

**Zum Einfluss von Methylphenidat (MPH; Ritalin<sup>®</sup>)  
auf die Reifung von Dopamin in limbo-präfrontalen  
Arealen von *Meriones unguiculatus***

**Dissertation**

zur Erlangung des Grades

Doktor rer. nat.

Fakultät für Biologie

Universität Bielefeld

vorgelegt von

Thorsten Grund

Bielefeld

im Juli 2005

## Zusammenfassung

Methylphenidat (MPH; z.B. Ritalin<sup>®</sup> und Medikinet<sup>®</sup>), ein zu den Psychostimulanzien gehörendes Amphetaminderivat, wird heute als Mittel der Wahl bei der Behandlung der Aufmerksamkeitsdefizit-/Hyperaktivitätsstörung (ADHS) eingesetzt, obwohl die therapeutische Wirkung des Medikaments immer noch weitgehend unverstanden ist. Das Dopaminsystem gilt bei der ADHS als ursächlich betroffen. Da MPH sein Wirkungsprofil speziell über diesen Transmitter entfaltet, steht Dopamin im Zentrum der hirnpfysiologischen Forschung zur ADHS.

Mit der vorliegenden Arbeit wurde die Langzeitwirkung einer chronischen MPH-Gabe während der Adoleszenz auf die strukturelle Reifung des Dopaminsystems im limbopräfrontalen System der Wüstenrennmaus (*Meriones unguiculatus*) untersucht. Zum Einsatz kam (1) die orale Vergabeform mit einer klinisch relevanten Dosierung (5 mg/kg/Tag), für die zwei Kontrollgruppen, eine mit Wasser behandelte und eine gänzlich unbehandelte Gruppe, zur Verfügung standen. Außerdem kam (2) die bei Menschen nur in Missbrauchsfällen angewandte, aber in präklinischen Tierstudien übliche, intraperitoneale (i.p.) Vergabe zum Einsatz. Hierfür wurden eine klinisch relevante (5 mg/kg/Tag) und eine überhöhte (50 mg/kg/Tag) Dosierung verglichen. Die Ansätze (1) und (2) wurden durch entsprechende Studien an frühkindlich traumatisierten Tieren (einmalige Methamphetamin-(MA-)Intoxikation) ergänzt, die wie die Tiere aus (1) und (2) aus restriktiver Aufzucht stammten. Die Untersuchung sämtlicher Gruppen (pro Gruppe jeweils zwischen 8 und 11 Tiere) erfolgte im jungerwachsenen Alter (P 90), in dem Gerbils die adulte Ausreifung des Dopaminfasersystems vollzogen haben.

Die quantitativen Analysen der dopaminergen Faserdichte wurden im medialen präfrontalen Kortex (mPFC), im ventralen Striatum, d.h. Nucleus accumbens (NAc) und olfaktorischer Tuberkel (OT) und in dem lateralen (LA), dem basolateralen (BLA), dem lateralen zentralen (CeAl) und dem medialen zentralen Kern (CeAm) der Amygdala durchgeführt.

- Die unbehandelte Kontrollgruppe stellte sich im Nachhinein als besonders wertvolles Werkzeug für eine angemessene Interpretation der MPH-Wirkung nach **oralen Vergabe** heraus. Denn allein die Behandlung der Tiere mit Wasser führte zu einer verstärkten Reifung der Dopaminfasern im PFC. Das ist als positiver Effekt zu werten, da Käfigtiere per se im Vergleich zu Aufzuchten aus angereicherter Umgebung unter einer suppressiv gereiften Dopamininnervation im PFC leiden, wie frühere Arbeiten gezeigt haben.

- Die **orale Vergabe** von MPH (Ritalin®) im jugendlichen Alter führte im Vergleich zur gehandelten Kontrollgruppe zu keinen Veränderungen in den gemessenen Gebieten. Die signifikante Anhebung der Dopaminfaserdichte nach Handling wird in den MPH-behandelten Tieren aber in fast allen untersuchten Regionen und Laminae des PFC und im BLA knapp verfehlt, d.h. die MPH-Behandlung beeinträchtigt leicht den Handlingefferkt.
- Die frühkindliche Traumatisierung mittels **MA-Intoxikation** und anschließende Behandlung mit Wasser bedingte eine suppressive Reifung der dopaminergen Faserdichte im PFC und im BLA.
- Bei traumatisierten Tieren führte die MPH-Behandlung in präfrontalen Gebieten und im BLA zu einer erhöhten dopaminergen Innervationsdichte. Diese gezeigte morphogene Wirkung von MPH auf die Reifung des dopaminergen Transmittersystems ist als positiv zu werten, da sie die suppressive Reifung verhindert.
- Nach **i.p.-Vergabe** von MPH zeigt sich ein gänzlich anderes Bild. Hier bewirkt die klinisch relevante Dosierung eine Absenkung der dopaminergen Faserdichte im NAc und im CeAm.
- Die Behandlung mit der überhöhten Dosierung bedingt demgegenüber im NAc und im BLA eine erhöhte Faserdichte.
- Bei traumatisierten Tieren führt die Behandlung mit der überhöhten MPH-Dosierung im CeAI zu einer exzessiven Reifung der Dopaminprojektionen.

Für die **orale** sowie für die **i.p.-Studie** gilt gleichermaßen, dass MPH (z.B. Ritalin®) eine veränderte Entwicklung des mesokortikolimbischen Dopaminsystems induziert. Notwendigerweise werden die Ergebnisse beider Vergabeformen getrennt in Bezug auf bekannte akute und langfristige Veränderungen nach MPH-Gabe bewertet. Mit dem hier verfolgten, breiten Ansatz ist eine **morphogene Wirkung** von MPH auf die Reifung des dopaminergen Systems belegt. Das Resultat dieser morphogenen Wirkung ist von den begleitenden Umständen, denen die Tiere ausgesetzt waren, abhängig.

---

# Inhaltsverzeichnis

<b>1. Einleitung</b> .....	<b>1</b>
1.1 Aufmerksamkeitsdefizitstörung (ADS) und Aufmerksamkeitsdefizit-/Hyperaktivitätsstörung (ADHS).....	2
1.2 Ursachen und Grundlagen der AD(H)S.....	3
1.2.1 Ätiologie.....	3
1.2.2 Neuroanatomische und Neurophysiologische Grundlagen.....	5
1.3 Methylphenidat (z.B. Ritalin <sup>®</sup> , Medikinet <sup>®</sup> ).....	8
1.4 Das dopaminerge System.....	10
1.5 Frühkindliche Methamphetamin-(MA-)Intoxikation zur modellhaften Fehlentwicklung des dopaminergen Systems.....	12
1.6 Das limbo-präfrontale System.....	13
1.6.1 Der präfrontale Kortex.....	14
1.6.2 Das ventrale Striatum und der Nucleus Accumbens.....	17
1.6.3 Die Amygdala.....	18
1.7 Ziele der Arbeit.....	22
<b>2. Material und Methoden</b> .....	<b>24</b>
2.1 Versuchstiere: Aufzuchtbedingungen.....	24
2.2 Pharmakologische Behandlungen.....	24
2.2.1 Orale Vergabe von Methylphenidat (Oralstudie).....	24
2.2.2 Intraperitoneale (i.p.) Vergabe von Methylphenidat (I.p.-Studie).....	25
2.3 Versuchsdurchführung.....	26
2.3.1 Perfusion.....	26
2.3.2 Immunhistochemische Aufarbeitung der Gehirne.....	26
2.4 Untersuchte Bereiche.....	28
2.5 Versuchsauswertung.....	33
2.5.1 Computerbasierte Bildanalyse.....	33
2.5.2 Statistik.....	35

---

<b>3. Ergebnisse</b> .....	<b>37</b>
3.1 Qualitative Ergebnisse.....	37
3.2 Quantitative Ergebnisse .....	40
3.2.1 Oral-Studie .....	40
3.2.1.1 Befunde im präfrontalen Kortex .....	40
3.2.1.2 Befunde im ventralen Striatum .....	48
3.2.1.3 Befunde in der Amygdala .....	50
3.2.2 I.p.-Studie .....	52
3.2.2.1 Befunde im ventralen Striatum .....	52
3.2.2.2 Befunde in der Amygdala .....	55
<b>4. Diskussion</b> .....	<b>59</b>
4.1 Handling und Voraussetzungen für das Wirkungsprofil von MPH.....	60
4.2 Oralstudie .....	62
4.2.1 Der präfrontale Kortex (PFC).....	63
4.2.2 Das ventrale Striatum .....	65
4.2.3 Die Amygdala .....	69
4.3 I.p.-Studie .....	71
4.3.1 Das ventrale Striatum .....	72
4.3.2 Die Amygdala .....	73
4.4 Fazit.....	75
<b>5. Eigene Arbeiten</b> .....	<b>78</b>
<b>6. Literatur</b> .....	<b>80</b>
<b>Danksagung</b> .....	<b>96</b>
<b>Erklärung</b> .....	<b>97</b>

# 1 Einleitung

Die Aufmerksamkeitsdefizit-/Hyperaktivitätsstörung (ADHS) hat sich zur häufigsten psychiatrischen Störung im Kindes- und Jugendalter entwickelt. Sie ist gekennzeichnet durch ausgeprägte motorische Unruhe (Hyperaktivität), leistungsbeeinträchtigende Konzentrationsstörungen (Unaufmerksamkeit) sowie massive Schwierigkeiten, das eigene Verhalten zu planen und zu steuern (Impulskontrollstörung). Zur pharmakologischen Behandlung dieser Störung wird hauptsächlich Methylphenidat (z.B. Ritalin® und Medikinet®) eingesetzt, obwohl bisher wenig über die Langzeiteffekte von Stimulanzien auf die Entwicklung des Gehirns bekannt ist. Zudem wird trotz fehlender kontrollierter Studien die Stimulanzientherapie an immer jüngeren Kindern (bis zu zwei Jahren) durchgeführt (Zito et al., 2000).

Kinder sind aber nicht bloß „kleine“ Erwachsene und das Gehirn ist kein funktionell und morphologisch starres System, sondern es besitzt erstaunliche plastische Kompetenzen, die speziell im Kindesalter besonders stark angelegt sind. Die genetische Grundlage für die anatomische Organisation kognitiver Funktionen bildet zwar eine notwendige Basis, doch tragen Umwelteinflüsse entscheidend zur epigenetischen Gestaltbildung und -veränderung von reifenden Nervennetzen bei. Dabei bedeutet die adaptive Reifung neuronaler Nervennetze aber nicht eine sukzessive Zunahme von Verbindungen, sondern Reifung heißt zusätzlich Umbau von Nervennetzen in kritischen Phasen.

Kritische Phasen bezeichnen Zeitfenster, in denen der Organismus durch vielfältige plastische Umbauprozesse neuronaler Verbindungen gekennzeichnet ist (Wolff, 1982). Die neuronalen Verbindungen befinden sich während dieser Phasen in einem instabilen Zustand und können durch die Umwelt besonders stark beeinflusst werden. Ereignisse in diesen Entwicklungsphasen prägen die Struktur und Funktion neuronaler Verknüpfungen des Gehirns in einem besonderen Maße. Im Laufe des Kindes- und Jugendalters durchlaufen verschiedene funktionelle Systeme solche kritische Reifungsphasen zu unterschiedlichen Zeiten der Hirnentwicklung.

Auf Grund ihrer morphogenen Wirkung sind Neurotransmitter an der Entstehung kritischer Phasen entscheidend beteiligt (Lauder, 1988; Mattson, 1988; Lauder, 1993). Jeder Transmitter hat unterschiedliche Wirkungsspektren und reift zudem zu unterschiedlichen Zeiten heran. Das bedeutet, dass es eine Vielzahl von kritischen Phasen für die Reifung von Teilaspekten gibt.

Methylphenidat (z.B. Ritalin®) ist ein Amphetaminderivat und wirkt wie andere Stimulanzien auf den Katecholaminstoffwechsel im Gehirn ein. Es konnte zwar im Gegensatz zu anderen Amphetaminderivaten für Methylphenidat bisher kein

neurotoxisches Potential festgestellt werden (Yuan et al., 1997), doch sind gerade auch aufgrund der chronischen Vergabe dieses Pharmakons während des Kindes- und Jugendalters morphogene Effekte nicht auszuschließen. An die Möglichkeit einer morphogenen Wirkung von Methylphenidat ist bisher nicht gedacht worden. Zur Prüfung sind strukturpharmakologische Studien eine unabdingbare Voraussetzung. Eine solche Studie soll hier für drei entscheidende Gebiete des limbo-präfrontalen Systems nachgeholt werden.

## **1.1 Aufmerksamkeitsdefizitstörung (ADS) und Aufmerksamkeitsdefizit-/Hyperaktivitätsstörung (ADHS)**

Die Aufmerksamkeitsdefizit-/Hyperaktivitätsstörung (ADHS) beinhaltet eine scheinbar heterogene Palette von Verhaltensstörungen, dessen Prävalenz nach konservativen Daten bei durchschnittlich 3 bis 7,5% liegt (Goldman et al., 1998). Weiter gefasste Kriterien erhöhen die Prävalenz auf bis zu 17% (Barbarese et al., 2002). Die klinische Diagnose der AD(H)S gründet auf den international gebräuchlichen Klassifikationssystemen ICD-10 der Weltgesundheitsorganisation und der DSM-IV der American Psychiatric Association. Beide Klassifikationssysteme setzen ein Andauern der Symptome von mindestens sechs Monaten voraus. Diese müssen vor dem siebten Lebensjahr auftreten oder aufgetreten sein und mindestens zwei Lebensbereiche betreffen (z.B. Schule und Elternhaus). Die beiden Klassifikationssysteme unterscheiden sich aber in der Bewertung der Hyperaktivität. In der ICD-10 ist die Aufmerksamkeitsstörung ohne Hyperaktivität unter „Sonstige näher bezeichnete Verhaltens- und emotionale Störungen mit Beginn in der Kindheit und Jugend“ neben Auffälligkeiten wie Daumenlutschen, Nägelkauen und Nasebohren aufgeführt. Die DSM-IV hingegen teilt die Störung in drei gleichwertige Subtypen: einen vorwiegend unaufmerksamen Typ, bei dem Hyperaktivität und Impulsivität kaum oder gar nicht ausgeprägt sind, einen vorwiegend hyperaktiv-impulsiven Typ, bei dem die Aufmerksamkeitsstörung nicht oder nur wenig ausgeprägt ist und schließlich den Mischtyp, bei dem sowohl Aufmerksamkeitsstörungen, als auch Hyperaktivität und Impulsivität vorliegen.

Erste Symptome einer AD(H)S entwickeln sich vielfach schon pränatal und können bis ins Erwachsenenalter fortdauern. Kinder mit Aufmerksamkeitsstörungen ohne Hyperaktivität fallen im Vorschulalter allenfalls dadurch auf, dass sie eher verträumt und in

sich gekehrt sind, sehr empfindlich und schnell verletzlich reagieren (Neuhaus, 2002). Kinder mit Hyperaktivitätsstörung treten oft durch ihre Unausgeglichenheit, Misslaune und oppositionelles Verhalten hervor. Außerdem sind sie zumeist extrem motorisch aktiv, unmotiviert und wenig ausdauernd.

Seit dem schnellen Anstieg der Prävalenz in den 1990ern haben Forscher erfolglos versucht, eine allgemeingültige Theorie der ADHS zu formulieren (Sonuga-Barke, 2002), die es ermöglichen sollte, einen objektiven diagnostischen Test zu entwickeln.

## **1.2 Ursachen und Grundlagen der AD(H)S**

### **1.2.1 Ätiologie**

Ätiologische Faktoren der Störung sind vielfältig und sowohl in den genetischen Variationen und Mutationen, als auch in den Umwelteinflüssen, bzw. deren Interaktionen, zu suchen (Rutter und Silberg, 2002).

Studien belegen, dass ADHS eine der am stärksten genetisch beeinflusste Störung bei Kindern ist (Swanson et al., 2001). Der erste veröffentlichte „genome-wide scan“ identifizierte die beiden Genloci DRD4, der für den Dopamin D4-Rezeptor kodiert, und DAT1 oder SLC6A3, der für den Dopamintransporter (DAT) kodiert, als hauptverantwortliche Gene, die zur ADHS-Anfälligkeit beitragen (Fisher et al., 2002).

Auch frühere Untersuchungen richteten ihren Fokus bei der Erforschung molekulargenetischer Grundlagen der ADHS aufgrund der Wirkung der Stimulanzien, die schon seit den 1970ern erfolgreich in der Pharmakotherapie eingesetzt werden, auf das Dopaminsystem. Dabei konnte ein bei ADHS-Betroffenen verstärkt auftretender Polymorphismus der beiden oben genannten Gene festgestellt werden. Der häufigste Polymorphismus des DRD4-Gens stellt sich als 7-fache statt 4-fache Wiederholung einer bestimmten Basensequenz dar, die in der kodierenden Region liegt und damit zu einer strukturellen Veränderung und wahrscheinlich zu einer verminderten Sensitivität des Dopaminrezeptors führt (Swanson et al., 1998; Swanson et al., 2000). Der festgestellte Polymorphismus beim DAT1-Gen (Cook et al., 1995; Gill et al., 1997) befindet sich außerhalb der kodierenden Region und hat somit keine Strukturveränderung zur Folge (Swanson et al., 2000). Doch es wird vermutlich die Expression und damit die Dichte des Dopamintransporters beeinflusst (Castellanos und Tannock, 2002).



## 1.2.2 Neuroanatomische und Neurophysiologische Grundlagen

Die neurobiologischen Grundlagen für die Aufmerksamkeitsdefizit-/Hyperaktivitätsstörung werden, je nach Subtyp, in unterschiedlichen Hirnregionen, in denen Katecholamine eine wichtige Rolle spielen, vermutet. Heilman und Kollegen haben vorgeschlagen, dass die Pathophysiologie der ADHS von einer rechtsseitigen fronto-striatalen Dysfunktion in Kombination mit einer Beeinträchtigung des mesokortikalen Dopaminsystems stammt (Heilman et al., 1991). Seitdem haben Studien mit bildgebenden Verfahren viel zu dieser Sicht beigetragen. Untersuchungen belegen eine signifikante rechtsseitige Volumenabnahme des rechten frontalen Kortex bei ADHS-Betroffenen bei gleichzeitiger abnormaler Veränderung des rechten Nucleus caudatus (Castellanos et al., 1996b; Casey et al., 1997; Pueyo et al., 2000; Mostofsky et al., 2002). Neuropsychologische und andere Untersuchungsmethoden deuten ebenfalls auf eine primäre Störung der rechtsseitigen Aufmerksamkeits- und Arousal-Systeme hin (Carter et al., 1995; Campbell et al., 1996; Stefanatos und Wasserstein, 2001). Ferner haben funktionelle bildgebende Analysen eine normale Erhöhung des Metabolismus im rechten präfrontalen Kortex während „response inhibition tasks“ festgestellt, die bei ADHS-Betroffenen deutlich vermindert ist (Rubia et al., 1999; Langleben et al., 2001; Rubia et al., 2001). Aufgrund der Tatsache, dass Stimulanzien die Wiederaufnahme von Dopamin und Noradrenalin hemmen und (im Fall von D-Amphetamin) auch deren Ausschüttung bewirken, wurde traditionell eine Beteiligung der Katecholamine angenommen. Für diese Involvierung der Katecholamine spricht außerdem, dass die oben erwähnten Befunde aus bildgebenden Verfahren die Störung in fronto-subkortikalen Regionen lokalisieren, die reich an diesen Transmittern sind (Faraone und Biederman, 1998).

Die einträglichste Theorie, die der Involvierung von Dopamin bei der ADHS Rechnung trägt, wurde zuerst von Castellanos aufgestellt, der einen defizitären Zustand im mesokortikalen Dopaminsystem (in Verbindung mit Aufmerksamkeits- und exekutiven Defiziten) bei gleichzeitiger Überfunktion des striatalen Dopaminsystems in Verbindung mit hyperaktivem Verhalten annahm (Castellanos et al., 1996a; Castellanos, 1997). So sehen auch Johansen und Mitarbeiter die Dysfunktionen im mesolimbokortikalen System als verantwortlich für verminderte Aufmerksamkeitsleistungen, Verhaltensvariabilitäten, motorische und kognitive Impulsivität, wogegen die verminderte motorische Kontrolle auf Dysfunktionen im nigrostriatalen System zurückgeführt werden (Johansen et al., 2002). Anfänglich wurde in beiden dopaminergen Systemen eine verminderte Transmission angenommen. Diese sollte sich zum einen aus der Interpretation genetischer Untersuchungen ergeben (s.o.), aus denen auf eine verminderte Sensitivität des Rezeptors und/oder eine vermehrte Wiederaufnahme des Dopamins durch eine verstärkte

Expression des Dopamintransporters geschlossen wurde, die zu einem Dopaminmangel im synaptischen Spalt führt. Eine signifikante Erhöhung der Dopamintransporterdichte konnte bei ADHS-Betroffenen auch tatsächlich festgestellt werden (Dougherty et al., 1999; Krause et al., 2000; Cheon et al., 2003). Zum anderen wurde die Annahme einer verminderten dopaminergen Funktion durch das am weitesten verbreitete Tiermodell, der „spontaneously-hypertensive rat“ (SHR), gestützt, bei dem eine verringerte Dopamintransmission im präfrontalen Kortex und im Striatum gezeigt werden konnte (Russell et al., 1995).

Die Schlussfolgerung der generellen „Dopamin-Mangel-Hypothese“, die aus den Befunden gezogen wurde, wird heutzutage immer mehr angezweifelt. Das wird einerseits auf der Verhaltensebene festgemacht, da ADHS-Betroffene bei einer verringerten Dopaminfreisetzung eher Symptome zeigen müssten, wie sie bei Speed-Konsumenten nach der amphetamininduzierten Entleerung der Dopaminvesikel bis zu ihrer Wiederauffüllung während des so genannten „flat“ vorkommen, d.h. Abgeschlagenheit, Lustlosigkeit und Schlappeheit. ADHS-Betroffene zeigen unterdessen genau entgegengesetzte Symptome (Huether, 2001). Weiterhin ist fraglich, ob der strukturelle Befund einer erhöhten Dopamintransporterdichte bei ADHS-Betroffenen wirklich ursächlich für eine verstärkte Wiederaufnahme des Dopamins in die Präsynapse ist, oder, wie bei anderen Untersuchungen vorausgesetzt, direkt mit der dopaminergen Innervationsdichte korreliert (Reyav et al., 1996; Sesack et al., 1998; Ciliax et al., 1999; Moll et al., 2000). Diese Interpretation der Daten führten zu der Hypothese, dass im Striatum eine erhöhte dopaminerge Innervationsdichte und kein Dopaminmangel vorliegt. Somit wäre die erhöhte Dopamintransporterdichte keine Ursache der Störung, sondern eine adaptive Anpassung an den erhöhten Dopaminlevel. Diese Theorie stimmt auch mit der unterschiedlichen Autorezeptor-vermittelten Regulation der Dopaminaktivität in präfrontalen und striatalen Gebieten überein. Die kontinuierliche Behandlung mit Methylphenidat sollte so eine stetige Förderung der Dopaminfunktion im PFC und eine Herunterregulierung der striatalen Dopaminfunktion zur Folge haben (Sullivan und Brake, 2003).

Eine Herunterregulierung der Dopamintransmission im Striatum und damit die beruhigende Wirkung der eigentlich anregenden Stimulanzen ist plausibel, da Dopamin nicht nur auf einen Nervenimpuls hin in den synaptischen Spalt ausgeschüttet wird (phasische, impulsinduzierte Ausschüttung), sondern auch stetig in den Intervallen zwischen den Impulsen (tonische Ausschüttung). Beide Prozesse sind voneinander abhängig, so dass eine Erhöhung des tonischen Dopaminlevels durch niedrige Stimulanzen-Dosen eine relativ dazu geringere impulsinduzierte Dopaminausschüttung

bedingt (Grace, 1991; Grace, 1993). Diese verminderte impulsinduzierte Dopaminausschüttung wird von präsynaptischen D<sub>2</sub>-Autorezeptoren vermittelt, die bei einem erhöhten extrazellulären Dopaminlevel die impulsinduzierte Dopaminausschüttung inhibieren. Höhere Stimulanzien-Dosen führen dagegen zu einer generellen Stimulierung, da die tonische und impulsinduzierte Dopaminausschüttung so stark erhöht wird, dass die Stimulation der postsynaptischen Rezeptoren die kompensatorischen Möglichkeiten der D<sub>2</sub>-Autorezeptoren übersteigt (Seeman und Madras, 2002).

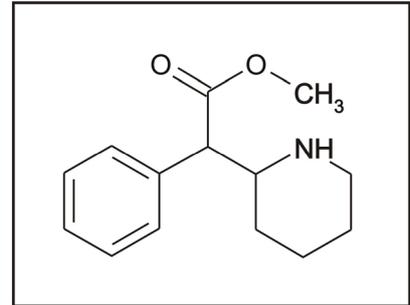
Eine Verminderung der impulsinduzierten Dopaminausschüttung kann aber für den PFC nicht angenommen werden, da die ohnehin schon als schwach postulierte Transmission damit noch weiter unterdrückt würde, was zu einer Verstärkung der Defizite führen müsste. Es konnte auch gezeigt werden, dass zusätzlich zu Methylphenidat verabreichte Neuroleptika (Dopaminantagonisten) die positive Wirkung von Methylphenidat auf motorische Verhaltensweisen verstärken (Gittelman-Klein et al., 1976; Weizman et al., 1984), andererseits eine fördernde Wirkung auf kognitive Fähigkeiten verhindern (Levy et al., 1997). Dies lässt auf eine erhöhte Dopamintransmission als Methylphenidatwirkung in präfrontalen Bereichen schließen, und somit auf zwei unterschiedliche Mechanismen der Stimulanzieneffekte auf motorische und kognitive Funktionen, die von diesen beiden Regionen vermittelt werden (Solanto, 2002). Diese Annahme wird auch durch das Fehlen von Impuls- und Synthese-regulierenden Autorezeptoren im PFC bestärkt, die im Striatum nachgewiesen werden konnten (Wolf et al., 1986; Wolf und Roth, 1987; Hoffmann et al., 1988; Meador-Woodruff et al., 1994).

Zusammengefasst legt das nahe, dass bei der ADHS eine Imbalance des dopaminergen Systems vorliegt, wobei der PFC durch einen Dopaminmangel und das Striatum durch eine erhöhte Dopaminfunktion gekennzeichnet ist. Eine derartige Imbalance des Dopaminsystems konnte durch Läsionsstudien gezeigt werden. So ließ sich zum Beispiel ein erhöhter Dopaminumsatz in den Basalganglien durch eine 6-Hydroxydopamin-bedingte Entleerung von Dopamin im mPFC induzieren (Pycock et al., 1980). Ferner zeigt sich eine verstärkte Dopaminaktivität im dorsalen bzw. ventralen Striatum nach präfrontaler Dopaminentleerung oder Dopaminrezeptorblockade (Deutch et al., 1990; Mitchell und Gratton, 1992; Rosin et al., 1992; Doherty und Gratton, 1996). Andererseits führt eine Agonisierung des Dopaminsystems im mPFC durch lokale Injektion von Apomorphin, einem Dopaminagonisten, zu einem verringerten Metabolismus im Nucleus Caudatus (Jaskiw et al., 1991).

Die Komplexität der integrativen Wirkungsmechanismen von Dopamin auf limbische sowie motorische Strukturen sei hier zu genüge dargestellt, um nunmehr zur Wirkungsweise von Methylphenidat überzugehen.

### 1.3 Methylphenidat (z.B. Ritalin<sup>®</sup>, Medikinet<sup>®</sup>)

Methylphenidat (Methyl[(RS;SR)(phenyl)(2-piperidyl)-acetat]) ist ein Amphetaminderivat und gilt heute als Wirkstoff der ersten Wahl bei der Pharmakotherapie von ADHS. Es wurde in den 40er Jahren des 20. Jahrhunderts zum ersten Mal synthetisiert und in den 50er Jahren erst als Appetitzügler und Antidepressivum oder auch als „Aufputzmittel“ verwandt (Krause et al., 2001). Später, in den 60er Jahren wurde Methylphenidat erstmals als Medikament zur Behandlung des Hyperkinetischen Syndroms eingesetzt (Knobel, 1962; Connors und Eisenberg, 1963). Der Wirkstoff unterliegt dem Betäubungsmittelgesetz und jede Verschreibung ist meldepflichtig.



**Abb. 1.2: Strukturformel von Methylphenidat**

Es wird als Methylphenidat-hydrochlorid (z.B. Ritalin<sup>®</sup> und Medikinet<sup>®</sup>) zu therapeutischen Zwecken eingesetzt und gehört zur Substanzklasse der zentralen Stimulantien. Die chemische Struktur basiert, wie die der catecholaminergen Neurotransmitter, auf einem Phenyläthylaminkern (Abb. 1.2), der auch bei anderen Stimulantien die Grundlage darstellt (Krause et al., 2001). Methylphenidat ist eine Verbindung, die hoch potent die Wiederaufnahme von Dopamin in die Präsynapse durch den Dopamintransporter (DAT) hemmt, obwohl sie als Racemat vorliegt, also ein Gemisch, das zu gleichen Teilen aus rechts- und linksdrehenden Molekülen besteht, und keine Phenyl-Substituenten aufweist, die generell die Potenz von Wiederaufnahmehemmern erhöhen (Froimowitz et al., 1995). Die hochaffine Bindung von Methylphenidat an die catecholaminergen Wiederaufnahmetransporter bewirkt deren Blockade (Gatley et al., 1996).

Methylphenidat ist ein kurzzeitig wirkendes Stimulans und wird klinisch oral in Tablettenform (z.B. Ritalin<sup>®</sup> und Medikinet<sup>®</sup>) und bei Missbrauch der Substanz oft intravenös verabreicht (Swanson und Volkow, 2003). Die Resorption im Gastrointestinaltrakt nach oraler Aufnahme und die Passage der Blut-Hirn-Schranke erfolgen zügig (Krause et al., 2001). Aufgrund eines ausgeprägten First-Pass-Metabolismus beträgt die maximale Plasmakonzentration bei Menschen ca. 40 nmol/l und wird nach 1-2 Stunden erreicht, wobei die Plasmahalbwertszeit 2-3 Stunden beträgt. Auch die maximale Konzentration von Methylphenidat im Gehirn wird etwa eine Stunde nach oraler Einnahme erreicht. Diese Werte korrelieren mit dem Einsetzen der verhaltensregulierenden Wirkung nach etwa einer Stunde und einer Wirkungsdauer von 3-4 Stunden (Swanson und Volkow, 2002). Nach intravenöser Vergabe ist eine maximale

Methylphenidatkonzentration im Gehirn schon nach circa 10 Minuten erreicht und die Halbwertszeit liegt bei etwa 90 Minuten (Swanson und Volkow, 2003). Diese Pharmakokinetik nach intravenöser Einnahme führt zu einer verstärkenden Wirkung und einem „High“-Gefühl, was auf einen schnellen extrazellulären Dopaminanstieg zurückgeführt wird, während der therapeutische Effekt nach einem langsamen Anstieg der Methylphenidatkonzentration und der damit verbundenen Erhöhung des Dopaminlevels erreicht wird (Volkow und Swanson, 2003). Zwei Variablen sind für die akute Wirkung von Methylphenidat von entscheidender Bedeutung. Zum einen die Pharmakokinetik und zum anderen die Dosierung. So ist das Dosis-Wirkungsverhältnis bei oraler Vergabe in klinischen Untersuchungen eindeutig belegt. Höhere Dosen führen zu einer stärkeren Reduzierung der ADHS-Symptome, aber auch zu vermehrten Nebenwirkungen (Magersucht, Schlaflosigkeit und stereotypen Verhaltensweisen) (Volkow und Swanson, 2003). Die optimale Dosierung ist individuell einzustellen und liegt im Bereich von 0,3 und 0,8 mg/kg, wobei Tageshöchst Dosen von 1 mg/kg bzw. 60 mg nicht überschritten werden sollen. Zu verwendeten Dosierungen bei Missbrauch sind keine Daten verfügbar.

Aufgrund der beiden Variablen des Pharmakons, Pharmakokinetik und Dosierung, stellte sich für die vorliegende Arbeit die Frage, ob diese auch unterschiedliche Einflüsse auf die strukturelle Dopaminfaserreifung zur Folge haben könnten.

Freilich müssen die Schwierigkeiten bedacht werden Ergebnisse von tierexperimentellen Untersuchungen mit an Menschen gewonnen Daten zu vergleichen. Kleinere Säugetiere neigen bekanntlich dazu, Pharmaka schneller zu eliminieren als größere Säugetiere. Ende der 1980er wurde die Technik des „interspecies scaling“ entwickelt (Mordenti und Chappell, 1989). Diese ermöglicht eine Aussage zur Elimination von Pharmaka in unterschiedlichen Spezies auf der Grundlage anatomischer, physiologischer und biochemischer Ähnlichkeiten zwischen landlebenden Säugetieren. So müssen bei kleineren Tieren höhere Dosierungen verwendet werden, um gleiche Effekte wie bei Menschen zu erreichen. Das Verhältnis wird nach folgender Formel berechnet

$$D_{human} = D_{animal} \times \left( \frac{W_{human}}{W_{animal}} \right)^{0,7},$$

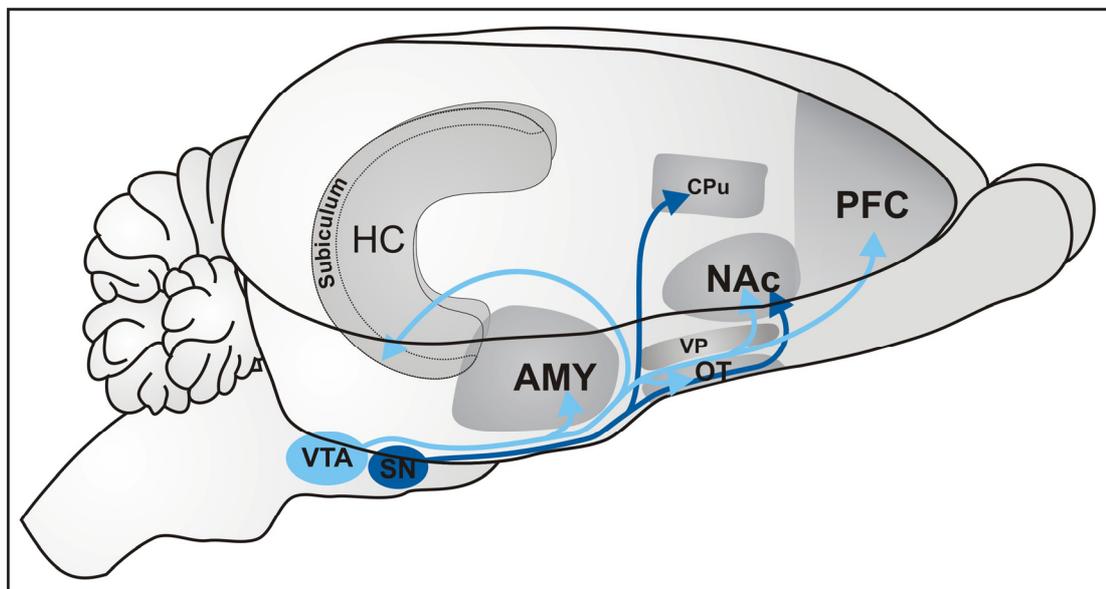
wobei D die Dosis des Pharmakons in Milligramm und W das Gewicht in kg bezeichnet.

So entspricht eine Methylphenidatdosis von 5 mg/kg bei einer Wüstenrennmaus mit einem Gewicht von 0,045 kg nach dieser Berechnung einer Dosis von 0,68 mg/kg bei einem Kind mit einem Gewicht von 35 kg. Damit liegt sie im Bereich der klinischen Anwendung und wird daher weiterhin auch als klinisch relevant bezeichnet, wogegen eine

Dosis von 50 mg/kg (Wüstenrennmaus; 0,045 kg) einer Dosis von 6,8 mg/kg (Kind; 35 kg) entspricht und im Folgenden als überhöht bezeichnet wird. Beide Dosierungen, eine klinisch relevante und eine überhöhte, sollten in der hier vorliegenden Studie zum Einsatz gebracht werden.

## 1.4 Das dopaminerge System

Dopamin ist einer der Schlüsseltransmitter im Gehirn, dem eine zentrale Rolle bei der Integration motorischer und limbischer, sowie kognitiver Funktionen zukommt (Nieoullon, 2002). Eine Besonderheit dieses Transmittersystems gegenüber anderen ist die spezifische und eng abgegrenzte Innervation einzelner Hirngebiete. Dopaminerge Neuronen projizieren über distinkte Bahnen zu ihren Terminationsgebieten im Großhirn und entspringen aus drei Kerngebieten des Mittelhirns (Abb. 1.3). Die ventrale tegmentale Area (VTA, A10), die Substantia nigra (SN, A9) und das retrorubale Feld (A8) innervieren sehr spezifisch einzelne Gebiete des Gehirns (Bjorklund und Lindvall, 1984; Yoshida et al., 1988). Das mesolimbische und das mesokortikale Bahnsystem werden meist zum mesolimbo-kortikalen System zusammengefasst, da sie ihren gemeinsamen Ursprung in der VTA nehmen, von wo aus sie den Nucleus accumbens und den olfaktorischen Tuberkel (mesoaccumbale Bahn), die Amygdala (mesoamygdaloide Bahn) und die



**Abb. 1.3: Schematische Darstellung der wichtigsten dopaminergen Bahnen bei Nagern**

AMY	Amygdala	PFC	Präfrontaler Kortex
CPu	Caudatus/Putamen	SN	Substantia nigra
HC	Hippocampus	VP	Ventrales Pallidum
NAc	Nucleus accumbens	VTA	Ventrale tegmentale Area
OT	Olfaktorischer Tuberkel		

Hippocampusformation (mesohippocampale Bahn) als mesolimbisches Bahnsystem, und den PFC als mesokortikales Bahnsystem innervieren (Neuhuber, 1994; Rockstroh, 2001). Läsionsstudien belegen eine gegenseitige Beeinflussung dieser Bahnsysteme, die somit nicht unabhängig voneinander ausschließlich in ihren Terminationsgebieten regulatorisch wirksam sind, sondern ein komplexes Netzwerk bilden, indem sie sich gegenseitig beeinflussen (Le Moal und Simon, 1991). So sind zum Beispiel Verhaltensveränderungen nach Verminderung kortikaler Dopaminfunktion auch als reaktive Veränderungen der Dopamintransmission in subkortikalen Gebieten zu betrachten (Nieoullon, 2002).

Eine weitere Besonderheit des dopaminergen Systems besteht in der unterschiedlichen zeitlichen Reifung dieser Bahnen, die nicht mit der Geburt abgeschlossen ist, sondern sich in Teilen noch bis in das Erwachsenenalter vollzieht. Die Reifung dieses Transmitters schreitet von caudal nach rostral fort, wodurch sich für die einzelnen Terminationsgebiete unterschiedliche kritische Phasen in der Entwicklung ergeben. So ist die Reifung der dopaminergen Fasern in die caudalen Gebiete durch einen Überschuss früh nach der Geburt (postnataler Tag 14 bei der Ratte) und einer sich leicht regressiv entwickelnden Faserdichte bis zum Erwachsenenalter gekennzeichnet (Verney et al., 1985; Erickson et al., 1998). Die Dopamininnervation im Nucleus accumbens erreicht ebenfalls am Tag 14 eine relativ hohe Dichte, die dann auf etwa die Hälfte zwischen Tag 30 und 70 abfällt, bevor sie auf das Niveau des Erwachsenenalters ansteigt (Lesting et al., submitted). Im PFC ist der stärkste Anstieg der Dopaminfaserdichte zwischen dem postnatalen Tag 23 und 60 zu verzeichnen, wobei sich die Zunahme der Dopaminfasern noch bis in das junge Erwachsenenalter fortsetzt (Kalsbeek et al., 1988; Dawirs et al., 1993; Rosenberg und Lewis, 1995), was auch essentiell zu der verzögerten funktionellen Reifung des PFC beiträgt (Lambe et al., 2000). Diese postnatalen Reifungsprozesse sind generell aktivitätsabhängig, was das dopaminerge System und die von ihm innervierten Hirnareale für äußere Einflüsse besonders anfällig macht. Somit führen frühkindliche Traumata, wie sie als eine Ursache für ADHS angenommen und z.B. mittels postnataler Methamphetaminintoxikation bei Nagern (Teuchert-Noodt und Dawirs, 1991) nachgeahmt werden können, zu negativen Entwicklungsfolgen im Dopaminsystem und zu daraus resultierenden Verhaltensstörungen (Dawirs et al., 1994; Dawirs et al., 1996; Neddens et al., 2002; Busche et al., 2004).

## 1.5 Frühkindliche Methamphetamin-(MA-)Intoxikation zur modellhaften Fehlentwicklung des dopaminergen Systems

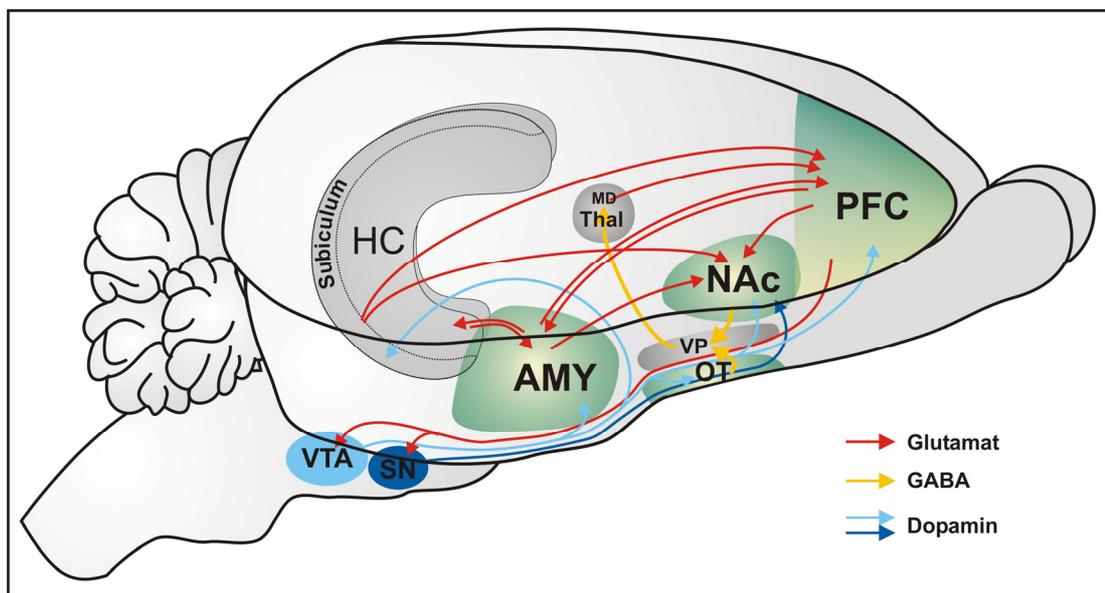
Methamphetamin ist ein Amphetaminderivat, das bei höherer Dosierung autotoxische Prozesse im dopaminergen Transmittersystem auslöst. Diese Toxizität wird durch die massive Ausschüttung von zytoplasmatischem Dopamin in den synaptischen Spalt (Sulzer et al., 1995), der partiellen Wiederaufnahmehemmung aus dem synaptischen Spalt, Verhinderung der Einlagerung in die synaptischen Vesikel und der Blockade des dopaminabbauenden Enzyms Monoaminoxidase (MAO) ausgelöst. Die damit verbundene Anreicherung von Dopamin im synaptischen Spalt führt zum nichtenzymatischen Abbau des Transmitters in 6-Hydroxy-Dopamin (6-OHDA) (Seiden und Vosmer, 1984). Beim weiteren Abbau des 6-OHDA entstehen freie Radikale (Fahn und Cohen, 1992), die zu einer Zerstörung der Präsynapse und somit zur Degeneration der betroffenen Neuritenzweige führen (Woolverton et al., 1989).

Eine einmalige Methamphetamin-Applikation führt bei jungen Gerbils (*Meriones unguiculatus*) zu einem massiven toxischen Abbau von Terminalien in den Laminae II und III des medialen PFC, was auf einen starken Verlust von dopaminergen Synapsen hindeutet, da Dopamin genau diesen Bereich sehr dicht innerviert. Der Nachweis wurde mittels der Gallyas-Silberimpregnation geführt, die selektiv lysosomale Abbauprozesse von Axon-Terminalien sichtbar macht (Teuchert-Noodt und Dawirs, 1991). Später wurde von unserer Arbeitsgruppe bestätigt, dass die einmalige Applikation einer hohen Dosis (50 mg/kg) Methamphetamin im frühkindlichen Alter (postnataler Tag 14) zu einer 38% niedrigeren Dopamininnervation im medialen PFC und 50% geringeren Innervationsdichte im orbitalen PFC im jungerwachsenen Alter (postnataler Tag 90) führt (Dawirs et al., 1994). Gleichzeitig konnte eine Überschussreifung von dopaminergen Fasern in der Amygdala und im entorhinalen Kortex nachgewiesen werden (Busche et al., 2004). Die einmalige hochdosierte Methamphetamin-Applikation wirkt also als frühkindliche traumatische Belastung, die das noch in der Reifung befindliche Dopaminsystem nachhaltig schädigt. Diese geht mit einer erhöhten motorischen Aktivität, Verschlechterung bei verzögerten Wechselaufgaben und erhöhter Emotionalität (Kernsymptome der ADHS) einher (Dawirs et al., 1996).

Diese frühkindliche Intoxikation simuliert modellhaft eine Fehlentwicklung des limbokortikalen Dopaminsystems auf struktureller Ebene, wie sie funktionell für die Entwicklung einer ADHS zugrunde gelegt wird (s.o.).

## 1.6 Das limbo-präfrontale System

Ursprünglich geht der Begriff „limbisches System“ auf Paul Broca zurück, der einen „Limbischen Lappen“ definierte (Broca, 1878). Die erste funktionelle Theorie wurde 1937 von James W. Papez entwickelt, der einen kleinen Neuronenkreis beschrieb, der entscheidend für die Emotionsbildung sein sollte (Papez, 1937). Der Begriff des limbischen Systems wurde letztlich von Paul McLean geprägt, der dem Papez-Kreis die Amygdala (den Mandelkern) hinzufügte (McLean, 1955). Seitdem sind diesem System viele Strukturen hinzugerechnet worden. Heutzutage wird es unter funktionellen Aspekten definiert, wobei jene Funktionen zusammengefasst werden, die sich von der primären Motorik und Sensorik abgrenzen, wie beispielsweise Motivation, Emotion, Lern- und Gedächtnisbildung. Zu den limbischen Arealen werden die Hippocampusformation, die Amygdala, der NAc, sowie im Hirnstamm lokalisierte monoaminerge Kerngebiete gezählt, die sowohl anatomisch als auch funktionell eng miteinander verknüpft sind (Krettek und Price, 1977; Cassell et al., 1986; Le Moal und Simon, 1991; Totterdell und Meredith, 1997; Pikkarainen et al., 1999; Pitkanen et al., 2000; Pitkanen, 2000; Pikkarainen und Pitkanen, 2001). Die zahlreichen reziproken Verbindungen des PFC zu den oben genannten limbischen Arealen (Swanson, 1981; Jay und Witter, 1991; Sesack und Pickel,



**Abb. 1.4: Schematische Darstellung des limbo-präfrontalen Systems bei Nagern**

Die einzelnen Kortexareale und Kerngebiete des limbo-präfrontalen Systems sind intensiv, meist reziprok, miteinander verbunden. Außerdem zeichnen sie sich durch eine starke dopaminerge Innervation aus.

AMY	Amygdala	PFC	Präfrontaler Kortex
HC	Hippocampus	SN	Substantia nigra
MD Thal	Mediodorsaler Thalamus	VP	Ventrales Pallidum
NAc	Nucleus accumbens	VTA	Ventrale tegmentale Area
OT	Olfaktorischer Tuberkel		

1992; Carr und Sesack, 1996; McDonald et al., 1996; Insausti et al., 1997; Rosenkranz und Grace, 2001; Rosenkranz und Grace, 2002) führten dazu, dass dieses funktionelle Ensemble zum so genannten limbo-präfrontalen System zusammengefasst wurde (Abb. 1.4). Die ADHS ist gekennzeichnet durch Ausfälle speziell in drei dieser zum limbo-präfrontalen System gehörigen Gebieten, weshalb diese zum Gegenstand der vorliegenden Arbeit wurden und im folgenden näher dargestellt werden.

### **1.6.1 Der präfrontale Kortex**

In den 1930er und 1940er Jahren wurde weithin angenommen, dass im Frontallappen die höchsten intellektuellen Kapazitäten „beheimatet“ sind und dass dieser nur bei Menschen und höheren Primaten vorkommt (Kolb, 1984).

Der präfrontale Kortex (PFC) wurde zunächst nach zytoarchitektonischen Kriterien als granulärer frontaler Kortex abgegrenzt (Brodmann, 1909) und erst später folgte die Abgrenzung aufgrund seiner Konnektivität mit dem mediodorsalen Thalamuskern (Rose und Woolsey, 1948) und seiner dopaminergen Innervation aus dem ventralen Mesenzephalon (Thierry et al., 1973; Bjorklund et al., 1978). Obwohl der PFC eine beträchtliche Variation durch die verschiedenen Spezies zeigt, vor allem in dem Verhältnis von granulären zu agranulären Anteilen, weisen Ähnlichkeiten hinsichtlich der Position und der Verbindungen des PFC auf die relative Vergleichbarkeit über die Spezies hin (Uylings und van Eden, 1990; Petrides und Pandya, 1994; Uylings et al., 2003). Der PFC ist durch reichliche Verbindungen mit unterschiedlichen Teilen des Zentralnervensystems wie dem mediodorsalen Thalamuskern, verschiedenen sensorischen Gebieten oder Systemen, praktisch allen limbischen Strukturen, dem ventromedialen Striatum, dem Hypothalamus und dem Hirnstamm verbunden, über die ihn verarbeitete Informationen aus sensorischen und motorischen Systemen erreichen (Öngür und Price, 2000). Aufgrund dieser vielen Verbindungen wird der PFC als übergeordnetes Assoziationsareal angesehen (Kolb und Whishaw, 1990). Der PFC ist ferner die einzige neokortikale Region, in der eine Repräsentation von Informationen aus limbischen Netzwerken stattfindet (Nauta, 1971; McLean, 1990).

Eine wichtige Funktion des PFC ist das Arbeitsgedächtnis zur Steuerung von Verhalten (Goldman-Rakic, 1987). Die „Online“ gehaltenen Repräsentationen werden genutzt, um Verhalten effektiv in Abwesenheit von Umweltsignalen zu steuern, so dass eine Unabhängigkeit des Organismus von der Umwelt entsteht, die unangebrachte Antworten oder ablenkende Stimuli inhibiert, wodurch Planung und Ausführung von organisiertem

Verhalten ermöglicht wird (Robbins, 1996). Tiere und Menschen mit Läsionen des PFC zeigen schlechte Aufmerksamkeitsregulation, disorganisiertes Verhalten, Hyperaktivität und Impulsivität (Stuss et al., 1994). Diese Defizite können unter Laborbedingungen mit Hilfe von Versuchen zum Arbeitsgedächtnis (z.B. verzögertes Antwortverhalten), Planungsvermögen (z.B. Tower of London-Test), Antwortunterdrückung und Aufmerksamkeit getestet werden (Broadbent, 1971; Stuss et al., 1994; Arnsten und Goldman-Rakic, 1998; Arnsten, 1998b). Diese über den PFC vermittelten und bei ADHS defizitären kognitiven Funktionen werden von den Katecholaminen moduliert (Arnsten, 1998a), wobei dem mesokortikalen Dopaminsystem eine zentrale Rolle zukommt (Sullivan und Brake, 2003).

Der PFC wird definiert als der Bereich rostral des Motor- und Prämotorkortex, in dem sich die kortikale Projektion des mediodorsalen Thalamus und die DAerge Innervation aus der ventralen tegmentalen Area überlappen (Ray und Price, 1992; Divac et al., 1993). Dieser wird in einen orbitalen (oPFC) und medialen (mPFC) Bereich unterteilt, die sich in den intrinsischen Verschaltungsmustern von kortiko-kortikalen Verbindungen, genauso wie in Verbindungen mit sensorischen, limbischen, striato-thalamischen und viszeromotorischen Strukturen, unterscheiden (Öngür und Price, 2000).

Aufgrund der zellulären Struktur und der Laminierung des Kortex wird der mPFC der Nager in einen infralimbischen (IL), prälimbischen (PL), einen dorsalen (ACd) und einen ventralen anterior cingulären (ACv) und einen medialen präzentralen (PrCm) kortikalen Bereich eingeteilt (Krettek und Price, 1977; Ray und Price, 1992).

### **Verbindungen des PFC**

Die intrinsischen kortiko-kortikalen Verbindungen wurden in etlichen Experimenten mit Hilfe von retrograden und anterograden Tracern analysiert, die auf einzelne architektonische Gebiete begrenzt waren (Carmichael und Price, 1996). Diese zeigten, dass die Areale des PFC in zwei Netzwerke eingeteilt werden können. Das eine beschränkt sich auf den oPFC und das andere verbindet den mPFC mit wenigen Teilen des oPFC.

Im Gegensatz zu orbitalen Bereichen des PFC erhält der mPFC nur sehr wenige direkte sensorische Eingänge (Öngür und Price, 2000), unterhält aber intensive Verbindungen mit limbischen Strukturen, wie dem basolateralen und dem lateralen Kern der Amygdala und dem Subiculum (Krettek und Price, 1977; Swanson, 1981; Ray und Price, 1992; Barbas und Blatt, 1995; Carmichael und Price, 1995). Untersuchungen zu Projektionen des PFC in das Striatum zeigen, dass distinkte Regionen des PFC in spezifische Regionen des ventromedialen Striatums projizieren (Phillipson und Griffiths,

1985; Berendse et al., 1992; Brog et al., 1993). Diese Verbindungen sind topisch in der Form organisiert, dass der dorsale Anteil des mPFC in die Core-Region des Nucleus accumbens und die ventralen Areale in die Shell-Region projizieren (Berendse et al., 1992). Die ventromedialen Anteile des Striatums, die Input vom mPFC erhalten, stehen ebenfalls mit der Amygdala und anderen limbischen Strukturen in Verbindung, wogegen die zentrale striatale Region, mit der der oPFC in Verbindung steht, diese Eingänge nicht hat (Russchen und Price, 1984; Russchen et al., 1985). Außerdem projiziert der PFC mit absteigenden Bahnen in monoaminerge Kerngebiete im Hypothalamus und im Hirnstamm (Arnsten und Goldman-Rakic, 1984). Diese innervieren wiederum höhere Hirngebiete, wodurch der PFC auf die Aktivität weiter Teile des Zentralnervensystems Einfluss nimmt.

Aufgrund der beschriebenen Verbindungen und von physiologischen Daten hat Neafsey die Teilung des PFC in viszerosensorische Gebiete an der ventrolateralen Oberfläche und viszeromotorische Gebiete an der medialen Oberfläche vorgeschlagen (Neafsey, 1990). Diese beiden Subgebiete des PFC haben distinkte extrinsische Verbindungen, doch durch intrinsische Kopplungen können die Informationen auch transferiert werden.

Verhaltensstudien belegen, dass der PFC nicht nur ein wichtiges Verbindungsglied zwischen sensorischer und viszeromotorischer Aktivität ist, sondern auch wichtige Funktion bei der Emotionsverarbeitung hat (Öngür und Price, 2000).

### **Dopaminerge Afferenzen**

Der mPFC erhält dopaminerge Afferenzen von der ventralen tegmental Area (VTA), die einen Teil des mesokortikalen Dopaminsystems bilden, mit der höchsten Innervationsdichte in infralimbischen und prälimbischen Regionen (Thierry et al., 1973; Lindvall et al., 1978; Conde et al., 1995). Dopaminerge Neuronen bilden Synapsen mit mindestens zwei Zelltypen im PFC aus. Zum einen mit exzitatorischen (glutamatergen) Pyramidenneuronen und andererseits mit nonpyramidalen GABA-Neuronen (Goldman-Rakic et al., 1989; Cowan et al., 1994; Sesack et al., 1995). Die GABAergen Interneuronen stehen ihrerseits auch mit Pyramidenzellen im mPFC in Verbindung (Cowan et al., 1994). Es konnte gezeigt werden, dass Dopamin generell stimulierend auf die GABAergen Interneuronen wirkt (Penit-Soria et al., 1987; Grobin und Deutch, 1998), sodass es zu einer verstärkten GABA-Ausschüttung und somit zu einer Inhibierung der Pyramidenzellen durch Dopamin und GABA kommt (Sesack und Bunney, 1989; Thierry et al., 1992; Cowan et al., 1994; Law-Tho et al., 1994; Grobin und Deutch, 1998).

## 1.6.2 Das ventrale Striatum und der Nucleus Accumbens

Der Begriff ventrales Striatum bezeichnet einen Bereich des Striatums, der Eingänge des olfaktorischen Kortex und Hippocampus (zusammengefasst als Allokokortex) und weiteren nichtisokortikalen (mesokortikalen) limbischen Regionen wie dem entorhinalen Kortex und der Amygdala, sowie dopaminerge Afferenzen vom ventralen Mesencephalon erhält (Heimer, 2003). Diese striatalen Afferenzen sind größtenteils auf die ventralen und medialen Anteile des Striatums begrenzt, obwohl einzelne dieser limbischen Afferenzen auch dorsale Teile des Striatums erreichen können (Groenewegen et al., 1999). Zum ventralen Striatum werden der Nucleus Accumbens, der Olfaktorische Tuberkel und der ventromediale Teil des Caudatus-Putamen-Komplexes gezählt (Heimer et al., 1995; Heimer, 2003). Aufgrund von isokortikalen und nichtisokortikalen Projektionen, die sich zum Teil im Striatum (Caudatus-Putamen) überlappen, existiert keine klare Grenze zwischen ventralen und dorsalen Regionen des Striatums und Pallidums (Heimer, 2003).

Der Nucleus Accumbens (NAc) ist eine Struktur im rostrombasalen Vorderhirn, die als hoch differenzierter striataler Teil des ventralen striatopallidalen Systems angesehen wird (Heimer und Wilson, 1975; Heimer und Van Hoesen, 1979; Heimer et al., 1982). Der NAc wird wegen seiner afferenten und efferenten Verschaltungen als funktionelle Schnittstelle zwischen dem limbischen und dem motorischen System (limbic-motor interface) angesehen (Mogenson et al., 1980) und integriert verschiedene kortikale und subkortikale Eingänge, um motivationales Verhalten zu adaptieren (Heimer, 2003). Der NAc ist afferent größtenteils mit verschiedenen limbischen Arealen (z.B. dem ventralen Subiculum und mehreren Kernen der Amygdala) verbunden, über die ihn emotional/motivational gefärbte Aktivitäten erreichen. Efferent projiziert er zu einem geringen Teil in das periaquäduktale Grau (Groenewegen et al., 1993), von wo aus der prämotorische Kortex und motorische Hirnstammkerne innerviert werden. Die meisten Projektionen sind in das ventrale Pallidum und die VTA und Substantia nigra (SN) gerichtet, die wiederum den PFC und das dorsale Striatum erreichen (Deniau et al., 1994; Groenewegen et al., 1994). So hat der NAc nicht nur Einfluß auf motivational getriebenes Verhalten, sondern beeinflusst überdies komplexe kognitive Leistungen des PFC (Pennartz et al., 1994). Aufgrund der regionalen Verteilung von Neurotransmittern, Neuropeptiden und Rezeptordichten wird der NAc in zwei Subareale, das innere Core und das äußere Shell, unterteilt (Zaborszky et al., 1985; Meredith et al., 1992; Zahm und Brog, 1992; Jongen-Relo et al., 1993; Jongen-Relo et al., 1994). Afferente und efferente Verbindungen unterscheiden sich zwischen diesen beiden Subarealen und weisen auf funktionelle Differenzen hin. Das Core stellt sich als eine Art ventraler Erweiterung des Caudatus-Putamen-Komplexes dar und ist eng mit dem motorischen System verbunden, wogegen

das Shell in limbische Kreisläufe eingebunden ist (Heimer et al., 1991; Deutch und Cameron, 1992; Groenewegen et al., 1996).

### **Dopaminerge Afferenzen**

Die dichte Dopamininnervation des NAc bahnt Informationen, die aus der Amygdala, dem PFC, dem Hippocampus und anderen limbokortikalen Regionen einlaufen (Horvitz, 2002). Doch sowohl das Innervationsmuster, als auch der Ursprung der dopaminergen Innervation unterscheiden sich in den beiden Subarealen des NAc bei Nagern (Voorn et al., 1986; Brog et al., 1993; Neddens et al., 2002), und zwar innervieren die SN pars compacta und die laterale VTA das Core, wogegen die mediale VTA in das Shell projiziert (Brog et al., 1993). Eine dopaminerge Fehlfunktion im NAc wird für einige psychiatrische Erkrankungen (Grace, 2000; Heidbreder et al., 2000; Andersen et al., 2002a; Weiner, 2003; Cardinal et al., 2004) und die Drogensucht (Di Chiara et al., 2004) diskutiert, wobei das Core und das Shell unterschiedlich beteiligt sind. Das impulsive Wahlverhalten ist ein Aspekt der Impulsivität bei ADHS und wird hauptsächlich vom NAc Core vermittelt, dessen Funktion bei Betroffenen demnach beeinträchtigt sein sollte (Cardinal et al., 2004).

Der olfaktorische Tuberkel (OT) wird nach neueren Untersuchungen trotz seines laminären Aufbaus nicht als kortikale Struktur angesehen, sondern dem ventralen Striatum zugerechnet, da er kortiko-striatale Verbindungen ebenso wie der NAc erhält, die sich durch das Fehlen von Rückprojektionen vom OT in den piriformen Kortex auszeichnen. Die Projektionen des OT in die Substantia innominata stellt sich ferner als striato-pallidale Verbindung dar (Heimer, 2003). Weitere Studien zeigen, dass die „medium-sized“ Zellpopulation des OT striataler Natur ist (Heimer et al., 1995) und dass der pallidale Komplex sich ventral bis tief in den OT erstreckt (Switzer, III et al., 1982).

### **1.6.3 Die Amygdala**

Die Amygdala bezeichnet einen aus 13 Kernen bestehenden Kernkomplex, der im dorsomedialen Pol des Temporallappens vor dem Unterhorn des Seitenventrikels liegt (Akert, 1994; Pitkanen, 2000). Die Amygdala steht mit anderen Strukturen des limbischen Systems in enger anatomischer Verbindung, weshalb sie bei vielen Erkrankungen dieses Systems betroffen ist (Akert, 1994; Yilmazer-Hanke, 2003). Sie wird als diejenige Hirnstruktur betrachtet, die für die emotionale Einfärbung von Informationen zuständig ist,

und sie spielt eine wichtige Rolle bei angst- und belohnungsbedingtem Verhalten, Stressreaktionen, Aufmerksamkeit, emotionalem und motivationalem Lernen und sozialem Verhalten (LeDoux, 1992; Gallagher, 2000; Yilmazer-Hanke, 2003).

Für die Furchtverarbeitung und die Steuerung emotionalen Verhaltens ist eine funktionelle Einheit drei dieser Kerne von besonderer Bedeutung. Diese besteht aus dem lateralen Kern (LA), dem basolateralen Kern (BLA) und dem zentralen Kern (CeA) (LeDoux, 2000; LeDoux, 2003), wobei der laterale und der basolaterale Kern oftmals zum basolateralen Komplex zusammengefasst werden (Swanson und Petrovich, 1998). Die Kerne des basolateralen Komplexes bestehen überwiegend aus modifizierten, glutamatergen Pyramidenneuronen mit dendritischen Spines und verschiedenen, überwiegend GABAergen, Interneuronentypen, die Ähnlichkeiten mit denen des zerebralen Kortex aufweisen (Braak und Braak, 1983; Swanson und Petrovich, 1998; Kempainen und Pitkanen, 2000; Smith et al., 2000). Die Neuronen des CeA sind ebenfalls mit Spines besetzte Projektionsneuronen, die GABA als Transmitter besitzen. Das Vorkommen von Interneuronen in dem CeA ist noch nicht erwiesen (McDonald, 1992; Swanson und Petrovich, 1998).

### **Der laterale Kern**

Der LA liegt im dorsalen Teil der Amygdala medial der Capsula externa und lateral des CeA und des Seitenventrikels. Ventral wird er vom BLA begrenzt (Pitkanen, 2000). In seinem Aufbau ähnelt der LA stark dem Claustrum, weshalb angenommen wird, dass es sich um eine temporale Ausdehnung von diesem handelt (Swanson und Petrovich, 1998).

Extrinsische Eingänge des LA stammen hauptsächlich aus sensorischen Kortexarealen, aus denen gustatorische, viszerale, somatosensorische, so wie auditive und visuelle Sinnesinformationen somatotopisch organisiert in den LA einlaufen. Diese starken Eingänge aus sensorischen Kortexarealen und die Tatsache, dass der LA kaum Projektionen zum Kortex entsendet, führte zu der Bezeichnung „Haupteingangspforte“ der Amygdala (Pitkanen, 2000). Weitere sehr dichte reziproke Verbindungen bestehen mit der Hippocampusformation, besonders mit dem entorhinalen Kortex und dem Subiculum (Pikkarainen et al., 1999; Pitkanen et al., 2000). Der Thalamus und der Hypothalamus projizieren ebenso wie monoaminerge Hirnstammkerne in den LA, wobei die dopaminergen Afferenzen von der SN und der VTA nur recht schwach sind (Fallon und Ciofi, 1992; Pitkanen, 2000). Zum PFC bestehen ebenfalls reziproke Verbindungen, die aber nicht so ausgeprägt sind, wie die des BLA (McDonald et al., 1996; Pitkanen, 2000).

Intrinsische reziproke Verbindungen innerhalb des Amygdalakomplexes bestehen mit dem basalen, akzessorisch basalen und medialen Kern so wie dem periamygdaloiden

Kortex, wogegen die Projektionen in den CeA nur unidirektional sind. Mit der kontralateralen Amygdala unterhält der LA keine Verbindungen (Pitkanen et al., 1997).

### **Der basolaterale Kern**

Der BLA liegt rostral, ventral des LA, medial der Capsula externa und lateral des CeA. Der BLA lässt sich aufgrund der Zellmorphologie in einen anterioren (BLAa; magnozellularen) und einen posterioren (BLAp; parvozellulären) Teil gliedern (Alheid et al., 1995). Auch der BLA wird aufgrund seiner Zytoarchitektur als eine Ausdehnung des Claustrums gerechnet (Swanson und Petrovich, 1998; Pitkanen, 2000).

Extrinsische Projektionen erreichen den BLA größtenteils aus den gleichen kortikalen Gebieten wie den LA, wobei die Dichte dieser Afferenzen deutlich geringer ist (Pitkanen, 2000). Der mPFC hingegen unterhält starke reziproke Verbindungen mit dem BLA, wobei die in der prälimbischen Region entspringenden Afferenzen stärker sind als diejenigen des infralimbischen und des anterior cingulären Kortex (McDonald, 1998). Die kräftigsten Projektionen des BLA in den mPFC stammen aus dem posterioren Teil des BLA und terminieren im infralimbischen Kortex. Der BLA projiziert ebenfalls in prälimbische und anterior cinguläre Regionen des mPFC (Pitkanen, 2000). Bedeutsam sind die Ausgänge des BLA zum NAc und zum Caudatus-Putamen, die die stärksten der Amygdala in diese Regionen sind. Die Projektionen des BLAp terminieren im Shell und in Teilen des Core des NAc und die Projektionen des BLAa terminieren nur in Teilen des Core (Wright et al., 1996). Auch ist der BLA mittels starker reziproker und topographisch organisierter Projektionen mit dem Thalamus verbunden (Pitkanen, 2000). Diese direkten und indirekten Verbindungen (über striato-pallidale Bahnen und den Thalamus) mit dem PFC werden für eine amygdaläre Rolle bei motivationsorientiertem Verhalten verantwortlich gemacht (Killcross et al., 1997). Weiterhin ist der BLA der Hauptzielort der Amygdala für die Eingänge der Hippocampusformation und er entsendet auch die ausgedehntesten amygdalären Projektionen in diese (Pitkanen, 2000). Kräftige Projektionen entsendet der entorhinale Kortex, wohingegen das Subiculum nur schwach mit dem BLA verbunden ist (Pikkarainen et al., 1999).

Die stärksten intrinsischen Afferenzen entstammt aus dem ipsilateralen LA. Weitere Projektionen laufen aus dem CeA, sowie vom kontralateralen BLA und CeA ein, wobei die meisten Eingänge im posterioren Anteil des BLA terminieren. Die meisten intrinsischen Efferenzen sind zum ipsilateralen LA, anterioren kortikalen und zentralen Kern, ebenso wie zum kontralateralen BLA, CeA und dem Kern des lateralen olfaktorischen Traktes der Amygdala gerichtet, die hauptsächlich dem anterioren Teil entspringen (Pitkanen, 2000).

### **Der zentrale Kern**

Der CeA befindet sich medial des LA und des BLA und lateral der Stria terminalis im dorsomedialen Teil der rostralen Amygdala. Kaudal endet der CeA mit dem Auftauchen des Seitenventrikels (Pitkanen, 2000). Er wird klassischerweise in einen medialen (CeAm) und einen lateralen Anteil (CeAl) unterteilt, die sich bei der Nissl-Färbung gut voneinander abgrenzen lassen, da der mediale Teil größere, stärker heterogene Zellen aufweist, die sich dunkler darstellen (Alheid et al., 1995). Außerdem grenzt sich laterale Teil bei Dopaminfärbungen durch die erheblich höhere Innervationsdichte gut von jedem anderen Kerngebiet der Amygdala ab.

Der CeA erhält wie der LA und der BLA extrinsische Eingänge aus den sensorischen Kortexarealen, der Hippocampusformation, dem PFC und dem Thalamus (Pitkanen, 2000). Diese sind aber zahlenmäßig wesentlich geringer als in die beiden anderen Kerngebiete. Bezeichnend ist, dass der CeA in keines dieser Gebiete zurückprojiziert (Pitkanen et al., 1997). Mit dem Hypothalamus und dem Hirnstamm bestehen allerdings starke reziproke Verbindungen, welche dem CeA eine besondere Rolle bezüglich des Outputs der Amygdala zu endokrinen und vegetativen Zentren zukommen lässt. Er ist somit befähigt, autonome Verhaltensreaktionen auszulösen, und wird auch als Ausgangsinstanz der Amygdala angesehen (Pitkanen et al., 1997; Pitkanen, 2000). Weiterhin besteht eine unidirektionale Projektionsbahn zum NAc (Pitkanen, 2000).

Die Anbindung der Amygdala an den PFC, der reziprok glutamaterg hauptsächlich zum BLA projiziert, ist von entscheidender Bedeutung für die Bildung emotionaler Reaktionen (Bertolucci-D'Angio et al., 1990) und ihre Kontrolle (Morgan et al., 1993; Rosenkranz und Grace, 2001). Ist diese nicht vorhanden, ist der Organismus nicht mehr in der Lage, adäquat auf ungefährliche Reize zu reagieren (Morgan et al., 1993; Zahrt et al., 1997).

### **Dopaminerge Afferenzen**

Die Amygdala ist eines der wesentlichen Zielgebiete der mesolimbischen Dopaminbahn, die ihren Ursprung in der VTA und der SN hat. Die aufsteigenden Projektionen verlaufen über das ventrale Vorderhirnbündel und die amygdalofugale Bahn zur Amygdala (Fallon und Ciofi, 1992). Der laterale Teil des CeA erhält die dichteste Dopamininnervation. Der mediale Anteil des CeA und der BLA werden moderat innerviert, wobei der posteriore Anteil dichtere Dopaminterminationen erhält als der anteriore Anteil. Die wenigsten dopaminergen Projektionen erreichen den lateralen Kern (Fallon und Ciofi, 1992; Asan, 1998; Brinley-Reed und McDonald, 1999). Wie mittels ultrastruktureller Untersuchungen in dem BLA herausgefunden wurde, befinden sich die dopaminergen Terminalien

hauptsächlich an den Schäften von Dendriten und Spines und zu einem kleineren Teil auch an den Somata und proximalen Dendriten, an denen sie ein korbartiges Geflecht ausbilden (Fallon und Ciofi, 1992; Asan, 1997; Brinley-Reed und McDonald, 1999). Bei diesen dicht innervierten Neuronen handelt es sich um GABAerge Interneuronen, die ihrerseits inhibitorisch die Pyramidenzellen innervieren. So ist davon auszugehen, dass Dopamin über diese Interneuronen eine modulierende Funktion in der Amygdala übernimmt (Brinley-Reed und McDonald, 1999; Rosenkranz und Grace, 2001).

## 1.7 Ziele der Arbeit

Die vorliegende Arbeit sollte klären, ob Methylphenidat einen morphogenen Einfluss auf das ausreifende dopaminerge Transmittersystem ausübt, indem die Auswirkungen einer chronischen Methylphenidatvergabe während der Adoleszenz auf die Funktionsanatomie des mesolimbokortikalen Systems von *Meriones unguiculatus* untersucht wurden. Dazu wurden vier Ansätze formuliert:

1. Es wurde eine klinisch relevante Dosierung von 5 mg/kg/Tag in der klinischen Darreichungsform (oral) chronisch (über die Zeit von vier Wochen) appliziert.
2. Es wurde eine klinisch relevante (5 mg/kg/Tag) und eine überhohe Dosierung (50 mg/kg/Tag) intraperitoneal (i.p.) chronisch (über die Zeit von vier Wochen) appliziert.
3. Es wurde jeweils die Hälfte der Tiere mit einer einmaligen postnatalen Methamphetaminapplikation vorbehandelt; damit war eine erheblich suppressive Dopaminreifung in den PFC vorprogrammiert.
4. Die Oralstudie beinhaltete unbehandelte Kontrolltiere, um einen möglichen Effekt des täglichen Handlings bestimmen zu können.

Im Jungerwachsenenalter wurden die dopaminergen Fasern immunhistochemisch in den Arealen des limbo-präfrontalen Systems (PFC, ventrales Striatum und Amygdala) dargestellt und quantitativ mit Hilfe der Bildanalyse am Mikroskop bestimmt.

Folgenden Fragestellungen wurde dabei nachgegangen:

1. Inwieweit wird die Reifung der dopaminergen Innervation bei Tieren ohne und mit einer frühkindlichen Traumatisierung (Methamphetamin-Intoxikation) nach oraler Applikation einer klinisch relevanten Methylphenidatdosis beeinflusst?

2. Hat das tägliche Handling der Tiere einen Einfluss auf die dopaminerge Faserdichte?
3. Inwieweit wird die Reifung der dopaminergen Innervation bei Tieren ohne und mit einer frühkindlichen Traumatisierung nach i.p.-Applikation einer klinisch relevanten und einer überhöhten Methylphenidatdosis beeinflusst?
4. Verändert sich die Wirkung von Methylphenidat bei unterschiedlicher Applikationsform (oral versus i.p.)?
5. Wirkt die unterschiedliche Methylphenidatdosierung (5 versus 50 mg/kg/Tag) tendenziell gleich auf das reifende dopaminerge Fasersystem?

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Versuchstiere: Aufzuchtbedingungen

Für alle Versuchsreihen wurden ausschließlich männliche Wüstenrennmäuse (*Meriones unguiculatus*) verwendet. Die Oralstudie umfasste insgesamt 42 und die I.p.-Studie 63 Tiere. Sie erhielten Futter und Wasser *ad libitum* und wuchsen unter den natürlichen Tag-/Nachtbedingungen auf.

Alle Versuchstiere waren den gleichen Haltungsbedingungen ausgesetzt. Die Tiere wurden in Standardmakrolonkäfigen (Typ IV, Ebesco, Castrop-Rauxel) geboren, blieben bis zur Entwöhnung am Tag 30 im Familienverband und wurden dann einzeln in kleinere Käfige (Typ III, Ebesco, Castrop-Rauxel) mit einer Bodenfläche von 20 x 30 cm umgesetzt und verblieben dort bis zur Perfusion am Tag 90. Die Käfige waren mit Kleintierstreu ausgelegt und boten keinerlei Möglichkeiten zum Verstecken oder Spielen. Diese Art der isolierten und reizarmen Haltung bezeichnet man als restriktiv und sozial depriviert (Winterfeld, 1998).

### 2.2 Pharmakologische Behandlungen

#### 2.2.1 Orale Vergabe von Methylphenidat (Oralstudie)

Die Hälfte der Tiere, außer einer Gruppe die ohne jegliche Behandlung blieb, bekam jeweils am postnatalen Tag 14 eine einmalige Injektion von 50 mg/kg Methamphetamin oder 0,9%iger Kochsalzlösung intraperitoneal (i.p.).

Am Tag 30 wurden die Tiere beider Vorbehandlungen in zwei Gruppen aufgeteilt, wobei eine Gruppe über einen Zeitraum von 30 Tagen eine tägliche Dosis von 5 mg/kg Methylphenidat (MPH) und die zweite Gruppe Leitungswasser (H<sub>2</sub>O) oral appliziert bekommen hat (Tab. 2.1).

Bezeichnung	Unbehandelte Kontrollen	Saline-H <sub>2</sub> O	Saline-MPH	MA-H <sub>2</sub> O	MA-MPH
Behandlung Tag 14	-	0,9%ige Kochsalzlösung	0,9%ige Kochsalzlösung	50 mg/kg Methamphetamin	50 mg/kg Methamphetamin
Behandlung Tag 30-60	-	Leitungswasser (H <sub>2</sub> O)	5 mg/kg Methylphenidat	Leitungswasser (H <sub>2</sub> O)	5 mg/kg Methylphenidat

Tab. 2.1: Einteilung der Tiere in die Versuchsgruppen (Oralstudie)

Für die pharmakologische Intervention mit Methylphenidat (Ritalin® IR, Novartis Pharma GmbH, Nürnberg) wurde täglich eine 10 mg Tablette des Medikaments in 800 µl kaltem Leitungswasser in einem Eppendorf-Gefäß komplett gelöst. Nach kurzer Zeit setzen sich die nicht wasserlöslichen Bindemittel, wie z.B. Talkum, am Boden des Gefäßes ab. Da der Wirkstoff Methylphenidat als sehr gut wasserlösliches Hydrochlorid in der Tablette vorliegt, wurde für die orale Applikation nur Flüssigkeit aus dem wässrigen Überstand entnommen.

Die Applikation erfolgte vom postnatalen Tag 30 bis 60 immer vormittags. Um eine möglichst exakte Dosierung zu erreichen, wurden die Tiere zweimal wöchentlich vor der Applikation gewogen.

Den Kontrolltieren wurde eine konstante Menge von 20 µl kaltem Leitungswasser verabreicht. Auch sie wurden zweimal wöchentlich vor der Applikation gewogen.

Für die Behandlung mit MPH und Wasser wurden die Tiere aus dem Käfig genommen und die Lösungen mit einer Pipette oral verabreicht. Die Aufnahme der Lösungen wurde kontrolliert.

## 2.2.2 Intraperitoneale (i.p.) Vergabe von Methylphenidat (I.p.-Studie)

Jeweils die Hälfte der Tiere bekam am postnatalen Tag 14 eine einmalige Injektion von 50 mg/kg Methamphetamin oder 0,9%iger Kochsalzlösung intraperitoneal.

Am Tag 30 wurden die Tiere beider Vorbehandlungen in drei Gruppen aufgeteilt, wodurch insgesamt sechs Gruppen zustande kamen (Tab. 2.2). Jeweils eine der drei Gruppen erhielt eine tägliche Dosis von 5 mg/kg, die zweite Gruppe 50 mg/kg Methylphenidat und die dritte Gruppe 0,9%ige Kochsalzlösung intraperitoneal appliziert.

Bezeichnung	Saline-Saline	Saline-MPH 5	Saline-MPH 50	MA-Saline	MA-MPH 5	MA-MPH 50
Behandlung Tag 14	0,9%ige Kochsalzlösung	0,9%ige Kochsalzlösung	0,9%ige Kochsalzlösung	50 mg/kg Methamphetamin	50 mg/kg Methamphetamin	50 mg/kg Methamphetamin
Behandlung Tag 30-60	0,9%ige Kochsalzlösung	5 mg/kg Methylphenidat	50 mg/kg Methylphenidat	0,9%ige Kochsalzlösung	5 mg/kg Methylphenidat	50 mg/kg Methylphenidat

**Tab. 2.2: Einteilung der Tiere in die Versuchsgruppen (I.p.-Studie)**

Für den Ansatz der Lösung für die i.p.-Vergabe von Methylphenidat wurde die Ritalin® IR-Tablette in physiologischer 0,9%iger Kochsalzlösung (Saline) gelöst. Ansonsten wurde wie oben beschrieben verfahren.

Die Kontrolltiere erhielten eine konstante Menge von 200 µl Saline.

## **2.3 Versuchsdurchführung**

### **2.3.1 Perfusion**

Drei Stunden vor Beginn der Perfusion wurde den Versuchstieren Haloperidol (1ml/kg, i.p.) injiziert, um eine vorzeitige, durch Stress hervorgerufene, Entleerung der dopaminergen Speicher zu unterdrücken.

Das Tier wurde zunächst mit einer intraperitonealen Injektion von 1,7 g/kg Chloralhydrat in physiologischer Kochsalzlösung betäubt. Nach kurzer Wartezeit wurden die Extremitäten mit Nadeln fixiert, die Bauchhaut transversal durchtrennt und der Thorax geöffnet. Die Perfusionskanüle (Durchmesser 0,7mm) wurde in den linken Herzventrikel eingeführt und die rechte Vorkammer / Vena cava durch einen Schnitt, zwecks Abfluss der Perfusionslösungen, geöffnet. Der Blutaustausch erfolgte mittels einer Schlauchpumpe (Desaga, Heidelberg) bei einem Druck von 70 mm Hg, wobei erst ein Vorspülpuffer (pH 6,2: 0,2 mol Cacodylat, 1% Natriumdisulfit in A. dest.) gefolgt von der Fixierlösung (pH 7,5: 0,2 mol Cacodylat, 1% Natriumdisulfit, 5% Glutardialdehyd in A. dest.) durch das Gefäßsystem gepumpt wurde.

Nach Beendigung der Perfusion wurde das Tier dekapitiert und das fixierte Gehirn herauspräpariert.

### **2.3.2 Immunhistochemische Aufarbeitung der Gehirne**

#### **Anfertigung der Schnitte**

##### **Oralstudie**

Das Gehirn wurde nach der Präparation zuerst medial geteilt. Die für diese Untersuchung relevante rechte Hemisphäre wurde auf die mediale Schnittkante gelegt und der olfaktorische Bulb entfernt. Anschließend wurde der rostrale Teil kaudal vom Nucleus accumbens rechtwinklig zur medialen Kante abgetrennt und mit der kaudalen Fläche mittels Sekundenkleber auf einer Metallplatte fixiert, die ihrerseits in der Auffangschale

des Vibratoms (Leica VT 1000S, Nussloch, Germany) befestigt wurde. Damit das Präparat während des Schneidens nicht trockenfiel war die Auffangschale mit 4°C kaltem Waschpuffer (pH 7,5: 0,05 mol Trispuffer, 0,9 % NaCl, 1% Natriummetabisulfit in A. dest.) gefüllt. Von den erstellten Frontalschnitten mit einer Dicke von 50µm wurde jeder dritte in eisgekühltem Waschpuffer aufgefangen. Von den nächstfolgenden Schnitten wurde ebenfalls jeder dritte für die Färbung von GABA aufgefangen. Die Auswertung dieser Präparate im Rahmen von Folgestudien findet zurzeit statt.

Vom kaudalen Teil wurde dann das Cerebellum und die Medulla oblongata entfernt, um es plan auf der dorsalen Cortexseite auf der Metallplatte zu befestigen. Die dann angefertigten, ebenfalls 50µm dicken, Horizontalschnitte wurden ebenfalls in Waschpuffer aufgefangen.

#### I.p.-Studie

Für diese Untersuchung wurde zunächst genau wie bei der Oralstudie verfahren, nur wurden hier vom rostralen wie vom kaudalen Teil der rechten Hemisphäre 50 µm Frontalschnitte angefertigt.

#### **Immunhisologische Färbung**

Die Schnitte wurden nach dem Schneiden erst dreimal 10 Minuten in gekühltem Waschpuffer gewaschen und anschließend für 30 Minuten in eine Präinkubationslösung mit NGS (normal goat serum, Sigma, Deishofen; Verdünnung 1:10 in Waschpuffer mit 0,3 % Triton X100 (Sigma)) überführt. Das NGS dient der Absättigung der unspezifischen Bindungsstellen und die Zugabe des Triton X100 ist nötig, um die Lipiddoppelschicht für die einzubringenden Substanzen durchgängig zu machen.

Anschließend wurden die Schnitte direkt in das 1. Antiserum (polyclonal rabbit-anti-dopamine, Diasorin Stillwater, USA; Verdünnung 1:600 mit Waschpuffer und 0,3% Triton X100 und 1% NGS) überführt und für 40 Stunden bei 4°C inkubiert.

Nach dreimaligem Waschen für je 10 Minuten in Waschpuffer erfolgte die Inkubation im biotinylierten 2. Antikörper (goat-anti-rabbit, Sigma; Verdünnung 1:20 in TBS (0,05 mol Trispuffer, 0,9% NaCl, pH 7,6) mit 1% NGS) bei Raumtemperatur. Nach drei weiteren je 10minütigen Waschgängen werden die Schnitte in einer Avidin-Peroxidase-Lösung (Sigma; Verdünnung 1:20 in TBS mit 1% NGS) für 30 Minuten ebenfalls bei Raumtemperatur inkubiert.

Die Färbung erfolgte mittels einer Lösung von 0,05% 3,3'-Diaminobenzidin (DAB, Sigma) in TBS mit 1% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Dabei spaltet die Peroxidase das in der Lösung enthaltene

Wasserstoffperoxid ( $H_2O_2$ ), wodurch Sauerstoffradikale freigesetzt werden. Diese oxidieren das DAB und führen so zu einer Ausfällung der Farbstoffkomplexe genau dort, wo Dopamin in den Zellkörpern und -fortsätzen eingelagert ist. Anschließend wurden die Schnitte nochmals viermal 10 Minuten in TBS gewaschen, dann in rostrocaudaler, bzw. dorsoventraler Reihenfolge auf gelatinebeschichtete Objektträger aufgezogen und bei  $30^\circ C$  über Nacht getrocknet.

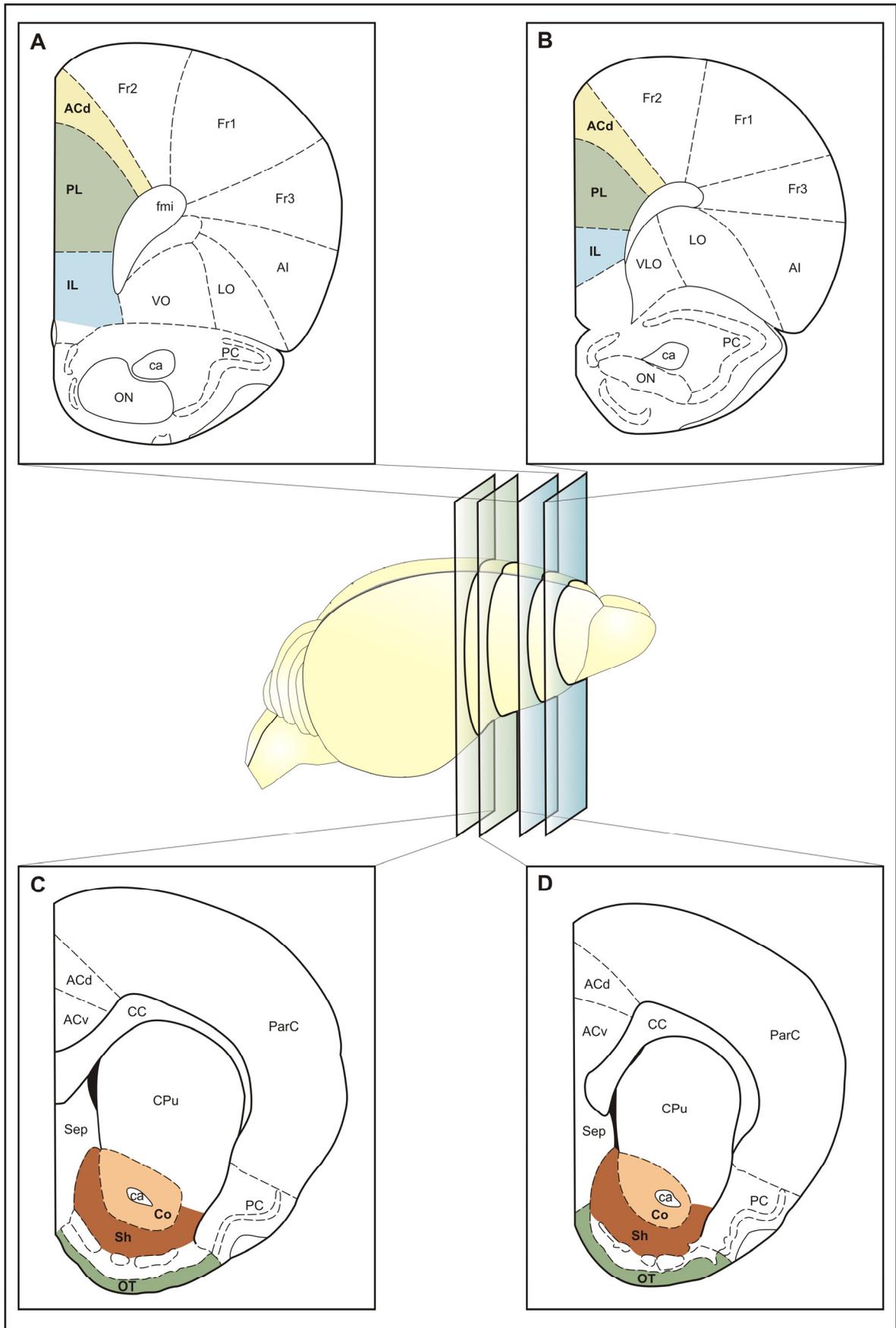
Die Entwässerung erfolgte am nächsten Tag mit Hilfe einer Alkoholreihe mit steigenden Ethanolkonzentrationen von 40%, 70%, 80%, 90%, 96% und 100% für je zweimal 10 Minuten, gefolgt von dreimal 10 Minuten in reinem Xylol. Danach wurden die Präparate in DePeX (Serva, Heidelberg) eingedeckelt.

## 2.4 Untersuchte Bereiche

### Präfrontaler Kortex

Der präfrontale Kortex (PFC) stand nur bei der Oralstudie für die Auswertung zur Verfügung. Für die Datenauswertung wurden nur die präkallosalen Anteile des medialen PFC berücksichtigt, wobei fünf aufeinander folgende Schnitte verwendet wurden. Die Tiefe des Sulcus rhinalis diente hier als anatomische Markierung für die Auswahl des vordersten Schnittes. In der rostrocaudalen Schnittfolge reicht der Sulcus rhinalis in rostralen Schnitten fast bis zur medialen Kante und wird nach caudal immer flacher. Der Schnitt bei dem der Sulcus rhinalis medial bis zur Höhe der Commissura anterior reicht wurde als rostralster Schnitt für die Auswertung definiert. Im caudalsten Schnitt wurde dann der Forceps minor des Corpus callosum als helle Faserstruktur sichtbar, die mit der ebenfalls hellen, faserreichen Commissura anterior ein imaginäres Ausrufungszeichen bildet (Abb. 2.1).

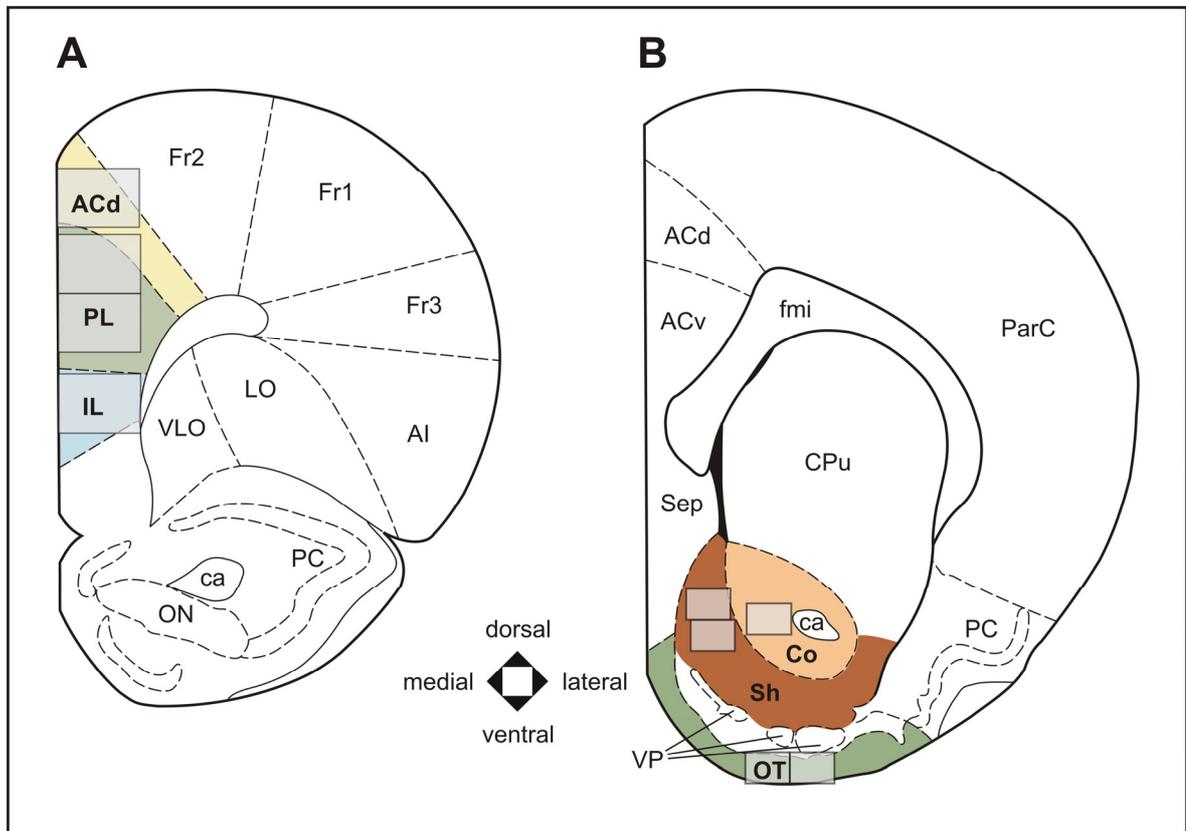
Es wurden bei 250-facher Vergrößerung pro Schnitt vier Bilder aufgenommen, wobei sich eins in der dorsal anterior cingulären (ACd), zwei in der prälimbischen (PL) und eins in der infralimbischen (IL) Region des mPFC befand (Abb. 2.2). Innerhalb dieser Bilder wurde zwischen Lamina I und III und in den Regionen PL und IL auch Lamina V unterschieden und separat ausgewertet.



**Abb. 2.1: Ausgewertete Schnittebenen des präfrontalen Kortex und des ventralen Striatums**  
 Repräsentative Schnitte des ausgewerteten Bereichs des mPFC (A und B) und des ventralen Striatums (C und D). Die ausgewerteten Bereiche sind farblich hinterlegt. Abkürzungen siehe Abb. 2.2.

## Ventrales Striatum

Die Schnitte wurden so ausgewählt, dass der größte Teil der rostrocaudalen Ausdehnung des Nucleus accumbens (NAc), in dem die Subareale Core und Shell klar voneinander unterschieden werden können, in die Auswertung einbezogen wurde. Dabei fand der sogenannte rostrale Pol, der Teil des NAc in dem die Subareale verschachtelt auftreten, keine Berücksichtigung. In der rostrocaudalen Schnittfolge verlagert sich die Commissura anterior innerhalb des Cores von lateral nach medial und befindet sich rostral vor dem Durchbruch zur gegenüberliegenden Hemisphäre lateral des Seitenventrikels. Der rostralste Teil der auszuwertenden Schnittserie war definiert durch die Ablösung der Commissura anterior vom lateralen Rand des Cores (Abb. 2.1). Von dieser Ebene wurden fünf nach caudal aufeinander folgende Schnitte ausgewertet. Der Olfaktorische Tuberkel



**Abb. 2.2: Lage der Messfenster im präfrontalen Kortex und im ventralen Striatum**

Die eingesetzten Rechtecke umreißen die für die Quantifizierung aufgenommenen Bilder an je einem repräsentativen Schnitt des mPFC (A) und des ventralen Striatums (B) (verändert nach Figs. 7 und 11 aus Paxinos und Watson, 1986).

ACd	Cingulärer Kortex, dorsal	IL	Infralimbischer Kortex
ACv	Cingulärer Kortex, ventral	LO	Lateral orbitaler Kortex
AI	Agranulärer insulärer Kortex	ON	Nucleus olfactorius
ca	Commissura anterior	OT	Olfaktorischer Tuberkel
Co	NAc Core	ParC	Parietaler Kortex
Cpu	Caudatus/Putamen	PC	Piriformer Kortex
fmi	Forceps minor corpus callosum	PL	Prälimbischer Kortex
FR1	Frontaler Kortex Area 1	Sep	Septum
FR2	Frontaler Kortex Area 2	Sh	NAc Shell
FR3	Frontaler Kortex Area 3	VP	Ventrales Pallidum

(OT) wurde an denselben Schnitten wie der NAc, an der maximalen lateralen Ausdehnung des jeweiligen Schnittes, ausgewertet.

An jedem der Schnitte wurden zwei Bilder bei 400-facher Vergrößerung im medialen Shell, eins im Core und zwei im Olfaktorischen Tuberkel aufgenommen (Abb. 2.2).

## **Amygdala**

### Oralstudie

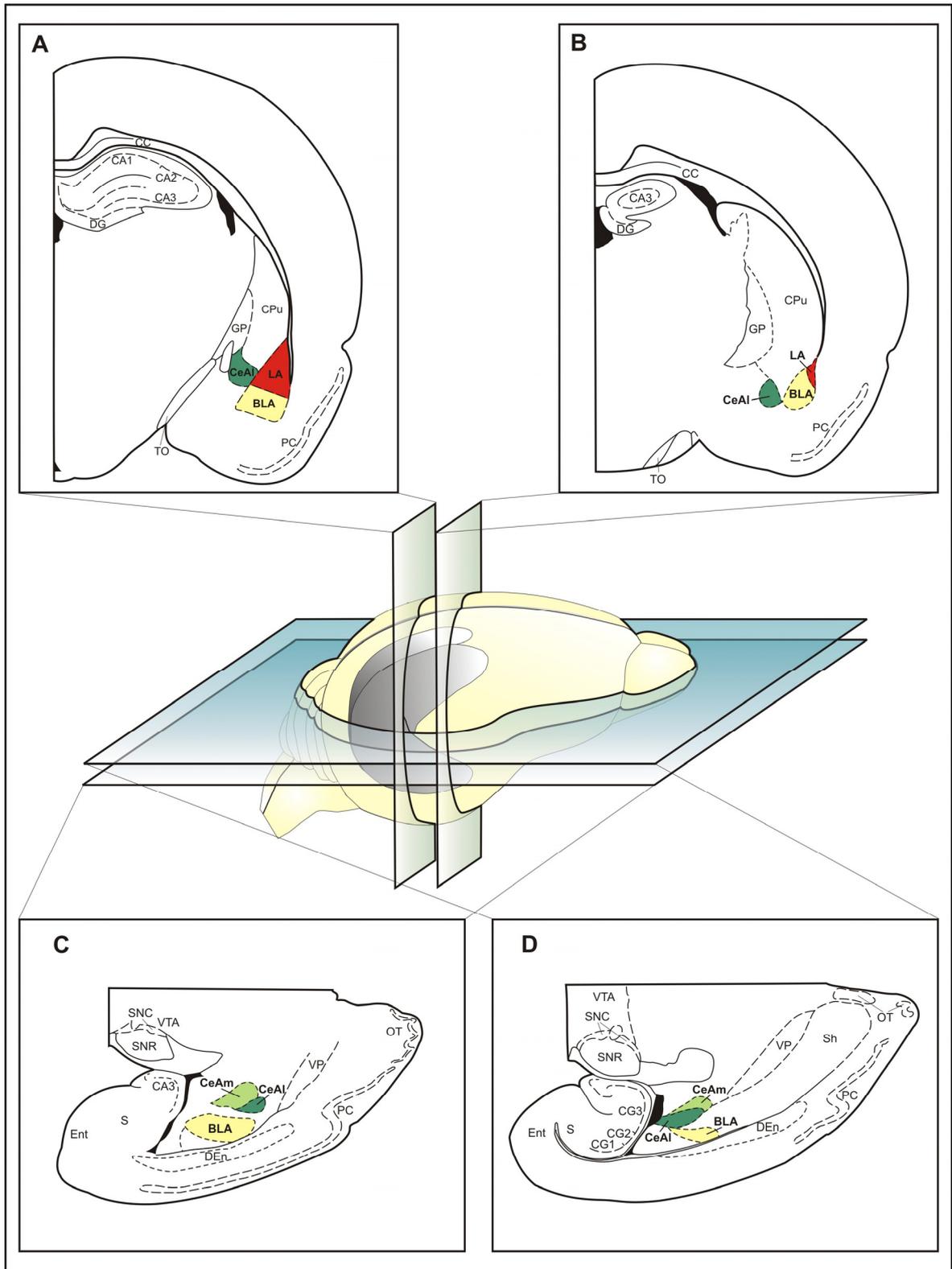
Die horizontale Schnittserie der Amygdala umfasste die gesamte ventrodorsale Entfaltung des basolateralen (BLA) und des zentralen Kerns (CeA). Als anatomischer Markierungspunkt für den ventralsten Schnitt diente das ventrale Ende des Hippocampus. Von diesem Schnitt wurden sechs aufeinander folgende Schnitte für die Auswertung verwendet (Abb. 2.3).

Der basolaterale Kern wurde mit einem Bild bei 200-facher und der zentrale Kern mit drei Bildern bei 400-facher Vergrößerung erfasst, wobei zwei Bilder im lateralen und ein Bild im medialen Teil des zentralen Kerns aufgenommen wurden (Abb. 2.4).

### I.p.-Studie

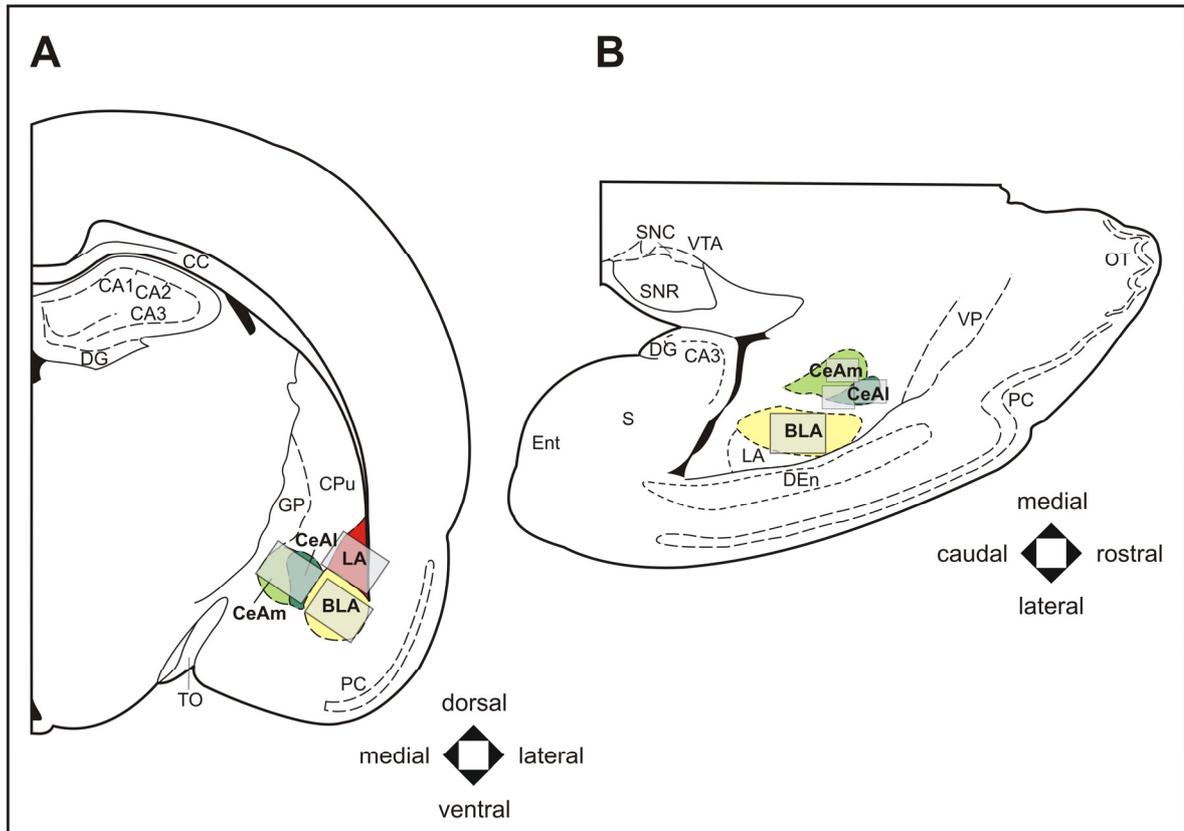
Die für die Auswertung ausgewählte Schnittserie erfasste die gesamte rostrocaudale Ausdehnung der Amygdala, in der der laterale (LA), der basolaterale (BLA) und der zentrale Kern (CeA) zu detektieren waren. Das Hineinziehen des optischen Traktes in das Vorderhirn von ventral und die deutliche Abgrenzbarkeit des zentralen Kerns vom dorsalen Striatum kennzeichneten den rostralsten Schnitt. Auf dem caudalsten Schnitt der Serie verdrängt der optische Trakt den medialen Teil des zentralen Kerns (Abb. 2.3). Somit ergaben sich für den zentralen und den basolateralen Kern jeweils 5-6 Schnitte, sowie etwa 4 Schnitte für den lateralen Kern.

In jedem der drei Subareale der Amygdala wurde jeweils ein Bild bei 200-facher Vergrößerung aufgenommen, wobei der basolaterale Kern in seiner größten ventrodorsalen Ausdehnung (2. und 3. Schnitt, selten 1. Schnitt) zum Teil zwei übereinander liegende Bildaufnahmen ermöglichte (Abb. 2.4).



**Abb. 2.3: Ausgewertete Schnittebenen der Amygdala**

Repräsentative Schnitte des ausgewerteten Bereichs der Amygdala in der I.p.-Studie (A und B) und in der Oralstudie (C und D). Die ausgewerteten Bereiche sind farblich hinterlegt. Abkürzungen siehe Abb. 2.4.



**Abb. 2.4: Lage der Messfenster in der Amygdala**

Die eingesetzten Rechtecke umreißen die für die Quantifizierung aufgenommenen Bilder an je einem repräsentativen Schnitt der Amygdala der I.p.-Studie (A) und der Oralstudie (B) (verändert nach Figs. 28 und 92 aus Paxinos und Watson, 1986).

BLA	Basolateraler Kern der Amygdala	GP	Globus pallidus
CA1	CA1-Region des Hippokampus	LA	Lateraler Kern der Amygdala
CA2	CA2-Region des Hippokampus	OT	Olfaktorischer Tuberkel
CA3	CA3-Region des Hippokampus	PC	Piriformer Kortex
CC	Corpus callosum	S	Subiculum
CeAl	Zentraler Kern der Amygdala, lateraler Anteil	SNC	Substantia nigra, Pars compacta
CeAm	Zentraler Kern der Amygdala, medialer Anteil	SNR	Substantia nigra, Pars reticulata
Cpu	Caudatus/Putamen	TO	Olfaktorischer Trakt
DEn	Dorsaler endopiriformer Nucleus	VP	Ventrales Pallidum
DG	Gyrus dentatus	VTA	Ventrale tegmentale Area
Ent	Entorhinaler Kortex		

## 2.5 Versuchsauswertung

### 2.5.1 Computerbasierte Bildanalyse

Die Bildaufnahme für die quantitative Analyse erfolgte an zwei Durchlichtmikroskopen, die mit unterschiedlichen Kamerasystemen ausgestattet waren. Die Bilder des PFC, des ventralen Striatums und des zentralen Kerns der Amygdala (Oralstudie) entstanden am Polyvar (Reichert-Jung, Wien) und wurden von einer Farbvideokamera (ProgRes 3008, Jenoptik, Jena; Bildgröße 2048x1450 Pixel) an das Bildanalyseprogramm KS300 (Carl

Zeiss Vision, Hallbergmoos) übertragen, wogegen die Bilder des lateralen, basolateralen und zentralen (i.p.-Studie) Kerns der Amygdala am Olympus BX61 (Olympus Optical Co. LTD) aufgenommen und ebenfalls von einer Farbvideokamera (Color View, Soft Imaging GmbH, Münster; Bildgröße 2080x1544 Pixel) erfasst und an das Bildanalyseprogramm *analySIS* (Soft Imaging GmbH, Münster) übergeben wurden.

Die Bildaufnahme am Olympus BX61-Mikroskop erfolgte mit Hilfe der nur von diesem Gerät und der zugehörigen Software (*analySIS*; Soft Imaging GmbH) unterstützten so genannten *extended focal imaging*-(EFI)-Funktion. Diese ermöglichte Aufnahmen von unterschiedlichen Fokusebenen eines Präparates zu machen, dessen jeweils schärfste Anteile zu einem endgültigen Bild verrechnet wurden. Für die vorliegende Arbeit wurden immer nur zwei Schärfenebenen, die oberste (caudal) und die unterste (rostral) aufgenommen. Diese zwei gefärbten Bereiche ergaben sich bei den 50µm dicken Schnitten aus der Penetrationstiefe des Antikörpers von ca. 10µm an den beiden Schnittflächen. Das daraus resultierende Farbbild wurde anschließend in ein Schwarz-Weiß-Bild konvertiert und der Kontrast maximiert. Beim Vibratomschneiden eventuell entstandene gleichmäßige so genannte „shatter“ wurden dann mit Hilfe der Fast-Furier-Transformation-(FFT)-Filterung herausgerechnet, so dass ein gleichmäßiger Hintergrund entstand, ohne die gefärbten Faseranteile zu verändern. Die so genannten „shatter“ sind regelmäßige feinste Oberflächenunterschiede des Gewebes, die von der schwingenden Klinge des Vibratoms verursacht werden und die sich nach der immunhistochemischen Färbung als Hell-Dunkel-Unterschiede der Hintergrundfärbung darstellen. Nach diesen Bildbearbeitungsschritten wurden die Bilder für die eigentliche Faserdetektion mit Hilfe der Bildanalysesoftware KS300 (Carl Zeiss Vision) weiter bearbeitet.

Die Bildaufnahmen, die am Polyvar (Reichert-Jung) mit dem Bildanalyseprogramm KS300 durchgeführt wurden, berücksichtigten nur die untere Schärfenebene der jeweiligen Präparate, die sich durch wenig „shatter“ auszeichnete. Die aufgenommenen Farbbilder wurden anschließend ebenfalls in Schwarz-Weiß-Bilder konvertiert und ebenfalls der Kontrast maximiert.

Die weitere Bildbearbeitung, sowie die eigentliche Faserdetektion wurde nun einheitlich für alle Bilder mit der Bildanalysesoftware KS300 durchgeführt. Dabei erfolgte zunächst eine *Shading-Korrektur* zur Normierung der Ausleuchtung des Aufnahmebereichs im Mikroskop und der Hintergrundfärbung des Präparats. Das dafür notwendige unscharfe Referenzbild wurde durch ein Lowpassfilter jeweils aus dem aufgenommenen Bild errechnet. Durch die Bildkorrektur wurde der Kontrast so beeinflusst, dass kleine dunkle Strukturen deutlicher gegenüber dem Hintergrund hervortraten. Anschließend wurden die gefärbten Fasern mittels der *Valleys-Funktion* erfasst, der eine Kombination aus Gauss-

Filter und Gierig-Operator darstellt. Diese Funktion detektiert schmale linienförmige Bereiche mit dunklen Grauwerten vor hellem Hintergrund. Die Einstellung des Grenzwerts für diesen lokalen Grauwertunterschied ermöglicht die Anpassung dieser Funktion an die jeweilige Färbung und das zu untersuchende Hirngewebe. Mit der Funktion *Region Growing* wurden Blutgefäße und Risse in den Schnitten markiert und von der Messfläche subtrahiert. Als letzter Schritt wurde der prozentuale Flächenanteil der Fasern gegen die Messfläche errechnet:

$$\text{Flächenanteil}[\%] = \frac{\text{Faserfläche} \times 100}{\text{Messfläche}}$$

Die so erhaltenen Werte wurden in eine Datenbank geschrieben und gleichzeitig in eine Excel-Datei (Excel 2000, Microsoft) konvertiert, um sie anschließend statistisch auswerten zu können.

## 2.5.2 Statistik

Für den mPFC, das ventrale Striatum und die Amygdala (Oralstudie) wurden die arithmetischen Mittelwerte über die Messwerte der verschiedenen Messfenster in den Subarealen innerhalb eines Schnittes gebildet. Dann wurden in allen ausgewerteten Hirnregionen die arithmetischen Mittelwerte über die rostrocaudale, bzw. die dorsoventrale (für die Amygdala der Oralstudie) Schnittserie gebildet, so dass für jede Subregion und jede Lamina des PFC (Oralstudie) ein Wert und für den NAc Shell und Core, OT, LA (I.p.-Studie), BLA, mediale und laterale CeA ebenfalls je ein Messwert für jedes Tier in die statistische Berechnung einging. Auf Grund von Unwägbarkeiten der immunhistochemischen Färbung konnten nicht bei jedem Tier alle Hirngebiete gemessen werden, so dass die Stichprobengröße leicht variiert. Insgesamt wurden für die vorliegende Arbeit etwa 1100 Schnitte berücksichtigt.

Zunächst wurden die Datensätze mittels des Kolmogorov-Smirnov-Tests auf Normalverteilung getestet. Die statistischen Vergleiche wurden mit Hilfe der Varianzanalyse (ANOVA) mit Messwiederholung über die Subregionen der Gebiete durchgeführt. Die unterschiedlichen Behandlungen am Tag 14 (Saline/MA) und Tag 30-60 (Oralstudie: H<sub>2</sub>O/MPH und I.p.-Studie: Saline/MPH 5/MPH 50) waren als Behandlungsfaktoren definiert. Die statistischen Unterschiede der verschiedenen Gruppen wurden dann mit Hilfe der Kontrastanalyse berechnet. Für die Oralstudie wurden zusätzlich die Unterschiede der unbehandelten Kontrollgruppe zu den behandelten Gruppen mittels F- und t-Test berechnet.

Alle Berechnungen erfolgten bei zweiseitiger Fragestellung mit dem Programm Statistica 6 (StatSoft, Tulsa, USA). In den Abbildungen sind die Daten als Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler dargestellt.

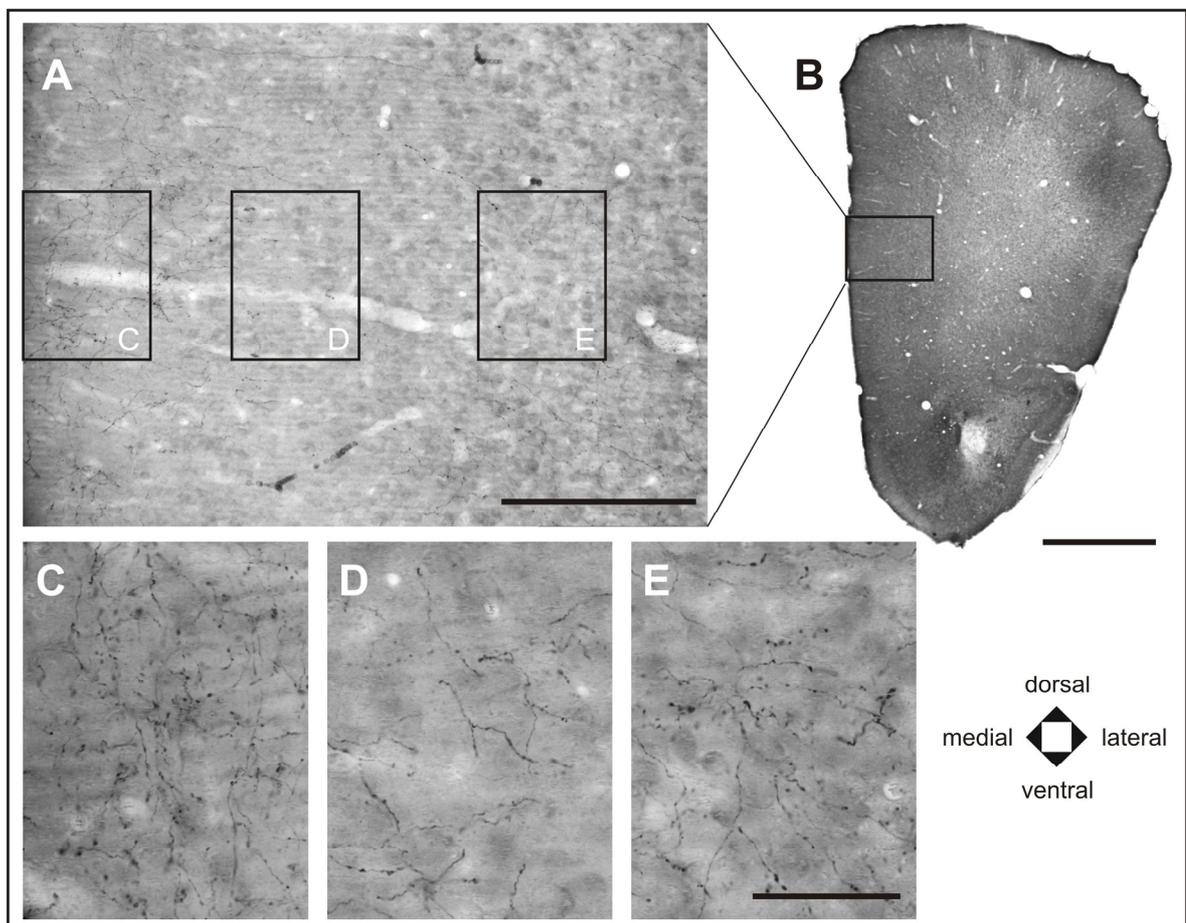
Die Signifikanzniveaus waren wie folgt definiert:

$p > 0,05$	nicht signifikant	(n.s.)
$p < 0,05$	signifikant	(*)
$p < 0,01$	hoch signifikant	(**)
$p < 0,001$	höchst signifikant	(***)

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Qualitative Ergebnisse

Die qualitative Ergebnisdarstellung für die Illustration des generellen Verteilungsmusters dopaminerger Fasern in den drei ausgewerteten Gebieten (Präfrontaler Kortex, Nucleus accumbens und Amygdala) erfolgte anhand der behandelten Kontrollgruppe (Saline-H<sub>2</sub>O, bzw. Saline-Saline). Die immunhistochemische Darstellung von dopaminhaltigen Fasern im medialen präfrontalen Kortex (mPFC) ist in Abb. 3.1 beispielhaft gezeigt und weist bei *Meriones unguiculatus* die höchste Innervationsdichte in Lamina I und II sowie in der



**Abb. 3.1: Die dopaminerge Innervation des medialen präfrontalen Kortex.**

(A) Übersicht der Laminae des prälimbischen Kortex in der Dopaminfärbung.

(B) Übersichtsaufnahme im Bereich des präfrontalen Kortex

(C) Detailaufnahme der Lamina I

(D) Detailaufnahme der Lamina III

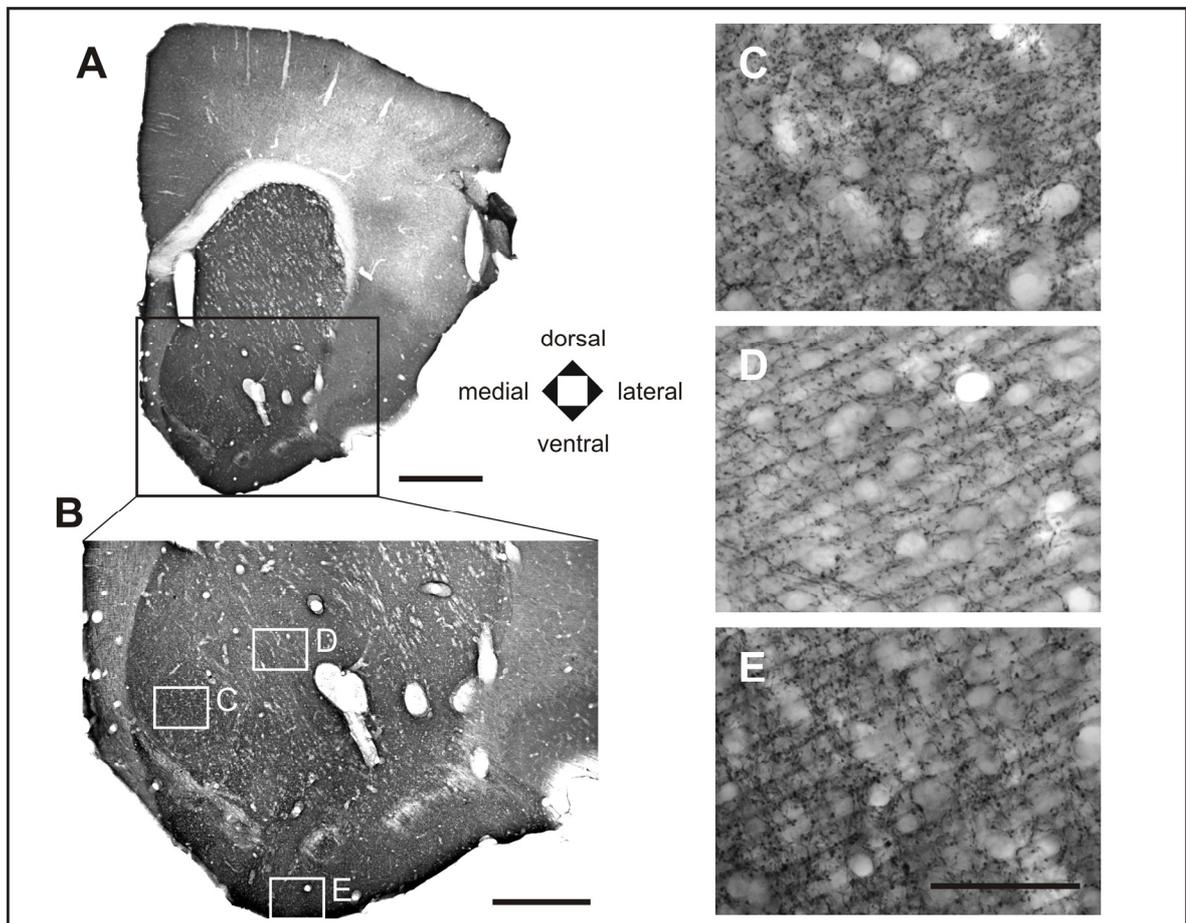
(E) Detailaufnahme der Lamina V

Balken = 1000µm (B), 200µm (A), 50µm (C, D, E)

Lamina VI auf. Diese Faserverteilung stimmt mit dem an Ratten beschriebenen Innervationsmuster überein (Descarries et al., 1987).

Auch die Faserdarstellung im Nucleus accumbens (NAc), die qualitative Unterschiede der Innervation von Core und Shell zeigt (Abb. 3.2), entspricht der in der Literatur für Ratten beschriebenen Verteilung (Voorn et al., 1986). Die dopaminergen Fasern des Core erscheinen glatt und wenig verzweigt, wogegen die des Shell viele Verzweigungen und Varikositäten aufweisen und die immunonegativen Somata geflechtartig umgeben.

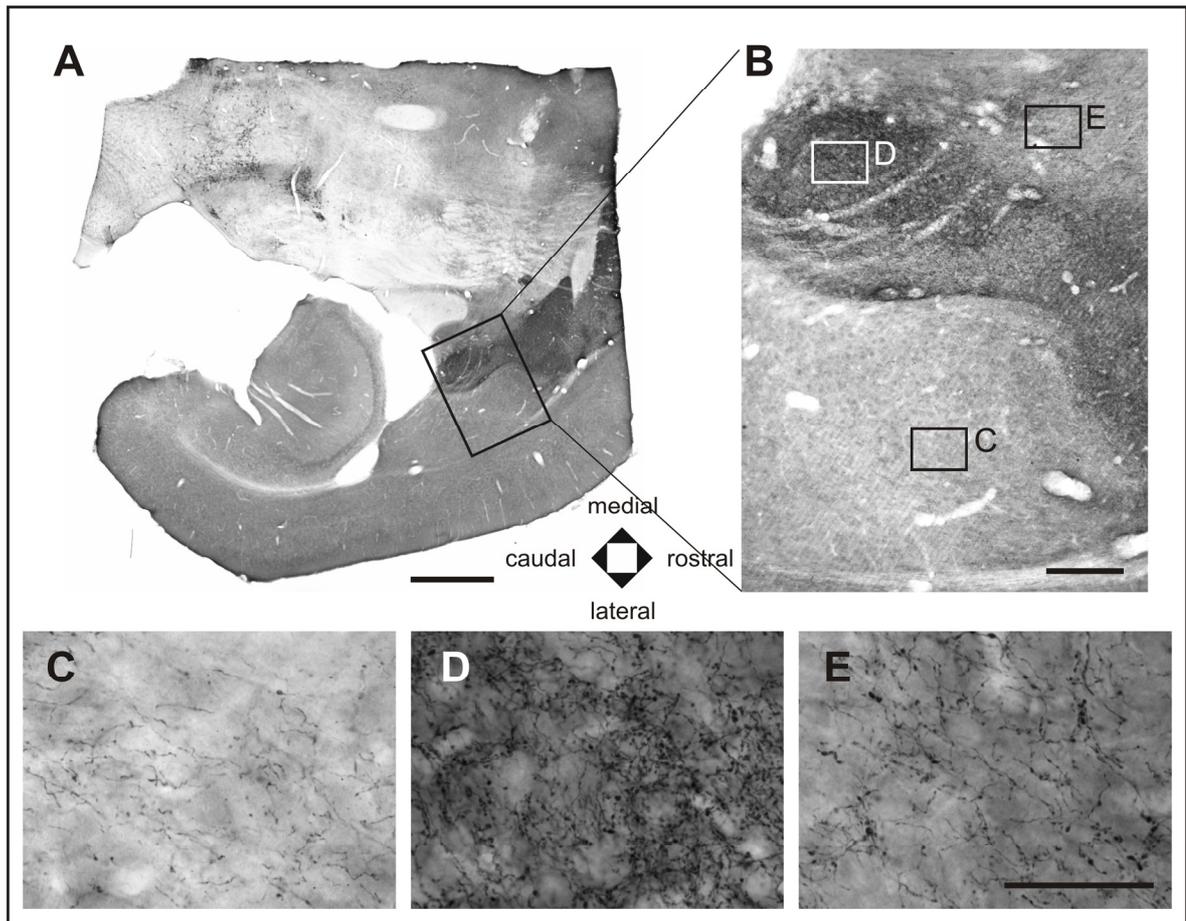
Die dopaminerge Innervation der drei untersuchten Kerngebiete der Amygdala zeigt hinsichtlich der Dichte deutliche Unterschiede. Das dichteste Fasernetz zeigt der laterale Anteil des zentralen Kerns (CeAl), der mediale Anteil (CeAm) ist deutlich schwächer



**Abb. 3.2: Die dopaminerge Innervation des ventralen Striatums.**

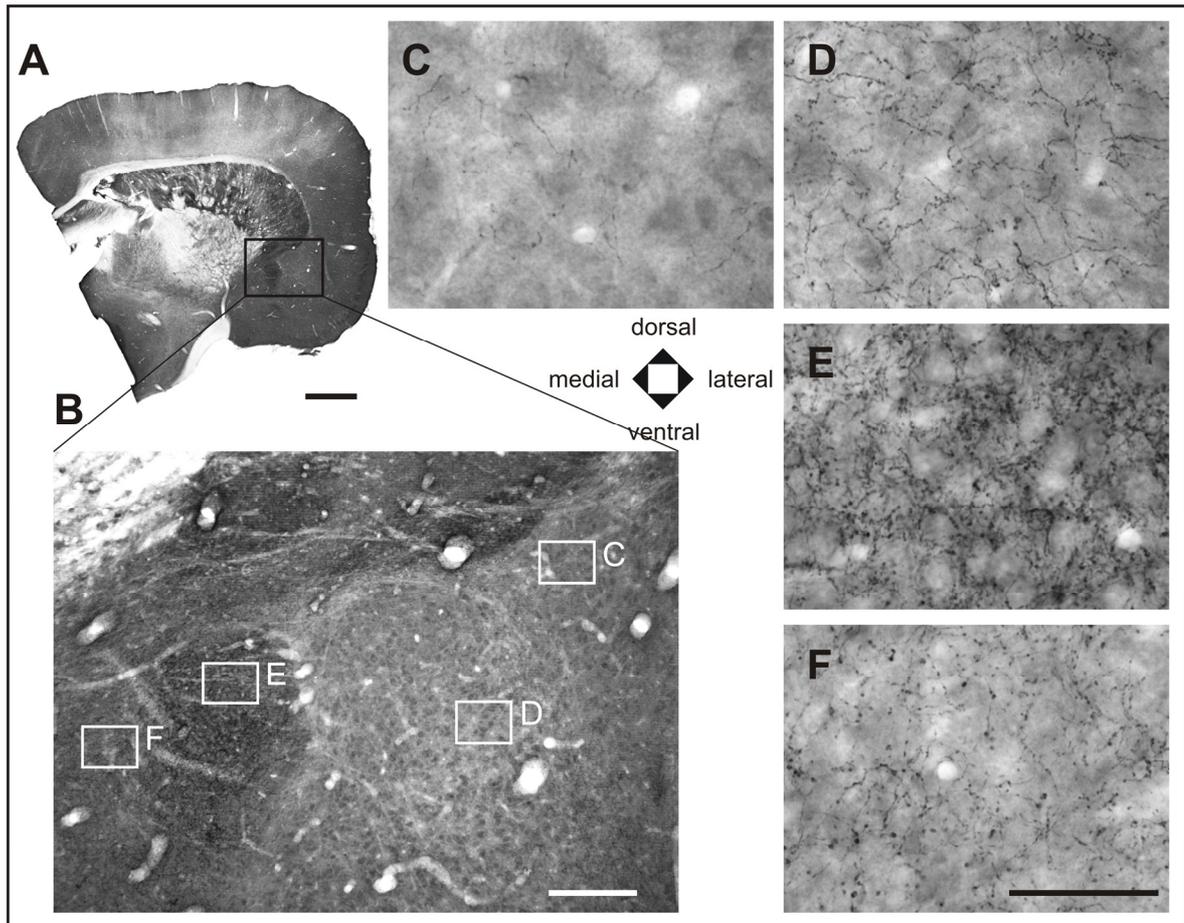
- (A) Übersichtsaufnahme im Bereich des ventralen Striatums
  - (B) Ausschnittvergrößerung der drei ausgewerteten Regionen des ventralen Striatums
  - (C) Detailaufnahme des Nucleus accumbens Shell (NAc Shell)
  - (D) Detailaufnahme des Nucleus accumbens Core (NAc Core)
  - (E) Detailaufnahme des olfaktorischen Tuberkels (OT)
- Balken = 1000µm (A), 500µm (B), 50µm (C, D, E)

innerviert. Eine moderate Faserdichte weist der basolaterale Kern (BLA) auf mit einer deutlich stärkeren Innervation des posterioren Anteils im Vergleich zum anterioren Anteil (Abb. 3.3 und 3.4). Am schwächsten innerviert stellt sich der laterale Kern (LA) dar (Abb. 3.4). Diese Innervationsmuster stehen ebenfalls im Einklang mit der an Ratten gezeigten Faserverteilung (Asan, 1998).



**Abb. 3.3: Die dopaminerge Innervation der Amygdala (Horizontalschnitt der Oralstudie).**

- (A) Übersichtsaufnahme im Bereich der Amygdala
  - (B) Ausschnittvergrößerung der zwei untersuchten Kerne der Amygdala
  - (C) Detailaufnahme des basolateralen Kerns (BLA)
  - (D) Detailaufnahme des lateralen Anteil des zentralen Kerns (CeAl)
  - (E) Detailaufnahme des medialen Anteil des zentralen Kerns (CeAm)
- Balken = 1000 $\mu$ m (A), 200 $\mu$ m (B), 50 $\mu$ m (C, D, E)



**Abb. 3.4: Die dopaminerge Innervation der Amygdala (Frontalschnitt der I.p.-Studie).**

- (A) Übersichtsaufnahme im Bereich der Amygdala
  - (B) Ausschnittvergrößerung der drei untersuchten Kerne der Amygdala
  - (C) Detailaufnahme des lateralen Kernes (LA)
  - (D) Detailaufnahme des basolateralen Kernes (BLA)
  - (E) Detailaufnahme des lateralen Anteil des zentralen Kernes (CeAl)
  - (F) Detailaufnahme des medialen Anteil des zentralen Kernes (CeAm)
- Balken = 1000µm (A), 200µm (B), 50µm (C, D, E)

## 3.2 Quantitative Ergebnisse

### 3.2.1 Oral-Studie

#### 3.2.1.1 Befunde im präfrontalen Kortex

Aufgrund der oben gezeigten unterschiedlichen Innervationsmuster der Laminae mit der getrennten Auswertung der Laminae I, III und V in der dorsalen anterior cingulären (ACd), prälimbischen (PL) und infralimbischen (IL) Subregionen des mPFC, stellt sich die quantitative Ergebnisvorstellung sehr komplex dar.

Die ANOVA mit Messwiederholung über die drei gemessenen Subregionen des mPFC (ACd, PL und IL) zeigt für die Lamina I einen höchstsignifikanten ( $p < 0,001, ***$ )

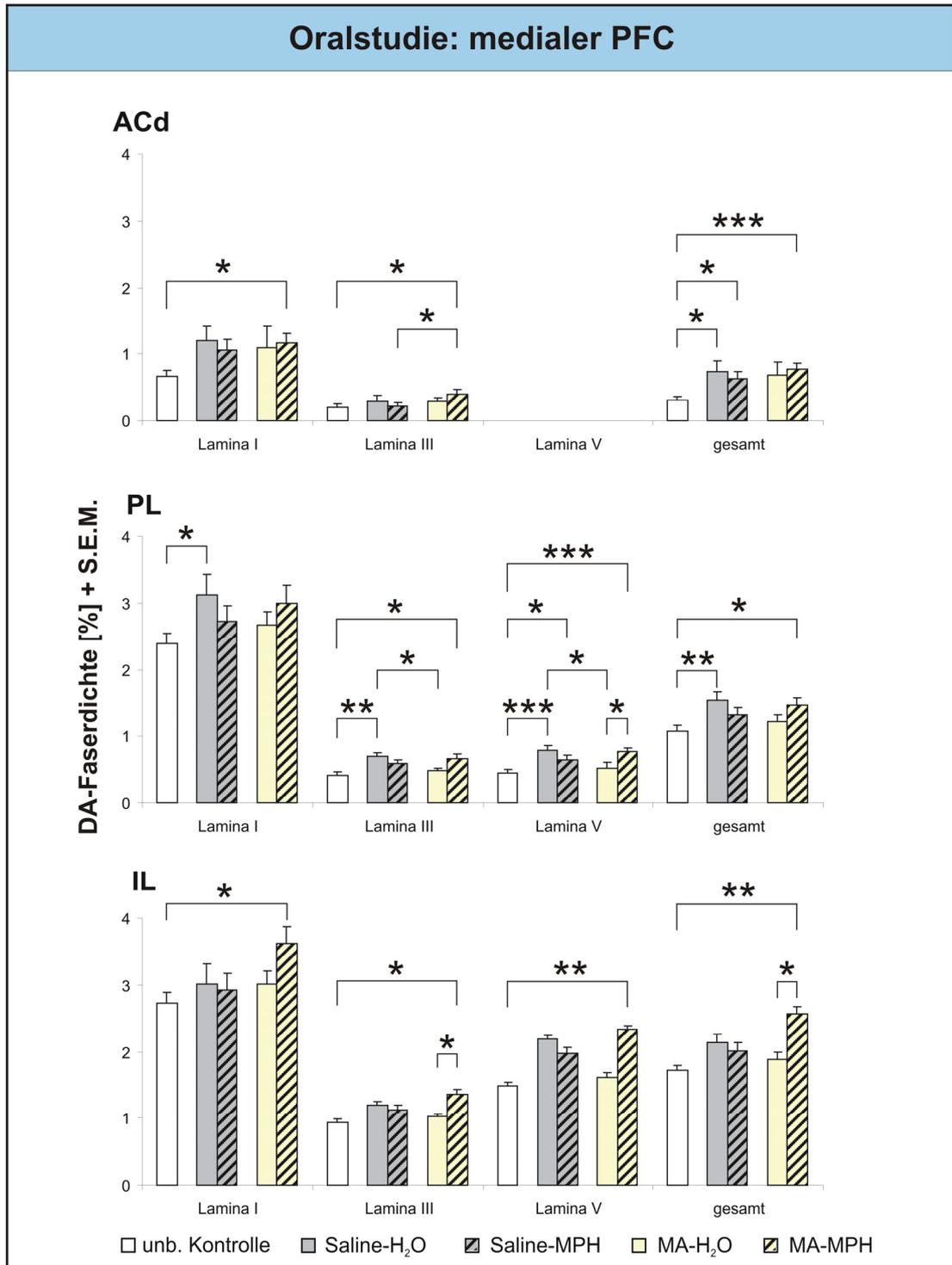
Unterschied in der Innervationsdichte der einzelnen Regionen, aber weder einen signifikanten Einfluss eines der beiden eingesetzten Behandlungsfaktoren „Tag 14“ (Saline vs. MA) und „Tag 30-60“ (H<sub>2</sub>O vs. MPH), noch eine Wechselwirkung der beiden Faktoren. Für die Lamina III des mPFC zeigt die ANOVA mit Messwiederholung über die Subregionen eine signifikante Interaktion der beiden eingesetzten Behandlungsfaktoren ( $p < 0,05, *$ ). Weiterhin unterscheiden sich die gemessenen Gebiete höchstsignifikant ( $p < 0,001, ***$ ) hinsichtlich der Innervationsdichte. In der Lamina V tritt ebenfalls eine signifikante Wechselwirkung ( $p < 0,05, *$ ) der beiden Behandlungsfaktoren auf und auch hier unterscheiden sich die Subregionen höchstsignifikant ( $p < 0,001, ***$ ) voneinander. Die ANOVA mit Messwiederholung über die Subregionen für die Mittelwerte aller Laminae ergibt keinen signifikanten Einfluss der Behandlungsfaktoren und auch keine Wechselwirkung dieser beiden. Aber auch hier unterscheiden sich die Regionen höchstsignifikant ( $p < 0,001, ***$ ) voneinander und es besteht eine Interaktion ( $p < 0,05, *$ ) der Behandlung von Tag 30-60 und den Subregionen, das heißt die Behandlung führt in den drei Regionen zu unterschiedlichen Effekten (zusammengefasst in Tabelle 3.2).

Die Kontrastanalysen zeigen, dass die chronische Behandlung mit Methylphenidat bei nicht-traumatisierten Tieren (Saline-MPH) gegenüber der mit Wasser behandelten Kontrollgruppe (Saline-H<sub>2</sub>O) in keiner der gemessenen Subregionen und Laminae des medialen PFC einen signifikanten Einfluss auf die dopaminerge Innervationsdichte hat (Abb. 3.5 und Tab. 3.3).

Eine signifikant geringere Faserdichte der MA-behandelten Kontrollgruppe (MA-H<sub>2</sub>O) gegenüber der nicht-traumatisierten Kontrollgruppe (Saline-H<sub>2</sub>O) zeigt sich in der Lamina III (-29%;  $p < 0,05, *$ ) und V (-35%;  $p < 0,05, *$ ) des prälimbischen Areals (PL). Diese Absenkung ist sowohl im PL in Lamina I (-15%) und über die Laminae gemittelt (-20%), als auch im anterior dorsalen Areal (ACd; Lamina I: -9%; Lamina III: -2%; gesamt: -7%) und im infralimbischen Areal (IL; Lamina III: -14%; Lamina V: -26%; gesamt: -11%) nicht signifikant (Abb. 3.5 und Tab. 3.3).

Weiterhin stellt sich eine erhöhte Dopaminfaserdichte nach einmaliger MA-Intoxikation und chronischer MPH-Behandlung (MA-MPH) gegenüber der MA-behandelten Kontrollgruppe (MA-H<sub>2</sub>O) heraus, die im PL in Lamina V (+50%;  $p < 0,05, *$ ), im IL in Lamina III (+32%;  $p < 0,05, *$ ) und im Mittel über die Laminae (+36%;  $p < 0,05, *$ ) signifikant ist (Abb. 3.5 und Tab. 3.3).

Für die Lamina III des ACd stellt die Kontrastanalyse ferner eine signifikant erhöhte Innervationsdichte (+84%;  $p < 0,05, *$ ) der MA-MPH-Gruppe im Vergleich zur Saline-MPH-Gruppe heraus (Abb. 3.5 und Tab. 3.3).



**Abb. 3.5: Die dopaminerge Faserdichte in den einzelnen Subregionen und Laminae des medialen präfrontalen Kortex**

Die Grafik zeigt keine signifikanten Veränderungen der nicht traumatisierten und chronisch mit MPH behandelten Tiere (Saline-MPH) gegenüber behandelten Kontrollen (Saline-H<sub>2</sub>O). Eine erniedrigte Innervationsdichte nach frühkindlicher MA- und chronischer Behandlung mit Wasser (MA-H<sub>2</sub>O) im Vergleich zur behandelten Kontrolle ist in allen drei Bereichen des mPFC vorhanden und in Lamina III und V des PL signifikant. Die chronisch mit MPH behandelten traumatisierten Tiere (MA-MPH) zeigen im Vergleich zu traumatisierten Kontrolltieren (MA-H<sub>2</sub>O) eine erhöhte dopaminerge Faserdichte, die in Lamina V des PL und Lamina III und gesamt des IL signifikant ist. Weiterhin zeigt sich eine signifikant bis höchstsignifikant erhöhte Dopaminfaserdichte der behandelten gegenüber den unbehandelten Kontrollen.

Weiter ist die dopaminerge Faserdichte der behandelten Kontrollgruppe im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle in allen Regionen und Laminae erhöht, was nach t-Test im ACd über die Laminae gemittelt (+139%;  $p < 0,05, *$ ) und im PL in allen Laminae und im Mittel (Lamina I: +31%;  $p < 0,05, *$ ; Lamina III: +67%;  $p < 0,01, **$ ; Lamina V: +80%;  $p < 0,001, ***$ ; gesamt: +42%;  $p < 0,01, **$ ) signifikant bis höchstsignifikant ist (Abb. 3.5 und Tab. 3.4).

Eine erhöhte Innervationsdichte zeigt sich auch nach einmaliger MA- und chronischer MPH-Behandlung (MA-MPH) gegenüber unbehandelten Kontrollen, die im ACd in beiden gemessenen Laminae und im Mittel (Lamina I: +73%;  $p < 0,05, *$ ; Lamina III: +106%;  $p < 0,05, *$ ; gesamt: +151%;  $p < 0,001, ***$ ), im PL in Lamina III und V und über die Laminae gemittelt (Lamina III: +61%;  $p < 0,05, *$ ; Lamina V: +74%;  $p < 0,001, ***$ ; gesamt: +36%;  $p < 0,05, *$ ) und im IL in allen Laminae und im Mittel (Lamina I: +33%;  $p < 0,05, *$ ; Lamina III: +47%;  $p < 0,05, *$ ; Lamina V: +57%;  $p < 0,01, **$ ; gesamt: +49%;  $p < 0,01, **$ ) signifikant bis höchstsignifikant ist (Abb. 3.5 und Tab. 3.4).

Weiterhin zeigt der Mittelwertvergleich mittels t-Test eine signifikant erhöhte Faserdichte der MPH-behandelten nicht-traumatisierten Gruppe (Saline-MPH) im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe im Mittel über die Laminae im ACd (+104%;  $p < 0,05, *$ ) und in der Lamina V des PL (+46%;  $p < 0,05, *$ ) (Abb. 3.5 und Tab. 3.4).

mPFC		Lamina I		Lamina III		Lamina V		gesamt	
		MW	S.E.M.	MW	S.E.M.	MW	S.E.M.	MW	S.E.M.
ACd	unb. Kontrolle (n=8)	0,6706	0,0757	0,1934	0,0506			0,3102	0,0416
	Saline-H <sub>2</sub> O (n=7)	1,1986	0,2164	0,2863	0,0875			0,7424	0,1496
	Saline-MPH (n=8)	1,0508	0,1704	0,2164	0,0532			0,6336	0,1057
	MA-H <sub>2</sub> O (n=6)	1,0963	0,3282	0,2819	0,0630			0,6891	0,1912
	MA-MPH (n=8)	1,1592	0,1553	0,3976	0,0684			0,7784	0,0880
PL	unb. Kontrolle (n=8)	2,3874	0,1650	0,4161	0,0569	0,4420	0,0593	1,0819	0,0809
	Saline-H <sub>2</sub> O (n=7)	3,1271	0,2925	0,6936	0,0607	0,7977	0,0651	1,5395	0,1338
	Saline-MPH (n=8)	2,7203	0,2405	0,5906	0,0639	0,6459	0,0792	1,3189	0,1210
	MA-H <sub>2</sub> O (n=6)	2,6707	0,1984	0,4898	0,0370	0,5150	0,0862	1,2252	0,1031
	MA-MPH (n=8)	2,9941	0,2638	0,6714	0,0680	0,7709	0,0514	1,4672	0,1102
IL	unb. Kontrolle (n=8)	2,7250	0,2188	0,9273	0,1399	1,4879	0,2458	1,7217	0,1803
	Saline-H <sub>2</sub> O (n=7)	3,0209	0,3368	1,1934	0,0987	2,1820	0,3029	2,1321	0,2358
	Saline-MPH (n=8)	2,9280	0,3867	1,1303	0,1436	1,9748	0,2313	2,0110	0,2331
	MA-H <sub>2</sub> O (n=6)	3,0170	0,1048	1,0292	0,1109	1,6077	0,2188	1,8893	0,1141
	MA-MPH (n=8)	3,6171	0,3166	1,3631	0,1113	2,3332	0,1095	2,5599	0,1104

**Tab. 3.1: Anzahl der Tiere (n), Mittelwerte (MW) und Standardfehler (S.E.M.) der Subregionen und Laminae des mPFC**

mPFC	Lamina I		Lamina III		Lamina V		gesamt	
	F	p	F	p	F	p	F	p
"P14"	0,0578	0,8120	0,1500	0,7018	0,1307	0,7208	0,0565	0,8141
P30-60	0,0353	0,8525	1,0044	0,3259	1,0269	0,3210	0,4380	0,5144
"P14"*P30-60	1,2571	0,2729	4,4315	0,0455	5,1699	0,0322	3,0980	0,0911
Regionen	170,8733	0,0000	208,9906	0,0000	220,6429	0,0000	293,8358	0,0000
Regionen *"P14"	2,0736	0,1364	1,8807	0,1631	0,0547	0,8171	1,6555	0,2017
Regionen *P30-60	1,0480	0,3582	1,3910	0,2583	0,9956	0,3283	3,2707	0,0466
Regionen *"P14"*P30-60	0,6122	0,5462	0,9848	0,3806	1,6806	0,2072	2,9590	0,0614

Tab. 3.2: ANOVA mit Messwiederholung über die Subregionen (ACd, PL und IL) des mPFC<sup>1</sup>

mPFC		Lamina I		Lamina III		Lamina V		gesamt	
		F	p	F	p	F	p	F	p
ACd	Sal-H <sub>2</sub> O / Sal-MPH	0,2625	0,6129	0,5673	0,4584			0,3644	0,5517
	Sal-H <sub>2</sub> O / MA-H <sub>2</sub> O	0,1943	0,6632	0,0000	0,9996			0,1235	0,7283
	Sal-MPH / MA-MPH	0,0725	0,7900	4,6513	0,0408			0,4456	0,5108
	MA-H <sub>2</sub> O / MA-MPH	0,0451	0,8336	1,6243	0,2142			0,1689	0,6848
PL	Sal-H <sub>2</sub> O / Sal-MPH	1,2973	0,2655	1,4484	0,2400	2,3931	0,1350	1,7785	0,1949
	Sal-H <sub>2</sub> O / MA-H <sub>2</sub> O	1,4945	0,2329	4,7924	0,0381	6,8835	0,0149	3,1565	0,0883
	Sal-MPH / MA-MPH	0,3628	0,5524	0,6888	0,4144	1,7653	0,1965	1,0648	0,3124
	MA-H <sub>2</sub> O / MA-MPH	0,5264	0,4749	3,4976	0,0732	5,8591	0,0234	2,2380	0,1477
IL	Sal-H <sub>2</sub> O / Sal-MPH	0,0422	0,8389	0,1418	0,7097	0,4399	0,5135	0,2092	0,6515
	Sal-H <sub>2</sub> O / MA-H <sub>2</sub> O	0,0001	0,9918	0,8904	0,3544	1,9914	0,1710	0,7280	0,4020
	Sal-MPH / MA-MPH	2,3206	0,1402	2,7785	0,1080	1,7588	0,1973	4,0182	0,0564
	MA-H <sub>2</sub> O / MA-MPH	1,4986	0,2323	4,6416	0,0410	4,1122	0,0538	5,2557	0,0309

Tab. 3.3: Ergebnisse der Kontrastanalysen der Subregionen und der Laminae des mPFC

mPFC		Lamina I		Lamina III		Lamina V		gesamt	
		F-Test (p)	t-Test (p)						
ACd	unb. Kontr. / Sal-H <sub>2</sub> O	0,0203	0,0564	0,2343	0,5618			0,0053	0,0274
	unb. Kontr. / Sal-MPH	0,0481	0,0794	0,8987	0,8509			0,0251	0,0198
	unb. Kontr. / MA-H <sub>2</sub> O	0,0031	0,3094	0,8240	0,4793			0,0022	0,1184
	unb. Kontr. / MA-MPH	0,0771	0,0226	0,4456	0,0462			0,0664	0,0003
PL	unb. Kontr. / Sal-H <sub>2</sub> O	0,2117	0,0268	0,9859	0,0075	0,9309	0,0007	0,2781	0,0068
	unb. Kontr. / Sal-MPH	0,3413	0,1881	0,7671	0,0825	0,4627	0,0311	0,3100	0,0880
	unb. Kontr. / MA-H <sub>2</sub> O	0,8883	0,2083	0,2252	0,4185	0,5577	0,2888	0,7812	0,2084
	unb. Kontr. / MA-MPH	0,2390	0,0695	0,6499	0,0219	0,6245	0,0005	0,4326	0,0125
IL	unb. Kontr. / Sal-H <sub>2</sub> O	0,3964	0,4505	0,3348	0,1359	0,7389	0,1000	0,6362	0,1833
	unb. Kontr. / Sal-MPH	0,1865	0,6364	0,9662	0,3020	0,8648	0,1691	0,5480	0,3340
	unb. Kontr. / MA-H <sub>2</sub> O	0,0727	0,2715	0,4260	0,5568	0,5844	0,5050	0,2082	0,4412
	unb. Kontr. / MA-MPH	0,3869	0,0456	0,5613	0,0186	0,0519	0,0073	0,2010	0,0026

Tab. 3.4: F- und t-Test-Ergebnisse der Subregionen und der Laminae des mPFC

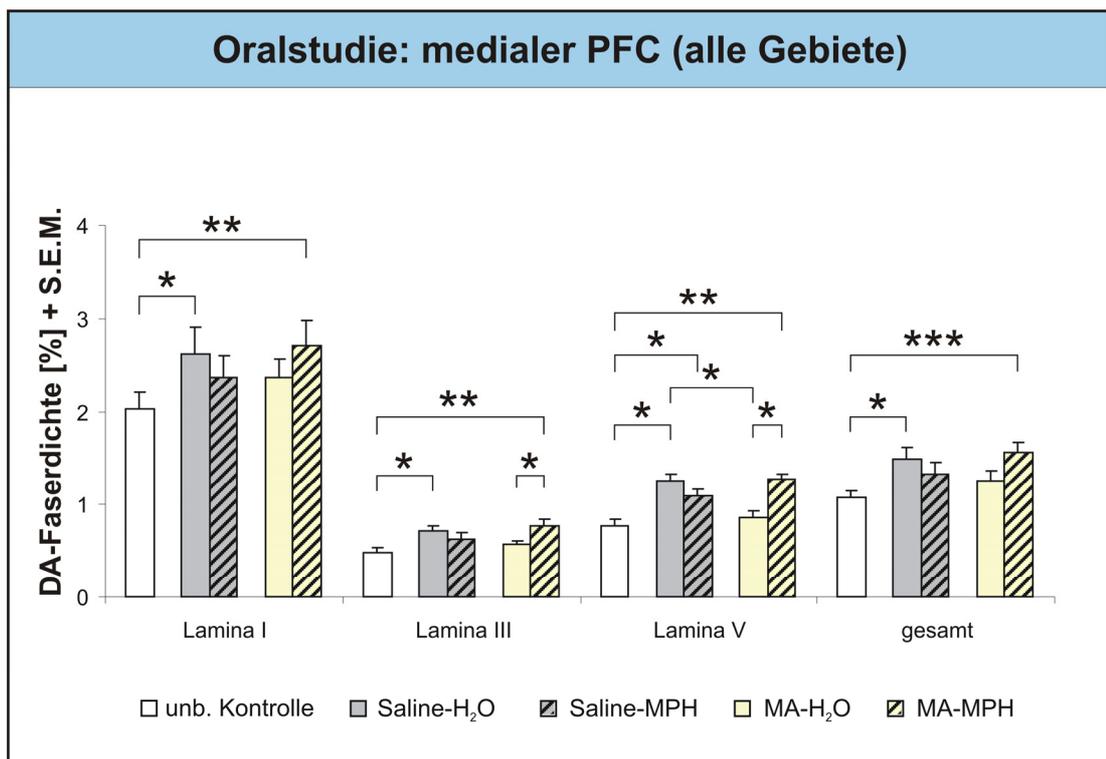
<sup>1</sup> Sämtliche signifikanten Ergebnisse sind rot gekennzeichnet.

Eine Gesamtübersicht des medialen PFC, für die die arithmetischen Mittelwerte der einzelnen Laminae über die drei gemessenen Subregionen (ACd, PL und IL) gebildet wurden, ist in Abbildung 3.6 dargestellt.

Die zweifaktorielle ANOVA zeigt für Lamina I und für die Mittelwerte über die Laminae keinen Einfluss der beiden Behandlungsfaktoren und auch keine Wechselwirkung. Für Lamina III und V zeigt die zweifaktorielle ANOVA ebenfalls keinen Einfluss der beiden Behandlungsfaktoren, doch tritt in diesen beiden Laminae eine signifikante Interaktion der beiden Behandlungsfaktoren auf (Lamina III:  $p < 0,05, *$ ; Lamina V:  $p < 0,05, *$ ) (Abb. 3.6 und Tab. 3.6).

Die Kontrastanalyse zeigt eine signifikant geringere Faserdichte der MA-behandelten Kontrollen (MA-H<sub>2</sub>O) im Vergleich zur nicht-traumatisierten Kontrollgruppe (Saline-H<sub>2</sub>O) in Lamina V (-32%;  $p < 0,05, *$ ). Diese Absenkung ist in Lamina I (-10%) und III (-21%) und über die Laminae gemittelt (-16%) nicht signifikant (Abb. 3.6 und Tab. 3.7).

Nach chronischer Behandlung mit Methylphenidat (MA-MPH) ist die dopaminerge



**Abb. 3.6: Die dopaminerge Faserdichte in den einzelnen Laminae des medialen präfrontalen Kortex**

Die Grafik zeigt keine Veränderungen der chronisch MPH-behandelten Tiere (Saline-MPH) im Vergleich zu behandelten Kontrolltieren (Saline-H<sub>2</sub>O). Die frühkindliche MA-Intoxikation und chronische Behandlung mit Wasser (MA-H<sub>2</sub>O) bedingt gegenüber behandelter Kontrollen eine abgesenkte Faserdichte (signifikant in Lamina V). Die chronisch mit MPH-behandelten traumatisierten Tiere (MA-MPH) zeigen im Vergleich zu traumatisierten Kontrolltieren (MA-H<sub>2</sub>O) eine erhöhte Dopaminfaserdichte (signifikant in Lamina III und V). Weiterhin zeigt sich eine hoch- bis höchstsignifikant erhöhte Innervationsdichte der behandelten gegenüber den unbehandelten Kontrollen.

Faserdichte im Vergleich zur traumatisierten Kontrollgruppe (MA-H<sub>2</sub>O) in Lamina III (+36%;  $p < 0,05, *$ ) und V (+49%;  $p < 0,05, *$ ) signifikant erhöht. Diese Erhöhung ist in Lamina I (+15%) und über die Laminae gemittelt (+24%) nicht signifikant (Abb. 3.6 und Tab. 3.7).

Die t-Tests zeigen außerdem erhöhte Dopaminfaserdichten der behandelten Kontrollgruppe (Saline-H<sub>2</sub>O) gegenüber der unbehandelten Kontrolle in allen Laminae und über die Laminae gemittelt (Lamina I: +29%;  $p < 0,05, *$ ; Lamina III: +48%;  $p < 0,05, *$ ; Lamina V: +62%;  $p < 0,05, *$ ; gesamt: +39%;  $p < 0,05, *$ ) auf (Abb. 3.6 und Tab. 3.8).

Hoch- bis höchstsignifikant erhöhte Innervationsdichten zeigen sich auch nach einmaliger MA- und chronischer MPH-Behandlung (MA-MPH) gegenüber unbehandelten Kontrollen in allen Laminae und im Mittel (Lamina I: +33%;  $p < 0,01, **$ ; Lamina III: +59%;  $p < 0,01, **$ ; Lamina V: +64%;  $p < 0,01, **$ ; gesamt: +45%;  $p < 0,001, ***$ ) (Abb. 3.6 und Tab. 3.8).

Weiterhin stellt der t-Test für die Lamina V eine signifikant erhöhte Dopaminfaserdichte nach MPH-Behandlung (Saline-MPH) gegenüber unbehandelten Kontrollen (+40%;  $p < 0,05, *$ ) heraus (Abb. 3.6 und Tab. 3.8).

mPFC	Lamina I		Lamina III		Lamina V		gesamt	
	MW	S.E.M.	MW	S.E.M.	MW	S.E.M.	MW	S.E.M.
unb. Kontrolle (n=8)	2,0341	0,1322	0,4830	0,0581	0,7782	0,1253	1,0730	0,0828
Saline-H <sub>2</sub> O (n=7)	2,6184	0,2708	0,7167	0,0739	1,2591	0,1417	1,4884	0,1575
Saline-MPH (n=8)	2,3678	0,2416	0,6328	0,0780	1,0888	0,1209	1,3257	0,1369
MA-H <sub>2</sub> O (n=6)	2,3677	0,1944	0,5683	0,0615	0,8541	0,1141	1,2565	0,1243
MA-MPH (n=8)	2,7141	0,1897	0,7697	0,0411	1,2756	0,0625	1,5556	0,0831

**Tab. 3.5: Anzahl der Tiere (n), Mittelwerte (MW) und Standardfehler (S.E.M.) der Laminae des mPFC**

mPFC		F	p
Lamina I	"P14"	0,0176	0,8957
	P30-60	0,0514	0,8226
	"P14"*P30-60	1,7263	0,2008
Lamina III	"P14"	0,0074	0,9322
	P30-60	0,7996	0,3798
	"P14"*P30-60	<b>4,6910</b>	<b>0,0401</b>
Lamina V	"P14"	0,9479	0,3396
	P30-60	1,3176	0,2619
	"P14"*P30-60	<b>7,0672</b>	<b>0,0135</b>
gesamt	"P14"	0,0033	0,9550
	P30-60	0,3098	0,5828
	"P14"*P30-60	3,3299	0,0800

**Tab. 3.6: Zweifaktorielle ANOVA der Laminae des mPFC**

mPFC		F	p
Lamina III	Sal-H <sub>2</sub> O / Sal-MPH	0,8445	0,3669
	Sal-H <sub>2</sub> O / MA-H <sub>2</sub> O	2,2915	0,1426
	Sal-MPH / MA-MPH	2,4206	0,1323
	MA-H <sub>2</sub> O / MA-MPH	4,4909	0,0442
Lamina V	Sal-H <sub>2</sub> O / Sal-MPH	1,1916	0,2854
	Sal-H <sub>2</sub> O / MA-H <sub>2</sub> O	5,9615	0,0220
	Sal-MPH / MA-MPH	1,5883	0,2192
	MA-H <sub>2</sub> O / MA-MPH	6,9482	0,0142

**Tab. 3.7: Ergebnisse der Kontrastanalysen der Laminae des mPFC**

mPFC		F-Test (p)	t-Test (p)
Lamina I	unb. Kontr. / Sal-H <sub>2</sub> O	0,1126	0,0423
	unb. Kontr. / Sal-MPH	0,1340	0,1681
	unb. Kontr. / MA-H <sub>2</sub> O	0,5405	0,1206
	unb. Kontr. / MA-MPH	0,3610	0,0068
Lamina III	unb. Kontr. / Sal-H <sub>2</sub> O	0,6559	0,0290
	unb. Kontr. / Sal-MPH	0,4561	0,1607
	unb. Kontr. / MA-H <sub>2</sub> O	0,8768	0,3728
	unb. Kontr. / MA-MPH	0,3817	0,0015
Lamina V	unb. Kontr. / Sal-H <sub>2</sub> O	0,8739	0,0118
	unb. Kontr. / Sal-MPH	0,9279	0,0463
	unb. Kontr. / MA-H <sub>2</sub> O	0,6222	0,4362
	unb. Kontr. / MA-MPH	0,0866	0,0011
gesamt	unb. Kontr. / Sal-H <sub>2</sub> O	0,1573	0,0209
	unb. Kontr. / Sal-MPH	0,2079	0,0937
	unb. Kontr. / MA-H <sub>2</sub> O	0,5089	0,1710
	unb. Kontr. / MA-MPH	0,9919	0,0006

**Tab. 3.8: F- und t-Test-Ergebnisse der Laminae des mPFC**

### 3.2.1.2 Befunde im ventralen Striatum

Die ANOVA mit Messwiederholung ergibt für das ventrale Striatum weder einen Einfluss der Behandlungsfaktoren „Tag 14“ und „Tag 30-60“ noch eine Wechselwirkung dieser beiden Faktoren. Die Subregionen innerhalb des ventralen Striatums (NAc Shell, NAc Core und OT) unterscheiden sich höchstsignifikant in der dopaminergen Innervationsdichte ( $p < 0,001, ***$ ), doch gibt es keine Wechselwirkung mit einem oder beiden Behandlungsfaktoren (Tab. 3.10).

Auch die Mittelwertvergleiche mittels t-Tests zeigen keine signifikanten Unterschiede der behandelten Gruppen zu der unbehandelten Kontrolle (Abb. 3.7 und Tab. 3.11).

ventrales Striatum	NAc Shell			NAc Core			OT		
	n	MW	S.E.M.	n	MW	S.E.M.	n	MW	S.E.M.
unb. Kontrolle	7	4,3321	0,2271	7	1,9011	0,2287	7	4,2305	0,1917
Saline-H <sub>2</sub> O	7	4,6599	0,2574	7	2,3189	0,2745	7	4,4773	0,1812
Saline-MPH	5	4,5330	0,2809	5	2,3540	0,3250	5	4,7092	0,3321
MA-H <sub>2</sub> O	4	4,5740	0,2247	4	1,9465	0,4158	4	4,4950	0,4716
MA-MPH	5	4,9964	0,4608	5	2,5944	0,3057	5	5,0508	0,3560

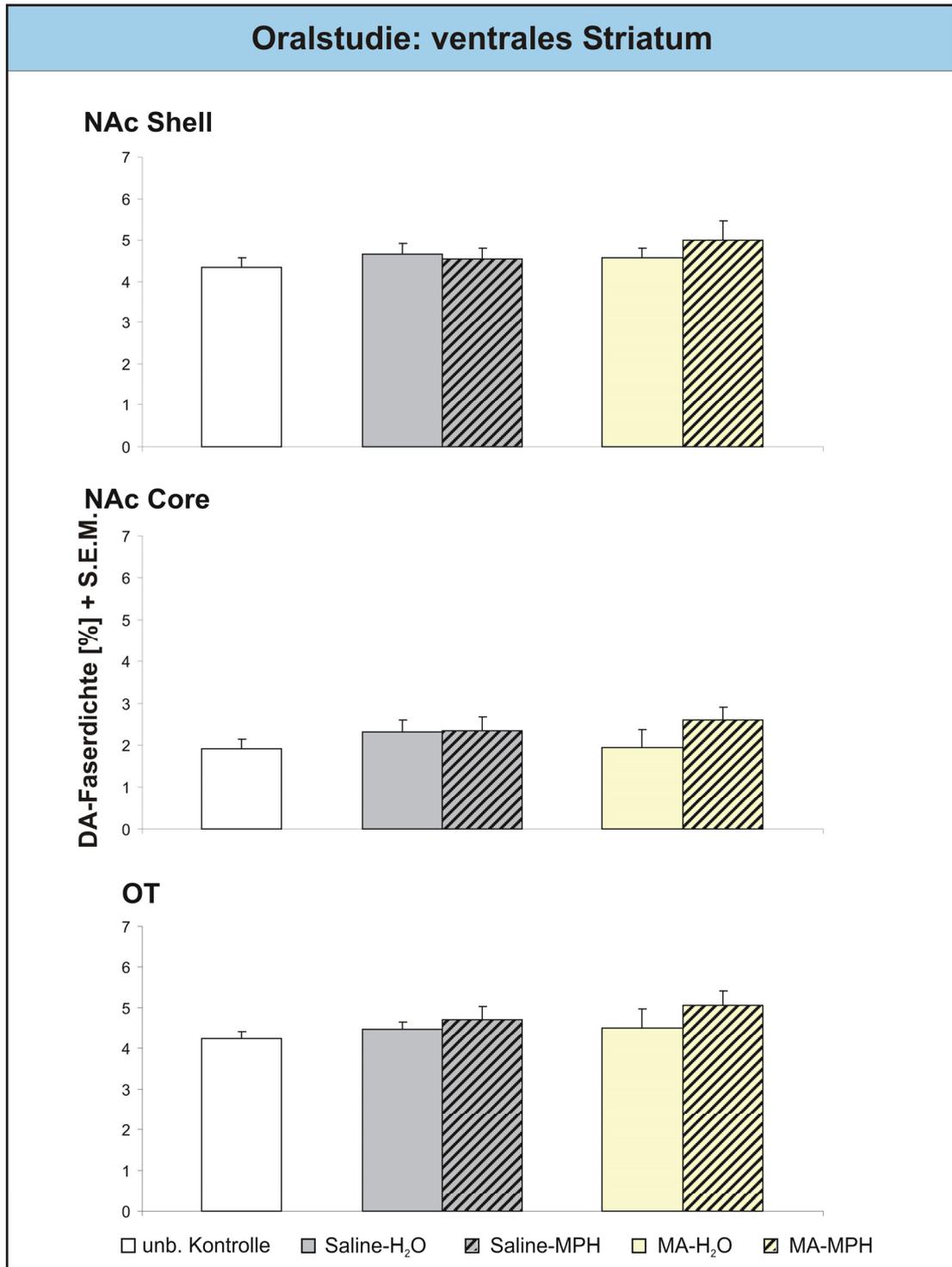
**Tab. 3.9: Anzahl der Tiere (n), Mittelwerte (MW) und Standardfehler (S.E.M.) der Subregionen des ventralen Striatums der Oralstudie**

ventrales Striatum	F	p
"P14"	0,1291	0,7238
P30-60	1,1010	0,3087
"P14"*P30-60	0,7792	0,3897
Regionen	<b>186,4181</b>	<b>0,0000</b>
Regionen*"P14"	0,5140	0,6027
Regionen*P30-60	0,4136	0,6645
Regionen*"P14"*P30-60	0,1418	0,8683

**Tab. 3.10: ANOVA mit Messwiederholung über die Subregionen (NAc Shell, NAc Core und OT) des ventralen Striatums**

ventrales Striatum	NAc Shell		NAc Core		OT	
	F-Test	t-Test	F-Test	t-Test	F-Test	t-Test
unb. Kontr. / Sal-H <sub>2</sub> O	0,7695	0,3586	0,6689	0,2650	0,8952	0,4409
unb. Kontr. / Sal-MPH	0,8773	0,5875	0,6547	0,2660	0,3856	0,2457
unb. Kontr. / MA-H <sub>2</sub> O	0,6777	0,5045	0,4649	0,9186	0,1830	0,6078
unb. Kontr. / MA-MPH	0,2304	0,1870	0,7505	0,0930	0,3105	0,0625

**Tab. 3.11: F- und t-Test-Ergebnisse der Subregionen des ventralen Striatums**



**Abb. 3.7: Die dopaminerge Faserdichte in den einzelnen Subregionen des ventralen Striatums**

Die Grafik zeigt keine signifikanten Veränderungen der Innervationsdichte in allen drei Subregionen des ventralen Striatums.

### 3.2.1.3 Befunde in der Amygdala

Für die Amygdala zeigt sich nach der ANOVA mit Messwiederholung kein signifikanter Einfluss der beiden Behandlungsfaktoren auf die dopaminerge Faserdichte und keine Interaktion dieser beiden. Die Subregionen sind auch in der Amygdala höchstsignifikant unterschiedlich dicht innerviert ( $p < 0,001, ***$ ). Weiterhin besteht eine Wechselwirkung zwischen den Regionen und der Behandlung am Tag 14 ( $p < 0,05, *$ ) und zwischen den Regionen und beiden Behandlungsfaktoren ( $p < 0,05, *$ ) (Tab. 3.13).

Die Kontrastanalyse stellt für die basolaterale Amygdala (BLA) eine hochsignifikant erniedrigte Innervationsdichte nach einmaliger MA-Behandlung und chronischer Wassergabe (MA-H<sub>2</sub>O) gegenüber der mit Wasser behandelten nicht-traumatisierten Gruppe (Saline-H<sub>2</sub>O) heraus (-27%;  $p < 0,01, **$ ) (Abb. 3.8 und Tab. 3.14).

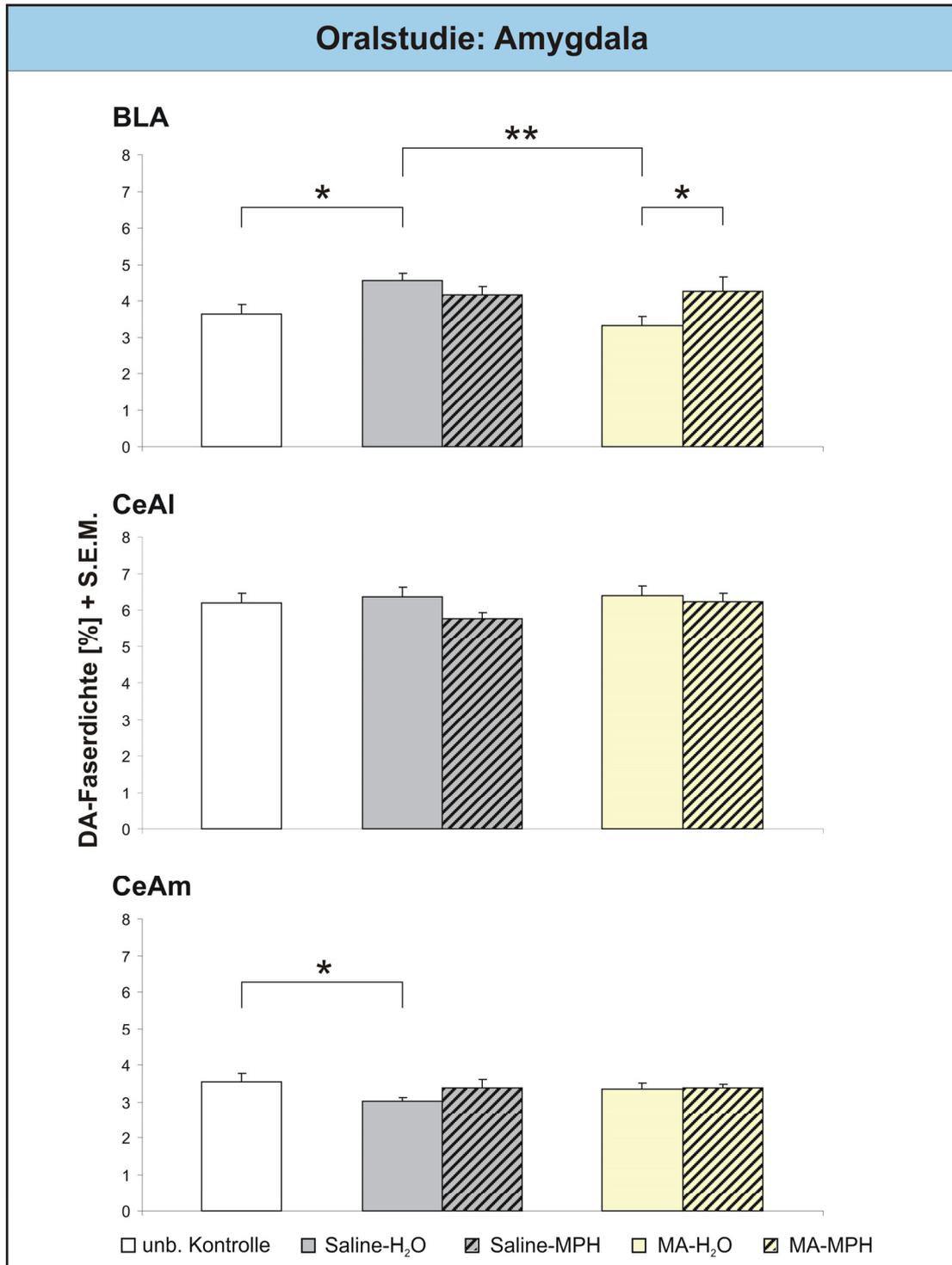
Nach chronischer Behandlung mit Methylphenidat (MA-MPH) ist die dopaminerge Faserdichte im Vergleich zur traumatisierten Kontrollgruppe (MA-H<sub>2</sub>O) signifikant erhöht (+28%;  $p < 0,05, *$ ) (Abb. 3.8 und Tab. 3.14).

Der t-Test zeigt außerdem eine erhöhte Dopaminfaserdichte der behandelten Kontrollgruppe gegenüber der unbehandelten Kontrolle auf (+26%;  $p < 0,05, *$ ) (Abb. 3.8 und Tab. 3.15).

In der zentralen Amygdala (CeA) detektiert die Kontrastanalyse keine Unterschiede zwischen den behandelten Gruppen. Nach den Mittelwertvergleichen der unbehandelten Kontrolle mit den behandelten Gruppen stellt sich aber für den medialen Anteil der CeA (CeAm) eine signifikant niedrigere Innervationsdichte der mit Wasser behandelten nicht-traumatisierten Gruppe (Saline-H<sub>2</sub>O) heraus (-15%;  $p < 0,05, *$ ) (Abb. 3.8 und Tab. 3.15).

Amygdala	BLA			CeAl			CeAm		
	n	MW	S.E.M.	n	MW	S.E.M.	n	MW	S.E.M.
unb. Kontrolle	8	3,6284	0,2844	7	6,1943	0,2594	7	3,5540	0,2100
Saline-H <sub>2</sub> O	7	4,5617	0,1802	8	6,3763	0,2356	8	3,0262	0,0832
Saline-MPH	7	4,1656	0,2283	7	5,7553	0,1663	7	3,3771	0,2157
MA-H <sub>2</sub> O	6	3,3238	0,2651	6	6,4029	0,2609	6	3,3322	0,1765
MA-MPH	8	4,2583	0,3999	8	6,2214	0,2419	8	3,3851	0,0949

**Tab. 3.12: Anzahl der Tiere (n), Mittelwerte (MW) und Standardfehler (S.E.M.) der Subregionen der Amygdala der Oralstudie**



**Abb. 3.8: Die dopaminerge Faserdichte in den einzelnen Subregionen der Amygdala**

Die Grafik zeigt keine Veränderung der Innervationsdichte nach chronischer Behandlung mit MPH bei nicht-traumatisierten Tieren (Saline-MPH) gegenüber behandelten Kontrolltieren (Saline-H<sub>2</sub>O) in allen drei Subregionen der Amygdala. Die frühkindliche MA- und chronische Behandlung mit Wasser (MA-H<sub>2</sub>O) führt in dem BLA zu einer erniedrigten Faserdichte im Vergleich zur behandelten Kontrolle. Die MPH-Behandlung führt im BLA bei frühkindlich traumatisierten Tieren (MA-MPH) zu einer signifikant erhöhten dopaminergen Innervationsdichte gegenüber traumatisierten Kontrolltieren (MA-H<sub>2</sub>O). Weiterhin zeigt sich im BLA (erhöht) und CeAm (erniedrigt) eine veränderte Faserdichte der behandelten im Vergleich zu der unbehandelten Kontrolle.

Amygdala	F	p
"P14"	0,1491	0,7027
P30-60	0,0481	0,8282
"P14"*P30-60	2,5362	0,1238
Regionen	192,4950	0,0000
Regionen**"P14"	4,9677	0,0108
Regionen*P30-60	2,5941	0,0847
Regionen**"P14"*P30-60	3,7151	0,0313

**Tab. 3.13: ANOVA mit Messwiederholung über die Subregionen (BLA, CeAl und CeAm) der Amygdala**

Amygdala	BLA		CeAl		CeAm	
	F	p	F	p	F	p
Sal-H <sub>2</sub> O / Sal-MPH	0,9511	0,3388	2,9122	0,1003	3,0507	0,0930
Sal-H <sub>2</sub> O / MA-H <sub>2</sub> O	9,1950	0,0056	0,0405	0,8421	2,8907	0,1015
Sal-MPH / MA-MPH	0,0257	0,8740	1,8303	0,1882	0,0403	0,8425
MA-H <sub>2</sub> O / MA-MPH	5,0680	0,0334	0,2918	0,5938	0,0276	0,8695

**Tab. 3.14: Ergebnisse der Kontrastanalysen der Subregionen der Amygdala**

Amygdala	BLA		CeAl		CeAm	
	F-Test	t-Test	F-Test	t-Test	F-Test	t-Test
unb. Kontr. / Sal-H <sub>2</sub> O	0,4861	0,0164	0,9404	0,7361	0,0383	0,0311
unb. Kontr. / Sal-MPH	0,5026	0,1166	0,2988	0,1788	0,9315	0,4901
unb. Kontr. / MA-H <sub>2</sub> O	0,6585	0,5243	0,9065	0,6194	0,5305	0,5053
unb. Kontr. / MA-MPH	0,3887	0,1811	0,9943	0,9933	0,0738	0,4523

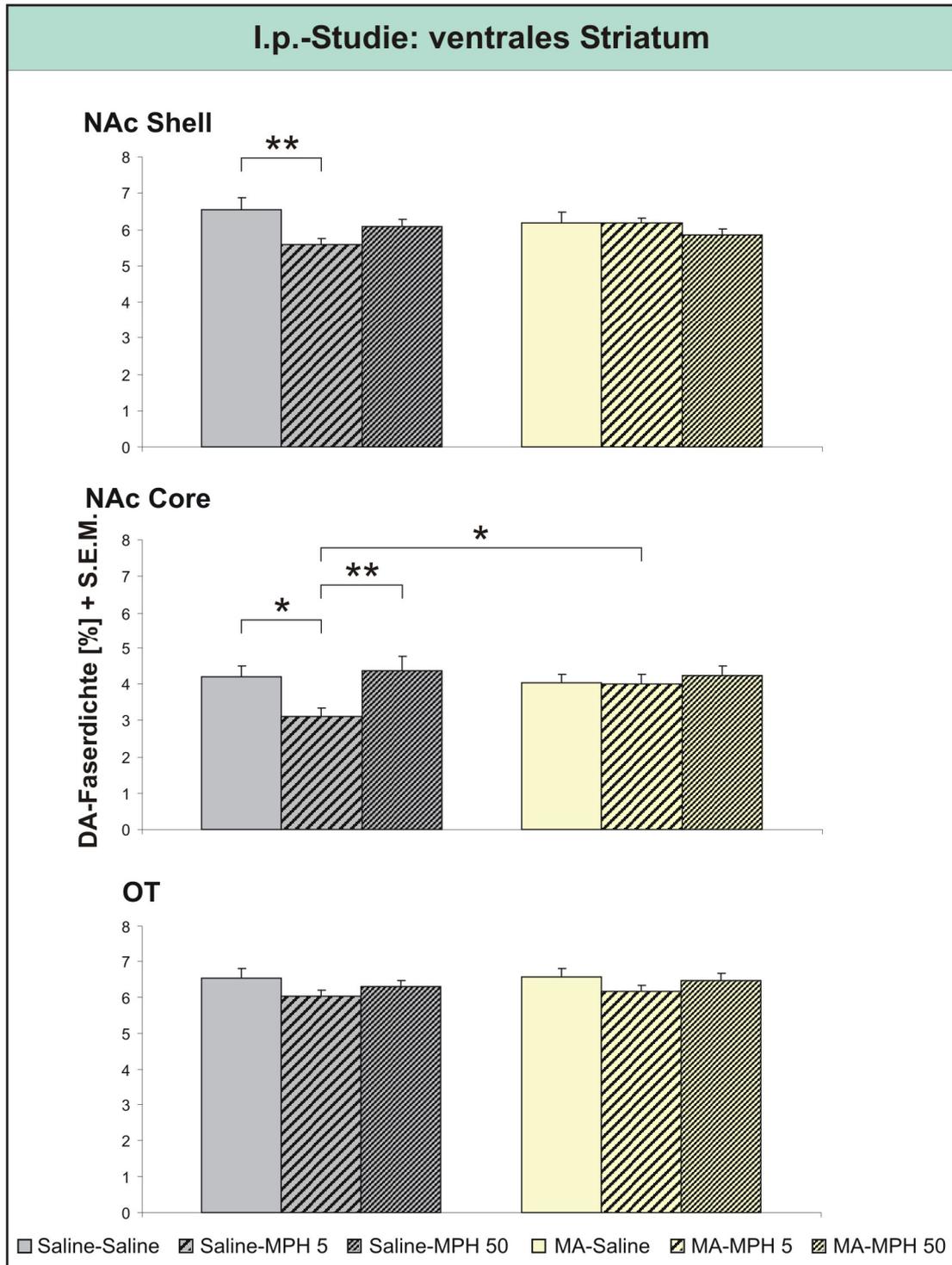
**Tab. 3.15: F- und t-Test-Ergebnisse der Subregionen der Amygdala**

## 3.2.2 I.p.-Studie

### 3.2.2.1 Befunde im ventralen Striatum

Im ventralen Striatum zeigt die ANOVA mit Messwiederholung keinen signifikanten Einfluss der Behandlungsfaktoren und keine Wechselwirkung dieser beiden Faktoren. Sie stellt aber einen höchstsignifikanten Unterschied der drei gemessenen Subregionen (NAc Shell, NAc Core und OT) heraus. Zudem besteht eine signifikante Interaktion der Behandlung von Tag 30-60 mit den Regionen, das heißt die chronische Behandlung hat auf die dopaminerge Faserdichte in den Subregionen des ventralen Striatums unterschiedliche Effekte (Tab. 3.17).

Im Shell des Nucleus accumbens (NAc Shell) führt die chronische Behandlung mit Methylphenidat in der klinisch relevanten Dosierung bei nicht-traumatisierten Tieren



**Abb. 3.9: Die dopaminerge Faserdichte in den einzelnen Subregionen des ventralen Striatums**

Die Grafik zeigt eine erniedrigte Innervationsdichte im NAc Shell und Core nach chronischer Behandlung nicht-traumatisierter Tiere mit der klinisch relevanten MPH-Dosis (Saline-MPH 5) im Vergleich zu nicht-traumatisierten Kontrolltieren (Saline-Saline). Weiter führt die Behandlung mit der überhöhten Dosis MPH (Saline-MPH 50) im NAc Core zu einer signifikant erhöhten Faserdichte gegenüber den mit der klinisch relevanten Dosis behandelten nicht-traumatisierten Tieren (Saline-MPH 5). Die MPH-Behandlung mit der niedrigen MPH-Dosis führt bei traumatisierten Tieren (MA-MPH 5) im NAc Core zu einer erhöhten Innervationsdichte im Vergleich zu ebenfalls mit der niedrigen MPH-Dosis behandelten nicht-traumatisierten Tieren (Saline-MPH 5).

(Saline-MPH 5) im Vergleich zu nicht-traumatisierten Kontrolltieren (Saline-Saline) zu einer hochsignifikant abgesenkten dopaminergen Innervationsdichte (-15%;  $p < 0,01, **$ ).

Diese Absenkung tritt im Core des NAc ebenfalls signifikant (-26%;  $p < 0,05, *$ ) auf. Zusätzlich existiert im Core ein hochsignifikanter Unterschied der chronisch mit überhöhter Dosierung MPH behandelten (Saline-MPH 50) zu den mit klinisch relevanter Dosierung behandelten (Saline-MPH 5) nicht-traumatisierten Tieren (+41%;  $p < 0,01, **$ ). Außerdem zeigt sich im Core ein signifikanter Unterschied in der Faserdichte der einmalig MA- und chronisch mit der niedrigen Dosierung behandelten (MA-MPH 5) zu der ebenfalls mit der klinisch relevanten Dosierung behandelten nicht-traumatisierten (Saline-MPH 5) Gruppe (+29%;  $p < 0,05, *$ ) (Abb. 3.9 und Tab. 3.18).

ventrales Striatum	NAc Shell			NAc Core			OT		
	n	MW	S.E.M.	n	MW	S.E.M.	n	MW	S.E.M.
Saline-Saline	8	6,5535	0,3222	8	4,1820	0,3061	8	6,5137	0,2728
Saline-MPH 5	8	5,6019	0,1436	8	3,0997	0,2523	8	6,0133	0,1694
Saline-MPH 50	9	6,0928	0,1855	9	4,3640	0,3899	9	6,2919	0,1694
MA-Saline	9	6,1899	0,2805	9	4,0340	0,2353	9	6,5466	0,2377
MA-MPH 5	8	6,1876	0,1316	8	4,0043	0,2664	8	6,1686	0,1679
MA-MPH 50	7	5,8477	0,1730	7	4,2206	0,2857	7	6,4683	0,1818

**Tab. 3.16: Anzahl der Tiere (n), Mittelwerte (MW) und Standardfehler (S.E.M.) der Subregionen des ventralen Striatums der I.p.-Studie**

ventrales Striatum	F	p
"P14"	0,3670	0,5479
P30-60	2,8377	0,0696
"P14"*P30-60	1,6140	0,2109
Regionen	<b>472,5226</b>	<b>0,0000</b>
Regionen**"P14"	0,8137	0,4466
Regionen*P30-60	<b>3,1716</b>	<b>0,0176</b>
Regionen**"P14"*P30-60	2,2345	0,0719

**Tab. 3.17: ANOVA mit Messwiederholung über die Subregionen (NAc Shell, NAc Core und OT) des ventralen Striatums**

ventrales Striatum	NAc Shell		NAc Core		OT	
	F	p	F	p	F	p
Sal-Sal / Sal-MPH 5	<b>8,9845</b>	<b>0,0045</b>	<b>6,4687</b>	<b>0,0147</b>	3,0005	0,0904
Sal-Sal / Sal-MPH 50	2,2296	0,1427	0,1937	0,6621	0,5823	0,4496
Sal-Sal / MA-Sal	1,3885	0,2451	0,1281	0,7222	0,0132	0,9090
Sal-MPH 5 / Sal-MPH 50	2,5317	0,1189	<b>9,3465</b>	<b>0,0038</b>	1,0391	0,3137
Sal-MPH 5 / MA-MPH 5	3,4038	0,0719	<b>4,5191</b>	<b>0,0393</b>	0,3120	0,5793
Sal-MPH 50 / MA-MPH 50	0,5866	0,4479	0,1118	0,7397	0,3392	0,5633
MA-Sal / MA-MPH 5	0,0001	0,9940	0,0052	0,9431	1,7494	0,1929
MA-Sal / MA-MPH 50	1,1437	0,2908	0,1892	0,6657	0,0698	0,7929
MA-MPH 5 / MA-MPH 50	1,0697	0,3068	0,2410	0,6259	0,9693	0,3304

**Tab. 3.18: Ergebnisse der Kontrastanalysen der Subregionen des ventralen Striatums**

### 3.2.2.2 Befunde in der Amygdala

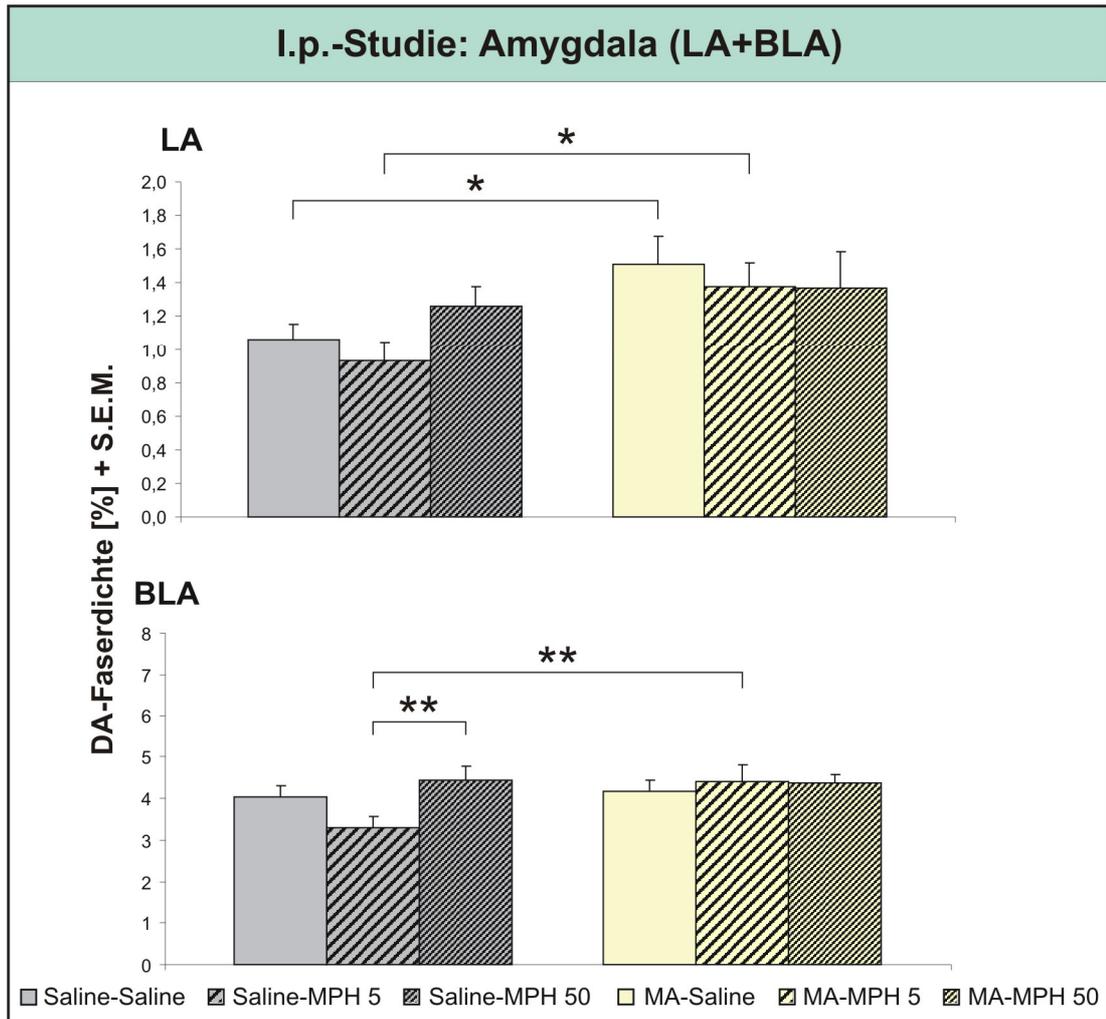
Die ANOVA mit Messwiederholung zeigt einen höchstsignifikanten Einfluss der Behandlung am Tag 14 auf die dopaminerge Innervationsdichte in der Amygdala ( $p < 0,001, ***$ ). Die chronische Behandlung von Tag 30-60 hingegen hat keinen signifikanten Einfluss ( $p = 0,06$ ) und es besteht keine Wechselwirkung dieser beiden Faktoren. Weiterhin sind die Subregionen höchstsignifikant unterschiedlich dicht innerviert ( $p < 0,001, ***$ ) und es besteht eine Interaktion der Behandlung am Tag 14 mit den Regionen der Amygdala ( $p < 0,05, *$ ) (Tab. 3.20).

Im lateralen Kern (LA) ist die dopaminerge Faserdichte der MA-behandelten Kontrolle (MA-Saline) signifikant gegenüber der nicht-traumatisierten Kontrollgruppe (Saline-Saline) erhöht (+42%;  $p < 0,05, *$ ). Auch die chronisch mit der klinisch relevanten Dosierung MPH behandelten Tiere zeigen bei vorhergehender MA-Intoxikation (MA-MPH 5) eine im Vergleich zu nicht-traumatisierten Tieren (Saline-MPH 5) erhöhte Innervationsdichte in dem LA (+48%;  $p < 0,05, *$ ) (Abb. 3.10 und Tab. 3.21).

Diese erhöhte Dopaminfaserdichte ist im basolateralen Kern (BLA) ebenfalls vorhanden (+34%;  $p < 0,01, **$ ). Außerdem zeigt sich im BLA eine hochsignifikant höhere Innervationsdichte nach chronischer Behandlung mit der überhöhten Dosierung MPH (Saline-MPH 50) gegenüber der klinisch relevanten (Saline-MPH 5) Dosierung bei nicht-traumatisierten Tieren (+35%;  $p < 0,01, **$ ) (Abb. 3.10 und Tab. 3.21).

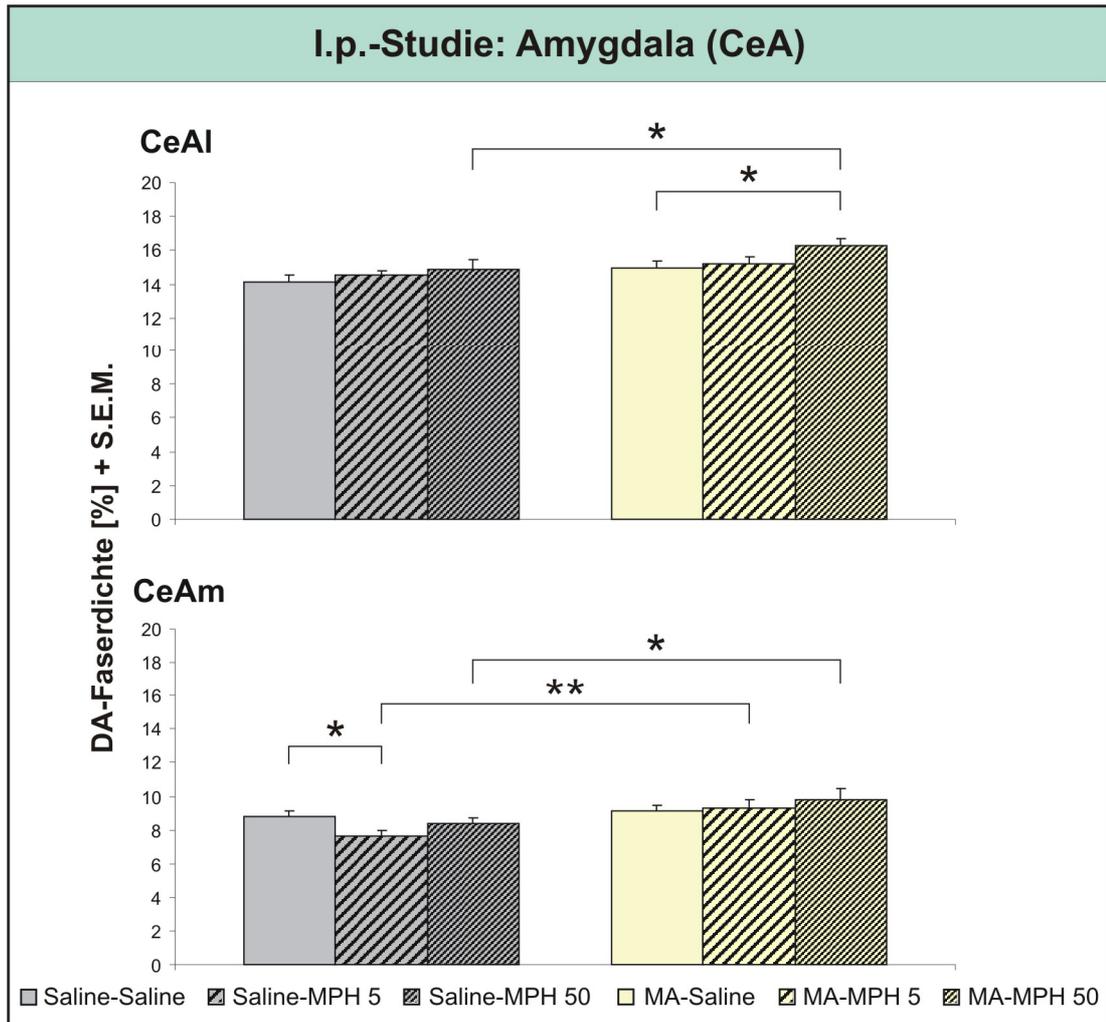
Im lateralen Anteil des zentralen Kerns (CeAl) führt die überhöhte MPH-Dosierung bei einmalig MA-behandelten Tieren (MA-MPH 50) zu einer signifikant höheren dopaminergen Innervationsdichte (+9%;  $p < 0,05, *$ ) im Vergleich zu den ebenfalls traumatisierten Kontrollen (MA-Saline). Die einmalig MA- und chronisch mit der überhöhten Dosierung MPH behandelte Gruppe (MA-MPH 50) zeigt im CeAl auch gegenüber der ebenfalls mit der überhöhten Dosierung behandelten nicht-traumatisierten Gruppe (Saline-MPH 50) eine erhöhte Faserdichte (+9%;  $p < 0,05, *$ ) (Abb. 3.11 und Tab. 3.21).

Dieselbe Erhöhung ist auch im medialen Anteil zu finden (+17%;  $p < 0,05, *$ ). Ferner ist in der CeAm, wie in der BLA die Innervationsdichte bei der MA-MPH 5-Gruppe im Vergleich zur Saline-MPH 5-Gruppe hochsignifikant erhöht (+21%;  $p < 0,01, **$ ). Des Weiteren zeigt sich eine abgesenkte Dopaminfaserdichte nach chronischer Behandlung mit der klinisch relevanten Dosierung bei nicht-traumatisierten Tieren (Saline-MPH 5) gegenüber der entsprechenden Kontrolle (Saline-Saline) (-13%;  $p < 0,05, *$ ) (Abb. 3.11 und Tab. 3.21).



**Abb. 3.10: Die dopaminerge Faserdichte in dem lateralen (LA) und basolateralen Kern (BLA) der Amygdala**

Die Grafik zeigt eine erhöhte Innervationsdichte im LA der traumatisierten (MA-Saline) gegenüber den nicht-traumatisierten Kontrolltieren (Saline-Saline). Weiter ist die Faserdichte nach chronischer MPH-Behandlung der traumatisierten Tiere mit der klinisch-relevanten Dosis (MA-MPH 5) im Vergleich zu der Behandlung nicht-traumatisierter Tiere (Saline-MPH 5) im LA und BLA erhöht. Im BLA führt die Behandlung mit der überhöhten MPH-Dosis (Saline-MPH 50) gegenüber der Behandlung mit der niedrigen Dosis bei nicht-traumatisierten Tieren (Saline-MPH 5) zu einer erhöhten Dopaminfaserdichte.



**Abb. 3.11: Die dopaminerge Faserdichte in dem lateralen (CeAl) und medialen Anteil (CeAm) des zentralen Kerns der Amygdala**

Die Grafik zeigt eine erhöhte Innervationsdichte im CeAl nach Behandlung mit der überhöhten MPH-Dosis bei traumatisierten Tieren (MA-MPH 50) gegenüber traumatisierten Kontrolltieren (MA-Saline). Weiter ist im CeAl sowie im CeAm die Dopaminfaserdichte der traumatisierten und mit der überhöhten MPH-Dosis behandelten Tiere (MA-MPH 50) im Vergleich zu ebenfalls mit der überhöhten Dosis behandelten nicht-traumatisierten Tieren erhöht. Im CeAm führt die MPH-Behandlung mit der klinisch relevanten Dosierung bei nicht-traumatisierten Tieren (Saline-MPH 5) zu einer erniedrigten Innervationsdichte gegenüber nicht-traumatisierten Kontrolltieren (Saline-Saline). Die Behandlung mit der niedrigen MPH-Dosis führt bei traumatisierten Tieren (MA-MPH 5) zu einer erhöhten Faserdichte gegenüber ebenfalls mit der niedrigen Dosis behandelten nicht-traumatisierten Tieren (Saline-MPH 5).

Amygdala	LA			BLA			CeAl			CeAm		
	n	MW	S.E.M.	n	MW	S.E.M.	n	MW	S.E.M.	n	MW	S.E.M.
Saline-Saline	9	1,0619	0,0936	9	4,0193	0,2775	10	14,1642	0,3781	10	8,8032	0,3338
Saline-MPH 5	10	0,9312	0,1169	10	3,2904	0,2588	11	14,5603	0,2123	11	7,6695	0,2634
Saline-MPH 50	10	1,2597	0,1215	10	4,4402	0,3439	10	14,8949	0,5430	10	8,3563	0,3552
MA-Saline	11	1,5125	0,1637	10	4,1534	0,2865	11	14,9716	0,4216	11	9,1618	0,2979
MA-MPH 5	9	1,3815	0,1359	9	4,4133	0,3857	10	15,2264	0,3951	10	9,2779	0,4934
MA-MPH 50	8	1,3725	0,2153	9	4,3609	0,2014	9	16,2931	0,4350	9	9,7780	0,6468

**Tab. 3.19: Anzahl der Tiere (n), Mittelwerte (MW) und Standardfehler (S.E.M.) der Subregionen der Amygdala der I.p.-Studie**

Amygdala	F	p
"P14"	15,6134	0,0002
P30-60	2,9295	0,0618
"P14"*P30-60	0,8290	0,4419
Regionen	2892,2554	0,0000
Regionen*"P14"	3,1942	0,0251
Regionen*P30-60	1,7698	0,1082
Regionen*"P14"*P30-60	1,6210	0,1443

**Tab. 3.20: ANOVA mit Messwiederholung über die Subregionen (LA, BLA, CeAl und CeAm) der Amygdala**

Amygdala	LA		BLA		CeAl		CeAm	
	F	p	F	p	F	p	F	p
Sal-Sal / Sal-MPH 5	0,5787	0,4501	3,4072	0,0703	0,3967	0,5314	4,7127	0,0343
Sal-Sal / Sal-MPH 50	0,8892	0,3498	1,1587	0,2864	2,0308	0,1598	0,5988	0,4423
Sal-Sal / MA-Sal	5,4725	0,0230	0,1854	0,6685	2,0664	0,1562	0,3814	0,5394
Sal-MPH 5 / Sal-MPH 50	2,9787	0,0900	8,6883	0,0047	0,6868	0,4108	1,9011	0,1735
Sal-MPH 5 / MA-MPH 5	5,8571	0,0188	8,5791	0,0049	1,6021	0,2109	9,1900	0,0037
Sal-MPH 50 / MA-MPH 50	0,5594	0,4577	0,0291	0,8652	4,6011	0,0364	6,1430	0,0163
MA-Sal / MA-MPH 5	0,4623	0,4994	0,4259	0,5167	0,2099	0,6487	0,0591	0,8089
MA-Sal / MA-MPH 50	0,3264	0,5701	0,2286	0,6345	4,8986	0,0310	1,3534	0,2497
MA-MPH 5 / MA-MPH 50	0,0077	0,9304	0,0234	0,8791	2,9910	0,0893	0,8224	0,3684

**Tab. 3.21: Ergebnisse der Kontrastanalysen der Subregionen der Amygdala**

## 4 Diskussion

Mit dieser Untersuchung sollte der Einfluss einer chronischen Methylphenidat-Vergabe während der Adoleszenz auf die Reifung von dopaminergen Fasern im limbo-präfrontalen System von *Meriones unguiculatus* geklärt werden.

Die **orale Vergabe** von Methylphenidat (MPH; Ritalin®) im jugendlichen Alter zeigt für die klinisch relevante Dosierung (5 mg/kg/Tag) keine Veränderungen am postnatalen Tag 90 in den gemessenen Gebieten des limbo-präfrontalen Systems (PFC, ventrales Striatum und Amygdala). Die frühkindliche Traumatisierung mittels Methamphetamin-(MA-)Intoxikation und anschließende Behandlung mit Wasser bedingt eine suppressive Reifung dopaminergere Fasern im präfrontalen Kortex und dem basolateralen Kern der Amygdala (BLA). Die MPH-Behandlung führt demgegenüber bei traumatisierten Tieren in präfrontalen Gebieten, dem BLA und tendenziell im ventralen Striatum zu einer erhöhten dopaminergen Innervationsdichte. Weiterhin tritt ein so genannter Handlungeffekt auf, da die chronische Behandlung mit Wasser im PFC und in dem BLA zu einer erhöhten und im CeAm zu einer erniedrigten Innervationsdichte führt. Dieser Handlungeffekt betrifft also die MPH-behandelten Tiere gleichermaßen.

Nach **i.p.-Vergabe** der klinisch relevanten MPH-Dosierung (5 mg/kg/Tag) während der Adoleszenz zeigt sich eine erniedrigte dopaminerge Innervationsdichte im Nucleus accumbens (NAc) und im medialen Anteil des zentralen Kerns der Amygdala (CeAm). Die Behandlung mit der überhöhten Dosierung (50 mg/kg/Tag) bedingt demgegenüber im NAc und der Amygdala (BLA) eine erhöhte Faserdichte. Bei den mittels MA-Intoxikation traumatisierten Tieren führt diese Behandlung in einer Amygdalaregion (CeAl) zu einer exzessiven Reifung der Dopaminprojektionen. In allen anderen untersuchten Gebieten (ventrales Striatum, LA, BLA und CeAm) ergeben sich keine Veränderungen.

In dieser Gegenüberstellung der Daten wird deutlich, dass für die Bewertungen der MPH-behandelten Tiere der Vergleich von gehandelten Tieren mit den unbehandelten Kontrollen von großer Bedeutung ist. Deswegen werden diese eigentlich nachgeordneten Befunde zuerst zur Diskussion gestellt. Weitere allgemeine Voraussetzungen, die immer ein Wirkungsprofil von Psychopharmaka mit bestimmen, sollen zusätzlich vorab angesprochen werden.

## 4.1 Handling und Voraussetzungen für das Wirkungsprofil von MPH

### A) Einfluss von Handling

Erstmals konnte ein dauerhafter Einfluss von kurzem täglichem Handlingstress während der Adoleszenz auf die strukturelle Reifung des dopaminergen Transmittersystems gezeigt werden. *Es wird deutlich, dass das Handeln während der Entwicklung der mesokortikolimbischen Dopaminprojektionen in Terminationsfeldern des mPFC und des BLA erhöhte und im CeAm abgesenkte Dichtewerte erzeugt.*<sup>1</sup>

Weitere Untersuchungen zeigen lang anhaltende Effekte nach mildem Handlingstress auf physiologischer und Verhaltensebene, besonders nach früher Intervention. So führt z.B. neonataler Handlingstress bei Ratten im prä- und postpubertären Alter zu veränderten basalen und stress-induzierten Monoaminausschüttungen (Papaioannou et al., 2002). Frühes postnatales Handling bedingt bei Ratten im Erwachsenenalter eine abgesenkte stressinduzierte Dopaminausschüttung im NAc (Brake et al., 2004). Diese Studie zeigt weiterhin, dass nicht-gehandelte, im Gegensatz zu gehandelten Tieren, mit Hyperaktivität reagieren, wenn sie einer neuen Umgebung ausgesetzt werden.

Bemerkenswert ist, dass diese Handlingeffekte an Nagern aus restriktiver Aufzucht untersucht wurden. Das heißt also, von Tieren, die, wie viele Beobachtungen dokumentiert haben, mit einem massiv veränderten Dopaminstoffwechsel bis in das Erwachsenenalter leben. So hat unsere Arbeitsgruppe an Gerbils aus restriktiver im Vergleich zu seminatürlicher Aufzucht gezeigt, dass Erstere eine suppressive Reifung von Dopamin im medialen PFC (Winterfeld et al., 1998) und im orbitalen PFC (Neddens et al., 2001) sowie im Caudatus-Putamen (Lehmann et al., 2002) und eine exzessive Reifung in limbische Regionen (Busche et al., 2004; Lesting et al., 2005) entwickeln. Die erhöhte Faserdichte im PFC durch Handling dieser chronisch deprivierten Tiere ist also unbedingt als ein positiver Effekt zu betrachten.

Wenn man den Vorstellungen anderer Autoren folgt, bedeutet die isolierte Aufzucht keinen Stressor, sondern das Fehlen von Stress (Holson et al., 1991). Eine gewisse Stimulation wird aber offenbar für eine normale Entwicklung benötigt (Levine, 1971; Baldwin und Baldwin, 1977). Das bedeutet, Handling trägt einen Teil zu dieser Stimulation bei und führt folglich zu einem schnelleren Umsatz von Dopamin im PFC von adulten Tieren, was als größere Stressresistenz ausgelegt wird (Meiergerd et al., 1997). Verhaltenstests zeigen ebenfalls deutlich positive Handlingeffekte. Gehandelte isoliert

---

<sup>1</sup> Sämtliche kursiv hervorgehobene Sätze beinhalten Befunde dieser Arbeit.

gehaltene Nager explorieren mehr im Openfield, sind weniger aggressiv und ängstlich und haben im Vergleich zu nicht-gehandelten Tieren eine intakte „pre-pulse inhibition“ (Xavier et al., 1983; Holson et al., 1991; Reboucas und Schmidek, 1997; Krebs-Thomson et al., 2001).

Unter diesen Gesichtspunkten betrachtet rückt die Interpretation der MPH-Befunde in ein ganz neues Licht, wie im Folgenden diskutiert werden soll.

## **B) Handling und das Wirkungsprofil von MPH**

*Die vorliegenden Ergebnisse zeigen keine Veränderungen in der dopaminergen Innervationsdichte als Langzeiteffekt chronischer Methylphenidat-(MPH-)Behandlung. Dennoch ist ein MPH-Effekt gegeben. Im Vergleich mit der unbehandelten und der gehandelten Kontrollgruppe wird nämlich deutlich, dass ein MPH-Effekt darin besteht, dass eine signifikante Anhebung der Dopaminfaserdichte in fast allen untersuchten Regionen und Laminae des PFC und im BLA knapp verfehlt wird.* Das ist ein bedeutendes Resultat. Denn für die klinische Anwendung heißt das vorsichtig formuliert, eine MPH-Behandlung sollte begleitende Stressfaktoren unbedingt berücksichtigen.

Dies wird auch aus Ergebnissen deutlich, die eine Interaktion des Handlings mit der MPH-Wirkung zeigen. So ist ein modulatorischer Einfluss von akutem Handlingstress auf die MPH-Wirkung auf physiologischer Ebene nachgewiesen worden. Eine Untersuchung zeigt, dass eine moderate Dosierung von MPH (10 mg/kg) bei oraler Vergabe ohne Handlingstress (per Magensonde) den extrazellulären Dopaminspiegel im medialen PFC anhebt. Diese Anhebung wird aber bei gleichzeitigem Handling noch signifikant verstärkt. Wurden die Ratten allerdings zwei Stunden vor der MPH-Vergabe dem Handlingstress ausgesetzt, so schwächte dies die Wirkung von MPH ab (Marsteller et al., 2002). Es ist wahrscheinlich, dass dieser Einfluss von Handling auf die MPH-Wirkung im PFC ausgeprägter ist als in anderen Bereichen. Nach stressiger Stimulierung konnte festgestellt werden, dass im PFC, im Vergleich zu anderen limbischen Arealen, besonders starke Abweichungen in der Dopaminausschüttung gegeben sind (Abercrombie et al., 1989; Feenstra et al., 1998; Ihalainen et al., 1999). Die besondere Anfälligkeit der mesopräfrontalen Dopaminbahn während der Kindes- und Jugendzeit gegenüber Stressoren erklärt sich aus der Tatsache, dass diese Bahn extrem langsam reift (siehe Abschnitt 1.4, Einleitung).

### **C) Allgemeine Voraussetzungen und zeitliche Bedingungen für das Wirkungsprofil von MPH**

*Die abweichenden Befunde zur frühkindlichen Traumatisierung (MA-Intoxikation) bestätigen einmal mehr, dass Vorerfahrungen bei einer Medikamentierung unbedingt berücksichtigt werden müssen. Denn nunmehr wird die MA-induzierte Absenkung der Dopaminreifung durch die MPH-Behandlung regelrecht verhindert.*

Das Ergebnis macht deutlich, dass MPH unterschiedliche Prozesse auslöst, abhängig von dem Respondersystem, auf das das Pharmakon trifft. Dies stimmt auch mit Studien zur akuten Wirkung von MPH überein. Im „5-choice serial reaction time task“, der Aspekte der anhaltenden, oder selektiven und geteilten Aufmerksamkeit messen kann (Robbins, 2002), bewirkt eine niedrige MPH-Dosis bei Ratten, die zuvor schlecht im Test abschneiden, eine Reduzierung der impulsiven Antworten, sowie eine Verbesserung der richtigen Antworten. Vergleichbare Veränderungen treten nicht bei Tieren nach MPH-Gabe auf, die den Test zuvor gut bewältigen (Puumala et al., 1996).

Entscheidend für langfristige Effekte ist offenbar auch, zu welcher Zeit der Entwicklung und über welchen Zeitraum die Administration erfolgte und zu welchem Zeitpunkt gemessen wurde (direkt nach Ende bzw. Pause einer Vergabe). So haben Moll und Kollegen an Ratten gezeigt, dass die Dopamintransporterdichte im Striatum bei Verwendung der klinischen Vergabeform (oral) und einer klinisch relevanten Dosierung (2 mg/kg/Tag) nur nach chronischer präpubertärer (postnataler Tag 25 bis 39), aber nicht nach postpubertärer (postnataler Tag 50 bis 64) Vergabe abgesenkt ist. Diese Reduktion ist noch signifikanter, wenn die Vergabepause 31 statt 6 Tage beträgt (Moll et al., 2001). Dieses bedeutende Resultat, einer durch MPH reduzierten dopaminergen Transmitterreifung im Striatum, stellt einen der wenigen Befunde dar, die Langzeitfolgen der klinischen Vergabepaxis am Tiermodell getestet haben.

## **4.2 Oralstudie**

Allgemeine Aspekte zum PFC und zur Dopaminwirkung werden vorangestellt, um notwendige Voraussetzungen zum Verständnis der MPH-Wirkung zu schaffen.

## 4.2.1 Der präfrontale Kortex (PFC)

### Zur Dopaminfunktion im PFC

Die Wirkung von Dopamin im PFC ist sehr vielschichtig (Pralong et al., 2002) und soll deshalb hier nur in Grundzügen angesprochen werden. Die entscheidende Aufgabe des PFC, die Steuerung exekutiver Funktionen, wie Aufmerksamkeitskontrolle und Arbeitsgedächtnis, ist stark von der Dopaminfunktion abhängig. Der PFC nutzt das Arbeitsgedächtnis, um Verhalten und Aufmerksamkeit zu steuern, unangebrachte Antworten zu inhibieren und die Aufmerksamkeit, besonders bei Beeinträchtigung durch Störfaktoren, über längere Zeit aufrecht zu erhalten (Robbins, 1996; Goldman-Rakic, 1996). Bei verzögerten Antworttests konnte gezeigt werden, dass Klassen von Neuronen im PFC während der Verzögerungsphase aktiv sind und die Aktivität dieser Neuronen präzise durch Dopaminaktivität gesteuert wird. Leichte Veränderungen der D<sub>1</sub>-Rezeptor-Stimulation beeinflussen die Feuerrate dieser Neuronen und verschlechtern die Aufgabenleistung (Sawaguchi und Goldman-Rakic, 1991; Murphy et al., 1996; Sawaguchi, 2001). Mehrere Studien belegen, dass eine optimale Dopaminkonzentration für normale PFC-Funktionen benötigt wird. Ist der Dopaminspiegel zu hoch oder zu gering, führt dies zu kognitiven Defiziten (Sawaguchi und Goldman-Rakic, 1994; Murphy et al., 1996; Zahrt et al., 1997).

Die mesopräfrontalen dopaminergen Fasern kontaktieren dendritische Spines der kortikalen Pyramidenzellen und modulieren – durch die ständige Abgabe geringer Transmittermengen – tonisch inhibierend deren funktionellen Zustand (Ferron et al., 1984). Die phasische Aktivität der dopaminergen Afferenz führt über D<sub>1</sub>-Rezeptoraktivierung zu einer höheren Erregbarkeit der Pyramidenzellen (Henze et al., 2000). Wichtig für die MPH-Wirkung ist hier noch einmal zu bemerken, dass der PFC keine Impuls- und Synthese-regulierenden Autorezeptoren besitzt (Wolf et al., 1986; Wolf und Roth, 1987; Hoffmann et al., 1988).

Der D<sub>1</sub>-vermittelte Effekt auf das neuronale Membranpotential scheint von dem Grad der Depolarisierung der Pyramidenzellen abhängig zu sein. Z.B. erhöht Dopamin die Erregbarkeit von depolarisierten, aber nicht von hyperpolarisierten Neuronen, was vermutlich die „signal-to-noise“-Rate erhöht (Lavin und Grace, 2001).

Dopamin interagiert im PFC auch mit N-Methyl-D-Aspartat-(NMDA)Rezeptoren. So wurde gezeigt, dass eine geringe Dopaminkonzentration die NMDA-Antworten D<sub>1</sub>-Rezeptor-vermittelt verstärkt, wogegen sie mittels D<sub>2</sub>-Rezeptoransprache bei höheren Dopaminkonzentrationen abgeschwächt werden (Zheng et al., 1999).

## **Zur MPH-Wirkung und dopaminergen Innervationsdichte im präfrontalen Kortex**

Der Effekt von MPH auf den PFC ist zunächst erstaunlich, da das Pharmakon den extrazellulären Dopaminspiegel über die Blockade des Dopamintransporters erreichen sollte (siehe Abschnitt 1.3, Einleitung), diese aber im PFC kaum nachzuweisen sind (Coulter et al., 1995; Sesack et al., 1998). Trotzdem ist für MPH gezeigt worden, dass es im PFC akut zu einem signifikanten Anstieg von extrazellulärem Dopamin führt (Bymaster et al., 2002; Marsteller et al., 2002). Dieser Effekt ist dadurch zu erklären, dass MPH nicht wie selektive DAT-Blocker (z.B. GBR 12909) nur die Dopaminwiederaufnahme, sondern auch die Noradrenalinwiederaufnahme blockiert (Gatley et al., 1996). Ferner haben Untersuchungen gezeigt, dass Dopamin in Regionen, die kaum Dopamintransporter aufweisen und von Noradrenalin und Dopamin innerviert werden (z.B. PFC und NAc shell) vom Noradrenalintransporter aus dem extrazellulären Raum eliminiert wird (Carboni und Silvagni, 2004).

*Wie die Gesamtübersicht (siehe Abb. 3.6, Ergebnisse) zeigt, bei der die einzelnen Laminae über die Subregionen gemittelt abgebildet sind, verhindert die chronische MPH-Behandlung in Lamina I und III, aber nicht in Lamina V den positiven Effekt des Handlings im Sinne einer erhöhten Dopaminfaserdichte. Dieses Ergebnis ist wahrscheinlich aufgrund der unterschiedlichen laminaeren Verteilung der verschiedenen Dopaminrezeptortypen von großer funktioneller Bedeutung. So sind die Rezeptoren der D<sub>1</sub>-Familie (D<sub>1</sub> und D<sub>5</sub>) besonders dicht in den superfiziellen Laminae (Bergson et al., 1995). Die Aktivierung dieser Rezeptoren ist also nach chronischer MPH-Behandlung im Vergleich zum reinen Handling nicht signifikant verbessert, was Einbußen in der Arbeitsgedächtnisleistung haben sollte (s.o.). Die D<sub>2</sub>-Rezeptortypen (D<sub>2</sub>, D<sub>3</sub> und D<sub>4</sub>) sind hauptsächlich auf die Lamina V konzentriert (Goldman-Rakic et al., 1990), wobei D<sub>4</sub>-Rezeptoren besonders häufig an GABAergen Interneuronen gefunden wurden (Mrzljak et al., 1996). Die Aktivierung dieser Rezeptoren, die sich hauptsächlich an kortikostriatalen Pyramidenzellen in Lamina V befinden (Goldman-Rakic et al., 1990), scheint also nach MPH-Vergabe, wie nach Wasserbehandlung, verbessert zu sein.*

*Die in Lamina V signifikant abgesenkte dopaminerge Faserdichte nach frühkindlicher MA-Intoxikation und anschließender Behandlung mit Wasser zeigt eine strukturelle Situation, wie sie auch bei ADHS-Betroffenen angenommen wird. So wurde mit Hilfe von Positronen-Emissions-Tomographie (PET) und [F18]FluoroDOPA (DOPA-Analogon) bei*

ADHS-Betroffenen eine verminderte DOPA-Decarboxylase-Aktivität im PFC festgestellt, die als abgesenkte Katecholamininnervation interpretiert wird (Ernst et al., 1998).

Bei ADHS-betroffenen Kindern wurden gegenüber Kontrollen verminderte Leistungen von PFC-Funktionen festgestellt, die durch MPH verbessert werden (Vaidya et al., 1998). Jüngst wurde auch an Ratten gezeigt, dass niedrige orale Dosen MPH die Arbeitsgedächtnisleistung des PFC steigern, während sie durch höhere Dosen beeinträchtigt werden kann. Diese Steigerung der PFC-Funktion wird durch gleichzeitige Gabe eines D<sub>1</sub>-Rezeptorantagonisten verhindert (Arnsten und Dudley, 2005).

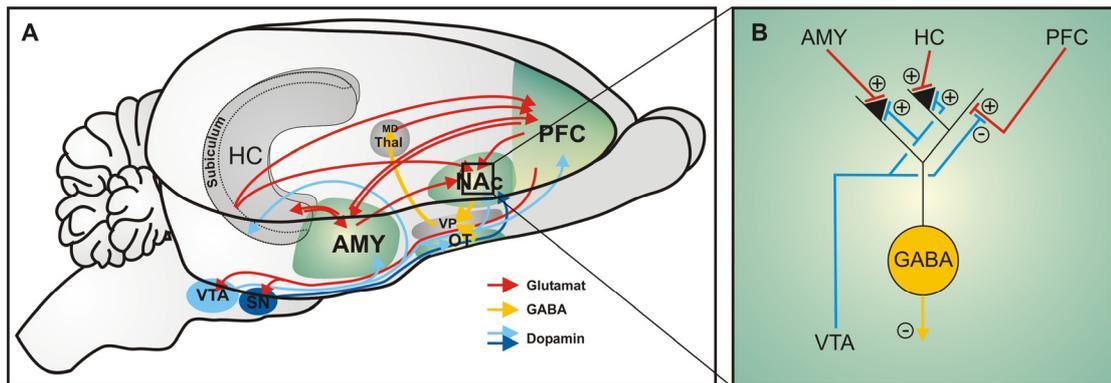
Diese Studien bestätigen anschaulich die funktionelle Relevanz des dopaminergen Systems für die kognitiven Leistungen des PFC und die akute Steigerung dieser Leistungen durch MPH.

*So ist zu erwarten, dass der positive Langzeiteffekt einer verhinderten Absenkung der Dopaminfaserdichte in Lamina III und V (Lamina I nicht signifikant) nach frühkindlicher Traumatisierung und anschließender MPH-Behandlung zu einer dauerhaften Verbesserung der PFC-Leistungen und somit der ADHS-Symptome führt.*

## **4.2.2 Das ventrale Striatum**

### **Zur Dopaminfunktion im Nucleus accumbens**

Der NAc erhält überlappende Eingänge vom PFC, dem Subiculum des Hippocampus, dem BLA und dem mesolimbischen Dopaminsystem. Diese limbischen Afferenzen konvergieren jeweils auf definierten kleinen Zellgruppen (ensembles) (Sesack und Pickel, 1990; Sesack und Pickel, 1992; O'Donnell und Grace, 1995; Mulder et al., 1998). Der PFC ist hierbei für die Modulation der Amygdala-NAc-Interaktion mittels kognitiver Prozesse (Mogenson et al., 1980; Damasio, 1994) und die Entwicklung motorischer Handlungspläne verantwortlich, durch die zielgerichtetes Verhalten ermöglicht wird (Grace, 2000). Der geeignete Plan wird im NAc durch den fördernden Effekt des Hippocampus und der Amygdala und den modulierenden Einfluss von Dopamin zugelassen. Dabei wird angenommen, dass der Hippocampus das Verhalten kontextspezifisch und aufgrund vergangener Erfahrungen mit dem Reiz ermöglicht. Die Amygdala liefert Informationen zum affektiven Wert des Stimulus. Hat der Reiz einen hohen affektiven Wert, kann die Amygdala den hippocampalen Einfluss außer Kraft setzen und das Verhalten emotional bestimmen. Im NAc werden die „medium spiny cells“ durch die glutamatergen Afferenzen des Hippocampus und der Amygdala tonisch



**Abb. 4.1: Vereinfachte schematische Darstellung (A) des limbo-präfrontalen Systems und (B) der Verschaltung im Nucleus accumbens**

(B) Glutamaterge Afferenzen (rot) aus dem PFC, dem Hippocampus und der Amygdala terminieren an GABAergen „medium spiny“ Neuronen (gelb) und werden mittels Dopamin (blau) prä- und postsynaptisch moduliert. +-Zeichen bedeuten eine erregende und --Zeichen eine hemmende Wirkung. Abkürzungen siehe Abb. 1.4, Einleitung.

vordepolarisiert und durch ein zusätzliches phasisches Signal der glutamatergen Afferenzen aus dem PFC zur Auslösung von Aktionspotentialen veranlasst (Grace, 2000).

Dopamin wirkt im NAc über  $D_1$ - und  $D_2$ -Rezeptoren modulierend auf die Eingänge. Die Afferenzen aus dem PFC werden präsynaptisch mittels  $D_2$ -Rezeptoraktivierung gehemmt und die Afferenzen aus dem Hippocampus und der Amygdala durch  $D_1$ -Rezeptoraktivierung verstärkt (Abb. 4.1B). Die beiden Rezeptortypen sprechen zusätzlich auf unterschiedliche Aktivitäten an, wobei der  $D_1$ -Rezeptor aufgrund phasischer Dopaminausschüttung und der  $D_2$ -Rezeptor durch den tonischen Dopaminspiegel aktiviert wird (Goto und Grace, 2005). Wichtig für die Wirkung von MPH ist, dass die beiden Aktivitäten (tonisch und phasisch) sich gegenseitig beeinflussen (Grace, 1991; Grace, 1993). Die Ergebnisse von Goto und Grace lassen vermuten, dass ein tonischer, basaler Level der Dopaminausschüttung die Balance zwischen limbischen und kortikalen Eingängen in den NAc aufrechterhält. Ein Anstieg, sowie eine Absenkung der Dopaminausschüttung hätte starken Einfluss auf die Informationsverarbeitung im NAc (Goto und Grace, 2005).

Der NAc stellt eine Schlüsselkomponente für das Zustandekommen von Impulsivität, einem Kernsymptom von ADHS, dar (Cardinal et al., 2004). Die Impulsivität kann nach Grace erfolgen, wenn der präfrontale und der hippocampale Eingang gestört sind und die amygdaläre Afferenz besonders stark ist. Dieser Zustand hat zur Folge, dass nicht mehr die richtige Antwortstrategie, basierend auf den präfrontalen Einflüssen und dem Kontextbezug (hippocampale Afferenz), zur Ausführung zielgerichteten Verhaltens führt,

sondern das System ausschließlich dazu neigt, aufgrund des affektiven Wertes eines Stimulus zu reagieren. Als Ergebnis wird das geplante Verhalten durch impulsive Antworten, die auf dem emotionalen Zustand basieren, ersetzt (Grace, 2000). Aufgrund der bei ADHS angenommenen zusätzlich erhöhten phasischen Aktivität der Dopaminneuronen (Seeman und Madras, 2002) würde diese impulsive Reaktion weiter verstärkt.

Der NAc spielt außerdem in dem Kreislauf, der für die Drogensucht verantwortlich ist, eine zentrale Rolle. Dopamin wird im NAc normalerweise nach dem Auftreten von natürlichen Verstärkerreizen, wie z.B. Essen oder Sex, ausgeschüttet. Drogen wie Amphetamine verursachen im NAc eine sehr starke Dopaminausschüttung, die nach mehrmaligem Gebrauch adaptive Mechanismen auslöst. So wird als eine Folge dessen ebenfalls eine Verstärkung der Afferenzen von Amygdala und Hippocampus und eine Abschwächung der präfrontalen Afferenz angenommen (Wolf, 2002).

### **Zur MPH-Wirkung und dopaminergen Innervationsdichte im Nucleus accumbens**

*Für den Nucleus accumbens (NAc) konnte keine veränderte Innervationsdichte aufgrund der MPH-Vergabe festgestellt werden. Die chronische Vergabe nach frühkindlicher Traumatisierung führt zwar zu einem tendenziellen Anstieg, der aber nicht signifikant ist.*

Im NAc wurde an Ratten nach akuter oraler MPH-Vergabe von 5 mg/kg zwar ein erhöhter extrazellulärer Dopaminspiegel gezeigt (Gerasimov et al., 2000; Kuczenski und Segal, 2002), der aber nach oraler Gabe von 2 mg/kg (Gerasimov et al., 2000), bzw. 2,5 mg/kg (Kuczenski und Segal, 2002) nicht signifikant angehoben war.

Die von mir verwendeten Wüstenrennmäuse haben ein etwa 5-fach geringeres Gewicht als Ratten. Damit entspricht eine Dosis von 5 mg/kg bei Wüstenrennmäusen nach dem in der Einleitung beschriebenen „interspecies scaling“ (siehe Abschnitt 1.3, Einleitung) einer Dosis von knapp 3 mg/kg bei Ratten. Diese Dosis scheint demnach den extrazellulären Dopaminspiegel im NAc nicht signifikant anzuheben.

Da jedoch die im NAc reich vorhandenen präsynaptischen Autorezeptoren schon auf geringe Veränderungen der Dopaminkonzentration im synaptischen Spalt reagieren (Richfield et al., 1989), kann es durch diese leichte Anhebung des tonischen Dopaminspiegels zu einer Reduzierung der phasischen Ausschüttung kommen. Eine

derartige Anpassung auf molekularer Ebene reicht scheinbar aus, sodass keine strukturellen Veränderungen, in Form einer veränderten Dopaminfaserdichte, messbar sind. Eher würde man dann Adaptationen z.B. von Rezeptordichten erwarten.

Hinweise für eine Anpassung der Rezeptordichten an eine erhöhte Dopaminausschüttung im ventralen Striatum von ADHS-Betroffenen stammen von der SHR, einem Tiermodell, für die eine erhöhte Dichte von postsynaptischen  $D_1$ -Rezeptoren und eine geringere Dichte von  $D_2/D_3$ -Autorezeptoren im ventralen Striatum gezeigt wurde (Papa et al., 2002). Die Rezeptordichten sind nach zweiwöchiger Behandlung mit MPH (3 mg/kg) signifikant verändert. So zeigt sich eine abgesenkte Dichte von postsynaptischen  $D_1$ -Rezeptoren und eine Erhöhung der  $D_2/D_3$ -Rezeptordichte auf Kontrollniveau (Papa et al., 2002).

Während der Entwicklung steigt besonders die  $D_1$ -Rezeptordichte im NAc postnatal erst stark an und wird in der Adoleszenz auf das Niveau im Erwachsenenalter reduziert („pruning“) (Andersen und Teicher, 2000; Tarazi und Baldessarini, 2000). Eine zu starke Expression bzw. ein veränderter Abbau der  $D_1$ -Rezeptoren während der Adoleszenz würde also den am Tiermodell gezeigten Zustand erklären. Da bei Mädchen die beschriebene Rezeptorüberproduktion und anschließende Eliminierung in der Entwicklung geringer ist (Andersen et al., 1997; Andersen und Teicher, 2000), könnte darin ein Grund für die geringere Anfälligkeit für diese Störung begründet liegen.

Die Rezeptorveränderungen nach chronischer MPH-Behandlung sollten zur Folge haben, dass der PFC-Eingang in den NAc nicht weiter gehemmt, aber die Afferenzen von Amygdala und Hippocampus nicht mehr so stark verstärkt werden (s.o.). Dieser Effekt geht mit einer verstärkt funktionalen Reifung des PFC nach chronischer MPH-Behandlung traumatisierter Tiere einher (s.o.), dessen Afferenzen in den NAc somit ebenfalls stärker funktional gereift sein sollten. Ein daraus resultierender Rückgang impulsiver Verhaltensweisen ist auch tatsächlich bei ADHS-Betroffenen gezeigt (Greenhill, 2001).

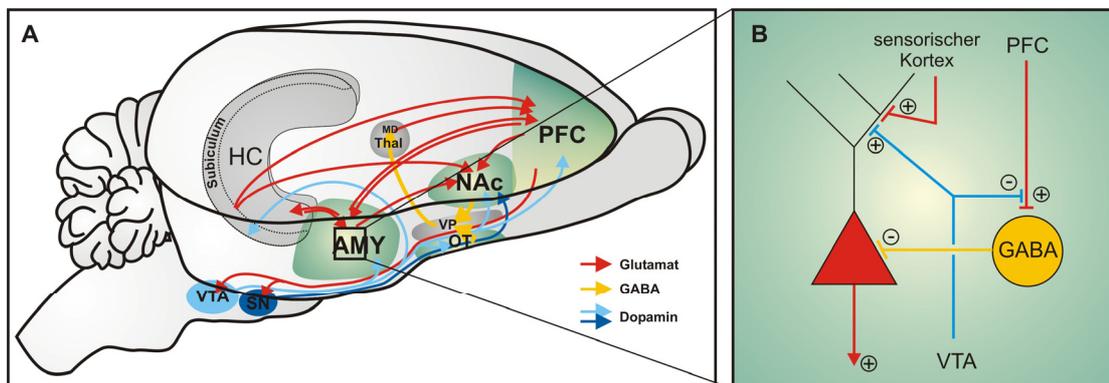
Auch sollte eine Reduzierung der phasischen Dopaminaktivität im NAc zu einer geringeren Suchtneigung führen, da die reizbedingte Dopaminausschüttung dann nicht mehr so stark wäre (Di Chiara, 2002). Dies sollte eine verringerte Verstärkung dieser Reize zur Folge haben (s.o.). Tatsächlich konnte an Ratten eine verminderte Verstärkerwirkung von Kokain im Erwachsenenalter (P 60) nach chronischer MPH-Behandlung während der Adoleszenz (2 mg/kg; von P 20-35) festgestellt werden (Andersen et al., 2002b; Carlezon, Jr. et al., 2003).

Wie aktuelle Berichte zeigen, sinkt auch das erhöhte Suchtpotential von ADHS-Betroffenen offenbar nach der MPH-Behandlung (Huss und Lehmkuhl, 2002; Wilens et al., 2003).

### 4.2.3 Die Amygdala

#### Zur Dopaminfunktion in der Amygdala

Die Amygdala, besonders der BLA, unterhält intensive reziproke Verbindungen mit dem mPFC (McDonald et al., 1996; Pitkanen, 2000). Die Verbindung von PFC und Amygdala ist von entscheidender Bedeutung für die Bildung emotionaler Reaktionen (Bertolucci-D'Angio et al., 1990) und ihre Kontrolle (Morgan et al., 1993; Rosenkranz und Grace, 2001). Fehlt diese Kontrolle, kann der Organismus nicht mehr adäquat auf ungefährliche Reize reagieren (Morgan et al., 1993; Zahrt et al., 1997). Der PFC steuert die Aktivität amygdalärer Pyramidenzellen, indem er GABAerge Interneuronen erregt. Diese Erregung GABAerger Neuronen bedingt eine Hemmung der kortikalen und thalamischen Eingänge und dämpft die Aktivität der amygdalären Projektionen (Morgan et al., 1993; Rosenkranz



**Abb. 4.2: Vereinfachte schematische Darstellung (A) des limbisch-präfrontalen Systems und (B) der Verschaltung in der Amygdala (untersucht in der BLA)**

(B) Glutamaterge Afferenzen (rot) aus dem PFC terminieren hauptsächlich an GABAergen Interneuronen (gelb), wogegen z.B. sensorische Kortexareale vorwiegend synaptische Verbindungen mit glutamatergen Projektionsneuronen ausbilden. Diese Afferenzen werden mittels Dopamin (blau) prä- und postsynaptisch moduliert. +-Zeichen bedeuten eine erregende und --Zeichen eine hemmende Wirkung. Abkürzungen siehe Abb. 1.4, Einleitung.

und Grace, 1999; Rosenkranz und Grace, 2001; Rosenkranz und Grace, 2002).

Dopamin wirkt hier gewissermaßen wie ein Gegenspieler zu den Einflüssen des PFC. Einerseits führt die Aktivierung von D<sub>1</sub>-Rezeptoren zu einer präsynaptischen Hemmung der PFC-Afferenzen und andererseits wird die Erregbarkeit der amygdalären Projektionsneuronen durch Aktivierung von D<sub>2</sub>-Rezeptoren erhöht (Abb. 4.2B), was den erregenden Einfluss der kortikalen und thalamischen Eingänge verstärkt (Rosenkranz und

Grace, 2002). Die Dopaminaktivität entscheidet sozusagen darüber, wie sehr ein affektives Verhalten von sensorischen Reizen bestimmt wird (Rosenkranz und Grace, 2002)

### **Zur MPH-Wirkung und dopaminergen Innervationsdichte in der Amygdala**

*Die MPH-Behandlung bewirkt im BLA und im CeAm die Verhinderung des Handlingeffekts, in der Form, dass die erhöhte Faserdichte im BLA und die abgesenkte Innervationsdichte im CeAm nicht zugelassen werden.* Das Ergebnis im BLA ist für sich als positiv zu interpretieren, da eine erhöhte Dopaminfaserdichte in diesem Gebiet eine stärkere Imbalance zwischen der präfrontalen und amygdalären Dopamininnervation bedeutet (Busche et al., 2004; Polascheck, 2004). Diese Imbalance im mesolimbischen Dopaminsystem korreliert mit einer erhöhten Furchtreaktion und einer schlechteren Furchtbewältigung der Tiere (Polascheck, 2004). Die mangelnde Furchtbewältigung bei dauerhaft erhöhter Dopaminfunktion liegt wahrscheinlich in der zu starken Hemmung der schon abgeschwächten PFC-Afferenzen begründet, durch die die indirekte Hemmung der amygdalären Projektionen abgeschwächt wird. Somit bedingen sensorische Reize schneller eine emotionale Reaktion.

Die Wirkung von MPH ist in der Amygdala bisher allerdings nicht weiter untersucht, wodurch sich die Einordnung und Übertragbarkeit der Befunde schwierig gestaltet.

Nur eine Untersuchung an Ratten von Bolanos und Kollegen liefert Ergebnisse zur Langzeitwirkung von MPH auf das emotionale Verhalten. Die Resultate zeigen zusammenfassend, dass die chronische MPH-Behandlung (4 mg/kg/Tag; P 20 – 35) das Antwortverhalten auf Verstärkerreize im Erwachsenenalter (P 90) abschwächt und die Sensitivität gegenüber aversiven Stimuli erhöht. So konnte im „elevated-plus-maze“-Test eine erhöhte „Ängstlichkeit“ der Tiere nach MPH-Behandlung festgestellt werden. Weiterhin wurde eine erniedrigte Lokomotion in einer neuen Umgebung gezeigt, was unter anderem Ausdruck für eine stärkere Furchtreaktion sein kann (Bolanos et al., 2003).

Die Emotionalität bei ADHS-Betroffenen gilt Berichten nach als erhöht (Neuhaus, 2002). Eine veränderte Emotionsverarbeitung muss aufgrund der engen Einbindung der Amygdala in das limbo-präfrontale System und der beschriebenen Veränderungen der Dopaminfunktion im PFC und NAc auch unbedingt angenommen werden.

Entgegen früherer Studien unserer Abteilung, in denen eine exzessive Reifung der mesolimbischen Dopaminbahn in den BLA nach frühkindlicher MA-Intoxikation nachgewiesen werden konnte (Busche et al., 2004; Polascheck, 2004), zeigt sich in der vorliegenden Untersuchung nach Handling ein gegenteiliger Befund. *Der chronische milde*

*Handlingstress führt nach frühkindlicher Traumatisierung zu einer erniedrigten Innervationsdichte auf dem Niveau unbehandelter Kontrollen.* Dieser Befund ist aber nur zu einem gewissen Teil als positiv zu betrachten, da die Tiere aus restriktiver Aufzucht stammen und somit entwicklungsbedingt schon eine Imbalance des dopaminergen Systems besitzen. Das bedeutet, dass sie ähnliche Verhaltensauffälligkeiten haben sollten, wie sie für Tiere aus restriktiver Aufzucht gezeigt worden sind (Polascheck, 2004).

*Die erhöhte Innervationsdichte nach MPH-Behandlung traumatisierter Tiere bedeutet eine Veränderung in der Emotionsverarbeitung.* Die Bewertung dieses Befundes fällt allerdings schwer, da dieser Aspekt bei Untersuchungen zur MPH-Wirkung von ADHS-Betroffenen nur unzureichend berücksichtigt wird. Von unseren modellhaft traumatisierten Tieren ausgehend wäre zu erwarten, dass sich eine veränderte affektive Handlungsweise auch bei ADHS-Betroffenen nach einer Langzeittherapie mittels MPH einstellt. Hier besteht dringender Forschungsbedarf.

### 4.3 I.p.-Studie

Ein gänzlich anderes Bild morphogener Effekte im Vergleich zur oralen Vergabe zeigte sich nach i.p.-Applikation von MPH. *Hier hatte die MPH-Vergabe der klinisch relevanten Dosierung eine suppressive Dopaminfaserreifung sowohl im NAc als auch im BLA zur Folge. Bei frühkindlich mittels MA-Intoxikation traumatisierten Tieren ergibt sich in einer Subregion der Amygdala (CeAl) eine exzessive Dopaminreifung nach chronischer Vergabe der überhöhten Dosierung MPH.*

Diese ungleichen Langzeitwirkungen gehen mit unterschiedlichen akuten Wirkungsprofilen von MPH einher. So ergibt sich eine veränderte Pharmakokinetik und eine wesentlich höhere Bioverfügbarkeit des Wirkstoffs nach i.p.-Vergabe. MPH unterliegt nach oraler Vergabe einem ausgeprägten hepatischen First-Pass-Metabolismus, der durch die Injektion umgangen wird. Somit wird ein vielfach höherer Plasmaspiegel erreicht (Faraj et al., 1974). Ferner ist der Plasmalevel positiv mit dem extrazellulären Dopaminspiegel korreliert, was bedeutet, dass die gleiche Dosis MPH nach i.p.-Vergabe gegenüber der oralen Vergabe eine erhöhte extrazelluläre Dopaminkonzentration bedingt (Gerasimov et al., 2000).

### 4.3.1 Das ventrale Striatum

#### Zur MPH-Wirkung und dopaminergen Innervationsdichte im Nucleus accumbens

*Im NAc zeigt sich nach MPH-Behandlung mit der klinisch relevanten Dosierung eine erniedrigte Innervationsdichte.*

Ein vergleichbarer Befund ergibt sich aus Arbeiten unserer Abteilung an Käfigtieren, die frühkindlich MA-intoxiziert, aber nicht chronisch gehandelt wurden (Neddens et al., 2002; Lesting et al., 2005).

Aus diesem Ergebnis wird deutlich, dass der schon gezeigte signifikant höhere extrazelluläre Dopaminspiegel nach i.p.-Vergabe im Vergleich zur oralen Vergabe (Gerasimov et al., 2000) morphogene Prozesse auslöst, die über die oben beschriebenen Anpassung auf molekularer und Rezeptorebene hinausgehen (siehe Abschnitt 4.2.2). Für MPH sind bislang zwar, im Gegensatz zu anderen Amphetaminderivaten, keine toxischen Effekte nachgewiesen (Wagner et al., 1980; Zaczek et al., 1989; Yuan et al., 1997), doch bedingt das Pharmakon die Verhinderung der normalen Ausreifung dopaminerger Fasern im NAc.

Dieses Ergebnis bedeutet eine enorme Störung der Integration von limbischen und kognitiven Informationen auf Ebene des NAc, die mit erheblichen Verhaltensdefiziten einhergehen sollte.

*Erstaunlicherweise ist nach Vergabe der überhöhten Dosierung keine entsprechende Veränderung der Innervationsdichte zu verzeichnen, obwohl der extrazelluläre Dopaminspiegel mit steigender MPH-Dosis ebenfalls weiter erhöht wird (Gerasimov et al., 2000).*

Dieser Befund bedeutet also nicht, dass der chronische Missbrauch einer hohen Dosis MPH ungefährlicher wäre als die Verwendung niedrigerer Dosierungen, sondern sind hier ebenfalls langfristige Veränderungen zu erwarten, die sich nicht in einer veränderten dopaminergen Faserdichte im ventralen Striatum äußern.

Dies kann sich unter anderem in morphologischen Veränderungen der „medium spiny“-Neuronen ausdrücken. Ein entsprechender Befund ist an Ratten erhoben worden, die chronisch Kokain erhalten haben (15 mg/kg/Tag; für vier Wochen). So konnten Robinson und Kolb zeigen, dass die Zahl der dendritischen Verzweigungen und die Spinedichte der „medium spiny cells“ im NAc nach der Vergabe von Kokain erhöht sind. Entsprechende Veränderungen treten auch an den apikalen Dendriten von Lamina V Pyramidenneuronen im PFC auf (Robinson und Kolb, 1999). Dieser Befund ist durchaus auf den Missbrauch

von MPH übertragbar, da intravenös (i.v.) verabreichtes Kokain eine vergleichbare Wirkung entfaltet wie i.v. appliziertes MPH (Volkow et al., 1999).

Auch konnte eine weitere Studie an Ratten zeigen, dass eine einmalige i.p. applizierte hohe Dosis MPH (30 mg/kg) genau wie Kokain (40 mg/kg) einen sensitivierenden Einfluss ausübt. Auf eine nachfolgende geringe Menge Amphetamin (1,5 mg/kg; i.p.) reagieren die Tiere wie nach der sensitivierenden MPH- bzw. Kokaininjektion mit ausgeprägtem stereotypen Verhalten (Kuczenski und Segal, 1999). Die gefundene Sensitivierung wird als ein Indiz für höhere Suchtanfälligkeit interpretiert, was bedeutet, dass sich langfristige Veränderungen im mesoaccumbalen Dopaminsystem einstellen sollten (siehe Abschnitt 4.2.2).

Dieser Befund macht deutlich, dass schon eine einmalige hohe Dosierung MPH langfristige Veränderungen hervorruft, die nach chronischer Vergabe noch verstärkt sein sollte.

### **4.3.2 Die Amygdala**

#### **Zur MPH-Wirkung und dopaminergen Innervationsdichte in der Amygdala**

*Die MPH-Behandlung mit der niedrigen Dosierung führt in dem CeAm zu einer abgesenkten Faserdichte, die im LA und im BLA ebenfalls tendenziell zu verzeichnen sind.*

Die Funktion von Dopamin im CeA ist noch nicht genauer untersucht. Aufgrund der neuronalen Einbindung mit massiven Projektionen in den Hypothalamus und den Hirnstamm (siehe Abschnitt 1.6.3, Einleitung), durch die der CeA vegetative Reaktionen auslöst, ist zu vermuten, dass Dopamin eine wichtige Funktion bei der Modulation adäquater autonomer und endokriner Antworten auf affektive Reize zukommt. Eine wichtige Rolle für das Angstverhalten spielen auch die im CeA gelegenen Corticotropin-Releasing-Faktor-(CRF-)produzierenden Neuronen. Über Projektionen zum Hypothalamus und zum Hirnstamm sind sie in der Lage endokrine und vegetative Angstreaktionen auszulösen (Yilmazer-Hanke, 2003). Diese CRF-produzierenden Neuronen werden überwiegend dopaminerg innerviert (Eliava et al., 2003). Die Aktivität dieser Neuronen wird wahrscheinlich von Dopamin gehemmt, sodass die abgesenkte Dopaminfaserdichte nach MPH-Behandlung zu einer verstärkten Aktivität der CRF-Neuronen und somit zu einer gesteigerten Angstreaktion führen sollte.

*Die tendenziell abgesenkten Faserdichten im LA und im BLA nach MPH-Vergabe sollten zudem zu einer gestörten Modulation der amygdalären Reizverarbeitung führen (siehe Abschnitt 4.2.3).*

*Wie im NAc führt die MPH-Behandlung mit der überhöhten Dosierung in der Amygdala zu keinen Veränderungen der Innervationsdichte.* Doch auch für dieses Gebiet des limbopräfrontalen Systems müssen Veränderungen im Dopaminsystem nach einem so heftigen dauerhaften Eingriff unbedingt angenommen werden.

Einen Hinweis für Umbauprozesse in der Amygdala nach Behandlung mit einer hohen MPH-Dosierung liefert eine Studie, die eine veränderte Sensitivität metabotroper Glutamatrezeptoren in der CeA nach 14-tägiger Vergabe von Kokain (30 mg/kg/Tag; i.p.) festgestellt hat (Neugebauer et al., 2000).

*Im LA bewirkt die frühkindliche Traumatisierung eine erhöhte dopaminerge Faserdichte.* Diese morphogene Wirkung der einmaligen MA-Intoxikation im LA ist in unserer Arbeitsgruppe auch für nicht gehandelte, chronisch deprivierte Tiere gezeigt worden (Polascheck, 2004). Diese erhöhte Dopaminfaserdichte im LA deutet auf die Ausbildung der schon beschriebenen Imbalance im dopaminergen System hin, die für nicht gehandelte MA-intoxizierte Käfigtiere in unserer Arbeitsgruppe gezeigt wurde (Busche et al., 2004).

*Die Behandlung mit MPH führt bei frühkindlich traumatisierten Tieren nach überhöhter Dosierung im CeAI zu einer erhöhten Innervationsdichte.* Der CeAI ist eine Subregion des CeA und somit ebenfalls für die Steuerung des vegetativen Verhaltens zuständig, bei der Dopamin eine wichtige modulierende Funktion haben sollte (s.o.). Schließlich ist der CeAI das am dichtest dopaminerg innervierte Kerngebiet der Amygdala.

Der vorgenannte Befund liefert den einzigen Hinweis der vorliegenden Arbeit, dass chronisch i.p.-appliziertes MPH eine strukturelle Langzeitwirkung nach frühkindlicher Traumatisierung hat.

Dies kann in einem höheren Stresspotential der i.p.-Applikationsform begründet liegen, die dann zu einer höheren Dopaminausschüttung führen sollte als der milde Handlingstress der oralen Vergabe, sodass die MPH-Wirkung eventuell von diesem stressbedingten Effekt überlagert wird. Einen Hinweis für die Vermutung liefert eine Studie, die nach stärker werdenden Fußschocks einen erhöhten Dopaminmetabolismus gezeigt hat (Gonenc et al., 2000)

Dass der ausbleibende Langzeiteffekt nach MPH-Gabe besonders bei MA-intoxizierten Tieren zu finden ist, liegt möglicherweise an dem sehr stark entwicklungsgestörten mesolimbokortikalen Dopaminsystem dieser Tiere, das sich eventuell nicht mehr strukturplastisch an wechselnde Bedingungen adaptieren kann.

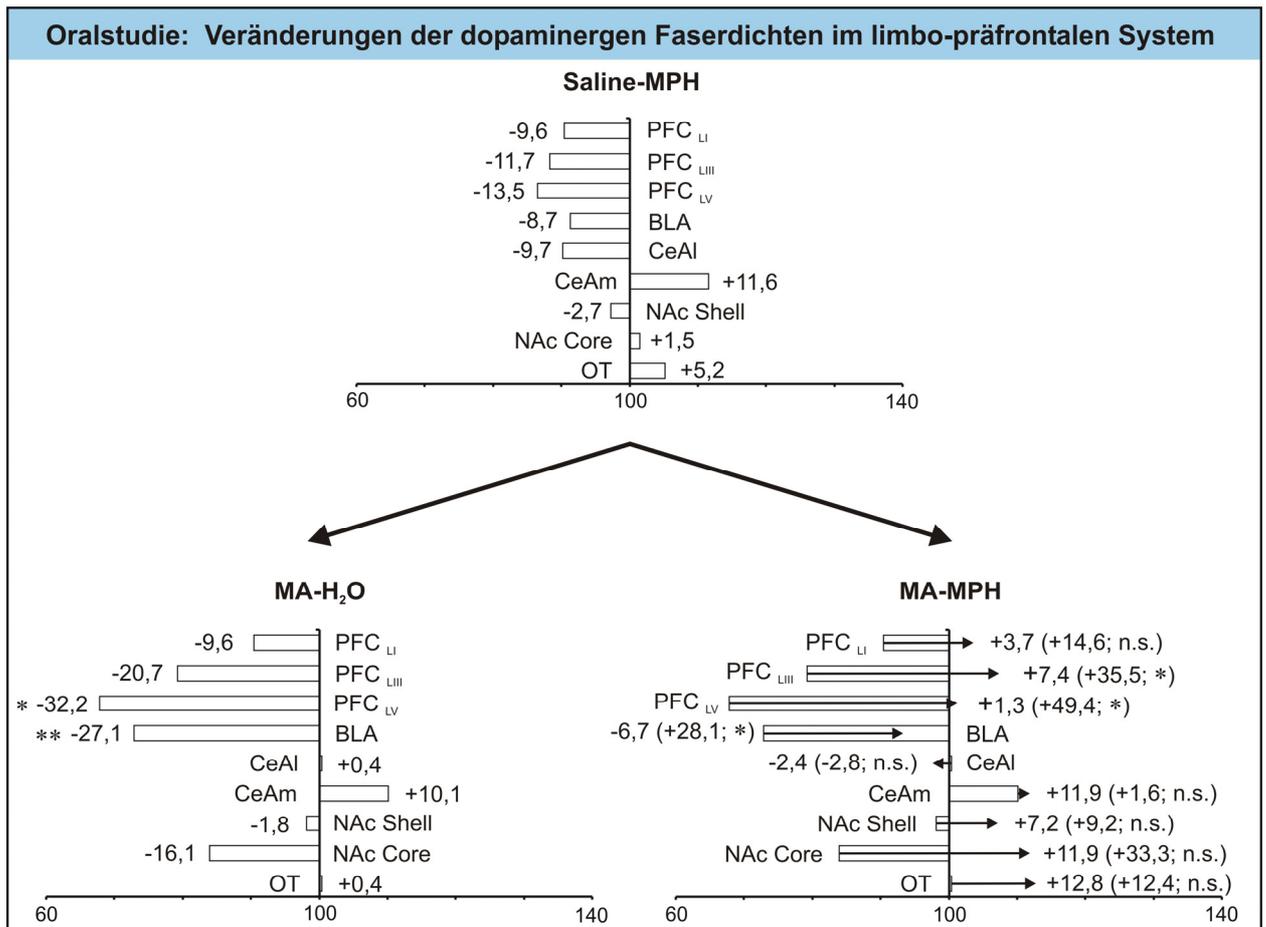
Auch würden sich die ausbleibenden Veränderungen nach Vergabe der überhöhten Dosierung bei nicht-traumatisierten Tieren mit der möglicherweise verhinderten Strukturplastizität erklären lassen.

#### 4.4 Fazit

Festzuhalten gilt, dass die drei untersuchten Zielregionen des mesolimbischen Dopaminsystems (PFC, NAc, Amygdala) nach **oralen Vergabe** von MPH teilweise in gleicher und teilweise in unterschiedlicher Weise auf die Behandlung ansprechen.

Die chronische Behandlung mit MPH (z.B. Ritalin<sup>®</sup>) während der Adoleszenz sollte, ausgehend von der modellhaften dopaminergen Entwicklungsstörung (ausgelöst durch restriktive Aufzucht und MA-Intoxikation), dauerhaft zu verbesserten kognitiven Fähigkeiten, einer verminderten Impulsivität und einer veränderten Affektivität führen. Letztere sollte aber mit einer stärkeren Kontrolle von Affektverhalten (z.B. gesteigerte Furchtbewältigung), aufgrund der funktionellen Reifung des PFC, verbunden sein. Zusammenfassend sind die Veränderungen der behandelten Gruppen als prozentuale Veränderungen gegenüber der behandelten Kontrolle, ohne Berücksichtigung der unbehandelten Kontrollen, in Abbildung 4.3 gezeigt. Die drei Diagramme stellen die Ergebnisse alternativer Entwicklungen dar, wobei die MPH-Behandlung bei Kontrolltieren (Saline-MPH) keine Veränderungen bewirkt. Die frühkindliche MA-Intoxikation (MA-H<sub>2</sub>O) führt allerdings im PFC und im BLA zu einer suppressiven Entwicklung von Dopaminfasern, die durch die chronische MPH-Behandlung (MA-MPH) verhindert wird.

Die positiven Effekte der MPH-Behandlung nach frühkindlicher Traumatisierung sind aber nur bei gleichzeitiger zusätzlicher Stimulation (hier durch Handling) zu verzeichnen. Im übertragenen Sinn heißt das, dass die pharmakologische Therapie nur in Begleitung z.B. mit einer Verhaltenstherapie die in dieser Arbeit dargelegten Veränderungen bewirken kann. Wie sich eine chronische orale Vergabe ohne die gleichzeitige Stimulation auf die Ausreifung des mesolimbokortikalen Dopaminsystems auswirkt, muss erst noch durch weitere Studien geklärt werden.



**Abb. 4.3: Veränderungen der dopaminergen Faserdichten im limbo-präfrontalen System nach oraler Vergabe von MPH**

Die Graphik stellt die Veränderungen der gehandelten Gruppen, ohne die unbehandelten Kontrollen, dar. (1) Nach der Behandlung nicht-traumatisierter Tiere mit MPH (Saline-MPH), die sich nicht signifikant von der Kontrollgruppe unterscheidet. (2) Die traumatisierte Kontrollgruppe (MA-H<sub>2</sub>O), die sich durch die minder gereifte Innervation im PFC (Lamina III unerschwellig;  $p=0,1426$ ; Lamina V signifikant;  $p=0,0220$ ) und im BLA ( $p=0,0082$ ) auszeichnet. (3) Die traumatisierte und chronisch mit MPH behandelte Gruppe (MA-MPH) mit den im PFC (Lamina III;  $p=0,0442$  und V;  $p=0,0142$ ) und im BLA ( $p=0,0372$ ) signifikanten Veränderungen im Vergleich zur traumatisierten Kontrollgruppe (Pfeile und Werte mit Angaben zur Signifikanz in den Klammern). Die chronische MPH-Behandlung verhindert die negativen Entwicklungsfolgen des frühkindlichen MA-Traumas und bedingt einen morphologischen Zustand der dem nicht-traumatisierter Kontrolltiere entspricht.

Dargestellt sind die prozentualen Veränderungen zur Saline-H<sub>2</sub>O-Kontrollgruppe dessen Werte in allen Regionen als 100% gesetzt wurden und somit die Ordinate bildet. Abweichungen von diesem Wert sind in Prozent ausgedrückt (verändert nach Grund et al., 2005).

Im Abgleich mit den unbehandelten Kontrollen stellt sich heraus, dass MPH (Ritalin<sup>®</sup>) bei Tieren ohne MA-Intoxikation einen negativen Einfluss hat. Die durch Handling signifikant erhöhte Dopamininnervation in präfrontalen Gebieten wurde durch die MPH-Behandlung leicht verhindert. Dies sollte übertragen auf die klinische Situation bedeuten, dass eine Verbesserung kognitiver Funktionen mittels z.B. einer Verhaltenstherapie bei nicht ADHS-Betroffenen durch eine zusätzliche Medikamentierung mit MPH (Ritalin<sup>®</sup>) eher verhindert werden könnte. Das sind natürlich sehr weit reichende Interpretationen, die

unbedingt weiterer präklinischer Studien bedürfen, um sie entsprechend auf die klinische Anwendung zu übertragen.

Ein gänzlich anderes Bild zeichnet sich nach der missbräuchlichen Anwendung des Wirkstoffs durch **i.p.-Applikation** ab. Hier sind als Langzeitwirkungen der klinisch relevanten Dosierung erhebliche Beeinträchtigungen gezeigt worden. Zum einen verhindert die chronische MPH-Gabe die Ausbildung des normalen dopaminergen Innervationsmusters im NAc und zum anderen führt es zu einem zu starken Abbau dopaminergere Fasern im CeAm.

Insgesamt ist also eine drastisch gestörte Entwicklung des mesolimbokortikalen Dopaminsystems zu verzeichnen, was mit bleibenden Einbußen im Verhalten verbunden sein sollte.

Um ein abschließendes Bild zu bekommen, muss unbedingt in weiteren Studien die Wirkung auf die Dopaminreifung im PFC, als zentrales Glied im limbo-präfrontalen System (Le Moal und Simon, 1991), bewertet werden, der aufgrund von zeitlichen Problemen in der vorliegenden Arbeit nicht ausgewertet werden konnte.

Die Befunde der vorliegenden Studien lassen die allgemeine Schlussfolgerung zu, dass unbedingte Vorsicht im Umgang mit Methylphenidat (z.B. Ritalin<sup>®</sup>) geboten ist. Denn MPH hat eine deutliche morphogene Wirkung auf die Dopaminreifung und es nimmt somit einen dauerhaften Einfluss auf höchste Hirnstrukturen. Es wäre nunmehr von großer Wichtigkeit, weitere Strukturveränderungen zu analysieren; eine umfangreiche quantitative GABA-Auswertung wird zurzeit an meinem Material durchgeführt. Für die Anwendung von MPH ist weiterhin aus den vorliegenden Befunden abzuleiten, dass eine eindeutige Diagnose notwendig ist, da gezeigt werden konnte, dass MPH (z.B. Ritalin<sup>®</sup>) je nach Responderstatus eine unterschiedliche Wirkung entfaltet. Somit können positive Effekte nur bei ADHS-Betroffenen zu erwarten sein. Über die Folgen missbräuchlichen Umgangs muss weitläufig aufgeklärt werden, um diesen so gut wie möglich zu unterbinden.

## 5 Eigene Arbeiten

### Publikationen

- Grund T, Busche A, Neddens J, Teuchert-Noodt G, Dawirs RR, Moll GH (2005): Oral methylphenidate during prepuberty prevents pharmacologically-induced (preweaning) suppressive development of dopamine projections into prefrontal cortex and amygdala. (in prep.)
- Lehmann K, Grund T, Bagorda A, Bagorda F, Busche A (2005): Post-weaning handling partly protects dopamine projections and hippocampal cell proliferation from the adverse effects of isolated rearing. *Exp Neurol* (submitted)
- Neddens J, Grund T, Czok A, Teuchert-Noodt G (2005): A single methamphetamine challenge in adult gerbils exerts region-specific effects on dopamine fibre density in the nucleus accumbens. (in prep.)
- Schäfers A, Grund Th, Teuchert-Noodt G (2005): Das Syndrom der Aufmerksamkeits-Defizit-(Hyperaktivitäts-)Störung aus neurobiologischer, neuropharmakologischer und schulpädagogischer Sicht (Teil 1: Definition – Symptome – Ursachen). *ZNS & Schmerz* 2/05: 2-19
- Schäfers A, Grund Th, Teuchert-Noodt G (2005): Das Syndrom der Aufmerksamkeits-Defizit-(Hyperaktivitäts-)Störung aus neurobiologischer, neuropharmakologischer und schulpädagogischer Sicht (Teil 2: Diagnostik – Therapie – Methylphenidat (Ritalin®)). *ZNS & Schmerz* 3/05 (in press)
- Schäfers A, Grund Th, Teuchert-Noodt G (2005): Das Syndrom der Aufmerksamkeits-Defizit-(Hyperaktivitäts-)Störung aus neurobiologischer, neuropharmakologischer und schulpädagogischer Sicht (Teil 3: Methylphenidat (Ritalin®) und Schulleistungen – Pädagogische Konsequenzen). *ZNS & Schmerz* 4/05 (in press)
- Teuchert-Noodt G, Bagorda F, Schroeder U, Polascheck D, Grund T (2003): "Lernen durch Lehren: Physiologische Grundlagen des Lernens". Film auf DVD, *erschienen im IWF (Göttingen) unter der Mediennummer C 12425*

**Drittmittelprojekt (Deutsche Parkinson Vereinigung)**

Stellvertretender federführender Projektleiter des Drittmittelprojekts: Epigenetisch induzierte pathologische Veränderungen monoaminerger Fasersysteme im reifen und alternden Gehirn: Quantitative Studien zum Einfluss pharmakologischer und umweltbedingter Faktoren auf die neuronale Funktionsanatomie am Modell der Maus.

Antragsteller und federführender Projektleiter: Dr. Jörg Neddens; bewilligt von der Deutschen Parkinson Vereinigung.

Förderungsdauer: 01.10.2002 bis 30.09.2004, OZ 20940, Universität Bielefeld, Fakultät für Biologie, Bereich Neuroanatomie

**Betreuungsleistungen**

Schäfers A (2005): Zum Einfluss von Methylphenidat (Ritalin®) auf die dopaminerge Innervation im Corpus amygdaloideum (Eine quantitative Studie an *Meriones unguiculatus* und mögliche Konsequenzen für das Verhalten und die Behandlung von Schulkindern). *Schriftliche Hausarbeit für das Lehramt, Sekundarstufe I und II, Universität Bielefeld*

Sprenger JO (2003): Zum Einfluss von Methylphenidat (Ritalin) auf die Neurogenese im hippocampalen Dentatus der Maus (Eine quantitative Studie und mögliche Konsequenzen für die Behandlung von Schulkindern). *Schriftliche Hausarbeit für das Lehramt, Sekundarstufe I und II, Universität Bielefeld*

## 6 Literatur

- Abercrombie ED, Keefe KA, DiFrischia DS, Zigmond MJ (1989): Differential effect of stress on in vivo dopamine release in striatum, nucleus accumbens, and medial frontal cortex. *J Neurochem* Vol. 52(5): 1655-1658.
- Akert K (1994): Limbisches System. In: Drenckhahn D, Zenker W (eds.), *Benninghoff Anatomie - Makroskopische Anatomie, Embryologie und Histologie des Menschen (Bd. 2)*. Urban & Schwarzenberg, München - Wien - Baltimore: 603-627.
- Alheid GF, de Olmos JS, Beltramino CA (1995): Amygdala and Extended Amygdala. In: Paxinos G (ed.), *The Rat Nervous System*. Academic Press, Sydney: 495-578.
- Andersen SL, Rutstein M, Benzo JM, Hostetter JC, Teicher MH (1997): Sex differences in dopamine receptor overproduction and elimination. *Neuroreport* Vol. 8(6): 1495-1498.
- Andersen SL, Teicher MH (2000): Sex differences in dopamine receptors and their relevance to ADHD. *Neurosci Biobehav Rev* Vol. 24(1): 137-141.
- Andersen SL, Dumont NL, Teicher MH (2002a): Differences in behavior and monoamine laterality following neonatal clomipramine treatment. *Dev Psychobiol* Vol. 41(1): 50-57.
- Andersen SL, Arvanitogiannis A, Pliakas AM, LeBlanc C, Carlezon WA, Jr. (2002b): Altered responsiveness to cocaine in rats exposed to methylphenidate during development. *Nat Neurosci* Vol. 5(1): 13-14.
- Arnsten AFT, Goldman-Rakic PS (1984): Selective prefrontal cortical projections to the region of the locus coeruleus and raphe nuclei in the rhesus monkey. *Brain Res* Vol. 306(1-2): 9-18.
- Arnsten AFT (1998a): Catecholamine modulation of prefrontal cortical cognitive function. *Trends Cogn Sci* Vol. 2(11): 436-447.
- Arnsten AFT, Goldman-Rakic PS (1998): Noise stress impairs prefrontal cortical cognitive function in monkeys: evidence for a hyperdopaminergic mechanism. *Arch Gen Psychiatry* Vol. 55(4): 362-368.
- Arnsten AFT (1998b): The biology of being frazzled. *Science* Vol. 280(5370): 1711-1712.
- Arnsten AFT, 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* Vol. 1(1): 2.
- Asan E (1997): Ultrastructural features of tyrosine-hydroxylase-immunoreactive afferents and their targets in the rat amygdala. *Cell Tissue Res* Vol. 288(3): 449-469.
- Asan E (1998): The catecholaminergic innervation of the rat amygdala. *Adv Anat Embryol Cell Biol* Vol. 142: 1-118.
- Baldwin JD, Baldwin JI (1977): The role of learning phenomena in the ontogeny of exploration and play. In: Chevalier-Skolnikoff S, Poirier FE (eds.), *Primate bio-social development*. Garland, New York: 343-406.
- Barbarese WJ, Katusic SK, Colligan RC, Pankratz VS, Weaver AL, Weber KJ, Mrazek DA, Jacobsen SJ (2002): How common is attention-deficit/hyperactivity disorder? Incidence in a population-based birth cohort in Rochester, Minn. *Arch Pediatr Adolesc Med* Vol. 156(3): 217-224.
- Barbas H, Blatt GJ (1995): Topographically specific hippocampal projections target functionally distinct prefrontal areas in the rhesus monkey. *Hippocampus* Vol. 5(6): 511-533.
- Berendse HW, Galis-de GY, Groenewegen HJ (1992): Topographical organization and relationship with ventral striatal compartments of prefrontal corticostriatal projections in the rat. *J Comp Neurol* Vol. 316(3): 314-347.

- Bergson C, Mrzljak L, Smiley JF, Pappy M, Levenson R, Goldman-Rakic PS (1995): Regional, cellular, and subcellular variations in the distribution of D1 and D5 dopamine receptors in primate brain. *J Neurosci* Vol. 15(12): 7821-7836.
- Bertolucci-D'Angio M, Serrano A, Driscoll P, Scatton B (1990): Involvement of mesocorticolimbic dopaminergic systems in emotional states. *Prog Brain Res* Vol. 85: 405-416.
- Biederman J, Milberger S, Faraone SV, Kiely K, Guite J, Mick E, Ablon S, Warburton R, Reed E (1995): Family-environment risk factors for attention-deficit hyperactivity disorder. A test of Rutter's indicators of adversity. *Arch Gen Psychiatry* Vol. 52(6): 464-470.
- Bjorklund A, Divac I, Lindvall O (1978): Regional Distribution of Catecholamines in Monkey Cerebral-Cortex, Evidence for A Dopaminergic Innervation of Primate Prefrontal Cortex. *Neurosci Lett* Vol. 7(2-3): 115-119.
- Bjorklund A, Lindvall O (1984): Dopamine-containing systems in the CNS. In: Bjorklund A, Hokfelt T (eds.), *Handbook of neuroanatomy - Classical transmitters in the CNS, Part 1*. Elsevier, Amsterdam: 55-122.
- Bolanos CA, Barrot M, Berton O, Wallace-Black D, Nestler EJ (2003): Methylphenidate treatment during pre- and periadolescence alters behavioral responses to emotional stimuli at adulthood. *Biol Psychiatry* Vol. 54(12): 1317-1329.
- Braak H, Braak E (1983): Neuronal types in the basolateral amygdaloid nuclei of man. *Brain Res Bull* Vol. 11(3): 349-365.
- Brake WG, Zhang TY, Diorio J, Meaney MJ, Gratton A (2004): Influence of early postnatal rearing conditions on mesocorticolimbic dopamine and behavioural responses to psychostimulants and stressors in adult rats. *Eur J Neurosci* Vol. 19(7): 1863-1874.
- Brinley-Reed M, McDonald AJ (1999): Evidence that dopaminergic axons provide a dense innervation of specific neuronal subpopulations in the rat basolateral amygdala. *Brain Res* Vol. 850(1-2): 127-135.
- Broadbent D (1971): *Decision and Stress*. Academic Press,
- Broca P (1878): Anatomie comparé de circonvolutions cérébrales. Le grand lobe limbique et la scissure limbique dans le série des mammifères. *Revue d'Anthropologie* Vol. 1: 385-498.
- Brodmann K (1909): *Vergleichende Lokalisationslehre der Großhirnrinde in ihren Prinzipien dargestellt auf Grund des Zellenbaues*. Barth, Leipzig.
- Brog JS, Salyapongse A, Deutch AY, Zahm DS (1993): The patterns of afferent innervation of the core and shell in the "accumbens" part of the rat ventral striatum: immunohistochemical detection of retrogradely transported fluoro-gold. *J Comp Neurol* Vol. 338(2): 255-278.
- Busche A, Polascheck D, Lesting J, Neddens J, Teuchert-Noodt G (2004): Developmentally induced imbalance of dopaminergic fibre densities in limbic brain regions of gerbils (*Meriones unguiculatus*). *J Neural Transm* Vol. 111(4): 451-463.
- 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* Vol. 27(5): 699-711.
- Campbell L, Malone MA, Kershner JR, Roberts W, Humphries T, Logan WJ (1996): Methylphenidate slows right hemisphere processing in children with attention-deficit/hyperactivity disorder. *J Child Adolesc Psychopharmacol* Vol. 6(4): 229-239.
- Carboni E, Silvagni A (2004): Dopamine reuptake by norepinephrine neurons: exception or rule? *Crit Rev Neurobiol* Vol. 16(1-2): 121-128.
- Cardinal RN, Winstanley CA, Robbins TW, Everitt BJ (2004): Limbic corticostriatal systems and delayed reinforcement. *Ann NY Acad Sci* Vol. 1021: 33-50.
- Carlezon WA, Jr., Mague SD, Andersen SL (2003): Enduring behavioral effects of early exposure to methylphenidate in rats. *Biol Psychiatry* Vol. 54(12): 1330-1337.

- Carmichael ST, Price JL (1995): Sensory and premotor connections of the orbital and medial prefrontal cortex of macaque monkeys. *J Comp Neurol* Vol. 363(4): 642-664.
- Carmichael ST, Price JL (1996): Connectional networks within the orbital and medial prefrontal cortex of macaque monkeys. *J Comp Neurol* Vol. 371(2): 179-207.
- Carr DB, Sesack SR (1996): Hippocampal afferents to the rat prefrontal cortex: synaptic targets and relation to dopamine terminals. *J Comp Neurol* Vol. 369(1): 1-15.
- Carter CS, Krenner P, Chaderjian M, Northcutt C, Wolfe V (1995): Asymmetrical visual-spatial attentional performance in ADHD: evidence for a right hemispheric deficit. *Biol Psychiatry* Vol. 37(11): 789-797.
- Casey BJ, Castellanos FX, Giedd JN, Marsh WL, Hamburger SD, Schubert AB, Vauss YC, Vaituzis AC, Dickstein DP, Sarfatti SE, Rapoport JL (1997): Implication of right frontostriatal circuitry in response inhibition and attention-deficit/hyperactivity disorder. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry* Vol. 36(3): 374-383.
- Cassell MD, Gray TS, Kiss JZ (1986): Neuronal architecture in the rat central nucleus of the amygdala: a cytological, hodological, and immunocytochemical study. *J Comp Neurol* Vol. 246(4): 478-499.
- Castellanos FX, Elia J, Kruesi MJ, Marsh WL, Gulotta CS, Potter WZ, Ritchie GF, Hamburger SD, Rapoport JL (1996a): Cerebrospinal fluid homovanillic acid predicts behavioral response to stimulants in 45 boys with attention deficit/hyperactivity disorder. *Neuropsychopharmacology* Vol. 14(2): 125-137.
- Castellanos FX, Giedd JN, Marsh WL, Hamburger SD, Vaituzis AC, Dickstein DP, Sarfatti SE, Vauss YC, Snell JW, Lange N, Kaysen D, Krain AL, Ritchie GF, Rajapakse JC, Rapoport JL (1996b): Quantitative brain magnetic resonance imaging in attention-deficit hyperactivity disorder. *Arch Gen Psychiatry* Vol. 53(7): 607-616.
- Castellanos FX (1997): Toward a pathophysiology of attention-deficit/hyperactivity disorder. *Clin Pediatr (Phila)* Vol. 36(7): 381-393.
- Castellanos FX, Tannock R (2002): Neuroscience of attention-deficit/hyperactivity disorder: the search for endophenotypes. *Nat Rev Neurosci* Vol. 3(8): 617-628.
- Cheon KA, Ryu YH, Kim YK, Namkoong K, Kim CH, Lee JD (2003): Dopamine transporter density in the basal ganglia assessed with [<sup>123</sup>I]IPT SPET in children with attention deficit hyperactivity disorder. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* Vol. 30(2): 306-311.
- Ciliax BJ, Drash GW, Staley JK, Haber S, Mobley CJ, Miller GW, Mufson EJ, Mash DC, Levey AI (1999): Immunocytochemical localization of the dopamine transporter in human brain. *J Comp Neurol* Vol. 409(1): 38-56.
- Conde F, Maire-Lepoivre E, Audinat E, Crepel F (1995): Afferent connections of the medial frontal cortex of the rat. II. Cortical and subcortical afferents. *J Comp Neurol* Vol. 352(4): 567-593.
- Conners CK, Eisenberg L (1963): The effect of methylphenidate on symptomatology and learning in disturbed children. *Am J Psychiatry* Vol. 120: 458-463.
- Cook EH, Stein MA, Krasowski MD, Cox NJ, Olkon DM, Kieffer JE, Leventhal BL (1995): Association of attention-deficit disorder and the dopamine transporter gene. *Am J Hum Genet* Vol. 56(4): 993-998.
- Coulter CL, Happe HK, Bergman DA, Murrin LC (1995): Localization and quantification of the dopamine transporter: comparison of [<sup>3</sup>H]WIN 35,428 and [<sup>125</sup>I]RTI-55. *Brain Res* Vol. 690(2): 217-224.
- Cowan RL, Sesack SR, Van Bockstaele EJ, Branchereau P, Chain J, Pickel VM (1994): Analysis of synaptic inputs and targets of physiologically characterized neurons in rat frontal cortex: combined in vivo intracellular recording and immunolabeling. *Synapse* Vol. 17(2): 101-114.
- Damasio AR (1994): Descartes' error and the future of human life. *Sci Am* Vol. 271(4): 144.

- Dawirs RR, Teuchert-Noodt G, Czaniera R (1993): Maturation of the dopamine innervation during postnatal development of the prefrontal cortex in gerbils (*Meriones unguiculatus*). A quantitative immunocytochemical study. *J Hirnforsch* Vol. 34(3): 281-290.
- Dawirs RR, Teuchert-Noodt G, Czaniera R (1994): The postnatal maturation of dopamine innervation in the prefrontal cortex of gerbils (*Meriones unguiculatus*) is sensitive to an early single dose of methamphetamine. A quantitative immunocytochemical study. *J Brain Res* Vol. 35(2): 195-204.
- Dawirs RR, Teuchert-Noodt G, Czaniera R (1996): Ontogeny of PFC-related behaviours is sensitive to a single non-invasive dose of methamphetamine in neonatal gerbils (*Meriones unguiculatus*). *J Neural Transm* Vol. 103(11): 1235-1245.
- Deniau JM, Menetrey A, Thierry AM (1994): Indirect nucleus accumbens input to the prefrontal cortex via the substantia nigra pars reticulata: a combined anatomical and electrophysiological study in the rat. *Neuroscience* Vol. 61(3): 533-545.
- Descarries L, Lemay B, Doucet G, Berger B (1987): Regional and laminar density of the dopamine innervation in adult rat cerebral cortex. *Neuroscience* Vol. 21(3): 807-824.
- Deutch AY, Clark WA, Roth RH (1990): Prefrontal cortical dopamine depletion enhances the responsiveness of mesolimbic dopamine neurons to stress. *Brain Res* Vol. 521(1-2): 311-315.
- Deutch AY, Cameron DS (1992): Pharmacological characterization of dopamine systems in the nucleus accumbens core and shell. *Neuroscience* Vol. 46(1): 49-56.
- Di Chiara G (2002): Nucleus accumbens shell and core dopamine: differential role in behavior and addiction. *Behav Brain Res* Vol. 137(1-2): 75-114.
- Di Chiara G, Bassareo V, Fenu S, De Luca MA, Spina L, Cadoni C, Acquas E, Carboni E, Valentini V, Lecca D (2004): Dopamine and drug addiction: the nucleus accumbens shell connection. *Neuropharmacology* Vol. 47 Suppl 1: 227-241.
- Divac I, Mogensen J, Petrovic-Minic B, Zilles K, Regidor J (1993): Cortical projections of the thalamic mediodorsal nucleus in the rat. Definition of the prefrontal cortex. *Acta Neurobiol Exp (Wars)* Vol. 53(2): 425-429.
- Doepfner M (2000): Hyperkinetische Störungen. In: Petermann F (ed.), *Lehrbuch der klinischen Kinderpsychologie und -psychotherapie*. Hogrefe, Göttingen – Bern – Toronto - Seattle: 151-186.
- Doherty MD, Gratton A (1996): Medial prefrontal cortical D1 receptor modulation of the meso-accumbens dopamine response to stress: an electrochemical study in freely-behaving rats. *Brain Res* Vol. 715(1-2): 86-97.
- Dougherty DD, Bonab AA, Spencer TJ, Rauch SL, Madras BK, Fischman AJ (1999): Dopamine transporter density in patients with attention deficit hyperactivity disorder. *Lancet* Vol. 354(9196): 2132-2133.
- Eliava M, Yilmazer-Hanke D, Asan E (2003): Interrelations between monoaminergic afferents and corticotropin-releasing factor-immunoreactive neurons in the rat central amygdaloid nucleus: ultrastructural evidence for dopaminergic control of amygdaloid stress systems. *Histochem Cell Biol* Vol. 120(3): 183-197.
- Erickson SL, Akil M, Levey AI, Lewis DA (1998): Postnatal development of tyrosine hydroxylase- and dopamine transporter-immunoreactive axons in monkey rostral entorhinal cortex. *Cereb Cortex* Vol. 8(5): 415-427.
- Ernst M, Zametkin AJ, Matochik JA, Jons PH, Cohen RM (1998): DOPA decarboxylase activity in attention deficit hyperactivity disorder adults. A [fluorine-18]fluorodopa positron emission tomographic study. *J Neurosci* Vol. 18(15): 5901-5907.
- Fahn S, Cohen G (1992): The oxidant stress hypothesis in parkinsons-disease - Evidence supporting it. *Ann Neurol* Vol. 32(6): 804-812.

- Fallon JH, Ciofi P (1992): Distribution of monoamines within the amygdala. In: Aggleton JP (ed.), *The Amygdala: Neurobiological aspects of emotion, memory, and mental dysfunction*. Wiley-Liss, New York: 97-114.
- Faraj BA, Israili ZH, Perel JM, Jenkins ML, Holtzman SG, Cucinell SA, Dayton PG (1974): Metabolism and disposition of methylphenidate-<sup>14</sup>C: Studies in man and animals. *J Pharmacol Exp Ther* Vol. 191(3): 535-547.
- Faraone SV, Biederman J (1998): Neurobiology of attention-deficit hyperactivity disorder. *Biol Psychiatry* Vol. 44(10): 951-958.
- Feenstra MG, Botterblom MH, van Uum JF (1998): Local activation of metabotropic glutamate receptors inhibits the handling-induced increased release of dopamine in the nucleus accumbens but not that of dopamine or noradrenaline in the prefrontal cortex: comparison with inhibition of ionotropic receptors. *J Neurochem* Vol. 70(3): 1104-1113.
- Ferron A, Thierry AM, Le DC, Glowinski J (1984): Inhibitory influence of the mesocortical dopaminergic system on spontaneous activity or excitatory response induced from the thalamic mediodorsal nucleus in the rat medial prefrontal cortex. *Brain Res* Vol. 302(2): 257-265.
- Fisher SE, Francks C, McCracken JT, McGough JJ, Marlow AJ, MacPhie IL, Newbury DF, Crawford LR, Palmer CG, Woodward JA, Del'Homme M, Cantwell DP, Nelson SF, Monaco AP, Smalley SL (2002): A genomewide scan for loci involved in attention-deficit/hyperactivity disorder. *Am J Hum Genet* Vol. 70(5): 1183-1196.
- Fried PA, Watkinson B (2001): Differential effects on facets of attention in adolescents prenatally exposed to cigarettes and marijuana. *Neurotoxicol Teratol* Vol. 23(5): 421-430.
- Froimowitz M, Patrick KS, Cody V (1995): Conformational-analysis of methylphenidate and its structural relationship to other dopamine reuptake blockers such as CFT. *Pharm Res* Vol. 12(10): 1430-1434.
- Gallagher M (2000): The amygdala and associative learning. In: Aggleton JP (ed.), *The amygdala - A functional analysis*. Oxford University Press, Oxford: 311-330.
- Gatley SJ, Pan DF, Chen RY, Chaturvedi G, Ding YS (1996): Affinities of methylphenidate derivatives for dopamine, norepinephrine and serotonin transporters. *Life Sci* Vol. 58(12): L231-L239.
- Gerasimov MR, Franceschi M, Volkow ND, Gifford A, Gatley SJ, Marsteller D, Molina PE, Dewey SL (2000): Comparison between intraperitoneal and oral methylphenidate administration: A microdialysis and locomotor activity study. *J Pharmacol Exp Ther* Vol. 295(1): 51-57.
- Gill M, Daly G, Heron S, Hawi Z, Fitzgerald M (1997): Confirmation of association between attention deficit hyperactivity disorder and a dopamine transporter polymorphism. *Mol Psychiatry* Vol. 2(4): 311-313.
- Gittelman-Klein R, Klein DF, Katz S, Saraf K, Pollack E (1976): Comparative effects of methylphenidate and thioridazine in hyperkinetic children. I. Clinical results. *Arch Gen Psychiatry* Vol. 33(10): 1217-1231.
- Goldman-Rakic PS (1987): Circuitry of the primate prefrontal cortex and the regulation of behavior by representational memory. In: Plum F (ed.), *Handbook of Physiology, The Nervous System, Higher Functions of the Brain*. American Physiological Society, 373-417.
- Goldman-Rakic PS, Leranth C, Williams SM, Mons N, Geffard M (1989): Dopamine synaptic complex with pyramidal neurons in primate cerebral cortex. *Proc Natl Acad Sci USA* Vol. 86(22): 9015-9019.
- Goldman-Rakic PS, Lidow MS, Gallager DW (1990): Overlap of dopaminergic, adrenergic, and serotonergic receptors and complementarity of their subtypes in primate prefrontal cortex. *J Neurosci* Vol. 10(7): 2125-2138.
- Goldman-Rakic PS (1996): The prefrontal landscape: implications of functional architecture for understanding human mentation and the central executive. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* Vol. 351(1346): 1445-1453.

- Goldman LS, Genel M, Bezman RJ, Slanetz PJ (1998): Diagnosis and treatment of attention-deficit/hyperactivity disorder in children and adolescents. Council on Scientific Affairs, American Medical Association. *JAMA* Vol. 279(14): 1100-1107.
- Gonenc S, Acikgoz O, Kayatekin BM, Uysal N, Akhisaroglu M (2000): Effects of footshock stress on superoxide dismutase and glutathione peroxidase enzyme activities and thiobarbituric acid reactive substances levels in the rat prefrontal cortex and striatum. *Neurosci Lett* Vol. 289(2): 107-110.
- Goto Y, Grace AA (2005): Dopaminergic modulation of limbic and cortical drive of nucleus accumbens in goal-directed behavior. *Nat Neurosci* Vol. 8(6): 805-812.
- Grace AA (1991): Phasic versus tonic dopamine release and the modulation of dopamine system responsivity: a hypothesis for the etiology of schizophrenia. *Neuroscience* Vol. 41(1): 1-24.
- Grace AA (1993): Cortical regulation of subcortical dopamine systems and its possible relevance to schizophrenia. *J Neural Transm Gen Sect* Vol. 91(2-3): 111-134.
- Grace AA (2000): Gating of information flow within the limbic system and the pathophysiology of schizophrenia. *Brain Res Rev* Vol. 31(2-3): 330-341.
- Greenhill L (2001): Clinical effects of stimulants in ADHD. In: Solanto MV, Arnsten AFT, Castellanos FX (eds.), *Stimulant Drugs and ADHD: Basic and Clinical Neuroscience*. Oxford University Press, New York: 31-71.
- Grobin AC, Deutch AY (1998): Dopaminergic regulation of extracellular gamma-aminobutyric acid levels in the prefrontal cortex of the rat. *J Pharmacol Exp Ther* Vol. 285(1): 350-357.
- Groenewegen HJ, Berendse HW, Haber SN (1993): Organization of the output of the ventral striatopallidal system in the rat: ventral pallidal efferents. *Neuroscience* Vol. 57(1): 113-142.
- Groenewegen HJ, Berendse HW, Wouterlood FG (1994): Organization of the projections from the ventral striatopallidal system to ventral mesencephalic dopaminergic neurons. In: Percheron G, McKenzie JS (eds.), *The basal ganglia IV*. Plenum Press, New York: 81-93.
- Groenewegen HJ, Wright CI, Beijer AV (1996): The nucleus accumbens: gateway for limbic structures to reach the motor system? *Prog Brain Res* Vol. 107: 485-511.
- Groenewegen HJ, Wright CI, Beijer AV, Voorn P (1999): Convergence and segregation of ventral striatal inputs and outputs. *Ann NY Acad Sci* Vol. 877: 49-63.
- Heidbreder CA, Weiss IC, Domeney AM, Pryce C, Homberg J, Hedou G, Feldon J, Moran MC, Nelson P (2000): Behavioral, neurochemical and endocrinological characterization of the early social isolation syndrome. *Neuroscience* Vol. 100(4): 749-768.
- Heilman KM, Voeller KK, Nadeau SE (1991): A possible pathophysiologic substrate of attention deficit hyperactivity disorder. *J Child Neurol* Vol. 6 Suppl: S76-S81.
- Heimer L, Wilson RD (1975): The subcortical projections of allocortex: similarities in the neural associations of the hippocampus, the piriform cortex and the neocortex. In: Santini M (ed.), *Golgi centennial symposium proceedings*. Raven Press, New York: 173-193.
- Heimer L, Van Hoesen GW (1979): Ventral striatum. In: Divac I, Oberg RGE (eds.), *The neostriatum*. Pergamon Press, New York: 147-158.
- Heimer L, Switzer RD, Van Hoesen GW (1982): Ventral striatum and ventral pallidum: Components of the motor system? *Trends in Neurosciences* Vol. 5: 83-87.
- Heimer L, Zahm DS, Churchill L, Kalivas PW, Wohltmann C (1991): Specificity in the projection patterns of accumbal core and shell in the rat. *Neuroscience* Vol. 41(1): 89-125.
- Heimer L, Zahm DS, Alheid GF (1995): Basal Ganglia. In: Paxinos G (ed.), *The Rat Nervous System*. Academic Press, Sydney: 579-628.
- Heimer L (2003): A new anatomical framework for neuropsychiatric disorders and drug abuse. *Am J Psychiatry* Vol. 160(10): 1726-1739.

- Henze DA, Gonzalez-Burgos GR, Urban NN, Lewis DA, Barrionuevo G (2000): Dopamine increases excitability of pyramidal neurons in primate prefrontal cortex. *J Neurophysiol* Vol. 84(6): 2799-2809.
- Herskovits EH, Megalooikonomou V, Davatzikos C, Chen A, Bryan RN, Gerring JP (1999): Is the spatial distribution of brain lesions associated with closed-head injury predictive of subsequent development of attention-deficit/hyperactivity disorder? Analysis with brain-image database. *Radiology* Vol. 213(2): 389-394.
- Hoffmann IS, Talmaciu RK, Ferro CP, Cubeddu LX (1988): Sustained high release at rapid stimulation rates and reduced functional autoreceptors characterize prefrontal cortex dopamine terminals. *J Pharmacol Exp Ther* Vol. 245(3): 761-772.
- Holson RR, Scallet AC, Ali SF, Turner BB (1991): "Isolation stress" revisited: isolation-rearing effects depend on animal care methods. *Physiol Behav* Vol. 49(6): 1107-1118.
- Horvitz JC (2002): Dopamine gating of glutamatergic sensorimotor and incentive motivational input signals to the striatum. *Behav Brain Res* Vol. 137(1-2): 65-74.
- Huether G (2001): Kritische Anmerkungen zu den bei ADHD-Kindern beobachteten neurobiologischen Veränderungen und den vermuteten Wirkungen von Psychostimulanzien (Ritalin®). *Analytische Kinder- und Jugendlichen-Psychotherapie* Vol. 112: 471-486.
- Huss M, Lehmkuhl U (2002): Methylphenidate and substance abuse: a review of pharmacology, animal, and clinical studies. *J Atten Disord* Vol. 6 Suppl 1: S65-S71.
- Ihalainen JA, Riekkinen P, Jr., Feenstra MG (1999): Comparison of dopamine and noradrenaline release in mouse prefrontal cortex, striatum and hippocampus using microdialysis. *Neurosci Lett* Vol. 277(2): 71-74.
- Insausti R, Herrero MT, Witter MP (1997): Entorhinal cortex of the rat: cytoarchitectonic subdivisions and the origin and distribution of cortical efferents. *Hippocampus* Vol. 7(2): 146-183.
- Jaskiw GE, Weinberger DR, Crawley JN (1991): Microinjection of apomorphine into the prefrontal cortex of the rat reduces dopamine metabolite concentrations in microdialysate from the caudate nucleus. *Biol Psychiatry* Vol. 29(7): 703-706.
- Jay TM, Witter MP (1991): Distribution of hippocampal CA1 and subicular efferents in the prefrontal cortex of the rat studied by means of anterograde transport of Phaseolus vulgaris-leucoagglutinin. *J Comp Neurol* Vol. 313(4): 574-586.
- Johansen EB, Aase H, Meyer A, Sagvolden T (2002): Attention-deficit/hyperactivity disorder (ADHD) behaviour explained by dysfunctioning reinforcement and extinction processes. *Behav Brain Res* Vol. 130(1-2): 37-45.
- Jongen-Relo AL, Groenewegen HJ, Voorn P (1993): Evidence for a multi-compartmental histochemical organization of the nucleus accumbens in the rat. *J Comp Neurol* Vol. 337(2): 267-276.
- Jongen-Relo AL, Voorn P, Groenewegen HJ (1994): Immunohistochemical characterization of the shell and core territories of the nucleus accumbens in the rat. *Eur J Neurosci* Vol. 6(8): 1255-1264.
- Kalsbeek A, Voorn P, Buijs RM, Pool CW, Uylings HB (1988): Development of the dopaminergic innervation in the prefrontal cortex of the rat. *J Comp Neurol* Vol. 269(1): 58-72.
- Kempainen S, Pitkanen A (2000): Distribution of parvalbumin, calretinin, and calbindin-D(28k) immunoreactivity in the rat amygdaloid complex and colocalization with gamma-aminobutyric acid. *J Comp Neurol* Vol. 426(3): 441-467.
- Killcross S, Robbins TW, Everitt BJ (1997): Different types of fear-conditioned behaviour mediated by separate nuclei within amygdala. *Nature* Vol. 388(6640): 377-380.
- Knobel M (1962): Psychopharmacology for hyperkinetic-child - Dynamic considerations. *Arch Gen Psychiatry* Vol. 6: 30-34.

- Kolb B (1984): Functions of the frontal cortex of the rat: a comparative review. *Brain Res* Vol. 320(1): 65-98.
- Kolb B, Whishaw IQ (1990): *Fundamentals of human neuropsychology*. New York.
- Krause KH, Dresel SH, Krause J, Kung HF, Tatsch K (2000): Increased striatal dopamine transporter in adult patients with attention deficit hyperactivity disorder: effects of methylphenidate as measured by single photon emission computed tomography. *Neurosci Lett* Vol. 285(2): 107-110.
- Krause KH, Dresel S, Krause J (2001): Wirkmechanismus von Methylphenidat. In: Voss Hv (ed.), *Kinderärztliche Praxis; Sonderheft "Unaufmerksam und hyperaktiv"*. Kirchheim-Verlag, Mainz: 23-27.
- Krebs-Thomson K, Giracello D, Solis A, Geyer MA (2001): Post-weaning handling attenuates isolation-rearing induced disruptions of prepulse inhibition in rats. *Behav Brain Res* Vol. 120(2): 221-224.
- Kreppner JM, O'Connor TG, Rutter M (2001): Can inattention/overactivity be an institutional deprivation syndrome? *J Abnorm Child Psychol* Vol. 29(6): 513-528.
- Krettek JE, Price JL (1977): Projections from the amygdaloid complex to the cerebral cortex and thalamus in the rat and cat. *J Comp Neurol* Vol. 172(4): 687-722.
- Kuczenski R, Segal DS (1999): Dynamic changes in sensitivity occur during the acute response to cocaine and methylphenidate. *Psychopharmacology (Berl)* Vol. 147(1): 96-103.
- Kuczenski R, Segal DS (2002): Exposure of adolescent rats to oral methylphenidate: preferential effects on extracellular norepinephrine and absence of sensitization and cross-sensitization to methamphetamine. *J Neurosci* Vol. 22(16): 7264-7271.
- Lambe EK, Krimer LS, Goldman-Rakic PS (2000): Differential postnatal development of catecholamine and serotonin inputs to identified neurons in prefrontal cortex of rhesus monkey. *J Neurosci* Vol. 20(23): 8780-8787.
- Langleben DD, Austin G, Krikorian G, Ridlehuber HW, Goris ML, Strauss HW (2001): Interhemispheric asymmetry of regional cerebral blood flow in prepubescent boys with attention deficit hyperactivity disorder. *Nucl Med Commun* Vol. 22(12): 1333-1340.
- Lauder JM (1988): Neurotransmitters as morphogens. *Prog Brain Res* Vol. 73: 365-387.
- Lauder JM (1993): Neurotransmitters as growth regulatory signals: role of receptors and second messengers. *Trends Neurosci* Vol. 16(6): 233-240.
- Lavin A, Grace AA (2001): Stimulation of D1-type dopamine receptors enhances excitability in prefrontal cortical pyramidal neurons in a state-dependent manner. *Neuroscience* Vol. 104(2): 335-346.
- Law-Tho D, Hirsch JC, Crepel F (1994): Dopamine modulation of synaptic transmission in rat prefrontal cortex: an in vitro electrophysiological study. *Neurosci Res* Vol. 21(2): 151-160.
- Le Moal M, Simon H (1991): Mesocorticolimbic dopaminergic network: functional and regulatory roles. *Physiol Rev* Vol. 71(1): 155-234.
- LeDoux JE (1992): Emotion and the Amygdala. In: Aggleton JP (ed.), *The Amygdala: Neurobiological aspects of emotion, memory, and mental dysfunction*. Wiley-Liss, New York:
- LeDoux JE (2000): Emotion circuits in the brain. *Annu Rev Neurosci* Vol. 23: 155-184.
- LeDoux JE (2003): *Das Netz der Gefühle. Wie Emotionen entstehen*. Deutscher Taschenbuch Verlag, München.
- Lehmann K, Teuchert-Noodt G, Dawirs RR (2002): Postnatal rearing conditions influence ontogeny of adult dopamine transporter (DAT) immunoreactivity of the striatum in gerbils. *J Neural Transm* Vol. 109(9): 1129-1137.
- Lesting J, Neddens J, Busche A, Teuchert-Noodt G (2005): Hemisphere-specific effects on serotonin but not dopamine innervation in the nucleus accumbens of gerbils caused by isolated rearing and a single early methamphetamine challenge. *Brain Res* Vol. 1035(2): 168-176.

- Levine S (1971): Stress and behavior. *Sci Am* Vol. 224(1): 26-31.
- Levy F, Hay DA, McStephen M, Wood C, Waldman I (1997): Attention-deficit hyperactivity disorder: a category or a continuum? Genetic analysis of a large-scale twin study. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry* Vol. 36(6): 737-744.
- Lindvall O, Bjorklund A, Divac I (1978): Organization of catecholamine neurons projecting to the frontal cortex in the rat. *Brain Res* Vol. 142(1): 1-24.
- Marsteller DA, Gerasimov MR, Schiffer WK, Geiger JM, Barnett CR, Borg JS, Scott S, Ceccarelli J, Volkow ND, Molina PE, Alexoff DL, Dewey SL (2002): Acute handling stress modulates methylphenidate-induced catecholamine overflow in the medial prefrontal cortex. *Neuropsychopharmacology* Vol. 27(2): 163-170.
- Mattson MP (1988): Neurotransmitters in the regulation of neuronal cytoarchitecture. *Brain Res* Vol. 472(2): 179-212.
- Max JE, Fox PT, Lancaster JL, Kochunov P, Mathews K, Manes FF, Robertson BA, Arndt S, Robin DA, Lansing AE (2002): Putamen lesions and the development of attention-deficit/hyperactivity symptomatology. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry* Vol. 41(5): 563-571.
- McDonald AJ (1992): Cell types and intrinsic connections of the amygdala. In: Aggleton JP (ed.), *The Amygdala: Neurobiological aspects of emotion, memory, and mental dysfunction*. Wiley-Liss, New York: 67-96.
- McDonald AJ, Mascagni F, Guo L (1996): Projections of the medial and lateral prefrontal cortices to the amygdala: a Phaseolus vulgaris leucoagglutinin study in the rat. *Neuroscience* Vol. 71(1): 55-75.
- McDonald AJ (1998): Cortical pathways to the mammalian amygdala. *Prog Neurobiol* Vol. 55(3): 257-332.
- McLean PD (1955): The limbic system („visceral brain“) and emotional behavior. *Archives of Neurology and Psychiatry* Vol. 73: 130-134.
- McLean PD (1990): *The triune brain in evolution: Role in paleocerebral functions*. Plenum, New York.
- Meador-Woodruff JH, Damask SP, Watson SJ, Jr. (1994): Differential expression of autoreceptors in the ascending dopamine systems of the human brain. *Proc Natl Acad Sci USA* Vol. 91(17): 8297-8301.
- Meiergerd SM, Schenk JO, Sorg BA (1997): Repeated cocaine and stress increase dopamine clearance in the rat medial prefrontal cortex. *Brain Res* Vol. 773(1-2): 203-207.
- Meredith GE, Agolia R, Arts MP, Groenewegen HJ, Zahm DS (1992): Morphological differences between projection neurons of the core and shell in the nucleus accumbens of the rat. *Neuroscience* Vol. 50(1): 149-162.
- Mick E, Biederman J, Faraone SV, Sayer J, Kleinman S (2002): Case-control study of attention-deficit hyperactivity disorder and maternal smoking, alcohol use, and drug use during pregnancy. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry* Vol. 41(4): 378-385.
- Mitchell JB, Gratton A (1992): Partial dopamine depletion of the prefrontal cortex leads to enhanced mesolimbic dopamine release elicited by repeated exposure to naturally reinforcing stimuli. *J Neurosci* Vol. 12(9): 3609-3618.
- Mogenson GJ, Jones DL, Yim CY (1980): From motivation to action: functional interface between the limbic system and the motor system. *Prog Neurobiol* Vol. 14(2-3): 69-97.
- Moll GH, Mehnert C, Wicker M, Bock N, Rothenberger A, Ruther E, Huether G (2000): Age-associated changes in the densities of presynaptic monoamine transporters in different regions of the rat brain from early juvenile life to late adulthood. *Dev Brain Res* Vol. 119(2): 251-257.
- Moll GH, Hause S, Ruther 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* Vol. 11(1): 15-24.

- Mordenti J, Chappell W (1989): The use of interspecies scaling in toxicokinetics. In: Yacogi A, Kelly J, Batra V (eds.), *Toxicokinetics and New Drug Development*. Pergamon Press, New York: 42-96.
- Morgan MA, Romanski LM, LeDoux JE (1993): Extinction of emotional learning: contribution of medial prefrontal cortex. *Neurosci Lett* Vol. 163(1): 109-113.
- Mostofsky SH, Cooper KL, Kates WR, Denckla MB, Kaufmann WE (2002): Smaller prefrontal and premotor volumes in boys with attention-deficit/hyperactivity disorder. *Biol Psychiatry* Vol. 52(8): 785-794.
- Mrzljak L, Bergson C, Pappy M, Huff R, Levenson R, Goldman-Rakic PS (1996): Localization of dopamine D4 receptors in GABAergic neurons of the primate brain. *Nature* Vol. 381(6579): 245-248.
- Mulder AB, Hodenprijl MG, Lopes da Silva FH (1998): Electrophysiology of the hippocampal and amygdaloid projections to the nucleus accumbens of the rat: convergence, segregation, and interaction of inputs. *J Neurosci* Vol. 18(13): 5095-5102.
- Murphy BL, Arnsten AF, Goldman-Rakic PS, Roth RH (1996): Increased dopamine turnover in the prefrontal cortex impairs spatial working memory performance in rats and monkeys. *Proc Natl Acad Sci USA* Vol. 93(3): 1325-1329.
- Nauta WJ (1971): The problem of the frontal lobe: a reinterpretation. *J Psychiatr Res* Vol. 8(3): 167-187.
- Neafsey EJ (1990): Prefrontal cortical control of the autonomic nervous system: anatomical and physiological observations. *Prog Brain Res* Vol. 85: 147-165.
- Neddens J, Brandenburg K, Teuchert-Noodt G, Dawirs RR (2001): Differential environment alters ontogeny of dopamine innervation of the orbital prefrontal cortex in gerbils. *J Neurosci Res* Vol. 63(2): 209-213.
- Neddens J, Lesting J, Dawirs RR, Teuchert-Noodt G (2002): An early methamphetamine challenge suppresses the maturation of dopamine fibres in the nucleus accumbens of gerbils: on the significance of rearing conditions. *J Neural Transm* Vol. 109(2): 141-155.
- Neugebauer V, Zinebi F, Russell R, Gallagher JP, Shinnick-Gallagher P (2000): Cocaine and kindling alter the sensitivity of group II and III metabotropic glutamate receptors in the central amygdala. *J Neurophysiol* Vol. 84(2): 759-770.
- Neuhaus C (2002): *Das hyperaktive Kind und seine Probleme*. Urania Verlag, Berlin.
- Neuhuber W (1994): Innerer Aufbau und Leitungsbahnen des Hirnstamms. In: Drenckhahn D, Zenker W (eds.), *Benninghoff Anatomie - Makroskopische Anatomie, Embryologie und Histologie des Menschen (Bd. 2)*. Urban & Schwarzenberg, München - Wien - Baltimore: 471-519.
- Nieoullon A (2002): Dopamine and the regulation of cognition and attention. *Prog Neurobiol* Vol. 67(1): 53-83.
- O'Donnell P, Grace AA (1995): Synaptic interactions among excitatory afferents to nucleus accumbens neurons: hippocampal gating of prefrontal cortical input. *J Neurosci* Vol. 15(5 Pt 1): 3622-3639.
- Oliff HS, Gallardo KA (1999): The effect of nicotine on developing brain catecholamine systems. *Front Biosci* Vol. 4: D883-D897.
- Öngür D, Price JL (2000): The organization of networks within the orbital and medial prefrontal cortex of rats, monkeys and humans. *Cereb Cortex* Vol. 10(3): 206-219.
- Papa M, Diewald L, Carey MP, Esposito FJ, Gironi Carnevale UA, Sadile AG (2002): A rostro-caudal dissociation in the dorsal and ventral striatum of the juvenile SHR suggests an anterior hypo- and a posterior hyperfunctioning mesocorticolimbic system. *Behav Brain Res* Vol. 130(1-2): 171-179.

- Papaoiannou A, Dafni U, Alikaridis F, Bolaris S, Stylianopoulou F (2002): Effects of neonatal handling on basal and stress-induced monoamine levels in the male and female rat brain. *Neuroscience* Vol. 114(1): 195-206.
- Papez JW (1937): A proposed mechanism of emotion. *Archives of Neurology and Psychiatry* Vol. 38: 725-743.
- Paxinos G., Watson C. (1986): *The rat brain in stereotaxic coordinates*. Academic Press, Sidney.
- Penit-Soria J, Audinat E, Crepel F (1987): Excitation of rat prefrontal cortical neurons by dopamine: an in vitro electrophysiological study. *Brain Res* Vol. 425(2): 263-274.
- Pennartz CM, Groenewegen HJ, Lopes da Silva FH (1994): The nucleus accumbens as a complex of functionally distinct neuronal ensembles: an integration of behavioural, electrophysiological and anatomical data. *Prog. Neurobiol.* Vol. 42(6): 719-761.
- Petrides M, Pandya DN (1994): Comparative cytoarchitectonic analysis of the human and the macaque frontal cortex. In: Boller F, Grafman J (eds.), *Handbook of neuropsychology*. Elsevier, Amsterdam: 17-58.
- Phillipson OT, Griffiths AC (1985): The topographic order of inputs to nucleus accumbens in the rat. *Neuroscience* Vol. 16(2): 275-296.
- Pikkarainen M, Ronkko S, Savander V, Insausti R, Pitkanen A (1999): Projections from the lateral, basal, and accessory basal nuclei of the amygdala to the hippocampal formation in rat. *J Comp Neurol* Vol. 403(2): 229-260.
- Pikkarainen M, Pitkanen A (2001): Projections from the lateral, basal and accessory basal nuclei of the amygdala to the perirhinal and postrhinal cortices in rat. *Cereb Cortex* Vol. 11(11): 1064-1082.
- Pitkanen A, Savander V, LeDoux JE (1997): Organization of intra-amygdaloid circuitries in the rat: an emerging framework for understanding functions of the amygdala. *Trends Neurosci* Vol. 20(11): 517-523.
- Pitkanen A, Pikkarainen M, Nurminen N, Ylinen A (2000): Reciprocal connections between the amygdala and the hippocampal formation, perirhinal cortex, and postrhinal cortex in rat. A review. *Ann NY Acad Sci* Vol. 911: 369-391.
- Pitkanen A (2000): Connectivity of the rat amygdaloid complex. In: Aggleton JP (ed.), *The amygdala - A functional analysis*. Oxford University Press, Oxford: 31-115.
- Polascheck D (2004): Zum Einfluss epigenetischer Faktoren auf die Reifung aminergener Neurotransmitter im Corpus amygdaloideum und das Verhalten. Eine quantitative Studie an *Meriones unguiculatus*. *Dissertation, Bielefeld*.
- Pralong E, Magistretti P, Stoop R (2002): Cellular perspectives on the glutamate-monoamine interactions in limbic lobe structures and their relevance for some psychiatric disorders. *Prog Neurobiol* Vol. 67(3): 173-202.
- Pueyo R, Maneru C, Vendrell P, Mataro M, Estevez-Gonzalez A, Garcia-Sanchez C, Junque C (2000): Attention deficit hyperactivity disorder. Cerebral asymmetry observed on magnetic resonance. *Rev Neurol* Vol. 30(10): 920-925.
- Puumala T, Ruotsalainen S, Jakala P, Koivisto E, Riekkinen P, Jr., Sirvio J (1996): Behavioral and pharmacological studies on the validation of a new animal model for attention deficit hyperactivity disorder. *Neurobiol Learn Mem* Vol. 66(2): 198-211.
- Pycock CJ, Carter CJ, Kerwin RW (1980): Effect of 6-hydroxydopamine lesions of the medial prefrontal cortex on neurotransmitter systems in subcortical sites in the rat. *J Neurochem* Vol. 34(1): 91-99.
- Ray JP, Price JL (1992): The organization of the thalamocortical connections of the mediodorsal thalamic nucleus in the rat, related to the ventral forebrain-prefrontal cortex topography. *J Comp Neurol* Vol. 323(2): 167-197.
- Reboucas RC, Schmidek WR (1997): Handling and isolation in three strains of rats affect open field, exploration, hoarding and predation. *Physiol Behav* Vol. 62(5): 1159-1164.

- Revay R, Vaughan R, Grant S, Kuhar MJ (1996): Dopamine transporter immunohistochemistry in median eminence, amygdala, and other areas of the rat brain. *Synapse* Vol. 22(2): 93-99.
- Richfield EK, Penney JB, Young AB (1989): Anatomical and affinity state comparisons between dopamine D1 and D2 receptors in the rat central nervous system. *Neuroscience* Vol. 30(3): 767-777.
- Robbins TW (1996): Dissociating executive functions of the prefrontal cortex. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* Vol. 351(1346): 1463-1470.
- Robbins TW (2002): The 5-choice serial reaction time task: behavioural pharmacology and functional neurochemistry. *Psychopharmacology (Berl)* Vol. 163(3-4): 362-380.
- Robinson TE, Kolb B (1999): Alterations in the morphology of dendrites and dendritic spines in the nucleus accumbens and prefrontal cortex following repeated treatment with amphetamine or cocaine. *Eur J Neurosci* Vol. 11(5): 1598-1604.
- Rockstroh S (2001): *Einführung in die Neuropsychopharmakologie*. Verlag Hans Huber, Bern – Göttingen – Toronto – Seattle.
- Rose JE, Woolsey CN (1948): The orbitofrontal cortex and its connections with the mediodorsal nucleus in rabbit, sheep and cat. *Res Pub Ass Nerv Ment Dis* Vol. 27: 210-232.
- Rosenberg DR, Lewis DA (1995): Postnatal maturation of the dopaminergic innervation of monkey prefrontal and motor cortices: a tyrosine hydroxylase immunohistochemical analysis. *J Comp Neurol* Vol. 358(3): 383-400.
- Rosenkranz JA, Grace AA (1999): Modulation of basolateral amygdala neuronal firing and afferent drive by dopamine receptor activation in vivo. *J Neurosci* Vol. 19(24): 11027-11039.
- Rosenkranz JA, Grace AA (2001): Dopamine attenuates prefrontal cortical suppression of sensory inputs to the basolateral amygdala of rats. *J Neurosci* Vol. 21(11): 4090-4103.
- Rosenkranz JA, Grace AA (2002): Cellular mechanisms of infralimbic and prelimbic prefrontal cortical inhibition and dopaminergic modulation of basolateral amygdala neurons in vivo. *J Neurosci* Vol. 22(1): 324-337.
- Rosin DL, Clark WA, Goldstein M, Roth RH, Deutch AY (1992): Effects of 6-hydroxydopamine lesions of the prefrontal cortex on tyrosine hydroxylase activity in mesolimbic and nigrostriatal dopamine systems. *Neuroscience* Vol. 48(4): 831-839.
- Rubia K, Overmeyer S, Taylor E, Brammer M, Williams SC, Simmons A, Bullmore ET (1999): Hypofrontality in attention deficit hyperactivity disorder during higher-order motor control: a study with functional MRI. *Am J Psychiatry* Vol. 156(6): 891-896.
- Rubia K, Taylor E, Smith AB, Oksanen H, Overmeyer S, Newman S (2001): Neuropsychological analyses of impulsiveness in childhood hyperactivity. *Br J Psychiatry* Vol. 179: 138-143.
- Russchen FT, Price JL (1984): Amygdalostriatal projections in the rat. Topographical organization and fiber morphology shown using the lectin PHA-L as an anterograde tracer. *Neurosci Lett* Vol. 47(1): 15-22.
- Russchen FT, Bakst I, Amaral DG, Price JL (1985): The amygdalostriatal projections in the monkey. An anterograde tracing study. *Brain Res* Vol. 329(1-2): 241-257.
- Russell V, de Villiers A, Sagvolden T, Lamm M, Taljaard J (1995): Altered dopaminergic function in the prefrontal cortex, nucleus-accumbens and caudate-putamen of an animal-model of attention-deficit hyperactivity disorder - the spontaneously hypertensive rat. *Brain Res* Vol. 676(2): 343-351.
- Rutter M, Silberg J (2002): Gene-environment interplay in relation to emotional and behavioral disturbance. *Annu Rev Psychol* Vol. 53: 463-490.
- Sawaguchi T, Goldman-Rakic PS (1991): D1 dopamine receptors in prefrontal cortex: involvement in working memory. *Science* Vol. 251(4996): 947-950.

- Sawaguchi T, Goldman-Rakic PS (1994): The role of D1-dopamine receptor in working memory: local injections of dopamine antagonists into the prefrontal cortex of rhesus monkeys performing an oculomotor delayed-response task. *J Neurophysiol* Vol. 71(2): 515-528.
- Sawaguchi T (2001): The effects of dopamine and its antagonists on directional delay-period activity of prefrontal neurons in monkeys during an oculomotor delayed-response task. *Neurosci Res* Vol. 41(2): 115-128.
- Seeman P, Madras B (2002): Methylphenidate elevates resting dopamine which lowers the impulse-triggered release of dopamine: a hypothesis. *Behav Brain Res* Vol. 130(1-2): 79-83.
- Seiden LS, Vosmer G (1984): Formation of 6-hydroxydopamine in caudate-nucleus of the rat-brain after a single large dose of methylamphetamine. *Pharmacol Biochem Behav* Vol. 21(1): 29-31.
- Sesack SR, Bunney BS (1989): Pharmacological characterization of the receptor mediating electrophysiological responses to dopamine in the rat medial prefrontal cortex: a microiontophoretic study. *J Pharmacol Exp Ther* Vol. 248(3): 1323-1333.
- Sesack SR, Pickel VM (1990): In the rat medial nucleus accumbens, hippocampal and catecholaminergic terminals converge on spiny neurons and are in apposition to each other. *Brain Res* Vol. 527(2): 266-279.
- Sesack SR, Pickel VM (1992): Prefrontal cortical efferents in the rat synapse on unlabeled neuronal targets of catecholamine terminals in the nucleus accumbens septi and on dopamine neurons in the ventral tegmental area. *J Comp Neurol* Vol. 320(2): 145-160.
- Sesack SR, Snyder CL, Lewis DA (1995): Axon terminals immunolabeled for dopamine or tyrosine hydroxylase synapse on GABA-immunoreactive dendrites in rat and monkey cortex. *J Comp Neurol* Vol. 363(2): 264-280.
- Sesack SR, Hawrylak VA, Matus C, Guido MA, Levey AI (1998): Dopamine axon varicosities in the prelimbic division of the rat prefrontal cortex exhibit sparse immunoreactivity for the dopamine transporter. *J Neurosci* Vol. 18(7): 2697-2708.
- Smith Y, Pare JF, Pare D (2000): Differential innervation of parvalbumin-immunoreactive interneurons of the basolateral amygdaloid complex by cortical and intrinsic inputs. *J Comp Neurol* Vol. 416(4): 496-508.
- Solanto MV (2002): Dopamine dysfunction in AD/HD: integrating clinical and basic neuroscience research. *Behav Brain Res* Vol. 130(1-2): 65-71.
- Sonuga-Barke EJ (2002): Psychological heterogeneity in AD/HD--a dual pathway model of behaviour and cognition. *Behav Brain Res* Vol. 130(1-2): 29-36.
- Stefanatos GA, Wasserstein J (2001): Attention deficit/hyperactivity disorder as a right hemisphere syndrome. Selective literature review and detailed neuropsychological case studies. *Ann NY Acad Sci* Vol. 931: 172-195.
- Stuss DT, Eskes GA, Foster JK (1994): Experimental neuropsychological studies of frontal lobe functions. *Handbook of neuropsychology*(9): 149-185.
- Sullivan RM, Brake WG (2003): What the rodent prefrontal cortex can teach us about attention-deficit/hyperactivity disorder: the critical role of early developmental events on prefrontal function. *Behav Brain Res* Vol. 146(1-2): 43-55.
- Sulzer D, Chen TK, Lau YY, Kristensen H, Rayport S, Ewing A (1995): Amphetamine redistributes dopamine from synaptic vesicles to the cytosol and promotes reverse transport. *J Neurosci* Vol. 15(5): 4102-4108.
- Swanson J, Posner M, Fusella J, Wasdell M, Sommer T, Fan J (2001): Genes and attention deficit hyperactivity disorder. *Curr Psychiatry Rep* Vol. 3(2): 92-100.
- Swanson JM, Sunohara GA, Kennedy JL, Regino R, Fineberg E, Wigal T, Lerner M, Williams L, LaHoste GJ, Wigal S (1998): Association of the dopamine receptor D4 (DRD4) gene with a refined phenotype of attention deficit hyperactivity disorder (ADHD): a family-based approach. *Mol Psychiatry* Vol. 3(1): 38-41.

- Swanson JM, Flodman P, Kennedy S, Spence MA, Moyzis R, Schuck S, Murias M, Moriarity J, Barr C, Smith M, Posner M (2000): Dopamine genes and ADHD. *Neurosci Biobehav Rev* Vol. 24(1): 21-25.
- Swanson JM, Volkow ND (2002): Pharmacokinetic and pharmacodynamic properties of stimulants: implications for the design of new treatments for ADHD. *Behav Brain Res* Vol. 130(1-2): 73-78.
- Swanson JM, Volkow ND (2003): Serum and brain concentrations of methylphenidate: implications for use and abuse. *Neurosci Biobehav Rev* Vol. 27(7): 615-621.
- Swanson LW (1981): A direct projection from Ammon's horn to prefrontal cortex in the rat. *Brain Res* Vol. 217(1): 150-154.
- Swanson LW, Petrovich GD (1998): What is the amygdala? *Trends Neurosci* Vol. 21(8): 323-331.
- Switzer RC, III, Hill J, Heimer L (1982): The globus pallidus and its rostroventral extension into the olfactory tubercle of the rat: a cyto- and chemoarchitectural study. *Neuroscience* Vol. 7(8): 1891-1904.
- Tarazi FI, Baldessarini RJ (2000): Comparative postnatal development of dopamine D(1), D(2) and D(4) receptors in rat forebrain. *Int J Dev Neurosci* Vol. 18(1): 29-37.
- Teuchert-Noodt G, Dawirs RR (1991): Age-related toxicity in prefrontal cortex and caudate-putamen complex of gerbils (*Meriones unguiculatus*) after a single dose of methamphetamine. *Neuropharmacology* Vol. 30(7): 733-743.
- Thierry AM, Blanc G, Sobel A, Stinus L, Golwinski J (1973): Dopaminergic terminals in the rat cortex. *Science* Vol. 182(4111): 499-501.
- Thierry AM, Mantz J, Glowinski J (1992): Influence of dopaminergic and noradrenergic afferents on their target cells in the rat medial prefrontal cortex. *Adv Neurol* Vol. 57: 545-554.
- Totterdell S, Meredith GE (1997): Topographical organization of projections from the entorhinal cortex to the striatum of the rat. *Neuroscience* Vol. 78(3): 715-729.
- Uylings HB, van Eden CG (1990): Qualitative and quantitative comparison of the prefrontal cortex in rat and in primates, including humans. *Prog Brain Res* Vol. 85: 31-62.
- Uylings HB, Groenewegen HJ, Kolb B (2003): Do rats have a prefrontal cortex? *Behav Brain Res* Vol. 146(1-2): 3-17.
- Vaidya CJ, Austin G, Kirkorian G, Ridlehuber HW, Desmond JE, Glover GH, Gabrieli JD (1998): Selective effects of methylphenidate in attention deficit hyperactivity disorder: a functional magnetic resonance study. *Proc Natl Acad Sci USA* Vol. 95(24): 14494-14499.
- Verney C, Baulac M, Berger B, Alvarez C, Vigny A, Helle KB (1985): Morphological evidence for a dopaminergic terminal field in the hippocampal formation of young and adult rat. *Neuroscience* Vol. 14(4): 1039-1052.
- Volkow ND, Wang GJ, Fowler JS, Gatley SJ, Logan J, Ding YS, Dewey SL, Hitzemann R, Gifford AN, Pappas NR (1999): Blockade of striatal dopamine transporters by intravenous methylphenidate is not sufficient to induce self-reports of "high". *J Pharmacol Exp Ther* Vol. 288(1): 14-20.
- Volkow ND, Swanson JM (2003): Variables that affect the clinical use and abuse of methylphenidate in the treatment of ADHD. *Am J Psychiatry* Vol. 160(11): 1909-1918.
- Voorn P, Jorritsma-Byham B, Van DC, Buijs RM (1986): The dopaminergic innervation of the ventral striatum in the rat: a light- and electron-microscopical study with antibodies against dopamine. *J Comp Neurol* Vol. 251(1): 84-99.
- Wagner GC, Ricaurte GA, Johanson CE, Schuster CR, Seiden LS (1980): Amphetamine induces depletion of dopamine and loss of dopamine uptake sites in caudate. *Neurology* Vol. 30(5): 547-550.
- Weiner I (2003): The "two-headed" latent inhibition model of schizophrenia: modeling positive and negative symptoms and their treatment. *Psychopharmacology (Berl)* Vol. 169(3-4): 257-297.

- Weizman A, Weitz R, Szekely GA, Tyano S, Belmaker RH (1984): Combination of neuroleptic and stimulant treatment in attention deficit disorder with hyperactivity. *J Am Acad Child Psychiatry* Vol. 23(3): 295-298.
- Wilens TE, Faraone SV, Biederman J, Gunawardene S (2003): Does stimulant therapy of attention-deficit/hyperactivity disorder beget later substance abuse? A meta-analytic review of the literature. *Pediatrics* Vol. 111(1): 179-185.
- Winterfeld KT (1998): Zum Einfluß von Haltungsbedingungen auf die strukturelle und funktionale Reifung des präfrontalen Cortex bei der Wüstenrennmaus (*Meriones unguiculatus*). *Dissertation, Bielefeld*.
- Winterfeld KT, Teuchert-Noodt G, Dawirs RR (1998): Social environment alters both ontogeny of dopamine innervation of the medial prefrontal cortex and maturation of working memory in gerbils (*Meriones unguiculatus*). *J Neurosci Res* Vol. 52(2): 201-209.
- Wolf ME, Galloway MP, Roth RH (1986): Regulation of dopamine synthesis in the medial prefrontal cortex: studies in brain slices. *J Pharmacol Exp Ther* Vol. 236(3): 699-707.
- Wolf ME, Roth RH (1987): Dopamine neurons projecting to the medial prefrontal cortex possess release-modulating autoreceptors. *Neuropharmacology* Vol. 26(8): 1053-1059.
- Wolf ME (2002): Addiction: making the connection between behavioral changes and neuronal plasticity in specific pathways. *Mol Interv* Vol. 2(3): 146-157.
- Wolff JR (1982): Morphogenetische Aspekte der Hirnentwicklung. In: Immelmann K (ed.), *Verhaltensentwicklung bei Mensch und Tier. Das Bielefeld-Projekt*. Paul Parey Verlag, Berlin: 282-309.
- Woolverton WL, Ricaurte GA, Forno LS, Seiden LS (1989): Long-term effects of chronic methamphetamine administration in rhesus-monkeys. *Brain Res* Vol. 486(1): 73-78.
- Wright CI, Beijer AV, Groenewegen HJ (1996): Basal amygdaloid complex afferents to the rat nucleus accumbens are compartmentally organized. *J Neurosci* Vol. 16(5): 1877-1893.
- Xavier GF, Zelger KD, Zelger JL, de-Albuquerque AA (1983): Effects of housing conditions on three behavioral tests in rats. *Braz J Med Biol Res* Vol. 16(1): 65-71.
- Yilmazer-Hanke DM (2003): Beziehungen zwischen der Zytoarchitektur, Pathoarchitektur und Subsystemen der Amygdala und verschiedenen Formen des Angstverhaltens. *Habilitationsschrift, Magdeburg*.
- Yoshida M, Sakai M, Kani K, Nagatsu I, Tanaka M (1988): The dopaminergic innervation as observed by immunohistochemistry using anti-dopamine serum in the rat cerebral cortex. *Experientia* Vol. 44(8): 700-702.
- Yuan J, McCann U, Ricaurte G (1997): Methylphenidate and brain dopamine neurotoxicity. *Brain Res* Vol. 767(1): 172-175.
- Zaborszky L, Alheid GF, Beinfeld MC, Eiden LE, Heimer L, Palkovits M (1985): Cholecystokinin innervation of the ventral striatum: a morphological and radioimmunological study. *Neuroscience* Vol. 14(2): 427-453.
- Zaczek R, Battaglia G, Contrera JF, Culp S, Desouza EB (1989): Methylphenidate and pemoline do not cause depletion of rat-brain monoamine markers similar to that observed with methamphetamine. *Toxicol Appl Pharmacol* Vol. 100(2): 227-233.
- Zahm DS, Brog JS (1992): On the significance of subterritories in the "accumbens" part of the rat ventral striatum. *Neuroscience* Vol. 50(4): 751-767.
- Zahrt J, Taylor JR, Mathew RG, Arnsten AF (1997): Supranormal stimulation of D1 dopamine receptors in the rodent prefrontal cortex impairs spatial working memory performance. *J Neurosci* Vol. 17(21): 8528-8535.
- Zheng P, Zhang XX, Bunney BS, Shi WX (1999): Opposite modulation of cortical N-methyl-D-aspartate receptor-mediated responses by low and high concentrations of dopamine. *Neuroscience* Vol. 91(2): 527-535.

Zito JM, Safer DJ, dosReis S, Gardner JF, Boles M, Lynch F (2000): Trends in the prescribing of psychotropic medications to preschoolers. *JAMA* Vol. 283(8): 1025-1030.

## Danksagung

An erster Stelle danke ich herzlich Frau Prof. Dr. Dr. Gertraud Teuchert-Noodt für die Möglichkeit, die vorliegende Arbeit verwirklichen zu können, ihren immerwährenden Zuspruch und die konstruktive und motivierende Begleitung dieser Arbeit.

Besonders möchte ich mich bei Herrn Dr. Jörg Neddens bedanken. Die Mitarbeit in dem von ihm geleiteten Drittmittelprojekt und die freundschaftliche Zusammenarbeit machten die Durchführung der Arbeit erst möglich.

Auch bei der Deutschen Parkinson Vereinigung möchte ich mich herzlich für die Finanzierung des Drittmittelprojekts bedanken, ohne die diese Arbeit nicht zustande gekommen wäre.

Bedanken möchte ich mich bei Frau Dr. Andrea Busche für die engagierte Hilfe im Labor und bei der Korrektur der Arbeit. Auch Frau U. Schröder danke ich für die tatkräftige Hilfe im Labor.

Weiterhin möchte ich der gesamten Abteilung für Neuroanatomie ganz herzlichen Dank für das ausgezeichnete Arbeitsklima und die vielfältige Unterstützung aussprechen.

Mein herzlichster Dank gilt meiner Verlobten für ihr Verständnis, ihre Geduld und ihren andauernd motivierenden Beistand. Meinen Eltern schulde ich ebenfalls großen Dank für ihre anhaltende Unterstützung. Ohne ihre Hilfe wäre dieser Weg nicht möglich gewesen.

## Erklärung

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig angefertigt habe und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet wurden. Ferner erkläre ich, dass es sich um meinen ersten Promotionsversuch handelt.

Bielefeld, im Juli 2005

(Thorsten Grund)