durch eine Tryptophanmangeldiät verursacht werden kann, führte zu dem (Wieder)Auftreten depressiver Symptomatik bei depressiven Patienten, die sich in Remission befanden, oder auch bei Gesunden, in deren Familie aber eine Disposition für Depression bestand.^{32 33} Bei Gesunden ohne familiäre Belastung verursachte die Diät keine depressiven Symptome, so dass ein Serotoninmangel allein nicht zur Auslösung einer Depression genügt. Gleiches gilt für einen Katecholaminmangel. Auch die gleichzeitige Beeinträchtigung des serotonergen und noradrenergen Systems führte bei gesunden Probanden nicht zur Entstehung depressiver Symptomatik.^{34 35} Dies weist auf genetische Einflüsse hin, die zu einer erhöhten Anfälligkeit hinsichtlich einer Depressionsentstehung führen.³³

Bei der Depression vorhandene Aspekte wie Anhedonie, psychomotorische Hemmung und Beeinträchtigung der Motivation könnten durch eine Dysfunktion des dopaminergen mesokortikolimbischen Systems erklärt werden.^{36 37 38} Denn durch einige Neuroleptika, die eine

Dopaminverringern bewirken, konnten Anhedonie und depressive Symptomatik hervorgerufen werden.³⁹ Und die euphorisierende Wirkung, die durch Stimulanzien wie Amphetamin oder Methylphenidat induziert wird, kann nur mit einer Dopaminrezeptorblockade antagonisiert werden. Eine therapeutische antidepressive Anwendung dopaminerger Psychostimulanzien wird untersucht.^{40 41 37 38}

1.1.4.2 Stresshypothese

In Tierexperimenten wurde gezeigt, dass Stress und Depression ursächlich in Zusammenhang zueinander stehen.⁴² Auch bei Patienten wurde beobachtet, dass vor dem Beginn depressiver Episoden häufig Stress auftrat und als ihr Auslöser angesehen werden konnte.⁴³ Durch Stressexposition kommt es zu einer Dysregulation im Sinne einer Überaktivität der Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenrinden-Achse (HPA, hypothalamus-pituitary-adrenal-axis) und so zu einer Erhöhung der Glukokortikoidkonzentrationen.^{29 44 45}

Als Ursache der Überaktivität wird eine Störung des Rückkopplungsmechanismus der Stressachse angenommen, bei längerer Stressexposition besteht dabei die Gefahr der Entgleisung des HPA-Systems.^{46 6} Die Aktivierung der Glukokortikoidrezeptoren im Hippocampus führt unter anderem zu einer Suppression von Nervenwachstumsfaktoren, den Neurotrophen, besonders des brain-derived neurotrophic factors (im Folgenden: BDNF).^{47 48 49 50 51} So bedingen die hohen Glukokortikoidkonzentrationen bei Stress eine Verringerung der Neurogenese im Hippocampus und eine vermehrte Verletzlichkeit hippocampaler Neuronen hinsichtlich schädigender Faktoren (s.u.).⁵² Daneben haben die erhöhten Glukokortikoide auch direkte metabolische Einflüsse auf Nervenzellen, z.B. durch Hemmung des Glukosetransportes^{53 52} und beeinflussen die Morphologie und Integrität von Nervenzellen.⁵⁴ Ferner erhöhen sie die Konzentrationen von exzitatorischen Aminosäuren, z.B. von Glutamat, in hippocampalen Synapsen, das in hoher Konzentration neurotoxisch wirkt.^{5 42}

Ähnliche Effekte wie die durch Stress entstandenen, sind auch nach wiederholter Kortikosterongabe zu beobachten.⁵⁵ Bei Applikation adrener Glukokortikoide wird die Proliferation der granulären Zellen vermindert,⁵⁶ die Aktivierung des N-methyl-D-Aspartat (NMDA)-Rezeptors (Glutamatrezeptors) führt zu einem ähnlichen Effekt.⁵⁵ Durch Gabe eines NMDA-Rezeptor-Antagonisten wird die Neurogenese dagegen erhöht.⁵⁵ Die Hypothese lautet, dass eine Gabe von adrenalen Glukokortikoiden die NMDA-Rezeptor-vermittelte Transmission aktiviert, die zu einer Erniedrigung der adulten Neurogenese führt.⁵⁷

Auch Patienten mit einem Morbus Cushing, bei denen ein Hyperkortisolismus vorliegt,³⁸ weisen psychopathologische Befunde auf, die einer depressiven Symptomatik ähnlich sind.⁵⁸ daneben

ist eine Volumenreduktion des Hippocampus nachweisbar,⁴² wie sie auch bei Patienten mit einer schweren Depression zu finden ist.^{3 59} Da der Hippocampus eine wichtige Region für emotionales und motivationales Verhalten, sowie für die Lern- und Gedächtnisfunktion ist, können durch die Volumenreduktion Beeinträchtigungen entstehen.⁴⁷ Stress und die Applikation von Glukokortikoiden vermindern ferner die Erregbarkeit der Neurone in der CA1-Region des Hippocampus, was zu einer Hemmung der Langzeitpotenzierung (long-term potentiation, LTP, synaptische Plastizität der Lern- und Gedächtnisleistung) führt.^{60 61} Sowohl bei Patienten mit einer Major Depression, als auch bei solchen mit Morbus Cushing konnten in klinischen Studien deutliche Defizite im Bereich des Gedächtnisses gezeigt werden.^{62 42} Da depressive Patienten trotz des teilweise beträchtlichen Hyperkortisolismus keine Symptome eines Morbus Cushing aufweisen, geht man von einer gewissen Steroidresistenz bei depressiven Patienten aus.^{63 64}

Neben den durch die erhöhten Glukokortikoide bedingten Auswirkungen der Stressexposition ist die erhöhte Konzentration von Interleukinen eine weitere Möglichkeit für die Übermittlung der durch Stress ausgelösten Effekte. Denn Stress erhöht die Konzentration von Interleukin 1- β (IL-1 β),⁶⁵ welches ebenfalls eine BDNF-Verminderung herbeiführen könnte. Es reduziert die Glutamat-Freisetzung und den Ca²⁺(Calcium)-Einstrom,⁶⁶ was zu einer Verringerung der aktivitätsabhängigen BDNF-Expression im Gyrus dentatus führen könnte.⁶⁶

Unterstützend konnte gezeigt werden, dass die intrahippocampale Infusion eines IL-1 β -Antagonisten die durch sozialen Stress hervorgerufene Herunterregulation von BDNF blockiert.^{67 55} Die beschriebenen, durch Stress hervorgerufenen, pathologischen Veränderungen können mit Hilfe antidepressiver Therapie in der Regel gut behandelt werden. Diese bewirkt meist eine wieder verbesserte Rückkopplung und Normalisierung des HPA-Systems.⁶⁹

1.1.4.3 Neurotrophin-Hypothese

Die Neurotrophin-Hypothese der Depression rückt zunehmend in den Fokus der Forschung.

Sie basiert hauptsächlich auf Beobachtungen, nach denen akuter und chronischer, sowohl physischer als auch psychischer Stress, die Konzentrationen der endogenen Neurotrophine herabsetzt, eine Abnahme der hippocampalen BDNF-Level mit depressivem Verhalten in Beziehung steht und antidepressive Therapie die BDNF-Expression erhöht (s. Abb. A).^{70 71 72}

Für lange Zeit war die Monoaminhypothese in der Erforschung der Depression vorherrschend.⁷⁰⁷³ Doch verschiedene Fakten sprachen gegen diese Theorie.³⁰ Zum einen führte die Verminderung von Serotonin und Noradrenalin bei Gesunden zu keiner depressiven Symptomatik,³⁵ zum anderen sprach die Latenzzeit von etwa 2 Wochen nach Antidepressiva-

Einnahme bis zum Eintreten antidepressiver Effekte trotz bereits schon wenige Stunden nach der ersten Anwendung erhöhter Monoamine im synaptischen Spalt gegen die Annahme, dass der Monoaminmangel allein als Ursache der Depressionsentstehung anzusehen sei.^{5 7 30 70}

Auch dass es bei einigen Betroffenen trotz medikamentöser Monoamin-Konzentrationserhöhung nicht zu einer Verbesserung der Symptomatik kam, trug weiterhin zur Entkräftigung der Hypothese bei.⁷⁰ Unter anderem von Duman und Mitarbeitern wurde angenommen, dass der antidepressive Effekt durch nachgeschaltete längerfristige adaptive Mechanismen bewirkt wird. Dass eine längerfristige Erhöhung der monoaminergen Neurotransmitter neben zellulären Modifikationen zu einer modifizierten Genexpression neuronaler Zellen führt, die eine Veränderung der neuronalen Plastizität bewirkt, aus der dann die antidepressive Wirkung resultiert. Dies führte zu der möglichen Rolle von Wachstumsfaktoren, den sogenannten Neurotrophinen, in der Pathogenese der Depression.^{30 49 5 7 28 29 31 74 75 76}

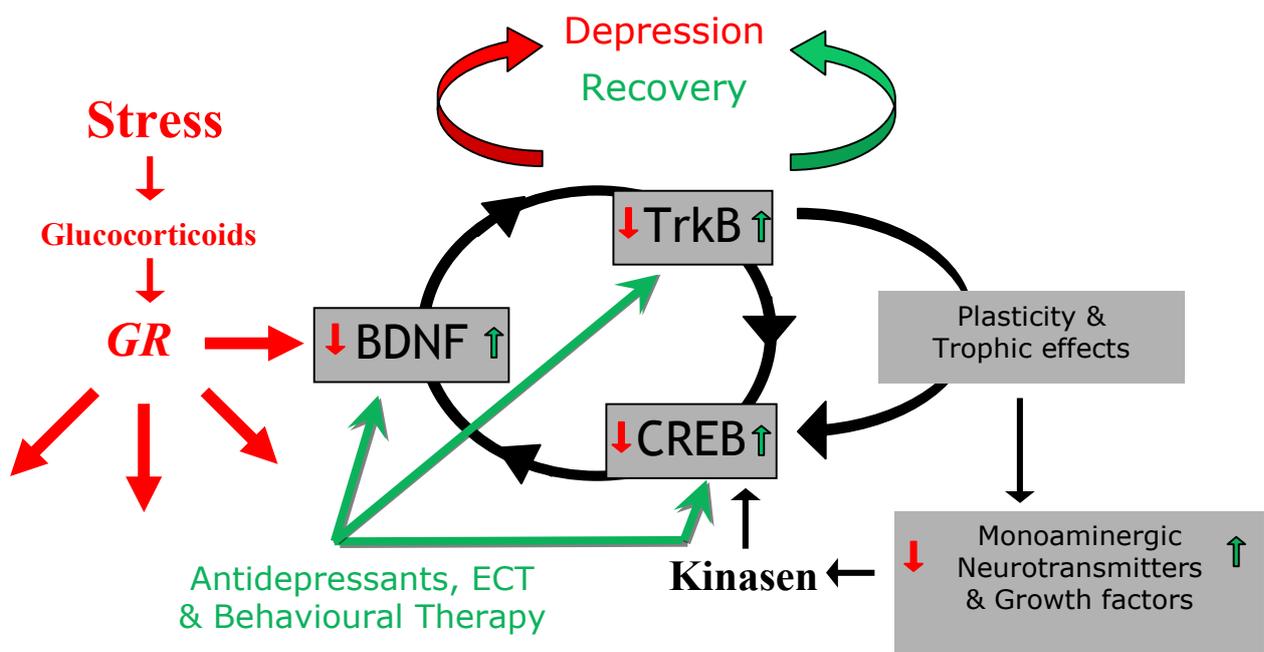


Abb. A: Hypothetischer Regelkreis über die Auswirkungen von Stress bzw. antidepressiver Behandlung auf die Expression von BDNF. Stress führt durch Aktivierung von Glukokortikoidrezeptoren (GR) zu einer Suppression von BDNF und der nachgeschalteten Signalkaskade. Antidepressiva und Elektrokrampftherapie revertieren und aktivieren den Regelkreis auf mehreren Ebenen. Modifiziert nach⁵⁸.

In vivo werden Neurotrophine in begrenzter Anzahl produziert, weshalb die Neurotrophin-sensitiven Zellen um sie kompetitieren. Daher sind die hochaffinen Neurotrophin-Rezeptoren TrkA, TrkB und TrkC (s.u.), die die neurotrophen Signale vermitteln, unter physiologischen Bedingungen nur partiell mit ihren endogenen Liganden besetzt, so dass schon geringe Konzentrationsveränderungen der Neurotrophine merkliche Auswirkungen haben.⁷⁷

Es wurde festgestellt, dass die Serumwerte des Neurotrophins BDNF bei depressiven, nicht medikamentös behandelten Patienten, im Vergleich zu denen von nichtdepressiven Kontrollpersonen oder Patienten, die Antidepressiva erhalten, erniedrigt sind.⁵⁵ In post mortem Untersuchungen depressiver Patienten konnte gezeigt werden, dass diese im Vergleich zu Kontrollpersonen außerdem erniedrigte BDNF- und TrkB-Konzentrationen (BDNF-Rezeptor, s.u.) im Hippocampus aufwiesen. Bei Patienten allerdings, die zum Todeszeitpunkt Antidepressiva einnahmen, waren die Konzentrationen erhöht.^{70 71}

Die ersten, die eine Beziehung zwischen Neurotrophinen und Stress beschrieben, waren Smith und Mitarbeiter.⁴⁷ Sie fanden heraus, dass Immobilisationsstress die Expression von BDNF in der CA3 Pyramidenzellschicht und dem Gyrus dentatus verringert. Auch durch andere Studien wurde der Zusammenhang zwischen unterschiedlichen Arten von Stress und einer BDNF-Verminderung im Hippocampus belegt.^{47 55 50 70 71 31 72 67} Sogar ein Signalton, der mit Stress assoziiert worden war, konnte bei Ratten zu einer konditionierten BDNF-Abnahme führen.⁵⁵ Auch die frühe Entbehrung der Mutter oder fehlende Fürsorge führten bei Ratten im späteren Leben zu einer verringerten BDNF-Konzentration und einem depressiven Phänotyp.^{55 70} Dies macht deutlich, wie frühere Erfahrungen zu Langzeitveränderungen der BDNF-Expression führen können.⁵⁵ Stressexposition und erniedrigte BDNF-Expression ziehen neben funktionellen auch morphologische Folgen nach sich. Stress führt zu einem Abfall der Zellproliferation im Hippocampus,⁷⁸ die Neurogenese wird vermindert, es kann zu neuronalem Verlust und zu Atrophie kommen.^{78 72 55 70 71} In bildgebenden Studien wurde gezeigt, dass das hippocampale Volumen bei depressiven Patienten erniedrigt ist.^{71 55 59}

Dabei war das Ausmaß der Abnahme direkt mit der Krankheitsdauer verbunden.⁶⁸ Dies unterstützt die Annahme, dass das verringerte Volumen ein Ergebnis und nicht die Ursache der Depression darstellt.⁵⁵ Neben den Untersuchungen des Hippocampus gibt es auch Berichte über eine Verringerung der grauen Substanz und die Atrophie weiterer limbischer Strukturen bei depressiven Patienten. Es wurden eine Verminderung im präfrontalen Kortex und der Amygdala beschrieben. Diese Hirnregionen sind direkt mit Veränderungen der Stimmung, der Ängstlichkeit und Kognition verbunden, die bei depressiven Patienten beobachtet werden.⁵⁵ In der vorliegenden Arbeit wurde der präfrontale Kortex neben dem Hippocampus als zu untersuchende Hirnregion ausgewählt, da er ebenso eine wichtige Rolle in der Entstehung und Therapie der Depression spielt. Der präfrontale Kortex ist unter anderem an der Persönlichkeitsentstehung, an emotionalem Verhalten und den Reaktionen auf Stress beteiligt und direkt mit dem Hippocampus verbunden.^{79 80}

In bildgebenden Studien wurden neurophysiologische Auffälligkeiten in den unterschiedlichen Bereichen des präfrontalen Kortex bei depressiven Patienten festgestellt. Auch eine Reduktion des kortikalen Volumens und metabolische Veränderungen wurden nachgewiesen.^{80 81} Bei Patienten mit Depression sind sowohl im präfrontalen Kortex als auch im Hippocampus der zerebrale Blutfluss und der zerebrale Glukosestoffwechsel pathologisch verändert.^{7 82 83} Stress bewirkt im präfrontalen Kortex Funktionsänderungen und Veränderungen der Glukokortikoidrezeptoren, was die Ursache neurotoxischer Wirkungen sein kann.⁸¹ Im Hippocampus, der essentiell für emotionales und motivationales Verhalten sowie Gedächtnisfunktionen und Lernen ist, wird die BDNF-Expression durch Stress im Besonderen reduziert.⁸⁴ Er weist eine hohe Dichte an Glukokortikoidrezeptoren auf, wodurch er bei chronischen Konzentrationssteigerungen, wie sie im Falle einer Depression aufgrund der Störung des durch den Hippocampus regulierten Rückkopplungsmechanismus vorkommen, den Glukokortikoiden gegenüber eine besondere Sensibilität aufweist.^{83 85}

Eine folgende verringerte Expression und Funktion der Neurotrophine im Hippocampus und auch im präfrontalen Kortex steht in Zusammenhang mit neuronaler Atrophie im Rahmen der Depression, bei der ein Verlust an synaptischen Verbindungen vorliegt. Es kommt zu einer Volumenreduktion, insbesondere der grauen Substanz.^{59 86}

Eine Schwäche der Neurotrophin-Hypothese ist das Fehlen eines direkten Beweises, der zeigt, dass die Hemmung des BDNF-Signalweges zu depressivem Verhalten führt.^{70 71 55} Es konnte zwar nachgewiesen werden, dass durch die Blockade des BDNF Signalweges die antidepressiven Effekte auf das Verhalten durch antidepressive Behandlung in Depressionsmodellen gehemmt wurden,^{71 55} transgene Mäuse aber, die heterozygot für das BDNF-Gen waren, (die vollständige Deletion des BDNF-Gens führte zu schweren Entwicklungsstörungen und embryonalem Tod⁷⁰) oder bei denen dort kein oder ein trunkierter, nicht funktionsfähiger TrkB-Rezeptor exprimiert wurde, zeigten keine eindeutigen Tendenzen zu depressivem Verhalten, sie waren anhand verschiedener Parameter nicht von Wild-Typ Mäusen zu unterscheiden.^{70 71} Sowohl bei BDNF knockout Mäusen und TrkB-T1 transgenen Mäusen, das heißt bei Mäusen, die die dominant negative T1 Form von TrkB überexprimieren, ist aber wie beschrieben eine antidepressive Therapie nicht mehr wirksam, wenn man als Bezug die Reduzierung der Immobilitätszeit im Forced Swim Test (FST, ein etabliertes Tier-Depressionsmodell) betrachtet.^{70 71}

Ein Verlust an BDNF oder ein gestörter BDNF-Signalweg führt also nicht allein zu depressivem Verhalten, er kann aber einen prädisponierenden Faktor hierfür darstellen. Für die Manifestation einer Depression müssen dann noch auslösende Faktoren wie zum Beispiel chronischer Stress oder Einschränkungen in verschiedenen Signalwegen dazukommen.^{70 71} Monoamin-, Stress- und Neurotrophinhypothese hängen also zusammen, sind nicht klar zu trennen und ergänzen sich in der beschriebenen Auswirkungsweise.

1.2 NGF (nerve growth factor)

Das erste Neurotrophin, das beschrieben wurde, war NGF (nerve growth factor).⁸⁷

Seine Entdeckung war jedoch eher zufällig. Elmar Bueker führte 1948 Experimente durch, in denen er untersuchte, inwieweit das Volumen peripheren Gewebes das Ausmaß der Entwicklung der innervierenden spinalen motorischen und sensorischen Neuronen bestimmt.

Er transplantierte dafür Maus-Sarkom-Gewebe in Hühnerembryonen und stellte fest, dass dies eine Größenzunahme sowohl der sensorischen Ganglia, als auch besonders der sympathischen Ganglia bewirkte, die das Gebiet des Tumorgewebes versorgten.⁸⁸

1951 beobachteten Levi-Montalcini und Hamburger, dass von dieser Reaktion auch Ganglienzellen betroffen waren, die weiter entfernt vom Tumorgewebe lagen. Sie nahmen daher an, dass das Sarkomgewebe einen löslichen Faktor aussandte, der die beschriebenen Veränderungen auslöste.⁸⁸ Die Effekte des löslichen Faktors konnten in vitro nachgewiesen werden: Die Zugabe von Tumorgewebe zu explantierten sensorischen und sympathischen Ganglia führte bei diesen zu einem starken Auswuchs von Nervenfasern.⁸⁸ Für ihre Entdeckungen um NGF wurde Rita Levi-Montalcini 1986 mit dem Nobelpreis ausgezeichnet.⁸⁹

^{90 91 88} Bei weiteren Untersuchungen wurde festgestellt, dass Schlangengift, welches wegen seiner Phosphodiesteraseaktivität zur genaueren Erforschung von NGF eingesetzt worden war, auch eine Substanz enthielt, die das Wachstum und die Differenzierung von Neuronen förderte.^{92 87} Diese stellte sich ebenfalls als NGF heraus. Neben dem Schlangengift wurden weitere NGF-Quellen identifiziert, wie die Prostata des männlichen Meerschweinchens⁸⁸ oder, der Giftdrüse der Schlange entsprechend, die Glandula submaxillaris der männlichen Maus, in der hohe Konzentrationen des Neurotrophins gefunden wurden.⁸⁷ Die Glandula submaxillaris ist die für Forschungszwecke am häufigsten verwandte NGF-Quelle, und der Maus-NGF wurde bisher auch am besten untersucht, so dass sich die meisten der folgenden Angaben auf diesen beziehen.⁸⁸

1.2.1 NGF-Synthese und Expression

Synthese und Expression von NGF kommen an vielen Stellen des peripheren und zentralen Nervensystems vor. Das Neurotrophin wird besonders von Neuronen, aber auch von Gliazellen synthetisiert.⁹³ Die höchsten Konzentrationen zentraler NGF mRNA wurden im Hippocampus, Kortex und Bulbus olfactorius gefunden.^{94 95} Hohe Mengen in sympathisch und sensorisch innervierten peripheren Geweben existieren zum Beispiel im Herzen, der Iris, der Haut, der Milzkapsel, dem Nervus ischiadicus und der Glandula submaxillaris. Es besteht eine positive Korrelation zwischen der NGF mRNA-Menge in den Zielgeweben und dem Ausmaß der Innervation. In den Regionen, in denen NGF mRNA gefunden wurde, konnte auch das NGF Protein nachgewiesen werden. Seine Häufung in neuronalen Geweben, die keine hohen Mengen an NGF mRNA exprimieren, unterstützt die Annahme des so genannten target-derived, also retrograden Transports, wonach NGF von den Zielgeweben NGF-sensitiver Zellen synthetisiert und von dort retrograd axonal in die Zellkörper transportiert wird.⁸⁷ Die Synthese und Reifung von NGF wird von einer Reihe hormonaler Mediatoren kontrolliert, beispielsweise von Androgenen und Thyroxin.⁹⁶ Es ist zu vermuten, dass die hormonale regulatorische Aktivität unterschiedlich wirkt und unter anderem von Gewebe- und Zelltyp abhängig ist.⁹⁷

Nach verhaltens- und psychologisch stressigen Ereignissen, sowie nach aggressivem Verhalten, zeigen Nagetiere erhöhte NGF-Serumlevel.^{97 98} Auch bei Menschen ist anzunehmen, dass sie nach emotionalem Stress signifikant erhöhte NGF-Blutspiegel zeigen.⁹⁹ Auch während einer Depression sind die NGF-Level erhöht.⁹⁷ Vieles, wie zum Beispiel die Aktivierung der HPA-Achse durch exogenes NGF, mit einer nachfolgenden erhöhten Sekretion von adrenocortikotropem Hormon (ACTH) und erhöhten Glukokortikoid-Konzentrationen, weist auf eine wichtige Funktion von NGF in der HPA-Achse hin.⁹⁷ Das ist von besonderem Interesse, da dieses hormonelle System für die Kontrolle der systemischen Homöostase sehr wichtig ist. Daher ist anzunehmen, dass NGF eine bedeutende Regulationskomponente darstellt.⁹⁷

1.2.2 NGF-Rezeptoren

NGF vermittelt, wie andere Polypeptidhormone auch, seine neurotrophe Wirkung über spezifische Rezeptoren.⁸⁷ Es wurden zwei spezifische Rezeptoren für NGF identifiziert. Ein hochaffiner Rezeptor trk (tropomyosin-related kinase receptor) mit langsamer Dissoziationskonstante ($K_d = 2,3 * 10^{-11}$ M), sowie ein niedrigaffiner Transmembranrezeptor p75NTR (Neurotrophinrezeptor, Gewicht ca. 75kDa) mit einer schnellen Dissoziationskonstante ($K_d = 1,7 * 10^{-9}$ M)⁸⁷ und extrazellulärer Bindungsdomäne.⁸⁷ Der hochaffine trk-Rezeptor, ein Onkogen, hat ein Molekulargewicht von 140kDa und ist ein transmembranes Glykoprotein, das

Tyrosinkinaseaktivität aufweist.⁸⁷ Der Name trk zeigt die molekulare Struktur des Onkogens auf, das aus zwei vereinten Sequenzen besteht, die für ein nichtmuskuläres Tropomyosin und einen Tyrosinkinase-Rezeptor kodieren (tropomyosin-related kinase receptor).⁸⁷ Obwohl die ursprüngliche Entdeckung im Kolon erfolgte, zeigte sich, dass das trk Protoonkogenprodukt vor allem auf neurale Gewebe beschränkt ist, besonders in einer Untergruppe von NGF-sensitiven Neuronen.⁸⁷ NGF nutzt zur Signalübermittlung den Mechanismus der intrinsischen Tyrosinkinaseaktivität des Rezeptors. Die Blockierung der Tyrosinphosphorylierung hemmt sowohl die Phosphotyrosinproduktion als auch die Neuritenausprossung.⁸⁷

1.2.3 Wirkungen von NGF

Im ZNS sind cholinerge Neuronen das Hauptziel von NGF.⁸⁷ Diese reagieren auf das Neurotrophin mit einer gesteigerten Proliferationsrate und einem erhöhten Überleben, sowie mit einem Anstieg des Enzyms ChAT (Cholinacetyltransferase), das für die Acetylcholinproduktion zuständig ist.⁸⁷ NGF-sensitive periphere Neurone reagieren auf NGF-Kontakt mit Differenzierung, Neuritenausprossung und erhöhter Produktion von katecholamin- und neuropeptidsynthetisierenden Enzymen.^{88 92 87}

Daneben erhöht NGF die Dichte von sensorischen nozizeptiven Endigungen in der Dermis und Epidermis und erhöht die zentrale Verbindung nozizeptiver Afferenzen.⁹⁷

Bei Gabe von NGF an erwachsene Nagetiere kommt es schnell zu einer Abnahme der nozizeptiven Schwelle für Hitze und mechanische Stimuli, mit nachfolgender langsamer Normalisierung.⁹⁷ Auch bei transgenen Tieren, die NGF in der Haut überexprimierten, wurden hyperalgetische Reaktionen beobachtet.⁹⁷ Die schnelle Anfangsphase der NGF-induzierten thermalen Hyperalgesie scheint durch Mastzellen vermittelt zu werden und einen NMDA-Rezeptor-abhängigen Mechanismus einzuschließen.⁹⁷ NGF aktiviert nozizeptive Neuronen also nicht direkt, sondern verringert eher die nozizeptive Schwelle.⁹⁷ In Zuständen lokal erhöhter NGF-Level, wie z.B. bei Entzündungen oder Verletzungen, erschafft NGF so ein Gebiet mit erhöhter Empfindlichkeit, das dazu dienen könnte, die Beschädigung des verletzten Gebietes zu begrenzen und so die Heilung zu unterstützen.⁹⁷ Auch in physiologischen Konzentrationen scheint NGF nicht direkt Zellen des Immunsystems zu aktivieren, sondern verändert eher ihre Sensitivität in Hinblick auf andere auslösende Stimuli. NGF könnte als ein generelles Alarmsignal wirken, das vom ZNS in Situationen von Stress und Angst eingesetzt wird, um das Immunsystem auf externe schädliche Reize vorzubereiten. So könnte NGF sehr wichtig für die Koordination der Abwehrmechanismen sowohl des Immun- als auch des Nervensystems gegenüber schädlichen Impulsen von außen sein.⁹⁷

Ferner regt NGF die Proliferation von B- und T-Lymphozyten und die Produktion von IgM, IgA und IgG-Antikörpern an.⁹⁷ Der Kontakt zu NGF induziert hochaffine IL-2-Rezeptoren auf humanen peripheren Blut-mononukleären Zellen und unterstützt das Zellwachstum und die Proliferation von hämatopoetischen Zellen.⁹⁷ Daneben ist NGF in die Funktionsfähigkeit der menschlichen polymorphkernigen Neutrophilen und der thymischen Stromazellen eingebunden.⁹⁷

Die ersten Immunzellen, bei denen beobachtet wurde, dass sie auf NGF reagierten, waren Mastzellen.⁹⁷ Neonatale Ratten, die während ihrer ersten vierzehn Lebenstage NGF erhielten, zeigten eine Mastzell-Hyperplasie, Anti-NGF-Antikörper verringerten dagegen die Mastzellanzahl der Ratte. NGF übt also einen überlebensunterstützenden Effekt auf Mastzellen aus, die den hochaffinen funktionalen NGF-Rezeptor Trk exprimieren. NGF selbst ist in physiologischen Konzentrationen nur ein schwacher Sekretionsauslöser der peritonealen Mastzellen der Ratte, wohingegen er die durch beispielsweise Antigene induzierte Histaminfreisetzung erhöhen kann. So könnte NGF als Immunmodulator angesehen werden. Peritoneale Mastzellen der Ratte sowie Zellen der basophilen Linie synthetisieren und speichern selbst NGF.⁹⁷ Die Freisetzung von gespeichertem NGF ist eine schnell verfügbare Quelle, nozizeptive Fasern zu sensitivieren und Elemente des Immunsystems zu aktivieren. Diese können durch Freisetzung von IL-1 β und TNF- α die NGF-Synthese in unter anderem Fibroblasten und Schwannzellen induzieren und so dazu beitragen, dass die NGF-Spiegel des Gewebes erhöht bleiben, wie sie bei akuten und chronischen entzündlichen Exsudaten vorkommen.⁹⁷

Die Fähigkeit von Mastzelldegranulationsprodukten, wie auch NGF, auf autokrinem Weg auf Mastzellen zu wirken, hat Konsequenzen für atopische Krankheitszustände oder andere chronische Entzündungen, bei denen eine fortlaufende Mastzelldegranulation bestehen kann.

So können angrenzende Gewebe angegriffen werden und es kann zu chronisch entzündlichen Prozessen kommen, wie sie bei vielen Autoimmunkrankheiten vorliegen.⁹⁷ Die pharmakologische Regulierung der Mastzellaktivierung, und damit Kontrolle der NGF-Konzentrationen, könnte dem entgegenwirken.⁹⁷

1.3 BDNF (brain-derived neurotrophic factor)

BDNF gehört, wie unter anderem auch NGF, zur Familie der Neurotrophine.^{87 100 101} BDNF war nach NGF das zweiterforschte Neurotrophin.⁸⁷ Nachdem die Entdeckung von NGF eher zufällig war (s.o.), handelte es sich bei der Isolierung von BDNF um das Ergebnis zielgerichteter Forschung.⁸⁷ Die für BDNF kodierenden Gene von Schwein, Maus und Mensch wurden geklont und die primären Strukturen bestimmt.^{102 87 100} Im Vergleich zu anderen Neurotrophinen liegt eine über 50%ige Homologie der Aminosäuren vor.^{87 100} Hinsichtlich NGF besteht eine 55%ige Homologie, 51 Aminosäuren sind dabei identisch.⁸⁷

1.3.1 BDNF-Prozessierung

Die BDNF-Transkripte werden im endoplasmatischen Retikulum zu dem Präkursorprotein präpro-BDNF translatiert und im Anschluss, nach Abspaltung des Signalpeptides, wird das entstandene pro-BDNF, ein 32kDa schweres Protein, im trans-Golgi gefaltet und in sekretorische Vesikel verpackt.¹⁰³ Die Vesikel werden dann zu den Dornfortsätzen der Dendriten und den Nervenendigungen der Axone transportiert. Das Proneurotrophin kann entweder durch regulierte Freisetzung bei Stimulation, wie es häufiger vorkommt, oder durch spontane Freisetzung sezerniert werden.^{104 71}

Die aktivitätsabhängige Sekretion, eine Besonderheit von BDNF im Vergleich zu den anderen Neurotrophinen, könnte ein wichtiges Element für die Stimmungsregulierung sein. Das könnte erklären, weshalb BDNF eher als andere Neurotrophine in affektive Störungen eingebunden ist.⁷¹ Der größte Teil von BDNF wird in der pro-Form sezerniert und anschließend durch extrazelluläre Proteasen wie Plasmin oder Matrix Metalloproteinasen zu reifem, maturem BDNF (mBDNF) umgewandelt.^{71 105} Eine wichtige Stellung bei der Prozessierung nimmt der gewebe-spezifische Plasminogenaktivator (Tissue plasminogen activator (tPA)), eine extrazelluläre Protease, ein, die inaktives Plasminogen zu Plasmin umwandelt. Auch p11 (Annexin 11, Leichtkette), ein membranassoziiertes Protein, erhöht die tPA-Aktivität in großem Maße. Studienergebnisse brachten das Protein mit der Pathogenese der Depression in Zusammenhang. Denn der Serotoninrezeptor 5-HT1B reagiert auf p11. Letzteres führt zu einer erhöhten Expression der 5-HT1B-Rezeptoren auf Zelloberflächen. In Tierexperimenten konnte gezeigt werden, dass p11 durch Antidepressiva oder Elektrokrampftherapie im Gehirn von Nagetieren erhöht wird, wohingegen es in einem Tiermodell der Depression verringert ist. Auch im Hirngewebe von depressiven Patienten wurden erniedrigte p11-Werte gefunden. Transgene Mäuse, die p11 überexprimieren, gleichen in ihrem Verhaltensmuster Tieren, die mit

Antidepressiva behandelt wurden. Mäuse, denen p11 fehlt, zeigen dagegen depressionsartiges Verhalten und sprechen nicht gut auf Antidepressiva an.⁷¹

1.3.2 Vorkommen von BDNF

Die höchsten BDNF-Konzentrationen im Gehirn männlicher Ratten wurden im Hippocampus gefunden, gefolgt von Hypothalamus und Septum,^{100 102} wobei BDNF ubiquitär im ZNS vorkommt. Es ist im ZNS von adulten Nagetieren das am stärksten exprimierte Neurotrophin.^{102 87 100} Die Verteilung der BDNF-mRNA im Rattenhirn ist grob der des BDNF-Proteins ähnlich. Die höchste Konzentration von BDNF-mRNA findet sich im Hippocampus, die niedrigste im Striatum. Bei genauerer Betrachtung zeigen sich allerdings Unterschiede in bestimmten Hirngebieten.¹⁰⁰ Im Vergleich zur NGF-mRNA ist die Konzentration von BDNF-mRNA viel höher. Im Hippocampus beispielsweise, der auch der Ort des höchsten NGF-mRNA-Vorkommens ist, liegt der BDNF-mRNA-Gehalt um ein 50faches höher. In anderen Hirnregionen, wie etwa dem Kleinhirn, ist der Unterschied noch ausgeprägter.¹⁰² Das Neurotrophin wirkt aber nicht nur im ZNS, sondern auch auf Neurone des peripheren Nervensystems.¹⁰⁶ Im peripheren Nervensystem wirkt BDNF, wie zuvor auch bei NGF gefunden, parakrin, autokrin, als target-derived factor,¹⁰⁷ sowie durch anterograden axonalen Transport. Neben der Produktion in Neuronen und Gliazellen wird BDNF auch in Thrombozyten, Lymphozyten, Monozyten, Fibroblasten, Epithelzellen und Muskelzellen synthetisiert,^{214 106} mindestens während der Entwicklung auch in peripheren Geweben wie Herz und Lunge.^{102 87 100} In Thrombozyten wird BDNF auch gespeichert, wobei die gespeicherte Menge in etwa der BDNF-Gesamtmenge im ZNS entspricht.^{108 100} Die Funktion dieses großen BDNF-Speichers ist noch weitgehend unbekannt; es wird angenommen, dass die Thrombozyten ein wichtiges Transportsystem für das Neurotrophin darstellen, das bei akutem Bedarf große Mengen an BDNF freisetzen kann.¹⁰⁹

1.3.3 Effekte von BDNF

BDNF hat neuroprotektive Eigenschaften.^{110 111} Durch Übermittlung seiner Wirkungen via des spezifischen Rezeptors TrkB (tropomyosin-related kinase receptor type B) ist das Neurotrophin wichtig für die neuronale Proliferation und Differenzierung,¹¹² die Morphologie von Axonen und Dendriten,⁹⁷ für die Expression von Neuropeptiden und Neurotrophinen,¹¹³ die Neurotransmission und für die neuronale Plastizität.⁹³ Es ist an Erinnerungs- und Lernprozessen beteiligt¹¹⁴ und beeinflusst über präsynaptische TrkB-Rezeptoren die frühe und späte Phase der hippocampalen Langzeitpotenzierung (LTP).¹¹⁵ BDNF spielt aufgrund der verbreiteten

Expression seiner mRNA eine wichtige Rolle im ZNS.^{100 87 102} Zu den durch BDNF hinsichtlich der Entwicklung und des Überlebens positiv beeinflussten Neuronen zählen Motoneurone, hippocampale und kortikale Neurone,¹¹⁶ sensorische Neurone,¹¹⁷ cholinerge Neurone des basalen Vorderhirns, noradrenerge Neurone des Locus coeruleus,¹¹⁸ dopaminerge Neurone, serotonerge Neurone,¹¹⁹ GABAerge Neurone,¹²⁰ granuläre zerebelläre Neurone¹²¹ und retinale Neurone.¹⁰⁰ Anders als auf NGF reagieren sympathische und parasympathische Neurone nicht auf BDNF.¹²² BDNF wird, wie NGF auch, in den neuronalen ZNS Zielregionen synthetisiert und über die Zentralaxone der BDNF-abhängigen Neurone zurück zu den Zellkörpern transportiert.^{122 100}

Bereits geringe Veränderungen der endogenen BDNF-Konzentrationen führen zu neurochemischen Unterschieden wie Veränderungen der ChAT (Cholinacetyltransferase)-Aktivität und Verhaltensänderungen im Mausmodell und bei Menschen, wie zum Beispiel zu Veränderungen des episodischen Gedächtnisses und der Aufmerksamkeit, der vermehrten Anfälligkeit gegenüber Erkrankungen wie Depression und Ängstlichkeit, oder einem abnormen Essverhalten.^{103 123} Letzteres ist dadurch zu erklären, dass BDNF im ventromedialen Hypothalamus, dem Appetitkontrollzentrum, in hohem Maße vorkommt, und auf diese Weise auch das Essverhalten beeinflusst. So führt Nahrungsentzug zu einer reduzierten hypothalamischen BDNF-Expression. Durch intraventrikuläre BDNF-Infusionen oder aber die Induktion der BDNF-Expression durch wiederholte elektrokonvulsive stimuli (ecs, electroconvulsive stimuli, electroconvulsive shocks) bei Mäusen wird der Appetit unterdrückt, was zu einer erniedrigten Nahrungsaufnahme mit folgender verringerter Gewichtszunahme oder einem Gewichtsverlust führt, sowohl unter normaler als auch bei fettreicher Diät.^{124 125} Auf der anderen Seite führt eine heterozygote Deletion des BDNF-Gens zu einem chronisch gesteigerten Appetit mit folgender Fettleibigkeit, Hyperinsulinismus und Hyperglykämie.¹²⁴

Mäuse mit einer heterozygoten Deletion des BDNF-Gens, die eine nur noch etwa sechzig prozentige Proteinkonzentration von BDNF in bestimmten Hirnregionen aufweisen, zeigen normale Monoamin-Werte, aber eine um neunzehn Prozent signifikant erniedrigte Aktivität der Acetylcholintransferase-Aktivität im Hippocampus, was die Abhängigkeit des cholinergen Systems des basalen Vorderhirns von einer ausreichenden endogenen BDNF-Menge deutlich macht. Die Mäuse weisen sowohl unter normalen Bedingungen als auch nach Immobilisationsstress normale Werte von Kortikosteron und adrenokortikotropem Hormon (ACTH) im Serum auf. In weiteren Verhaltenstests sind die genetisch veränderten nicht von Wild-Typ-Mäusen zu unterscheiden. Erniedrigtes BDNF allein reicht also nicht aus, um neurochemische- oder Verhaltensänderungen hervorzurufen, die denen bei depressiver Symptomatik ähneln.¹²⁶

1.3.4 Gegensätzliche Wirkungen von pro-BDNF und BDNF

Im Nervensystem des Erwachsenen überwiegt der reife BDNF, wohingegen pro-BDNF vermehrt während der neuronalen Entwicklung in einigen Hirnregionen vorkommt.¹²⁴

Das ProNeurotrophin übt gegensätzliche Wirkungen zum reifen Wachstumsfaktor aus.^{71 127} Während mBDNF (maturer, reifer BDNF) durch Bindung an den spezifischen Rezeptor *trkB* sowohl *in vivo* als auch *in vitro* die Entwicklung und das neuronale Überleben von Neuronen sowie die Langzeitpotenzierung (long-term potentiation, LTP) fördert, also wichtig für die synaptische Plastizität ist,¹⁰⁵ führt der pro-BDNF durch Bindung an den *p75NTR* zu Apoptose und fördert die Langzeitdepression (long-term depression LTD) im Hippocampus.⁷¹ Die Prozessierung von pro-BDNF ist daher ein Mechanismus, der die BDNF-Regulation kontrolliert.⁷¹ BDNF selbst kann allerdings ebenfalls gegensätzliche Wirkungen ausüben.^{70 31} Im Hippocampus bewirkt die BDNF-Applikation antidepressive Effekte,^{71 70 31} wohingegen sie im VTA-NAc-System (ventrales Tegmentum, ventral tegmental area - Nucleus accumbens, als „Belohnungssystem“ bezeichnet) einen prodepressiven Effekt auszuüben scheint.⁷¹ Ferner bewirkt die Hemmung des BDNF-*TrkB* Signalweges im Nucleus accumbens, dem Ziel der VTA-dopaminergen Neuronen, einen starken antidepressiven Effekt.⁷¹ Wiederholte Aussetzung gegenüber Aggression führt zu lang anhaltendem sozialen Rückzug bei Mäusen. Eine selektive Deletion des BDNF-Gens im Nucleus accumbens wirkt dem entgegen und gleicht dem Effekt einer chronischen antidepressiven Therapie.^{71 70} Der NAc besteht hauptsächlich aus GABAergen Interneuronen. Da diese scheinbar kein BDNF exprimieren, könnte der vorhandene BDNF vor allem von der Glia stammen. Die gegensätzlichen Effekte von BDNF in Hippocampus und NAc könnten daher in unterschiedlichen Kinetiken der BDNF-Transkription und -Sekretion durch Neurone und Glia begründet sein.^{70 71 31} Dementsprechend ist es wahrscheinlich, dass die Symptomatik und Pathophysiologie der Depression mit unterschiedlichen und regional spezifischen Funktionen der Neurotrophine zusammenhängt.^{70 71}

1.3.5 BDNF- und NGF-Serumspiegel

Wegen der Thrombozytendegranulation bei Serumgewinnung weisen Menschen sehr hohe BDNF-Spiegel im Serum auf (1-50ng/ml). Im Plasma dagegen sind diese deutlich niedriger (<100 pg/ml).¹⁰⁸ Es gibt Hinweise, dass die BDNF-Serumspiegel mit den entsprechenden Konzentrationen im ZNS korrelieren und die neuronale Integrität widerspiegeln, die durch die Konzentrationen von N-Acetyl-Aspartat (NAA) dargestellt werden kann.^{128 129 108} Entsprechend der Neurotrophin-Hypothese depressiver Störungen lässt sich dies auch für unbehandelte Patienten mit Major Depression annehmen, da bei ihnen im Vergleich zu gesunden

Kontrollgruppen erniedrigte BDNF-Serumspiegel gefunden wurden.^{130 70} Dabei korrelierten die gemessenen BDNF-Konzentrationen nur im Serum, aber nicht in anderen Blutpräparaten, negativ mit der Schwere der Depression.⁷⁰ Bei klinisch gesunden Personen werden verringerte BDNF-Serumspiegel mit depressiven Persönlichkeitszügen negativ verbunden, so dass es möglich scheint, die BDNF-Konzentration im Serum als potentiellen biologischen Marker für Depression zu verwenden¹³¹ (s. auch Diskussion).

Die Serumspiegel von NGF sind dagegen deutlich niedriger als die von BDNF, und, wenigstens beim Menschen, nicht normal verteilt.^{132 133} Es wird aber ebenfalls angenommen, dass die NGF-Serumspiegel teilweise den NGF-Gehalt in bestimmten ZNS-Regionen widerspiegeln.¹³⁴

1.3.6 Effekte antidepressiver Therapie

Durch Antidepressivatherapie können die durch die Depression bedingten Veränderungen zum Teil wieder korrigiert werden. Tierexperimentell wird bei langfristiger Anwendung medikamentöser Antidepressiva die Neurogenese im Hippocampus erwachsener Nagetiere gesteigert,^{55 135} die neuronale Proliferation, wie auch das Überleben der Neurone, nimmt zu.⁵⁵ Die BDNF-mRNA-Expression im Hippocampus und präfrontalen Kortex von Ratten wird signifikant erhöht, wie auch die der mRNA des hochaffinen BDNF-Rezeptors TrkB,^{72 71 136 55 70 30} und die durch Stress ausgelöste Herunterregulation der Neurogenese wird gehemmt.^{55 136 30}

Auch die bei depressiven Patienten vorkommende hippocampale Atrophie kann durch Antidepressiva zum Teil wieder rückgängig gemacht werden.^{55 71}

Neben den Konzentrationserhöhungen im Hirngewebe werden auch die BDNF-Serumlevel durch Antidepressiva gesteigert bzw. wieder normalisiert, dieser Effekt korreliert positiv mit dem Ansprechen auf die Behandlung.^{55 70 130 108 137} Auch die intrazerebrale Infusion von BDNF selbst wirkt antidepressiv,^{136 71} wodurch die Neurotrophinhypothese gestärkt wird. Um die Verbindung zwischen Neurotrophinen und Depression zu untersuchen, war Ratten BDNF in den Hippocampus infundiert worden. Im Folgenden konnten bei den Tieren, die vorher unausweichlichem Schock ausgesetzt worden waren, antidepressive Effekte beobachtet werden, die denen nach pharmakologischer Antidepressivatherapie glichen und die im Forced Swim-(FST) sowie erlernten Hilflosigkeits-Test (learned helplessness, LH) objektivierbar waren.^{70 31 71} Diese Tests sind etablierte Tier-Depressionsmodelle und werden routinemäßig zur Begutachtung der antidepressiven Potenz von Medikamenten angewandt.³¹

Die antidepressiven Effekte der BDNF-Infusionen sind dabei lang anhaltend, sie wirken bis zu 10 Tage nach einer einzelnen Behandlung. Die Anwendung von BDNF selbst ist aber aufgrund der Schwierigkeit des Einbringens in das Nervensystem problematisch.^{31 138}

Auch in klinischen Studien wurde die intraparenchymale Protein-Infusion bereits angewandt. Parkinson-Patienten wurde durch implantierte Pumpen kontinuierlich GDNF (glial cell line-derived neurotrophic factor) in das Hirnparenchym infundiert. Die hohen Flussraten aber, die benötigt wurden, um die Verteilung von GDNF zu erzielen, führten zu anormalen Signalen im MRT und möglichem Gewebeschaden. Niedrigere Flussraten wiederum waren nicht effektiv und es wurden nur mäßige Verbreitungen des Wachstumsfaktors in den Zielregionen gefunden. Ein weiteres Problem der intraparenchymalen Infusion ist der mögliche Reflux des Faktors mit einer daraus resultierenden Verteilung im Liquor, was in Studien an Primaten zu einem Untergang zerebellärer Neurone führte. Die Infusionssysteme benötigen daher weitere Entwicklung, um ein sichereres und gezielteres Verteilen, beispielsweise durch kleine implantierte Pumpen, der Wachstumsfaktoren erreichen zu können.¹²⁴

Die Nervenwachstumsfaktor-Therapie muss unter Umständen über lange Zeiträume, auch Jahre, erfolgen, dabei müssen Konzentrationen der Neurotrophine erreicht werden, die effektiv sind und genau an den richtigen Neuronen wirken, ohne zu unerwünschten Wirkungen, wie unter anderem Gewichtsverlust oder sensorischen Störungen, durch ungezielte Verbreitung der Neurotrophine, zu führen.¹²⁴ Die orale oder systemische BDNF-Gabe hat sich als ineffektiv erwiesen, da BDNF durch Verdauungsenzyme zerstört wird. Bei intraventrikulärer oder intrathekaler Gabe von BDNF findet eine nicht ausreichende Verteilung in die tiefer gelegenen Schichten statt, so dass die Effekte zu gering sind. Durch Pegylierung von BDNF wird seine Durchdringung ins Parenchym bei Ratten verbessert, aber für das menschliche Nervensystem könnten die erreichten Level nicht ausreichend sein. Die Neurotrophine dürfen auf der anderen Seite das Nervensystem auch nicht überfluten, wie etwa nach intrathekaler Infusion, da schwerwiegende Nebenwirkungen auftreten können.^{138 124}

Ein anderer Ansatz neben der nicht gut durchführbaren intrazerebralen BDNF-Infusion ist die Beeinflussung der Neurotransmittersysteme und Signalwege, die die BDNF-Expression regulieren. Die aktivitätsabhängige Genexpression von BDNF erfolgt vermutlich über eine erhöhte Glutamat Neurotransmission, die eine Aktivierung der Ca^{2+} -abhängigen Kinasen, wie Ca^{2+} /Calmodulin abhängige Kinase (CaMK), verursacht. CaMK phosphoryliert das cAMP response element binding protein (CREB), einen Transkriptionsfaktor, der die BDNF-Genexpression über die Bindung an ein Ca^{2+} /cAMP response element (CaRE) im Exon III-

spezifischen Promotor des BDNF Gens aktiviert.⁵⁵ Antidepressive Behandlung verstärkt die cAMP-CREB-Kaskade samt einer gesteigerten Funktion und Expression von CREB im Hippocampus. Die Aktivierung der cAMP-CREB-Kaskade steigert sowohl die Proliferation als auch das Überleben von neuen Neuronen im Hippocampus.^{55 70}

Dabei wird die Expression von BDNF erhöht, durch eine Hemmung der cAMP-spezifischen Phosphodiesterase Typ IV (PDE4), die die Blockierung des Stoffwechsels von cAMP katalysiert.⁵⁵ Medikamente, die selektiv die PDE4 beeinflussen, werden momentan erprobt. Auch die Möglichkeit einer Beeinflussung der ionotropen Glutamatrezeptoren wurde untersucht. Durch einen AMPA (α -Amino-3-Hydroxy-5-Methyl-4-Isloxazol-Propionsäure, α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole propionic acid)-Rezeptorverstärker konnten antidepressive Effekte ausgelöst werden.¹²⁴ Ein weiteres Medikament, das das Glutamatsystem beeinflusst und die BDNF-Expression steigert, ist Memantin. Auch Riluzol, ein Natriumkanalblocker, erhöht die BDNF-Expression und die Neurogenese im adulten Hippocampus. Nach neueren klinischen Studien wird auch angenommen, dass NMDA- (N-Methyl-D-Aspartat, N-methyl-D-aspartic acid) Antagonisten schnell antidepressive Effekte bewirken können.^{55 70 71 86}

Eine weitere Möglichkeit, den TrkB-Signalweg zu aktivieren, ist der Einsatz kleiner Moleküle (s.u.), wie beispielsweise 7,8-Dihydroxyflavone (7,8-DHF), das in vitro ein selektiver TrkB Rezeptor-Agonist ist und durch die Aktivierung des TrkB-Signalweges die gleichen Effekte wie BDNF auslöst und so vorhandene Defizite durch vermindertes BDNF ausgleichen kann. Es wirkt neuroprotektiv und konnte sowohl bei nicht vorbelasteten Mäusen als auch bei solchen, die zuvor Stress ausgesetzt waren, zu einer verstärkten Abnahme erlernter Angst führen.¹³⁸

Die BDNF-Expression wird darüber hinaus durch Bewegung und eine kalorienmäßig eingeschränkte Nahrungsaufnahme oder bestimmte Ernährungsformen positiv beeinflusst.¹²⁴ Es ist dabei noch nicht geklärt, ob diese positiven Effekte direkt auf die Aktivierung der Nervenwachstumsfaktoren zurückzuführen sind. Die durch Bewegung und Nahrung bedingten Veränderungen der BDNF-Expression sind deutlich niedriger als jene, die durch direkte BDNF-Infusion oder Gentherapie erreicht werden können.¹²⁴

1.3.6.1 Gentherapie

Eine weitere Möglichkeit der Erzielung antidepressiver Effekte ist der Gentransfer, der zu einer Nervenwachstumsfaktorerrhöhung mittels eines viralen Vektors führt. Es wurden bereits mehrere klinische Studien an Menschen durchgeführt, in denen Nervenwachstumsfaktoren auf diese Weise ins Gehirn eingebracht wurden. Es können hohe Konzentrationen an den Zielregionen

erreicht werden, mit einer deutlichen Reduzierung oder auch ohne Verbreitung der Faktoren in anderen Regionen und somit einer starken Reduktion der möglichen unerwünschten Effekte.

Die erste menschliche klinische Studie war noch *ex vivo*, wobei Fibroblasten des Patienten, die aus Hautbiopsien gewonnen worden waren, kultiviert und mittels retroviralen Vektors genetisch verändert wurden, so dass sie NGF produzierten und freisetzten. Anschließend wurden Fibroblasten in das Gehirn der Patienten eingesetzt, wo sie als kleine Pumpen lokal und lang anhaltend NGF abgaben.¹²⁴ Dies führte in den Gehirnen der Alzheimer-Patienten zu einer Aussprossung von cholinergen Fasern in Richtung der NGF-Quelle und zu einer Aktivierung des kortikalen Stoffwechsels.¹²⁴

1.3.6.2 Epigenetische Modifikationen

Langfristige Veränderungen der BDNF-Expression können durch epigenetische Modifikationen erreicht werden.¹²⁴ Dabei kann entweder die DNA direkt methyliert werden, oder es können posttranslational Histone verändert werden, die dann die Transkription entweder fördern oder hemmen. Frühe Stresserfahrungen können zu Langzeitveränderungen der BDNF-Expression durch Methylierung der DNA führen.¹²⁴

Angst-Gewöhnung kann die Expression der BDNF-mRNA auf unterschiedliche Weise regulieren, an bestimmten Exons nach der Methylierung der BDNF-DNA. Die neurale aktivitätsinduzierte Methylierung des BDNF-Gens wird auch durch Gadd45b, das zu den sogenannten immediate early genes gehört und in reifen hippocampalen Neuronen exprimiert wird, vermittelt. So kann angenommen werden, dass pharmakologische Aktivierung von Gadd45b die BDNF-Expression erhöhen könnte.

Antidepressive Pharmaka scheinen BDNF durch epigenetische Mechanismen zu beeinflussen, die die Herunterregulierung von Histon-Deacetylasen einschließen.¹²⁴

1.3.6.3 Neurotrophinmimetika

Kleine Moleküle, Peptidmimetika der Nervenwachstumsfaktoren, können nach peripherer Gabe die Blut-Hirn-Schranke überqueren. Durch sie wäre eine einfache und kontrollierte Dosierung möglich. Allerdings gibt es die Befürchtung, dass die potenten Mimetika auch zu den unerwünschten Wirkungen führen könnten, wie sie bei einer weiten Verteilung der Nervenwachstumsfaktoren im Gehirn vorkommen.¹²⁴

1.3.6.4 Ausblick

Ein aktuelles Forschungsziel ist es, die Gentherapie zu verbessern, um eine sichere, regulierbare und lang anhaltende Expression der Nervenwachstumsfaktoren im ZNS zu erreichen. Durch den Gebrauch von Echt-Zeit MRT während der Behandlung soll die Genauigkeit der Vektor- und Wachstumsfaktorplatzierung erhöht werden. Und durch Entwicklung von Wachstumsfaktormimetika, die speziell an degenerativen Zellsystemen wirken, können unerwünschte Wirkungen vermieden werden, wie sie bei einer weiten Verbreitung von Wachstumsfaktoren vorkommen würden, wie auch bei einer invasiven Verabreichung. Diese Ergebnisse hätten weit reichende Auswirkungen auf die Behandlung diverser neurologischer Erkrankungen.¹²⁴

Antidepressive Therapien, die nicht direkt das Monoaminsystem beeinflussen, wie Elektrokrampftherapie (EKT), Transkranielle Magnetstimulation, und die eben angesprochenen neuen AMPA-Rezeptorverstärker und NMDA-Antagonisten, erhöhen ebenfalls die BDNF-mRNA- und BDNF-Konzentration im Rattengehirn.^{70 31 136}

Die Wirkung der Elektrokrampftherapie (EKT) beruht auf der Auslösung von Spasmen, mit nachfolgenden neurochemischen Veränderungen, die unter anderem antidepressiv wirken. Vor der genaueren Beschreibung der EKT werden zunächst die Effekte von Krampfaktivität auf BDNF beschrieben.

1.3.7 BDNF nach Krampfaktivität

Wie bereits erwähnt, wird die BDNF-mRNA im Hippocampus durch EKT erhöht.^{30 100 139 140}

Die BDNF-mRNA-Induktion durch Krampfaktivität führt zu einem deutlichen Anstieg von BDNF selbst. Die Anstiege des Neurotrophins sind dabei anhaltender als die der mRNA.¹⁰⁰ Dies legt nahe, dass BDNF schnell translatiert wird und eine relativ lange Halbwertszeit aufweist.¹⁰⁰ Signifikant gestiegene BDNF-Werte blieben in den limbischen Regionen für mehr als vier Tage erhöht. So könnte BDNF lang anhaltende Wirkungen auf Prozesse haben, die nach den Krämpfen stattfinden.¹⁰⁰

Einen bedeutenden Vorgang nach Krampfaktivität stellt auch die Veränderung der Neuropeptidexpression dar. So wird der Anstieg der NPY-Expression (Neuropeptid Y) wenigstens zum Teil durch endogenes BDNF vermittelt. Die durch die Krämpfe induzierten Veränderungen von NPY können auch durch die direkte Applikation von BDNF in das Gehirn imitiert werden.¹⁰⁰

1.4 Elektrokrampftherapie

Die Elektrokrampftherapie (im Folgenden EKT), auch Elektrokonvulsionstherapie (electro convulsive therapy, ECT) genannt, wurde 1938 von Cerletti und Bini für die Behandlung psychiatrischer Erkrankungen eingeführt (s. unten).^{141 142} Vorangehend war bereits durch Manfred Sakel die Insulinschockbehandlung entwickelt worden. Das Fundament der Elektrokrampftherapie wurde von dem ungarischen Arzt Ladislas J. Meduna (1896-1964) gelegt. Er hatte eine Gegensätzlichkeit von Schizophrenie und Epilepsie angenommen. Ab 1933 hatte er in Tierversuchen zur Behandlung der Schizophrenie Kampfer, ein naturheilkundliches Mittel, eingesetzt, durch dessen Gabe epileptische Anfälle ausgelöst werden konnten. 1934 injizierte er dieses Mittel erstmals einem schizophrenen Patienten und führte so einen medikamentös bedingten Krampfanfall zur Behandlung der Schizophrenie herbei, wodurch der Zustand des Patienten schnell gebessert wurde. Aufgrund der Nebenwirkungen von Kampfer und der nicht immer verlässlichen Induktion eines Krampfanfalles, nutzte Meduna später das synthetisch hergestellte Cardiazol. Er führte bei über 100 schizophrenen Patienten eine solche Krampftherapie mit Cardiazol durch. Etwa 50% der Patienten konnten eine Remission erreichen. Das Verfahren wurde von vielen psychiatrischen Kliniken übernommen. Vor dem Hintergrund dieser erfolgreichen Therapie, die allerdings noch immer mit zum Teil wesentlichen Nebenwirkungen verbunden war, untersuchte der italienische Psychiater Ugo Cerletti, ob beim Menschen nicht sicher elektrisch eingeleitete epileptische Anfälle ausgelöst werden könnten. Zusammen mit seinen Assistenzärzten (u.A. Lucio Bini) führte er zunächst tierexperimentelle Studien durch. 1938 erfolgte dann die erste Anwendung bei einem schizophrenen Patienten, die erfolgreich verlief. In den folgenden Jahren verbreitete sich die Elektrokrampftherapie in den psychiatrischen Kliniken und löste die pharmakologische Krampftherapie ab.^{143 144 145 146}

Mit Einführung der psychopharmakologischen antidepressiven Behandlung in den 50er und 60er Jahren wurde die Elektrokrampftherapie wieder aus der Reihe der Therapieverfahren gedrängt. Als sich später allerdings zeigte, dass ein hoher Prozentsatz der depressiven Patienten mit der Psychopharmakotherapie und / oder Psychotherapie nicht wirksam behandelt werden konnte, rückte die Elektrokrampftherapie wieder zurück in das therapeutische Interesse.¹⁴⁷ Die heutzutage angewandte EKT ist eine modifizierte Form des ursprünglichen Verfahrens.^{143 144 145}

146 135

1.4.1 Indikationen

Der wichtigste Anwendungsbereich der EKT sind depressive Erkrankungen.¹⁴⁸

Nach der von der Deutschen Gesellschaft für Psychiatrie, Psychotherapie und Nervenheilkunde (DGPPN) initiierten und koordinierten S3-Leitlinie/Nationalen Versorgungsleitlinie¹⁴⁹ „Unipolare Depression“ soll die EKT bei „schweren, therapieresistenten depressiven Episoden als Behandlungsalternative in Betracht gezogen werden.“ Sie „wird überwiegend zur Behandlung therapieresistenter Depression (...) angewandt, kann jedoch auch als Behandlungsverfahren bei schwerer depressiver Episode mit psychotischen Symptomen, schwerer depressiver Episode mit psychomotorischer Verlangsamung, bei bedrohlichem depressionsbedingtem Gewichtsverlust oder bei massiv suizidalen Patienten in Betracht gezogen werden.“¹⁴⁹ Die am häufigsten gestellte Indikation zur EKT-Behandlung depressiver Patienten ist also ein Nichtansprechen auf Psychopharmakotherapie.^{150 151 152 153 154 155}

Von einer solchen Antidepressiva-resistenz wird gesprochen, wenn mindestens zwei, wenigstens vierwöchige¹⁵⁶ Phasen einer Behandlung mit antidepressiver Medikation aus unterschiedlichen pharmakologischen Wirkgruppen in ausreichend hoher Dosierung ohne therapeutischen Effekt geblieben sind.^{153 157 149} Innerhalb dieses Patientenkollektives werden EKT-Ansprechraten von 50-60%¹⁵⁴ bzw. 60-80%¹⁴⁹ beschrieben.

In einigen Fällen, in denen ein schneller Therapieerfolg erzielt werden muss, ist die EKT auch Mittel der ersten Wahl. Ein frühzeitigerer Therapieerfolg der EKT gegenüber antidepressiver Psychopharmakotherapie ist dabei belegt.¹⁵⁸ So wird die Erstindikation für eine EKT in Ergänzung zu o.g. Zuständen bei akuter Suizidalität, besonders vor dem Hintergrund schwerer und auch wahnhafter Depressionen gestellt, bei depressivem Stupor, schizoaffektiver Psychose mit schwerer depressiver Verstimmung sowie als Notfallindikation bei akuter lebensbedrohlicher perniziöser Katatonie im Rahmen einer schizophrenen Psychose oder bei einem malignen neuroleptischen Syndrom. Auch bei einem Parkinson-Syndrom, einer nicht auf die Pharmakotherapie ansprechenden Epilepsie oder bei Manien kann nach erfolgloser medikamentöser Therapie eine EKT erfolgen.^{158 154}

1.4.2 Durchführung

Moderne EKT-Geräte nutzen bidirektionale Rechteckimpulse als Stimuli. Diese werden über am Kopf des Patienten befestigte Elektroden appliziert. Im Gegensatz zu der früher verwandten, sinusförmigen Stimulation mit langsam an- und absteigenden Impulsen, von denen sich viele unterhalb der Krampfschwelle befanden, liegt bei den modernen Geräten jeder Impuls oberhalb der Krampfschwelle, wodurch auch die

Nebenwirkungen (s.u.) reduziert werden.¹³⁵ Die Krampfschwelle ist dabei als Ladung definiert, die mindestens nötig ist, um einen motorischen Krampf von oder über 25 Sekunden Dauer auszulösen. Sie ist allerdings keine feste Konstante und kann im Verlauf der EKT-Behandlung steigen.¹³⁵ Die Stimulation wird über eine Zeitdauer von 0,5-8 Sekunden abgegeben.¹⁴⁹

1.4.3 Platzierung der Elektroden

Es wurden viele Platzierungen der Elektroden untersucht. Die inzwischen am häufigsten angewandte ist die unilaterale, bei der eine Elektrode auf der Schläfe der nichtdominanten Seite des Kopfes platziert wird (meist rechts), die zweite nahe dem Scheitel auf der selben Seite, gefolgt von der bilateralen Platzierung, bei der die Elektroden an beiden Schläfen befestigt werden. Bei der unilateralen EKT ist die Wirkung dosisabhängig, bei der bilateralen EKT ist es dagegen ausreichend, wenn die Krampfschwelle überschritten wird.¹³⁵ Da bei der bilateralen im Gegensatz zur unilateralen Elektrodenplatzierung jedoch vermehrt Nebenwirkungen auftreten, wird die EKT in der Regel mit unilateral platzierten Elektroden durchgeführt.⁴⁴⁹ Unter bestimmten Umständen ist aber die bilaterale EKT der unilateralen überlegen. Bei perniziöser Katatonie, wahnhaften Depressionen mit ausgeprägter Suizidalität, sowie schweren Manien, kann es sinnvoll sein, primär die bilaterale EKT anzuwenden.⁴⁴⁹

1.4.4 Nebenwirkungen/Komplikationen

Die EKT gilt als sicheres Verfahren. Die Mortalitätsrate liegt bei unter 1/80 000 Behandlungen und entspricht in etwa dem allgemeinen Anästhesierisiko.¹⁵⁹

Die sehr seltenen Todesfälle sind meist auf kardiovaskuläre Komplikationen bei kardial geschädigten Patienten zurückzuführen. Die weit verbreitete Meinung, eine Pharmakotherapie sei im Vergleich sicherer als eine EKT, ist nicht belegt.

Für ältere, auch herzkranken Patienten, systemisch Kranke und schwangere Frauen stellt die EKT sogar eine sicherere Behandlungsmöglichkeit für psychische Krankheiten dar als jede Alternative.^{160 161 135 149}

1.4.5 Behandlungsfrequenz

Die EKT wird als Behandlungsserie durchgeführt, in der Regel erfolgen insgesamt 6-12 Behandlungen mit je 2-3 Sitzungen pro Woche, wobei in zu diesem Aspekt durchgeführten Studien ein Vorteil der zweimal wöchentlichen Behandlung festgestellt werden konnte. Die Behandlung wird von einem speziell ausgebildeten Psychiater im Beisein eines Anästhesisten ausgeübt.^{158 162}

1.4.6 Erhaltungs-EKT

Nach erreichter Vollremission durch die EKT-Behandlung ist es sinnvoll, eine Erhaltungstherapie anzuschließen. Ohne diese ist die Rückfallrate hoch. So erlitten in einer Studie von Sackheim et al. 84% der Patienten ohne Erhaltungstherapie innerhalb von 24 Wochen nach erfolgreicher EKT-Behandlung einen Rückfall.¹⁶³

Die Erhaltungstherapie wird häufig pharmakologisch durchgeführt. Allerdings sind bei Patienten, die schon vor der EKT eine Medikamentenresistenz gezeigt haben, die Rückfallquoten nach erfolgreicher Behandlung mit anschließender pharmakologischer Erhaltungstherapie höher (64%) als bei nicht medikamentenresistenten Patienten (32%). Hier ist eine Erhaltungs-EKT-Behandlung zur Rückfallprophylaxe geeignet.

Die Empfehlungen der DGPPN zur Durchführung einer Erhaltungs-EKT nach o.g. Leitlinie lauten: Einsatz bei Patienten, die „während einer Krankheitsepisode auf EKT angesprochen haben; nicht angesprochen haben auf eine andere leitliniengerechte antidepressive Therapie; psychotische Merkmale aufweisen oder eine entsprechende Präferenz haben.“¹⁴⁹ Die Erhaltungs-EKT wird dabei entweder nach einem Ausschleichschema, mit einem fixen Behandlungsintervall, oder auch nach Bedarf durchgeführt. Sie erfolgt meist ambulant.¹³⁵

Im Verlauf der Behandlung kann die Dosis reduziert werden, da mit abnehmender Behandlungsfrequenz die Krampfschwelle wieder sinkt. Daher sind auch die kognitiven Nebenwirkungen in dieser Behandlungsphase geringer. Auch in Hinblick auf die Behandlungskosten hat sich die Einführung der Erhaltungs-EKT als sehr günstig erwiesen.^{164 165}

135

1.4.7 Wirkungsweise der EKT

Die Wirksamkeit der EKT bei depressiven Erkrankungen im Vergleich zu einer Schein-EKT ist klar belegt.^{166 167 168 149} Ihre Wirkungsweise ist jedoch bis heute nicht vollständig aufgeklärt. Nach dem derzeitigen Kenntnisstand beruht die Wirkung auf zahlreichen neurochemischen Veränderungen, die durch die Konvulsionen verursacht werden. Dazu gehört unter anderem ein Anstieg des Neurotrophins BDNF durch die EKT, auf den weiter oben schon eingegangen wurde.^{169 170 171 172 108} Daneben wird auch das Serotoninsystem durch die EKT beeinflusst. Durch die Behandlung werden verschiedene 5-HT-Rezeptor-Subtypen im ZNS verändert. Mehrmalige EKT sensitiviert 5-HT_{1A}-Rezeptoren in postsynaptischen Neuronen, wohingegen die 5-HT_{1A}-Rezeptoren in präsynaptischen Neuronen (die Autorezeptoren) unverändert bleiben. Die Sensibilisierung der 5-HT_{1A}-Rezeptoren führt zu einer Abnahme an 5-HT_{2A}-Rezeptoren, die bei depressiven Patienten erhöht sind. So könnte diese Änderung der Rezeptoren helfen, die Effektivität der EKT zu erklären. Auch die Sensitivität von 5-HT₃-Rezeptoren im Hippocampus

auf Serotonin wird durch die EKT erhöht, was zu einer vermehrten Freisetzung von Neurotransmittern wie Glutamat und Gamma-Aminobuttersäure (γ -Aminobuttersäure) führt. Diese vermehrte Neurotransmitterfreisetzung könnte eine wichtige Rolle in der erfolgreichen Behandlung von depressiven, medikamentenresistenten Patienten spielen. Die Funktion der Autorezeptoren in den noradrenergen und dopaminergen Neuronen des Locus coeruleus, beziehungsweise der Substantia nigra, wird dagegen durch EKT verringert, was eine erhöhte Freisetzung von Noradrenalin und Dopamin nach sich zieht.¹⁷³ Weitere Veränderungen des neuronalen Stoffwechsels umfassen unter anderem einen Anstieg von N-Acetyl-Aspartat (NAA), einer Aminosäure, die ausschließlich in Neuronen lokalisiert ist und einen Parameter für die neuronale Funktionsfähigkeit darstellt. Ihr Anstieg weist auf einen neurotrophen Effekt der EKT hin.¹⁷⁴ Auch Cholin, das als Marker für den Membranzumsatz angesehen wird, steigt nach EKT-Behandlung an, so dass sich die bei depressiven Patienten reduzierten Cholinanteile wieder normalisieren.¹³⁵

Dies ist gut mit der Annahme einer durch die EKT-induzierten Veränderung der strukturellen Plastizität vereinbar, die unter anderem durch Veränderungen des in der vorliegenden Arbeit untersuchten Nervenwachstumsfaktors BDNF nachgewiesen werden kann.^{170 173}

1.4.8 Strukturelle Hirnveränderungen durch EKT

Zerebral kommt es im Rahmen der EKT zu einer vermehrten Durchblutung mit einer kurzfristigen Steigerung des intrakraniellen Druckes und einer Zunahme des zerebralen Metabolismus. Die Blut-Hirn-Schranke weist dabei vorübergehend eine erhöhte Permeabilität auf.¹³⁵ In prospektiven kernspintomographischen und computertomographischen Studien wurde gezeigt, dass die EKT-Behandlung nicht zu strukturellen Veränderungen des Gehirns im Sinne von Hirnschäden führt.^{135 149} Auch der Liquor/Serum-Albuminquotient ist nach EKT unverändert. Das bedeutet, dass es keinen biochemischen Nachweis für einen neuronalen oder glialen Schaden oder eine Dysfunktion der Blut-Hirn-Schranke durch die EKT-Behandlung gibt.¹⁷⁵ Durch EKT wird die Neuroplastizität vermutlich unterstützt, wie der Anstieg von N-Acetylaspartat (NAA) und BDNF durch erfolgreiche EKT nahe legt, ganz im Gegensatz zu der früher befürchteten Zerstörung von Hirngewebe.¹⁷⁴

1.5 Fragestellung der vorliegenden Arbeit

Bei den folgenden Untersuchungen zur EKT und deren Auswirkungen auf die Neurotrophine NGF und BDNF wurden Ratten mit elektrokonvulsiven Schocks (im Folgenden ECS, electroconvulsive shocks) behandelt. Diese entsprechen der EKT beim Menschen. Tierexperimentell konnte bereits gezeigt werden, dass ECS die Neurogenese verstärken, insbesondere im Gyrus dentatus des Hippocampus, und zu einer gesteigerten Expression von BDNF führen.^{135 55} Die Neurogenese wird dabei durch eine Behandlungsserie in stärkerem Maße erhöht als durch eine einzelne Anwendung.¹⁷⁰

Die Fragestellung der vorliegenden Arbeit ist es, an Ratten zu untersuchen, welche zeitabhängigen Auswirkungen die elektrische Stimulation auf die Konzentration der genannten Neurotrophine hat und in welchen Regionen. Als zu untersuchende Hirnregionen wurden der Hippocampus und präfrontale Kortex ausgewählt, die angesichts der oben aufgeführten Gründe eine zentrale Bedeutung in der Rolle der Depression einnehmen.⁸⁶ Dabei wird nicht nur eine Neurotrophin-Quantifizierung im Hirngewebe vorgenommen, sondern auch im Serum der Versuchstiere, um so der relevanten Frage nachzugehen, ob die im Serum gemessenen Werte der Neurotrophine mit denen im Hirngewebe korrelieren und so ein Rückschluss von den Serumwerten auf die Gewebewerte des Gehirns gezogen werden kann. Dies wäre, bei einer möglichen Übertragung auf den Menschen, von großer therapeutischer und eventuell auch prognostischer Relevanz. Denn eine Überwachung der Serumwerte könnte, ohne eine am lebenden Menschen nicht durchführbare direkte Messung der Neurotrophine im Hirngewebe, die Konzentration letzterer widerspiegeln und so eine Kontrolle des Ansprechens auf etwa eine antidepressive Therapie, den Therapieverlauf und eventuell auch schon vor Therapiebeginn die Einschätzung der Wahrscheinlichkeit eines Ansprechens auf die Therapie ermöglichen.

Folgende Hypothesen werden aufgestellt:

- 1.) Durch ECS-Anwendung kommt es zu einem Anstieg von BDNF im Hirngewebe und, zeitverzögert, im Serum von Ratten. Dabei führt eine ECS-Serie zu einer deutlicheren und lang anhaltenderen BDNF-Erhöhung als eine einmalige Anwendung.
- 2.) Die BDNF-Konzentrationen von Hirngewebe und Serum korrelieren, nach einer zeitlichen Verzögerung, signifikant miteinander. Es scheint daher möglich, anhand der BDNF-Serumwerte Rückschlüsse auf die Konzentration des Neurotrophins im Hirngewebe zu ziehen.
- 3.) Entsprechend der oben genannten Hypothesen 1.) u. 2.) sind ähnliche Veränderungen für die NGF-Werte zu erwarten, sowohl im Hirngewebe als auch im Serum.

2. Material und Methoden

2.1 Einteilung der Versuchstiere, ECS-Durchführung

Als Versuchstiere wurden 88 männliche Sprague-Dawley Ratten eingesetzt, die die Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Dipl. Phys. A. Sartorius und Prof. Dr. P. Gass (Zentralinstitut für Seelische Gesundheit, Abteilung für Psychiatrie und Psychotherapie, Mannheim) im Alter von acht Wochen von der Firma Janvier (Le Genest-St-Isle, Frankreich) erhielt. Die Tiere wurden zu viert in einem Käfig ($38^2 \times 20^2 \times 59 \text{ cm}^3$) gehalten, bei einer konstanten Umgebungstemperatur von 22°C , mit einem 12:12h Hell-Dunkel-Zyklus. Wasser und Futter wurden ad libitum angeboten. Vor Beginn der Untersuchungen, die durch die o.g. Arbeitsgruppe durchgeführt wurden, wurde den Ratten zwei Wochen lang Zeit gelassen, um sich an die Umgebung zu gewöhnen. Die Versuchstiere wurden gemäß der Bestimmungen des European Communities Council Directive vom 24. November 1986 behandelt, das Vorgehen wurde vom Regierungspräsidium Karlsruhe genehmigt.^{176 177}

Die zehn Wochen alten Ratten wurden in zwei Versuchsgruppen unterteilt.

Die erste Gruppe erhielt eine einmalige Behandlung mit elektrokonvulsiven Schocks, dem Tiermodell für die EKT¹⁰⁸ (ECS, s.o.), die zweite Gruppe eine Serie von insgesamt fünf ECS-Anwendungen, jeweils eine pro Tag, an fünf aufeinander folgenden Tagen.

Die ECS-Applikation erfolgte über Ohrclip-Elektroden, nach einer Vorbehandlung des Ohres mit einem Elektroden-Gel. Die ECS wurden dabei jeweils eine Sekunde lang mit einer Stromstärke von 100mA und einer Frequenz von 50Hz verabreicht.

Die ECS-Applikation führte regelmäßig zu tonisch-klonischen Krämpfen der Ratten, mit einer Dauer von mindestens 20s.¹⁷⁸ Die Tiere der ersten Versuchsgruppe, mit nur einer ECS-Behandlung, wurden zu den Zeitpunkten 3, 8 oder 24 Stunden nach der Behandlung entsprechend der Methode von Glowinski und Iversen dekapitiert.¹⁷⁹ Die Tiere der zweiten Versuchsgruppe wurden 3, 8, 24, 72, 168 oder 336 Stunden nach der letzten ECS-Anwendung dekapitiert. Die Anzahl der jeweiligen Versuchstiere betrug pro Gruppe und Zeitpunkt 8, d.h. insgesamt wurden 72 Tiere einer ECS-Behandlung zugeführt, mit nachfolgender Dekapitation. 16 Tiere erhielten keine ECS-Applikation und dienten als Kontrollgruppe.

Bei den Hirngeweben gab es für NGF und BDNF aufgrund einer zu geringen Probenmenge bzw. nicht messbarer Werte je 4 nicht verwertbare Ergebnisse, bei den Serumproben waren für NGF 21 und für BDNF 9 Ergebnisse aus den gleichen Gründen nicht verwertbar. Insgesamt wurden 704 Proben untersucht.

2.2 Probengewinnung

Die Rattenhirne wurden sofort nach der Dekapitation auf einer eisgekühlten Platte disseziert. Hippocampi und frontale Kortizes, die im Folgenden untersucht werden sollten, wurden schockgefroren und bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert. Aus dem Rumpf der Ratten wurde Blut entnommen, und durch 20 minütige Zentrifugation bei 900 x g daraus Serum gewonnen. Dieses wurde ebenfalls bei -80°C eingefroren.

2.3 Vorbereitung der Proben

Die weitere Behandlung der Proben einschließlich der fluorometrischen Messung der enthaltenen Neurotrophine wurde dann durch mich in dem von Prof. Dr. Hellweg geleiteten Labor¹⁸⁰ durchgeführt. Zu Beginn wurden die Gewebeproben gewogen, um das jeweilige Feuchtgewicht zu ermitteln. Anschließend wurden die Proben durch Ultraschall in 1,2ml 10-20vol. Homogenisierungspuffer zunächst für 3 Minuten homogenisiert. Darauf folgte eine erneute Beschallung über mindestens 15 Minuten, um mögliche noch vorhandene Geweberückstände zu zersetzen. Bis zur weiteren Verarbeitung wurden die Proben erneut bei -80°C gelagert. Die Konzentrationen der Neurotrophine NGF und BDNF in den erhaltenen Gewebe- bzw. Serumproben wurden im Folgenden fluorometrisch, mithilfe eines enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) bestimmt.^{181 182 183 184}

2.4 Prinzip des enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

Die Methode des enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) beruht auf dem sogenannten Sandwich-Prinzip. Dabei wird als erster Schritt eine feste Phase mit spezifischen Antikörpern gegen die zu untersuchende Substanz (hier NGF bzw. BDNF) besetzt. Die Antikörper werden dabei im Überschuss angeboten, die Bindung an die feste Oberfläche (hier Mikrotiterplatten, je Mikrotiterplatte 96 Vertiefungen = wells) erfolgt durch Adsorption. Nach einer 2-3- stündigen Inkubationszeit werden die nicht fest an der Oberfläche haftenden Antikörper durch Waschen entfernt.

Als nächster Schritt wird das Antigen aufgetragen, das an den spezifischen Antikörper bindet und so über diesen mit der festen Phase verbunden ist. Das Antigen (NGF / BDNF) ist in den zugegebenen Gewebe- und Serumproben, wie auch im gereinigten Standard, enthalten.

Eine Voraussetzung für die Durchführung eines zweiseitigen ELISA ist die Eigenschaft des Antigens, ein Dimer zu sein. Sowohl NGF als auch BDNF erfüllen diese Bedingung. So bleibt eine Bindungsstelle frei, an die sich im nächsten Schritt ein zweiter zugegebener Antikörper bindet, der erneut spezifisch für das Antigen ist. Dieser zweite Antikörper ist kovalent an ein

Enzym gekoppelt. Die ungebundenen gekoppelten Antikörper werden durch Waschen entfernt. Das an den zweiten Antikörper gebundene Enzym katalysiert den Umsatz eines Substrates zu einem fluoreszierenden Produkt, das anschließend quantitativ fluorometrisch bestimmt werden kann und der gebundenen Menge an NGF bzw. BDNF direkt proportional ist. Mithilfe der erhaltenen Fluoreszenzmesswerte aus der ebenfalls gemessenen Standardkurve kann dann die NGF- bzw. BDNF- Konzentration der jeweiligen Probe errechnet werden.^{185 181 182}

2.5 Verfahren zur Messfehlervorbeugung

Um Auswertungsfehlern vorzubeugen, wird für jede Probe auch die Wiederfindungsrate, die so genannte Recovery, bestimmt. Dabei wird dem Homogenat in einem gesonderten Ansatz eine definierte Menge an exogenem NGF bzw. BDNF zugefügt und anschließend gemessen, wie viel dieser bekannten zugegebenen Menge nachgewiesen werden konnte. So kann bestimmt werden, in welchem Maße Verluste während des Assays auftreten.¹⁸¹ Ein Grund für diese Verluste sind zum Beispiel die Bindung von NGF / BDNF an im Homogenat oder Serum vorhandene Rezeptoren oder Proteine. Besonders BDNF als basisches Protein weist dabei eine hohe Bindungsaffinität auf.^{87 100}

Die so ermittelte Recovery-Rate wird dann bei der Auswertung der Proben berücksichtigt.

Daneben wird auch die unspezifische Bindung mithilfe eines unspezifischen Antikörpers ermittelt. Um das methodisch bedingte „Hintergrundrauschen“ einzubeziehen, werden ein spezifischer und ein unspezifischer Leerwert (blank) bestimmt. Dabei wird nur das Signal von Homogenisierungspuffer mit spezifischen oder unspezifischen Antikörpern gemessen, das also nicht durch eines der Neurotrophine verursacht sein kann.

Die so genannte unspezifische Bindung errechnet sich dann aus der Differenz des unspezifischen Probenwertes und dem unspezifischen Blank und wird von der berechneten Neurotrophinkonzentration in der jeweiligen Probe abgezogen.¹⁸¹

Die Bestimmung von spezifischer sowie unspezifischer Bindung und der Recovery erfolgt aufgrund der unvermeidbaren Streuung für jede Probe in vierfacher Ausführung (Quadruplikate). Zur Vermeidung von Einflüssen möglicher Inter-Assay-Varianzen werden die zu messenden Proben in den jeweiligen Assays so angeordnet, dass sie zu vergleichenden Bedingungen innerhalb der jeweiligen Assays vorliegen.

2.6 Durchführung des NGF-ELISA ^{181 182 183 184}

2.6.1 Erster Tag:

2.6.1.1 Aufbringen der Antikörper auf die feste Phase

Die wells der Mikrotiterplatten werden bei Raumtemperatur nach einem feststehenden Schema mit je 50µl/well des spezifischen Coating-Puffers (Anti-Mouse-β-NGF Klon 27/21 Verdünnung 1:100) bzw. 50µl/well des unspezifischen Coating-Puffers (Anti-Maus IgG₁, Verdünnung 1:2000) beschichtet. Anschließend werden die Platten für 2-3 Stunden im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubiert. Danach werden die Mikrotiterplatten dreimal in Folge mit jeweils 200µl Waschpuffer/well per Hand gewaschen, um ungebundene Antikörper zu entfernen.

2.6.1.2 Vorbereitung der Probenansätze, Auftragung auf die Mikrotiterplatten

Die bereits (in 1,2ml Homogenisierpuffer = Hpi-Puffer) homogenisierten Gewebe werden aufgetaut und nochmals für 3 Minuten im Ultraschallbad behandelt, um etwaige bisher nicht vollkommen aufgelöste Teilchen vollständig zu homogenisieren. Die Probenansätze werden wie folgt in Eppendorfgläsern vorbereitet: Pro Probe gibt es je ein Gefäß für die spezifische und die unspezifische Bindung, sowie ein Gefäß für die Recovery-Probe. In jedes Probengefäß werden 400µl Homogenat pipettiert. In das Recovery-Gefäß werden 10µl Recovery-Lösung für das Homogenat vorgelegt, bei Seren 5,5µl. Dann werden 200µl Homogenat zugegeben.

Bei den Serumproben werden 140µl Serum + 560µl S/Cpi (Standard/Conjugatpuffer mit Proteaseninhibitoren) +PolyMak[Verdünnung 1:5000] in das Probengefäß pipettiert, daraus werden dann 220µl für das Recovery-Probengefäß entnommen. Die Ansätze werden anschließend bei 6000 x g und einer Temperatur von +10°C für 25 Minuten zentrifugiert.

Ein weiterer Ansatz wird vorbereitet, für den in leere Probengefäße 220µl und in die Gefäße für die spätere Recovery-Bestimmung 110µl Equilibrierpuffer vorlegt werden.

Anschließend werden von dem Überstand der zentrifugierten Proben des ersten Ansatzes 220µl in das Probengefäß des zweiten Ansatzes gegeben und 110µl aus dem 1.Recovery-Probengefäß in das 2. (=1:1 Verdünnung).

In einem dritten Ansatz wird bei jedem Assay ein NGF-Standard mit Konzentrationen von 1,28ng/ml bis 1,25pg/ml NGF/ml angelegt, der zur Erstellung einer Eichkurve dient.

Die Gewebe- bzw. Serum- sowie die Recovery-Proben und der Standard werden anschließend nach einem festen Schema auf die Mikrotiterplatten aufgetragen. Anschließend werden die Platten für 15-20 Stunden bei +4°C in einer festverschlossenen Kammer im Dunkeln inkubiert.

2.6.2 Zweiter Tag

2.6.2.1 Auftragung des 2. Antikörpers sowie Initiierung der Enzymreaktion

Am zweiten Tag werden die Mikrotiterplatten nach etwa 45 Minuten Akklimatisation an die Raumtemperatur erneut dreimalig mit dem Waschpuffer gewaschen (200µl/well).

Daraufhin wird in jedes well der Mikrotiterplatten 50µl des Anti-β-NGF-Galaktosidase-Konjugats Gal/27/21-Konjugat gegeben. (Homogenat: Verd.: 1:250, Serum: 1:75) mit folgender erneuter Inkubation für 2 Stunden im Dunkeln bei Raumtemperatur.

Darauf folgend werden die Platten dreimal mit Waschpuffer gewaschen (200µl/well), sowie zweimal mit Substratpuffer (150µl/well). Gleich im Anschluss wird als spezifisches Substrat Methyl-Umbelliferyl-β-Galaktosid (=MUG, 0,2mM in Substratpuffer gelöst, je 50µl/well) in die wells pipettiert. Die Platten werden für 15-20 Stunden bei +4°C in einer festverschlossenen Kammer im Dunkeln inkubiert.

2.6.3 Dritter Tag

2.6.3.1 Fluorometrische Messung des Reaktionsproduktes, Auswertung

Nachdem die Mikrotiterplatten Raumtemperatur erlangt haben, wird die Enzymreaktion durch Zugabe von 200µl Stopp-Puffer/well beendet. Anschließend erfolgt die fluorometrische Messung. Das Reaktionsprodukt der β-Galaktosidase, 4-Methylumbelliferon, wird bei einer Wellenlänge von 355nm angeregt und emittiert bei 470nm. Die erhaltenen Messwerte sind dabei der Menge des Reaktionsproduktes proportional. Von den in jeweils vierfacher Ausführung bestimmten Messwerten wird der Mittelwert errechnet. Um den NGF-Gehalt der einzelnen Proben zu erhalten, werden die Messwerte der unspezifischen von der spezifischen Bindung abgezogen und um die Wiederfindungsrate, die Recovery, korrigiert.

Der NGF-Gehalt wird als Äquivalent zu Maus 2,5S NGF angegeben. Die Nachweisgrenze des ELISA liegt bei 0,25pg/ml. Mithilfe der Eichkurve können die NGF-Konzentrationen der Proben bestimmt werden. Die erhaltenen Daten werden mithilfe des Serocalc TM-Programmes sowie eines in Prof. Hellwegs Labor entwickelten Excel-Programmes ausgewertet.^{181 182 183 108 184}

2.7 Durchführung des BDNF-ELISA^{142 181 186 184}

Die BDNF-Konzentrationsmessung wird mithilfe eines kommerziellen ELISA Kits nach den grundsätzlichen Anweisungen des Herstellers (Promega, Inc.) durchgeführt. Allerdings wird sie an die fluorometrische Technik angepasst, die auch für die NGF-Bestimmung verwandt wird.

2.7.1 Erster Tag

2.7.1.1 Aufbringen der Antikörper auf die feste Phase

Es werden jeweils 50µl/well des spezifischen Coating-Puffers (monoklonaler Anti-BDNF-Antikörper mAb = 1. Antikörper, Verdünnung 1:750) bzw. 50µl/well des unspezifischen Coating-Puffers (Maus IgG₁, aus MOPC 21, Verdünnung 1:8000) in die wells der Mikrotiterplatten pipettiert. Die Platten werden dann für 15-20 Stunden bei +4°C in einer festverschlossenen Kammer im Dunkeln inkubiert.

2.7.2 Zweiter Tag

2.7.2.1 Vorbereitung der Probenansätze, Auftragung auf die Mikrotiterplatten

Nach der Inkubation werden die Mikrotiterplatten viermal mit Waschpuffer gewaschen, jeweils 200µl/well. Dies dient wiederum der Entfernung nicht gebundener Antikörper.

Die zuvor in 1,2ml Hpi-Puffer homogenisierten Gewebeproben werden aufgetaut und für 3 Minuten im Ultraschallbad behandelt, um eventuell noch vorhandene Gewebestückchen aufzulösen. Die dann vorbereiteten Ansätze sind denen bei der NGF-Bestimmung ähnlich:

In die Gefäße für die Recovery-Proben für die Homogenate werden 10µl Recovery-Lösung vorgelegt und anschließend wird 200µl Homogenat zupipettiert. In die Probengefäße für die Bestimmungen aus dem Gewebe werden 400µl Homogenat gegeben. Bei den Bestimmungen aus dem Serum werden als erster Schritt in den dafür vorgesehenen Eppendorfgefäßen 5µl Recovery-Lösung vorgelegt. In einem anderen Probengefäß werden dann je 10µl Serum mit 190µl S/Cpi + Poly Mak 33 [1:5000] gemischt und davon je 70µl zu 630µl S/Cpi + Poly Mak 33 [1:5000] gegeben. So entsteht ein Verdünnungsverhältnis von 1:200. Aus diesem zweifach verdünnten Ansatz werden dann jeweils 215µl zu den vorgelegten 5µl Recovery-Ansatz pipettiert. (Die Verdünnung entspricht einer Zugabe von 25pg Recovery-Ansatz/ml). Die Proben- und Recovery-Ansätze werden dann 25 Minuten lang bei 6000 x g und +10°C zentrifugiert. Anschließend werden die Überstände abpipettiert, und zwar 220µl der Proben und 110µl der Recovery-Ansätze, und jeweils im Verhältnis 1:1 mit Equilibrierpuffer in einem neuen Gefäß vermischt.^{181 186} Bei jedem Assay wird zusätzlich ebenfalls ein BDNF-Standard angesetzt, um eine Referenzkurve zu erhalten. Nach dem Waschen werden die Proben, Recovery-Proben, Standards und Blanks (=nur S/Cpi-Puffer) auf die Mikrotiterplatten aufgetragen (je 50µl/well). Dies geschieht ebenfalls in vierfacher Ausführung, bzw. sechsmal für die Blanks. Das Schema entspricht dabei dem des NGF-ELISA. Die Platten werden im Anschluss 15-20 Stunden lang bei +4°C in einer festverschlossenen Kammer im Dunkeln inkubiert.

2.7.3 Dritter Tag

2.7.3.1 Auftragung des 2. und 3. Antikörpers, Initiierung der Enzymreaktion

Am dritten Tag werden die Mikrotiterplatten zuerst viermal mit je 200µl/well Waschpuffer gewaschen. Dann werden je 50µl/well des 2. Antikörpers Anti-BDNF-pAb (polyklonaler Antikörper, gelöst in Standard/Conjugatpuffer (S/C) [Verdünnung 1: 500]), aufpipettiert.

Es folgt eine Inkubationszeit von 2 Stunden im Dunkeln bei Raumtemperatur.

Nach deren Ablauf werden die Platten erneut viermal mit je 200µl Waschpuffer pro well gewaschen, bevor dann je 50µl/well des 3. Antikörpers, Anti-BDNF IgY Chicken AP (anti-chicken IgY-alkaline phosphatase conjugate, gelöst in S/C-Puffer [Verd.:1:1000]), aufgetragen werden. Darauf folgt wiederum eine Inkubationszeit von 1,5 Stunden im Dunkeln bei Raumtemperatur. Der anschließende erneute Waschgang umfasst 4 Zyklen, und direkt danach folgen zwei Zyklen, in denen je 150µl Substratpuffer/well pipettiert werden.

Nachfolgend werden die Platten ausgeschüttet. Um die Enzymreaktion zu starten, werden daraufhin 50µl von 1mM Attophos-Substrat/Attophos Working Solution (Boehringer Mannheim, Deutschland) in jedes geleerte well gegeben. Im Anschluss an die Attophos-Zugabe werden die Mikrotiterplatten für 15-20 Stunden in einer feuchten Umgebung, auf sogenannten „Schwimmern“, bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert.

2.7.4 Vierter Tag

2.7.4.1 Stopp der Enzymreaktion, Messung

Zur Terminierung der Enzymreaktion wird den Mikrotiterplatten 200µl Stopppuffer pro well zugegeben. Direkt danach kann das enzymatische Reaktionsprodukt bei einer Exzitationswellenlänge von 485nm und einer Emissionswellenlänge von 538nm fluorometrisch bestimmt werden. Die Ergebnisse werden als Enzymaktivität bestimmt, mit Vergleich zu einem AttoPhos-Standard in mit Antikörpern beschichteten Mikrowells.

Der BDNF-Gehalt wird als Äquivalent zu rekombinantem humanen BDNF angegeben. Die Nachweisgrenze des Assays liegt bei 1pg/ml.^{142 181 186 108 184}

Die Auswertung der Fluoreszenzdaten erfolgt mithilfe des Serocalc TM-Programmes, sowie eines in Prof. Hellwegs Labor entwickelten Excel-Programmes, mit dem die Konzentrationen der Neurotrophine in pg/mg Feuchtgewicht berechnet werden können.

2.8. Materialien

2.8.1 Pufferlösungen ¹⁸⁴

Coating-Puffer

(0,05M CO₃-Puffer; pH: 9,6)

a) 5,3g/l Na₂CO₃ (M => 105,99g/mol)

b) 4,2g/l NaHCO₃ (M => 84,01g/mol)

Mischverhältnis a:b = 1:0,6; Lagerung bei +4°C im Kühlschrank

Oder: Den Inhalt einer Kapsel Carbonate-Bicarbonate Puffer in 100ml Reinstwasser auflösen.

(Kapseln werden bei Raumtemperatur aufbewahrt) = pH 9,2

Waschpuffer

(pH 7,0)

a) 15,8g/2l Tris-HCl (=>0,05M)

b) 23,37g/2l NaCl (=>0,2M)

c) 2,0g Na-Azid (=>0,1%)

d) 15,0g Gelatine (=>0,75%)

e) 2,0ml NP-40 (Nonidet) (=> 0,1%)

⇒ 1 Teil 0,1M Tris-HCl / 0,4M NaCl + 1Teil 0,2% TritonX-100 oder NP-40

Die Substanzen a) und b) werden in 2l Reinstwasser aufgelöst. Danach wird der pH-Wert mit ca. 1-2 NaOH-Plätzchen auf 7,0 eingestellt. Zum Schluss werden die restlichen Substanzen in der Mischung aufgelöst.

NGF-Substratpuffer

(0,1M PO₄-Puffer; pH 7,3)

a) 7,8g/500ml NaH₂PO₄*H₂O (M = 137,99g/mol)

b) 17,8g/l Na₂HPO₄*2H₂O (M = 177,99g/mol)

Lösung a) wird zu Lösung b) hinzugegeben, bis pH 7,3 erreicht ist (=> 200-300ml).

Danach wird der Puffer mit 1mM MgCl₂ versetzt (=> Bei ca. 1,3l Lösung sind das 0,26g MgCl₂; M = 203,30g/mol).

Stopp-Puffer

(pH 10,5)

11,26g Glycin/l Reinstwasser (M = 75,07g/mol; 0,15M)

Die pH-Einstellung erfolgt mit ca. 15-20 NaOH-Plätzchen

BDNF-Substratpuffer

(pH 8,7)

s. NGF-Substratpuffer, anderer pH-Wert

Homogenisierpuffer

(pH 7,0)

a) 15,8g/l Tris-HCl (\Rightarrow 0,1M)

b) 23,37g/l NaCl (\Rightarrow 0,4M)

Beide Substanzen werden in 1l Reinstwasser aufgelöst und der pH-Wert auf 7,0 mit konzentriertem NaOH eingestellt. Anschließend wird 1,0g Na-Azid (\Rightarrow 0,1%) hinzugefügt. Der Proteasen-Inhibitoren-Mix wird erst kurz vor Gebrauch im Verhältnis 1:100 hinzugegeben.

Proteasen-Inhibitor-Mix (PI):

4000 KU Aprotinin/ml: 0,666mg/ml (Boehringer Mannheim)

20 mM Benzethoniumchlorid: 9,322mg/ml (Serva, Heidelberg, MG 466,1)

200 mM Benzamidin (MG 174,6); 34,92mg/ml

in 400mM EDTA (MG 336,2) lösen: 134,5mg/ml (bei neutralem pH löslich)

Standard/Conjugatpuffer

(pH 7,0)

a) 3,95g Tris-HCl (\Rightarrow 0,05M)

b) 5,80g NaCl (\Rightarrow 0,2M)

c) 0,5g Na-Azid (\Rightarrow 0,1%)

d) 5,0g BSA (bovines Serumalbumin) (\Rightarrow 1,0%)

e) 0,5ml NP-40 (\Rightarrow 0,1%)

Zunächst werden Substanzen a) und b) in $\frac{1}{2}$ l Reinstwasser aufgelöst, dann wird der pH-Wert mit NaOH auf 7,0 eingestellt. Anschließend werden die restlichen Substanzen der Reihe nach zugefügt.

Equilibrierpuffer

(0,2% NP-40)

Auf ½ l Reinstwasser wird 1ml NP-40 pipettiert (=> 0,2%)

Die Puffer wurden grundsätzlich in Reinstwasser (Millipore-QUF Plus Anlage) erstellt.

2.8.2 Ansätze ¹⁸⁴

NGF-Standard-Ansatz

- 1) 1000pg/ml => a) 985µl S/Cpi + 15µl NGF-Stock 2
- 2) 250pg/ml => b) 900µl “ + 300µl von a)
- 3) 62,5pg/ml => c) 900µl “ + 300µl von b)
- 4) 15,63pg/ml => d) 900µl “ + 300µl von c)
- 5) 3,91pg/ml => e) 900µl “ + 300µl von d)
- 6) 0,98pg/ml => f) 900µl “ + 300µl von e)
- 7) 0,24pg/ml => g) 900µl “ + 300µl von f)

Für den Standard wird S/Cpi verwendet. Bei Serum allerdings S/Cpi + Poly Mak (33)

⇒ 1:5000 Verd.

NGF-Recovery-Ansatz

125pg/ml => 570µl S/Cpi bzw. Hpi + 30µl NGF-Stock 2

Bei Flüssigkeiten wird S/Cpi-Puffer eingesetzt, während bei Geweben Hpi-Puffer und bei Serum S/Cpi-Puffer + Poly Mak33[Verdünnung 1:5000] verwendet wird.

MUG-Ansatz = 4-Methylumbelliferyl-β-Galaktoside

Bei 6 Mikrotiterplatten 1,5mg – 2,0mg des Stoffes in 30ml Substratpuffer geben. (MUG zunächst mit DMF (Dimethylformamid) auflösen; i.R. 5mg mit 1000µl)

BDNF-Standard-Ansatz:

- 1) 500pg/ml => a) 10ml S/Cpi + 1µl BDNF-Stock (Sigma)
- 2) 166,7pg/ml => b) 600µl S/Cpi + 300µl von a)
- 3) 55,56pg/ml => c) 600µl S/Cpi + 300µl von b)
- 4) 18,52pg/ml => d) 600µl S/Cpi + 300µl von c)
- 5) 6,17pg/ml => e) 600µl S/Cpi + 300µl von d)
- 6) 2,06pg/ml => f) 600µl S/Cpi + 300µl von e)
- 7) 0,69pg/ml => g) 600µl S/Cpi + 300µl von f)

Für den Standard wird ebenfalls S/Cpi verwandt, außer bei Seren, dort S/Cpi + Poly Mak 33 => 1:5000 Verdünnung

BDNF-Recovery-Ansatz

- a) 250pg/ml => 476µl Hpi + 1µl BDNF-Stock (Sigma) => Homogenat
- b) 25pg/ml => 9091µl S/Cpi + 2µl BDNF-Stock (Sigma) => Serum

2.8.3 Antikörper, Zusätze ¹⁸⁴

- Anti-NGF-β-Antikörper (Maus, Klon 27/21) (Boehringer Mannheim)
- Anti-NGF-β-Galaktosidase-Konjugat (Maus, Klon 27/21) (Boehringer Mannheim, Bestellnr.:1530623)
- NGF-β, Standard (Maus, mNGF-β) (Boehringer Mannheim)
- Maus IgG₁-Antikörper aus MOPC 21 (Sigma Chemicals, Deisenhofen, Bestellnr.: M9269)
- Methylumbelliferyl-β-D-Galaktosid (Sigma Chemicals, Deisenhofen, Bestellnr.: M1633)

- Anti-BDNF mAb (Promega GmbH)
- Anti-BDNF pAb (Promega GmbH)
- Anti-Chicken IgY AP Conjugate (Promega GmbH)
- Maus IgG₁-Antikörper (Sigma Chemicals, Deisenhofen)
- BDNF-Neurotrophic Factor (Standard) (Sigma GmbH)
- Attophos TM Substrate Set (Boehringer Mannheim GmbH / Roche GmbH)
- Proteasen-Inhibitor-Tabletten (Boehringer Mannheim GmbH / Roche GmbH)
- BDNF Emax Kit TM Immuno Assay (Promega Inc.)

2.8.4 Geräte

- Branson-Sonicator „W 250“ mit flüssigkeitsgekühltem Titan-Becherresonator (Branson Sonic Power Company)
- Kühlzentrifuge Cryofuge 6-6, (Heraeus-Christ)
- Fluorometer (Titertek Fluoroskan II, Labsystems Research Centre, Finnland, ehemals vertrieben durch Merlin Diagnostika (Bornheim-Hersel)
- Millipore-QUF Plus Anlage

2.8.5 Sonstige Materialien

- schwarze 96-Loch-Mikrotiterplatten (Micro Fluor B plates, Dynatech Laboratories Inc., Alexandria, Virginia, USA)
- autoklavierte 1,5ml Eppendorfgefäße (Bestellnr.: 3180)
- 4ml Polysterol-Reagenzröhrchen (Greiner Labortechnik)

Falls nicht anders angegeben, wurden allgemeine Laborchemikalien von der Fa. Merck, Darmstadt, und Reagenzien von der Sigma Chemical Company, Deisenhofen bezogen.¹⁸⁴

2.9 Statistik

Für die Analyse der Zusammenhänge zwischen den BDNF bzw. NGF- Konzentrationen im Hirngewebe und Serum als so genannten abhängigen Variablen und den Hirnregionen, der EKT-Behandlung, der Anzahl der EKT-Behandlungen und der Zeit bis zur Enthauptung wurden die Varianzanalyse (analysis of variance = ANOVA) und die Kovarianzanalyse (analysis of covariance = ANCOVA) eingesetzt.

Mithilfe der ANOVA wird der Einfluss einer oder mehrerer unabhängiger Variablen auf eine abhängige Variable überprüft. Die abhängige Variable wird auch als Zielvariable oder metrische Zufallsvariable bezeichnet. Ihr Wert wird durch die unabhängigen Variablen bestimmt. Die unabhängigen Variablen, auch Einflussvariablen, Faktoren oder kategoriale Variablen genannt, geben die einzelnen zu vergleichenden Gruppen vor. Die Kategorien oder Faktorstufen eines Faktors bzw. einer Gruppe bezeichnen die Ausprägungen des Faktors.

Es wird der Varianzanteil untersucht, der auf einen Faktor zurückzuführen ist. Die Signifikanz lässt sich über einen F-Test ermitteln. In Tabellen der F-Verteilung kann der entsprechende F-Wert abgelesen werden. Anders ausgedrückt kann die Varianzanalyse als Ursachenzuschreibung erklärt werden.

Mit Hilfe der ANCOVA werden die Wirkungen von bestimmten, vermutlich irrelevanten, unabhängigen Faktoren, so genannter Kovariate, auf die abhängige Variable eliminiert, so dass die Varianz der Messwerte reduziert wird, entsprechend einer Verringerung des Hintergrundrauschens. So können die möglichen Effekte einer relevanten unabhängigen Variable auf die abhängige Variable statistisch nachgewiesen werden. Bei der ANCOVA werden die Methoden der Varianzanalyse (ANOVA) und der linearen Regressionsanalyse verbunden.¹⁸⁷

Alle Daten wurden mit Hilfe von STATATM Statistics/Data Analysis, Version 9.0 analysiert. Das zweiseitige Signifikanzniveau wurde für alle Statistiken mit $p < 0,05$ angegeben.

Vgl.¹⁰⁸.

3. Ergebnisse

3.1 Auswirkungen der ECS- (electroconvulsive shocks) Behandlung auf die Konzentration von NGF bzw. BDNF in Hirngewebe (präfrontaler Kortex / Hippocampus) und Serum

3.1.1 Auswirkungen auf NGF in präfrontalem Kortex und Hippocampus:

Nach einer einzelnen ECS-Anwendung blieben die NGF-Konzentrationen im Hirngewebe unverändert. Nach 5 ECS-Behandlungen stiegen sie innerhalb von 24 Stunden an, sowohl im präfrontalen Kortex (1,3-facher Anstieg), als auch im Hippocampus (1,2-facher Anstieg) (Abb. 1).

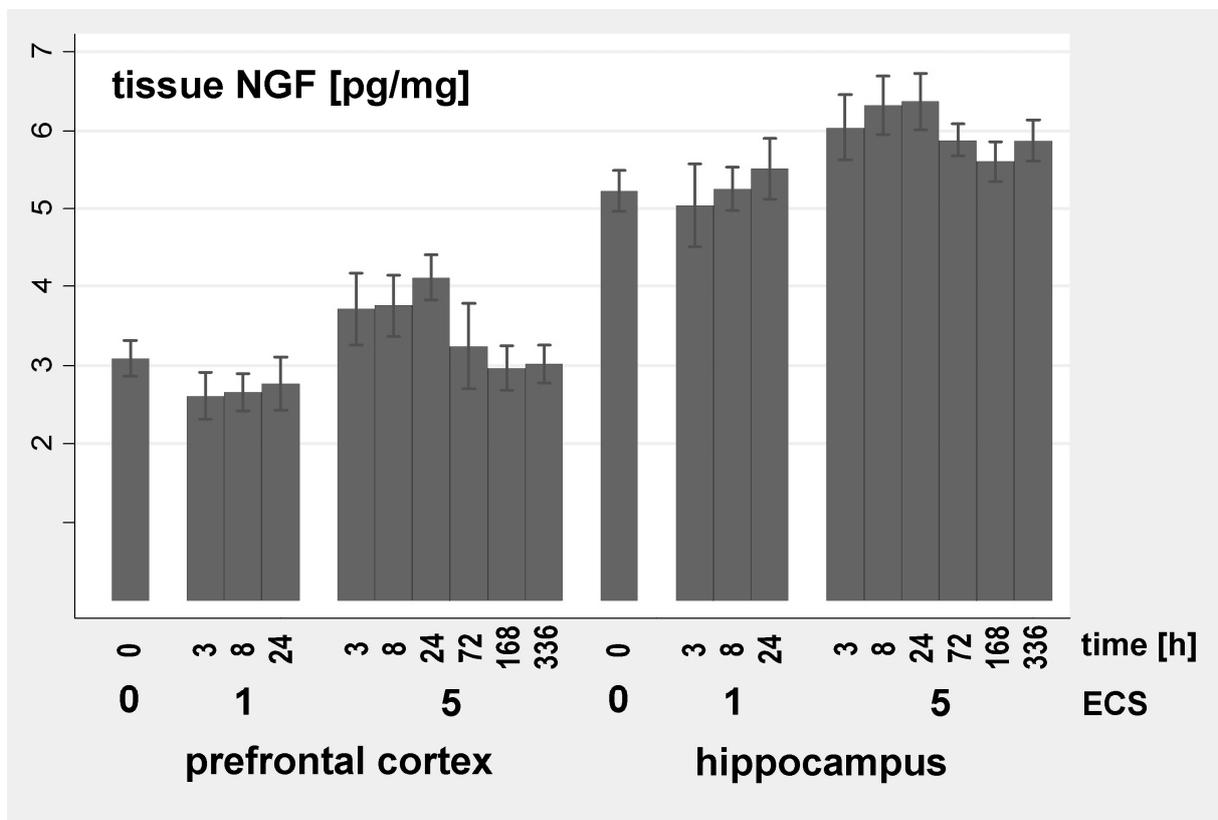


Abb.1: Zeitverlauf der NGF-Konzentrationen in pg/mg in präfrontalem Kortex und Hippocampus nach einer einzelnen ECS-Anwendung sowie einer Behandlungsserie von 5 ECS. Die Werte wurden zu den Zeitpunkten 3, 8 und 24h nach einer einzelnen ECS-Anwendung sowie zu den Zeitpunkten 3, 8, 24, 72, 168 und 336h nach einer fünfmaligen ECS-Behandlung gemessen und dargestellt. Der Zeitpunkt 0 steht für die Werte der Kontrollgruppe, in der keine ECS erfolgten. Abb.: ¹⁰⁸.

3.1.2 Auswirkungen auf NGF im Serum

Im Serum wurde sowohl nach einer einzelnen ECS-Anwendung, als auch nach einer Serie von 5 ECS-Behandlungen und einer Zeitdauer von bis zu zwei Wochen kein signifikanter Anstieg der NGF-Level gefunden (Abb.2).

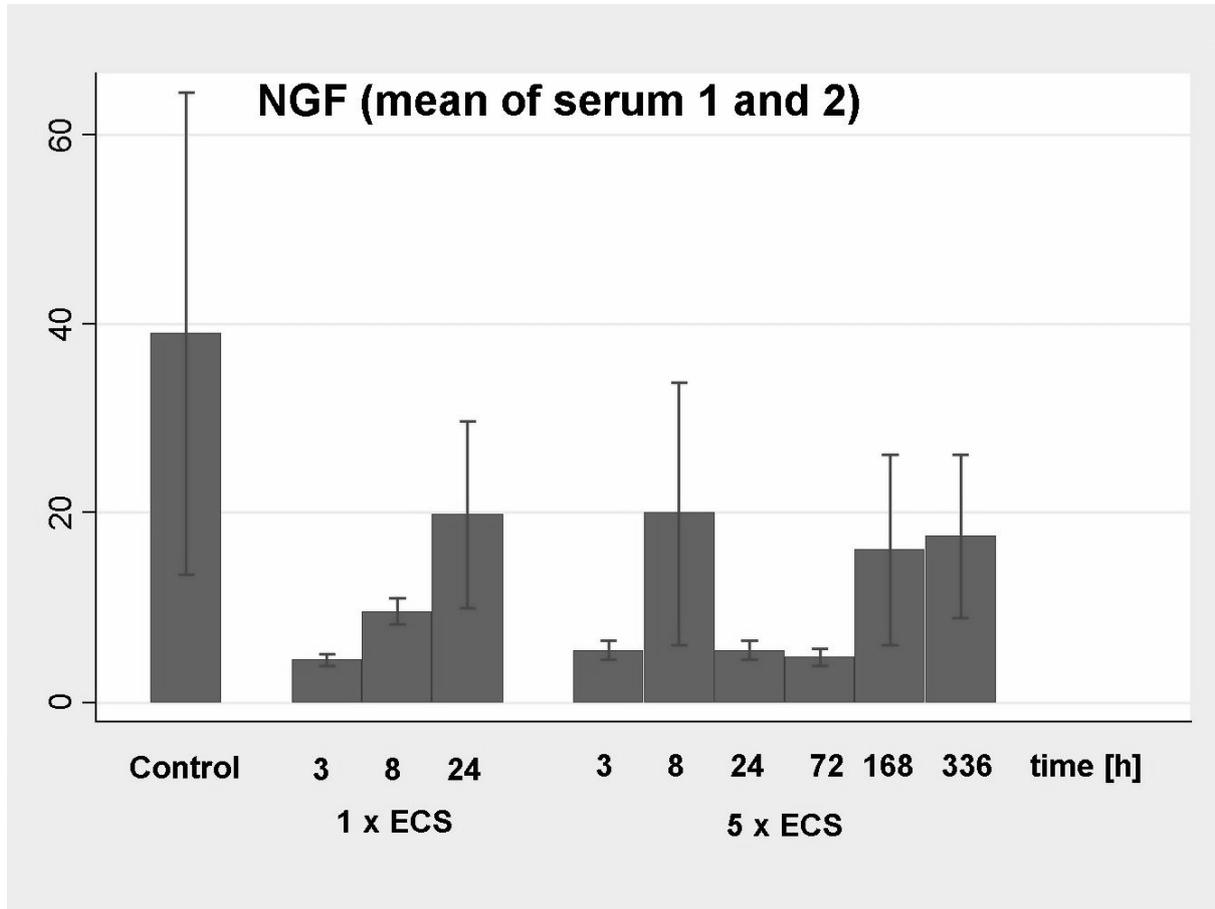


Abb.2 : Zeitverlauf der NGF-Serumkonzentrationen in pg/ml nach einer einzelnen und nach fünfmaliger ECS-Anwendung. Die Messungen erfolgten nach einer einzelnen ECS-Behandlung zu den Zeitpunkten 3, 8 und 24h, nach fünfmaliger ECS-Applikation zu den Zeitpunkten 3, 8, 24, 72, 168 und 336h nach der letzten Anwendung. Die Werte zum Zeitpunkt 0 stellen die NGF-Serumkonzentrationen der Kontrolltiere dar, bei denen keine ECS durchgeführt wurde. Es zeigt sich kein signifikanter Anstieg der NGF-Serumwerte. Abb.:¹⁰⁸.

3.1.3 Auswirkungen auf BDNF in präfrontalem Kortex u. Hippocampus

Nach einer einzelnen ECS-Anwendung waren die BDNF-Konzentrationen im Hirngewebe, besonders im Hippocampus, erhöht (Abb. 3).

Nach 5 ECS Sitzungen zeigten die BDNF-Konzentrationen dagegen einen deutlichen, 72 Stunden lang anhaltenden Anstieg, im präfrontalen Kortex 2,8-fach und im Hippocampus 2,2-fach. Nach einer Woche kehrten die Konzentrationen wieder zu den Ausgangswerten zurück (Abb.3).

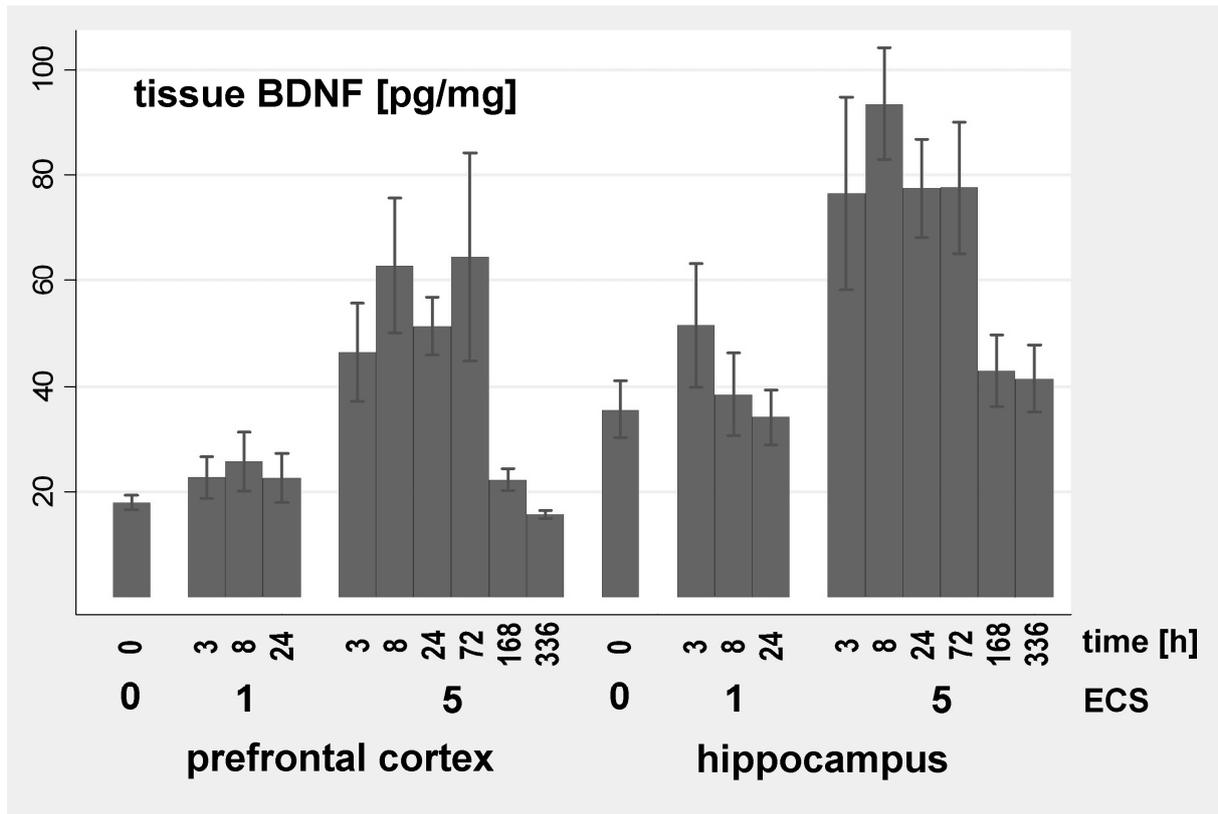


Abb. 3: Zeitverlauf der BDNF-Konzentrationen in präfrontalem Kortex und Hippocampus nach einer einzelnen ECS-Anwendung sowie einer Behandlungsserie von 5 ECS. Der Zeitpunkt 0 steht für die Werte der Kontrollgruppe, ohne ECS. Die Angabe der BDNF-Konzentrationen erfolgt in pg/mg. Die Werte wurden zu den Zeitpunkten 3, 8 und 24h nach einer einzelnen ECS-Anwendung sowie zu den Zeitpunkten 3, 8, 24, 72, 168 und 336h nach einer fünfmaligen ECS-Behandlung gemessen und dargestellt. Abb.: ¹⁰⁸.

3.1.4 Auswirkungen auf BDNF im Serum

Nach einer einzelnen ECS-Behandlung stiegen die BDNF-Serumwerte für eine Zeitspanne von bis zu acht Stunden an (Abb. 4). Nach 5 ECS-Behandlungen blieben die BDNF-Konzentrationen im Serum dagegen für drei Tage unverändert, stiegen aber eine Woche nach der letzten ECS-Sitzung signifikant an ($p=0,04$).

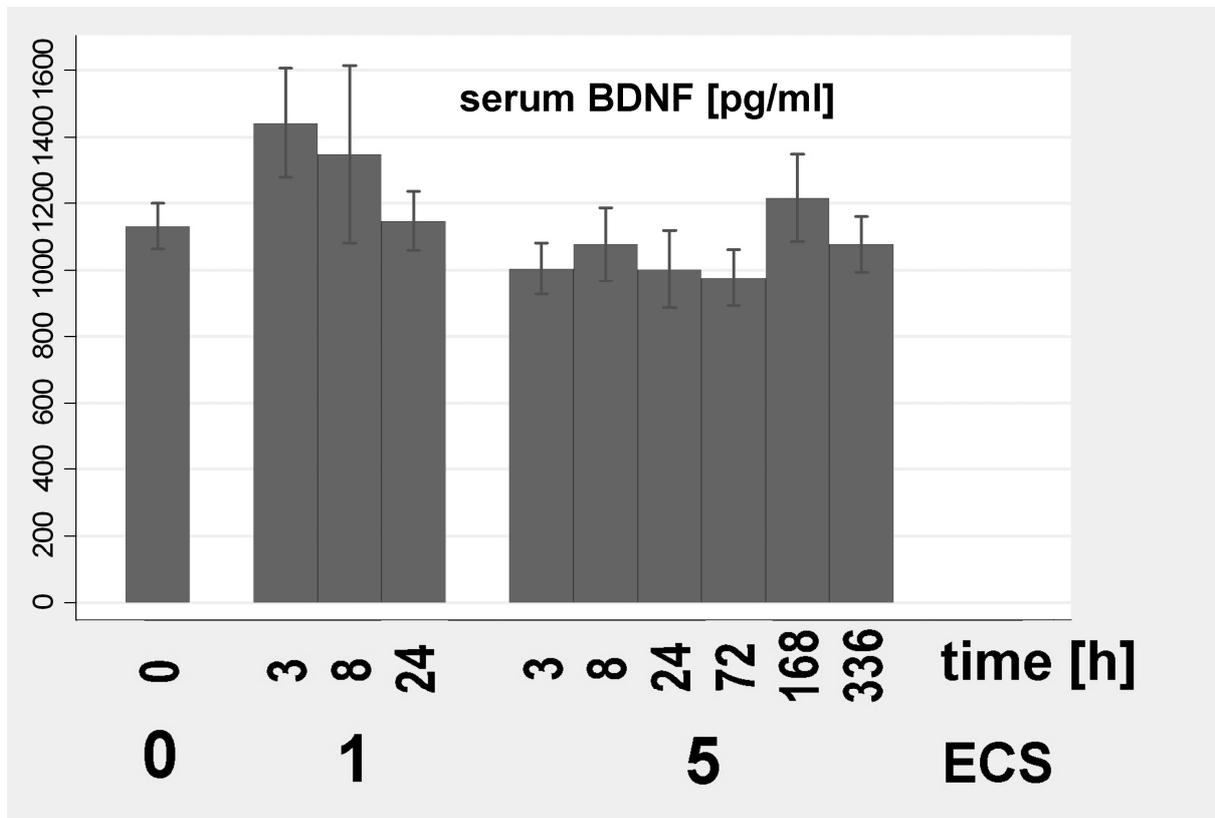


Abb. 4: Zeitverlauf der BDNF-Serumkonzentrationen nach einer einzelnen und nach fünfmaliger ECS-Anwendung. Die BDNF-Serumwerte werden in pg/ml angegeben. Die Messungen erfolgten nach einer einzelnen ECS-Behandlung zu den Zeitpunkten 3, 8 und 24h, nach fünfmaliger ECS-Applikation zu den Zeitpunkten 3, 8, 24, 72, 168 und 336h nach der letzten Anwendung. Die Werte zum Zeitpunkt 0 stellen die BDNF-Serumkonzentrationen der Kontrolltiere dar, bei denen keine ECS durchgeführt wurde. Abb.:¹⁰⁸.

3.2 Ergebnisse der ANCOVA-Analyse

Bei Durchführung der oben vorgestellten Analyse zeigte sich, dass sowohl die NGF- als auch die BDNF-Gewebekonzentrationen von der Anzahl der ECS, der Zeit und der Hirnregion abhängen. ($p < 0,0001$, bzw. $p = 0,0149$ für die Abhängigkeit der NGF-Konzentration im Gewebe und der Zeit.) Die NGF-Konzentrationen im Serum zeigten nur eine Abhängigkeit von der Anzahl der ECS-Behandlungen ($p = 0,0139$). Anders die BDNF-Serumkonzentrationen. Diese hängen von der Anzahl der ECS, der Hirnregion und der Zeit ab ($p = 0,0007$, bzw. $= 0,0022$, bzw. $= 0,0223$).

ANCOVA mit den NGF- und BDNF-Gewebekonzentrationen als abhängigen Variablen

	NGF (Hirngewebe)		BDNF (Hirngewebe)	
	F (df)	p	F(df)	p
Model	78,96 (4)	<0,00001	30,34 (4)	<0,00001
ECS-Anzahl	14,57 (2)	<0,00001	41,63 (2)	<0,00001
Hirnregion	286,68 (1)	<0,00001	32,23 (1)	<0,00001
Zeit (Kovariate)	6,06 (1)	0,0149	42,7 (1)	<0,00001
R ²	0,65		0,42	

Tabelle 1 zeigt die NGF- und BDNF-Hirngewebekonzentrationen als abhängige Variablen, mit der Anzahl der ECS-Anwendungen (0, 1, 5) und der Hirnregion (präfrontaler Kortex, Hippocampus) als Faktoren sowie der Zeit nach der letzten ECS-Behandlung (≤ 3 Tage, ≥ 1 Woche) als Kovariate. Es zeigt sich ein signifikanter Einfluss der Faktoren und der Kovariate auf die Hirngewebekonzentrationen der Neurotrophine. Die Anzahl der Untersuchungen betrug 172.¹⁰⁸

ANCOVA mit den NGF- und BDNF-Serumkonzentrationen als abhängigen Variablen

	NGF (Serum)		BDNF (Serum)	
	F(df)	p	F(df)	p
Model	1,87 (5)	0,1023	4,17 (5)	0,0014
ECS-Anzahl	4,40 (2)	0,0139	7,54 (2)	0,0007
Hirnregion	0,70 (1)	0,4055	9,69 (1)	0,0022
Zeit	1,33 (1)	0,2510	5,32 (1)	0,0223
NGF bzw. BDNF i.G. (Kovariate)	1,60 (1)	0,2075	7,11 (1)	0,0085
R ²	0,06		0,12	

Tabelle 2 zeigt die NGF- und BDNF-Serumkonzentrationen als abhängige Variablen, mit der Anzahl der ECS-Anwendungen (0, 1, 5), der Hirnregion (präfrontaler Kortex, Hippocampus) und der Zeit nach der letzten ECS-Behandlung (≤ 3 Tage, ≥ 1 Woche) als Faktoren sowie der NGF- beziehungsweise der BDNF-Gewebekonzentration als Kovariate.

Die Anzahl der Untersuchungen betrug 172. Das Entfernen der BDNF-Gewebekonzentration aus der Analyse führt zu einer kleineren Varianz ($R^2 = 0,08$).¹⁰⁸

Um einen möglichen Einfluss der NGF- bzw. BDNF-Konzentrationen im Hirngewebe auf die jeweiligen Serumkonzentrationen zu untersuchen, wurde zusätzlich eine ANCOVA mit den Hirngewebekonzentrationen der beiden Neurotrophine als Kovariate durchgeführt.

Dabei zeigte sich, dass die NGF-Konzentration im Serum nicht von der NGF-Gewebekonzentration beeinflusst wird (Abb. 5).

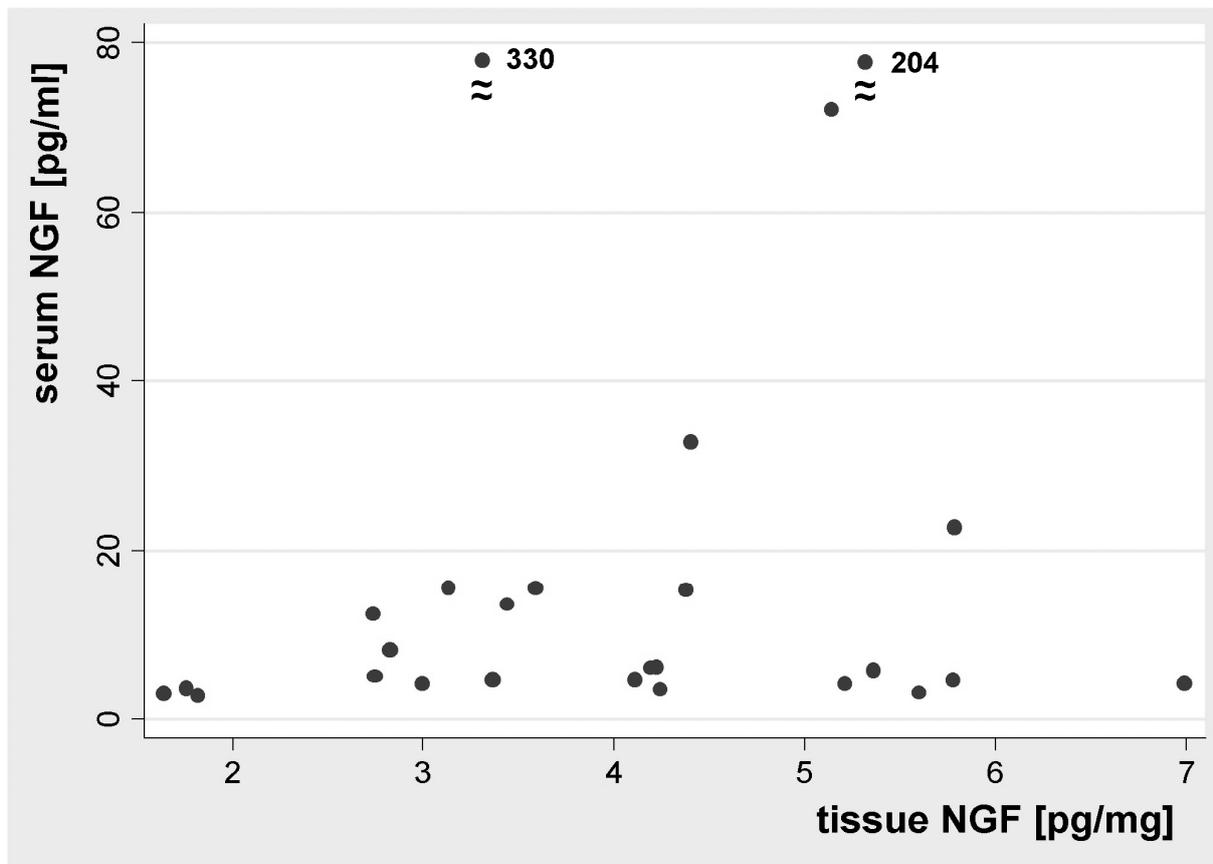


Abb.5: Keine Korrelation der Serum- und Gewebelevel von NGF. Abgebildet sind Werte der Kontrollgruppe, in der die Tiere keine ECS erhalten haben (Spearman's rho = 0,20, p= 0,32). Abb.: ¹⁰⁸.

Als eines der Hauptergebnisse der vorliegenden Arbeit konnte hingegen nachgewiesen werden, dass die BDNF-Serumkonzentration von dem BDNF-Gehalt im Hirngewebe abhängig ist. ($p = 0,0085$). In Tabelle 2 ist der signifikante kovariante Einfluss der BDNF-Hirngewebskonzentration auf die Serumkonzentration von BDNF dargestellt.

Die BDNF-Konzentrationen im Serum steigen dabei nach einer Zeitverzögerung von 3 Tagen an und spiegeln so, zeitverzögert, den Anstieg des Neurotrophins im Hirngewebe wider.

Aufgrund des kovariaten Einflusses von Gewebs-BDNF auf Serum-BDNF wurde eine Korrelationsanalyse durchgeführt, bei der andere Einflüsse durch Kovariate konstant gehalten wurden.

Für die Untergruppe, die keine ECS-Behandlung erhalten hat (Kontrollgruppe, n=31), wurde sowohl für NGF als auch BDNF eine Spearman rank correlation der Gewebe- und Serumlevel durchgeführt. Diese führte bei NGF zu keinem signifikanten Ergebnis (Spearman's rho = Spearman's rank correlation coefficient, Rangkorrelationskoeffizient: 0,20, p = 0,32) (Abb. 5). Bei BDNF hingegen kam es zu einem signifikanten Korrelationsergebnis, mit einem Spearman's rho von 0.40 und einem p= 0,025. (Abb. 6a).

Da die Konzentrationen von BDNF im Hirngewebe für etwa drei Tage nach fünfmaliger ECS-Behandlung erhöht waren (s. Abb. 3), wurden die Hirngewebs- und Serumkonzentrationen von BDNF nach 5 ECS-Behandlungen und einer Zeitverzögerung von 3, 8, 24 und 72h nach der letzten ECS-Anwendung ebenso korreliert (Abb. 6b).

Außer vier Werten lagen dabei alle oberhalb der Regressionslinie der Kontrolltiere (Abb. 6a), das heißt dass, bis auf vier, alle BDNF-Hirngewebskonzentrationen zu dieser Zeit höher als die Konzentrationen im Serum waren. Die vier verbliebenen Werte befanden sich ebenfalls über der unteren Grenze des 95% Konfidenzintervalles. Nach einer Zeitverzögerung von ein bis zwei Wochen waren die Konzentrationen von BDNF in Hirngewebe und Serum wieder zufällig um die Regressionslinie der Kontrollgruppe verteilt (Abb. 6c), was auf ein wiederhergestelltes Äquilibrium zwischen Gewebe- und Serumkonzentration weist.

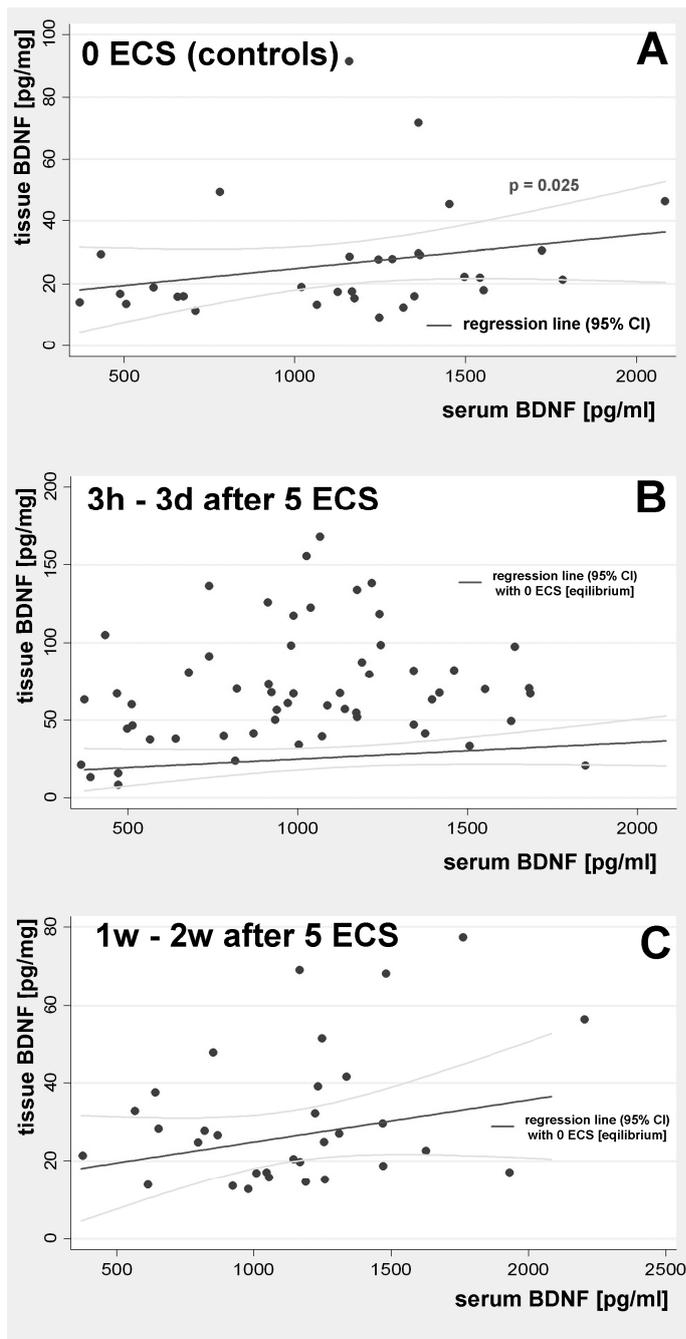


Abb. 6 Korrelation des BDNF Gehalts in Serum und Gewebe.

a) Kontrollgruppe, keine ECS-Anwendung. Serum- und Gewebekonzentrationen von BDNF sind korreliert.

Spearman rank correlation: $p = 0,0025$. Regressionslinie und das 95%-Konfidenzintervall (KI) sind dargestellt.

b) BDNF-Konzentrationen in Serum und Gewebe nach fünfmaliger ECS-Anwendung und einer Zeitverzögerung von 3, 8, 24 u. 72 Std. Alle Messwerte liegen oberhalb der 95%-Konfidenzintervall-Regressionslinie der Kontrollgruppe, damit sind alle Gewebekonzentrationen höher als die Serumkonzentrationen.

c) Serum- und Gewebekonzentrationen von BDNF nach fünfmaliger ECS-Anwendung und einer Zeitverzögerung von 1-2 Wochen. Die Messwerte liegen wieder zufällig um die Regressionslinie der Kontrollgruppe verteilt, Serum- und Gewebekonzentrationen von BDNF befinden sich also wieder in einem Äquilibrium. Abb.:¹⁰⁸.

3.3 Zusammengefasste Ergebnistabellen:

Gewebe: Frontaler Cortex (FC)

Treatment		Proben Nr.	Preap Date	Mean NGF Gewebe pg/mg o. ml	Mean NGF Serum pg/mg o. ml	Mean BDNF Gewebe pg/mg o. ml	Mean BDNF Serum pg/mg o. ml
1×EKT	+ 3h	49 (FC) - 56 (FC)	23.05.2006	2,61125	5,30125	22,7075	1790,61875
1×EKT	+ 8h	57 (FC) - 64 (FC)	23.05.2006	2,6625	12,62	25,7125	1265,69714
1×EKT	+ 24h	65 (FC) - 72 (FC)	24.05.2006	2,77125	16,14	22,6075	1189,07625
5×EKT	+ 3h	1 (FC) - 8 (FC)	19.05.2006	3,72	6,2014286	46,47	1044,18167
5×EKT	+ 8h	9 (FC) - 16 (FC)	19.05.2006	3,76	15,4828571	62,895	1283,97714
5×EKT	+ 24h	17 (FC) - 24 (FC)	20.05.2006	4,12	5,122857	51,35375	1043,125
5×EKT	+ 3d	25 (FC) - 32 (FC)	22.05.2006	3,242857	4,587143	64,4771429	1205,495
5×EKT	+ 7d	33 (FC) - 40 (FC)	26.05.2006	2,965	13,12125	22,28625	1273,60125
5×EKT	+ 14d	41 (FC) - 48 (FC)	02.06.2006	3,0175	12,5942857	15,7875	1033,44875

Gewebe: Hippocampus (HC)

Treatment		Proben Nr.	Preap Date	Mean NGF Gewebe pg/mg o. ml	Mean NGF Serum pg/mg o. ml	Mean BDNF Gewebe pg/mg o. ml	Mean BDNF Serum pg/mg o. ml
1×EKT	+ 3h	49 (HC)-56 (HC)	23.05.2006	5,0425	3,24833	51,58625	1090,61875
1×EKT	+ 8h	57 (HC)-64 (HC)	23.05.2006	5,2525	6,695	38,45375	1410,89875
1×EKT	+ 24h	65 (HC)-72 (HC)	24.05.2006	5,51125	21,7128571	34,11375	1106,265
5×EKT	+ 3h	1 (HC)-8 (HC)	19.05.2006	6,03857	4,995	76,4985714	932,794286
5×EKT	+ 8h	9 (HC)-16 (HC)	19.05.2006	6,32375	24,4171429	93,51875	913,35125
5×EKT	+ 24h	17 (HC)-24 (HC)	20.05.2006	6,37	5,352857	77,5125	962,6525
5×EKT	+ 3d	25 (HC)-32 (HC)	22.05.2006	5,87857	4,72	77,6657143	772,111429
5×EKT	+ 7d	33 (HC)-40 (HC)	26.05.2006	5,605	17,837	42,95625	1158,67375
5×EKT	+ 14d	41 (HC)-48 (HC)	02.06.2006	5,87125	20,52	41,51375	1122,2375

Gewebe: Frontaler Cortex (FC)**Kontrollen**

Treatment	Proben Nr.	Preap. Date	Mean NGF Gewebe pg/mg o. ml	Mean NGF Serum pg/mg o. ml	Mean BDNF Gewebe pg/mg o. ml	Mean BDNF Serum pg/mg o. ml
Keine EKT	73-80 (FC)	22.05.2006	3,3375	11,1914	18,23375	1087,94375
Keine EKT	81-88 (FC)	24.05.2006	2,84125	51,997	17,7625	1335,18375

Gewebe: Hippocampus (HC)**Kontrollen**

Treatment	Proben Nr.	Preap. Date	Mean NGF Gewebe pg/mg o. ml	Mean NGF Serum pg/mg o. ml	Mean BDNF Gewebe pg/mg o. ml	Mean BDNF Serum pg/mg o. ml
keine EKT	73-80 (HC)	22.05.2006	5,4975	18,785	37,4925	1045,20875
keine EKT	81-88 (HC)	24.05.2006	4,95625	41,1683	33,79	1074,80857

4. Diskussion

4.1 Methodendiskussion

Zur Diskussion der Methodik soll zunächst auf den ELISA für NGF genauer eingegangen werden. Dieser ist, wie der BDNF-ELISA auch, spezifisch, sensibel und reliabel.¹⁸¹

Alle anderen bekannten NGF-Assays sind vergleichbar oder weniger sensitiv^{181 185 97 189} bis auf den von Lärkfors und Ebendahl 1987 beschriebenen ELISA.¹⁹⁰

Der Assay weist eine hohe Sensitivität auf, die zu einem großen Teil auf den monoklonalen Antikörper 27/21NGF zurückzuführen ist, da dieser sowohl als erster als auch als zweiter Antikörper eingesetzt wird.¹⁸⁵ Der Antikörper weist außerdem eine hohe Spezifität für NGF auf, trotz der bestehenden großen Sequenzähnlichkeit der Aminosäuren anderer Neurotrophine. Durch die beachtliche Homologie des NGF verschiedener Spezies kann der Maus-Antikörper 27/21 spezifisch NGF im Rattenhirn erkennen.^{185 191}

Bei der Durchführung des ELISA wurde darauf geachtet, die Neurotrophin-Ausbeute (Recovery) möglichst hoch und falsche Messwerte möglichst gering zu halten. Dazu wurde beispielsweise das Gewebe mit Ultraschall homogenisiert. Denn es konnte nachgewiesen werden, dass auf diesem Wege eine höhere NGF-Ausbeute erzielt wird, im Vergleich zu Messungen, bei denen beispielsweise eine Glashomogenisation verwendet wurde.¹⁸¹

Bei dem Vergleich unterschiedlicher Messmethoden hat sich auch gezeigt, dass die Geschwindigkeit der Zentrifugation Einfluss auf die NGF-Ausbeute nimmt. Eine hohe Zentrifugationsgeschwindigkeit (100 000 x g) führte im Vergleich zu einer niedrigeren Zentrifugationsgeschwindigkeit (13 000 x g) zu einer geringeren gemessenen NGF-Menge. Es ist anzunehmen, dass NGF bei hoher Zentrifugationsleistung durch Gewebestrukturen zurückgehalten wird.¹⁹² Die bei den hier durchgeführten Assays genutzte Zentrifugationsgeschwindigkeit von 6000 x g, für die Dauer von 25 Minuten, trug daher zu einer begünstigten NGF-Ausbeute bei.

Vor Beginn des Assays wurden die Proben bei -80C eingefroren und gelagert. Ein daraus resultierender negativer Einfluss auf die Neurotrophinlevel konnte ausgeschlossen werden.

Es wurde gezeigt, dass diese Art der Lagerung zu keiner Beeinträchtigung der Ergebnisse führte.¹⁸⁵ Dass auftretende Streuungen zwischen den Werten der Tiere, den einzelnen Assays, aber auch innerhalb eines Assays unvermeidlich sind, wurde in Versuchsreihen bei der Entwicklung des ELISA bestätigt.¹⁸¹ Um diese statistischen Fehler möglichst kleinzuhalten und die Ergebnisse möglichst unverfälscht darzustellen, wurde von jeder Probe die spezifische

Bindung, die unspezifische Bindung (mit Hilfe ungerichteter Mausantikörper) und die Wiederfindungsrate, die Recovery, bestimmt, dies jeweils in vierfacher Ausführung. Die erhaltenen Werte wurden bei der Ergebnisberechnung berücksichtigt. Bei den gemessenen Fluoreszenzdaten wurden außerdem „Ausreißer“-Werte nicht in die weitere Berechnung übernommen, wenn sie eine Abweichung um mindestens den Faktor zwei vom Mittelwert zeigten. Die relativ große Probenzahl trug ebenfalls zur Verringerung von durch Streuung bedingten Messfehlern bei.¹⁸¹

Bei jedem Assay wurde eine Eichkurve erstellt, um die Genauigkeit der erhaltenen Messwerte überblicken, und die Ergebnisse einordnen zu können. Die Nachweisgrenze des ELISA liegt bei 50fg NGF per Well, entsprechend 0,25pg NGF pro g Feuchtgewicht des Gewebes.¹⁸¹

Er weist eine hohe Reliabilität auf, mit einem Pearson-Regressionskoeffizienten von $r=0,93$.¹⁹³

4.2 Ergebnisdiskussion

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit konnten die aufgestellten Hypothesen 1.) und 2.) bestätigen, nicht hingegen die NGF betreffende Hypothese 3.).

Durch die ECS-Behandlung zeigte sich ein signifikanter Anstieg von BDNF im Hirngewebe und, zeitverzögert, im Serum. Die mehrmalige ECS-Anwendung führte dabei zu deutlicheren und lang anhaltenderen Erhöhungen als die einmalige. Im Gegensatz zu der Hypothese 3.) zeigten die Konzentrationen von NGF im Gewebe hingegen nur leichte Veränderungen nach repetitiven ECS, die Serumwerte blieben unverändert.

Als wichtiges Ergebnis konnte die vermutete Korrelation von Gewebe- und Serum-BDNF bestätigt werden, wohingegen die Konzentrationen von NGF in Hirngewebe und Serum keine Korrelation aufwiesen.

Die Ergebnisse zeigen, dass durch ECS die Konzentrationen der Neurotrophine NGF und BDNF im Hirngewebe in Abhängigkeit von der Anzahl der ECS-Anwendungen, der Zeit und der Hirnregion verändert werden. Dabei ist der Anstieg von NGF nach fünf ECS-Behandlungen und einer Zeitspanne von 24 Stunden im präfrontalen Kortex 1,3-fach und im Hippocampus 1,2-fach (Abb. 1). BDNF steigt nach ebenfalls fünf ECS-Behandlungen und einer Zeitspanne von 24 Stunden im präfrontalen Kortex um ein 2,8- und im Hippocampus um ein 2,2-faches an (Abb. 3). Nach etwa drei Tagen (NGF) bzw. einer Woche (BDNF) hat sich diese vorübergehende Konzentrationserhöhung der Neurotrophine zurückgebildet; ihre Konzentrationen befinden sich wieder auf Ausgangsniveau.

Neben diesem gemeinsamen Anstieg und Abfall von NGF und BDNF konnte gezeigt werden, dass ihre Gewebekonzentrationen hochsignifikant linear miteinander korrelieren.¹⁰⁸

Anders als in der vorliegenden Arbeit konnte in einer früheren Studie von Angelucci und Mitarbeitern kein gemeinsamer Anstieg von NGF und BDNF, sowohl im frontalen Kortex, als auch im Hippocampus, durch ECS nachgewiesen werden. Es wurde lediglich ein Anstieg von BDNF im Hippocampus und von NGF im frontalen Kortex beschrieben, jedoch keine hippocampale NGF- und frontale BDNF-Konzentrationserhöhung.^{108 194} Dieser Unterschied könnte auf die abweichende ECS Technik, die angewandt worden ist, zurückzuführen sein. Denn von Angelucci und Mitarbeitern wurde für die elektrische Stimulation eine feststehende Spannung (fixed voltage) verwandt, die unter anderem zu kürzeren Krämpfen führt.¹⁰⁸ Bei der vorliegenden Arbeit wurde dagegen eine Krampfinduktion durch feststehende Stromstärke (fixed-current), angewandt, wie sie auch bei klinischen EKT-Anwendungen genutzt wird.¹⁰⁸ Diese Art der Krampfinduktion führt zu Krämpfen mit einer Mindestlänge von 20 Sekunden, so dass anzunehmen ist, dass nachfolgend eine deutlichere und ausgedehntere Neurotrophinerhöhung erfolgt, wohingegen die messbaren Veränderungen der Neurotrophine durch Anwendung der von Angelucci und Mitarbeitern verwandten Technik zu gering ausfallen könnten.^{108 194} Altar und Mitarbeiter konnten hingegen nach zehntägiger ECS-Anwendung einen Anstieg von BDNF in allen sechs von ihnen untersuchten Hirnregionen finden. Der Anstieg im Hippocampus umfasste dabei 132%, der im frontalen Cortex 94%. Nach der letzten ECS-Anwendung blieben die gestiegenen BDNF-Werte für mindestens 3 Tage lang erhöht.⁷⁰ Weitere Ergebnisse der vorliegenden Arbeit sind, dass zum einen die Serumwerte von NGF eine Abhängigkeit von der Anzahl der ECS-Anwendungen, allerdings nicht vom NGF-Gewebegehalt zeigen. Auch bei den Kontrolltieren, die nicht mit ECS behandelt worden waren, zeigte sich keine Korrelation zwischen Gewebe- und Serumwerten von NGF, wie es bei BDNF der Fall ist. Zum anderen wird dargelegt, dass der BDNF-Serumgehalt von der Anzahl der ECS-Anwendungen abhängt, allerdings nicht von der Zeit und von der Hirnregion.

Als weiterer wichtiger Punkt kann festgestellt werden, dass der BDNF im Serum von der BDNF-Konzentration im Hirngewebe abhängt, wobei eine Erhöhung der BDNF-Hirngewebswerte nach einer Zeitverzögerung von 3-7 Tagen in den Serumleveln reflektiert wird. Dies ist ein bedeutender Zusammenhang, der neue Möglichkeiten in der antidepressiven Therapie eröffnen könnte (s.u.).

Einige Studien haben den Zusammenhang zwischen den Konzentrationen von BDNF im Liquor (CSF) und im Serum geprüft. Laske und Mitarbeiter untersuchten eine mögliche Korrelation zwischen den BDNF-Konzentrationen in Liquor und Serum von 27 Alzheimer Patienten, 9 Patienten mit einem Normaldruckhydrozephalus und 28 altersentsprechenden gesunden Kontrollen.¹⁹⁵ Von letzteren standen ihnen 10 Liquorproben zur Verfügung.

Sie konnten eine signifikante Verringerung der BDNF-Serumlevel bei den Alzheimer und Normaldruckhydrozephalus Patienten im Vergleich zu denen der gesunden Kontrollen feststellen. Die Konzentrationen von BDNF im Serum korrelierten aber nicht mit denen im Liquor. Es konnte nur bei jeweils einem Teil der Patienten der entsprechenden Gruppe überhaupt BDNF im Liquor nachgewiesen werden (zwischen 11,1% und 50% der Patienten), da die Konzentrationen zu einem großen Teil unterhalb der Nachweisgrenze lagen.^{108 195}

In der Tat befinden sich die BDNF-Level im Liquor trotz sensitiver Nachweismethoden selbst bei gesunden Personen bereits unter oder an der Nachweisgrenze. Demnach scheint es nicht sinnvoll, den BDNF-Gehalt im Liquor zu bestimmen, zumal dieser sehr wahrscheinlich lediglich als blutige Kontamination zu messen wäre.⁸⁴

In einer anderen Studie von Chiaretti und Mitarbeitern,¹⁹⁶ in der Kinder mit Meningoenzephalitis untersucht wurden, konnte ebenfalls keine Korrelation der BDNF- und NGF-Konzentrationen in Liquor und Plasma gefunden werden. Die Liquor- und Plasmakonzentrationen von unter anderem NGF und BDNF wurden bei 13 Kindern mit viraler oder bakterieller Meningitis gemessen und mit denen von 12 Kontrollkindern mit nichtentzündlichem obstruktiven Hydrozephalus verglichen. Bei allen Patienten wurden hohe Konzentrationen von NGF und BDNF im Liquor gefunden. Die NGF-Werte im Liquor waren bei viraler Meningoenzephalitis höher, wohingegen die BDNF-Werte bei bakterieller Meningoenzephalitis hervorstechender waren. Klinisch und radiologisch gesehen korrelierten die erhöhten NGF- und BDNF-Werte mit einem vermehrten Krampfvorkommen, verlängerten komatösen Zuständen und spezifischen radiologischen Läsionen. Den Krankheitsausgang betreffend gab es allerdings keine Verbindung zu den NGF- oder BDNF-Leveln.¹⁹⁶

Eine mögliche Erklärung für das Fehlen einer Korrelation zwischen Liquor- und Plasmawerten könnte ein schneller Beginn der zentralen Neurotrophin-Produktion mit einem folgenden Ungleichgewicht hinsichtlich der peripheren Konzentrationen sein, wobei durch die schnelle Neurotrophin-Produktion eine neuronale Schädigung des ZNS möglichst verhindert werden soll.^{196 108}

4.2.1 BDNF-Veränderungen nach EKT

Andere Studien, die BDNF-Veränderungen in Serum und Plasma bei Menschen nach einem EKT-Verlauf untersuchten, kamen zu uneinheitlichen Ergebnissen. Viele konnten aber BDNF-Erhöhungen durch die EKT-Behandlung nachweisen (s.u.).^{108 172 197 171}

Grønli und Mitarbeiter fanden keinen signifikanten Anstieg von NGF oder BDNF im Serum bei 10 depressiven Patienten, die neben einer antidepressiven Medikation und Psychotherapie EKT erhielten. Die Serumwerte der Patienten wurden allerdings direkt nach der letzten EKT-Anwendung entnommen, so dass, neben der geringen Patientenzahl, die zu kurze Zeit, als dass sich ein Äquilibrium zwischen Hirn- und Serumwerten im Sinne einer Erhöhung nach EKT hätte einstellen können, der Grund für das Fehlen eines nachweisbaren Neurotrophin-, d.h. BDNF-Anstiegs sein könnte. Ein möglicher späterer Anstieg konnte also nicht erfasst werden.^{197 108}

Marano und Mitarbeiter konnten hingegen einen signifikanten Anstieg der BDNF-Konzentration nach EKT nachweisen. Bei 15 Patienten mit Major Depression wurde vor und während eines EKT-Verlaufes mittels ELISA BDNF im Plasma bestimmt. Daneben erfolgte eine Einstufung der Schwere der Depression mit einer Depressionsskala, der 21-item-Hamilton Rating Scale for Depression (HAM-D). 13 der 15 Patienten (=86,7%) zeigten durch die EKT einen signifikanten BDNF-Anstieg im Plasma, von einem Mittelwert vor EKT von 84,9pg BDNF/ml zu einem Mittelwert nach EKT von 141,2pg BDNF/ml. Auch im HAM-D Score gab es eine signifikante Veränderung. Die Schwere der Depression nahm bei den Patienten von einem Mittelwert von 30 vor dem EKT-Verlauf auf einen Wert von 9 nach der Behandlung ab.

Allerdings wurde hier, wie schon beschrieben, der BDNF-Gehalt im Plasma bestimmt. Dieser liegt um ca. ein Hundertfaches niedriger als der im Serum, da der größte Teil des BDNFs in den Thrombozyten gespeichert wird.¹⁰⁸ Die frühzeitige Erhöhung im Plasma könnte zum Beispiel auf einen schnellen Übergang von BDNF aus dem Gehirn ins Plasma, mit einem anschließenden hinausgezögerten Transport in die Thrombozyten, zurückgeführt werden.¹⁰⁸

Fernandes und Mitarbeiter konnten bei einer Gruppe antidepressivaresistenter Patienten nach EKT zwar eine deutliche Verbesserung der depressiven Symptomatik in der Hamilton Rating Scale for Depression (HAM-D) feststellen, allerdings keine Veränderung der Serumwerte von BDNF. Dies könnte ebenfalls auf eine zu frühe Serumentnahme zurückzuführen sein.¹⁹⁸

Piccinni und Mitarbeiter untersuchten den Krankheitsverlauf von medikamentenresistenten depressiven Patienten nach einem EKT-Verlauf und den Zusammenhang mit den Konzentrationen von BDNF im Plasma.¹⁹⁹ Sie fanden, dass die Patienten im Vergleich zur Kontrollgruppe vor EKT-Beginn signifikant niedrigere BDNF-Werte im Plasma aufwiesen. Nach dem EKT-Verlauf waren diese signifikant erhöht, mit einer gleichzeitigen Abnahme der

Depressionswerte in der HAM-D. Eine weitere interessante Beobachtung der Studie ist, dass nur Patienten, die eine Remission erreichten und höhere BDNF-Ausgangswerte aufwiesen als die Patienten, die keine Remission erlangten, nach dem EKT-Verlauf normalisierte BDNF-Konzentrationen aufwiesen. Dies würde die Möglichkeit der Verwendbarkeit des BDNF-Plasma-Ausgangswertes bei therapieresistenten Patienten eröffnen, mit dem eventuell im Vorhinein Aussagen über das Ansprechen des Patienten auf eine EKT-Behandlung getroffen werden können.¹⁹⁹ Auch hier wurden die BDNF-Werte im Plasma bestimmt, die wie beschrieben um ein Vielfaches niedriger liegen als im Serum. Es ist anzunehmen, dass eine Bestimmung der Serumwerte noch zweckmäßiger wäre.

Okamoto und Mitarbeiter beschrieben ebenfalls die Auswirkungen eines fünfwöchigen EKT-Verlaufes auf unter anderem die Serumwerte von BDNF bei 18 therapieresistenten depressiven Patienten.²⁰⁰ Sie fanden einen signifikanten BDNF-Anstieg im Serum bei den Patienten, die auf die EKT-Behandlung ansprachen. Die BDNF-Werte der Nonresponder aber blieben unverändert. Daneben wurde eine signifikante Abnahme der Plasmakonzentrationen von Homovanillinsäure (einem Abbauprodukt des Dopamins) nach dem EKT-Verlauf beobachtet. Gleichzeitig trat eine Verbesserung der depressiven Symptome bei allen Patienten auf. Dies unterstützt die Vermutung, dass die der Wirkungsweise der EKT zugrunde liegenden Mechanismen mit BDNF und dopaminergen Neuronen in Zusammenhang stehen könnten.²⁰⁰

Ein Anstieg von BDNF im Serum konnte daneben bei einer Patientin nachgewiesen werden, die aufgrund einer schweren Depression eine antidepressive Therapie in Form von Tiefenhirnstimulation erhielt. Es ist anzunehmen, dass die durch die Tiefenhirnstimulation induzierten neuroplastischen Veränderungen auf diese Weise in den peripheren BDNF-Leveln widerspiegelt wurden. So könnte BDNF auch hier als ein Marker für den Behandlungserfolg angesehen werden.²⁰¹

Auch Martinotti und Mitarbeiter konnten in einer Fallstudie eines 54jährigen Patienten mit schweren therapieresistenten schizophrenen Symptomen einen Anstieg der BDNF-Serumwerte im Verlauf einer EKT-Behandlung nachweisen.²⁰² Daneben konnte der therapeutische Effekt der EKT bei dem behandlungsresistenten schizophrenen Patienten belegt werden, seine Symptome wurden deutlich gebessert.

Bocchio-Chiavetto und Mitarbeiter untersuchten, ob EKT zu einer Veränderung der Serum-BDNF-Level bei einer Auswahl von medikamentenresistenten depressiven Patienten führte.¹⁷²

Bei den Patienten wurde ein signifikanter Anstieg der BDNF-Serumkonzentrationen festgestellt, allerdings erst einen Monat nach Beendigung der EKT. Daneben stieg BDNF in einer Untergruppe von Patienten mit niedrigen BDNF-Ausgangswerten bereits innerhalb eines Tages

nach der letzten EKT-Behandlung an. Bei den Patienten mit normal hohen BDNF-Konzentrationen trat hingegen während und direkt nach dem EKT-Verlauf keine Veränderung der Serumwerte auf. Der prompter Anstieg von BDNF bei Patienten, die niedrige BDNF-Anfangskonzentrationen im Serum aufwiesen, war bereits in einer anderen Studie beobachtet worden, in der die Serumkonzentrationen von BDNF bei depressiven, mit Antidepressiva behandelten Patienten, gemessen wurden.^{137 70 108} So kann angenommen werden, dass BDNF bei denjenigen Patienten am frühesten ansteigt, die niedrige Ausgangskonzentrationen des Neurotrophins aufweisen.^{172 108}

Der Anstieg von BDNF im Serum der Patienten nach einer Zeitdauer von einem Monat stimmt mit den Ergebnissen der vorliegenden Untersuchung überein, bei der ebenfalls eine verzögerte Erhöhung der Konzentrationen von BDNF im Rattenserum gefunden wurde.

4.2.2 Korrelation der BDNF-Konzentrationen in Gewebe und Serum

Die durch einige der aufgeführten Studien bestätigte Erhöhung der Serumwerte für BDNF geht mit der Annahme einer durch die EKT erhöhten BDNF-Konzentration im Hirngewebe einher, die sich nach einer Zeitverzögerung in den Serumwerten widerspiegelt. Es ist davon auszugehen, dass dieser zeitverzögerte Anstieg direkt mit den Hirngewebsleveln in Zusammenhang steht und BDNF über die Blut-Hirn-Schranke ins Serum gelangt. Dieser Zusammenhang ist allerdings nicht zwangsläufig kausativ. Es könnte auch sein, dass die erhöhten Serumwerte des Neurotrophins durch erhöhte periphere Produktion zustande kommen,^{108 197} eventuell auch durch direkte Effekte der EKT bzw. ECS auf Zellen des Immunsystems oder auf Thrombozyten. Da BDNF auch von vielen nicht-neuronalen Zelltypen synthetisiert wird, könnten die BDNF-Serumlevel auch eine Ansammlung des Neurotrophins aus unterschiedlichen Quellen sein, deren Veränderungen daher unter Umständen nicht mit den BDNF-Werten im Hirngewebe korrelieren.^{108 84 203} Die Leukozyten-BDNF-mRNA könnte aufgrund ihrer kurzen Halbwertszeit daher eine höhere Aussagekraft haben.⁸⁴

Auf der anderen Seite wurde in einer Studie, die radioaktiv markiertes BDNF nutzte, eindeutig gezeigt, dass BDNF die Blut-Hirn-Schranke passiert und zwar in Transport-Raten, die in einer Höhe waren, mit der die in der vorliegenden Arbeit gefundenen Korrelationen von BDNF aus dem Hirngewebe und den daraus resultierenden Plasmawerten erklärt werden können. Der Transport von BDNF über die Blut-Hirn-Schranke ist dabei in beiden Richtungen möglich, d.h. vom ZNS in die Peripherie und umgekehrt und folgt einem sättigbaren Mechanismus.^{108 206 207}

In einer anderen Studie wurden direkt die Konzentrationen von BDNF in Hirngewebe und Serum verglichen.²⁰⁴ Es zeigte sich eine lineare positive Korrelation der BDNF-Werte des frontalen

Kortex und des Serums bei postnatalen Ratten (die eine bzw. drei Wochen alt waren) und eine Sättigung bei Serumleveln von 4ng/mL bei ausgewachsenen Ratten.¹⁰⁸

Klein und Mitarbeiter fanden eine Korrelation zwischen BDNF-Leveln im Hippocampus und denen im Blut von Ratten, beziehungsweise im Plasma von Schweinen. Damit reproduzierten sie unsere Ergebnisse ^{vgl. 108} und unterstützen ebenfalls die Annahme, dass durch periphere BDNF-Werte die Konzentrationen des Neurotrophins im Hirngewebe widerspiegelt werden.²⁰⁵

Ein direkter Hinweis dafür, dass BDNF die Blut-Hirn-Schranke passiert, ist die Korrelation zwischen den BDNF Konzentrationen im Hirngewebe und Serum bei Tieren, bei denen keine ECS angewandt wurden; bei ihnen liegt ein Äquilibrium vor (Abb. 6a) ^{vgl. 108}.

Aus der Abb. 6b kann weiterhin ersehen werden, dass alle Werte der Tiere, die zwischen drei Stunden und drei Tagen nach der letzten der 5 ECS-Anwendungen dekapitiert wurden, über der unteren Grenze des 95% Konfidenzintervalls der Regressionslinie der Kontrolltiere liegen.

Das heißt, dass die Neurotrophinkonzentrationen im Hirngewebe zu diesem Zeitpunkt relativ höher liegen und sich die Konzentrationen von BDNF in Gehirn und Serum nicht in einem Äquilibrium befinden. Nach einer Verzögerung von einer Woche tritt der signifikante Anstieg des Serum-BDNFs auf (Abb. 4). So wird der höchste Anstieg des Gewebe-BDNFs (in der Zeit zwischen 3h und 3 Tagen) durch einen verzögerten Anstieg des Serum-BDNFs widerspiegelt. In der Zeitspanne bis etwa zwei Wochen nach der letzten EKT-Anwendung ist wieder ein Äquilibrium zwischen Gewebe- und Serumkonzentration von BDNF hergestellt, wie es bei den Kontrolltieren ohne ECS-Behandlung vorliegt (Abb. 6a).

Neuere bildgebende Verfahren, wie die Magnet Resonanz Spektroskopie, können auf indirektere Weise den Neurotrophinzustand des Gehirns mit Hilfe von Markern wie N-Actetyl-Aspartat (NAA) wiedergeben.¹⁰⁸ Bei 36 gesunden Probanden konnte gezeigt werden, dass die BDNF-Serumlevel positiv mit N-Acetyl-Aspartat (NAA) im anterioren Gyrus cinguli (anterior cingulate cortex, ACC) korrelieren.^{129 108} Dies bestätigt den Fund, dass es eine Korrelation der Konzentrationen von Hirngewebe und Serum in einem Zustand des Gleichgewichts gibt.

4.2.3 BDNF und Thrombozyten

Der verzögerte Anstieg von BDNF im Serum nach etwa 7 Tagen weist auf einen möglichen Zusammenhang mit der Lebensdauer der Thrombozyten bei Ratten, die etwa 3-5 Tage beträgt.¹⁰⁸

So könnte es sein, dass erst eine bestimmte Anzahl an Thrombozyten, die schon vor der ECS-Anwendung im Blut zirkulierten, eliminiert werden muss, bevor ein statistisch signifikanter Anstieg der BDNF-Konzentration im Serum beobachtet werden kann. Und gleichermaßen würden die BDNF-Konzentrationen im Serum wieder ihre Ausgangswerte erreichen, wenn eine

bestimmte Anzahl der Thrombozyten, die während und nach der ECS-Behandlung im Blut zirkulierten und BDNF aufgenommen haben, durch neue, weniger BDNF enthaltende, Thrombozyten ersetzt worden ist. So könnte die Expression spezifischer Neurotrophintransporter für die Konzentrationen der Neurotrophine mitverantwortlich sein. Dabei ist zusätzlich zu bedenken, dass beispielsweise Antidepressiva in der Lage sind, Transporter wie etwa den Thrombozyten-, Serotonin-, und Dopamintransporter zu verändern und so zusätzlich die Neurotrophinwerte beeinflussen können.¹⁰⁸

4.2.4 Einflussfaktoren auf die Konzentrationen von NGF und BDNF

Ein Unterschied zwischen den NGF- und BDNF Serumkonzentrationen war bereits durch ihre fehlende Korrelation festgestellt worden, wohingegen sie im Hirngewebe eine hochgradige Korrelation zeigen.¹⁰⁸ Daran könnte zum einen eine Ungleichheit der Aufnahme in Zellen wie den eben genannten Thrombozyten, denn auch NGF wird von Thrombozyten gespeichert, beteiligt sein; daneben könnte sie auf Unterschiede hinsichtlich der Neurotrophinproduktion außerhalb des ZNS zurückgeführt werden.^{108 206 207} Ferner könnten tageszeitabhängige Änderungen der Neurotrophinexpression eine Rolle spielen.¹⁰⁸ Ein wichtiger Punkt ist aber auch die angenommene unterschiedliche Permeabilität der Blut-Hirn-Schranke für BDNF und NGF.²⁰⁸ Wie bereits erwähnt, folgt der Transport von BDNF aus dem Gehirn ins Blut und umgekehrt dabei einem saturierenden Transportmechanismus.^{206 207 108} Für den Fluss vom Blut ins Gehirn konnte gezeigt werden, dass die Rate für BDNF etwa eine Größenordnung höher liegt als die für NGF.^{207 108} Die fehlende Erhöhung der NGF-Konzentration im Serum nach antidepressiver EKT-Behandlung stimmt mit einer Studie²⁰⁹ über den Einfluss einer medikamentösen Therapie auf die NGF-Serumkonzentration überein. Dabei trat keine Veränderung der NGF-Serumkonzentration nach Gabe der Antidepressiva Amitriptylin oder Paroxetin bei depressiven Patienten auf.²⁰⁹ Aufgrund dieser Ergebnisse wurde geschlossen, dass sich die nach einer antidepressiven Therapie nachweislichen Veränderungen der NGF-Konzentration in den verschiedenen Hirnregionen nicht zwangsläufig in Veränderungen der NGF-Serumkonzentration widerspiegeln müssen, auch wenn NGF wahrscheinlich an den therapeutischen Effekten antidepressiver Therapieformen beteiligt ist.²⁰⁹ In einer Parallelstudie, in der wir keine signifikanten Veränderungen der NGF-Konzentrationen im Serum von Müttern während der Perinatalperiode im Vergleich zu nicht schwangeren Frauen feststellten, konnte darüber hinaus keine Korrelation der NGF-Werte im Serum mit dem Vorliegen einer Depression nachgewiesen werden. Dies stützt die oben aufgeführten Ergebnisse hinsichtlich des Verhaltens von NGF.²¹⁵

4.2.5 Bedeutung der Ergebnisse und Ausblick

Ein wichtiges Ergebnis der vorliegenden Arbeit ist der erbrachte Nachweis, dass es aufgrund der Korrelation der BDNF-Konzentrationen in Hirngewebe und Serum gerechtfertigt ist, Serumkonzentrationen von BDNF zu bestimmen, um so Veränderungen der Neurotrophinkonzentration im Hirngewebe nachzuvollziehen.

Allerdings ist nach einem anfänglichen BDNF-Anstieg im Hirngewebe der Ratte erst nach einer Zeitverzögerung von etwa 7 Tagen wieder ein Gleichgewicht zwischen Hirn- und Peripheriekonzentration hergestellt. Den vorliegenden Daten entsprechend scheint es daher sinnvoll, den Gleichgewichtszustand der BDNF-Hirn- und Serumkonzentration abzuwarten, ehe Serumproben von den Patienten entnommen werden. Diese Wartezeit sollte vermutlich länger als eine Woche dauern, aber auch nicht länger als einen Monat ^{172 vgl. 108}.

Im Gegensatz dazu ist es entsprechend der vorliegenden Ergebnisse nicht dienlich, NGF in der Peripherie zu bestimmen, um so die NGF-Veränderungen im Gehirn zu überwachen.

So scheint es möglich, auf relativ einfache Weise, durch Bestimmung der Serumkonzentrationen, Rückschlüsse auf die BDNF-Konzentrationen und Konzentrationsänderungen im Gehirn zu ziehen und somit antidepressive Therapien besser und direkter überwachen und ein An- oder Nichtansprechen auf die Behandlung schneller und genauer nachvollziehen und unter Umständen sogar vorhersagen zu können.¹⁹⁹

Allerdings konnten aktuelle Meta-Analysen keinen Zusammenhang zwischen der BDNF-Erhöhung und einer Verbesserung der depressiven Symptomatik nachweisen. Brunoni und Mitarbeiter vermuten daher, dass EKT neurotrophe Effekte bewirkt, diese aber nicht mit der klinischen Symptomatik korrelieren.²¹⁰

Molendijk und Mitarbeiter bestätigten das Vorliegen erniedrigter BDNF-Serum-Level bei depressiven Patienten und die Normalisation dieser durch antidepressive Therapie. Doch auch sie konnten keinen beständigen Zusammenhang zwischen BDNF-Konzentrationen im Serum und der Schwere der Depression feststellen. Ihre Ergebnisse bekräftigten zwar die Annahme, dass veränderte BDNF-Werte im Serum der periphere Nachweis einer Depression seien, drückten aber aus, dass auch dies nicht so eindeutig sei, wie ursprünglich angenommen.²¹¹

Auch Hoyer und Mitarbeiter fanden eine Korrelation in Form einer umgekehrten U-Kurve zwischen BDNF-Leveln im Serum und der Schwere der Depression.²⁰¹

Dies ist ein weiterer Nachweis dafür, dass der bisher angenommene lineare Zusammenhang zwischen BDNF-Konzentrationen im Serum und der Schwere der depressiven Symptomatik so nicht zutrifft.

Bus und Mitarbeiter konnten hingegen in einer Longitudinalstudie mit 1751 Patienten über einen Zeitraum von zwei Jahren einen steileren Abfall der BDNF-Serumwerte, im Vergleich zu den nichtdepressiven Studienteilnehmern, bei depressiven und sich in Remission befindlichen depressiven Patienten feststellen.²¹²

Die Tatsache, dass BDNF im Serum auch bei anderen neuropsychiatrischen oder neurodegenerativen Erkrankungen, aber auch bei gesunden Personen, mit einem erhöhtem Risiko für das Auftreten einer neuropsychiatrischen Erkrankung, erniedrigt ist, schränkt seine Rolle als depressionsspezifischen Marker weiter ein. Allerdings könnte er als Biomarker für das individuelle Ansprechen auf eine spezifische antidepressive Therapie eingesetzt werden sowie als Zustandsmarker bei neuropsychiatrischen Erkrankungen.⁸⁴ Um die genaue Rolle und Aussagekraft der BDNF-Serumkonzentrationen zuzuordnen zu können, sind weitere Forschungen nötig. Auch die Frage, ob die Leukozyten-BDNF-Level eventuell einen genaueren Marker für Diagnostik und Voraussage des klinischen Verlaufs einer Depression darstellen, ist sehr interessant und bedarf weiterer Untersuchungen.⁸⁴ Weiterhin wären Untersuchungen an genetisch modifizierten, oder z.B. durch das Modell der „erlernten Hilflosigkeit“ in ihrem Verhalten veränderten, einen depressiven Phänotyp aufweisenden Tieren, sehr aufschlussreich, bei denen vor und nach einem ECS-Verlauf die NGF- und BDNF- Serumkonzentrationen bestimmt und mit Veränderungen der Neurotrophine im Hirngewebe verglichen werden könnten. Auf diese Weise könnten die Veränderungen der Neurotrophine durch ECS-Anwendung bei Vorliegen einer depressiven Symptomatik überprüft werden und, wie es angenommen werden kann, die Ergebnisse dieser Arbeit und auch der oben genannten Arbeiten weiter bestätigt werden.

Literaturverzeichnis

- 1 Kessler RC, Berglund P, Demler O, Jin R, Merikangas KR, Walters EE. Lifetime prevalence and age-of-onset distributions of DSM-IV disorders in the National Comorbidity Survey Replication. *Arch Gen Psychiatry*. 2005 Jun;62(6):593-602.
- 2 Wacker HR. Epidemiology and comorbidity of depressive disorders. *Ther Umsch*. 2000 Feb;57(2):53-8.
- 3 Demyttenaere K, Bruffaerts R, Posada-Villa J, Gasquet I, Kovess V, Lepine JP, Angermeyer MC, Bernert S, de Girolamo G, Morosini P, Polidori G, Kikkawa T, Kawakami N, Ono Y, Takeshima T, Uda H, Karam EG, Fayyad JA, Karam AN, Mneimneh ZN, Medina-Mora ME, Borges G, Lara C, de Graaf R, Ormel J, Gureje O, Shen Y, Huang Y, Zhang M, Alonso J, Haro JM, Vilagut G, Bromet EJ, Gluzman S, Webb C, Kessler RC, Merikangas KR, Anthony JC, Von Korff MR, Wang PS, Brugha TS, Aguilar-Gaxiola S, Lee S, Heeringa S, Pennell BE, Zaslavsky AM, Ustun TB, Chatterji S; WHO World Mental Health Survey Consortium. Prevalence, severity, and unmet need for treatment of mental disorders in the World Health Organization World Mental Health Surveys. *JAMA*. 2004 Jun 2;291(21):2581-90.
- 4 Wittchen HU and Jacobi F. Epidemiologie. In: Stoppe G, Bramesfeld A, Schwartz FW (Hrsg.) *Volkskrankheit Depression? Bestandsaufnahme und Perspektive*. Springer, Berlin, Heidelberg, 2006, pp.15–37.
- 5 Nestler EJ, Barrot M, DiLeone RJ, Eisch AJ, Gold SJ, Monteggia LM. Neurobiology of depression. *Neuron*. 2002 Mar 28;34(1):13-25.
- 6 Ehlert U, Gaab J, Heinrichs M. Psychoneuroendocrinological contributions to the etiology of depression, posttraumatic stress disorder, and stress-related bodily disorders: the role of the hypothalamus-pituitary-adrenal axis. *Biol Psychol*. 2001 Jul-Aug;57(1-3):141-52.
- 7 Manji HK, Drevets WC, Charney DS. The cellular neurobiology of depression. *Nat Med*. 2001 May;7(5):541-7.
- 8 Post RM, Weiss SR, Smith M, Rosen J, Frye M. Stress, conditioning, and the temporal aspects of affective disorders. *Ann N Y Acad Sci*. 1995 Dec 29;771:677-96.
- 9 Fuchs E and Flügge G. Psychosocial stress induces molecular and structural alterations in the brain - How animal experiments help to understand pathomechanisms of depressive illnesses. *Z Psychosom Med Psychother*. 2001;47(1):80-97.
- 10 aan het Rot M, Mathew SJ, Charney DS. Neurobiological mechanisms in major depressive disorder. *CMAJ*. 2009 Feb 3;180(3):305-13.
- 11 Kendler KS, Kuhn JW, Vittum J, Prescott CA, Riley B. The interaction of stressful life events and a serotonin transporter polymorphism in the prediction of episodes of major depression: a replication. *Arch Gen Psychiatry*. 2005 May;62(5):529-35.

- 12 DSM-IV-TR American Psychiatric Association: Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, Fourth Edition, Text Revision. Washington, DC, American Psychiatric Association, 2000, p.356.
- 13 Keller MB and Boland RJ. Implications of failing to achieve successful long-term maintenance treatment of recurrent unipolar major depression. *Biol Psychiatry*. 1998 Sep 1;44(5):348-60.
- 14 Bronisch T. Depression and suicidal behavior. *Crisis*. 2003;24(4):179-80.
- 15 Demyttenaere K, Bonnewyn A, Bruffaerts R, Brugha T, De Graaf R, Alonso J. Comorbid painful physical symptoms and depression: prevalence, work loss, and help seeking. *J Affect Disord*. 2006 Jun;92(2-3):185-93. Epub 2006 Mar 6.
- 16 Barnes DE, Alexopoulos GS, Lopez OL, Williamson JD, Yaffe K. Depressive symptoms, vascular disease, and mild cognitive impairment: findings from the Cardiovascular Health Study. *Arch Gen Psychiatry*. 2006 Mar;63(3):273-9.
- 17 Wulsin LR1, Vaillant GE, Wells VE. A systematic review of the mortality of depression. *Psychosom Med*. 1999 Jan-Feb;61(1):6-17.
- 18 Janssen I, Powell LH, Matthews KA, Cursio JF, Hollenberg SM, Sutton-Tyrrell K, Bromberger JT, Everson-Rose SA; SWAN study. Depressive symptoms are related to progression of coronary calcium in midlife women: The Study of Women's Health Across the Nation (SWAN) Heart Study. *Am Heart J*. 2011 Jun;161(6):1186-1191.
- 19 Celano CM and Huffman JC. Depression and cardiac disease: a review. *Cardiol Rev*. 2011 May-Jun;19(3):130-42.
- 20 Wolkowitz OM, Reus VI, Mellon SH. Of sound mind and body: depression, disease, and accelerated aging. *Dialogues Clin Neurosci*. 2011;13(1):25-39.
- 21 Ladwig KH, Emeny RT, Häfner S, Lacruz ME. Depression. An underestimated risk for the development and progression of coronary heart disease. *Bundesgesundheitsblatt Gesundheitsforschung Gesundheitsschutz*. 2011 Jan;54(1):59-65.
- 22 Pagnin D, de Queiroz V, Pini S, Cassano GB. Efficacy of ECT in depression: a meta-analytic review. *J ECT*. 2004 Mar;20(1):13-20.
- 23 Nemeroff CB, Heim CM, Thase ME, Klein DN, Rush AJ, Schatzberg AF, Ninan PT, McCullough JP Jr, Weiss PM, Dunner DL, Rothbaum BO, Kornstein S, Keitner G, Keller MB. Differential responses to psychotherapy versus pharmacotherapy in patients with chronic forms of major depression and childhood trauma. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003 Nov 25;100(24):14293-6. Epub 2003 Nov 13.
- 24 Mathew SJ, Manji HK, Charney DS. Novel drugs and therapeutic targets for severe mood disorders. *Neuropsychopharmacology*. 2008 Aug;33(9):2080-92. Epub 2008 Jan 2.
- 25 Binder EB and Holsboer F. Pharmacogenomics and antidepressant drugs. *Ann Med*. 2006;38(2):82-94.

- 26 Ressler KJ and Mayberg HS. Targeting abnormal neural circuits in mood and anxiety disorders: from the laboratory to the clinic. *Nat Neurosci.* 2007 Sep;10(9):1116-24.
- 27 Charney DS. Monoamine dysfunction and the pathophysiology and treatment of depression. *J Clin Psychiatry.* 1998;59 Suppl 14:11-4.
- 28 de Kloet ER, Vreugdenhil E, Oitzl MS, Joëls M. Brain corticosteroid receptor balance in health and disease. *Endocr Rev.* 1998 Jun;19(3):269-301.
- 29 Holsboer F. The corticosteroid receptor hypothesis of depression. *Neuropsychopharmacology.* 2000 Nov;23(5):477-501.
- 30 Duman RS, Heninger GR, Nestler EJ. A molecular and cellular theory of depression. *Arch Gen Psychiatry.* 1997 Jul;54(7):597-606.
- 31 Altar CA. Neurotrophins and depression. *Trends Pharmacol Sci.* 1999 Feb;20(2):59-61.
- 32 Smith KA, Fairburn CG, Cowen PJ. Relapse of depression after rapid depletion of tryptophan. *Lancet.* 1997 Mar 29;349(9056):915-9.
- 33 Benkelfat C, Ellenbogen MA, Dean P, Palmour RM, Young SN. Mood-lowering effect of tryptophan depletion. Enhanced susceptibility in young men at genetic risk for major affective disorders. *Arch Gen Psychiatry.* 1994 Sep;51(9):687-97.
- 34 Berman RM, Narasimhan M, Miller HL, Anand A, Cappiello A, Oren DA, Heninger GR, Charney DS. Transient depressive relapse induced by catecholamine depletion: potential phenotypic vulnerability marker? *Arch Gen Psychiatry.* 1999 May;56(5):395-403.
- 35 Berman RM, Sanacora G, Anand A, Roach LM, Fasula MK, Finkelstein CO, Wachen RM, Oren DA, Heninger GR, Charney DS. Monoamine depletion in unmedicated depressed subjects. *Biol Psychiatry.* 2002 Mar 15;51(6):469-73.
- 36 Davis PF, Ozias MK, Carlson SE, Reed GA, Winter MK, McCarson KE, Levant B. Dopamine receptor alterations in female rats with diet-induced decreased brain docosahexaenoic acid (DHA): interactions with reproductive status. *Nutr Neurosci.* 2010 Aug;13(4):161-9.
- 37 Nestler EJ and Carlezon WA Jr. The mesolimbic dopamine reward circuit in depression. *Biol Psychiatry.* 2006 Jun 15;59(12):1151-9. Epub 2006 Mar 29.
- 38 Gershon AA, Vishne T, Grunhaus L. Dopamine D2-like receptors and the antidepressant response. *Biol Psychiatry.* 2007 Jan 15;61(2):145-53. Epub 2006 Aug 24.
- 39 Danna CL and Elmer GI. Disruption of conditioned reward association by typical and atypical antipsychotics. *Pharmacol Biochem Behav.* 2010 Jul;96(1):40-7. Epub 2010 Apr 21.

- 40 Wallace AE, Kofoed LL, West AN. Double-blind, placebo-controlled trial of methylphenidate in older, depressed, medically ill patients. *Am J Psychiatry*. 1995 Jun;152(6):929-31.
- 41 Lavergne F and Jay TM. A new strategy for antidepressant prescription. *Front Neurosci*. 2010 Nov 19;4:192.
- 42 Sapolsky RM. Glucocorticoids and hippocampal atrophy in neuropsychiatric disorders. *Arch Gen Psychiatry*. 2000 Oct;57(10):925-35.
- 43 Kendler KS, Kessler RC, Walters EE, MacLean C, Neale MC, Heath AC, Eaves LJ. Stressful life events, genetic liability, and onset of an episode of major depression in women. *Am J Psychiatry*. 1995 Jun;152(6):833-42.
- 44 de Kloet ER, Oitzl MS, Joëls M. Stress and cognition: are corticosteroids good or bad guys? *Trends Neurosci*. 1999 Oct;22(10):422-6.
- 45 Young EA, Haskett RF, Murphy-Weinberg V, Watson SJ, Akil H. Loss of glucocorticoid fast feedback in depression. *Arch Gen Psychiatry*. 1991 Aug;48(8):693-9.
- 46 de Kloet ER. Stress in the brain. *Eur J Pharmacol*. 2000 Sep 29;405(1-3):187-98.
- 47 Smith MA, Makino S, Kvetnanský R, Post RM. Stress and glucocorticoids affect the expression of brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-3 mRNAs in the hippocampus. *J Neurosci*. 1995 Mar;15(3 Pt 1):1768-77.
- 48 Schaaf MJ, De Kloet ER, Vreugdenhil E. Corticosterone effects on BDNF expression in the hippocampus. Implications for memory formation. *Stress*. 2000 May;3(3):201-8.
- 49 Duman RS, Malberg J, Thome J. Neural plasticity to stress and antidepressant treatment. *Biol Psychiatry*. 1999 Nov 1;46(9):1181-91.
- 50 Smith MA, Makino S, Kvetnanský R, Post RM. Effects of stress on neurotrophic factor expression in the rat brain. *Ann N Y Acad Sci*. 1995 Dec 29;771:234-9.
- 51 Smith MA, Makino S, Kim SY, Kvetnansky R. Stress increases brain-derived neurotrophic factor messenger ribonucleic acid in the hypothalamus and pituitary. *Endocrinology*. 1995 Sep;136(9):3743-50.
- 52 Sapolsky RM, Packan DR, Vale WW. Glucocorticoid toxicity in the hippocampus: in vitro demonstration. *Brain Res*. 1988 Jun 21;453(1-2):367-71.
- 53 Virgin CE Jr, Ha TP, Packan DR, Tombaugh GC, Yang SH, Horner HC, Sapolsky RM. Glucocorticoids inhibit glucose transport and glutamate uptake in hippocampal astrocytes: implications for glucocorticoid neurotoxicity. *J Neurochem*. 1991 Oct;57(4):1422-8.
- 54 Nitta A, Ohmiya M, Sometani A, Itoh M, Nomoto H, Furukawa Y, Furukawa S. Brain-derived neurotrophic factor prevents neuronal cell death induced by corticosterone. *J Neurosci Res*. 1999 Jul 15;57(2):227-35.

- 55 Duman RS. Role of neurotrophic factors in the etiology and treatment of mood disorders. *Neuromolecular Med.* 2004;5(1):11-25.
- 56 Cameron HA and Gould E. Adult neurogenesis is regulated by adrenal steroids in the dentate gyrus. *Neuroscience.* 1994 Jul;61(2):203-9.
- 57 Cameron HA, Tanapat P, Gould E. Adrenal steroids and N-methyl-D-aspartate receptor activation regulate neurogenesis in the dentate gyrus of adult rats through a common pathway. *Neuroscience.* 1998 Jan;82(2):349-54.
- 58 Starkman MN, Gebarski SS, Berent S, Schteingart DE. Hippocampal formation volume, memory dysfunction, and cortisol levels in patients with Cushing's syndrome. *Biol Psychiatry.* 1992 Nov 1;32(9):756-65.
- 59 Sheline YI, Wang PW, Gado MH, Csernansky JG, Vannier MW. Hippocampal atrophy in recurrent major depression. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1996 Apr 30;93(9):3908-13.
- 60 Zhou J, Zhang F, Zhang Y. Corticosterone inhibits generation of long-term potentiation in rat hippocampal slice: involvement of brain-derived neurotrophic factor. *Brain Res.* 2000 Dec 8;885(2):182-91.
- 61 Fleischmann A, Hvalby O, Jensen V, Strekalova T, Zacher C, Layer LE, Kvello A, Reschke M, Spanagel R, Sprengel R, Wagner EF, Gass P. Impaired long-term memory and NR2A-type NMDA receptor-dependent synaptic plasticity in mice lacking c-Fos in the CNS. *J Neurosci.* 2003 Oct 8;23(27):9116-22.
- 62 Whelan TB, Schteingart DE, Starkman MN, Smith A. Neuropsychological deficits in Cushing's syndrome. *J Nerv Ment Dis.* 1980 Dec;168(12):753-7.
- 63 Rupprecht R, Rupprecht C, Rupprecht M, Noder M, Mahlstedt J. Triiodothyronine, thyroxine, and TSH response to dexamethasone in depressed patients and normal controls. *Biol Psychiatry.* 1989 Jan;25(1):22-32.
- 64 Rupprecht R, Wodarz N, Kornhuber J, Wild K, Schmitz B, Braner HU, Müller OA, Riederer P, Beckmann H. In vivo and in vitro effects of glucocorticoids on lymphocyte proliferation in depression. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci.* 1991;241(1):35-40.
- 65 Murray CA and Lynch MA. Evidence that increased hippocampal expression of the cytokine interleukin-1 beta is a common trigger for age- and stress-induced impairments in long-term potentiation. *J Neurosci.* 1998 Apr 15;18(8):2974-81.
- 66 Murray CA, McGahon B, McBennett S, Lynch MA. Interleukin-1 beta inhibits glutamate release in hippocampus of young, but not aged, rats. *Neurobiol Aging.* 1997 May-Jun;18(3):343-8.
- 67 Barrientos RM, Sprunger DB, Campeau S, Higgins EA, Watkins LR, Rudy JW, Maier SF. Brain-derived neurotrophic factor mRNA downregulation produced by social isolation is blocked by intrahippocampal interleukin-1 receptor antagonist. *Neuroscience.* 2003;121(4):847-53.

- 68** Sheline YI, Sanghavi M, Mintun MA, Gado MH. Depression duration but not age predicts hippocampal volume loss in medically healthy women with recurrent major depression. *J Neurosci*. 1999 Jun 15;19(12):5034-43.
- 69** Künzel HE, Binder EB, Nickel T, Ising M, Fuchs B, Majer M, Pfennig A, Ernst G, Kern N, Schmid DA, Uhr M, Holsboer F, Modell S. Pharmacological and nonpharmacological factors influencing hypothalamic-pituitary-adrenocortical axis reactivity in acutely depressed psychiatric in-patients, measured by the Dex-CRH test. *Neuropsychopharmacology*. 2003 Dec;28(12):2169-78.
- 70** Groves JO. Is it time to reassess the BDNF hypothesis of depression? *Mol Psychiatry*. 2007 Dec;12(12):1079-88. Epub 2007 Aug 14.
- 71** Martinowich K, Manji H, Lu B. New insights into BDNF function in depression and anxiety. *Nat Neurosci*. 2007 Sep;10(9):1089-93.
- 72** Duman RS and Monteggia LM. A neurotrophic model for stress-related mood disorders. *Biol Psychiatry*. 2006 Jun 15;59(12):1116-27. Epub 2006 Apr 21.
- 73** Hindmarch I. Beyond the monoamine hypothesis: mechanisms, molecules and methods. *Eur Psychiatry*. 2002 Jul;17 Suppl 3:294-9.
- 74** Jacobs BL, van Praag H, Gage FH. Adult brain neurogenesis and psychiatry: a novel theory of depression. *Mol Psychiatry*. 2000 May;5(3):262-9.
- 75** Kempermann G. Regulation of adult hippocampal neurogenesis - implications for novel theories of major depression. *Bipolar Disord*. 2002 Feb;4(1):17-33.
- 76** Santarelli L, Saxe M, Gross C, Surget A, Battaglia F, Dulawa S, Weisstaub N, Lee J, Duman R, Arancio O, Belzung C, Hen R. Requirement of hippocampal neurogenesis for the behavioral effects of antidepressants. *Science*. 2003 Aug 8;301(5634):805-9.
- 77** Huang EJ and Reichardt LF. Trk receptors: roles in neuronal signal transduction. *Annu Rev Biochem*. 2003;72:609-42. Epub 2003 Mar 27.
- 78** Gould E, McEwen BS, Tanapat P, Galea LA, Fuchs E. Neurogenesis in the dentate gyrus of the adult tree shrew is regulated by psychosocial stress and NMDA receptor activation. *J Neurosci*. 1997 Apr 1;17(7):2492-8.
- 79** Miller EK and Cohen JD. An integrative theory of prefrontal cortex function. *Annu Rev Neurosci*. 2001;24:167-202.
- 80** Drevets WC. Functional anatomical abnormalities in limbic and prefrontal cortical structures in major depression. *Prog Brain Res*. 2000;126:413-31.
- 81** Rajkowska, G. Postmortem studies in mood disorders indicate altered numbers of neurons and glial cells. *Biol Psychiatry*. 2000 Oct 15;48(8):766-77.
- 82** Drevets WC. Neuroimaging and neuropathological studies of depression: implications for the cognitive-emotional features of mood disorders. *Curr Opin Neurobiol*. 2001 Apr;11(2):240-9.

- 83** Davidson RJ, Pizzagalli D, Nitschke JB, Putnam K. Depression: perspectives from affective neuroscience. *Annu Rev Psychol.* 2002;53:545-74.
- 84** Gass P and Hellweg R. Peripheral brain-derived neurotrophic factor (BDNF) as a biomarker for affective disorders? *Int J Neuropsychopharmacol.* 2010 Feb;13(1):1-4.
- 85** Pariante CM and Miller AH. Glucocorticoid receptors in major depression: relevance to pathophysiology and treatment. *Biol Psychiatry.* 2001 Mar 1;49(5):391-404.
- 86** Duman RS. Pathophysiology of depression and innovative treatments: remodeling glutamatergic synaptic connections. *Dialogues Clin Neurosci.* 2014 Mar;16(1):11-27.
- 87** Maness LM, Kastin AJ, Weber JT, Banks WA, Beckman BS, Zadina JE. The neurotrophins and their receptors: structure, function, and neuropathology. *Neurosci Biobehav Rev.* 1994 Spring;18(1):143-59.
- 88** Thoenen H and Barde YA. Physiology of nerve growth factor. *Physiol Rev.* 1980 Oct;60(4):1284-335.
- 89** Shampo MA and Kyle RA. Stamp vignette on medical science. Rita Levi-Montalcini--Nobel Prize for work in neurology. *Mayo Clin Proc.* 2003 Dec;78(12):1448.
- 90** Levi-Montalcini R and Giudice G. From a home-made laboratory to the Nobel Prize: an interview with Rita Levi Montalcini. *Int J Dev Biol.* 2000;44(6):563-6.
- 91** Weltman JK. The 1986 Nobel Prize for Physiology or Medicine awarded for discovery of growth factors: Rita Levi-Montalcini, M.D., and Stanley Cohen, Ph.D. *N Engl Reg Allergy Proc.* 1987 Jan-Feb;8(1):47-8.
- 92** Cohen S and Levi-Montalcini R. A Nerve Growth-Stimulating Factor Isolated From Snake Venom. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1956 Sep;42(9):571-4.
- 93** Thoenen H. Neurotrophins and neuronal plasticity. *Science.* 1995 Oct 27;270(5236):593-8.
- 94** Thoenen H, Bandtlow C, Heumann R. The physiological function of nerve growth factor in the central nervous system: comparison with the periphery. *Rev Physiol Biochem Pharmacol.* 1987;109:145-78.
- 95** Vantini G. The pharmacological potential of neurotrophins: a perspective. *Psychoneuroendocrinology.* 1992 Aug;17(4):401-10.
- 96** Aloe L and Levi-Montalcini R. Comparative studies on testosterone and L-thyroxine effects on the synthesis of nerve growth factor in mouse submaxillary salivary glands. *Exp Cell Res.* 1980 Jan;125(1):15-22.
- 97** Levi-Montalcini R, Dal Toso R, della Valle F, Skaper SD, Leon A. Update of the NGF saga. *J Neurol Sci.* 1995 Jun;130(2):119-27.

- 98** Aloe L, Alleva E, Böhm A, Levi-Montalcini R. Aggressive behavior induces release of nerve growth factor from mouse salivary gland into the bloodstream. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1986 Aug;83(16):6184-7.
- 99** Aloe L, Bracci-Laudiero L, Alleva E, Lambiase A, Micera A, Tirassa P. Emotional stress induced by parachute jumping enhances blood nerve growth factor levels and the distribution of nerve growth factor receptors in lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1994 Oct 25;91(22):10440-4.
- 100** Nawa H, Carnahan J, Gall C. BDNF protein measured by a novel enzyme immunoassay in normal brain and after seizure: partial disagreement with mRNA levels. *Eur J Neurosci*. 1995 Jul 1;7(7):1527-35.
- 101** Lai KO, Fu WY, Ip FC, Ip NY. Cloning and expression of a novel neurotrophin, NT-7, from carp. *Mol Cell Neurosci*. 1998 May;11(1-2):64-76.
- 102** Hofer M, Pagliusi SR, Hohn A, Leibrock J, Barde YA. Regional distribution of brain-derived neurotrophic factor mRNA in the adult mouse brain. *EMBO J*. 1990 Aug;9(8):2459-64.
- 103** Greenberg ME, Xu B, Lu B, Hempstead BL. New insights in the biology of BDNF synthesis and release: implications in CNS function. *J Neurosci*. 2009 Oct 14;29(41):12764-7.
- 104** Mowla SJ, Farhadi HF, Pareek S, Atwal JK, Morris SJ, Seidah NG, Murphy RA. Biosynthesis and post-translational processing of the precursor to brain-derived neurotrophic factor. *J Biol Chem*. 2001 Apr 20;276(16):12660-6. Epub 2001 Jan 10.
- 105** Lee R, Kermani P, Teng KK, Hempstead BL. Regulation of cell survival by secreted proneurotrophins. *Science*. 2001 Nov 30;294(5548):1945-8.
- 106** Lommatzsch M, Braun A, Mannsfeldt A, Botchkarev VA, Botchkareva NV, Paus R, Fischer A, Lewin GR, Renz H. Abundant production of brain-derived neurotrophic factor by adult visceral epithelia. Implications for paracrine and target-derived Neurotrophic functions. *Am J Pathol*. 1999 Oct;155(4):1183-93.
- 107** Kokaia Z, Bengzon J, Metsis M, Kokaia M, Persson H, Lindvall O. Coexpression of neurotrophins and their receptors in neurons of the central nervous system. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1993 Jul 15;90(14):6711-5.
- 108** Sartorius A, Hellweg R, Litzke J et al Vogt M, Dormann C, Vollmayr B, Danker-Hopfe H, Gass P. Correlations and discrepancies between serum and brain tissue levels of neurotrophins after electroconvulsive treatment in rats. *Pharmacopsychiatry*. 2009 Nov;42(6):270-6. Epub 2009 Nov 18.
- 109** Staats R, Stoll P, Zingler, Virchow JC, Lommatzsch M. Regulation of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) during sleep apnoea treatment. *Thorax*. 2005 Aug;60(8):688-92.

- 110** Murer MG, Yan Q, Raisman-Vozari R. Brain-derived neurotrophic factor in the control human brain, and in Alzheimer's disease and Parkinson's disease. *Prog Neurobiol.* 2001 Jan;63(1):71-124.
- 111** Fossati P, Radtchenko A, Boyer P. Neuroplasticity: from MRI to depressive symptoms. *Eur Neuropsychopharmacol.* 2004 Dec;14 Suppl 5:S503-10.
- 112** Sieber-Blum M. Role of the neurotrophic factors BDNF and NGF in the commitment of pluripotent neural crest cells. *Neuron.* 1991 Jun;6(6):949-55.
- 113** Leingärtner A, Heisenberg CP, Kolbeck R, Thoenen H, Lindholm D. Brain-derived neurotrophic factor increases neurotrophin-3 expression in cerebellar granule neurons. *J Biol Chem.* 1994 Jan 14;269(2):828-30.
- 114** McAllister AK, Katz LC, Lo DC. Neurotrophins and synaptic plasticity. *Annu Rev Neurosci.* 1999;22:295-318.
- 115** Xu B, Gottschalk W, Chow A, Wilson RI, Schnell E, Zang K, Wang D, Nicoll RA, Lu B, Reichardt LF. The role of brain-derived neurotrophic factor receptors in the mature hippocampus: modulation of long-term potentiation through a presynaptic mechanism involving TrkB. *J Neurosci.* 2000 Sep 15;20(18):6888-97.
- 116** Lindholm D, Carroll P, Tzimogiogis G, Thoenen H. Autocrine-paracrine regulation of hippocampal neuron survival by IGF-1 and the neurotrophins BDNF, NT-3 and NT-4. *Eur J Neurosci.* 1996 Jul;8(7):1452-60.
- 117** Henderson CE, Bloch-Gallego E, Camu W, Gouin A, Lemeulle C, Mettling C. Motoneuron survival factors: biological roles and therapeutic potential. *Neuromuscul Disord.* 1993 Sep-Nov;3(5-6):455-8.
- 118** Friedman WJ, Ibáñez CF, Hallböök F, Persson H, Cain LD, Dreyfus CF, Black IB. Differential actions of neurotrophins in the locus coeruleus and basal forebrain. *Exp Neurol.* 1993 Jan;119(1):72-8.
- 119** Siuciak JA, Clark MS, Rind HB, Whittemore SR, Russo AF. BDNF induction of tryptophan hydroxylase mRNA levels in the rat brain. *J Neurosci Res.* 1998 Apr 15;52(2):149-58.
- 120** Ventimiglia R, Mather PE, Jones BE, Lindsay RM. The neurotrophins BDNF, NT-3 and NT-4/5 promote survival and morphological and biochemical differentiation of striatal neurons in vitro. *Eur J Neurosci.* 1995 Feb 1;7(2):213-22.
- 121** Segal RA, Takahashi H, McKay RD. Changes in neurotrophin responsiveness during the development of cerebellar granule neurons. *Neuron.* 1992 Dec;9(6):1041-52.
- 122** Barde YA. Trophic factors and neuronal survival. *Neuron.* 1989 Jun;2(6):1525-34.

- 123** Gaede G, Hellweg R, Zimmermann H, Brandt AU, Dörr J, Bellmann-Strobl J, Zangen A, Paul F, Pfueller CF. Effects of deep repetitive transcranial magnetic stimulation on brain-derived neurotrophic factor serum concentration in healthy volunteers. *Neuropsychobiology*. 2014;69(2):112-9. Epub 2014 Mar 12.
- 124** Nagahara AH and Tuszynski MH. Potential therapeutic uses of BDNF in neurological and psychiatric disorders. *Nat Rev Drug Discov*. 2011 Mar;10(3):209-19.
- 125** Segi-Nishida E, Sukeno M, Imoto Y, Kira T, Sakaida M, Tsuchiya S, Sugimoto Y, Okuno Y. Electroconvulsive seizures activate anorexigenic signals in the ventromedial nuclei of the hypothalamus. *Neuropharmacology*. 2013 Aug;71:164-73. Epub 2013 Apr 17.
- 126** Chourbaji S, Hellweg R, Brandis D, Zörner B, Zacher C, Lang UE, Henn FA, Hörtnagl H, Gass P. Mice with reduced brain-derived neurotrophic factor expression show decreased choline acetyltransferase activity, but regular brain monoamine levels and unaltered emotional behaviour. *Brain Res Mol Brain Res*. 2004 Feb 5;121(1-2):28-36
- 127** Blum R and Konnerth A. Neurotrophin-mediated rapid signaling in the central nervous system: mechanisms and functions. *Physiology (Bethesda)*. 2005 Feb;20:70-8.
- 128** Lang UE, Jockers-Scherübl MC, Hellweg R. State of the art of the neurotrophin hypothesis in psychiatric disorders: implications and limitations. *J Neural Transm*. 2004 Mar;111(3):387-411. Epub 2003 Dec 29.
- 129** Lang UE, Hellweg R, Seifert F, Schubert F, Gallinat J. Correlation between serum brain-derived neurotrophic factor level and an in vivo marker of cortical integrity. *Biol Psychiatry*. 2007 Sep 1;62(5):530-5. Epub 2007 Jun 8.
- 130** Karege F, Perret G, Bondolfi G, Schwald M, Bertschy G, Aubry JM. Decreased serum brain-derived neurotrophic factor levels in major depressed patients. *Psychiatry Res*. 2002 Mar 15;109(2):143-8.
- 131** Lang UE, Hellweg R, Gallinat J. BDNF serum concentrations in healthy volunteers are associated with depression-related personality traits. *Neuropsychopharmacology*. 2004 Apr;29(4):795-8.
- 132** Ziegenhorn AA, Schulte-Herbrüggen O, Danker-Hopfe H, Malbranc M, Hartung HD, Anders D, Lang UE, Steinhagen-Thiessen E, Schaub RT, Hellweg R. Serum neurotrophins--a study on the time course and influencing factors in a large old age sample. *Neurobiol Aging*. 2007 Sep;28(9):1436-45. Epub 2006 Aug 1.
- 133** Lang UE, Gallinat J, Danker-Hopfe, Bajbouj M, Hellweg R. Nerve growth factor serum concentrations in healthy human volunteers: physiological variance and stability. *Neurosci Lett*. 2003 Jun 19;344(1):13-6.
- 134** Jockers-Scherübl MC, Matthies U, Danker-Hopfe H, Lang UE, Mahlberg R, Hellweg R. Chronic cannabis abuse raises nerve growth factor serum concentrations in drug-naive schizophrenic patients. *J Psychopharmacol*. 2003 Dec;17(4):439-45.
- 135** Klecha D, Legler M, Hüll M. Current use of ECT in the treatment of depressive disorders. *Fortschr Neurol Psychiatr*. 2002 Jul;70(7):353-67.

- 136** Nibuya M, Morinobu S, Duman RS. Regulation of BDNF and trkB mRNA in rat brain by chronic electroconvulsive seizure and antidepressant drug treatments. *J Neurosci*. 1995 Nov;15(11):7539-47.
- 137** Gervasoni N, Aubry JM, Bondolfi G, Osiek C, Schwald M, Bertschy G, Karege F. Partial normalization of serum brain-derived neurotrophic factor in remitted patients after a major depressive episode. *Neuropsychobiology*. 2005;51(4):234-8. Epub 2005 May 12.
- 138** Monteggia LM. Toward neurotrophin-based therapeutics. *Am J Psychiatry*. 2011 Feb;168(2):114-6.
- 139** Krishnan V and Nestler EJ. Linking molecules to mood: new insight into the biology of depression. *Am J Psychiatry*. 2010 Nov;167(11):1305-20. Epub 2010 Sep 15.
- 140** Castrén E and Rantamäki T. The role of BDNF and its receptors in depression and antidepressant drug action: Reactivation of developmental plasticity. *Dev Neurobiol*. 2010 Apr;70(5):289-97.
- 141** Peters UH. Introduction of shock therapy and psychiatric emigration. *Fortschr Neurol Psychiatr*. 1992 Sep;60(9):356-65.
- 142** Hellweg R, von Arnim CA, Büchner M, Huber R, Riepe MW. Neuroprotection and neuronal dysfunction upon repetitive inhibition of oxidative phosphorylation. *Exp Neurol*. 2003 Oct;183(2):346-54.
- 143** Shorter E: *Geschichte der Psychiatrie*. Rowohlt Verlag, Reinbek 2003, pp. 326-335.
- 144** Passione R. Italian psychiatry in an international context: Ugo Cerletti and the case of electroshock. *Hist Psychiatry*. 2004 Mar;15(57 Pt 1):83-104.
- 145** Endler NS. The Origins of Electroconvulsive Therapy (ECT). *Convuls Ther*. 1988;4(1):5-23.
- 146** Fink M. Meduna and the origins of convulsive therapy. *Am J Psychiatry*. 1984 Sep;141(9):1034-41.
- 147** Fink M. Convulsive therapy: a review of the first 55 years. *J Affect Disord*. 2001 Mar;63(1-3):1-15.
- 148** Folkerts HW. Der Stellenwert der EKT bei therapieresistenten Depressionen. In: Bauer M, Berghöfer A (Hrsg.). *Therapieresistente Depressionen*. Berlin: Springer, 1997, pp.185-187.

- 149** Die Leitlinie wird gemeinsam von den beteiligten Organisationen, der Bundesärztekammer, der Kassenärztlichen Bundesvereinigung, der Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften und der DGPPN als kombinierte S3-Leitlinie/Nationale Versorgungsleitlinie „Unipolare Depression“ herausgegeben.
- www.depression.versorgungsleitlinien.de
www.versorgungsleitlinien.de/themen/depression/pdf/s3_nvl_depression_lang.pdf
- 150** Möller HJ. Therapy resistance to antidepressive drugs: risk factors and treatment possibilities. *Nervenarzt*. 1991 Nov;62(11):658-69.
- 151** Nunes EV, Deliyannides D, Donovan S, McGrath PJ. The management of treatment resistance in depressed patients with substance use disorders. *Psychiatr Clin North Am*. 1996 Jun;19(2):311-27.
- 152** Sharan P and Saxena S. Treatment-resistant depression: clinical significance, concept and management. *Natl Med J India*. 1998 Mar-Apr;11(2):69-79.
- 153** Warneke L. Management of resistant depression. *Can Fam Physician*. 1996 Oct;42:1973-80.
- 154** Frey R, Schreinzer D, Heiden A, Kasper S. Use of electroconvulsive therapy in psychiatry. *Nervenarzt*. 2001 Sep;72(9):661-76.
- 155** Deutsche Gesellschaft für Psychiatrie, Psychotherapie und Nervenheilkunde (DGPPN) (Hrsg.). *Praxisleitlinien in Psychiatrie und Psychotherapie. Band 5: Behandlungsleitlinie Affektive Erkrankungen*. Darmstadt: Steinkopff, 2000.
- 156** Souery D, Oswald P, Massat I, Bailer U, Bollen J, Demyttenaere K, Kasper S, Lecrubier Y, Montgomery S, Serretti A, Zohar J, Mendlewicz J; Group for the Study of Resistant Depression. Clinical factors associated with treatment resistance in major depressive disorder: results from a European multicenter study. *J Clin Psychiatry*. 2007 Jul;68(7):1062-70.
- 157** Möller HJ. Therapieresistenz unter Antidepressiva: Definition, Epidemiologie und Risikofaktoren. In: Bauer M, Berghöfer A (Hrsg.). *Therapieresistente Depressionen*. Springer, Berlin Heidelberg, 1997, pp. 3-15.
- 158** Ludwig Maximilians Universität München. Klinik für Psychiatrie und Psychotherapie. Aktuelle Informationen zur Elektrokonvulsionstherapie.
<http://psywifo.klinikum.uni-muenchen.de/download/inhalt/diagtherap/ektfach.pdf>
- 159** Watts BV, Groft A, Bagian JP, Mills PD. An examination of mortality and other adverse events related to electroconvulsive therapy using a national adverse event report system. *J ECT*. 2011 Jun;27(2):105-8.
- 160** Folkerts H. Electroconvulsive therapy of depressive disorders. *Ther Umsch*. 2000 Feb;57(2):90-4.

- 161 Abrams R. The mortality rate with ECT. *Convuls Ther.* 1997 Sep;13(3):125-7.
- 162 Gangadhar BN, Janakiramaiah N, Subbakrishna DK, Praveen J, Reddy AK. Twice versus thrice weekly ECT in melancholia: a double-blind prospective comparison. *J Affect Disord.* 1993 Apr;27(4):273-8.
- 163 Sackeim HA, Haskett RF, Mulsant BH, Thase ME, Mann JJ, Pettinati HM, Greenberg RM, Crowe RR, Cooper TB, Prudic J. *JAMA.* Continuation pharmacotherapy in the prevention of relapse following electroconvulsive therapy: a randomized controlled trial. 2001 Mar 14;285(10):1299-307.
- 164 Steffens DC, Krystal AD, Sibert TE, Moore SD, Weiner RD. *Convuls Ther.* Cost effectiveness of maintenance ECT. 1995 Dec;11(4):283-4.
- 165 Petrides G, Dhossche D, Fink M, Francis A. Continuation ECT: relapse prevention in affective disorders. *Convuls Ther.* 1994 Sep;10(3):189-94.
- 166 American Psychiatric Association. Task Force on Electroconvulsive Therapy. *The Practice of ECT: Recommendations for Treatment, Training and Privileging.* *Convuls Ther.* 1990 Jun;6(2):85-120.
- 167 Sauer H and Lauter H. Electroconvulsive therapy. I. Effectiveness and side effects of electroconvulsive therapy. *Nervenarzt.* 1987 Apr;58(4):201-9.
- 168 Sauer H and Lauter H. Electroconvulsive therapy. II. Indications, contraindications and therapeutic technics of electroconvulsive therapy. *Nervenarzt.* 1987 Apr;58(4):210-8.
- 169 Taylor SM; Electroconvulsive therapy, brain-derived neurotrophic factor, and possible neurorestorative benefit of the clinical application of electroconvulsive therapy. *J ECT.* 2008 Jun;24(2):160-5.
- 170 Holtzmann J, Polosan M, Baro P, Bougerol T. ECT: from neuronal plasticity to mechanisms underlying antidepressant medication effect. *Encephale.* 2007 Sep;33(4 Pt 1):572-8.
- 171 Marano CM, Phatak P, Vemulapalli UR, Sasan A, Nalbandyan MR, Ramanujam S, Soekadar S, Demosthenous M, Regenold WT. Increased plasma concentration of brain-derived neurotrophic factor with electroconvulsive therapy: a pilot study in patients with major depression. *J Clin Psychiatry.* 2007 Apr;68(4):512-7.
- 172 Bocchio-Chiavetto L, Zanardini R, Bortolomasi M, Abate M, Segala M, Giacomuzzi M, Riva MA, Marchina E, Pasqualetti P, Perez J, Gennarelli M. Electroconvulsive Therapy (ECT) increases serum Brain Derived Neurotrophic Factor (BDNF) in drug resistant depressed patients. *Eur Neuropsychopharmacol.* 2006 Dec;16(8):620-4. Epub 2006 Jun 6.
- 173 Ishihara K and Sasa M. Mechanism underlying the therapeutic effects of electroconvulsive therapy (ECT) on depression. *Jpn J Pharmacol.* 1999 Jul;80(3):185-9.

- 174** Michael N, Erfurth A, Ohrmann P, Arolt V, Heindel W, Pfleiderer B. Neurotrophic effects of electroconvulsive therapy: a proton magnetic resonance study of the left amygdalar region in patients with treatment-resistant depression. *Neuropsychopharmacology*. 2003 Apr;28(4):720-5. Epub 2002 Oct 10.
- 175** Zachrisson OC, Balldin J, Ekman R, Naesh O, Rosengren L, Agren H, Blennow K. No evident neuronal damage after electroconvulsive therapy. *Psychiatry Res*. 2000 Oct 30;96(2):157-65.
- 176** www.eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=CELEX:31986L0609:en:HTML
- 177** www.humane-endpoints.info/eng/index.php?option=com_content&view=article&id=62&Itemid=101
- 178** Sartorius A, Mahlstedt MM, Vollmayr B, Henn FA, Ende G. Elevated spectroscopic glutamate/gamma-amino butyric acid in rats bred for learned helplessness. *Neuroreport*. 2007 Sep 17;18(14):1469-73
- 179** Iversen LL and Glowinski J. Regional differences in the rate of turnover of norepinephrine in the rat brain. *Nature*. 1966 Jun 4;210(5040):1006-8.
- 180** Labor für Neurotrophine und Labor für Klinische Neurobiologie der Klinik für Psychiatrie und Psychotherapie der Charité – Universitätsmedizin Berlin.
http://psy-ccm.charite.de/forschung/experimentelle_und_molekulare_psychiatrie/#c93665
- 181** Hellweg R, Hock C, Hartung HD. An improved rapid and highly sensitive enzyme immunoassay for nerve growth factor. *Technique, J Methods Cell Mol Biol*. 1989; 1:43-48.
- 182** Hellweg R, Baethge C, Hartung HD, Brückner MK, Arendt T. NGF level in the rat sciatic nerve is decreased after long-term consumption of ethanol. *Neuroreport*. 1996 Feb 29;7(3):777-80.
- 183** Hellweg R and Hartung HD. Endogenous levels of nerve growth factor (NGF) are altered in experimental diabetes mellitus: a possible role for NGF in the pathogenesis of diabetic neuropathy. *J Neurosci Res*. 1990 Jun;26(2):258-67.
- 184** Laborbuch des von Prof. Hellweg geleiteten Labors für Neurotrophine / Klinische Neurobiologie der Klinik für Psychiatrie und Psychotherapie der Charité – Universitätsmedizin Berlin, s.¹⁸⁰.
- 185** Korsching S and Thoenen H. Two-site enzyme immunoassay for nerve growth factor. *Methods Enzymol*. 1987;147:167-85.
- 186** Hellweg R, Gericke CA, Jendroska K, Hartung HD, Cervós-Navarro J. NGF content in the cerebral cortex of non-demented patients with amyloid-plaques and in symptomatic Alzheimer's disease. *Int J Dev Neurosci*. 1998 Nov-Dec;16(7-8):787-94.

- 187** Backhaus K, Erichson B, Plinke W, Weiber R. *Multivariate Analysemethoden. Eine anwendungsorientierte Einführung*. 11. Auflage Berlin. Springer 2006. pp. 10, 21, 142, 148 ff.
- 188** Persönliche Bekanntgabe durch Prof. Dr. Sartorius, Zentralinstitut für Seelische Gesundheit, Mannheim.
- 189** Heinrich G and Meyer TE. Nerve growth factor (NGF) is present in human placenta and semen, but undetectable in normal and Paget's disease blood: measurements with an anti-mouse-NGF enzyme immunoassay using a recombinant human NGF reference. *Biochem Biophys Res Commun*. 1988 Aug 30;155(1):482-6.
- 190** Lärkfors L and Ebendal T. Highly sensitive enzyme immunoassays for beta-nerve growth factor. *J Immunol Methods*. 1987 Feb 26;97(1):41-7.
- 191** Bertrand P, Roger O, Houlgatte R, Javoy-Agid F, Brandel JP, Doble A, Blanchard JC. Measurement of nerve growth factor-like immunoreactivity in human brain using an anti-mouse-NGF enzyme immunoassay. *Neurochem Int*. 1992 Feb;20(2):215-8.
- 192** Zettler C, Bridges DC, Zhou XF, Rush RA. Detection of increased tissue concentrations of nerve growth factor with an improved extraction procedure. *J Neurosci Res*. 1996 Dec 1;46(5):581-94.
- 193** Reischies FM and Hellweg R. Prediction of deterioration in mild cognitive disorder in old age--neuropsychological and neurochemical parameters of dementia diseases. *Compr Psychiatry*. 2000 Mar-Apr;41(2 Suppl 1):66-75.
- 194** Angelucci F, Aloe L, Jiménez-Vasquez P, Mathé AA. Electroconvulsive stimuli alter the regional concentrations of nerve growth factor, brain-derived neurotrophic factor, and glial cell line-derived neurotrophic factor in adult rat brain. *J ECT*. 2002 Sep;18(3):138-43.
- 195** Laske C, Stransky E, Leyhe T, Eschweiler GW, Maetzler W, Wittorf A, Soekadar S, Richartz E, Koehler N, Bartels M, Buchkremer G, Schott K. BDNF serum and CSF concentrations in Alzheimer's disease, normal pressure hydrocephalus and healthy controls. *J Psychiatr Res*. 2007 Aug;41(5):387-94. Epub 2006 Mar 22.
- 196** Chiaretti A, Antonelli A, Piastra M, Genovese O, Polidori G, Aloe L. Expression of neurotrophic factors in cerebrospinal fluid and plasma of children with viral and bacterial meningoencephalitis. *Acta Paediatr*. 2004 Sep;93(9):1178-84.
- 197** Grønli O, Stensland GØ, Wynn R, Olstad R. Neurotrophic factors in serum following ECT: a pilot study. *World J Biol Psychiatry*. 2009;10(4):295-301.
- 198** Fernandes B, Gama CS, Massuda R, Torres M, Camargo D, Kunz M, Belmonte-de-Abreu PS, Kapczinski F, de Almeida Fleck MP, Inês Lobato M. Serum brain-derived neurotrophic factor (BDNF) is not associated with response to electroconvulsive therapy (ECT): a pilot study in drug resistant depressed patients. *Neurosci Lett*. 2009 Apr 10;453(3):195-8. Epub 2009 Feb 21.

- 199** Piccinni A, Del Debbio A, Medda P, Bianchi C, Roncaglia I, Veltri A, Zanello S, Massimetti E, Origlia N, Domenici L, Marazziti D, Dell'Osso L. Plasma Brain-Derived Neurotrophic Factor in treatment-resistant depressed patients receiving electroconvulsive therapy. *Eur Neuropsychopharmacol*. 2009 May;19(5):349-55. Epub 2009 Feb 15.
- 200** Okamoto T, Yoshimura R, Ikenouchi-Sugita A, Hori H, Umene-Nakano W, Inoue Y, Ueda N, Nakamura J. Efficacy of electroconvulsive therapy is associated with changing blood levels of homovanillic acid and brain-derived neurotrophic factor (BDNF) in refractory depressed patients: a pilot study. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2008 Jul 1;32(5):1185-90. Epub 2008 Feb 29.
- 201** Hoyer C, Kranaster L, Sartorius A, Hellweg R, Gass P. Long-term course of brain-derived neurotrophic factor serum levels in a patient treated with deep brain stimulation of the lateral habenula. *Neuropsychobiology*. 2012;65(3):147-52. Epub 2012 Feb 25.
- 202** Martinotti G, Ricci V, Di Nicola M, Caltagirone C, Bria P, Angelucci F. Brain-derived neurotrophic factor and electroconvulsive therapy in a schizophrenic patient with treatment-resistant paranoid-hallucinatory symptoms. *J ECT*. 2011 Mar;27(1):e44-6.
- 203** Nockher WA and Renz H. Neurotrophins in clinical diagnostics: pathophysiology and laboratory investigation. *Clin Chim Acta*. 2005 Feb;352(1-2):49-74.
- 204** Karege F, Schwald M, Cisse M. Postnatal developmental profile of brain-derived neurotrophic factor in rat brain and platelets. *Neurosci Lett*. 2002 Aug 16;328(3):261-4.
- 205** Klein AB, Williamson R, Santini MA, Clemmensen C, Ettrup A, Rios M, Knudsen GM, Aznar S. Blood BDNF concentrations reflect brain-tissue BDNF levels across species. *Int J Neuropsychopharmacol*. 2011 Apr;14(3):347-53. Epub 2010 Jul 7.
- 206** Pan W, Banks WA, Fasold MB, Bluth J, Kastin AJ. Transport of brain-derived neurotrophic factor across the blood-brain barrier. *Neuropharmacology*. 1998 Dec;37(12):1553-61.
- 207** Poduslo JF and Curran GL. Permeability at the blood-brain and blood-nerve barriers of the neurotrophic factors: NGF, CNTF, NT-3, BDNF. *Brain Res Mol Brain Res*. 1996 Mar;36(2):280-6.
- 208** Kastin AJ, Pan W, Maness LM, Banks WA. Peptides crossing the blood-brain barrier: some unusual observations. *Brain Res*. 1999 Nov 27;848(1-2):96-100.
- 209** Hellweg R, Ziegenhorn A, Heuser I, Deuschle M. Serum concentrations of nerve growth factor and brain-derived neurotrophic factor in depressed patients before and after antidepressant treatment. *Pharmacopsychiatry*. 2008 Mar;41(2):66-71.
- 210** Brunoni AR, Baeken C, Machado-Vieira R, Gattaz WF, Vanderhasselt MA. BDNF blood levels after electroconvulsive therapy in patients with mood disorders: A systematic review and meta-analysis. *World J Biol Psychiatry*. 2014 Jul;15(5):411-8. Epub 2014 Mar 16.

- 211** Molendijk ML, Spinhoven P, Polak M, Bus BA, Penninx BW, Elzinga BM. Serum BDNF concentrations as peripheral manifestations of depression: evidence from a systematic review and meta-analyses on 179 associations (N=9484). *Mol Psychiatry*. 2014 Jul;19(7):791-800. Epub 2013 Aug 20.
- 212** Bus BAA, Molendijk ML, Tendolkar I, Penninx BWJH, Prickaerts J, Elzinga BM, Oude Voshaar RC. Chronic depression is associated with a pronounced decrease in serum brain-derived neurotrophic factor over time.
Aktuell im Druck.
- 213** Nemeroff CB. Prevalence and management of treatment-resistant depression. *J Clin Psychiatry*. 2007;68 Suppl 8:17-25.
- 214** Cartwright M, Mikheev AM, Heinrich G. Expression of neurotrophin genes in human fibroblasts: differential regulation of the brain-derived neurotrophic factor gene. *Int J Dev Neurosci*. 1994 Dec;12(8):685-93.
- 215** Schulte-Herbrüggen O, Litzke J, Hornych K, Zingler C, Höppner J, Virchow JC, Hellweg R, Lommatzsch M. Maternal nerve growth factor serum levels in the perinatal period. *J Reprod Immunol*. 2007 Jun;74(1-2):170-3. Epub 2006 Dec 1.

Abkürzungsverzeichnis

5-HAT	5-Hydroxytryptamin, Serotonin
5-HT1A-, 5-HT1B-, 5-HT2A-, 5-HT3- Rezeptor	Verschiedene Serotoninrezeptoren
7,8-DHF	7,8-Dihydroxyflavone
27/21-NGF	monoklonaler anti- β -NGF-Antikörper
Abb.	Abbildung
ACC	anterior cingulate cortex, anteriorer Gyrus cinguli
ACTH	Adrenokortikotropes Hormon
AMPA	α -Amino-3-Hydroxy-5-Methyl-4-Isloxazol-Propionsäure
ANCOVA	analysis of covariance, Kovarianzanalyse
ANOVA	analysis of variance, Varianzanalyse
Anti-BDNF-IgY -Chicken AP	anti-chicken IgY-alkaline phosphatase conjugate
Anti-BDNF -pAb	poyklonaler Antikörper
BDNF	brain-derived neurotrophic factor
BSA	bovines Serumalbumin
CA1-, CA3-Region	Region des Cornu Ammonis, Ammonshorn des Hippocampus
Ca ²⁺	Calcium
CaMK	Ca ²⁺ /Calmodulin abhängige Kinase
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
CaRE	Ca ²⁺ /cAMP response element
ChAT	Cholinacetyltransferase

CO ₃	Kohlenstofftrioxid
CREB	cAMP response element binding protein
CSF	cerebrospinal fluid, Liquor
d	Tag
DGPPN	Deutsche Gesellschaft für Psychiatrie, Psychotherapie und Nervenheilkunde
DMF	Dimethylformamid
DNA	deoxyribonucleic acid, Desoxyribonukleinsäure
DSM	Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders
ECS	electroconvulsive shocks, electroconvulsive stimuli, Tiermodell der EKT
ECT	electro convulsive therapy
EDTA	ethylenediaminetetraacetic acid, Ethylendiamintetraessigsäure
EKT	Elektrokrampftherapie
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
FC	Frontaler Cortex
F	Wert zur Darlegung der Varianz zwischen Gruppen
F (df)	degrees of freedom, Freiheitsgrade des F-Wertes
fg	Femtogramm
FST	Forced Swim Test (Tier-Depressionsmodell)
g	Gramm
x g	Maß der Beschleunigung, Vielfaches der Erdbeschleunigung (9,81m/s ²)
GABA	γ (Gamma)-Aminobuttersäure
Gadd45b	growth arrest and DNA damage-inducible beta
Gal 27/21 -Konjugat	Anti-β-NGF-Galaktosidase-Konjugat
GDNF	glial cell line-derived neurotrophic factor
h	Stunde

H ₂ O	Wasser
HAM-D	Hamilton Rating Scale for Depression
HC	Hippocampus
HCl	Chlorwasserstoff, in Wasser gelöste Salzsäure
HPA	hypothalamus-pituitary-adrenal-axis, Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenrinden-Achse
Hpi-Puffer	Homogenisierpuffer
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
K _d	Dissoziationskonstante
kDa	Kilodalton
KU	kallikrein units
l	Liter
LH	learned helplessness, Tier-Depressionsmodell
LTP	long-term-potential, Langzeitpotenzierung
LTD	long-term-depression, Langzeitdepression
μl	Mikroliter
M	Mol
MAO	Monoaminoxidase
Maus IgG ₁	unspezifischer Maus-Antikörper gegen Immunglobulin G ₁
mBDNF	maturer, reifer BDNF
MD	Major Depression
mg	Milligramm
MG	Molekulargewicht (neu: Molekülmasse)
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
ml	Milliliter

mM	Millimol
mol	SI-Basiseinheit der Stoffmenge
mRNA	messenger ribonucleic acid, Boten-Ribonukleinsäure
MRT	Magnetresonanztomographie
MUG	Methyl-Umbelliferyl- β -Galaktosid
Na ⁺	Natrium
Na ₂ CO ₃	Natriumcarbonat
Na ₂ HPO ₄	Dinatriumhydrogenphosphat
NAA	N-Acetyl-Aspartat
NAc	Nucleus accumbens
NaCl	Natriumchlorid
NaH ₂ PO ₄	Natriumdihydrogenphosphat
NaHCO ₃	Natriumhydrogencarbonat
NaOH	Natriumhydroxid
NGF	nerve growth factor
nm	Nanometer
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
NP-40 (Nonidet)	4-Nonylphenyl-Polyethylen Glykol
NPY	Neuropeptid Y
p	p-Wert, Signifikanzwert
P75NTR	niedrigaffiner Neurotrophin-Transmembranrezeptor
PDE4	Phosphodiesterase Typ IV
pg	Pikogramm
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionen-Konzentration
PI	Proteasen-Inhibitor-Mix

PO ₄	Phosphat
PolyMak	kommerzielle Mischung verschiedener Maus-Immunglobuline zur Reduktion der unspezifischen Bindung
Preap Date	Tag der Präparation
r	Pearson-Regressionskoeffizient
R	Korrelationskoeffizient
R ²	Bestimmtheitsmaß
S/C	Standard/Conjugatpuffer
S/Cpi	Standard/Conjugatpuffer mit Proteaseninhibitoren
Spearman`s rho	Spearman`s rank correlation coefficient
SNRI	norepinephrin reuptake inhibitor, Noradrenalinwiederaufnahmehemmer
SSRI	serotonin reuptake inhibitor, Serotoninwiederaufnahmehemmer
tissue (engl.)	Gewebe
TNF	Tumornekrosefaktor
tPA	tissue plasminogen activator, Plasminogenaktivator
Tris-HCl	Tris(Hydroxymethyl)-Aminomethan-HCl (Salzsäure), Puffer
TritonX-100	4-(1,1,3,3-Tetramethylbutyl)Phenyl-Polyethylen Glykol
Trk	tropomyosin-related kinase
vol.	Volumen
VTA	ventral tegmental area, ventrales Tegmentum
w	Woche
ZNS	Zentrales Nervensystem

Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Julia Litzke, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Veränderungen sowie Korrelation der Neurotrophine nerve growth factor (NGF) und brain-derived neurotrophic factor (BDNF) im präfrontalen Kortex, Hippocampus und Serum von Ratten nach elektrokonvulsiver Behandlung.“ selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung (siehe „Uniform Requirements for Manuscripts (URM)“ des ICMJE -www.icmje.org) kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) entsprechen den URM (s.o.) und werden von mir verantwortet.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden Erklärung angegeben sind. Sämtliche Publikationen, die aus dieser Dissertation hervorgegangen sind und bei denen ich Autor bin, entsprechen den URM (s.o.) und werden von mir verantwortet.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§156,161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

Datum

Unterschrift

Anteilserklärung an erfolgten Publikationen

Julia Litzke hatte folgenden Anteil an den folgenden Publikationen:

Publikation 1:

Schulte-Herbrüggen O, Litzke J, Hornyk K, Zingler C, Höppner J, Virchow JC, Hellweg R, Lommatzsch M. Maternal nerve growth factor serum levels in the perinatal period.

J Reprod Immunol. 2007 Jun;74(1-2):170-3. Epub 2006 Dec 1.

Durchführung sämtlicher Messungen des Neurotrophins nerve growth factor mittels enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA).

Publikation 2:

Sartorius A, Hellweg R, Litzke J et al Vogt M, Dormann C, Vollmayr B, Danker-Hopfe H, Gass P. Correlations and discrepancies between serum and brain tissue levels of neurotrophins after electroconvulsive treatment in rats. Pharmacopsychiatry. 2009 Nov;42(6):270-6. Epub 2009 Nov

18.

Durchführung sämtlicher Messungen der Neurotrophine nerve growth factor und brain-derived neurotrophic factor mittels enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA).

Unterschrift der Doktorandin

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

Publikationsliste

- 1 Schulte-Herbrüggen O, Litzke J, Hornyk K, Zingler C, Höppner J, Virchow JC, Hellweg R, Lommatzsch M. Maternal nerve growth factor serum levels in the perinatal period. *J Reprod Immunol.* 2007 Jun;74(1-2):170-3. Epub 2006 Dec 1.

- 2 Sartorius A, Hellweg R, Litzke J et al Vogt M, Dormann C, Vollmayr B, Danker-Hopfe H, Gass P. Correlations and discrepancies between serum and brain tissue levels of neurotrophins after electroconvulsive treatment in rats. *Pharmacopsychiatry.* 2009 Nov;42(6):270-6. Epub 2009 Nov 18.

Danksagung

Ich bedanke mich aufrichtig bei Herrn Prof. Dr. R. Hellweg für die Überlassung des interessanten Dissertationsthemas, für die zu jeder Zeit sehr freundliche Betreuung sowie die Begutachtung dieser Doktorarbeit.

Ferner möchte ich Herrn Prof. Dr. A. Sartorius und Herrn Prof. Dr. P. Gass für die unterstützende Auswertung der statistischen Analyse danken.

Bei Frau Bunge bedanke ich mich herzlich für die Anleitung und Betreuung während der Versuchsdurchführungen, die, wie sie selbst, ausgesprochen nett war.

Ich danke meiner unfassbar tollen Emmi für alles, einschließlich ihrer außerordentlichen und verständnisvollen Geduld.

Mein Dank gilt meinen Eltern für ihre immerwährende, allumfassende Unterstützung.