

Aus dem  
Institut für Pharmakologie und Toxikologie  
des Fachbereichs Veterinärmedizin  
der Freien Universität Berlin

---

**Langzeitwirkungen von Atomoxetin und Methylphenidat  
auf das Angst- und Explorationsverhalten der Ratte**

---

**INAUGURAL-DISSERTATION**  
zur Erlangung des Grades eines  
**Doctor medicinae veterinariae**  
an der  
Freien Universität Berlin

vorgelegt von  
*Nicola Schmidt*  
*Tierärztin aus Bad Oldesloe*

Berlin 2009  
Journal-Nr.: 3319

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin  
der Freien Universität Berlin

Dekan: Univ.-Prof. Dr. L. Brunnberg  
Erster Gutachter: PD Dr. A. Rex  
Zweiter Gutachter: Univ.- Prof. Dr. N. C. Jühr  
Dritter Gutachter: PD Dr. U. Reuter

*Deskriptoren (nach CAB-Thesaurus):*

rats, experimental animals, animal behaviour Atomoxetine (MeSH), Attention Deficit Disorder with Hyperactivity (MeSH), Central Nervous System Stimulants (MeSH), Methylphenidate (MeSH), Rat, Sprague Dawley (MeSH)

Tag der Promotion: 18.11.2009

Bibliografische Information der *Deutschen Nationalbibliothek*

Die Deutsche Nationalbibliothek verzeichnet diese Publikation in der Deutschen Nationalbibliografie; detaillierte bibliografische Daten sind im Internet über <http://dnb.ddb.de> abrufbar.

ISBN: 978-3-86664-734-3

**Zugl.: Berlin, Freie Univ., Diss., 2009**

Dissertation, Freie Universität Berlin

**D 188**

Dieses Werk ist urheberrechtlich geschützt.

Alle Rechte, auch die der Übersetzung, des Nachdruckes und der Vervielfältigung des Buches, oder Teilen daraus, vorbehalten. Kein Teil des Werkes darf ohne schriftliche Genehmigung des Verlages in irgendeiner Form reproduziert oder unter Verwendung elektronischer Systeme verarbeitet, vervielfältigt oder verbreitet werden.

Die Wiedergabe von Gebrauchsnamen, Warenbezeichnungen, usw. in diesem Werk berechtigt auch ohne besondere Kennzeichnung nicht zu der Annahme, dass solche Namen im Sinne der Warenzeichen- und Markenschutz-Gesetzgebung als frei zu betrachten wären und daher von jedermann benutzt werden dürfen.

This document is protected by copyright law.

No part of this document may be reproduced in any form by any means without prior written authorization of the publisher.

alle Rechte vorbehalten | all rights reserved

© mensch und buch verlag 2009

choriner str. 85 - 10119 berlin

verlag@menschundbuch.de – www.menschundbuch.de

*Meinen Eltern  
und  
Großeltern*



---

<b>1.</b>	<b>Einleitung.....</b>	<b>1</b>
<b>2.</b>	<b>Schriftum.....</b>	<b>4</b>
<b>2.1.</b>	<b>DIE AUFMERKSAMKEITS-HYPERAKTIVITÄTSSTÖRUNG...</b>	<b>4</b>
2.1.1.	<b>Definition und Klassifikation.....</b>	<b>4</b>
2.1.2.	<b>Epidemiologie und Verlauf.....</b>	<b>5</b>
2.1.3.	<b>Diagnostik und Komorbidität.....</b>	<b>7</b>
2.1.4.	<b>Ätiologie und Pathogenese.....</b>	<b>8</b>
2.1.4.1.	Das catecholaminerge Transmissionssystem.....	12
2.1.4.2.	Das serotonerge Transmissionssystem.....	16
2.1.5.	<b>Therapie und Versorgung.....</b>	<b>19</b>
2.1.5.1.	Stimulantien.....	20
2.1.5.2.	Nicht-Stimulantien.....	24
2.1.5.3.	Verordnungszahlen.....	28
2.1.6.	<b>Stand der Forschung.....</b>	<b>28</b>
<b>2.2.</b>	<b>DAS VERHALTEN.....</b>	<b>31</b>
2.2.1.	<b>Definition.....</b>	<b>31</b>
2.2.2.	<b>Verhaltensforschung und tierexperimentelle Verhaltenstests.</b>	<b>31</b>
2.2.2.1.	Verhaltenstests zur Untersuchung neurologisch-motorischer Fähigkeiten.....	32
2.2.2.2.	Verhaltenstests zur Untersuchung emotionaler Aspekte.....	33
2.2.2.3.	Verhaltenstests zur Untersuchung neurokognitiver Fähigkeiten...	34
2.2.4.	<b>Die Ratte als Tiermodell.....</b>	<b>34</b>
2.2.5.	<b>Das Angst- und Explorationsverhalten.....</b>	<b>35</b>
<b>3.</b>	<b>Eigene Untersuchungen.....</b>	<b>38</b>
<b>3.1.</b>	<b>ZIELVORSTELLUNGEN, WISSENSCHAFTLICHE NOVITÄT UND PRAKTISCHE BEDEUTUNG.....</b>	<b>38</b>
<b>3.2.</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN.....</b>	<b>38</b>
3.2.1.	<b>Versuchstiere.....</b>	<b>38</b>
3.2.1.1.	Stamm und Zucht.....	38
3.2.1.2.	Tierhaltung.....	39
3.2.1.3.	Alter der Tiere.....	39
3.2.2.	<b>Pharmakologische Substanzen.....</b>	<b>39</b>
3.2.2.1.	Wirkstoff, Handelsname und Hersteller.....	39
3.2.2.2.	Dosierung.....	40

3.2.2.3.	Applikation.....	40
<b>3.2.3.</b>	<b>Methoden.....</b>	<b>41</b>
3.2.3.1.	<i>Physiologische Untersuchungen.....</i>	41
3.2.3.1.1.	Nahrungs- und Wasseraufnahme.....	41
3.2.3.1.2.	Körpergewicht.....	41
3.2.3.1.3.	Körperlänge und Body Mass Index.....	41
3.2.3.1.4.	Motorische Aktivität.....	42
3.2.3.2.	<i>Verhaltensuntersuchungen.....</i>	43
3.2.3.2.1.	Elevated Plus Maze.....	43
3.2.3.2.2.	Hole Board.....	45
3.2.3.2.3.	Open Field.....	46
3.2.3.2.4.	Rota Rod.....	47
3.2.3.2.5.	Free Exploratory Paradigm.....	48
3.2.3.3.	<i>Analytische Untersuchungen.....</i>	50
3.2.3.3.1.	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie.....	50
3.2.3.3.1.1.	Bestimmung der Methylphenidat- und Atomoxetin- konzentrationen im Blutplasma.....	50
3.2.3.3.1.2.	Bestimmung der Serotonin-, Dopamin- und Noradrenalin- konzentrationen in verschiedenen Gehirnregionen.....	54
<b>3.3.</b>	<b>UNTERSUCHUNGEN.....</b>	<b>59</b>
<b>3.3.1.</b>	<b>Versuchsplan.....</b>	<b>59</b>
<b>3.3.2.</b>	<b>Versuchsvorbereitung.....</b>	<b>61</b>
3.3.2.1.	Tierversuchsantrag.....	61
3.3.2.2.	Bestimmung des Atomoxetingehalts.....	61
3.3.2.3.	Vorversuch: Wahl der Applikationsmethode.....	61
3.3.2.4.	Vorversuch: Dosisfindung.....	62
<b>3.3.3.</b>	<b>Versuchsdurchführung.....</b>	<b>63</b>
<b>3.4.</b>	<b>VERSUCHSAUSWERTUNG UND STATISTIK.....</b>	<b>64</b>
<b>3.5.</b>	<b>ERGEBNISSE.....</b>	<b>66</b>
<b>3.5.1.</b>	<b><i>Ergebnisse der physiologischen Untersuchungen.....</i></b>	<b>66</b>
3.5.1.1.	Nahrungs- und Wasseraufnahme.....	66
3.5.1.2.	Körpergewicht.....	67
3.5.1.3.	Körperlänge und Body Mass Index.....	67
3.5.1.4.	Motorische Aktivität.....	72

---

3.5.2.	<i>Ergebnisse der Verhaltensuntersuchungen</i> .....	77
3.5.2.1.	Elevated Plus Maze.....	77
3.5.2.2.	Hole Board.....	81
3.5.2.3.	Open Field.....	85
3.5.2.4.	Rota Rod.....	89
3.5.2.5.	Free Exploratory Paradigm.....	90
3.5.3.	<i>Ergebnisse der analytischen Untersuchungen</i> .....	96
3.5.3.1.	Methylphenidat- und Atomoxetinkonzentrationen im Blutplasma.....	96
3.5.3.2.	Serotonin-, Dopamin- und Noradrenalin- konzentrationen im Gehirn.....	97
<b>4.</b>	<b>Diskussion</b> .....	<b>106</b>
4.1.	<b>EINLEITUNG</b> .....	<b>106</b>
4.2.	<b>DISKUSSION DER METHODIK</b> .....	<b>106</b>
4.3.	<b>DISKUSSION DER ERGEBNISSE</b> .....	<b>111</b>
4.4.	<b>SCHLUSSBETRACHTUNG</b> .....	<b>118</b>
4.5.	<b>AUSBLICK</b> .....	<b>118</b>
<b>5.</b>	<b>Zusammenfassung</b> .....	<b>120</b>
<b>6.</b>	<b>Summary</b> .....	<b>122</b>
<b>7.</b>	<b>Zitierte Literatur</b> .....	<b>123</b>

---

5-HT	Serotonin
ADHS	Aufmerksamkeitsdefizit-Hyperaktivitätsstörung
ANOVA	Varianzanalyse (engl.: One Way Analysis Of Variance)
APA	Amerikanische Gesellschaft für Psychiatrie (engl.: American Psychiatric Association)
ATO, ato	Atomoxetin
BMI	Körpermasseindex (engl.: Body Mass Index)
COMT	Catechol-O-Methyl-Transferase
DA	Dopamin
DAT	Dopamintransporter
DDD	definierte Tagesdosis (engl.: Defined Daily Dose)
DOPA	Dihydroxyphenylalanin
EPM	Elevated Plus Maze
FEP	Free Exploratory Paradigm
G-Protein	Guaninnucleotid-bindendes Protein
HB	Hole Board
HICA	$\alpha$ -Hydroxyisocapronsäure
HIAA	5-Hydroxyindolessigsäure
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (engl.: High Pressure Liquid Chromatography)
ID	Innendurchmesser
IS	Interner Standard
KO, ko	Kontrolle
LC	Locus coeruleus
MAO	Monoaminoxidase
MPH, mph	Methylphenidat
MS	Massenspektrometrie
NA	Noradrenalin
NET	Noradrenalintransporter
OF	Open Field
PVC	Polyvinylchlorid
RR	Rota Rod
SD	Sprague Dawley
SERT	Serotonintransporter



---

SHR	Spontan-Hypertensive-Ratte (engl.: Spontaneous Hypertensive Rat)
SNRI	selektiver Noradrenalinwiederaufnahmehemmer (engl: Selective Noradrenaline Reuptake Inhibitor)
SPECT	Einzelphotonenemissionstomographie (engl.: Single Photon Emission Computed Tomography)
VMAT	vesikulärer Monoamintransporter
WHO	Weltgesundheitsorganisation (engl.: World Health Organisation)
ZNS	Zentralnervensystem

<u>Abb.1:</u>	Figur des „Zappelphillips“ aus dem Struwwelpeter.....	1
<u>Abb.2:</u>	Kriterien einer ADHS nach ICD–10 und DSM–IV (nach Döpfner et Köln, 2005).	4
<u>Abb.3:</u>	Vorderes und hinteres Aufmerksamkeitssystem (aus Rothenberger et Banaschewski, 2004).....	11
<u>Abb.4:</u>	Biosynthese der Catecholamine.....	14
<u>Abb.5:</u>	Biosynthese des Serotonins.....	18
<u>Abb.6:</u>	Strukturformel des Methylphenidats.....	21
<u>Abb.7:</u>	Darstellung der striatären Dopamintransporter im Tc–99m–Trodat–1–SPECT bei einem Erwachsenen mit ADHS (Dresel et al., 2000).....	22
<u>Abb.8:</u>	Strukturformel des Atomoxetins.....	25
<u>Abb.9:</u>	Atomoxetin: Affinitäten zu Monoamintransportern im Vergleich zu Methylphenidat ( $K_i$ -Wert) (nach Bymaster et al., 2002).....	26
<u>Abb.10:</u>	Schema der technischen Bestandteile des HPLC–Verfahrens.....	50
<u>Abb.11:</u>	Schematische Darstellung der Zielgebiete: A. Präfrontaler Cortex und Striatum, B. Hippocampus, C. Dorsale Raphe (modifiziert nach Paxinos und Watson, 1997).....	55
<u>Abb.12:</u>	Schematischer Ablauf der Probenaufbereitung für die HPLC–Analyse.....	55
<u>Abb.13:</u>	Versuchsschema.....	60
<u>Abb.14a-d:</u>	Nahrungs– und Wasseraufnahme.....	66
<u>Abb.15a-b:</u>	Körpergewicht.....	70
<u>Abb.16a-b:</u>	Körperlänge und Body Mass Index.....	71
<u>Abb.17a-e:</u>	Motorische Aktivität.....	73
<u>Abb.18a-e:</u>	Elevated Plus Maze.....	77
<u>Abb.19a-b:</u>	Hole Board.....	82
<u>Abb.20a-d:</u>	Open Field.....	86
<u>Abb.21:</u>	Rota Rod.....	89
<u>Abb.22a-c:</u>	Free Exploratory Paradigm.....	91
<u>Abb.23:</u>	Methylphenidat- und Atomoxetinkonzentrationen im Blutplasma.....	96
<u>Abb.24a-l:</u>	Serotonin-, Dopamin- und Noradrenalin-konzentrationen in verschiedenen Gehirnregionen.....	98
<u>Bild 1:</u>	Sprague–Dawley–Ratte.....	38
<u>Bild 2:</u>	Pharmakologische Substanzen.....	39
<u>Bild 3:</u>	Orale Applikation per Pipette.....	40

---

<u>Bild 4:</u>	Futter und Wasser.....	41
<u>Bild 5:</u>	Messung des Körpergewichts.....	41
<u>Bild 6:</u>	Messung der Körperlänge.....	41
<u>Bild 7:</u>	InfraMot.....	42
<u>Bild 8:</u>	Wheel Running.....	42
<u>Bild 9:</u>	Elevated Plus Maze (EPM).....	43
<u>Bild 10:</u>	Hole Board (HB).....	45
<u>Bild 11:</u>	Open Field (OF).....	46
<u>Bild 12:</u>	Rota Rod (RR).....	47
<u>Bild 13:</u>	Free Exploratory Paradigm (FEP).....	48
<u>Bild 14:</u>	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC)–Anlage.....	50
<u>Bild 15:</u>	Gehirnentnahme.....	54
<u>Tab.1:</u>	Nahrungs– und Wasseraufnahme.....	68
<u>Tab.2:</u>	Körperlänge und Body Mass Index.....	72
<u>Tab.3:</u>	Verhaltensparameter auf dem Elevated Plus Maze.....	80
<u>Tab.4:</u>	Verhaltensparameter im Hole Board.....	84
<u>Tab.5:</u>	Verhaltensparameter im Open Field.....	88
<u>Tab.6:</u>	Verhaltensparameter auf dem Rota Rod.....	89
<u>Tab.7:</u>	Verhaltensparameter im Free Exploratory Paradigm.....	94
<u>Tab.8:</u>	Methylphenidat- und Atomoxetinkonzentrationen im Blutplasma.....	96
<u>Tab.9:</u>	Serotonin-, Dopamin- und Noradrenalin-konzentrationen in verschiedenen Gehirnregionen.....	104



## 1. Einleitung

Die Aufmerksamkeitsdefizit-Hyperaktivitätsstörung (ADHS) ist die häufigste psychiatrische Erkrankung bei Kindern und Jugendlichen, die sich durch die drei Hauptsymptome Unaufmerksamkeit (mangelnde Ausdauer bei Beschäftigungen und die Tendenz, Tätigkeiten unbeendet abubrechen), Hyperaktivität (unruhiges Verhalten insbesondere die Unfähigkeit, stillsitzen zu können), Impulsivität (abruptes und unüberlegtes motorisches oder verbales Handeln, das nicht in den sozialen Kontext passt) auszeichnet, deren Ausprägung nicht dem Alter und Entwicklungsstand entspricht und zu Störungen in verschiedenen Lebensbereichen führt.

Die Tatsache, dass ADHS erst seit einigen Jahrzehnten zunehmend bei Kindern diagnostiziert und behandelt wird, hat zu der weit verbreiteten, durch Medien immer wieder aufgegriffenen Annahme geführt, dass ADHS nur eine Modediagnose und ein Produkt der modernen, hektischen Zeiten sei, in denen Kinder aufgrund neuartiger Medien einer ständigen Reizüberflutung unterlägen und schon frühzeitig einem zu hohen Leistungsdruck und Überforderung ausgesetzt seien (Trott, 1993). Dagegen spricht, dass bereits viele europäische Ärzte im 19. Jahrhundert das Syndrom beschrieben haben. Das bekannteste Beispiel findet sich in der Figur des „Zappelphillips“ aus dem Struwwelpeter vom Frankfurter Nervenarzt Dr. Heinrich Hoffmann (Abb.1).



Abb.1: Figur des „Zappelphillips“ aus dem Struwwelpeter

Es gibt keinen einfachen diagnostischen Test, der eine sichere Diagnose einer ADHS ermöglicht. Die Diagnose ADHS kann nur in Zusammenarbeit von Fachärzten für Kinder- und Jugendmedizin sowie -psychiatrie und -psychotherapie, Kinder- und Jugendlichenpsychotherapeuten, Eltern, Lehrern und Erziehern erfolgen.

Die medikamentöse Therapie stellt einen wichtigen Bestandteil der multimodalen Behandlung der ADHS dar.

Seit über 50 Jahren werden Psychostimulantien wie Dexamphetamin und Methylphenidat (MPH) zur Therapie der ADHS eingesetzt. Der in Deutschland 2005 eingeführte selektive Noradrenalinwiederaufnahmehemmer Atomoxetin (ATO) erweitert die Möglichkeiten der medikamentösen Therapie.

Die gesicherte und gute Effektivität der Methylphenidattherapie ist durch zahlreiche klinische Studien zweifelsohne belegt: In ca. 75 % der ADHS-Fälle wird für die Dauer der Einnahme eine Verringerung der hyperaktiven, impulsiven und unaufmerksamen Verhaltensweisen beobachtet (Döpfner et al., 2003).

Jedoch herrscht nicht nur ein Mangel sowohl an klinischen Studien als auch an tierexperimentellen Untersuchungen, was die Langzeitfolgen unter neuropsychologischen Aspekten angeht, sondern kontroverse Ergebnisse und uneinheitliche Versuchsansätze verhindern zudem allgemeingültige Aussagen.

In verschiedenen placebokontrollierten Doppelblindstudien wurde nachgewiesen, dass auch Atomoxetin im Vergleich zu Placebo die ADHS-Symptomatik reduziert (Becker et Wehmeier, 2003).

Aufgrund der verhältnismäßig kurzen Anwendungszeit seit der Zulassung im März 2005 gibt es auch für Atomoxetin noch keine klinischen Untersuchungen zu den Langzeitwirkungen.

Es sind Verordnungen überhöhter Dosen sowie eine zum Teil laxe Indikationstellung in Deutschland und den USA bekannt geworden (Lohse et al., 2006). Das Verordnungsvolumen beider Medikamente steigt stetig, die medikamentöse Therapie beginnt zum Teil schon im Kleinkindalter (Zito et al., 2000) und setzt sich bis ins Erwachsenenalter fort (Angold et al., 2000).

In jedem Fall gilt, dass die Behandlung beim Kind zu einem Zeitpunkt erfolgt, in dem das zentrale Nervensystem (ZNS) einer für äußere Einflüsse empfindlichen Entwicklungsphase befindet. Eine normale Hirnreifung hängt von der zeitlichen und örtlichen Koordination

zahlreicher Prozesse ab (Barone et al., 2000). Monoamine sind wichtige Regler dieser Prozesse und eine Veränderung ihrer Konzentration durch medikamentöses Eingreifen kann permanente Folgen haben. Die Wirkungen von Methylphenidat betreffen vornehmlich den Hippocampus und das Präfrontalhirn und gerade diese Regionen sind zum Zeitpunkt der Medikamentengabe in der Periadoleszenz auf der Höhe der Synapsenbildung bei Menschen und Ratten (Bayer et al., 1993).

Es ist also unbedingt erforderlich, dass mögliche langfristige Verhaltensänderungen und Veränderungen zentraler Neurotransmissionsmechanismen durch die medikamentöse Therapie erkannt und gegebenenfalls ausgeschlossen werden.

Sowohl Methylphenidat als auch das präferentiell die Noradrenalinwiederaufnahme hemmende Desipramin können nach wiederholter Gabe in der postnatalen Phase Verhaltensänderungen bei adulten Ratten verursachen (s. 2.1.6). Zu Atomoxetin liegen noch keine diesbezüglichen Untersuchungen vor. Jedoch sind beruhend auf dem ähnlichen Wirkmechanismus von Atomoxetin und Desipramin nach dem derzeitigen Kenntnisstand Langzeitfolgen nach einer Behandlung mit Atomoxetin im Kindes- und Jugendalter nicht auszuschließen.

Ein direkter Vergleich von Atomoxetin und Methylphenidat unter identischen Testbedingungen in dieser Fragestellung wurde noch nicht durchgeführt.

Für sowohl Atomoxetin als auch Methylphenidat gibt es keine Ergebnisse über die Langzeitwirkungen in den Fällen, in denen gesunde Kinder aufgrund falsch-positiver Diagnosen medikamentös behandelt werden.

Es besteht durchaus die Möglichkeit, dass diese Kinder sich als anfälliger für Substanzmissbrauch und -abhängigkeit erweisen. Es könnten Essstörungen, Angststörungen, depressive Episoden, Veränderungen der Impulsivität und Beeinträchtigungen von Lernen und Gedächtnis auftreten.

Hieraus ergibt sich die Aufgabe, die Langzeitfolgen einer wiederholten Methylphenidat- und Atomoxetingabe in der Periadoleszenz durch experimentelle Untersuchungen verschiedener Aspekte des Tierverhaltens abzuklären. Dabei wird besonderer Wert darauf gelegt, die Applikationsart und Dosierung der Medikamente sowie das Entwicklungsalter der Ratten weitestgehend der Situation der betroffenen Kinder anzupassen.

Zeigen sich Veränderungen müsste die Verschreibungspraxis bei einer ADHS neu überdacht werden.

## 2. Schriftum

### 2.1. DIE AUFMERKSAMKEITSDEFIZIT–HYPERAKTIVITÄTSSTÖRUNG

#### 2.1.1. Definition und Klassifikation

Die Aufmerksamkeitsdefizit–Hyperaktivitätsstörung (früher auch Hyperkinetisches Syndrom, Minimale Cerebrale Dysfunktion, Aufmerksamkeitsdefizitstörung genannt) stellt eine der häufigsten psychiatrischen Erkrankungen bei Kindern und Jugendlichen dar. Die drei Kardinalsymptome sind Unaufmerksamkeit, Hyperaktivität, Impulsivität.

Zur Klassifikation der Erkrankung stehen zwei international gebräuchliche Systeme zur Verfügung: Das Klassifikationsschema nach ICD–10 (Internationale Klassifikation der Erkrankung, 10. Revision) der World Health Organisation (WHO), in Europa vornehmlich angewandt, unterscheidet zwischen der einfachen Aufmerksamkeits– und Hyperaktivitäts–störung, der Hyperkinetischen Störung des Sozialverhaltens und sonstigen, nicht näher bezeichneten Hyperkinetischen Störungen (WHO, 1992). Das Klassifikationsschema nach DSM–IV der American Psychiatric Association (APA), dem die umfangreichsten Studien zugrunde liegen, unterteilt in einen vorwiegend unaufmerksamen Typ, einen vorwiegend hyperaktiven/ impulsiven Typ und einen Mischtyp (APA, 1994) (Abb.2).

<b>Diagnosen nach ICD–10</b>	<b>Diagnosen nach DSM–IV</b>
<u>F 90.0 Einfache Aufmerksamkeits– und Hyperaktivitätsstörung:</u> Aufmerksamkeitsstörung + Hyperaktivität + Impulsivität (situationsübergreifend)	<u>ADHS: Mischtyp:</u> Aufmerksamkeitsstörung + Hyperaktivität/ Impulsivität (situationsübergreifend)
<u>F 90.1 Hyperkinetische Störung des Sozialverhaltens:</u> Aufmerksamkeitsstörung + Hyperaktivität + Impulsivität (situationsübergreifend) + Störung des Sozialverhaltens	<u>ADHS: vorwiegend unaufmerksamer Typ:</u> Aufmerksamkeitsstörung – Hyperaktivität/ Impulsivität (situationsübergreifend)
	<u>ADHS: vorwiegend hyperaktiver Typ:</u> Hyperaktivität/ Impulsivität – Aufmerksamkeitsstörung (situationsübergreifend)

Abb.2: Kriterien einer ADHS nach ICD–10 und DSM–IV (nach Döpfner et Köln, 2005)



Bei beiden Diagnostischen Manualen wird gefordert, dass die Symptome über einen längeren Zeitraum (mindestens sechs Monate) und in einem Maß vorhanden sind, das dem Entwicklungsstand des Kindes nicht angemessen ist. Die Auffälligkeiten müssen bereits vor dem sechsten Lebensjahr und in verschiedenen Lebensbereichen des Kindes (Familie, Schule, Freizeit) aufgetreten sein.

### 2.1.2. Epidemiologie und Verlauf

Je nach Klassifikationssystem, Art der Stichprobe, Diagnoseverfahren ergibt sich in der Altersgruppe von vier bis siebzehn Jahren eine Prävalenz von 2–7 %.

Nach Erhebungen des Robert–Koch–Instituts im Rahmen des Kinder– und Jugendsurveys wurde eine mittlere Prävalenzrate von 3,9 % für Kinder und Jugendliche bis zum 17. Lebensjahr ermittelt (Huss, 2004).

Dabei scheinen Jungen drei bis viermal häufiger als Mädchen betroffen zu sein und vertreten häufiger den hyperaktiv–impulsiven Typ, wohingegen sich bei Mädchen bevorzugt die unaufmerksame („verträumte“) Variante finden lässt (Döpfner et al., 2000).

Rückblickend können die Auffälligkeiten schon im Säuglingsalter („Schreibabys“) erkennbar gewesen sein, im Kleinkindalter zeigten sich ein plan– und rastloses sowie destruktives Spielverhalten und eine ausgeprägte Trotzphase. In 50 % der Fälle setzt sich die Störung im Jugendalter fort und auch im Erwachsenenalter können sich noch deutliche Symptome zeigen (Döpfner et al., 2000).

Die Kernsymptome treten dauerhaft und situationsübergreifend in verschiedenen Lebensbereichen auf und führen zu einer deutlichen Beeinträchtigung der psychosozialen und kognitiven Funktionsfähigkeit.

Die Unaufmerksamkeit kann sich beispielsweise bei betroffenen Kindern darin äußern, dass sie Einzelheiten nicht beachten, bei den Hausaufgaben und anderen Tätigkeiten Flüchtigkeitsfehler machen und Anweisungen nicht vollständig durchführen. Sie haben Schwierigkeiten bei der Organisation von Aufgaben und Aktivitäten. Sie lassen sich leichter durch äußere Reize ablenken, sind vergesslicher bei Alltagstätigkeiten, verlieren öfter Gegenstände, hören nicht zu, wenn sie angesprochen werden und vermeiden Aufgaben, die länger dauernde geistige Anstrengungen erfordern.

Die Hyperaktivität zeigt sich durch Zappeln mit Händen und Füßen, Herumrutschen auf Stühlen, wiederholtes Aufstehen in Situationen, in denen Sitzenbleiben erwartet wird, durch

Herumlaufen oder exzessives Klettern. Kinder mit ADHS haben zudem oft Schwierigkeiten, ruhig zu spielen oder sich zu beschäftigen.

Die Impulsivität äußert sich häufig darin, dass betroffene Kinder mit Antworten herausplatzen, bevor eine Frage zu Ende gestellt ist, nicht abwarten können, bis sie an der Reihe sind, andere unterbrechen und stören. Auch haben sie ein erhöhtes Verletzungsrisiko (DiScala et al., 1998).

Es sind drei Verlaufstypen der ADHS bekannt (Krause et al., 1998): Remission bis zur Adoleszenz, Fortbestehen des klinischen Vollbildes oder einer residualen ADHS, Fortbestehen der ADHS mit häufigen komorbiden psychiatrischen Störungen.

Verlaufsstudien haben gezeigt, dass in mindestens einem Drittel der Fälle ein Fortbestehen der Störungen ins Erwachsenenalter vorkommt (Biedermann, 2004).

Die Hyperaktivität und die Impulsivität nehmen dabei analog ihres Rückgangs bei normalen Kindern in zunehmendem Alter eher ab als die Konzentrationsstörung. Das Ausmaß der Remission bzw. Persistenz stehen im Zusammenhang mit der initialen Symptomausprägung. Eine Komorbidität von oppositionellen und Sozialverhaltensstörungen sowie Störungen der familiären Beziehungsmuster fördern zusätzlich ein Fortbestehen der Symptomatik.

Bei 44–50 % der Adoleszenten mit ADHS zeigen sich Probleme des Sozialverhaltens (Barkley, 2003), bei 26 % findet sich eine Depression. ADHS-Patienten, vor allem die unbehandelten, weisen ein deutlich erhöhtes Suchtrisiko auf. Fälle von antisozialen Persönlichkeitsstörungen treten vermehrt auf und Risikoverhaltensweisen sind in überhöhtem Maße ausgeprägt. Des Weiteren zeigt sich ein grundlegendes Defizit in sozialen Anpassungsprozessen, was sich in Schulabbrüchen, verringerten akademischen Leistungen, gestörten zwischenmenschlichen Beziehungen und verringerten Engagement in konstruktiven sozialen Aktivitäten äußern kann (Taylor, 1999).

Bei einer Prävalenz von durchschnittlich 2–7 % (diagnostiziert nach DSM-IV) der ADHS bei Schulkindern und einer Persistenz in das Erwachsenenalter von ungefähr 33 % ist davon auszugehen, dass bis zu 2–3 % der Erwachsenen die Kriterien der ADHS erfüllen (Wender, 1995). Die Erkrankung äußert sich in mangelnder Alltagsorganisation, in chaotischer und insuffizienter Arbeitsweise, im sozialen Bereich sowie Auffälligkeiten im Straßenverkehr. Als zusätzliche Komorbiditäten können Substanzmissbrauch bzw. -abhängigkeit, Persönlichkeitsstörungen, affektive Störungen sowie Angst-, Tic-, Teilleistungs- und

Schlafstörungen auftreten. Eine Behandlung ist abhängig vom Ausprägungsgrad der ADHS. Zum Verlauf der ADHS im hohen Erwachsenenalter liegen bislang keine Studien vor.

### **2.1.3. Diagnostik und Komorbidität**

Die Diagnose einer ADHS ist zeitaufwendig und erfordert eine enge Kooperation des Arztes mit Eltern, Schule/ Kindergarten. Es gibt keinen sicheren Nachweistest, so dass die Diagnose einer ADHS eine „klinische Diagnose“ ist.

ADHS ist durch eine hohe inter- und intraindividuelle Variabilität der charakteristischen Symptome gekennzeichnet. Die Grenzen zwischen auffälligen und normalen Verhalten sind fließend. ADHS wirkt sich in hohem Maße negativ auf die kindliche Entwicklung und soziale Anpassung aus.

Daher sollte bei einem ADHS-Verdacht eine genaue und präzise Diagnosestellung erfolgen und nur spezialisierte Kinder- und Jugendärzte oder -psychiater damit betraut werden.

Die Diagnose vollzieht sich auf mehreren Ebenen:

- 1.) Anamnese
- 2.) Verhaltensbeobachtung
- 3.) Beurteilungsskalen und Fragebögen
- 4.) Psychologische Testuntersuchung
- 5.) Entwicklungsneurologische Untersuchung

Als erstes wird eine detaillierte Familienanamnese vorgenommen, um mögliche hyperkinetische Störungen sowie psychiatrische Störungen, insbesondere Alkoholismus, Drogenabhängigkeit und Dissozialität der Familienmitglieder abzuklären. Die Anamnese des Kindes umfasst eine sorgfältige prä-, peri- und postnatale Abklärung, um Risikofaktoren für mögliche koexistente Hirnfunktionsstörungen zu erfassen (Steinhausen, 2000). Standardisierte Fragebögen und Beurteilungsskalen sollen eine objektive Befunderhebung gewährleisten. Erweitert werden diese Untersuchungen durch Intelligenz-, Leistungs- und Entwicklungstests, internistische und neurologische Untersuchungen, Verhaltensbeobachtung während verschiedener Untersuchungssituationen etc.

Wichtig ist eine fundierte differentialdiagnostische Abgrenzung. Die Verlaufskontrolle bei einer Intervention ist empfehlenswert.

Vielfach treten psychiatrische Begleiterkrankungen auf (Döpfner et al., 2000). Untersuchungen gehen von mindestens einer komorbiden Störung bei bis zu 80 % der Betroffenen mit gesicherter ADHS aus (Jensen et al., 1997).

Je älter ein Patient ist, desto wahrscheinlicher ist auch eine komorbide Störung des Sozialverhaltens. Umgekehrt kann bei Jungen unter 12 Jahren bei einer Störung des Sozialverhaltens fast immer auch eine ADHS diagnostiziert werden (Herpertz-Dahlmann, 2003).

#### **2.1.4. Ätiologie und Pathogenese**

Die Entstehungsursachen sind noch nicht vollständig geklärt, es gilt aber als gesichert, dass es sich um ein multifaktorielles Geschehen handelt.

Hauptsächlich dürfte das Zusammenspiel verschiedener Gene in Kombination mit Umweltfaktoren bedeutsam sein.

Das soziale Umfeld beeinflusst vornehmlich Schweregrad und Stabilität der Verhaltensauffälligkeiten (Rutter et al., 2002).

Die genetische Prädisposition bildet die Basis für die Entstehung einer ADHS. Aufgrund von Familien-, Adoptions- und Zwillingsstudien wird davon ausgegangen, dass ca. 65–90 % der phänotypischen Varianz auf genetischen Einflüssen beruht (Thapar et al., 1999).

Jedoch entwickeln längst nicht alle Kinder mit entsprechender genetischer Disposition eine ADHS.

Bis zu 18 % der Eltern von Kindern mit ADHS sind selbst betroffen, für Geschwister von Betroffenen liegt das Risiko bei 10–35 % (Faraone et al., 2000).

Als begünstigende Risikofaktoren für die Entwicklung einer ADHS gelten Schwangerschafts- und Geburtskomplikationen, ein erniedrigtes Geburtsgewicht, Alkohol, Rauchen und andere Drogen in der Schwangerschaft, sowie Infektionen, ZNS-Erkrankungen und -verletzungen (Milberger et al., 1997; Thapar et al., 2003).

Ein Zusammenhang mit Allergien, Nahrungsmittelunverträglichkeiten, atopischen Erkrankungen konnte nicht bewiesen werden (Blank et al., 1994; Marcus, 1995).

Schon 1937 wurde aufgrund der guten Wirksamkeit von Stimulantien gegen die Symptome der ADHS, entsprechend dem bekannten Wirkmechanismus dieser Substanzen, eine Störung

im Stoffwechsel der biogenen Amine Dopamin (DA) und Noradrenalin (NA) vermutet (Bradley, 1937).

Messungen von Catecholaminen und ihren Metaboliten in Blut, Urin und Liquor gaben aber durchweg uneinheitliche Ergebnisse her und lieferten demzufolge keine Aussagen über die Beteiligung der catecholaminergen Transmissionssysteme (Mercugliano, 2000).

Molekularbiologische Untersuchungen unterstützen die Vermutung, dass Polymorphismen in verschiedenen Genen an der Entstehung der ADHS beteiligt sind (Asherson, 2004).

Das 7-repeat Allel des Dopamin-Rezeptor-Gens-4 codiert vermutlich einen postsynaptischen Rezeptor, der weniger dopaminsensitiv ist, während das DAT1-10-Transporter-Gen mit einer erhöhten präsynaptischen Dichte des Dopamintransporters (DAT) einherzugehen scheint und damit für die geringere Verfügbarkeit von Dopamin im synaptischen Spalt verantwortlich wäre.

Untersuchungen des Dopamintransporters mittels radioaktiv-markierter Liganden belegen eine deutlich höhere Konzentration des DAT im Striatum von erwachsenen Patienten mit ADHS im Vergleich zu normalen gleichaltrigen Kontrollpersonen (Dougherty et al., 1999; Krause et al., 2000). Weiterhin konnte in diesen Versuchen bewiesen werden, dass der gestörte Stoffwechsel durch MPH korrigiert wird. Dadurch lässt sich auch die angeblich paradoxe Wirkung des Methylphenidats (während es bei Personen mit ADHS die Aktivität senkt und die Aufmerksamkeit steigert, führt es bei Gesunden zu einem unangenehmen Gefühl ähnlich einer zu großen Aufnahme von Coffein) erklären: Bei den Gesunden führt die Gabe von Methylphenidat zu einem Überschuss von Dopamin im synaptischen Spalt, bei den Personen mit ADHS jedoch wird durch die Blockierung des DAT die zu hohe Dichte ausgeglichen und es kommt zu einem „normalen“ Dopaminlevel im synaptischen Spalt.

Neuroanatomisch konnte in diversen kernspintomographischen Studien Größenabnahmen des Frontallappens (8 %), der Basalganglien (6 %) sowie des Kleinhirns (12 %) bei ADHS-Patienten aufgezeigt werden (Castellanos, 1997; Hynd et al., 1990; Semrud-Clikeman et al., 1994). Sie waren bislang aber noch nicht hinreichend spezifisch, um die Kernspintomographie zu diagnostischen Zwecken einzusetzen.

Untersuchungen mit der funktionellen Kernspintomographie ergaben u.a. eine erniedrigte Aktivierung in rechtseitigen präfrontalen Systemen und im linken Caudatum (Rubia et al., 1999).

Mittlerweile konnte auch eine ganze Reihe von neurophysiologischen Unterschieden herausgearbeitet werden:

Mittels Elektroencephalogramm–Analysen konnte eine Verlangsamung über den frontalen Hirnregionen bei ADHS Patienten sichtbar gemacht werden (Monastera et al., 1999).

In Positronen–Emissions–Tomographie–Untersuchungen mit [F–18] Fluorodesoxyglucose konnte ein um 8,1 % verminderter Glukoseumsatz bei Erwachsenen mit ADHS während eines auditorischen Continuous Performance Test im Frontallappen links nachgewiesen werden (Zametkin et al., 1990).

Studien mit [F–18] Dihydroxyphenylalanin (DOPA) zeigten eine deutliche Abnahme der DOPA–Decarboxylase–Aktivität im präfrontalen Cortex bei ADHS–Patienten im Vergleich zu Gesunden (Ernst et al., 1998).

In Untersuchungen mit Single Photon Emission Computed Tomography (SPECT) wurden in verschiedenen Studien verminderte Durchblutung und Aktivitäten im Striatum und Frontallappenbereich festgestellt (Lou et al., 1984; Amen et al., 1993; Sieg, 2000).

Es ist also davon auszugehen, dass zumindest ein Grund der ADHS–Symptomatik in der erhöhten Expression des Dopamintransporter–Gens zu finden ist, wodurch eine um etwa 70 % erhöhte Bindungskapazität der präsynaptischen DATs besteht (Cheon et al., 2003) und folglich weniger Dopamin für die dopaminabhängigen Neurone zur Verfügung steht. Durch das zu schwache Dopaminsignal wird das Aufmerksamkeitssystem mit Informationen unterversorgt und so zudem empfänglicher für andere ablenkende Signale.

Diese Auffälligkeiten betreffen vor allem das vorwiegend dopaminerg innervierte anteriore Aufmerksamkeitssystem (Cingulum und präfrontaler Cortex), aber auch das posteriore Aufmerksamkeitssystem (rechter Parietallappen, die Colliculi superiores und hinterer Thalamusanteil), das überwiegend durch Noradrenalin gesteuert wird (Abb.3).

Beide Transmittersysteme hängen jedoch funktionell sehr eng zusammen. So übt das noradrenerge Transmittersystem einen großen Einfluss auf das dopaminerge Transmittersystem aus, insbesondere im frontalen Cortex, wo Dopamintransporter weitgehend fehlen und freigesetztes Dopamin durch Noradrenalintransporter (NET) wieder in die Zelle aufgenommen wird (Bymaster et al., 2002). Einen wichtigen Hinweis auf eine mögliche Störung des noradrenergen Systems bei Kindern mit ADHS gibt auch der pharmakotherapeutische Einsatz des Noradrenalinwiederaufnahmehemmers Atomoxetin.

DA und NA vermitteln auf Neurotransmitterebene über weit reichende, vielfach verzweigte neuronale Schaltkreise die so genannten „exekutiven Funktionen“ (Biedermann et Spencer,

1999); unter diesen versteht man höhere Kontrollmechanismen für problemlösendes Denken, zielgerichtetes und flexibles Verhalten sowie die Steuerung von Antrieb, Motivation und Affekt.

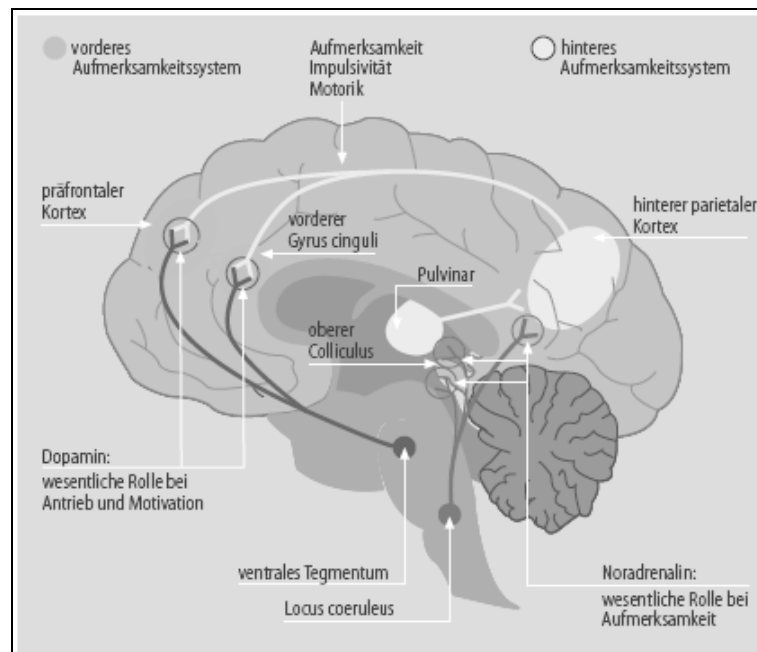


Abb.3: Vorderes und hinteres Aufmerksamkeitssystem (aus Rothenberger et Banaschewski, 2004)

Die Rolle des serotonergen Transmissionssystems ist noch unklar. Sie könnte auch mit den häufig mit ADHS vergesellschafteten Störungen wie Depressionen, Angststörungen, Zwangserkrankungen und Aggressionen im Zusammenhang stehen. Jedoch weisen schon die Hauptmerkmale des Krankheitsbildes (Hyperaktivität, Unaufmerksamkeit, Impulsivität) auf eine Beteiligung des serotonergen Transmissionssystems hin (Oades, 2007).

Es konnte weiterhin gezeigt werden, dass der Serotoningehalt in den Thrombozyten bei ADHS-Kindern im Vergleich zu gesunden Kindern erhöht ist. Dabei hinaus scheinen weitere Gene, die an der Ausprägung des serotonergen Systems beteiligt sind ebenfalls bei ADHS eine Rolle zu spielen (Manor et al., 2001).

Hypothese: Vermutlich führen unter anderem Dysfunktionen im anterioren und posterioren Aufmerksamkeitssystem und in motorischen Regelkreisen dazu, dass bei Kindern mit ADHS die frontokortikale Inhibitionsfähigkeit und exekutive Funktionen beeinträchtigt sind.

#### 2.1.4.1. Das catecholaminerge Transmissionssystem

Von den schätzungsweise 100 Billionen Neuronen des menschlichen Gehirns wird nur von 500.000 angenommen, dass sie Catecholamine als Neurotransmitter nutzen.

Aufgrund ihrer Aminogruppe werden die catecholaminergen Transmitter zusammen mit Serotonin und Histamin zu den Monoamin-Neurotransmittern zusammengefasst.

Sie üben übergeordnete modulatorische Funktionen im Gehirn aus, wobei eine relativ geringe Anzahl von Neuronen weite Regionen des ZNS innerviert.

Noradrenalin spielt bei zahlreichen Gehirnfunktionen eine Rolle, eingeschlossen Schlaf, Erregung, Aufmerksamkeit, Lernen und Gedächtnis. Ihm wird zudem eine Beteiligung an der Pathogenese von Depressionen und Angststörungen zugeschrieben (Baldwin et al., 2002).

Es ist aber auch Träger der postganglionären Reizübermittlung der sympathischen Anteile des autonomen Nervensystems und wirkt durch seine Ausschüttung aus dem Nebennierenmark in die Blutbahn auch als Hormon.

Dopamin, die biochemische Vorstufe von Noradrenalin, beeinflusst im ZNS die Regulation der motorischen Aktivität, kognitive Prozesse, Emotion und Motivation, sowie endokrine Funktionen. Das dopaminerge System ist daher bei verschiedenen Erkrankungen wie zum Beispiel Morbus Parkinson, Schizophrenie und Drogenabhängigkeit involviert.

#### *Funktionelle Anatomie*

Mehr als 50 % aller noradrenerger Neurone sind im Locus coeruleus (LC) am Boden des Vierten Ventrikels im vorderen Teil der Pons lokalisiert. Trotz ihrer dennoch geringen Anzahl ziehen Projektionsbahnen in so gut wie jeden Bereich des Gehirns und ins Rückenmark.

Die wichtigsten Projektionen ziehen vom LC zum Hirnstamm und innervieren dort den Thalamus, dorsalen Hypothalamus, Hippocampus und den Cortex (Foote et al., 1983). Die Entladungsfrequenz („firing rate“) der Neurone im LC ist stark abhängig vom Wachzustand und der Aufmerksamkeit eines Individuums. Daher wird der LC unter anderem mit der Regulation von Vigilanz und Aufmerksamkeit in Verbindung gebracht (Nestler et al., 1999).

Die übrigen noradrenergen Neurone befinden sich als lose Zellansammlungen im Hirnstamm und ziehen ebenfalls ins Gehirn und Rückenmark, jedoch in geringerer Ausprägung.



Die Gesamtanzahl der dopaminergen Neurone im menschlichen Gehirn (ausgeschlossen die der Retina und des Riechkolbens) wird zwischen 300. 000 und 400. 000 angesetzt. Die drei Hauptzentren im Gehirn der Ratte befinden sich in der Substantia nigra, dem ventralen Tegmentum und dem Nucleus arcuatus. Ähnliche Anordnungen finden sich auch bei Primaten, jedoch weniger kompakt.

Die Zellen der Substantia nigra projizieren vornehmlich zum Nucleus caudatus und Putamen und bilden in dieser Anordnung das nigrostriatale DA-System. Die Dopaminkonzentration im nigrostriatalen System ist ein wesentlicher Faktor bei der Steuerung der Willkürmotorik. Wenn dopaminerge Neuronen der Substantia nigra absterben– wie es bei Morbus Parkinson der Fall ist– sinkt der DA-Spiegel im Striatum und die Kontrolle der willkürlichen Bewegungen ist schwer beeinträchtigt.

Die Zellen des ventralen Tegmentums mit ihren Efferenzen zum limbischen System bilden das mesolimbocorticale DA-System. Das mesolimbocorticale DA-System hat sowohl kognitive als auch emotionale Funktionen. Es spielt eine bedeutende Rolle bei Belohnungseffekten und bei psychotischen Erkrankungen.

Die Zellen des Nucleus Arcuatus des Hypothalamus innervieren die Zirbeldrüse und stellen somit das tuberoinfundibuläre DA-System dar. Das tuberoinfundibuläre System kontrolliert die Prolactinfreisetzung der Zirbeldrüse, Störungen dieser Achse führen demzufolge zu neuroendokrinen Effekten.

### *Synthese und Abbau*

Die Catecholamine Dopamin, Noradrenalin und Adrenalin werden aus der Aminosäure Tyrosin synthetisiert (Abb.4). Der Großteil der Catecholaminsynthese findet in den Nervenendigungen statt. Das gebildete Dopamin wird dort mittels Vesikulärer Monoamin-Transporter-Proteine (VMATs) in Speichervesikel geschafft und somit vor dem Abbau durch die MAO geschützt. In noradrenergen Endigungen wird Dopamin durch die Dopamin- $\beta$ -Hydroxylase, die sich ebenfalls in den Speichervesikeln befindet, zu Noradrenalin umgewandelt. Es gibt zwei Wege der Freisetzung: eine Calcium-abhängige exozytotische und eine Calcium-unabhängige nicht-exozytotische. Ausgelöst wird die exozytotische durch die Depolarisation der Zellmembran im Rahmen eines Aktionspotentials. Dies ist der übliche Weg. Die nicht-exozytotische Freisetzung erfolgt über den DAT und kann mit Amphetamin ausgelöst werden.

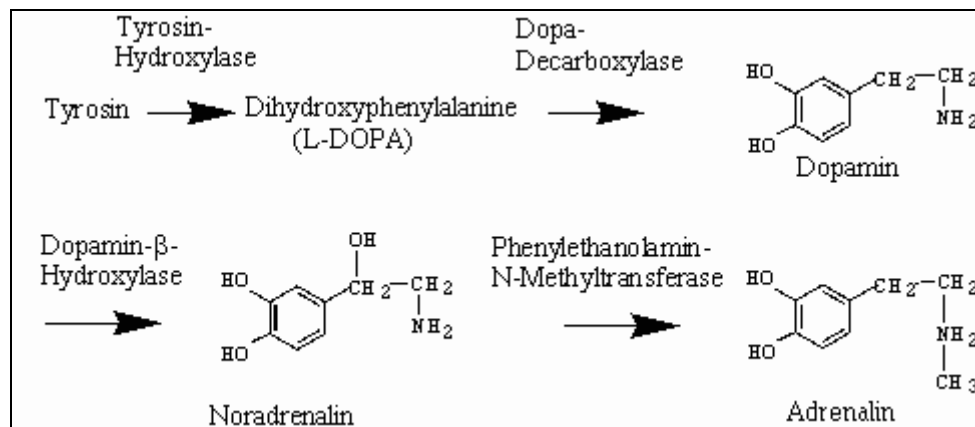


Abb.4: Biosynthese der Catecholamine

In den synaptischen Spalt freigesetzte Catecholamine können einen oder mehrere der folgenden Schritte durchlaufen:

- 1.) Abbau durch COMT oder MAO (s. oben)
- 2.) Diffusion aus dem synaptischen Spalt
- 3.) Aktivierung eines präsynaptischen Rezeptors
- 4.) Aktivierung eines postsynaptischen Rezeptors
- 5.) Wiederaufnahme („reuptake“) in die präsynaptische Nervenendigung

Im Wesentlichen bauen zwei Enzyme die Catecholamine ab: die Monoaminoxidase (MAO) und die Catechol-O-Methyl-Transferase (COMT) (Kopin, 1985). Das Noradrenalin wird intrazellulär hauptsächlich durch die Isoform MAO-A (Shih, 1994) und im synaptischen Spalt durch die COMT abgebaut.

Bei der Diffusion aus dem synaptischen Spalt kommt es zu einer Aktivierung weit entfernter Rezeptoren hoher Affinität anderer Nervenendigungen ohne synaptische Kontakte („wireless action“) (Vizi, 2000).

Die Aktivierung eines präsynaptischen Rezeptors reguliert die Transmitterfreisetzung (Langer, 1980).

Die Bindung an einem postsynaptischen Rezeptor bewirkt bei ionotropen Rezeptoren eine Änderung des Membranpotentials, bei metabotropen Rezeptoren biochemische Änderungen von Molekülen im Zellinneren (Starke et al., 1977).

Der Wirkung der freigesetzten Transmitter wird in erster Linie durch Reuptake in die Nervenendigungen ein Ende gesetzt. Die Wiederaufnahme erfolgt durch den DAT bzw. NET in kürzester Zeit. Dies hat zur Folge, dass zum einen die Dauer der Aktivierung von prä- oder postsynaptischen Rezeptoren begrenzt wird, zum anderen die Diffusion der Transmitter zu anderen Synapsen beschränkt wird, sowie die Möglichkeit geschaffen wird, einen unmetabolisierten Transmitter erneut zu nutzen. Diese Transporter bestehen aus  $\text{Na}^+/\text{Cl}^-$ -abhängigen membrandurchspannenden Proteinen (Nelson, 1998). Der im menschlichen Organismus vorkommende NET mit 617 Aminosäuren besteht aus 12 transmembranären Domänen und mehreren extra- und intrazelluläre Schleifen. Er wird analog dem Hauptvorkommen der noradrenergen Neurone in erster Linie im Locus coeruleus exprimiert, allerdings konnten auch relativ hohe Konzentrationen im dorsalen Raphekern, der primären Serotoninquelle des Gehirns, festgestellt werden, was darauf hindeutet, dass das noradrenerge System einen großen Einfluss auf den Serotoninstoffwechsel im dorsalen Raphekern ausübt. Der DAT ähnelt in seinem strukturellen Aufbau dem NET. Er besteht aus 620 Aminosäuren, die denen des NET zu 66 % homolog sind. Northern Blot und In-Situ-Hybridisierung zeigten, dass der DAT ausschließlich in dopaminergen Neuronen exprimiert wird. Mit immunhistologischen Methoden konnte gezeigt werden, dass die DAT-Proteine nicht nur auf der präsynaptischen Membran lokalisiert sind, sondern in der Substantia nigra und dem ventralen Tegmentum auch auf den dendritischen Membranen. Diese lässt im Mittelhirn auf eine Dopaminausschüttung auch durch die Dendriten schließen. Des Weiteren wird vermutet, dass der DAT in bestimmten axonalen Plasmamembranen auch umgekehrt Transmitter in den synaptischen Spalt freisetzen kann (s. 2.1.5.1.). Der DAT spielt eine kritische Rolle bei der Aufrechterhaltung des Gleichgewichts im dopaminergen System, Störungen werden mit einigen neuropsychiatrischen Zuständen in Zusammenhang gebracht.

### *Rezeptoren*

Alle catecholaminergen Rezeptoren agieren über Guaninnucleotid-bindende Proteine (G-Proteine). Die Reaktion zwischen Catecholamin und membrangebundenem Rezeptor bewirkt eine Konformationsänderung des Rezeptors, die die Aktivierung des G-Proteins zur Folge hat, welches wiederum einen Ionenkanal oder ein Second Messenger System beeinflusst. Es gibt verschiedene adrenerge und dopaminerge Rezeptoren. Die physiologischen Antworten auf die Rezeptorbindung variieren von Rezeptortyp zu Rezeptortyp sowie innerhalb eines

Rezeptortyps in Abhängigkeit von der Lokalisation, da in unterschiedlichen Zellen andere Signalmoleküle und Ionenkanäle gefunden werden.

Adrenerge Rezeptoren werden in alpha- und beta-Rezeptoren unterteilt (Bylund et al., 1994). Diese werden in weitere Subtypen aufgeteilt ( $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$ ,  $\beta_1$ ,  $\beta_2$ ,  $\beta_3$ ). Jeder Subtyp reagiert in unterschiedlichem Maß sowohl auf Noradrenalin als auch auf Adrenalin.

Im ZNS wirkt Noradrenalin über  $\alpha_1$ -Rezeptoren durch eine G-Protein-abhängige Erhöhung der Inositoltriphosphat- und Diacylglycerol-Konzentration exzitatorisch.

Es gibt fünf Dopaminrezeptoren. Die zuerst gefundenen  $D_1$ - und  $D_2$ -Rezeptoren übertreffen zahlenmäßig weit die später gefundenen  $D_3$ -  $D_5$ -Rezeptoren. Man unterscheidet auf Grund des unterschiedlichen intrazellulären Signalwegs und Wirkung zwei Gruppen: die  $D_1$ /  $D_5$ -Gruppe (kurz  $D_1$ -Gruppe) und die  $D_2$ /  $D_3$ /  $D_4$ -Gruppe (kurz  $D_2$ -Gruppe) (Seeman et Grigoriadis, 1987).

Die  $D_1$ -Rezeptoren finden sich auf Neuronen der Basalganglien, des Nucleus accumbens, der Großhirnrinde ( $D_1$ ) sowie im Hippocampus und in der Amygdala ( $D_5$ ).

$D_2$ -Rezeptoren kommen im Corpus striatum, Hypophysenvorderlappen (cholinerge Interneurone und die Prolactinfreisetzung werden durch Dopamin gebremst) und in der Area postrema (eine Aktivierung löst Erbrechen aus) vor,  $D_3$ -Rezeptoren sind im Cerebellum lokalisiert und  $D_4$ -Rezeptoren befinden sich im Hippocampus, Frontallappen und in der Amygdala.

#### 2.1.4.2. Das serotonerge Transmissionssystem

'Serotonin is an enigma. It is at once implicated in virtually everything but responsible for nothing.' (B. L. Jacobs and C. A. Fornal, 1999)

Trotz weit reichender Untersuchungen des Serotonins oder 5-Hydroxytryptamin (5-HT) ist seine präzise Rolle im Gehirn noch nicht vollständig geklärt.

Bei Säugetieren kommt ihm eine zentrale Bedeutung bei der pränatalen Entwicklung des Gehirns zu. Sowohl ontogenetisch als auch phylogenetisch manifestiert(e) es sich als eines der ersten Neurotransmittersysteme im Gehirn.

Dieser Botenstoff ist bereits bei Avertebraten, z.B. der Meeresschnecke *Aplysia*, nachweisbar (Southall et al., 1997).

Das zentrale serotonerge Transmissionssystem ist an physiologischen Funktionen wie Thermoregulation, Schlaf und Tag- und Nacht-Rhythmus (Sharpley und Cowen, 1995), Immunaktivität, Nahrungsaufnahme (Cooper, 1992), Sexualität (Bitran und Hull, 1987), an emotionalen Zuständen wie Angst und Streß (Lopez et al., 1999), aversivem Verhalten (Marsden, 1996), Belohnung (Tyers und Hayes, 1992) sowie an weiteren kognitiven und autonomen Prozessen beteiligt.

Änderungen in seinem Stoffwechsel werden für zahlreiche neuropsychologische Zustände von Angststörungen über Migräne bis Depressionen verantwortlich gemacht.

Das zentrale Serotonin stellt jedoch nur 1–2 % des Gesamtserotonins im Körper dar.

### *Funktionelle Anatomie*

Die Anzahl der serotonergen Neurone im menschlichen Gehirn wird auf einige Hunderttausend geschätzt. Diese Neurone sind fast ausnahmslos auf die Raphekerne im Hirnstamm konzentriert, von dort aus projizieren ihre Efferenzen jedoch in nahezu alle Strukturen des Gehirns.

Erstmals beschrieben wurden diese großzelligen Neurone in der Mittellinie des Hirnstamms von Ramon y Cajal (Cajal, 1911).

Entwicklungsgeschichtlich lassen sich die Zellen des Hirnstamms in zwei Gruppen unterteilen: die superiore Gruppe an der Grenze von Mittelhirn und Pons und die inferiore Gruppe zwischen caudaler Ponsregion und zervikalem Spinalmark.

Die superiore Gruppe bildet die beiden eigentlichen Raphekerne mit ihrem rostralen und caudalem Anteil.

Der dorsale Raphekern innerviert bevorzugt Cortex, Thalamus, Striatum und dopaminerge Kerne des Mittelhirns (Substantia nigra, ventrales Tegmentum).

Die Efferenzen des medianen Raphekerns ziehen zum Hippocampus, Septum und anderen limbischen Strukturen. Die Projektionsbahnen der caudalen Zellgruppe enden im Rückenmark (Dahlström et Fuxe, 1964), und zusammen mit Bahnen des rostralen Anteils im Cerebellum und Hirnstamm (Halliday et al., 1995). Diese Projektionen der Raphekerne haben derartige Ausmaße, dass fast jedes einzelne Nervenzelle des Gehirns unter Einfluss des serotonergen Systems steht, zudem finden sich auch noch diffuse Projektionen in nicht-neurales Gewebe, z.B. den Endothelzellen der Blutgefäße.

### Synthese und Abbau

Serotonin wird aus der Aminosäure Tryptophan synthetisiert (Abb.5). Nach der Decarboxylierung wird das Serotonin entlang des Axons zu den Synapsen transportiert. Dort wird es größtenteils carriervermittelt in Vesikeln gespeichert. Der Transport erfolgt über den gleichen VMAT, der auch für die Catecholamintransport in die Vesikel verantwortlich ist (Njus et al., 1986).

In geringen Mengen wird es im Zytoplasma der terminalen Nervenabschnitte akkumuliert und kann so direkt nach der Synthese freigesetzt werden. Die Entleerung der Vesikel erfolgt durch calciumabhängige Exozytose, bei der das davor proteingebundene Serotonin wieder abgespalten und freigesetzt wird.

Schließlich werden ca. 90 % des freigesetzten Serotonins durch einen  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase-Carrier aus dem synaptischen Spalt wieder aufgenommen und erneut in den Vesikeln gespeichert oder abgebaut.

Die Wiederaufnahme durch den Serotonintransporter (SERT) ist wiederum dem des catecholaminergen Transmissionssystem vergleichbar. Der SERT ist dabei ungefähr in 48 % der Aminosäuren dem NET und dem DAT homolog. Auch die Struktur ähnelt sich: er besteht aus 12 membrandurchspannenden Domänen, die durch intra- und extrazelluläre Schleifen verbunden sind.

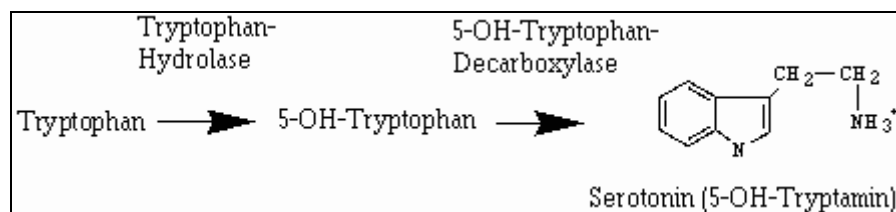


Abb.5: Biosynthese des Serotonins

Der Abbau des Serotonins erfolgt gleich den Catecholaminen durch Monoaminoxidasen. Dabei hat die in den serotonergen Nervenzellen synthetisierte mitochondriale MAO-B eine sehr viel niedrigere Affinität zu Serotonin als die MAO-A aus anderen Quellen. Demnach wird Serotonin hauptsächlich durch die Monoaminoxidase-A oxidiert, wohingegen die Monoaminoxidase-B die Aufgabe zu haben scheint, andere Amine, die als falsche Transmitter fungieren könnten, zu metabolisieren.

Der Serotoninspiegel im Gehirn kann auf verschiedene Weise beeinflusst werden: einerseits über verschiedene Medikamente und andererseits auch in gewissen Grenzen über die Tryptophanzufuhr.

### *Rezeptoren*

Heute werden aufgrund molekularbiologischer Techniken und neuer, selektiver Rezeptorantagonisten und –agonisten 7 5-HT–Rezeptortypen und 14 Rezeptor Subtypen unterschieden (Hoyer et al., 1994).

Davon gehören 13 Serotoninrezeptoren der Superfamilie der G–Protein–gekoppelten Rezeptoren an, nur der 5-HT<sub>3</sub>–Rezeptor wirkt als ligandengesteuerter Ionenkanal (ionotroper Rezeptor).

Die Rezeptoren der 5-HT<sub>1</sub>–Familie inhibieren die Adenylatcyclase. Sie sind sowohl postsynaptisch als auch präsynaptisch lokalisiert. Vom 5-HT<sub>1B</sub>– und 5-HT<sub>1D</sub>–Rezeptoren wird angenommen, dass es sich um speziesspezifische Varianten desselben Rezeptors handelt. Die Rezeptoren dieser Familie finden sich gehäuft in den Raphekernen, im Cortex und limbischen System.

Die Rezeptoren der 5-HT<sub>2</sub>–Familie haben die Aktivierung der Phospholipase C gemeinsam. Sie sind hauptsächlich im Cortex, aber auch in der Peripherie zu finden.

Der 5-HT<sub>3</sub>–Rezeptor ist in hohen Konzentrationen in peripheren Nervenganglien sowie in der Area postrema lokalisiert.

Die übrigen serotonergen Rezeptoren wirken in der Mehrzahl über die Aktivierung der Adenylatcyclase zentral und in der Peripherie.

### **2.1.5. Therapie und Versorgung**

Allgemein wird die Anwendung einer multimodalen Therapie empfohlen, d.h. der Einsatz von Medikamenten wird mit psychosozialen Maßnahmen (Psychoedukation und Psychotherapie) kombiniert, auch wenn Studien aus den USA zeigten, dass die Kombination von Methylphenidat plus psychosoziale Maßnahmen der alleinigen Behandlung mit Methylphenidat nicht überlegen war (Klein et al., 2004).

In der medikamentösen Therapie ist Methylphenidat aufgrund seiner erwiesenen Wirkung in zahlreichen unabhängigen Studien das Medikament erster Wahl. Nach derzeitigem Kenntnisstand kann Atomoxetin (Strattera®) als Medikament zweiter Wahl angesehen

werden. Alle anderen Wirkstoffe sollten nur angewendet wenn zuvor genannte Medikamente keine oder ausgeprägt unerwünschte Wirkung zeigen.

#### 2.1.5.1. Stimulantien

Zu den Psychostimulantien werden die Methylxanthine, besonders das Coffein, sowie das Amphetamin und seine Verwandten gezählt. Die amphetaminähnlichen Substanzen sind wie Dopamin, Noradrenalin und Adrenalin Abkömmlinge des Phenylethylamins, besitzen aber im Gegensatz zu diesen keine Catechol-Hydroxyl-Gruppen und sind daher relativ lipophil. Die Stoffe dieser Gruppe haben ihre Bedeutung in der Behandlung von Narkolepsie und hyperkinetischen Verhaltensstörungen sowie als Appetitzügler und „Designer-Drogen“.

Die Wirksamkeit der Stimulantientherapie ist vor allem für Methylphenidat, aber auch für Amphetamine und Pemolin, ein Psychostimulans vom Nicht-Amphetamintyp, in zahlreichen Studien bewiesen. Solange die Stimulantienmedikation erfolgt, vermindern sich Aufmerksamkeitsstörungen, Hyperaktivität, Impuls-Kontroll-Störungen und Aggressionen, darüber hinaus hält die symptomreduzierende Wirkung, wenn auch abgeschwächt, auch bei abgesetzter Medikation an (MTA Cooperative Group, 2004).

Erst bei nicht ausreichender Wirksamkeit von Methylphenidat empfiehlt sich die Gabe von d-l-Amphetamin.

#### Methylphenidat

##### *Stoff und Geschichte*

In den 30er Jahren des 20. Jahrhunderts wurde mit Amphetamin erstmals eine effektive medikamentöse Behandlung der ADHS möglich.

$\alpha$ -Methyl-Phenethylamin war ursprünglich von Lazar Edeleanu 1887 synthetisiert worden und wurde Mitte der 20er von Gordon Alles auf der Suche nach einem synthetischen Ersatz für Ephedrin wiederentdeckt. Es kam unter dem Handelsnamen Bensedrin auf den Markt (Weber, 2001).

1937 wurde es erstmals von Charles Bradley im US-amerikanischen Bundesstaat Rhode Island bei Kindern mit gestörter Aufmerksamkeit und motorischer Unruhe eingesetzt



(Bradley, 1937). Trotz des bemerkenswerten Erfolges warnte Bradley schon damals vor einem unkritischen Einsatz des Medikaments.

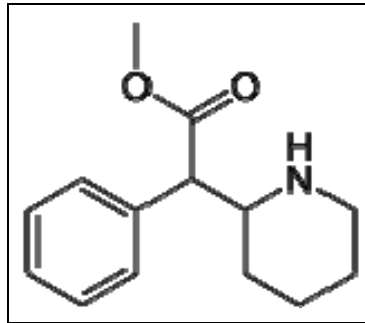


Abb.6: Strukturformel des Methylphenidats

1944 wurde von Leandro Panizzon in der Hoffnung auf ein zentral wirkendes Stimulans ohne die Nebenwirkungen und das Missbrauchspotential der Amphetamine das Stimulans Methylphenidat (Abb.6) synthetisiert. Der Produktname Ritalin® leitet sich von dem Vornamen seiner Ehefrau Marguerite (Rita) ab (Weber, 2001). Heute wird Methylphenidat von verschiedenen Herstellern und aufgrund der kurzen Halbwertszeit auch als Retardformulierung angeboten (Concerta®, Equasym®, Medikinet®).

### *Pharmakodynamik*

Der Dopamintransporter hat im Dopaminstoffwechsel eine Schlüsselrolle inne und seine Bedeutung in der Pathophysiologie des ADHS wurde mittels genetischer und bildgebender Verfahren in neuerer Zeit von verschiedenen Arbeitsgruppen beleuchtet. Bildgebende Verfahren haben gezeigt, dass Methylphenidat dosisabhängig den DAT im Striatum blockiert (Abb.7).

In diesen Studien konnte gezeigt werden, dass bei einer intravenösen Applikation 0,075 mg/kg Methylphenidat und bei oraler Zufuhr 0,25 mg/kg benötigt wurden, um 50 % der DAT zu blockieren (Volkow et al., 1998). Die bei der ADHS–Therapie verwendete übliche Dosis von 0,5 mg/kg blockiert somit mehr als die Hälfte der DAT. Dadurch wird die Wiederaufnahme in die Präsynapse gehemmt und die Dopaminkonzentration im synaptischen Spalt steigt.

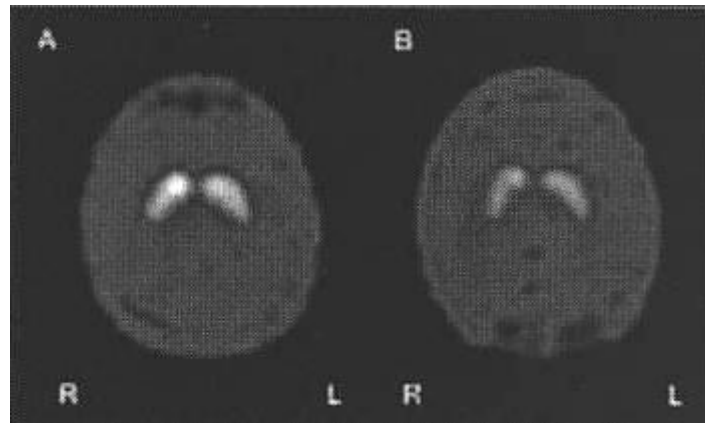


Abb.7: Darstellung der striatären Dopamintransporter im Tc-99m-Trodat-1-SPECT bei einem Erwachsenen mit ADHS (Dresel et al., 2000)

(A: erhöhte Dichte vor Therapiebeginn, B: deutlich reduzierte Dichte unter Einnahme von Methylphenidat)

Jedoch trägt nicht nur die DAT-Blockade, sondern auch eine gesteigerte nicht-exozytotische Dopaminfreisetzung zur Konzentrationserhöhung bei. Diese unterliegt individuellen Schwankungen in der neuronalen „firing rate“ und verschiedenen Umweltreizen und könnte somit für die inter- und intraindividuellen Unterschiede in der Wirkung des Methylphenidats eine Erklärung liefern (Pucak et Grace, 1994).

Dies scheinen jedoch noch nicht alle zugrunde liegenden Mechanismen zu sein, die den extrazellulären Catecholaminspiegel beeinflussen.

Amphetamine haben nicht nur eine inhibitorische Wirkung auf die Monoaminoxidasen, insbesondere für MAO-A, sondern beeinflussen zusätzlich die Dopaminsynthese durch Aktivierung der Tyrosin-Hydroxylase (Blaschko et al., 1937; Costa et al., 1972). Hinzu kommen die Fähigkeit, direkt Rezeptoren, die im Zusammenhang mit der endogenen Amphetamin-Synthese stehen, zu binden und direkte Einflüsse auf die DAT- und VMAT-Expression (Borowsky et al., 2001; Gulley et al., 2002).

### *Pharmakokinetik*

Nach intravenöser Verabreichung von [<sup>11</sup>C] Methylphenidat erfolgt die Aufnahme ins Gehirn rasch (die Maximalkonzentration wurde innerhalb von vier bis zehn Minuten erreicht) und in hohen Konzentrationen (7,5 % ± 1,5 %) (Volkow et al., 1995). Nach oraler Verabreichung wird Methylphenidat rasch und nahezu vollständig resorbiert. Aufgrund eines ausgeprägten

First Pass Metabolismus beträgt die systemische Verfügbarkeit jedoch nur 30 %. Maximale Plasmakonzentrationen werden nach durchschnittlich zwei Stunden erreicht. Die inter- und intraindividuellen Unterschiede sind groß. Es besteht keine Korrelation zwischen der maximalen Plasmakonzentration und der pharmakologischen Wirkung.

Bei Retardtabletten erfolgt die Absorption langsamer. Die Maximalkonzentration ist geringer und wird später erreicht.

Im Blut werden Methylphenidat und seine Metaboliten zwischen Plasma (57 %) und Erythrozyten (43 %) verteilt. Die Plasmaproteinbindung ist gering (10–33 %).

Methylphenidat wird rasch und in großem Umfang metabolisiert. Maximale Plasmakonzentrationen des entesterten Hauptmetaboliten  $\alpha$ -phenyl-2-Piperidinessigsäure werden etwa zwei Stunden nach Verabreichung von Methylphenidat erreicht. An hydroxylierten Metaboliten, wie z.B. Hydroxymethylphenidat oder Hydroxyritalinsäure sind nur geringe Mengen nachzuweisen. Für den therapeutischen Effekt scheint allein der unveränderte Wirkstoff verantwortlich zu sein.

Methylphenidat wird mit einer mittleren Halbwertszeit von 2 Stunden aus dem Plasma eliminiert und die systemische Clearance beträgt durchschnittlich 10 l/h/kg nach einer oralen Dosis und 0,565 l/h/kg nach einer intravenösen Gabe. Nach oraler Gabe werden innerhalb von 48–96 Stunden 78–97 % der Dosis im Urin und 1–3 % in den Fäzes in Form von Metaboliten, der größte Teil (60–86 %) als  $\alpha$ -phenyl-2-Piperidinessigsäure, ausgeschieden (Novartis Pharma, 2006).

#### *Kontraindikationen, Interaktionen und Nebenwirkungen*

Sehr häufige ( $>1/10$ ) und häufige ( $>1/100$ ) unerwünschte Wirkungen sind Nervosität und Schlaflosigkeit, vor allem am Anfang der Behandlung, sowie Kopfschmerzen, Schläfrigkeit, Schwindel und Dyskinesie. Am Herzen können indirekt sympathomimetische Wirkungen wie Tachykardie, Palpitationen, Arrhythmien, Veränderungen von Blutdruck und Herzfrequenz festgestellt werden. Es können Bauchschmerzen, Übelkeit, Erbrechen, Mundtrockenheit und Appetitmangel auftreten, in der Regel jedoch vorübergehend.

Beim Lenken von Fahrzeugen oder Bedienen von Maschinen sowie weiteren potentiell gefährlichen Aktivitäten ist Vorsicht geboten (Novartis Pharma, 2006).

Eine mäßige und meist vorübergehende Verlangsamung des Körperwachstums ist zu erwarten (Spencer et al., 1996). Substanzmissbrauch oder ein erhöhtes Suchtrisiko im Erwachsenenalter nach der Behandlung von Kindern mit Methylphenidat konnte nicht belegt

werden (Faraone et Wilens, 2003). Auch gibt es keine klinischen Hinweise, dass eine Medikation mit Methylphenidat eine erhöhte Vulnerabilität für Morbus Parkinson zur Folge hat (Gerlach et al., 2003).

### *Dosierung*

Die Dosierung ist individuell zu bestimmen. Die Wirkung von Methylphenidat tritt nach etwa einer halben Stunde ein und hält etwa vier Stunden an. Die tägliche Dosis bei Schulkindern liegt zwischen 0,3–1 mg/kg Körpergewicht pro Tag und verteilt sich auf ein bis drei Einzeldosen. Die Einstiegsdosis liegt meist bei 5 mg/Tag. Die Zeitpunkte der Medikation richten sich nach den kritischen Tagesanforderungen, z.B. Schulaufgaben, unter bestimmten Bedingungen können auch Therapiepausen angezeigt sein.

Die gesetzlich festgelegte Höchstdosis von 60 mg/Tag bzw. 1 mg/kgKG/Tag darf nicht überschritten werden. Diese Festlegung wird jedoch nicht durch wissenschaftliche Untersuchungen gestützt, fest steht nur, dass eine höhere Tagesdosis auch das Risiko unerwünschter Wirkungen steigert. Bei Retardformen reicht eine einmalige morgendliche Gabe, deren Wirkung zwischen acht und zwölf Stunden andauert. Die wesentlich teurere Retardmedikation wird genutzt, wenn eine verlässliche Gabe der schnell freisetzenden Präparate nicht möglich ist. Dabei muss jedoch von einer etwas höheren Tagesdosis ausgegangen werden. Die Medikation sollte mindestens über den Zeitraum eines Jahres fortgesetzt und mindestens jährlich überprüft werden.

#### 2.1.5.2. Nicht–Stimulantien (trizyklische und nicht–trizyklische Antidepressiva)

Gemeinsames Merkmal ist die stimmungsaufhellende Wirkung, die primär durch eine Hemmung der neuronalen Wiederaufnahme der Monoamine Noradrenalin und/ oder Serotonin zustande kommt. Dadurch wird die noradrenerge oder serotonerge synaptische Übertragung verstärkt. Allerdings scheint die antidepressive Wirksamkeit, die erst nach ca. zwei Wochen einsetzt, auf den neurochemischen Folgewirkungen, insbesondere der Rezeptor Down Regulation, zu beruhen.

Zu den trizyklischen Antidepressiva gehören die nicht–selektiven Monoamin–wiederaufnahmehemmer mit ihrem siebengliedrigem mittleren Ring, wie z.B. Imipramin, Clomipramin etc. Auch die trizyklischen Antidepressiva haben sich in der Behandlung der ADHS gegenüber Placebo als wirksamer erwiesen.

Den nicht-trizyklischen Antidepressiva werden die selektiven Serotoninwiederaufnahmehemmer, die selektiven Noradrenalinwiederaufnahmehemmer und der selektive Serotonin-/Noradrenalinwiederaufnahmehemmer Venlafaxin zugerechnet. Das neuerdings eingesetzte Atomoxetin, ein Noradrenalinwiederaufnahmehemmer, ist nach Methylphenidat und Amphetamin die am besten untersuchte Substanz mit guter Evidenzlage.

### Atomoxetin

#### *Stoff und Geschichte*

Atomoxetin ist eine Entwicklung des Pharmaunternehmens Eli Lilly. Atomoxetin war ursprünglich unter dem Namen Tomoxetin bekannt. Um Verwechslungen mit dem Stoff Tamoxifen zu vermeiden wurde es schließlich in Atomoxetin umbenannt (Abb.8).

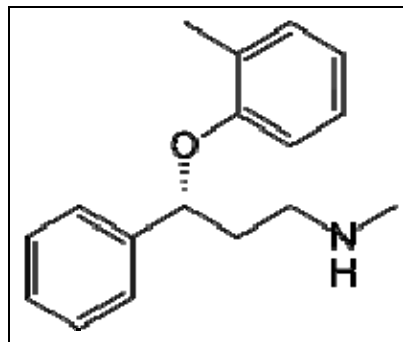


Abb.8: Strukturformel des Atomoxetins

Tomoxetin wurde erstmals in den 1980ern von Lilly zur Behandlung von Depressionen erforscht. Trotz guter Ergebnisse in klinischen Studien wurde die Entwicklung bezüglich dieser Indikation ca. 1990 gestoppt. 1996 jedoch wurden die präklinische Studien, diesmal mit der Indikation einer möglichen Therapie der ADHS wieder aufgenommen (Preti, 2002).

Im November 2002 wurde von der Food and Drug Administration Atomoxetin unter dem Markennamen Strattera® für die Behandlung von Kindern ab sechs Jahren, Jugendlichen und Erwachsenen in den USA zugelassen. Es war damit in Amerika das erste zugelassene Medikament gegen ADHS, das nicht unter das US-amerikanische Betäubungsmittelgesetz fiel.

Seit Dezember 2004 ist auch in Deutschland Atomoxetin zur Behandlung der ADHS bei Kindern und Jugendlichen über sechs Jahren zugelassen. Seit März 2005 ist es als Strattera® in deutschen Apotheken verfügbar.

### *Pharmakodynamik*

Atomoxetin wirkt über eine hochselektive Hemmung des präsynaptischen Noradrenalintransporters, was zur Erhöhung der NoradrenalinKonzentration im synaptischen Spalt führt. Die Affinität zu anderen neuronalen Transportern und Rezeptoren ist gering (Abb.9).

Atomoxetin erhöhte bei intraperitonealer Gabe bei Ratten den extrazellulären Noradrenalin Spiegel im präfrontalen und okzipitalen Cortex sowie im lateralem Hypothalamus, dorsalem Hippocampus und im Cerebellum, woraus man schlussfolgern kann, dass diese Wirkung das gesamte Gehirn betrifft (Swanson et al., 2006).

Im präfrontalen Cortex wird zudem der extrazelluläre Dopaminspiegel erhöht, da dort aufgrund fehlender Dopamintransporter auch Dopamin über den Noradrenalintransporter wieder aufgenommen wird (Swanson et al., 2006).

	<b>NAT</b>	<b>DAT</b>	<b>SERT</b>
<b>Atomoxetin</b>	5	1451	77
<b>Methylphenidat</b>	339	34	>1000

Abb.9: Atomoxetin: Affinitäten zu Monoamintransportern im Vergleich zu Methylphenidat ( $K_i$ -Wert), ein niedriger  $K_i$ -Wert weist auf höhere Affinität hin (nach Bymaster et al., 2002)

### *Pharmakokinetik*

Die Bioverfügbarkeit nach oraler Aufnahme beträgt normalerweise 63 %. Atomoxetin wird schnell resorbiert und erreicht seine maximale Plasmakonzentration nach etwa anderthalb Stunden (Farid et al., 1985). Sehr fetthaltige Mahlzeiten verzögern das Erreichen des Maximalwerts um bis zu drei Stunden und verringern die Absorptionsrate um bis zu 37 %. Atomoxetin ist zu 98 % an Plasmaproteine, v.a. Albumin, gebunden. Die Plasmahalbwertszeit beträgt vier bis fünf Stunden. Der Abbau zum wirksamen Hauptmetaboliten 4-Hydroxyatomoxetin erfolgt durch Oxidation durch das Cytochrom P450 2D6 (CYP2D6) in

der Leber. Ein Teil der Bevölkerung verstoffwechselt Arzneimittel, die über dieses Isoenzym abgebaut werden, besonders langsam („poor metabolizer“). Bei diesen Patienten kann es zu bis zu fünffach erhöhten Plasmaspitzenkonzentration und auf 24 Stunden verlängerten Halbwertszeit kommen (Sauer et al., 2003).

Die Ausscheidung erfolgt primär als 4-Hydroxyatomoxetin-O-Glucuronid über die Niere (>80 %) und zu einem geringen Teil auch über die Fäzes.

#### *Kontraindikationen, Interaktionen und Nebenwirkungen*

Durch die indirekt sympathomimetische Wirkung ist Vorsicht bei Patienten mit Bluthochdruck, Tachykardie oder anderen kardiovaskulären Erkrankungen angebracht (Becker et Wehmeier, 2003).

Wechselwirkungen bestehen zu CYP2D6-Inhibitoren. Wegen der möglichen Plasmakonzentrationserhöhung des Atomoxetin kann eine Dosisreduktion erforderlich sein. Die häufigsten unerwünschten Arzneimittelwirkungen sind Kopf- und Bauchschmerzen, Appetitminderung, Übelkeit, Erbrechen und Müdigkeit. Die FDA, Center for Drug Evaluation and Research, warnte vor schweren Leberschädigungen, nachdem diese bei zwei Patienten aufgetreten waren. Des Weiteren sind mit Atomoxetin behandelte Kinder sorgfältig daraufhin zu beobachten, ob sich ihr Verhalten zu suizidbezogenen Handlungen oder verstärkter Feindseligkeit hin verändert.

#### *Dosierung*

Die Dosierung richtet sich nach dem Körpergewicht und wird in der Regel als morgendliche Einmaldosis verabreicht. Bei Kindern und Jugendlichen bis 70 kg Körpergewicht beträgt die Anfangsdosis 0,5 mg Atomoxetin pro kg Körpergewicht. Nach einer Woche wird die Medikation auf die Erhaltungsdosis von 1,2 mg/kg Körpergewicht pro Tag gesteigert. Bei Jugendlichen mit einem Körpergewicht über 70 kg wird mit 40 mg Atomoxetin begonnen und die Dosis ebenfalls nach einer Woche auf 80 mg pro Tag erhöht (Lilly, 2006).

Wenn Patienten unter der Medikation über unerwünschte Wirkungen klagen, sollte entweder die Anfangsdosis länger beibehalten werden, ein zusätzlicher Zwischenschritt vor Erhöhung auf die Zieldosis eingeführt werden oder die Tagesdosis zumindest vorübergehend auf zweimal täglich verteilt werden (Greenhill et al., 2007). Mit dem Wirkungseintritt ist nach etwa einer Woche zu rechnen, eine Entfaltung der vollen Wirkung ist nach vier bis sechs

Wochen zu erwarten (Michelson et al., 2002). Eine Medikamentenpause („drug holiday“) ist nicht sinnvoll.

### 2.1.5.3. Verordnungszahlen

Seit über 50 Jahren werden Amphetaminderivate wie Methylphenidat als Medikamente der ersten Wahl zur Behandlung der ADHS eingesetzt. Seitdem war ein stetiger Anstieg des Verordnungsvolumens zu verzeichnen, der vor allem in den letzten Jahren noch deutlich zugenommen hat. Betrug im Jahr 1995 in Deutschland die Zahl der definierten Tagesdosen (DDD) noch 1,3 Mio., so stieg sie bis zum Jahr 2005 kontinuierlich auf 32,6 Mio. an. Allein gegenüber dem Jahr 2004 war eine Änderung um +26,3 % zu verzeichnen (Lohse et al., 2006).

Trotz überzeugender Studien darüber, dass Psychopharmaka lange Zeit unterverordnet wurden (Elliger et al., 1990), stellt sich nun die Frage einer möglichen „Überversorgung“.

Die Tatsache, dass 30 % der Verschreibungen von nur 66 Ärzten in so genannten „Schwerpunktpraxen“ getätigt werden und ein Großteil von diesen keine spezialisierten Kinder- und Jugendärzte/-psychiater sind, spricht des Weiteren dafür (Fegert et al., 2002).

Seit März 2005 ist Atomoxetin zur Behandlung der ADHS in Deutschland erhältlich. Trotz der Warnung vor suizidbezogenen Handlungen unter der Einnahme von Atomoxetin und der hohen Therapiekosten wurde es als Strattera® bereits im Jahr seiner Markteinführung so häufig verordnet (1,3 Mio. DDD), dass es unter den 3000 führenden Arzneimitteln vertreten ist. Es gibt keinen Grund anzunehmen, dass die Verordnungen des –im Gegensatz zum Methylphenidat– nicht betäubungsmittelrezeptpflichtigen Atomoxetins nicht in gleichem, wenn nicht noch höherem Maße als Methylphenidat ansteigen werden.

### 2.1.6. Stand der Forschung

Die Entwicklung von Stimulanzienmissbrauch und –abhängigkeit unter der Methylphenidattherapie ist eine weit verbreitete Befürchtung. Katamnestiche Befunde sprechen aber dafür, dass Kinder mit ADHS, die mit Stimulanzien behandelt wurden, später und weniger zu Tabak- und Alkoholkonsum und Konsum illegaler Drogen neigen als Kinder, deren ADHS-Erkrankung erst retrospektiv im Erwachsenenalter diagnostiziert wurde (Bundesärztekammer, 2005).



Allerdings erhöht die regelmäßige Einnahme von Substanzen mit Suchtpotential in der Periadoleszenz die Gefahr späteren Drogenmissbrauchs signifikant (Stacy et al., 1999). Dass Methylphenidat Suchtpotential hat, zeigt eine Studie aus den USA, der zufolge 3 % von 2250 befragten Studenten Methylphenidat missbräuchlich einnahmen (Teter et al., 2003).

Es konnte auch tierexperimentell gezeigt werden, dass eine wiederholte Methylphenidatgabe bei jungen und gesunden Ratten zu einer gesteigerten Cocainaufnahme im Erwachsenenalter führte (Torres–Reveron et al., 2005).

Auch die Veränderung weiterer zentraler Neurotransmissionsmechanismen und damit Verhaltensänderungen kann nicht ausgeschlossen werden.

Tierexperimentelle Untersuchungen, hauptsächlich mit Labornagern, weisen darauf hin, dass eine dauerhafte Stimulantiengabe zu einer Sensitivierung des Verhaltens und psychomotorischen Effekten führt. Dabei ist das Alter des Tieres zum Zeitpunkt der Medikamentengabe maßgeblich für Auftreten und Ausmaß dieser Folgen (Heyser et al., 2004). Auch ist die Dosis–Wirkungs–Beziehung stark abhängig vom gewählten Rattenstamm, was in Untersuchungen der lokomotorischen Aktivität von Spontan–Hypertensiven Ratten, Wistar–Kyoto– und Sprague–Dawley–Ratten gezeigt werden konnte (Amini et al., 2004). Zudem zeigten Untersuchungen an Ratten, dass die Effekte von Methylphenidat vom Gesundheitszustand der Tiere abhängen können: Während akute Gabe von MPH bei Tieren mit psychomotorischen Beeinträchtigungen die motorische Koordination verbesserte, hatte Methylphenidat bei Kontrolltieren keine Wirkung oder führte zu einer Verschlechterung der motorischen Koordination (Grund et al., 2006).

In nur sehr wenigen tierexperimentellen Studien wurden die Auswirkungen einer chronischen Methylphenidatbehandlung in der Periadoleszenz auf das Verhalten erwachsener Ratten untersucht und auch hier variiert die Versuchsdurchführung, z.B. in der Art und Dauer der Applikation, Tieralter während der Applikation und Dosis, noch enorm:

Brandon und Mitarbeiter stellten bei männlichen Sprague–Dawley–Ratten, die mit 35 Tagen eine Woche lang 2,0 mg/kg Methylphenidat intraperitoneal erhielten, eine vermehrte Selbstverabreichung von Cocain im Erwachsenenalter fest (Brandon et al., 2001).

Bolanos und Mitarbeiter stellten bei erwachsenen männlichen SD–Ratten, denen im Alter von 20–35 Tagen Methylphenidat (2,0 mg/kg) intraperitoneal injiziert wurde, eine erhöhte

Sensibilität in Stresssituationen, ein vermehrt angstbezogenes Verhalten und einen gestiegenen Corticosteronplasmaspiegel fest (Bolanos et al., 2003).

Die Arbeitsgruppe um Carlezon verabreichte männlichen Sprague–Dawley–Ratten vom 20.–35. Lebenstag zweimal täglich intraperitoneal 2,0 mg/kg Methylphenidat und bemerkte bei den erwachsenen Tieren eine verminderte Sensitivität gegenüber Cocain sowie vermehrt depressionsähnliches Verhalten und verminderte Habituation (Carlezon jr. et al., 2003).

Leblanc–Duchin und Taukulis, die acht Wochen alten weiblichen Long–Evans–Ratten vier Wochen lang 10 mg/kg Methylphenidat per os verabreichten, beobachteten bei den erwachsenen Tieren vermehrte Angst und Verteidigungsbereitschaft (Leblanc–Duchin et Taukulis, 2004).

Die Arbeitsgruppe um Adriani zeigte bei den in der Periadoleszenz vorbehandelten erwachsenen Wistar–Ratten eine Steigerung der Impulsivität auf (Adriani et al., 2006).

Trotz der unterschiedlichen Versuchsdurchführung gibt es also Hinweise, dass eine Verabreichung von Methylphenidat in der Periadoleszenz zu Verhaltensänderungen bei erwachsenen Tieren führt.

Aber es wird auch die Forderung nach einer Anpassung der Dosis und Applikationsart entsprechend des Einsatzes bei den behandelten Kindern laut, um die tierexperimentellen Ergebnisse angemessener beurteilen zu können (Andersen, 2005).

Aufgrund der verhältnismäßig kurzen Anwendungszeit seit der Zulassung im März 2005 gibt es auch für Atomoxetin noch keine klinischen Untersuchungen zu den Langzeitwirkungen.

Bei Ratten soll es jedoch keinen Anstieg der Dopaminkonzentration im Nucleus accumbens, einer Hirnregion, die mit einer Suchtentwicklung in Verbindung gebracht wird, bewirken (Bymaster et al., 2002). Auch scheint nach einer Studie mit 16 Freiwilligen in einem Doppelblind–Design ein Missbrauchspotential unwahrscheinlich (Heil et al., 2002).

Jedoch kann das vermehrte Auftreten von suizidbezogenen Handlungen oder verstärkter Feindseligkeit unter Atomoxetingabe durchaus auf langfristige psychosoziale Störungen hindeuten.

Hilakivi wies bei adoleszenten Ratten, denen ein nichtselektiver Monoamin–wiederaufnahmehemmer mit jedoch einer deutlichen Präferenz zum Noradrenalintransporter (Desipramin) gegeben wurden, depressionsähnliches Verhalten gekennzeichnet durch längere Immobilität im Porsolt–Test nach (Hilakivi et al., 1988). Die Gabe von Desipramin in der frühen postnatalen Phase führte außerdem zu einer langanhaltenden und noch im

Erwachsenenalter vorhandenen Steigerung des Dopamin- und Serotoninmetabolismus (Hilakivi et al., 1995).

Da sowohl Desipramin als auch Atomoxetin den Noradrenalintransporter hemmen, ist eine langfristige Verhaltensänderung nach Atomoxetintherapie nicht auszuschließen.

## **2.2. DAS VERHALTEN**

### **2.2.1. Definition**

Verhalten ist die organismische Interaktion mit der Umwelt auf der Grundlage eines Informationswechsels im Dienst der individuellen, ökologischen und inklusiven Fitness (Tembrock, 1987).

Das Verhalten eines Tieres umfasst all seine äußerlich wahrnehmbaren Bewegungen, Körperhaltungen, Lautäußerungen, Farbänderungen und Absonderungen von Duftstoffen. Zusammengesetzt wird das Verhalten aus ererbten und erlernten Erfahrungen.

### **2.2.2. Verhaltensforschung und tierexperimentelle Verhaltenstests**

Die Geschichte der Verhaltensforschung sowie der sie bezeichnenden Begriffe ist von verschiedenen naturwissenschaftlichen und philosophischen Ansätzen geprägt.

Die moderne Verhaltensforschung lässt sich jedoch grob durch zwei verschiedene Herangehensweisen charakterisieren:

Die Ethologie in Europa bedient sich der Beobachtung des Tierverhaltens in freier Wildbahn bzw. unter natürlichen Bedingungen und hat zum Ziel, Ursache, Eignung, Entwicklung und Evolution des Verhaltens zu erfassen.

Die vergleichende Psychologie („comparative psychology“) in Amerika zeichnet sich durch die Beobachtung im Labor unter kontrollierten Bedingungen aus und legt besonderen Schwerpunkt auf das Lernverhalten, wobei die Labormaus wichtigstes Untersuchungsobjekt ist.

Ein Verhaltenstest ist ein ethologischer Funktionstest, bei dem das Verhalten als Hinweis für funktionelle Störungen genutzt wird (Güttner, 1993). Da der Entstehungsort von Verhaltensweisen das Nervensystem ist, kann eine Untersuchung des Verhaltens gleichzeitig

Aufschluss über neuronale Funktionen, Aktivitäten und Systeme geben (Kolb et Wishaw, 1985). Somit sind Verhaltenstests essentiell bei der Untersuchung neurobiologischer Mechanismen bzw. Dysfunktionen, bei der Charakterisierung von Tiermodellen und bei der Beurteilung der Auswirkungen pharmakologischer Behandlungen (Ohl et al., 2001). Wichtige Verhaltensparameter sind die lokomotorische Aktivität (Broadhurst, 1957), die Motivation (Ohl et al., 2001), das Angst- (Ohl et al., 2001), Explorations- (File et Wardill, 1975) und Sozialverhalten (File et Hyde, 1977), sowie die visuell-räumliche Orientierung (Ohl et Fuchs, 1998).

Wichtig für die sinnvolle Auswertung eines Verhaltenstests ist eine möglichst geringe Beeinträchtigung des Wohlbefindens der Tiere.

Auch der Kontakt zwischen Mensch und Tier ist sehr wichtig und kann die Testergebnisse beeinflussen. In einer Versuchssituation soll unnötiger Stress durch den Kontakt mit dem Menschen möglichst vermieden werden. Deshalb wird gefordert, die Tiere an den Menschen und seine Eingriffe zu gewöhnen (Claasen, 1994).

Eine objektive Analyse muss durch testspezifische Parameter, ausreichende Erfahrung des Untersuchers und Kenntnisse der jeweiligen Tierspezies gesichert werden. Trotzdem ist der subjektive Einfluss des Untersuchers nicht sicher auszuschalten. Der Einsatz automatisierbarer Aufzeichnungsgeräte und digitale Auswertung erhöht die Objektivität. Der Test muss einfach durchzuführen und auszuwerten und vor allem reproduzierbar sein. Die Bildung einer Kontrollgruppe, d.h. Tiere gleichen Alters und Geschlechts, die identisch gehalten und bis auf die zu prüfende Substanz oder speziellen Eingriff identisch behandelt werden, ist notwendig, um den Einfluss eines Medikaments oder sonstiger Manipulationen zu verdeutlichen.

Im Folgenden sollen kurz etablierte und gebräuchliche Verhaltenstests bei Ratten aufgezählt werden. Die Unterteilung in emotional, kognitiv und motorisch beschreibt den Schwerpunkt, auf den der jeweilige Versuch abzielt, jedoch gibt es in fast jedem Versuch Überschneidungsbereiche.

### 2.2.2.1. Verhaltenstests zur Untersuchung neurologisch–motorischer Fähigkeiten

<b>Beam Balance</b> (Combs et D'Alecy, 1987))	Die Ratte muss auf einem 1,5 cm breiten Balken balancieren.
<b>Beam Walking</b> (Feeney et al., 1982)	Die Ratte läuft eine festgelegte Strecke auf einem 2,5 cm breiten Balken.
<b>Chimney Test</b> (Boissier et al., 1960)	Die Ratte muss nach Hineinklettern in eine enge, waagerechte Röhre, nach vertikalem Aufstellen aus dieser rückwärts hinausklettern.
<b>Prehensile Traction</b> (Combs et D'Alecy, 1987)	Die Ratte wird mit den Vorderpfoten an ein horizontal gespanntes Seil gehängt; alternativ kann die Ratte an ein rechtwinkliges Podest gehängt werden, auf das sie sich hinaufziehen muss (Müller, 2004).
<b>Screen Test</b> (Combs et D'Alecy, 1987)	Die Ratte wird auf ein horizontales Drahtgitter gesetzt (0°), das zuerst in eine vertikale (90°) und dann in die umgekehrt horizontale Position (180°) gedreht wird.
<b>Rota Rod</b> (Hamm et al., 1994)	Die Ratte wird auf eine sich drehende und sich kontinuierlich beschleunigende Walze gesetzt.

### 2.2.2.2. Verhaltenstests zur Untersuchung emotionaler Aspekte

<b>Elevated Plus Maze</b> (Handley et Mithani, 1984)	Die Ratte wird auf das Zentrum eines erhöhten rechtwinkligen Kreuzes mit zwei „offenen“ und zwei „geschlossenen“ (umrandeten) Armen verbracht.
<b>Hole Board</b> (Boissier et Simon, 1962)	Die Ratte kommt in eine Box mit einer gleichmäßig durchlöcherten Grundfläche; (alternativ an zwei Folgetagen zur Untersuchung neurokognitiver Fähigkeiten).

<p><b>Free Exploratory Paradigm</b> (Anderson, 1938)/</p> <p><b>Home Emergence Test</b> (Williams et Wells, 1970)</p>	<p>Den Tieren wird die Möglichkeit geboten, sich frei aus dem Heimkäfig fortzubewegen (auch an zwei Folgetagen zur Untersuchung neurokognitiver Fähigkeiten); der Heimkäfig wird aus dem Regal gezogen und geöffnet und der Zeitraum gemessen bis die Ratte mit der Pfote und/oder der Nase an den Käfigrand kommt.</p>
<p><b>Open Field</b> (Hall, 1934)</p>	<p>Das Tier wird in eine hell ausgeleuchtete umrandete quadratische ebene Fläche gesetzt.</p>
<p><b>Social Interaction</b> (File et Hyde, 1977)</p>	<p>Modifiziertes Open Field: Ein fremdes in Größe und Geschlecht entsprechendes Tier wird mit hinzu gesetzt.</p>

### 2.2.2.3. Verhaltenstests zur Untersuchung neurokognitiver Fähigkeiten

<p><b>Morris Water Maze</b> (Morris et al., 1982)</p>	<p>Die Ratte muss in einem Schwimmbecken eine verborgene durchsichtige Zielplattform finden.</p>
<p><b>Radial Arm Maze</b> (Olton et Samuelson, 1976)</p>	<p>In bestimmten Armen eines sternförmig angeordneten Labyrinths ist Futter versteckt.</p>
<p><b>3-Door-Runway</b> (Furuya et al., 1988)</p>	<p>Die Ratte muss einen viergeteilten Versuchsgang mit offenen und geschlossenen Türen durchlaufen.</p>

### **2.2.3. Die Ratte als Tiermodell**

Heutzutage ist die Ratte nach der Maus das am häufigsten verwendete Versuchstier, zusammen machen Ratten und Mäuse über 80 % der Gesamtversuchstieranzahl aus (Deutscher Bundestag, 2007).

Aufgrund ihrer geringen Körpergröße, Sauberkeit, relativen Kostengünstigkeit, einfachen Handhabung und Haltung, weiten Verfügbarkeit sowie kurzer Gestationsperioden und

Lebenszeit bietet die Ratte als Versuchsobjekt viele Vorteile, besonders wenn hohe Tierzahlen gefragt sind oder Entwicklungsstadien betrachtet werden sollen.

Der Nachteil besteht darin, dass es schwieriger ist Parallelen zwischen der Physiologie und Verhalten von Nagern und Menschen zu ziehen als zwischen nicht-menschlichen Primaten und Menschen.

Jedoch wäre die Anwendung von Tierversuchen weder ethisch noch wirtschaftlich gerechtfertigt, wenn Tierversuche nicht Vorhersagen über erwünschte und unerwünschte Wirkungen des betreffenden Wirkstoffs beim Menschen ermöglichen würde. Diese Übertragbarkeit ist durch retrospektive Vergleiche der tierexperimentellen Daten und den Wirkungen des jeweiligen Arzneimittels beim Menschen nach Einführung der Substanzen in zahlreichen Untersuchungen nachgewiesen worden.

Die heute verwendeten Laborratten sind fast ausschließlich Nachfahren der Wanderratte (*Rattus norvegicus*), welche Anfang des 18. Jahrhunderts über die norwegische Habinsel nach Westeuropa und Anfang des 19. Jahrhunderts über private Zuchten („rat baiting“) in die Laboratorien gelangte. Erste systematische Züchtung der Ratte für wissenschaftliche Zwecke erfolgte Anfang des 20. Jahrhunderts. 1906 brachte Donaldson weiße Ratten europäischen Ursprungs von Chicago zum Wistar-Institut in Philadelphia, die den Grundstock dieses Stamms bildeten (Castle, 1947).

Die Wistar-Ratte zählt zusammen mit der Sprague-Dawley (SD)-Ratte zu den am häufigsten genutzten Rattenstämmen.

Es gibt wenig Nachweise über die genaue Herkunft der Sprague-Dawley-Ratten. Es wird angenommen, dass Robert W. Dawley zu Beginn eine außergewöhnlich große männliche Ratte unbekanntem Ursprungs mit einer weißen Ratte (vermutlich aus der Wistar-Kolonie) und deren weiblichen Nachkommen der nächsten sieben Generationen verpaarte. Er selektierte auf hohe Laktation, schnelles Wachstum, hohe Vitalität, ausgeglichenes Temperament sowie hohe Arsenresistenz. Inzwischen gibt es zahlreiche Sublinien und verschiedene Anbieter, die die SD-Ratten verkaufen.

In Deutschland begann 1957 das Institut für Versuchstierzucht in Hannover mit der Zucht von Ratten und Mäusen (Weiss et al., 1996). Mittlerweile gibt es mehr als 400 genetisch definierte Inzucht und circa 50 Auszuchtstämme der Laborratte (Havenaar et al., 1995).

Je nach Rattenstamm zeigen bestimmte Behandlungen unterschiedliche Auswirkungen. Wenn Ratten in Versuchen mit definierten Fragestellungen genutzt werden sollen, ist die Wahl des bestgeeigneten Stamms notwendig. Harrington und Mitarbeiter veröffentlichten

Standarddaten aus dem Verhalten, Lernfähigkeit und physiologischen Eigenschaften von zahlreichen In- und Auszuchtstämmen (Harrington, 1981).

#### **2.2.4. Das Angst- und Explorationsverhalten**

Laborratten haben im Vergleich zu Wildratten einen noch ausgeprägteren Erkundungsdrang (Persch, 1994). Dieser wird vor allem durch neue Reize und eine starke innere Motivation ausgelöst.

Um den 10. Lebenstag herum zeigen Rattenjungen ein den der adulten Tiere gleichendes Schnüffeln, das ab dem 15. Lebenstag in die systematische mit Lokomotion einhergehende Exploration der unbelebten Umwelt und wenige Tage später der der Artgenossen übergeht. Zwischen dem 23. bis 25. Lebenstag zeigt sich erstmals eine aufrechte Erkundungshaltung (Bolles et Woods, 1964). Dieses so genannte Rearing ist Ausdruck eines ungerichteten Explorationsverhaltens. Das Explorationsverhalten steigt bis zum ersten Lebensmonat steil an um danach nach einem leichten Abfall auf einem hohen Niveau zu stagnieren.

Werden Ratten in eine ihnen unbekannte Umgebung verbracht, zeigen sie ein abwechselnd mit Lokomotion und Aufrichten einhergehendes Erkundungsverhalten und ziehen sich baldmöglichst an einen relativ geschützten Ort („home base“) zurück, von dem sie weitere sich wiederholende Erkundigungen der neuen Umgebung vornehmen (Eilam et Golani, 1989). Dabei kann beobachtet werden, dass sich die Tiere bevorzugt in der Nähe bzw. unmittelbaren Kontakt von Wänden und anderen vertikalen, Schutz bietenden Raumstrukturen bewegen (Thigmotaxis). Aktives Explorationsverhalten geht für das Tier immer mit einem potentiellen Risiko einher und kann somit auch als Merkmal verminderter Angst gewertet werden (Townsend, 1997).

Die Ratte markiert dabei bestimmte Orte und Wege und da sie keine speziellen Duftdrüsen besitzt, markiert sie mit Kot und Urin.

Angst äußert sich bei Nagetieren in verschiedenen Verhaltensweisen. Angst soll Kräfte und Energien freisetzen, die durch Angriffs- oder Fluchtreaktionen unter Umständen das Überleben gewährleisten (Flossendorf 1988). Andererseits kann Angst auch zu Handlungsunfähigkeit wie der Schreckstarre („freezing“) führen, wobei sich auch dieses Verhalten als lebensrettend erweisen kann. Es wurde beobachtet, dass Ratten vor einer potentiellen Gefahr nur flüchten, wenn eine sichere Rückzugsmöglichkeit besteht und ohne geeignete Fluchtmöglichkeit in Erstarrung verfallen (Bronstein et Hirsch, 1976).



In der Ethologie wurde der Anstieg der Kot- und Urinabsatzrate traditionell als Zeichen für angstbezogenes Verhalten gewertet (Hall, 1934; Broadhurst, 1957). Dieser Zusammenhang wird mittlerweile jedoch von einigen Autoren (Archer, 1973; Berton et al., 1997) in Frage gestellt. Auch das heftige Putzen von Gesicht und Fell („grooming“) kann als Anzeichen innerer Unruhe gewertet werden (O’Kelly, 1940). Jedoch stellt es nicht selten ein Übersprungsverhalten in Konfliktsituationen dar und kann somit nicht als eindeutiges Zeichen von Angst gewertet werden (Saibaba et al., 1996). Weitere Untersuchungen zeigten, dass auch Vokalisationen als Ausdruck von Angst zu sehen sind (Jahr, 1990).

### 3. Eigene Untersuchungen

#### 3.1. ZIELVORSTELLUNGEN, WISSENSCHAFTLICHE NOVITÄT UND PRAKTISCHE BEDEUTUNG

Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, die Langzeitfolgen einer wiederholten Methylphenidat- und Atomoxetingabe in der Periadoleszenz durch Untersuchungen verschiedener Aspekte des Tierverhaltens im frühen Erwachsenenalter abzuklären. Dabei wird besonderer Wert darauf gelegt, die Applikationsart und Dosierung der Medikamente sowie das Entwicklungsalter der Ratten weitestgehend der Situation der betroffenen Kinder anzupassen.

Ein direkter Vergleich von Atomoxetin und Methylphenidat unter identischen Testbedingungen in dieser Fragestellung wurde noch nicht durchgeführt. Für sowohl Atomoxetin als auch Methylphenidat gibt es keine Ergebnisse über die Langzeitwirkungen in den Fällen, in denen gesunde Kinder aufgrund falsch-positiver Diagnosen medikamentös behandelt werden.

Zeigen sich Veränderungen im Verhalten der erwachsenen Ratte, müsste die Verschreibungspraxis bei einer ADHS neu überdacht werden.

#### 3.2. MATERIAL UND METHODEN

##### 3.2.1. Versuchstiere

###### 3.2.1.1. Stamm und Zucht



Bild 1: Sprague-Dawley-Ratte

Bei den verwendeten Tieren handelt es sich um männliche und weibliche Sprague-Dawley-Ratten (CrI:CD(SD)) von Charles River Laboratories Deutschland. Die Tiere werden nach dem Absetzen im Alter von 21 Tagen geliefert. Bei ihrer Ankunft wiegen sie zwischen 40 bis 60 g. Nach der Anlieferung hatten die Tiere eine Woche Zeit, sich an die neuen Haltungsbedingungen zu gewöhnen, bevor mit der Medikamentenapplikation begonnen wurde.

Es werden sowohl männliche als auch weibliche Tiere getestet, da die ADHS-Erkrankung und die folgende Behandlung sowohl Jungen als auch Mädchen, wenn auch mit unterschiedlicher Prävalenz, betrifft.

### 3.2.1.2. Tierhaltung

Die Tiere werden in getrenntgeschlechtlichen Gruppen ( $n = 5$ ) in Macrolon Standardkäfigen Typ IV (Ehret GmbH, Emmendingen) bei einem künstlichen Lichtregime mit einer Tagphase von 6.00–18.00 Uhr gehalten. Die Lichtintensität im Tierstallmaß beträgt im Mittel 170 Lx, die Raumtemperatur  $22 \pm 2$  °C und die relative Luftfeuchtigkeit liegt bei  $60 \pm 5$  %. Wasser aus Nippeltränken und Standardpellets von Ssniff Spezialitäten GmbH (Soest, Deutschland) stehen ad libitum zur Verfügung. Als Einstreu wird entstaubtes, entkeimtes Weichholzgranulat (Altromin, Lage, Deutschland) verwendet, das einmal wöchentlich gewechselt wird.

### 3.2.1.3. Alter der Tiere

Ab dem 28. Lebenstag, nach einer einwöchigen Eingewöhnungszeit, beginnt für zwei Wochen die tägliche Medikamentengabe. Der gewählte Behandlungszeitraum vom 28. bis zum 42. Lebenstag in der Periadoleszenz der Ratten entspricht einer Behandlung im Übergang vom Kindesalter zum Jugendlichen beim Menschen. Ab dem 50. Lebenstag werden in zweiwöchigen Abständen die verschiedenen Verhaltenstests durchgeführt. Am 101. Lebenstag werden die Ratten unter Isofluran-Narkose (3 Vol.%) schmerzfrei dekapitiert.

## 3.2.2. Pharmakologische Substanzen

### 3.2.2.1. Wirkstoff, Handelsname und Hersteller



Bild 2: Pharmakologische Substanzen

Das Methylphenidat (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deutschland) wurde als Methylphenidathydrochlorid in Pulverform (500 mg/Flasche) bezogen.

Das Atomoxetin (Strattera®, Lilly Deutschland GmbH, Deutschland) lag als Atomoxetinhydrochlorid in Kapselform (60 mg/Kapsel) vor.

### 3.2.2.2. Dosierung

Für Methylphenidat wurde eine Dosierung von 2,0 mg/kg/Tag, für Atomoxetin wurden die zwei Dosierungen 10,0 mg/kg/Tag und 30,0 mg/kg/Tag gewählt.

Es wird davon ausgegangen, dass die gewählte Dosis des Methylphenidats bei Berücksichtigung des erhöhten Methylphenidat–Metabolismus der Ratte am ehesten der Dosierung beim Menschen entspricht, die noch keine Hyperlokomotion hervorruft (Wargin et al., 1983). Beim Atomoxetin wird noch eine große Bandbreite an Dosierungen in tierexperimentellen Untersuchungen getestet. Es wurde bislang keine einheitliche Verhaltens verändernde Dosierung im Tierexperiment gefunden. Ein Vorversuch diente der Dosisfindung (s. 3.3.2.4). Die gewählten Dosierungen berücksichtigen die niedrige orale Bioverfügbarkeit bei der Ratte ( $F = 4\%$ ) (Mattiuz et al., 2003).

### 3.2.2.3. Applikation

Die Verabreichung beider Substanzen erfolgt per Schlundsonde. In einem Vorversuch wurde geprüft, welche Auswirkungen verschiedene Applikationsmethoden im Vergleich zu einer unbehandelten Kontrollgruppe auf das Verhalten der Ratten haben (s. 3.3.2.3.).

Die Medikamentenapplikation mittels Schlundsonde entspricht der oralen Verabreichung der Medikamente in Tablettenform beim Menschen.



Bild 3: Orale Applikation per Pipette

Die zuerst angedachte Applikation per Pipette (Wheeler et al., 2007) stellte sich aufgrund des bitteren Eigengeschmacks des Atomoxetins in den gewählten Dosierungen als nicht praktikabel heraus. Beide Substanzen wurden in einer 30 %igen Zuckerlösung gelöst. Dabei war die Konzentration der Medikamente so gewählt, dass das oral aufzunehmende Volumen 1 ml/kg entsprach.

### 3.2.3. Methoden

#### 3.2.3.1. Physiologische Untersuchungen

##### 2.3.1.1. Nahrungs- und Wasseraufnahme



Bild 4: Futter und Wasser

Versuchsbeginn war zwischen 9.00 und 10.00 vormittags. Zu Beginn des Versuches wurde den Ratten eine zuvor ausgewogene Futter- und Wassermenge angeboten. Nach 24 Stunden wurde die übrig gebliebene Futter- und Wassermenge mittels Laborwaage ermittelt und aus den Differenzen die verzehrte Menge festgestellt. Der Versuch erfolgte einmal in der Jungtiergruppe während der Medikamentenapplikation und später bei den adulten Tieren in Einzelsetzung.

##### 3.2.3.1.2. Körpergewicht



Bild 5: Messung des Körpergewichts

Das Körpergewicht der Tiere wurde vom 22. bis zum 99. Lebenstag in wöchentlichen Abständen mit einer digitalen Tierwaage (Sartorius isoCal, LC4201-00MS, Sartorius AG, Deutschland) ermittelt. Die Messungen erfolgten immer am selben Wochentag zwischen 9.00 und 10.00. Während der Medikamentenapplikation wurden die Tiere alle zwei Tage gewogen, um akuten Effekten der Wirkstoffgabe nachzugehen.

##### 3.2.3.1.3. Körperlänge und Body Mass Index



Bild 6: Messung der Körperlänge

Die Körperlänge wurde in der finalen Narkose am 101. Lebenstag bestimmt.

Dazu wurde mit einem Zentimetermaß die Entfernung zwischen

Nasenspitze und Schwanzansatz gemessen.

Unter Einbeziehung der vorher ermittelten Körpermasse wurde der Body Mass Index (Körpermasse [g]/Körperlänge<sup>2</sup> [cm<sup>2</sup>]) berechnet.

#### 3.2.3.1.4. Motorische Aktivität

Die motorische Aktivität wurde mittels InfraMot und Wheel Running gemessen.



Bild 7: InfraMot

Beim InfraMot (TSE systems, 302015-C, Technical&Scientific Equipment GmbH, Deutschland) wird über Infrarotsensoren die Aktivität von einem oder mehreren Tieren mittels ihrer ausgestrahlten Körperwärme und deren Ortsveränderung erfasst.

Auf diesem Weg wird jede Bewegung innerhalb des Käfigs zuverlässig registriert. Die Messung ist unabhängig von den jeweiligen Lichtverhältnissen. Der Sensor ist auf den Käfigdeckel geschraubt. Bei einer Käfighöhe von 25 cm hat der durch den Sensor abgedeckte Bereich einen Durchmesser von 64 cm.

Über eine Kontrolleinheit können 32 dieser Sensoren zusammengefasst werden. Die TSE InfraMot Software protokolliert die Aktivität in regelmäßigen, manuell einstellbaren Zeitabständen in einer Exceltabelle.

Wir haben die InfraMot-Überwachung einmal zur Überprüfung akuter Effekte während der Medikamentenapplikation in der Gruppe und ein zweites Mal nach Beenden der Verhaltenstests in Einzelsetzung durchgeführt.

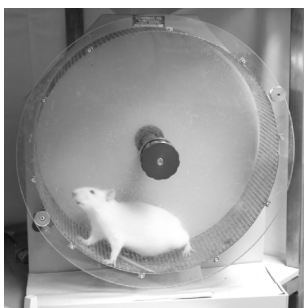


Bild 8: Wheel Running

Beim Wheel Running handelt es sich um an den Käfig angeschlossene Laufräder, deren Benutzung nach Belieben der Tiere erfolgen kann.

Die Laufräder haben einen Durchmesser von 30 cm. Die Lauffläche besteht aus gestanztem Blech. Das Laufrad wird vom Käfig durch eine mit einem Durchgang versehenen, 6 mm dicken, grauen Polyvinylchlorid (PVC)-Platte abgegrenzt. Nach außen ist es durch eine runde durchsichtige Plexiglasscheibe verschlossen, so dass Sichtkontakt zum Nachbarkäfig besteht.

Die Nutzung zehn solcher Laufräder kann fortwährend automatisch protokolliert werden. Dazu wurden die an der Trennwand befindlichen Magnetsensoren, die durch einen kleinen, am äußeren Rand des Laufrads befestigten Magneten, d.h. bei jeder Umdrehung des Rades aktiviert werden, mit den Ziffern 1–0 einer Computertastatur verkabelt. Über eine spezielle Software wird zu jeder Zeit die Umdrehung eines Laufrads mit entsprechender Ziffer aufgezeichnet.

### 3.2.3.2. Verhaltensuntersuchungen

#### 3.2.3.2.1. Elevated Plus Maze

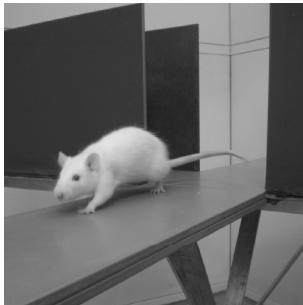


Bild 9: Elevated Plus Maze (EPM)

Das Prinzip des Elevated Plus Maze-Test beruht auf dem natürlichen Konflikt von Nagetieren zwischen der Neugierde, eine neue Umgebung zu erkunden, und der Abneigung, eine hell erleuchtete, offene und erhöhte Fläche zu betreten. Es können also Aussagen zum angstbezogenen Verhalten des Tieres getroffen werden und zwar vornehmlich zur Zustandsangst. Zustandsangst („state anxiety“) wird definiert als momentaner emotionaler Zustand, der durch Bedrohungs- und Spannungszustände bestimmt ist und mit einer Aktivierung des Organismus verbunden ist. Des Weiteren kann anhand der Bewegungen zwischen den verschiedenen Bereichen des Elevated Plus Maze die motorische Aktivität der Tiere erfasst werden.

Das Prinzip dieses Tests wurde von Montgomery (1955) entwickelt. Er beobachtete, dass die Ratten den wandlosen Teil eines Y-förmigen und erhöht gelagerten Gestelles mieden. Unbehandelte Tiere hielten sich die meiste Zeit des Versuches in den nicht so aversiven, mit einer Wand umgebenen (geschlossenen) Armen auf. Aus diesem Test wurde eine kreuzförmige Versuchsanordnung mit je zwei gegenüberliegenden offenen und geschlossenen Armen (Handley et Mithani, 1984) entwickelt. Seit der Validierung des Elevated Plus Maze für Ratten (Pellow et al., 1985) und Mäuse (Lister, 1987) ist es das am häufigsten verwendete Angstmodell bei Nagern.

Die Versuchsanordnung besteht aus einem auf einem Ständer befestigten, 64 cm über dem Boden befindlichen plusförmigen Kreuz. Jeder Arm des Kreuzes ist 44 cm lang, 17 cm breit und besteht aus 6 mm dickem grauen PVC. Zwei der gegenüberliegenden Arme sind von

einer 27 cm hohen Umrandung gleichen Materials begrenzt und werden im folgenden Text als „geschlossene Arme“ bezeichnet. Die unbegrenzten Arme werden im Folgenden „offene Arme“ genannt. Die vier Arme umschließen ein 17 cm x 17 cm großes Zentrum.

Zu Beginn des Versuches wird das zu untersuchende Tier diagonal auf das Zentrum gesetzt, um das erste Betreten eines bestimmten Arms möglichst wenig zu beeinflussen. Das Tier verbleibt für fünf Minuten auf der Testapparatur. Fällt es hinunter wird es von der Versuchsauswertung ausgeschlossen.

Folgende Parameter wurden erfasst:

- **Latenzzeit bis zum ersten Eintritt in die offenen Arme** (als Eintritt wurde gewertet, sobald sich Tier mit allen vier Pfoten auf einem Arm befand) (in Sekunden)
- **Anzahl der Eintritte in die offenen Arme und die geschlossenen Arme**
- **Prozentualer Anteil der Eintritte in die offenen Arme zu den Gesamteintritten**
- **Aufenthaltszeit in den offenen Armen** (in Sekunden)
- **Anzahl der Head Dips** (Hinunterbeugen des Kopfes in die Tiefe über die Ränder der offenen Arme)
- **Anzahl der Stretched Attended Postures (SAPs)** (Ausstrecken von den geschlossenen zu den offenen Armen)
- **Anzahl der Close Returns** (Zurückziehen in geschlossenen Bereich vor Betreten der offenen Arme)
- **Anzahl der Rearings** (Aufrichten auf den Hinterpfoten als ungerichtete vertikale Exploration)
- **Häufigkeit des Groomings** (Putzverhalten)

Dabei können der prozentuale Anteil der Eintritte in die offenen Arme zu den Gesamteintritten und die Aufenthaltszeit in den offenen Armen aufgrund ihrer relativen Unabhängigkeit vom einzelnen Untersucher zu den aussagekräftigsten Parametern gezählt werden.

Allgemein gilt, dass ängstliche Tiere die offenen Arme seltener und später betreten und weniger Zeit auf ihnen verbringen. Zusätzlich werden weniger Head Dips und vermehrt Stretched Attended Postures und Grooming beobachtet.

Die motorische Aktivität der Tiere beeinflusst die Anzahl der Rearings und der Gesamteintritte.



### 3.2.3.2.2. Hole Board

Der Hole Board–Test ist eine Methode, um die Reaktion eines Tieres auf eine unbekannte Umgebung zu untersuchen. Es können wiederum Aussagen über das angstbezogene Verhalten getroffen werden. Dabei stehen die Lichtverhältnisse mit dem Angstverhalten in direkter Beziehung: Fast alle Nager sind nachtaktiv und eine starke Lichtintensität hat eine aversive Wirkung (Mitchell, 1993). Da der Test an zwei aufeinander folgenden Tagen durchgeführt wird, können am zweiten Tag auch Schlüsse über Habituationsverhalten und Lernen gezogen werden.



Bild 10: Hole Board (HB)

Das Hole Board wurde zuerst 1962 von Boissier und Simon zur Untersuchung psychotroper Substanzen bei Mäusen eingeführt (Boissier et Simon, 1962).

Die Validität dieses Verhaltenstests wurde an Ratten und Mäusen mit unterschiedlichen Versuchslängen und Zeiträumen zwischen der erstmaligen und wiederholten Versuchsdurchführung von File und Wardill erbracht (File et Wardill, 1975).

Das Hole Board besteht aus einer 50 cm x 50 cm großen Plattform aus dunkelgrauem PVC, die 16 gleichmäßig verteilte (10 cm Trennweite) Löcher (2,5 cm Durchmesser) enthält. Dieser Boden ist von 35 cm hohen Wänden des gleichen Materials umgeben. Unter dem Boden verläuft ein Infrarotsensorsystem. Beim Durchbrechen der Lichtschranken, d.h. wenn das Tier sein Kopf in eins der Bodenlöcher steckt, wird dieses Ereignis über das Automated Holepoke (Nose Poke System IF/9519 9512NP368/IF, Omnitech Electronics, INC., Ohio) und eine spezielle Software auf dem angeschlossenen Computer erfasst.

Zu Beginn des Versuches wird das Tier in die Mitte der Bodenplatte gesetzt und anschließend das Verhalten für 10 min beobachtet.

Folgende Parameter werden erfasst:

- **Zeit bis zum ersten Nose Poke** (Hineinstecken des Kopfes in ein Loch der Bodenplatte) (in Sekunden)
- **Anzahl der Nose Pokes**
- **Anzahl der Rearings**
- **Häufigkeit des Groomings**

Eine vermehrte Exploration, gekennzeichnet durch einen frühen ersten Nose Poke, eine hohe Anzahl der Nose Pokes und Rearings, wird als vermindertes angstloses Verhalten gewertet. Es ist auch ein Zeichen für erhöhte motorische Aktivität. Innere Erregung spiegelt sich in dem Ausmaß des Groomings wieder. Die Abnahme der Nose Pokes und Rearings am zweiten Tag wird als Habituation an die Umgebung gesehen.

#### 3.2.3.2.3. Open Field

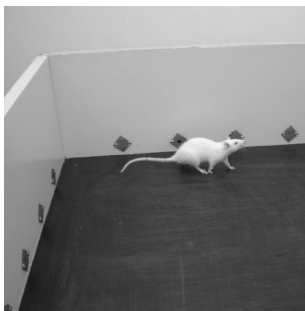


Bild 11: Open Field (OF)

Der Open Field-Test gehört zu den ältesten Methoden in der tierexperimentellen Verhaltensforschung. Er wurde von Hall entwickelt (Hall, 1934).

Das Open Field ist ein Verhaltenstest zur Messung motorischer Aktivität und unkonditionierten Explorations- und Vermeidungsverhalten. Es wird die natürliche Abneigung von Ratten und Mäuse vor unbekanntem, großen offenen Räumen genutzt (Archer, 1973).

Durch unterschiedliche Form und Größe sowie Beleuchtung des Open Field kann das Verhalten der Tiere unterschiedlich beeinflusst werden (Prut et Belzung, 2003). Um eine Aussage über Explorations- und Angstverhalten treffen zu können, muss das Open Field dementsprechend groß und hell erleuchtet sein, damit das Zentrum von den Tieren auch als aversiv wahrgenommen wird. Die motorische Aktivität wird untersucherunabhängig am Durchlaufen von Lichtschranken mittels eines Zählers (Mota 05, 02/83/00F IP 20) gemessen.

Die genutzte Versuchsanordnung besteht aus einer schwarzen quadratischen, 1 m x 1 m großen, ebenen Kunststofffläche, die von 27 cm hohen, weiß gestrichenen Holzwänden begrenzt wird. Ein Netz von Lichtschranken durchzieht das Open Field auf Höhe des Tieres. Das Durchbrechen der Lichtschranken wird automatisch registriert.

Nach Einsetzen des Tieres in die Mitte der Bodenfläche wird das Verhalten für fünf Minuten beobachtet.

Folgende Parameter werden erfasst:

- **Anzahl der durchlaufene Lichtschranken**
- **Zeit bis zum ersten Eintritt in den Innenraum** (als Innenraum wird ein 50 cm x 50 cm großes Quadrat im Zentrum der Grundfläche bezeichnet) (in Sekunden)
- **Anzahl der Eintritte**
- **Gesamtaufenthalt im Innenraum** (in Sekunden)
- **Anzahl der Rearings**
- **Häufigkeit des Groomings**

Die Anzahl der durchlaufenen Lichtschranken ist ein Maß für die motorische Aktivität. Frühes und vermehrtes Eintreten in den Innenraum, eine erhöhte Gesamtaufenthaltszeit im Innenraum und eine vermehrte Anzahl von Rearings sprechen für ein vermindertes Angstverhalten. Ein vermehrtes Grooming kann wieder als Zustand innerer Erregung gewertet werden.

#### 3.2.3.2.4. Rota Rod



Bild 12: Rota Rod (RR)

Der Rota Rod-Test dient zur Bestimmung der motorischen Fähigkeiten.

Die Idee des „Rota Rod“ hat seine Herkunft aus einem 1957 von Dunham und Miya veröffentlichten Paper (Dunham et Miya, 1957).

Mittlerweile ist die Effektivität des Rota Rods bei der Bewertung der motorischen Koordination zweifelsohne bewiesen (Hamm et al., 1994).

Das Rota Rod (Ugo Basile Rota Rod Treatmills, 7750 4, Linton Instrumentation, United Kingdom) besteht aus einer in 25 cm Höhe befindlichen, sich drehenden Walze mit griffiger Oberfläche, um ausreichenden Halt für die Tiere zu gewährleisten. Der Durchmesser der Walze beträgt 5,5 cm. Sie ist durch fünf graue Kunststoffscheiben (44 cm Durchmesser) in vier je neun cm breite Abteilungen unterteilt, so dass vier Tiere gleichzeitig ohne Sichtkontakt zueinander getestet werden konnten. Mittels eines Kippschalters kann zwischen konstanter und beschleunigender Geschwindigkeit gewählt werden. Jede Abteilung verfügt über eine

Fallplattform, die beim Fallen des Tieres den Stopp einer mit ihr verbundenen digitalen Uhr auslöst.

Vor dem eigentlichen Versuch wurden die Tiere am Vortag für einen Zeitraum von vier Minuten auf die sich kontinuierlich, viermal pro Minute umdrehende Walze gesetzt. In dieser Zeit heruntergefallene Tiere wurden sogleich wieder aufgesetzt. Am Ende dieser Zeit hatten alle Tiere gelernt sich entsprechend der Drehgeschwindigkeit auf der Walze fortzubewegen ohne Herunterzufallen.

Am Versuchstag wurden die Tiere bei dieser bekannten Anfangsgeschwindigkeit erneut auf das Rota Rod gesetzt. Die Stoppuhren wurden simultan gestartet und der Schalter zur Beschleunigung umgelegt (nach zwei Minuten hatte sich die Zahl der Umdrehungen auf 20 pro Minute erhöht). Zur selben Zeit wurden nur Tiere gleicher Versuchsgruppen getestet.

Folgende Parameter werden erfasst:

– **Latenz bis das Tier von der Walze fällt** (in Sekunden)

Je länger sich das Tier auf der Walze hält, desto besser die motorische Koordination.

#### 3.2.3.2.5. Free Exploratory Paradigm



Bild 13: Free Exploratory Paradigm (FEP)

Beim Free Exploratory Paradigm wird den Tieren von der gewohnten Umgebung heraus die Möglichkeit zur Exploration einer neuen Umgebung geboten. Es lassen sich Angstverhalten und Habituation beobachten. Mit dieser Testanordnung sollen Aufschlüsse zur Eigenschaftsangst der Tiere gewonnen werden. Eigenschaftsangst („trait anxiety“) wird definiert als angeborene oder erlernte Disposition eines Individuums, Reize aus der Umgebung als mehr oder weniger bedrohlich zu erleben und je nach Ausmaß dieser Disposition auf bedrohliche Stimuli mit unterschiedlichem Ausmaß an Zustandsangst zu reagieren.

Bereits vor 70 Jahren setzte Anderson den Austritt von Ratten aus ihrem Heimkäfig als Maß für ihre angeborenen Emotionalität ein (Anderson, 1938). Das Free Exploratory Paradigm unterlag in den Folgejahren verschiedener Variationen und Kombinationen mit anderen Verhaltenstests (Cox et Tye, 1975; Glickman et al, 1964). Griebel und Mitarbeiter ließen

Mäuse zwischen einer bekannten und neuen Umgebung wählen und zeigen auf, dass diese Methode geeignet ist, neophobisches Verhalten und das Potential anxiolytischer Substanzen zu untersuchen (Griebel et al., 1993).

Dieser Versuch wird an zwei Folgetagen in der gewohnten Umgebung des Tierstalls durchgeführt. Zwei Stunden vor Versuchsbeginn, um Stresseinwirkungen direkt vor dem Versuch zu vermeiden, werden die einzelnen Tiere farblich markiert (Edding 3000, permanent marker, edding AG, Ahrensburg, Deutschland). Drei Käfige werden in gleichgroßen Abständen auf einem Tisch platziert. Beim anschließenden Versuch wird nacheinander in jedem Käfig bei geöffnetem Deckel mittels Drahtleiter ein Ausstieg geschaffen. Die Tiere haben nun zehn Minuten lang die Möglichkeit, sich frei auf ihrem und den Nachbarkäfigen zu bewegen (Bert et al., 2008).

Folgende Parameter werden erfasst:

- **Zeit bis zum ersten Austritt** (als Austritt wird gewertet sobald das Tier mit allen vier Pfoten auf der Höhe des Käfigdeckels ist) (in Sekunden)
- **Anzahl der Austritte**
- **Zeit außerhalb des Käfigs** (in Sekunden)

Als Zeichen für ein vermindert angstbezogenes Verhalten werden früher und zahlreicher Austritt aus dem Käfig gewertet. Eine Habituation macht sich im Vergleich zum Vortag durch früheres und vermehrtes Austreten bemerkbar.

### 3.2.3.3. Analytische Untersuchungen

#### 3.2.3.3.1. Hochleistungsflüssigkeitschromatographie



Bild 14: Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC)–Anlage

Mit dieser analytischen Trennmethode können nahezu sämtliche Stoffgruppen quantitativ bestimmt werden und die Ergebnisse zeichnen sich durch hohe Präzision und Reproduzierbarkeit aus.

Bei der Flüssigchromatographie erfolgt die Trennung der Komponenten eines Substanzgemisches durch ein Phasensystem, bestehend aus der polaren

mobilen Phase (in der Regel wässrige Gemische von Methanol oder Acetonitrile) und der unpolaren stationären Phase (chemisch modifizierte, hydrophobe Partikel auf Kieselgelbasis). Die **Hochleistungsflüssigkeitschromatographie** ist gekennzeichnet durch die hohe Trennleistung, die durch sehr kleine, druckstabile Packungsteilchen (<10 µm), pulsationsarme Pumpen, hohe Drücke (bis 400 bar), entsprechende Injektionssysteme und miniaturisierte Detektoren erreicht wird.

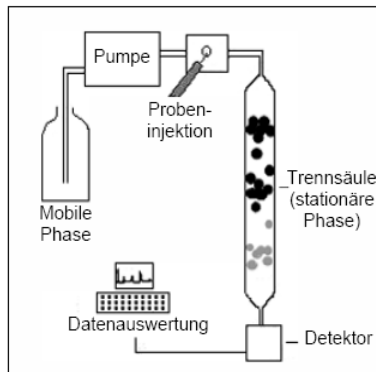


Abb.10: Schema der technischen Bestandteile des HPLC-Verfahrens

Das Verfahren setzt sich aus zwei Teilschritten zusammen: Bei der Chromatographie wird das Stoffgemisch zwischen der mobilen und der stationären Phase in seine Einzelbestandteile aufgetrennt. Die Retentionszeit der einzelnen Bestandteile variiert aufgrund deren unterschiedlichen Charakteristika, z.B.

Molekülgröße und Ladung. In der anschließenden Substanzeanalyse wird die Konzentration der jeweiligen isolierten Substanzen durch einen Detektor bestimmt.

#### 3.2.3.3.1.1. Bestimmung der Methylphenidat- und Atomoxetinkonzentrationen im Blutplasma

Es wurden je fünf adulte männliche Sprague-Dawley-Ratten (CrI:CD(SD)) von Charles River Laboratories Deutschland untersucht. Zwei Stunden nach der Gabe von entweder 2,0 mg/kg Methylphenidat oder 10,0 mg/kg und 30,0 mg/kg Atomoxetin wurde intrakardial Blut entnommen; dieser Zeitraum entspricht der Vorbehandlungszeit, nach deren Ablauf die Tiere in den Verhaltenstests nach Akutgabe getestet wurden und zu dem Zeitpunkt ist nachgewiesenermaßen der Plasmapeak erreicht (Mattiuz et al., 2003, Novartis Pharma, 2005). Zuerst wurden die Tiere mit Isofluran (3 Vol.%) (Forene®, Abbott GmbH, Wiesbaden, Deutschland) narkotisiert. Der Brustkorb wurde entlang des Brustbeins eröffnet und anschließend das Blut unter Sichtkontrolle aus der linken Herzkammer entnommen. Die Blutentnahme wurde mittels einer 2,7 ml S-Monovette® KE (mit 1,6 mg Kalium-Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)/ml Blut) und einer 0,9 mm x 38 mm starken Kanüle vorgenommen (beides Sarstedt AG&Co., Nümbrecht, Deutschland).

Das Blut wurde zur Plasmagewinnung in einer Tischzentrifuge (BR4 i, Rotor S40, Jouan GmbH, Unterhaching, Deutschland) bei 4 °C und 4100 rpm für 30 min zentrifugiert. Das

überständige Blutplasma wurde abpipettiert, in 0,5 ml Portionen in 2 ml Multi®-Sicherheitsreaktionsgefäße (Carl Roth GmbH + Co.KG, Karlsruhe, Deutschland) überführt und bei  $-87\text{ }^{\circ}\text{C}$  gelagert.

### Methylphenidat

Zur Bestimmung der Methylphenidatkonzentration wurde die Flüssigchromatographie mit einer Tandem-Massenspektrometrie (MS) gekoppelt. Diese sensitive Methode bietet sich an, um Substanzen mit geringer Molekülgröße (Molekulargewicht Methylphenidat: 233,31) und in stark Matrix belasteten bzw. komplexen Proben wie z.B. Plasma zu quantifizieren.

Das Grundprinzip der MS ist es, aus anorganischen oder organischen Substanzen –thermisch, durch elektrische Felder oder Beschuss mit Elektronen, Ionen oder Photonen– Ionen zu erzeugen. Diese werden in einem Analysator nach ihrer Masse und Ladung getrennt und durch einen Detektor qualitativ und quantitativ erfasst.

Zur Probenvorbereitung wurden zu 500  $\mu\text{L}$  Plasma 0,1 N Natriumhydroxid-Lösung gegeben und die Mischung mit 1-Chlorbutan, welches Chlorhaloperidol als internen Standard (IS) enthielt, extrahiert. Nach Zentrifugieren wurde ein Teil der organischen Phase mit Stickstoff bei  $40\text{ }^{\circ}\text{C}$  bis zur Trockene eingedampft. Der Rückstand wurde in eine Rekonstitutionslösung aus Methanol und 1 %iger Ameisensäure (1 : 9) aufgenommen und ein Teil dieser Lösung in die Messapparatur injiziert.

Die HPLC bestand aus einem binären Pumpensystem (LC-10 ADVP), einem System Controller (SCL-10 AVP), einem Lösungsmitteldegasser (DGU-14 A), einem Autosampler (SIL-10 ADVP), einem Ofen (CTO-10 ASVP) und einem UV-Detektor (SPD-10 A, alles Shimadzu, Duisburg, Deutschland). Als analytische Trennsäule wurde eine Polaris C18 (250 x 4,6 mm, 5  $\mu\text{m}$ , Fa. Varian Deutschland GmbH, Darmstadt, Deutschland) verwendet. Die Ofentemperatur betrug  $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

Die mobile Phase setzte sich zusammen aus: Laufmittel A: Methanol, Laufmittel B: Methanol und 0,1 %ige Ameisensäure (1 : 9).

Die Laufzeit des Gradienten betrug 12,5 min. Die Konzentration des Laufmittels B stieg während der Analyse von 0 % auf 70 %. Die Flussrate der mobilen Phase lag bei 0,55 mL/min.

Für die Massenspektrometrie diente ein MS-2010-System (Shimadzu, Duisburg, Deutschland). Die Messungen erfolgten mit dem Elektrospray-Ionisation-Interface im positiven Modus. Als Nebulizer Gas wurde Stickstoff mit einer Flussrate von 4,5 L/min verwendet. Die Block- und Elektroden-Temperatur lag bei 280 °C. Alle anderen Einstellungen resultierten aus dem Standard-Tuning. Der Massendetektor arbeitete im Sekundärmassenspektrometrie-Modus mit Fokussierung auf die Massen ( $m/z$ ): 233 (Methylphenidat) und 392 (interner Standard) bei einer Detektorspannung von 1,9 kV.

Zur Quantifizierung wurde eine 5-Punkt Kalibration von Methylphenidat (0, 1, 5, 10, 25, 50 µg/L) durchgeführt. Die Kalibrationen waren im geprüften Bereich linear ( $r > 0,995$ ).

Die Bestimmungsgrenze lag bei 3 µg/L.

Diese Untersuchung wurde am Institut für Toxikologie des Berliner Betriebs für Zentrale Gesundheitliche Aufgaben (Berlin, Deutschland) in Auftrag gegeben.

#### Atomoxetin

Zur Bestimmung des Atomoxetin wurde die Probe wie folgt zubereitet: 1 ml Plasma wurde mit 50 µl einer 5 µg/ml Imipramin-Lösung (interner Standard) in Wasser versetzt und auf dem Vortex-Mixer (Vortex-2 Genie, Modell G-560F, Scientific Industries, Bohemia, N.Y., USA) gemischt. Zu dieser Lösung wurden 0,5 ml Boratpuffer (pH = 10,5, enthält 5,4 % Kaliumborat, OD104, Pickering Laboratories Inc., Mountain View, USA) und 5 ml Diethylether (zur Analyse, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland) zugefügt und im verschlossenen Röhrchen 2 min auf dem Vortex-Mixer gemischt. Zur Phasentrennung wurde die Mischung 10 min bei 4000 U/min und 5 °C zentrifugiert (Labofuge 400 R, Heraeus, Osterode, Deutschland) und für etwa eine Stunde bei -22° eingefroren. Nach vollständigem Durchfrieren der Unterphase wurde die Etherphase in ein 15 ml-Zentrifugenglas mit spitzem Boden (DURAN®, Carl Roth GmbH + Co.KG, Karlsruhe, Deutschland) gegossen, bei etwa 30 °C mit Stickstoff auf etwa 0,7 ml eingengt und in ein 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß (Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland) überführt. Nach dem Zugabe von 100 µl 0,1 N Schwefelsäure (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland) wurde 2 min auf dem Vortex-Mixer gemischt, 2 min bei 13400 U/min zentrifugiert (miniSpin, Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland) und die Röhrchen anschließend bei -22 °C eingefroren. Nach dem Gefrieren der Unterphase wurde der Ether abgegossen und verworfen. Die verbleibende Schwefelsäure wurde mit 0,5 ml n-Hexan (LiChrosolv, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland) versetzt, auf dem Vortex-Mixer 1 min gemischt, 2 min zentrifugiert und bei -22°C eingefroren. Nachdem



die wässrige Phase gefroren war, wurde die Hexanphase abgegossen und verworfen. Die verbleibende wässrige Phase wurde nach dem Auftauen in ein HPLC–Vial überführt und 50 µl zur Analyse injiziert.

*Anmerkung:* Bei der Auswertung der Ergebnisse wurde nicht nach der Methode des internen Standards verfahren. Der Zusatz von Imipramin ist daher nicht erforderlich.

Alternativ wurde auch die Verwendung von Desipramin als IS untersucht. Dabei wurden den Plasmaproben 50 µl einer Lösung von 2,5 µg/ml Desipramin in Wasser zugefügt.

Die chromatographische Analyse der Proben erfolgte auf einer HPLC–Anlage bestehend aus zwei Pumpen LC–7A, einem UV–Detektor SPD–10Avp, einem Probengeber SIL–10A, einem Säulenofen CTO–6A und einem Systemkontroller CBM–10A (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japan). Zur Steuerung der Anlage und zur Auswertung der Chromatogramme wurde die LC–Workstation CLASS–LC–10 (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japan) verwendet.

Zur Herstellung der mobilen Phase wurden 25 ml 1M Triethylammonium–Phosphat Puffer (TEAP), pH = 3 (Fluka 90362, Sigma–Aldrich, Buchs, Schweiz) mit bidestilliertem Wasser auf 500 ml aufgefüllt und 240 ml Acetonitril (LiChrosolv, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland) zugefügt. Die chromatographische Trennung wurde an einer Säule von 250 mm Länge und 3 mm Innendurchmesser (ID), gefüllt mit UltraSep ES PHARM RP18E, 5 µm (Sepserv Separation Service, Berlin, Deutschland) bei einer Fließgeschwindigkeit von 0,5 ml/min und einer Temperatur von 40°C durchgeführt. Die Säule war mit einer Vorsäule von 10 mm Länge und 3 mm ID, gefüllt mit dem gleichen Material, versehen.

Die Detektion erfolgte bei einer Wellenlänge von 216 nm.

Atomoxetin wurde bei 9,7 min, Desipramin bei 10,8 min und Imipramin bei 12,0 min eluiert.

Die Berechnung der Ergebnisse wurde auf der Basis der gemessenen Peakflächen auf der Grundlage der Tageseichkurven durchgeführt.

Diese Untersuchung wurde am Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Charité Universitätsmedizin Berlin (Berlin, Deutschland) durchgeführt.

### 3.2.3.3.1.2. Bestimmung der Serotonin-, Dopamin- und Noradrenalin-Konzentrationen in verschiedenen Gehirnregionen

Es sollte untersucht werden, ob nach einer chronischen Applikation von Methylphenidat und Atomoxetin in der Periadoleszenz, einhergehend mit den möglichen Verhaltensänderungen, auch dauerhafte Veränderungen zentraler Neurotransmissionsmechanismen zu erkennen sind. Dafür wurden die Gehalte von Serotonin, Dopamin und Noradrenalin in dem präfrontalen Cortex, dem Striatum, im Hippocampus sowie in der dorsalen Raphe bestimmt.

Die gewählten Neurotransmitter und Gehirnregionen spielen bekanntermaßen eine Rolle bei der Pathophysiologie der ADHS, der Pharmakodynamik des Methylphenidats und Atomoxetins sowie dem untersuchten Verhalten.

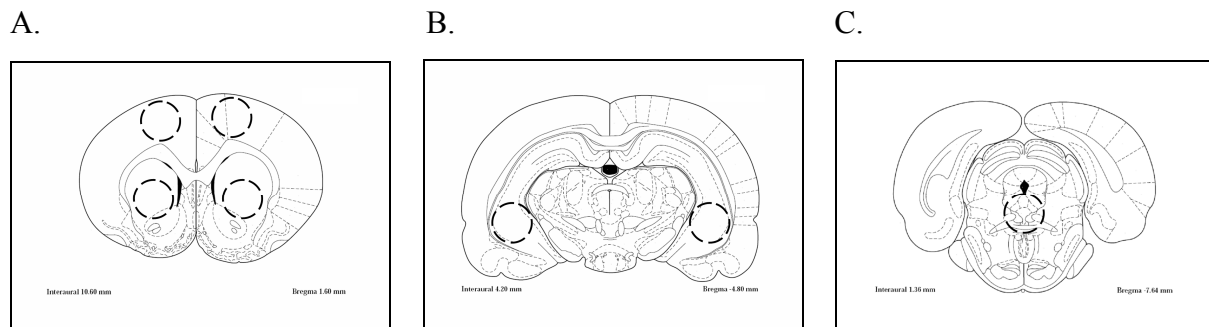


Bild 15: Gehirnentnahme

Die Tiere wurden im Alter von 101 Tagen mit Isofluran (3 Vol.%) (Forene®, Abbot GmbH, Deutschland) narkotisiert. Die Tötung erfolgte durch Dekapitation mittels Guillotine.

Der Schädel wurde mit einer Schere geöffnet und das Hirn unverzüglich im Ganzen herauspräpariert. Die entnommenen Gehirne wurden sofort in 7 ml Rotilabo®-Probenröhrchen (Carl Roth GmbH + Co.KG, Karlsruhe, Deutschland) überführt und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Nach einer Stunde wurden die Gehirne dem Stickstoff entnommen, in einen Tiefkühlschrank verbracht und dort bei  $-87^{\circ}\text{C}$  bis zur histologischen Aufbereitung aufbewahrt.

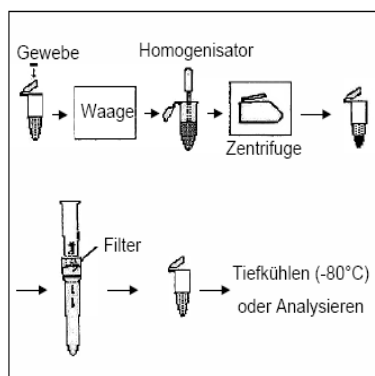
Die Gehirne wurden mit einem Gefriermikrotoms entsprechend der gewünschten Hirnregion seziiert. Die Schnittdicke betrug dabei 1 mm. Die Gewebeproben wurden bilateral mittels eines Trokars entnommen und in vorher austarierten 1,5 ml Multi®-Sicherheitsreaktionsgefäßen (Carl Roth GmbH + Co.KG, Karlsruhe, Deutschland) gewogen.



**Abb.11:** Schematische Darstellung der Zielgebiete: A. Präfrontaler Cortex (oben) und Striatum (unten), B. Hippocampus, C. Dorsale Raphe (modifiziert nach Paxinos und Watson, 1997). (Millimeterangaben von Interaural und Bregma entsprechen Schnittebene der Gewebeprobenentnahme)

Anschließend wurde den Einzelproben jeweils 597  $\mu\text{l}$  eisgekühlte 0,1 M Perchlorsäure und 3,0  $\mu\text{l}$  (50 ng/ml) Hydroxyindolcarboxylsäure (HICA) als interner Standard zugegeben.

Nachdem sie kurz gerüttelt (Vortex-2 Genie, Modell G-560F, Scientific Industries, Bohemia, N.Y., USA) worden waren, wurden die Proben mit einem Hochleistungs-Ultraschall-Desintegrator (Sonopuls Ultraschall-Homogenisator, Modell HD2070, Bandelin Electronic, Berlin, Deutschland) dreimal je zwei Sekunden lang homogenisiert.



**Abb.12:** Schematischer Ablauf der Probenaufbereitung für die HPLC-Analyse

Die Homogenate wurden, um die Membranproteine abzutrennen, 10 min bei 4  $^{\circ}\text{C}$  und 14000 rpm in einer Tischzentrifuge (Jouan, Modell MR 18.22, Rotor 74, Jouan S.A., Saint Herblain, Frankreich) zentrifugiert.

### Dopamin und Serotonin

100  $\mu\text{l}$  des Überstandes wurden in ein 0,5 ml Multi®-Sicherheitsreaktionsgefäß (Carl Roth GmbH + Co.KG, Karlsruhe, Deutschland) überführt.

Das Zentrifugat wurde in einem Volumen von 25  $\mu\text{l}$  durch ein Probenaufgabenventil (Rheodyne 7125, Cotati, California, USA) in die HPLC injiziert, wo es im System zuerst durch eine 10 mm lange Vorsäule (10 x 2,1 mm ID, MP-PAH S-5  $\mu\text{m}$ , YMC Europe GmbH, Dinslaken, Deutschland) filtriert wurde. Die chromatographische Trennung erfolgte in der 125 mm langen Hauptsäule (125 x 2,1 mm ID, MP-ODS-5 S-5  $\mu\text{m}$ , YMC Europe GmbH, Dinslaken, Deutschland), bei einer Fließgeschwindigkeit von 200  $\mu\text{l}/\text{min}$  und einem Druck

von  $76 \pm 2$  bar. Mittels eines Degassers (VDS optilab Chromatographie Technik GmbH, Berlin, Deutschland) wurde das System luftblasenfrei gehalten.

Das Laufmittel setzte sich wie folgt zusammen:

- 0,1 M Natriumdihydrogenphosphat
- 1 mM EDTA–Dinatriumsalz
- 0,35 mM Oktansulfonsäure–Natriumsalz

Die Lösung, bevor sie auf 1 Liter aufgefüllt wurde, war auf den pH–Wert überprüft und mit 1 M Natronlauge auf 4,5 pH eingestellt. Anschliessend wurde die auf solche Weise vorbereitete Pufferlösung zusätzlich mit 30 g Isopropanol gemischt.

Zur gleichmäßigen Förderung des Laufmittels wurde eine Pumpe (Modell 480, Gynkotek, Deutschland) mit zusätzlichem Pulsationsdämpfer verwendet.

Vor der eigentlichen Messung und in regelmäßigen Abständen während der Messungen wurde eine Eichung mit einem Kalibrationsstandard durchgeführt. Diese Standardlösung enthielt die zu messenden Komponenten und diente als Maß für die Retentionszeit. In einem Volumen von 200  $\mu\text{l}$  waren enthalten:

- 1  $\mu\text{l}$   $\alpha$ –Hydroxyisocaproinsäure (HICA)
- 50  $\mu\text{l}$  5–Hydroxyindolessigsäure (HIAA)
- 50  $\mu\text{l}$  5–HT
- 50  $\mu\text{l}$  Catecholamin–Mix
- 49  $\mu\text{l}$  Laufmittel

Die Substanzen in den Proben wurden mittels einer amperometrischen Messzelle bei einem Potential von 700 mV und einem Filter von 0,3 Hz detektiert. Bei der amperometrischen Detektion wird das für die Oxidations– bzw. Reduktionsreaktion benötigte Potential zwischen Referenzelektrode und Arbeitselektrode angelegt. Eine Gegenelektrode dient zur Aufrechterhaltung des Potentials und verhindert außerdem einen Stromfluß an der Referenzelektrode. Durchströmt eine elektrochemische Substanz die Durchflußzelle wird sie oxidiert und gibt Elektronen ab bzw. reduziert und nimmt Elektronen auf. Der dabei fließende Strom wird von einem Messgerät erfasst, elektrisch verstärkt und als chromatographisches Signal dargestellt.

Die Elutionsdauer des Dopamins betrug durchschnittlich 3,5 min, die der HIAA ungefähr 6 min und die des Serotonins um die 8 min.

Zur Auswertung der Chromatogramme wurde ein Computerprogramm (Chromatographie–Datensystem, CSW, Data APEX, Tschechien) benutzt. Anschließend wurden die Konzentrationen von 5–HT und dessen Stoffwechselprodukt HIAA und DA aus den

Peakflächen in  $\mu\text{g/ml}$  berechnet.

### Noradrenalin

Alle Bestandteile des Probenaufbereitungskits stammen von Chromsystems Instruments & Chemicals GmbH, München, Deutschland. Zur Probenvorbereitung wurde 0,5 ml Extraktionspuffer in die entsprechend beschrifteten Probenvorbereitungskartuschen gegeben und das Aluminiumoxid in dem Extraktionspuffer kurz aufgeschüttelt. Dann wurden 0,4 ml des Homogenats zugegeben, mit HPLC-Wasser auf 1 ml aufgestockt und die Probe mit 50  $\mu\text{l}$  Internem Standard versetzt. Die Kartusche wurde mit dem Deckel verschlossen und 30 min über Kopf geschüttelt. Dann wurde der Deckel geöffnet, der untere Kunststoffstopfen der Kartusche abgenommen und der Plasmaüberstand unter Verwendung einer Vakuumstation abgesaugt.

Der untere Verschlussstopfen wurde wieder an die Probenvorbereitungskartusche gesteckt und 1 ml Waschpuffer aufgetragen. Anschließend wurde die Kartusche erneut verschlossen und der Aluminiumniederschlag am Vortex-Mischer (Vortex-2 Genie, Modell G-560F, Scientific Industries, Bohemia, N.Y., USA) kurz im Waschpuffer aufgeschüttelt. Der untere Verschlussstopfen wurde wieder abgenommen und der Waschpufferüberstand abgesaugt. Dieser Waschvorgang wurde noch zweimal wiederholt. Nach dem letzten Waschschrift wurden die Kartuschen 2 min bei 4000 rpm gut trocken zentrifugiert und der untere Verschlussstopfen verworfen.

Daraufhin wurde an die Probenvorbereitungskartusche das im Testset mitgelieferte Kunststoffprobengefäß montiert. 120  $\mu\text{l}$  des Elutionspuffers wurden hinzugegeben, das Ganze kurz aufgeschüttelt und ungefähr 5 min stehen gelassen. Dann wurde ca. 30 s am Vortex geschüttelt, die Kartuschen in ein Einmalreagenzglas gestellt und 1 min bei 200 rpm zentrifugiert (Jouan, Modell MR 18.22, Rotor 74, Jouan S.A., Saint Herblain, Frankreich).

Die im Kunststoffprobengefäß befindliche eluierte Probe wurde zur Feinfiltration in Ultrafree-MC-Probengefäße (Millipore Corporation, Bedford, M.A., USA) überführt und zuletzt in den gekühlten Waters 717 Autosampler (Millipore Waters Chromatography, Waters GmbH, Eschborn, Deutschland) gestellt. Unter Verwendung des Autosamplers wurden 50  $\mu\text{l}$  des Eluats in das HPLC-System injiziert. Das System bestand überwiegend aus Geräten der Firma Waters GmbH, Eschborn, Deutschland. Als Pumpe diente das Modell 510, die Messung erfolgte mittels des elektrochemischen Detektors 460. Zusätzlich war ein Degasser (Gastorr 103, Sunchrom Wissenschaftliche Geräte GmbH, Friedrichsdorf, Deutschland). Haupt- und Vorsäule waren Reversed Phase-C18 Säulen der Firma Chromsystems. Es wurde

mit einem Fluß von 0,8 ml/min und einem Arbeitspotential von 440 mV gearbeitet. Der Kalibrationsstandard war folgendermaßen zusammengesetzt:

- 5,0 pg/µl Noradrenalin
- 2,5 pg/µl Adrenalin
- 5,0 pg/µl 3,4-Dihydroxybenzylamin (IS)
- 2,5 pg/µl Dopamin

Die Retentionszeit des Noradrenalins betrug im Durchschnitt 4 min. Die Datenerfassung erfolgte mittels der Chromatographiesoftware Peak Net <sup>TM</sup> (Automatisierungssoftware–Version 4.11a, Dionex GmbH, Idstein, Deutschland).

### 3.3. UNTERSUCHUNGEN

#### 3.3.1. Versuchsplan

Ab dem 28. Lebenstag, nach einer einwöchigen Eingewöhnungszeit, bekamen die Tiere täglich für zwei Wochen entweder Methylphenidat oder Atomoxetin oder die reine Zuckerlösung per Schlundsonde verabreicht. Für jede Dosierung wurden 20 männliche und 20 weibliche Tiere getestet.

Um akute Effekte der unterschiedlichen Behandlung zu identifizieren, wurde mit dem InfraMot die motorische Aktivität der Tiergruppen gemessen, sowie Körpergewicht, Wasser- und Futteraufnahme überprüft. Das Körpergewicht wurde im weiteren Verlauf in wöchentlichen Abständen ermittelt.

Um bei den Tieren eine Verhaltensbeeinträchtigung durch wiederholte Testerfahrungen zu vermindern, wurden die Tiere mit gleicher Behandlung in zwei Gruppen (n = 10) aufgeteilt, die jeweils nur zwei Verhaltenstests absolvieren. Zwischen den einzelnen Verhaltenstests lag eine Pause von zwei Wochen, um Lerneffekte und Gewöhnung auszuschließen.

22 und 36 Tage nach Beginn der medikamentösen Behandlung (50. und 64. Lebenstag) wurden die Tiere entweder im Elevated Plus Maze und Open Field (Gruppe 1) oder im Hole Board und Rota Rod (Gruppe 2) getestet.

Am 78. und 79. Lebenstag wurde in der gewohnten Umgebung des Stalles mit allen Tieren das Free Exploratory Paradigm durchgeführt.

Vom 85. bis 96. Lebenstag wurden die Ratten in Einzelkäfigen (Macrolon Typ II) gehalten. Zuerst erhielten sie die Möglichkeit, nach Belieben ein an den Käfig angeschlossenes Laufrad zu nutzen, dessen Nutzung fortwährend automatisch protokolliert wurde (Wheel Running).

Anschließend wurde über InfraMot kontinuierlich die motorische Aktivität gemessen sowie der Futter- und Wasserverbrauch über 24 Stunden bestimmt.

Nach Versuchsende wurden die Tiere mit Isofluran (3 Vol.%) narkotisiert und die Körperlänge wurde bestimmt. Anschließend wurden sie schmerzfrei dekapitiert und die Gehirne entnommen. Mittels Hochleistungsflüssigkeitschromatographie wurden die Serotonin-, Dopamin- und NoradrenalinKonzentrationen im präfrontalen Cortex, im Striatum, im Hippocampus, sowie in der dorsalen Raphe bestimmt.

VERSUCHSSCHEMA

Lebenstag

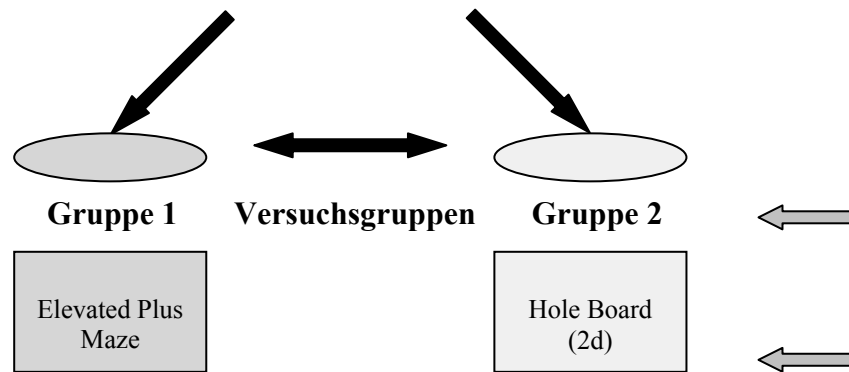
21.

**Tiergruppenbildung**

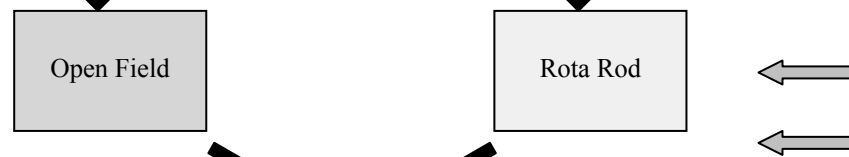
28.-43.

Wirkstoffapplikation, InfraMot, Futter- und Wasseraufnahme  
in der Gruppe

50./51.



64./65.



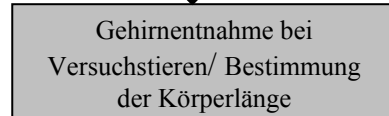
78./79.



85.-96.



101.



Bestimmung des Körpergewichts

Abb.13: Versuchsschema



### 3.3.2. Versuchsvorbereitung

#### 3.3.2.1. Tierversuchsantrag

Der Antrag auf die Genehmigung von Versuchen an lebenden Wirbeltieren wurde am 16.7.2006 gestellt. Dem Tierversuchsantrag wurde am 7.12.2006 durch das Landesamt für Gesundheit und Soziales Berlin stattgegeben.

#### 3.3.2.2. Bestimmung des Atomoxetingehalts

Die Löslichkeit des Atomoxetins wurde in physiologischer Kochsalzlösung getestet. Zur Überprüfung der Stabilität der Lösung wurde der Atomoxetingehalt einer 1 mg/ml Atomoxetinlösung nach einer einwöchigen Lagerung bei Kühlschranktemperatur so wie bei – 80 °C von dem Charité Centrum für diagnostische und präventive Labormedizin (Berlin, Deutschland) bestimmt.

Die Bestimmung der Gehalte erfolgte unter Verwendung eines HPLC-Systems mit Diodenarraydetektor (Firma Shimadzu Europe GmbH, Duisburg, Deutschland).

Als Laufmittel diente ein Gemisch aus Acetonitril und Phosphatpuffer (600 ml : 1020 ml) mit einem pH-Wert von 2,3. Als feste Säule wurde LiChrosorb RP-8® (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland) verwendet. Bei einer Flußrate von 1 ml/min betrug die Retentionszeit von Atomoxetin unter diesen Bedingungen ca. 9 min.

#### 3.3.2.3. Vorversuch: Wahl der Applikationsmethode

Zu Beginn sollte geklärt werden, welchen Einfluss verschiedene Applikationsmethoden auf die später zu untersuchenden Parameter haben.

Vier Gruppen (n = 6) weiblicher Sprague-Dawley-Ratten erhielten im Alter von 28 bis 42 Tagen eine Zuckerlösung mittels intraperitonealer Injektion, oral über eine Pipette, per Schlundsonde bzw. sie blieben unbehandelt. Nach einer anschließenden einwöchigen Pause wurden die Tiere auf dem Elevated Plus Maze (50. Lebenstag), über zwei Tage im Hole Board (64./65. Lebenstag) und im Free Exploratory Paradigm (78./79. Lebenstag) getestet. Das Körpergewicht wurde wöchentlich protokolliert. Im Anschluss an den letzten Verhaltenstest wurde die motorische Aktivität im gewohnten Käfig im Tageszeitverlauf mit

dem InfraMot (85.–88. Lebenstag) und frei zugängliche Laufräder gemessen (92.–95. Lebenstag). Währenddessen wurde auch die Futter- und Wasseraufnahme ermittelt.

Die tägliche Behandlung der Ratten hatte keine Auswirkungen auf die Gewichtszunahme und das Fressverhalten der Tiere. Die motorische Aktivität über 24 Stunden im gewohnten Käfig war in den einzelnen Untersuchungsgruppen gleich hoch. Das Explorationsverhalten der Ratten im Hole Board war in allen Untersuchungsgruppen gleich. Das angstbezogene Verhalten auf dem Elevated Plus Maze war bei allen vorbehandelten Tieren ähnlich. Im Free Exploratory Paradigm waren die Tiere, die oral über eine Pipette behandelt wurden, angstloser als die anderen Gruppen.

Da die Verabreichung von Atomoxetin und Methyphenidat beim Menschen oral erfolgt, wird die orale Applikation für den Tierversuch bevorzugt. Es konnten nach wiederholter intraperitonealer Injektion, oraler Gabe über eine Pipette oder per Schlundsonde und nachfolgender siebentägiger Behandlungspause keine Unterschiede in der Gewichtsentwicklung, im Fressverhalten, der motorischen Aktivität und im Angst- und Explorationsverhalten sowohl im Hole Board und als auch auf dem Elevated Plus Maze nachgewiesen werden. Eine eventuelle Verminderung des angstbezogenen Verhaltens im Free Exploratory Paradigm nach Gabe per Pipette ist zu berücksichtigen (Schmidt et al., 2007).

Für die folgenden Versuche wird die Applikation per Schlundsonde gewählt. Eine Gabe per Pipette, die generell eine weitestgehend stressfreie Lösung und optimale Dosierungsmöglichkeiten darstellt, bietet sich aufgrund des bitteren Eigengeschmacks des Atomoxetins in den gewählten Dosierungen hier nicht an.

#### 3.3.2.4. Vorversuch: Dosisfindung

Es sollte geklärt werden, welchen Einfluss verschiedene Dosierungen einer akuten Gabe von Methylphenidat und Atomoxetin auf anschließende Verhaltenstests haben.

Sechs Gruppen (n = 10) männlicher Sprague–Dawley–Ratten erhielten jeweils zwei Stunden vor den folgenden Verhaltenstests entweder 2,0 mg/kg oder 6,0 mg/kg Methylphenidat, 10,0 mg/kg, 30,0 mg/kg oder 100,0 mg/kg Atomoxetin oder reine Zuckerlösung per Schlundsonde verabreicht. Die Tiere wurden entsprechend dem späteren Versuchsschema auf dem Elevated

Plus Maze (50. Lebenstag), im Open Field (64. Lebenstag) und über zwei Tage im Free Exploratory Paradigm (78./79. Lebenstag) getestet. Das Körpergewicht wurde wöchentlich protokolliert. Im Anschluss an den letzten Verhaltenstest wurde die motorische Aktivität über 24 Stunden im gewohnten Käfig mit dem InfraMot und frei zugängliche Laufräder gemessen. Es wurde auch die Futter- und Wasseraufnahme nach Substanzgabe ermittelt.

Im Elevated Plus Maze verhielten sich die Tiere der Gruppe 6,0 mg/kg Methylphenidat aktiver, die Tiere, denen 100,0 mg/kg Atomoxetin verabreicht wurde, inaktiver. Die Tiere mit den niedrigeren Atomoxetindosierungen schienen weniger ängstlich. Im Open Field durchliefen die mit 6,0 mg/kg Methylphenidat behandelten Tiere deutlich mehr Lichtschranken, sie zeigten sich wie auch die 2,0 mg/kg Methylphenidat- und 10,0 mg/kg Atomoxetin-Tiere explorativer. Im Free Exploratory waren die Tiere der Gruppe 6,0 mg/kg Methylphenidat wiederum aktiver, die Tiere mit den niedrigeren Atomoxetindosierungen weniger ängstlich. Die motorische Aktivität im gewohnten Käfig und im Laufrad war in beiden Methylphenidatgruppen gesteigert. Die Futter- und Wasseraufnahme war bei der höheren Atomoxetindosierung herabgesetzt, bei der niedrigen gesteigert. Die Gewichtszunahmen der 6,0 mg/kg Methylphenidat-Tiere sind leicht erhöht.

Insgesamt scheint die Gabe von 6,0 mg/kg Methylphenidat einen ausgeprägten aktivitätssteigernden, die Gabe von 100,0 mg/kg Atomoxetin eher einen sedativen Effekt auszuüben. Die Dosierungen bei der ADHS-Behandlung sind so gewählt, dass diese Effekte vermieden werden. Für die chronische Applikation werden die Dosierungen Methylphenidat 2,0 mg/kg/Tag und Atomoxetin 10 mg/kg/Tag und 30 mg/kg/Tag gewählt.

### **3.3.3. Versuchsdurchführung**

Es wurden sechs zeitlich versetzt aufeinander folgende Versuchsreihen durchgeführt, die von Versuchsbeginn an jeweils eine Dauer von 80 Tagen in Anspruch nahmen. In jeder Versuchsreihe wurden jeweils zwei „Wirkstoff-Gruppen“ und eine Kontrollgruppe getestet, die wiederum aus jeweils fünf Weibchen und fünf Männchen bestanden. Dies ermöglichte eine Versuchsdurchführung mit angemessener Tierzahl pro Zeiteinheit. Zudem wurden jahreszeitliche Einflüsse und sonstige exogene Störfaktoren auf nur eine bestimmte Gruppe möglichst gering gehalten.

Die Substanzgabe wurde zwischen 9.00 und 10.00 im gewohnten Tierstall durchgeführt.

Das InfraMot und Wheel Running erfolgte über mehrere Tage in gesonderten Tierställen.

Von den Verhaltenstests erfolgten das Free Exploratory Paradigm sowie das Rota Rod in der gewohnten Umgebung.

Für die anderen Verhaltenstests wurden die Tiere um 8.00 in den Versuchsraum verbracht, um sich zu akklimatisieren und damit einen möglichen Einfluss des Transportstresses auf die bevorstehenden Versuche zu vermeiden. Die Versuchsapparaturen befanden sich in einer schallgeschützten, gleichmäßig gut ausgeleuchteten Untersuchungsbox (1,8 m x 1,8 m x 2,3 m). Die Versuche konnten über eine in der Untersuchungskammer angebrachten Videokamera (Panasonic WV-F15E, Matsushita Communication, Yokohama, Japan), die an einen außerhalb der Kammer befindlichen Monitor (Panasonic, TX-28A2C, Matsushita Electric, Cardiff, United Kingdom) angeschlossen war, überwacht werden. Gleichzeitig wurden die Versuche mittels eines Videorecorders (Panasonic, NV-HS86O, Matsushita Audio Video GmbH, Peine, Deutschland) aufgezeichnet. Alle Verhaltenstests begannen morgens um 10.00. Die Versuchsdauer betrug je nach Verhaltenstest 5 oder 10 min. Die Versuchsapparaturen wurden zwischen den einzelnen Testdurchläufen mit 50 %igem Propanol (Meliseptol ®, B.Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland) gereinigt, um Duftmarken etc. des Vorgängertiers zu entfernen.

Im Anschluss an die Verhaltensversuche erfolgten die analytische Untersuchung der Neurotransmitterkonzentrationen im Gehirn und die statistischen Auswertungen.

### **3.4. VERSUCHSAUSWERTUNG UND STATISTIK**

Die Stichprobengröße (n) bestand aus zehn weiblichen und zehn männlichen Ratten pro Versuch und Gruppe. Beim InfraMot, Wheelrunning, dem Free Exploratory Paradigm, der Messung des Futter- und Wasserverbrauchs sowie der Körpergewichte erhöhte sich die Anzahl auf 20 Tiere.

Für die Bestimmung der Konzentration von Methylphenidat und Atomoxetin im Blutplasma wurden fünf männliche Tiere pro Gruppe verwendet, für die Bestimmung der Serotonin-, Dopamin- und NoradrenalinKonzentrationen in verschiedenen Gehirnregionen jeweils fünf männliche und weibliche Ratten.

Die Irrtumswahrscheinlichkeit  $\alpha$ , bei deren Unterschreitung die Nullhypothese als widerlegt angenommen wird, wurde auf  $\alpha = 0,05$  festgelegt.

War der p-Wert (Überschreitungswahrscheinlichkeit)  $< \alpha$  wurde die Wahrscheinlichkeit, dass die Abweichung von der Nullhypothese nicht zufallsbedingt war, als signifikant bezeichnet. Je weiter der p-Wert unterhalb der Irrtumswahrscheinlichkeit lag, desto höher wurde die Informationsqualität angesehen. Die Unterschiede in der Qualität wurden wie folgt gekennzeichnet:  $p < 0,05$  \*,  $p < 0,01$  \*\*,  $p < 0,001$  \*\*\*.

Als Tendenz wurde eine Irrtumswahrscheinlichkeit  $p < 0,10$  bezeichnet.

Die statistische Auswertung erfolgte mit Hilfe von SigmaStat Version 3.0 (Systat Software GmbH, Erkrath, Deutschland). Die graphische Darstellung erfolgte in Form von Box Plots und Line and Scatter Plots mit der SigmaPlot Version 8.0 (Systat Software GmbH, Erkrath, Deutschland).

Es wurde von einer Normalverteilung der Werte ausgegangen.

Beim Vergleich mehrerer Gruppen (Atomoxetin) erfolgte die Berechnung der Signifikanz mit der One Way Analysis Of Variance (ANOVA).

Wenn keine Normalverteilung vorlag, erfolgte die Berechnung der Signifikanz mit der Kruskal–Wallis ANOVA on Ranks. Daraufhin folgte der Vergleich zur Kontrollgruppe mit der Dunn's Methode oder dem Bonferroni t-Test.

Beim Vergleich von zwei Gruppen (Methylphenidat) wurde die Signifikanz mit dem Student's t-Test bzw. dem Mann–Whitney–U-Test (Mann–Whitney–Rank–Sum–Test) überprüft.

Beim InfraMot und Wheel Running wurde zuerst die Fläche unter den Einzelkurven pro Gruppe berechnet.

Die statistische Versuchsauswertung der Gewichtsentwicklung der Tiere erfolgte mit der Two Way Repeated Measures ANOVA.

Tiere, die vom Elevated Plus Maze gefallen sind, wurden nicht in die statistische Auswertung einbezogen.

Drei Tiere verstarben während der Medikamentenapplikation.

### 3.5. ERGEBNISSE

#### 3.5.1. Ergebnisse der physiologischen Untersuchungen

##### 3.5.1.1. Nahrungs- und Wasseraufnahme

Die Messung der Nahrungs- und Wasseraufnahme während der Gruppenhaltung am 37. Lebensstag ergab eine tendenziell verminderte Futtermittelaufnahme bei den mit 30 mg/kg behandelten weiblichen Jungtieren ( $P = 0,057^+$ , s. Abb.14a, Tab.1).

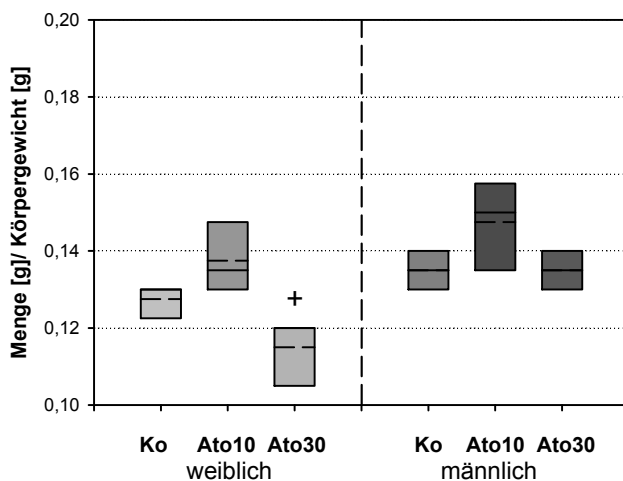
Bei den adulten Ratten hatten die mit Methylphenidat behandelten männlichen Tiere einen geringeren Futtermittelverbrauch ( $P = 0,047^*$ , s. Abb.14c, Tab.1)

(Ausreißer nach unten im Wasser- und konsekutiv im Futtermittelverbrauch sind auf minderdurchlässige Nippeltränken zurückzuführen. Da diese gleichmäßig über alle Gruppen verteilt sind, wurden sie in der Auswertung belassen.)

Abb.14: Nahrungs- und Wasseraufnahme

#### a.) Futtermittelverbrauch pro Körpergewicht in Gruppenhaltung (37. Lebensstag)

##### A. Atomoxetin



##### B. Methylphenidat

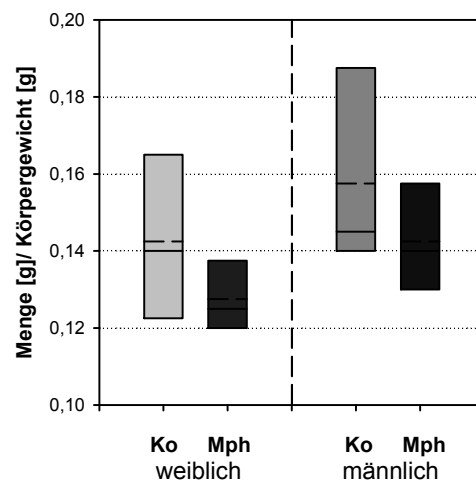
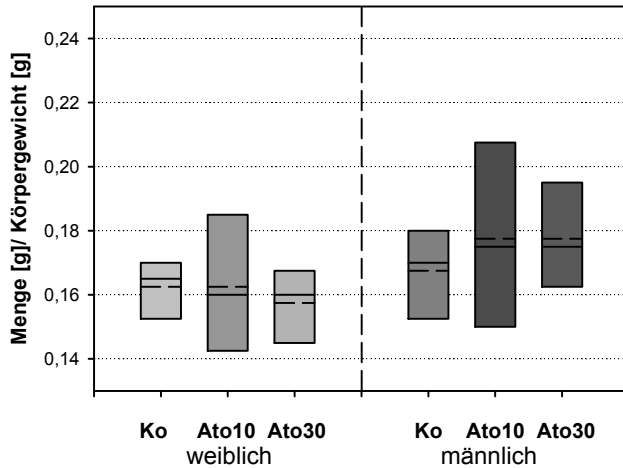


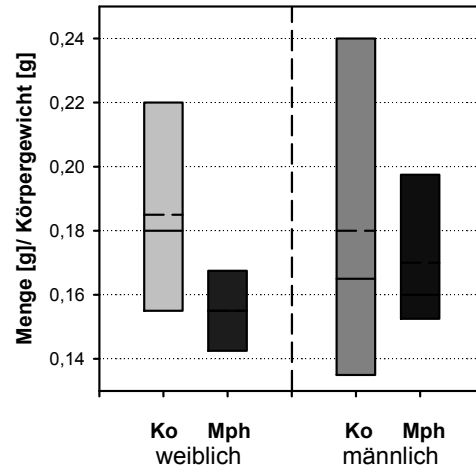
Abb.14a: Nahrungsaufnahme in Gruppenhaltung bei jugendlichen CrI:CD(SD)-Ratten. (A) Behandlung mit Atomoxetin, (B) Behandlung mit Methylphenidat. Dargestellt sind die Werte als Box Plots mit Median (durchgezogene Linie) und 25./75. Perzentile. Zusätzlich ist der Mittelwert (gestrichelte Linie) angegeben.  $n = 4$  Gruppen/20 Tiere.  $p < 0,1^+$ .

## b.) Wasserverbrauch pro Körpergewicht in Gruppenhaltung (37. Lebensstag)

### A. Atomoxetin



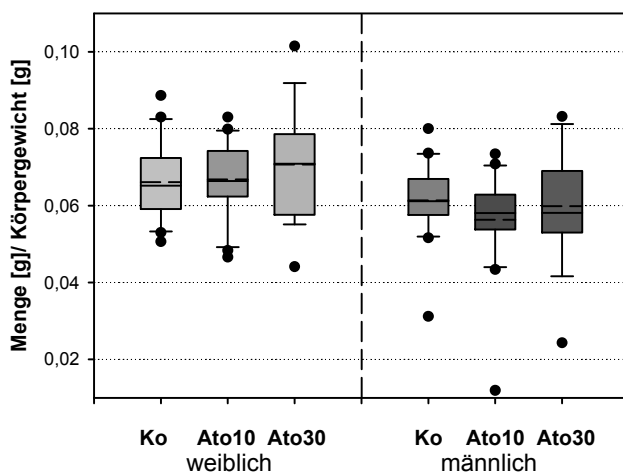
### B. Methylphenidat



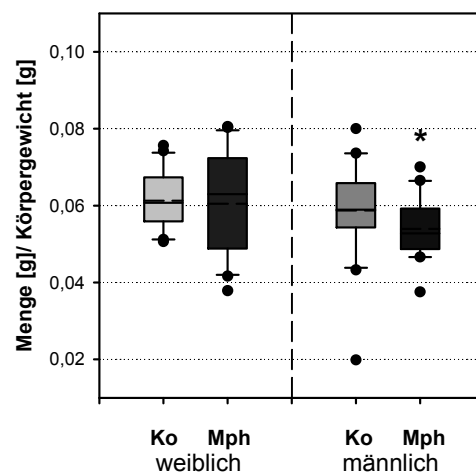
**Abb.14b:** Wasseraufnahme in Gruppenhaltung bei jugendlichen Crl:CD(SD)–Ratten. (A) Behandlung mit Atomoxetin, (B) Behandlung mit Methylphenidat. Dargestellt sind die Werte als Box Plots mit Median (durchgezogene Linie) und 25./75. Perzentile. Zusätzlich ist der Mittelwert (gestrichelte Linie) angegeben.  $n = 4$  Gruppen/20 Tiere.

## c.) Futtermittelverbrauch pro Körpergewicht der erwachsenen Tiere während Einzelsetzung (92. Lebensstag)

### A. Atomoxetin



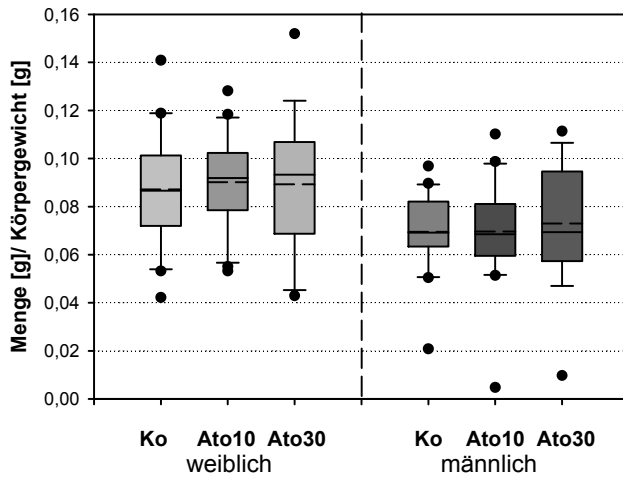
### B. Methylphenidat



**Abb.14c:** Nahrungsaufnahme in Einzelsetzung bei erwachsenen Crl:CD(SD)–Ratten. (A) Behandlung mit Atomoxetin, (B) Behandlung mit Methylphenidat. Dargestellt sind die Werte als Box Plots mit Median (durchgezogene Linie) und 25./75. Perzentile. Zusätzlich sind der Mittelwert (gestrichelte Linie) und –wenn vorhanden– Ausreißer angegeben.  $n = 20$ /Gruppe,  $n(\text{♀ Ato 10}) = 19$ ,  $n(\text{♂ Ato 30}) = 18$ .  $p < 0,05^*$ .

### d.) Wasserverbrauch pro Körpergewicht der erwachsenen Tiere während Einzelsetzung (92. Lebenstag)

#### A. Atomoxetin



#### B. Methylphenidat

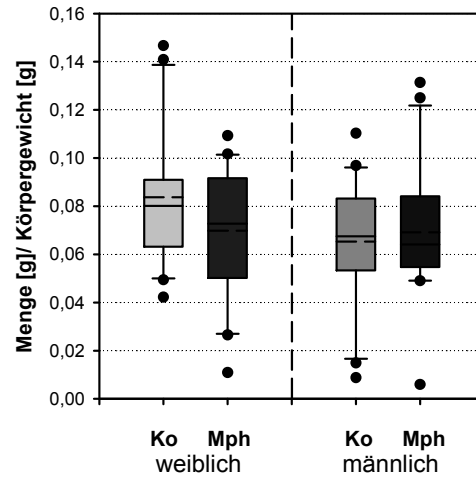


Abb.14d: Wasseraufnahme in Einzelsetzung bei erwachsenen Crl:CD(SD)-Ratten. (A) Behandlung mit Atomoxetin, (B) Behandlung mit Methylphenidat. Dargestellt sind die Werte als Box Plots mit Median (durchgezogene Linie) und 25./75. Perzentile. Zusätzlich sind der Mittelwert (gestrichelte Linie) und –wenn vorhanden– Ausreißer angegeben.  $n = 20/\text{Gruppe}$ ,  $n_{\text{♀ Ato 10}} = 19$ ,  $n_{\text{♂ Ato 30}} = 18$ .

Tab.1: Nahrungs- und Wasseraufnahme

#### A. Atomoxetin

Nahrungs- u. Wasser- aufnahme	w Ko (n=4/20)	w Ato 10mg/kg (n=4/20)	w Ato 30mg/kg (n=4/19)	m Ko (n=4/20)	m Ato 10mg/kg (n=4/20)	m Ato 30mg/kg (n=4/18)
<b>Futter (Gruppe)</b> [g/gKG]	0,13 [0,13/0,13]	0,14 [0,13/0,15]	0,12 <sup>+</sup> [0,11/0,12]	0,14 (0,01/0,0)	0,15 (0,01/0,1)	0,14 (0,01/0,0)
<b>Wasser (Gruppe)</b> [g/gKG]	0,16 (0,01/0,0)	0,16 (0,02/0,01)	0,16 (0,01/0,01)	0,17 [0,16/0,18]	0,18 [0,15/0,21]	0,18 [0,17/0,19]
<b>Futter (einzeln)</b> [g/gKG]	0,07 [0,06/0,07]	0,07 [0,06/0,07]	0,07 [0,06/0,08]	0,06 [0,06/0,07]	0,06 [0,05/0,06]	0,06 [0,05/0,07]
<b>Wasser (einzeln)</b> [g/gKG]	0,09 (0,02/0,01)	0,09 (0,02/0,0)	0,09 (0,03/0,01)	0,07 (0,02/0,0)	0,07 (0,02/0,0)	0,07 (0,03/0,01)

Tab.1A: Nahrungs- und Wasseraufnahme von periadoleszenten und erwachsenen Crl:CD(SD)-Ratten. Behandlung mit Atomoxetin. Angegeben sind die Mittelwerte mit Standardabweichung und Standardfehler bei normalverteilten Werten (gekennzeichnet durch runde Klammern) bzw. die Mediane mit 25./75. Perzentile bei unabhängiger Verteilung der Werte (gekennzeichnet durch *kursive* Schrift und eckige Klammern).  $p < 0,1^+$ . Alle Felder, in denen  $p < 0,10$  sind zur besseren Übersicht hellgrau unterlegt. Die Zahlenwerte sind auf zwei Stellen hinter dem Komma aufgerundet.

#### B. Methylphenidat



Nahrungs- u. Wasser- aufnahme	w Ko (n=4/20)	w Mph 2mg/kg (n=4/20)	m Ko (n=4/20)	m Mph 2mg/kg (n=4/20)
<b>Futter (Gruppe)</b> [g/gKG]	0,14 (0,02/0,01)	0,13 (0,01/0,0)	0,16 (0,03/0,01)	0,14 (0,02/0,01)
<b>Wasser (Gruppe)</b> [g/gKG]	0,16 (0,01/0,01)	0,19 (0,03/0,02)	0,17 (0,03/0,01)	0,18 (0,06/0,03)
<b>Futter (einzeln)</b> [g/gKG]	<i>0,06</i> [0,06/0,07]	<i>0,06</i> [0,05/0,07]	<i>0,06</i> [0,05/0,07]	<i>0,05*</i> [0,05/0,06]
<b>Wasser (einzeln)</b> [g/gKG]	0,08 (0,03/0,01)	0,07 (0,03/0,01)	0,07 (0,03/0,01)	0,07 (0,03/0,01)

Tab.1B: Nahrungs- und Wasseraufnahme von periadoleszenten und erwachsenen Crl:CD(SD)-Ratten. Behandlung mit Methylphenidat. Angegeben sind die Mittelwerte mit Standardabweichung und Standardfehler bei normalverteilten Werten (gekennzeichnet durch runde Klammern) bzw. die Mediane mit 25./75. Perzentile bei unabhängiger Verteilung der Werte (gekennzeichnet durch *kursive* Schrift und eckige Klammern).  $p < 0,05^*$ . Alle Felder, in denen  $p < 0,10$  sind zur besseren Übersicht hellgrau unterlegt. Die Zahlenwerte sind auf zwei Stellen hinter dem Komma aufgerundet.

### 3.5.1.2. Körpergewicht

Während der Wirkstoffapplikation vom 27. bis zum 43. Lebenstag kam es zu einer erhöhten Gewichtszunahme der weiblichen Ratten, die mit 10 mg/kg Atomoxetin behandelt wurden ( $P = 0,039^*$ , s. Abb.15a). Das Gewicht der mit 10 mg/kg Atomoxetin behandelten Ratten blieb auch während der gesamten folgenden Versuchszeit erhöht ( $P = 0,038^*$ , s. Abb.15b).

Bei allen weiteren Gruppen hatte die Behandlung keine Auswirkungen auf das Körpergewicht. Die Gewichte der männlichen Tiere lagen naturgemäß höher als die der weiblichen (s. Abb.15a, b).

### 3.5.1.3. Körperlänge und Body Mass Index

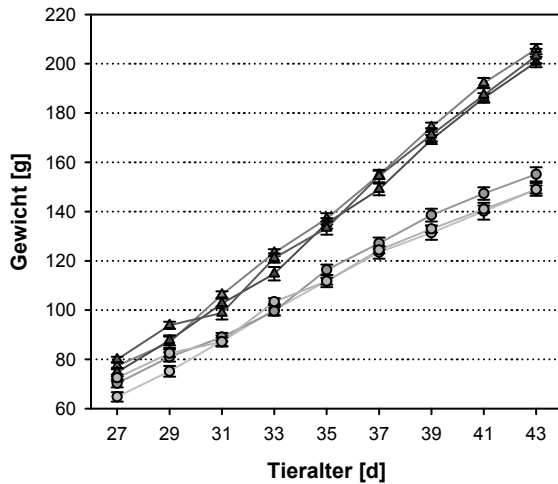
Die Messung der Körperlänge von Nasenspitze zum Schwanzansatz am 101. Lebenstag zeigte keine signifikanten Unterschiede zwischen den Behandlungsgruppen (s. Abb.16a, Tab.2). Wie zu erwarten waren die männlichen Tiere im Vergleich zu den weiblichen Tieren länger.

Der BMI der mit 30 mg/kg Atomoxetin behandelten weiblichen Ratten war erhöht ( $P = 0,016^*$ , s. Abb.16b, Tab.2).

Abb.15: Körpergewicht

a.) Körpergewicht während Wirkstoffapplikation  
(27.–43. Lebenstag)

## A. Atomoxetin



## B. Methylphenidat

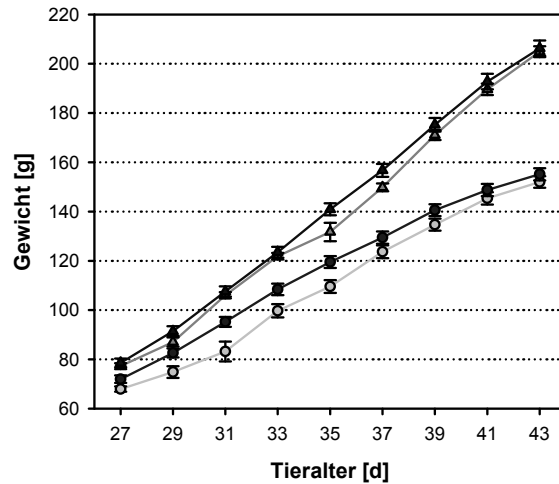
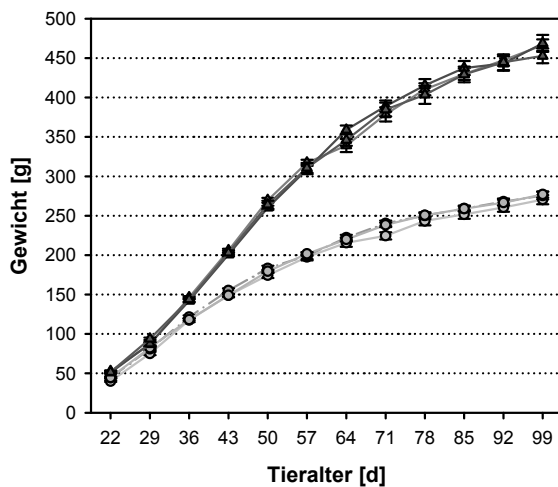


Abb.15a: Körpergewichtszunahmen von Crl:CD(SD)–Ratten während der Wirkstoffapplikation. (A) Behandlung mit Atomoxetin, (B) Behandlung mit Methylphenidat. Dargestellt sind die Werte als Line and Scatter Plots mit Mittelwert und Standardfehler.  $n = 20/\text{Gruppe}$ ,  $n(\text{♂ Ato } 30) = 18$ ,  $n(\text{♀ Ato } 10) = 19$ . ♂ Ko, ♂ Ato 10, ♂ Ato 30, ♂ Mph, ♀ Ko, ♀ Ato 10, ♀ Ato 30, ♀ Mph.

b.) Körpergewicht während des gesamten Versuchsdurchlaufs  
(22.–99. Lebenstag)

## A. Atomoxetin



## B. Methylphenidat

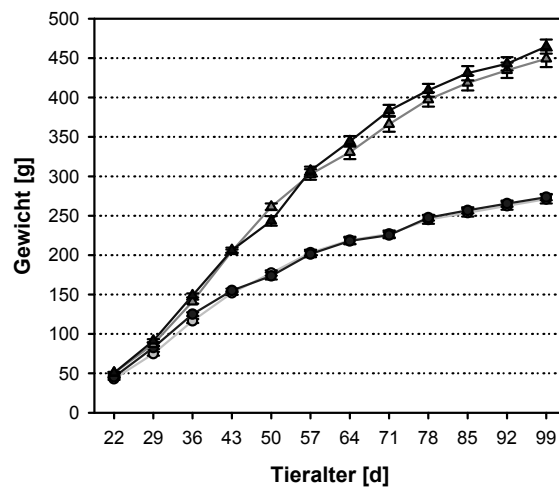
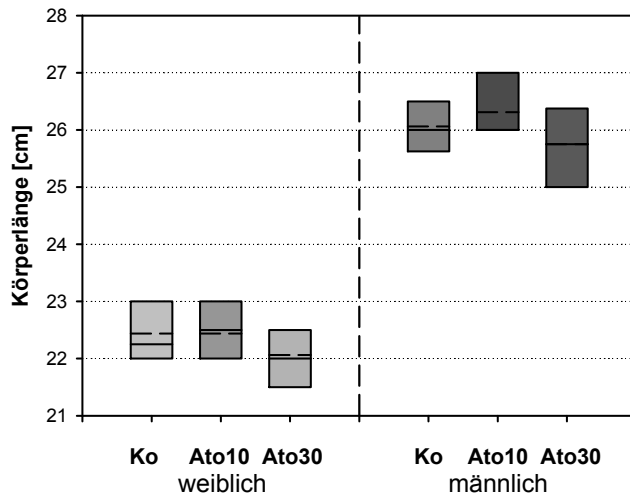


Abb.15b: Körpergewichtszunahmen von Crl:CD(SD)–Ratten während des gesamten Versuchsdurchlaufs. (A) Behandlung mit Atomoxetin, (B) Behandlung mit Methylphenidat. Dargestellt sind die Werte als Line and Scatter Plots mit Mittelwert und Standardfehler.  $n = 20/\text{Gruppe}$ ,  $n(\text{♂ Ato } 30) = 18$ ,  $n(\text{♀ Ato } 10) = 19$ . ♂ Ko, ♂ Ato 10, ♂ Ato 30, ♂ Mph, ♀ Ko, ♀ Ato 10, ♀ Ato 30, ♀ Mph.

Abb.16: Körperlänge und Body Mass Index

### a.) Körperlänge (101. Lebenstag)

#### A. Atomoxetin



#### B. Methylphenidat

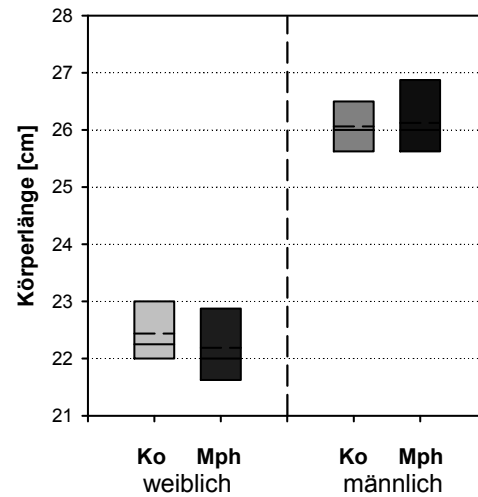
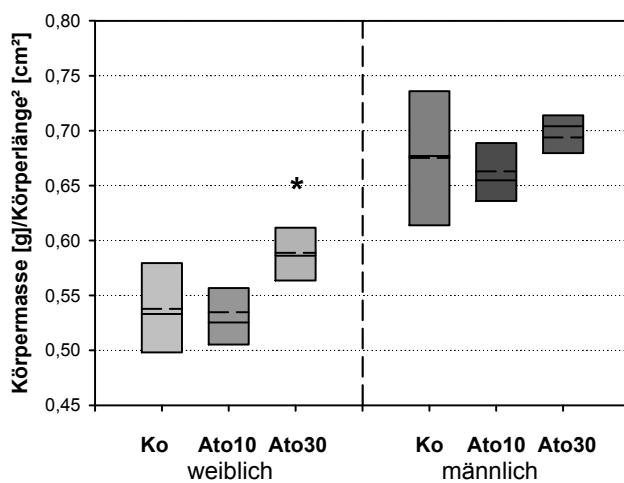


Abb.16a: Körperlänge von erwachsenen Crl:CD(SD)-Ratten. (A) Behandlung mit Atomoxetin, (B) Behandlung mit Methylphenidat. Dargestellt sind die Werte als Box Plots mit Median (durchgezogene Linie) und 25./75. Perzentile. Zusätzlich ist der Mittelwert (gestrichelte Linie) angegeben.  $n = 8/\text{Gruppe}$ .

### b.) Body Mass Index (101. Lebenstag)

#### A. Atomoxetin



#### B. Methylphenidat

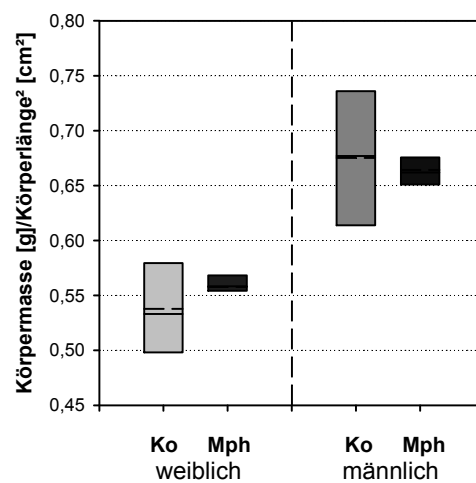


Abb.16b: Body Mass Index von erwachsenen Crl:CD(SD)-Ratten. (A) Behandlung mit Atomoxetin, (B) Behandlung mit Methylphenidat. Dargestellt sind die Werte als Box Plots mit Median (durchgezogene Linie) und 25./75. Perzentile. Zusätzlich ist der Mittelwert (gestrichelte Linie) angegeben.  $n = 8/\text{Gruppe}$ .  $p < 0,05^*$ .

Tab. 2: Körperlänge und Body Mass Index

## A. Atomoxetin

Körperlänge+ BMI	w Ko (n=8)	w Ato 10mg/kg (n=8)	w Ato 30mg/kg (n=8)	m Ko (n=8)	m Ato 10mg/kg (n=8)	m Ato 30mg/kg (n=8)
Körperlänge [cm]	22,44 (0,9/0,32)	22,44 (0,56/0,2)	22,06 (0,56/0,2)	26,06 (0,62/0,22)	26,31 (0,59/0,21)	25,75 (0,76/0,27)
Body Mass Index [g/cm <sup>2</sup> ]	0,54 (0,04/0,01)	0,54 (0,04/0,01)	0,59* (0,03/0,01)	0,68 (0,06/0,02)	0,66 (0,04/0,01)	0,69 (0,05/0,02)

Tab. 2A: Körperlänge und BMI von erwachsenen CrI:CD(SD)-Ratten. Behandlung mit Atomoxetin. Angegeben sind die Mittelwerte mit Standardabweichung und Standardfehler bei normalverteilten Werten (gekennzeichnet durch runde Klammern) bzw. die Mediane mit 25./75. Perzentile bei unabhängiger Verteilung der Werte (gekennzeichnet durch *kursive* Schrift und eckige Klammern).  $p < 0,05^*$ . Alle Felder, in denen  $p < 0,10$  sind zur besseren Übersicht hellgrau unterlegt. Die Zahlenwerte sind auf zwei Stellen hinter dem Komma aufgerundet.

## B. Methylphenidat

Körperlänge+ BMI	w Ko (n=8)	w Mph 2mg/kg (n=8)	m Ko (n=8)	m Mph 2mg/kg (n=8)
Körperlänge [cm]	22,44 (0,9/0,32)	22,19 (0,59/0,21)	26,06 (0,62/0,22)	26,13 (0,69/0,25)
Body Mass Index [g/cm <sup>2</sup> ]	0,54 (0,04/0,01)	0,56 (0,03/0,01)	0,68 [0,62/0,73]	0,66 [0,65/0,67]

Tab. 2B: Körperlänge und BMI von erwachsenen CrI:CD(SD)-Ratten. Behandlung mit Methylphenidat. Angegeben sind die Mittelwerte mit Standardabweichung und Standardfehler bei normalverteilten Werten (gekennzeichnet durch runde Klammern) bzw. die Mediane mit 25./75. Perzentile bei unabhängiger Verteilung der Werte (gekennzeichnet durch *kursive* Schrift und eckige Klammern).

## 3.5.1.4. Motorische Aktivität

Während der gesamten Zeit der Wirkstoffapplikation war die Aktivität in der Gruppe der mit 2 mg/kg Methylphenidat behandelten männlichen Ratten deutlich erhöht ( $P = 0,006^{**}$ , s. Abb.17a). Eine tendenziell vermehrte Aktivität war auch bei den mit 10 mg/kg Atomoxetin behandelten weiblichen Jungtieren auszumachen ( $P = 0,098^+$ , s. Abb.17a).

Bereits bei Beginn der Wirkstoffgabe (zweiter bis vierter Tag) war die motorische Aktivität bei den mit 2 mg/kg Methylphenidat behandelten männlichen Ratten erhöht ( $P = 0,029^*$ , s. Abb.17b). Zum Ende (11.–13. Tag der Behandlung) hin konnte auch eine Tendenz zur

Aktivitätssteigerung bei den weiblichen mit 2 mg/kg Methylphenidat behandelten Ratten festgestellt werden ( $P = 0,089^+$ , s. Abb.17c), die aktivitätssteigernde Wirkung des Methylphenidats bei den männlichen Tieren war noch ausgeprägter ( $P = <0,001^{***}$ , s. Abb.17c).

In den anderen Behandlungsgruppen zeigten sich keine Unterschiede zwischen Beginn und Ende der Behandlung.

Allgemein ist in allen Gruppen eine Aktivitätserhöhung mit steigendem Alter erkennbar sowie die Verschiebung der Aktivität in die Nacht hinein und ein Tagesaktivitätspeak am Vormittag.

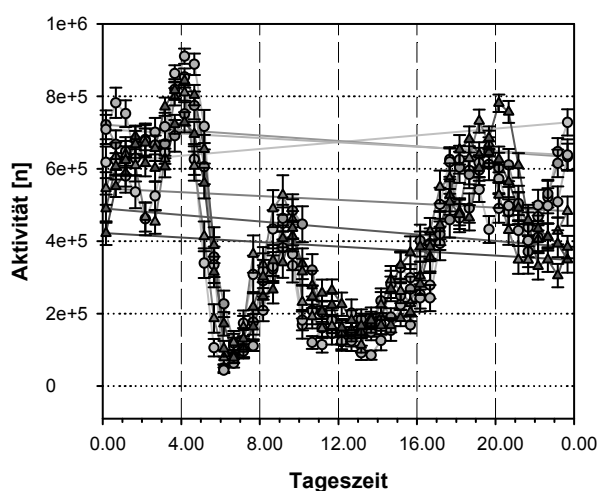
Die Untersuchung der Aktivität der erwachsenen Tiere in Einzelsetzung zeigte weder im InfraMot noch im Wheel Running Unterschiede zwischen den verschiedenen Behandlungsgruppen.

Ein Aktivitätsunterschied zwischen weiblichen und männlichen Tieren im Wheel Running war deutlich sichtbar.

Abb.17: Motorische Aktivität

**a.) InfraMot: Aktivität der Gruppe während Wirkstoffapplikation  
(28.–42. Lebenstag)**

A. Atomoxetin



B. Methylphenidat

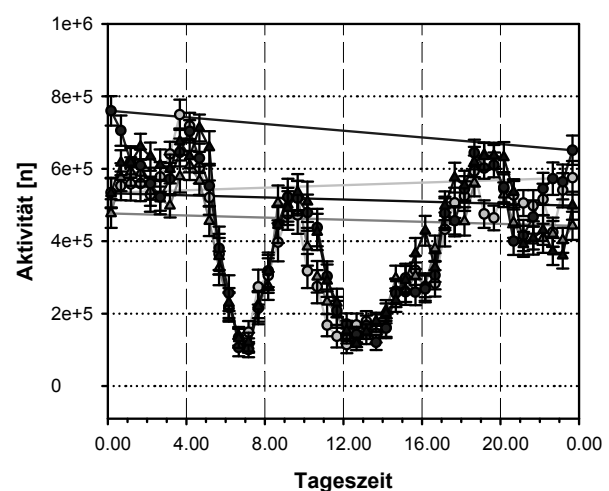
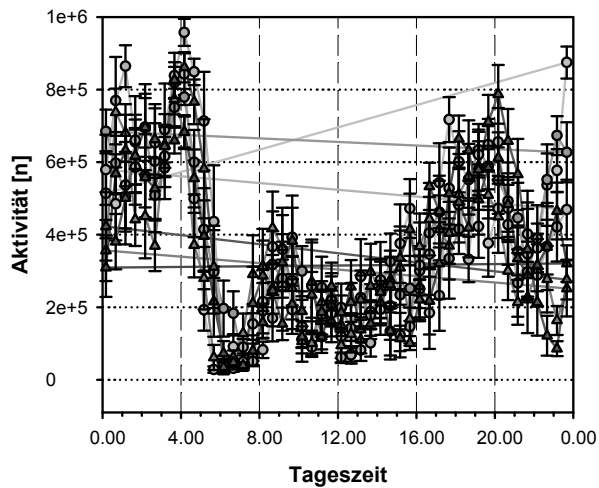


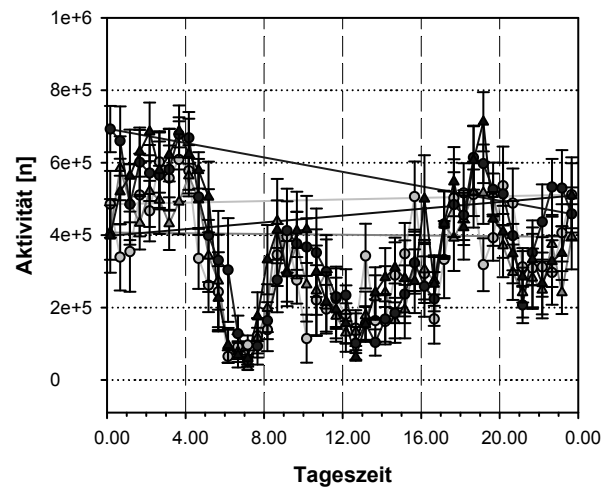
Abb.17a: Aktivität in Gruppenhaltung bei jugendlichen Crl:CD(SD)–Ratten im InfraMot über den gesamten Zeitraum der Wirkstoffapplikation hinweg. (A) Behandlung mit Atomoxetin, (B) Behandlung mit Methylphenidat. Dargestellt sind die Werte als Line and Scatter Plots mit Mittelwert und Standardfehler.  $n = 20/\text{Gruppe}$ . ♀ **Ko**, ♀ **Ato 10**, ♀ **Ato 30**, ♀ **Mph**, ♂ **Ko**, ♂ **Ato 10**, ♂ **Ato 30**, ♂ **Mph**.

**b.) InfraMot: Aktivität der Gruppe zu Beginn der Wirkstoffapplikation  
(29.–31. Lebenstag)**

**A. Atomoxetin**



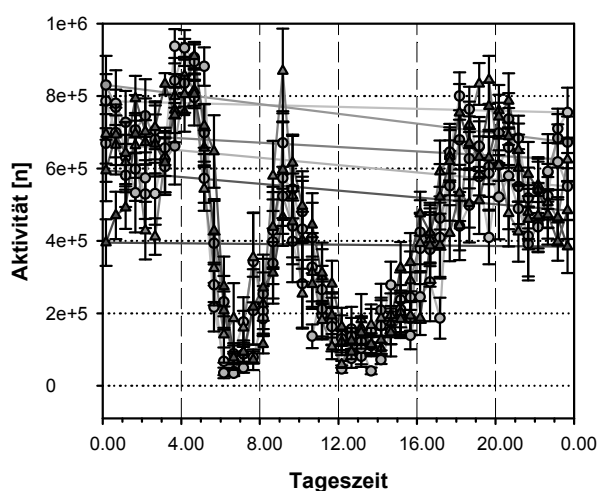
**B. Methylphenidat**



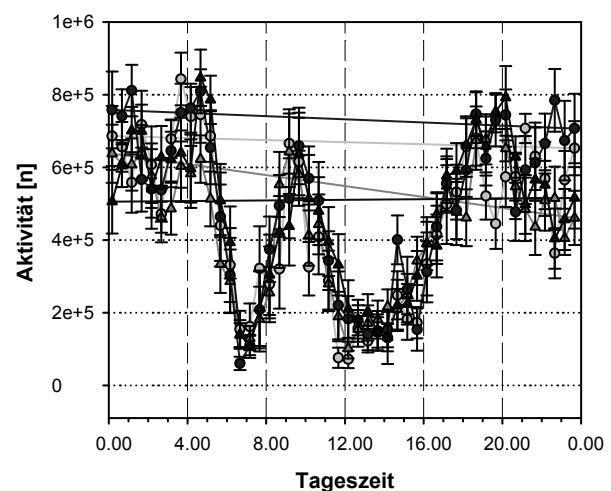
**Abb.17b:** Aktivität in Gruppenhaltung bei jugendlichen Crl:CD(SD)–Ratten im InfraMot zu Beginn der Wirkstoffapplikation. (A) Behandlung mit Atomoxetin, (B) Behandlung mit Methylphenidat. Dargestellt sind die Werte als Line and Scatter Plots mit Mittelwert und Standardfehler.  $n = 20/\text{Gruppe}$ . ♀ **Ko**, ♀ **Ato 10**, ♀ **Ato 30**, ♀ **Mph**, ♂ **Ko**, ♂ **Ato 10**, ♂ **Ato 30**, ♂ **Mph**.

**c.) InfraMot: Aktivität der Gruppe am Ende der Wirkstoffapplikation  
(39.–41. Lebenstag)**

**A. Atomoxetin**



**B. Methylphenidat**



**Abb.17c:** Aktivität in Gruppenhaltung bei jugendlichen Crl:CD(SD)–Ratten im InfraMot am Ende der Wirkstoffapplikation. (A) Behandlung mit Atomoxetin, (B) Behandlung mit Methylphenidat. Dargestellt sind die Werte als Line and Scatter Plots mit Mittelwert und Standardfehler.  $n = 20/\text{Gruppe}$ . ♀ **Ko**, ♀ **Ato 10**, ♀ **Ato 30**, ♀ **Mph**, ♂ **Ko**, ♂ **Ato 10**, ♂ **Ato 30**, ♂ **Mph**.

**d.) InfraMot: Aktivität der erwachsenen Tiere während Einzelsetzung**  
(85.–88/ 89.–92./ 93.–96. Lebensstag)

A. Atomoxetin

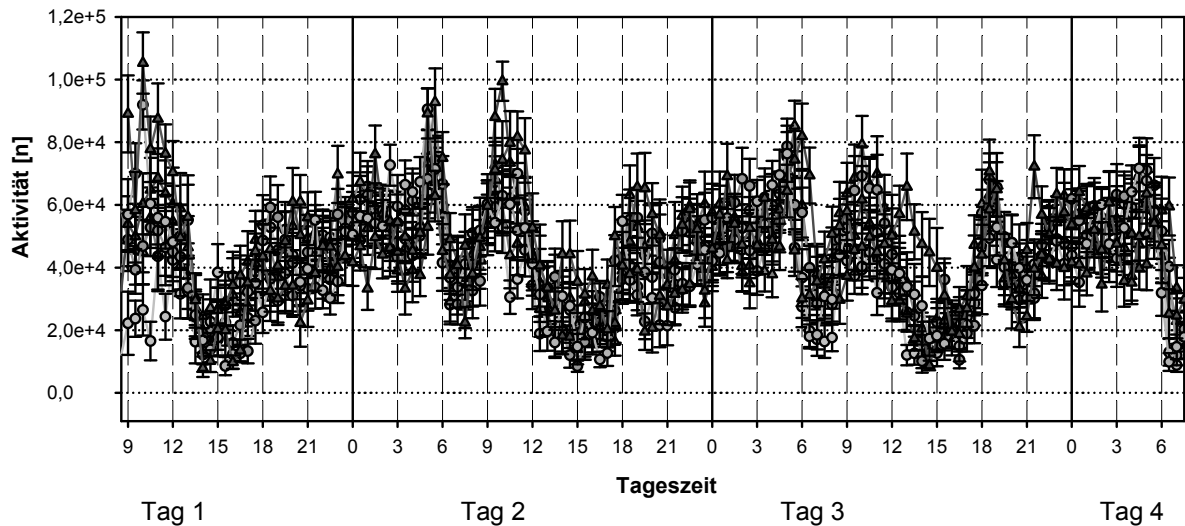


Abb.17d A: Aktivität in Einzelhaltung bei erwachsenen Crl:CD(SD)–Ratten im InfraMot. Behandlung mit Atomoxetin. Dargestellt sind die Werte als Line and Scatter Plots mit Mittelwert und Standardfehler.  $n = 20/\text{Gruppe}$ ,  $n(\text{♀ Ato } 10) = 19$ ,  $n(\text{♂ Ato } 30) = 18$ . ♀ Ko, ♀ Ato 10, ♀ Ato 30, ♂ Ko, ♂ Ato 10, ♂ Ato 30.

B. Methylphenidat

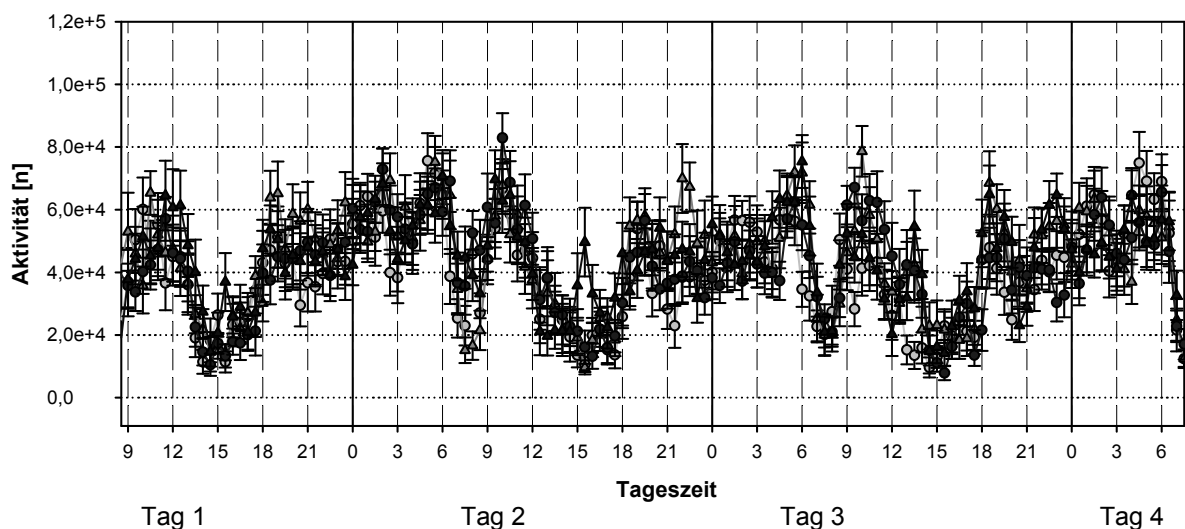
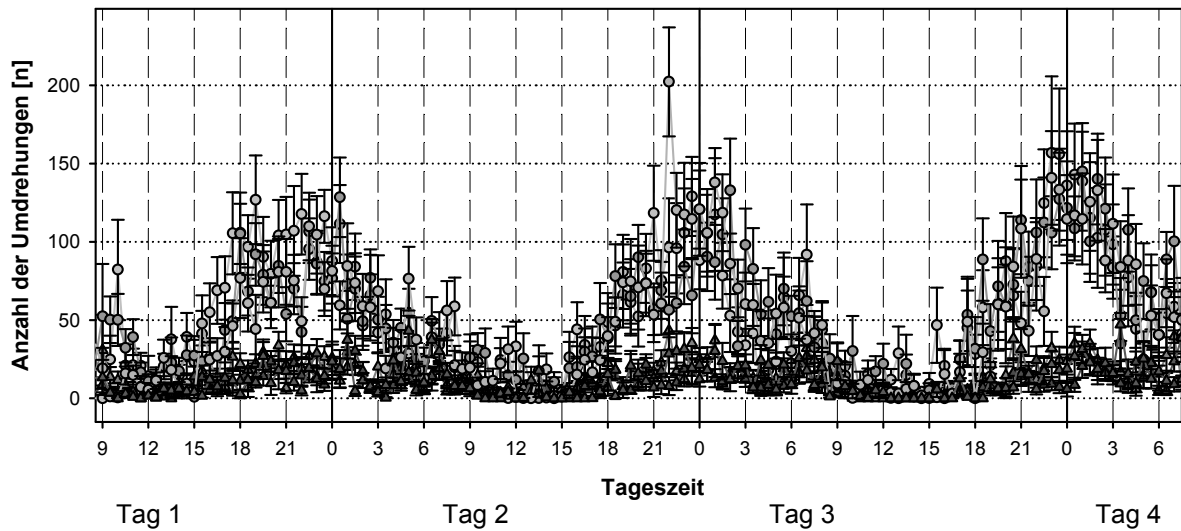


Abb.17d B: Aktivität in Einzelhaltung bei erwachsenen Crl:CD(SD)–Ratten im InfraMot. Behandlung mit Methylphenidat. Dargestellt sind die Werte als Line and Scatter Plots mit Mittelwert und Standardfehler.  $n = 20/\text{Gruppe}$ . ♀ Ko, ♀ Mph, ♂ Ko, ♂ Mph.

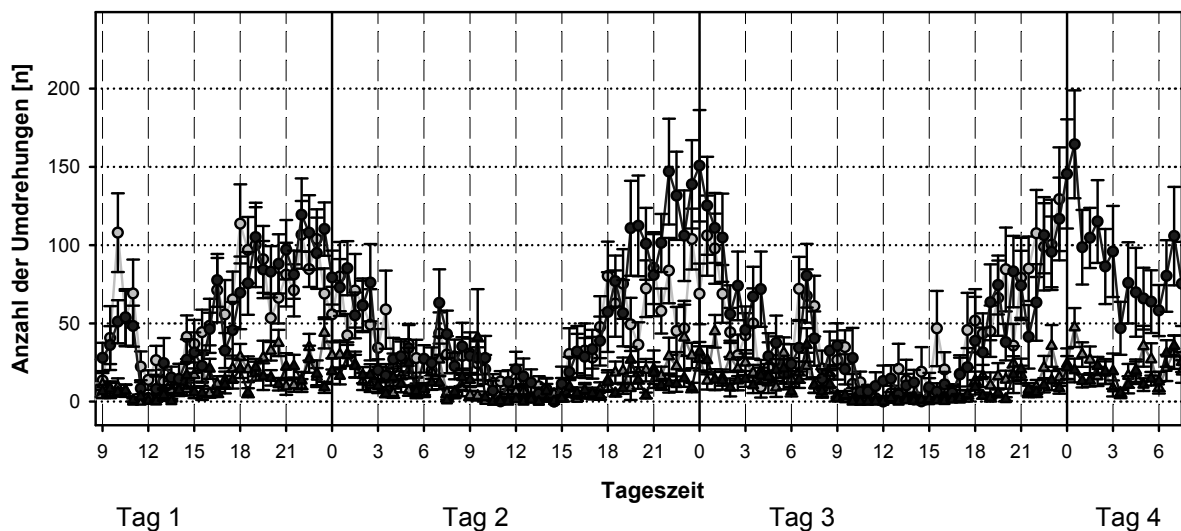
**e.) Wheel Running: Aktivität der erwachsenen Tiere während Einzelsetzung  
(85.–88/ 89.–92./ 93.–96. Lebenstag)**

**A. Atomoxetin**



**Abb.17e A:** Aktivität in Einzelhaltung bei erwachsenen Crl:CD(SD)–Ratten im Wheel Running. Behandlung mit Atomoxetin. Dargestellt sind die Werte als Line and Scatter Plots mit Mittelwert und Standardfehler.  $n = 20/\text{Gruppe}$ ,  $n(\text{♀ Ato } 10) = 19$ ,  $n(\text{♂ Ato } 30) = 18$ . ♀ Ko, ♀ Ato 10, ♀ Ato 30, ♂ Ko, ♂ Ato 10, ♂ Ato 30.

**B. Methylphenidat**



**Abb.17e B:** Aktivität in Einzelhaltung bei erwachsenen Crl:CD(SD)–Ratten im Wheel Running. Behandlung mit Methylphenidat. Dargestellt sind die Werte als Line and Scatter Plots mit Mittelwert und Standardfehler.  $n = 20/\text{Gruppe}$ . ♀ Ko, ♀ Mph, ♂ Ko, ♂ Mph.



### 3.5.2. Ergebnisse der Verhaltensuntersuchungen

#### 3.5.2.1. Elevated Plus Maze

Die Verabreichung von Atomoxetin in der Periadoleszenz hatte nur bei den weiblichen Tieren in der Dosierung 10 mg/kg einen signifikanten Effekt auf das Angstverhalten. Sie verhielten sich deutlich ängstlicher. Dies zeigte sich in einem verzögerten 1.Eintritt auf einen offenen Arm ( $P = 0,018^*$ ), der verringerten Anzahl von Eintritten auf die offenen Arme ( $P = 0,004^{**}$ ), ein erniedrigter prozentualer Anteil der Eintritte auf die offenen Arme zu den Gesamteintritten ( $P = 0,026^*$ ) und einer kürzeren Gesamtaufenthaltszeit auf den offenen Armen ( $P = 0,085^+$ ), auch die erhöhte Anzahl der SAPs spricht dafür ( $P = 0,009^{**}$ ) (s. Abb.18a, c, d, e, Tab.3). Es konnte eine zudem sedierende Wirkung festgestellt werden: die Zahl der Eintritte auf die geschlossenen Arme war reduziert ( $P = 0,013^*$ , s. Abb.18b, Tab.3). Bei den mit Methylphenidat behandelten Tieren konnten bis auf eine verringerte motorische Aktivität der weiblichen Ratten keine Unterschiede im Verhalten festgestellt werden ( $P = 0,013^*$ , s. Abb.18b, Tab.3).

Abb.18: Elevated Plus Maze

#### a.) Erster Eintritt auf die offenen Arme auf dem EPM (50. Lebensstag)

##### A. Atomoxetin

##### B. Methylphenidat

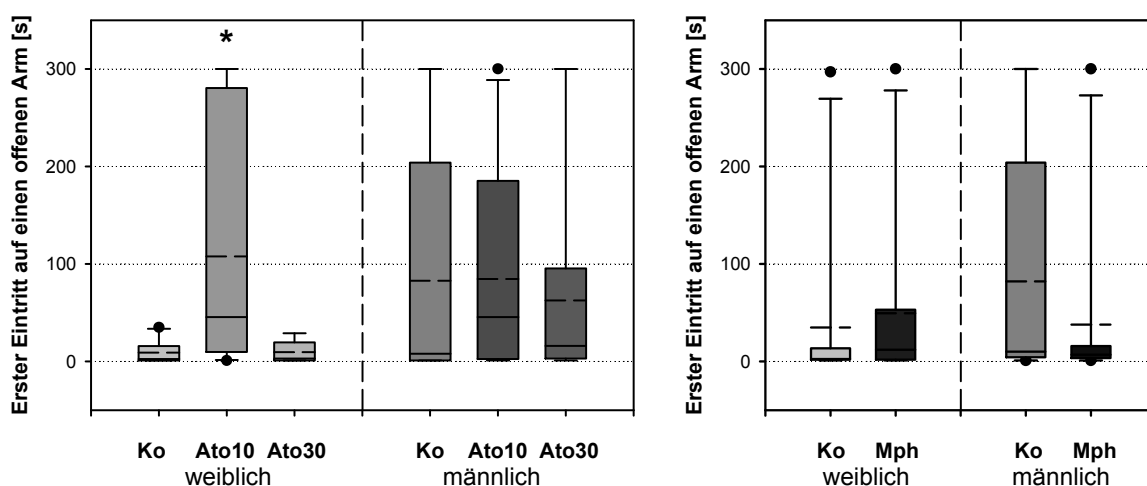
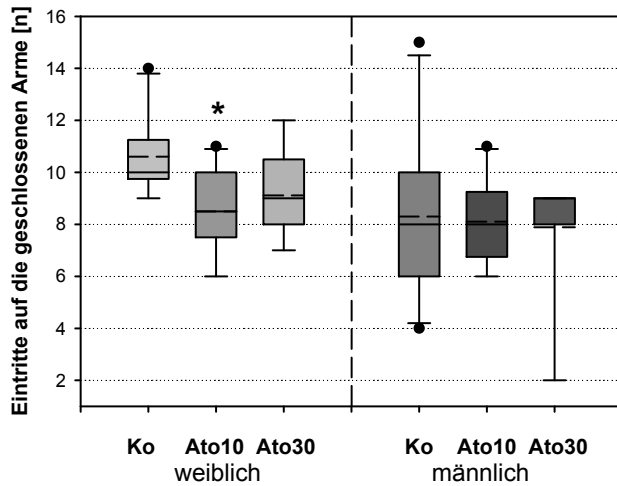


Abb.18a: Erster Eintritt auf die offenen Arme auf dem EPM. Crl:CD(SD)-Ratten. (A) Behandlung mit Atomoxetin, (B) Behandlung mit Methylphenidat. Dargestellt sind die Werte als Box Plots mit Median (durchgezogene Linie) und 25./75. Perzentile. Zusätzlich sind der Mittelwert (gestrichelte Linie) und –wenn vorhanden– Ausreißer angegeben.  $n = 10/\text{Gruppe}$ ,  $n(\text{♀ Ato } 10) = 9$ ,  $n(\text{♂ Ato } 30) = 9$ .  $p < 0,05^*$ .

**b.) Anzahl der Eintritte auf die geschlossenen Arme auf dem EPM  
(50. Lebensstag)**

A. Atomoxetin



B. Methylphenidat

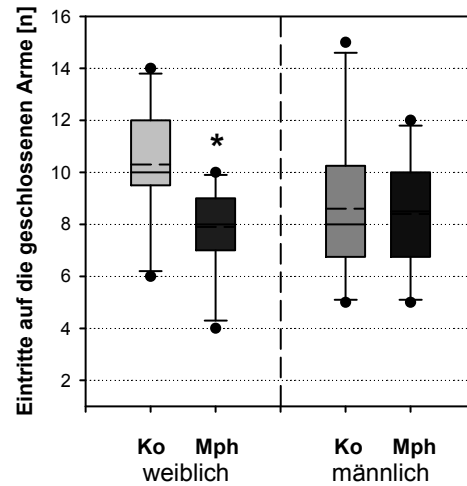
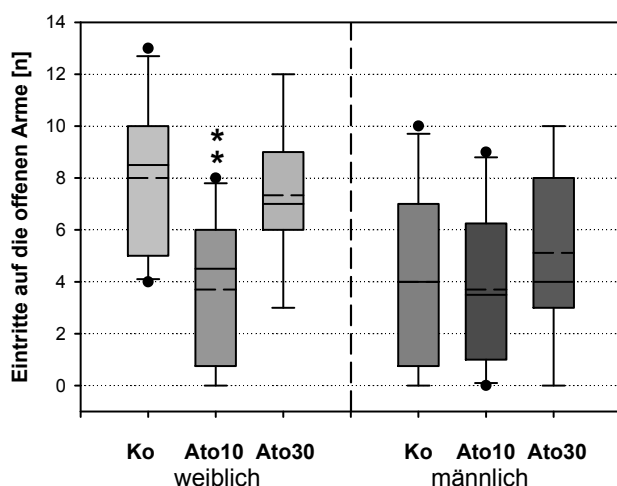


Abb.18b: Anzahl der Eintritte auf die geschlossenen Arme auf dem EPM. CrI:CD(SD)-Ratten. (A) Behandlung mit Atomoxetin, (B) Behandlung mit Methylphenidat. Dargestellt sind die Werte als Box Plots mit Median (durchgezogene Linie) und 25./75. Perzentile. Zusätzlich sind der Mittelwert (gestrichelte Linie) und –wenn vorhanden– Ausreißer angegeben.  $n = 10/\text{Gruppe}$ ,  $n(\text{♀ Ato } 10) = 9$ ,  $n(\text{♂ Ato } 30) = 9$ .  $p < 0,05^*$ .

**c.) Anzahl der Eintritte auf die offenen Arme auf dem EPM  
(50. Lebensstag)**

A. Atomoxetin



B. Methylphenidat

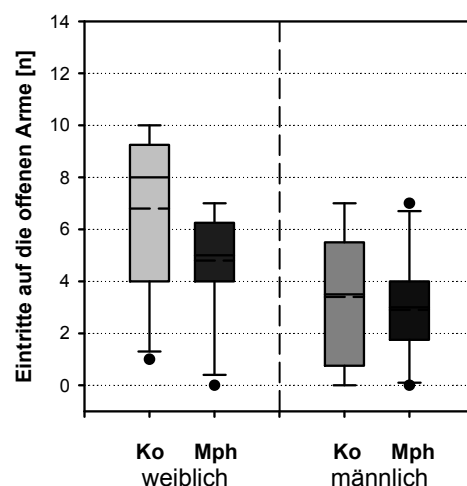
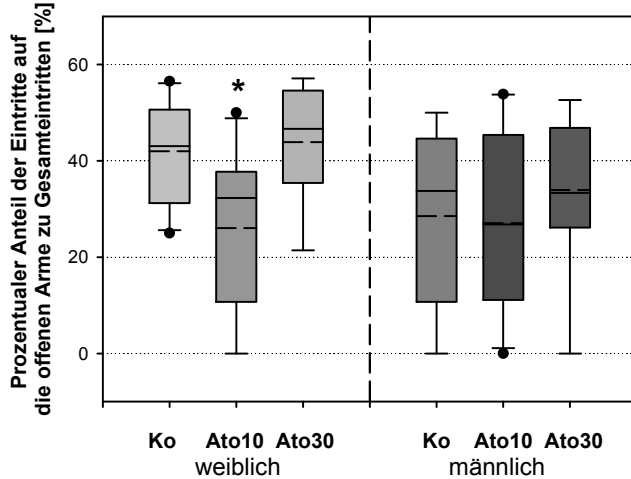


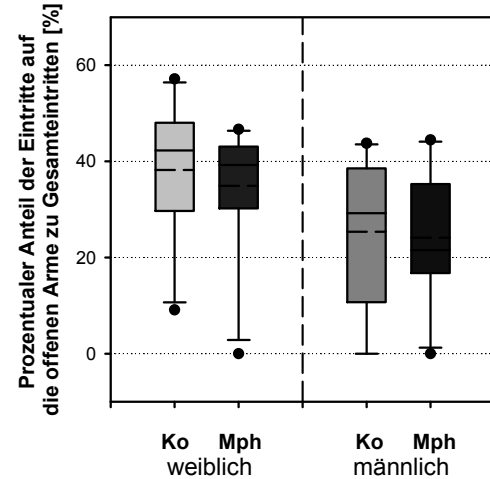
Abb.18c: Anzahl der Eintritte auf die offenen Arme auf dem EPM. CrI:CD(SD)-Ratten. (A) Behandlung mit Atomoxetin, (B) Behandlung mit Methylphenidat. Dargestellt sind die Werte als Box Plots mit Median (durchgezogene Linie) und 25./75. Perzentile. Zusätzlich sind der Mittelwert (gestrichelte Linie) und –wenn vorhanden– Ausreißer angegeben.  $n = 10/\text{Gruppe}$ ,  $n(\text{♀ Ato } 10) = 9$ ,  $n(\text{♂ Ato } 30) = 9$ .  $p < 0,01^{**}$ .

**d.) Prozentualer Anteil der Eintritte auf die offenen Arme zu den Gesamteintritten auf dem EPM**  
(50. Lebensstag)

## A. Atomoxetin



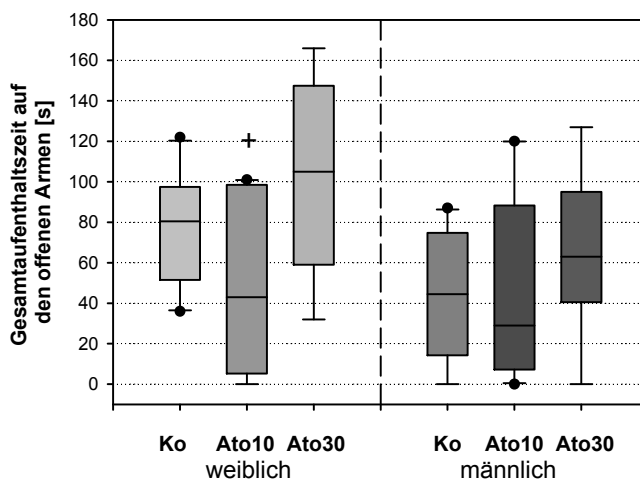
## B. Methylphenidat



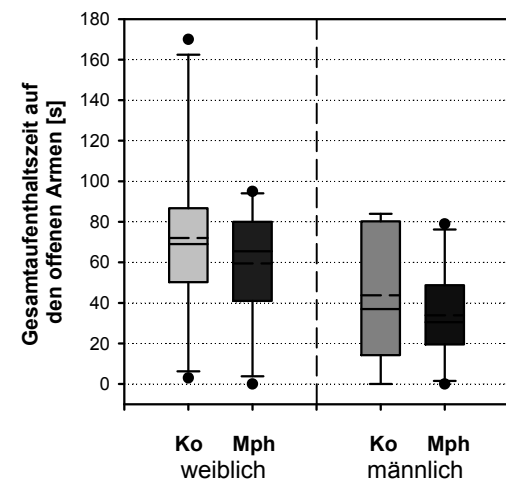
**Abb.18d:** Prozentualer Anteil der Eintritte auf die offenen Arme zu den Gesamteintritten auf dem EPM. CrI:CD(SD)-Ratten. (A) Behandlung mit Atomoxetin, (B) Behandlung mit Methylphenidat. Dargestellt sind die Werte als Box Plots mit Median (durchgezogene Linie) und 25./75. Perzentile. Zusätzlich sind der Mittelwert (gestrichelte Linie) und –wenn vorhanden– Ausreißer angegeben.  $n = 10/\text{Gruppe}$ ,  $n(\text{♀ Ato } 10) = 9$ ,  $n(\text{♂ Ato } 30) = 9$ .  $p < 0,05^*$ .

**e.) Gesamtaufenthaltszeit auf den offenen Armen auf dem EPM**  
(50. Lebensstag)

## A. Atomoxetin



## B. Methylphenidat



**Abb.18e:** Gesamtaufenthalt auf den offenen Armen auf dem EPM. CrI:CD(SD)-Ratten. (A) Behandlung mit Atomoxetin, (B) Behandlung mit Methylphenidat. Dargestellt sind die Werte als Box Plots mit Median (durchgezogene Linie) und 25./75. Perzentile. Zusätzlich sind der Mittelwert (gestrichelte Linie) und –wenn vorhanden– Ausreißer angegeben.  $n = 10/\text{Gruppe}$ ,  $n(\text{♀ Ato } 10) = 9$ ,  $n(\text{♂ Ato } 30) = 9$ .  $p < 0,10^+$ .

Tab.3: Verhaltensparameter auf dem Elevated Plus Maze

## A. Atomoxetin

Elevated Plus Maze	w Ko (n=10)	w Ato 10mg/kg (n=10)	w Ato 30mg/kg (n=9)	m Ko (n=10)	m Ato 10mg/kg (n=10)	m Ato 30mg/kg (n=9)
1.Eintritt offen [s]	2,5 [1,0/14,0]	45,5* [11,0/274,0]	3,0 [1,0/17,25]	8,0 [1,0/172,0]	45,5 [3,0/185,0]	16,0 [3,5/65,25]
Eintritte geschlossen [n]	10,6 (1,5/0,48)	8,5* (1,65/0,52)	9,111 (1,62/0,54)	8,0 [6,0/10,0]	8,0 [7,0/9,0]	9,0 [8,0/9,0]
Eintritte offen [n]	8,0 (2,9/0,92)	3,7** (2,8/0,88)	7,333 (2,55/0,85)	4,0 (3,367/1,065)	3,7 (3,02/0,955)	5,111 (3,18/1,06)
Zeit offen [s]	80,5 [55,0/95,0]	43,0 <sup>+</sup> [7,0/98,0]	105,0 [59,0/145,75]	45,4 (32,74/10,35)	44,7 (45,69/14,45)	65,22 (37,63/12,54)
Eintritt offen/geschl. [%]	42,01 (10,26/3,24)	26,05* (17,09/5,4)	43,91 (11,65/3,88)	28,54 (18,51/5,85)	27,1 (18,45/5,84)	33,96 (16,09/5,36)
Grooming [n]	1,0 [0,0/2,0]	1,0 [0,0/3,0]	1,0 [1,0/2,0]	0,5 [0,0/1,0]	2,0 [1,0/2,0]	1,0 [1,0/2,25]
Rearing [n]	13,0 [12,0/15,0]	14,0 [13,0/17,0]	13,0 [7,5/16,25]	11,5 [9,0/13,0]	13,5 [12,0/15,0]	12,0 [10,25/18,25]
Head Dip [n]	3,7 (2,31/0,73)	2,8 (2,35/0,74)	4,78 (3,23/1,08)	2,0 [0,0/3,0]	1,5 [0,0/3,0]	0,0 [0,0/2,5]
Stretched Attended Postures [n]	1,3 (1,16/0,37)	3,4** (1,78/0,56)	1,11 (1,54/0,51)	2,3 (1,77/0,56)	3,4 (2,5/0,79)	2,44 (2,5/0,84)
Close Returns [n]	0,0 [0,0/0,0]	0,0 [0,0/1,0]	0,0 [0,0/0,0]	0,0 [0,0/1,0]	0,0 [0,0/1,0]	0,0 [0,0/0,0]

Tab.3A: Ergebnisse des Elevated Plus Maze von Crl:CD(SD)-Ratten. Behandlung mit Atomoxetin. Angegeben sind die Mittelwerte mit Standardabweichung und Standardfehler bei normalverteilten Werten (gekennzeichnet durch runde Klammern) bzw. die Mediane mit 25./75. Perzentile bei unabhängiger Verteilung der Werte (gekennzeichnet durch *kursive* Schrift und eckige Klammern).  $p < 0,10^+$ ,  $p < 0,05^*$ ,  $p < 0,01^{**}$ . Alle Felder, in denen  $p < 0,10$  sind zur besseren Übersicht hellgrau unterlegt. Die Zahlenwerte sind auf zwei Stellen hinter dem Komma aufgerundet.

## B. Methylphenidat

Elevated Plus Maze	w Ko (n=10)	w Mph 2mg/kg (n=10)	m Ko (n=10)	m Mph 2mg/kg (n=10)
1.Eintritt Offen [s]	2,5 [2,0/11,0]	12,0 [2,0/44,0]	10,0 [5,0/172,0]	7,0 [4,0/11,0]
Eintritte geschlossen [n]	10,3 (2,21/0,7)	7,9* (1,66/0,53)	8,6 (2,91/0,92)	8,4 (2,17/0,69)

<b>Eintritte offen</b> [n]	6,8 (3,08/0,96)	4,8 (2,04/0,65)	3,4 (2,63/0,83)	2,9 (1,91/0,61)
<b>Zeit offen</b> [s]	72,0 (43,52/13,76)	59,5 (28,0/8,86)	43,8 (33,75/10,67)	33,9 (21,8/6,9)
<b>Eintritt offen/geschl.</b> [%]	42,26 <i>[31,25/47,37]</i>	39,23 <i>[30,77/42,86]</i>	25,36 (16,06/5,08)	24,13 (13,32/4,21)
<b>Grooming</b> [n]	1,7 (0,68/0,21)	1,4 (1,27/0,4)	1,1 (0,74/0,23)	1,1 (1,1/0,35)
<b>Rearing</b> [n]	15,4 (4,97/1,57)	14,5 (2,5/0,79)	12,9 (3,41/1,08)	11,9 (3,14/0,99)
<b>Head Dip</b> [n]	4,6 (3,5/1,11)	2,5 (2,32/0,73)	1,0 <i>[0,0/3,0]</i>	1,0 <i>[0,0/1,0]</i>
<b>Stretched Attended Postures</b> [n]	1,0 <i>[0,0/2,0]</i>	2,0 <i>[2,0/3,0]</i>	2,0 <i>[1,0/3,0]</i>	3,0 <i>[2,0/4,0]</i>
<b>Close Returns</b> [n]	0,0 <i>[0,0/0,0]</i>	0,0 <i>[0,0/0,0]</i>	0,0 <i>[0,0/1,0]</i>	0,0 <i>[0,0/0,0]</i>

Tab.3B: Ergebnisse des Elevated Plus Maze von Crl:CD(SD)-Ratten. Behandlung mit Methylphenidat. Angegeben sind die Mittelwerte mit Standardabweichung und Standardfehler bei normalverteilten Werten (gekennzeichnet durch runde Klammern) bzw. die Mediane mit 25./75. Perzentile bei unabhängiger Verteilung der Werte (gekennzeichnet durch *kursive* Schrift und eckige Klammern).  $p < 0,10^+$ ,  $p < 0,05^*$ ,  $p < 0,01^{**}$ . Alle Felder, in denen  $p < 0,10$  sind zur besseren Übersicht hellgrau unterlegt. Die Zahlenwerte sind auf zwei Stellen hinter dem Komma aufgerundet.

### 3.5.2.2. Hole Board

Es zeigten sich zwischen den einzelnen Versuchsgruppen keine Unterschiede bezüglich der Exploration im Hole Board.

Jedoch war sowohl bei den weiblichen als auch männlichen mit 10 mg/kg Atomoxetin behandelten Tieren eine verbesserten Habituation zu erkennen (Tab.4A). Bei den weiblichen Tiere zeigte sich dies in einer verkürzten Zeit zum ersten Nose Poke am zweiten Tag ( $P = 0,034^*$ , s. Abb.19a A, Tab.4A), einer verringerten Anzahl von Nose Pokes ( $P = 0,08^+$ , s. Abb.19b A, Tab.4A) und Rearings ( $P = 0,003^{**}$ , s. Tab.4A) gegenüber dem ersten Tag. Bei den männlichen Tieren war sowohl die Anzahl der Nose Pokes ( $P = 0,015^*$ , s. Abb.19b A, Tab.4A) als auch die Anzahl der Rearings ( $P = 0,002^{**}$ , s. Tab.4A) am zweiten Tag vermindert.

Bei den männlichen mit Methylphenidat behandelten Tieren war die Anzahl der Nose Pokes und Rearings am zweiten Tag deutlich reduziert und lässt somit auf eine verbesserte Habituation schließen (s. Abb.19b B, Tab.4B).

Abb.19: Hole Board

a.) Zeit bis zum ersten Nose Poke im HB  
(50.+51. Lebenstag)

## A. Atomoxetin

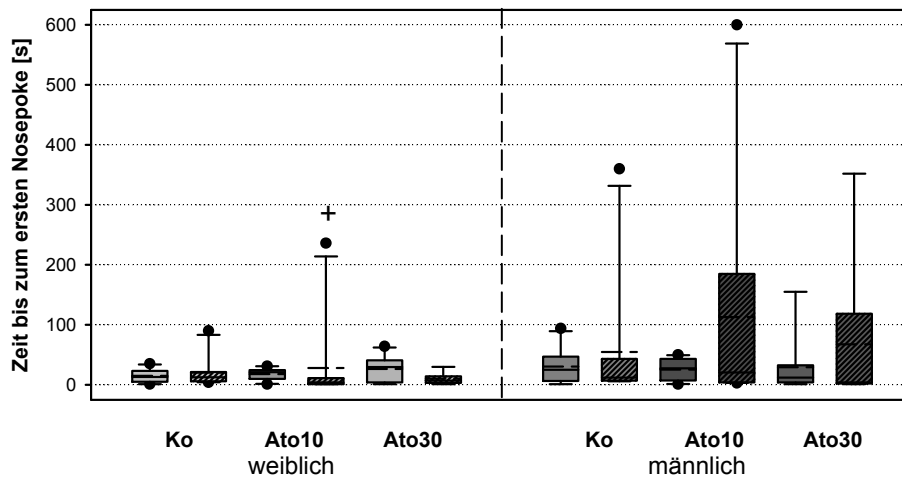


Abb.19a A: Zeit bis zum ersten Nose Poke im HB an zwei Folgetagen. Crl:CD(SD)-Ratten. Behandlung mit Atomoxetin. Dargestellt sind die Werte als Box Plots mit Median (durchgezogene Linie) und 25./75. Perzentile. Zusätzlich sind der Mittelwert (gestrichelte Linie) und –wenn vorhanden– Ausreißer angegeben.  $n = 10/\text{Gruppe}$ ,  $n(\text{♂ Ato 30}) = 9$ .  $p < 0,1^+$ . Die Werte des zweiten Tags wurden durch gestrichelte Box Plots dargestellt.

## B. Methylphenidat

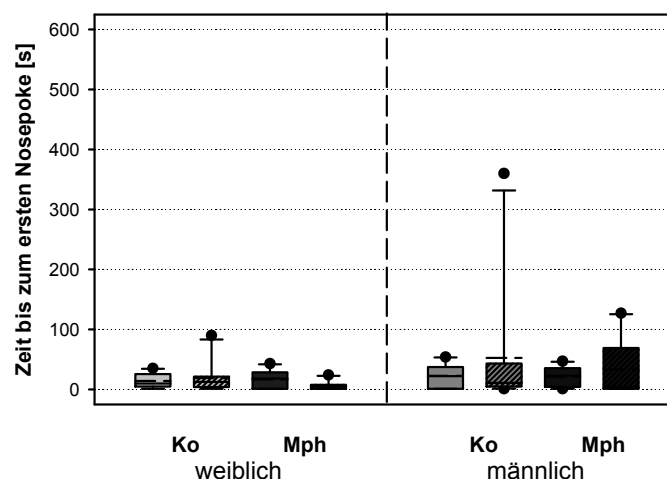


Abb.19a B: Zeit bis zum ersten Nose Poke im HB an zwei Folgetagen. Crl:CD(SD)-Ratten. Behandlung mit Methylphenidat. Dargestellt sind die Werte als Box Plots mit Median (durchgezogene Linie) und 25./75. Perzentile. Zusätzlich sind der Mittelwert (gestrichelte Linie) und –wenn vorhanden– Ausreißer angegeben.  $n = 10/\text{Gruppe}$ . Die Werte des zweiten Tags wurden durch gestrichelte Box Plots dargestellt.

**b.) Anzahl der Nose Pokes im HB  
(50.+51. Lebensstag)**

**A. Atomoxetin**

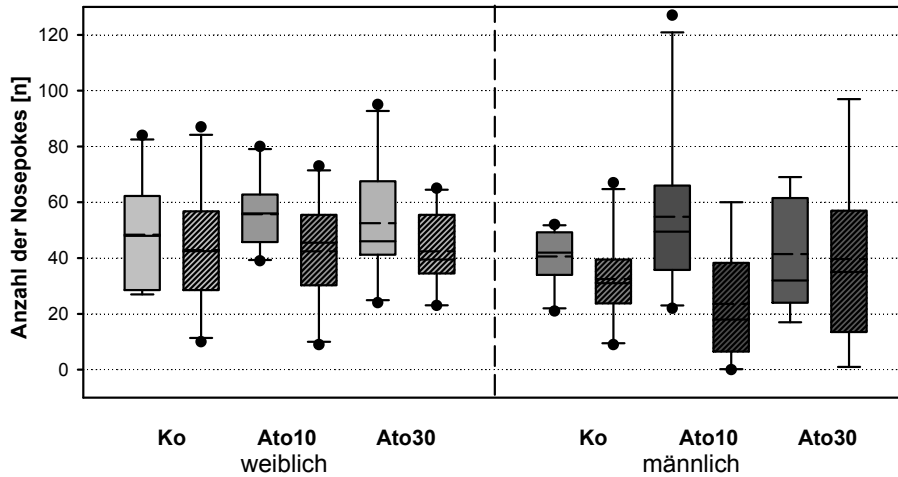


Abb.19b A: Anzahl der Nose Pokes im HB an zwei Folgetagen. Crl:CD(SD)–Ratten. Behandlung mit Atomoxetin. Dargestellt sind die Werte als Box Plots mit Median (durchgezogene Linie) und 25./75. Perzentile. Zusätzlich sind der Mittelwert (gestrichelte Linie) und –wenn vorhanden– Ausreißer angegeben.  $n = 10/\text{Gruppe}$ ,  $n(\text{♂ Ato 30}) = 9$ . Die Werte des zweiten Tags wurden durch gestrichelte Box Plots dargestellt.

**B. Methylphenidat**

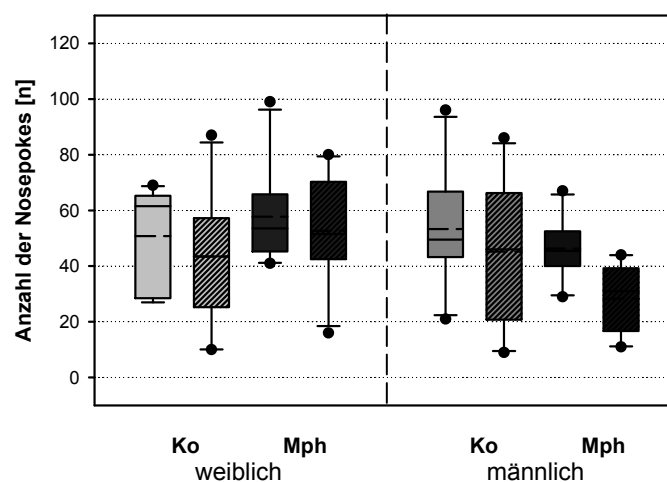


Abb.19b B: Anzahl der Nose Pokes im HB an zwei Folgetagen. Crl:CD(SD)–Ratten. Behandlung mit Methylphenidat. Dargestellt sind die Werte als Box Plots mit Median (durchgezogene Linie) und 25./75. Perzentile. Zusätzlich sind der Mittelwert (gestrichelte Linie) und –wenn vorhanden– Ausreißer angegeben.  $n = 10/\text{Gruppe}$ . Die Werte des zweiten Tags wurden durch gestrichelte Box Plots dargestellt.

Tab.4: Verhaltensparameter im Hole Board

## A. Atomoxetin

Hole Board	w Ko (n=10)	w Ato 10mg/kg (n=10)	w Ato 30mg/kg (n=10)	m Ko (n=10)	m Ato 10mg/kg (n=10)	m Ato 30mg/kg (n=9)
<b>1.Nose Poke</b> (1.Tag) [s]	13,0 [6,0/23,0]	21,0 [11,0/23,0]	29,5 [5,0/39,0]	25,0 [8,0/47,0]	27,5 [8,0/43,0]	12,0 [5,0/31,25]
<b>1.Nose Poke</b> (2.Tag) [s]	12,5 [6,0/21,0]	4,0 <sup>+</sup> [1,0/10,0]	7,0 [4,0/9,0]	12,0 [7,0/32,0]	20,5 [4,0/151,0]	4,0 [2,5/63,75]
<b>Habituation</b> 1.Nose Poke	P=1,000	P=0,034*	P=0,130	P=0,734	P=0,970	P=0,377
<b>Nose Pokes</b> (1.Tag) [n]	48,4 (19,33/6,11)	55,7 (12,62/3,99)	52,5 (20,54/6,5)	40,6 (9,79/3,1)	54,8 (29,28/9,26)	41,44 (20,21/6,74)
<b>Nose Pokes</b> (2.Tag) [n]	42,9 (21,25/6,72)	42,4 (18,83/5,95)	42,4 (13,82/4,37)	32,5 (16,1/5,09)	23,6 (21,85/6,91)	39,67 (29,87/9,96)
<b>Habituation</b> Nose Pokes	P=0,552	P=0,080 <sup>+</sup>	P=0,213	P=0,191	P=0,015*	P=0,884
<b>Grooming</b> (1.Tag) [n]	2,6 (1,17/0,37)	2,1 (1,37/0,43)	3,1 (1,79/0,57)	3,0 (2,36/0,75)	2,6 (1,43/0,45)	2,0 (1,0/0,33)
<b>Grooming</b> (2.Tag) [n]	2,2 (1,14/0,36)	2,3 (1,77/0,56)	3,2 (1,75/0,55)	3,0 (2,0/4,0)	2,0 (2,0/5,0)	2,0 (2,0/4,0)
<b>Habituation</b> Grooming	P=0,449	P=0,781	P=0,901	P=0,906	P=0,613	P=0,174
<b>Rearing</b> (1.Tag) [n]	17,9 (7,43/2,35)	19,7 (6,9/2,18)	17,8 (9,75/3,08)	23,0 (10,91/3,54)	15,7 (7,96/2,52)	20,89 (7,93/2,64)
<b>Rearing</b> (2.Tag) [n]	13,0 [8,0/21,0]	7,5 [5,0/9,0]	10,0 [7,0/20,0]	12,1 (7,65/2,42)	4,9 (5,26/1,66)	13,22 (9,77/3,26)
<b>Habituation</b> Rearing	P=0,616	P=0,003**	P=0,197	P=0,019*	P=0,002**	P=0,086*

Tab.4A: Ergebnisse des Hole Board von Crl:CD(SD)-Ratten an zwei Folgetagen. Behandlung mit Atomoxetin. Angegeben sind die Mittelwerte mit Standardabweichung und Standardfehler bei normalverteilten Werten (gekennzeichnet durch runde Klammern) bzw. die Mediane mit 25./75. Perzentile bei unabhängiger Verteilung der Werte (gekennzeichnet durch *kursive* Schrift und eckige Klammern).  $p < 0,10^+$ ,  $p < 0,05^*$ ,  $p < 0,01^{**}$ . Alle Felder, in denen  $p < 0,10$  sind zur besseren Übersicht hellgrau unterlegt. Die Zahlenwerte sind auf zwei Stellen hinter dem Komma aufgerundet.



## B. Methylphenidat

Hole Board	w Ko (n=10)	w Mph 2mg/kg (n=10)	m Ko (n=10)	m Mph 2mg/kg (n=10)
<b>1.Nose Poke</b> (1.Tag) [s]	14,2 (11,92/3,77)	16,6 (15,22/4,81)	22,7 (18,72/5,92)	21,2 (16,01/5,06)
<b>1.Nose Poke</b> (2.Tag) [s]	12,5 [5,0/21,0]	5,0 [1,0/7,0]	11,0 [5,0/32,0]	4,0 [1,0/55,0]
<b>Habituation</b> 1.Nose Poke	P=0,970	P=0,325	P=0,88	P=0,464
<b>Nose Pokes</b> (1.Tag) [n]	50,8 (18,24/5,77)	57,7 (17,27/5,46)	53,3 (20,58/6,51)	46,3 (10,88/3,44)
<b>Nose Pokes</b> (2.Tag) [n]	43,4 (23,16/7,32)	52,7 (18,46/5,84)	46,0 [23,0/66,0]	31,0 [18,0/38,0]
<b>Habituation</b> Nose Pokes	P=0,438	P=0,678	P=0,445	P=0,003 **
<b>Grooming</b> (1.Tag) [n]	2,0 [0,0/3,0]	3,0 [1,0/4,0]	2,0 [2,0/4,0]	1,5 [1,0/3,0]
<b>Grooming</b> (2.Tag) [n]	2,0 [1,0/4,0]	2,5 [1,0/4,0]	2,5 (1,18/0,73)	1,8 (1,23/0,39)
<b>Habituation</b> Grooming	P=0,268	P=0,775	P=0,850	P=0,848
<b>Rearing</b> (1.Tag) [n]	21,0 (10,5/3,32)	17,4 (6,1/1,93)	21,0 [11,0/26,0]	17,0 [15,0/21,0]
<b>Rearing</b> (2.Tag) [n]	16,6 (12,67/4,0)	11,8 (5,85/1,85)	12,2 (7,02/2,22)	10,3 (7,13/2,26)
<b>Habituation</b> Rearing	P=0,409	P=0,050*	P=0,111	P=0,013 *

Tab.4B: Ergebnisse des Hole Board von Crl:CD(SD)-Ratten an zwei Folgetagen. Behandlung mit Methylphenidat. Angegeben sind die Mittelwerte mit Standardabweichung und Standardfehler bei normalverteilten Werten (gekennzeichnet durch runde Klammern) bzw. die Mediane mit 25./75. Perzentile bei unabhängiger Verteilung der Werte (gekennzeichnet durch *kursive* Schrift und eckige Klammern).  $p < 0,05^*$ ,  $p < 0,01^{**}$ . Alle Felder, in denen  $p < 0,10$  sind zur besseren Übersicht hellgrau unterlegt. Die Zahlenwerte sind auf zwei Stellen hinter dem Komma aufgerundet.

## 3.5.2.3. Open Field

Im Open Field betraten die mit 30 mg/kg Atomoxetin behandelten weiblichen Ratten weniger oft den Innenraum ( $P = 0,022^*$ , s. Abb.20b A, Tab.5A). Die geringgradig verminderte Anzahl durchlaufener Lichtschranken ( $P=0,91^+$ , s. Abb.20a A, Tab.5A) bei unveränderter Zeit bis zum ersten Eintritt in den Innenraum und im Innenraum lässt eher auf eine verringerte motorische Aktivität als auf ein vermehrt ängstliches Verhalten als Erklärung dafür schließen. Die männlichen mit Methylphenidat behandelten Ratten zeigten eine verminderte vertikale Exploration. Das äußerte sich in der reduzierten Anzahl von Rearings ( $P = 0,021^*$ , s. Tab.5B).

Abb.20: Open Field

**a.) Anzahl der durchlaufenen Lichtschranken im OF**  
(64. Lebensstag)

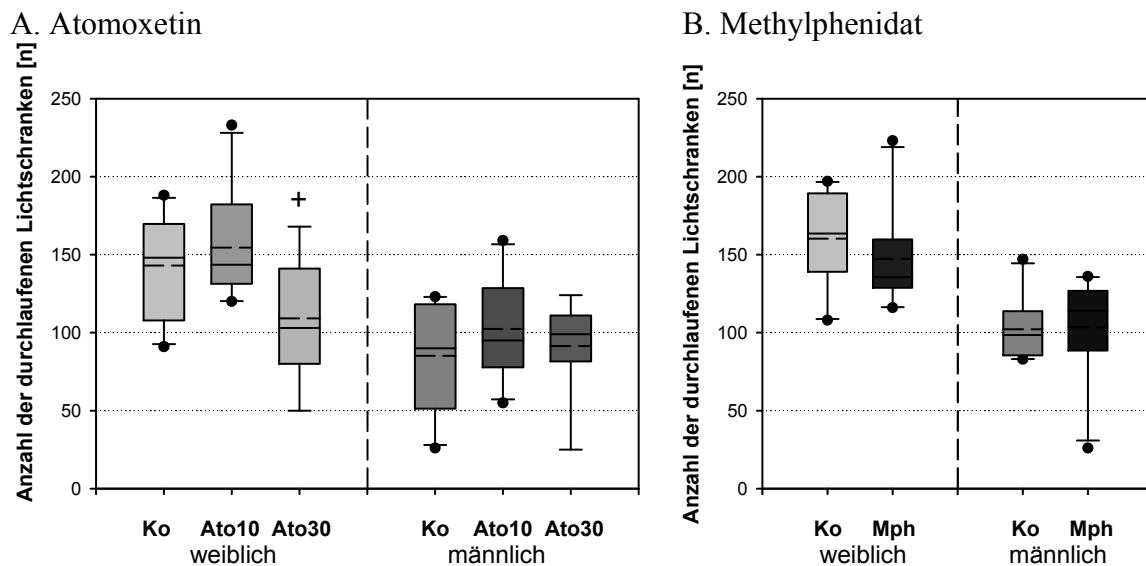
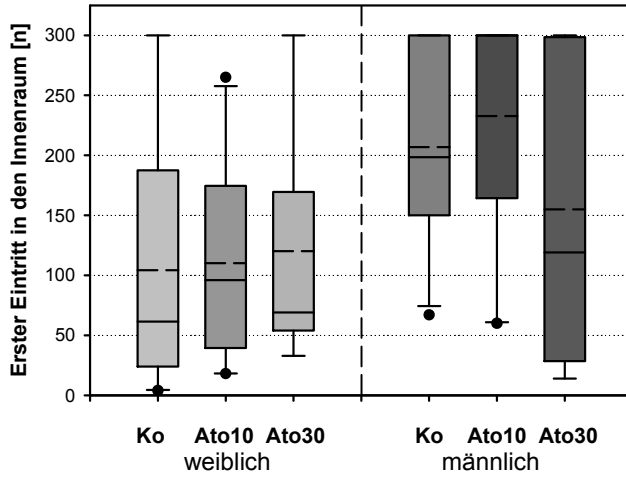


Abb.20a: Anzahl der durchlaufenen Lichtschranken im OF. Crl:CD(SD)-Ratten. (A) Behandlung mit Atomoxetin, (B) Behandlung mit Methylphenidat. Dargestellt sind die Werte als Box Plots mit Median (durchgezogene Linie) und 25./75. Perzentile. Zusätzlich sind der Mittelwert (gestrichelte Linie) und –wenn vorhanden– Ausreißer angegeben.  $n = 10/\text{Gruppe}$ ,  $n(\text{♀ Ato 10}) = 9$ ,  $n(\text{♂ Ato 30}) = 9$ .  $p < 0,10^+$ .

**b.) Zeit bis zum ersten Eintritt in den Innenraum im OF**  
(64. Lebensstag)

## A. Atomoxetin



## B. Methylphenidat

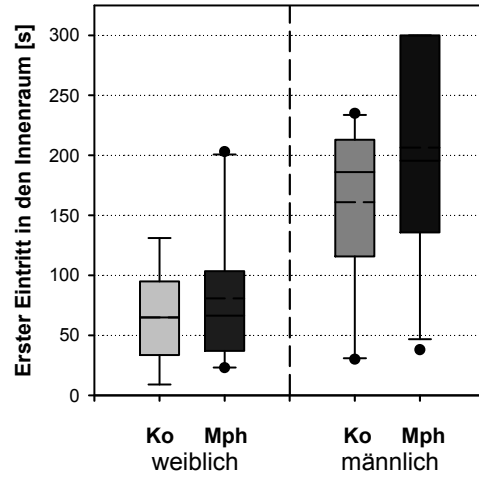
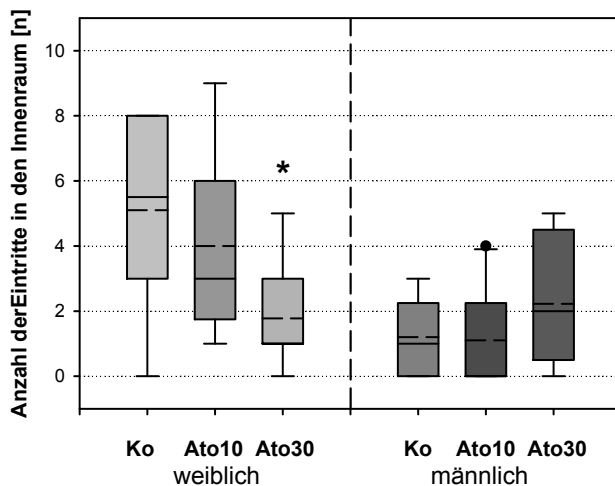


Abb.20b: Zeit bis zum ersten Eintritt in den Innenraum im OF. Crl:CD(SD)-Ratten. (A) Behandlung mit Atomoxetin, (B) Behandlung mit Methylphenidat. Dargestellt sind die Werte als Box Plots mit Median (durchgezogene Linie) und 25./75. Perzentile. Zusätzlich sind der Mittelwert (gestrichelte Linie) und –wenn vorhanden– Ausreißer angegeben.  $n = 10/\text{Gruppe}$ ,  $n(\text{♀ Ato 10}) = 9$ ,  $n(\text{♂ Ato 30}) = 9$ .

**c.) Anzahl der Eintritte in den Innenraum im OF**  
(64. Lebensstag)

## A. Atomoxetin



## B. Methylphenidat

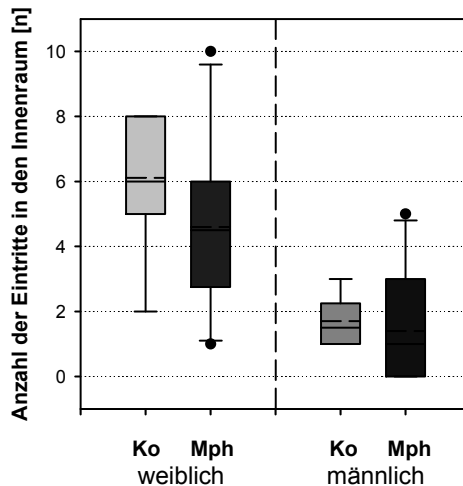
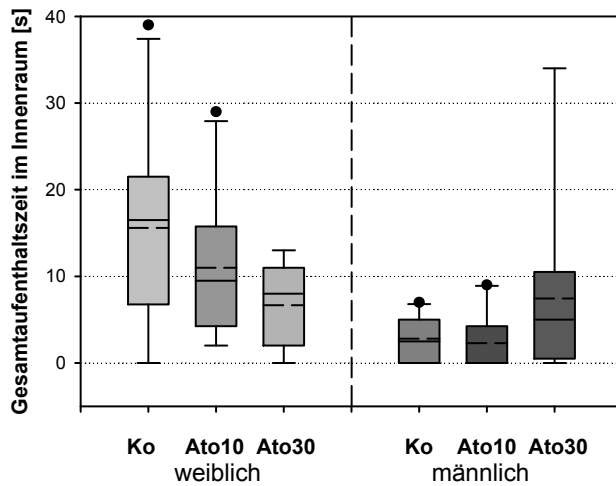


Abb.20c: Anzahl der Eintritte in den Innenraum im OF. Crl:CD(SD)-Ratten. (A) Behandlung mit Atomoxetin, (B) Behandlung mit Methylphenidat. Dargestellt sind die Werte als Box Plots mit Median (durchgezogene Linie) und 25./75. Perzentile. Zusätzlich sind der Mittelwert (gestrichelte Linie) und –wenn vorhanden– Ausreißer angegeben.  $n = 10/\text{Gruppe}$ ,  $n(\text{♀ Ato 10}) = 9$ ,  $n(\text{♂ Ato 30}) = 9$ .  $p < 0,05^*$ .

**d.) Gesamtaufenthaltszeit im Innenraum im OF**  
(64. Lebensstag)

## A. Atomoxetin



## B. Methylphenidat

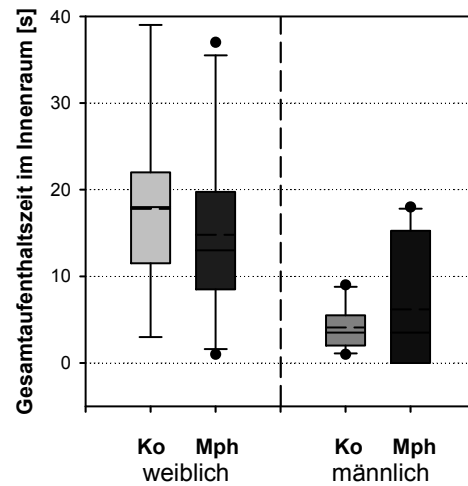


Abb.20d: Gesamtaufenthaltszeit im Innenraum im OF. Crl:CD(SD)-Ratten. (A) Behandlung mit Atomoxetin, (B) Behandlung mit Methylphenidat. Dargestellt sind die Werte als Box Plots mit Median (durchgezogene Linie) und 25./75. Perzentile. Zusätzlich sind der Mittelwert (gestrichelte Linie) und –wenn vorhanden– Ausreißer angegeben.  $n = 10/\text{Gruppe}$ ,  $n(\text{♀ Ato } 10) = 9$ ,  $n(\text{♂ Ato } 30) = 9$ .

Tab.5: Verhaltensparameter im Open Field

## A. Atomoxetin

Open Field	w Ko (n=10)	w Ato 10mg/kg (n=10)	w Ato 30mg/kg (n=9)	m Ko (n=10)	m Ato 10mg/kg (n=10)	m Ato 30mg/kg (n=9)
Licht- schranken [n]	143,0 (32,17/10,17)	154,0 (34,92/11,04)	109,22 <sup>+</sup> (38,01/12,67)	85,1 (33,74/10,67)	102,4 (31,92/10,1)	91,44 (29,15/9,72)
1.Eintritt Innen [s]	61,5 [29,0/150,0]	96,0 [46,0/169,0]	69,0 [54,5/168,25]	198,5 [153,0/300,0]	300,0 [196,0/300,0]	119,0 [35,25/297,75]
Eintritte innen [n]	5,1 (3,04/0,96)	4,0 (2,91/0,92)	1,78* (1,64/0,55)	1,0 [0,0/2,0]	0,0 [0,0/2,0]	2,0 [0,75/4,25]
Zeit innen [s]	15,6 (11,51/3,64)	11,0 (8,18/2,59)	6,67 (4,8/1,6)	2,5 [0,0/5,0]	0,0 [0,0/3,0]	5,0 [0,75/8,75]
Grooming [n]	1,5 [0,0/2,0]	1,0 [1,0/4,0]	2,0 [0,75/2,25]	2,6 (1,17/0,37)	1,4 (1,08/0,34)	1,67 (1,12/0,37)
Rearing [n]	16,9 (6,76/2,14)	20,6 (8,93/2,83)	12,44 (5,18/1,73)	13,8 (5,69/1,8)	15,0 (6,13/1,94)	14,11 (9,09/3,03)

## B. Methylphenidat

Open Field	w Ko (n=10)	w Mph 2mg/kg (n=10)	m Ko (n=10)	m Mph 2mg/kg (n=10)
Licht-schranken [n]	160,2 (30,54/9,66)	147,4 (32,5/10,28)	102,2 (20,02/6,33)	103,5 (33,29/10,53)
1.Eintritt Innen [s]	65,0 <i>[35,75/82,5]</i>	66,5 <i>[41,0/78,0]</i>	160,9 (72,53/22,93)	206,4 (92,25/29,17)
Eintritte innen [n]	6,11 (2,03/0,68)	4,6 (2,59/0,82)	1,5 <i>[1,0/2,0]</i>	1,0 <i>[0,0/3,0]</i>
Zeit innen [s]	17,78 (10,04/3,35)	14,8 (9,94/3,14)	3,5 <i>[2,0/5,0]</i>	3,5 <i>[0,0/15,0]</i>
Grooming [n]	1,7 (0,95/0,3)	1,5 (0,85/0,27)	2,3 (1,77/0,56)	2,3 (1,16/0,37)
Rearing [n]	20,8 (7,36/2,33)	19,5 (5,36/1,7)	16,9 (3,41/1,08)	12,4* (4,5/1,42)

Tab.5A+B: Ergebnisse des Open Field von Crl:CD(SD)-Ratten. (A)Behandlung mit Atomoxetin, (B) Behandlung mit Methylphenidat. Angegeben sind die Mittelwerte mit Standardabweichung und Standardfehler bei normalverteilten Werten (gekennzeichnet durch runde Klammern) bzw. die Mediane mit 25./75. Perzentile bei unabhängiger Verteilung der Werte (gekennzeichnet durch *kursive* Schrift und eckige Klammern).  $p < 0, 10$  <sup>+</sup>,  $p < 0, 05$  \*. Alle Felder, in denen  $p < 0, 10$  sind zur besseren Übersicht hellgrau unterlegt. Die Zahlenwerte sind auf zwei Stellen hinter dem Komma aufgerundet.

## 3.5.2.4. Rota Rod

Im Rota Rod hielten sich die mit 10 mg/kg Atomoxetin behandelten weiblichen Ratten deutlich kürzer auf der sich beschleunigenden Walze ( $P = 0,001$ \*\*\*, s. Abb.21a, Tab.6).

Abb.21: Rota Rod

**Latenz bis das Tier von der Walze fällt auf dem RR**  
(64. Lebenstag)

## A. Atomoxetin

## B. Methylphenidat

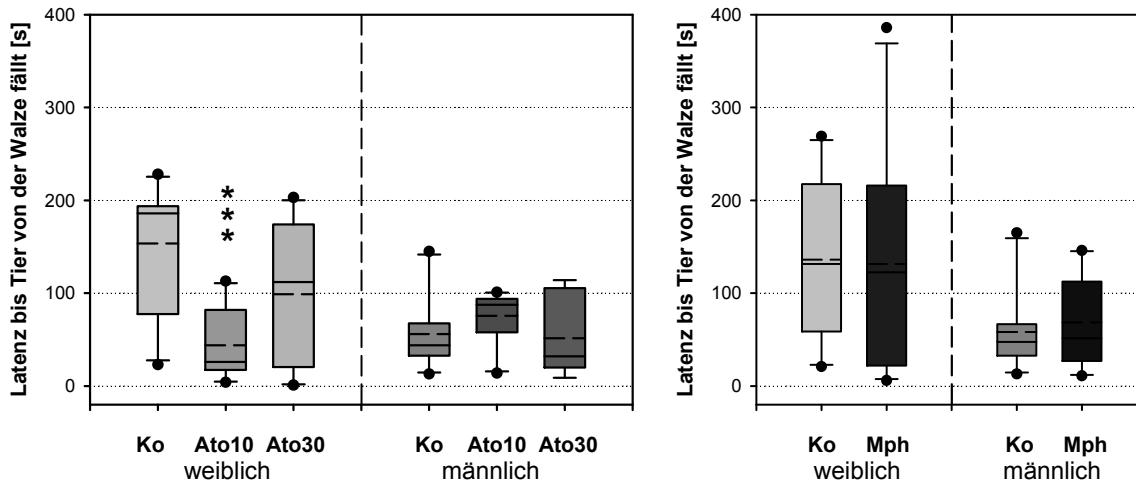


Abb.21: Latenz bis Tier von der Walze fällt auf dem RR. Crl:CD(SD)-Ratten. (A) Behandlung mit Atomoxetin, (B) Behandlung mit Methylphenidat. Dargestellt sind die Werte als Box Plots mit Median (durchgezogene Linie) und 25./75. Perzentile. Zusätzlich sind der Mittelwert (gestrichelte Linie) und –wenn vorhanden– Ausreißer angegeben.  $n = 10/\text{Gruppe}$ ,  $n(\text{♂ Ato 30}) = 9$ .  $p < 0,001^{***}$ .

Tab.6: Verhaltensparameter auf dem Rota Rod

## A. Atomoxetin

Rota Rod	w Ko (n=10)	w Ato 10mg/kg (n=10)	w Ato 30mg/kg (n=9)	m Ko (n=10)	m Ato 10mg/kg (n=10)	m Ato 30mg/kg (n=9)
Latenz bis Hinunter- fallen [s]	153,6 (69,04/21,83)	43,8*** (37,63/11,9)	98,8 (75,18/23,78)	56,1 (40,39/12,77)	75,6 (29,65/9,38)	51,56 (43,42/14,47)

Tab.6A: Ergebnisse des Rota Rod von Crl:CD(SD)-Ratten. Behandlung mit Atomoxetin. Angegeben sind die Mittelwerte mit Standardabweichung und Standardfehler bei normalverteilten Werten (gekennzeichnet durch runde Klammern) bzw. die Mediane mit 25./75. Perzentile bei unabhängiger Verteilung der Werte (gekennzeichnet durch *kursive* Schrift und eckige Klammern).  $p < 0,001^{***}$ . Alle Felder, in denen  $p < 0,10$  sind zur besseren Übersicht hellgrau unterlegt. Die Zahlenwerte sind auf zwei Stellen hinter dem Komma aufgerundet.

## B. Methylphenidat

Rota Rod	w Ko (n=10)	w Mph 2mg/kg (n=10)	m Ko (n=10)	m Mph 2mg/kg (n=10)
Latenz bis Hinunter- fallen [s]	136,1 (89,72/28,37)	131,4 (119,97/37,94)	47,5 [34,0/53,0]	51,5 [29,0/104,0]

Tab.6B: Ergebnisse des Rota Rod von CrI:CD(SD)-Ratten. Behandlung mit Methylphenidat. Angegeben sind die Mittelwerte mit Standardabweichung und Standardfehler bei normalverteilten Werten (gekennzeichnet durch runde Klammern) bzw. die Mediane mit 25./75. Perzentile bei unabhängiger Verteilung der Werte (gekennzeichnet durch *kursive* Schrift und eckige Klammern).  $p < 0,001^{***}$ . Alle Felder, in denen  $p < 0,10$  sind zur besseren Übersicht hellgrau unterlegt. Die Zahlenwerte sind auf zwei Stellen hinter dem Komma aufgerundet.

## 3.5.2.5. Free Exploratory Paradigm

Die mit 10 mg/kg Atomoxetin behandelten männlichen Ratten zeigten sich im Free Exploratory Paradigm ängstlicher.

Sowohl am ersten als auch am zweiten Tag verließen sie später ihren Käfig ( $P = 0,05^*$  bzw.  $0,042^*$ , s. Abb.22a A, Tab.7) und die Anzahl der Austritte am ersten Tag war vermindert ( $P = 0,083^+$ , s. Abb.22b A, Tab.7).

Die Habituation der mit 30 mg/kg Atomoxetin behandelten männlichen und weiblichen Ratten war weniger deutlich ausgeprägt (s. Tab.7).

Die weiblichen mit Methylphenidat behandelten Tiere zeigten gegenüber den Kontrolltieren ein früheres ( $P = 0,062^+$ , s. Abb. 22a B, Tab.7) und vermehrtes ( $P = 0,023^*$  s. Abb. 22b B, Tab.7) Austreten aus dem Käfig.

Da die Gesamtaufenthaltszeit außerhalb des Käfigs jedoch nicht erhöht war scheint dies auf eine erhöhte motorische Aktivität zurückzuführen zu sein.

Die männlichen mit Methylphenidat behandelten Tiere zeigten eine im Vergleich zu den Kontrolltieren verminderte Habituation (s. Tab.7).

Abb.22: Free Exploratory Paradigm

a.) Erster Austritt aus dem Heimkäfig im FEP  
(78.+79. Lebensstag)

## A. Atomoxetin

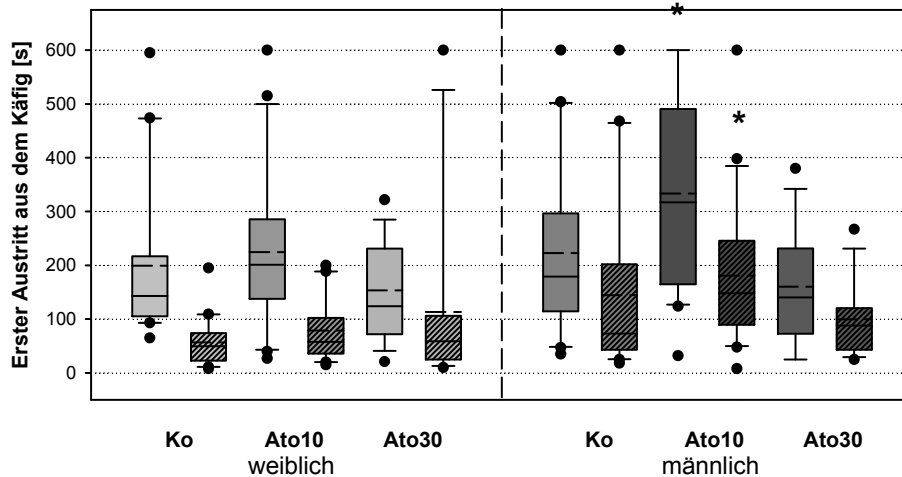


Abb.22a A: Zeit bis zum ersten Austritt im FEP an zwei Folgetagen. Crl:CD(SD)-Ratten. Behandlung mit Atomoxetin. Dargestellt sind die Werte als Box Plots mit Median (durchgezogene Linie) und 25./75. Perzentile. Zusätzlich sind der Mittelwert (gestrichelte Linie) und –wenn vorhanden– Ausreißer angegeben.  $n = 20/\text{Gruppe}$ ,  $n(\text{♀ Ato } 10) = 19$ ,  $n(\text{♂ Ato } 30) = 18$ .  $p < 0,05^*$ . Die Werte des zweiten Tags wurden durch gestrichelte Box Plots dargestellt.

## B. Methylphenidat

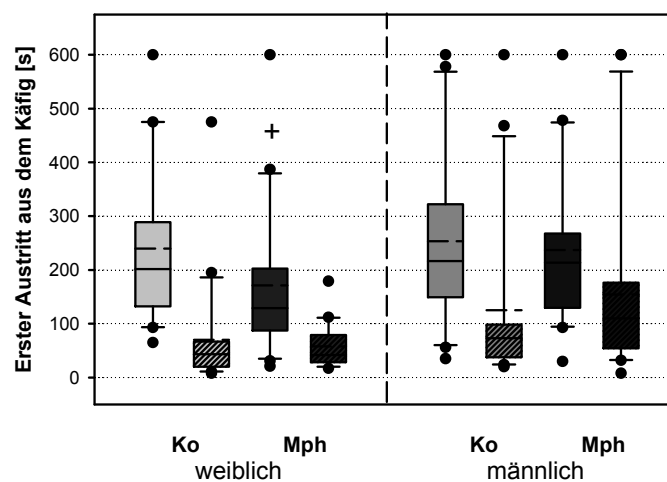
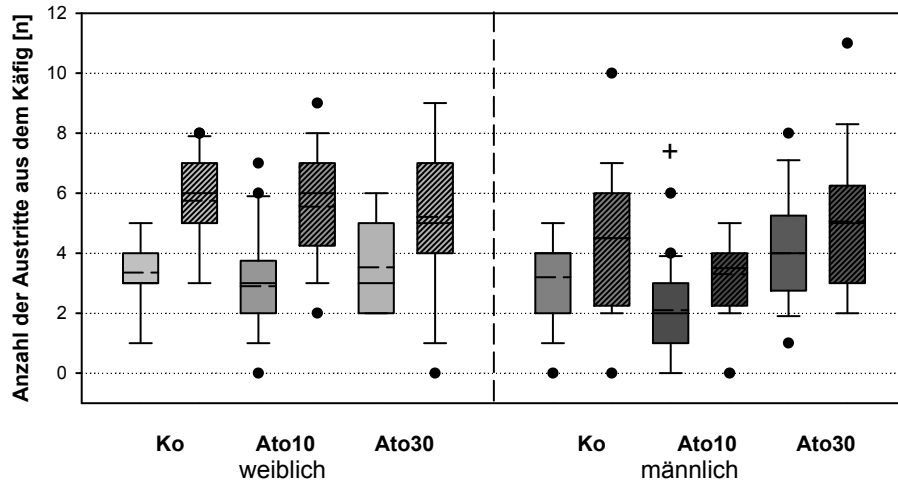


Abb.22a B: Zeit bis zum ersten Austritt im FEP an zwei Folgetagen. Crl:CD(SD)-Ratten. Behandlung mit Methylphenidat. Dargestellt sind die Werte als Box Plots mit Median (durchgezogene Linie) und 25./75. Perzentile. Zusätzlich sind der Mittelwert (gestrichelte Linie) und –wenn vorhanden– Ausreißer angegeben.  $n = 20/\text{Gruppe}$ .  $p < 0,10^+$ . Die Werte des zweiten Tags wurden durch gestrichelte Box Plots dargestellt.



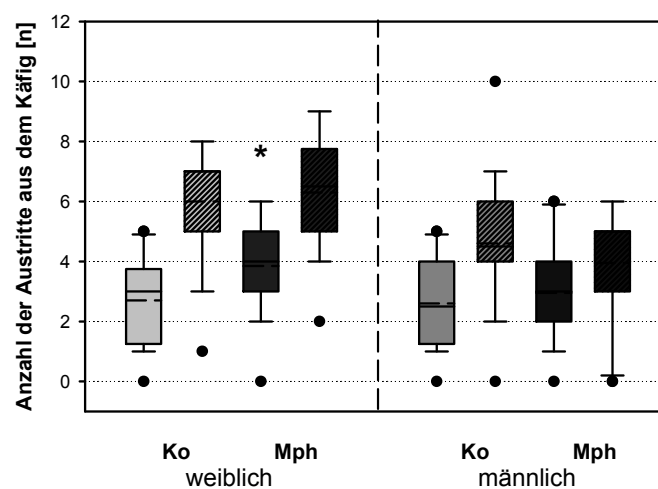
**b.) Anzahl der Austritte aus dem Heimkäfig im FEP  
(78.+79. Lebensstag)**

**A. Atomoxetin**



**Abb.22b A:** Anzahl der Austritte im FEP an zwei Folgetagen. Crl:CD(SD)-Ratten. Behandlung mit Atomoxetin. Dargestellt sind die Werte als Box Plots mit Median (durchgezogene Linie) und 25./75. Perzentile. Zusätzlich sind der Mittelwert (gestrichelte Linie) und –wenn vorhanden– Ausreißer angegeben.  $n = 20/\text{Gruppe}$ ,  $n(\text{♀ Ato 10}) = 19$ ,  $n(\text{♂ Ato 30}) = 18$ .  $p < 0,10^+$ . Die Werte des zweiten Tags wurden durch gestrichelte Box Plots dargestellt.

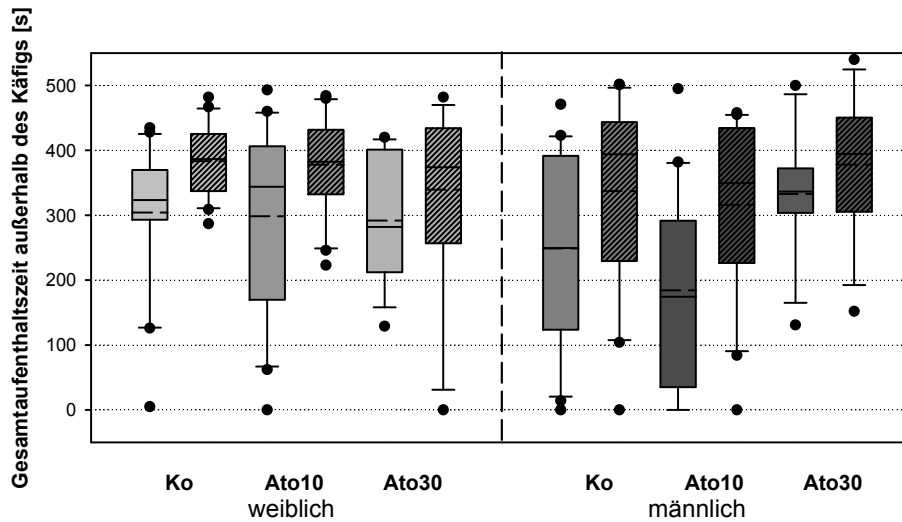
**B. Methylphenidat**



**Abb.22b B:** Anzahl der Austritte im FEP an zwei Folgetagen. Crl:CD(SD)-Ratten. Behandlung mit Methylphenidat. Dargestellt sind die Werte als Box Plots mit Median (durchgezogene Linie) und 25./75. Perzentile. Zusätzlich sind der Mittelwert (gestrichelte Linie) und –wenn vorhanden– Ausreißer angegeben.  $n = 20/\text{Gruppe}$ .  $p < 0,05^*$ . Die Werte des zweiten Tags wurden durch gestrichelte Box Plots dargestellt.

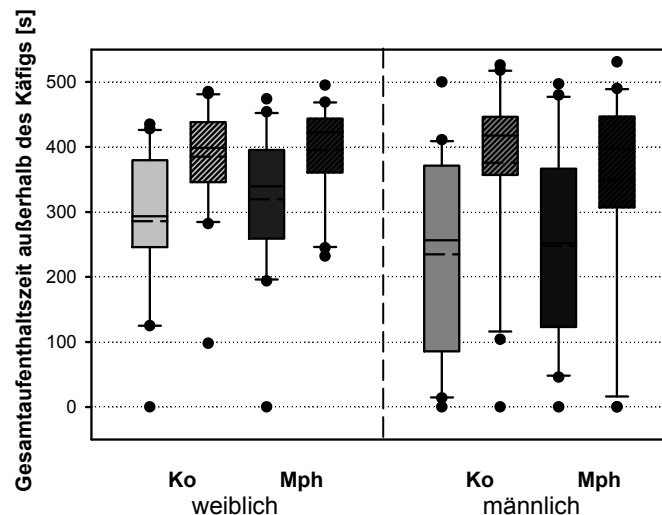
**c.) Gesamtaufenthaltszeit außerhalb des Käfigs im FEP  
(78.+79. Lebensstag)**

**A. Atomoxetin**



**Abb.22c A:** Gesamtaufenthaltszeit außerhalb des Käfigs im FEP an zwei Folgetagen. Crl:CD(SD)-Ratten. Behandlung mit Atomoxetin. Dargestellt sind die Werte als Box Plots mit Median (durchgezogene Linie) und 25./75. Perzentile. Zusätzlich sind der Mittelwert (gestrichelte Linie) und – wenn vorhanden– Ausreißer angegeben.  $n = 20$ /Gruppe,  $n(\text{♀ Ato 10}) = 19$ ,  $n(\text{♂ Ato 30}) = 18$ .  $p < 0,10^+$ . Die Werte des zweiten Tags wurden durch gestrichelte Box Plots dargestellt.

**B. Methylphenidat**



**Abb.22c B:** Gesamtaufenthaltszeit außerhalb des Käfigs im FEP an zwei Folgetagen. Crl:CD(SD)-Ratten. Behandlung mit Methylphenidat. Dargestellt sind die Werte als Box Plots mit Median (durchgezogene Linie) und 25./75. Perzentile. Zusätzlich sind der Mittelwert (gestrichelte Linie) und – wenn vorhanden– Ausreißer angegeben.  $n = 20$ /Gruppe.  $p < 0,10^+$ ,  $p < 0,05^*$ ,  $p < 0,01^{**}$ ,  $p < 0,001^{***}$ . Die Werte des zweiten Tags wurden durch gestrichelte Box Plots dargestellt.

Tab.7: Verhaltensparameter im Free Exploratory Paradigm

## A. Atomoxetin

Free Ex- ploratory Paradigm	w Ko (n=10)	w Ato 10mg/kg (n=10)	w Ato 30mg/kg (n=10)	m Ko (n=10)	m Ato 10mg/kg (n=10)	m Ato 30mg/kg (n=9)
<b>1.Austritt</b> (1.Tag) [s]	143,0 [107,5/214,0]	201,0 [141,5/279,0]	124,0 [77,5/231,0]	222,65 (158,26/35,39)	333,3* (178,39/39,89)	160,17 (105,19/24,79)
<b>1.Austritt</b> (2.Tag) [s]	49,5 [24,5/73,0]	57,5 [36,5/100,5]	59,0 [28,0/99,0]	73,0 [44,0/168,0]	148,0* [94,0/243,0]	88,0 [43,0/118]
<b>Habituation</b> 1.Austritt	P=<0,001***	P=<0,001***	P=0,014*	P=0,015*	P=0,004**	P=0,094 <sup>+</sup>
<b>Austritte</b> (1.Tag) [n]	3,0 [3,0/4,0]	3,0 [2,0/3,5]	3,0 [2,25/5,0]	3,2 (1,54/0,35)	2,1 <sup>+</sup> (1,52/0,34)	4,0 (1,94/0,46)
<b>Austritte</b> (2.Tag) [n]	6,0 [5,0/7,0]	6,0 [4,5/7,0]	5,0 [4,25/6,75]	4,5 (2,37/0,53)	3,3 (1,26/0,28)	5,06 (2,34/0,55)
<b>Habituation</b> Austritte	P=<0,001***	P=<0,001***	P=0,010**	P=0,047*	P=0,008**	P=0,164
<b>Zeit außen</b> (1.Tag) [s]	323,5 [293,5/363,5]	344,0 [184,5/398,5]	282,0 [214,25/400,5]	249,5 [131,5/391,0]	174,5 [44,0/287,0]	336,5 [304,0/361]
<b>Zeit außen</b> (2.Tag) [s]	386,5 [338,5/424,0]	382,5 [340,5/429,5]	374,0 [268,75/432,5]	394,0 [235,0/442,0]	349,5 [227,0/433,0]	394,5 [314,0/450,0]
<b>Habituation</b> Zeit außen	P=0,006**	P=0,072 <sup>+</sup>	P=0,223	P=0,039*	P=0,005**	P=0,180

Tab.7A: Ergebnisse des Free Exploratory Paradigm von Crl:CD(SD)-Ratten an zwei Folgetagen. Behandlung mit Atomoxetin. Angegeben sind die Mittelwerte mit Standardabweichung und Standardfehler bei normalverteilten Werten (gekennzeichnet durch runde Klammern) bzw. die Mediane mit 25./75. Perzentile bei unabhängiger Verteilung der Werte (gekennzeichnet durch *kursive* Schrift und eckige Klammern).  $p < 0,10^+$ ,  $p < 0,05^*$ ,  $p < 0,01^{**}$ ,  $p < 0,001^{***}$ . Alle Felder, in denen  $p < 0,10$  sind zur besseren Übersicht hellgrau unterlegt. Die Zahlenwerte sind auf zwei Stellen hinter dem Komma aufgerundet.

## B. Methylphenidat

Free Ex- ploratory Paradigm	w Ko (n=10)	w Mph 2mg/kg (n=10)	m Ko (n=10)	m Mph 2mg/kg (n=10)
<b>1.Austritt</b> (1.Tag) [s]	201,5 [134,0/277,0]	129,0 <sup>+</sup> [88,0/197]	216,5 [151,5/319,5]	213,5 [133,5/265,5]
<b>1.Austritt</b> (2.Tag) [s]	43,5 [20,5/66,5]	42,0 [29,0/78,0]	73,0 [38,5/98,0]	110,0 [56,5/168,0]
<b>Habituation</b> 1.Austritt	P=<0,001***	P=<0,001***	P=0,001***	P=0,011*
<b>Austritte</b> (1.Tag) [n]	3,0 [1,5/3,5]	4,0* [3,0/5,0]	2,6 (1,43/0,32)	2,95 (1,61/0,36)
<b>Austritte</b> (2.Tag) [n]	7,0 [5,0/7,0]	6,5 [5,0/7,5]	4,6 (2,19/0,49)	3,95 (1,82/0,41)
<b>Habituation</b> Austritte	P=<0,001***	P=<0,001***	P=0,002**	P=0,050*
<b>Zeit außen</b> (1.Tag) [s]	285,9 (115,16/25,75)	319,55 (109,84/24,56)	234,85 (151,62/33,9)	247,55 (148,42/33,19)
<b>Zeit außen</b> (2.Tag) [s]	398,5 [351,0/437,5]	422,5 [364,0/442,5]	417,5 [361,0/446,0]	397,0 [314,0/440,0]
<b>Habituation</b> Zeit außen	P=0,003**	P=0,015*	P=0,002**	P=0,023*

**Tab.7B:** Ergebnisse des Free Exploratory Paradigm von Crl:CD(SD)-Ratten an zwei Folgetagen. Behandlung mit Methylphenidat. Angegeben sind die Mittelwerte mit Standardabweichung und Standardfehler bei normalverteilten Werten (gekennzeichnet durch runde Klammern) bzw. die Mediane mit 25./75. Perzentile bei unabhängiger Verteilung der Werte (gekennzeichnet durch *kursive* Schrift und eckige Klammern).  $p < 0,10^+$ ,  $p < 0,05^*$ ,  $p < 0,01^{**}$ ,  $p < 0,001^{***}$ . Alle Felder, in denen  $p < 0,10$  sind zur besseren Übersicht hellgrau unterlegt. Die Zahlenwerte sind auf zwei Stellen hinter dem Komma aufgerundet.

### 3.5.3. Ergebnisse der analytischen Untersuchungen

#### 3.5.3.1. Methylphenidat- und Atomoxetinkonzentrationen im Blutplasma

Der Wirkstoffspiegel bei den adulten männlichen SD-Ratten betrug zwei Stunden nach der Gabe von 2 mg Methylphenidat pro kg Körpergewicht im Mittel 1,89 ng/ml. Zwei Stunden nach der Gabe von 10 bzw. 30 mg/kg Atomoxetin betrug der Mittelwert 14,37 bzw. 49,45 ng/ml. Dabei wurde ein Ausreißer von 325,43 ng/ml in der Gruppe der Tiere, denen 30 mg/kg Atomoxetin verabreicht worden war, ausgeschlossen.

Abb.23: Methylphenidat- und Atomoxetinkonzentrationen im Blutplasma

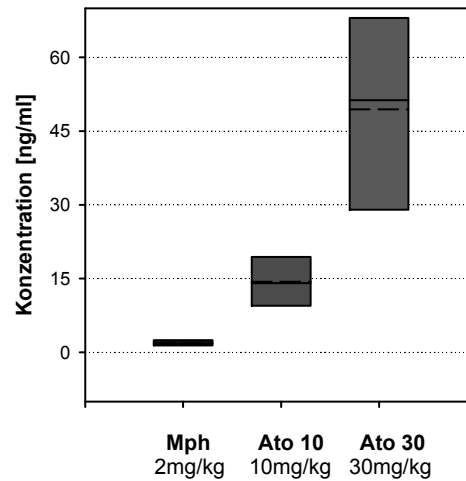
**Wirkstoffkonzentrationen im Blutplasma**

Abb.23: Ergebnisse der HPLC-Analyse: Methylphenidat- und Atomoxetinkonzentration im Blutplasma von erwachsenen Crl:CD(SD)-Ratten.

Dargestellt sind die Werte als Box Plots mit Median (durchgezogene Linie), Mittelwert (gestrichelte Linie) und 25./75. Perzentile. n = 5.

Tab.8: Methylphenidat- und Atomoxetinkonzentrationen im Blutplasma

Substanzspiegel im Blutplasma	m Mph 2mg/kg (n=5)	m Ato 10mg/kg (n=5)	m Ato 30mg/kg (n=5)
Mean [ng/ml]	1,89 ± 0,32	14,37 ± 2,71	49,45 ± 10,2

Tab.8: Ergebnisse der HPLC-Analyse: Methylphenidat- und Atomoxetinkonzentrationen im Blutplasma von erwachsenen Crl:CD(SD)-Ratten. Angegeben sind die Mittelwerte ± Standardfehler.

### 3.5.3.2. Serotonin-, Dopamin- und NoradrenalinKonzentrationen in verschiedenen Gehirnregionen

#### Dopamin

Die Dopaminkonzentration bei den männlichen mit Methylphenidat behandelten Ratten war im Hippocampus deutlich erhöht ( $P = 0,008^{**}$ , s. Abb.24c, Tab.9).

Bei den weiblichen Ratten (30 mg/kg Atomoxetin) ist eine etwas verminderte Dopaminkonzentration im Hippocampus und in der Raphe bestimmt worden ( $P = 0,064^+$  bzw.  $0,054^+$ , Abb.24c, d, Tab.9).

### Serotonin

Allein bei den mit 10 mg/kg Atomoxetin behandelten weiblichen Ratten zeigte sich ein geringfügig verminderter Serotoninspiegel und demzufolge ein erhöhter HIAA/5-HT-Quotient im Striatum ( $P = 0,08^+$  bzw.  $0,056^+$ , s. Abb.24f, Tab.9).

In allen anderen Versuchsgruppen waren die Serotoninkonzentrationen und der HIAA/5-HT-Quotient als Indikator für den Serotoninmetabolismus unverändert.

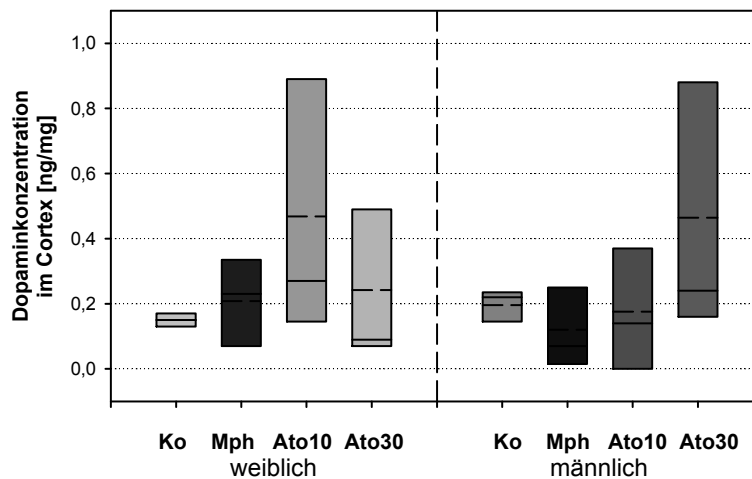
### Noradrenalin

Bei den weiblichen mit Methylphenidat behandelten Ratten war die Noradrenalinkonzentration im Cortex erniedrigt ( $p = 0,027^*$ , s. Abb.24i, Tab.9).

Es ist zu beachten, dass aufgrund der geringen Stichprobenmenge ( $n = 5$ ) weitere mögliche Veränderungen nicht erfasst werden konnten. Verdoppelt man versuchsweise die erhaltenen Ergebnisse ergeben sich weitere Signifikanzen.

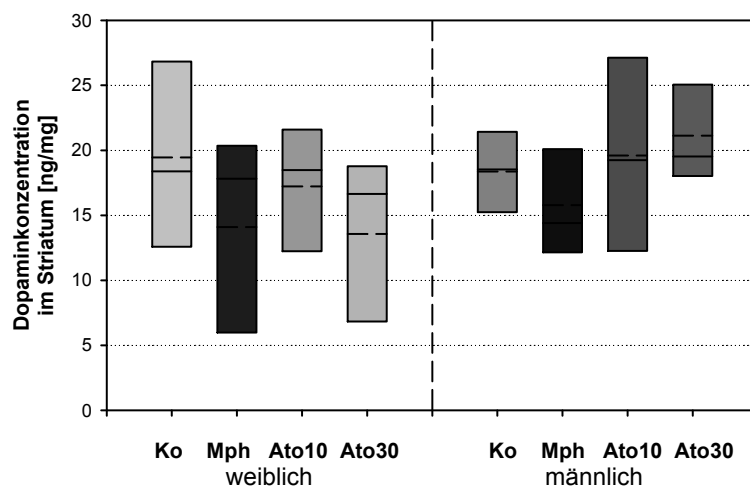
**Abb.24:** Serotonin-, Dopamin- und Noradrenalin-Konzentrationen in verschiedenen Gehirnregionen

**a.) Dopaminkonzentration im Cortex**  
(101. Lebenstag)



**Abb.24a:** Ergebnisse der HPLC-Analyse: Dopaminkonzentration im Cortex. Crl:CD(SD)-Ratten. Dargestellt sind die Werte als Box Plots mit Median (durchgezogene Linie) und 25./75. Perzentile. Zusätzlich ist der Mittelwert (gestrichelte Linie) angegeben. n = 5/Gruppe.

**b.) Dopaminkonzentration im Striatum**  
(101. Lebenstag)



**Abb.24b:** Ergebnisse der HPLC-Analyse: Dopaminkonzentration im Striatum. Crl:CD(SD)-Ratten. Dargestellt sind die Werte als Box Plots mit Median (durchgezogene Linie) und 25./75. Perzentile. Zusätzlich ist der Mittelwert (gestrichelte Linie) angegeben. n = 5/Gruppe.

### c.) Dopaminkonzentration im Hippocampus (101. Lebenstag)

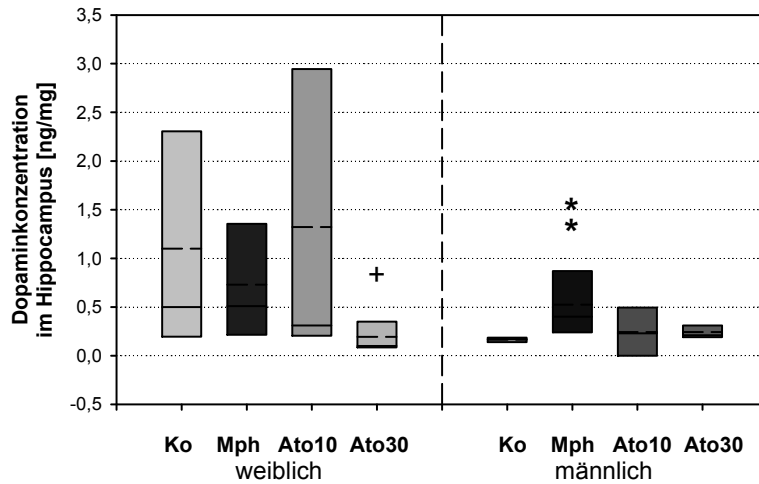


Abb.24c: Ergebnisse der HPLC-Analyse: Dopaminkonzentration im Hippocampus. Crl:CD(SD)-Ratten. Dargestellt sind die Werte als Box Plots mit Median (durchgezogene Linie) und 25./75. Perzentile. Zusätzlich ist der Mittelwert (gestrichelte Linie) angegeben.  $n = 5/\text{Gruppe}$ .  $p < 0,10^+$ ,  $p < 0,01^{**}$ .

### d.) Dopaminkonzentration in der Raphe (101. Lebenstag)

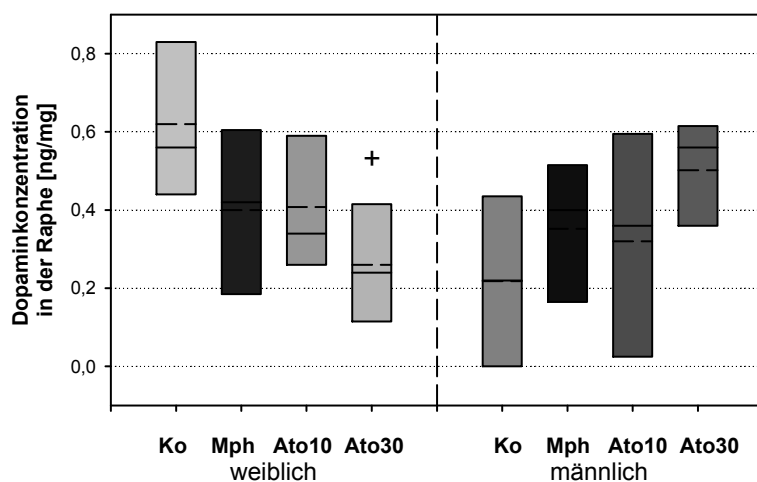


Abb.24d: Ergebnisse der HPLC-Analyse: Dopaminkonzentration in der Raphe. Crl:CD(SD)-Ratten. Dargestellt sind die Werte als Box Plots mit Median (durchgezogene Linie) und 25./75. Perzentile. Zusätzlich ist der Mittelwert (gestrichelte Linie) angegeben.  $n = 5/\text{Gruppe}$ .  $p < 0,10^+$ ,  $p < 0,01^{**}$ .



**e.) Serotoninkonzentration im Cortex**  
(101. Lebenstag)

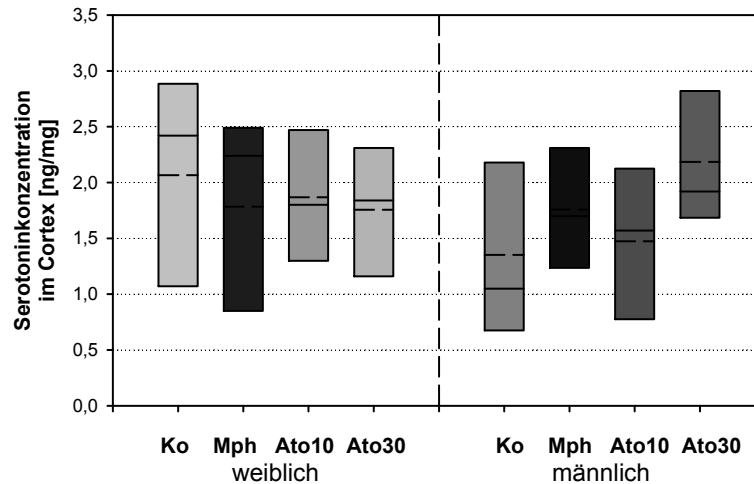


Abb.24e: Ergebnisse der HPLC–Analyse: Serotoninkonzentration im Cortex. Crl:CD(SD)–Ratten. Dargestellt sind die Werte als Box Plots mit Median (durchgezogene Linie) und 25./75. Perzentile. Zusätzlich ist der Mittelwert (gestrichelte Linie) angegeben.  $n = 5$ /Gruppe.

**f.) Serotoninkonzentration im Striatum**  
(101. Lebenstag)

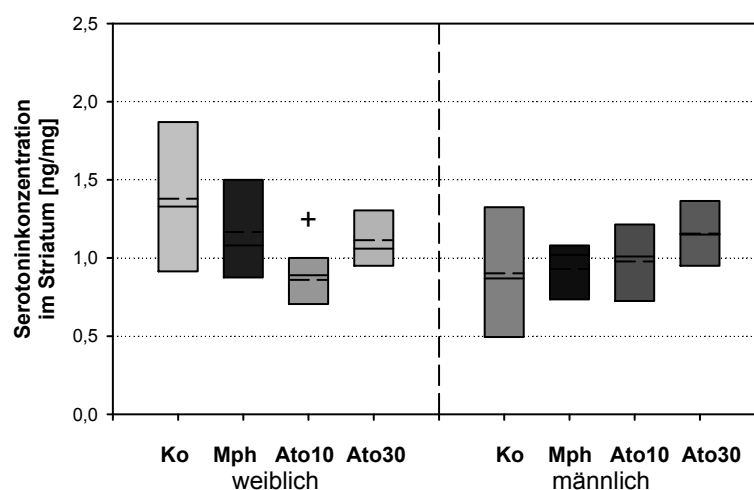


Abb.24f: Ergebnisse der HPLC–Analyse: Serotoninkonzentration im Striatum. Crl:CD(SD)–Ratten. Dargestellt sind die Werte als Box Plots mit Median (durchgezogene Linie) und 25./75. Perzentile. Zusätzlich ist der Mittelwert (gestrichelte Linie) angegeben.  $n = 5$ /Gruppe.  $p < 0,10^+$ .

### g.) Serotoninkonzentration im Hippocampus (101. Lebenstag)

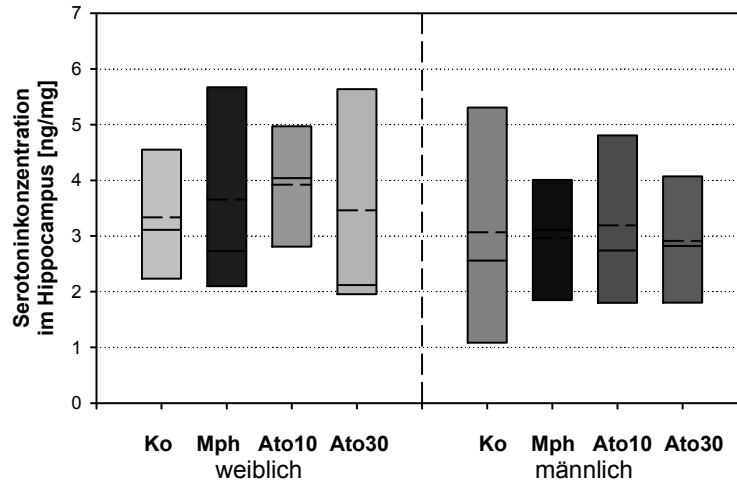


Abb.24g: Ergebnisse der HPLC-Analyse: Serotoninkonzentration im Hippocampus. Crl:CD(SD)-Ratten. Dargestellt sind die Werte als Box Plots mit Median (durchgezogene Linie) und 25./75. Perzentile. Zusätzlich ist der Mittelwert (gestrichelte Linie) angegeben. n = 5/Gruppe.

### h.) Serotoninkonzentration in der Raphe (101. Lebenstag)

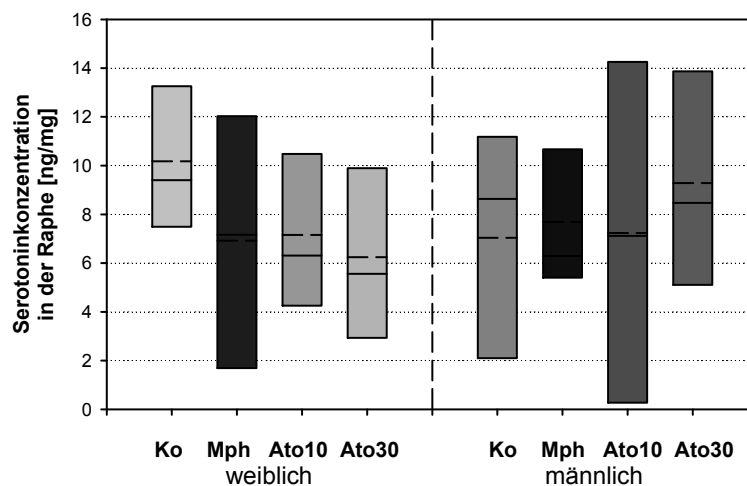


Abb.24h: Ergebnisse der HPLC-Analyse: Serotoninkonzentration in der Raphe. Crl:CD(SD)-Ratten. Dargestellt sind die Werte als Box Plots mit Median (durchgezogene Linie) und 25./75. Perzentile. Zusätzlich ist der Mittelwert (gestrichelte Linie) angegeben. n = 5/Gruppe.

**i.) Noradrenalkonzentration im Cortex**  
(101. Lebenstag)

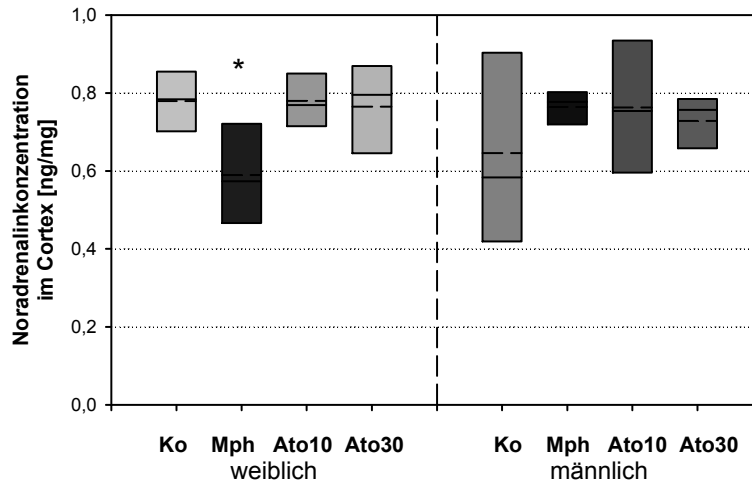


Abb.24i: Ergebnisse der HPLC-Analyse: Noradrenalkonzentration im Cortex. Crl:CD(SD)-Ratten. Dargestellt sind die Werte als Box Plots mit Median (durchgezogene Linie) und 25./75. Perzentile. Zusätzlich ist der Mittelwert (gestrichelte Linie) angegeben. n = 5/Gruppe. p < 0,05\*.

**j.) Noradrenalkonzentration im Striatum**  
(101. Lebenstag)

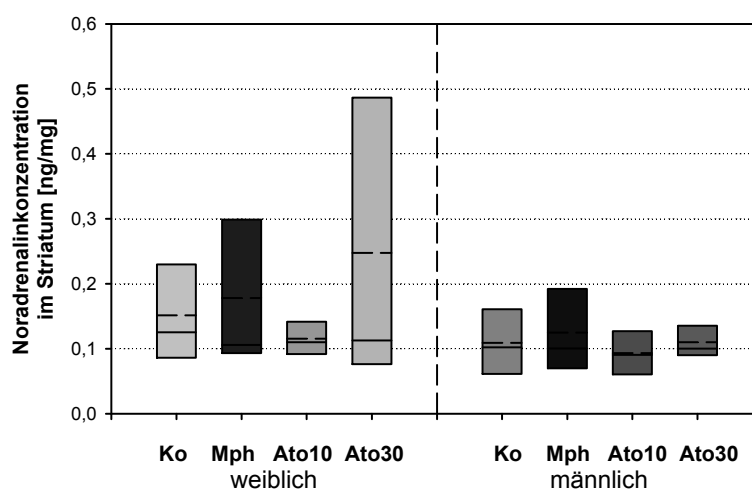


Abb.24j: Ergebnisse der HPLC-Analyse: Noradrenalkonzentration im Striatum. Crl:CD(SD)-Ratten. Dargestellt sind die Werte als Box Plots mit Median (durchgezogene Linie) und 25./75. Perzentile. Zusätzlich ist der Mittelwert (gestrichelte Linie) angegeben. n = 5/Gruppe.

### k.) NoradrenalinKonzentration im Hippocampus (101. Lebenstag)

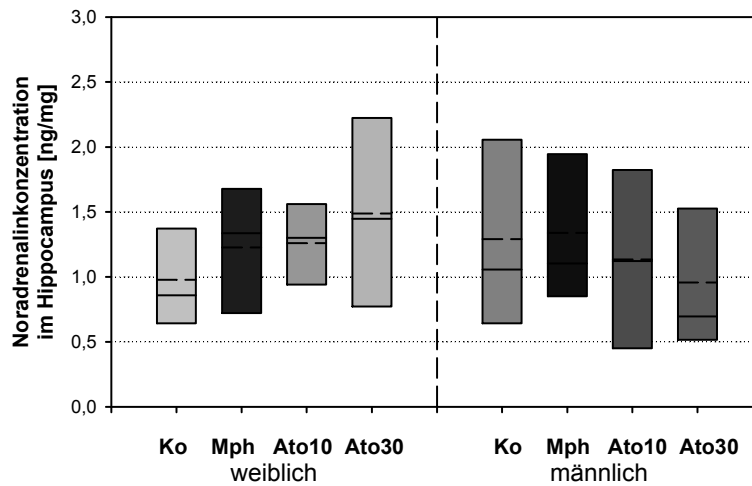


Abb.24k: Ergebnisse der HPLC-Analyse: NoradrenalinKonzentration im Hippocampus. Crl:CD(SD)-Ratten. Dargestellt sind die Werte als Box Plots mit Median (durchgezogene Linie) und 25./75. Perzentile. Zusätzlich ist der Mittelwert (gestrichelte Linie) angegeben. n = 5/Gruppe.

### l.) NoradrenalinKonzentration in der Raphe (101. Lebenstag)

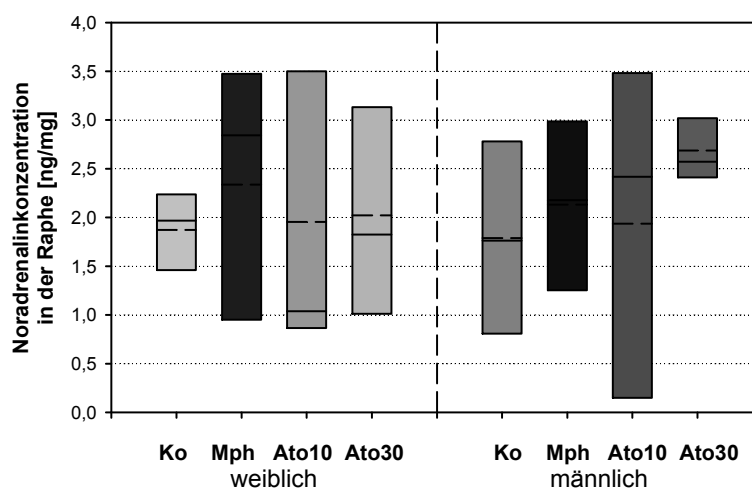


Abb.24l: Ergebnisse der HPLC-Analyse: NoradrenalinKonzentration in der Raphe. Crl:CD(SD)-Ratten. Dargestellt sind die Werte als Box Plots mit Median (durchgezogene Linie) und 25./75. Perzentile. Zusätzlich ist der Mittelwert (gestrichelte Linie) angegeben. n = 5/Gruppe.

Tab.9: Serotonin-, Dopamin- und Noradrenalinkonzentrationen in verschiedenen Gehirnregionen

Neurotransmitter im Gehirn [ng/mg]	w Ko (n=5)	w Mph 2mg/kg (n=5)	w Ato 10mg/kg (n=5)	w Ato 30mg/kg (n=5)	m Ko (n=5)	m Mph 2mg/kg (n=5)	m Ato 10mg/kg (n=5)	m Ato 30mg/kg (n=5)	
DOPAMIN	Cortex	0,15 [0,14/0,17]	0,23 [0,07/0,3]	0,27 [0,15/0,64]	0,09 [0,08/0,34]	0,2 (0,05/0,02)	0,12 (0,12/0,06)	0,18 (0,19/0,09)	
	Striatum	19,44 (7,46/3,34)	14,1 (8,43/3,77)	17,23 (5,25/2,35)	13,57 (7,8/3,49)	18,37 (3,35/1,5)	15,78 (4,59/2,05)	19,6 (7,6/3,4)	
	Hippocampus	0,5 [0,21/1,59]	0,51 [0,22/1,12]	0,31 [0,21/1,96]	0,1 <sup>+</sup> [0,09/0,23]	0,17 [0,15/0,18]	0,4 <sup>**</sup> [0,25/0,65]	0,23 [0,0/0,49]	0,21 [0,2/0,29]
SEROTONIN	Raphe	0,62 (0,26/0,12)	0,4 (0,22/0,1)	0,41 (0,18/0,08)	0,26 <sup>+</sup> (0,18/0,08)	0,22 (0,23/0,1)	0,35 (0,19/0,08)	0,32 (0,29/0,13)	0,5 (0,15/0,07)
	Cortex	2,07 (0,96/0,43)	1,78 (0,87/0,39)	1,87 (0,59/0,26)	1,76 (0,67/0,3)	1,35 (0,8/0,36)	1,76 (0,54/0,24)	1,47 (0,69/0,31)	2,19 (0,72/0,32)
	Striatum	1,38(0,49/0,22) 1,33[0,95/1,83]	1,17 (0,34/0,15)	0,89 <sup>+</sup> [0,71/0,98]	1,06 [0,98/1,3]	0,9(0,42/0,19) 0,87[0,51/1,31]	0,93 (0,23/0,1)	1,01 [0,79/1,17]	1,15 [1,01/1,35]
	Hippocampus	3,34 (1,23/0,55)	3,65 (2,22/0,99)	3,92 (1,4/0,63)	3,46 (2,09/0,93)	3,07 (2,14/0,96)	2,96 (1,12/0,5)	3,19 (1,79/0,8)	2,91 (1,29/0,58)
	Raphe	10,18 (3,31/1,48)	6,92 (5,17/2,31)	7,16 (3,46/1,55)	6,24 (4,46/2,0)	7,04 (4,69/2,1)	7,69 (2,8/1,25)	7,24 (7,73/3,46)	9,28 (4,75/2,12)
	Cortex	0,78 (0,09/0,04)	0,59 <sup>*</sup> (0,13/0,06)	0,78 (0,07/0,03)	0,77 (0,12/0,05)	0,65(0,25/0,11) 0,58[0,44/0,89]	0,78 [0,73/0,79]	0,76 (0,2/0,09)	0,73 (0,07/0,03)
NORADRENALIN	Striatum	0,13 [0,09/0,21]	0,11 [0,1/0,22]	0,11 [0,1/0,14]	0,11 [0,08/0,3]	0,11 (0,06/0,03)	0,13 (0,08/0,04)	0,09 (0,03/0,02)	0,11 (0,03/0,01)
	Hippocampus	0,98 (0,42/0,19)	1,23 (0,53/0,24)	1,26 (0,37/0,17)	1,49 (0,74/0,33)	1,29 (0,78/0,35)	1,34 (0,58/0,26)	1,13 (0,69/0,31)	0,96 (0,53/0,24)
	Raphe	1,87 (0,39/0,18)	2,34 (1,31/0,58)	1,95 (1,43/0,64)	2,02 (1,11/0,5)	1,79(1,05/0,47) 1,76[0,98/2,6]	2,13 (0,89/0,4)	2,18 [0,15/3,43]	2,57 [2,48/2,9]

Tab.9: Ergebnisse der HPLC- Analyse der Serotonin-, Dopamin- und Noradrenalinkonzentrationen in verschiedenen Gehirnregionen. Angegeben sind die Mittelwerte mit Standardabweichung und Standardfehler bei normalverteilten Werten (gekennzeichnet durch runde Klammern) bzw. die Mediane mit 25./75. Perzentile bei unabhängiger Verteilung der Werte (gekennzeichnet durch *kursive* Schrift und eckige Klammern).  $p < 0, 10^+$ ,  $p < 0, 05^*$ ,  $p < 0, 01^{**}$ . Alle Felder, in denen  $p < 0, 10$  sind zur besseren Übersicht hellgrau unterlegt. Die Zahlenwerte sind auf zwei Stellen hinter dem Komma aufgerundet.

## ZUSAMMENFASSUNG

### *a.) Ergebnisse der physiologischen Untersuchungen*

Der Futterverbrauch ist bei den adulten mit Methylphenidat behandelten Tieren erniedrigt.

Die Behandlung mit Atomoxetin hat bei den weiblichen Ratten Auswirkungen im Sinne einer Erhöhung auf das Körpergewicht (10 mg/kg) und auf den Body Mass Index (30 mg/kg). Es zeigen sich zwischen den Behandlungsgruppen keine Unterschiede in der Körperlänge.

Während der Wirkstoffgabe ist die Aktivität der männlichen mit Methylphenidat behandelten Ratten erhöht, bei den adulten Tieren sind sowohl im InfraMot als auch Wheel Running keine Aktivitätsunterschiede auszumachen.

### *b.) Ergebnisse der ethologischen Untersuchungen*

**50. LT:** Im Elevated Plus Maze sind die mit 10 mg/kg Atomoxetin behandelten weiblichen Ratten ängstlicher („state anxiety“), die mit Methylphenidat behandelten weiblichen Ratten weniger aktiv. Im Hole Board zeigt sich eine verstärkte Habituation bei männlichen und weiblichen mit 10 mg/kg Atomoxetin behandelten Tieren und der männlichen Methylphenidat-Tiere.

**64. LT:** Im Open Field ist die Aktivität der mit 30 mg/kg Atomoxetin behandelten weiblichen Ratten erniedrigt. Die männlichen Methylphenidat-Tiere zeigen eine verminderte Anzahl an Rearings. Im Rota Rod ist eine verringerte motorische Koordination der mit 10 mg/kg Atomoxetin behandelten weiblichen Ratten erkennbar.

**78. LT:** Im Free Exploratory Paradigm zeigen sich die mit 10 mg/kg Atomoxetin behandelten männlichen Ratten ängstlicher („trait anxiety“), die mit Methylphenidat behandelten weiblichen Ratten aktiver. Die männlichen und weiblichen mit 30 mg/kg Atomoxetin behandelten Tiere sowie die männlichen mit Methylphenidat behandelten Ratten zeigen eine verminderte Habituation.

### *c.) Ergebnisse der analytischen Untersuchungen*

Die Dopaminkonzentration bei den männlichen mit Methylphenidat behandelten Ratten im Hippocampus ist erhöht. Bei den weiblichen Ratten (30 mg/kg Atomoxetin) ist eine etwas verminderte Dopaminkonzentration im Hippocampus und in der Raphe zu sehen.

Bei den mit 10 mg/kg Atomoxetin behandelten weiblichen Ratten zeigt sich ein geringfügig verminderter Serotoninspiegel und demzufolge ein erhöhter HIAA/5-HT-Quotient im Striatum. Bei den weiblichen mit Methylphenidat behandelten Ratten ist die NoradrenalinKonzentration im Cortex erniedrigt.

## 4. Diskussion

### 4.1. EINLEITUNG

Die Aufmerksamkeitsdefizit–Hyperaktivitätsstörung ist die häufigste psychiatrische medikamentös behandelte Erkrankung bei Kindern und Jugendlichen. Seit über 50 Jahren werden Psychostimulantien wie Dexamphetamin und Methylphenidat zur Therapie der ADHS eingesetzt. Der in Deutschland 2005 eingeführte selektive Noradrenalinwiederaufnahme–hemmer Atomoxetin erweitert die Möglichkeiten einer medikamentösen Therapie. Das Verschreibungsvolumen beider Substanzen steigt stetig. Langfristige Auswirkungen besonders im Falle der möglicherweise beträchtlichen Anzahl von falsch–positiven Diagnosen sind nur unzulänglich untersucht. Das Ziel des Forschungsvorhabens war es, Verhaltensänderungen von erwachsenen Ratten, die im Jungtieralter für 14 Tage mit Methylphenidat oder Atomoxetin behandelt wurden, zu erfassen.

### 4.2. DISKUSSION DER METHODIK

#### *Wahl des Rattenstammes*

Unterschiede im Verhalten zwischen den einzelnen Auszuchtrattenstämmen sind schon seit langem bekannt und wurden wiederholt beschrieben (Broadhurst, 1958, Porsolt et al., 1978, Rex et al., 1996). Selbst zwischen den einzelnen Zuchtlinien sind Verhaltensdifferenzen nicht auszuschließen (Glick et al., 1986, Hirate et al., 1988, Rex et al., 2007). Auch Unterschiede in den zentralen Neurotransmittersystemen sind seit längerem bekannt (Jenni–Eiermann et al., 1986) und wiederholt wurden auch unterschiedliche Reaktionen verschiedener Stämme auf Substanzgaben beschrieben (Ho et al., 1977). Deswegen ist die Wahl des Rattenstammes ein einflussgebender Faktor auf die Versuchsergebnisse.

Es sprachen mehrer Gründe gegen die Wahl eines als Tiermodells für ADHS eingesetzten Rattenstammes wie der Spontan–Hypertensiven–Ratte: zum einen waren die Symptome der ADHS und die Effekte einer Methylphenidatgabe unbeständig und dieser Stamm somit als repräsentatives Tiermodell der ADHS unzuverlässig (van den Bergh et al., 2006), zum anderen sollte ohnehin gezielt den Folgen der Behandlung Gesunder nachgegangen werden. Die Sprague–Dawley–Ratte ist weithin bei tierexperimentellen Fragestellungen gefragt, sie ist die meist genutzte Auszuchtratte in der Labortierforschung. Im Vergleich mit Wistar–Kyoto–

Ratten und Spontan-Hypertensiven-Ratten zeigten Sprague-Dawley-Ratten bei akuter Gabe eine mittlere Ansprechbarkeit auf Methylphenidat (Amini et al., 2004).

Letztendlich ist also mit hoher Wahrscheinlichkeit davon auszugehen, dass bei der Wahl eines anderen Stammes zumindest geringfügige Abweichungen von den Ergebnissen unserer Sprague-Dawley-Ratten zu erwarten wären und es spricht –obwohl bis jetzt nicht untersucht– viel dafür, dass es nicht nur die Wirkungen des Methylphenidats, sondern auch die des Atomoxetins beträfe.

### *Wahl des Alters*

Das Alter der Tiere während der Wirkstoffgabe spielt nicht nur aufgrund der pharmakokinetischen und pharmakodynamischen Unterschiede in verschiedenen Lebensaltern (Claasen, 1994) eine maßgebliche Rolle. Gerade bei der Gabe von in den Hirnstoffwechsel eingreifenden Medikamenten ist der Stand der Hirnentwicklung zu berücksichtigen. In den ersten Jahren eines Menschen ist die Entstehung, Differenzierung und Migration der Gehirnzellen schon fast komplett abgeschlossen, nachfolgend beginnt jedoch bis ins junge Erwachsenenleben hinein die Ausbildung und Feinabstimmung der Synapsen in regional unterschiedlicher Art und Weise. Dieser Prozess verläuft bei allen Säugetierspezies, eingeschlossen Menschen und Ratten, ähnlich (Andersen, 2003). Das heißt aber auch, dass während dieser Zeit v.a. während sensibler Phasen medikamentöse Eingriffe durch so genanntes „neuronal imprinting“ den ursprünglichen Entwicklungsverlauf entscheidend beeinflussen bzw. verändern können und damit langfristige Auswirkungen haben. Für Methylphenidat ist nachgewiesen, dass es bei chronischer Applikation zu altersabhängigen Auswirkungen kommen kann. So konnte gezeigt werden, dass die chronische Behandlung neugeborener Ratten mit einer hohen Methylphenidat-Dosis (35 mg/kg 2 x tgl.) zu einer kurzzeitigen Wachstumsverlangsamung mit anschließender Erholung führte, bei periadoleszenten Ratten jedoch keinen Einfluss hatte (Pizzi et al., 1987). Heyser und Mitarbeiter zeigten, dass nach einer chronischen Gabe von 5 mg/kg Methylphenidat bei frisch abgesetzte Ratten zu einer erhöhten lokomotorische Aktivität und einem gestörten Explorationsverhalten führten, während bei periadoleszenten Ratten wiederum nur das veränderte Explorationsverhalten zu beobachten war (Heyser et al., 2004). Bei erwachsenen Ratten kam es nach wiederholter Gabe von Methylphenidat zu keinen bleibenden Veränderungen der Konzentrationen der Monoamine und ihrer Transporter (Yuan et al., 1997,



Sproson et al., 2001), jedoch stellten Moll et al. eine um 70 %ige Verminderung der DAT-Dichte bei in der Periadoleszenz behandelten Ratten fest (Moll et al., 2001).

Das Hauptbehandlungsalter einer ADHS beim Menschen liegt zwischen 6 und 16 Jahren, jedoch kommt es mitunter auch zu Verschreibungen im 3. Lebensjahr (von Ferber, 2003). Es handelt sich also um den Zeitraum vom Kindesalter bis in die Pubertät hinein (im Normalfall wird in unseren Breiten die Pubertät bei Mädchen zwischen dem 10. und 18. Lebensjahr und bei Jungen zwischen dem 12. und 20. Lebensjahr durchlaufen). Rattenjunge werden in der Regel mit drei Wochen von der Mutter abgesetzt, auch unter natürlichen Bedingungen verbringen sie während der vierten Woche den größten Anteil ihrer aktiven Zeit unabhängig von der Mutter außerhalb des Nestes, die Pubertät tritt zwischen dem 40. und 70. Lebenstag ein (Schleif, 2001). Mit der Wirkstoffgabe vom 28. bis 42. Lebenstag der Ratte dürfte also ein dem Hauptbehandlungsalter beim Menschen ähnliches Zeitfenster gewählt worden sein.

#### *Wahl der Dosis*

Die Dosisfindung richtete sich nach den Akutversuchen, d.h. bei Methylphenidat wurde eine Dosierung gewählt, die keine vermehrte Aktivität zeigte und bei Atomoxetin eine, die keine sedierenden Effekte hatte. Die Plasmauntersuchung nach Gabe von 10 bzw. 30 mg/kg Atomoxetin wies einen Blutspiegel von durchschnittlich 14 bzw. 49 ng/ml nach. Diese beiden Werte stimmen ungefähr mit den orientierendem therapeutischen Bereich von Atomoxetin zwischen 13 und 45 ng/ml in der Humanmedizin überein (Bereich Experimentelle Psychiatrie, Univ. Klinik für Psychiatrie, Universität Innsbruck). Der Ausreißer von 325 ng/ml bei der 30 mg/ml Dosis Atomoxetin könnte die Situation der „poor metabolizer“ der menschlichen Bevölkerung widerspiegeln. 7 % der weißen Bevölkerung bauen Atomoxetin über das Cytochrom P450 2D6-Isoenzym verlangsamt ab, die Halbwertszeit und die maximale Plasmakonzentration sind bei diesen Menschen wesentlich, ungefähr um ein fünffaches, höher (Wirkstoff Bibliothek, 2005).

Von Methylphenidat ist bekannt, dass es zu hohen inter- und intraindividuellen Unterschieden in der Plasmakonzentration kommen kann, die jedoch keine prädiktive Aussagekraft für die therapeutische Wirksamkeit haben (Novartis Pharma, 2005). Für Methylphenidat wird der orientierende therapeutische Bereich in der Humanmedizin zwischen 8–30 ng/ml angegeben (MVZ Labor Nord-West GmbH, 2008). Allerdings konnte in tierexperimentellen Studien gezeigt werden, dass die Wirkungen von Methylphenidat auf kognitive Funktionen bei peroraler Gabe eine dosisabhängigen Verlauf in Form eines

umgekehrten Us nehmen. Niedrige Dosen von 1–2 mg verbesserten dabei die kognitiven Fähigkeiten, wohingegen höhere Dosen (2–3 mg/kg) zu einer erhöhten Fehlerrate führten (Arnsten et Dudley, 2005). Es kann angenommen werden, dass in den meisten früheren Verhaltensstudien, die Dosisgabe von Methylphenidat zu hoch war und die Administration per Injektion des weiteren dazuführte, dass die pharmakokinetischen Prozesse und der Wirkstoffspiegel eher zur Untersuchung des Suchtpotentials als der der Auswirkungen einer ADHS–Therapie geeignet war. Eine Überlegung wäre es allerdings, dass kurzwirksame Methylphenidathydrochlorid durch eine Retardformulierung zu ersetzen. Eine zweimalige Gabe ist als unpraktikabel anzusehen und würde zudem das Risiko unerwünschter unkontrollierbarer Effekte, die eine noch vermehrte direkte Handhabung der Tiere („handling“) in sich birgt, vergrößern.

#### *Wahl der Applikationsart*

Dass die Art der Applikation Unterschiede in der Pharmakokinetik bedingt, ist allseits bekannt. Im Vergleich zu parenteralen Verabreichung resultieren orale Gaben in Vergleichsweise niedrigen Plasmaspiegeln. Dies ist in unserem Versuch nur erwünscht (s. oben). Da die Einnahme der ADHS–Medikamente beim Menschen auch oral erfolgt, ist die Administration per os nahe liegend. Natürlich ist ein direkter Umgang mit den Tieren bei der Medikamentengabe kaum vermeidbar. Ein vermehrtes Handling kann zu einer verminderten Angst führen und die Wirkung einer Substanz verändern (Andrews et File, 1993). In unserem Vorversuch haben wir gezeigt, dass sich die behandelten Tiere unabhängig von der Applikationsart im EPM angstloser als die ungehandelten Tiere verhielten, im FEP jedoch die Tiere, die den Wirkstoff mit der Mikropipette verabreicht bekamen, angstloser als die anderen waren, ansonsten konnten wir keinerlei Unterschiede zwischen den Gruppen ausmachen (Schmidt et al., 2007).

#### *Wahl der Verhaltenstests*

Mehrere Autoren gehen davon aus, dass die einzelnen Verhaltenstests unterschiedliche Formen der Angst repräsentieren und auch die Wirkung einer Substanz von der Art des Tests abhängig ist (Lister, 1990; Handley et McBlane, 1993; Griebel, 1995; Treit et Menard, 1998). Die von uns gewählten Angsttests (EPM, HB, OF, FEP) basieren alle auf dem Explorationsverhalten (Lister, 1990) und können durch Änderungen der lokomotorischen

Aktivität, z.B. die Gesamteintritte auf offene und geschlossene Arme (EPM), Anzahl der Nosepokes (HB), Anzahl der durchlaufenen Lichtschranken (OF), Anzahl der Austritte (FEP), beeinflusst werden. Dies ist unabdinglich, da das Angstverhalten eng mit der Lokomotion verknüpft zu sein scheint. Ohne diese Komponente wäre es schwierig zu beurteilen, ob beispielsweise die vermehrten Eintritte auf die offenen Arme (EPM) oder in das Zentrum des Feldes (OF) ein Ausdruck überschießender Aktivität oder Angstlosigkeit sind. Da die motorische Aktivität bei dem Krankheitsbild der ADHS und ihrer Behandlung eine entscheidende Rolle spielt, wurde diese mit verschiedenen Methoden (InfraMot, Laufrad, Rota Rod) gesondert untersucht. Die gewählten Tests sind auf das unkonditionierte, natürliche Verhalten der Ratte gerichtet und sollten somit am besten geeignet sein, Hinweise auf die Auswirkungen auf das Verhalten der behandelten Kinder zu geben.

#### *Wahl der analytischen Untersuchung*

Es ist davon auszugehen, dass sowohl Dopamin als auch Noradrenalin eine maßgebliche Rolle bei der Pathogenese der ADHS spielen, wohingegen die Rolle des Serotonins noch unklar ist (s.2.1.4.).

Es ist bekannt, dass sowohl Atomoxetin als auch Methylphenidat die Konzentrationen von Noradrenalin und Dopamin im präfrontalen Cortex erhöhen. In weiteren Gehirnregionen erhöht jedoch Methylphenidat nur den Dopaminspiegel, wohingegen Atomoxetin nur den Noradrenalinspiegel erhöht (Bymaster et al., 2002; Swanson et al., 2006); dies lässt den Schluss zu, dass diese jeweilige Wirkung für das gesamte Gehirn zutrifft.

Für Methylphenidat konnte gezeigt werden, dass sowohl akute wie auch chronische Gaben keine Auswirkungen auf den Serotoninspiegel haben (Segal et Kuczenski, 1999); für Atomoxetin liegen keine derartigen Untersuchungen vor.

Für Methylphenidat wurden bereits dauerhafte Veränderungen im Gehirn nach einer chronischen Gabe bei jugendlichen Ratten im Erwachsenenalter nachgewiesen:

Es wurden bei adulten Ratten weniger Catecholamine gefunden (direkt im Anschluss an die Gabe wurden hingegen höhere Konzentrationen an Catecholaminen und Neuronen gefunden, aber die Anzahl der Noradrenalintransporter war vermindert) (Gray et al., 2007).

Wie bereits oben erwähnt, fanden Moll et al eine reduzierte Anzahl von Dopamintransportern im Striatum vor (Moll et al., 2001).

Zusätzlich konnte eine Up-Regulation verschiedener Neurotransmitterrezeptoren im Striatum ausgemacht werden (Adriani et al., 2006).

In weiteren Untersuchungen wurden eine eingeschränkte Lebensdauer von Neuronen v.a. im Hippocampus (Lagace et al., 2006), oxidativ bedingte Schäden (Martins et al., 2006), eine kurzfristige Erhöhung mit darauf folgender Reduktion der Entladungsfrequenz dopaminerger Neurone im Mittelhirn beschrieben (Brandon et al., 2003).

Für Atomoxetin wurden noch keine Untersuchungen über langfristige Veränderungen im Gehirn veröffentlicht. Hinweise lassen sich nur aus Studien mit pharmakologisch verwandten Substanzen entnehmen:

So wiesen Hilakivi et al. nach, dass eine Gabe von Monoaminwiederaufnahmehemmern bei jungen Ratten abhängig von der jeweiligen Substanz und untersuchten Gehirnregion zu Veränderungen im Metabolismus von Dopamin, Noradrenalin oder Serotonin führen kann (Hilakivi et al., 1995).

Wiederholte Untersuchungen mit dem Serotoninwiederaufnahmehemmer Fluoxetin und dem Noradrenalinwiederaufnahmehemmer Reboxetin zeigen eine Erhöhung der Serotonintransporter im frontalen Cortex, jedoch keine der Noradrenalintransporter (Bock et al., 2005). Zu dem gleichen Ergebnis in Bezug auf das Fluoxetin war auch schon die Arbeitsgruppe um Wegerer gekommen (Wegerer et al., 1999).

Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass der Monoaminwiederaufnahmehemmer Desipramin bei Gabe bei noch nicht abgesetzten Ratten Veränderungen in dem D<sub>1</sub>/D<sub>2</sub>-Rezeptoren-Verhältnis bewirkt (Hilakivi et al., 1999).

Die Untersuchung von Neurotransmittern ist an unserem Institut seit langem etabliert. In verschiedenen tierexperimentellen Studien konnte bereits gezeigt werden, dass langfristige neuronale Veränderungen möglich sind. Da es noch keine diesbezüglichen Ergebnisse für Atomoxetin gibt und dies unter identischen Bedingungen auch noch nicht für Methylphenidat untersucht worden ist, ist die Untersuchung der Neurotransmitter ein guter Ansatzpunkt, um langfristige Auswirkungen auf das Gehirn zu untersuchen und möglicherweise auch Rückschlüsse auf Veränderungen bei den dazugehörigen Rezeptoren und Transportern zu ziehen.

### 4.3. DISKUSSION DER ERGEBNISSE

#### *Diskussion der Ergebnisverteilung*

Leider zeigen die Ergebnisse durchweg eine relativ große Streuung. Jedoch ist es durchaus nicht ungewöhnlich, dass Tiere einer bestimmten Population eine Vielfalt von Verhaltensvariationen zeigen. Auch die Sensitivität gegenüber Substanzen kann interindividuell variieren –sowohl bei den Labortieren wie auch bekanntermaßen bei menschlichen Patienten. Interindividuelle Unterschiede von Ratten konnten z.B. bezüglich des Distributionsvolumens (Johannessen et Aarbakke, 1982), der Plasmaproteinbindung (Yacobi et al., 1975), der Metabolisierungsrate (van der Graaff et al., 1983) festgestellt werden. So stellten Segal und Kuczenski trotz strenger Kontrolle der Versuchsvariablen eine hohe, nicht zu eliminierende interindividuelle Variabilität in dem Verhalten einer Sprague–Dawley–Ratten–Population nach Gabe von d–Amphetamin fest (Segal et Kuczenski, 1987). Es sollen bereits vier Subtypen der ADHS anhand unterschiedlicher Reaktionen von Sprague–Dawley–Ratten auf Methylphenidat/Atomoxetin und verschiedene Umweltreize klassifiziert worden sein, die die menschlichen Verhaltensdimensionen spezifischer widerspiegeln (Blondeau et Dellu–Hagedorn, 2006). Unser Anliegen war es aber nicht die möglichen Auswirkungen nur auf eine spezielle Gruppe zu testen. Eine vorherige Klassifizierung der Tiere mit nachfolgender Versuchsdurchführung in den verschiedenen Subtypen–Gruppen wäre schwer umzusetzen (zeitliche Engpässe, hohe Tieranzahl, Zeitpunkt der Klassifizierungsversuche, Einfluss der Klassifizierungsversuche auf Folgeversuche, eventuell sogar vorherige Zucht von Subtypen). Unser Versuchsansatz bietet die Möglichkeit, einen Gesamtüberblick zu gewinnen.

#### *Diskussion der Geschlechterdifferenzen*

Es ist bekannt, dass sowohl das Verhalten als auch pharmakologische Wirkungen bei einer weiblichen Ratte abhängig vom Stand des sexuellen Zyklus variieren können. Es wird angenommen, dass die Versuchsdurchführung mit weiblichen Ratten aufgrund des sich regelmäßig verändernden hormonellen Status eine größere Variabilität der Ergebnisse als bei Männchen zur Folge hat (Claasen, 1994). Abgesehen davon gibt es aber eine Anzahl von Reaktionen, in denen sich die durchschnittlichen Werte von weiblichen und männlichen Tieren eindeutig unterscheiden. So sind weibliche Ratten im Allgemeinen aktiver (Joseph et

Gallagher, 1980), rennen im Laufrad deutlich mehr (Eikelboom et Mills, 1988) und scheinen weniger ängstlich bzw. explorativer (Ray et Hansen, 2004). Dies wird durch unsere Ergebnisse bestätigt.

Vom Menschen weiß man, dass Mädchen gemeinhin früher und in geringeren Ausmaßen Synapsen und Rezeptoren überproduzieren (Giedd et al., 1999), so dass medikamentöse Eingriffe durchaus geschlechtsspezifische Auswirkungen haben können. Geschlechterdifferenzen bei akuten, und möglicherweise auch chronischen Gaben von Stimulantien hängen vom Östrogenspiegel ab (Kuhn et al., 2001). Gonadale Steroide bestimmen schon früh die Sensitivität für Stimulantien und resultieren später in geschlechtlichen Unterschieden (Kuhn et al., 2001).

Die Arbeitsgruppe um Vendruscolo konnte bei weiblichen SHR im Vergleich zu männlichen Ratten einen vermehrten Alkoholkonsum nach chronischer Methylphenidatbehandlung in der Periadoleszenz feststellen. Die Ergebnisse dieser Arbeitsgruppe zeigten weiterhin ein ängstlicheres Verhalten der vorbehandelten Ratten im OF, nicht jedoch im EPM (Vendruscolo et al., 2008). Auch unsere Ergebnisse zeigen deutliche geschlechtsspezifische Unterschiede auf allen Untersuchungsebenen. Dies spricht für eine unterschiedliche Sensitivität, möglicherweise bedingt durch einen unterschiedlichen neuronalen Entwicklungsverlauf und Metabolismus, bei jungen weiblichen und männlichen Ratten sowohl für Methylphenidat als auch Atomoxetin.

### *Diskussion der Ergebnisse der physiologischen Untersuchungen*

Bei Menschen ist ein geringer, oft auch vorübergehender Appetitverlust unter Stimulantien und Nicht-Stimulantientherapie häufig (Graham et Coghill, 2008). In tierexperimentellen Untersuchungen wurde nach einer akuten Gabe von 20 mg/kg Methylphenidat und ab einer Dosis von 3 mg/kg Atomoxetin per os eine verminderte Aufnahme von Milch bei Ratten festgestellt (Pearl et Seiden, 1976, Gehlert et al., 1998). Die Ergebnisse unserer Akutversuche unterstützen diese Befunde: Sie zeigen eine Appetitminderung ab einer Dosierung von 30 mg/kg Atomoxetin, während bis 6 mg/kg Methylphenidat keine Appetitminderung festzustellen war. Des Weiteren wurde festgestellt, dass dieser Effekt zumindest bei Methylphenidat nach wiederholter Gabe nicht mehr vorhanden war (Pearl et Seiden, 1976). Auch die Arbeitsgruppe um Bolanos stellte nach Gabe von Methylphenidat weder einen Unterschied in der Körpergewichtszunahme noch der Wasseraufnahme fest (Bolanos et al., 2003).

Auch unsere Ergebnisse zeigen bei der Messung von Futter und Wasser in der Methylphenidat-Gruppe bei den Jungtieren keinen Effekt. Betrachtet man den Graphen der mit Atomoxetin behandelten Tiere, sieht es allerdings wieder so aus als würde 10 mg/kg Atomoxetin –wie auch in unseren Akutversuchen– den Appetit steigern. Als Konsequenz der appetitsteigernden Wirkung von 10 mg/kg Atomoxetin ist es nicht verwunderlich, dass die weiblichen mit 10 mg/kg behandelten Tiere ein erhöhtes Körpergewicht haben. Diesen Vorsprung behalten sie über die Wirkstoffapplikation hinweg und gleichen sich erst gegen Ende des Versuchsdurchlaufs wieder an das Gewicht der Kontrolltiere an. So ist bekannt, dass Gewichtszunahmen in der frühen postnatalen Periode mit einem dauerhaften Übergewicht einhergehen können (Xiao et al., 2007). Die Dosierung mit 30 mg/kg Atomoxetin scheint den Appetit mindern, wobei die weiblichen Tiere sensibler darauf zu reagieren scheinen als die männlichen. Die mit 30 mg/kg Atomoxetin behandelten Ratten nehmen erst im späteren Alter zu. Es gibt Untersuchungen, die zeigen, dass Ratten nach einer Periode der verminderten Futterraufnahme die in der Nahrung enthaltene Energie effizienter verwerten können (Williams et Sheedy, 1987). Es konnten zwar keine signifikanten Unterschiede in sowohl Körpergewicht als auch Körperlänge ausgemacht werden, jedoch lagen die Werte jeweils oberhalb bzw. unterhalb der der Kontrollgruppe und dies führte zu einem erhöhten Body Mass Index dieser Behandlungsgruppe.

Der bei uns gemessene geringere Futterverbrauch der erwachsenen männlichen Methylphenidat-Tiere ist bisher durch keine anderen experimentellen Studien bestätigt.

Es wird postuliert, dass eine Methylphenidatbehandlung im Kindesalter einen negativen Effekt auf die spätere Körpergröße hat (Poulton, 2005). Es existiert aber auch die Hypothese, dass das Krankheitsbild der ADHS selbst mit der Reduktion der Körpergröße einhergeht (Spencer et al., 1998). Unsere Ergebnisse zeigen keine Veränderungen in der Körperlänge bei den mit Methylphenidat behandelten Tieren.

In einer langfristig angelegten Studie zeigten Spencer et al., dass Atomoxetin zu einer leichten Verminderung des Körpergewichts und der Körperlänger in den ersten zwei Jahren der Behandlung führt, nach 5 Jahren aber die ursprüngliche Körpergröße jedoch wieder voll erreicht wird (Spencer et al., 2007). Unserer Ergebnisse lassen vermuten, dass bei einer Dosierung von 30 mg/kg Atomoxetin eine Reduktion der Körperhöhe nicht auszuschließen ist.

Die Ergebnisse der Untersuchung der Aktivität während der Wirkstoffgabe unterstützt bereits bekannte Studien: So wurde bei der Verwendung von 0,6, 2,5, 10 und 40 mg/kg Methylphenidat eine akute aktivitätssteigernde Wirkung ab der Dosis von 2,5 mg/kg

festgestellt (Gaytan et al., 1997). In unseren Versuchen hatten weder Methylphenidat noch Atomoxetin langfristige Auswirkungen auf die Aktivität im Laufrad und InfraMot der erwachsenen Tiere.

### *Diskussion der Ergebnisse der Verhaltensuntersuchungen*

Auffällig ist, dass sich in unseren Ergebnissen veränderte Verhaltensweisen stark von dem jeweiligen Test und vom Geschlecht abhängig sind. Derartige Unterschiede sind jedoch nicht weiter verwunderlich und wurden bereits diskutiert. Ein weiterer Faktor in unserem Versuchsdesign ist aber auch der unterschiedliche Zeitabstand zur Medikamentengabe. So gibt es Studien, die besagen, dass bei Methylphenidat Veränderungen des lokomotorischen Verhaltens durch intermittierende Substanzgaben und längere Pausen nach Medikamentengabe verstärkt werden (Brandon et al., 2001).

Die Gabe von Methylphenidat bewirkte bei den männlichen Ratten im Erwachsenenalter nach kurzer Zeit (eine Woche nach Absetzen der Medikamente) noch eine verbesserte Habituation (HB), jedoch im späteren Alter eine verminderte Habituation im FEP (fünf Wochen nach Methylphenidatgabe). Auch die Arbeitsgruppe um Carlezon stellte 25 Tage nach Absetzen einer zweiwöchigen 2 mg/kg Methylphenidatgabe eine verminderte Habituation bei männlichen Ratten fest (Carlezon et al., 2003). Habituation ist gekennzeichnet durch eine Abnahme angeborener Reizantworten, wenn der Reiz über längere Zeitspannen andauert oder wiederholt wird, jedoch keine unvorteilhaften Auswirkungen hat: z.B. nimmt das lokomotorische oder explorative Verhalten in einer neuen Umgebung im Verlauf der Zeit oder wiederholter Exposition ab (Leussis et Bolivar, 2006); es kann somit in Zusammenhang mit Lernen und Gedächtnis gesehen werden.

Im Open Field zeigen die männlichen Ratten eine verminderte Anzahl von Rearings. Bolanos et al. stellten bei wiederum mit 2 mg/kg Methylphenidat behandelten jungen Ratten sechs Wochen nach Beendigung der Gabe im Erwachsenenalter eine erhöhte Ängstlichkeit anhand vermehrtem Groomings im EPM fest (Bolanos et al., 2003). Es spricht nichts dagegen, dass verminderte vertikale Explorationsverhalten unserer Ratten nicht auch als vermehrte Ängstlichkeit zu interpretieren.

Bei den weiblichen mit Methylphenidat behandelten Ratten zeigt sich dieser Umkehreffekt im Verlauf der Zeit nach Medikamentengabe in Bezug auf die Aktivität: Eine Woche nach Medikamentengabe zeigten sie eine verringerte Aktivität im EPM, fünf Wochen später eine gesteigerte Aktivität im FEP. Die Arbeitsgruppe um Bolanos allerdings zeigte eine verringerte



Aktivität männlicher Ratten sechs Wochen nach Methylphenidat–Applikation in der ersten Stunde in einer neuen Umgebung auf, dieses Verhalten war jedoch in der zweiten Stunde nicht mehr zu beobachten (Bolanos et al., 2003).

Beim Atomoxetin scheinen die geschlechtsspezifischen Auswirkungen zumindest bei 10 mg/kg Dosierung weniger ausgeprägt. Auch scheint die unterschiedliche Länge des Zeitfensters nach der Gabe eine geringere Rolle zu spielen. Jedoch ist erneut eine Testspezifität erkennbar.

Die Dosierung von 10 mg/kg Atomoxetin bewirkt eine vermehrte Ängstlichkeit– bei den weiblichen Tieren im EPM und bei den männlichen im FEP. Interessanterweise äußerte sich in unseren Akutversuchen diese Dosierung in einer verringerten Ängstlichkeit.

Von 5-HT–Wiederaufnahmehemmern ist bekannt, dass sie akut die Angst erhöhen und nach chronischer Gabe angstloser machen (Greenwood et al., 2008). Dies lässt für uns allerdings nur den Schluss zu, dass die Monoaminwiederaufnahmehemmer das Angstverhalten ändern können. Es ist bekannt, dass in der Anfangsphase einer Atomoxetingabe die Gefahr suizidaler Handlungen steigt (Wooltorton, 2005). Es ist nicht abwegig diese Enthemmung mit Angstlosigkeit in Verbindung zu sehen. Auch ist es bekannt, dass Störungen des Neurotransmitters NA mit Ängsten und Depressionen einhergehen kann (Baldwin et al., 2002). Die Vermutung liegt nahe, dass die Erhöhung des NA–Spiegels bei akuter Gabe zu Angstlosigkeit führt, über eine dauerhafte Down–Regulation der Rezeptoren oder anderweitiger Veränderung, gerade bei Gabe im Jugendalter, aber zu einem langfristig reduzierten NA–Spiegel und damit zur Ängstlichkeit führt.

Im Hole Board zeigt sich eine verbesserte Habituation. Dies könnte mit der erhöhten Ängstlichkeit in Verbindung stehen. Starke Emotionen können nämlich die Gedächtnisbildung verstärken (Yerkes–Dodson–Gesetz), was vermutlich auf die Aktivierung des monoaminergen und cholinergen Transmissionssystems zurückzuführen ist.

Im Rota Rod ist bei weiblichen Tieren die Motorik beeinträchtigt.

Die Dosierung von 30 mg/kg Atomoxetin führt im FEP bei beiden Geschlechtern zu einer verminderten Habituation.

### *Diskussion der Ergebnisse der analytischen Untersuchungen*

Wir wissen, dass unter anderem ein Zusammenspiel von Dopamin und Serotonin im präfrontalen Cortex, Hippocampus und Striatum eine Rolle beim Lernen und der Gedächtnisbildung spielt (González-Burgos et Feria-Velasco, 2008; Olvera-Cortés et al, 2008).

Auch ist bekannt, dass neben Dopamin der Noradrenalin Spiegel im präfrontalen Cortex wichtig für die Ausübung exekutiver Funktionen, Aufmerksamkeit, Lernen und Gedächtnis ist (Arnsten et Li, 2005; Ramos et Arnsten, 2007).

Serotonin/Dopamin-Interaktionen in der Raphe und im Striatum haben genauso Einfluss auf die motorische Aktivität (Di Matteo et al, 2008; Mylecharane, 1996; Sandyk et Fisher, 1988) wie Noradrenalin im Cortex (Goldstein, 2006).

Angst wird u.a. durch Serotonin und Dopamin im präfrontalen Cortex, in Striatum und in den Raphekernen mediiert (Lowry et al., 2005; Stein et al., 2002), aber auch Noradrenalin spielt wiederum eine Rolle (Baldwin et al., 2002).

Serotonin senkt bekanntermaßen die Nahrungs- und Wasseraufnahme (Pal et al., 2004).

Bei den männlichen mit Methylphenidat behandelten Tieren konnten wir eine erhöhte Dopaminkonzentration im Hippocampus feststellen, diese Tiere zeichneten sich in den Verhaltensuntersuchungen durch eine reduzierte Futtermittelaufnahme, verringerte Habituation und vermehrte Ängstlichkeit aus. Wir wissen, dass Dopamin im Hippocampus eine Rolle bei der Gedächtnisbildung und Lernen spielt, es könnte also ein Zusammenhang zu der beeinträchtigten Habituation bestehen.

Bei den weiblichen mit Methylphenidat behandelten Ratten ist die Noradrenalin-Konzentration im Cortex erniedrigt- dies deckt sich mit Ergebnissen der Arbeitsgruppe um Gray (Gray et al., 2007, s. auch S.110). Diese Tiere zeigten im Alter eine verminderte Aktivität und wir wissen, dass Noradrenalin im Cortex eine Rolle für die motorische Aktivität spielt (Goldstein, 2006).

Bei den weiblichen mit 10 mg/kg Atomoxetin behandelten Tieren ist Serotonin im Striatum erniedrigt, diese Tiere sind in ihrer Motorik beeinträchtigt, wie bereits oben erwähnt hat Serotonin im Zusammenspiel mit Dopamin Einfluss auf die Motorik.

Die mit 30 mg/kg Atomoxetin behandelten weiblichen Ratten haben erniedrigte Dopaminkonzentrationen im Hippocampus und in der Rapheregion. Ein Zusammenhang zum veränderten Körpergewicht und -länge wird nicht durch vorhandene Literatur gestützt.

Letztendlich sind die Prozesse von den neuronalen Schaltkreisen zur Verhaltensentstehung viel zu komplex und noch viel zu ungeklärt als dass wir eindeutige Beziehungen aus unseren analytischen Ergebnissen und Ergebnissen der Verhaltensuntersuchungen formulieren könnten. Unsere Tierzahl war zudem recht gering und es stellt sich die Frage, welche weiteren neuronalen Komponenten wie z.B. Rezeptoren und Transporter langfristig verändert wären. Aber es ist nicht zu leugnen, dass es permanente Veränderungen im Gehirnstoffwechsel nach einer chronischen Gabe von Methylphenidat und Atomoxetin in der Periadoleszenz gibt und weitere Untersuchungen sind nötig um die gesamten Ausmaße zu erfassen.

#### 4.4. SCHLUSSBETRACHTUNG

Unsere Ergebnisse lassen eindeutig den Schluss zu, dass verhaltensändernde Auswirkungen nach einer Methylphenidat-Gabe in der Periadoleszenz in hohem Maße von der Länge der „wash out“ Periode abhängig sind. Es gibt – wie nicht anders zu erwarten – geschlechtsspezifische Differenzen, wobei die männlichen Tiere sensitiver zu sein scheinen. Die männlichen Ratten zeigen im höheren Alter bzw. nach längerem „wash out“ eine erhöhte Ängstlichkeit und eine verminderte Habituation – dies deckt sich mit bereits bekannten Untersuchungen. Bei den weiblichen Tieren lässt sich nur eine leichte Aktivitätssteigerung nachweisen.

Beim Atomoxetin scheinen die gezeigten Verhaltensänderungen weniger von dem Zeitabstand zur Medikamentengabe als von der Art des gewählten Tests und der Dosierung abhängig zu sein. Hier scheinen die weiblichen Tiere sensitiver. In beiden Dosierungen hat Atomoxetin offensichtliche Effekte auf das Körpergewicht der weiblichen Tiere. In der 10 mg/kg Dosierung zeigen sowohl weibliche wie auch männliche Tiere eine erhöhte Ängstlichkeit und vermehrte Habituation, noch beunruhigender sind jedoch die motorischen Ausfälle bei den weiblichen Tieren. In der 30 mg/kg Dosierung kommt es bei beiden Geschlechtern zu einer verminderten Habituation. Da Atomoxetin noch nie in dieser Fragestellung untersucht wurde, gibt es keine unterstützende oder widersprüchliche Literatur zu unseren Ergebnissen.

#### 4.5. AUSBLICK

Natürlich können anatomische und physiologische Abweichungen zwischen Nagetier und Menschen bei der Interpretation und Übertragbarkeit der Ergebnisse nicht außer Acht gelassen werden. Jedoch zeigen unsere Ergebnisse zweifelsfrei, dass es nach einer chronischen Gabe von Methylphenidat oder Atomoxetin in der Periadoleszenz zu andauernden Veränderungen im Verhalten und auf Neurotransmitterebene kommen kann. Es ist nicht an uns zu entscheiden, ob diese Auswirkungen übertragen auf den Menschen schlimmere Konsequenzen haben als eine nicht behandelte ADHS. Nach wie vor sollte es aber das Mindeste sein, die Diagnose einer ADHS nicht leichtsinnig zu stellen und eine medikamentöse Therapie einzuleiten, so dass davon ausgegangen werden kann, dass zumindest keine gesunden Kinder unter den Auswirkungen zu leiden haben.

Methodisch wäre es von Interesse, den Versuch mit einem anderen Rattenstamm, mit längeren „wash out“-Perioden und gegebenenfalls einer Retardformulierung von Methylphenidat zu erweitern.

## 5. Zusammenfassung

### **Langzeitwirkungen von Atomoxetin und Methylphenidat auf das Angst- und Explorationsverhalten der Ratte**

Die Aufmerksamkeitsdefizit-Hyperaktivitätsstörung (ADHS) ist die häufigste psychiatrische medikamentös behandelte Erkrankung bei Kindern und Jugendlichen. Seit über 50 Jahren werden Psychostimulantien wie Dexamphetamin und Methylphenidat zur Therapie der ADHS eingesetzt. Der in Deutschland 2005 eingeführte selektive Noradrenalinwiederaufnahmehemmer Atomoxetin erweitert die Möglichkeiten der medikamentösen Therapie. Das Verschreibungsvolumen beider Substanzen steigt stetig. Langfristige Auswirkungen besonders im Falle der möglicherweise beträchtlichen Anzahl von falsch-positiven Diagnosen sind nur unzulänglich untersucht. Das Ziel des Forschungsvorhabens war es, Verhaltensänderungen von erwachsenen Ratten, die im Jungtieralter für 14 Tage oral mit Methylphenidat oder Atomoxetin behandelt wurden, zu erfassen. Es wurden neben dem Angst-, Habitations- und Lernverhalten, auch die physische Entwicklung, das Fressverhalten, motorische Eigenschaften und Veränderungen zentraler Neurotransmissionsmechanismen untersucht.

Die männlichen mit Methylphenidat behandelten Ratten zeigen im höheren Alter eine erhöhte Ängstlichkeit und eine verminderte Habituation. Bei den weiblichen Tieren lässt sich nur eine leichte Erhöhung in der Aktivität nachweisen.

Atomoxetin hat offensichtliche Effekte auf das Körpergewicht der weiblichen Tiere. In der 10 mg/kg Dosierung zeigen sowohl weibliche wie auch männliche Tiere eine erhöhte Ängstlichkeit und vermehrte Habituation. Bei den weiblichen Tieren kommt es zu gravierenden motorischen Ausfällen. In der 30 mg/kg Dosierung kommt es bei beiden Geschlechtern zu einer verminderten Habituation.

Bei der Ausprägung der Auswirkungen einer chronischen Behandlung mit Atomoxetin und Methylphenidat in der Periadoleszenz spielen das Geschlecht, die Länge der „wash out“-Periode und der gewählte Verhaltenstest eine maßgebliche Rolle.

Es konnten auch Veränderungen in der Konzentration der Neurotransmitter Dopamin, Noradrenalin und Serotonin in verschiedenen Gehirnregionen ausgemacht werden.

Unsere tierexperimentellen Ergebnisse zeigen zweifelsfrei, dass es nach einer chronischen Gabe von Methylphenidat oder Atomoxetin in der Periadoleszenz zu andauernden Veränderungen im Verhalten und auf Neurotransmitterebene kommen kann. Es ist nicht an

uns zu entscheiden, ob diese Auswirkungen übertragen auf den Menschen schlimmere Konsequenzen haben als eine nicht behandelte ADHS. Nach wie vor sollte es aber das Mindeste sein, die Diagnose einer ADHS nicht leichtsinnig zu stellen, so dass davon ausgegangen werden kann, dass zumindest keine gesunden Kinder fälschlicherweise behandelt werden.

## 6. Summary

### **Examination of long-term effects of methylphenidate and atomoxetine on emotional behaviour in rats**

Attention Deficit Hyperactivity Disorder (ADHD) is the predominant psychiatric disorder during childhood/adolescence with an incidence of 2-7 % in children. The psychostimulant methylphenidate and lately the selective norepinephrine reuptake inhibitor atomoxetine are approved drugs for the pharmacological therapy of ADHD and prescriptions are rising constantly. To our knowledge there are no studies evaluating the long-term behavioural effects of a treatment with atomoxetine or methylphenidate in healthy adolescents.

We have assessed several facets of emotional behaviour, physical development and brain neurotransmission in adult rats following chronic oral administration of atomoxetine or methylphenidate during periadolescence.

To begin with the behavioural effects of both drugs when administered during periadolescence seem to depend significantly on the sex, the drugs' wash out-length and the used behavioural test.

While male methylphenidate-rats showed an increased anxiety and less habituation the females showed only a slightly increase in activity when adult.

In atomoxetine a gain of weight could be detected in female rats in both dosages.

The 10 mg/kg dosage seems to increase anxiety and habituation in both females and males whereas the 30 mg/kg dosage reduces habituation. The 10 mg/kg dosage also impairs motor coordination in female rats.

Both drugs do change neurotransmitter-tissue-levels in specific brain areas.

Based on our results behavioural and neuronal alterations caused by atomoxetine and methylphenidate can no longer be excluded. It's not for us to say if these alterations or the consequences of an untreated ADHD are the better option. But it remains and becomes an even more important issue to improve ADHD diagnostic.

## 7. Zitierte Literatur

**Adriani W, Leo D, Greco D, Rea M, di Porzio U, Laviola G, Perrone-Capano C, 2006**

Methylphenidate administration to adolescent rats determines plastic changes on reward-related behaviour and striatal gene expression

*Neuropsychopharmacology*. 31(9):1946-1956

**Adriani W, Canese R, Podo F, Laviola G, 2007**

1H MRS-detectable metabolic brain changes and reduced impulsive behavior in adult rats exposed to methylphenidate during adolescence

*Neurotoxicol Teratol*. 29(1):116-125

**Amen DG, Paldi F, Thisted RA, 1993**

Brain SPECT imaging

*J Am Acad Child Adolesc Psychiatry*. 32(5):1080-1081

**American Psychiatric Association, 1994**

Diagnostic and statistical manual of mental disorders. 4<sup>th</sup> edition (DSM-IV)

*Am Psych Association (Hrsg.), Washington DC*

**Amini B., Yang PB, Swann AC, Dafny N, 2004**

Differential locomotor responses in male rats from three strains to acute methylphenidate

*Int J Neurosci*. 114(9):1063-1084

**Andersen SL, 2003**

Trajectories of brain development: point of vulnerability or window of opportunity?

*Neurosci Biobehav Rev*. 27(1-2):3-18

**Andersen SL, 2005**

Stimulants and the developing brain

*Trends Pharmacol Sci*. 26(5):237-243

**Anderson EE, 1938**

The interrelationship of driver in the male albino rat: III. Interrelations among measures of emotional, sexual and exploratory behaviour

*J Genet Psychol*. 53:335-352



**Andrews N, File SE, 1993**

Handling history of rats modifies behavioural effects of drugs in the elevated plus-maze test of anxiety  
*Eur J Pharmacol.* 235(1):109-112

**Angold A, Erkanli A, Egger HL, Costello EJ, 2000**

Stimulant treatment for children: a community perspective  
*J Am Acad Child Adolesc Psychiatry.* 39(8):975-984

**Archer J, 1973**

Tests for emotionality in rats and mice: A review  
*Anim Behav.* 21:205-235

**Arnsten AF, Dudley AG, 2005**

Methylphenidate improves prefrontal cortical cognitive function through alpha2 adrenoceptor and dopamine D1 receptor actions: Relevance to therapeutic effects in Attention Deficit Hyperactivity Disorder  
*Behav Brain Funct.* 22;1(1):2

**Arnsten AF, Li BM, 2005**

Neurobiology of executive functions: catecholamine influences on prefrontal cortical functions  
*Biol Psychiatry.* 57(11):1377-1384

**Asherson P, IMAGE-Consortium, 2004**

Attention-deficit hyperactivity disorder in the post-genomic era  
*Eur Child Adolesc Psychiatry.* 13 (suppl 1):1 150-170

**Baldwin DS, Evans DL, Hirschfeld RM, Kasper S, 2002**

Can we distinguish anxiety from depression?  
*Psychopharmacol Bull.* 36 Suppl 2:158-165

**Barkley RA, 2003**

Attention deficit / hyperactivity disorder  
*In: Child Psychopathology, Mash EJ, Barkley RA (Hrsg.), Guilford Press, New York, 75-143*

**Barone S Jr, Das KP, Lassiter TL, White LD, 2000**

Vulnerable processes of nervous system development: a review of markers and methods  
*Neurotoxicology.* 21(1-2):15-36

**Bayer SA, Altman J, Russo RJ, Zhang X, 1993**

Timetables of neurogenesis in the human brain based on experimentally determined patterns in the rat  
*Neurotoxicology*. 14(1):83-144

**Becker K, Wehmeier PM, 2003**

Atomoxetin zur Behandlung der Aufmerksamkeitsdefizit-/Hyperaktivitätsstörungen (ADHS)  
*Psych Neuro*. 10:472-476

**Bert B, Schmidt N, Voigt JP, Fink H, Rex A, 2008**

Evaluation of the rat free exploratory behaviour as an animal test for trait anxiety  
*Psychopharmacology (in revision)*

**Berton O, Ramos A, Chaouloff F, Mormede P, 1997**

Behavioral reactivity to social and nonsocial stimulations: A multivariate analysis of six inbred rat strains  
*Behav Genet*. 27:155-166

**Biedermann J, Spencer T, 1999**

Attention-deficit/hyperactivity disorder (ADHD) as a noradrenergic disorder  
*Biological Psychiatry*. 46:1234-1242

**Biederman J, 2004**

Impact of comorbidity in adults with attention-deficit / hyperactivity disorder  
*J Clin Psychiatry*. 65 (3):3-7

**Bitran D, Hull EM, 1987**

Pharmacological analysis of male rat sexual behavior  
*Neurosci Biobehav. Rev*. 11:365-389

**Blank R, Remschmidt H, 1994**

Hyperkinetic syndrome: The role of allergy among psychological and neurological factors  
*Eur Child Adolescent Psychiatry*. 3(4):220-228

**Blaschko H, Richter D, Schlossmann H, 1937**

The inactivation of adrenaline  
*J Physiol*. 90:1-17

**Blondeau C, Dellu-Hagedorn F, 2007**

Dimensional analysis of ADHD subtypes in rats

*Biol Psychiatry*. 61(12):1340-1350

**Bock N, Quentin DJ, Hüther G, Moll GH, Banaschewski T, Rothenberger A., 2005**

Very early treatment with fluoxetine and reboxetine causing long-lasting change of the serotonin but not the noradrenaline transporter in the frontal cortex of rats

*World J Biol Psychiatry*. 6(2):107-112

**Boehm S, Kubista H, 2002**

Fine tuning of sympathetic transmitter release via ionotropic and metabotropic presynaptic receptors

*Pharmacol Rev*. 54:43-99

**Boissier JR, Simon P, 1962**

La réaction d'exploration chez la souris

*Therapie*. 17:1225-1232

**Boissier JR, Tardy J, Diverres JC, 1960**

Une nouvelle méthode simple pour explorer l'action tranquillisante: Le test de la chemine

*Med Exp (Basel)*. 3:81-84

**Bolanos CA, Barrot M, Berton O, Wallace- Black D, Nestler EJ, 2003**

Methylphenidate treatment during pre- and periadolescence alters behavioural responses to emotional stimuli at adulthood

*Biol Psychiatry*. 54:1317-1329

**Bolles RC, Woods PJ, 1964**

The ontogeny of behaviour in the albino rat

*Anim Behav*. 12: 427-441

**Borowsky B, Adham N, Jones KA, Raddatz R, Artymyshyn R, Ogozalek KL, Durkin MM, Lakhani PP, Bonini JA, Pathirana S, Boyle N, Pu X, Kouranova E, Lichtblau H, Ochoa FY, Branchek TA, Gerald C, 2001**

Trace amines: identification of a family of mammalian G protein-coupled receptors

*Proc Natl Acad Sci U S A.* 98(16):8966-8971

**Bradley CH, 1937**

The behavior of children receiving benzedrine

*Am. J. Psychiatry.* 94:577-585

**Brandon CL, Marinelli M, White FJ, 2003**

Adolescent exposure to methylphenidate alters the activity of rat midbrain dopamine neurons

*Biol Psychiatry.* 54(12):133813-44

**Brandon CL, Marinelli M, Baker LK, White FJ, 2001**

Enhanced reactivity and vulnerability to cocaine following methylphenidate treatment in adolescent rats

*Neuropsychopharmacology.* 25(5):651-661

**Broadhurst PL, 1957**

Determinants of emotionality in the rat. I. Situational factors

*Br J Psychol.* 48:1-12

**Broadhurst PL, 1958**

Determinants of emotionality in the rat. III. Strain differences

*J Comp Physiol Psychol.* 51:55-59

**Bronstein PM, Hirsch SM, 1976**

Ontogeny of defence reactions in Norway rats

*J Comp Physiol Psychol.* 90:620-629

**Bylund DB, Eikenberg DC, Hieble JP, Langer SZ, Lefkowitz RJ, Minnemann KP, Molinoff PB, Ruffolo Jr. RR, Trendelenburg U, 1994**

International Union of Pharmacology nomenclature of adrenoceptors

*Pharmacol Rev.* 46:121-136

**Bymaster FP, Katner JS, Nelson DL, Hemrick-Luecke SK, Threlkeld PG, Heiligenstein JH, Morin SM, Gehlert DR, Perry KW, 2002**

Atomoxetine increases extracellular levels of norepinephrine and dopamine in prefrontal cortex of rat: a potential mechanism for efficacy in attention deficit/hyperactivity disorder

*Neuropsychopharmacology.* 27:699-711

**Carlezon WA Jr., Mague SD, Andersen SL, 2003**

Enduring behavioural effects of early exposure to methylphenidate in rats

*Biol Psychiatry*. 54(1):1330-1337

**Castellanos FX, 1997**

Toward a pathophysiology of attention-deficit/hyperactivity disorder

*Clin Pediat*. 36:381-393

**Castle WE, 1947**

The Domestication of the Rat

*Proc N A S*. 33(5):109-117

**Cheon KA, Ryu YH, Kim YK, Namkoong K, Kim CH, Lee JD, 2003**

Dopamine transporter density in the basal ganglia assessed with [123 I] IPT SPET in children with attention deficit hyperactivity disorder

*Eur J Nucl Med Mol Imaging*. 30(2):306-311

**Claasen, 1994**

Neglected factors in pharmacology and neuroscience research

*In: Huston JP (Hrsg.), Techniques in behavioural and neural sciences, Elsevier, Amsterdam, Lausann, New York, Oxford, Shannon, Tokyo, 12*

**Combs DJ, D'Alecy LG, 1987**

Motor performance in rats exposed to severe forebrain ischemia: effect of fasting and 1,3-butanediol

*Stroke*. 18(2):503-511

**Cooper SJ, 1992**

5-HT and ingestive behaviour

*In: Marsden CA, Heal DJ (Hrsg.), Central serotonin and psychotropic drugs, Blackwell Scientific Publications, Oxford*

**Costa E, Groppetti A, Naimzada MK, 1972**

Effects of amphetamine on the turnover rate of brain catecholamines and motor activity.

*Br J Pharmacol*. 44(4):742-751

**Cox T, Tye N, 1975**

The effects of amphetamine, imipramine and ICI 58,834 (Vivalan), a potential antidepressant, on unconditioned behaviour in rats

*Psychopharmacologia (Berlin)*. 40:297–304

**Dahlström A, Fuxe K., 1964**

Evidence for the existence of monoamine-containing neurons in the central nervous system. I. Demonstration of monoamines in the cell bodies of brainstem neurons

*Acta physiol Scand*. 62:1-55

**Deutscher Bundestag-16.Wahlperiode, 2007**

Tierschutzbericht 2007

*Drucksache 16/5044:49*

**Di Matteo V, Pierucci M, ESposito E, Crescimanno G, Benigno A, Di Giovanni G, 2008**

Serotonin modulation of the basal ganglia circuitry: therapeutic implication for Parkinson's disease and other motor disorders

*Prog Brain Res*. 172:423-463

**Di Scala C, Lescohier I, Barthel M, Li G, 1998**

Injuries to children with attention deficit hyperactivity disorder

*Pediatrics*. 102(6):1415-1421

**Döpfner M, Fröhlich J, Lehmkuhl G, 2000**

Hyperkinetische Störungen

*Reihe: Leitfaden Kinder- und Jugendpsychotherapie - Band 1, Hogrefe Verlag*

**Döpfner M, Banaschewski T, Schmidt J, Uebel H, Schmeck K, Gerber WD, Günter M, Knölker U, Gehrke, Häßler F, Möhler E, Brünger M, Ose C, Fischer R, Poustka F, Lehmkuhl G, Rothenberger A, 2003**

Langzeitwirksames Methylphenidat bei Kindern mit Aufmerksamkeitsdefizit-Hyperaktivitätsstörungen: Eine multizentrische Studie

*Nervenheilkunde*. 22:85-92

**Dougerthy DD, Bonab AA, Spencer TJ, Rauch SL, Madras BK, Fischman AJ, 1999**

Dopamine transporter density in patients with attention deficit hyperactivity disorder

*Lancet*. 354:2132-2133

**Dresel S, Krause KH, Krause J, Kung HF, Hahn K, Tatsch K, 2000**

Hyperkinetisches Syndrom: [Tc-99m] TRODAT-1-SPECT des Dopamintransporters vor und unter Therapie mit Methylphenidat

*Nuklearmedizin. 39:A14*

**Dunham NW, Miya TS, 1957**

A note on a simple apparatus for detecting neurological deficit in rats and mice

*J Am Pharm Assoc Am Pharm Assoc (Baltim). 46(3):208-209*

**Eikelboom R, Mills R, 1988**

A microanalysis of wheel running in male and female rats

*Physiol Behav. 43(5):625-630*

**Eilam D, Golani I, 1989**

Home base behaviour of rats (*Rattus norvegicus*) exploring a novel environment

*Behav Brain Res. 36:161-170*

**Elliger TJ, Trott GE, Nissen G, 1990**

Prevalence of psychotropic medication in childhood and adolescence in the Federal Republic of Germany

*Pharmacopsychiatry. 23:38-44*

**Ernst M, Zametkin AJ, Matochik JA, Jons PH, Cohen RM, 1998**

DOPA decarboxylase activity in attention deficit hyperactivity disorder in adults

*J Neurosci. 18:5901-5907*

**Faraone SV, Biederman J, Monuteaux M, 2000**

Toward guidelines for pedigree selection in genetic studies of attention deficit hyperactivity disorder

*Genet Epidemiol. 18(1):1-16*

**Faraone SV, Wilens T, 2003**

Does stimulant treatment lead to substance use disorders?

*J Clin Psychiatry. 64 (suppl 11):9-13*

**Farid NA, Bergstrom RF, Ziege EA, Parli CJ, Lemberger L, 1985**

Single-dose and steady-state pharmacokinetics of tomoxetine in normal subjects

*J Clin Pharmacol. 25(4):296-301*

**Feeney DM, Gonzalez A, Law WA, 1982**

Amphetamine, haloperidol, and experience interact to affect rate of recovery after motor cortex injury  
*Science*. 27;217(4562):855-857

**Fegert J, Glaeske G, Jahnsen K, Ludolph A, Ronge C, 2002**

Untersuchungen der Arzneimittelversorgung von Kindern mit hyperkinetischen Störungen anhand von Leistungsdaten der GKV

[http://www.bmg.bund.de/hu\\_604272/DE/Themenschwerpunkte/Resortforschung/Kurzberichte/2003/Forschungsbericht-21-11-2003-4387,param=.html\\_nnn=true](http://www.bmg.bund.de/hu_604272/DE/Themenschwerpunkte/Resortforschung/Kurzberichte/2003/Forschungsbericht-21-11-2003-4387,param=.html_nnn=true). 17.9.2006 17:34

**File SE, Hyde JR, 1977**

The effects of p-chlorophenylalanine and etanolamine-O-sulphate in an animal test of anxiety  
*J Pharm Pharmacol*. 29:735-738

**File SE, Hyde JR, 1978**

Can social interaction be used to measure anxiety?  
*Br J Pharmacol*. 62(1):19-24

**File SE, Wardill AG, 1975**

The reliability of the hole-board apparatus  
*Psychopharmacologia*. 44:47-51

**Flossendorf B, 1988**

Angst

In: Asanger R, Wenninger G (Hrsg.), *Handwörterbuch der Psychologie*, 4.Aufl. Verlagsunion Psychologie, München, 34-36

**Foote SL, Bloom FE, Aston-Jones G, 1983**

Nucleus locus ceruleus: new evidence of anatomical and physiological specificity  
*Physiol Rev*. 63(3):844-914

**Furuya Y, Yamamoto T, Yatsugi S, Ueki S, 1988**

A new method for studying working memory by using the three-panel apparatus in rats  
*Japan J Pharmacol*. 4:183-188



**Gaytan O, Ghelani D, Martin S, Swann A, Dafny N, 1997**

Methylphenidate: diurnal effects on locomotor and stereotypic behaviour in the rat

*Brain Res.* 777(1-2):1-12

**Gehlert DR, Dreshfield L, Tinsley F, Benvenga MJ, Gleason S, Fuller RW, Wong DT, Hemrick-Luecke SK, 1998**

The selective norepinephrine reuptake inhibitor, LY368975, reduces food consumption in animal models of feeding

*J Pharmacol Exp Ther.* 287(1):122-7

**Gerlach M, Banaschewski T, Warnke A, Rothenberger A, 2003**

Ist ein Parkinson-Syndrom als Spätfolge einer Methylphenidat-Behandlung im Kindesalter möglich?

Eine empirische Standortbestimmung

*Nervenheilkunde.* 22:80-84

**Giedd JN, Blumenthal J, Jeffries NO, Castellanos FX, Liu H, Zijdenbos A, Paus T, Evans AC, Rapoport JL, 1999**

Brain development during childhood and adolescence: a longitudinal MRI study

*Nat Neurosci.* 2(10):861-863

**Glick SD, Shapiro RM, Drew KL, Hinds PA, Carlson JN, 1986**

Differences in spontaneous and amphetamine-induced rotational behavior, and in sensitization to amphetamine, among Sprague-Dawley derived rats from different sources

*Physiol Behav.* 38(1):67-70

**Glickman SE, Sroges RW, Hunt J, 1964**

Brain lesions and locomotor exploration in the albino rat

*J Comp Physiol Psychol.* 58:93-100

**Goldstein LB, 2006**

Neurotransmitters and motor activity: effects on functional recovery after brain injury

*NeuroRx.* 3(4):451-457

**González-Burgos I, Feria-Velasco A, 2008**

Serotonin/dopamine in memory formation

*Prog Brain Res.* 172:603-623

**Graham J, Coghill D, 2008**

Adverse Effects of Pharmacotherapies for Attention-Deficit Hyperactivity Disorder: Epidemiology, Prevention and Management

*CNS Drug.*, 22(3):213-237

**Gray JD, Punsoni M, Tabori NE, Melton JT, Fanslow V, Ward MJ, Zupan B, Menzer D, Rice J, Drake CT, Romeo RD, Brake WG, Torres-Reveron A, Milner TA, 2007**

Methylphenidate administration to juvenile rats alters brain areas involved in cognition, motivated behaviors, appetite, and stress

*J Neurosci.* 27(27):7196-7207

**Greenhill LL, Newcorn JH, Gao H, Feldman PD, 2007**

Effect of two different methods of initiating atomoxetine on the adverse event profile of atomoxetine

*J Am Acad Child Adolesc Psychiatry.* 46(5):566-572

**Greenwood BN, Strong PV, Brooks L, Fleshner M, 2008**

Anxiety-like behaviors produced by acute fluoxetine administration in male Fischer 344 rats are prevented by prior exercise

*Psychopharmacology (Berl).* 199(2):209-222

**Griebel G, 1995**

5-Hydroxytryptamine-interacting drugs in animal models of anxiety disorders: more than 30 years of research

*Pharmacol Ther.* 65(3):319-395

**Griebel G, Moreau JL, Jenck F, Martin JR, Misslin, R, 1993**

Some critical determinants of the behaviour of rats in the elevated plus-maze

*Behav Proc.* 29:37-48

**Grund T, Lehmann K, Bock N, Rothenberger A, Teuchert- Noodt G, 2006**

Influence of methylphenidate on brain development- an update of recent animal experiments

*Behav Brain Funct.* 2:2

**Gulley JM, Doolen S, Zahniser NR, 2002**

Brief, repeated exposure to substrates down-regulates dopamine transporter function in *Xenopus* oocytes in vitro and rat dorsal striatum in vivo

*J Neurochem.* 83(2):400-411

**Güttner J, 1993**

Wörterbuch der Versuchstierkunde

*Gustav Fischer Verlag, Jena, Stuttgart, 397-399*

**Hall CS, 1934**

Emotional behaviour in the rat. I. Defaecation and urination as measures of individual differences in emotionality

*J Comp Psychol.* 18:385-403

**Halliday G, Harding A, Paxinos G, 1995**

Serotonin and tachykinin systems

*In: The rat nervous system, Paxinos G (Hrsg.), Academic Press, San Diego*

**Hamm RJ, Pike BR, O'Dell DM, Lyeth BG, Jenkins LW, 1994**

The rotarod test: an evaluation of its effectiveness in assessing motor deficits following traumatic brain injury

*J Neurotrauma.* 11(2):187-196

**Handley SL, McBlane JW., 1993**

5HT drugs in animal models of anxiety

*Psychopharmacology (Berl).* 112(1):13-20

**Handley SL, Mithani S, 1984**

Effects of alpha-adrenoceptor agonists and antagonists in a maze-exploration model of 'fear'-motivated behaviour

*Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 327(1):1-5

**Harrington GM, 1981**

The Har strains of rats: origins and characteristics

*Behav Genet.* 11(5):445-468

**Havenaar R, Meijer JC, Morton DB, Ritseks-Hoitina J, Zwart P, 1995**

Biologie, Zucht und Haltung von Versuchstieren

*In: van Zutphen LFM, Baumans V, Beynen AC (Hrsg), Grundlagen der Versuchstierkunde, Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, Jena, 19-70*

**Herpertz-Dahlmann B, 2003**

Komorbide Störungen des Aufmerksamkeits-defizit-/ Hyperaktivitätssyndroms im Kindes- und Jugendalter

*Kinder- und Jugendmedizin. 3(4):148-154*

**Heyser CJ, Pelletier M, Ferris JS, 2004**

The effects of methylphenidate on novel object exploration in weanling and periadolescent rats

*Ann N Y Acad Sci. 1021:465-469*

**Hilakivi I, Ahtee L, Rinne JO, Taira T, Attila LM, Marjamäki P, 1995**

Effects of monoamine uptake inhibitors given early postnatally on monoamines in the brain stem, caudate/putamen and cortex, and on dopamine D1 and D2 receptors in the caudate/putamen

*J Neural Transm Gen Sect. 102(2):139-148*

**Hilakivi I, Rinne J, Marjamäki P, 1999**

Effect of desipramine during infancy and preweanling on dorsal striatal dopamine D1 and D2 receptor binding in adolescence in the rat

*Pol J Pharmacol. 51(4):311-316*

**Hilakivi LA, Taira T, Hilakivi I, Loikas P, 1988**

Neonatal treatment with monoamine uptake inhibitors alters later response in behavioural 'despair' test to beta and GABA-B receptor agonists

*Pharmacol Toxicol. 63(1):57-61*

**Hirate K, Kuribara H, Tadokoro S., 1988**

Breeder differences within Wistar strain rats in acquisition of discrete shuttle avoidance response and in sensitivity to chlorpromazine

*Japan J Pharmacol. 47(3):209-216*

**Ho IK, Loh HH, Way EL., 1977**

Morphine analgesia, tolerance and dependence in mice from different strains and vendors

*J Pharm Pharmacol. 29(9):583-584*

**Hoyer D, Clarke DE, Fozard JR, Hartig PR, Martin GR, Mylecharane EJ, Saxena PR, Humphrey PP, 1994**

International union of pharmacology classification of receptors for 5-hydroxytryptamine (serotonin)  
*Pharmacol Rev.* 46:157-203

**Huss M, 2004**

Vorbereitung der Erhebung und Auswertung zur Prävalenz des Aufmerksamkeitsdefizit-Hyperaktivitäts-Syndrom (ADHS) in Deutschland in Rahmen des Kinder und Jugendsurveys des Robert-Koch-Instituts

*Abschlussbericht an das Bundesministerium für Gesundheit und soziale Sicherheit (BMGS). BMGS (Hrsg.), Bonn*

**Hynd GW, Semrud-Clikeman M, Lorys AR, Novey ES, Eliopoulos D, 1990**

Brain morphology in developmental dyslexia and attention deficit hyperactivity disorder  
*Arch Neurol.* 47:919-926

**Jenni-Eiermann S, von Hahn HP, Honegger CG, 1986**

Diurnal rhythms in neurotransmitter receptor binding and choline acetyltransferase activity: different patterns in two rat lines of Wistar origin

*Brain Res.* 370(1):54-60

**Jensen PS, Martin D, Cantwell DP, 1997**

Comorbidity in ADHD: implications for research, practice, and DSM-IV

*J Am Acad Child Adolesc Psychiatry.* 36(8):1065-1079

**Johannessen W, Aarbakke J., 1982**

Interindividual variation in apparent volumes of distribution of antipyrine in the rat

*J Pharm Pharmacol.* 34(5):327-328

**Joseph R, Gallagher RE, 1980**

Gender and early environmental influences on activity, overresponsiveness, and exploration

*Dev Psychobiol.* 13(5):527-544

**Juhr NC, 1990**

Verhaltensindikatoren für Wohlbefinden

*Tierlaboratorium.* 13:192-220

**Klein RG, Abikoff H, Hechtman L, Weiss G, 2004**

Design and rationale of controlled study of long-term methylphenidate and multimodal psychosocial treatment in children with ADHD

*J Am Acad Child Adolesc Psychiatry.* 43(7):792-801

**Kolb B, Whishaw IQ, 1985**

An observer's view of locomotor asymmetry in the rat

*Neurobehav. Toxicol. Teratol.* 7:71-78

**Kopin IJ, 1985**

Catecholamine metabolism: basic aspects and clinical significance

*Pharmacol Rev.* 37, 333-364

**Krause KH, Krause J, Trott GE, 1998**

Das hyperkinetische Syndrom (Aufmerksamkeitsdefizit-/ Hyperaktivitätsstörung) im Erwachsenenalter

*Nervenarzt.* 69:543-556

**Krause KH, Dresel S, Krause J, 2000**

Neurobiologie der Aufmerksamkeitsdefizit-/Hyperaktivitätsstörung

*Psycho.* 26(4):199-208

**Kuhn CM, Walker QD, Kaplan KA, Li ST, 2001**

Sex, steroids, and stimulant sensitivity

*Ann N Y Acad Sci.* 937:188-201

**Lagace DC, Yee JK, Bolaños CA, Eisch AJ, 2006**

Juvenile administration of methylphenidate attenuates adult hippocampal neurogenesis

*Biol Psychiatry.* 60(10):1121-1130

**Langer SZ, 1980**

Presynaptic regulation of the release of catecholamines

*Pharmacol Rev.* 32, 337-362

**Leblanc-Duchin D, Taukulis HK, 2004**

Behavioural reactivity to a noradrenergic challenge after chronic oral methylphenidate (Ritalin) in rats

*Pharmacol Biochem Behav.* 79(4):641-649

**Leussis MP, Bolivar VJ, 2006**

Habituation in rodents: a review of behaviour, neurobiology, and genetics

*Neurosci Biobehav Rev.* 30(7):1045-1064

**Lilly Deutschland GmbH, 2006**

Strattera

*Fachinformation.* 1-5

**Lister RG, 1987**

The use of a plus-maze to measure anxiety in the mouse

*Psychopharmacol.* 92:180-185

**Lister RG, 1990**

Ethologically-based animal models of anxiety disorders

*Pharmacol Ther.* 46: 321-340

**Lohse MJ, Lorenzen A, Müller-Oerlinghausen B, 2006**

Psychopharmaka: Psychostimulantien

*In: Arzneiverordnungsreport 2006, U. Schwabe, D. Paffrath (Hrsg.), Verlag Springer, Berlin: 852-854*

**López JF, Akil H, Watson SJ, 1999**

Neural circuits mediating stress

*Biol Psychiatry.* 46(11):1461-1471

**Lou HC, Henriksen L, Bruhn P, 1984**

Focal cerebral hypoperfusion in children with dysphoria and/or attention deficit disorder

*Arch. Neurol* 41:825-829

**Lowry CA, Johnson PL, Hay-Schmidt A, Mikkelsen J, Shekhar A, 2005**

Modulation of anxiety circuits by serotonergic systems

*Stress.* 8(4):233-246

**Manor I, Eisenberg J, Tyano S, Sever Y, Cohen H, Ebstein RP, Kotler M., 2001**

Family-based association study of the serotonin transporter promoter region polymorphism (5-HTTLPR) in attention deficit hyperactivity disorder

*Am J Med Genet.* 105(1):91-95

**Marcus A, 1995**

Einflüsse von Ernährung auf das Verhalten im Kindesalter-Hypothesen und Fakten

*In: Hyperkinetische Störungen im Kindes- und Jugendalter, H. Steinhausen (Hrsg.), Verlag Kohlhammer, Stuttgart, 112-127*

**Marsden CA, 1996**

The neuropharmacology of serotonin in the central nervous system

*In: Feighner JP, Boyer WF (Hrsg.), Selective Serotonin Re-uptake Inhibitors, Wiley & Sons, Chichester, New York, Brisbane*

**Martins MR, Reinke A, Petronilho FC, Gomes KM, Dal-Pizzol F, Quevedo J, 2006**

Methylphenidate treatment induces oxidative stress in young rat brain

*Brain Res. 1078(1):189-197*

**Mattiuz EL, Ponsler GD, Barbuch RJ, Wood PG, Mullen JH, Shugert RL, Li Q, Wheeler WJ, Kuo F, Conrad PC, Sauer JM, 2003**

Disposition and metabolic fate of atomoxetine hydrochloride: pharmacokinetics, metabolism, and excretion in the Fischer 344 rat and beagle dog

*Drug Metab Dispos. 31(1):88-97*

**Mercugliano M, 2000**

Neurochemistry of ADHD

*In: Attention deficits and hyperactivity in children and adults, AccardoPJ, Blondis TA, Whitman BY, Stein MA (Hrsg.), Marcel Dekker, New York, Basel, 59-72*

**Michelson D, Allen AJ, Busner J, Casat C, Dunn D, Kratochvil C, Newcorn J, Sallee FR, Sangal RB, Saylor K, West S, Kelsey D, Wernicke J, Trapp NJ, Harder D, 2002**

Once-daily atomoxetine treatment for children and adolescents with attention deficit hyperactivity disorder: a randomized, placebo-controlled study

*Am J Psychiatry. 159(11):1896-1901*

**Milberger S, Biedermann J, Faraone SV, Guite J, Tsuang MT, 1997**

Pregnancy, delivery and infancy complications and attention deficit hyperactivity disorder: issues of gene-environment interaction

*Biol Psychiatry. 41(1):65-75*



**Mitchell PJ, 1993**

Ethological studies of the social behaviour of the rat

*Anim Technol.* 44(2):109-120

**Moll GH, Hause S, R  ther E, Rothenberger A, Huether G, 2001**

Early methylphenidate administration to young rats causes a persistent reduction in the density of striatal dopamine transporters

*J Child Adolesc Psychopharmacol.* 11(1):15-24

**Monastra VJ, Lubar JF, Linden M, van Deusen P, Green G, Wing W, Phillips A, Fenger TN, 1999**

Assessing attention deficit hyperactivity disorder via quantitative electroencephalography: an initial validation study

*Neuropsychology.* 13:424-433

**Morris RG, Garrud P, Rawlins JN, O'Keefe J, 1982**

Place navigation impaired in rats with hippocampal lesions

*Nature.* 297(5868):681-683

**Mylecharane EJ, 1996**

Ventral tegmental area 5-HT receptors: mesolimbic dopamine release and behavioural studies

*Behav Brain Res.* 73(1-2):1-5

**Nelson N, 1998**

The family of Na<sup>+</sup>/Cl<sup>-</sup> neurotransmitter transporters

*J Neurochem.* 71:1785-1803

**Nestler EJ, Alreja M, Aghajanian GK, 1999**

Molecular control of locus coeruleus neurotransmission

*Biological Psychiatry.* 46:1131-1139

**Novartis Pharma, 2005**

Ritalin®

*Fachinformation (Zusammenfassung der Merkmale des Arzneimittels/SPC), MS 06/4.4 Art.-Nr.83868, 1-5*

**Novartis Pharma, 2006**

Ritalin®/-SR/-LA

*Fachinformation des Arzneimittel-Kompendium der Schweiz®*, 1-9**O'Kelly LI, 1940**

The validity of defaecation as a measure of emotionality in the rat

*J Genet Psychol.* 23: 75-87**Oades RD, 2007**

Role of the serotonin system in ADHD: treatment implications

*Exp Rev Neurotherapeutics.* 7(10):1357-1374**Ohl F, Fuchs E, 1998**

Memory performance in tree shrews: effects of stressful experiences

*Neurosci Biobehav. Rev.* 23:319-323**Ohl F, Holsboer F, Landgraf R, 2001**

The modified holeboard as a differential screen for behavior in rodents

*Behav Res Methods Instrum Comput.* 33:392-397**Ohl F, Toschi N, Wigger A, Henniger MS, Landgraf R, 2001**

Dimensions of emotionality in a rat model of innate anxiety

*Behav Neurosci.* 115:429-436**Olson DA, Samuelson RJ, 1976**

Remembrance of places past: Spatial memory in rats

*J Exp Psychol.: Animal Behavior Processes* 2:97-116**Olvera-Cortés ME, Anguiano-Rodríguez P, López-Vázquez MA, Alfaro JM, 2008**

Serotonin/dopamine interaction in learning

*Prog Brain Res.* 172:567-602**Pal GK, Kannan N, Pal P, 2004**

Effects of injection of serotonin into nucleus caudatus on food and water intake and body weight in albino rats

*Indian J Physiol Pharmacol.* 48(4):437-445

**Paxinos G, Watson C, 1997**

The Rat Brain in Stereotactic Coordinates  
*Compact 3rd Edition, Academic Press*

**Pearl RG, Seiden LS, 1976**

The existence of tolerance to and cross-tolerance between d-amphetamine and methylphenidate for their effects on milk consumption and on differential-reinforcement-of-low-rate performance in the rat  
*J Pharmacol Exp Ther. 198(3):635-647*

**Pellow S, Chopin P, File SE, Briley M, 1985**

Validation of open:closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat  
*J Neurosci Methods. 14(3):149-167*

**Persch A, 1994**

Die Bedeutung des Explorationsverhaltens bei Versuchstieren  
*Tierärztl. Umschau 49, 539-545*

**Pizzi WJ, Rode EC, Barnhart JE, 1987**

Differential effects of methylphenidate on the growth of neonatal and adolescent rats  
*Neurotoxicol Teratol. 9(2):107-111*

**Porsolt RD, Bertin A, Jalfre M., 1978**

"Behavioural despair" in rats and mice: strain differences and the effects of imipramine  
*Eur J Pharmacol. 51(3):291-294*

**Poulton A, 2005**

Growth on stimulant medication; clarifying the confusion: a review  
*Arch Dis Child. 90(8):801-806*

**Preti A, 2002**

Tomoxetine Eli Lilly & Co  
*Current Opinion in Investigational Drugs. 3(2):272-277*

**Prut L, Belzung C, 2003**

The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviors: a review  
*Eur J Pharmacol. 463(1-3):3-33*

**Pucak ML, Grace AA, 1994**

Regulation of substantia nigra dopamine neurons

*Crit Rev Neurobiol.* 9(1):67-89

**Ramon y Cajal S, 1911**

Histologie du système nerveux de l'homme et des vertèbres

*A Malone France.*

**Ramos BP, Arnsten AF, 2007**

Adrenergic Pharmacology and cognition: focus on the prefrontal cortex

*Pharmacol Ther.* 113(3):523-536

**Ray J, Hansen S, 2004**

Temperament in the rat: sex differences and hormonal influences on harm avoidance and novelty seeking

*Behav Neurosci.* 118(3):488-497

**Rex A, Kolbasenko, Bert B, Fink H, 2007**

Choosing the right wild type: behavioural and neurochemical differences between 2 populations of Sprague-Dawley rats from the same source but maintained at different sites

*J Am Assoc Lab Anim Sci.* 46(5):13-20

**Rex A, Sondern U, Voigt JP, Franck S, Fink H., 1996**

Strain differences in fear-motivated behavior of rats

*Pharmacol Biochem Behav.* 54(1):107-111

**Rothenberger A, Banaschewski T, 2004**

Hilfe für den Zappelphilipp

*Gehirn und Geist.* 3:54-61

**Rubia K, Overmeyer S, Taylor E, Brammer M, Williams SC, Simmons A, Bullmore ET, 1999**

Hypofrontality in attention deficit hyperactivity disorder during higher-order control: a study with functional MRI

*Am J Psychiatry.* 156:891-896

**Rutter M, Roy P, Kreppner J, 2002**

Institutional cares as a risk factor for inattention/ overactivity

*In: Hyperactivity and Attention Disorders of Childhood (2<sup>nd</sup> ed.), S. Sandberg (Hrsg.), Cambridge University Press, Cambridge UK, 417-434*

**Saibaba P, Sales GD, Stodulski G, Hau J, 1996**

Behaviour of rats in their home cages: Daytime variations and effects of routine husbandry procedures analysed by time sampling techniques

*Lab Anim. 30:13-21*

**Sandyk R, Fisher H, 1988**

Serotonin in involuntary movement disorders

*Int J Neurosci. 42(3-4):185-208*

**Sauer JM, Ponsler GD, Mattiuz EL, Long AJ, Witcher JW, Thomasson HR, Desante KA, 2003**

Disposition and metabolic fate of atomoxetine hydrochloride: the role of CYP2D6 in human disposition and metabolism.

*Drug Metab Dispos. 31(1):98-107*

**Schleif O, 2001**

Ein Beitrag zur tiergerechten Haltung der Ratte anhand der Literatur

*Dissertation, Hannover, Tierärztliche Hochschule*

**Schmidt N, Rex A, 2007**

Examination of long-term effects of different routes of drug-administration on physical development and emotional behaviour in rats

*Eur J Med Res. 12(4):178-179*

**Seeman P, Grigoriadis D, 1987**

Dopamine receptors in brain and periphery

*Neurochem Int. 10:1-25*

**Segal DS, Kuczenski R, 1999**

Escalating dose-binge treatment with methylphenidate: role of serotonin in the emergent behavioral profile

*J Pharmacol Exp Ther. 291(1):19-30*

**Semrud-Clikeman M, Filipek PA, Biedermann J, Steingard R, Kennedy R, Renshaw P, Bekken K, 1994**

Attention-deficit hyperactivity disorder: Magnetic resonance imaging morphometric analysis of the corpus callosum

*J Amer Acad. Child Psychiatry.* 33:875-881

**Sharpley AL, Cowen PJ, 1995**

Effect of pharmacologic treatments on the sleep of depressed patients

*Biol Psychiatry.* 37:85-98

**Shih JC, 1994**

Molecular basis of human MAO A and B

*Neuropsychopharmacology.* 4:1-7

**Sieg KG, 2000**

Neuroimaging and attention deficit hyperactivity disorder

*In: Attention deficits and hyperactivity in children and adults, AccardoPJ, Blondis TA, Whitman BY, Stein MA (Hrsg.), Marcel Dekker, New York, Basel, 73-118*

**Southall MD, Flinn JM, Holt RW, Chandhoke V, 1997**

Age dependent changes in serotonin and dopamine receptors in *Aplysia californica*

*Comp Biochem Physiol C Pharmacol Toxicol Endocrinol.* 118:137-141

**Spencer T, Biedermann J, Wilens T, 1998**

Growth Deficits in children with attention deficit hyperactivity disorder

*Pediatrics.* 102(2):501-506

**Spencer TJ, Kratochvil CJ, Sangal RB, Saylor KE, Bailey CE, Dunn DW, Geller DA, Casat CD, Lipetz RS, Jain R, Newcorn JH, Ruff DD, Feldman PD, Furr AJ, Allen AJ, 2007**

Effects of Atomoxetine on Growth in Children with Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder Following up to Five Years of Treatment

*J. Child. Adolesc. Psychopharmacol.* 17(5):689-700

**Sproson EJ, Chantrey J, Hollis C, Marsden CA, Fonel KC, 2001**

Effect of repeated methylphenidate administration on presynaptic dopamine and behaviour in young adult rats

*J Psychopharmacol.* 15(2):67-75

**Stacy AW, Newcomb MD, 1999**

Adolescent drug use and adult drug problems in women: direct, interactive, and mediational effects  
*Exp Clin Psychopharmacol.* 7(2):160-173

**Starke K, Taube HD, Borowski E, 1977**

Pre- and postsynaptic receptors in catecholaminergic transmission  
*Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 297(Suppl. 1):43-44

**Stein DJ, Westenberg HG, Liebowitz MR, 2002**

Social anxiety disorder and generalized anxiety disorder: serotonergic and dopaminergic neurocircuitry  
*J Clin Psychiatry.* 63(6):12-19

**Swanson CJ, Perry KW, Koch-Krueger S, Katner J, Svensson KA, Bymaster FP, 2006**

Effect of the attention deficit/hyperactivity disorder drug atomoxetine on extracellular concentrations of norepinephrine and dopamine in several brain regions of the rat  
*Neuropharmacology.* 50(6):755-760

**Taylor E, 1999**

Developmental neuropsychopathology of attention deficit and impulsiveness  
*Dev Psychopathol.* 11:607-628

**Tembrock, 1987**

Verhaltensbiologie  
*Gustav Fischer-Verlag, Jena*

**Teter CJ, McCabe SE, Boyd CJ, Guthrie SK, 2003**

Illicit methylphenidate use in an undergraduate student sample: prevalence and risk factors  
*Pharmacotherapy.* 23:609-617

**Thapar A, Fowler T, Rice F et al., 2003**

Maternal smoking during pregnancy and attention deficit hyperactivity disorder symptoms in offspring  
*Am J Psychiatry.* 160(11):1985-1989

**Thapar A, Holmes J, Poulton K, Harrington R, 1999**

Genetic basis of attention deficit and hyperactivity  
*Br J Psychiatry.* 174:105-111

**Torres- Reveron A, Dow- Edwards DL, 2005**

Repeated administration of methylphenidate in young, adolescent, and mature rats affects the response to cocaine later in adulthood

*Psychopharmacology. 181:38-47*

**Townsend P, 1997**

Use of in-cage shelters by laboratory rats

*Anim Welfare. 6:95-103*

**Treit D, Menard J, 1998**

Animal models of anxiety and depression

*In: Neuromethods (34): In Vivo Neuromethods, Boulton AA, Baker BG, Bateson AN (Hrsg.), Human Press Inc., Totowa, New Jersey, 89-148*

**Trott GE, 1993**

Das hyperkinetische Syndrom und seine medikamentöse Behandlung

*1.Auflage, Johann Ambrosius Barth Verlag, Leipzig*

**Tyers MB, Hayes AG, 1992**

5-HT receptors and addiction

*In: Marsden CA, Heal DJ (Hrsg.), Central serotonin and psychotropic drugs, Blackwell Scientific Publications, Oxford*

**van den Bergh FS, Bloemarts E, Chan JS, Groenink L, Olivier B, Oosting RS, 2006**

Spontaneously hypertensive rats do not predict symptoms of attention deficit disorder

*Pharmacol Biochem Behav. 83:380-390*

**van der Graaff M, Vermeulen NP, Langendijk PN, Breimer DD., 1983**

Pharmacokinetics of simultaneously administered hexobarbital and heptabarbital in rats: an alternative approach to metabolic correlation studies

*J Pharmacol Exp Ther. 225(3):747-751*

**Vendruscolo LF, Izídio GS, Takahashi RN, Ramos A, 2008**

Chronic methylphenidate treatment during adolescence increases anxiety-related behaviors and ethanol drinking in adult spontaneously hypertensive rats

*Behav Pharmacol. 19(1):21-27*



**Vizi SE, 2000**

Role of high-affinity receptors and membrane transporters in non-synaptic communications and drug action in the central nervous system

*Pharmacol Rev.* 52:63-89

**Volkow ND, Ding YS, Fowler JS, Wang GJ, Logan J, Gatley JS, Dewey S, Ashby C, Liebermann J, Hitzemann R, et al., 1995**

Is methylphenidate like cocaine? Studies on their pharmacokinetics and distribution in the human brain

*Arch Gen Psychiatry.* 52(6):456-463

**Volkow ND, Wang GJ, Fowler JS, Gatley SJ, Logan J, Ding YS, 1998**

Dopamine transporter occupancies in the human brain induced by therapeutic doses of oral methylphenidate

*Am J Psychiatry* 155:1325-1331

**Von Ferber L, Lehmkuhl G, Köster I, Döpfner M, Schubert I, Fröhlich J, Ihle P, 2003**

Methylphenidatgebrauch in Deutschland: Versichertenbezogene epidemiologische Studie über die Entwicklung von 1998 bis 2000

*Dtsch Ärztebl.* 100(1-2):A-41/B-39/C-38

**Wargin W, Kilts PC, Gualtieri CT, Ellington KR, Mueller RA, Kraemer G, Breese GR, 1983**

Pharmacokinetics of methylphenidate in man, rat and monkey

*J Pharmacol Exp Ther.* 226:382-386

**Weber R, 2001**

Die Ritalin-Story

*Dtsch Apoth Ztg.* 141:1091-1093

**Wegerer V, Moll GH, Bagli M, Rothenberger A, Rüter E, Huether G, 1999**

Persistently increased density of serotonin transporters in the frontal cortex of rats treated with fluoxetine during early juvenile life

*J Child Adolesc Psychopharmacol.* 9(1):13-24

**Weiss J, Meass J, Nebendahl K, Rossbach W, 1996**

Haus- und Versuchstierpflege

*Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, Jena, New York, 58-64*

**Wender PH, 1995**

Attention-deficit hyperactivity disorder in adults

*Oxford University Press, New York, Oxford*

**Wheeler TL, Eppolito AK, Smith LN, Huff TB, Smith RF, 2007**

A novel method for oral stimulant administration in neonate rat and similar species

*J Neurosci Methods. 159:282-285*

**World Health Organisation, 1992**

The ICD-10 classification of mental and behavioural disorders: clinical descriptions and diagnostic guidelines

*World Health Organisation (Hrsg.), Genf*

**Williams VJ, Sheedy JW, 1987**

The efficiency of growth during body weight recovery in young adult female rats

*Comp Biochem Physiol A. 87(3):547-549*

**Williams DI, Wells PA, 1970**

Differences in home-cage-emergence in the rat in relation to infantile handling

*Psychon. Sci. 18:168-169*

**Wirkstoff Bibliothek, 2005**

Atomoxetin: Hochselektiver Noradrenalin-Wiederaufnahmehemmer zur Behandlung der Aufmerksamkeitsdefizit-/Hyperaktivitätsstörung (ADHS)

*Kirchheim Verlag, Mainz, Heft 4*

**Wooltorton E, 2005**

Suicidal ideation among children taking atomoxetine (Strattera)

*CMAJ. 173(12):1447*

**Xiao XQ, Williams SM, Grayson BE, Glavas MM, Cowley MA, Smith MS, Grove KL, 2007**

Excess weight gain during the early postnatal period is associated with permanent reprogramming of brown adipose tissue adaptive thermogenesis

*Endocrinology. 148(9):4150-4159*

**Yacobi A, Lai CM, Levy G, 1975**

Comparative pharmacokinetics of coumarin anticoagulants XV: relationship between pharmacokinetics of dicumarol and warfarin in rats

*J Pharm Sci.* 64(12):1995-1998

**Yuan J, McCann U, Ricaurte G, 1997**

Methylphenidate and brain dopamine neurotoxicity

*Brain Res.* 767(1):172-175

**Zametkin AJ, Nordahl TE, Gross M, King AC, Semple WE, Rumsey J, Hamburger S, Cohen RM., 1990**

Cerebral glucose metabolism in adults with hyperactivity of childhood onset

*N Engl J Med.* 323(20):1361-1366

**Zito JM, Safer DJ, dosReis S, Gardner JF, Boles M, Lynch F, 2000**

Trends in the prescribing of psychotropic medications to preschoolers

*JAMA.* 283(8):1025-1030

Mein herzlicher Dank gilt Herrn PD Dr. A. Rex für die Überlassung des Themas, für die wissenschaftliche und praktische Hilfestellung und vor allem für seine Menschlichkeit.

Frau Prof. Dr. H. Fink danke ich dafür, dass sie es mir ermöglicht hat, die Dissertation am Institut für Pharmakologie und Toxikologie zu schreiben.

Ich möchte mich aufrichtig bei Frau C. Bohnwagner für die Einarbeitung in die Verhaltensversuche und die Unterstützung bei den HPLC-Messungen bedanken.

Herrn Dr. R. Sohr gilt mein Dank für die Analyse der Atomoxetin-Plasmaspiegel.

Ein weiteres Dankeschön gilt all denjenigen Mitarbeitern des Instituts, die durch ihre Hilfsbereitschaft und Anteilnahme, durch ihre gute Laune und mitunter theobromin- bzw. coffeinhaltigen Aufmunterungen die Arbeit erleichtert haben.

Mein besonderer Dank jedoch gilt meiner Familie und meinen Freunden, die mich trotz meiner Launenhaftigkeit während der letzten Jahre ertragen und mich moralisch unterstützt haben.

Vor allem danke ich meinen Eltern, die es mir zwar nicht immer leicht machen ;-), aber uneingeschränkt und jederzeit für mich da sind, wenn ich sie brauche.

**Untersuchungen zu Langzeitwirkungen von Methylphenidat und Atomoxetin auf das Angst- und Explorationsverhalten der Ratte (Poster)**

Schmidt N; Fink H; Rex A. 2. Doktorandensymposium. Berlin, 8.6.2007. Programm und Abstracts. Mensch & Buch, 2007. S. 41. ISBN 978-3-86664-235-5

**Examination of long-term effects of different routes of drug-administration on physical development and emotional behaviour in rats (Vortrag)**

Schmidt N; Rex A. 18th European Students' Conference. Berlin, 7.-11.10.2007. European Journal of Medical Research, Vol. 12 (Suppl. IV). München: Holzapfel Verlag, 2007. S.179-180. ISBN 0949-2321

**Evaluation of the rat free exploratory paradigm as an animal test for trait anxiety (Poster)**

Schmidt N; Voigt J-P; Bert B; Fink H; Rex A. 49. Frühjahrstagung der DGPT. Mainz, 11.-13.3.2008. Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology, Vol. 377 (Suppl. 1). Springer, 2008. S. 51. ISBN 0028-1298

**Long-term effects of Atomoxetine on physical development and anxiety-related behaviour after administration during periadolescence in rats (Poster)**

Schmidt N; Fink H; Rex A. 3. Doktoranden-Symposium am Fachbereich Veterinärmedizin. Berlin, 27.06.2008. Programm und Abstracts. Mensch & Buch, 2008. S. 61. ISBN 9783866644120

**Long-term effects of atomoxetine on physical development and anxiety-related behaviour after administration during periadolescence in rats (Poster)**

Schmidt N, Fink H, Rex A. 6th FENS Forum of European Neuroscience. Geneva- July 12- 16, 2008. FENS Forum Abstracts, Vol. 4. Abstract 018 21

**Atomoxetine treatment during periadolescence induces long-lasting effects on physical development, anxiety-related behaviour and central monoamine transmission in adult rats (Poster)**

Schmidt N; Fink H; Rex A. 50. Frühjahrstagung der DGPT. Mainz, 10.-12.03.2009. Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology, Vol. 379 (Suppl. 1). Springer, 2009. S. 47. ISBN 0028-1298

Hiermit bestätige ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig angefertigt habe. Ich versichere, dass ich ausschließlich die angegebenen Quellen und Hilfen in Anspruch genommen habe.

Aachen, den 25.05.2009

Nicola Schmidt