

Aus der Klinik für Neurologie
der Universität zu Lübeck
Direktor: Prof. Dr. med. D. Kömpf

Nachweis und Bedeutung von Tetrahydroisoquinolinen im Urin von Patienten mit Aufmerksamkeits-Defizit- Hyperaktivitätsstörung.

Inauguraldissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
der Universität zu Lübeck
- Aus der Medizinischen Fakultät -

Vorgelegt von
Katharina Gramm
aus Hamburg

Lübeck 2009

1. Berichterstatter: Prof. Dr. A. Moser

2. Berichterstatterin: PD Dr. R. Lencer

Tag der mündlichen Prüfung: 16.12.2009

Zum Druck genehmigt. Lübeck, den 16.12.2009

Inhaltsverzeichnis:

	Seite
I. <u>Einleitung</u>	5
II. <u>Materialliste</u>	23
II. 1. Geräte:	23
II.1.1. Hochdruck Flüssigkeitschromatographie (HPLC) -System	23
II.1.2. Weitere Geräte	23
II. 2. Hilfsmittel und Einmalartikel	23
II. 3. Reagenzien	24
II. 4. Lösungen	25
III. <u>Methoden</u>	26
III. 1. Patientenkollektive	26
III. 1. 1. Patienten mit ADHS	26
III. 1. 2. Kontrollprobanden	26
III. 2. Untersuchte klinische Parameter der ADHS-Patienten	27
III. 3. Probenmaterial	27
III. 3. 1. Probengewinnung	27
III. 3. 2. 12-Stunden-Sammelurin	27
III. 4. Probenaufbereitung und Analyse	28
III. 5. Affinitätschromatographie mit m-Aminophenylboronat-Säulen	29
III. 5. 1. Herstellung der Boronat-Säulen	29
III. 5. 2. Die Affinitätschromatographie in ihren Grundzügen	30
III. 5. 3. Elutionsschema	31
<i>III. 5. 3. 1. Grundzüge des Elutionsschemas</i>	31
<i>III. 5. 3. 2. Durchführung des Elutionsschemas</i>	31
III. 5. 4. Lagerung der Boronat-Säulen	32
III. 6. Prinzip der Umkehrphasen-HPLC	33
III. 7. Elektrochemische Detektion (ECD)	34
III. 8. Berechnung der Substanzkonzentrationen im Urin	35
III. 9. Statistische Berechnungen	37
IV. <u>Ergebnisse</u>	38
IV. 1. Bestimmung von TIQ im Urin von Patienten mit ADHS und Kontrollprobanden	38

IV. 1. 1.	Ergebnisse der Analysen in Tabellenform	38
IV. 1. 2.	Vergleich des Nachweises von TIQ im Urin von Patienten mit ADHS und Kontrollprobanden	39
IV. 2.	Untersuchung der TIQ-Derivate in Zusammenhang mit den Faktoren Alter, Medikation und psychischen Komorbiditäten im 12-Stunden-Sammelurin von ADHS-Patienten und Kontrollprobanden	39
IV. 2. 1.	Alter, Medikation und psychische Komorbiditäten als Kovariaten	39
IV. 2. 2.	Vergleich des Nachweises von TIQ im Urin von Patienten mit ADHS und Kontrollprobanden unter Ausschluss der Beeinflussung durch die Faktoren Alter, Medikation und psychische Komorbiditäten	41
IV.3.	TIQ-Konzentrationen im Urin als Marker für ADHS	42
V.	Diskussion	44
VI.	Zusammenfassung	52
VII.	Abkürzungen	53
VIII.	Literaturverzeichnis	54
	Danksagung	69
	Lebenslauf	71

I. Einleitung:

Gegenstand dieser Arbeit ist die Untersuchung von 1,2,3,4,-Tetrahydroisoquinolinen (TIQ) bei Kindern und Jugendlichen mit Aufmerksamkeits-Defizit-Hyperaktivitätsstörung (ADHS). Dafür wurden die Konzentrationen unterschiedlicher TIQ-Derivate im Urin von Kindern und Jugendlichen mit ADHS bestimmt und mit denen im Urin gesunder Probanden verglichen. Die Ergebnisse sollen einen Beitrag dazu leisten, mögliche pathophysiologische Faktoren bei Kindern und Jugendlichen mit ADHS zu identifizieren bzw. auszuschließen.

Innerhalb der Einleitung soll auf die Symptomatik, die Diagnostik, die Therapie sowie die unterschiedlichen Hypothesen zur Ätiologie der ADHS eingegangen werden. Dieser Überblick gilt dabei hauptsächlich den Theorien und Therapien, die sich mit den neurochemischen Aspekten der ADHS beschäftigen, da der Kern der Frage, der in dieser Arbeit nachgegangen werden soll, sich mit der neurochemischen Seite der ADHS beschäftigt.

Das Krankheitsbild ADHS und seine Symptome

Die hyperkinetische Störung wurde erstmals von F. KRAMER und H. POLLNOW 1932 als „hyperkinetische Erkrankung im Kindesalter“ beschrieben. (Huber, 2006).

Im Rahmen der klinischen Diagnostik werden die Begriffe „Aufmerksamkeits-Defizit-Hyperaktivitätsstörung“ und „Hyperkinetische Störung“ häufig synonym verwendet, obgleich mit ihnen zum Teil verschiedene Konzepte verbunden sind.

Die *International Classification of Diseases* (ICD-10) benutzt den Begriff der „hyperkinetischen Störung“ (F90) oder der einfachen „Aktivitäts- und Aufmerksamkeitsstörung“ (F90,0) und beschreibt damit eine Störung, die im Allgemeinen vor dem 7. Lebensjahr beginnt und sich durch die Kernsymptome Unaufmerksamkeit, Impulsivität und Hyperaktivität auszeichnet. Nach den Kriterien der ICD-10 müssen zur Diagnosestellung Auffälligkeiten in allen der genannten drei Störungsbereichen vorliegen und weiterhin in mehr als nur einem sozialen Lebensbereich auftreten, zum Beispiel sowohl im häuslichen Bereich als auch in der Schule. Dementsprechend müssen sie situationsunabhängig und zeitstabil vorhanden sein.

Das *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders* (DSM IV) verwendet den Begriff „Aufmerksamkeits-Defizit-Hyperaktivitätsstörung“, welcher sich in der Definition der einzelnen Symptome zwar kaum von der ICD-10 unterscheidet, allerdings werden hier die Symptome zur Diagnosestellung in anderer Weise kombiniert.

Nach DSM IV (American-Psychiatric-Association 1994) werden drei Subtypen unterschieden:

1. der Mischtyp
2. der vorherrschend unaufmerksame Typ
3. der vorherrschend hyperaktiv-impulsive Typ

Eine Übersicht über die Diagnosen nach ICD-10 und DSM-IV gibt Abbildung 1.

Zum Mischtyp wurden die meisten empirischen Studien durchgeführt, über die beiden anderen Subtypen liegt weniger fundiertes Wissen vor. Die Unterschiede zwischen dem Mischtyp und dem vorherrschend unaufmerksamen Typ wurden in mehreren Studien untersucht (Lahey und Carlson, 1992; Goodyear und Hydn, 1992).

Bei Jugendlichen und Erwachsenen, die zum Zeitpunkt der Untersuchung nicht mehr alle Kriterien erfüllen, wird nach DSM-IV eine „ADHS in partieller Remission“ diagnostiziert.

Damit wird die Erkenntnis, dass die Symptome der Hyperaktivität im Laufe der Adoleszenz oft rückläufig sind in die Diagnosekriterien miteinbezogen (Döpfner und Lehmkuhl, 2004).

In Abhängigkeit von den angewandten diagnostischen Kriterien sind etwa 2-5 % der Gesamtbevölkerung von der Störung ADHS betroffen (Swanson et al., 1998), wobei das Verhältnis Jungen zu Mädchen in etwa 3:1 bis 6:1 beträgt.

International und national liegen mittlerweile Leitlinien sowohl zur Diagnostik als auch zur Therapie von ADHS vor. In dieser Arbeit wurde die Diagnosestellung im Rahmen eines halbstrukturierten Interviews vorgenommen, welche durch den DISYPS-KJ (Döpfner und Lehmkuhl, 2000) verifiziert wurde. Die klinische Beurteilung erfolgte anhand der darin enthaltenen Diagnose-Checklisten (DCL-HKS), die Einschätzung der Eltern, der Lehrer bzw. Erzieher wurde anhand des Fremdbeurteilungsbogens (FBB-HKS) vorgenommen.

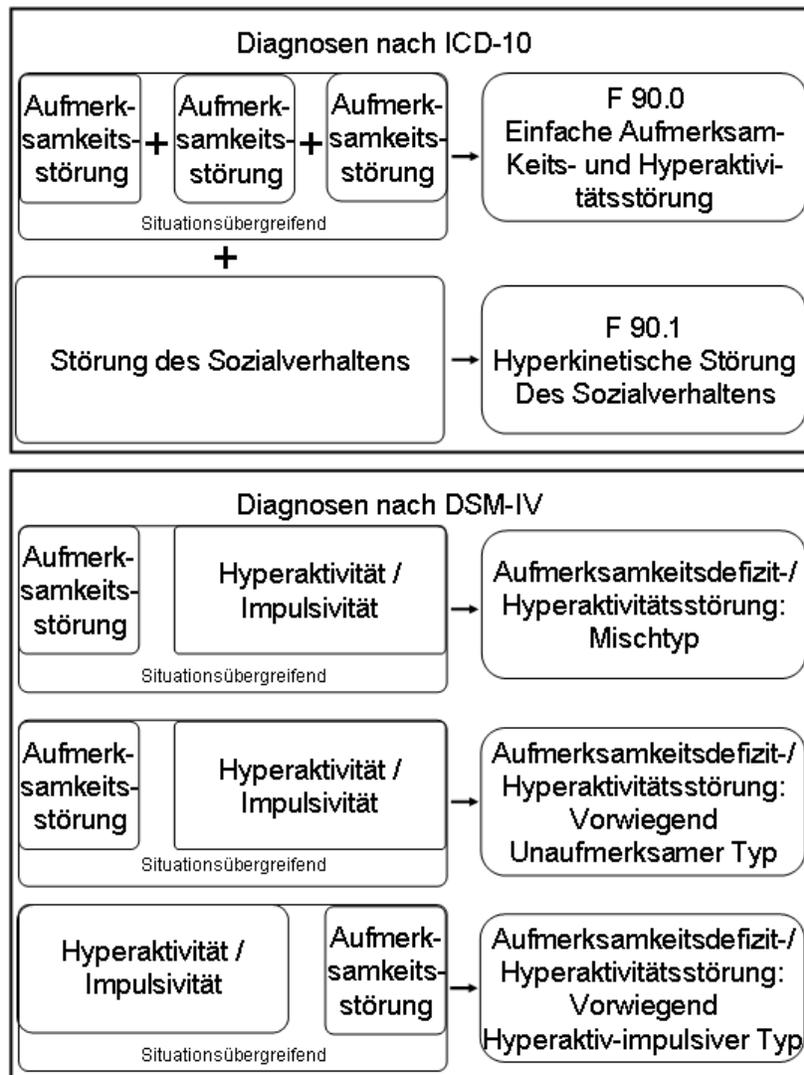


Abb. 1: Übersicht über die Diagnosestellung nach ICD-10 und DSM-IV (<http://www.uni-bielefeld.de>) Die Diagnostik erfolgt im Rahmen von klinischen Interviews, die Erfassung der Symptomatik anhand von verschiedenen Fragebogenverfahren.

Komorbide Störungen treten bei Kindern mit ADHS in etwa zwei Drittel der Fälle auf. Hierbei sind vor allem oppositionell-trotziges Verhalten (40 %), Angststörungen (einfache Phobie ausgenommen) (35 %) und Störungen des Sozialverhaltens (14 %) zu nennen (Ishii et al., 2003). Weiterhin sind die Intelligenzleistungen von Kindern mit ADHS um 7 bis 15 Intelligenzquotient (IQ)-Punkte vermindert; bislang ist allerdings nicht geklärt, inwieweit dies durch die mangelnde Aufmerksamkeit während der Durchführung des Tests verursacht wird (Döpfner, 2000). Auch umschriebene Lernprobleme, motorische Ungeschicklichkeit, Entwicklungsstörungen, depressive Verstimmungen sowie rigide und zwanghafte

Verhaltensweisen treten bei Patienten mit ADHS vermehrt auf. Bei 32-50 % der Kinder mit ADHS wird außerdem eine Tic-Störung beschrieben (Spencer et al., 2001a).

Unter einer Tic-Störung versteht man eine plötzlich einsetzende, unwillkürliche, motorische Bewegung meist umschriebener Muskelgruppen oder eine Lautproduktion, die keinem offensichtlichen Zweck dient.

Die schulischen Leistungen bei bis zu 80 % der Kinder liegen um mindestens zwei Noten unter dem Klassendurchschnitt (Cantwell und Baker, 1992). Insgesamt sind Patienten mit ADHS durch eine am Intelligenzniveau gemessene unterdurchschnittliche akademische Ausbildung gekennzeichnet (Faraone et al., 1993).

Im Verlauf der Entwicklung verändert sich das klinische Erscheinungsbild der ADHS erheblich. Ab dem Einschulungsalter bis ins Jugend- und Erwachsenenalter ist eine relativ hohe Persistenz der Störung in mehreren Längsschnittstudien belegt. Die Symptome der Hyperaktivität vermindern sich oft im Jugendalter (Fergusson et al., 1997; Greene et al., 1997; Satterfield und Schell, 1997; Mannuzza und Klein, 1999). Insgesamt persistieren bei 30-80 % aller Kinder die Symptome von ADHS bis ins Jugend- und bei bis zu 65 % bis ins Erwachsenenalter (Barkley, 1998; Weiss und Hechtman, 1993). Dabei sind die Diagnosekriterien meist nicht mehr komplett erfüllt, Funktionsbeeinträchtigungen sind aber in der überwiegenden Mehrzahl der Fälle weiterhin vorhanden (Biedermann et al., 2000).

Hypothesen zur Entstehung von ADHS

Die Ätiologie der ADHS ist noch nicht abschließend geklärt. Es existieren unterschiedliche Hypothesen, wobei schon vorab festgehalten werden muss, dass es bisher keinen strukturellen, funktionellen, neurochemischen oder genetischen Marker für ADHS gibt (Zametkin et al., 1998) und dass sich Unterschiede in der Struktur und Funktion des Gehirns ebenfalls bei Kindern mit sog. „normalen“ Temperamentsvariationen finden lassen (z.B. Fox et al., 1995).

Zur Erklärung der ADHS gibt es unter anderem neuropsychologische Konzepte und Befunde. Zur Zeit existieren unterschiedliche neuropsychologische Modelle, die gleichermaßen Störungen bei der Hemmung oder Verzögerung von Reaktionen, bei den exekutiven Funktionen sowie motivationale Faktoren als zentrale Komponenten bei der Entwicklung von ADHS hervorheben (Nigg, 2000, 2001; Sergeant, 2000; Sonuga-Barke, 2002; Tannock, 1998).

Unterschieden werden u.a. die folgenden Modelle:

- das Verhaltenshemmungs/-aktivierungsmodell (Quay, 1993)

- das Modell der Störungen exekutiver Funktionen (Pennington und Ozonoff, 1996)
- das Modell der mangelnden Reaktionsinhibition als primäres Defizit (Barkley, 1997a,b)
- das kognitiv-energetische Modell (Sergeant, 2000)
- das Modell der Verzögerungsinvasion (Sonuga-Barke, 1994)
- das duale Modell inhibitorischer und motivationaler Dysfunktionen (Sonuga-Barke, 2002)

Eine Übersicht über neuropsychologische Testverfahren, die zur Prüfung dieser Modelle entwickelt wurden, gibt Tabelle 1.

Paradigma	Beschreibung
Go-/No-Go-Aufgaben	Nach dem Zufallsprinzip wird der Proband unterschiedlichen Stimuli ausgesetzt (z.B. 1 und 2), wobei er bei 1 reagieren und bei 2 nicht reagieren soll. Stimulus 1 wird dabei häufiger gesetzt, um bei dem Probanden eine Tendenz zur Reaktion zu erzeugen. Ein Mehr an Reaktionen auf 2 gilt als Hinweis auf mangelnde Hemmung von Impulsen.
Stopp-Signal-Aufgaben	Dem Probanden werden zwei verschiedene Stimuli (z.B. 3 und 4) mit gleicher Wahrscheinlichkeit präsentiert, wobei der Proband aufgefordert wird, bei jedem der Reize schnellstmöglich eine bestimmte Taste zu drücken. Wird ein Stopp-Signal präsentiert, soll keine Taste gedrückt werden. Gelingt es dem Probanden, den Handlungsimpuls zu unterdrücken, gilt dies als inhibitorische Leistung.
Stroop-Test	Der Proband soll die Farbe, in der ein Wort geschrieben ist, benennen. Das Wort beschreibt dabei eine andere Farbe (z.B. wird das Wort „blau“ in roter Farbe geschrieben. Die Antwort „rot“ wäre hier richtig). Die unter dieser Bedingung messbare Verlangsamung der Benennung einer Farbe gilt als Maß für die

	Interferenzkontrolle.
Antisakkaden-Aufgabe	Dem Probanden wird in der Peripherie seines Gesichtsfeldes ein visuelles Signal präsentiert, wobei der Patient Augenbewegungen zu diesem Signal hin unterdrücken soll. Die Fähigkeit dazu gilt als inhibitorische Fähigkeit.
Matching Familiar Figures Test (MFF)	Der Proband soll ein vorgegebenes Bild aus einer Gruppe ähnlicher Bilder wieder erkennen. Arbeitet der Proband mit hoher Geschwindigkeit in Verbindung mit vielen Fehlern gilt dies als Hinweis auf mangelnde inhibitorische Kontrolle bzw. erhöhte Impulsivität.
Continuous Performance Test (CPT)	Der Proband soll in einer Serie von Signalen auf ein seltenes Signal reagieren, z.B. soll er in einer Serie von Buchstaben immer dann eine Taste drücken, wenn ein z nach einem b folgt. Auslassungsfehler werden als Maß für die Aufmerksamkeit, falsche Reaktionen als Maß für die Impulsivität interpretiert.

Tabelle 1: Wichtige Testparadigmen in der neuropsychologischen Diagnostik von ADHS (Mod. Nach Nigg, 2001)

Zur Darstellung der ADHS aus neurobiologischer Perspektive wurden funktionelle und strukturelle Untersuchungen vor allem von Gehirnregionen durchgeführt, deren neuronale Netzwerke für die Steuerung, Kontrolle und Regulation des Verhaltens bedeutsam sind. Hierzu zählen zum Beispiel der frontale und parietale Kortex sowie der Basalganglienbereich (Casey et al., 1997).

Funktionelle Auffälligkeiten zeigten sich bei Kindern mit ADHS im Bereich des zerebralen Blutflusses und der Glukoseutilisation. Es wurde unter Ruhebedingungen eine Positronenemissionstomographie (PET)-Untersuchung durchgeführt. Diese zeigte einen niedrigen zerebralen Blutfluss im Bereich der Basalganglien und des frontalen Kortex. Nachdem die Kinder Methylphenidat (MPH) eingenommen hatten, stieg der zerebrale

Blutfluss im Bereich der Basalganglien an, während er im Bereich des sensomotorischen Kortex abnahm (Lou et al., 1984).

Eine Untersuchung von Jugendlichen mit ADHS zeigte keine Unterschiede in der globalen oder absoluten Glukoseutilisation, allerdings wurde für die Gruppe der Mädchen mit ADHS eine niedrigere absolute Metabolismusrate festgestellt. Eine signifikante inverse Beziehung zwischen Ausprägungsgrad der ADHS und der Metabolismusrate konnte für den Bereich des linken anterioren frontalen Kortex aufgezeigt werden (Zametkin et al., 1993).

Neurophysiologische Auffälligkeiten konnten bei Kindern und Jugendlichen mit ADHS im Elektroenzephalogramm (EEG) nachgewiesen werden. Es zeigte sich ein höherer Anteil langsamer Wellen (Barry et al., 2003; Clarke et al., 2001; Lazzaro et al., 1999; Monastra et al., 2001): eine niedrige alpha- und beta-Power, eine relativ hohe theta-Power und ein höherer theta-/alpha- bzw. theta-/beta-Quotient. Während einer Go-Aufgabe (motorische Antwort auf einen Stimulus) konnten bei Kindern mit ADHS langsamere und variabelere Antworten festgestellt werden. Dieses könnte im Sinne eines niedrigeren Arousal bzw. einer niedrigeren Aktivierung neuronaler Systeme eingeordnet werden (Sergeant, 2000).

Morphologische Auffälligkeiten zeigten sich bei Kindern mit ADHS als kleinere kortikale Volumina der rechtsseitigen anterioren Region des frontalen Kortex bzw. der rechten präfrontalen und frontalen Hemisphärenregion, bilateral der parietal-okzipitalen Hemisphärenregion und des Corpus Callosum (Filipek et al., 1997; Mataro et al., 1997). Im präfrontalen Kortex betrafen diese kleineren Volumina sowohl die graue als auch die weiße Substanz (Kates et al., 2002). Subkortikal wurde ein verkleinerter linker Nucleus caudatus und ein verkleinerter Globus pallidus festgestellt (Castellanos et al., 1996). Diese Volumenunterschiede liegen in der Größenordnung zwischen 5-10 %, sind allerdings bezüglich der Lateralität bzw. der Asymmetrie inkonstant (Castellanos et al., 2001). Betroffen sind letztlich also Regionen frontal-subkortikaler Neuronensysteme zur übergeordneten Verhaltenssteuerung (Casey et al., 1997).

Von allen morphologischen Auffälligkeiten sind die des Cerebellums am deutlichsten ausgeprägt. Hier fand sich ein kleineres Volumen der Hemisphären und der Subregion VIII-X des Vermis (Castellanos et al., 2001). In diesen Subregionen und ebenso im ventralen Cerebellum konnte bei Primaten das Vorhandensein von Dopamintransportern immunozytochemisch dargestellt werden (Melchitzky und Lewis, 2000). Diese Auffälligkeiten unterstützen also die Theorie einer dopaminergen Dysfunktion bei ADHS. Weiterhin werden die neuronalen Netzwerke des Neocerebellums als bedeutsamer Bestandteil für die präzise Ausführung zeitlicher Vorgänge angesehen (Ivry, 1997).

Die Dopamin-Theorie der ADHS wurde zum ersten Mal 1987 von Sokol (Sokol et al., 1987) veröffentlicht. Seitdem sind zahlreiche Publikationen erschienen, in welchen die Rolle von Dopamin bei ADHS diskutiert wird. Befunde bildgebender Verfahren unterstützen die Theorie der katecholaminergen Dysfunktion bei ADHS ebenso wie Befunde genetischer Studien und die Erfolge der Pharmakotherapie der ADHS mit Stimulanzien, die direkt ins dopaminerge und noradrenerge System eingreifen (Levy und Swanson, 2001).

Heute existieren drei unterschiedliche Modelle der ADHS, die versuchen, die verschiedenen neurobiologischen Befunde und Theorien zu vereinigen (Williams, 2008), wobei inzwischen weitgehend Einigkeit herrscht, dass eine in der Summe erniedrigte striatale dopaminerge Transmission für die ADHS-Symptomatik verantwortlich ist (Biederman und Faraone, 2002; Sagvolden et al., 2005; Solanto, 2002; Pliszka, 2005). Andere Ansätze gehen teilweise von einem zumindest punktuellen Überangebot von Dopamin bei ADHS aus.

Diese teilweise widersprüchlichen Befunde zur Rolle des dopaminergen Systems bei ADHS wurden vor einigen Jahren in einem komplexeren Modell kombiniert, welches davon ausgeht, dass eine zu niedrige tonische Freisetzung von Dopamin über eine reduzierte Stimulation präsynaptischer Autorezeptoren zu einer erhöhten phasenhaften Dopaminausschüttung führen könnte (Grace, 2001, Solanto, 2002).

Wieder andere Autoren gehen von einer Verminderung sowohl der tonischen als auch der phasenhaften Dopaminausschüttung bei ADHS aus (Madras et al., 2005; Sagvolden et al., 2005). Die daraus resultierende ADHS-Symptomatik erklärt man sich dadurch, dass besonders durch die phasenhafte Dopaminausschüttung das Lernen unterstützt wird, indem negative Handlungen verhindert und positive Handlungen durch Belohnung verstärkt werden (Frank et al., 2005). Auf das Arbeitsgedächtnis wirkt diese Dopaminausschüttung im Sinne einer kontinuierliche Aktualisierung von relevanten Informationen (O'Reilly und Frank, 2006) und beeinflusst weiterhin in orbitofrontalen Regionen die Entscheidungsfindung (Frank und Claus, 2006).

Insgesamt muss darauf hingewiesen werden, dass es nicht immer möglich ist, Befunde einer Studie zur Pathophysiologie der ADHS eindeutig als Hinweis auf eine hypo- oder aber eine hyperdopaminerge Neurotransmission zu interpretieren.

Folgend werden verschiedene Hypothesen vorgestellt, die sich unter anderem mit der Bedeutung von Dopamin bei ADHS auseinandersetzen.

Familien-, Adoptions- und Zwillingsstudien zeigten, dass genetische Faktoren bei ADHS eine entscheidende Rolle spielen (Stevenson, 1992). Beispielsweise erhöht das Vorhandensein einer ADHS bei den Eltern die Wahrscheinlichkeit der Ausbildung einer ADHS bei einem Kind um den Faktor 8 (Mick et al., 2002).

Zahlreiche Kandidatengene mit einer Verbindung zum dopaminergen System wurden bei Patienten mit ADHS untersucht, insbesondere das Dopamintransporter-Gen (DAT-Gen), welches vor allem im Striatum und Nucleus accumbens exprimiert wird, und das Dopaminrezeptor-D4 (DRD₄)-Gen, welches hauptsächlich im präfrontalen Kortex exprimiert wird (Castellanos, 1997).

Es zeigten sich Assoziationen mit dem 10-Repeat-Allel des DAT-Gens (Cook et al., 1995) und mit dem 7-Repeat-Allel des DRD₄-Rezeptor-Gens (Faraone et al., 1999).

Das besagte Allel des DAT-Gens beeinflusst zwar nicht die Struktur des Transporterproteins, könnte allerdings dessen Expression und damit dessen Dichte beeinflussen (Madras et al., 2002). Insgesamt ist die Stärke der Assoziationen allerdings nicht deutlich genug, um das Auftreten von ADHS alleine zu bewirken. In einer aktuellen Metaanalyse konnte weiterhin kein statistisch signifikanter Beleg für eine Beteiligung des DAT-Gens an der Ätiologie der ADHS nachgewiesen werden (Li et al., 2006). Zwei neuere Studien legen allerdings die Vermutung nahe, dass nur die Kombination unterschiedlicher Allele des DAT-Gens das Risiko einer ADHS signifikant erhöhen (Asherson et al., 2007; Brookes et al., 2006). Möglich ist, dass sowohl das DAT-Gen als auch das DRD₄-Rezeptor-Gen zu dem vermuteten Dopamin-Defizit bei ADHS beitragen. Man nimmt an, dass das 7-Repeat-Allel des DRD₄-Rezeptor-Gens einen Rezeptor produziert, der für die Aufnahme von Dopamin subsensitiv ist, während das 10-Repeat-Allel des DAT-Gens eventuell mit einem hypereffizienten Transporter assoziiert ist, wodurch vermehrt Dopamin abtransportiert werden würde. So könnten die genannten Gene zu einer dopaminergen Unteraktivität in Regionen des Gehirns, die bei Kontrollprozessen von Aufmerksamkeit und Verhalten eine entscheidende Rolle spielen, beitragen (Swanson et al., 1998).

Bei Vorliegen des 7-Repeat-Allel des DRD₄-Rezeptor-Gens konnte in einer Metaanalyse von mehr als 30 Studien gezeigt werden, dass das Risiko für ADHS zwar nur geringfügig, allerdings statistisch signifikant erhöht ist (Faraone et al., 2001b; Li et al., 2006).

Interessant ist weiterhin, dass unterschiedliche Autoren davon ausgehen, dass ein bestimmter DAT Polymorphismus mit einer bestimmten Wahrscheinlichkeit des Ansprechens auf eine Stimulanzienbehandlung assoziiert ist. Dazu fanden sich unterschiedliche Ergebnisse, wobei sich am ehesten herausstellte, dass besonders Träger des 9-9 Genotyps auf eine ADHS-Behandlung mit Stimulanzien schlecht ansprechen

Auch wurde in den meisten Bindungsstudien eine erhöhte DAT-Dichte im Striatum, welches maßgeblich für die Regulation von Aufmerksamkeit und Motorik verantwortlich ist, von Kindern, Jugendlichen und Erwachsenen mit ADHS gefunden (Krause, 2008).

Für ein weiteres Gen, das Dopamin-β-Hydroxylase-Gen (DBH-Gen) konnte in einer Studie eine signifikante Assoziation mit ADHS bei einem relativen Risiko von 1,3 festgestellt werden (Smith et al., 2003).

Weitere Kandidatengene wie die Gene für Dopamin D1–3 Rezeptoren, DOPA-Decarboxylase, Tyrosin Hydroxylase, Catechol-O-Methyl-Transferase und Monoamin Oxidase A wurden mit uneindeutigen Ergebnissen beforscht.

Die Strukturformel von Dopamin ist in Abbildung 2 dargestellt.

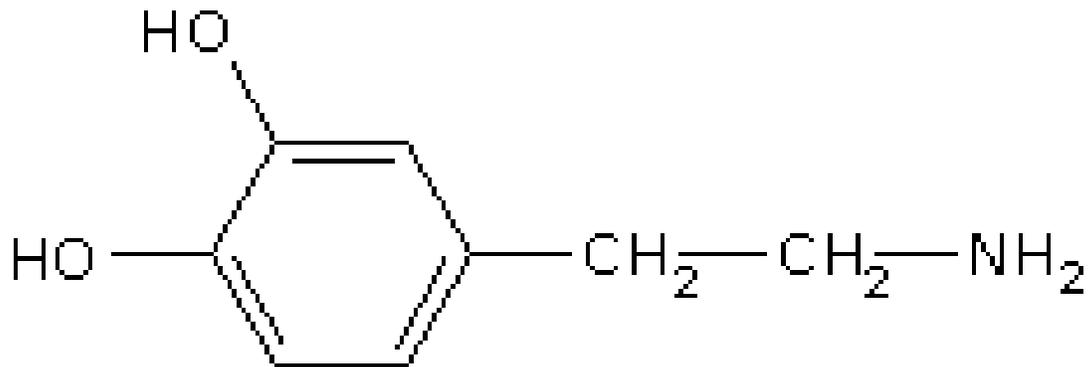


Abb. 2: Dargestellt ist die Strukturformeln von Dopamin, dem Neurotransmitter, dem bei ADHS in unterschiedlichen Theorien eine entscheidende Rolle zugeschrieben wird

Mittels funktioneller Untersuchungen wurden verschiedene neurochemische Auffälligkeiten bei ADHS-Patienten festgestellt. Hierzu gehören Single Photon Emission Computed Tomography (SPECT)-Untersuchungen bei Erwachsenen mit ADHS, bei denen im Basalganglienbereich mit hochselektiven Liganden eine um bis zu 70 % erhöhte Bindungsdichte des Dopamintransporters gemessen werden konnte (Dougherty et al., 1999; Krause et al., 2000). Bei Kindern mit ADHS wurde eine erhöhte Dopamintransporterbindung im Basalganglienbereich nachgewiesen. Allerdings konnte keine signifikante Korrelation zwischen der Dopamintransporter-Bindungsrate und dem Ausprägungsgrad der ADHS festgestellt werden (Cheon et al., 2003).

Aktivitätsunterschiede im dopaminergen System können bedeutend bei der Funktion präfrontaler und frontaler Neuronensysteme mitwirken und außerdem Leistungsunterschiede beispielsweise des Arbeitsgedächtnisses mitbedingen (Sawaguchi, 2001).

Auch für das im Gehirn weit verbreitete noradrenerge Neurotransmittersystem wird eine solche Aktivitätsveränderung diskutiert (Halperin et al., 1997). Es moduliert die dopaminerge

Regulation im Gehirn. Produziert wird Noradrenalin im lateralen Tegmentum und im Locus coeruleus. Die noradrenergen Neurone wiederum beteiligen sich an der Regulation von Vigilanz, der Orientierungsreaktion, der selektiven Aufmerksamkeit und der exekutiven Funktionen (Clark et al., 1987).

Auch die Wirkmechanismen der in der Therapie der ADHS erfolgreich eingesetzten Psychopharmaka, die Stimulanzien und der Noradrenalin-Wiederaufnahme-Inhibitor Atomoxetin, wurden als eine noradrenerge und eine daraus folgende bzw. auch für eine davon evt. unabhängige dopaminerge Störung als eine Ursache der ADHS interpretiert (Bymaster et al., 2002). Der Wirkmechanismus der Stimulanzien beruht hauptsächlich auf einer Hemmung der Wiederaufnahme von Dopamin in die Präsynapse (Dresel et al., 2000; Krause et al., 2000; Volkow et al., 2001).

Die Strukturformel von Noradrenalin ist in Abbildung 3 dargestellt.

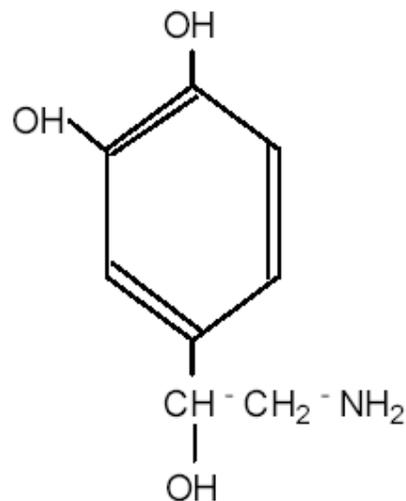


Abb. 3: Dargestellt ist die Strukturformel von Noradrenalin, einem Neurotransmitter, der bei ADHS vermutlich eine Rolle spielt

In Zusammenhang mit der Dopamin-Theorie kann ADHS auch aus entwicklungsneurobiologischer Perspektive betrachtet werden. Die schrittweise Anpassung der sich entwickelnden synaptischen Verschaltungsmuster an die Anforderungen, die während der Gehirnentwicklung immer komplexer werden, wurde in mehreren Studien nachgewiesen (Übersicht: Joseph, 1999). Die Gehirnentwicklung wird als ein Prozess verstanden, der sich selbst organisiert, allerdings durch Interaktion mit der äußeren Welt beeinflusst wird. Eines der in diesem Kontext am besten untersuchten Systeme ist das Stresssystem, das wiederum

entscheidenden Einfluss auf die Entwicklung des Gehirns nimmt (Hüher, 1998). Im frontalen Kortex deprivierter Ratten konnte beispielsweise, wie auch in anderen Gehirnarealen, sowohl eine erhöhte Apoptose- als auch eine verminderte Zytogeneserate festgestellt werden (Zhang et al., 2002). Diese Tiere zeigten im Gegensatz zu Ratten, die unter natürlichen Bedingungen aufgewachsen waren, im Erwachsenenalter schon bei geringer Belastung eine Veränderung ihres dopaminergen Systems (Anand und Scalzo, 2000).

Dopaminsynthetisierende und -freisetzende Nervenzellen sind bereits sehr früh während der Embryonalzeit nachweisbar, beim Menschen in der 4. Schwangerschaftswoche (Pendelton et al., 1998). Dopamin wirkt während der Embryonalzeit als Signalstoff (Lauder, 1998) und ist an der Regulation morphogenetischer Prozesse in den jeweiligen Zielgebieten dopaminergere Projektionen im sich entwickelnden Gehirn beteiligt (Todd, 1992). Die dopaminergere Projektionen erreichen ihre maximale Innervationsdichte erst mit dem Eintritt in die Adoleszenz (Goldman-Rakic und Brown, 1992; Lewis et al., 1998).

Neben seiner Funktion als Neurotransmitter ist Dopamin entscheidend an der Regulation struktureller Umbau- und Regulationsprozesse kortikaler Netzwerke von Primaten beteiligt (Walters et al., 2000). Die mesokortikalen dopaminergere Projektionen sollen auch beim Menschen eine wichtige Bedeutung für Anpassungsleistungen und Verankerung neuer Erfahrungen haben. Weiterhin sind besonders die im präfrontalen Kortex vorhandenen dopaminergere Afferenzen an der Regulation von Aufmerksamkeits- und kognitiven Prozessen sowie an der Verstärkung von Intention und deren Umsetzung in entsprechende Handlungen beteiligt (Nieoullon, 2002). Die Aktivierung dopaminergere Neurone im Mittelhirn ist abhängig von unterschiedlichen Reizen wie beispielsweise der Wahrnehmung von etwas Neuartigem oder unerwartet auftretender Reize (Ljungberg et al., 1992). Die dopaminergere Innervationsdichte ist auch von den äußeren Bedingungen abhängig, unter denen sich das Gehirn entwickelt. Dies konnte tierexperimentell nachgewiesen werden, indem die Versuchstiere entweder unter Bedingungen aufgezogen wurden, die wenig neuartige Stimuli boten oder aber unter Bedingungen, unter denen sie gerade besonders vielen neuartigen Reizen ausgesetzt waren. Erstere entwickelten eine dopaminergere Hypoinnervation, letztere eine dopaminergere Hyperinnervation des präfrontalen Kortex (Winterfeld et al., 1998; Neddens et al., 2001) bzw. des Striatum (Lehmann et al., 2002). Diese Veränderungen waren wiederum mit charakteristischen Verhaltensänderungen der Tiere im Erwachsenenalter verbunden (Morgan et al., 1975; Jones et al., 1991; Hall, 1998). Die Ausformung einzelner Verhaltensmerkmale wie beispielsweise Impulsivität, Ängstlichkeit, Lernfähigkeit, Stressanfälligkeit ließ sich durch gezielte Beeinflussung der Aufzuchtbedingungen sogar so stark verändern, dass sich die Tiere im Erwachsenenalter kaum noch von Inzuchtstämmen unterschieden, die diese Merkmale angeborenermaßen herausgebildet hatten (Gentsch et al., 1981).

Aus diesen Versuchen wird also deutlich, dass es durch übermäßig häufige Aktivierung des sich entwickelnden dopaminergen Systems zu einer übermäßigen Stimulation von axonalem Wachstum der in striatale, limbische und besonders frontokortikale Projektionsgebiete einwachsender dopaminergere Projektionen kommen kann. Als Gründe für diese zu häufige Stimulation dopaminergere Neurone kommen besonders frühe Reizüberflutung und/oder mangelhafte Reizabschirmung in Betracht.

Somit wird verständlich, dass psychosoziale Faktoren wie beispielsweise unsichere Bindungsbeziehungen, fehlende Strukturen und Rituale und inkompetente Erziehungsstile einen modulierenden Einfluss auf die Hyperaktivität haben und deren Prognose wesentlich beeinflussen können.

Ein weiteres in Zusammenhang mit ADHS wichtiges Tiermodell ist das Modell der spontanen Hypertensiven Ratte (SHR). Eine bei SHR gefundene Veränderung von Basenpaaren in nicht kodierenden Regionen im DAT-Gen (Mill et al., 2005) scheint von Bedeutung zu sein, da in einigen ADHS-Familienstudien Veränderungen von Basenpaaren in eben diesem Bereich des DAT-Gens mit ADHS assoziiert sind (Bobb et al., 2005; Cook et al., 1995; Dougherty et al., 1999; Kirley, et al., 2003; Krause et al., 2000). Eine durch die Veränderung von Basenpaaren möglicherweise hervorgerufene Beeinflussung der Transkription passt zu Befunden bei SHR, welche besagen, dass die Expression des DAT-Gens im Laufe der Entwicklung einer Veränderung unterlegen ist (Leo et al., 2003; Watanabe et al., 1997). Veränderungen in der Expression des DAT Gens können wiederum über DAT Veränderungen die Dopaminaufnahme und -wiederverwendung beeinträchtigen. Es konnte nachgewiesen werden, dass vor allem durch eine präpubertale Medikation mit MPH die erhöhte DAT Dichte im Striatum der SHR auf normale Werte reduziert werden konnte (Roessner et al., 2009).

TIQ und ADHS

Ebenfalls durch tierexperimentelle Untersuchungen an Affen konnte die Bedeutung einer dopaminergen Hypofunktion im präfrontalen Kortex für die ADHS-Symptomatik nachgewiesen werden. Eine Verabreichung von chronisch niedrigdosiertem 1-Methyl-4-Phenyl-1,2,3,6-Tetrahydropyridin (MPTP) bewirkte bei diesen Affen eine Zerstörung von präfrontalen, dopaminergeren Neuronen. Die Affen zeigten daraufhin Verhaltensauffälligkeiten, die denen hyperaktiver Kinder ähnelten wie z.B. Ungeduld, Ruhelosigkeit, Frustrationsintoleranz und Zappeligkeit. Post mortem konnte bei diesen Tieren eine Verarmung an Dopamin und Noradrenalin im N. caudatus und an Noradrenalin in

präfrontalen, frontalen und inferior temporalen Hirnregionen festgestellt werden (Roeltgen und Schneider, 1991). Die Strukturformeln von MPTP ist in Abbildung 4 dargestellt.

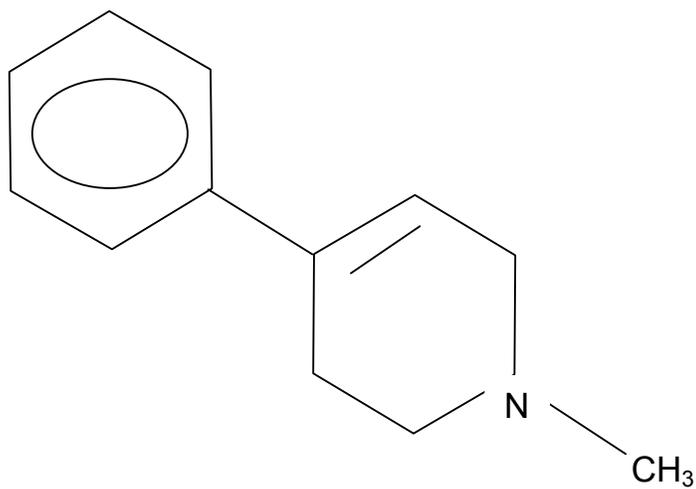


Abb. 4: Dargestellt ist die Strukturformel von MPTP, einem selektiven Toxin für dopaminerge Neurone

Nachdem MPTP als selektives Neurotoxin identifiziert wurde, begann eine Suche nach Substanzen, die MPTP ähneln. Basierend auf Untersuchungen verschiedener Strukturen wurde geschlussfolgert, dass ein Phenyl- und ein Pyridinring für einen toxischen Effekt erforderlich sind. Als potentielle neurotoxische Verbindungen wurden TIQ (Nagatsu und Hirata, 1986) und N-Methyl-Tetrahydroisoquinolin (NMTIQ) identifiziert (Niwa et al., 1987; Naoi et al., 1989a; Naoi et al., 1989b). Zu den TIQ gehören beispielsweise die Derivate 1-Methyl-6,7-Dihydroxy-1,2,3,4-Tetrahydroisoquinolin (Salsolinol) und 6,7-Dihydroxy-1,2,3,4-Tetrahydroisoquinolin (Norsalsolinol), zu den NMTIQ die Derivate 1,2-Dimethyl-6,7-Dihydroxy-1,2,3,4-Tetrahydroisoquinolin (N-Methyl-Salsolinol) und 2-Methyl-6,7-Dihydroxy-1,2,3,4-Tetrahydroisoquinolin (N-Methyl-Norsalsolinol).

Den Pathomechanismus der möglichen Neurotoxizität von TIQ kann man sich folgendermaßen vorstellen: Nach Oxidation über die Monoaminoxidase B kommt es zur Bildung von Isochinolinium-Ionen, welche neben einer Hemmung der Tyrosinhydroxylase auch die Bildung von Hydroxylradikalen und nachfolgend eine Hemmung des Energiestoffwechsels in den Mitochondrien bewirken (Niwa et al., 1987, 1991; Suzuki et al., 1990; Naoi und Maruyama, 1993; Naoi et al., 1993).

Der Nachweis von TIQ und NMTIQ konnte auch im Gehirn von Primaten und Menschen geführt werden (Kohno et al., 1986; Niwa et al., 1987; Ohta et al., 1987). Die höchsten Konzentrationen des TIQ-Derivats Salsolinol und seinen Metaboliten fanden sich in den dopaminreichen Basalganglien (Muschhoff et al., 1999). Dieser Region wird eine

entscheidende Rolle in der Ätiologie von ADHS zugeschrieben (Biederman und Faraone 2005)

Es wird angenommen, dass im menschlichen Gehirn die zwei TIQ-Derivate Salsolinol und Norsalsolinol aus Dopamin entstehen und zwar zum einen durch die nicht-enzymatische Pictet-Spengler-Reaktion und zum anderen durch eine enzymatische Synthese mittels einer Salsolinol-Synthetase (Naoi et al., 1996).

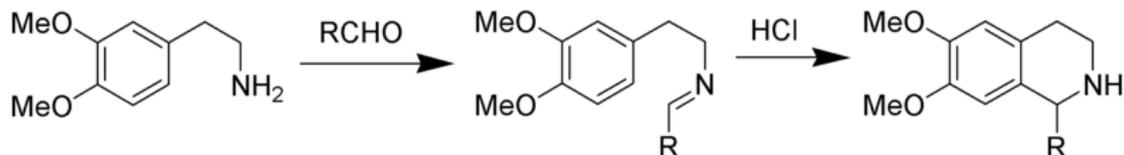


Abb.5: Dargestellt ist die Pictet-Spengler-Reaktion zur Synthese von Tetrahydroisoquinolinen (MeO = 3,4-dimethoxyphenyl-Gruppen, RCHO = Aldehyd) ausgehend von biogenen Aminen

Deren jeweilige N-Methyl-Derivate entstehen enzymatisch mittels N-Methyltransferase. Die Pictet-Spengler Reaktion ist beispielhaft in Abbildung 5 dargestellt, die Reaktionen zur Entstehung der N-Methyl-Derivate von Salsolinol und Norsalsolinol ist in Abbildung 6 zu sehen.

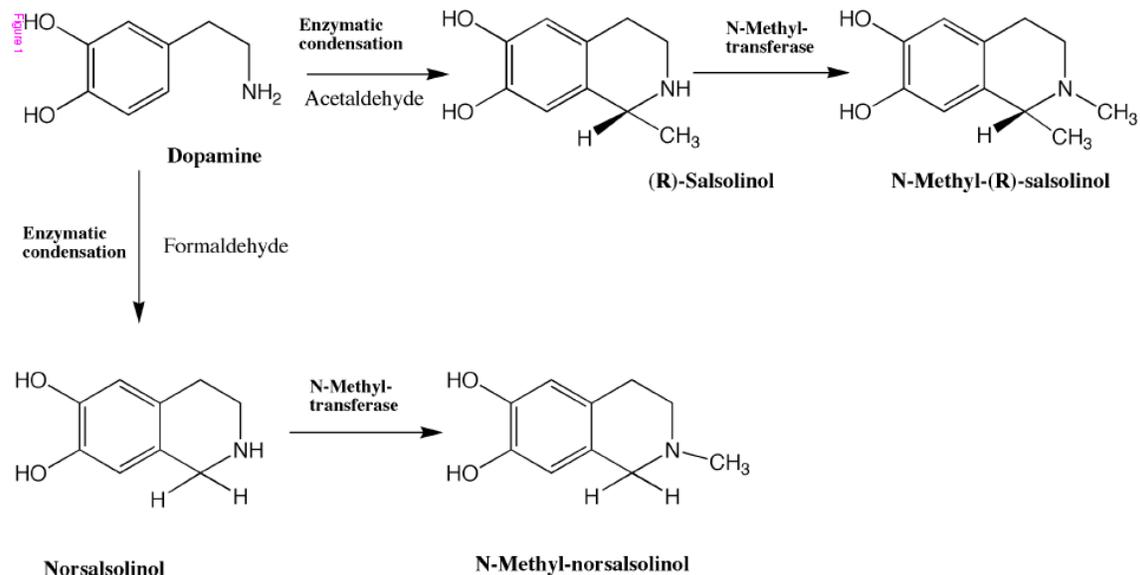


Abb. 6: Dargestellt sind die enzymatischen Reaktionswege, die zur Bildung von Salsolinol bzw. Norsalsolinol aus Dopamin führen und anschließend die Reaktionswege, an deren Ende die TIQ-Derivate N-Methyl-Salsolinol und N-Methyl-Norsalsolinol stehen (aus Moser, 1998b)

Auch die exogene Zufuhr von TIQ-Derivaten wird als Quelle der im menschlichen zentralen Nervensystem (ZNS) nachgewiesenen TIQ gewertet, da es sich um Verbindungen handelt, die leicht die Blut-Hirn-Schranke passieren und im ZNS akkumulieren können (Niwa et al., 1988). In vielen Nahrungsmitteln wie beispielsweise Sojaprodukten, Schokolade, Portwein, Bananen oder Käse konnten TIQ (Makino et al., 1988; Niwa et al., 1989) und Dihydroxy-1,2,3,4-Tetrahydroisoquinoline (DHTIQ) wie z.B. Salsolinol nachgewiesen werden (Duncan et al., 1984; Strölin Benedetti et al., 1989a), ebenso wurde nachgewiesen, dass die Aufnahme von Salsolinol mit der Nahrung zu einer vermehrten Ausscheidung von Salsolinol im Urin führt (Pianezzola et al., 1989; Strölin Benedetti et al., 1989b).

Im Gegensatz dazu stellte sich der Effekt der Einnahme stimulierender Medikamente auf die Menge an ausgeschiedenen Dopamin-Metaboliten, wie z.B. Salsolinol oder Norsalsolinol im Urin als eher gering heraus, ebenso fand sich bisher kaum ein Zusammenhang zwischen der Menge an im Urin bzw. Plasma nachgewiesenen Dopamin-Metaboliten und der Aktivität des Dopamin-Metabolismus im ZNS (Pliszka, 2005).

Therapie von ADHS

Die Therapie der ADHS ist eine Kombination aus medikamentöser Therapie und unterschiedlichen psychologischen Interventionen (sog. Multimodale Behandlung). Der Kinder- und Jugendpsychiater entscheidet, welche Form der Therapie und damit auch welche der zur Verfügung stehenden Medikation im individuellen Fall am Erfolg versprechendsten erscheint.

Zu den psychologischen Verfahren zählen die patientenzentrierten Verfahren, die Eltern- und familienzentrierten Verfahren und die Kindergarten- und schulzentrierten Interventionen. Mehrere Übersichtsarbeiten und Metaanalysen fassen die Ergebnisse der verschiedenen psychologischen Behandlungsformen zusammen (Abikoff, 1987; DuPaul und Eckert, 1997; Pelham et al., 1998; Pelham und Waschbusch, 1999; Döpfner und Lehmkuhl, 2002).

Die medikamentöse Therapie bietet verschiedene Optionen (mit unterschiedlichem Evidenzgrad und Nutzen-/Risikoprofil) :

- Psychostimulanzien (MPH (s.u.), Amphetamine (s.u.), Modafinil, Pemolin)
- Atomoxetin (s.u.)
- Dopaminerg wirkende Antidepressiva (Bupropion)
- Noradrenerg wirkende Antidepressiva (Desipramin und Reboxetin)
- Kombiniert serotonerg-noradrenerg wirksame Antidepressiva (Venlafaxin, Duloxetin)

Methylphenidat ist strukturell vom Amphetamin abgeleitet und bewirkt u.a. eine reversible Blockade von Dopamin-Transportern, und in geringerem Ausmaß auch eine Blockade von Noradrenalin- und Serotonin-Transportern. Außerdem wird bei Patienten mit ADHS eine Abnahme der Dichte an Dopamin-Transportern bewirkt. So wird weniger Dopamin an der Präsynapse wieder aufgenommen und es steht postsynaptisch mehr Dopamin zur Verfügung (Pliszka, 2005).

In Deutschland ist MPH in unretardierter Form mit einer Wirkdauer von etwa vier Stunden erhältlich (Ritalin, Methylphenidat hexal, Medikinet, Equasym) und ebenso in drei retardierten Formen mit einer Wirkdauer von etwa sechs bis acht Stunden (Medikinet retard, Equasym retard) und zwölf Stunden (Concerta). Die Retardpräparate bieten dabei einige Vorteile: Erstens eine gleichmäßigere Wirkstofffreisetzung im Tagesverlauf, zweitens das fehlende Problem der Medikamentengabe während der Schulzeit oder anderer außerhäuslicher Aktivitäten sowie drittens ein geringeres Missbrauchspotenzial.

Bezüglich der therapeutischen Wirksamkeit wurden Effektstärken um 0,8-0,9 für die Bereiche Aufmerksamkeit, Ablenkbarkeit, Impulsivität und Verhalten gegenüber Placebo im Kindes- und Jugendalter erreicht (Brown et al., 2005; Faraone et al., 2004; Schachter et al., 2001; Smith et al., 2000).

Insgesamt ist die Therapie mit MPH gut verträglich. In einer Meta-Analyse von 62 randomisierten Studien mit insgesamt 2897 Patienten fanden sich als häufige Nebenwirkungen im Kindes- und Jugendalter Schlafstörungen (bis zu 47 %), Appetitminderung (bis zu 44%), Ängstlichkeit (bis zu 31%), Müdigkeit (bis zu 24%), Magenbeschwerden (bis zu 24%), Kopfschmerzen (bis zu 18%) und Schwindel (bis zu 7%) (Schachter et al., 2001). Unter MPH wurde außerdem eine teilweise Erhöhung von Puls und Blutdruck festgestellt (Kahl et al., 2007).

Amphetamine blockieren Dopamintransporter, setzen außerdem Dopamin und Noradrenalin aus der Präsynapse frei und blockieren die Monoaminoxidase, so dass die Konzentration dieser Neurotransmitter im synaptischen Spalt erhöht wird und sie langsamer abgebaut werden. Eine Fertigarznei ist im deutschen Handel nicht erhältlich, Amphetaminsulfat kann aber in Apotheken als Präparat zubereitet werden. Die Wirksamkeit von Amphetaminen bei der ADHS-Symptomatik im Kindes-, Jugend- und Erwachsenenalter wurde in mehreren doppelblinden, placebokontrollierten Studien nachgewiesen (Brown et al., 2005; Faraone et al., 2001a; Pliszka et al., 2000; Spencer et al., 2001b).

Atomoxetin gehört zu den zentral wirkenden Sympathomimetika und wirkt wahrscheinlich über eine selektive, reversible Hemmung des präsynaptischen Noradrenalin-Transporters. So wird eine Erhöhung der Noradrenalin- und Dopaminkonzentration im präfrontalen Kortex

erreicht (Raiteri et al., 1977). Die Konzentrationen von Dopamin und Noradrenalin verändern sich hingegen im Nucleus accumbens nicht. So erklärt man sich das fehlende Suchtpotenzial von Atomoxetin.

Die therapeutische Wirksamkeit und Verträglichkeit von Atomoxetin wurde in mehreren doppelblinden, placebo-kontrollierten Studien im Kindes -und Jugendalter untersucht. Es ergab sich eine gegenüber Placebo deutliche Wirkung bei der Verbesserung der Aufmerksamkeit, der motorischen Unruhe und der Reduktion von Impulsivität (Sevecke et al., 2006).

Die Therapie mit Atomoxetin ist insgesamt gut verträglich. Als häufige, aber nach der Eindosierung oft sistierende Nebenwirkungen im Kindes - und Jugendalter wurden beispielsweise Appetitminderung (bis zu 20%), Erbrechen (bis zu 15,3%), Übelkeit (bis zu 11,8%), Abdominalbeschwerden (bis zu 11%), Müdigkeit (bis zu 10%), Schwindel (bis zu 10%) und Dyspepsie (bis 9,4%) angegeben (Michelson et al., 2001; Michelson et al., 2002; Sevecke et al., 2006).

Um immer noch bestehenden Fragen wie zum Beispiel der Frage nach der Pathogenese der ADHS oder der Frage nach dem Zusammenhang von TIQ mit ADHS nachzugehen, sind in dieser Arbeit die vier genannten TIQ-Derivate Salsolinol, Norsalsolinol, N-Methyl-Salsolinol und N-Methyl-Norsalsolinol erstmals qualitativ und quantitativ im Urin von Patienten mit ADHS und im Urin von gesunden Kontrollprobanden bestimmt worden.

Weiterhin erfolgte bei den Patienten mit ADHS eine Korrelation der TIQ-Konzentrationen im Urin mit den Parametern Alter, Komorbiditäten sowie Medikation.

II. Materialliste:

II. 1. Geräte:

II.1.1. Hochdruck Flüssigkeitschromatographie (HPLC)-System

HPLC Pumpe L-7110	Merck, Darmstadt
HPLC Ofen Column heater	Bio-Rad, München
HPLC Interface D-7000	Merck, Darmstadt
HPLC Amperometric Detector L-3500 AI	Merck, Darmstadt
Injektionsventil mit Schleife 20 µl	Rheodyne, Alsbach
HPLC-Injektionsspritze 100 µl	ILS Germany, Stützerbach
HPLC-Patronenhauptsäule, Eurosphere 100, C18, 5 µm, 250x4 mm	Knauer, Berlin
HPLC-Patronenvorsäule, Eurosphere 100, C18, 5 µm, 30x4 mm	Knauer, Berlin
HPLC Steuer- und Aufzeichnungsprogramm HPLC 21A	Knauer, Berlin
Magnetstirrer HI 300 N	Hassa Laborbedarf, Lübeck

Elektrochemischer Detektor, baugleich mit Waters bzw. Krumcherom Systems

II.1.2. Weitere Geräte:

Zentrifuge Multifuge 1 S-R	Heraeus, Hanau Tuttlingen
Wärmebad Typ 1013	Gesellschaft für Labortechnik, Burgwedel
Knick pH-Meter 761 Calimatic	Knick, Berlin
Analysenwaage Satorius Research	Satorius, Göttingen
Analysenwaage Mettler PM 2000	Mettler, Giessen
Magnetstirrer Megnetomix	Colora Messtechnik GmbH Lorch/Württemberg
Kreisschüttler VF2	IKA Labortechnik, Staufen

II. 2. Hilfsmittel und Einmalartikel:

Eppendorf-Pipetten 0,5 - 1000 µl	Eppendorf, Hamburg
Pipettenspitzen 10 - 1000 µl	Eppendorf, Hamburg
Varitip S Pipette 1 - 10 ml	Eppendorf, Hamburg
Maxitips für Varitip S	Eppendorf, Hamburg

Pasteurpipetten 250 mm	Hassa Laborbedarf, Lübeck
Pipettierball für Pasteurpipetten	Hassa Laborbedarf, Lübeck
Glassäulen für die Affinitätschromatographie	Hassa Laborbedarf, Lübeck
Glaswolle	Serva, Heidelberg
Helium 4,6 Reinheitsgrad 99,9%	Gasversorgung, MUL
Tubes 1,5 ml	Sarstedt, Nürnbergrecht

II. 3. Reagenzien:

Arylsulfatase Typ IV	Sigma, Deisenhofen
β-Glucuronidase	Sigma, Deisenhofen
3,4-Dihydroxybenzylamin (3,4-DHBA)	Sigma, Deisenhofen
1-Methyl-6,7-Dihydroxy-1,2,3,4-Tetrahydroisoquinolin (Salsolinol)	Sigma, Deisenhofen
6,7-Dihydroxy-1,2,3,4-Tetrahydroisoquinolin (Norsalsolinol)	Sigma, Deisenhofen
2-Methyl-6,7-Dihydroxy-1,2,3,4-Tetrahydroisoquinolin (N-Methyl-Norsalsolinol)	synthetisiert von E. Bäuml, Institut für Chemie, Universität zu Lübeck
1,2-Dimethyl-6,7-Dihydroxy-1,2,3,4-Tetrahydroisoquinolin (N-Methyl-Salsolinol)	Sigma, Deisenhofen
Dinatrium-Ethylendiamintetraessigsäure (Na ₂ -EDTA)	Serva, Heidelberg
Essigsäure 96%	Merck, Darmstadt
Homovanillinsäure	Merck, Darmstadt
Kaliumchlorid 3 molar (M)	Metrohm, Herisau (Schweiz)
m-Aminophenylboronsäure-Agarose	Sigma, Deisenhofen
Methanol LiChrosolv	Merck, Darmstadt
Magnesiumdichlorid (MgCl ₂)	Merck, Darmstadt
Natriumchlorid	Merck, Darmstadt
Natriumacetat wasserfrei Suprapur	Merck, Darmstadt
Natrium-1-Octansulfonsäure	Sigma, Deisenhofen
N-[2-Hydroxyethyl]-piperazin-N'- [3-propansulfonsäure] (EPPS)-Puffer	Sigma, Deisenhofen

pH-Meter Kalibrationslösung
0,2 M:

1,6460 g Natriumacetat/100 ml Wasser LiChrosolv

pH 5 mit Essigsäure 96% eingestellt

Essigsäure 0,25 M zur Elution:

1,56375 g Essigsäure 96%/100 ml Wasser LiChrosolv

Methanol/Wasser 70:30 (v/v):
pH 4,01 und pH 6,88

WTW, Weilheim

Semicarbazid

Sigma, Deisenhofen

Titrisol Natriumhydroxid

Merck, Darmstadt

Wasser LiChrosolv

Merck, Darmstadt

Zitronensäure

Merck, Darmstadt

II. 4. Lösungen:

Acetatpuffer

70 ml LiChrosolv Methanol

30 ml LiChrosolv Wasser

Natriumhydroxid 0,02 M zur Regeneration der Boronatsäulen:

0,8 g Natriumhydroxid/1000 ml Wasser LiChrosolv

„Running Eluent“ zur Affinitätschromatographie:

0,02 M EPPS, pH 8,6

0,15 M NaCl

0,01 M MgCl₂

Mobile Phase zur Analyse der Urinproben:

Citrat-Puffer 100 mM, pH 3,0

Na₂-EDTA 0,30 mM

Natrium-1-Octansulfonsäure 0,52 mM

+ 14,5% Methanol

III. Methoden

III. 1. Patientenkollektive

III. 1.1. Patienten mit Aufmerksamkeits-Defizit-Hyperaktivitätsstörung (ADHS)

Bei allen in die Studie eingeschlossenen Patienten war die Diagnose ADHS bereits vor dem Zeitpunkt der Probensammlung gestellt worden. Die Patienten befanden sich weiterhin bereits vor Beginn der Studie in psychiatrischer Behandlung in den Abteilungen für Kinder- und Jugendpsychiatrie der Universitäten Göttingen oder Würzburg.

Sowohl für die Studie in Würzburg (Aktenzeichen 52/02, genehmigt am 28.05.2002) als auch für die Studie in Göttingen (Aktenzeichen 3/3/04, genehmigt am 19.03.2004) erteilte die Ethikkommission die erforderliche Genehmigung.

Das Patientenkollektiv setzte sich aus 42 Kindern und Jugendlichen zusammen, von denen 4 weiblich und 38 männlich waren. Das Durchschnittsalter betrug 12,1 Jahre (Standardabweichung (SD) 3,2 Jahre). 16 Patienten litten unter einer oder mehreren psychiatrischen Komorbiditäten, wie zum Beispiel Störung des Sozialverhaltens (n = 13), Lernschwierigkeiten (n = 4), Tics (n = 2) und andere (n = 5). 18 Patienten nahmen zum Zeitpunkt der Probensammlung Psychopharmaka ein, 14 dieser Patienten entweder Ritalin, Amphetamin, Concerta, Risperdal, Fluctin oder Dipiperon in Monotherapie und vier dieser Patienten Kombinationstherapien aus Amphetamin und Risperdal, Ritalin und Risperdal oder Concerta und Ritalin.

III. 1.2. Kontrollprobanden

Die Gruppe der Kontrollprobanden setzte sich zusammen aus Angestellten der teilnehmenden Krankenhäuser in Würzburg, Göttingen und Wien, deren Kindern und einer Schulklasse in der Nähe von Göttingen.

Alle Kontrollprobanden wurden von einem Kinder- und Jugendpsychiater untersucht und zeigten keinerlei Hinweise auf bestehende psychiatrische Erkrankungen. Weiterhin gaben alle Kontrollprobanden an, weder während noch vor Beginn der Studie Medikamente eingenommen zu haben.

Insgesamt wurde der Urin von 24 Kontrollprobanden mit einem Durchschnittsalter von 23, 8 Jahren (SD 17, 0 Jahre) untersucht, von denen 10 weiblich und 14 männlich waren.

III. 2. Untersuchte klinische Parameter der ADHS-Patienten

In die Studie wurden alle Patienten aufgenommen, die den Diagnosekriterien einer ADHS bzw. sowohl einer ADHS als auch einer chronischen Tic-Störung genügten.

Ausgeschlossen wurden Patienten mit einem Handlungs-Intelligenzquotienten (IQ) < 85, Patienten mit schweren neurologischen Auffälligkeiten bzw. Erkrankungen, Patienten mit psychiatrischen Komorbiditäten im Sinne einer Psychose bzw. tiefgreifenden Entwicklungsstörungen sowie Patienten mit Stoffwechselstörung.

Die Diagnose ADHS wurde im Rahmen eines halbstrukturierten Interviews gestellt. Sie wurde durch das Diagnostik-System für psychische Störungen im Kindes- und Jugendalter (DISYPS-KJ, Döpfner und Lehmkuhl, 2000) verifiziert. Dabei handelt es sich um ein Diagnostik-System zur Erfassung psychischer Störungen bei Kindern und Jugendlichen gemäß ICD-10 und DSM-IV. Die klinische Beurteilung erfolgte in dieser Studie anhand der darin enthaltenen Diagnose-Checklisten (DCL-HKS), die Einschätzung der Eltern, der Lehrer bzw. Erzieher wurde anhand des Fremdbeurteilungsbogens (FBB-HKS) vorgenommen.

III. 3. Probenmaterial

III. 3. 1. Probengewinnung

Die Proben (12-Stunden Sammelurin) von ADHS-Patienten und Kontrollprobanden wurden von Juli 2002 bis Dezember 2005 von Mitarbeitern der Abteilungen für Kinder- und Jugendpsychiatrie der Universitäten Göttingen, Würzburg und Wien gesammelt.

Alle Patienten/Probanden sowie deren Erziehungsberechtigte wurden über die vorgesehene wissenschaftliche Verwendung, das Wesen und die Bedeutung der Studie informiert und erklärten sich mit ihrer Teilnahme bzw. mit der Teilnahme ihrer Kinder einverstanden. Die Aufklärung der Patienten/Probanden erfolgte altersgemäß.

Die Kontrollprobanden wurden darüber in Kenntnis gesetzt, dass die Ergebnisse der Analyse ihrer Urinproben lediglich dem Vergleich mit den Ergebnissen anderer Patienten/Probanden dienen, für sie selber aber keine Auswirkungen haben werden.

III. 3. 2. 12-Stunden-Sammelurin

Der Urin aller 42 Patienten mit ADHS und ebenso der Urin aller 24 Kontrollprobanden wurde nach Einhalten einer von Moser (Moser, 1998a) beschriebenen Diät gewonnen. Bei dieser Diät ist die Restriktion von TIQ- und Salsolinol-haltigen Nahrungsmitteln, wie z.B. Bananen,

Käse, Schokolade, Sojaprodukte, Bier, Portwein und Weißwein vorgeschrieben. Die Diät begann 48 Stunden vor Beginn der Sammelperiode und wurde auch während der Sammelperiode eingehalten. Die Sammlung des 12-Stunden-Sammelurins (mindestens 10 ml) begann abends um 19 Uhr.

Als Sammelbehälter dienten 1-Liter Polyvinylchlorid-Flaschen. Diese wurden mit 50 mg Dinatrium-Ethylendiamintetraessigsäure ($\text{Na}_2\text{-EDTA}$) und 50 mg Semicarbazid vorbereitet, um über den Sammelzeitraum hinweg sicherzustellen, dass die gewonnenen Substanzen stabil blieben. Die gewonnenen Proben wurden gekühlt (<10 Grad Celsius), nach Abschluss der Sammelperiode gut gemischt und anschließend in mehrere 1 ml Aliquots umgefüllt. Diese wurden bei mindestens -40 Grad Celsius gelagert.

III. 4. Probenaufbereitung und Analyse

Am Vortag der HPLC-Analyse wurden die 1 ml Aliquots dem Tiefkühlschrank entnommen und tauten bei Raumtemperatur auf. Danach wurden die Proben mittels Kreisschüttler gut durchgemischt und für 10 Minuten mit 1500 g bei 4 Grad Celsius zentrifugiert.

Von dem entstandenen Überstand wurden 500 μl in ein Eppendorf-Tube pipettiert.

Nachfolgend wurde dieser Menge 250 μl Acetat-Puffer 0,2 M, pH 5,0 zur pH-Einstellung zugesetzt. Dann wurde erneut durchgemischt.

Sowohl die Gesamtkonzentration als auch die Konzentration der freien Anteile der zu untersuchenden 1,2,3,4-Tetrahydroisoquinolin (TIQ)-Derivate Salsolinol, N-Methyl-Salsolinol, Norsalsolinol, und N-Methyl-Norsalsolinol sollten analysiert werden. Daher fand die Weiterverarbeitung der Proben anschließend auf zwei unterschiedlichen Wegen statt, bevor sie zur Affinitätschromatographie auf die m-Aminophenylboronat Agarose-Säulen aufgetragen wurden:

Da nur die freien Anteile der jeweiligen TIQ-Derivate eine Diol-Konfiguration besitzen, die für die Retention in der folgenden Affinitätschromatographie erforderlich ist, ist es zur Bestimmung der **Gesamtkonzentration** nötig, die konjugierte Form des jeweiligen TIQ-Derivates in die freie Form zu überführen. Hierzu erfolgte die Zugabe von 5 IE Arylsulfatase Typ IV (E.C. 3.3.6.1), 400 IE β -Glucuronidase (E.C.3.2.1.31) sowie 10 μl 3,4-Dihydroxybenzylamin (3,4-DHBA) 0,1 mM zu der vorbereiteten Probe. Daraufhin wurde die Probe erneut durchgemischt und anschließend für 16 Stunden bei 30 Grad Celsius im Wärmebad inkubiert. Die Inkubation im Wärmebad in Kombination mit der vorausgegangenen Einstellung des pH-Wertes war nötig, um die für die Enzyme

Arylsulfatase Typ IV und β -Glucuronidase geeigneten Bedingungen zu schaffen, die zur vollständigen Überführung von der veresterten in die freie Form nötig waren.

Nach Beendigung des Wärmebades wurde der Probe 250 μ l „Running Eluent“ pH 8,6 sowie 250 μ l H₂O in direkter Abfolge zugegeben. Beide Lösungen hatten bei der Zugabe Raumtemperatur.

Zur Bestimmung der **Konzentration der freien Anteile** wurde die Probe direkt nach der Einstellung des pH-Wertes mit 10 μ l 3,4-DHBA 0,1 mM, 250 μ l „Running Eluent“ pH 8,6 sowie 250 μ l H₂O in direkter Abfolge versetzt. Die weiteren Arbeitsschritte waren für die Analyse der Gesamtkonzentration und auch für die Analyse der Konzentration der freien Anteile der jeweiligen TIQ-Derivate wieder identisch.

Das 3,4-DHBA wurde als interner Chromatographie-Standard verwendet (Moser et al., 1995), indem die Chromatogramme der Urinproben sowohl auf die zu untersuchenden TIQ-Derivate als auch auf 3,4-DHBA hin ausgewertet wurden. Der „Running-Eluent“ wurde hinzugegeben, um den pH-Wert der Probe in den neutralen bis alkalischen Bereich anzuheben. Dieses war notwendig, um die Bindung der Testsubstanzen an die Boronat-Gruppen der Säulen zu verbessern.

Nach Zugabe von 3,4-DHBA, Wasser und „Running Eluent“ wurde die Probe erneut kurz durchgemischt und anschließend sofort zur Affinitätschromatographie auf die m-Aminophenylboronat Agarose-Säulen (Boronat-Säulen) aufgetragen.

Da die **Konzentration der konjugierten Anteile** der jeweiligen TIQ-Derivate grundsätzlich nicht direkt gemessen werden kann, wurden diese Konzentrationen nach der Formel

$$\text{TIQ}_{\text{gebunden}} = \text{TIQ}_{\text{gesamt}} - \text{TIQ}_{\text{frei}}$$

berechnet.

III. 5. Affinitätschromatographie mit m-Aminophenylboronat-Säulen

III. 5. 1. Herstellung der Boronat-Säulen

Der Konus einer jeden Glassäule wurde mit einer Schicht Glaswolle gestopft und der Durchlauf anschließend mit Wasser geprüft. Das Wasser sollte jede der Glassäulen in etwa gleicher Geschwindigkeit durchlaufen. In jede Glassäule wurde weiterhin 4 x 1 ml von der mit

7 Teilen Wasser verdünnten m-Aminophenylboronat Agarose-Suspension eingefüllt. Danach wurden die so entstandenen Boronat-Säulen mit 2-5 ml Wasser nachgespült. Dementsprechend erhielten die hergestellten Säulen jeweils ca. 40 µmol Boronat, wie sich mit folgender Rechnung nachvollziehen lässt:

4 ml m-Aminophenylboronat-Agarose 77 µmol/ml + 42 ml LiChrosolv Wasser
→ 4 x 1 ml pro Glassäule, also ca 40 µmol Boronat pro Glassäule.

Die Boronat-Säulen mussten vor ihrer ersten Verwendung einer kompletten Regeneration unterzogen werden (siehe hierzu III. 5. 3. 2. Elutionsschema Schritte Q.-S.). Vorerst wurden zusätzlich zu der Standardregeneration 5 ml „Running Eluent“ in die Glassäulen gefüllt. Es konnte eine deutliche Materialexpansion des Boronats beobachtet werden, während die Natronlauge abtropfte. Während des Durchlaufs des „Running Eluenten“ und der Natronlauge mussten die Säulen mehrfach vorsichtig aufgespült werden. Die Regenerationsschritte waren bei den nun folgenden Verwendungen jeweils nur noch nach Beendigung der Elution nötig.

III. 5. 2. Die Affinitätschromatographie in ihren Grundzügen

Zur Durchführung der Affinitätschromatographie wurden die in III. 5. 1. beschriebenen Boronat-Säulen verwendet. Dieses Säulenmaterial ist gut zur Trennung von Katecholaminen geeignet (Higa et al., 1977), da eine hohe Affinität zu Diolen besteht, die in einer Ebene stehen, also Diole an aromatischen Ringen in ortho-Stellung und cis-Diol-Verbindungen (Gehrke et al., 1978).

Da die Bindungsfähigkeit der Boronat-Säulen im alkalischen Bereich (zwischen pH 8 -10) besonders hoch ist, muss zur Lösung der Bindung zwischen den Boronat-Gruppen und den Diolen der pH-Wert abgesenkt werden. Durch diese sogenannte saure Hydrolyse, die in dieser Analyse mittels fraktionierter Zugabe von 0,25 M Essigsäure in Schritten zu 250 µl erfolgte, werden die Bindungen zwischen den Boronat-Gruppen und den Diolen gelöst und die jeweilige Testsubstanz kann durch den Flüssigkeitsstrom aus der Säule getragen werden. Die saure Hydrolyse ist also zur Elution der Diole gut geeignet (Bouritius et al., 1981).

Hierbei muss stets darauf geachtet werden, dass erst nach vollständigem Abtropfen des eingefüllten Volumens der Elutionsschritt als beendet betrachtet werden kann (Gehrke et al., 1978). Während eines Elutionsschrittes sollte der Sog weitgehend konstant sein, d.h. entweder sollten die Säulen immer frei abtropfen oder immer mit Hilfe eines konstanten Sogs

entleert werden. Dies ist für die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse wichtig. Im Laufe dieser Analyse tropften die Säulen stets frei ab.

Um die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse weiterhin zu gewährleisten, wurden von allen in der Analyse verwendeten Lösungen vor Beginn der jeweiligen Analyse ausreichende Mengen hergestellt, um für alle stattfindenden Versuche und Analysen vergleichbare Bedingungen zu schaffen. Die Zwischenlagerung der Lösungen für einen Tag erfolgte bei Raumtemperatur, ebenso hatten die Boronat-Säulen und alle bei der Affinitätschromatographie verwendeten Lösungen zum Zeitpunkt ihrer Anwendung stets Raumtemperatur.

III. 5. 3. Elutionsschema

III. 5. 3. 1. Grundzüge des Elutionsschemas

Das in dieser Arbeit verwendete Elutionsschema wurde von Siebecker (1999) entwickelt, um unter Verwendung von Boronat-Säulen einen möglichst optimalen Ablauf der Affinitätschromatographie zu gewährleisten. Es stellte sich heraus, dass unter der Verwendung von Essigsäure zur sauren Hydrolyse weit weniger unerwünschte Substanzpeaks in der anschließenden Umkehrphasen-Hochdruck-Flüssigkeitschromatographie- (RP-HPLC) Analyse auftraten als unter der Verwendung vorheriger publizierter Elutionsschemata. Zudem wurde deutlich, dass es mittels fraktionierter saurer Hydrolyse möglich war, den überwiegenden Teil der eingesetzten Stoffmenge Salsolinol zurückzugewinnen. Der höchste Wiederfindungswert für das eingesetzte Salsolinol bestand in der dritten Essigsäurefraktion, in der der relative Wiederfindungswert bei 71% lag. Zudem zeigte die RP-HPLC Analyse von Proben aus dem letzten Milliliter Essigsäure zur Regeneration stets eine Null-Linie ohne Peaks, so dass man davon ausgehen konnte, dass nach vollendeter Regeneration keine Diole mehr in den Boronat-Säulen enthalten waren. Weiterhin zeigten Testelutionen, dass der absolute und der relative Wiederfindungswert für Salsolinol unter Verwendung der Boronat-Säulen konstant blieben und sowohl zwischen den einzelnen Säulen als auch in einer Säule nur geringen Schwankungen unterlag (Siebecker, 1999)

III. 5. 3. 2. Durchführung des Elutionsschemas

Konditionierung der Boronatsäulen:

- A. 5 ml „Running Eluent“
- B. 1 ml Methanol/Wasser
70:30 (v/v)
- C. 5 ml Wasser

	D.	5 ml "Running Eluent"
Auftragen der Probe:	E.	Probe (500 µl)
Ausspülen von Störsubstanzen:	F.	5 ml Wasser
	G.	1 ml Methanol/Wasser 70:30 (v/v)
	H.	4 ml Methanol
	I.	2 ml Methanol/Wasser 70:30 (v/v)
Eluieren der Diol:	J.	250 µl Essigsäure 0,25 M
	K.	250 µl Essigsäure 0,25 M
Sammeln der dritten Säurefraktion:	L.	250 µl Essigsäure 0,25 M
	M.	500 µl Essigsäure 0,25 M
	N.	1 ml Wasser
	O.	1 ml „Running Eluent“
Abtragen von Auflagerungen, Aufspülen der Säulen, ggf.		
Auffüllen auf die Ausgangshöhe:	P.	1 ml Natronlauge 0,02 M
Regeneration der Boronat-Säulen:	Q.	4 ml Natronlauge 0,02 M
	R.	5 ml Wasser
	S.	5 ml Essigsäure 0,05 M
	T.	10 ml Wasser

Die dritte Fraktion der Essigsäuren (Schritt L) wurde aufgefangen und nach maximal 5 Stunden unverändert der HPLC-Analyse zugeführt.

III. 5. 4. Lagerung der Boronat-Säulen

Nach Beendigung der Elution wurden die Boronat-Säulen in Wasser gestellt und im Kühlschrank unter Lichtschutz bei 0-5 Grad Celsius gelagert. Vor Durchführung einer neuen Elution mussten die Säulen Raumtemperatur erreichen und konnten, sofern sie nicht länger als einen Tag aufbewahrt worden waren, ohne weitere Vorbereitung in Gebrauch genommen werden.

III. 6. Prinzip der Umkehrphasen-HPLC

Das Prinzip der HPLC zählt zu den Adsorptionschromatographie-Verfahren, welches seit vielen Jahren benutzt wird, um verschiedene Substanzen aus komplexen Gemischen herauszutrennen. Mitte der siebziger Jahre wurde es eingeführt und hat sich seitdem rasant weiterentwickelt (Petrides, 1988). Bei der HPLC wird ein Polaritätsunterschied an der Phasengrenze zwischen einer mobilen und einer stationären Phase ausgenutzt, wobei die stationäre Phase hierbei aus einer apolaren Substanz, wie z.B. C-18-Verbindungen und die mobile Phase aus einer polaren Lösung, wie z.B. einem wässrigen Eluenten besteht. Die in einer Probe vorhandenen Substanzen verbleiben so entsprechend ihrer unterschiedlichen Eigenschaften wie beispielsweise Polarität, Molekülgröße oder Molekulargewicht unterschiedlich lange an der RP-HPLC-Säule. Sie haben dementsprechend verschiedene Retentionszeiten. Da die Retentionszeit einer jeden Substanz durch mehrere Faktoren verändert werden kann, die einen Einfluss auf das Gleichgewicht der jeweiligen Substanz zwischen mobiler und stationärer Phase ausüben, muss stets darauf geachtet werden, diese Faktoren bei allen Analysen konstant zu halten. Dazu zählen unter anderem Temperatur, die Flussrate und die Zusammensetzung der mobilen Phase. Weiterhin muss bei der Wahl der Temperatur darauf geachtet werden, dass die Stabilität der jeweiligen Testsubstanz nicht gefährdet wird.

Innerhalb des RP-HPLC-Systems, das innerhalb dieser Versuchsreihe zur Anwendung kam (Kapitel II. 1.1.), herrschte stets ein konstanter, pulsationsarmer Fluss der mobilen Phase. Die mobile Phase gelangte vom Vorratsbehälter zum Injektionsventil, über das die Zugabe der Probe erfolgte. Die Probe gelangte dann mittels der mobilen Phase zu der RP-HPLC-Säule, welche sich in einem Heizofen befand und somit keine Temperaturschwankungen aufwies, und von dort weiter zum elektrochemischen Detektor.

Die mobile Phase erhielt in dieser Analyse 14,5% Methanol, 100 mM Citrat-Puffer, pH 3 (eingestellt mit Natronlauge 8%), 0,3 mM Na₂-EDTA und 0,52 mM Natrium-1-Octansulfonsäure (vergleiche Moser et al., 1995).

Um die Bedingungen zur Analyse mittels der RP-HPLC zu optimieren ist es notwendig, Störfaktoren so weit wie möglich zu vermindern, da diese über Schwankungen in der Grundlinie die Auswertungen der Chromatogramme stark erschweren. Neben den schon erwähnten Maßnahmen wie der Gewährung eines konstanten Flusses und einer gleichbleibenden Temperatur sind besonders Maßnahmen zur Entgasung der mobilen Phase sowie der Einsatz eines Gegen-Ions zu den gesuchten Substanzen notwendig. Innerhalb dieser Versuchsreihe wurde zur Entgasung der mobilen Phase (Eluent) die Durchperlung mit dem Inertgas Helium angewandt. Dieses bietet den Vorteil einfacher und sicherer Handhabung. Weiterhin wird der Eluent während der Entgasung im Gegensatz zum

Auskochen im Vakuum nicht verändert. Hinzu kommt, dass diese Form der Entgasung ergiebiger als die Entgasung im Ultraschallbad ist.

Um die Auswertbarkeit der Chromatogramme weiterhin zu verbessern, kommt die Ionenpaarchromatographie zur Anwendung. Hierbei handelt es sich um den Einsatz eines Gegenions, wie in diesem Fall Natrium-1-Octansulfonsäure. Mittels dieser Methode sollen unerwünschte Wechselwirkungen der Ionen in der mobilen Phase mit der stationären Phase unterdrückt werden, was zu einer Verbesserung der Peakform führt (zusammengestellt nach Gottwald, 1993).

Für die Auswertung der Chromatogramme war es außerdem notwendig, die Peakidentitäten der gesuchten Substanzen Salsolinol, N-Methyl-Salsolinol, Norsalsolinol und N-Methyl-Norsalsolinol zu sichern. Dieses erfolgte durch die Bestimmung der Retentionszeiten in Standardproben und durch Co-Chromatographie sowie durch die Kontrolle der Retentionszeit des internen Standards 3,4-DHBA. Es folgte die quantitative Auswertung wie in III. 8. dargestellt.

Die Herstellung der Standardproben, die zur Bestimmung der Retentionszeiten und der Referenzpeakhöhe nötig waren, erfolgte aus einer Stammlösung. Die Standardproben wurden daraufhin bei -40 Grad Celsius gelagert und nach Verwendung verworfen, um die Gleichheit aller Standardproben zu gewährleisten.

III. 7. Elektrochemische Detektion (ECD)

Der bei einer elektrochemischen Detektion verwendete elektrochemische Detektor besteht aus einer Messzelle mit Arbeitselektrode, Referenzelektrode und Hilfelektrode, sowie einem Steuerteil, über das Arbeitspotential und Messbereich reguliert werden.

In der Messzelle werden Substanzen durch ein angelegtes Spannungspotential entweder oxidiert oder reduziert. Ob oxidiert oder reduziert wird, hängt davon ab, ob das Potential der Arbeitselektrode in Bezug auf das Potential des Elektrolyten positiv oder negativ ist. Ist das Potential positiv, werden die Substanzen oxidiert, da dem Elektrolyten in diesem Fall durch die Arbeitselektrode ein oder mehrere Elektronen entzogen werden. Ist das Potential negativ, werden die Substanzen reduziert, da dem Elektrolyten in diesem Fall durch die Arbeitselektrode ein oder mehrere Elektronen zugeführt werden. Insofern hängt die stattfindende Reaktion in der Messzelle von dem angelegten Arbeitspotential ab, welches von der Arbeitselektrode erzeugt wird. Das Arbeitspotential wird vorgewählt und von der Referenzelektrode abgeglichen.

Als Referenzelektrode diente eine Silber/Silberchlorid-Elektrode, als Arbeitselektrode eine Glassy-Carbon-Elektrode.

Glassy-Carbon-Elektroden sind sowohl bei sauren pH-Werten (also <7) als auch in Wasser sowie Methanol beständig und geeignet für einen Spannungsbereich von -800 bis $+1200$ mV.

Durch die Elektrolyse der Testsubstanzen ergibt sich eine Änderung der Leitfähigkeit innerhalb der Messzelle, wodurch ein Elektronenfluss an der Arbeitselektrode induziert wird. Der Strom, der so durch die Arbeitselektrode fließt, wird mit Hilfe eines Strom-Spannungswandlers in einen Spannungswert umgewandelt, welcher dann entsprechend den ausgewählten Verstärker- und Filtereinstellungen modifiziert und als Signal an den Schreiber bzw. Integrator weitergeleitet wird. Die so entstehenden Signale werden nun vom Aufzeichnungsgerät als Bildpunkte in ein Chromatogramm übertragen. Das Aufzeichnungsgerät speichert weiterhin, sofern möglich, die Messdaten.

Die Änderung der Leitfähigkeit innerhalb der Messzelle ist konzentrationsabhängig, also abhängig von der Anzahl der reduzierten bzw. oxidierten Moleküle. Durch die Wahl entsprechender Parameter des elektrochemischen Detektors wird die Linearität der Leitfähigkeitsänderung der Messzelle gesichert. Diese Linearität kann mittels einer Eichkurve überprüft werden. (siehe Abbildung 7)

Die in dieser Versuchsreihe gewählten Parameter für die Analyse mittels der RP-HPLC-ECD waren:

Flussrate: 1 ml/Minute,

Messbereich der ECD: 5 nA (der Druck lag dabei um 17,8 mPa),

Spannung: +900 mV,

Temperatur: 30 Grad Celsius.

III. 8. Berechnung der Substanzkonzentrationen im Urin

Aus den ermittelten Peakhöhen wurden die Substanzkonzentrationen errechnet. Für jede der untersuchten Substanzen Salsolinol, N-Methyl-Salsolinol, Norsalsolinol und N-Methyl-Norsalsolinol wurde sowohl die Gesamtkonzentration als auch die Konzentration der freien Anteile berechnet.

Da die Urinproben vor der RP-HPLC-Analyse einer umfangreichen Aufarbeitung unterzogen worden waren, waren zur Berechnung der endgültigen Konzentrationen der untersuchten TIQ-Derivate einige Vorüberlegungen erforderlich.

- (1) Zu Beginn musste der Wiederfindungswert in der Affinitätschromatographie ermittelt werden.

Dieses geschah vor Beginn der Analysen für jede einzelne Testsubstanz jeweils für die Aufbereitung mit und ohne Wärmebad.

$$\text{Peakhöhe}_{\text{kor}} = \text{Peakhöhe}_{\text{Probe}} \times 100/\text{Wiederfindungswert}$$

- (2) Weiterhin wurde für jede Testsubstanz anhand der durch ECD ermittelten Peakhöhen eine Eichkurve mittels der Software Microsoft Excel erstellt. Hieraus ließ sich dann die vorläufige Konzentration des jeweiligen TIQ-Derivates anhand der Geradengleichung errechnen. Eine der Eichkurven ist beispielhaft in Abbildung 7 dargestellt.
- (3) Bei der Berechnung der Konzentration musste außerdem berücksichtigt werden, dass 500 µl Urin auf die Boronat-Säulen gegeben und mit 250 µl Essigsäure eluiert wurde. So ergab sich eine Konzentration um den Faktor 2.

$$\text{Konzentrationsfaktor KF} = 500 \mu\text{l}/250 \mu\text{l} = 2$$

- (4) Für die Aufbereitung mittels Enzymen sowie für die Aufarbeitung ohne Enzyme wurden unterschiedliche Mengen an Reagenzien verwendet. So wurde für jede Methode ein eigener Verdünnungsfaktor errechnet, der die Mengen der zur Analyse gebrauchten Reagenzien einbezog.

Für die Berechnung der endgültigen Konzentration der jeweiligen TIQ-Derivate ergab sich somit die Formel:

$$[\text{Subs}]_{\text{Probe}} = [\text{Subs}]_{\text{vorläufig}} \times \text{VF}/\text{PH}_{\text{kor}} \times \text{KF}$$

$[\text{Subs}]_{\text{Probe}}$	= endgültige Konzentration der jeweiligen Substanz
$[\text{Subs}]_{\text{vorläufig}}$	= aus der Eichkurve ermittelte Konzentration (siehe Schritt (2))
VF	= Verdünnungsfaktor (siehe Schritt (4))
PH_{kor}	= Peakhöhe Probe x 100/Wiederfindungswert (siehe Schritt (1))
KF	= Konzentrationsfaktor der Methode (siehe Schritt (3))

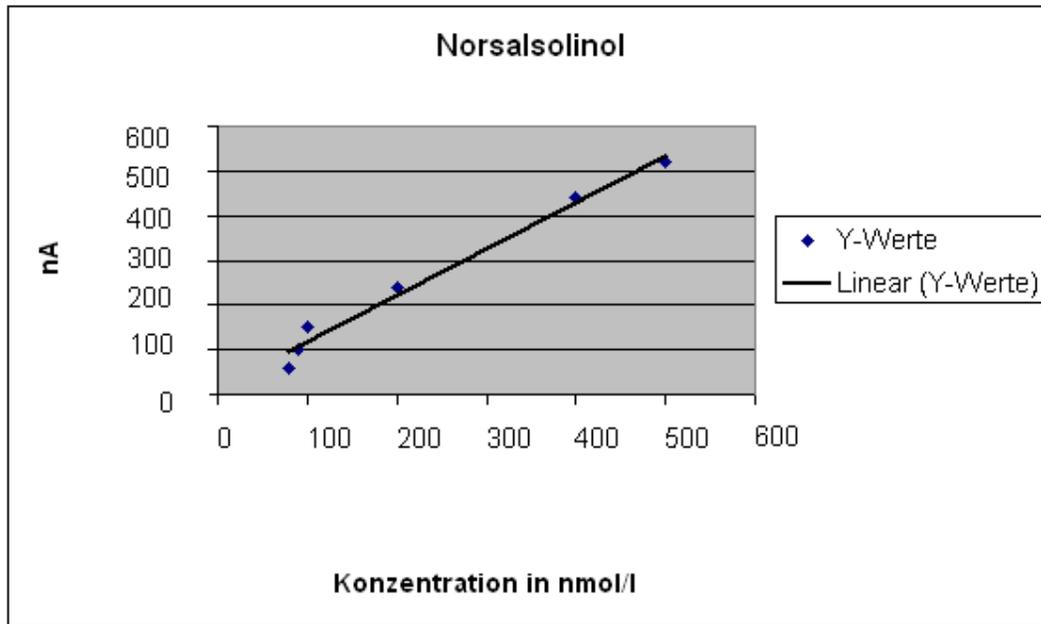


Abb. 7: Beispielhaft die Darstellung der Eichkurve zur Berechnung der vorläufigen Konzentration für Norsalsolinol mit der entsprechenden linearen Regression. Es besteht eine lineare Beziehung von Konzentration und Signal der ECD.

III.9. Statistische Berechnungen

Die Berechnungen der Statistik erfolgten mit der Software SPSS für Windows in der Version 12.0.

Die errechneten Werte wurden in $\text{nM} \pm \text{Standardfehler (SEM)}$ angegeben (Feuerstein et al., 1997).

Als statistische Verfahren wurde vorerst die Varianz berechnet, um die Konzentrationen der jeweiligen TIQ-Derivate der Gruppen untereinander vergleichen zu können. Weiterhin erfolgte die Ermittlung der Kovarianz mit den Faktoren Alter, Medikation (ja/nein) und Komorbiditäten (ja/nein), um mögliche Einwirkungen dieser Faktoren auf die TIQ-Konzentration im Urin ermitteln zu können.

Um die Vorhersagekraft der Konzentrationen der freien TIQ-Derivate als Marker für ADHS bestimmen zu können, wurden außerdem Sensitivität und Spezifität ermittelt.

IV. Ergebnisse

IV. 1. Bestimmung von 1,2,3,4-Tetrahydroisoquinolin (TIQ) im Urin von Patienten mit Aufmerksamkeits-Defizit-Hyperaktivitätsstörung (ADHS) und Kontrollprobanden

IV. 1. 1. Ergebnisse der Analysen in Tabellenform

Es wurden Urinproben von 42 Patienten mit ADHS sowie von 24 Kontrollprobanden analysiert. Die Ergebnisse dieser Analysen sind in folgender Tabelle zusammengefasst:

TIQ-Derivat	ADHS-Patienten					Kontrollprobanden					ANOVA		ANCOVA ¹⁾
	Nachweis-häufigkeit		Konzentration gemessen			Nachweis-häufigkeit		Konzentration gemessen			F	F	
	(n)	(%)	↑↑	↓↓	\bar{x} (SEM)	(n)	(%)	↑↑	↓↓	\bar{x} (SEM)			
Salsolinol													
<i>Frei</i>	36	85.7	51.62	3.92	8.44 (2.0)	24	100	1.36	nm	0.06 (0.1)	11.17***	5.87**	
<i>Gesamt</i>	38	90.5	147.01	4.08	19.34 (5.0)	24	100	40.79	2.36	2.79 (1.9)	6.57*	2.82 ^{ns}	
<i>Gebunden</i> <small>errechnet</small>	23	54.7			20.10 (7.2)	3	12.5			22.3 (11.0)	0.01 ^{ns}	0.01 ^{ns}	
N-Methyl-Salsolinol													
<i>Frei</i>	39	92.9	293.0	18.12	71.13 (8.6)	19	79.2	82.33	7.27	14.54 (4.0)	19.76***	10.31**	
<i>Gesamt</i>	39	92.9	672.0	24.28	129.01 (17.8)	21	87.5	111.00	10.91	53.51 (6.9)	9.22**	3.12 ^{ns}	
<i>Gebunden</i> <small>errechnet</small>	37	88.1			59.00 (16.2)	19	79.2			32.0 (6.7)	1.61 ^{ns}	0.23 ^{ns}	
Norsalsolinol													
<i>Frei</i>	41	97.6	2190.0	33.43	553.30 (68.0)	24	100	306.0	8.91	121.50 (21.7)	22.64***	25.73***	
<i>Gesamt</i>	42	100	3436.0	162.01	1107.89 (123.7)	22	91.7	1120.0	40.19	253.09 (53.3)	22.63***	29.84***	
<i>Gebunden</i> <small>errechnet</small>	39	92.9			599.4 (68.3)	17	70.8			195.10 (53.9)	13.58***	20.78***	
N-Methyl-Norsalsolinol													
<i>Frei</i>	42	100	47.8	1.25	9.06 (1.25)	24	100	17.23	0.24	0.94 (0.7)	77.07***	12.28***	
<i>Gesamt</i>	42	100	300.0	5.57	33.76 (5.57)	24	100	94.98	0.13	10.64 (4.3)	5.38*	6.56*	
<i>Gebunden</i> <small>errechnet</small>	38	90.5			27.3 (6.5)	13	54.2			17.9 (6.0)	0.63 ^{ns}	1.88 ^{ns}	

Tabelle 2: Konzentrationen der TIQ-Derivate im Urin von Patienten mit ADHS und im Urin von Kontrollprobanden in nmol/l.

n: Patienten/Probanden mit Substanznachweis; %: relative Nachweishäufigkeit,

↑↑: höchste gemessene Konzentration, ↓↓: niedrigste gemessene Konzentration, nm: nicht messbar, (die gemessene Konzentration lag in diesem Fall unterhalb der Nachweisgrenze dieser Methode).

Weiterhin dargestellt sind die jeweiligen SEM, die durchschnittliche gemessene Konzentration (\bar{x}) sowie die mittels der ANOVA und ANCOVA errechneten Werte für die Varianz und Kovarianz.

- 1) Kovariaten: Alter, Medikation (ja/nein), Komorbiditäten (ja/nein);
Kein Effekt der Kovariaten, abgesehen von „Medikation“ ($F = 11,53$, Freiheitsgrad (df) = 1, $p < 0,001$) und „Komorbiditäten“ ($F = 7,80$, $df = 1$, $p < 0,01$) auf das TIQ-Derivat N-Methyl-Salsolinol frei.

* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, ns = nicht signifikant

IV. 1. 2. Vergleich des Nachweises von TIQ im Urin von Patienten mit ADHS und Kontrollprobanden

Im Urin der Gruppe der 42 ADHS-Patienten konnten signifikant erhöhte Werte sowohl für Salsolinol, Norsalsolinol, N-Methyl-Salsolinol und N-Methyl-Norsalsolinol im Vergleich zu den Werten im Urin der 24 gesunden Kontrollprobanden gemessen werden. Dieses gilt sowohl für die gemessenen Konzentrationen der freien Anteile als auch für die gemessenen Gesamtkonzentrationen.

Im Gegensatz dazu ergaben sich bezüglich der Konzentrationen der konjugierten, also gebundenen Formen (die, wie in Abschnitt III. 4. erwähnt, nicht direkt gemessen sondern errechnet wurden) der jeweiligen TIQ-Derivate im Urin nur für die Substanz Norsalsolinol signifikante Unterschiede zwischen der Gruppe der ADHS-Patienten und der Gruppe der Kontrollprobanden.

IV. 2. Untersuchung der TIQ-Derivate in Zusammenhang mit den Faktoren Alter, Medikation und Komorbiditäten im 12-Stunden-Sammelurin von ADHS-Patienten und Kontrollprobanden

IV. 2. 1. Alter, Medikation und Komorbiditäten als Kovariaten

Da sich die Gruppe der Patienten mit ADHS und die Kontrollgruppe im **Alter** unterschieden und das Alter auch innerhalb der Kontrollgruppe variierte (13 Kinder, Durchschnittsalter 10,5 Jahre, Standardabweichung (SD) 3,9 Jahre, 11 Erwachsene, Durchschnittsalter 36,7 Jahre, SD 11,3 Jahre), wurde die Kovarianz mit dem Faktor „Alter“ ermittelt.

Es konnte hierbei allerdings kein signifikanter Einfluss des Faktors „Alter“ auf die Konzentration der TIQ-Derivate im 12-Stunden-Sammelurin festgestellt werden.

Innerhalb der Gruppe der ADHS-Patienten gab es weiterhin Unterschiede in der **Medikation**.

18 Patienten nahmen zum Zeitpunkt der Studie Psychopharmaka ein (siehe III.1.1.). 24

Patienten nahmen zum Zeitpunkt der Studie keine Psychopharmaka ein.

Innerhalb der Gruppe der Kontrollprobanden nahm keiner der Patienten vor oder während der Studie Psychopharmaka ein.

Nach Ermittlung der Kovarianz mit dem Faktor „Medikation“ konnte ein signifikanter Einfluss der Einnahme von Psychopharmaka lediglich auf die Konzentration des TIQ-Derivates N-Methylnorsalsolinol_{frei} im Urin festgestellt werden. Die Konzentration im Urin war bei Patienten nach Einnahme von Medikamenten signifikant höher als bei Patienten ohne Medikation.

Auch bezüglich zusätzlicher **Komorbiditäten** ergaben sich innerhalb der Gruppe der ADHS-Patienten Unterschiede.

16 Patienten innerhalb der ADHS-Gruppe wiesen Komorbiditäten auf. 26 Patienten hatten neben der Diagnose ADHS keine weiteren psychischen Diagnosen zu verzeichnen.

Innerhalb der Gruppe der Kontrollprobanden gab es keinerlei Hinweise auf psychiatrische Erkrankungen.

Somit wurde auch die Kovarianz mit dem Faktor „Komorbiditäten“ ermittelt. Auch hier konnte, ebenso wie bei dem Faktor „Medikation“, ausschließlich ein signifikanter Einfluss auf die Konzentration des TIQ-Derivates N-Methylnorsalsolinol_{frei} im Urin festgestellt werden, wobei die Konzentration im Urin bei Patienten mit Komorbiditäten wie auch bei Patienten nach der Einnahme von Medikamenten signifikant höher als bei Patienten ohne Komorbiditäten war.

Insgesamt wurden nach Ermittlung der Kovarianz mittels der Kovarianzanalyse (ANCOVA) für die freien Anteile aller TIQ-Derivate die gleichen Ergebnisse wie bei der Ermittlung der Varianz, ermittelt durch die Varianzanalyse (ANOVA) festgestellt. Zusätzlich zu den freien Anteilen der TIQ-Derivate blieben auch die Konzentrationen für die gebundenen Anteile von Norsalsolinol und die Gesamtkonzentrationen von Norsalsolinol und N-Methyl-Norsalsolinol im Urin der ADHS-Patienten erhöht.

Eine Zusammenfassung der Werte für Varianz und Kovarianz findet sich in Tabelle 2.

IV. 2. 2. Vergleich des Nachweises von TIQ im Urin von Patienten mit ADHS und Kontrollprobanden unter Ausschluss der Beeinflussung durch die Faktoren Alter, Medikation und Komorbiditäten

Um auszuschließen, dass die Ergebnisse der Urinalysen durch die Faktoren Alter, Medikation und/oder Komorbiditäten signifikant beeinflusst wurden, folgte auf die statistische Einbeziehung dieser Faktoren (wie in IV. 2. 1. dargestellt) eine weitere Auswertung.

Diese wurde durchgeführt, indem vor einer erneuten statistischen Auswertung in beiden Gruppen (ADHS-Patienten und Kontrollprobanden) strikte Ein- und Ausschlusskriterien bezüglich der genannten Faktoren angewandt wurden.

In dieser zweiten statistischen Auswertung wurden die Werte von 21 Kindern und Jugendlichen mit den Werten von 12 gesunden Kontrollprobanden unter 18 Jahren verglichen.

Zwischen beiden Gruppen bestand kein signifikanter Unterschied im Alter (Durchschnittsalter der ADHS-Patienten 11,8 Jahre, Standardfehler 3,5 Jahre, Durchschnittsalter der Kontrollprobanden 9,5 Jahre, Standardfehler 3,2 Jahre) und in beiden Gruppen gab es weder Patienten mit Komorbiditäten noch Patienten, die Medikamente einnahmen.

Die Unterschiede der TIQ-Konzentrationen zwischen der Gruppe der ADHS-Patienten und der Gruppe der Kontrollprobanden blieben ebenso wie in der ersten statistischen Analyse signifikant für Salsolinol_{frei}, Salsolinol_{gesamt}, N-Methyl-Salsolinol_{frei}, N-Methyl-Salsolinol_{gesamt}, Norsalsolinol_{frei}, Norsalsolinol_{gesamt}, Norsalsolinol_{gebunden} und N-Methyl-Norsalsolinol_{frei}.

Auch konnten, ebenso wie in der ersten statistischen Analyse für N-Methyl-Salsolinol_{gebunden} und für N-Methyl-Norsalsolinol_{gebunden}, keine signifikanten Unterschiede zwischen der Gruppe der ADHS-Patienten und der Gruppe der Kontrollprobanden festgestellt werden.

Für Salsolinol_{gebunden} war kein Gruppenvergleich möglich, da es in der Gruppe der Kontrollprobanden nur bei einem Kind möglich war, die Konzentration korrekt zu errechnen.

Für N-Methyl-Norsalsolinol_{total} gab es in dieser zweiten statistischen Analyse eine Veränderung. Der signifikante Gruppenunterschied, der sich in der ersten statistischen Analyse gezeigt hatte, konnte hier nicht mehr nachgewiesen werden.

Die Ergebnisse dieser zweiten Analyse sind in Tabelle 3 zusammengefasst.

TIQ-Derivat	ADHS-Patienten			Kontrollprobanden			ANOVA F	df
	Nachweis- häufigkeit		Durchschnittliche Konzentration (SEM)	Nachweis- häufigkeit		Durchschnittliche Konzentration (SEM)		
	(n)	(%)		(n)	(%)			
<u>Salsolinol</u>								
<i>Frei</i>	16	76,2	5,64 (2,02)	12	100,0	0,11 (0,11)	5,56*	1,3
<i>Gesamt</i>	19	90,5	10,81 (2,17)	12	100,0	0,22 (0,22)	14,78***	1,3
<i>Gebunden_{errechnet}</i>	10	47,6	8,54 (2,41)	1	8,3	2,67 (nk)	nk	nk
<u>N-Methyl-Salsolinol</u>								
<i>Frei</i>								
<i>Gesamt</i>	18	85,7	66,28 (8,27)	10	83,3	10,50 (1,27)	24,54***	1,3
<i>Gebunden_{errechnet}</i>	20	95,2	116,52 (13,03)	11	91,7	46,09 (9,11)	13,85***	1,3
	18	85,7	52,88 (9,02)	11	91,7	36,55 (9,31)	1,43 ^{ns}	1,3
<u>Norsalsolinol</u>								
<i>Frei</i>	21	100	688,73 (122,37)	12	100,0	66,26 (14,64)	14,52***	1,3
<i>Gesamt</i>	21	100	1416,67 (211,09)	11	91,7	150,89 (2,09)	18,45***	1,3
<i>Gebunden_{errechnet}</i>	21	100	727,93 (102,37)	10	83,3	94,70 (21,54)	17,72***	1,3
<u>N-Methyl-Norsalsolinol</u>								
<i>Frei</i>								
<i>Gesamt</i>	21	100	11,93 (2,90)	12	100,0	0,44 (0,26)	8,79**	1,3
<i>Gebunden_{errechnet}</i>	21	100	38,10 (13,88)	12	100,0	4,81 (1,51)	3,23 ^{ns}	1,3
	18	85,7	30,52 (13,46)	8	66,7	4,75 (1,68)	1,37 ^{ns}	1,2

Tabelle 3: Konzentrationen der Tetrahydroisoquinolin-(TIQ) Derivate im Urin von Patienten mit ADHS und im Urin von Kontrollprobanden in nmol.

n: Patienten/Probanden mit Substanznachweis, %: relative Nachweishäufigkeit.

Weiterhin dargestellt sind die jeweiligen SEM sowie die mittels der ANOVA errechneten Werte für die Varianz und der df-Wert.

*p < 0,05, **p < 0,01, ***p < 0,001, ns = nicht signifikant, nk = nicht kalkulierbar

In dieser Auswertung wurde die eventuelle Beeinflussung durch die Faktoren Alter, Medikation sowie Komorbiditäten ausgeschlossen, indem strengere Ein- und Ausschlusskriterien als in der vorangegangenen Auswertung angewandt wurden.

IV.3. TIQ-Konzentrationen im Urin als Marker für ADHS

Um feststellen zu können, ob sich die Messung von TIQ-Derivaten im Urin als Marker für die Diagnose ADHS eignet, wurde vorerst ein Schwellenwert festgelegt, der die Grenze für eine signifikant erhöhte Konzentration von TIQ im Urin darstellt. Dieser Schwellenwert ergab sich folgendermaßen:

Zu der durchschnittlichen Konzentration der freien Anteile aller TIQ-Derivate innerhalb der Kontrollgruppe wurde einmalig der jeweilige SEM addiert.

Anschließend wurden sowohl Sensitivität als auch Spezifität ermittelt.

Sensitivität wurde definiert als der Anteil der „richtig positiven“ Patienten (definiert als Patienten mit ADHS-Diagnose und nachgewiesener signifikant erhöhter TIQ-Konzentration im Urin) an der Gruppe aller Patienten mit ADHS-Diagnose in der Grundgesamtheit.

Spezifität wurde dabei definiert als der Anteil der „richtig negativen“ Patienten (definiert als die Gruppe der Patienten ohne ADHS-Diagnose, bei denen keine signifikant erhöhte Konzentration von TIQ im Urin festgestellt werden konnte) an der Gruppe aller Patienten ohne ADHS-Diagnose (also alle Kontrollprobanden) in der Grundgesamtheit.

Bezüglich der freien Anteile von N-Methyl-Salsolinol ergab sich die größte Anzahl korrekt zugeordneter Patienten bei einer Sensitivität von 92,5 % und einer Spezifität von 94,4 %.

Eine Übersicht über die Werte der Sensitivität und Spezifität für die freien Anteile der jeweiligen TIQ-Derivate im Urin als Marker für ADHS gibt Tabelle 4.

TIQ-Derivat	Sensitivität	Spezifität
Norsalsolinol _{frei}	87.8 %	80.0 %
Salsolinol _{frei}	55.5 %	95.2 %
N-Methyl-Norsalsolinol _{frei}	69.0 %	93.5 %
N-Methyl-Salsolinol _{frei}	92.5 %	94.4 %

Tabelle 4: Übersicht über die Werte für Sensitivität und Spezifität der freien TIQ-Derivate im Urin als Marker für ADHS.

Mit N-Methyl-Salsolinol_{frei} wurden die größte Anzahl von Patienten korrekt bei einer Sensitivität von 92,5 % und einer Spezifität von 94,4 % identifiziert

V. Diskussion:

In dieser Arbeit wurde der Frage nachgegangen, ob sich im Urin von Kindern und Jugendlichen mit Aufmerksamkeits-Defizit-Hyperaktivitätsstörung (ADHS) erhöhte Konzentrationen unterschiedlicher 1,2,3,4-Tetrahydroisoquinolin (TIQ)-Derivate im Vergleich mit dem Urin gesunder Kontrollprobanden nachweisen lassen und ob sich die Bestimmung der Konzentrationen dieser TIQ-Derivate möglicherweise als Marker für die Erkrankung ADHS eignen könnte. Auch der pathogenetischen Bedeutung dieser TIQ-Derivate im Zusammenhang mit ADHS soll in dieser Arbeit nachgegangen werden.

Dabei wurden die Konzentrationen von Salsolinol, Norsalsolinol, N-Methyl-Salsolinol, N-Methyl-Norsalsolinol (jeweils als Gesamtkonzentration, als Konzentration der freien Anteile und als Konzentration der konjugierten Anteile) im Urin von ADHS-Patienten und gesunden Kontrollprobanden bestimmt. Der Nachweis dieser TIQ-Derivate erfolgte nach Vortrennung durch eine Affinitätschromatographie mittels der RP-HPLC-Analyse, wie in Abschnitt III.4. und III.5. beschrieben.

Mittels dieser Methode zur quantitativen Bestimmung der genannten TIQ-Derivate im Urin wurden deren Konzentrationen bei 24 Kontroll- und 42 ADHS-Patienten ermittelt.

Alle ADHS-Patienten befanden sich aufgrund ihrer Krankheit in psychiatrischer Behandlung in den Abteilungen für Kinder- und Jugendpsychiatrie der Universitäten Göttingen oder Würzburg.

Alle Kontrollprobanden wurden von einem Kinder- und Jugendpsychiater untersucht und zeigten keinerlei Hinweise auf bestehende psychiatrische Erkrankungen. Auch wurden in der Gruppe der Kontrollprobanden weder vor noch während der Studie Psychopharmaka eingenommen.

Da die orale Aufnahme von TIQ deren Konzentration im Urin beeinflusst (Riggin et al., 1976; Strölin Benedetti et al., 1989b), begannen sowohl die ADHS-Patienten als auch die Kontrollprobanden 48 Stunden vor Beginn der Urin-Sammelperiode eine von Moser (Moser, 1998a) beschriebene Diät (Restriktion von TIQ- und Salsolinol-haltige Nahrungsmitteln, wie z.B. Bananen, Käse, Schokolade, Sojaprodukte, Bier, Portwein, Weisswein), um eine Beeinflussung der TIQ-Konzentration im Urin durch die Nahrung weitgehend auszuschließen.

Da zwischen der Gruppe der ADHS-Patienten und der Gruppe der Kontrollprobanden Unterschiede im Alter existierten und die Gruppe der ADHS-Patienten außerdem bezüglich der Faktoren „Komorbiditäten“ und „Medikation“ Differenzen zeigte, galt es, durch mehrere analytische Schritte die Beeinflussung dieser Faktoren auf das Gesamtergebnis auszuschließen. Dieses geschah durch die Einführung von Kovariaten sowie durch eine

zweite statistische Analyse, in der strengere Ein- und Ausschlusskriterien Anwendung fanden (vergleiche hierzu ausführlich Abschnitt IV.2.).

Als Resultate zeigten sich signifikant erhöhte Konzentrationen von Salsolinol_{frei}, N-Methyl-Salsolinol_{frei}, Norsalsolinol_{frei} und N-Methyl-Norsalsolinol_{frei} im Urin der ADHS-Patienten. Auch nach Einbeziehung der Kovariaten „Alter“, „Komorbiditäten“ und „Medikation“ blieben diese Konzentrationen im Urin der ADHS-Patienten signifikant erhöht.

Um die Aussagekraft der gemessenen TIQ-Konzentrationen im Urin als Marker für ADHS zu bestimmen, wurde geprüft, inwieweit ein Rückschluss von einer signifikant erhöhten TIQ-Konzentration im Urin auf eine tatsächlich bestehende Diagnose ADHS möglich ist. Es sollte also festgestellt werden, ob sich möglicherweise mittels einer TIQ-Bestimmung im Urin von Patienten die Diagnose ADHS stellen lassen könnte, und wie zuverlässig diese Art der Diagnosestellung wäre.

Bezüglich N-Methyl-Salsolinol_{frei} konnte innerhalb dieser Versuchsreihe die höchste Sensitivität und Spezifität unter den TIQ-Derivaten festgestellt werden. Bei fehlender ADHS-Diagnose fiel in 94,4 % der Fälle die qualitative Bestimmung von N-Methyl-Salsolinol_{frei} im Urin negativ aus, d.h. es konnte keine signifikant erhöhte Konzentration von N-Methyl-Salsolinol_{frei} im Urin nachgewiesen werden. Dieses entspricht einer Spezifität von 94,4 %. In 92,5 % der Fälle fiel bei feststehender ADHS-Diagnose die qualitative Bestimmung von N-Methyl-Salsolinol_{frei} im Urin entsprechend positiv aus, d.h. es konnte eine signifikant erhöhte Konzentration von N-Methyl-Salsolinol_{frei} im Urin nachgewiesen werden. Dieses entspricht einer Sensitivität von 92,5 %.

Es besteht schlussfolgernd ein statistischer Zusammenhang zwischen dem Nachweis von N-Methyl-Salsolinol_{frei} im Urin und der Diagnose ADHS.

Um der pathogenetischen Bedeutung von TIQ in Zusammenhang mit ADHS nachzugehen bleibt allerdings nach wie vor die Frage offen, ob gemessene Konzentrationen von TIQ im Urin tatsächlich mit bestehenden TIQ-Konzentrationen im Zentralen Nervensystem (ZNS) korrelieren.

Obgleich Moser et al (Moser et al., 1996b) eine Korrelation zwischen den gemessenen Salsolinol-Konzentrationen im Urin und den gemessenen Salsolinol-Konzentrationen im Liquor demonstrieren konnten und eine Langzeitstudie, die sich mit N-Methyl-Norsalsolinol im Liquor beschäftigte, einen parallelen Anstieg von TIQ-Derivaten auf beiden Seiten der Blut-Hirn-Schranke aufzeigte (Scholz et al., 2004; Thümen et al., 2002), mangelt es immer noch an verlässlichen Daten, die eine definitive Korrelation zwischen den TIQ-Konzentrationen im Urin und den TIQ-Konzentrationen im ZNS beweisen würden.

Trotzdem könnte die Bestimmung von TIQ-Konzentrationen im Urin von möglichen ADHS-Patienten als erster Hinweis zur Untersuchung von ADHS bei Kindern und Jugendlichen sinnvoll sein, da diese Methode in der Handhabung einfach und ethisch durchaus vertretbar ist. Hinzu kommt, dass diese Form der Diagnostik unabhängig von subjektiven Eindrücken ist, welche bei der Diagnostik mittels Fragebögen sicher eine Rolle spielen.

Da Veränderungen des Dopamin-Stoffwechsels im Zusammenhang mit der ADHS-Symptomatik eine Rolle zu spielen scheinen, ist es sinnvoll, die Korrelation des Dopamin-Metabolismus im ZNS einerseits und den Konzentrationen bestimmter TIQ-Derivate im Urin andererseits näher zu betrachten.

Es wird angenommen, dass die zwei TIQ-Derivate Salsolinol und Norsalsolinol im menschlichen Gehirn aus Dopamin entstehen, und zwar zum einen durch die nicht-enzymatische-Spengler-Reaktion und zum anderen durch eine enzymatische Synthese mittels einer Salsolinol-Synthetase (Naoi et al., 1996). Daher geht man davon aus, dass das Vorkommen dieser TIQ-Derivate an das Vorhandensein von Dopamin im ZNS gebunden ist (siehe Abb. 4). Die jeweilige N-methyl-Derivate von Salsolinol und Norsalsolinol entstehen enzymatisch in einem anschließenden Schritt mittels der N-Methyltransferase (siehe Abb.5). Letztendlich ist es also durchaus denkbar, dass erhöhte Konzentrationen von Dopamin im ZNS zu erhöhten Konzentrationen von Salsolinol und Norsalsolinol im Urin führen, was wiederum zu erhöhten Konzentrationen von N-Methyl-Salsolinol und N-Methyl-Norsalsolinol im Urin führen könnte.

Mittels der durchgeführten Analysen ließen sich bei ADHS-Patienten erhöhte Konzentrationen von TIQ im Urin nachweisen. Daraus kann die Hypothese abgeleitet werden, dass im ZNS von ADHS-Patienten ein Überangebot an Dopamin besteht. Diese Hypothese steht allerdings im Gegensatz zu der Großzahl an bisher ermittelten Resultaten, die eher die Hypothese unterstützen, dass im ZNS von ADHS-Patienten ein Unterangebot von Dopamin herrscht (Sagvolden et al., 2005; Pliszka, 2005). Bei diesen Untersuchungen wird unter anderem davon ausgegangen, dass eine Veränderung im zentralen dopaminergen System über eine Modulation nicht-dopaminerges Signalübertragung (hauptsächlich Glutamat und GABA) zu Veränderungen beispielsweise im mesolimbischen und mesokortikalen System führt. Diese fehlerhaften Signalübertragungen führen dann beispielsweise zu den klassischen Symptomen Hyperaktivität, Impulsivität und Unaufmerksamkeit (Sagvolden et al., 2005).

Insgesamt könnte man die gefundenen Erhöhungen der TIQ-Derivate auf zwei unterschiedlichen Wegen interpretieren: Zum einen könnte man, wie oben ausgeführt, davon ausgehen, dass ein Mehr an Dopamin im ZNS auch zu einem Mehr an TIQ im Urin führt, die

ADHS also einen hyperdopaminergen Ursprung hat. Zum anderen ist es denkbar, dass das im ZNS vorhandene Dopamin über einen aberranten Abbauweg zu TIQ umgewandelt wird und damit im ZNS ein hypodopaminerner Zustand entsteht.

Zur Klärung dieser Frage wären weitere Untersuchungen zu TIQ bei ADHS sinnvoll.

Der Erfolg von Stimulanzien in der Therapie der ADHS scheint eher die Hypothese der Unterversorgung mit Dopamin im ZNS von ADHS-Patienten zu unterstützen (Pliszka, 2005). Die Weltgesundheitsorganisation WHO definiert Stimulanzien als Substanzen, die die Aktivität der Nerven erhöhen, beschleunigen oder verbessern. Die Wirkung von Stimulanzien beruht u.a. auf einer reversiblen Blockade von Dopamin-Transportern, außerdem wird bei Patienten mit ADHS eine Abnahme von Dopamin-Transportern bewirkt, was wiederum eine erhöhte zentrale Konzentration von Dopamin zur Folge hat. Man könnte also daraus folgern, dass die Einnahme von Stimulanzien zu höheren Konzentrationen von Salsolinol_{frei} und Norsalsolinol_{frei} im Urin führen müsste.

Interessanterweise zeigte sich in den durchgeführten Analysen allerdings kein Effekt der Einnahme von Psychostimulanzien (wie z.B. Methylphenidat (MPH)) auf die TIQ-Konzentration im Urin der ADHS-Patienten. Von den in die Analysen eingeschlossenen Patienten nahmen 18 Patienten Psychostimulanzien ein.

Insgesamt scheint die Annahme, dass die Konzentration von TIQ im Urin ausschließlich mit dem zentralen Dopamin-Metabolismus zusammenhängt, eine zu simple Betrachtungsweise zu sein. Es wäre auch möglich, dass die in dieser Arbeit festgestellten erhöhten Konzentrationen von TIQ im Urin von ADHS-Patienten nicht nur aus einer zentral vermehrten Synthese von TIQ, sondern ebenso aus einer peripher vermehrten Synthese von TIQ resultieren (Scholz et al., 2004).

Als eine weitere mögliche Ursache für eine periphere Herkunft von TIQ im Urin ist neben dem genannten peripheren Dopaminmetabolismus die Aufnahme TIQ-haltiger Nahrungsmittel und/oder Getränke zu nennen (Riggin et al., 1976; Strölin Benedetti et al., 1989b). Die Aufnahme dieser Nahrungsmittel und Getränke führt zu einer vermehrten Ausscheidung von TIQ-Derivaten im Urin. Werden diese Nahrungsmittel und Getränke jedoch vermieden, hat die Ernährung keinen Einfluss auf die Ausscheidung von TIQ-Derivaten mit dem Urin (Strölin Benedetti et al., 1989b). Da die Patienten in dieser Arbeit aber, wie in Abschnitt III. 3. 2. erwähnt, vor und während der Sammelperiode keine TIQ-haltigen Nahrungsmittel (wie z.B. Bananen, Käse, Schokolade oder Sojaprodukte) oder Getränke zu sich nahmen, spielten Schwankungen der exogenen TIQ-Mengen bzw. der vorher eingenommenen TIQ-Mengen für die innerhalb der durchgeführten Analysen

gefundenen Gruppenunterschiede der TIQ-Konzentrationen wohl eher eine untergeordnete Rolle.

Man kann die gefundenen erhöhten Konzentrationen der unkonjugierten TIQ-Derivate (TIQ_{frei}) im Urin von ADHS-Patienten vielmehr als Hinweis auf eine endogene, also im Körper der Patienten stattfindende Synthese ansehen, da oral zugeführte unkonjugierte TIQ_{frei}-Derivate im Körper sehr schnell durch Glukoronidierung oder Sulfonisierung inaktiviert werden. Dadurch würde trotz ihrer oralen Aufnahme eine Erhöhung der unkonjugierten TIQ_{frei}-Derivate verhindert werden (Moser, 1998a).

Hinzu kommt, dass die orale Aufnahme von TIQ wahrscheinlich nicht zu einem gleichzeitigen Anstieg aller vier TIQ_{frei}-Derivate führen würde. Vielmehr würde man nach oraler Aufnahme von TIQ_{frei} von individuell unterschiedlich ansteigenden Konzentrationen der verschiedenen TIQ-Derivate ausgehen.

Allerdings ist es auch möglich, dass für ADHS spezifische, für jedes TIQ-Derivat individuelle Veränderungen in den Metabolisierungswegen der einzelnen TIQ-Derivate existieren. Daher können trotz allem Einflüsse von Nahrungsmitteln und/oder Getränken auf die Symptomatik von ADHS (Schnoll et al., 2003; Marcason, 2005) nicht vollständig ausgeschlossen werden.

Insgesamt ist es notwendig, unabhängig von den vorliegenden Ergebnissen, die einen kausalen Zusammenhang zwischen ADHS und erhöhter Konzentrationen von TIQ frei im Urin wahrscheinlich machen, weitere Studien durchzuführen, um die Sensitivität und Spezifität von TIQ-Konzentrationen im Urin zu bestätigen und zu differenzieren. Dies gilt insbesondere für die Sensitivität und Spezifität der Konzentrationen von N-Methyl-Salsolinol_{frei} im Urin, da dieses TIQ-Derivat in seiner Sensitivität und Spezifität wesentlich besser als die anderen neurobiologischen Marker zu sein scheint (Biedermann und Faraone, 2005).

In der Zukunft wären Studien, die neben den hier untersuchten TIQ-Derivaten weitere Metabolite von Dopamin in die Analysen miteinbeziehen und außerdem weitere Patientengruppen mit Krankheiten, die mit dem Dopamin-System in Zusammenhang stehen (wie beispielsweise Patienten mit Tic-Störungen oder Schizophrenie) in die Analysen mit aufnehmen, zu empfehlen.

Bei Tic Erkrankungen werden ebenfalls, wie auch bei ADHS, Störungen vorrangig auf dopaminergem Transmitterebene angenommen. Neben einer Überaktivität des dopaminergen Systems im Bereich der Basalganglien werden weiterhin Störungen des serotonergen und noradrenergen Transmittersystems, die die Aktivität kortiko-striato-pallido-thalamiko-kortikaler Regelkreise beeinflussen, vermutet. Allerdings wurden bei Tic-Störungen bisher

keine genetischen Varianten für noradrenerge oder dopaminerge Transporter gefunden, so dass sich die Rezeptorauffälligkeiten auf funktionelle Untersuchungen stützen müssen. Ein von Rothenberg (2003) entwickeltes Modell zur Pathogenese der Tic-Störung geht von einem erhöhten Dopamin-Spiegel sowie von einer erhöhten Dichte von speziellen Dopaminrezeptoren im Bereich der Basalganglien aus. Zwischen beiden Größen und der Schwere der Tic-Symptomatik bestehen enge Zusammenhänge, so dass die Reifung des dopaminergen Systems neben der ADHS-Symptomatik auch den Verlauf der Tic-Störung erklären könnte. (Rothenberger et al., 2003).

Ebenfalls bei der Schizophrenie, deren Ätiologie nicht abschließend geklärt ist, wird eine Beteiligung des dopaminergen Systems angenommen. Dabei wird davon ausgegangen, dass im dopaminergen System von Schizophrenie-Patienten eine Überaktivität besteht. Diese Dopamin-Überaktivität kann sich sowohl als eine übermäßige Ausschüttung von Dopamin aus der Präsynapse als auch als Anstieg der Dichte von Dopamin-Rezeptoren bzw. als Aktivitätsanstieg der postsynaptischen Dopamin-Rezeptoren darstellen. Abi-Dargham et al. untersuchten in diesem Zusammenhang sowohl die prä- als auch die postsynaptischen Aspekte. Ihre Ergebnisse unterstützen die Theorie, dass Patienten mit Schizophrenie eine erhöhte Dopamin-Konzentration im ZNS aufweisen ebenso wie die Theorie, dass Schizophrenie-Patienten eine erhöhte Anzahl an zentralen Dopamin-Rezeptoren aufweisen (Abi-Dargham et al., 2000).

Insofern wäre eine Aufnahme sowohl von Tic-Patienten als auch von Schizophrenie-Patienten in künftige Studien, die sich mit der Bestimmung von TIQ im Urin beschäftigen, unter der Annahme, dass die zentrale Dopamin-Konzentration mit der TIQ-Konzentration im Urin zusammenhängt, sinnvoll.

Zusätzlich wäre es erstrebenswert, in einer weiteren Studie mit einer größeren Anzahl von Patienten zwischen den verschiedenen ADHS-Subtypen (Mischtyp, vorherrschend unaufmerksamer Typ, vorherrschend hyperaktiv-impulsiver Typ) zu differenzieren. Zur Übersicht über die unterschiedlichen Subtypen sowie deren Diagnose siehe Abb. 1. Denkbar wäre beispielsweise, dass sich die höchsten TIQ-Konzentrationen im Urin von Patienten des vorherrschend hyperaktiv-impulsiven Typs finden lassen. Dies lässt sich nach Versuchen an Ratten vermuten, bei denen man nach Injektion von TIQ eine deutliche Hyperaktivität nachweisen konnte (Meisenberg et al., 1984; Antkiewicz-Michaluk et al., 2000; Costall et al., 1976). Insofern wäre es denkbar, dass zwischen dem Kernsymptom Hyperaktivität bei ADHS-Patienten und den nachgewiesenen Höhen der Konzentrationen der

TIQ-Derivate die stärkste Korrelation besteht und sich die höchsten Konzentration von TIQ bei dem vorwiegend hyperaktiv-impulsiven Typen nachweisen lassen.

Weiterhin sollte der Frage nach der pathophysiologischen Bedeutung von TIQ bei Patienten mit ADHS weiter nachgegangen werden, da diese nicht abschließend geklärt ist.

Es existieren bereits unterschiedliche Studien, die einen Einfluss der zentralen TIQ-Konzentration auf die ADHS-Symptomatik wahrscheinlich machen. So beeinflussen TIQ-Derivate die zentrale dopaminerge und noradrenerge Erregungsübertragung (Mravec, 2006). Auch konnte neben den TIQ bedingten Verhaltensänderungen (Roeltgen und Schneider, 1991) eine Veränderung der Motorik beobachtet werden. Beispielsweise wurden nach intrathekaler TIQ-Applikation im Tierexperiment Drehbewegungen zur ipsilateralen Seite beobachtet (Moser et al., 1996a). Vetulani und Nalepa gehen davon aus, dass die Ursache hierfür neben der direkten Wirkung von TIQ über Rezeptorbindungen in der Beeinflussung von Freisetzung und Aufnahme biogener Amine durch TIQ liegt (Vetulani et al., 2001). Weiterhin gibt es verschiedene Hypothesen über den Einfluss hyper-oder hypodopaminerg Abweichungen im ZNS auf die ADHS-Symptomatik (Solanto, 2002), ausserdem wird eine Störung der physiologischen Funktion des noradrenergen Systems bei ADHS vermutet. TIQ hat offensichtlich auf beide dieser monoaminergen Systeme einen modulierenden Einfluss (Michaluk et al., 2002; Vetulani et al., 2003). Dies wirft die Frage auf, ob TIQ auf ADHS Einfluss nehmen bzw. sogar an deren Entstehung beteiligt sein könnte. In Studien von Vetulani und Kollegen konnte eine hohe Affinität von TIQ auf den α_2 -Adrenorezeptor festgestellt werden (Vetulani et al., 2001). Unterformen dieses Rezeptors sind für die Regulation der Freisetzung von Neurotransmittern wie beispielsweise Noradrenalin und Dopamin verantwortlich (Ihaliien und Tanila, 2002; Dalley und Stanford, 1995). Vetulani und Kollegen berichten weiter, dass appliziertes TIQ lediglich den α_2 -Adrenorezeptor-Liganden Clonidin (welcher mit begrenztem Erfolg bei der Behandlung von ADHS eingesetzt wird) zu verdrängen vermochte. α_1 - und β -Adrenorezeptor-Liganden wurden von TIQ hingegen nicht verdrängt (Vetulani et al., 2001). Somit kann Frage aufgestellt werden, ob bei ADHS eventuell veränderte TIQ-Konzentrationen über eine Wirkung am präsynaptischen α_2 -Adrenorezeptor zu einer Verdrängung von Dopamin und Noradrenalin führen könnten. Es bleibt demnach die Frage offen, ob erhöhte TIQ-Konzentrationen bei ADHS-Patienten als Resultat oder eventuell sogar als Ursache der Krankheit angesehen werden können.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass die Konzentrationen von Salsolinol_{frei}, Norsalsolinol_{frei}, N-Methyl-Salsolinol_{frei} und N-Methyl-Norsalsolinol_{frei} im Urin von Patienten mit ADHS erhöht sind. Diese Erkenntnisse eröffnen neue Perspektiven zur Entwicklung von

Hypothesen über die Ursachen von ADHS in Zusammenhang mit Funktionsbeeinträchtigungen im katecholaminergen System bei ADHS-Patienten.

Weiterhin steht mit der Identifizierung von N-Methyl-Salsolinol_{frei} erstmals ein neurobiologischer Marker zur Diagnose von ADHS zur Verfügung.

Um die gefundenen Resultate zu bestätigen, wären weitere Studien unter Einbeziehung einer größeren Gruppe von Kindern und Jugendlichen mit ADHS sinnvoll, in denen auch auf die ADHS-Subtypen eingegangen wird.

Die hier gefundenen Ergebnisse sind ein erster Schritt in der Weiterentwicklung dieses neuen und vielversprechenden Forschungsgebietes.

VI. Zusammenfassung:

Bei der Aufmerksamkeits-Defizit-Hyperaktivitätsstörung (ADHS) handelt es sich um eine Störung, die im Allgemeinen vor dem 7. Lebensjahr beginnt und sich durch die Kernsymptome Unaufmerksamkeit, Impulsivität und Hyperaktivität auszeichnet.

Noch immer ist die Ätiologie der der ADHS nicht abschließend geklärt. Es existieren verschiedene Hypothesen, ohne dass es bisher einen Marker für ADHS gibt.

Eine weit verbreitete Theorie der Pathogenese von ADHS geht davon aus, dass der Dopamin-Metabolismus bei der Entstehung von ADHS eine entscheidende Rolle spielt.

Mit der Identifikation von MPTP als selektivem Neurotoxin für dopaminerge Neurone begann eine Suche nach verwandten Substanzen. Als potentiell neurotoxische Substanzen wurden TIQ und NMTIQ sowie deren Metabolite identifiziert.

Diese Arbeit beschäftigt sich hauptsächlich mit der neurochemischen Perspektive der ADHS und hierbei speziell mit der Frage, inwieweit TIQ mit der ADHS in Zusammenhang stehen, da über die pathogenetische Bedeutung von TIQ für die ADHS bisher keine Klarheit besteht. Es wurde TIQ und NMTIQ im Urin von 42 Kindern und Jugendlichen mit der Diagnose ADHS sowie im Urin von 24 Kontrollprobanden bestimmt.

Als weitere Fragestellung wurde geprüft, ob die Konzentration der freien TIQ-Derivate im Urin der ADHS-Patienten aussagekräftig genug ist, um als Marker für die ADHS zu dienen. Hierzu wurden sowohl die Sensitivität als auch die Spezifität ermittelt.

Der qualitative und quantitative Nachweis einiger der untersuchten TIQ-Derivate im Urin der ADHS-Patienten war im Vergleich zu den Kontrollprobanden signifikant erhöht.

Bezüglich der Aussagekraft der freien TIQ-Derivate konnte für N-Methyl-Salsolinol_{frei} ein statistischer Zusammenhang zwischen dem Nachweis von N-Methyl-Salsolinol_{frei} im Urin und der Diagnose ADHS nachgewiesen werden. Die Bestimmung von N-Methyl-Salsolinol_{frei} könnte daher ein potentieller Marker der ADHS werden.

Die hier gefundenen Ergebnisse lassen die erhöhten Konzentrationen verschiedener TIQ-Derivate als die Folge eines veränderten Dopaminstoffwechsels bei ADHS-Patienten erscheinen, da davon ausgegangen wird, dass das Vorkommen dieser TIQ-Derivate an das Vorhandensein von Dopamin im ZNS gebunden ist. Bezüglich der pathogenetischen Bedeutung von TIQ in Zusammenhang mit ADHS bleibt nach wie vor die Frage offen, ob und wie stark gemessene TIQ-Konzentrationen im Urin mit bestehenden TIQ-Konzentrationen im Liquor korrelieren. Auch ist noch nicht klar, ob erhöhte TIQ-Konzentrationen bei ADHS-Patienten als Resultat oder eventuell sogar als Ursache der Krankheit angesehen werden können.

VII. Abkürzungen:

ADHS	Aufmerksamkeits-Defizit-Hyperaktivitätsstörung
ANCOVA	Kovarianzanalyse
ANOVA	Varianzanalyse
Boronat-Säulen	m-Aminophenylboronat Agarose-Säulen
DAT	Dopamintransporter
Df-Wert	Freiheitsgrad
3,4-DHBA	3,4-Dihydroxybenzylamin
DHTIQ	Dihydroxy-1,2,3,4-Tetrahydroisoquinolin
DRD ₄	Dopaminrezeptor-D4
DSM IV	vierte Ausgabe des Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders
ECD	Elektrochemische Detektion
EEG	Elektroenzephalogramm
EPPS	N-[2-Hydroxyethyl]-piperazin-N'-[3- propansulfonsäure]
HPLC	Hochdruck-Flüssigkeitschromatographie
ICD-10	aktuelle Ausgabe der International Classification of Diseases
IQ	Intelligenzquotient
M	Molar
MPH	Methylphenidat
MPTP	1-Methyl-4-Phenyl-1,2,3,6-Tetrahydropyridin
Na ₂ -EDTA	Dinatrium-Ethylendiamintraessigsäure
NMTIQ	N-Methyl-1,2,3,4-Tetrahydroisoquinolin
PET	Positronenemissionstomographie
RP-HPLC	Umkehrphasen- Hochdruck- Flüssigkeitschromatographie
SD	Standardabweichung
SEM	Standardfehler
SHR	Sponate Hypertensive Ratte
SPECT	Single Photon Emission Computed Tomography
TIQ	1,2,3,4-Tetrahydroisoquinolin
ZNS	Zentrales Nervensystem

VIII. **Literaturverzeichnis**

1. Abikoff, H. (1987) An evaluation of cognitive behaviour therapy for hyperactive children. Lahey BB, Kadzin AE (eds) *Advances in clinical child psychology* Vol. 10. Plenum, New York, 171-216.
2. Abi-Dargham, A., Rodenhiser J., Printz, D., Zea-Ponce Y., Gil, R., Kegeles, L. S., Weiss, R., Cooper, T. B., Mann, J. J., Van Heertum, R. L., Gorman, J. M., Laruelle, M. (2000) Increased baseline occupancy of D2 receptors by dopamine in schizophrenia. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97, 8104-8109.
3. Anand, K.J., Scalzo, F.M. (2000) Can adverse neonatal experiences alter brain development and subsequent behaviour? *Biol Neonate* 77, 68-82.
4. Antkiewicz-Michaluk L., Michaluk J., Romanska I., Papla I., Vetulani J. (2000) Antidopaminergic effects of 1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline and salsolinol. *J Neural Transm*, 107,1009-1019.
5. Asherson, P., Brookes, K., Franke, B., Chen, W., Gill, M., Ebstein, R. P., Buitelaar, J., Banaschewski, T., Sonuga-Barke, E., Eisenberg, J., Manor, I., Miranda, A., Oades, R. D., Roeyers, H., Rothenberger, A., Sergeant, J., Steinhausen, H. C., Faraone, S. V. (2007) Confirmation that a specific haplotype of the dopamine transporter gene is associated with combined-type ADHD. *Am J Psychiatry*, 164, 674-677.
6. Barkley, R.A. (1997a) Behavioral inhibition, sustained attention, and executive functions: Construction a unifying theory of ADHD. *Psychol Bull* 121, 65-94.
7. Barkley, R.A. (1997b) ADHD and the nature of self-control. Guilford, New York.
8. Barkley, R.A. (1998) Attention-deficit hyperactivity disorder: A handbook for diagnosis and treatment 2nd ed. Guilford, New York.
9. Barry, R.J., Clarke, A.R., Johnstone, S.J. (2003) A review of electrophysiology in attention-deficit/hyperactivity disorder: I. Qualitative and quantitative electroencephalography. *Clin Neurophysiol* 114, 171-183.
10. Biedermann, J., Mick, E., Faraone, S.V. (2000) Age-dependent decline of symptoms of attention deficit hyperactivity disorder: impact of remission definition and symptome type. *AM J Psychiatry* 157, 816-818.
11. Biederman, J., Faraone, S. V. (2002) Current concepts on the neurobiology of Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder. *J Atten Disord*, 6 Suppl 1, S7-16.
12. Biederman, J., Faraone, S.V. (2005) Attention-deficit hyperactivity disorder. *Lancet*, 366, 237-248.

13. Bobb, A. J., Castellanos, F. X., Addington, A. M., Rapoport, J. L. (2005) Molecular genetic studies of ADHD: 1991 to 2004. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet*, 132B, 109-125.
14. Bouritius, V., Galpin, I.J., Dean P.D.G. (1981) Applications of immobilised phenylboronic acid as supports for group-specific ligands in the affinity chromatography of enzymes. *J Chromatogr* 210, 267-278.
15. Brookes, K. J., Mill, J., Guindalini, C., Curran, S., Xu, X., Knight, J., Chen, C. K., Huang, Y. S., Sethna, V., Taylor, E., Chen, W., Breen, G., Asherson, P. (2006) A common haplotype of the dopamine transporter gene associated with attention-deficit/hyperactivity disorder and interacting with maternal use of alcohol during pregnancy. *Arch Gen Psychiatry*, 63, 74-81.
16. Brown, R.T., Amler, R.W., Freeman, W.S., Perrin, J.M., Stein, M.T., Feldman, H.M., Pierce, K., Wolraich, M.L. and the Committee on Quality Improvement (2005) Subcommittee on Attention-deficit/hyperactivity disorder: Overview of the evidence, *Pediatrics* 115, 749-757.
17. Bymaster, F.P., Katner, J.S., Nelson, D.L., Hemrick-Luecke, S.K., Threlkeld, P.G., Heiligenstein, J.H., Morin, S.M., Gehlert, D.R., Perry, K.W. (2002) Atomoxetine increases extracellular levels of norepinephrine and dopamine in prefrontal cortex of rat: a potential mechanism for efficacy in attention deficit/hyperactivity disorder. *Neuropsychopharmacology* 27 (5), 699-711.
18. Cantwell, D.P., Baker, L. (1992) Association between attention deficit-hyperactivity disorder and learning disorders. Shaywitz SE, Shaywitz BA (eds) *Attention deficit disorder comes of age*. Pro-ed, Austin, 145-164.
19. Casey, B.J., Castellanos, F.X., Giedd, J.N., Marsh, W. L.; Hamburger, S. D.; Schubert, A. B.; Vauss, Y. C.; Vaituzis, A. C.; Dickstein, D. P.; Sarfatti, S. E.; Rapoport, J. L. (1997) Implication of right frontostriatal circuitry in response inhibition and attention-deficit/hyperactivity disorder. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry* 36, 374-383.
20. Castellanos, F.X. (1997) Toward a pathophysiology of attention-deficit/hyperactivity disorder. *Clin Pediatr* 36, 381-393.
21. Castellanos F.X., Giedd, J.N., Marsh, W.L .Hamburger, S.D., Vaituzis, A.C., Dickstein, D.P.,Sarfatti, S.E., Vauss, Y.C., Snell, J.W., Lange, N., Kaysen, D., Krain, A.L., Ritchie, G.F., Rajapakse,J.C., Rapoport, J.L. (1996) Quantitative brain magnetic resonance imaging in attention-deficit hyperactivity disorder. *Arch Gen Psychiatry* 53, 607-616.
22. Castellanos, F.X., Giedd, J.N., Berquin, P.C., Walter, J.M., Sharp, W., Tran, T., Vaituzis, A.C., Blumenthal, J.D., Nelson, J., Bastain, T.M., Zijdenbos, A., Evans,

- A. C., Rapoport, J.L. (2001) Quantitative brain magnetic resonance imaging in girls with attention-deficit/hyperactivity disorder. *Arch Gen Psychiatry* 58, 289-295.
23. Cheon, K.A., Ryu, Y.H., Kim, Y.K., Namkoong, K., Kim, C.H., Lee, J.D. (2003) Dopamine transporter density in the basal ganglia assessed with [¹²³I] IPT SPET in children with attention deficit hyperactivity disorder. *Eur J Nucl Med Mollmaging* 30, 306-311.
 24. Clark, C.R., Geffen, G.M., Geffen, L.B. (1987) Catecholamines and attention. I: Animal and clinical studies. *Neurosci Biobehav Rev* 11(4), 341-352.
 25. Clarke, A.R., Barry, R.J., McCarthy, R., Selikowitz, M. (2001) EEG-defined subtypes of children with attention-deficit/hyperactivity disorder. *Clin Neurophysiol* 112, 2098-2105.
 26. Cook, E.H. Jr, Stein, M.A., Krasowski, M.D., Cox, N.J., Olkon, D.M., Kieffer, J.E., Leventhal, B.L. (1995) Association of attention-deficit disorder and the dopamine transporter gene. *Am J Hum Genet* 56, 993-998.
 27. Costall, B., Naylor, R.J., Pinder, R.M. (1976) Hyperactivity induced by tetrahydroisoquinoline derivatives injected into the nucleus accumbens. *Eur J Pharmacol*, 39, 153-160
 28. Dalley, J.W., Stanford, S.C. (1995) Contrasting effects of the imidazol(in)e alpha 2-adrenoreceptor agonists, medetomidine, clonidine and UK 14, 304 on extraneuronal levels of noradrenaline in the rat frontal cortex: evaluation using in vivo microdialysis and synaptosomal uptake studies. *Br J Pharmacol* 114(8), 1717-1723.
 29. Döpfner, M. (2000) Hyperkinetische Störungen. In: Petermann F (Hrsg) *Lehrbuch der Kinderpsychologie*, 4. Auflage, Hogrefe, Göttingen, 153-189.
 30. Döpfner, M., Lehmkuhl, G. (2000) *Diagnostik-System für psychische Störungen im Kindes- und Jugendalter nach ICD-10 und DSM-IV (DISYPS-KJ)*, Bern, Huber.
 31. Döpfner, M., Lehmkuhl, G. (2002) Evidenzbasierte Therapie von Kindern und Jugendlichen mit Aufmerksamkeitsdefizit-/Hyperaktivitätsstörung (ADHS) *Prax Kinderpsychol Kinderpsychiatr* 51, 419-440.
 32. Döpfner, M., Lehmkuhl, G. (2004) Aufmerksamkeitsstörung und Hyperaktivität. In: Schlottke PF, Silbereisen RK, Schneider S, Lauth GW (Hrsg) *Enzyklopädie der Psychologie, Serie II: Klinische Psychologie Bd 5: Störungen im Kindes- und Jugendalter – Grundlagen und Störungen im Entwicklungsverlauf*. Hogrefe, Göttingen, S 613-651.
 33. Dougherty, D.D., Bonab, A.A., Spencer, T.J., Rauch, S.L., Madras, B.K., Fischman, A.J. (1999) Dopamine transporter density in patients with attention deficit hyperactivity disorder. *Lancet* 354, 2132-2133.

34. Dresel, S., Krause J., Krause, K.-H., LaFougere, C., Brinkbäumer, C., Kung, H. F., Hahn, H., Tatsch, K. (2000) Attention deficit hyperactivity disorder: binding of [^{99m}Tc] TRODAT-1 to the dopamine transporter before and after methylphenidate treatment. *Eur J Nucl Med* 27 (10),1518-1524.
35. Duncan, M.W., Smythe, G.A., Nicholson, M.V. (1984) Comparison of high-performance liquid chromatography with electrochemical detection and gaschromatography with electrochemical detection and gaschromatography-massfragmentography for the assay of salsolinol, dopamine and dopamine metabolites in food and beverage samples. *J Chromatography* 336, 199-209.
36. DuPaul, G.J., Eckert, T.L. (1997) The effects of school-based interventions for attention deficit hyperactivity disorder: A meta-analysis. *School Psychol Rev* 23, 5-27.
37. Faraone, S.V., Biedermann, J., Weiffenbach, B. Keith, T., Chu, M.P., Weaver, A., Spencer, T.J., Wilens, T.E., Frazier, J., Cleves, M., Sakai, J. (1999) Dopamine D4 gene 7-repeat allele and attention deficit hyperactivity disorder. *Am J Psychiatry* 156, 768-770.
38. Faraone, S.V., Biedermann, J. Lehman, B.K., Spencer, T., Norman, D., Seidman, L.J., Kraus, I., Perrin, J., Chen, W.J., Tsuang, M.T. (1993) Intellectual performance and school failure in children with attention deficit hyperactivity disorder and in their siblings. *J Abnorm Psychol* 102 (4), 616-623.
39. Faraone S. V., Pliszka, S.R., Olvera, R.L., Skolnik, R., Biedermann, J. (2001a) Efficacy of Adderall and methylphenidate in attention-deficit/hyperactivity disorder: A reanalysis using drug-placebo and drug-drug response curve methodology, *J Chil Adolesc Psychopharmacol.* 11, 171-180.
40. Faraone, S. V., Doyle, A. E., Mick, E., Biederman, J. (2001b) Meta-analysis of the association between the 7-repeat allele of the dopamine D(4) receptor gene and attention deficit hyperactivity disorder. *Am J Psychiatry*, 158, 1052-1057.
41. Faraone , S.V., Spencer, T., Aleari, M., Pagano, C., Biedrmann, J. (2004) Meta-analysis of the efficacy of methylphenidate for treating adult attention-deficit /hyperactivity disorder. *J Clin Psychopharmacol* 24, 24-29.
42. Fergusson, D.M., Lynskey, M.T., Horwood, L.J. (1997) Attentional of difficulties in middle childhood and psychosocial outcomes in young adulthood. *J Cild Psychol Psychiatry* 38, 633-644.
43. Feuerstein, T.J., Rossner, R., Schumacher, M. (1997) How to express an effect mean as percentage of a control mean? *J Pharmacol Toxicol Methods*, 37, 187-190.

44. Filipek, P.A., Semrud-Clikeman, M, Steingard, R.J., Renshaw, P.F., Kennedy, B.N., Biedermann, J. (1997) Volumetric MRI analysis comparing subjects having attention-deficit hyperactivity disorder with normal controls, *Neurology* 48, 589-601.
45. Fox, N.A., Rubin, K.H., Calkins, S.D., Marshall, T.R., Coplan, R.J., Porges, S.W., Long, J.M., Stewart, S. (1995) Frontal activation asymmetry and social competence at four years of age. *Cild Dev* 6, 1770-1784.
46. Frank, M. J., Claus, E. D. (2006) Anatomy of a decision: striato-orbitofrontal interactions in reinforcement learning, decision making, and reversal. *Psychol Rev*, 113, 300-326.
47. Frank, M. J., Woroch, B. S., Curran, T. (2005) Error-related negativity predicts reinforcement learning and conflict biases. *Neuron*, 47, 495-501.
48. Gehrke, C.W., Kuo, K.C., Davis, G.E., Suits, R.D., Waalkes, T.P., Borek, E. (1978) Quantitative high-performance liquid chromatography of nucleosids in biological materials. *J. Chromatogr* 150, 455-476.
49. Gentsch, C., Lichtensteiner, M., Feer, H. (1981) Locomotor activity defecation score and corticosterone levels during an open-field exposure. A comparison among individually and group-housed rats and genetically selected rat lines. *Physiol Behav* 27, 183-186.
50. Goldman-Rakic, P.S., Brown, R.M. (1982) Post-natal development of monoamine content and synthesis in the cerebral cortex of Rhesus monkey. *Dev Brain Res* 4, 339-349.
51. Goodyear, P., Hynd, G. (1992) Attention deficit disorder with (ADHD) and without (ADDWO) hyperactivity: Behavioral and neuropsychological differentiation. *J Clin Cild Psychol* 21, 273-304.
52. Gottwald, W. in: Gruber, U. und Klein, W. (Hrsg.) (1993) *RP-HPLC für Anwender*. VCH-Verlag 1-170.
53. Grace, A. A. (2001) Psychostimulant actions on dopamine and limbic system function: relevance to the pathophysiology and treatment of ADHD. In: Solanto, M.V., Arnsten, A.F.T., Castellanos, F.X. (Ed.), *Stimulant Drugs and ADHD, Basic and Clinical Neuroscience*, Oxford Univ. Press., New York, 134-155.
54. Greene, R.W., Biedermann, J., Faraone, S.V., Sienna, M., Garcia-Jetton, J. (1997) Adolescent outcome of boys with attention-deficit/hyperactivity disorder and social disability: results from a 4-year longitudinal follow-up study. *J. Consult Clin Psychol* 65, 758-767.

55. Hall, F.S. (1998) Social deprivation of neonatal, adolescent, and adult rats has distinct neurochemical and behavioural consequences. *Crit Rev Neurobiol* 12, 129-162.
56. Halperin, J.M., Newcom, J.H., Koda, V.H., Pick, L., McKay, K.E., Knott, P. (1997) Noradrenergic mechanism in ADHD children with and without reading disabilities: a replication and extension. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry* 36, 1688-1697.
57. Higa, S., Suzuki, T., Hayashi, A., Yamamura, Y., Tsuge, I. (1977) Isolation of catecholamins in biological fluids by boric acid gel. *Anal Biochem* 77, 18-24.
58. Huber, G. (2006) *Psychiatrie, 7. Auflage*, Schattauer, Stuttgart, 588.
59. Hüher, G. (1998) Stress and the adaptive self-organization of neuronal connectivity during early childhood. *Int J Dev Neurosci* 16, 297-306.
60. Ihalién, J.A., Tanila, H. (2002) In vivo regulation of dopamine and noradrenaline release by alpha2A-adrenoceptors in the mouse prefrontal cortex. *Eur J Neurosci* 57(5), 457-463.
61. Ishii, T., Takahashi, O., Kawamura, Y., Ohta, T. (2003) Comorbidity in attention deficit-hyperactivity disorder. *Psychiatry Clin Neurosci* 57 (5): 457-463.
62. Ivry, R. (1997) Cerebellar timing systems. *Int Rev Neurobiol* 41, 555-573.
63. Jones, G.H., Marsden, C.A., Robbins, T.W. (1991) Behavioural rigidity and rule-learning deficits following social isolation in rats: neurochemical correlates. *Behav Brain Res* 443, 35-50.
64. Joseph, R. (1999) Environmental influence on neural plasticity, the limbic system, emotional development and attachment: a Review. *Child Psychiatry Hum dev* 29, 189-208.
65. Kates, W.R., Frederikse, M., Mostofsky, S.H., Folley, B.S., Cooper, K., Mazur-Hopkins, P., Kofman, O., Singer, H.S., Denckla, M.B., Pearlson, G.D., Kaufmann, W.E. (2002) MRI parcellation of the frontal lobe in boys with attention-deficit hyperactivity disorder or Tourette Syndrome. *Psychiatry Res* 116, 63-81.
66. Kahl, K.G., Puls, J.H., Schmidt, G. (2007) *Praxishandbuch ADHS. Diagnostik und Therapie für alle Altersstufen*, Thieme, Stuttgart, New York, 22.
67. Kirley, A., Lowe, N., Hawi, Z., Mullins, C., Daly, G., Waldman, I., McCarron, M., O'Donnell, D., Fitzgerald, M., Gill, M. (2003) Association of the 480 bp DAT1 allele with methylphenidate response in a sample of Irish children with ADHD. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet*, 121B, 50-54.
68. Kohno, M., Ohta, S., Hirobe, M. (1986) Tetrahydroisoquinoline and 1-methyl-tetrahydroisoquinolin as novel endogenous amines in rat brain. *Biochem Biophys Res Commun* 140, 448-454.

69. Krause, J. (2008) SPECT and PET of the dopamine transporter in attention-deficit/hyperactivity disorder. *Expert Rev Neurother*, 8, 611-625.
70. Krause, K.H., Dresel, S.H., Krause, J., Kung, H.F., 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* 285, 107-110.
71. Lahey, B.B., Carlson, C.L. (1992) Validity of the diagnostic category of attention deficit disorder without hyperactivity: A review of the literature, In: Shaywitz BA (eds) *Attention deficit disorder comes of age: toward the twenty-first century*. Pro Ed, Austin, 119-144.
72. Lauder, J.M. (1988) Neurotransmitters as morphogens. *Prog Brain Res* 73, 365-387.
73. Lazzaro, I., Gordon, E., Li, W., Lim, C.L., Plahn, M., Whitmont, S., Clarke, S., Barry, R.J., Dosen, A., Meares, R. (1999) Simultaneous EEG and EDA measures in adolescent attention deficit hyperactivity disorder. *Int J Psychophysiol* 24, 123-134.
74. Lehmann, K., Teuchert-Noodt, G., Dawirs, R.R. (2002) Postnatal rearing conditions influence ontogeny of adult dopamine transporter (DAT) immunoreactivity of the striatum in gerbils. *J Neural Transm* 109, 1129-1137.
75. Leo, D., Sorrentino, E., Volpicelli, F., Eyman, M., Greco, D., Viggiano, D., di Porzio, U., Perrone-Capano, C. (2003) Altered midbrain dopaminergic neurotransmission during development in an animal model of ADHD. *Neurosci Biobehav Rev*, 27, 661-669.
76. Levy, F., Swanson, J.M. (2001) Timing, space and ADHD: the dopamine theory revisited. *Aust N Z J Psychiatry* 35(4), 504-511.
77. Lewis, D.A., Sesack, S.R., Levey, A.I., Rosenberg, D.R. (1998) Dopamine axons in primate pre-frontal cortex: specificity of distribution, synaptic targets and development. *Adv Pharmacol* 42, 703-706.
78. Li, D., Sham, P.C., Owen, M.J., He, L. (2006). Meta-analysis shows significant association between dopamine system genes and attention deficit hyperactivity disorder (ADHD). *Hum Mol Genet*, 15, 2276-2284.
79. Ljungberg, T., Apicella, P., Schultz, W. (1992) Responses of monkey dopamine neurons during learning of behavioral reactions. *J Neurophysiol* 67, 154-163.
80. Lou, H.C., Henriksen, L., Bruhn, P. (1984) Focal cerebral hypoperfusion in children with dysphasia and/or attention deficit disorder. *Arch Neurol* 41, 825-829.

81. Madras, B.K., Miller, G.M., Fischman, A.J. (2002) The dopamine transporter: relevance to attention deficit hyperactivity disorder (ADHD). *Behav Brain Res* 130, 57-63.
82. Madras, B.K., Miller, G.M., Fischman, A.J. (2005) The dopamine transporter and attention-deficit/hyperactivity disorder. *Biol Psychiatry*, 57, 1397-1409.
83. Makino, Y., Ohta, S., Tachikawa, O., Hirobe, M. (1988) Presence of tetrahydroisoquinoline and 1-methyl-tetrahydroisoquinoline in foods: Compounds related to Parkinson's disease. *Life Sci* 43, 373-378.
84. Mannuzza, S., Klein, R.G. (1999) Adolescent and adult outcomes in attention deficit/hyperactivity disorder. In Quay, H.C., Hogan, A.E. (eds) *Handbook of disruptive behaviour disorders*. Kluwer Academic, New York, 279-294.
85. Marcason, W. (2005) Can dietary intervention play a part in the treatment of attention deficit and hyperactivity disorder? *J Am Diet Assoc*, 105, 1161-1162.
86. Mataro, M., Garcia-Sanchez, C., Junque, C., Estevez-Gonzalez, A., Pujol, J. (1997) Magnetic resonance imaging measurement of the caudate nucleus in adolescents with attention-deficit hyperactivity disorder and its relationship with neuropsychological and behavioural measures. *Arch Neurol* 54, 963-968.
87. Meisenberg G, Simmons, W.H., Collins, M.A. (1984) Effects of catecholamine-related mammalian alkaloids on spontaneous and vasopressin-induced behavior in mice. *Pharmacol Biochem Behav*, 20, 355-360.
88. Melchitzky, D.S., Lewis, D.A. (2000) Tyrosine hydroxylase- and dopamine transporter-immunoreactive axons in the primate cerebellum. Evidence for a lobular- and laminar-specific dopamine innervation. *Neuropsychopharmacology* 22, 466-472.
89. Michaluk, J., Krygowska-Wajs, A., Karolewicz, B., Antkiewicz-Michaluk, L. (2002) Role of noradrenergic system in the mechanism of action of endogenous neurotoxin 1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline: biochemical and functional studies. *Pol J Pharmacol* 54(1), 19-25.
90. Michelson, D., Faries, D., Wernicke, J., Kelsey, D., Kendrick, K. Group (2001) Atomoxetine in the treatment of children and adolescent with attention-deficit/hyperactivity disorder: A randomized, placebo-controlled dose-response study. *Pediatrics* 108, e83.
91. Michelson, D., Allen, A.J., Busner, J., Casat, C., Dunn, D., Kratochvil, C., Newcorn, J., Sallee, F.R., Sangal, R.B., Saylor, K., West, S., Kelsey, D., Wernicke, J., Trapp, N.J., Hrder, D. (2002) Once-daily Atomoxetine treatment for children and adolescents with attention-deficit/hyperactivity disorder: A randomized placebo-controlled study. *Am J Psychiatry* 159, 1896-1901.

92. Mick, E., Biedermann, J., Faraone, S.V., 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* 41, 378-385.
93. Mill, J., Sagvolden, T., Asherson, P. (2005) Sequence analysis of *Drd2*, *Drd4*, and *Dat1* in SHR and WKY rat strains. *Behav Brain Funct* 1, 24.
94. Monastra, V.J., Lubar, J.F., Linden, M. (2001) The development of a quantitative electroencephalographic scanning process for attention deficit-hyperactivity disorder: reliability and validity studies. *Neuropsychology* 15, 136-144.
95. Morgan, M.J., Einon, D.F., Nicholas, D. (1975) The effects of isolation rearing on behavioural inhibition in the rat. *Q J Exp Psychol* 27, 615-634.
96. Moser, A., Scholz, J., Siebecker, F. (1995) HPLC assay for quantitating salsolinol in the urine of patients with Parkinson's disease. *Biol Chem Hoppe-Seyler* 376, 132.
97. Moser, A., Siebecker, F., Nobbe, F., Böhme, V. (1996a) Rotational behaviour and neurochemical changes in unilateral N-Methyl-Norsalsolinol and 6-hydroxydopamine lesioned rats. *Exp Brain Res* 112(1), 89-95.
98. Moser, A., Siebecker, F., Vieregge, P., Jaskowski, P., Kompf, D. (1996b) Salsolinol, catecholamine metabolites, and visual hallucinations in L-dopa treated patients with Parkinson's disease. *J Neural Transm* 103, 421-432.
99. Moser, A. (1998a) TIQ derivatives in the human central nervous system. *Pharmacology of Endogenous Neurotoxins: A Handbook*. A. Moser, Birkhäuser, Boston, 25-40.
100. Moser, A. (1998b) TIQ derivatives in the human central nervous system. *Pharmacology of Endogenous Neurotoxins: A Handbook*. A. Moser, Birkhäuser, Boston, 43.
101. Mravec, B. (2006) Salsolinol, a derivative of dopamine, is a possible modulator of catecholaminergic transmission: a review of recent developments. *Physiol Res* 55, 353-364.
102. Musshoff, F., Schmidt, P., Dettmeyer, R., Priemer, F., Wittig, H., Madea, B. (1999) A systematic regional study of dopamine and dopamine-derived salsolinol and norsalsolinol levels in human brain areas. *Forensic Sci Int* 105,1-11.
103. Nagatsu, T., Hirata, Y. (1986) Inhibition of the tyrosine hydroxylase system by MPTP, 1-methyl-4-phenylpyridinium ion (MPP⁺) and the structurally related compounds in vitro and in vivo. *Eur Neurol* 26, 11-15.
104. Naoi, M., Takahashi, T., Parvez, H., Kabeya, R., Tahushi, E., Yamaguchi, K., Hirata, Y., Minami, M., Nagatsu, T. (1989a). N-methylisoquinolinium ion as an

- inhibitor of tyrosine hydroxylase L-amino decarboxylase and monoamine oxidase. *Neurochem* 15, 315-320.
105. Naoi, M., Matsuura, S., Takahashi, T., Nagatsu, T. (1989b) An N-methyltransferase in human brain catalyses N-methylation of 1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline into N-methyl-1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline, a precursor of a dopaminergic neurotoxin, N-methylisoquinolinium ion. *Biochem Biophys Res Commun* 161, 1213-1216.
 106. Naoi, M., Maruyama, W. (1993) Type B monoamine oxidase and neurotoxins. *Eur Neurol* 33, 31-37.
 107. Naoi, M., Dostert, P., Yoshida, M., Nagatsu, T. (1993) N-methylated tetrahydroisoquinolines as dopaminergic neurotoxins. *Adv Neurol* 60, 212-217.
 108. Naoi, M., Maruyama, W., Dostert, P., Kohda, K., Kaiya, T. (1996) A novel enzyme enantioselectively synthesizes (R)salsolinol, a precursor of a dopaminergic neurotoxin, N-methyl(R)salsolinol. *Neurosci Lett* 212, 183-186.
 109. Neddens, J., Brandenburg, K., Teuchert-Noodt, G., Darwirs, R.R. (2001) Differential environment alters ontogeny of dopamine innervation of the orbital prefrontal cortex in gerbils. *J Neurosci Res* 63, 209-213.
 110. Nieoullon, A. (2002) Dopamine and the regulation of cognition and attention. *Prog Neurobiol* 67, 53-83.
 111. Nigg, J.T. (2000) On inhibition/disinhibition in developmental psychopathology: views from cognitive and personality psychology and a working inhibition taxonomy. *Psycho Bull* 127, 220-246.
 112. Nigg, J.T. (2001) Is ADHD a disinhibitory disorder? *Psychol Bull* 127, 571-598.
 113. Niwa, T., Takeda, N., Kaneda, N., Hashizume, Y., Nagatsu, T. (1987) Presence of tetrahydroisoquinoline and 2-methyl-tetrahydroisoquinoline in parkinsonian and normal human brains. *Biochem Biophys Res Commun* 144, 1084-1089.
 114. Niwa, T., Takeda, N., Tatematsu, A., Matsuura, S., Yoshida, M., Nagatsu, T. (1988) Migration of tetrahydroisoquinoline, a possible parkinsonian neurotoxin, into monkey brain from blood as proved by gas chromatography-mass spectrometry. *J Chromatogr.* 452, 85-91.
 115. Niwa, T., Yoshizumi, H., Tatematsu, A., Matsuura, A., Nagatsu, T. (1989) Presence of tetrahydroisoquinoline, a parkinsonism-related compound in foods. *J Chromatogr* 493, 347-352.
 116. Niwa, T., Takeda, N., Yoshizumi, H., Tatematsu, A., Yoshida, M., Dostert, P., Naoi, M., Nagatsu, T. (1991) Presence of 2-methyl-6,7-dihydroxy-1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline and 1,2-dimethyl-6,7-dihydroxy-1,2,3,4-

- tetrahydroisoquinoline, novel endogenous amines, in parkinsonian and normal human brains. *Biochem Biophys Res Commun* 177, 603-609.
117. O'Reilly, R. C., Frank, M. J. (2006) Making working memory work: a computational model of learning in the prefrontal cortex and basal ganglia. *Neural Comput* 18, 283-328.
 118. Ohta, S., Kohno, N., Makino, Y., Tachikawa, O., Hirobe, M. (1987) Tetrahydroisoquinoline and 1-methyl.tetrahydroisoquinoline are present in the human brain: Realtion to the Parkinson´s disease. *Biomed Res* 8, 453-456.
 119. Pelham, W.E., Waschbusch, D.A. (1999) Behavioral intervention in attention-deficit/hyperactivity disorder. In: Quay,H., Hogan, A.E. (eds) *Handbook of disruptive disorders*. Kluwer Academic, New York, 255-278.
 120. Pelham, W.E., Wheeler, T., Chronis, A. (1998) Empirically supported psychosocial treatments for attention deficit hyperactivity disorder. *J Clin Child Psychol* 27, 190-205.
 121. Pendelton, R.G., Rasheed, A., Roychowdhury, R., Hillman, R. (1998) A new role for catecholamines: ontogenesis. *Trends Physiol Sci* 19, 248-251.
 122. Pennington, B.F., Ozonoff, S. (1996) Executive functions and developmental psychopathology. *J Child Psychol Psychiatry* 37, 51-87.
 123. Petrides, P.E. (1988) Teil A: Stoffe und Stoffwechsel der Zelle. I. Stoffe: Bausteine der Zelle, Aminosäuren und Polyaminosäuren. In: *Physiologische Chemie*, Löffler G., Petrides, P.E., Springer Verlag, Berlin, 4. Auflage, 99-102.
 124. Pianezzola, E., Bellotti, V., Fontana, E., Moro, E., Gal, J., Desai, D.M. (1989) Determination of the enantiomeric composition of salsolinol in biological samples by high-performance liquid chromatograohy with electrochemical detection. *J Chromatogr.* 495, 205-214.
 125. Pliszka, S.R., Brone, R.G., Olvera, R.L., Wynne, S.K. (2000) A double blind, placebo-controlled study of Adderall and methylphenidate in the treatmetn of attention-deficit/hyperactivity disorder. *J Am Acd Child Adolesc Psychiatry* 39, 619-626.
 126. Pliszka, S.R. (2005) The neuropsychopharmacology of attention deficit/hyperactivity disorder. *Biol Psychiatry* 57, 1385-1390.
 127. Quay, H.C. (1993) The psychobiology of undersocialized aggressive conduct disorder: A theoretical perspective. *Dev Psychopathol* 5, 165-180.
 128. Raiteri, M., Del Carmine, R., Bertollini, A., Levi, G. (1977) Effect of sympathomimetic amines on the synaptosomal transport of noradrenaline, dopamine and 5-hydroxy-tryptamine. *Eur J Pharmacol* 41, 133-143.

129. Riggan, R.M., McCarthy, M.J., Kissinger, P.T. (1976) Identification of Salsolinol as a Major Dopamine Metabolite in Banana. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 24, 189-191.
130. Roeltgen, D.P., Schneider, J.S. (1991) Chronic low-dose MPTP in nonhuman primates: a possible model for attention deficit disorder. *J Child Neurol* 6 Suppl, 82-89.
131. Roessner, V., Manzke, T., Becker, A., Rothenberger, A., Bock, N. (2009) Development of 5-HT transporter density and long-term effects of methylphenidate in an animal model of ADHD. *World J Biol Psychiatry* 26, 1-5.
132. Rothenberger, A., Banaschewski, Siniatchkin, M. (2003) Tic-Störungen. In: *Entwicklungspsychiatrie*. Herpetz-Dahlmann, B, Resch, F., Schulte-Markwort, M. Warnke, A. Schattauer-Verlag, Stuttgart, 50-84.
133. Sagvolden, T., Johansen, E.B., Aase, H., Russell, V.A. (2005) A dynamic developmental theory of attention-deficit/hyperactivity disorder (ADHD) predominantly hyperactive/impulsive and combined subtypes. *Behav Brain Sci* 28, 397-419; discussion 419-368.
134. Satterfield, J.H., Schell, A. (1997) A prospective study of hyperactive boys with conduct problems and normal boys: adolescent and adult criminality. *J. Am Acad Child Adolesc Psychiatry* 36, 1726-1735.
135. 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* 41, 115-128.
136. Schachter, H.M., Pham, B., King, J., Langford, S., Moher, D. (2001) How efficacious and safe is the short-acting methylphenidate for the treatment of attention-deficit disorder in children and adolescents? *CMAJ* 165, 1475-1477.
137. Schnoll, R., Burshteyn, D., Cea-Aravena, J. (2003) Nutrition in the treatment of attentiondeficit hyperactivity disorder: a neglected but important aspect. *Appl Psychophysiol Biofeedback*, 28, 63-75.
138. Scholz, J., Klingemann, I., Moser, A. (2004) Increased systemic levels of norsalsolinol derivatives are induced by levodopa treatment and do not represent biological markers of Parkinson's disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 75, 634-636.
139. Sergeant, J. (2000) The cognitive-energetic model: an empirical approach to attention-deficit hyperactivity disorder. *Neurosci Biobehav rev* 24, 7-12.
140. Sevecke, K., Battel, S., Dittmann, R., Lehmkuhl, G., (2006) Döpfner, M. Wirksamkeit von Atomoxetin bei Kindern, Jugendlichen und Erwachsenen mit ADHS. *Nervenarzt* 77, 294-308.

141. Siebecker, F. (1999) Nachweis und Bedeutung von Salsolinol in Liquor und Urin von Patienten mit Morbus Parkinson. Inauguraldissertation zur Erlangung der Doktorwürde der Medizinischen Universität zu Lübeck, 29-31.
142. Smith, B.H., Waschbusch, D.A., Willoughby, M.T. (2000) Evans, S. The efficacy, safety, and practicability of treatments for adolescents with attention-deficit/hyperactivity disorder. *Clin Child Fam Psychol Rev* 3, 243-267.
143. Smith, K.M., Dalay, M., Fischer, M., Yiannoutsos, C.T., Bauer, L., Barkley, R., Navia, B.A. (2003) Association of the dopamine beta hydroxylase gene with attention deficit hyperactivity disorder: Genetic analysis of the Milwaukee longitudinal study. *Am J Med Genet* 119B, 77-85.
144. Sokol, M.S., Campbell, M., Goldstein, M., Kriechman, A.M. (1987) Attention deficit disorder with hyperactivity and the dopamine hypothesis : case presentations with theoretical background. *J.Am Acad Child Adolesc Psychiatry* 26(3), 428-33.
145. Solanto, M.V. (2002) Dopamine dysfunction in AD/HD: integrating clinical and basic neuroscience research. *Behav Brain Res* 130, 65-71.
146. Sonuga-Barke, E.J. (1994) On dysfunction and function in psychological theories of childhood disorder. *J Clin Child Psychol* 35, 801-815.
147. Songua-Barke, E.J. (2002) Psychological heterogeneity in AD/HD; a dual pathway model of behaviour and cognition. *Behav Brain Res* 130, 29-36.
148. Spencer, T., Biedermann, J., Coffey, B., Geller, D., Faraone, S., Wilens, T. (2001a) Tourette disorder and ADHD. *Adv Neurol* 85, 57-77.
149. Spencer, T., Biedermann, J., Heiligenstein, J., Wilens, T., Faries, D., Prince, J., Faraone, S.V., Rea, J., Witcher, J., Zervas, S. (2001b) An open-label, dose-ranging study of axomoxetine in children with attention-deficit/hyperactivity disorder. *J Child Adolesc Psychopharmacol* 11, 251-265.
150. Stevenson, J., (1992) Evidence for a genetic etiology in hyperactivity in children. *Behav Genet* 22(3), 337-44.
151. Strölin Benedetti, M., Belloti, V., Pianezoll, E., Moro, E., Carminati, P., Dostert, P. (1989a) Ratio of R and S enantiomers of salsolinol in food and human urine. *J Neural Transm* 77, 47-53.
152. Strölin Benedetti, M., Dostert, P., Carminati, P. (1989b) Influence of food intake on the enantiomeric composition of urinary salsolinol in man. *J Neural Transm* 78, 43-51.
153. Suzuki, K., Mizuno, Y., Yoshida, M. (1990) Effects of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP)-like compounds on mitochondrial respiration. *Adv Neurol* 53, 215-218.

154. Swanson, J.M., Sergeant, J.A., Taylor, E., Sonuga-Barke, E.J.S., Jensen, P.S., Cantwell, D.P. (1998) Attention-deficit hyperactivity disorder and hyperkinetic disorder. *Lancet* 351, 429-433.
155. Thümen, A., Behnecke, A., Qadri, F., Bauml, E., Behnecke, C.A., Moser, A. (2002) N-methylorsalsolinol, a putative dopaminergic neurotoxin, passes through the bloodbrain barrier in vivo. *Neuroreport*, 13, 25-28.
156. Tannock, R. (1998) Attention deficit hyperactivity disorder: advances in cognitive, neurobiological, and genetic research. *J Child Psychol Psychiatry* 39, 65-100.
157. Todd, R.D. (1992) Neural development is regulated by classical neurotransmitters: dopamine D2 receptor stimulation enhances neurite outgrowth. *Biol Psychiatry* 31, 794-807.
158. Vetulani, J., Antkiewicz-Michaluk, L., Nalepa, I., Sansone, M. (2003) A possible physiological role for cerebral tetrahydroisoquinolines. *Neurotox Res* 5(1-2), 147-155.
159. Vetulani, J., Nalepa, I., Antkiewicz-Michaluk, L., Sansone, M. (2001) Opposite effect of simple tetrahydroisoquinolines on amphetamine- and morphine-stimulated locomotor activity in mice. *J Neural Transm* 108 (5), 513-26.
160. Volkow, N.D., Wang, G., Fowler, J.S., Logan, J., Gerasimov, M., Maynard, L., Ding, Y., Gatley, S.J., Gifford, A., Franceschi, D. (2001) Therapeutic doses of oral methylphenidate significantly increase extracellular dopamine in the human brain. *J Neurosci* 21(2), RC 121.
161. Walters, J.R., Ruskin, D.N., Allers, K.A., Bergstrom, D.A. (2000) Pre- and postsynaptic aspects of dopamine-mediated transmission. *Trends Neurosci* 23, 41-47.
162. Watanabe, Y., Fujita, M., Ito, Y., Okada, T., Kusuoka, H., Nishimura, T. (1997) Brain dopamine transporter in spontaneously hypertensive rats. *J Nucl Med* 38, 470-474.
163. Weiss, G., Hechtman, L.T. (1993) *Hyperactive children grow up: ADHD in children, adolescents, and adults*, 2nd edn. Guilford, New York.
164. Williams, J. (2008) Working toward a neurobiological account of ADHD: commentary on Gail Tripp and Jeff Wickens, dopamine transfer deficit. *J Child Psychol Psychiatry* 49, 705-711; discussion 711.
165. Winterfeld, K.T., Teuchert-Noodt, G., Dawirs, R.R. (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* 52; 201-209.

166. Zametkin, A.J., Liebenauer, L.L., Fitzgerald, G.A., King, A.C., Minkunas, D.V., Herscovitch, P., Yamada, E.M., Cohen, R.M. (1993) Brain metabolism in teenagers with attention-deficit hyperactivity disorder. *Arch Gen Psychiatry* 50, 333-340.
167. Zametkin, A.J., Ernst, M., Silver, R. (1998) Laboratory and diagnostic testing in child and adolescent psychiatry: a review of the past 10 years. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry* 37, 464-472.
168. Zhang, L.X., Levine, S., Dent, G. et al.,: (2002) Maternal deprivation increases cell death in the infant rat brain. *Dev Brain Res* 133, 1-11.
169. <http://www.uni-bielefeld.de/psychologie/ae/AE09/HOMEPAGE/Wild/ADHSZusf.pdf>
20.03.2009

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich für die Unterstützung und die Hilfe bedanken, die zum Erstellen und Gelingen meiner Dissertation unerlässlich waren.

Ein besonderer Dank gilt Prof. Dr. A. Moser für die freundliche Überlassung des Themas sowie die wissenschaftliche Betreuung meiner Arbeit.

Auch möchte ich Prof. Dr. D. Kömpf als Direktor der Neurologischen Klinik für den zur Verfügung gestellten Arbeitsplatz danken.

PD Dr. V. Rössner aus Göttingen, Prof. Dr. Dipl.-Psych. S. Walitza aus Würzburg sowie Dr. F. Riederer aus Wien gilt mein Dank für die Rekrutierung sowohl von Patienten als auch von Kontrollprobanden und die anschließende Sammlung, Erstverarbeitung und Zusendung der Urinproben. Außerdem danke ich PD Dr. V. Rössner für die freundliche Hilfe per Telefon und Computer ebenso wie für das Korrekturlesen.

Dem Team des Labors für Liquordiagnostik und klinischer Neurochemie sei gedankt für die Unterstützung und Hilfe im Rahmen meiner Analysen.

Vielen Dank an Prof. Dr. K.-F. Klotz für die studienbegleitende Unterstützung und die hilfreichen Ratschläge.

Danke auch an meine ehemalige Doktorandenkollegin Caroline Korte für die zahlreichen Wochen(enden), die wir gemeinsam mit Messen und Pipettieren zugebracht haben.

Dr. E. Bäuml danke ich für die Versorgung mit N-Methyl-Norsalsolinol.

Einen Dank an Dipl.-Ing. Thomas Piskol, der zu jeder Zeit für die Lösung kleiner und großer Computerprobleme zur Verfügung stand.

Weiterhin möchte ich auch allen „externen“ Korrekturlesern danken, die durch ihre Anmerkungen sehr zur Verbesserung der Arbeit beigetragen haben. In diesem Zusammenhang auch einen Danke an Arne, ohne den es vermutlich keine so schönen Tabellen geben würde und an Marc, der zum Verständnis der Statistik einen großen Beitrag geleistet hat.

Mein ganz besonderer Dank gilt meiner Familie für die Unterstützung und Anteilnahme, ohne die es mir sicher nicht möglich gewesen wäre, diese Arbeit fertig zu stellen.

LEBENS LAUF

Katharina Gramm
Grindelberg 39, 20144 Hamburg
Tel.: 0173/6124440
Email: K.Gramm@web.de

Persönliche Daten

Geburtsdatum: 03.07.1980
Nationalität: deutsch
Familienstand: ledig

Bildungsweg

18.08.2008 Aufnahme der Berufstätigkeit als Assistenzärztin in der Abteilung für Anästhesiologie und operative Intensivmedizin in der Asklepios Klinik Harburg

seit Mai 2003: Anfertigung der Dissertation in der Neurologie unter Prof. Dr. A. Moser.

Oktober 2000 – 04.12.2007: Medizinstudium an der Universität zu Lübeck

04.12.2007: Bestehen der Ärztlichen Prüfung mit der Note 2,0

20.02.2006 – 29.04.2007: Ausübung des Praktischen Jahres

14.03.2003: Bestehen der Ärztlichen Vorprüfung mit der Note 1,66

Oktober 2000: Beginn des Medizinstudiums an der Universität zu Lübeck

Juli 2000: Erwerb der allgemeinen Hochschulreife (Note 1,4)

1991-2000: Gymnasium Meiendorf, Hamburg

1987-1991: Grundschule Berne, Hamburg
