

**Aus dem Lehrstuhl für Toxikologie
der Julius-Maximilians-Universität Würzburg
Kommissarische Leitung: Prof. Dr. Helga Stopper**

**Does methylphenidate cause a cytogenetic effect in children
with attention deficit hyperactivity disorder?**

**Zytogenetische Veränderung durch Methylphenidat bei Kin-
dern mit ADHS?**

**Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde der
Medizinischen Fakultät
der
Julius-Maximilians-Universität Würzburg**

**Vorgelegt von
Anne Kristina Kämpf
aus Frankfurt am Main**

Würzburg, Dezember 2012



Referent: Prof. Dr. Helga Stopper

Korreferent: Prof. Dr. Marcel Romanos

Dekan: Prof. Dr. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 11.06.2013

Die Promovendin ist Ärztin.

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abbildungsverzeichnis	III
Tabellenverzeichnis	VI
1 Einleitung	1
1.1 Aufmerksamkeitsdefizit- und Hyperaktivitätsstörung (ADHS)	1
1.1.1 Definition	1
1.1.2 Komorbiditäten	3
1.1.3 Epidemiologie	4
1.1.4 Diagnostik und Differentialdiagnose	4
1.1.5 Einteilung	6
1.1.6 Diagnostische Methoden	7
1.1.7 Ätiologie	9
1.1.8 Pathophysiologie	10
1.2 Therapie von ADHS	11
1.3 Methylphenidat	13
1.3.1 Historie	14
1.3.2 Missbrauch	15
1.3.3 Studienlage	16
1.3.4 Wichtige Nebenwirkungen	17
1.3.5 Wechselwirkungen mit anderen Medikamenten	18
1.3.6 Wirkung	19
1.3.7 Potentielle Mutagenität von Methylphenidat	24
1.3.7.1 In Patienten	24
1.3.7.2 In Gentoxizitätstests und Tiermodellen	24
2 Fragestellung der Arbeit	27
3 Material und Methoden	28
3.1 Material	28
3.1.1 Laborchemikalien und Verbrauchsmaterial	28
3.1.2 Arbeitsgeräte	28
3.1.3 Medien und Puffer	29
3.2 Methoden	30
3.2.1 Isolierung peripherer Lymphozyten aus heparinisiertem Vollblut	30
3.2.2 Mikrokernassay	31
3.2.2.1 Theoretische Grundlagen	31
3.2.2.2 Durchführung	33
3.3 Statistische Auswertung	35
3.4 Studiendesign	36
3.4.1 Probandenkollektiv	38
3.4.2 Patientengruppen und Entnahmezeitpunkte	39
3.4.2.1 Patientengruppe NEU	39
3.4.2.2 Dauermedikation (CHRON)	40
3.4.2.3 Gesunde Kontrollkinder (KK)	40
3.4.2.4 Positivkontrolle (PK)	40

3.4.2.5	NEU 4 doppelte Auswertung.....	40
4	Ergebnisse	42
4.1	Allgemein	42
4.2	Charakterisierung des Probandenkollektivs	43
4.2.1	Abkürzungen und Erklärung verwendeter Symbole.....	43
4.2.2	Statistische Extremwerte	43
4.2.3	Übersicht.....	44
4.2.4	Anmerkungen	45
4.2.4.1	Dauermedikation (CHRON).....	45
4.2.4.2	Gesunde Kontrollkinder (KK).....	47
4.2.4.3	NEU	47
4.2.4.4	NEU 4 doppelte Auswertung (1, 3 und 4).....	48
4.2.5	Übersicht aller in die Studie eingeschlossenen Kinder.....	49
4.3	Ergebnisse des Mikrokerntests	50
4.4	Weitere untersuchte Lymphozytenparameter	57
4.5	Vergleich der Mikrokernfrequenzen mit Kontrollpersonen	58
4.5.1	CHRON und KK	58
4.5.2	NEU zum Zeitpunkt 1-4 und KK	58
4.6	Vergleich der Mikrokernfrequenzen von ADHS- Kindern	59
4.6.1	NEU zum Zeitpunkt 1-4	59
4.6.2	CHRON und NEU zum Zeitpunkt 1.....	60
4.7	Mikrokernfrequenz und Geschlecht	60
4.8	Mikrokernfrequenz und Alter	63
4.9	Mikrokernfrequenz und Jahreszeit	66
4.10	Mikrokernfrequenzen und Raucherstatus	67
4.11	NEU 4 doppelte Auswertung (1, 3 und 4).....	70
4.12	Zusammenfassung	72
5	Diskussion.....	74
5.1	Allgemein	74
5.2	Qualität der erhobenen Daten / Vergleich mit Referenzwerten.....	75
5.3	Mikrokerntest.....	76
5.4	Einflussgrößen (Geschlecht, Alter, Jahreszeit, Raucherstatus)	78
5.5	Weitere untersuchte Lymphozytenparameter	83
5.6	Vergleich El-Zein	83
6	Zusammenfassung	88
7	Anhang.....	90
7.1	Statistische Auswertung ohne statistische Ausreißer	90
7.2	Statistische Auswertung 2 alle Daten inkl. statistische Ausreißer.....	93
8	Literaturverzeichnis	98
	Danksagung.....	107
	Lebenslauf	108

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Boxplot zur Mikrokern-Verteilung in der Gruppe der chronisch mit Methylphenidat therapierten Kinder mit einem offensichtlichen Ausreißer	46
Abbildung 2: Boxplot zur Mikrokern-Verteilung in der Gruppe der chronisch mit Methylphenidat therapierten Kinder nach Ausreißerbereinigung.....	46
Abbildung 3: Boxplot zur Mikrokern-Verteilung in der Gruppe der neu mit Methylphenidat therapierten Kinder nach zwölf Monaten (NEU 4) mit einem offensichtlichen Ausreißer.....	48
Abbildung 4: Mikrokern-Frequenzen aller Gruppen mit Mittelwert und Standardabweichung: Mikrokernfrequenzen von den gesunden Kontrollkindern und von Kindern mit ADHS nach chronischer Therapie mit Methylphenidat (23 Kinder), sowie vor Beginn der Methylphenidat-Therapie (27 Kinder) und zu 3 Zeitpunkten während der Therapie mit Methylphenidat (nach 3 Monaten 22 Kinder, nach 6 Monaten 17 Kinder, nach 12 Monaten 12 Kinder). Aufgeführt sind hier Gruppenmittelwerte mit Standardabweichung.....	51
Abbildung 5: Boxplots der Mikrokern-Frequenzen aller Gruppen	52
Abbildung 6: Mikrokern-Frequenzen aller Gruppen mit den jeweiligen Ausgangswerten in den NEU-Gruppen mit Mittelwert und Standardabweichung	53
Abbildung 7: Liniendiagramm mit Mikrokernfrequenzen von zwölf ADHS-Kindern über zwölf Monate. Entwicklung der Mikrokernfrequenzen bei Kindern mit ADHS, die neu mit Methylphenidat therapiert wurden, und über einen Zeitraum von einem Jahr beobachtet werden konnten (12 Kinder), sowie durchschnittliche Mikrokernfrequenzen einer gesunden Kontrollgruppe.....	54
Abbildung 8: Liniendiagramm mit Mikrokernfrequenzen von allen NEU-ADHS-Kindern über zwölf Monate. Durchschnittliche Mikrokernfrequenzen von Kindern vor der Therapie mit Methylphenidat (27 Kinder), nach 3 Monaten (22 Kinder), nach 6 Monaten, sowie nach 12 Monaten (13 Kinder)	54
Abbildung 9: Individuelle Mikrokern-Frequenzen von 22 neu mit Methylphenidat therapierten ADHS-Kindern zum Zeitpunkt 1 (vor Methylphenidat-Therapie) und 2 (nach drei Monaten Methylphenidat-Therapie)= Gruppe NEU mit vorher Werten	55
Abbildung 10: Individuelle Mikrokern-Frequenzen von 17 neu mit Methylphenidat therapierten ADHS-Kindern zum Zeitpunkt 1 (vor Methylphenidat-Therapie), 2 (nach drei Monaten Methylphenidat-Therapie) und 3 (nach sechs Monaten Methylphenidat-Therapie)= Gruppe NEU 3 mit vorher- Werten	56
Abbildung 11: Individuelle Mikrokern-Frequenzen von 12 neu mit Methylphenidat therapierten ADHS-Kindern zum Zeitpunkt 1 (vor Methylphenidat-Therapie), 2 (nach drei Monaten Methylphenidat-Therapie), 3 (nach sechs Monaten Methylphenidat-Therapie) und 4 (nach zwölf Monaten Methylphenidat-Therapie)= Gruppe NEU 4 mit Vorher- Werten.....	56
Abbildung 12: Verteilung des Geschlechts NEU zum Zeitpunkt 1 (vor Methylphenidat-Therapie) und gesunde Kontrollkinder.....	61
Abbildung 13: MK-Frequenzen aller nicht mit Methylphenidat therapierten Kinder: NEU zum Zeitpunkt 1 (vor Methylphenidat-Therapie), und gesunde Kontrollkinder mit Mittelwert und Standardabweichung.....	61

Abbildung 14: Boxplot der Mikrokern-Frequenzen aller nicht mit Methylphenidat therapierten Kinder: NEU zum Zeitpunkt 1 (vor Methylphenidat-Therapie), und gesunde Kontrollkinder	62
Abbildung 15: Mikrokern-Frequenzen nach Geschlecht aller Kinder (NEU: jedes Kind zu allen verfügbaren Zeitpunkten und damit bis zu 4mal vertreten) NEU zum Zeitpunkt 1 (vor Methylphenidat-Therapie), 3 (nach sechs Monaten Methylphenidat-Therapie) und 4 (nach zwölf Monaten Methylphenidat-Therapie), gesunde Kontrollkinder und chronisch mit Methylphenidat therapierte Kinder.....	62
Abbildung 16: Boxplot der Mikrokern-Frequenzen nach Geschlecht aller Kinder (NEU: jedes Kind zu allen verfügbaren Zeitpunkten und damit bis zu 4mal vertreten) NEU zum Zeitpunkt 1 (vor Methylphenidat-Therapie), 3 (nach sechs Monaten Methylphenidat-Therapie) und 4 (nach zwölf Monaten Methylphenidat-Therapie), gesunde Kontrollkinder und chronisch mit Methylphenidat therapierte Kinder	63
Abbildung 17: Verteilung des Alters aller nicht mit Methylphenidat therapierten Kinder: NEU zum Zeitpunkt 1 (vor Methylphenidat-Therapie), und gesunde Kontrollkinder...	64
Abbildung 18: Mikrokern-Frequenzen aller nicht mit Methylphenidat therapierten Kinder: NEU zum Zeitpunkt 1 (vor Methylphenidat-Therapie), und gesunde Kontrollkinder	65
Abbildung 19: Verteilung des Alters aller Kinder (NEU: jedes Kind zu allen verfügbaren Zeitpunkten und damit bis zu 4mal vertreten) NEU zum Zeitpunkt 1 (vor Methylphenidat-Therapie), 3 (nach sechs Monaten Methylphenidat-Therapie) und 4 (nach zwölf Monaten Methylphenidat-Therapie), gesunde Kontrollkinder und chronisch mit Methylphenidat therapierte Kinder.	65
Abbildung 20: Mikrokern-Frequenzen aller Kinder (NEU: jedes Kind zu allen verfügbaren Zeitpunkten und damit bis zu 4mal vertreten) NEU zum Zeitpunkt 1 (vor Methylphenidat-Therapie), 3 (nach sechs Monaten Methylphenidat-Therapie) und 4 (nach zwölf Monaten Methylphenidat-Therapie), gesunde Kontrollkinder und chronisch mit Methylphenidat therapierte Kinder	66
Abbildung 21: Verhältnis von Nichtrauchern zu Passivrauchern von neu mit Methylphenidat therapierten Kindern zum Zeitpunkt 1 (vor Methylphenidat-Therapie).	67
Abbildung 22: Verhältnis von Nichtrauchern zu Passivrauchern von chronisch mit Methylphenidat therapierten Kindern.....	68
Abbildung 23: Verhältnis von Nichtrauchern zu Passivrauchern von gesunden Kontrollkindern.	68
Abbildung 24: Säulendiagramm Mikrokern-Frequenzen (pro 1000 doppelkernige Zellen, absolut) von Nichtrauchern und Passivrauchern in den Gruppen: neu mit Methylphenidat therapierte Kinder zum Zeitpunkt 1 (vor Methylphenidat-Therapie), chronisch mit Methylphenidat therapierte Kinder, gesunde Kontrollkinder	69
Abbildung 25: Boxplots zu den Mikrokern-Frequenzen von Nichtrauchern und Passivrauchern in den Gruppen: neu mit Methylphenidat therapierte Kinder zum Zeitpunkt 1 (vor Methylphenidat-Therapie), chronisch mit Methylphenidat therapierte Kinder, gesunde Kontrollkinder	70
Abbildung 26: Boxplots der Mittelwerte aus zwei Objekträgern der Mikrokern von zwölf neu mit Methylphenidat therapierten Kindern zum Zeitpunkt 1 (vor Methylphenidat-Therapie), 3 (nach sechs Monaten Methylphenidat-Therapie) und 4 (nach zwölf Monaten Methylphenidat-Therapie).....	71

Abbildung 27 Charakterisierung des Probandenkollektivs von zwölf neu mit Methylphenidat therapierten Kindern: Mittelwerte aus zwei Objektträgern zum Zeitpunkt 1 (vor Methylphenidat-Therapie), 3 (nach sechs Monaten Methylphenidat-Therapie) und 4 (nach zwölf Monaten Methylphenidat-Therapie)..... 72

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Datengrundlage der Auswertungen	49
Tabelle 2: Datengrundlage der Auswertungen ohne statistische Ausreißer	50
Tabelle 3: Weitere untersuchte Lymphozytenparameter in % pro 1000 ausgezählte doppelkernige Lymphozyten mit Standardabweichung.....	57
Tabelle 4: Zusammenfassung statistische Testergebnisse (Signifikanz zum Niveau 5% grau hinterlegt).....	73

1 Einleitung

1.1 Aufmerksamkeitsdefizit- und Hyperaktivitätsstörung (ADHS)

Die Begriffe Hyperaktives oder Hypermotorisches Syndrom, attention deficit disorder (ADHD) und Hyperkinetisches Syndrom werden synonym verwendet (Pschyrembel and Dornblüth 2004).

Veraltet sind hingegen die Bezeichnungen Minimale Cerebrale Dysfunktion (MCD) und Psychoorganisches Syndrom (POS). International wird üblicherweise von Attention Deficit/Hyperactivity Disorder (ADHD) bzw. Attention Deficit Disorder (ADD) gesprochen. In dieser Arbeit soll die deutsche Abkürzung ADHS (Aufmerksamkeitsdefizit/Hyperaktivitätsstörung) verwendet werden.

1.1.1 Definition

Als Erstbeschreiber gilt Heinrich Hoffmann mit seinem 1845 erschienenen Buch „Lustige Geschichten und drollige Bilder für Kinder von 3-6 Jahre“, das bis heute eine Auflage von über 25 Millionen Exemplaren erreicht hat. Aus diesem erschien 1904 als Auszug die „Geschichte vom Zappel-Philipp“ im englischen Journal Lancet (Thome and Jacobs 2004). Die Symptome Unaufmerksamkeit, motorische Unruhe und Impulsivität definieren eine Gruppe von Störungsbildern, die gemäß ICD-10 und DSM-IV als hyperkinetische Störung (HKS) bzw. Aufmerksamkeitsdefizit/ Hyperaktivitätsstörung beschrieben werden (Deutsche Gesellschaft für Kinder- und Jugendpsychiatrie und Psychotherapie 2007). Kennzeichnende Symptome sind insbesondere eine Störung der Aufmerksamkeit mit Mangel an Ausdauer und der Tendenz, Dinge nicht zu Ende bringen zu können, des Weiteren unruhiges Verhalten, insbesondere mit Unfähigkeit still zu sitzen, und zuletzt eine nicht in den sozialen Kontext passende Impulsivität (Möller, Laux et al. 2009). Andere Störungen wie umschriebene Entwicklungsstörungen z.B. der Sprache oder des Lesens, Störungen des Sozialverhaltens sowie Tic-Störungen sind für

die Diagnose nicht von Bedeutung, tauchen jedoch im Zusammenhang mit ADHS überdurchschnittlich häufig auf (Remschmidt and Bundesärztekammer 2007). Zur Diagnostik werden weitere Informationen wie der Beginn der Erkrankung, sowie die Dauer des Bestehens von Symptomen und die Beurteilung der Situationen, in denen die Symptomatik auftaucht, berücksichtigt (Deutsche Gesellschaft für Kinder- und Jugendpsychiatrie und Psychotherapie 2007). Als hyperkinetisch wird ein Kind bezeichnet, das „eine für sein Alter inadäquate Aufmerksamkeit, ausgeprägte motorische Hyperaktivität, erhöhte Impulsivität, sowie emotional und sozial störende Verhaltensweisen wie erhöhte Erregbarkeit oder Irritierbarkeit aufweist“. (Pschyrembel and Dornblüth 2004)

Kinder mit ADHS sind äußerst unaufmerksam, ablenkbar, impulsiv und oft hyperaktiv, wobei die Symptome nicht dem Entwicklungsstand des Kindes entsprechen (Möller, Laux et al. 2009). Weitere häufig auftretende Auffälligkeiten im Rahmen dieser Störung sind eine geringe Frustrationstoleranz, ein häufiger Aktivitätswechsel, Probleme beim Organisieren sowie Tagträume. Die Symptome sind sehr beständig, müssen jedoch nicht in allen Situationen gleich stark ausgeprägt sein. Kinder, die vor allem unaufmerksam sind, haben eher in der Schule oder bei den Hausaufgaben, jedoch nicht beim Zusammensein mit Freunden oder in der Familie Probleme, während vornehmlich hyperaktive Kinder gute Schulleistungen erbringen können, jedoch vor allem zu Hause oder in wenig strukturierten Situationen problematisches Verhalten zeigen (Biederman and Faraone 2005). Lange Zeit wurde angenommen, dass sich ADHS quasi „auswachsen“ würde, und die Symptome mit Eintritt in die Pubertät verschwinden würden. Es scheint jedoch so zu sein, dass sich bei einem Großteil der Patienten, bei denen in der Kindheit ADHS diagnostiziert wurde, diese Symptome in unterschiedlicher Ausprägung auch im Erwachsenenalter zeigen (Barkley, Fischer et al. 2002). Einzelne Symptome können lange persistieren, wobei dies abhängig ist vom initialen Ausmaß der Funktionsstörungen zudem beeinflusst die Intaktheit der umgebenden sozialen Strukturen den Verlauf der Erkrankung, genau wie eventuell vorhandene Komorbiditäten (Mannuzza, Klein et al. 1998; Remschmidt and Bundesärztekammer 2007).

1.1.2 Komorbiditäten

Die Diagnose ADHS erhöht das Risiko für oppositionelle und Sozialverhaltensstörungen um mehr als das zehnfache (Mash and Barkley 2003). Aus Zwillingsstudien konnten Hinweise gewonnen werden, dass ADHS, oppositionelles Verhalten sowie Störungen des Sozialverhaltens eine gemeinsame genetische Grundlage besitzen können. Auch das soziale Netz und die familiären Strukturen stellen einen wichtigen Risikofaktor für diese Erkrankungen dar (Mash and Barkley 2003). Der ähnlichen Ätiologie entsprechend scheinen die häufigsten Komorbiditäten Störungen des Sozialverhaltens und oppositionelle Störungen zu sein (Remschmidt and Bundesärztekammer 2007), daraus resultierend bzw. eventuell auch als unabhängige Erkrankung kann es in bis zu 26% der Fälle zu einer Major-Depression kommen. Auch Angststörungen können bei 10-40% der Kinder diagnostiziert werden, das Risiko scheint bei Anwesenheit von ADHS dreifach zu sein.

Umgekehrt sind Erkrankungen wie Tic-Störungen und Tourette-Syndrom mit einem erhöhten Risiko (bis zu 48%) für ADHS behaftet (Mash and Barkley 2003). Auch für Patienten mit einer geistigen Behinderung oder autistischen Störungen ist eine Komorbidität mit ADHS beschrieben worden, zumindest profitieren diese Kinder auch von einem Behandlungsversuch mit den bei ADHS üblicherweise verwendeten Medikamenten (Aman, Armstrong et al. 2002). ADHS-Patienten, die unbehandelt bleiben, haben aufgrund ihres impulsiven Verhaltens, des negativen Selbstbildes, sowie der Neigung zur Selbstmedikation ein deutlich erhöhtes Suchtrisiko (Mannuzza, Klein et al. 1998; Wilens, Faraone et al. 2003; Remschmidt and Bundesärztekammer 2007). In Amerika konnte in Studien ein schädlicher Substanzgebrauch bei Patienten mit ADHS in 16% der bei 18-jährigen und 12-16% bei 26-jährigen dokumentiert. (Mannuzza, Klein et al. 1998). Hyperkinetische Kinder wiesen bis ins Erwachsenenalter vermehrt illegalen Drogenbesitz und drogenbezogene Probleme auf (Barkley, Fischer et al. 2004). Delinquente Verhaltensweisen wie soziale Regelübertretungen, Arrestierungen und antisoziale Persönlichkeiten werden bei Kindern mit ADHS vermehrt beobachtet (Mannuzza, Klein et al. 1998). Auch Risikoverhaltensweisen mit gesundheitlichen Folgen wie Knochenbrüchen, Kopfverletzungen, akzidentielle Vergiftungen und offene Hautverletzungen findet sich deutlich gehäuft bei Kindern, die an ADHS leiden (Barkley, Murphy et al. 1996;

Barkley 2003; Remschmidt and Bundesärztekammer 2007), zu passend haben hyperaktive Jugendliche ein erhöhtes Risiko für Verkehrsunfälle (Barkley, Murphy et al. 1996) und fahren deutlich unsicherer. Weitere Folgen der ADHS können verringerte akademische Leistung mit frühen Schulabbrüchen, sowie grundlegende Defizite in sozialen Anpassungsprozessen sein (Taylor 1999).

1.1.3 Epidemiologie

ADHS gehört zu den häufigsten Kinder- und jugendpsychiatrischen Erkrankungen. Die Krankheit beginnt meist vor dem 6. Lebensjahr, erreicht aber oft erst nach der Einschulung störende Ausmaße. Etwa 3% der Schulkinder in Deutschland sollen eine hyperkinetische Störung aufweisen. In unselektierten Populationen sind Jungen dreimal häufiger, in Klinikpopulationen sechs- bis neunmal häufiger betroffen als Mädchen (Möller, Laux et al. 2009). Vor dem sechsten Lebensjahr ist die Abgrenzung eines manifesten hyperaktiven Verhaltens von natürlicher, entwicklungsbedingter Unruhe nur sehr schwer einzuschätzen. In der Altersgruppen zwischen 4 und 17 Jahren ergibt sich in einer bevölkerungsbasierten Stichprobe, die mittels strukturierter oder semistrukturierter Interviews untersucht wurde, eine Prävalenz zwischen 2% und 7% bzw. 1% und 2%, wobei es hier eine Rolle spielt, welches diagnostische Klassifikationssystem man verwendet (DSM-IV oder ICD 10) (Barkley, Fischer et al. 2002). Bei etwa 40-80% aller Kinder mit der Diagnose ADHS persistieren die Symptome bis ins Erwachsenenalter, eine Remission von ADHS wird zu 60-70% beschrieben, was im Rückschluss bedeutet, dass rund 30% der Patienten bis ins Erwachsenenalter hinein die Diagnose ADHS aufweisen (Biederman 2004).

1.1.4 Diagnostik und Differentialdiagnose

Zur Diagnostik wird ein multiaxiales Vorgehen empfohlen, wobei man versucht die Störung auf den folgenden sechs „Achsen“ abzubilden:

Klinisch-psychiatrisches Syndrom, umschriebene Entwicklungsstörungen, Intelligenzniveau, körperliche Symptomatik, assoziierte aktuelle psychosoziale Umstände und globale Beurteilung des psychosozialen Funktionsniveaus (Remschmidt 2009). Die Diagnos-

tik richtet sich vor allem nach der Klinik und deren Verlauf. Dazu werden vor allem die Eltern des Kindes, die Patienten selbst sowie Lehrer oder Erzieher ausführlich befragt. Weiterhin sollen direkte Beobachtungen angestellt werden. Zur Objektivierung und Quantifizierung dienen Checklisten, Fragebogenverfahren und strukturierte oder semi-strukturierte Interviews (Deutsche Gesellschaft für Kinder- und Jugendpsychiatrie und Psychotherapie 2007). Die klinische Befragung soll zudem bei der Differentialdiagnose helfen, und sie ermöglicht die Erfassung verschiedener koexistenter Störungen. Bei bis zu 80% der Kinder mit gesichertem ADHS tritt mindestens noch eine weitere Störung auf (Jensen, Martin et al. 1997). Des Weiteren sind Intelligenz-, Leistungs- und Entwicklungstests Teil der Diagnostik, sowie eine begleitende internistische und neurologische Untersuchung. Spezifische körperliche Symptome von ADHS existieren nicht (Döpfner, Frölich et al. 2000). Entscheidend für die Diagnose ist außerdem, dass die Symptome den Patienten im Leistungs- und Sozialbereich deutlich einschränken, und nicht durch andere Umstände erklärt werden können, wie z.B. Medikamenteneinnahme, organische Primärstörungen, tiefgreifende Entwicklungsstörungen, ausgeprägten Intelligenzmangel und andere psychiatrische Krankheitsbilder. Ganz wichtig ist in diesem Zusammenhang zwischen hyperaktivem Verhalten und intellektueller Überforderung zu unterscheiden, sei es durch eine pathologische Intelligenzminderung bzw. komplexe geistige Behinderung oder durch Überforderung bei normal begabten Kindern, die z.B. eine für Ihre Fähigkeiten ungeeignete Schule besuchen. In diesen Fällen entwickeln sich die Symptome zeitgleich mit der inadäquaten Beschulung. (Döpfner, Frölich et al. 2000) Ganz wichtig ist auch der explizite Ausschluss des Vorliegens einer Psychose, hier z.B. einer manischen Episode einer bipolaren Störung, um die Diagnosestellung nicht zu verschleppen.

Eine der wichtigsten Komorbiditäten ist das Vorliegen von Störungen des Sozialverhaltens, z.B. in Form von oppositionellem oder aggressivem Verhalten. Dies stellt allerdings auch eine wichtige Differentialdiagnose dar, die es mithilfe präziser klinischer Diagnostik auszuschließen gilt. Erschwerend kommt hinzu, dass die Kernsymptome auch als völlig normale Erscheinungen in den Entwicklungsphasen des Vorschulalters auftreten und die Unterscheidung zwischen Variationen der Norm und Auffälligkeit Eltern und Lehrern daher oft sehr schwer fällt. Einzelne Symptome können bei bis zu

31 % der Jungen festgestellt werden. Die notwendige Anzahl der Kriterien für eine ADHS-Diagnose erreichen aber nur 6% aller Kinder (Döpfner, Frölich et al. 2000). Insgesamt ist es wichtig, eine hyperkinetische Störung bzw. ADHS nur dann zu diagnostizieren, wenn ein deutliches Missverhältnis des Verhaltens zu Entwicklungsalter und Intelligenz die Kinder beeinträchtigt. Es scheint auch Hinweise zu geben, dass die Schwerpunkte der Symptome geschlechtsbezogen variieren können (James and Taylor 1990). So wird z.B. aus den Praxen berichtet, dass gerade Mädchen und junge Frauen weniger als hyperaktive Störenfriede im Unterricht auffallen, sondern eher durch Träumereien und introvertierte Störungen der Aufmerksamkeit auffällig werden. Hierdurch kann gerade bei Mädchen die Diagnose oft verschleppt werden (Ryffel-Rawak 2004). Die Unterschiede in der Symptompräsentation können so gravierend sein, dass einzelne Experten fordern, man müsse die Diagnosekriterien abhängig von Geschlecht der Patienten angleichen, um damit beiden Geschlechtern gerecht zu werden und einer Über- oder Unterdiagnostizierung vorzubeugen (Taylor, Sergeant et al. 1998).

1.1.5 Einteilung

Zur Klassifikation Hyperkinetischer Störungen bzw. ADHS werden zwei unterschiedliche Systeme verwendet: das ICD-10 der World Health Organisation (WHO) (World Health Organization 1993), und das Klassifikationsschema nach DSM-IV der American Psychiatric Association (APA) (American Psychiatric Association and American Psychiatric Association. Task Force on DSM-IV 2005). In Europa sowie insbesondere in Deutschland wird am häufigsten die Einteilung nach ICD-10 der WHO vorgenommen, allerdings ist die Studienlage zum Klassifikationsschema nach DSM-IV umfangreicher.

Nach ICD-10 umfasst die Klassifikation hyperkinetischer Störungen die einfache Aktivitäts- und Aufmerksamkeitsstörung (F90.0), die hyperkinetische Störung des Sozialverhaltens (F90.1) und sonstige nicht näher bezeichnete Hyperkinetische Störungen (F90.8)

In der ICD-10 werden Forschungskriterien von klinischen Kriterien unterschieden. Die klinischen Kriterien beschränken sich darauf, dass Hyperaktivität, Impulsivität und Aufmerksamkeitsstörung in ausgeprägter Form vorliegen müssen. Gemäß den besser objek-

tivierbaren Forschungskriterien werden diese jeweiligen Kriterien nochmals unterteilt in Symptome.

Zur Diagnosestellung müssen sechs der neun Symptome von Unaufmerksamkeit (z.B. Sorgfaltsfehler bei Hausaufgaben, häufiges Verlieren von Arbeitswerkzeug), drei der vier Symptome von Überaktivität (z.B. Fuchteln mit den Händen, Unfähigkeit, ruhig zu sitzen), und eines der vier Symptome von Impulsivität (z.B. Unterbrechen und Stören von anderen, exzessives/ unangemessenes Reden) für mindestens sechs Monate in einem mit dem Entwicklungsstand des Kindes nicht zu vereinbarenden und unangemessenen Ausmaß vorliegen. Außerdem ist ein erkennbares Leiden bzw. eine Beeinträchtigung der sozialen und beruflichen Funktionsfähigkeit Voraussetzung. Es müssen die Symptome eindeutig sowie in abnormem Ausmaß, des Weiteren situationsübergreifend bzw. andauernd vorliegen. Im DSM-IV ist die Aufmerksamkeits-Hyperaktivitätsstörung (ADHS) etwas umfassender definiert als die Hyperkinetische Störung (HKS) in der ICD-10. Daraus resultiert eine höhere Prävalenz der Erkrankung bei Klassifikation nach DSM-IV. (American Psychiatric Association and American Psychiatric Association. Task Force on DSM-IV 2005). Es wird nicht unterschieden zwischen klinischen Kriterien und Forschungskriterien. Es erfolgt hier die Gliederung nach Punkt A1 (Unaufmerksamkeit) und A2 (Hyperaktivität und Impulsivität). Es müssen jeweils sechs der neun Kriterien aus einem Punkt erfüllt sein. Die Punkte B-E beschreiben weitere Bedingungen bezüglich der Beschaffenheit der Symptome (Döpfner and Lehmkuhl 1998).

1.1.6 Diagnostische Methoden

Die Diagnose einer Hyperkinetischen Störung ist immer eine klinische Diagnose. Je älter das Kind ist, desto mehr rückt es in den Vordergrund der Exploration, ansonsten hilft die Befragung der Bezugspersonen, der Lehrer, des Familienumfeldes bei der Einschätzung, da die Selbstauskunft immer kritisch hinterfragt werden muss. Die Fragen sollen abzielen auf Leitsymptome der Erkrankung, auf die Häufigkeit, die Intensität und den Kontext, in dem sie auftauchen. Außerdem soll sich der Untersucher einen Eindruck über das psychosoziale Umfeld, familiäre Belastungen, Entwicklungsauffälligkeiten sowie Komorbiditäten verschaffen. Als Hilfe können theoretisch hochstrukturierte Interviews zu den Diagnosekriterien eingesetzt werden (Schneider 2009). In der Praxis

werden jedoch eher semistrukturierte Explorationsschemata (Explorationsschema für hyperkinetische und oppositionelle Verhaltensstörungen ESHOV) (Döpfner, Frölich et al. 2000) bzw. sogenannte Diagnosechecklisten eingesetzt, so z.B. Diagnose Checkliste für Hyperkinetische Störungen (DCL-HKS) (Döpfner and Lehmkuhl 1998). Die Bewertung der Informationen bleibt jedoch Aufgabe des Untersuchers, vor allem vor dem Hintergrund, dass das Störungsbild eher durch ein Merkmalskontinuum mit geringeren und stärkeren Ausprägungen gekennzeichnet und keinesfalls eindeutig von Normvarianten abgrenzbar ist (Remschmidt 2009). Fragebögen erleichtern die klinische Exploration und helfen bei der Standardisierung. Sie existieren in verschiedenen Ausführungen (für die Eltern, das Kind, die Lehrer, Betreuer, Kindergärtner). Meist sind auch hier die Fremangaben besser verwertbar. Es eignen sich hierzu vor allem Fragebögen, die die ADHS-Symptomatik entsprechend ICD-10 bzw. DSM-IV überprüfen (Remschmidt and Bundesärztekammer 2007). In der Klinik für Kinder- und Jugendpsychiatrie der Universität Würzburg liegt hier z.B. der Fremdbeurteilungsbogen für Hyperkinetische Störungen (FBB-HKS) vor, in dem sowohl die Beurteilungen von Eltern als auch Lehrern berücksichtigt werden können (Döpfner and Lehmkuhl 1998). Ein Bogen zur Selbstbeurteilung kann etwa ab dem 11. Lebensjahr angewendet werden (Döpfner and Lehmkuhl 1998). Im englischsprachigen Raum sehr beliebt ist auch der Conners-Fragebogen oder seine Kurzform, der allerdings für Deutschland nur unzureichend normiert ist (Steinhausen and Blank 1995). Bei der 10 Items Conners-Kurzformvariante werden zehn Charaktermerkmale und ihre Ausprägungsstärke von 1-3 abgeschätzt, ein Summe ab 15 gilt als verdächtig für das Vorliegen einer hyperkinetischen Störung. Hier fehlt aber wie eben beschrieben die Normierung. Der Test kann jedoch die Einschätzung der Ärzte und Betreuer zum Behandlungserfolg in der Einstellungsphase einer medikamentösen Therapie gut unterstützen. Für Deutschland gibt es einige Conners-Langformen, die auch in verschiedenen Studien schon überprüft wurden (Huss, Iseler et al. 2001). Da die Diagnose ADHS klinisch gestellt wird, dienen neuropsychologische Tests eher der Erfassung und Umschreibung vorhandener Defizite, und können auch bei der Quantifizierung der klinischen Symptome hilfreich sein (Dulcan 1997). Vor allem das situationsgebundene auffällige Verhalten kann mit diesen Tests nicht nachgestellt werden, so dass zu viele Kinder fälschlicherweise als unauffällig eingeschätzt werden (Barkley 1991).

Auch wenn diese Tests nicht zur Diagnosestellung geeignet sind, können sie doch wertvolle Informationen über Aufmerksamkeits- und andere neuropsychologische Leistungen geben, die häufig auch therapierelevant sind.

1.1.7 Ätiologie

Man muss davon ausgehen, dass ADHS eine multifaktorielle Genese mit sowohl genetischen als auch exogenen Faktoren zugrunde liegt. In zahlreichen Familien-, Zwillings-, und Adoptionsstudien konnte gezeigt werden, dass genetische Faktoren vermutlich die wichtigste Rolle in der Ätiologie spielen (Levy, Hay et al. 1997; Faraone and Biederman 1998). Direkte Verwandte eines an ADHS erkrankten Patienten haben ein drei- bis fünf-fach erhöhtes Risiko, auch an ADHS zu erkranken oder unwissentlich bereits an ADHS erkrankt zu sein. Vermutlich sind unter anderem DNA-Polymorphismen in verschiedenen Genen für die Entstehung von ADHS mitverantwortlich. Zu den exogenen Risikofaktoren gehören unter anderem Toxine, hier vor allem pränatale Alkohol- und Nikotinexposition. Diese gelten sogar als eigenständige Risikofaktoren. Neue Studien zu Tabakrauch, Blei, PCBs (polychlorierten Biphenyle), Pestiziden, Quecksilber und Mangan verdichten die Hinweise auf neurotoxische Schädigungen, deren Symptomatik starke Ähnlichkeiten zum kindlichen ADHS aufzeigt. Neurotoxine müssen diesbezüglich zukünftig weitaus stärker als Risikofaktor berücksichtigt werden (Laucht and Schmidt 2004). Des Weiteren zählt man Schwangerschafts- und Geburtskomplikationen, ein erniedrigtes Geburtsgewicht, Infektionen und ZNS-Verletzungen zu den exogenen Risikofaktoren (Milberger, Biederman et al. 1997). Umgebungsfaktoren wie schwere Vernachlässigung, häusliche Gewalt und sehr ungünstige familiäre Bedingungen scheinen für die Entstehung von ADHS auch eine Rolle zu spielen. Vor allem für den Schweregrad der Störung und die mit der Erkrankung einhergehenden sozialen Beeinträchtigungen scheinen sie sogar entscheidend zu sein (Biederman, Faraone et al. 1996; Sandberg 2002). Viel diskutiert wird auch immer wieder der Zusammenhang zwischen sehr unruhigen bzw. an ADHS erkrankten Kindern und dem Fernsehkonsum, hier ist die Datenlage jedoch uneinheitlich und keine Kausalität nachgewiesen.

1.1.8 Pathophysiologie

Es gibt morphologische Korrelate im Gehirn Betroffener, es ist aber noch unklar, wie aus den bekannten Risikofaktoren die Veränderungen in der kindlichen Hirnentwicklung- und Morphologie entstehen können (Remschmidt and Bundesärztekammer 2007). Eine der ersten Entdeckungen in diesem Zusammenhang war eine zerebrale Volumensminderung bei einigen betroffenen Patienten. Hier wurde diskutiert, ob es sich dabei um eine Ursache für die ADHS-Symptomatik handeln kann, oder ob die Befunde als Folge der Erkrankung oder ihrer Therapie zu werten sind. Man geht heute davon aus, dass es sich dabei um frühe Abweichungen der Hirnentwicklung handelt, die nicht erst im Verlauf durch Stimulanzien oder ähnliches entstanden sind (Castellanos, Lee et al. 2002). Störungen im Dopamin-, Noradrenalin- sowie Serotonin-Haushalt scheinen auf unterschiedlichste Weise eine Rolle bei der Entstehung von ADHS zu spielen. Sicher von Bedeutung sind die Dopamin-Rezeptor-Gene DRD-4 und DRD-5 sowie das Dopamin-Transporter-Gen (Asherson 2004). Im DRD-4-Gen wird vermutlich ein postsynaptischer Dopamin-D-4-Rezeptor kodiert, der eine erniedrigte Sensitivität für Dopamin aufweist. Ein weiteres Gen (DAT1-10) wird verantwortlich gemacht für eine erhöhte präsynaptische Dichte des Dopamin-Rezeptors und dadurch erniedrigte Dopamin-Spiegel im synaptischen Spalt (Asherson 2004).

Interessanterweise sind die genannten Polymorphismen in der Bevölkerung weit verbreitet. Sie können das Risiko für das Auftreten von ADHS also nicht in vollem Umfang erklären, da sie nur für etwas weniger als 5% der Fälle verantwortlich zu sein scheinen. Dies bestärkt die Theorien einer multifaktoriellen Genese als Wechselwirkung von sowohl verschiedenen Genen als auch exogenen Faktoren (Kahn, Khoury et al. 2003). Es finden sich außerdem Anzeichen für strukturelle und funktionelle, rechtsseitig betonte Auffälligkeiten im Bereich des präfrontalen Kortex, des vorderen Gyrus cinguli, der Basalganglien (Castellanos, Lee et al. 2002), sowie striatofrontale Dysfunktionen. Kinder mit ADHS scheinen ein verändertes kognitives Profil aufzuweisen, das mit einem relativen Mangel bzw. einer Verzögerung in der Entwicklung des ventralen frontostrialen Regelkreis einhergeht (Durstun, Tottenham et al. 2003). Insgesamt deuten die bisherigen Ergebnisse darauf hin, dass es durch unterschiedliche Faktoren zur gestörten Entwicklung unterschiedlicher zentralnervöser Regelkreise kommt. Vor allem katecho-

laminerge Neurotransmittersysteme, die für die Impulskontrolle und die übergeordnete Steuerung von Motorik und Aufmerksamkeit zuständig sind, müssen hiervon betroffen sein. Als weiterer Faktor scheint klar zu sein, dass bei ADHS-Patienten die exekutive Funktion beeinträchtigt ist (Sergeant, Geurts et al. 2003). Hier finden sich deutlich schlechtere Leistungen in verschiedenen Funktionen, jedoch resultiert daraus kein ADHS-spezifisches Profil. Einige Merkmale sind jedoch charakteristisch, wie langsamere und variable Reaktionszeiten (Sergeant, Geurts et al. 2002), eine Störung der initialen Aufmerksamkeit (Brandeis, van Leeuwen et al. 1998), die Störung der Regulation des jeweiligen Aktivierungsniveaus (Kuntsi, Oosterlaan et al. 2001), Motivationsprobleme (Slusarek, Velling et al. 2001), eine gestörte Frustrationstoleranz bei Belohnungsaufschub (Sonuga-Barke 2002) und Einschränkungen des Arbeitsgedächtnisses (Castellanos and Tannock 2002). Auch nutritive Faktoren scheinen eine Rolle zu spielen: ein Mangel an ungesättigten Fettsäuren, an Eisen sowie an Zink scheint an der Verursachung der Symptomatik bei Kindern mit ADHS zumindest teilweise beteiligt zu sein. Die Gabe von Zink zusätzlich zu einer Therapie mit Methylphenidat führte in Studien zu einer signifikanten Verbesserung der Symptome, verglichen mit einer Gruppe, die lediglich mit Methylphenidat therapiert worden war (Akhondzadeh, Mohammadi et al. 2004).

1.2 Therapie von ADHS

Die Therapie des ADHS beinhaltet einen umfassenden Behandlungsplan, der sowohl nichtmedikamentöse Maßnahmen, wie psychologische, pädagogische und psychosoziale Interventionen, als auch die Option auf eine ergänzende Pharmakotherapie einschließen sollte (Biederman and Faraone 2005). Die Säulen bilden also Psychoedukation, Verhaltenstherapie und medikamentöse Therapie. Alle Maßnahmen können und sollen nach Möglichkeit ambulant durchgeführt werden (Möller, Laux et al. 2009). Die Behandlung sollte am besten in darauf spezialisierten Zentren unter Supervision eines Experten für ADHS eingeleitet werden, der die Diagnose in Übereinstimmung mit den DSM-IV-Kriterien bzw. den ICD-10-Richtlinien nach ausführlicher Anamnese und diagnostischer Beurteilung zu stellen hat. Sollte eine medikamentöse Therapie unumgänglich sein, ist

das Medikament der ersten Wahl Methylphenidat (MPH), welches auch mit Abstand am häufigsten verabreicht wird. Nach groben Schätzungen werden heutzutage in den USA und in Deutschland bereits etwa 1% aller Kinder mit MPH therapiert (Stopper, Walitza et al. 2008). Man geht davon aus, dass MPH vor allem über die Inhibition eines Dopamin-Transporters wirkt, obwohl der genaue Wirkmechanismus sehr komplex zu sein scheint und noch nicht vollständig geklärt ist (Stopper, Walitza et al. 2008). In verschiedenen Studien hat sich gezeigt, dass die Kombination von MPH mit psychosozialer Behandlung der alleinigen Behandlung mit MPH nicht überlegen war (Hechtman, Abikoff et al. 2004). Dennoch handelt es sich bei der Pharmakotherapie um einen Eingriff in komplexe neuronale Prozesse, der trotz der guten Datenlage zur Wirksamkeit niemals leichtfertig beschlossen werden sollte, zumal einige Patienten auch erheblich unter den Nebenwirkungen der Therapie leiden. Die meisten Studien liegen zu MPH vor, doch gibt es auch Belege für die signifikante Wirkung von Amphetaminen und Pemolin sowie für Atomoxetin bei Kindern mit ADHS (Gerlach 2004). Auch trizyklische Antidepressiva scheinen wirksamer zu sein als Placebo. Bei der Pharmakotherapie verwendete Präparate lassen sich in Stimulanzien und Nicht-Stimulanzien gliedern. Zu den Stimulanzien zählen: Concerta, Equasym Retard, Medikinet Retard, Ritalin (alle auf MPH-Basis), Adderall XR (4 Amphetaminsalze). Zu den Nichtstimulanzien rechnet man z.B. Strattera (Atomoxetin, selektiver Noradrenalin-Reuptake-Hemmer). Solange die Stimulanzientherapie erfolgt, vermindern sich die Aufmerksamkeitsstörungen, Hyperaktivität, und auch das überaktive Verhalten. Die überlegene Wirkung der Stimulanzientherapie bleibt gemäß Ergebnissen von Verlaufstudien, die über einen Zeitraum bis zu 5 Jahren reichen, erhalten, sofern die Medikation kontinuierlich fortgesetzt wird. Es gibt Hinweise, dass auch nach Absetzen des Medikamentes die symptomreduzierende Wirkung weiter anhalten könnte, allerdings deutlich abgeschwächt. Stimulanzien stellen aufgrund ihrer in zahlreichen Studien belegten signifikanten Wirksamkeit die Medikamente der ersten Wahl dar, während Atomoxetin Medikament der zweiten Wahl ist (Gerlach 2004). Alle anderen Präparate, wie Amphetamin oder Pemolin gelten als Medikamente der dritten Wahl und sollten nur angewendet werden, wenn die Gabe von Medikamenten der ersten Wahl kontraindiziert ist, oder sie nicht den erwünschten Erfolg bringen (Schulte-Markwort and Huss 2004). Die Indikation zur medikamentösen Therapie ist

bei gesicherter Diagnose nach ICD-10- oder DMS-IV-Kriterien gegeben, bei ausgeprägter Symptomatik und wenn nichtmedikamentöse Therapieansätze die Symptomatik nicht mildern konnten. Die Dauer der Medikation muss individuell auf die Patienten abgestimmt werden, allerdings sollten innerhalb von 6 Wochen nach Therapiebeginn erste positive Wirkungen zu beobachten sein. Ansonsten muss die Diagnose, die Compliance und die Dosierung überprüft und gegebenenfalls korrigiert werden. Auch Therapieversagen unter optimaler Einstellung ist möglich (Schulte-Markwort and Huss 2004). Unter den Nichtstimulanzien ist Atomoxetin die am besten untersuchte Substanz mit guter Evidenzlage. Das Nebenwirkungsprofil erscheint zusätzlich recht günstig zu sein, es gilt jedoch die Leberfunktion engmaschig zu überwachen, da es in Einzelfällen zu reversiblen Erhöhungen der Leberwerte gekommen ist (Banaschewski, Roessner et al. 2004). Trizyklische Antidepressiva haben sich ebenfalls in der Behandlung von ADHS als wirksam erwiesen. In Studien konnten für Imipramin und Desipramin positive Effekte gezeigt werden. Auch hier ist aufgrund des Nebenwirkungsprofil eine engmaschige Kontrolle zu empfehlen (Spencer, Biederman et al. 2002). Clonidin kann zum Einsatz kommen, wenn die Medikamente erster Wahl sich als unwirksam erwiesen haben oder kontraindiziert sind. Auch hier gilt es die häufigen Nebenwirkungen wie Sedierung, Benommenheit und Depression gut zu überwachen und Kontraindikationen wie eingeschränkte Nierenfunktion gut zu überprüfen. Auch das Beenden der Therapie erfordert hier im Gegensatz zur Therapie mit MPH engmaschige Überwachung und sollte ausschleichend erfolgen (Taylor, Dopfner et al. 2004).

1.3 Methylphenidat

Methylphenidat (MPH) unterliegt der Betäubungsmittel-Verschreibungsverordnung (BtMVV) und stellt nach wie vor das wichtigste Therapeutikum zur medikamentösen Therapie des ADHS dar (Janhsen 2007). Es gehört in die pharmakologische Gruppe der Psychostimulanzien, wie z.B. auch Coffein oder Theophyllin. Diese Substanzengruppe stimuliert die menschliche Psyche, im Sinne erhöhter Wachheit, vermindertem Schlafbedürfnis sowie gesteigerter Konzentrationsfähigkeit, und wird daher auch als Psychoanaleptikum oder Psychotonikum bezeichnet. Die Wirkung fällt stärker aus bei erschöpf-

ten Personen als bei wachen Personen (Kuschinsky, Lüllmann et al. 1993). Neben dem ADHS als häufigstem Rezeptionsgrund dient MPH auch der Therapie der Narkolepsie. Die Wirksamkeit des MPHs in der Behandlung von ADHS wurde in zahlreichen unabhängigen Studien an über 5000 Patienten belegt. Es gibt keine andere psychische Störung, deren Medikation hinsichtlich Qualität und Risiken ähnlich gut untersucht ist (Group 1999; Group 2004). Das Bundesinstitut für Arzneimittel und Medizinprodukte (BfArM) hat mit Wirkung zum 1. September 2009 die Zulassung von Arzneimitteln mit dem Wirkstoff MPH geändert. Dies könnte ein wichtiger Beitrag zum Abbau von Über- und Fehlversorgung mit MPH bei Kindern und Jugendlichen sein. Das BfArM setzte mit seinem Bescheid vom 22. Juni 2009 eine entsprechende Entscheidung der Europäischen Kommission vom 27. Mai 2009 um, welche auf dem wissenschaftlichen Gutachten des Ausschusses für Humanarzneimittel (CHMP) der Europäischen Arzneimittelagentur basiert. In Übereinstimmung mit den gängigen Leitlinien sind die evidenzbasierten nicht-medikamentösen Behandlungsverfahren den betroffenen Kindern und Jugendlichen auch tatsächlich als Therapiemethoden der ersten Wahl zur Verfügung zu stellen (Atkinson and Hollis 2010).

Eine Behandlung des ADHS im Erwachsenenalter wie in anderen Ländern ist in Deutschland noch nicht möglich, da kein Präparat mit dem Wirkstoff MPH zur Behandlung dieser Indikation zugelassen ist. Die Therapie muss also bis jetzt durch einen off label use erfolgen.

1.3.1 Historie

Die zentrale Wirkung des Methylphenidats wurde erst sehr spät und eher zufällig entdeckt. Erst 1954 wurde es unter dem Marktnamen Ritalin – hergeleitet vom Vornamen der Ehefrau des Chemikers Panizzon – als mildes Psychostimulans auf den Markt gebracht.

Bezüglich des Missbrauches können verschiedene Formen unterschieden werden: einerseits die unsachgemäße Einnahme eines regelrecht rezeptierten Präparates bei an ADHS erkrankten Personen, z.B. in zu hohen Dosen. Andererseits die Einnahme von Stimulanzien bei gesunden Personen zur mentalen Leistungssteigerung. Zuletzt kann der Missbrauch der Stimulanzien auf die unerwünschten Arzneimittelwirkungen, wie z.B. den

Appetitverlust, abzielen (Wilens, Gignac et al. 2006). Als „Mathepille“ wurde MPH in den 50er Jahren bekannt, doch den heutigen therapeutischen Hauptnutzen, nämlich die Linderung der ADHS-Symptome, erkannte man damals noch nicht (Conners 2002). Die Eigenschaften von MPH machte man sich auch während des 2. Weltkrieges zu Nutze, wo ein nicht unerheblicher Prozentsatz der amerikanischen Soldaten, insbesondere der Piloten, regelmäßig Amphetamine einnahmen (Schulte-Markwort and Huss 2004).

1.3.2 Missbrauch

Methylphenidat kann zwar als Stimulanz missbräuchlich verwendet werden, durch seine vergleichsweise schwache Wirkung besitzt es jedoch in der Drogenszene eine eher geringe Bedeutung. Gestampft lassen sich die Tabletten entweder schnüffeln, oder in Lösung bringen und intravenös spritzen. Hier wird über massive Gesundheitsgefährdungen durch Embolien bei nicht gut aufgelösten Tabletten oder durch Wirkungen der Zusatzstoffe in den Tabletten berichtet. Toleranzentwicklung, Craving, Beschaffungskriminalität und Entzugserscheinungen als Ausdruck einer echten Abhängigkeit werden für MPH nicht beschrieben (Renschmidt and Bundesärztekammer 2007). Gerade in den letzten Jahren wird jedoch über massiv ansteigende Missbrauchsfälle unter gesunden Schülern und Studenten berichtet, die verschiedene Stimulanzien zum „Hirn-Doping“ missbrauchen. Die Lebenszeitprävalenz für den nichtmedizinischen Gebrauch von verschreibungspflichtigen Substanzen an 10904 zufällig ausgewählten Collegestudenten lag bei 6,9% (McCabe, Teter et al. 2005). Eine internationale Umfrage unter 1400 Nature-Lesern hat gezeigt, dass 12% in regelmäßigen Abständen MPH konsumierten, um ihre intellektuellen Leistungen zu verbessern (Maher 2008). Eine systematische Analyse der Missbrauchsfälle von in den USA zur Behandlung von ADHS verschriebenen Psychostimulanzien (MPH und Amphetamin), hat gezeigt dass 5-9% der Jugendlichen und 5-35% der jungen Erwachsenen im Laufe des Jahres diese Medikamente missbräuchlich angewendet hatten. Außerdem waren 16-29% der Studenten/Schüler, deren ADHS medikamentös behandelt wurde, zum illegalen Handel (Abgabe, Verkauf und Tausch) aufgefordert worden (Wilens, Adler et al. 2008). Allerdings handelte es sich bei den verwendeten Präparaten fast ausschließlich um Stimulanzien mit schneller Freisetzung, was den Verdacht nahelegt, dass das Missbrauchspotential von Retard-Präparaten geringer

ausfällt. Bei Patienten mit bekanntem Substanzmissbrauch sollten daher Retard-Präparate bevorzugt werden. Auch die steigende Anzahl an Verschreibungen und Erstdiagnosen im Adoleszentenalter kann Hinweis auf eine zunehmende Bereitschaft zur Optimierung der kognitiven Eigenleistung durch anregende und verschreibungspflichtige Substanzen sein (Weyandt, Janusis et al. 2009). Andere Studien assoziieren das kontinuierlich steigende Verordnungsvolumen von MPH, z.B. von 2 Mio. Tagesdosen im Jahre 1995 auf 20 Mio. Tagesdosen im Jahre 2003, mit einer lange praktizierten Unterversorgung, die sich inzwischen an den internationalen Trend angeglichen hat (Schwabe and Paffrath 2010).

1.3.3 Studienlage

Erst als schließlich in den 60er Jahren die endgültige Definition des Krankheitsbildes ADHS als Störung von Aufmerksamkeit, Impulsivität und Motorik erarbeitet wurde, konnten kontrollierte Studien an den nun diagnostizierten Patienten durchgeführt werden, die belegten, dass sowohl die kognitiven Symptome, als auch die Verhaltensauffälligkeiten positiv beeinflusst werden konnten (Conners 1967). Diese Effekte scheinen dosis- und situationsunabhängig zu sein, und konnten bis heute in zahlreichen Studien gesichert werden. Metaanalysen, die sich mit dem Effekt der Behandlung mit MPH befassten, konnten bei einer durchschnittlichen Behandlungsdauer von 3,3 Wochen einen signifikanten Effekt der Therapie nachweisen. Überprüft wurde der Effekt mithilfe des Conners-Index in einer Analyse von 62 Studien mit insgesamt 2897 Patienten mit ADHS, wobei zur Einschätzung Eltern (Effektstärke 0,78) sowie Lehrer (Effektstärke 0,54) befragt wurden (Schachter, Pham et al. 2001). Die Rate der Kinder, die in der geschilderten Weise auf MPH ansprechen, scheint bei etwa 70% zu liegen.

Damit gehört MPH zu den wenigen Medikamenten, zu deren Anwendung in Medizin und in der Kinder- und Jugendpsychiatrie mehr als 40 Jahre Erfahrung vorliegen, was im Vergleich mit zahlreichen neueren Medikamenten eine unglaublich lange Zeitspanne der Beobachtung ist (Schulte-Markwort and Huss 2004). Dennoch darf gerade bei Medikamenten mit einer derart langen Zulassungszeit nicht vergessen werden, dass zum Zeitpunkt der Zulassung die Zulassungsbeschränkungen im Vergleich zu heutigen Verfahren nicht annähernd so streng waren, und die wissenschaftlichen Möglichkeiten der

Austestung neuer Substanzen begrenzt waren. Es ist daher wichtig, auch so vermeintlich sichere Medikamente ständig unter dem neuesten Stand der Technik zu begutachten und auszutesten.

So konnten z.B. erst in den 80er Jahren des vorigen Jahrhunderts Angaben zur Pharmakokinetik des Medikamentes gemacht werden, da es zuvor keine ausreichend sensiblen analytischen Methoden gab, um die niedrigen Serumkonzentrationen von MPH zu messen (Greenhill and Osman 2000). Auch unerwünschte Arzneimittelwirkungen wurden zur Zeit der Einführung der Stimulanzien weniger streng überwacht. Bei der Entwicklung eines weiteren zur Therapie des ADHS eingesetzten Nichtstimulanz, dem Stattera (Atomexitin), einem selektiven Noradrenalin-Wiederaufnahmehemmer, erfolgte eine strengere Überwachung der unerwünschten Arzneimittelwirkungen, so dass hier einige seltene unerwünschte Ereignisse gemeldet wurden, die durchaus auch bei Stimulanzientherapie gehäuft auftreten könnten (Taylor, Dopfner et al. 2004).

1.3.4 Wichtige Nebenwirkungen

Die sorgfältige und regelgerechte Medikation von Methylphenidat und Amphetaminen hat bei Patienten mit ADHS nach bisherigem Kenntnisstand keine schädlichen unerwünschten Wirkungen (Remschmidt and Bundesärztekammer 2007).

Die unerwünschten Wirkungen sind dosisabhängig, treten meist nur vorübergehend zu Beginn der Behandlung auf; in jedem Fall sind sie nach Absetzen der Substanz reversibel. Lebensbedrohliche unerwünschte Wirkungen sind bislang nicht berichtet worden. An unerwünschten Wirkungen der Stimulanzientherapie sind insbesondere abdominelle Beschwerden, Kopfschmerzen, Schlafstörungen, Inappetenz und Gewichtsverlust sowie klinisch nicht relevante Puls- und Blutdruckerhöhung bekannt geworden (Warnke & Walitza, 2004). Oft berichten die Kinder bzw. deren Eltern auch über ein Gefühl der inneren Gereiztheit und der inneren Unruhe. Weitere unerwünschte Nebenwirkungen wie Übelkeit, Schwindel und Schlafstörungen sind eher selten bis sehr selten (selten = 1 bis 10 Behandelte von 10.000, sehr selten: weniger als 1 Behandler von 10.000) (Jerome 2001; Remschmidt and Bundesärztekammer 2007). Mögliche Nebenwirkungen einer Überdosierung von MPH können psychotische Symptome sowie Weinerlichkeit bzw. depressive Verstimmung sein. MPH scheint auch eine vorbestehende Tic-

Erkrankung beeinflussen zu können, und zwar im Sinne einer Verstärkung wie auch einer Milderung der Symptome. Als mögliche Langzeitfolgen einer Stimulanzienbehandlung wurden eine Minderung des Körperwachstums sowie die Entwicklung von Suchterkrankungen und eines Parkinson-Syndroms diskutiert. Hierzu lässt sich aus den bisher zugänglichen Studien ableiten, dass bei einigen Kindern unter MPH eine mäßige und wahrscheinlich vorübergehende Verlangsamung des Wachstums zu erwarten ist (Schulte-Markwort and Huss 2004). Während die appetitzügelnde Wirkung der Stimulanzien nachgewiesen ist, und daher auch eine erwünschte oder unerwünschte Gewichtsreduktion durch diese Medikamente möglich ist, ist der Einfluss von z.B. einer Langzeittherapie mit MPH bei Kindern auf deren Endgröße nicht endgültig geklärt (Damiani and Casella 2010). Natürlich kann durch den gedrosselten Appetit in Extremfällen eine Unterernährung bzw. ein Nährstoffmangel mit Auswirkungen auf das Wachstum resultieren. Daher sind engmaschige Kontrollen von Körpergröße und Körpergewicht unter der Therapie notwendig (Holtkamp, Peters-Wallraf et al. 2002; Lisska and Rivkees 2003). Die Sorge eines erhöhten Risikos von späterem Drogenmissbrauch nach Stimulanzienbehandlung im Kindes- oder Jugendalter ist mittlerweile widerlegt (Wilens, Faraone et al. 2003). Vermutlich vermindert die Behandlung sogar das Risiko eines späteren Konsums von Tabak, Alkohol oder illegalen Drogen. Die Gründe dafür können nur vermutet werden, so scheint eine Reduktion der ADHS-Symptome und deren Konsequenzen (Schulprobleme, niedrigere Abschlüsse trotz guten Intellektes, soziale Stigmatisierung) auch zu einer Reduktion der Ursachen für einen Substanzmissbrauch zu führen. Andere Faktoren könnten der sozioökonomische Hintergrund der Familien sein, die Kinder mit ADHS-Symptomen therapieren lassen, da vermutet wird, dass eher Kinder aus intaktem Umfeld mit fürsorglichen Eltern einer Diagnostik und Therapie zugeführt werden (Wilens, Faraone et al. 2003).

1.3.5 Wechselwirkungen mit anderen Medikamenten

Methylphenidat kann die Wirkung aller Sympathomimetika verstärken.

Da MPH den Abbau von Antikoagulanzen des Cumarintyps, Antiepileptika (z.B. Phenobarbital, Phenytoin, Primidon), Neuroleptika und trizyklischen Antidepressiva (z.B. Imipramin, Desipramin) sowie Phenylbutazon im Organismus hemmt, muss deren Dosis

bei gemeinsamer Gabe reduziert werden, um Wechselwirkungen wie z.B. Verwirrtheit, Agitiertheit, Stimmungslabilität, Gereiztheit und Labilität vorzubeugen (Remschmidt and Bundesärztekammer 2007).

1.3.6 Wirkung

MPH ist ein Stimulans des zentralen Nervensystems, welches deutlichere Wirkung auf die mentale als auf die motorische Aktivität hat. MPH scheint in eine gestörte dopaminerge, noradrenerge und serotenerge Neurotransmission regulierend eingreifen zu können (Schulte-Markwort and Huss 2004). Seine Indikation für die Behandlung der hyperkinetischen Störung sowie anderer Formen des ADHS ist sehr gut etabliert, und wurde von EUNETHYDIS für *European Child and Adolescent Psychiatrie* evaluiert (Taylor, Dopfner et al. 2004). Die Substanz ist in den meisten Teilen Europas als Teil eines umfassenden Behandlungsprogramms bei Kindern (ab 6 Jahren) und Jugendlichen zugelassen, wenn sich nicht-medikamentöse Behandlungsmaßnahmen alleine als unzureichend erweisen (Banaschewski, Coghill et al. 2008). Man unterscheidet die vier Präparate Ritalin (Novartis), Equasym (UCB), Concerta (Jansen-Cilag) und Medikinet Retard (Medice), welche alle eine Mischung aus schnell und verzögert abgegebenem MPH enthalten. Die verschiedenen Präparate unterscheiden sich in ihrer Galenik sowie im Anteil der schnell freigesetzten Komponenten (Banaschewski, Coghill et al. 2008). Bei Schulkindern liegt die tägliche Dosis von MPH in der Regel zwischen 0,3 bis 1mg/kg Körpergewicht pro Tag, verteilt auf 1-3 Einzeldosen. Die Maximaldosis von 1mg/kg Körpergewicht sollte nicht überschritten werden, da mit steigender Dosierung auch das Risiko erheblicher Nebenwirkungen stark zunimmt. Bei Erwachsenen muss man davon ausgehen, dass gerade sehr hohe Dosen die beste Wirksamkeit aufweisen (Faraone, Spencer et al. 2004). Die Zeitpunkte der Medikation werden so gewählt, dass das Kind die Tagesanforderungen (Schule, Hausaufgaben, Freizeit) bewältigen kann, meist wird dazu mit einer Dosierung von etwa 5mg/Tag begonnen. Für den Therapieerfolg entscheidend ist eine ausreichende Dosierung, verteilt auf zwei bis drei Einzeldosen, sowie eine kontinuierliche Beratung und Therapieüberwachung (Group 1999). Die Therapie sollte mindestens über den Zeitraum eines Jahres konsequent durchgeführt und überwacht werden. Therapiepausen an Feiertagen, Wochenenden oder in der Ferienzeit kön-

nen unter bestimmten Bedingungen sinnvoll sein, z.B. in Fällen, in denen sich die Symptomatik am ausgeprägtesten in der Schule zeigt. Bei fraglicher Indikation können auch Auslassversuche zur Überprüfung der Diagnose und der weiteren Indikation eingesetzt werden. Wenn die Symptomatik in einem den Alltag beeinträchtigenden Ausmaß weiter persistiert, so ist eine mehrjährige kontinuierliche Therapie bis ins Erwachsenenalter hinein indiziert. Beim MPH ist der Wirkungseintritt nach etwa einer halben Stunde für die Dauer von etwa vier Stunden zu erwarten. Die höchste Serumkonzentration wird etwa nach 1,5h erreicht, man geht bei Kindern und Jugendlichen von einer Halbwertszeit von etwas unter drei Stunden aus (Swanson and Volkow 2002) und daher auch von einer relativ raschen Passage der Blut-Hirn-Schranke. Dies spiegelt sich auch wieder im klinischen Verlauf der Symptomatik nach Stimulanzieinnahme: schneller Wirkeintritt mit guter Wirkung in den ersten Schulstunden; oft reicht die morgendliche Dosis dann nicht mehr aus für die Hausaufgaben am Nachmittag. Durch gezielte Koordination mit der Nahrungseinnahme können einerseits Resorption und Bioverfügbarkeit noch optimiert werden, andererseits kann versucht werden, auf die Nebenwirkung Gewichtsverlust durch Appetitlosigkeit Einfluss zu nehmen (Chan, Swanson et al. 1983). Retardformen, (z.B. Ritalin LA, Medikinet retard) geben MPH zunächst rasch, und später verzögert frei, so dass die Wirkung bei einmaliger morgendlicher Gabe zwischen 6 und 12 Stunden andauert. Sie sind momentan noch wesentlich teurer als schnell freisetzende Präparate. Ihre Indikation ist gegeben, wenn z.B. durch schlechte Compliance eine verlässliche Mehrfachgabe nicht gegeben ist, oder wenn trotz guter Compliance kein stabiler Tagesverlauf erreicht werden kann (Gerlach 2004). Die verzögerte Freisetzung wird erreicht durch eine besondere Galenik dieser Präparate, die aus einer äußeren magensaftlöslichen Hülle bestehen, und im Inneren den Wirkstoff in einer hydrokolloiden Polymatrix verpackt nur verzögert freigeben (z.B. Concerta). Damit entspricht die Bioverfügbarkeit etwa drei Tabletten herkömmlichem MPH (Schulte-Markwort and Huss 2004). Die Ausscheidung von MPH erfolgt zu 90% mit dem Urin, zu geringem Anteil auch mit dem Fäzes. Paradoxe Weise hat MPH im Tierversuch dosisabhängig auch entgegengesetzte Wirkungen (Berzewski and Riederer 1993). Bei Nagetieren kommt es bei niedriger Dosierung eher zu einer verstärkten motorischen Aktivierung, während bei höherer Dosierung die Neugierde und motorische Spontanbewegungen eher abnehmen,

dafür aber stereotype Bewegungsmuster eher zunehmen. Diese Wirkungen müssen jedoch immer im Gesamtkontext gesehen werden, sowohl Faktoren wie Alter, Geschlecht, Art der Haltung, Nahrungszug etc. spielten eine Rolle. Dafür werden Ratten verwendet, die durch genetische Manipulationen einen erhöhten Bluthochdruck aufweisen. Sie werden zur Simulation metabolischer Grunderkrankungen beim Menschen und den assoziierten kardiovaskulären Risiken verwendet. Außerdem sind sie umgebungsabhängig motorisch hyperaktiv, schlechter im Erlernen komplexer Aufgaben und stark abhängig von zeitnahen Verhaltensverstärkern. All diese Symptome werden bei den Ratten durch die Gabe von MPH gebessert. Daher kann man bezüglich der Symptome Parallelen ziehen zu ADHS-Patienten mit den Symptomen Hyperaktivität, Lernschwierigkeiten und Impulsivität (Davids, Zhang et al. 2003). Ebenfalls untersucht werden sogenannte „spontan hypertensive“ Mäuse. Hier scheinen auch Störungen des Dopamin-Haushaltes, wie z.B. Mechanismen der Dopamin-Freisetzung sowie die vesikuläre Speicherung von Dopamin eine Rolle zu spielen (Russell, de Villiers et al. 2000). Auch andere Mausmodelle wie z.B. die Dopamin-Transporter-Knock-Out-Mouse (DAT-KO-Maus), bei der der synaptische Dopamin-Transporter ausgeschaltet wurde, bestätigen die dämpfende Wirkung von MPH auf die Lokomotion, während bei Wildtyp-Mäusen die aktivierende Wirkung im Vordergrund zu stehen scheint. Durch MPH wird, wie durch andere Amphetamine auch, die extrazelluläre Konzentration von Dopamin in dopaminergen Projektionsarealen des Gehirns erhöht, vor allem im Striatum. Dies konnte sowohl bei Ratten als auch bei gesunden Freiwilligen nachgewiesen werden. Die MPH-Therapie korrigiert vermutlich eine Gehirndysfunktion; es gibt Hinweise, dass die Einnahme bei Personen mit ADHS qualitativ anders funktioniert als bei gesunden Personen (Moll, Heinrich et al. 2003). Mittels transkranieller Magnetstimulation konnte gezeigt werden, dass MPH auf die intrakortikale Erregbarkeit sowie auf das inhibierende Stimuli-Intervall unterschiedlich wirkt in Abhängigkeit davon, ob die untersuchten Personen an ADHS erkrankt waren oder nicht (Beck, Moller et al. 1987). MPH scheint den Dopamin-(Rück-)Transporter, durch den normalerweise die Dopamin-Wirkung im synaptischen Spalt beendet wird, zu hemmen. Dadurch wird die Wirkung von Dopamin an postsynaptischen Rezeptoren verlängert, da ja nicht das gesamte freigesetzte Dopamin ins Neuron rücktransportiert werden kann. Es kommt zu erhöhten Dopamin-Spiegeln

während der Ruhephase zwischen den Nervenimpulsen im synaptischen Spalt. Dies wiederum führt dazu, dass die präsynaptische dopaminerge Aktivität über den Dopamin-D2-Autorezeptor herunterreguliert wird. Wie können Medikamente, deren Wirkung in der Erhöhung des Dopaminspiegels liegen, eine psychomotorische Dämpfung bewirken, wo doch bekannt ist, dass Dopamin aktivierend auf die Motorik wirkt (siehe z.B. Parkinson) (Seeman and Madras 2002)? Unter therapeutischer Dosierung von MPH ist die Menge von Dopamin, die durch ein Aktionspotential freigesetzt wird, bei ADHS-Patienten geringer als bei gesunden Personen. Dadurch kommt es auch zu einer abgeschwächten psychomotorischen Aktivierung. Bei Patienten mit ADHS wird im DRD4-Gen vermutlich ein postsynaptischer Dopamin D4-Rezeptor kodiert, der eine erniedrigte Sensitivität für Dopamin aufweist. Ein weiteres Gen (DAT1-10) wird verantwortlich gemacht für eine erhöhte präsynaptische Dichte des Dopamin-Rezeptors und dadurch erniedrigte Dopamin-Spiegel im synaptischen Spalt (Asherson 2004). MPH hemmt nun die Rückresorption; dadurch findet sich viel Dopamin im synaptischen Spalt, es kommt zur Downregulation der Rezeptoren. In der Folge wird weniger Dopamin freigesetzt (Seeman and Madras 2002). Dieser Erklärungsversuch wird auch durch bildgebende Untersuchungen bestätigt. Mit Hilfe von SPECT-Aufnahmen (Single Photon Emission Computed Tomography) ist es möglich, den präsynaptischen Dopamin-Rezeptor (DAT) im Striatum darzustellen und die Dichte zu quantifizieren. Hier zeigten Erwachsene und Kinder mit ADHS im Vergleich zu Probanden ohne neurologische oder psychiatrische Vorerkrankungen eine erhöhte DAT-Dichte, die sich durch eine Behandlung mit MPH wieder normalisierte (Krause, Dresel et al. 2000; Cheon, Ryu et al. 2003). Es konnte auch eine Korrelation zwischen der Reduktion der DAT-Dichte und der klinischen Wirkung festgestellt werden (Vles, Feron et al. 2003). MPH scheint die striatale DAT-Dichte langfristig zu reduzieren, es soll etwa einen Monat dauern, bis die Werte wieder das Ausgangsniveau erreichen. Dieser Effekt wiederum korreliert nicht mit den klinischen Befunden, da ja nach oraler MPH-Gabe die klinische Besserung nur einige Stunden anhält (Vles, Feron et al. 2003).

Ritalin enthält die eben erwähnte Mischung aus schnell und verzögert freigesetzten MPH-Kügelchen im Verhältnis 1:1 und beruht auf dem patentierten Wirkstoffabgabesystem SODAS (Spheroidal Oral Drug Absorption System). Ähnlich wie Equasym Re-

tard und Medikinet Retard weist das Präparat eine größere unmittelbare und eine geringere verzögerte Wirkung auf als z.B. Concerta (Lopez, Silva et al. 2003). Es wird eine Anfangsdosis von 10mg einmal täglich morgens vor dem Frühstück verabreicht, bei starken Nebenwirkungen wie Appetitlosigkeit kann die Tagesdosis auch angepasst werden und z.B. nach dem Frühstück verabreicht werden. In wöchentlichen Schritten von 20mg kann dann die Anfangsdosis bis zu einer Maximaldosis von 60mg/ Tag angepasst werden. Allerdings sind in manchen Fällen höhere Dosen indiziert, wobei eine Höchstdosis von 2mg/kg/Tag bzw. eine Tagesgesamtdosis von 100mg nicht überschritten werden sollte.

Die Ritalinkapseln können ohne Wirkungsverlust geöffnet werden und auf geeignete Nahrungsmittel aufgestreut werden, falls Kinder Schluckprobleme haben oder generell eine schlechte Compliance gegeben ist. Dieses Verfahren wird von den Herstellern so nicht empfohlen, kann jedoch in der Praxis sehr hilfreich sein (Banaschewski, Coghill et al. 2008).

Unklar ist nach wie vor die Datenlage zum Problem der langfristigen Wachstumsverzögerung, evtl. auch assoziiert mit einer starken Beeinträchtigung des Appetits. Hier kann aufgrund teilweise widersprüchlicher Studien noch keine abschließende Bewertung abgegeben werden (Swanson, Wigal et al. 2004). Dennoch gehören zum Monitoring der behandelten Kinder selbstverständlich standardmäßig eine Überwachung von Größe und Gewicht, sowie der regelmäßige Vergleich mit normierten Wachstumstabellen.

Kontraindikation für die Verabreichung von Ritalin sowie auch anderen Stimulanzien sind Schizophrenie, schwere Depressionen, Schilddrüsenfunktionsstörungen, Herzrhythmusstörungen, Bluthochdruck, gleichzeitige oder innerhalb der letzten zwei Wochen erfolgte Anwendung von Monoaminoxidase-Hemmern, sowie bekannte Unverträglichkeit. Außerdem gilt die sehr zurückhaltende Rezeptierung bei Patienten mit bekannten Substanz-Abusus oder Alkoholismus, bei schwangeren oder stillenden Patientinnen, bei Anorexia nervosa und anderen Essstörungen sowie bei suizidaler Gefährdung (Banaschewski, Coghill et al. 2008). Insgesamt scheint es so zu sein, dass die tatsächliche Häufigkeit unerwünschter Arzneimittelwirkungen vermutlich höher ist als berichtet, auch wenn keine eindeutigen Hinweise vorliegen, dass schwere Nebenwirkungen wie Herzrhythmusstörungen, Leberinsuffizienz sowie suizidale Gedanken, die z.B. bei dem

in der Entwicklung sehr gut überwachten Strattera auftraten, auch bei der Therapie mit Stimulanzien zu befürchten sind (Banaschewski, Coghill et al. 2008).

1.3.7 Potentielle Mutagenität von Methylphenidat

1.3.7.1 In Patienten

Bereits 1977 hatten Walker und Dumars bei zwei von vier Kindern, die mit MPH behandelt worden waren, eine leichte, aber signifikante Zunahme von Schwester-Chromosomen-Austauschraten in peripheren Lymphozyten gefunden. Dieser Befund blieb damals ohne größeres Echo, womöglich, da er nur in Abstract-Form veröffentlicht worden war (Holtmann, Kaina et al. 2006). Epidemiologische Daten zum Krebsrisiko nach Einnahme von MPH konnte eine Studie von Oestreicher et al. (Oestreicher, Friedman et al. 2007) bereitstellen: Hier kam es zu 23 Krebsfällen bei erwarteten 20,4 Krebsfällen unter 35400 Patienten die mit MPH therapiert wurden, und damit nicht zu einer signifikanten Assoziation von MPH-Einnahme und Krebsrisiko, bei jedoch insgesamt sehr kurzem Beobachtungszeitraum (Walitza, Kampf et al. 2010). Eine ältere Studie zum gleichen Thema (Selby, Friedman et al. 1989) konnte ebenfalls keine epidemiologischen Hinweise auf ein erhöhtes Krebsrisiko nach MPH-Einnahme liefern. Hier wurden 15 Fälle einer Krebserkrankung anstatt der 32,7 erwarteten bei 529 Patienten dokumentiert. Dennoch muss hinzugefügt werden, dass beide Studien durch einerseits geringe Stichprobengrößen, andererseits durch relativ kurze Beobachtungszeiträume nur eingeschränkt zu interpretieren sind (Walitza, Kampf et al. 2009).

1.3.7.2 In Gentoxizitätstests und Tiermodellen

Mutagene und klastogene Effekte von Substanzen werden an standardisierten Testsystemen untersucht. Im Rahmen von in vitro-Untersuchungen werden Bakterien oder Säugerzellen mit der Testsubstanz in verschiedenen Konzentrationen behandelt und dann auf Veränderungen und auf Mutationen hin untersucht. Ein Problem dieser Testmodelle im Vergleich zum menschlichen Metabolismus ist, dass die Testzellen oft keine oder nur eine geringe Fähigkeit besitzen, Fremdstoffe zu verstoffwechseln. Substanzen, die erst im Zuge ihrer Metabolisierung ein mutagenes Potential entwickeln, würden daher

nicht gut erfasst werden. Dem kann abgeholfen werden, indem die Testsubstanzen in Gegenwart eines Leberextraktes appliziert werden, welches eine metabolische Aktivierung der Testsubstanz bewirkt und somit eine Verstoffwechslung durch die Leber partiell ersetzt (Ganten and Bader 2003; Holtmann, Kaina et al. 2006).

In vitro-Daten zu potentiell genomschädigenden Wirkungen von MPH stellten Suter, Martus et al. 2006 (Suter, Martus et al. 2006) in Form einer der ersten in vitro-Studien zu chromosomalen Aberrationen mit MPH an humaner Lymphozytenkultur zur Verfügung. Es konnten keine strukturellen oder numerischen Abweichungen festgestellt werden. Die Autoren führten außerdem einen in vivo-Maus-Knochenmark-Mikrokerntest durch; auch hier ergaben sich keinerlei Hinweise für mögliche genotoxische Wirkungen von MPH.

Auch von Teo et al. (Teo, San et al. 2003) konnten an mehreren Testsystemen in vitro (Salmonella typhimurium, E. coli, Lymphomzellen von Mäusen) und in vivo (Knochenmark von CD-1-Mäusen) keine mutagenen oder klastogenen Effekte nachgewiesen werden. Teo et al. führten ebenfalls einen Mikrokerntest in vivo durch, außerdem einen Säugerzellmutationstest mit und ohne Enzymzugabe (S9). In einer Dosierung, die etwa dem 60-fachen der für ADHS-Patienten empfohlenen Höchstdosis entspricht, konnte jedoch eine erhöhte Inzidenz hepatischer Neoplasien in B6C3F Mäusen beobachtet werden. Präneoplastische und neoplastische Auffälligkeiten in der Leber wurden ebenfalls beobachtet. Bei männlichen Mäusen fanden sich nach zweijähriger MPH-Behandlung vermehrt Hepatoblastome; bei weiblichen und männlichen Mäusen stieg die Inzidenz von eosinophilen Foci, die als Vorläufer von Neoplasien gelten, und hepatozellulären Adenomen signifikant an.

Der Mechanismus, über den MPH zur Entstehung von Leber-Neoplasien führt, ist ungeklärt. Da MPH im Mutationstest nicht mutagen war (s. oben), vermuten die Autoren, dass die Tumorentstehung nicht über mutagene Effekte erfolgt, sondern über eine erhöhte Zellproliferation.

Zusammenfassend wurden in den USA die Befunde wegen der hepatozellulären Neoplasien bei Mäusen durch das National Toxicology Program (NTP) als «some evidence of carcinogenic activity» bewertet, dies ist die zweithöchste von fünf Bewertungsstufen. Da die Inzidenz der Neoplasien nur unter extremer MPH-Dosierung erhöht war (bis zu 60-

fach über der beim Menschen üblichen Dosis von 1 mg/kg Körpergewicht), wurde auf die Klassifizierung «clear evidence of carcinogenic activity» (Stufe 1) verzichtet (Holtmann, Kaina et al. 2006).

Andreazza et al. (Andreazza, Frey et al. 2007) beschrieben DNA-Schäden, die durch MPH induziert worden sein sollen, nach Durchführung des sogenannten Comet Assays (Einzelzellgelelektrophorese). Sie untersuchten dafür Blutzellen und Zellen des Striatums und des Hippocampus, nach Einmalgaben und nach längerer Therapie von Mäusen mit MPH. Sie fanden jedoch keine erhöhten Mikrokernfrequenzen in den Blutlymphozyten derselben Mäuse. Diese Ergebnisse sind umstritten und können aus verschiedenen Gründen nicht als Beweis für eine Genotoxizität des MPH geführt werden (Stopper, Walitza et al. 2008). Die verwendeten Zelltypen sind – bis auf die Lymphozyten aus dem peripheren Blut – ungewöhnlich für die Durchführung eines Comet Assays und es fehlen valide Erfahrungswerte. Die Berücksichtigung von Kontrollwerten bezüglich dieser Zellen wäre wünschenswert gewesen, um interindividuelle bzw. interexperimentelle Unterschiede bewerten zu können. Ein letzter Kritikpunkt zielt auf das Nichtberücksichtigen von Positivkontrollen ab (Stopper, Walitza et al. 2008).

Es scheint insgesamt so zu sein, dass mit in vivo und in vitro Standardtest-Systemen kein Nachweis für eine Genomschädigung erbracht werden kann (Teo, San et al. 2003; Suter, Martus et al. 2006; Stopper, Walitza et al. 2008).

Angesichts der unklaren Befunde tierexperimenteller Daten wurde nach der Veröffentlichung der Studie von El-Zein zunehmend deutlich, dass der Mangel an toxikologischen Langzeitdaten zu MPH beim Menschen beunruhigend ist. Zwar wurde einheitlich vor vorschnellen Schlüssen hinsichtlich einer mutagenen Gefährdung durch MPH gewarnt; der durch El-Zein et al. aufgeworfene Verdacht erforderte aber eine fundierte Klärung (Preston, Kollins et al. 2005; Holtmann, Kaina et al. 2006).

2 Fragestellung der Arbeit

Mit dieser Studie soll untersucht werden, ob eine Therapie mit MPH bei Kindern mit ADHS zu erhöhten Mikrokernfrequenzen in peripheren Lymphozyten als Marker für eine Genomschädigung und einem damit potentiell assoziierten erhöhten Karzinomrisiko führt.

Methylphenidat gehört zu den am meisten rezeptierten Medikamenten im Kindesalter mit einer verschriebenen Gesamtmenge von 1200kg im Jahr 2006. Diese Menge würde ausreichen, eine Anzahl von 200.000 Kindern über das Jahr zu behandeln, was bedeutet, dass bis zu 2% aller Kindern bzw. etwa 1/3 aller an ADHS erkrankten Kinder in Deutschland mit Methylphenidat behandelt werden (Janhsen 2007).

El-Zein et al. 2005 (El-Zein, Abdel-Rahman et al. 2005) hatten in einer Studie mit 12 Kinder auffällig erhöhte Mikrokernfrequenzen gefunden. Die Studie führte zu einer großen Verunsicherung bei Ärzten, Eltern und Kindern und machte aufmerksam auf den Mangel an Studien zu diesem Thema.

In der vorliegenden Studie wurden einerseits prospektiv die Mikrokernfrequenzen von an ADHS erkrankten Kindern unter MPH Therapie untersucht, andererseits wurden Proben von Kindern ausgewertet, die schon seit langem unter MPH-Therapie standen. Die Werte konnten außerdem mit Proben von gesunden Kontrollprobanden gleichen Alters verglichen werden. Die Entwicklung der DNS-Schäden der Patienten wurde in peripheren Lymphozyten mit Hilfe des Mikrokern-Assays untersucht.

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Laborchemikalien und Verbrauchsmaterial

Die Chemikalien für den Versuchsaufbau stammen von den Firmen Gibco (Maryland, USA), SERVA (Heidelberg), und Sigma Chemical Co. (Taufkirchen). Alle Chemikalien wurden kommerziell und in höchster Qualität erworben. Allgemeine Verbrauchsmaterialien stammten von der Firma Hartenstein (Würzburg). Lieferant der Puffersalze war Merck (Darmstadt). Die Lithium-Heparin-Monovetten stammen von Sarstadt (Nürnberg-Rommelsberg).

Sämtliche Puffer und Lösungen wurden autoklaviert oder durch Filter steril filtriert. Das verwendete Wasser entstammt der laboreigenen Reinstwasser-Anlage (Millipore-system).

3.1.2 Arbeitsgeräte

Alle Arbeitsgeräte, die verwendet wurden, sind nachfolgend aufgeführt in alphabetischer Reihenfolge:

Autoklav Melag Typ 28, Melag Deutschland

Brutschrank Typ B 5060 EK-CO₂, Heraeus, Deutschland

Coulter Counter Z1, Coulter Electronics, UK

Fluoreszenzmikroskop Nikon, Deutschland

Lichtmikroskop Zeiss, Deutschland

Pipetten Gilson Frankreich Eppendorf Hamburg, Deutschland Labsystem Finnland

Sterile Werkbank Gelaire BH 26, Flow Laboratories, Deutschland

Sterilisator Heraeus Deutschland

Wasserbad GFL, Burgwedel, Deutschland

Zentrifuge Labofuge 400e, Heraeus, Deutschland

Zytozentrifuge Cytospin 3, Shandon, UK

3.1.3 Medien und Puffer

Die humanen Lymphozyten wurden in RPMI 1640 Medium (Sigma Chemical Co., Taufkirchen) kultiviert, das dafür mit folgenden Substanzen (Sigma Chemical Co., Taufkirchen und GIBCO, Maryland, USA) versetzt wurde:

500ml RPMI

75ml hitzeinaktiviertes Pferdeserum (30 Minuten, 56°C)

5ml Natrium-Pyruvat (100mM)

5ml L-Glutamin (200mM)

2ml Penicillin-Streptomycin (10.000I.U./ml Pen., 10.000yg/ml Streptomycin) (GIBCO, Maryland, USA)

500yg Tylosin (8mg/ml)

5ml MEM (100% Konzentration an „non essential amino acids“) (GIBCO, Maryland, USA)

Um die Mikrokerne zu bestimmen wurden die Lymphozytenpräparate mit Acridin-Orange eingefärbt.

Acridin-Orange-Lösung: 450µl 1%ige Acridin-Stammlösung (SERVA, Heidelberg) auf 71,5 ml Sörensen- Puffer

Sörensen-Puffer: Dinatriumhydrogenphosphatdihydrat: 5,84 g pro 492 ml H₂O

Kaliumhydrogenphosphat: 4,61 g pro 508ml H₂O, pH-Wert 6,8

Der Sörensen-Puffer diente dem Waschen der Präparate nach dem Anfärben mit Acridin-Orange.

3.2 Methoden

3.2.1 Isolierung peripherer Lymphozyten aus heparinisier- tem Vollblut

6ml Vollblut wurde vorsichtig in einem 15 ml Zentrifugenröhrchen (Greiner) auf 6 ml Histopaque 1077 (Sigma Chemical Co., Taufkirchen) aufgeschichtet. Das anschließende Zentrifugieren (1600 Umdrehungen/ Minute, 30 Minuten, Raumtemperatur) trennte das Vollblut mittels eines Dichtegradienten in die folgenden Schichten:

- Gelbliches Plasma in der obersten Schicht
- Dünner Lymphozytensaum zwischen Plasma und Histopaque
- Histopaque als Trennmateriale
- Am Boden des Röhrchen Zellmaterial (v.a. Erythrozyten)

Das Plasma wurde vorsichtig mittels einer Pasteur-Pipette abgenommen und auf zwei Reaktionsgefäße verteilt, in welchen es bis zur Weiterverwendung bei -20°C tiefgefroren werden konnte. Ebenfalls mit Hilfe einer Pasteur-Pipette wurde die Lymphozytenschicht in ein neues Zentrifugenröhrchen transferiert und nach Zugabe von 10ml Lymphozytenmedium bei 1200 Umdrehungen/min und Raumtemperatur für 10 Minuten zentrifugiert.

Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet vorsichtig mit 10 ml Lymphozytenmedium resuspendiert. Daraufhin wurden die Lymphozyten ein zweites Mal für 10 Minuten bei 1200 Umdrehungen/min zentrifugiert. Anschließend erfolgte das erneute Verwerfen des Überstandes und Resuspension des Pellets mit 3ml Lymphozytenmedium. Aus dieser Suspension wurden dann 200µl entnommen, mit 9,8ml isotoner Lösung versetzt und daraus im Coulter Counter die Zellzahl bestimmt. Daraufhin wurden die Lymphozyten durch Zugabe von Lymphozytenmedium (variabel, rechnerisch ermittelt) auf eine Zellzahl von 1×10^6 eingestellt und 5ml davon in eine Kulturflasche überführt. Diese Lymphozytenlösung wurde nun für den Mikrokernversuch verwendet.

3.2.2 Mikrokernassay

3.2.2.1 Theoretische Grundlagen

Das Auftreten von Mikrokernen ist ein Maß für einen potentiellen zytogenetischen Schaden der Zelle. Zytogenetische Schäden scheinen bei allen karzinomatösen Zellen vorhanden zu sein (Garewal, Ramsey et al. 1993). Deshalb werden Substanzen, die im erhöhten Maße Mikrokerne hervorrufen, als potentiell karzinogen eingestuft. Dies ist die Grundlage für den Mikrokerntest. Um die Mikrokernfrequenz zu bestimmen muss jede Zelle unter dem Fluoreszenzmikroskop gezählt werden und das Vorhandensein von Mikrokernen geprüft werden. Grundsätzlich treten Mikrokerne in jeder Zellart auf. Sie lassen sich jedoch in Abhängigkeit von der Morphologie der Zellen nicht in jedem Gewebe gleich gut beobachten. In Studien wird der Mikrokerntest meistens an peripheren humanen Lymphozyten durchgeführt, bei Tierversuchen sind es häufig Erythrozyten aus dem Knochenmark von Mäusen. Jahrzehntelange Erfahrung mit in vivo und in vitro Versuchen hat gezeigt, dass mutagene Substanzen oder Strahlung Mikrokerne erzeugen können und dass die Mikrokernfrequenz einen validen Marker für Genotoxizität darstellt. Ein verbindliches Protokoll wurde durch die Organisation für wirtschaftliche Zusammenarbeit und Entwicklung (Organisation for Economic Co-operation and Development, OECD) festgelegt: OECD Guideline for Testing of Chemicals Section 4: Health effects, Test No 487: in vitro mammarian cell micronucleus test 2010 (OECD).

Zytogenetische Parameter zur Untersuchung erbgutverändernder Eigenschaften sind chromosomale Aberrationen, Austausch von Schwesterchromatiden, sowie Mikrokerne (Ganten and Bader 2003; Holtmann, Kaina et al. 2006). Chromosomenaberrationen entstehen, wenn beide Stränge der DNS an gegenüberliegenden oder eng benachbarten Stellen brechen. Die spontane Frequenz dizentrischer Chromosomen in menschlichen Lymphozyten beträgt etwa 1 in 1.000 Zellen; die spontane Rate von Chromatidaustauschen liegt bei 0,5 in 1.000 Zellen, die der Chromatidbrüche bei etwa 6 in 1.000 Zellen (Holtmann, Kaina et al. 2006). Die spontane Schwesterchromatid-Austausch-Frequenz in Lymphozyten des gesunden Menschen beträgt etwa 6 pro Zelle, wobei die Anzahl in den einzelnen Zellen zwischen 2 und 20 schwanken kann (Ganten and Bader 2003). Mikrokerne gelten als Indikatoren von Chromosomenbrüchen. Wenn Zellen mit Chro-

mosomenaberration während der Zellteilung erstmals wieder in die Anaphase eintreten, können Bruchstücke oft nicht wieder in die Zellkerne integriert werden, sondern werden dann mit einer eigenen Membran umhüllt und bilden die Mikrokerne, die dann mikroskopisch außerhalb des eigentlichen Zellkerns im Zytoplasma sichtbar sind (Holtmann, Kaina et al. 2006). Ein Mikrokern wird definiert als abgerundete, Erbgut enthaltende und von einer Membran umgebene Struktur, die ähnliche Farbintensität wie der Zellkern aufweist. Per definitionem muss er vom Zellkern getrennt im Plasma liegen, darf aber vom Hauptkern nicht weiter entfernt sein als 2 Hauptkerndurchmesser. Seine Größe darf die eines Drittels des Hauptkernes nicht überschreiten. Unabhängig vom Zeitpunkt der potentiellen Schädigung entstehen Mikrokerne während der Mitose durch Ausschluss ganzer Chromosomen oder einzelner Chromosomenfragmente. Daher ähnelt der Mikrokern ultrastrukturell dem Zellkern (Schiffmann and De Boni 1991). Zur Entstehung von Mikrokernen trägt der Verlust von Chromatin aus dem Hauptkern infolge einer Mutagenbelastung bei (Fenech 2000). Mikrokerne können aus ganzen Chromosomen (durch Verzögerung der Anaphase nicht in die Tochterzelle integriert) oder aus Chromosomenfragmenten (Bruchereignis) bestehen. Bei Mikrokernen, die dagegen Chromosomenfragmente enthalten, liegt ein klastogener gentoxischer Effekt zugrunde (Moore, Warner et al. 1996). Mikrokerne stellen lediglich ein quantitatives Maß für chromosomale Schäden dar, da strukturelle Chromosomenaberrationen wie Inversion oder Translokation zu keiner Fragmentierung führen.

Der Mikrokern-Test wird seit 1937 als Indikator für eine gentoxische Exposition eingesetzt (Ramirez and Saldanha 2002). In den 50er Jahren haben Evans und Mitarbeiter bei Pflanzenzellen, die gegenüber einer ionisierenden Strahlung exponiert wurden, eine erhöhte Anzahl von Mikrokernen festgestellt (Evans, Neary et al. 1959). Heddle und Mitarbeiter führten Ende der 70er Jahre in vivo-Versuche an Knochenmarkzellen von Kleinsäugetieren durch (Heddle and Carrano 1977). Klinische Studien zeigen, dass die Bestimmung der Mikrokernzahl in verschiedenen zytologischen Präparaten reproduzierbar ist, z.B. in Präparaten der Schleimhaut des oberen Aerodigestivtraktes, des Intestinaltraktes, der Lunge sowie der Lympho- und Erythrozyten (Shin, Hittelman et al. 1994).

Inwieweit der Mikrokern selbst an einer möglichen Krebsentstehung beteiligt ist, oder ob er nur ein Ausdruck einer Schädigung ist, ist noch nachzuweisen. Es ist noch unklar, ob das Genmaterial des Mikrokerns im weiteren Zellzyklus vielleicht wieder in den Kern integriert werden kann, oder ob es einfach verloren geht bzw. enzymatisch abgebaut wird (Stopper and Müller 1997). Die Ausbildung eines Mikrokerns könnte als Teilschritt zur Entwicklung einer Aneuploidie verstanden werden, da eventuell Teile des genetischen Materials in der nächsten Mitose nicht mehr repliziert werden können. Diese wiederum scheint eine Rolle bei der Karzinomentstehung zu spielen (Gustavino, Degrossi et al. 1994). Andere Autoren vermuten allerdings, dass Mikrokerne sogar der Elimination genetischer Schäden dienen könnten, und somit eine mögliche maligne Entartung verhindern könnten (Von Hoff, McGill et al. 1992). Allerdings wurde in krebsbefallenem bzw. präkanzerösem Gewebe eine erhöhte Mikrokernfrequenz nachgewiesen. Bis jetzt kann allerdings noch nicht nachgewiesen werden, ob und wann eine im Zusammenhang mit erhöhten Mikrokernfrequenzen eine Tumorerkrankung ausbricht (Bloching, Hofmann et al. 2000; Delfino, Casartelli et al. 2002).

Bei Krebspatienten, die Chemo- oder Strahlentherapie erhielten, ist die Mikrokernfrequenz ebenfalls nachweislich erhöht, wohingegen chemopräventive Substanzen wie Retinol oder Carotin auch die Mikrokernfrequenz senken können (Benner, Wargovich et al. 1993).

3.2.2.2 Durchführung

Der Mikrokerntest oder „cytokinesis-block micronucleus assay“ (CBMN) wurde nach der Methode von Michael Fenech durchgeführt (Fenech 2000). Um die Zellteilung zu stimulieren, wurde pro ml Lymphozytensuspension 10 µg Phytohämagglutinin zugegeben, und die Lymphozyten anschließend bei 37°C und 5% CO₂-Gehalt im Brutschrank inkubiert. Nach 42 bis 44 Stunden wurde 5 µg/ml Cytochalasin B hinzugefügt. Cytochalasin B hemmt die Zellteilung nach erfolgter Mitose. Es bewirkt die Auflösung von Aktinfilamenten, so dass die Zellen im Zweikernstadium verbleiben. Durch einfache Bestimmung des Verhältnisses von einkernigen zu doppel-, drei- und vierkernigen Zellen erhält man ein Maß für die Proliferation. Durch Zählen der Mikrokerne in den doppelkernigen

Zellen erhält man später die Mikrokernrate, die nach genau einer Zellteilung aufgetreten ist.

Anschließend erfolgte die erneute Inkubation der Zellen für weitere 24 Stunden. Durch mehrfaches Resuspensieren der Lymphozytenlösung wurden die Lymphozyten vereinzelt, um dann zu je mindestens 6 Cytospin-Präparaten pro teilnehmendem Kind aufgetragen zu werden. Mittels Zytozentrifuge (5 Minuten, 1000 Umdrehungen/min) wurden auf einen Objektträger ca. 20.000 Zellen aufgetragen. Danach erfolgte sofort die Fixation der Objektträger in Küvetten mit -20°C kaltem Methanol. Nach mindestens einstündiger Fixierung in Methanol konnten die Präparate in der Acridin-Orange-Färbelösung etwa eine Minute gefärbt werden, überschüssiger Farbstoff wurde durch Abspülen mit Sörensen-Puffer entfernt. Die mit Puffer benetzten Objektträger wurden mit einem 24mm x 40mm großen Deckglas versehen. Die Auswertung erfolgte unter dem Fluoreszenzmikroskop. Es wurden bei 400-facher Vergrößerung pro Studienteilnehmer und pro Messzeitpunkt etwa 1000 doppelkernige Lymphozyten auf das Vorhandensein von Mikrokernen untersucht. Hierbei wurde auch unterschieden, ob ein oder mehrere Mikrokerne vorlagen. Maßgeblich war hierbei die Anzahl der Zellen, die Mikrokerne enthielten, nicht die absolute Anzahl von Mikrokernen. Das heißt, ein doppelkerniger Lymphozyt, der mehrere Mikrokerne enthielt, wurde dennoch nur einfach gewertet, sowie separat vermerkt. Mikrokerne in Zellen mit nur einem oder mehr als zwei Zellkernen wurden dabei nicht berücksichtigt. Im Rahmen des HUMN- (Human Micronucleus) Projektes haben Fenech et al. (Fenech, Chang et al. 2003) Bestimmungskriterien für Mikrokerne nach der Doppelkernmethode festgelegt, um eine einheitliche und reproduzierbare Auswertung des Assay zu gewährleisten. Sie gehen dabei prinzipiell auf die von Countryman und Heddle (Countryman and Heddle 1976) definierten Kriterien zur Klassifikation von Mikrokernen im klassischen Mikrokerntest zurück. Die Kriterien zur Erfassung von Mikrokernen sind:

1. Der Durchmesser eines Mikrokerns beträgt maximal $\frac{1}{3}$ des Zellkerns.
2. Der Mikrokern ist nicht fragmentiert und hat eine runde oder ovale äußere Form.
3. Mikrokerne müssen ohne Verbindung zum Zellkern im Zytoplasma vorliegen.
4. Mikrokerne müssen in ihrer Farbintensität dem Zellkern gleichen oder heller sein.
5. Der Mikrokern muss im gemeinsamen Zytoplasma des Doppelkerns liegen.

Sehr wichtig ist zudem auch die verblindete Auszählung der Mikrokerne. Durch zunehmende Übung des Auszählenden könnte es dazu kommen, dass im Verlauf immer mehr Kerne gesehen und gezählt werden. Daher wurde in der vorliegenden Studie eine Positivkontrolle verblindet in regelmäßigen Abständen zwischen die normalen Objektträger gemischt. Neben der Zahl der Mikrokerne wurde die Anzahl an ein-, doppel- und mehrkernigen Zellen, sowie die Häufigkeit von Mitosen und Apoptosen pro 1000 ausgezählten Zellen dokumentiert. In einer weiteren Kategorie wurden die Lymphozyten erfasst, die bei der Herstellung der Präparate zerstört worden waren oder aus anderen Gründen nicht eindeutig einer der sieben Kategorien zugeordnet werden konnten (Fenech 2000; Fenech 2007). Während der Auswertung war aufgrund eines Verschlüsselungssystems nicht bekannt, welcher Person, Studiengruppe oder welchem Messzeitpunkt das Präparat zuzuordnen war. Die Auswertung der Proben erfolgte gesammelt und in größeren gemischten Gruppen, in zeitlichem Abstand zu Entnahme- und Aufbereitungszeitpunkt. Zum Zeitpunkt der Publikation von Walitza et al. 2009 (Walitza, Kampf et al. 2009) wurden noch weitere Proben aufgearbeitet und ausgezählt, die dann separat ausgewertet und in eine weitere Publikation eingefügt werden konnten (Walitza, Kampf et al. 2010).

3.3 Statistische Auswertung

Grundsätzliche Fragestellung:

Erhöht eine MPH-Therapie die Anzahl an Mikrokernen?

1. Gruppenvergleich:

Haben Kinder, die mit MPH behandelt werden, höhere Mikrokernzahlen als Kinder, die kein MPH bekommen?

2. Längsstudie:

Erhöht sich die Mikrokernzahl während der Einnahme von MPH über die Zeit?

Als Signifikanzniveau wurde eine Irrtumswahrscheinlichkeit von kleiner 5% ($p < 0,05$) gewählt. Die graphische Darstellung erfolgte mittels Boxplots. Die obere horizontale Begrenzung der Box gibt das obere Quartil an, die untere horizontale Begrenzung das

untere Quartil. Die Box wird somit unten vom ersten und oben vom dritten Quartil (25. bzw. 75. Perzentil) begrenzt. Dies bedeutet, dass 50 % der Werte in der Box liegen, während sich jeweils 25 % der Werte oberhalb und unterhalb der Box befinden. Die waagerechte Linie in der Box stellt den Median dar. Die die Graphik begrenzenden horizontalen T-Linien schränken den gesamten Bereich, in dem die Werte liegen, ein. Sie geben somit den kleinsten und den größten Wert an, sofern es sich hierbei nicht um Ausreißer oder Extremwerte handelt. Ausreißer und Extremwerte werden in der Graphik gesondert vermerkt. Bei Ausreißern handelt es sich um Werte, die um mehr als andert-halb Kastenlängen außerhalb liegen. Diese werden mit einem Kreis gekennzeichnet. Extremwerte liegen um mehr als drei Kastenlängen außerhalb und werden in der Graphik mit einem Stern markiert. Darüber hinaus fanden bei der graphischen Darstellung der Versuchsergebnisse Häufigkeitsdiagramme Anwendung. Diese geben in Form von Säulen die Häufigkeiten bestimmter Werte in einer definierten Gruppe wieder.

Das Programm Statistica (Statistica Version 9.1 und 10) wurde für die statistische Analyse und für die Erzeugung der Boxplots verwendet. Die statistische Auswertung erfolgte mit Hilfe des Wilcoxon two sample test (entsprechend dem Mann-Whitney-U-Test in Statistica) zum Vergleich zweier unabhängiger Stichproben bezüglich einer Variablen, und des Wilcoxon matched pairs test zum Vergleich zweier abhängiger Stichproben (prospektive Beobachtungen), da die Stichproben nicht streng normalverteilt waren.

Verglichen wurden Mittelwerte und Mediane der Versuchsergebnisse. Der Mittelwert ist definiert als der Quotient aus der Summe aller Einzelwerte und der Anzahl dieser Einzelwerte. Der Median ist definiert als der Wert, der in einer Aufreihung der nach zunehmender Größe geordneten Einzelwerte genau in der Mitte dieser Wertereihe liegt. Somit sind 50 % der Werte größer und 50 % der Werte kleiner als der Median.

3.4 Studiendesign

Es handelt sich bei der hier beschriebenen Studie um eine quasi-experimentelle klinische Studie mit einer Kontrollgruppe sowie eine Längsstudie ohne Randomisierung.

Die Auszählung erfolgte verblindet. Nach Entnahme des Blutes erfolgte zunächst die fortlaufende Kodierung in der Klinik für Kinder- und Jugendpsychiatrie des Universi-

tätsklinikums Würzburg durch eine nicht mit der weiteren Behandlung der Proben betraute Person. Die Aufbereitung der Proben erfolgte nun unter dieser Kodierung (z.B. NEU 1-x, CHRON 1-x). Die fertig aufbereiteten Objektträger wurden nun durch eine mit Auszählung und Aufbereitung nicht betraute Person erneut kodiert, hier wurde insbesondere die Chronologie unterbrochen, und eine weitere Kodierung (L-Nummer fortlaufend) verwendet. Unter dieser Nummer wurden die Objektträger nun gesammelt und in regelmäßigen Abständen in Unkenntnis der ursprünglichen Kodierung ausgezählt. Die Entblindung erfolgte am Ende der Auszählung.

Patientenzahl:

- KK gesunde Kontrollgruppe: 26 Kinder
- CHR chronisch (> 12 Monate) mit MPH behandelte Gruppe: 21 Patienten
- NEU1 ADHS-Kinder vor MPH Therapie: 27 Patienten
- NEU2 nach 3 Monaten: 22 Patienten
- NEU3 nach 6 Monaten: 17 Patienten
- NEU4 nach 12 Monaten: 13 Patienten

Für die Gruppe der mit MPH neu behandelten ADHS-Kinder waren die Einschlusskriterien: ADHS diagnostiziert nach Diagnosekriterien, keine MPH Therapie im Vorfeld, regelmäßige, zuverlässige Medikamenteneinnahme, keine weiteren chronisch eingenommenen Medikamente. Für die Gruppe der Kinder, die chronisch mit MPH therapiert wurden, war das Einschlusskriterium eine regelmäßige Medikamenteneinnahme über mindestens 12 Monate mit Pause von insgesamt höchstens 30 Tagen. Ausschlusskriterien für beide Gruppen waren ein Alter >18 Jahre, Rauchen (bei Studienbeginn, soweit bekannt), akuter (oder weniger als zwei Wochen zurückliegender) Infekt, extremes Essverhalten, chronische Erkrankungen (Diabetes, Asthma, ...) sowie andere neurologische Störungen. Für die Gruppe der gesunden Kontrollkinder galten dieselben Ausschlusskriterien, außerdem durften keinerlei psychiatrische Erkrankungen (ADHS, Essstörung, Schizophrenie, ...) bekannt sein.

3.4.1 Probandenkollektiv

Die Patienten befanden sich alle in Therapie in der Kinder- und Jugendpsychiatrie des Universitätsklinikums Würzburg. Sie wurden im Zeitraum zwischen Januar 2007 und Juni 2008 rekrutiert. Die Diagnostik erfolgte durch ein Team von Kinder- und Jugendpsychiatern und Psychiatern der Kinder- und Jugendpsychiatrie der Universität Würzburg. Die Beurteilung und die Therapie der Kinder erfolgte entweder stationär oder ambulant (Walitza, Kampf et al. 2009). Zur Diagnostik kamen semistrukturierte Interviews und Kiddie-SADS-PL (schedule for Affective Disorders and Schizophrenia for School-Aged Children) (Kaufman, Birmaher et al. 1997), die Child Behavior Checklist (Achenbach and Ruffle 2000) und ein deutscher Test zum Depressions-Screening „Depressions-Inventar für Kinder- und Jugendliche“ (DIKJ) von Stiermeier, Schürmann, Duda, 2000 (Ettrich and Ettrich 2006) zum Einsatz. Alle Patienten erfüllen die Diagnosekriterien für ADHS nach DSM-IV (American Psychiatric Association and American Psychiatric Association. Task Force on DSM-IV 2005) und nach den European clinical guidelines (Taylor, Dopfner et al. 2004); alle Patienten nahmen vor Beginn der Teilnahme an der Studie keine Medikamente ein. Zusätzlich zur Untersuchung der Mikrokernfrequenzen wurden potentielle Nebenwirkungen der Therapie nach den Richtlinien der „European clinical guidelines for hyperkinetic disorder“ (Taylor, Dopfner et al. 2004) durch Analyse von Vitalzeichen, Blutdruck, Puls sowie regelmäßigen Elektrokardiogrammen überwacht. Um hämatologische Auffälligkeiten erkennen bzw. ausschließen zu können, wurden regelmäßig Untersuchungen des Blutbildes durchgeführt. Gewicht und Größe wurden ebenfalls bei jeder Untersuchung notiert. 13 Patienten vervollständigten innerhalb des Untersuchungszeitraumes den 12 Monat der MPH- Therapie. Fünf Patienten (NEU 3, 111, 16, 20, 23a) beendeten die Studie bereits nach der ersten Blutentnahme vor Beginn der MPH- Therapie. Weitere 5 beendeten die Studie nach der 2. Blutentnahme. Von den verbliebenen 17 beendete ein weiteres Kind die Studie nach der 3. Blutentnahme (NEU 18), weitere 13 Kinder konnten die komplette Studie nach 12 Monaten beenden, die restlichen wurden so spät rekrutiert, dass ihr letzter Termin nicht mehr in den Studienrahmen fiel. Somit konnten 11 Patienten nicht über den Zeitraum untersucht werden, da sie entweder aus eigenem Antrieb oder auf Wunsch der Eltern die

Teilnahme abbrechen, oder aus medizinischen Gründen nicht weiter mit MPH behandelt wurden. Alle Teilnehmer wurden vor Beginn der Studie ausführlich mündlich und durch ein Patienteninformationsschreiben aufgeklärt, und gaben schriftlich ihr Einverständnis für die Teilnahme an der Studie. Minderjährige Patienten gaben sowohl selbst als auch durch die Erziehungsberechtigten ihr Einverständnis.

Die analysierten Proben stammten von Kindern aus folgenden Gruppen:

- Eine gesunde Kontrollgruppe, die kein MPH einnahm.
- Eine Gruppe von nachweislich an ADHS erkrankten Kindern, die länger als 12 Monate mit MPH therapiert wurden.
- Eine Gruppe von Kindern, die nachweislich an ADHS erkrankt waren, und von denen Proben zu 4 verschiedenen Zeitpunkten entnommen wurden:

Zuerst zum Zeitpunkt der Diagnosestellung ohne MPH-Therapie, dann nach 3 Monaten regelmäßiger MPH-Einnahme, nach 6 Monaten regelmäßiger MPH-Einnahme, und nach 12 Monaten regelmäßiger MPH-Einnahme.

Zu guter Letzt wurde noch eine Gruppe erstellt, die aus Objektträgern einer Patientin stammten, die zum Entnahmezeitpunkt eine Radiojodtherapie an der Strahlenklinik der Universitätsklinik Würzburg erhielt.

Dadurch fanden sich bei dieser Patientin im Vergleich zu den Teilnehmern erhöhte Mikrokernfrequenzen. Die Objektträger wurden als Positivkontrolle zur Überprüfung des Zählverhaltens in unregelmäßigen Abständen unter die auszuzählenden Objektträger gemischt. Von all diesen Teilnehmern wurde jeweils nur ein Objektträger pro Entnahmezeitpunkt ausgezählt.

3.4.2 Patientengruppen und Entnahmezeitpunkte

3.4.2.1 Patientengruppe NEU

Die Gruppe der Kinder mit ADHS, bei welchen eine Neueinstellung auf MPH erfolgte, sollen im Folgenden als Patientengruppe NEU bezeichnet werden

Die erste Blutentnahme (im Folgenden BE genannt) =NEU1 erfolgte zum Zeitpunkt der Diagnosestellung ohne MPH-Therapie. N betrug hier 27 Kinder.

Die 2. BE=NEU 2 erfolgte nach 3 Monaten (11.-13. Woche) regelmäßiger MPH-Einnahme. N beträgt in dieser Gruppe 22 Kinder.

Nach 6 Monaten (23-25. Woche) regelmäßiger MPH-Einnahme erfolgte die 3. BE=NEU 3, in der N=17 Kinder betrug.

Schlussendlich konnte nach 12 Monaten (50.-54. Woche) regelmäßiger MPH-Einnahme die 4. BE=NEU 4 mit N=13 Kinder erfolgen.

3.4.2.2 Dauermedikation (CHRON)

Diese Kinder standen unter Methylphenidat-Therapie seit mindestens einem Jahr. Insgesamt durfte die Therapie nur maximal 30 Tage pausiert werden. N betrug hier 21 Kinder.

3.4.2.3 Gesunde Kontrollkinder (KK)

Eine Gruppe von nicht an ADHS erkrankten, und auch sonst gesundheitlich unauffälligen Kindern, die kein MPH nahmen, diente als Kontrollgruppe, hier N=23 Kinder. Sie soll im Folgenden als KK (Kontrollkinder) bezeichnet werden.

3.4.2.4 Positivkontrolle (PK)

Als Positivkontrolle für erhöhte Mikrokerne wurden 11 Objektträger einer erwachsenen Krebspatientin in unregelmäßigen Abständen unter die regulären Objektträger gemischt. Diese war wegen eines Schilddrüsenkarzinoms mit einer Radiojodtherapie (0,363 Gy) behandelt worden, was ihre Mikrokernfrequenz erhöhte. Die Blutentnahme erfolgte jeweils 96h nach der Exposition.

3.4.2.5 NEU 4 doppelte Auswertung

Da speziell Daten zum Langzeitgebrauch von MPH immer noch recht spärlich sind, wurde ein besonderes Augenmerk auf die Kinder gelegt, die über einen langen Zeitraum regelmäßig Blutproben abgegeben hatten. Hier konnten 12 Kinder (ursprünglich 13 Kinder) im gesamten Zeitraum von vor dem Beginn der Einnahme von MPH bis 12 Monate danach analysiert werden. Von dieser kleinen Gruppe untersuchten wir je zwei Objektträger zu den Zeitpunkten 1, 3 und 4. Um validere Daten zu dieser kleinen Gruppe ge-

winnen zu können, bildeten wir für die statistische Auswertung den Mittelwert aus den zwei Objektträgern.

4 Ergebnisse

4.1 Allgemein

Zusammenfassend wurden in dieser Studie 3 Gruppen von Kindern untersucht:

Kinder, die über einen Zeitraum von 6 Monaten oder länger (also chronisch) mit MPH behandelt wurden (CHRON), eine Gruppe gesunder Kontrollkinder (KK) sowie eine Gruppe von an ADHS erkrankten Kindern, die vor der Therapie mit MPH sowie zu verschiedenen Zeitpunkten während der Einnahme analysiert wurde (NEU).

Es gab zudem noch eine zusätzliche Gruppe, die aus 14 Kindern bestand, die im Rahmen der vorangegangenen Studie von Walitza et al. (Walitza, Werner et al. 2007) schon einmal ausgewertet worden waren. Diese Probanden sollten in die vorliegende Studie einbezogen werden. Da mikroskopische Analysen verschiedener Auswerter nicht ohne weiteres gemittelt werden sollten, wurden diese Proben von der Verfasserin nochmals ausgewertet. Ermittelt wurden jeweils die Mikrokernrate in Prozent (als MK/1000 DK Lymphozyten; MK = Mikrokerne, DK = doppelkernige Lymphozyten). Der Anteil der doppelkernigen Lymphozyten als Marker für die Proliferationsfähigkeit der Lymphozyten wurde, neben der Mikrokern-Rate, als weiteres Kriterium für die Funktion der Lymphozyten erhoben. Außerdem wurde jeweils der CBPI (Cytochalasin Block Proliferation Index) ermittelt, der sich durch den Anteil der durch Endomitose entstandenen doppelkernigen bzw. mehrkernigen Zellen an der Gesamtzellzahl ermitteln lässt, (Anzahl einkernige Zellen + 2x Anzahl zweikernige Zellen + 3x Anzahl der dreikernigen Zellen geteilt durch die Gesamtzahl der Zellen) und Einblick in die mitotische Aktivität einer Zellkultur erlaubt.

Von der Funktion der Zelle, in diesem Fall die Zellteilung, kann in begrenztem Umfang auf die Zellvitalität geschlossen werden. Ein hoher Anteil an doppelkernigen Lymphozyten spiegelt somit eine gute Zellvitalität- und funktionalität wieder.

Im Versuch lassen sich durch diesen Parameter außerdem Probleme bei der Kultivierung der Lymphozyten detektieren (Temperatur, CO₂-Gehalt, etc.).

4.2 Charakterisierung des Probandenkollektivs

4.2.1 Abkürzungen und Erklärung verwendeter Symbole

ADHS = Aufmerksamkeitsdefizit-/Hyperaktivitätsstörung; MPH = Methylphenidat; m = männlich (male); f = weiblich (female); KG = Körpergewicht; d = Tag (day); CBPI = Cytokinesis block proliferation index ; $\bar{O} \pm sd$ = Durchschnitt \pm Standard-Abweichung (standard deviation); Signifikanz wurde bestimmt mit Hilfe des "Wilcoxon two sample test" bzw. in Statistica mit dem vergleichbaren Mann-Whitney-U-Test (für den Vergleich zweier Gruppen) und durch den "Wilcoxon matched pairs test" (für prospektive Beobachtungen).

4.2.2 Statistische Extremwerte

Die hier verwendete Statistik-Software STATISTICA kennzeichnet solche Datenpunkte als extreme Werte, welche mehr als drei IQR (inter quartil range, Abstand zwischen 25% und 75% Quantil, entspricht der Boxhöhe) oberhalb des 75% Quantils oder unterhalb des 25% Quantils liegen. Diese Definition ist Grundlage für die Bezeichnung eines Datenpunktes als Ausreißer in der vorliegenden Arbeit. Einzelne Mikrokern-Werte, welche durch das Programm STATISTICA als extremer Werte= Ausreißer identifiziert wurden, werden im Folgenden beschrieben, bleiben jedoch in der Statistik (wenn nicht ausdrücklich anders beschrieben) berücksichtigt. Eine Übersicht über alle eingeschlossenen Kinder, also die komplette Datengrundlage zeigt Tabelle 1. Eine Übersicht über die Daten ohne Ausreißer zeigt Tabelle 2. Zur Komplettierung wurden alle Berechnungen und Vergleiche auch auf Basis der Daten aus Tabelle 2, also ohne die statistischen „Ausreißer“ = „ausreißerbereinigt“ angestellt.

Es ergab sich jedoch in den Quer- und Längsvergleichen keine Änderung, unabhängig davon, welche Daten man als Berechnungsgrundlage heranzog- Lediglich in der Gruppe der 12 Kinder, von denen der Mittelwert aus 2 Objektträgern untersucht wurde, ergab sich nach Ausschluss der Ausreißer eine Veränderung, welche im Ergebnisteil beschrieben ist (siehe Ergebnisteil Kapitel 4.12, Tabelle 4).

4.2.3 Übersicht

Es konnten insgesamt 126 Proben ausgewertet werden. Im Folgenden sind alle Kinder beschrieben, die initial eingewilligt hatten, an der Studie teilzunehmen, und denen Blut entnommen wurde. Im Folgenden wird auch erläutert, welche der Kinder schließlich erfolgreich an der Studie teilnehmen konnten, und welche Kinder aus welchen Gründen nicht eingeschlossen werden konnten (Verlust der Objektträger, nicht erfolgreiche Probengewinnung, Nichterfüllend der Studienkriterien etc.). Das mittlere Alter der initial 26 gesunden Kontrollkinder betrug 7-23 Jahre ($12,4 \pm 4,3$). Das mittlere Alter der 21 chronisch mit MPH behandelten Kinder betrug $11,1 \pm 1,7$, sie waren zwischen 9 und 16 Jahren alt. Die beiden Gruppen waren damit bezüglich des Alters vergleichbar. Das mittlere Alter der 27 Kinder, die vor Beginn der MPH- Therapie im Rahmen der prospektiven Studie getestet wurden, betrug $8,5 \pm 2,0$ und lag damit signifikant unter dem der gesunden Kontrollgruppe. 76-85% aller Patienten aus den Gruppen der chronisch therapierten ADHS-Kinder, sowie aus der neu mit MPH therapierten Kinder waren männlich. In der Gruppe der gesunden Kontrollkinder waren dagegen nur 54% männlich. Die durchschnittlichen MPH-Dosen lagen bei $0,81 \pm 0,30$ mg/kg KG in der Gruppe der chronisch mit MPH therapierten Kinder. In der Gruppe der neu mit MPH therapierten Kinder lagen die durchschnittlichen MPH-Dosen bei $0,46 \pm 0,17$ mg/kg KG zum Zeitpunkt 2 nach 3 Monaten, bei $0,52 \pm 0,28$ mg/kg KG zum Zeitpunkt 3 nach 6 Monaten, und bei $0,49 \pm 0,28$ mg/kg KG zum Zeitpunkt 4 nach 12 Monaten. Damit lagen die Dosen in den Gruppen der neu therapierten Kinder signifikant unter denen in der Gruppe der chronisch mit MPH therapierten Patienten. Es gab in 3 Fällen Patienten aus der chronisch mit MPH therapierten Gruppe, die bei Ihrer Zuweisung an die Kinder- und Jugendpsychiatrie der Universität Würzburg bei Dosen über 1mg/kg eingestellt worden waren. Hier wurde jedoch die Medikamentenmenge schrittweise reduziert. Es wurde die Dosierung angegeben, die sie zum Zeitpunkt der Blutentnahme erhalten hatten. (In der Gruppe der Kinder aus einer vorangegangenen Studie, von denen konservierte Objektträger zusätzlich erneut ausgezählt worden waren, lag das Durchschnittsalter bei $9,4 \pm 2,9$ Jahren, diese Subgruppe bestand zu 79% aus Jungen, die MPH-Durchschnittsdosis lag bei $0,65 \pm 0,21$ mg/kg KG.) Der CBP-Index (Cytochalasin Blocked Proliferation Index) als Marker für das Zellwachstum der untersuchten Proben, veränderte sich im Verlauf der

Studie kaum, lediglich bei den gesunden Kontrollkindern betrug er $1,5 \pm 0,1$ und lag damit etwas niedriger, jedoch nicht signifikant. In der Gruppe der gesunden Kontrollkinder berichteten von den 26 Familien, von deren Kindern auswertbare Daten gewonnen werden konnten, 4 Familien über eine Exposition der Kinder durch Zigarettenrauch, bei einem Kind wurde aus den anamnestischen Daten nicht klar, ob es sogar manchmal selbst raucht. Somit waren 15% der gesunden Kontrollkinder passiv/evtl. gelegentlich aktiv Zigarettenrauch ausgesetzt. In der Gruppe der NEU mit MPH therapierten Kinder schwankten die Werte durch die Reduktion der Probandenzahl im Studienverlauf zwischen 37% Passivrauchern bei den Kindern vor Therapiebeginn, und 15% der Kinder nach 12 Monaten. Die Gruppe der Kinder, welche chronisch mit MPH therapiert wurden, lag bei 26% Passivrauchern.

4.2.4 Anmerkungen

4.2.4.1 Dauermedikation (CHRON)

Es stellte sich im Nachhinein heraus, dass ein Mädchen (Chron 7) nicht über die volle Dauer mit MPH therapiert worden war, sondern lediglich mit Risperdal weiterbehandelt wurde. Sie wurde somit in keiner Tabelle berücksichtigt.

Dann gab es bezüglich der MK-Frequenzen bei einem Kind erhöhte Werte (Chron 15 mit 2,705% MK-haltige/DK, siehe Abbildung 1). Der Wert dieses Kindes (Chron 15) war signifikant erhöht und wurde von Statistica als Ausreißer gekennzeichnet, beeinflusste jedoch das Ergebnis der Statistik nicht.

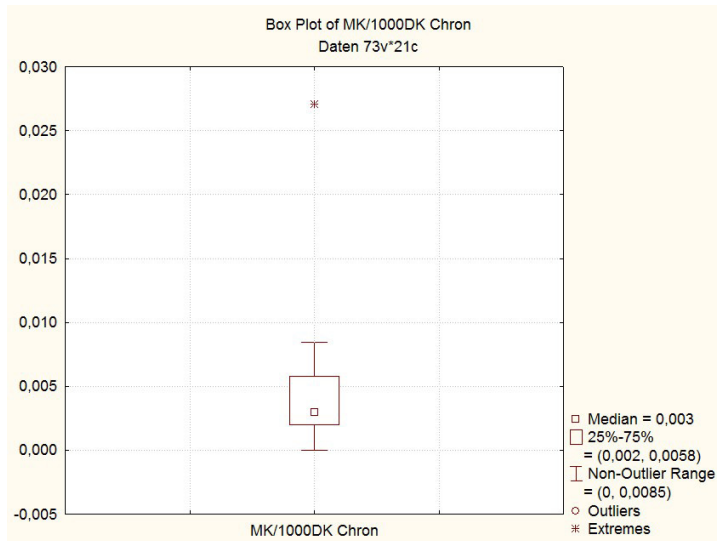


Abbildung 1: Boxplot zur Mikrokern-Verteilung in der Gruppe der chronisch mit Methylphenidat therapierten Kinder mit einem offensichtlichen Ausreißer

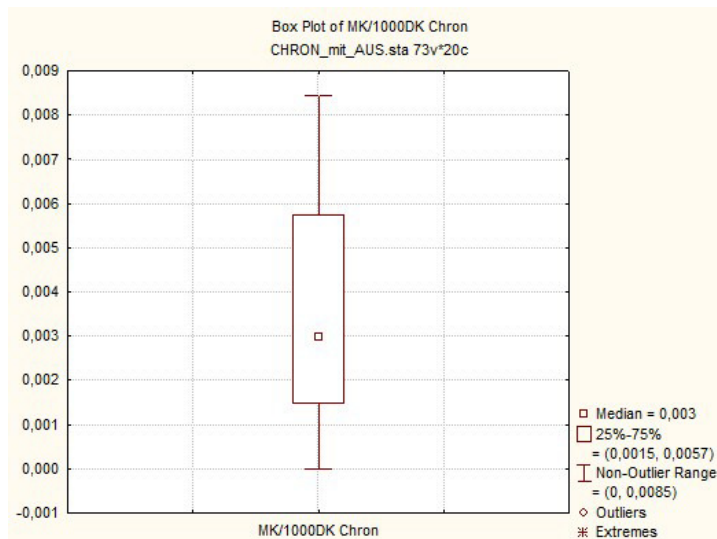


Abbildung 2: Boxplot zur Mikrokern-Verteilung in der Gruppe der chronisch mit Methylphenidat therapierten Kinder nach Ausreißerbereinigung.

Zur Abklärung der etwas erhöhten MK-haltigen Zellen/ 1000 DK wurden von diesem Kind ein zweiter, erneut kodierter Objektträger sowie ein dritter ausgezählt, beide mit unauffälligen Ergebnissen= nicht erhöhte Werte.

Wenn man diesen Ausreißer nicht in die Statistik einspeist, liegt die MK-Frequenz bei $3,5 \pm 2,6$ MK/ 1000 DK gegenüber dem Wert aller chronischen Kinder inklusive dem Ausreißer bei $4,6 \pm 5,7$ MK/ 1000 DK (siehe Abbildung 2). Dieses Kind war zu Hause

Rauch ausgesetzt, der Anteil der passiv rauchenden Kinder beträgt ohne dieses 24% anstatt 27%.

4.2.4.2 Gesunde Kontrollkinder (KK)

Bei zwei Kindern konnten aus der Blutprobe nicht erfolgreich Zellen gewonnen werden (KK 2, KK14). Sie wurden daher im Weiteren in keiner Aufzählung/ Tabelle berücksichtigt. Bei den Kontrollkinder gibt es zwei deutliche Ausreißer bezüglich des Alters, (KK 3,5, beide 23 Jahre alt), bzw. sind sie nicht mehr als Kinder zu zählen, sie wurden daher nicht berücksichtigt. Beide sind jedoch bezüglich der Anzahl der MK-haltigen Zellen unauffällig. Sie kamen auch aus Nichtraucherhaushalten und waren auch selbst Nichtraucher.

Ohne diese zwei 23-jährigen Kontrollkinder liegt das durchschnittliche Alter bei $11,5 \pm 2,9$ anstatt $12,4 \pm 4,2$, der Anteil der Raucher vergrößert sich auf 16% von ursprünglich 15%. Die MK-Frequenz erhöht sich dann auf $2,8 \pm 2,1$ anstatt $2,7 \pm 2,1$.

Ein weiteres Kind (KK 13) ist bezüglich der MK-Frequenzen ein Ausreißer. Auch hier wurden alle Berechnungen sowohl mit als auch ohne diesen Wert durchgeführt (siehe Kapitel 4.2.2).

Wenn man nun sowohl die beiden Ausreißer bezüglich des Alters als auch das Kind mit der erhöhten MK-Frequenz (KK3, 5, 13) aus der Statistik herauslassen würde ($N=23$), dann betrüge das Durchschnittsalter $11,3 \pm 2,8$, die MK-Frequenz $2,5 \pm 1,8$, und der Anteil der Passivraucher 13% anstatt 15%.

4.2.4.3 NEU

In der Gruppe Neu 4 (Kinder mit ADHS, therapiert mit MPH für 12 Monate), gab es einen Ausreißer bezüglich der Mikrokernfrequenzen (Kind hat den Code NEU 2) mit 15,98 MK-haltigen Zellen/1000 DK, siehe auch Abbildung 3. Zu den anderen Entnahmezeitpunkten zeigte dieses Kind eine durchschnittliche Mikrokernzahl.

Da dieses Kind auch noch in der Gruppe der 12 Kinder war, von denen 2 Objektträger zu den Zeitpunkte 1,3 und 4 ausgewertet wurden, haben wir auch zu dem auffälligen Wert zum Zeitpunkt nach 12 Monaten einen zweiten Objektträger. In diesem zeigte sich keine signifikant erhöhte Mikrokernfrequenz. Auch der Mittelwert aus beiden Objekt-

trägern erbrachte kein signifikantes Ergebnis. Es ist daher davon auszugehen, dass dieses Ergebnis nicht auf die MPH-Therapie zurückzuführen ist.

Der erhöhte Wert dieses Kindes wurde in der Auswertung belassen, es wurden die Gruppenvergleiche (NEU-CHRON, NEU 4-KK, NEU 1-NEU 4, NEU 2- NEU 4, NEU 3-NEU 4) jeweils einmal unter Einschluss dieses Kindes (sowie der anderen Werte welche STATISTICA als Ausreißer identifiziert hatte) sowie einmal unter Ausschluss dieser Werte durchgeführt.

Zu den Zeitpunkten NEU 1-3 blieben die Werte dieses Kindes berücksichtigt.

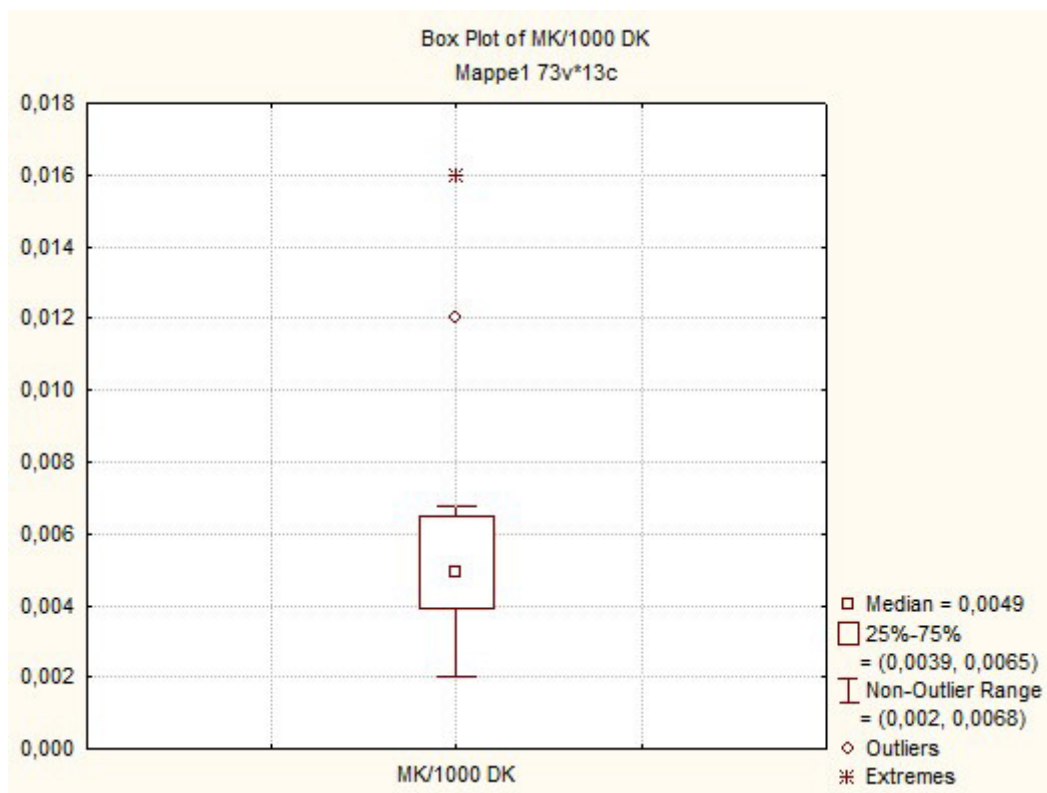


Abbildung 3: Boxplot zur Mikrokern-Verteilung in der Gruppe der neu mit Methylphenidat therapierten Kinder nach zwölf Monaten (NEU 4) mit einem offensichtlichen Ausreißer.

4.2.4.4 NEU 4 doppelte Auswertung (1, 3 und 4)

Von ursprünglich 13 Kindern, die zum Zeitpunkt nach 12 Monaten noch an der Studie teilnahmen und von denen verwertbare Daten erbracht werden konnten, konnten nur von 12 Kindern zwei verwertbare Objektträger zu allen Zeitpunkten gefunden werden. Zu einem Kind (Neu15) fanden wir zum Zeitpunkt 1 und 3 nur einen auszählbaren Objektträger, die anderen waren beschädigt bzw. nicht auswertbar. Zwei Kinder (NEU 21,

NEU 23) hatten zum Zeitpunkt 4 (nach 12 Monaten) keinen Objektträger, da die Studie hier bereits beendet war.

Ein Kind (NEU 2) hatte im ersten Objektträger zum Entnahmezeitpunkt NEU 4 einen signifikant erhöhten Wert. Zum Umgang mit statistischen Ausreißern siehe Kapitel 4.2.2. Die Gruppengröße variierte demnach von 14 Kindern zum Zeitpunkt 1, 14 Kinder zum Zeitpunkt 3, 13 Kinder zum Zeitpunkt 4. Nur 12 Kinder gaben 2 Objektträger zu allen Zeitpunkten ab.

4.2.5 Übersicht aller in die Studie eingeschlossenen Kinder

Gruppe	Anzahl	Alter (Jahren) avg ± sd (range)	Geschlecht (m/w) (%m)	MPH-Dosis (mg/kg KG/d) avg ± sd (range)	CBPI-Index	Mkhaltige Zellen/ 1000 doppelkernige
Gesunde Kontrollkinder	24	11.5±2.9 (7-17)	13m/11w (54)	---	1.6±0.1	2.8±2.1
Chronisch mit MPH behandelte Kinder	21	11.1±1.7 (9-16)	16m/5w (76)	0.81±0.30 (0.35-1.64)	1.6±0.1	4.6±5.7
Neu mit MPH therapierte Kinder vor Therapiebeginn	27	8.5±2.0 (5-16)	21m/6w (78)	---	1.6±0.1	5.3±4.6
Neu mit MPH behandelte Kinder nach 3 Monaten	22	8.5±1.3 (6-11)	17m/5w (77)	0.46±0.17 (0.22-0.84)	1.6±0.1	4.9±3.3
Diese Kinder vorher		8.2±1.2		---	1.6±0.1	4.9±4.2
Neu mit MPH behandelte Kinder nach 6 Monaten	17	8.8±1.4 (7-12)	14m/3w (82)	0.52±0.28 (0.22-1.35)	1.6±0.1	3.5±2.4
Diese Kinder vorher		8.2±1.2		---	1.6±0.1	5.7±4.5
Neu mit MPH behandelte Kinder nach 12 Monaten	13	9.5±1.5 (8-12)	11m/2w (85)	0.49±0.28 (0.20-1.30)	1.6±0.1	6.0±3.9
Diese Kinder vorher		8.3±1.3		---	1.6±0.1	5.1±3.8

Tabelle 1: Datengrundlage der Auswertungen

Gruppe	Anzahl	Alter (Jahren) avg ± sd (range)	Geschlecht (m/w) (%m)	MPH-Dosis (mg/kg KG/d) avg ± sd (range)	CBPI-Index	Mkhaltige Zellen/ 1000 doppelkernige
Gesunde Kontrollkinder	23	11.3±2.8 (7-17)	13m/10w (57)	---	1.6±0.1	2.5±1.8
Chronisch mit MPH behandelte Kinder	20	11.3±1.7 (9-16)	15m/5w (75)	0.81±0.31 (0.35-1.64)	1.6±0.1	3.5±2.6
Neu mit MPH therapierte Kinder vor Therapiebeginn	27	8.5±2.0 (5-16)	21m/6w (78)	---	1.6±0.1	5.3±4.6
Neu mit MPH behandelte Kinder nach 3 Monaten	22	8.5±1.3 (6-11)	17m/5w (77)	0.46±0.17 (0.22-0.84)	1.6±0.1	4.9±3.3
Diese Kinder vorher		8.2±1.2		---		
Neu mit MPH behandelte Kinder nach 6 Monaten	17	8.8±1.4 (7-12)	14m/3w (82)	0.52±0.28 (0.22-1.35)	1.6±0.1	3.5±2.4
Diese Kinder vorher		8.2±1.2		---		
Neu mit MPH behandelte Kinder nach 12 Monaten	12	9.5±1.5 (8-12)	10m/2w (83)	0.49±0.29 (0.20-1.30)	1.6±0.1	5.1±2.6
Diese Kinder vorher		8.3±1.3		---		

Tabelle 2: Datengrundlage der Auswertungen ohne statistische Ausreißer

4.3 Ergebnisse des Mikrokerntests

Es wurden die Mikrokernfrequenzen von den gesunden Kontrollkindern (24 Kinder/23 Kinder) und von Kindern mit ADHS nach chronischer Therapie mit Methylphenidat (21 Kinder/20 Kinder) verglichen, sowie vor Beginn der MPH-Therapie (27 Kinder) und zu 3 Zeitpunkten während der Therapie mit MPH (nach 3 Monaten 22 Kinder, nach 6 Monaten 17 Kinder, nach 12 Monaten 13 Kinder/12Kinder). In Tabelle 2 und Tabelle 3 aufgeführt sind hier Gruppenmittelwerte mit Standardabweichung. Die Positivkontrolle ist der Mittelwert aus 11 Objektträgern einer Blutentnahme, die einer weiblichen, an Schilddrüsenkrebs erkrankten Person 96 Stunden nach einer Radiojodtherapie entnommen worden war, und unter alle zu analysierenden Datenträger gemischt wurde.

Wie erwartet sind die Mikrokernfrequenzen der mit Radiojod therapierten Positivkontrolle signifikant erhöht im Vergleich mit allen anderen Gruppen (Abbildung 4).

Ansonsten finden sich im Gruppenvergleich keine signifikanten Veränderungen der Mikrokerne.

Einzig im Vergleich der Gruppe KK und NEU 1, NEU 2 und NEU 4 fällt eine signifikanter Unterschied der Mikrokerne auf, wobei jedoch im Vergleich CHRON mit KK kein signifikanter Unterschied zu beobachten ist.

Gruppenvergleiche (Längs- und Quervergleiche) wurden auch mit der um die statistischen Ausreißer bereinigten Datengrundlage (Tabelle 3) durchgeführt. Hier ergab sich keine Änderung der Ergebnisse. Im Folgenden wird, wenn nicht anders erwähnt, Tabelle 3 als Datengrundlage verwendet. Abbildung 4 zeigt die MK-Frequenzen aller Gruppen im Vergleich, genau wie Abbildung 5 als Boxplot.

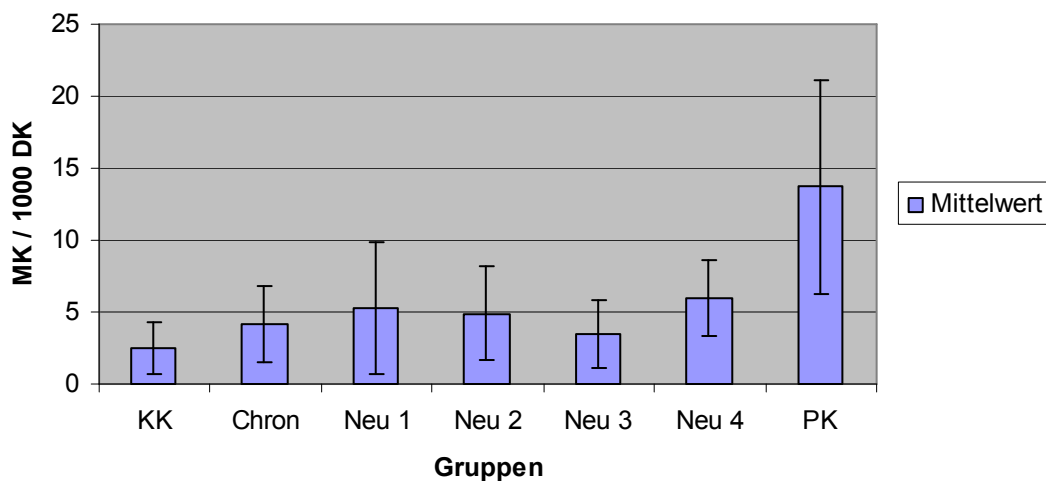


Abbildung 4: Mikrokern-Frequenzen aller Gruppen mit Mittelwert und Standardabweichung: Mikrokernfrequenzen von den gesunden Kontrollkindern und von Kindern mit ADHS nach chronischer Therapie mit Methylphenidat (23 Kinder), sowie vor Beginn der Methylphenidat-Therapie (27 Kinder) und zu 3 Zeitpunkten während der Therapie mit Methylphenidat (nach 3 Monaten 22 Kinder, nach 6 Monaten 17 Kinder, nach 12 Monaten 12 Kinder). Aufgeführt sind hier Gruppenmittelwerte mit Standardabweichung.

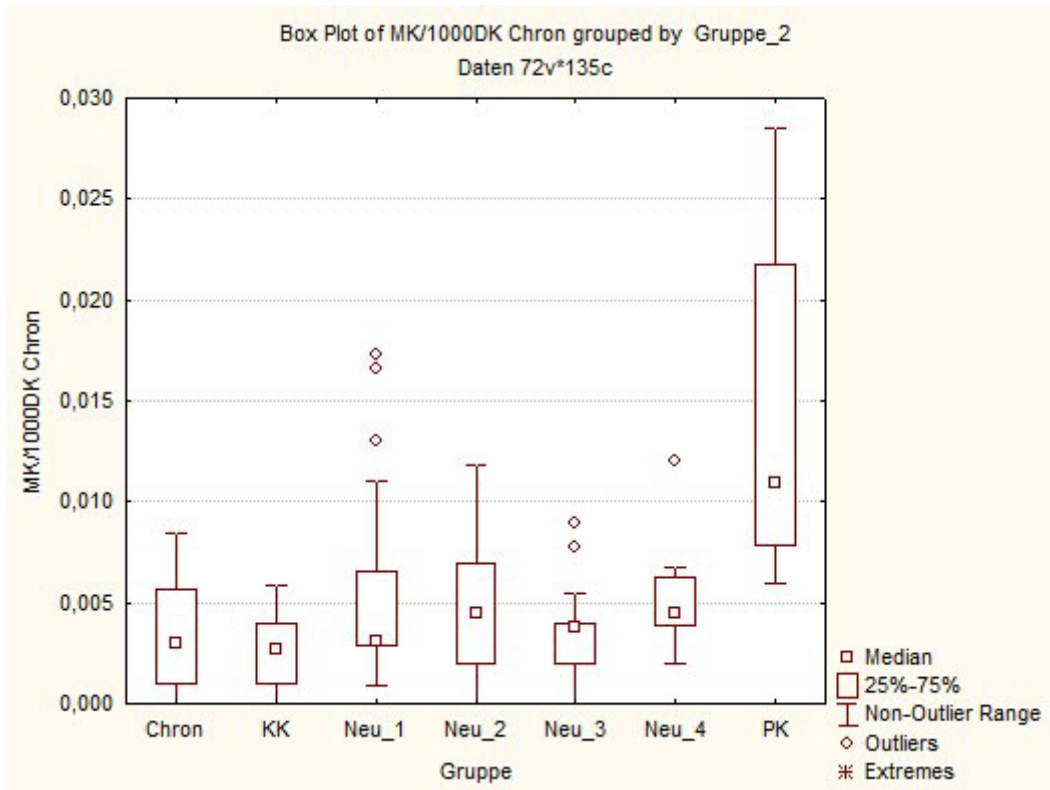


Abbildung 5: Boxplots der Mikrokern-Frequenzen aller Gruppen

Zur besseren Übersicht wurde bei den neu mit Methylphenidat therapierten Kindern zu den Zeitpunkten 2-4 jeweils der Ausgangswert der jeweiligen Kinder mit angezeigt, um die Entwicklung in den einzelnen Gruppen darzustellen (Abbildung 6).

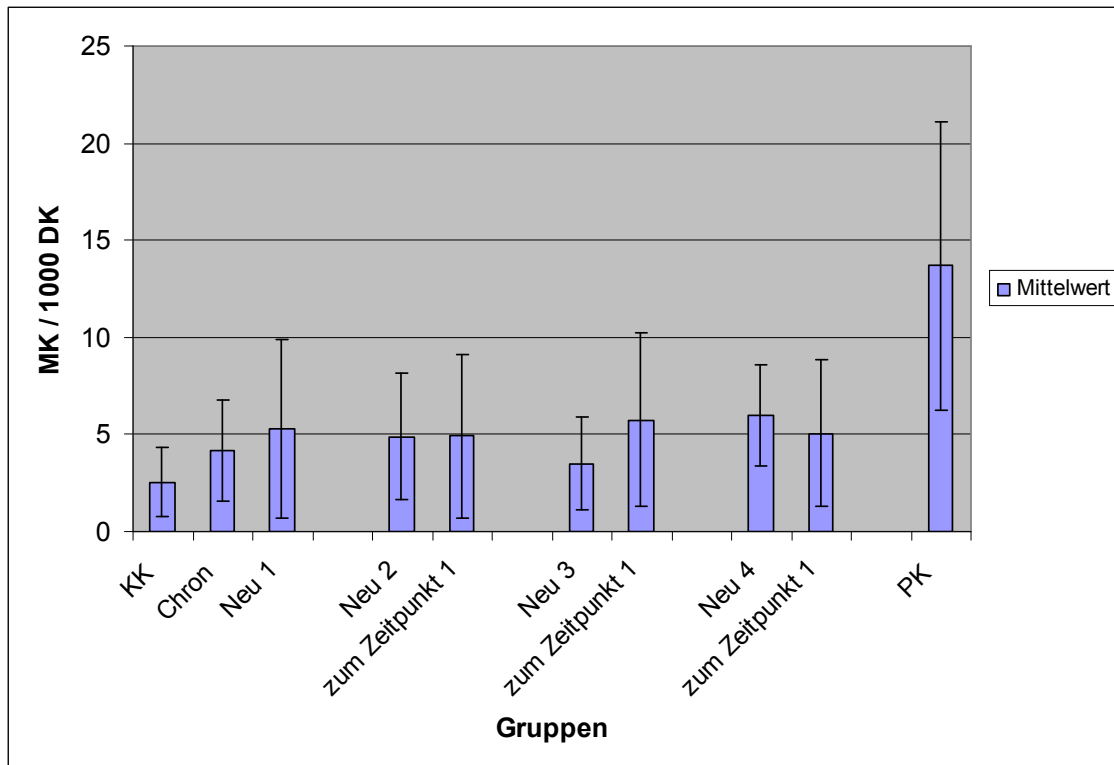


Abbildung 6: Mikrokern-Frequenzen aller Gruppen mit den jeweiligen Ausgangswerten in den NEU-Gruppen mit Mittelwert und Standardabweichung

Eine Gruppe von 12 Kindern konnte über den gesamten Zeitraum von einem Jahr beobachtet werden. Die Entwicklung der Werte dieser Gruppe zu den einzelnen Zeitpunkten 1-4 zeigt einen leichten Trend zu niedrigen Werten zum Zeitpunkt NEU 3 nach 6 Monaten, jedoch keine signifikanten Differenzen (siehe Abbildung 7).

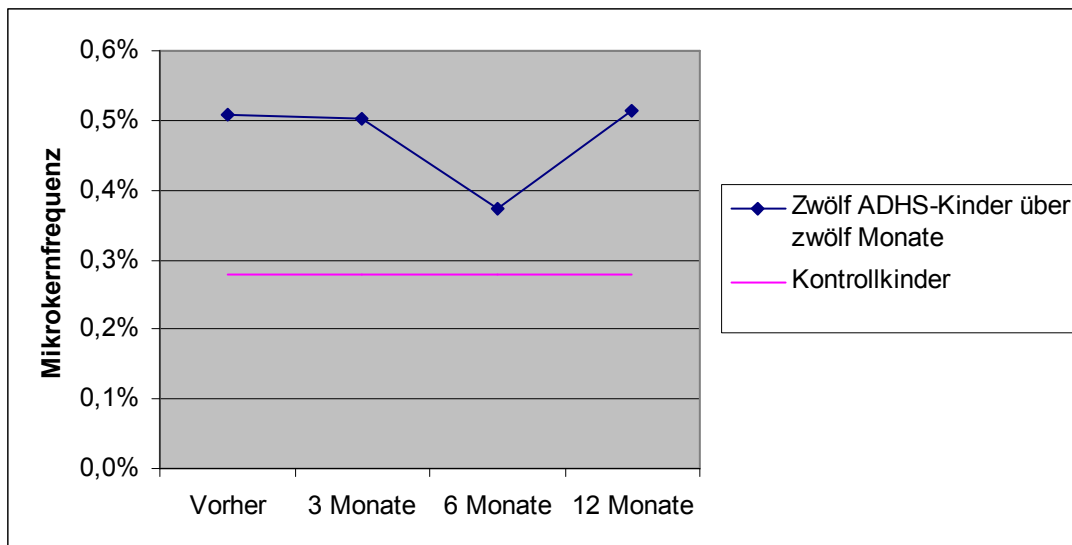


Abbildung 7: Liniendiagramm mit Mikrokernfrequenzen von zwölf ADHS-Kindern über zwölf Monate. Entwicklung der Mikrokernfrequenzen bei Kindern mit ADHS, die neu mit Methylphenidat therapiert wurden, und über einen Zeitraum von einem Jahr beobachtet werden konnten (12 Kinder), sowie durchschnittliche Mikrokernfrequenzen einer gesunden Kontrollgruppe.

Wenn man alle neu mit MPH therapierten Kinder berücksichtigt, ergeben sich für die verschiedenen Entnahmezeitpunkte unterschiedlich große Gruppengrößen, der Kurvenverlauf ändert sich jedoch nur geringfügig, auch hier ergeben sich keine signifikanten Differenzen bezüglich der Mikrokernfrequenzen (siehe Abbildung 8).

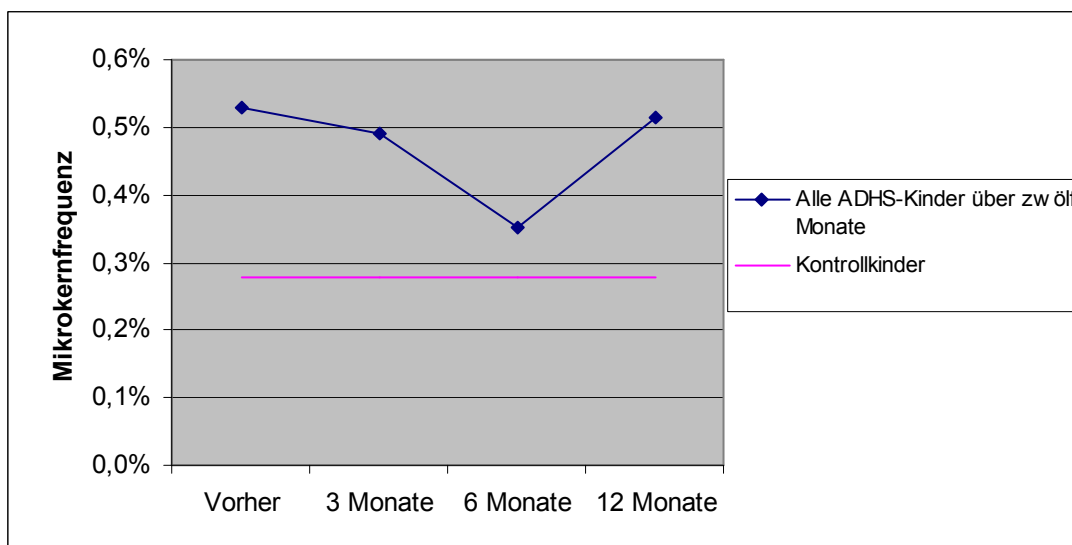


Abbildung 8: Liniendiagramm mit Mikrokernfrequenzen von allen NEU-ADHS-Kindern über zwölf Monate. Durchschnittliche Mikrokernfrequenzen von Kindern vor der Therapie mit Me-

thyphenidat (27 Kinder), nach 3 Monaten (22 Kinder), nach 6 Monaten, sowie nach 12 Monaten (13 Kinder)

Um die individuellen Werte der einzelnen Kinder im Verlauf einschätzen zu können, wurden Säulendiagramme zu den Gruppen NEU 2-4 erstellt. Je ein Diagramm enthält alle Kinder der jeweiligen NEU 2-4 (daher unterschiedliche Gruppengrößen: NEU 2 enthält 22 Kinder, NEU 3 enthält 17 Kinder, NEU 4 enthält 12 Kinder) (Abbildung 9, Abbildung 10, Abbildung 11)

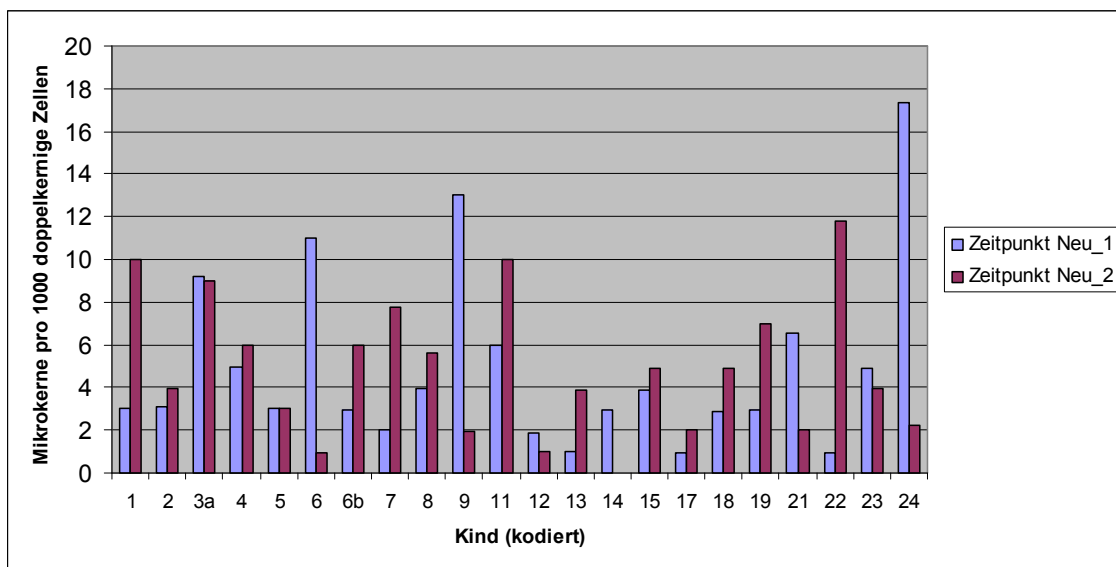


Abbildung 9: Individuelle Mikrokern-Frequenzen von 22 neu mit Methylphenidat therapierten ADHS-Kindern zum Zeitpunkt 1 (vor Methylphenidat-Therapie) und 2 (nach drei Monaten Methylphenidat-Therapie)= Gruppe NEU mit vorher Werten

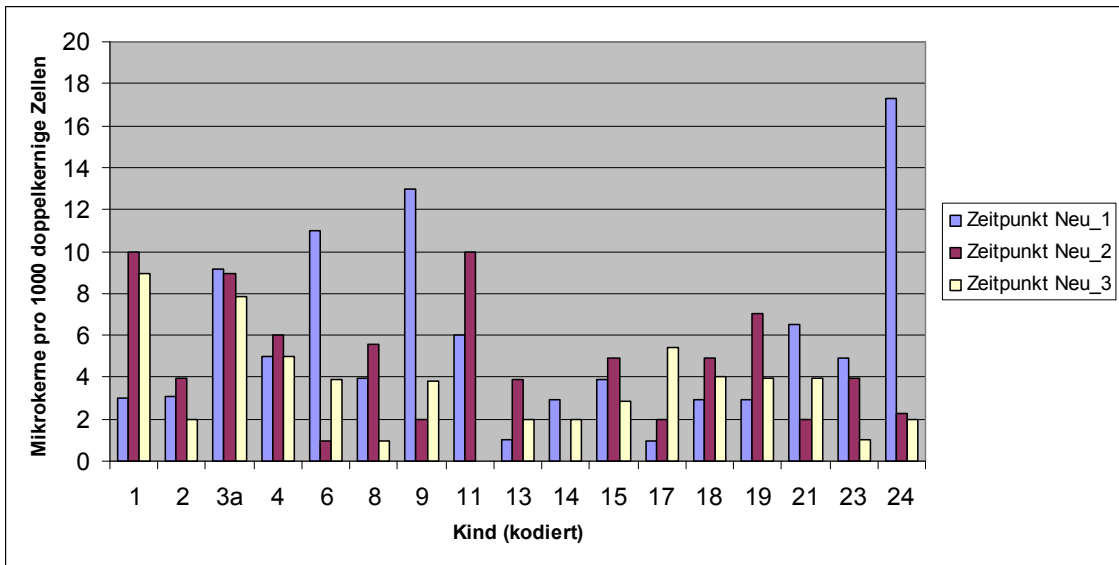


Abbildung 10: Individuelle Mikrokern-Frequenzen von 17 neu mit Methylphenidat therapierten ADHS-Kindern zum Zeitpunkt 1 (vor Methylphenidat-Therapie), 2 (nach drei Monaten Methylphenidat-Therapie) und 3 (nach sechs Monaten Methylphenidat-Therapie)= Gruppe NEU 3 mit vorher- Werten

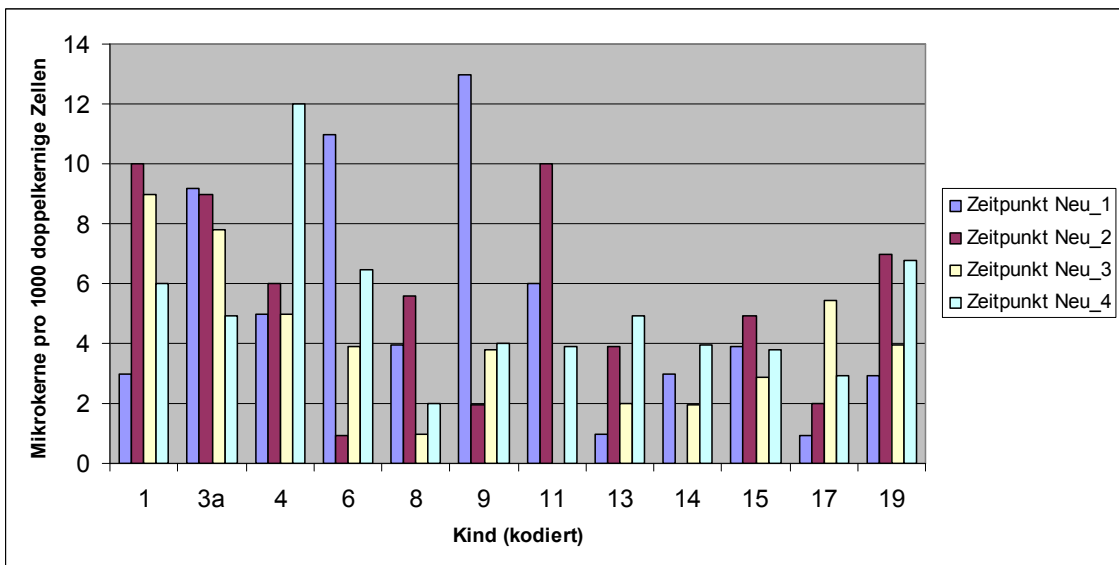


Abbildung 11: Individuelle Mikrokern-Frequenzen von 12 neu mit Methylphenidat therapierten ADHS-Kindern zum Zeitpunkt 1 (vor Methylphenidat-Therapie), 2 (nach drei Monaten Methylphenidat-Therapie), 3 (nach sechs Monaten Methylphenidat-Therapie) und 4 (nach zwölf Monaten Methylphenidat-Therapie)= Gruppe NEU 4 mit Vorher- Werten

4.4 Weitere untersuchte Lymphozytenparameter

Gruppe	1 kernig	2 kernig	3-4 kernig	Mitosen	Apoptosen	Sonstige	Proliferationsrate
Gesunde Kontrollkinder	43,00%	51,77%	0,64%	2,29%	2,29%	2,51%	1,26
	7,00%	7,00%	7,00%	0,50%	1,10%	0,90%	0,30
Chronisch mit MPH behandelte Kinder	41,08%	53,46%	1,56%	1,82%	1,82%	2,98%	1,37
	7,10%	7,00%	1,70%	0,90%	0,90%	1,80%	0,50
Neu mit MPH therapierte Kinder vor Therapiebeginn	39,67%	53,76%	1,96%	2,28%	2,28%	3,02%	1,40
	6,20%	5,70%	2,30%	1,50%	2,10%	1,80%	0,30
Neu mit MPH behandelte Kinder nach 3 Monaten	42,80%	52,36%	1,06%	2,02%	2,02%	2,33%	1,34
	10,00%	9,20%	0,70%	0,90%	1,20%	1,20%	0,60
Neu mit MPH behandelte Kinder nach 6 Monaten	39,42%	55,16%	1,29%	1,83%	1,83%	1,96%	1,46
	7,00%	7,00%	1,30%	0,90%	1,00%	1,10%	0,40
Neu mit MPH behandelte Kinder nach 12 Monaten	37,60%	56,35%	1,51%	1,85%	1,85%	2,75%	1,59
	7,90%	8,30%	1,80%	1,10%	1,00%	1,80%	0,50
Alle	40,87%	53,53%	1,34%	2,05%	2,05%	2,62%	1,39
	7,60%	7,30%	1,60%	1,10%	1,30%	1,50%	0,40

Tabelle 3: Weitere untersuchte Lymphozytenparameter in % pro 1000 ausgezählte doppelkernige Lymphozyten mit Standardabweichung

Bei der Auswertung der Lymphozytenpräparate wurde neben der Mikrokernrate auch die Anzahl von Lymphozyten mit einem, zwei oder mehr als zwei Zellkernen bestimmt, ferner die Häufigkeit von Mitosen und Apoptosen. Bei den Mikrokernen wurde unterschieden, ob ein einzelner oder multiple Mikrokerne in einem doppelkernigen Lymphozyten vorlagen. Der betrachtete Endpunkt war die Genomintegrität der Zelle, daher wurde eine Zelle sowohl mit einem als auch mit mehreren Mikrokernen gleichermaßen als geschädigt gewertet. Unter der Kategorie Sonstiges wurden die Lymphozyten subsummiert, die entweder destruiert waren oder nicht sicher einer der anderen Kategorien zugeordnet werden konnten (siehe Tabelle 3). Das Verhältnis von doppelkernigen zu einkernigen Lymphozyten – im Folgenden als Proliferationsrate bezeichnet – betrug minimal $1,26 \pm 0,3$ und maximal $1,59 \pm 0,5$. Die Proliferationsrate aller Proben lag bei $1,39 \pm 0,4$. Für die Gruppe Kontrollkinder lag sie bei $1,26 \pm 0,3$, für die Gruppe CHRON bei $1,37 \pm 0,5$, und für die Gruppe NEU 1-4 bei $1,4 \pm 0,3$ bis $1,59 \pm 0,5$.

Zwischen der Höhe der Proliferationsrate und der Dauer der Therapie mit MPH war kein Zusammenhang festzustellen. Die durchschnittliche Anzahl an Lymphozyten mit

mehr als zwei Zellkernen lag pro tausend ausgewerteter Zellen bei $1,34\% \pm 1,6$ (Kontrollkinder $0,64\% \pm 7,0$, CHRON $1,56\% \pm 1,7$, NEU 1 $1,96\% \pm 2,3$, NEU 2 $1,06\% \pm 0,7$, NEU 3 $1,29\% \pm 1,3$, NEU 4 $1,51\% \pm 1,8$). Die höchste Anzahl mehrkerniger Zellen betrug $1,96\% \pm 2,3$, die niedrigste $0,64\% \pm 7$.

Pro tausend ausgewerteter Zellen wurden zwischen 19 und 30 Apoptosen gezählt, der Mittelwert aller Kinder lag bei $20,5 \pm 13$ Apoptosen (Kontrollkinder $22,9 \pm 11$, CHRON $18,2 \pm 9$, NEU 1 $22,8 \pm 21$, NEU 2 $20,2 \pm 12$, NEU 3 $18,3 \pm 10$, NEU 4 $18,5 \pm 10$).

Die Anzahl von Mitosen pro 1000 ausgewerteter Lymphozyten schwankte zwischen $18,3 \pm 9$ und $22,9 \pm 5$, wobei der Gesamt-Mittelwert $20,5 \pm 11$ betrug (Kontrollkinder $22,9 \pm 5$, CHRON $18,2 \pm 9$, NEU 1 $22,8 \pm 10$, NEU 2 $20,2 \pm 9$, NEU 3 $18,3 \pm 9$, NEU 4 $18,5 \pm 11$).

In die Rubrik Sonstiges wurden zwischen $19,6 \pm 4$ und $30,2 \pm 18$ Zellen eingeordnet, der Durchschnitt lag bei $26,2 \pm 15$.

4.5 Vergleich der Mikrokernfrequenzen mit Kontrollpersonen

4.5.1 CHRON und KK

Die Anzahl der mikrokernhaltigen Zellen zwischen den Kindern aus der gesunden Kontrollgruppe sowie der an ADHS erkrankten Kinder, die chronisch mit MPH behandelt wurde, waren nicht signifikant unterschiedlich, obwohl die Kinder, die chronisch mit MPH behandelt worden waren, wie oben erwähnt, die höchsten MPH-Dosen ($0,81 \pm 0,3$ mg/kg KG/d) erhielten.

4.5.2 NEU zum Zeitpunkt 1-4 und KK

Der einzige signifikante Unterschied konnte beobachtet werden zwischen der gesunden Kontrollgruppe (KK) und den an ADHS erkrankten Kindern zum Zeitpunkt 1 (NEU 1), also bevor sie mit MPH therapiert wurden ($p=0,013$), sowie zum Zeitpunkt 2 (NEU 2) ($p=0,009$) und NEU 4 ($p=0,002$). Hier zeigte die Gruppe der gesunden Kontrollkinder

signifikant erniedrigte Mikrokernfrequenzen. Die Mikrokernfrequenzen der Kinder mit ADHS vor Therapiebeginn mit MPH waren mehr als doppelt so hoch ($5,3 \pm 4,6$ anstatt $2,5 \pm 1,8$).

Davon abgesehen gab es über die Zeiträume 1-4 gesehen, bei den Kindern mit ADHS, die neu mit MPH therapiert worden waren, keine signifikanten Veränderungen bezüglich der Mikrokernfrequenz jeweils im Vergleich mit den gesunden Kontrollkindern, sowie im Längsvergleich. Dies gilt sowohl für die statistische Berechnung unter Einschluss von statistisch erhöhten Einzelwerten (Ausreißern), als auch für die ausreißerbereinigte Statistik.

4.6 Vergleich der Mikrokernfrequenzen von ADHS- Kindern

4.6.1 NEU zum Zeitpunkt 1-4

Die Mikrokernfrequenzen zu den jeweiligen Zeitpunkten 1-4 wurden verglichen mit dem Wilcoxon matched paired sample test für abhängige Stichproben.

Hier ergab sich kein signifikanter Anstieg der Mikrokernfrequenzen über die Zeit (Vergleich NEU 1 mit NEU 2, 3 und 4, Vergleich NEU 2 mit NEU 3 und 4, Vergleich NEU 3 mit NEU 4).

Es lässt sich jedoch ein Trend zu eher hohen Werten zum Zeitpunkt NEU 1, also vor Beginn der MPH-Therapie, feststellen, sowie zu eher niedrigen MK-Frequenzen zum Zeitpunkt NEU 3, also nach 6 Monaten.

In diesem Zusammenhang kann erwähnt werden, dass, obwohl die Rekrutierung der Patienten kontinuierlich über das ganze Jahr und über mehrere Jahre verteilt erfolgte und die Kinder sich jeweils an unterschiedlichen Zeitpunkten ihres Therapieregimes befanden, dennoch 40% der Kinder zum Zeitpunkt NEU 1, also vor Beginn ihrer Therapie, im Winter Blut abgaben. Nach 6 Monaten der Therapie gaben lediglich 3 Kinder Blutproben im Winter ab (17,6%).

4.6.2 CHRON und NEU zum Zeitpunkt 1

Die Mikrokernfrequenzen zu den jeweiligen Zeitpunkten 1-4 wurden mit der Gruppe der chronisch mit MPH therapierten Kinder verglichen mit Wilcoxon two sample test für unabhängige Stichproben. Hier ergab sich kein signifikanter Unterschied zwischen den MK-Frequenzen.

4.7 Mikrokernfrequenz und Geschlecht

Da in verschiedenen Studien für Frauen erhöhte Mikrokernraten gefunden wurden, wurde auch im Rahmen dieser Studie auf einen möglichen Effekt durch das Geschlecht geachtet. Es konnte jedoch kein signifikanter Unterschied gefunden werden bezüglich der Mikrokernfrequenzen von männlichen und weiblichen Studienteilnehmern.

Lediglich erwähnenswert ist, dass alle Gruppen, in denen an ADHS erkrankte Kinder untersucht wurden, zu einem Großteil aus Jungen bestanden (75-83%). Nur die Gruppe der Kontrollkinder zeigte ein einigermaßen ausgeglichenes Geschlechterverhältnis mit 54% männlichen Kindern. Um einen Einfluss des Geschlechts auf die Mikrokernfrequenz zusätzlich zu dem zu untersuchenden Effekt des MPH ausschließen zu können, wurden hier zunächst eine Gruppe erstellt und angeschaut, die nur aus Patienten bestand, welche kein MPH einnahmen (KK und NEU 1).

Außerdem wurde der Einfluss des Geschlechts auf die Mikrokernfrequenzen bei allen Probanden untersucht. Auch hier konnte kein signifikanter Effekt beschrieben werden.

Dies veranschaulichen Abbildung 12, Abbildung 13, Abbildung 14, Abbildung 15 und Abbildung 16.

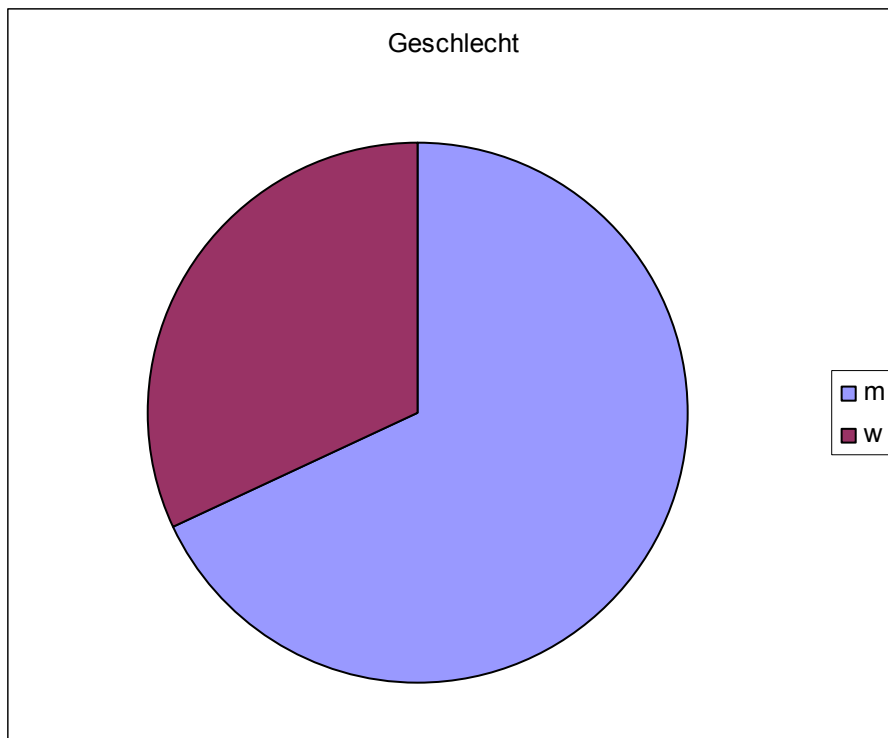


Abbildung 12: Verteilung des Geschlechts NEU zum Zeitpunkt 1 (vor Methylphenidat-Therapie) und gesunde Kontrollkinder.

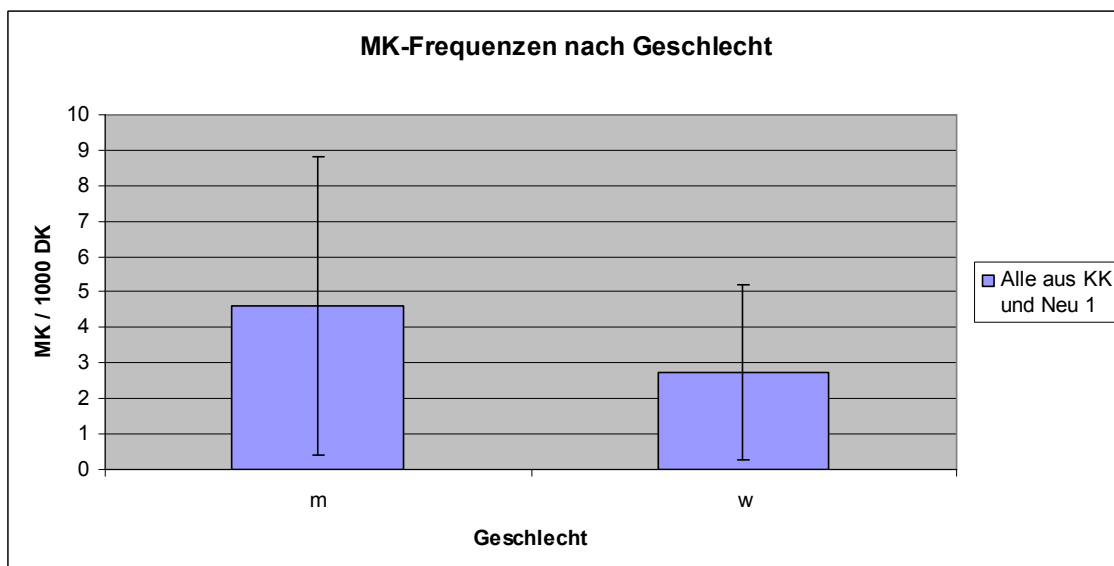


Abbildung 13: MK-Frequenzen aller nicht mit Methylphenidat therapierten Kinder: NEU zum Zeitpunkt 1 (vor Methylphenidat-Therapie), und gesunde Kontrollkinder mit Mittelwert und Standardabweichung

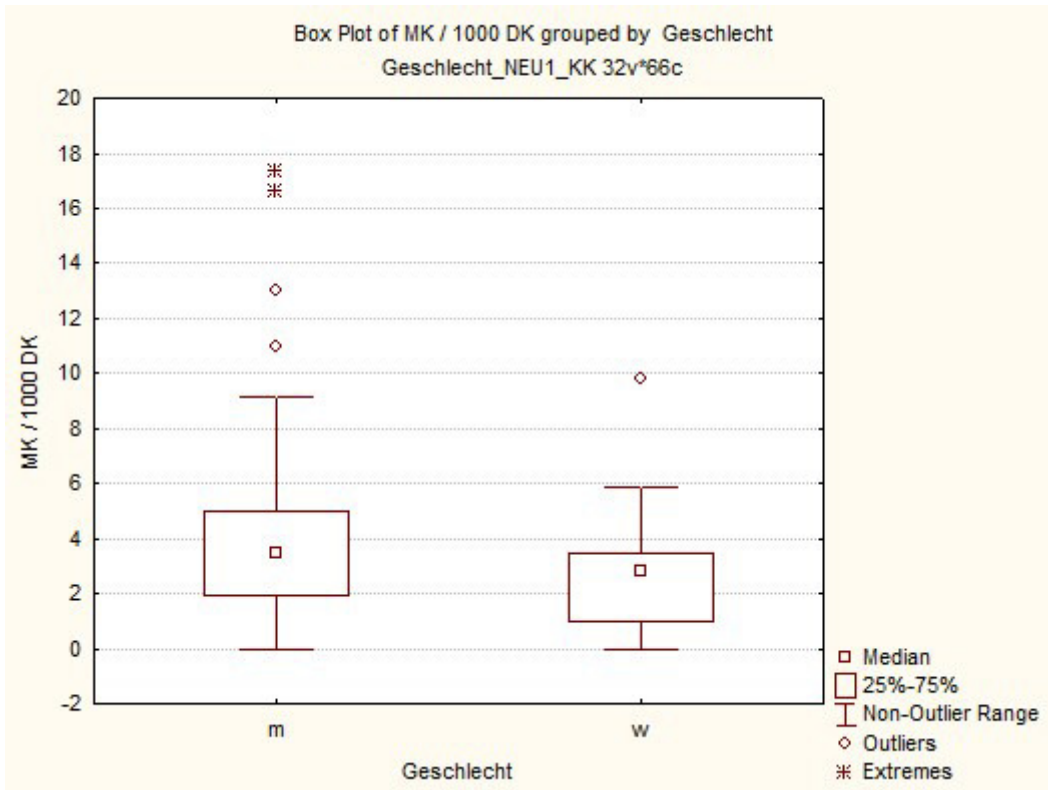


Abbildung 14: Boxplot der Mikrokern-Frequenzen aller nicht mit Methylphenidat therapierten Kinder: NEU zum Zeitpunkt 1 (vor Methylphenidat-Therapie), und gesunde Kontrollkinder

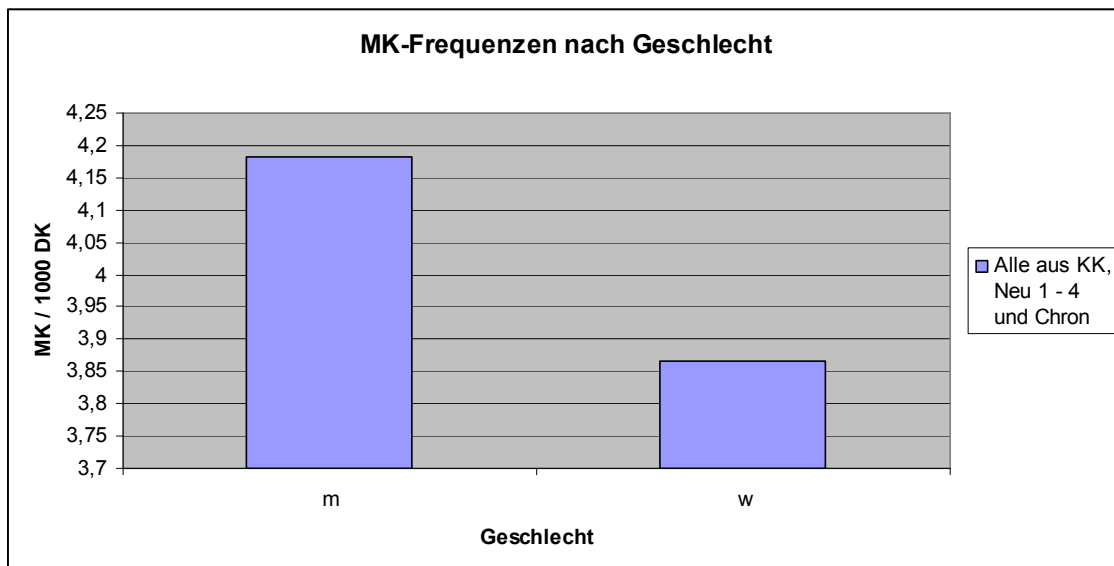


Abbildung 15: Mikrokern-Frequenzen nach Geschlecht aller Kinder (NEU: jedes Kind zu allen verfügbaren Zeitpunkten und damit bis zu 4mal vertreten) NEU zum Zeitpunkt 1 (vor Methylphenidat-Therapie), 3 (nach sechs Monaten Methylphenidat-Therapie) und 4 (nach zwölf Monaten Methylphenidat-Therapie), gesunde Kontrollkinder und chronisch mit Methylphenidat therapierte Kinder.

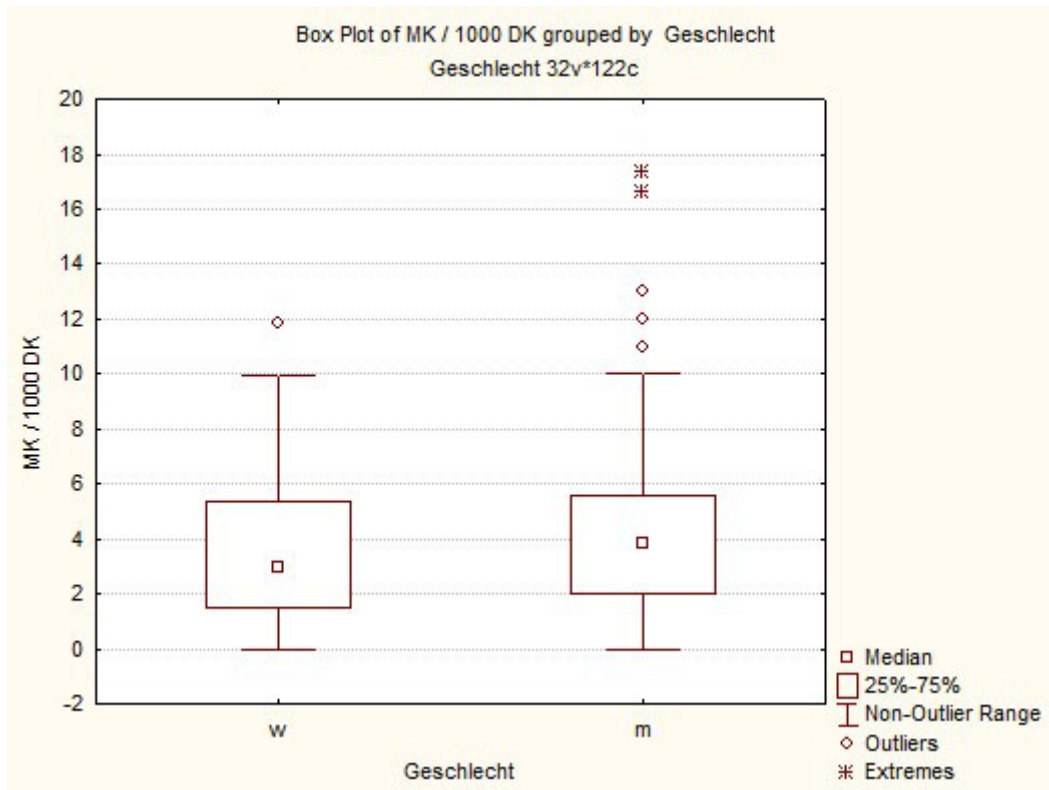


Abbildung 16: Boxplot der Mikrokern-Frequenzen nach Geschlecht aller Kinder (NEU: jedes Kind zu allen verfügbaren Zeitpunkten und damit bis zu 4mal vertreten) NEU zum Zeitpunkt 1 (vor Methylphenidat-Therapie), 3 (nach sechs Monaten Methylphenidat-Therapie) und 4 (nach zwölf Monaten Methylphenidat-Therapie), gesunde Kontrollkinder und chronisch mit Methylphenidat therapierte Kinder

4.8 Mikrokernfrequenz und Alter

Da Mikrokernkerne einen Anstieg mit dem Alter zeigen (Bolognesi, Lando et al. 1999; Bonassi, Fenech et al. 2001), wurde in dieser Studie ebenfalls versucht, die Mikrokernfrequenzen auf das Alter zu beziehen.

Es muss aber erwähnt werden, dass der Bereich von 5-17 Jahren, in dem sich unsere Kinder befanden, sehr klein ist, und eher ungeeignet erscheint, den bewiesenen signifikanten Anstieg der Mikrokernkerne über das ganze Leben abzubilden. Dennoch wurde das Alter berücksichtigt, um es als beeinflussenden Faktor auf die Mikrokernkerne ausschließen zu können, und um zu unterstreichen, dass zumindest in unserer Stichprobe Kinder von 5-17 Jahren durchaus verglichen werden können, da die Frequenzen sich durch das Alter

nicht signifikant verändert haben. Da das Alter als ein die Mikrokernfrequenzen beeinflussender Faktor neben dem Faktor der MPH-Therapie ausgeschlossen werden sollte, wurde eine Gruppe von Kindern gebildet, welche kein MPH erhalten hatte. In dieser Gruppe fanden sich die gesunden Kontrollkinder, also Kinder ohne ADHS, sowie die neu mit MPH therapierten ADHS-Kinder vor Therapiebeginn. Demzufolge bestand diese Gruppe aus Kindern mit und ohne ADHS. Die meisten Kinder in dieser künstlichen Gruppe waren 9 Jahre alt, der Großteil (68%) der Kinder befand sich in der Altersgruppe zwischen 7-10 Jahren (siehe Abbildung 17).

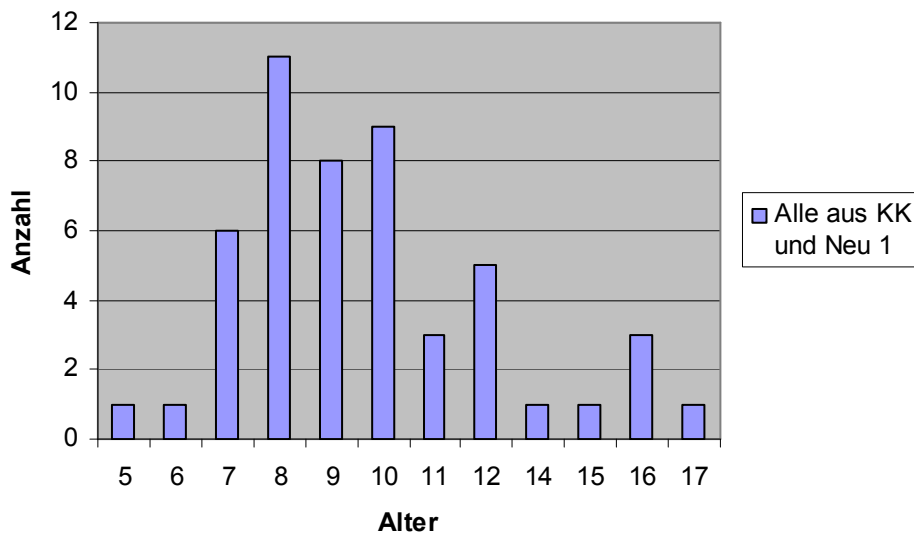


Abbildung 17: Verteilung des Alters aller nicht mit Methylphenidat therapierten Kinder: NEU zum Zeitpunkt 1 (vor Methylphenidat-Therapie), und gesunde Kontrollkinder.

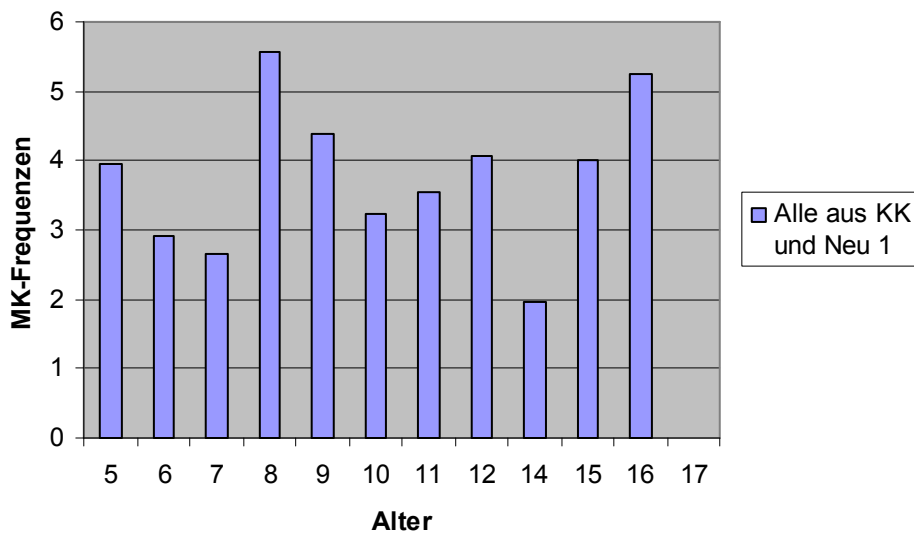


Abbildung 18: Mikrokern-Frequenzen aller nicht mit Methylphenidat therapierten Kinder: NEU zum Zeitpunkt 1 (vor Methylphenidat-Therapie), und gesunde Kontrollkinder

Es konnte kein Anstieg der MK-Frequenzen über das Alter beobachtet werden (Abbildung 18).

Zur Ergänzung wurde noch eine Übersicht über alle Proben aller Probanden angefügt. Da die prospektiv beobachteten NEU-Kinder zu jeder Blutentnahme unterschiedlich alt waren, wurden sie auch mehrfach, entsprechend des jeweiligen Alters, berücksichtigt. Auch über die gesamte Untersuchung betrachtet liegen die meisten Kinder (79%) im Bereich zwischen 7-11 Jahre (Abbildung 19).

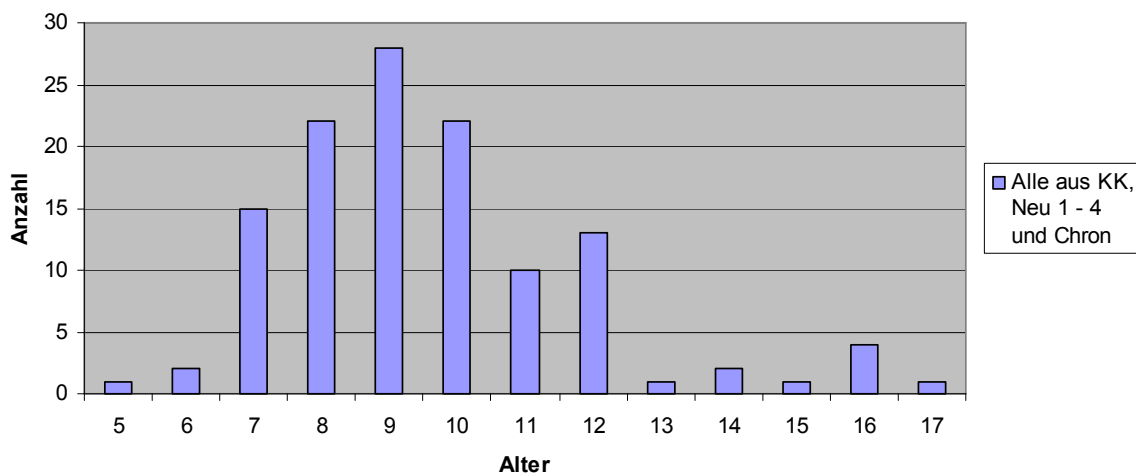


Abbildung 19: Verteilung des Alters aller Kinder (NEU: jedes Kind zu allen verfügbaren Zeitpunkten und damit bis zu 4mal vertreten) NEU zum Zeitpunkt 1 (vor Methylphenidat-Therapie), 3 (nach

sechs Monaten Methylphenidat-Therapie) und 4 (nach zwölf Monaten Methylphenidat-Therapie), gesunde Kontrollkinder und chronisch mit Methylphenidat therapierte Kinder.

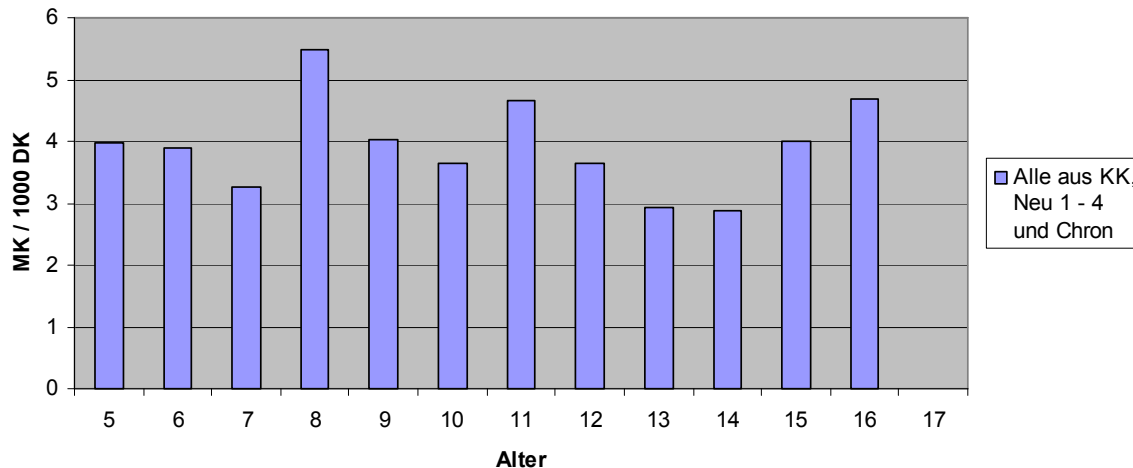


Abbildung 20: Mikrokernel-Frequenzen aller Kinder (NEU: jedes Kind zu allen verfügbaren Zeitpunkten und damit bis zu 4mal vertreten) NEU zum Zeitpunkt 1 (vor Methylphenidat-Therapie), 3 (nach sechs Monaten Methylphenidat-Therapie) und 4 (nach zwölf Monaten Methylphenidat-Therapie), gesunde Kontrollkinder und chronisch mit Methylphenidat therapierte Kinder

Die Mikrokernelfrequenz der einzelnen Kinder scheint auch hier mit dem Alter nicht anzusteigen (Abbildung 20).

4.9 Mikrokernelfrequenz und Jahreszeit

Der Anteil der Kinder, die Ihre Blutproben im Winter abgaben, wird hier aufgeführt, da Erkältungen, welche das Immunsystem schwächen und die Mikrokernelfrequenz erhöhen können (Fenech 2000), gehäuft in den kalten Jahreszeit auftreten. Als Winter wird hier der meteorologischen Einteilung folgend der Zeitraum ab 1. Dezember bis zum vollendeten Februar (Häckel 2008) gewählt.

Insgesamt gab es keinen signifikanten Zusammenhang zwischen dem Zeitpunkt der Blutentnahme und der Mikrokernelfrequenz. Der Anteil der Kinder, die im Winter getestet wurden, lag bei 40% in der Gruppe NEU 1, 9% in der Gruppe NEU 2, 18% in der Gruppe NEU 3, sowie bei 16% in Gruppe NEU 4.

In der Kontrollgruppe erfolgten alle Blutentnahmen im Zeitraum zwischen dem 1.10.2007 und dem 2.11.2007, also alle im meteorologischen Herbst.

In der Gruppe der chronisch mit MPH therapierten Kinder erfolgten lediglich 4% der Blutentnahmen im Winter.

4.10 Mikrokernfrequenzen und Raucherstatus

Ein weiterer die Mikrokernfrequenz potentiell beeinflussender Faktor ist Tabakrauch (Baier, Stopper et al. 2002). Daher wurde in der Anamnese der Kinder erfragt, ob sie selber rauchen oder aus Raucherhaushalten kamen. Aktives Rauchen war ein Ausschlusskriterium für diese Studie. Die Exposition mit Tabak durch Passivrauchen war jedoch kein Ausschlusskriterium und soll im Folgenden untersucht werden.

Dafür wurde das Verhältnis von Passivrauchern zu Nichtrauchern in den folgenden Kreisdiagrammen jeweils für die verschiedenen Gruppen dargestellt. In der Gruppe der neu mit MPH therapierten Kinder wurde nur der Zeitpunkt NEU 1 berücksichtigt, da einerseits davon ausgegangen wurde, dass sich die Exposition/Nichtexposition des gleichen Kindes innerhalb eines Zeitraumes von maximal einem Jahr nicht verändert hat, und da andererseits in dieser Untergruppe die höchsten Mikrokernfrequenzen gefunden wurden, so dass auf ihr ein besonderes Augenmerk liegt (Abbildung 21).

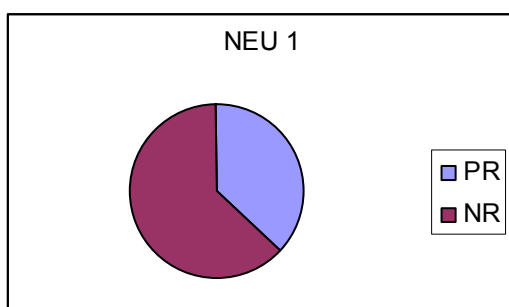


Abbildung 21: Verhältnis von Nichtrauchern zu Passivrauchern von neu mit Methylphenidat therapierten Kindern zum Zeitpunkt 1 (vor Methylphenidat-Therapie).

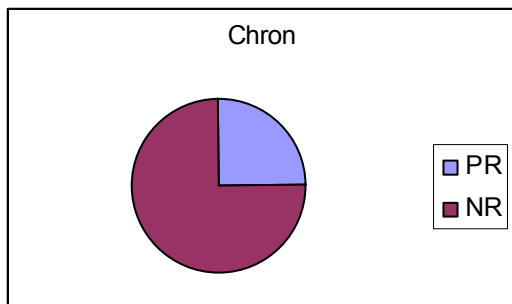


Abbildung 22: Verhältnis von Nichtrauchern zu Passivrauchern von chronisch mit Methylphenidat therapierten Kindern

In den Gruppen der chronisch mit MPH therapierten Kindern (siehe Abbildung 22) und der neu mit MPH zu therapierenden Kinder zum Zeitpunkt 1 (Abbildung 21) lag der Anteil der passiv Rauch ausgesetzten Kinder etwa bei einem Anteil von 25% bzw. 37%. Damit lag die absolut gesehen höchste Mikrokernfrequenz auch in der Gruppe der Kinder, in denen ein großer Anteil Tabakrauch ausgesetzt war (NEU 1). Die gleichen Kinder hatten jedoch zum Zeitpunkt nach 6 Monaten wieder sehr niedrige Werte, obwohl immer noch 35% Tabakrauch ausgesetzt waren. Keiner der auffälligen Werte war signifikant erhöht im Vergleich mit den anderen Werten desselben Kindes.

Am niedrigsten war der Anteil der Passivraucher in der Gruppe der gesunden Kontrollkinder mit 13%. Hier fanden sich absolut gesehen auch die niedrigsten Mikrokernfrequenzen. Auch dieses Ergebnis war nicht signifikant (Abbildung 23).

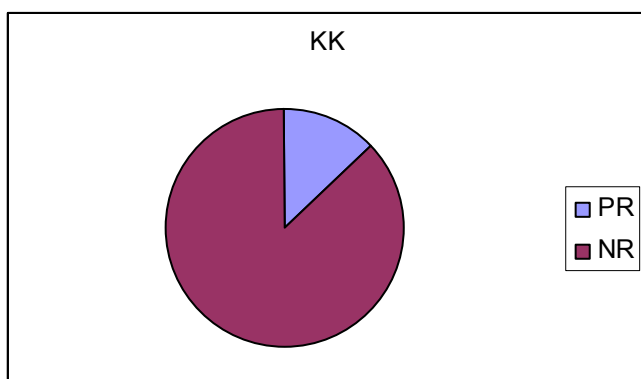


Abbildung 23: Verhältnis von Nichtrauchern zu Passivrauchern von gesunden Kontrollkindern.

Im Schnitt hatten im direkten Vergleich die Nichtraucher keine signifikant erniedrigten Mikrokernfrequenzen, wie aus Abbildung 25 ersichtlich. Lediglich ein Trend zu niedri-

geren Mikrokernen in der Nichtrauchergruppe kann für die Gruppe der chronisch mit MPH therapierten Patienten sowie für die Kontrollkinder postuliert werden. In der Gruppe NEU 1 finden sich sogar absolut gesehen ein Trend zu höheren Mikrokernraten bei den Nichtrauchern. Man beachte jedoch in Abbildung 24 die Skalierung, die sehr kleinschrittig gewählt ist, und dadurch einen größeren Unterschied suggeriert. Im Boxplot zeigt sich dann, dass keine der beobachteten Differenzen signifikant ist (Abbildung 25).

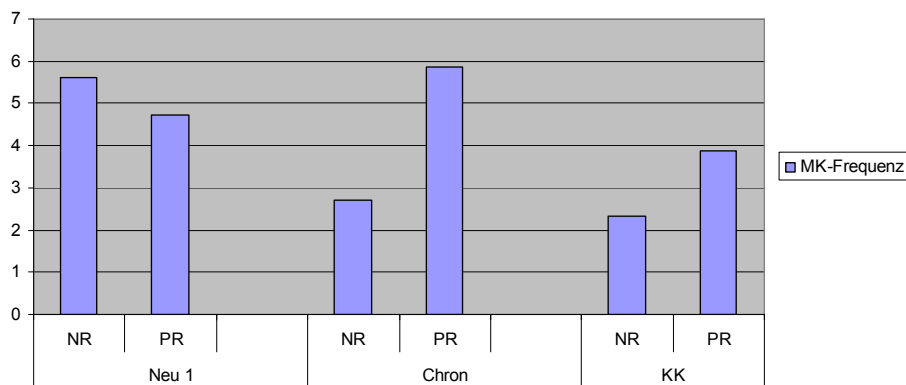


Abbildung 24: Säulendiagramm Mikrokern-Frequenzen (pro 1000 doppelkernige Zellen, absolut) von Nichtrauchern und Passivrauchern in den Gruppen: neu mit Methylphenidat therapierte Kinder zum Zeitpunkt 1 (vor Methylphenidat-Therapie), chronisch mit Methylphenidat therapierte Kinder, gesunde Kontrollkinder

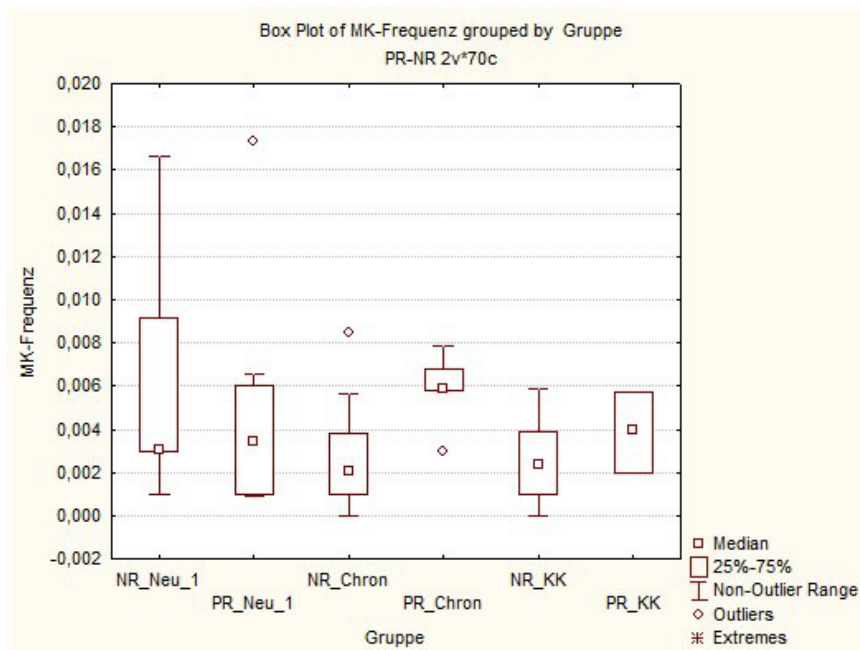


Abbildung 25: Boxplots zu den Mikrokern-Frequenzen von Nichtrauchern und Passivrauchern in den Gruppen: neu mit Methylphenidat therapierte Kinder zum Zeitpunkt 1 (vor Methylphenidat-Therapie), chronisch mit Methylphenidat therapierte Kinder, gesunde Kontrollkinder

4.11 NEU 4 doppelte Auswertung (1, 3 und 4)

Die Langzeitdaten zur MPH-Therapie sind nach wie vor spärlich. Wir konnten eine Gruppe von 12 Kindern über einen Zeitraum von 12 Monaten nach Beginn der MPH-Therapie beobachten. Es wurden bei diesen 12 Kinder zusätzlich zu den Zeitpunkten 1, 3 und 4 immer je 2 Objektträger, die aus der gleichen Blutprobe gewonnen worden waren, ausgewertet und der Mittelwert aus beiden Objektträgern berechnet. Die Auswertung der Daten war bei Publikation der Studie von Walitza et al. (Walitza, Kampf et al. 2009) noch nicht beendet. Von ursprünglich 13 Kindern, die zum Zeitpunkt nach 12 Monaten noch an der Studie teilnahmen und von denen verwertbare Daten erbracht werden konnten, konnten nur von 12 Kindern zwei verwertbare Objektträger zu allen Zeitpunkten gefunden werden. Zu einem Kind (Neu15) fanden wir zum Zeitpunkt 1 und 3 nur einen auszählbaren Objektträger, die anderen waren beschädigt worden bzw. nicht auswertbar. Zwei Kinder (NEU 21, NEU 23) hatten zum Zeitpunkt 4 (nach 12 Monaten) keinen Objektträger, da die Studie hier bereits beendet war. Ein Kind (NEU 2) hatte im ersten Objektträger zum Entnahmezeitpunkt NEU 4 einen signifikant erhöhten Wert.

Zum Umgang mit statistischen Ausreißern siehe Kapitel 4.2.2. Die Gruppengröße variierte demnach von 14 Kindern zum Zeitpunkt 1, 14 Kinder zum Zeitpunkt 3, 13 Kinder zum Zeitpunkt 4. Nur 12 Kinder gaben 2 Objektträger zu allen Zeitpunkten ab (Abbildung 27).

Somit konnten von 12 Kindern verwertbare Daten zu allen Zeitpunkten 1, 3 und 4 (also vor MPH-Therapie, nach 6 Monaten und nach 12 Monaten) berücksichtigt werden. Mikrokernfrequenzen (Mittelwert, Median) siehe Abbildung 26.

Auch in diesem Probandenkollektiv konnte keine Erhöhung der Mikrokernfrequenz über den beobachteten Zeitraum gefunden werden. Lediglich der Trend zu niedrigeren Mikrokernfrequenzen zum Zeitpunkt NEU 3, also nach einem halben Jahr, kann auch hier wieder beobachtet werden.

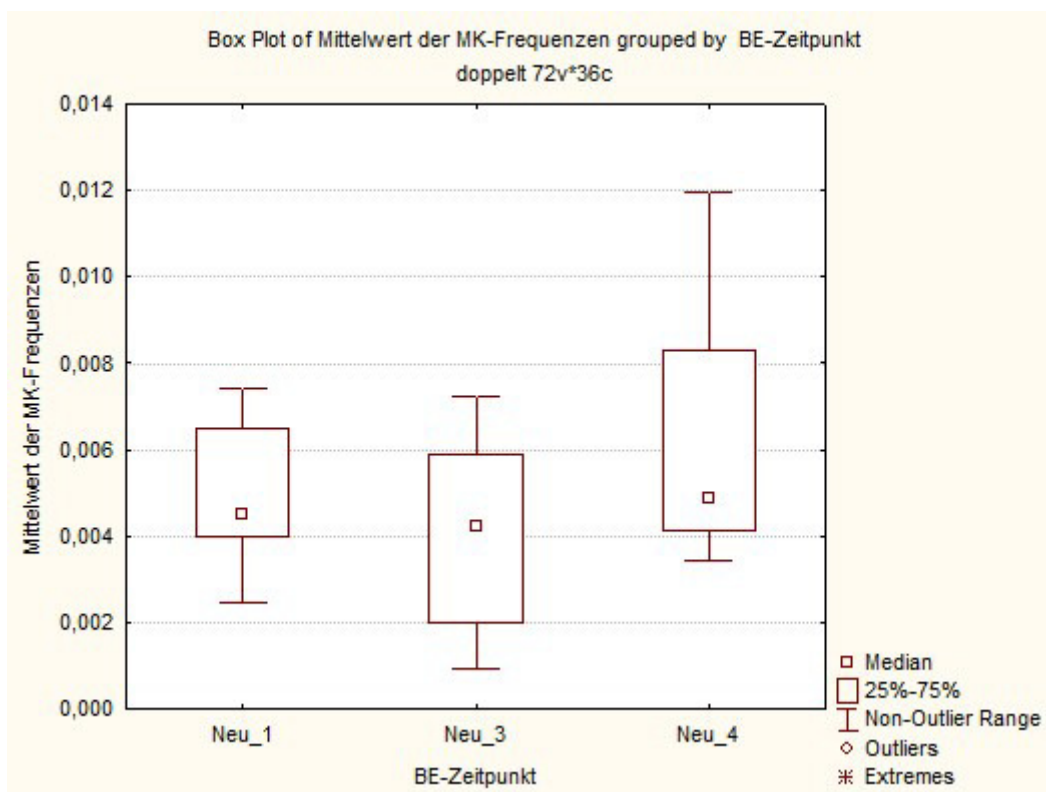


Abbildung 26: Boxplots der Mittelwerte aus zwei Objektträgern der Mikrokerne von zwölf neu mit Methylphenidat therapierten Kindern zum Zeitpunkt 1 (vor Methylphenidat-Therapie), 3 (nach sechs Monaten Methylphenidat-Therapie) und 4 (nach zwölf Monaten Methylphenidat-Therapie)

Gruppe	Anzahl	Alter (Jahren) avg +- sd (range)	Geschlecht (m/w) (%m)	MPH-Dosis (mg/kg KG/d) avg +- sd (range)	Mittelwert CBPI-Index	Mittelwert Mkhaltige Zellen/1000 doppelkernige
Neu mit MPH therapierte Kinder vor Therapiebeginn	12	8.1±1.0 (7-10)	11m/1w (92)	---	1.6±0.1	5.0±1.6
Neu mit MPH behandelte Kinder nach 6 Monaten				0.51±0.31 (0.22-1.35)	1.6±0.1	4.0±2.2
Neu mit MPH behandelte Kinder nach 12 Monaten				0.51±0.29 (0.20-1.30)	1.6±0.1	6.3±3.2

Abbildung 27 Charakterisierung des Probandenkollektivs von zwölf neu mit Methylphenidat therapierten Kindern: Mittelwerte aus zwei Objekträgern zum Zeitpunkt 1 (vor Methylphenidat-Therapie), 3 (nach sechs Monaten Methylphenidat-Therapie) und 4 (nach zwölf Monaten Methylphenidat-Therapie).

4.12 Zusammenfassung

Die Gruppe der Kontrollkinder zeigte insgesamt niedrigere Mikrokernfrequenzen. Im Vergleich mit den Gruppen NEU 1, NEU 2 und NEU 4 war dieser Unterschied signifikant. In der Publikation von Walitza et al. (Walitza, Kampf et al. 2009) von 2009 war lediglich der Vergleich Kontrollkinder mit NEU 1 signifikant gewesen, allerdings war hier aufgrund der noch laufenden Rekrutierung von Probanden die Datengrundlage nicht die gleiche. Im Vergleich zwischen den chronisch mit MPH therapierten sowie den gesunden Kontrollkindern fand sich kein signifikanter Unterschied (KK/CHRON). Auch im Vergleich der chronisch mit MPH therapierten Kindern mit den neu mit MPH behandelten/zu behandelnden Kindern (CHRON/NEU 1-4) fanden sich keine signifikanten Unterschiede. Ebenso gab es keine signifikanten Unterschiede im Längsvergleich der Gruppen NEU 1-4, in dem jede Gruppe mit sich selbst über die Zeit verglichen wird. Unter MPH-Therapie stiegen die Mikrokernfrequenzen also nicht an. ADHS-Kinder ohne MPH-Therapie (NEU 1) sowie nach Beginn einer Therapie mit MPH (NEU 2-4) zeigten im Vergleich mit chronisch mit MPH therapierten Patienten (CHRON) keine signifikanten Unterschiede. Eine Zusammenfassung zeigt Tabelle 4.

Richtung	Vergleich MK-Frequenzen				
	Vergleich	Objektträger (OT) 1		Mittelwert OT 1, OT 2	
		Probanden-Kollektiv	ohne stat. Ausreisser	Probanden-Kollektiv	ohne stat. Ausreisser
Quer p-Werte des Mann-Whitney U-Test	Chron - KK	0,193	0,282		
	Neu1 - KK	0,022	0,012	0,001	0,000
	Neu2 - KK	0,017	0,008		
	Neu3 - KK	0,275	0,182	0,084	0,028
	Neu4 - KK	0,002	0,002	0,000	0,001
	Neu1 - Chron	0,458	0,192		
	Neu2 - Chron	0,317	0,129		
	Neu3 - Chron	0,794	0,839		
	Neu4 - Chron	0,104	0,069		
Längs Wilcoxon-Test (gepaarte Stichprobe)	Neu1 - Neu2	0,408	0,407		
	Neu1 - Neu3	0,076	0,075		
	Neu1 - Neu4	0,753	0,875		
	Neu2 - Neu3	0,227	0,227		
	Neu2 - Neu4	0,701	0,937		
	Neu3 - Neu4	0,116	0,209		

Tabelle 4: Zusammenfassung statistische Testergebnisse (Signifikanz zum Niveau 5% grau hinterlegt)

5 Diskussion

5.1 Allgemein

ADHS ist die häufigste psychiatrische Erkrankung im Kindesalter mit etwa 6-12% Betroffenen weltweit (Biederman and Faraone 2005) und einer Tendenz zur Persistenz bis ins Erwachsenenalter bei 49-66% der Betroffenen mit schweren Einschränkungen des Privat- und Berufslebens (American Academy of Pediatrics. Subcommittee on Attention-Deficit/Hyperactivity and Committee on Quality 2001). MPH gehört zu den am häufigsten rezeptierten Substanzen in der pharmakologischen Behandlung psychischer Störungen des Kindes- und Jugendalters mit etwa 5 Millionen Verschreibungen alleine in den USA im Jahre 2003 (Ponsa, Ramos-Quiroga et al. 2009) und hat seine Sicherheit und Wirksamkeit in den etwa 50 Jahren seiner Anwendung bewiesen (Schulte-Markwort and Huss 2004). Bisherige Untersuchungen zur Mutagenität von MPH waren bisher immer negativ, weder in vivo- noch in vitro-Studien gaben Anhalt zur Beunruhigung (Mortelmans, Haworth et al. 1986; Teo, San et al. 2003; Suter, Martus et al. 2006).

Die Food and Drug Administration (FDA), die behördliche Lebensmittelüberwachung und Arzneimittelzulassungsbehörde der Vereinigten Staaten sieht in der Zusammenschau aktuell keinen Grund zur Beunruhigung (Morris, Petibone et al. 2012). Dennoch existieren noch viel zu wenige verwendbare Daten zu den Risiken der Langzeitbehandlung (Walitza, Werner et al. 2007). Neben relativ harmlosen, aber recht häufigen Nebenwirkungen wie Schlafstörungen oder Stimmungsschwankungen (Cascade, Kalali et al.), ist besonders die Erfassung seltenerer und potentiell bedrohlicher Nebenwirkungen von Interesse. In diesem Zusammenhang beunruhigten v.a. Berichte über eine Schädigung des Erbgutes durch eine MPH-Therapie (El-Zein, Abdel-Rahman et al. 2005), mit dem damit assoziierten erhöhten Karzinomrisiko (Bonassi, Hagmar et al. 2000). Eine erhöhte Mikrokernrate wurde auch in Untersuchungen von verschiedenen Tumorgeweben nachgewiesen (Garewal, Ramsey et al. 1993), was die Vermutung nahelegt, dass die Bildung von Mikrokernen eine mögliche Rolle bei der Karzinogenese spielt.

In dieser Studie wurde nun erneut der Zusammenhang zwischen einer Medikation mit MPH und dem Auftreten von Mikrokernen als Ausdruck einer Schädigung des Genoms untersucht, wobei im Vergleich zu Voruntersuchungen versucht wurde das Studiendesign zu optimieren, indem z.B. ein größeres Probandenkollektiv gewählt wurde sowie eine Gruppe gesunder Kontrollpersonen zusätzlich untersucht wurde. Der in dieser Arbeit verwendete Mikrokerntest spielt in den letzten Jahren eine immer größere Rolle bei der Gentoxizitätsprüfung von natürlichen und synthetischen, potentiell karzinogenen Substanzen. Zu diesem Zweck wurde er für die Anwendung in Säugetierzellsystemen verschiedener Gewebe und Arten entsprechend modifiziert und angepasst. Werden chromosomale Schäden durch indirekte DNA-Veränderung verursacht, ist eine Detektion mit den klassischen Mutations-Testsystemen nicht möglich. Derartige Veränderungen (z.B. Chromosomenbrüche oder der Verlust ganzer Chromosomen) können aber sehr gut durch den Mikrokerntest nachgewiesen werden.

Um potentielle Genomschäden erfassen zu können, wurde daher auch in der vorliegenden Arbeit der Mikrokern-Test ausgewählt. Von Vorteil ist hierbei, dass er leicht durchzuführen und wie oben ausgeführt als gentoxischer Endpunkt etabliert ist (Stopper and Müller 1997).

5.2 Qualität der erhobenen Daten / Vergleich mit Referenzwerten

Die Mikrokernfrequenz in peripheren Lymphozyten gemessen mit dem Mikrokern-Assay ist einer der populärsten Biomarker zur Messung gentoxischer Effekte auch an Kindern, obwohl man inzwischen aus großen Studien weiß, dass es wesentliche Variabilität innerhalb eines Labors und vor allem auch zwischen verschiedenen Labors geben kann.

Gerade deshalb sind Referenzwerte dringend notwendig, um einerseits innerhalb eines Labors das Vorgehen validieren zu können, und um andererseits die statistische Auswertung und Aussagekraft verbessern zu können (Neri, Ceppi et al. 2005). Verschiedene Studien beschäftigen sich mit der Bereitstellung von Basiswerten für die Mikrokernfrequenzen von Kindern und deren Einflussgrößen (Bonassi, Bolognesi et al. 1995; Neri,

Fucic et al. 2003; Neri, Ceppi et al. 2005). In der vorliegenden Studie betrug der Mittelwert der Mikrokerne bei allen 122 untersuchten Objektträgern zwischen $2,7 \pm 2,1$ sowie $5,7 \pm 4,5$ MK-haltige Zellen/ 1000 doppelkernige Zellen, und befand sich damit auch im Bereich der Werte einer gepoolten Referenzgruppe, die aus einer Analyse individueller Patientendaten mit 332 Teilnehmern zwischen 0-18 Jahren gewonnen wurden (Neri, Ceppi et al. 2005). Hier betrug der Wert $5,07$ MK-haltige Zellen/ 1000 doppelkernige Zellen. Eine weitere Studie in Form einer Metaanalyse, die es sich zum Ziel gesetzt hatte, Referenzwerte für die basale Mikrokernfrequenz zur Verfügung zu stellen, wertete 13 Publikationen mit insgesamt 440 gesunden Probanden aus, die nicht unter dem Einfluss genotoxischer Substanzen standen, und 0-19 Jahre alt waren. In dieser Metaanalyse von 13 Artikeln sowie Analyse von Daten aus 12 verschiedenen Laboratorien, die aus der HUMN- (Human Micronucleus International Collaborative Study) Datenbank gewonnen worden waren, wurde ein Mittelwert von $4,48$ - $5,4$ Mikrokerne/ 1000 DK Lymphozyten berechnet. Diese Darstellung entspricht nicht exakt der in dieser Studie gewählten Darstellung von MK-haltigen Zellen/ 1000 DK Lymphozyten, wird jedoch in der Literatur oft gleichwertig verwendet (Neri, Fucic et al. 2003).

5.3 Mikrokerntest

Die Gruppe der Kontrollkinder zeigte einen Trend zu deutlich niedrigeren Mikrokernfrequenzen. Im Vergleich mit den Gruppen NEU 1, NEU 2 und NEU 4 war dieser Unterschied signifikant. In der Gruppe der gesunden Kontrollkinder liegen die Werte mit $2,5 \pm 1,8$ mikrokernhaltigen Zellen / DK Lymphozyten jedoch niedriger als internationale Vergleichswerte (Neri, Ceppi et al. 2005). Die Gruppen der Kinder mit ADHS, die neu mit MPH behandelt werden bzw. behandelt werden sollen und deren Werte im Vergleich mit der gesunden Kontrollgruppe erhöht scheinen, sind im Vergleich mit der chronisch mit MPH therapierten Gruppe nicht (signifikant) erhöht. Vor allem weisen auch die chronisch mit MPH therapierten Kinder, die ja auch die höchsten MPH-Dosen erhielten, im Vergleich mit an ADHS erkrankten Kindern ohne MPH-Therapie (NEU 1) keinen Unterschied auf. Außerdem ist im Vergleich zwischen den ADHS-Kindern ohne MPH (NEU 1) und den ADHS-Kindern unter MPH-Einnahme (nach 3, 6 und 12 Mona-

ten) keine Erhöhung zu beobachten, so dass ausgeschlossen scheint, dass mit Beginn der MPH-Therapie und mit ihr assoziiert die Mikrokernfrequenzen anstiegen. Schließlich ist auch im Vergleich der gesunden Kontrollkinder mit den an ADHS erkrankten Kindern, die chronisch mit MPH therapiert werden kein Unterschied in der Mikrokernfrequenz feststellbar, so dass unwahrscheinlich scheint, dass einerseits ADHS als Grunderkrankung per se mit erhöhten Mikrokernen einhergeht sowie andererseits davon ausgegangen werden kann, dass die ADHS-Kinder bezüglich externer Faktoren vergleichbar mit einer gesunder Kindergruppe zu sein scheinen. Es finden sich für eine Erhöhung der Mikrokernraten durch ADHS auch keine Hinweise in der Literatur.

Als Erklärung hierfür wären zum Beispiel andere Ernährungsgewohnheiten zu diskutieren, oder andere unbekannte Faktoren. Da alle Kinder der Kontrollgruppe aus Familien stammten, in denen eines oder mehrere Kinder sowie die Eltern häufig freiwillig an Studien teilnahmen, über die sie unter anderem im Zusammenhang mit einer Tätigkeit im Gesundheitsbereich erfahren hatten, kann postuliert werden, dass die Gruppe bezüglich verschiedener Merkmale wie Gesundheitsbewusstsein und sozialer Status doch recht homogen war. Die Eltern zeichneten sich durch großes Engagement zur Unterstützung der Studie und durch Interesse an den an Ihren Kindern erhobenen Befunden aus. In der Gruppe der gesunden Kontrollkinder gab es weniger Raucher bzw. passiv-rauchende Kinder, was ebenfalls eine mögliche Erklärung für die eher niedrigeren Mikrokernfrequenzen sein könnte. Unter MPH-Therapie kommt es bekanntermaßen häufig zu einer Appetitlosigkeit. Als Folge davon ist eventuell eine selektive Nahrungsaufnahme mit konsekutivem Vitamin- und Nährstoffmangel denkbar, sowie dadurch erhöhte Mikrokern-kerne (Leddy, Waxmonsky et al. 2009). Im Widerspruch hierzu steht die Tatsache, dass bei Kindern die über einen längeren Zeitraum bereits MPH eingenommen haben, keine signifikante Erhöhung beobachtet werden konnte; hier ist ggf. eine Adaption und Anpassung des Essverhaltens denkbar. Dies ist jedoch in der Literatur so nicht vorbeschrieben. Andere Faktoren stehen eher im Gegensatz zu den erniedrigten Mikrokernzahlen. Im Vergleich zu den ADHS-Gruppen bestand die Kontrollgruppe aus einem höheren Anteil von Mädchen, das Durchschnittsalter war ebenfalls etwas höher als in den Gruppen der ADHS-Kinder. Da Mädchen tendenziell eher etwas höhere Mikrokern-

frequenzen haben, und da die Zahl der Mikrokerne mit dem Alter zuzunehmen scheint (Bonassi, Fenech et al. 2001), können diese Faktoren die Tendenz nicht erklären.

Im Vergleich der chronisch mit MPH therapierten Kindern mit den neu mit MPH behandelten/ zu behandelnden Kindern (CHRON/NEU 1-4) fanden sich keine signifikanten Unterschiede. Ebenso gab es keine signifikanten Unterschiede im Längsvergleich der Gruppen NEU 1-4, in dem jede Gruppe mit sich selbst über die Zeit verglichen wird. Unter MPH-Therapie stiegen die Mikrokernfrequenzen also nicht an.

ADHS-Kinder ohne MPH-Therapie (NEU 1) sowie nach Beginn einer Therapie mit MPH (NEU 2-4) zeigten im Vergleich mit chronisch mit MPH therapierten Patienten (CHRON) keine signifikanten Unterschiede.

5.4 Einflussgrößen (Geschlecht, Alter, Jahreszeit, Raucherstatus)

Chromosomale Veränderungen in humanen Lymphozyten korrelieren mit einem signifikant erhöhten Risiko, an Krebs zu erkranken, unabhängig von Alter, Geschlecht, Herkunft oder dem Zeitpunkt der Erfassung (Bonassi, Hagmar et al. 2000). Mikrokerne dienen als Marker für Chromosomenschäden, mit dem Alter steigen sie an (Bolognesi, Lando et al. 1999). Wie bereits erwähnt gibt es zahlreiche Einflussfaktoren auf die Ergebnisse des Mikrokerntestes. Einen signifikanten Zusammenhang zwischen der MK-Rate und dem Alter bzw. dem Geschlecht fanden Pastor und Mitarbeiter (Pastor, Gutierrez et al. 2001). Ergänzend dazu veröffentlichten Bonassi et al. eine Studie mit über 6700 Studienteilnehmern in zehn Ländern, nach der die Höhe der Mikrokernfrequenzen mit dem späteren Risiko einer Krebserkrankung korreliert (Bonassi, Znaor et al. 2007).

Konopacka (Konopacka 2003) fand dagegen weder alters- noch geschlechterspezifische Unterschiede. Die anamnestisch erfassten Angaben zu Allgemeinerkrankungen und Einnahme von Dauermedikamenten ergaben hier keinen signifikanten Effekt. Ramos-Remus et al. (Ramos-Remus, Dorazco-Barragan et al. 2002) belegten beispielsweise, dass bei Patienten mit rheumatoider Arthritis unabhängig von der Methotrexat- oder Folsäure-Medikation eine im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant höhere MK-Rate

vorhanden war, ohne allerdings Angaben über den Entstehungsmechanismus zu machen.

Einige Medikamente und Nahrungs(ergänzungs)mittel beeinflussen die Frequenz mikrokernhaltiger Mukosaepithelzellen positiv im Sinne einer Chemoprävention oder Radioprotektion (N-Acetyl-L-Cystein, Antioxidantien, α -Tocopherol, β -Carotin, Vitamin A und C, Riboflavin) (Van Schooten, Besaratinia et al. 2002), oder negativ im Sinne einer Induktion bereits 72 Stunden nach Einnahme (Chemotherapeutika, Paracetamol) (Ramirez and Saldanha 2002). Aceves Avila et al. (Aceves Avila, Esquivel Nava et al. 2004) fanden bei Patienten mit einem systemischen Lupus erythematoses (SLE) unter der Cyclophosphamid-Medikation eine Erhöhung der MK-Zahl um 44% bezogen auf die basalen Werte. Die Erkenntnis, dass eine ausreichende Zufuhr von Vitaminen (Folsäure, Niacin, Vitamin B12) und Mineralien (Selen, Zink) für die genomische Stabilität von Bedeutung ist, könnte auf der Grundlage von Genotoxizitätsmarkern wie des Mikrokern-Tests künftig eine Reevaluierung der empfohlenen Dosen (recommended dietary allowance RDA) für Vitamine und Mineralien erfordern (Fenech 2002). Vielversprechende Ergebnisse ließen sich auch durch die Therapie mit Benfotiamin (Vit. B1) erzielen, bei einem Kollektiv von Langzeitdialysepatienten konnte beispielsweise eine signifikante Reduktion der Mikrokernfrequenzen erzielt werden (Schupp, Dette et al. 2008). Eine Abhängigkeit zwischen der MK-Rate (Lymphozyten, Mundschleimhautepithel) und der plasmatischen Folsäure sowie Vitamin B12-Konzentration konnte bereits aufgezeigt werden (Titenko-Holland, Jacob et al. 1998). Wie Basu et al. (Basu, Ghosh et al. 2004) beobachteten, führen sogar auch Trinkwasserverunreinigungen mit bekannten Kanzerogenen zur Induktion von Mikrokernen. Wie oben dargestellt, wird die Mikrokernbildung als Biomarker für zytogenetische Schäden herangezogen. Andere Autoren diskutieren Möglichkeiten, den Mikrokerntest (cytokinesisblock micronucleus assay) bei Tumorpatienten im Speziellen zu Zwecken des Chemotherapie- und Radiotherapiemonitorings (Fenech 2000) einzusetzen. Einflüsse von Geschlecht und Alter, wie sie für die Mikrokernfrequenzen beschrieben sind, konnten wir in der vorliegenden Studie nicht bestätigen. Für Frauen werden je nach zitierter Studie um bis zu 40% erhöhte Mikrokernfrequenzen beschrieben (Fenech and Rinaldi 1994), diese Beobachtung konnte allerdings bis jetzt nicht auf Kinder übertragen werden (Neri, Ceppi et al. 2005). Damit

stehen die diesbezüglichen Ergebnisse unserer Studie im Einklang mit der aktuellen Studienlage.

Ein potentieller Schwachpunkt der Studie ist hier möglicherweise das in den verschiedenen Gruppen durchgehend ungleiche Verhältnis zwischen männlichen und weiblichen Teilnehmern. Einzig die Gruppe der gesunden Kontrollkinder mit 54% Anteil männlicher Probanden bietet ein relativ ausgewogenes Geschlechterverhältnis. Ein höherer Mädchenanteil hätte hier möglicherweise eine größere Aussagekraft ermöglicht. Anders wird der Einfluss der Alters auf die Mikrokernfrequenzen von Kindern in der Literatur bewertet: Hier finden sich signifikant erniedrigte Werte für Säuglinge; in welchem Zeitraum der bewiesene Anstieg mit Höchstwerten im Senium (Bolognesi, Abbondandolo et al. 1997) vor sich geht, ist jedoch im Detail nicht bekannt.

Da in der vorliegenden Studie das Alter als ein die Mikrokernfrequenzen beeinflussender Faktor neben dem Faktor der MPH-Therapie ausgeschlossen werden sollte, wurde eine Gruppe von Kindern gebildet, welche kein MPH erhalten hatte. In dieser Gruppe fanden sich die gesunden Kontrollkinder, also Kinder ohne ADHS, sowie die neu mit MPH therapierten ADHS-Kinder vor Therapiebeginn. Demzufolge bestand diese Gruppe aus Kindern mit und ohne ADHS. Die meisten Kinder in dieser künstlichen Gruppe waren 9 Jahre alt, der Großteil (68%) der Kinder befand sich in der Altersgruppe zwischen 7-10 Jahren. Es konnte in dieser künstlichen Gruppe ebenfalls keine Erhöhung der Mikrokernfrequenz mit dem Alter festgestellt werden. Zusammenfassend konnten wir in unserer Studie keinen Hinweis auf mit dem Alter erhöhte Mikrokernfrequenzen finden, weder was Mittelwerte der verschiedenen Gruppen angeht, noch bei der prospektiven Beobachtung. Allerdings ist der untersuchte Zeitraum zwischen dem 5. und 17. Lebensjahr eventuell zu klein, um Aussagen über die altersabhängige Entwicklung der Mikrokernfrequenzen machen zu können; zudem ist auch die Stichprobengröße zu klein um repräsentativ sein zu können, mit beispielsweise nur einem 17jährigen Probanden. Der Großteil der Kinder (79%) war während der Teilnahme an der Studie zwischen 9 und 11 Jahre alt, innerhalb dieser 3 Jahre ist eine massive Veränderung der Mikrokernfrequenzen nur durch das zunehmende Alter doch eher unwahrscheinlich. Generell scheinen Alter und Geschlecht keinen Einfluss auf die Wirkung von MPH zu haben, so dass davon ausgegangen werden kann, dass es auch gleich verstoffwechselt wird und gleichen sys-

temischen Einfluss mit gleichen systemischen Nebenwirkungen und Auswirkungen z.B. auf die Stabilität bei beiden Geschlechtern zeigen müsste (Cornforth, Sonuga-Barke et al.). Es kann als bewiesen angesehen werden, dass Tabakrauch die Mikrokernraten als Ausdruck eines erhöhten Krebsrisikos erhöhen und verändern kann (Baier, Stopper et al. 2002). Auch Passiv-Rauchen bzw. Exposition zu Tabakrauch aus der Umgebung (Kalucka 2007) kann das Krebsrisiko schon deutlich erhöhen und auch die Mikrokernfrequenzen verändern (Tredaniel, Savinelli et al. 2006). Rauchen war ein Ausschlusskriterium zur Teilnahme an unserer Studie, jedoch waren einige Kinder mehr oder stark rauchenden Angehörigen ausgesetzt. Wir sortierten diese Kinder in die rauchexponierte Gruppe ein, unabhängig davon wie viele Elternteile wie viel und vor allem wo (nur Balkon, nur Arbeitszimmer, ganzes Haus) rauchten. Die Daten zu Passivraucherstatus und vor allem zum Raucherstatus der Kinder beruhen ausschließlich auf Selbstangaben bzw. Angabe der Eltern. In Anbetracht des Alters der Kinder und der vermuteten Zurückhaltung zum Mitteilen eigener Tabakerfahrung kann hier nicht ausgeschlossen werden, dass einige Kinder zumindest gelegentlich selber geraucht haben. Ein regelmäßiger Tabakkonsum kann aber durch die anamnestic Daten und Befragung der Eltern doch mit großer Sicherheit ausgeschlossen werden. In der gesunden Kontrollgruppe berichteten 3 von 23 Familien über eine Rauchexposition des Probandenkindes (13%). In der Gruppe der an ADHS erkrankten Kinder berichteten in der Untergruppe der chronisch mit MPH therapierten Kinder 5 von 21 Familien (24%) und in den Familien der an ADHS erkrankten Kinder vor Beginn der MPH-Therapie sogar 10 von 27 Familien (37%) von einer Exposition gegenüber Zigarettenrauch. Tabakrauch kann auch bei Kindern die Mikrokernzahlen beeinflussen (Baier, Stopper et al. 2002). Aus unseren Daten lassen sich keine signifikanten Veränderungen der Mikrokernfrequenzen durch Exposition mit Nikotin ableiten. Dies kann damit zusammenhängen, dass die Belastung der Kinder durch das Rauchen der Eltern eben nicht so groß ist wie durch aktives Rauchen. Sicher spielen auch individuelle Faktoren eine Rolle, wie das Rauchverhalten der Eltern. Keinesfalls sollte aus unseren Ergebnissen eine Entwarnung für die Exposition mit Nikotin von Kindern gegeben werden. Studiengröße und Genauigkeit der erhobenen Daten waren viel zu unpräzise, um diesbezügliche Aussagen treffen zu können. Die schädliche Wirkung von Tabakrauch gerade auf Kinder ist in zahlreichen Studien gut belegt, auch

die Erhöhung der Mikrokernrate in Anhängigkeit von Dauer und Frequenz der Tabakexposition kann als gesichert angesehen werden (Haveric, Haveric et al.). Es erscheint jedoch in Anbetracht unserer Daten unwahrscheinlich, dass der Status als Passivraucher einen Effekt auf die Mikrokernraten der Kinder ausgeübt haben soll, der die Ergebnisse hätte verfälschen können. In der hier vorliegenden Studie konnten wir keine auffälligen Unterschiede in der Mikrokernfrequenz bei Kindern, die chronisch mit MPH therapiert worden waren, und den an ADHS erkrankten Kindern zum Zeitpunkt vor der MPH-Therapie finden. Es konnte ein Trend zu niedrigen Mikrokernzahlen in der Kontrollgruppe der gesunden Kinder beobachtet werden, der signifikant war im Vergleich zu den an ADHS erkrankten Kindern vor Therapiebeginn. also im Vergleich zweier Gruppen, die nicht MPH-exponiert waren, sowie im Vergleich mit Kindern, die 3 und 12 Monate mit MPH therapiert worden waren.

Bei der Suche nach Erklärungen hierfür müssen saisonale Unterschiede ausgeschlossen werden, da Erkältungen die Mikrokernfrequenz erhöhen können (Fenech 2000), und gehäuft in den kalten Jahreszeiten auftreten (Eccles 2002). Als Winter wird hier der meteorologischen Einteilung folgend der Zeitraum ab 1. Dezember bis zum vollendeten Februar (Häckel 2008) gewählt. Insgesamt gab es keinen signifikanten Zusammenhang zwischen dem Zeitpunkt der Blutentnahme und der Mikrokernfrequenz. Allerdings fällt auf, dass der Anteil der Kinder, die im Winter getestet wurden, bei 40% in der Gruppe NEU 1 (also ADHS Kinder vor Therapiebeginn) lag, 9% in der Gruppe NEU 2, 18% in der Gruppe NEU 3, sowie bei 16% in Gruppe NEU 4. In der gesunden Kontrollgruppe erfolgten alle Blutentnahme im Zeitraum zwischen dem 1.10.07 und dem 2.11.07, also alle im meteorologischen Herbst, dementsprechend 0% im meteorologischen Winter.

Damit ist ein Zusammenhang zwischen der Jahreszeit zum Entnahmepunkt als Erklärung für die Differenz in den beiden Gruppen der nicht mit MPH therapierten Kinder zumindest denkbar. In der Gruppe der chronisch mit MPH therapierten Kinder erfolgten lediglich 4% der Blutentnahmen im Winter.

Kein signifikanter Unterschied fand sich zu den Gruppen der neu mit MPH therapierten Kinder. Es gab außerdem keinen signifikanten Anstieg der Mikrokernfrequenzen bei mit MPH therapierten Kindern nach 3, 6 und 12 Monaten der Therapie mit MPH. Die Unterschiede in der Mikrokernfrequenz zwischen der gesunden Kontrollgruppe und den

anderen Gruppen können also eher nicht als Folge einer MPH-Exposition gewertet werden. Insgesamt dienten die zahlreichen Kontrollen (Positivkontrolle, gesunde Kontrollgruppe) dazu, auszuschließen, dass eine Veränderung der Mikrokernfrequenz entweder auf ein verändertes Zählverhalten (Positivkontrolle) oder auf andere exogene Faktoren, wie beispielsweise eine gesündere Ernährung oder eine bessere medizinische Betreuung, zurückzuführen ist (gesunde Kontrollgruppe). Die Werte der Positivkontrolle liegen signifikant höher als die Werte jeder einzelnen der Probandengruppen. Damit scheint das Zählverhalten im Verlauf der Studie stabil und die Verblindung erfolgreich gewesen zu sein. Die bekannte Tatsache, dass sowohl Chemotherapie als auch Bestrahlungstherapie, sowie auch maligne Grunderkrankungen die Mikrokernfrequenz erhöhen können, wird dadurch erneut bestätigt.

5.5 Weitere untersuchte Lymphozytenparameter

In der vorliegenden Studie wurde bei der Auswertung der Präparate neben der Mikrokernfrequenz und weiteren Parametern auch die Proliferationsrate bestimmt, also das Verhältnis von doppelkernigen zu einkernigen Lymphozyten.

Dieser Parameter scheint mit dem Alter abzunehmen (Bonassi, Bolognesi et al. 1995), aufgrund der durchgehend jugendlichen Probanden ließ sich in unserer Studie kein Trend zu mit zunehmendem Alter sinkenden Proliferationsraten feststellen. Die erhobenen Proliferationsraten decken sich mit aus anderen Studien bekannten Werten stimulierter Zellen, und sind somit als repräsentativ anzusehen (MacGregor, Wehr et al. 1997).

5.6 Vergleich El-Zein

Wie bereits beschrieben, sorgte im Jahr 2005 eine Studie von Randa A. El-Zein et al aus den USA, University of Texas, für Aufregung. Bei Kindern, die wegen einer Aufmerksamkeitsdefizit/Hyperaktivitätsstörung (ADHS) mit dem dafür üblichen Medikament behandelt wurden, sollten verstärkt Schäden am Erbgut aufgetreten sein (El-Zein, Abdel-Rahman et al. 2005). Hierbei fanden sie bei allen 12 Patienten signifikante Erhö-

hungen bezüglich Chromosomen-Aberrationen, Schwester-Chromatid-Austausch und Mikrokernfrequenz. Chromosomen-Aberrationen, der Austausch von Schwester-Chromatiden und Kleinkerne gelten als mikroskopisch sichtbare Zeichen von DNS-Schäden (Bonassi, Znaor et al. 2004). Diese Ergebnisse sind vor allem vor dem Hintergrund des gut dokumentierten Zusammenhangs zwischen erhöhter Anzahl an Chromosomenaberrationen und Krebsrisiko alarmierend (Bonassi, Znaor et al. 2004; Hagmar, Stromberg et al. 2004; El-Zein, Abdel-Rahman et al. 2005). Alle diese Veränderungen sind somit mögliche Hinweis auf eine mutagene Wirkung von Methylphenidat. Untersucht wurden in der Studie von El-Zein drei zytogenetische Endpunkte: chromosomale Aberrationen (CA), Schwester-Chromatiden-Austausche (sister chromatid exchanges, SCEs) und Mikrokerne (Micronuclei, MN) (El-Zein, Abdel-Rahman et al. 2005). Chromosomen-Aberrationen traten nach drei Monaten dreifach häufiger auf als vor Beginn der Behandlung, der Austausch von Schwesterchromatiden war um den Faktor 4,3 erhöht, und Kleinkerne wurden 2,4-fach häufiger beobachtet. Die beschriebenen Veränderungen fanden sich gleichsinnig bei allen Patienten für jeden der zytogenetischen Endpunkte (SCEs und MN konnten nur für elf Probanden ermittelt werden). Die MPH-Tagesdosen lagen zwischen 20 und 54mg. Von ursprünglich 18 Probanden wurden sechs nicht in die Auswertung einbezogen, da ihre Behandlung im Verlauf der Studie auf andere Präparate umgestellt wurde (Holtmann, Kaina et al. 2006). Die Ergebnisse waren damit bei allen ungewöhnlich einheitlich und die Werte deutlich erhöht, so dass weitere Studien erforderlich schienen (Walitza, Kampf et al. 2009). Die Studie von El-Zein hat für ein großes Echo vor allem auch an kritischen Stimmen gesorgt, unter Eltern und Betroffenen hat sie viel Verunsicherung hervor gerufen. Die Autoren verwiesen zwar auf die geringe Studiengröße und empfahlen eine Wiederholung bzw. Ausweitung der Versuche, dennoch betonten sie auch die ungenügende Studienlage zum Thema der Risiken einer Langzeittherapie mit Methylphenidat (El-Zein, Abdel-Rahman et al. 2005).

Die Methodik der Studie von El-Zein et al. ist nicht unumstritten (Preston, Kollins et al. 2005; Holtmann, Kaina et al. 2006). Generell wird angemerkt, dass genaue Beschreibungen und detaillierte Angaben über die verabreichten Medikamentendosen als auch über die Methoden der Auswertung, die lediglich als „Standardmethoden“ (El-Zein, Hay

et al. 2006) klassifiziert wurden, fehlen (Stopper, Walitza et al. 2008). Andere potentielle Gründe für die beobachteten erhöhten Mikrokernfrequenzen wie z.B. Krankheit oder veränderte Essgewohnheiten wurden nicht berücksichtigt (Stopper, Walitza et al. 2008). In unserer Studie wurden Kinder mit akuten und chronischen Erkrankungen sowie extremem Essverhalten explizit ausgeschlossen, so dass wir diese Einflussfaktoren weitestgehend ausschließen konnten. Kritikpunkt an der El-Zein-Studie war außerdem, dass jeder Patient durch das Prä-Post-Design als seine eigene Kontrolle diente. Wünschenswert wäre aber darüber hinaus der Einschluss einer Kontrollgruppe (Holtmann, Kaina et al. 2006), wie es nun in der hier vorliegenden Arbeit realisiert wurde.

Auffallend ist, dass in der Studie von El-Zein die Schwesterchromatid-Austausch-Rate (sister chromatid exchange rate, SCE-Rate) in den Proben vor MPH-Einnahme sehr viel niedriger als zu erwarten lag und sich bei der Hälfte der Patienten zu Studienbeginn in 25 Zellen gar keine Mikrokerne fanden, während die spontane SCE-Frequenz in Lymphozyten bei etwa sechs pro Zelle liegt (Ganten and Bader 2003). Die Darstellungsweise der SCE-Rate ist zudem ungewöhnlich (Gesamtzahl von SCEs in 25 Zellen anstatt SCEs pro Zelle); so bleibt unklar, ob Zellen auftreten, die möglicherweise sehr viele SCEs aufweisen (Holtmann, Kaina et al. 2006). Die Anzahl der pro Patient analysierten Zellen war bei El-Zein vergleichsweise gering: so sollten für Chromosomenaberrationen etwa 100 bis 150 Zellen und für SCEs mindestens 50 komplette Mitosen (El-Zein, Abdel-Rahman et al. 2005) in die Auswertung eingehen. Die Bestimmung der Anzahl von Mikronuclei pro 1000 Zellen, wie in den daraufhin durchgeführten Studien durchgehend realisiert, entspricht internationalen zytogenetischen Standards. Aussagen zur Reversibilität der zytogenetischen Effekte nach Absetzen von MPH sind aufgrund der vorgelegten Studie nicht möglich (Holtmann, Kaina et al. 2006).

Ein weiterer möglicher Erklärungsansatz für die auffälligen Werte ist die ethnische Heterogenität der untersuchten Kinder in der Studie von El-Zein. Es ist bekannt, dass die Aktivität des Enzyms Cytochrom P450 in verschiedenen Ethnien aufgrund verschiedener Polymorphismen unterschiedlich sein kann. Außerdem konnte in Tierversuchen gezeigt werden, dass MPH die Aktivität verschiedener Enzyme beeinflussen kann (Le Nedelec and Rosengren 2002). Jedoch muss auch erwähnt werden, dass es bis jetzt keine gesicherten Daten gibt, ob MPH über Cytochrom P450 verstoffwechselt wird (Walitza, Werner

et al. 2007). In unserer Studie konnten wir auf eine homogene Gruppe kaukasischer Kinder zurückgreifen, auch wenn deren die Herkunft kein Ein- bzw. Ausschlusskriterium war. Einige Autoren gehen nun davon aus, dass die Aussagekraft der El-Zein-Studie wegen methodischer Mängel begrenzt ist (Holtmann, Kaina et al. 2006).

Viele Kinder benötigen aufgrund ihrer ausgeprägten ADHS-Symptomatik über mehrere Jahre eine Behandlung mit Stimulanzien. Daher erfordert bereits der Verdacht eines Zusammenhangs zwischen der medikamentösen Behandlung und einer möglichen mutagenen Wirkung, wie ihn die Studie von El-Zein et al. (2005) trotz aller Einschränkungen vermuten lässt, eine fundierte Klärung. Eine vorschnelle Entwarnung unter Berufung auf epidemiologische Daten ist wegen der aufgezählten Einschränkungen nicht hilfreich; problematisch ist ebenfalls der Hinweis, dass nach 50 Jahren Erfahrungen mit den Stimulanzien ein Zusammenhang mit der Entstehung von Krebserkrankungen sicherlich aufgefallen wäre. Im Jahr 2007 erfolgte die erste Reaktion auf die Studie von El-Zein et al. in Form einer ausgedehnteren Studie durch Walitza et al (Walitza, Werner et al. 2007). Es wurden 30 Kinder vor und kurz nach dem Beginn der MPH-Behandlung untersucht, 21 dann nochmals drei Monate nach Therapiebeginn und acht Kinder ein halbes Jahr nach Therapiebeginn. Dazu untersuchten sie Blutproben von ADHS-Kindern, die mit MPH (Ritalin®, Medikinet®, Concerta®, Equasym®) behandelt wurden. Außerdem konnten sie auch 9 Kinder untersuchen, die schon seit einem halben Jahr oder länger mit MPH therapiert worden waren. In dieser Studie konnten keine Hinweise für cytogenetische Schäden im Sinne von chromosomalen Aberrationen bei den untersuchten Kindern gefunden werden. Dieses Ergebnis bestätigt den Forschern zufolge jahrzehntelange Beobachtungen, nach denen klinisch keine gravierenden Nebenwirkungen gesehen werden konnten (Walitza, Werner et al. 2007).

Zusammengefasst könnten Ursache für die unterschiedlichen Ergebnisse in der El-Zein-Studie z.B. ethnologische Unterschiede mit assoziierten Varianten z.B. im Cytochrom C450 Metabolismus in Frage kommen, die einen Einfluss haben könnten, auch wenn es bislang keine Hinweise gibt, dass MPH über Cytochrom C450 metabolisiert wird. El-Zein et al. untersuchten Kinder verschiedener Ethnien, während die Kinder in der Studie von Walitza et al alle deutschstämmig oder kaukasisch waren. Zuletzt könnten die Gründe für die unterschiedlichen Ergebnisse auch in der Durchführung des Mikrokern-

Tests liegen, hier wurden von El-Zein et al. keine detaillierten Angaben gemacht, während die Auswertung in der Studie von Walitza et al. in Übereinstimmung mit den aktuellen Empfehlungen und Leitlinien durchgeführt wurde (Walitza, Werner et al. 2007). Wenngleich keine der Studien der letzten Jahre einen Hinweis für eine Genomschädigung und ein dadurch erhöhtes Krebsrisiko feststellen konnte, bleibt unklar, ob MPH durch andere Mechanismen das Krebsrisiko erhöhen kann (Walitza, Kampf et al. 2010). Mögliche Ansätze für weitere Forschung wären hier z.B. im Bereich der Epigenetik, Wachstumshormonen oder der Interferenz mit anderen Signalwegen zu suchen.

Die aktuellen Erkenntnisse zur Problematik einer potentiellen Mutagenität der MPH-Therapie bei Kindern mit ADHS wurden von Walitza et al. 2010 zusammengefasst (Walitza, Kampf et al. 2010). Verglichen wurden hier 6 prospektive Studien zum Thema, alle veröffentlicht im Zeitraum von 2007 bis 2009, einschließlich der ursprünglichen Studie von El-Zein von 2005. Alle Verfahren untersuchten den Einfluss von MPH auf die Mikrokernfrequenz bei Kindern etwa zwischen dem 7. und 12. Lebensjahr. Die Anzahl der Studienteilnehmer war im Schnitt deutlich höher als in der Studie von El-Zein, insgesamt wurden in allen Studien zusammen 110 Kinder untersucht. Außerdem konnten in allen Studien Kinder zu verschiedenen Zeitpunkten nach Beginn der MPH-Einnahme untersucht werden, besonders wertvoll in diesem Zusammenhang sind, in Anbetracht der spärlichen Langzeitdaten, Untersuchungen an Kindern, die über einen langen Zeitraum, z.B. von einem Jahr beobachtet werden konnten, wie es uns auch in der vorliegenden Studie gelang. Keine der Studien, inklusive der hier von uns vorgelegten, konnte den Verdacht, der durch die Studie von El-Zein erzeugt wurde, bestätigen.

In einer aktuellen Übersichtsarbeit (2012) bestätigten die Autoren nochmals den Kenntnisstand, nach dem es keinen Zusammenhang zwischen einer Therapie mit MPH und mit einer potentiellen Schädigung des Erbgutes gibt (Morris, Petibone et al. 2012).

6 Zusammenfassung

MPH wird seit über 50 Jahren zur Therapie des ADHS eingesetzt. Gerade in den letzten Jahren wurde deutlich, dass der Einsatz ohne fundierte Kenntnis über mögliche Langzeiteffekte erfolgte, da zum Zeitpunkt der Zulassung aufgrund der begrenzten technischen Möglichkeiten weniger strenge und weniger umfassende Einschränkungen beachtet werden mussten (Walitza, Werner et al. 2007). Da in den letzten Jahren die Anzahl der verschrieben Tagesdosen MPH sprunghaft anstiegen, ist es wichtig, auch die langfristigen Nebenwirkungen von MPH zu untersuchen (Janhsen 2007). Eine Studie von El-Zein et al. von 2005 brachte die Frage auf, ob MPH eventuell Genomschäden hervorruft. Bei 11 von 12 untersuchten Kindern wurde unter der Therapie mit MPH um das 2,4fache erhöhte Mikrokernfrequenzen gefunden (El-Zein, Abdel-Rahman et al. 2005). Dies beunruhigte vor allem im Hinblick auf das mit erhöhten Mikrokernfrequenzen korrelierte erhöhte Karzinomrisiko. Eine daraufhin von Walitza et al. durchgeführte Studie, die ebenfalls Mikrokernfrequenzen in peripheren Blutzellen untersuchte (Walitza, Werner et al. 2007), konnte keine Hinweise auf eine Genomschädigung durch MPH erbringen. Zahlreiche weitere Untersuchungen zur potentiellen Genomschädigung durch MPH konnten die Ergebnisse durch in vivo- oder in vitro-Studien nicht bestätigen und kritisierten die geringe Stichprobengröße sowie mangelnde Transparenz der Arbeit von El-Zein (Preston, Kollins et al. 2005; El-Zein, Hay et al. 2006; Holtmann, Kaina et al. 2006; Suter, Martus et al. 2006). Da jedoch keine weitere Studie sich konkret mit zytogenetischen Effekten in peripheren Blutzellen befasste, soll die vorliegende Arbeit dazu dienen, den Verdacht einer Genomschädigung endgültig auszuräumen (Walitza, Kampf et al. 2009). Dazu wurde eine größere Gruppe von Kindern eingeschlossen, sowie Untersuchungen zu verschiedenen Zeitpunkten während der MPH-Einnahme, bis hin zu Untersuchungen nach einem Zeitraum von 12 Monaten der MPH-Einnahme, durchgeführt. Mit Hilfe eines Mikrokerntestes wurden in der vorliegenden Studie versucht, DNS-Schäden an peripheren Lymphozyten zu bestimmen, um daraus auf ein potentiell erhöhtes Krebsrisiko schließen zu können.

Im Vergleich mit einer gesunden Kontrollgruppe waren die Werte von ADHS-Kindern ohne MPH-Therapie sowie nach 3 und 12 Monaten MPH-Therapie zwar signifikant erhöht, diese gesunde Kontrollgruppe wies jedoch im Vergleich mit internationalen Referenzwerten eine extrem niedrige Mikrokernfrequenz auf, so dass davon ausgegangen werden muss, dass diese Vergleiche nur begrenzte Aussagekraft haben. In keiner der verschiedenen mit MPH therapierten Gruppen konnten über die Dauer der Einnahme eine signifikant Erhöhung der Mikrokernfrequenzen im Vergleich zu den Werten vor Einnahmebeginn nachgewiesen werden, was den Schluss zulässt, dass eine Therapie mit Methylphenidat in therapieüblichen Dosen bei Kindern das Erbgut nicht zu schädigen scheint. Dieses Ergebnis bestätigen inzwischen auch weitere Studien. Der Mikrokerntest erfasst Genomschäden, nicht jedoch etwaige tumorpromovierende Eigenschaften des verabreichten Medikaments. Damit ist unklar, ob MPH auf andere Art als über eine Schädigung des Genoms das Karzinomrisiko erhöhen könnte. Erste epidemiologische Studien sehen jedoch keinen Hinweis auf eine wie auch immer entstandene erhöhte Karzinominzidenz unter der Therapie mit MPH (Selby, Friedman et al. 1989; Oestreicher, Friedman et al. 2007). Hier scheinen jedoch weitere epidemiologische Studien, die möglichst große Zeitspannen umfassen, nötig zu sein.

7 Anhang

7.1 Statistische Auswertung ohne statistische Ausreißer

Mikrokernfrequenzen ohne Ausreißer

Quervergleiche

Mann-Whitney U-Test (Alle_bereinigten_Daten.sta) Nach Var.: Gruppe_2 Markierte Tests signifikant ab p <,05000										
Variable	Rgsumme Chron	Rgsumme KK	U	Z	p-Wert	Z korr.	p-Wert	Gült. N Chron	Gült. N KK	2*eins. exakt p
MK-Freq	518,5000	471,5000	195,5000	1,069110	0,285021	1,070430	0,284426	21	23	0,282859

Mann-Whitney U-Test (Alle_bereinigten_Daten.sta) Nach Var.: Gruppe_2 Markierte Tests signifikant ab p <,05000										
Variable	Rgsumme Neu_1	Rgsumme KK	U	Z	p-Wert	Z korr.	p-Wert	Gült. N Neu_1	Gült. N KK	2*eins. exakt p
MK-Freq	817,0000	458,0000	182,0000	2,491551	0,012719	2,492448	0,012687	27	23	0,011807

Mann-Whitney U-Test (Alle_bereinigten_Daten.sta) Nach Var.: Gruppe_2 Markierte Tests signifikant ab p <,05000										
Variable	Rgsumme Neu_2	Rgsumme KK	U	Z	p-Wert	Z korr.	p-Wert	Gült. N Neu_2	Gült. N KK	2*eins. exakt p
MK-Freq	621,0000	414,0000	138,0000	2,599812	0,009328	2,600926	0,009298	22	23	0,008392

Mann-Whitney U-Test (Alle_bereinigten_Daten.sta) Nach Var.: Gruppe_2 Markierte Tests signifikant ab p <,05000										
Variable	Rgsumme Neu_3	Rgsumme KK	U	Z	p-Wert	Z korr.	p-Wert	Gült. N Neu_3	Gült. N KK	2*eins. exakt p
MK-Freq	397,5000	422,5000	146,5000	1,326942	0,184529	1,327752	0,184261	17	23	0,182152

Mann-Whitney U-Test (Alle_bereinigten_Daten.sta) Nach Var.: Gruppe_2 Markierte Tests signifikant ab p <,05000										
Variable	Rgsumme Neu_4	Rgsumme KK	U	Z	p-Wert	Z korr.	p-Wert	Gült. N Neu_4	Gült. N KK	2*eins. exakt p
MK-Freq	302,0000	328,0000	52,00000	2,971330	0,002965	2,972788	0,002951	12	23	0,002101

Mann-Whitney U-Test (Alle_bereinigten_Daten.sta) Nach Var.: Gruppe_2 Markierte Tests signifikant ab p <,05000										
Variable	Rgsumme Neu_1	Rgsumme Chron	U	Z	p-Wert	Z korr.	p-Wert	Gült. N Neu_1	Gült. N Chron	2*eins. exakt p
MK-Freq	725,0000	451,0000	220,0000	1,309307	0,190431	1,309592	0,190335	27	21	0,192311

Mann-Whitney U-Test (Alle_bereinigten_Daten.sta) Nach Var.: Gruppe_2 Markierte Tests signifikant ab p <,05000										
Variable	Rgsumme Neu_2	Rgsumme Chron	U	Z	p-Wert	Z korr.	p-Wert	Gült. N Neu_2	Gült. N Chron	2*eins. exakt p
MK-Freq	547,0000	399,0000	168,0000	1,518530	0,128882	1,519276	0,128694	22	21	0,129848

Mann-Whitney U-Test (Alle_bereinigten_Daten.sta) Nach Var.: Gruppe_2 Markierte Tests signifikant ab p <,05000										
Variable	Rgsumme Neu_3	Rgsumme Chron	U	Z	p-Wert	Z korr.	p-Wert	Gült. N Neu_3	Gült. N Chron	2*eins. exakt p
MK-Freq	339,0000	402,0000	171,0000	0,205505	0,837178	0,205640	0,837072	17	21	0,839104

Mann-Whitney U-Test (Alle_bereinigten_Daten.sta) Nach Var.: Gruppe_2 Markierte Tests signifikant ab p <,05000										
Variable	Rgsumme Neu_4	Rgsumme Chron	U	Z	p-Wert	Z korr.	p-Wert	Gült. N Neu_4	Gült. N Chron	2*eins. exakt p
MK-Freq	253,0000	308,0000	77,00000	1,815067	0,069515	1,816129	0,069351	12	21	0,069064

Längsvergleich

Wilcoxon-Test gepaarte Stichpr. (Neu_1234.sta) Markierte Tests signifikant ab p <,05000				
Variablenpaar	Gültige N	T	Z	p-Wert
MK-Freq NEU_1, NEU_2	22	101,0000	0,827874	0,407742

Wilcoxon-Test gepaarte Stichpr. (Neu_1234.sta) Markierte Tests signifikant ab p <,05000				
Variablenpaar	Gültige N	T	Z	p-Wert
MK-Freq NEU_1, NEU_3	17	39,00000	1,775179	0,075869

Wilcoxon-Test gepaarte Stichpr. (Neu_1234.sta) Markierte Tests signifikant ab p <,05000				
Variablenpaar	Gültige N	T	Z	p-Wert
MK-Freq NEU_1, NEU_4	12	37,00000	0,156893	0,875329

Wilcoxon-Test gepaarte Stichpr. (Neu_1234.sta) Markierte Tests signifikant ab p <,05000				
Variablenpaar	Gültige N	T	Z	p-Wert
MK-Freq NEU_2, NEU_3	17	51,00000	1,207122	0,227386

Wilcoxon-Test gepaarte Stichpr. (Neu_1234.sta) Markierte Tests signifikant ab p <,05000				
Variablenpaar	Gültige N	T	Z	p-Wert
MK-Freq NEU_2, NEU_4	12	38,00000	0,078446	0,937473

Wilcoxon-Test gepaarte Stichpr. (Neu_1234.sta) Markierte Tests signifikant ab p <,05000				
Variablenpaar	Gültige N	T	Z	p-Wert
MK-Freq NEU_3, NEU_4	12	23,00000	1,255143	0,209428

Mikrokernfrequenz Mittelwert 2 Objektträger

Mann-Whitney U-Test (mean_tmp) Nach Var.: Gruppe_2 Markierte Tests signifikant ab p <,05000										
Variable	Rgsumme Neu_1	Rgsumme KK	U	Z	p-Wert	Z korr.	p-Wert	Gült. N Neu_1	Gült. N KK	2*eins. exakt p
MK-Freq	382,0000	321,0000	45,00000	3,617036	0,000298	3,617894	0,000297	14	23	0,000128

Mann-Whitney U-Test (mean_tmp) Nach Var.: Gruppe_2 Markierte Tests signifikant ab p <,05000										
Variable	Rgsumme Neu_3	Rgsumme KK	U	Z	p-Wert	Z korr.	p-Wert	Gült. N Neu_3	Gült. N KK	2*eins. exakt p
MK-Freq	336,0000	367,0000	91,00000	2,176485	0,029520	2,177001	0,029481	14	23	0,028180

Mann-Whitney U-Test (mean_tmp) Nach Var.: Gruppe_2 Markierte Tests signifikant ab p <,05000										
Variable	Rgsumme Neu_4	Rgsumme KK	U	Z	p-Wert	Z korr.	p-Wert	Gült. N Neu_4	Gült. N KK	2*eins. exakt p
MK-Freq	310,5000	319,5000	43,50000	3,266726	0,001088	3,267870	0,001084	12	23	0,000568

Alter

Mann-Whitney U-Test (Alle_bereinigten_Daten.sta) Nach Var.: Gruppe_2 Markierte Tests signifikant ab p <,05000										
Variable	Rgsumme Neu_1	Rgsumme KK	U	Z	p-Wert	Z korr.	p-Wert	Gült. N Neu_1	Gült. N KK	2*eins. exakt p
Alter	489,0000	786,0000	111,0000	-3,87358	0,000107	-3,91969	0,000089	27	23	0,000052

Mann-Whitney U-Test (Alle_bereinigten_Daten.sta) Nach Var.: Gruppe_2 Markierte Tests signifikant ab p <,05000										
Variable	Rgsumme Neu_2	Rgsumme KK	U	Z	p-Wert	Z korr.	p-Wert	Gült. N Neu_2	Gült. N KK	2*eins. exakt p
Alter	343,5000	691,5000	90,50000	-3,67834	0,000235	-3,72149	0,000198	22	23	0,000118

Mann-Whitney U-Test (Alle_bereinigten_Daten.sta) Nach Var.: Gruppe_2 Markierte Tests signifikant ab p <,05000										
Variable	Rgsumme Neu_3	Rgsumme KK	U	Z	p-Wert	Z korr.	p-Wert	Gült. N Neu_3	Gült. N KK	2*eins. exakt p
Alter	235,0000	585,0000	82,00000	-3,09164	0,001991	-3,12794	0,001761	17	23	0,001450

Mann-Whitney U-Test (Alle_bereinigten_Daten.sta) Nach Var.: Gruppe_2 Markierte Tests signifikant ab p <,05000										
Variable	Rgsumme Neu_4	Rgsumme KK	U	Z	p-Wert	Z korr.	p-Wert	Gült. N Neu_4	Gült. N KK	2*eins. exakt p
Alter	157,0000	473,0000	79,00000	-2,03302	0,042052	-2,06106	0,039298	12	23	0,040810

MPH-Dosierung

Mann-Whitney U-Test (Alle_bereinigten_Daten.sta)										
Nach Var.: Gruppe_2										
Markierte Tests signifikant ab p <,05000										
Variable	Rgsumme Neu_2	Rgsumme Chron	U	Z	p-Wert	Z korr.	p-Wert	Gült. N Neu_2	Gült. N Chron	2*eins. exakt p
MPH in mg/kg	320,0000	626,0000	67,00000	-3,97247	0,000071	-3,97262	0,000071	22	21	0,000026

Mann-Whitney U-Test (Alle_bereinigten_Daten.sta)										
Nach Var.: Gruppe_2										
Markierte Tests signifikant ab p <,05000										
Variable	Rgsumme Neu_3	Rgsumme Chron	U	Z	p-Wert	Z korr.	p-Wert	Gült. N Neu_3	Gült. N Chron	2*eins. exakt p
MPH in mg/kg	224,5000	516,5000	71,50000	-3,12661	0,001768	-3,12678	0,001767	17	21	0,001174

Mann-Whitney U-Test (Alle_bereinigten_Daten.sta)										
Nach Var.: Gruppe_2										
Markierte Tests signifikant ab p <,05000										
Variable	Rgsumme Neu_4	Rgsumme Chron	U	Z	p-Wert	Z korr.	p-Wert	Gült. N Neu_4	Gült. N Chron	2*eins. exakt p
MPH in mg/kg	118,0000	443,0000	40,00000	-3,19976	0,001376	-3,19976	0,001376	12	21	0,000810

7.2 Statistische Auswertung 2 alle Daten inkl. statistische Ausreißer

Quervergleich

Mann-Whitney U-Test (mit_stat_Ausreissern)										
Nach Var.: Gruppe_2										
Markierte Tests signifikant ab p <,05000										
Variable	Rgsumme Chron	Rgsumme KK	U	Z	p-Wert	Z korr.	p-Wert	Gült. N Chron	Gült. N KK	2*eins. exakt p
MK-Freq	541,0000	494,0000	194,0000	1,308170	0,190816	1,309033	0,190524	21	24	0,192801

Mann-Whitney U-Test (mit_stat_Ausreissern)										
Nach Var.: Gruppe_2										
Markierte Tests signifikant ab p <,05000										
Variable	Rgsumme Neu_1	Rgsumme KK	U	Z	p-Wert	Z korr.	p-Wert	Gült. N Neu_1	Gült. N KK	2*eins. exakt p
MK-Freq	823,0000	503,0000	203,0000	2,273990	0,022967	2,274762	0,022921	27	24	0,022043

Mann-Whitney U-Test (mit_stat_Ausreissern)										
Nach Var.: Gruppe_2										
Markierte Tests signifikant ab p <,05000										
Variable	Rgsumme Neu_2	Rgsumme KK	U	Z	p-Wert	Z korr.	p-Wert	Gült. N Neu_2	Gült. N KK	2*eins. exakt p
MK-Freq	625,0000	456,0000	156,0000	2,363922	0,018083	2,364870	0,018037	22	24	0,017049

Mann-Whitney U-Test (mit_stat_Ausreissern)										
Nach Var.: Gruppe_2										
Markierte Tests signifikant ab p <,05000										
Variable	Rgsumme Neu_3	Rgsumme KK	U	Z	p-Wert	Z korr.	p-Wert	Gült. N Neu_3	Gült. N KK	2*eins. exakt p
MK-Freq	398,5000	462,5000	162,5000	1,084975	0,277934	1,085590	0,277661	17	24	0,275493

Mann-Whitney U-Test (mit_stat_Ausreissern) Nach Var.: Gruppe_2 Markierte Tests signifikant ab p <,05000										
Variable	Rgsumme Neu_4	Rgsumme KK	U	Z	p-Wert	Z korr.	p-Wert	Gült. N Neu_4	Gült. N KK	2*eins. exakt p
MK-Freq	340,0000	363,0000	63,00000	2,942817	0,003253	2,944039	0,003240	13	24	0,002410

Mann-Whitney U-Test (mit_stat_Ausreissern) Nach Var.: Gruppe_2 Markierte Tests signifikant ab p <,05000										
Variable	Rgsumme Neu_1	Rgsumme Chron	U	Z	p-Wert	Z korr.	p-Wert	Gült. N Neu_1	Gült. N Chron	2*eins. exakt p
MK-Freq	698,0000	478,0000	247,0000	0,748176	0,454355	0,748277	0,454294	27	21	0,457933

Mann-Whitney U-Test (mit_stat_Ausreissern.sta) Nach Var.: Gruppe_2 Markierte Tests signifikant ab p <,05000										
Variable	Rgsumme Neu_2	Rgsumme Chron	U	Z	p-Wert	Z korr.	p-Wert	Gült. N Neu_2	Gült. N Chron	2*eins. exakt p
MK-Freq	525,5000	420,5000	189,5000	0,996156	0,319175	0,996419	0,319047	22	21	0,316751

Mann-Whitney U-Test (mit_stat_Ausreissern) Nach Var.: Gruppe_2 Markierte Tests signifikant ab p <,05000										
Variable	Rgsumme Neu_3	Rgsumme Chron	U	Z	p-Wert	Z korr.	p-Wert	Gült. N Neu_3	Gült. N Chron	2*eins. exakt p
MK-Freq	322,5000	418,5000	169,5000	-0,249542	0,802942	-0,249624	0,802879	17	21	0,794031

Mann-Whitney U-Test (mit_stat_Ausreissern) Nach Var.: Gruppe_2 Markierte Tests signifikant ab p <,05000										
Variable	Rgsumme Neu_4	Rgsumme Chron	U	Z	p-Wert	Z korr.	p-Wert	Gült. N Neu_4	Gült. N Chron	2*eins. exakt p
MK-Freq	274,0000	321,0000	90,00000	1,630171	0,103066	1,630669	0,102961	13	21	0,103660

Mann-Whitney U-Test (mit_stat_Ausreissern.sta) Nach Var.: Gruppe_2 Markierte Tests signifikant ab p <,05000										
Variable	Rgsumme Neu_1	Rgsumme KK	U	Z	p-Wert	Z korr.	p-Wert	Gült. N Neu_1	Gült. N KK	2*eins. exakt p
Alter	489,5000	836,5000	111,5000	-4,00071	0,000063	-4,04610	0,000052	27	24	0,000026

Mann-Whitney U-Test (mit_stat_Ausreissern.sta) Nach Var.: Gruppe_2 Markierte Tests signifikant ab p <,05000										
Variable	Rgsumme Neu_4	Rgsumme KK	U	Z	p-Wert	Z korr.	p-Wert	Gült. N Neu_4	Gült. N KK	2*eins. exakt p
Alter	178,0000	525,0000	87,00000	-2,17928	0,029312	-2,20880	0,027189	13	24	0,027909

Mann-Whitney U-Test (mit_stat_Ausreissern.sta) Nach Var.: Gruppe_2 Markierte Tests signifikant ab p <,05000										
Variable	Rgsumme Neu_1	Rgsumme Chron	U	Z	p-Wert	Z korr.	p-Wert	Gült. N Neu_1	Gült. N Chron	2*eins. exakt p
Alter	435,0000	741,0000	57,00000	-4,69688	0,000003	-4,75862	0,000002	27	21	0,000000

Mann-Whitney U-Test (mit_stat_Ausreissern.sta) Nach Var.: Gruppe_2 Markierte Tests signifikant ab p <,05000										
Variable	Rgsumme Neu_4	Rgsumme Chron	U	Z	p-Wert	Z korr.	p-Wert	Gült. N Neu_4	Gült. N Chron	2*eins. exakt p
Alter	149,5000	445,5000	58,50000	-2,74648	0,006024	-2,80629	0,005012	13	21	0,004563

Mann-Whitney U-Test (mit_stat_Ausreissern.sta) Nach Var.: Gruppe_2 Markierte Tests signifikant ab p <,05000										
Variable	Rgsumme KK	Rgsumme Chron	U	Z	p-Wert	Z korr.	p-Wert	Gült. N KK	Gült. N Chron	2*eins. exakt p
Alter	559,5000	475,5000	244,5000	0,159256	0,873468	0,162829	0,870653	24	21	0,865865

Mann-Whitney U-Test (mit_stat_Ausreissern.sta) Nach Var.: Gruppe_2 Markierte Tests signifikant ab p <,05000										
Variable	Rgsumme Neu_2	Rgsumme Chron	U	Z	p-Wert	Z korr.	p-Wert	Gült. N Neu_2	Gült. N Chron	2*eins. exakt p
MPH in mg/kg	321,0000	625,0000	68,00000	-3,94818	0,000079	-3,94833	0,000079	22	21	0,000030

Mann-Whitney U-Test (mit_stat_Ausreissern.sta) Nach Var.: Gruppe_2 Markierte Tests signifikant ab p <,05000										
Variable	Rgsumme Neu_3	Rgsumme Chron	U	Z	p-Wert	Z korr.	p-Wert	Gült. N Neu_3	Gült. N Chron	2*eins. exakt p
MPH in mg/kg	226,5000	514,5000	73,50000	-3,06790	0,002156	-3,06806	0,002155	17	21	0,001481

Mann-Whitney U-Test (mit_stat_Ausreissern.sta) Nach Var.: Gruppe_2 Markierte Tests signifikant ab p <,05000										
Variable	Rgsumme Neu_4	Rgsumme Chron	U	Z	p-Wert	Z korr.	p-Wert	Gült. N Neu_4	Gült. N Chron	2*eins. exakt p
MPH in mg/kg	135,0000	460,0000	44,00000	-3,26034	0,001113	-3,26034	0,001113	13	21	0,000647

Mikrokernfrequenz Mittelwert 2 Objektträger

Mann-Whitney U-Test (mit_stat_Ausreissern.sta) Nach Var.: Gruppe_2 Markierte Tests signifikant ab p <,05000										
Variable	Rgsumme Neu_1	Rgsumme KK	U	Z	p-Wert	Z korr.	p-Wert	Gült. N Neu_1	Gült. N KK	2*eins. exakt p
MK-Freq (Mean)	315,0000	351,0000	51,00000	3,104097	0,001909	3,104896	0,001904	12	24	0,001242

Mann-Whitney U-Test (mit_stat_Ausreissern.sta) Nach Var.: Gruppe_2 Markierte Tests signifikant ab p <,05000										
Variable	Rgsumme Neu_3	Rgsumme KK	U	Z	p-Wert	Z korr.	p-Wert	Gült. N Neu_3	Gült. N KK	2*eins. exakt p
MK-Freq (Mean)	274,0000	392,0000	92,00000	1,728227	0,083949	1,728672	0,083869	12	24	0,083968

Mann-Whitney U-Test (mit_stat_Ausreissern.sta) Nach Var.: Gruppe_2 Markierte Tests signifikant ab p <,05000										
Variable	Rgsumme Neu_4	Rgsumme KK	U	Z	p-Wert	Z korr.	p-Wert	Gült. N Neu_4	Gült. N KK	2*eins. exakt p
MK-Freq (Mean)	323,5000	342,5000	42,50000	3,389338	0,000701	3,390429	0,000698	12	24	0,000326

Mann-Whitney U-Test (mit_stat_Ausreissern.sta) Nach Var.: Gruppe_2 Markierte Tests signifikant ab p <,05000										
Variable	Rgsumme Neu_1	Rgsumme Chron	U	Z	p-Wert	Z korr.	p-Wert	Gült. N Neu_1	Gült. N Chron	2*eins. exakt p
MK-Freq (Mean)	245,0000	316,0000	85,00000	1,515674	0,129603	1,515801	0,129571	12	21	0,131040

Mann-Whitney U-Test (mit_stat_Ausreissern.sta) Nach Var.: Gruppe_2 Markierte Tests signifikant ab p <,05000										
Variable	Rgsumme Neu_3	Rgsumme Chron	U	Z	p-Wert	Z korr.	p-Wert	Gült. N Neu_3	Gült. N Chron	2*eins. exakt p
MK-Freq (Mean)	215,0000	346,0000	115,0000	0,392953	0,694355	0,392985	0,694330	12	21	0,698580

Mann-Whitney U-Test (mit_stat_Ausreissern.sta) Nach Var.: Gruppe_2 Markierte Tests signifikant ab p <,05000										
Variable	Rgsumme Neu_4	Rgsumme Chron	U	Z	p-Wert	Z korr.	p-Wert	Gült. N Neu_4	Gült. N Chron	2*eins. exakt p
MK-Freq (Mean)	258,0000	303,0000	72,00000	2,002187	0,045265	2,002354	0,045247	12	21	0,044075

Längsvergleich

Wilcoxon-Test gepaarte Stichpr. (Neu_1234_mitNEU2.sta) Markierte Tests signifikant ab p <,05000				
Variablenpaar	Gültige N	T	Z	p-Wert
MK-Freq NEU_1, NEU_2	22	101,00000	0,827874	0,407742

Wilcoxon-Test gepaarte Stichpr. (Neu_1234_mitNEU2.sta) Markierte Tests signifikant ab p <,05000				
Variablenpaar	Gültige N	T	Z	p-Wert
MK-Freq NEU_1, NEU_3	17	39,00000	1,775179	0,075869

Wilcoxon-Test gepaarte Stichpr. (Neu_1234_mitNEU2.sta) Markierte Tests signifikant ab p <,05000				
Variablenpaar	Gültige N	T	Z	p-Wert
MK-Freq NEU_1, NEU_4	13	41,00000	0,314485	0,753153

Wilcoxon-Test gepaarte Stichpr. (Neu_1234_mitNEU2.sta) Markierte Tests signifikant ab p <,05000				
Variablenpaar	Gültige N	T	Z	p-Wert
MK-Freq NEU_2, NEU_3	17	51,00000	1,207122	0,227386

Wilcoxon-Test gepaarte Stichpr. (Neu_1234_mitNEU2.sta) Markierte Tests signifikant ab p <,05000				
Variablenpaar	Gültige N	T	Z	p-Wert
MK-Freq NEU_2, NEU_4	13	40,00000	0,384371	0,700704

Variablenpaar	Wilcoxon-Test gepaarte Stichpr. (Neu_1234_mitNEU2.sta Markierte Tests signifikant ab $p < ,05000$			
	Gültige N	T	Z	p-Wert
MK-Freq NEU_3, NEU_4	13	23,00000	1,572427	0,115852

8 Literaturverzeichnis

- Aceves Avila, F. J., G. A. Esquivel Nava, et al. (2004). "Cyclophosphamide boluses induce micronuclei expression in buccal mucosa cells of patients with systemic lupus erythematosus independent of cytochrome P450 2D6 status." J Rheumatol **31**(7): 1335-1339.
- Achenbach, T. M. and T. M. Ruffle (2000). "The Child Behavior Checklist and related forms for assessing behavioral/emotional problems and competencies." Pediatr Rev **21**(8): 265-271.
- Akhondzadeh, S., M. R. Mohammadi, et al. (2004). "Zinc sulfate as an adjunct to methylphenidate for the treatment of attention deficit hyperactivity disorder in children: a double blind and randomized trial [ISRCTN64132371]." BMC Psychiatry **4**: 9.
- Aman, M. G., S. Armstrong, et al. (2002). "Four-year follow-up of children with low intelligence and ADHD: a replication." Res Dev Disabil **23**(2): 119-134.
- American Academy of Pediatrics. Subcommittee on Attention-Deficit/Hyperactivity, D. and I. Committee on Quality (2001). "Clinical practice guideline: treatment of the school-aged child with attention-deficit/hyperactivity disorder." Pediatrics **108**(4): 1033-1044.
- American Psychiatric Association and American Psychiatric Association. Task Force on DSM-IV (2005). Diagnostic and statistical manual of mental disorders : DSM-IV-TR. Arlington, VA, American Psychiatric Assoc.
- Andreazza, A. C., B. N. Frey, et al. (2007). "DNA damage in rats after treatment with methylphenidate." Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry **31**(6): 1282-1288.
- Asherson, P. (2004). "Attention-Deficit Hyperactivity Disorder in the post-genomic era." Eur Child Adolesc Psychiatry **13 Suppl 1**: I50-70.
- Atkinson, M. and C. Hollis (2010). "NICE guideline: attention deficit hyperactivity disorder." Arch Dis Child Educ Pract Ed **95**(1): 24-27.
- Baier, G., H. Stopper, et al. (2002). "[Respiratory diseases and genotoxicity in tobacco smoke exposed children]." Laryngorhinootologie **81**(3): 217-225.
- Banaschewski, T., D. Coghill, et al. (2008). "[Long-acting medications for the treatment of hyperkinetic disorders - a systematic review and European treatment guideline. Part 1: overview and recommendations]." Z Kinder Jugendpsychiatr Psychother **36**(2): 81-94; quiz 94-85.
- Banaschewski, T., V. Roessner, et al. (2004). "Non-stimulant medications in the treatment of ADHD." Eur Child Adolesc Psychiatry **13 Suppl 1**: I102-116.
- Barkley, R. A. (1991). "The ecological validity of laboratory and analogue assessment methods of ADHD symptoms." J Abnorm Child Psychol **19**(2): 149-178.
- Barkley, R. A. (2003). "Issues in the diagnosis of attention-deficit/hyperactivity disorder in children." Brain Dev **25**(2): 77-83.
- Barkley, R. A., M. Fischer, et al. (2002). "The persistence of attention-deficit/hyperactivity disorder into young adulthood as a function of reporting source and definition of disorder." J Abnorm Psychol **111**(2): 279-289.
- Barkley, R. A., M. Fischer, et al. (2004). "Young adult follow-up of hyperactive children: antisocial activities and drug use." J Child Psychol Psychiatry **45**(2): 195-211.
- Barkley, R. A., K. R. Murphy, et al. (1996). "Motor vehicle driving competencies and risks in teens and young adults with attention deficit hyperactivity disorder." Pediatrics **98**(6 Pt 1): 1089-1095.

- Basu, A., P. Ghosh, et al. (2004). "Micronuclei as biomarkers of carcinogen exposure in populations exposed to arsenic through drinking water in West Bengal, India: a comparative study in three cell types." Cancer Epidemiol Biomarkers Prev **13**(5): 820-827.
- Beck, T., H. G. Moller, et al. (1987). "Alterations in regional energy metabolism in rat brain produced by small and by large doses of apomorphine: possible relations to autoreceptors." Eur J Pharmacol **139**(2): 139-146.
- Benner, S. E., M. J. Wargovich, et al. (1993). "Micronuclei: a potential intermediate marker for chemoprevention of aerodigestive tract cancer." J Cell Biochem Suppl **17F**: 250-254.
- Berzowski, H. and P. Riederer (1993). Neuro-Psychopharmaka : ein Therapie-Handbuch 6 Notfalltherapie, Antiepileptika, Beta-Rezeptorenblocker und sonstige Psychopharmaka. Wien [u.a.], Springer.
- Biederman, J. (2004). "Impact of comorbidity in adults with attention-deficit/hyperactivity disorder." J Clin Psychiatry **65 Suppl 3**: 3-7.
- Biederman, J. and S. V. Faraone (2005). "Attention-deficit hyperactivity disorder." Lancet **366**(9481): 237-248.
- Biederman, J., S. V. Faraone, et al. (1996). "Is childhood oppositional defiant disorder a precursor to adolescent conduct disorder? Findings from a four-year follow-up study of children with ADHD." J Am Acad Child Adolesc Psychiatry **35**(9): 1193-1204.
- Bloching, M., A. Hofmann, et al. (2000). "[Micronuclei as biological markers for the detection of local cancer transformation in the upper aerodigestive tract]." HNO **48**(6): 444-450.
- Bolognesi, C., A. Abbondandolo, et al. (1997). "Age-related increase of baseline frequencies of sister chromatid exchanges, chromosome aberrations, and micronuclei in human lymphocytes." Cancer Epidemiol Biomarkers Prev **6**(4): 249-256.
- Bolognesi, C., C. Lando, et al. (1999). "Chromosomal damage and ageing: effect on micronuclei frequency in peripheral blood lymphocytes." Age Ageing **28**(4): 393-397.
- Bonassi, S., C. Bolognesi, et al. (1995). "Influence of sex on cytogenetic end points: evidence from a large human sample and review of the literature." Cancer Epidemiol Biomarkers Prev **4**(6): 671-679.
- Bonassi, S., M. Fenech, et al. (2001). "HUMAN MicroNucleus project: international database comparison for results with the cytokinesis-block micronucleus assay in human lymphocytes: I. Effect of laboratory protocol, scoring criteria, and host factors on the frequency of micronuclei." Environ Mol Mutagen **37**(1): 31-45.
- Bonassi, S., L. Hagmar, et al. (2000). "Chromosomal aberrations in lymphocytes predict human cancer independently of exposure to carcinogens. European Study Group on Cytogenetic Biomarkers and Health." Cancer Res **60**(6): 1619-1625.
- Bonassi, S., A. Znaor, et al. (2007). "An increased micronucleus frequency in peripheral blood lymphocytes predicts the risk of cancer in humans." Carcinogenesis **28**(3): 625-631.
- Bonassi, S., A. Znaor, et al. (2004). "Chromosomal aberrations and risk of cancer in humans: an epidemiologic perspective." Cytogenet Genome Res **104**(1-4): 376-382.
- Brandeis, D., T. H. van Leeuwen, et al. (1998). "Neuroelectric mapping reveals precursor of stop failures in children with attention deficits." Behav Brain Res **94**(1): 111-125.
- Cascade, E., A. H. Kalali, et al. "Real-World Data on: Attention Deficit Hyperactivity Disorder Medication Side Effects." Psychiatry (Edgmont) **7**(4): 13-15.
- Castellanos, F. X., P. P. Lee, et al. (2002). "Developmental trajectories of brain volume abnormalities in children and adolescents with attention-deficit/hyperactivity disorder." JAMA **288**(14): 1740-1748.

- Castellanos, F. X. and R. Tannock (2002). "Neuroscience of attention-deficit/hyperactivity disorder: the search for endophenotypes." Nat Rev Neurosci **3**(8): 617-628.
- Chan, Y. P., J. M. Swanson, et al. (1983). "Methylphenidate hydrochloride given with or before breakfast: II. Effects on plasma concentration of methylphenidate and ritalinic acid." Pediatrics **72**(1): 56-59.
- Cheon, K. A., Y. H. Ryu, et al. (2003). "Dopamine transporter density in the basal ganglia assessed with [¹²³I]IPT SPET in children with attention deficit hyperactivity disorder." Eur J Nucl Med Mol Imaging **30**(2): 306-311.
- Christakis, D. A., F. J. Zimmerman, et al. (2004). "Early television exposure and subsequent attentional problems in children." Pediatrics **113**(4): 708-713.
- Conners, C. K. (1967). "The syndrome of minimal brain dysfunction: psychological aspects." Pediatr Clin North Am **14**(4): 749-766.
- Conners, C. K. (2002). "Forty years of methylphenidate treatment in Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder." J Atten Disord **6** Suppl 1: S17-30.
- Cornforth, C., E. Sonuga-Barke, et al. "Stimulant drug effects on attention deficit/hyperactivity disorder: a review of the effects of age and sex of patients." Curr Pharm Des **16**(22): 2424-2433.
- Countryman, P. I. and J. A. Heddle (1976). "The production of micronuclei from chromosome aberrations in irradiated cultures of human lymphocytes." Mutat Res **41**(2-3): 321-332.
- Damiani, D. and E. Casella (2010). "[Attention deficit disorder and hyperactivity: does the treatment affect the statural growth?]." Arq Bras Endocrinol Metabol **54**(3): 262-268.
- Davids, E., K. Zhang, et al. (2003). "Animal models of attention-deficit hyperactivity disorder." Brain Res Brain Res Rev **42**(1): 1-21.
- Delfino, V., G. Casartelli, et al. (2002). "Micronuclei and p53 accumulation in preneoplastic and malignant lesions of the head and neck." Mutagenesis **17**(1): 73-77.
- Deutsche Gesellschaft für Kinder- und Jugendpsychiatrie und Psychotherapie (2007). Leitlinien zu Diagnostik und Therapie von psychischen Störungen im Säuglings-, Kindes- und Jugendalter : mit 9 Tabellen. Köln, Dt. Ärzte-Verl.
- Döpfner, M., J. Frölich, et al. (2000). Hyperkinetische Störungen. Göttingen [u.a.], Hogrefe, Verl. für Psychologie.
- Döpfner, M. and G. Lehmkuhl (1998). DISYPS-KJ : Diagnostik-System für psychische Störungen im Kindes- und Jugendalter nach ICD-10 und DSM-IV ; klinische Diagnostik - Elternurteil - Erzieher- und Lehrerurteil - Selbsturteil ; Manual. Bern [u.a.], Huber.
- Dulcan, M. (1997). "Practice parameters for the assessment and treatment of children, adolescents, and adults with attention-deficit/hyperactivity disorder. American Academy of Child and Adolescent Psychiatry." J Am Acad Child Adolesc Psychiatry **36**(10 Suppl): 85S-121S.
- Durston, S., N. T. Tottenham, et al. (2003). "Differential patterns of striatal activation in young children with and without ADHD." Biol Psychiatry **53**(10): 871-878.
- Eccles, R. (2002). "Acute cooling of the body surface and the common cold." Rhinology **40**(3): 109-114.
- El-Zein, R. A., S. Z. Abdel-Rahman, et al. (2005). "Cytogenetic effects in children treated with methylphenidate." Cancer Lett **230**(2): 284-291.
- El-Zein, R. A., M. J. Hay, et al. (2006). "Response to comments on 'Cytogenetic effects in children treated with methylphenidate' by El-Zein et al." Cancer Lett **231**(1): 146-148.
- Ettrich, C. and K. U. Ettrich (2006). Verhaltensauffällige Kinder und Jugendliche : mit 24 Abbildungen und 16 Tabellen. Heidelberg, Springer-Medizin-Verl.

- Evans, H. J., G. J. Neary, et al. (1959). "The relative biological efficiency of single doses of fast neutrons and gamma-rays on *Vicia faba* roots and the effect of oxygen. Part II. Chromosome damage: the production of micronuclei." Int J Radiat Biol **1**: 216-229.
- Faraone, S. V. and J. Biederman (1998). "Neurobiology of attention-deficit hyperactivity disorder." Biol Psychiatry **44**(10): 951-958.
- Faraone, S. V., T. Spencer, et al. (2004). "Meta-analysis of the efficacy of methylphenidate for treating adult attention-deficit/hyperactivity disorder." J Clin Psychopharmacol **24**(1): 24-29.
- Fenech, M. (2000). "The in vitro micronucleus technique." Mutat Res **455**(1-2): 81-95.
- Fenech, M. (2002). "Micronutrients and genomic stability: a new paradigm for recommended dietary allowances (RDAs)." Food Chem Toxicol **40**(8): 1113-1117.
- Fenech, M. (2007). "Cytokinesis-block micronucleus cytome assay." Nat Protoc **2**(5): 1084-1104.
- Fenech, M., W. P. Chang, et al. (2003). "HUMN project: detailed description of the scoring criteria for the cytokinesis-block micronucleus assay using isolated human lymphocyte cultures." Mutat Res **534**(1-2): 65-75.
- Fenech, M. and J. Rinaldi (1994). "The relationship between micronuclei in human lymphocytes and plasma levels of vitamin C, vitamin E, vitamin B12 and folic acid." Carcinogenesis **15**(7): 1405-1411.
- Ganten, D. and M. Bader (2003). Grundlagen der molekularen Medizin : mit 28 Tabellen. Berlin [u.a.], Springer.
- Garewal, H. S., L. Ramsey, et al. (1993). "Clinical experience with the micronucleus assay." J Cell Biochem Suppl **17F**: 206-212.
- Gerlach, M. (2004). Neuro-Psychopharmaka im Kindes- und Jugendalter : Grundlagen und Therapie. Wien [u.a.], Springer.
- Greenhill, L. L. and B. B. Osman (2000). Ritalin : theory and practice. Larchmont, NY, Liebert.
- Group, M. C. (1999). "MTA Cooperative Group: A 14-month randomized clinical trial of treatment strategies for attention-deficit/hyperactivity disorder. The MTA Cooperative Group. Multimodal Treatment Study of Children with ADHD." Arch Gen Psychiatry **56**(12): 1073-1086.
- Group, M. T. A. C. (2004). "National Institute of Mental Health Multimodal Treatment Study of ADHD follow-up: 24-month outcomes of treatment strategies for attention-deficit/hyperactivity disorder." Pediatrics **113**(4): 754-761.
- Gustavino, B., F. Degrassi, et al. (1994). "Mitotic indirect non-disjunction in phytohemagglutinin stimulated human lymphocytes." Mutagenesis **9**(1): 17-21.
- Häckel, H. (2008). Meteorologie : 29 Tabellen. Stuttgart, Ulmer.
- Hagmar, L., U. Stromberg, et al. (2004). "Impact of types of lymphocyte chromosomal aberrations on human cancer risk: results from Nordic and Italian cohorts." Cancer Res **64**(6): 2258-2263.
- Haveric, A., S. Haveric, et al. "Micronuclei frequencies in peripheral blood and buccal exfoliated cells of young smokers and non-smokers." Toxicol Mech Methods **20**(5): 260-266.
- Hechtman, L., H. Abikoff, et al. (2004). "Academic achievement and emotional status of children with ADHD treated with long-term methylphenidate and multimodal psychosocial treatment." J Am Acad Child Adolesc Psychiatry **43**(7): 812-819.
- Heddle, J. A. and A. V. Carrano (1977). "The DNA content of micronuclei induced in mouse bone marrow by gamma-irradiation: evidence that micronuclei arise from acentric chromosomal fragments." Mutat Res **44**(1): 63-69.

- Holtkamp, K., B. Peters-Wallraf, et al. (2002). "Methylphenidate-related growth impairment." J Child Adolesc Psychopharmacol **12**(1): 55-61.
- Holtmann, M., B. Kaina, et al. (2006). "Zytogenetische Veränderungen durch Methylphenidat?" Zeitschrift für Kinder-und Jugendpsychiatrie und Psychotherapie **34**(3): 215-220.
- Huss, M., A. Iseler, et al. (2001). "[Cross-cultural comparison of Conners Scales: Can the US-American factorial structure be replicated on German clinical sample?]." Z Kinder Jugendpsychiatr Psychother **29**(1): 16-24.
- James, A. and E. Taylor (1990). "Sex differences in the hyperkinetic syndrome of childhood." J Child Psychol Psychiatry **31**(3): 437-446.
- Janhsen, K. (2007). "Pillen für den Zappelphilipp." GEK-Arzneimittel Report 2007: 226-244.
- Jensen, P. S., D. Martin, et al. (1997). "Comorbidity in ADHD: implications for research, practice, and DSM-V." J Am Acad Child Adolesc Psychiatry **36**(8): 1065-1079.
- Jerome, L. (2001). "Can methylphenidate facilitate sleep in children with attention deficit hyperactivity disorder?" J Child Adolesc Psychopharmacol **11**(1): 109.
- Kahn, R. S., J. Khoury, et al. (2003). "Role of dopamine transporter genotype and maternal prenatal smoking in childhood hyperactive-impulsive, inattentive, and oppositional behaviors." J Pediatr **143**(1): 104-110.
- Kalucka, S. (2007). "Consequences of passive smoking in home environment." Przegl Lek **64**(10): 632-641.
- Kaufman, J., B. Birmaher, et al. (1997). "Schedule for Affective Disorders and Schizophrenia for School-Age Children-Present and Lifetime Version (K-SADS-PL): initial reliability and validity data." J Am Acad Child Adolesc Psychiatry **36**(7): 980-988.
- Konopacka, M. (2003). "Effect of smoking and aging on micronucleus frequencies in human exfoliated buccal cells." Neoplasma **50**(5): 380-382.
- Krause, K. H., S. H. Dresel, et al. (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**(2): 107-110.
- Kuntsi, J., J. Oosterlaan, et al. (2001). "Psychological mechanisms in hyperactivity: I. Response inhibition deficit, working memory impairment, delay aversion, or something else?" J Child Psychol Psychiatry **42**(2): 199-210.
- Kuschinsky, G., H. Lüllmann, et al. (1993). Kurzes Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie : 433 Formeln, meist farbig, 46 Tabellen. Stuttgart [u.a.], Thieme.
- Laucht, M. and M. H. Schmidt (2004). "[Maternal smoking during pregnancy: risk factor for ADHD in the offspring?]." Z Kinder Jugendpsychiatr Psychother **32**(3): 177-185.
- Le Nedelec, M. J. and R. J. Rosengren (2002). "Methylphenidate inhibits cytochrome P450 in the Swiss Webster mouse." Hum Exp Toxicol **21**(5): 273-280.
- Leddy, J. J., J. G. Waxmonsky, et al. (2009). "Dopamine-related genotypes and the dose-response effect of methylphenidate on eating in attention-deficit/hyperactivity disorder youths." J Child Adolesc Psychopharmacol **19**(2): 127-136.
- Levy, F., D. A. Hay, et al. (1997). "Attention-deficit hyperactivity disorder: a category or a continuum? Genetic analysis of a large-scale twin study." J Am Acad Child Adolesc Psychiatry **36**(6): 737-744.
- Lisska, M. C. and S. A. Rivkees (2003). "Daily methylphenidate use slows the growth of children: a community based study." J Pediatr Endocrinol Metab **16**(5): 711-718.
- Lopez, F., R. Silva, et al. (2003). "Comparative efficacy of two once daily methylphenidate formulations (Ritalin LA and Concerta) and placebo in children with attention deficit hyperactivity disorder across the school day." Paediatr Drugs **5**(8): 545-555.

- MacGregor, J. T., C. M. Wehr, et al. (1997). "'Spontaneous' genetic damage in man: evaluation of interindividual variability, relationship among markers of damage, and influence of nutritional status." Mutation Research **377**(1): 125-135.
- Maher, B. (2008). "Poll results: look who's doping." Nature **452**(7188): 674-675.
- Mannuzza, S., R. G. Klein, et al. (1998). "Adult psychiatric status of hyperactive boys grown up." Am J Psychiatry **155**(4): 493-498.
- Mash, E. J. and R. A. Barkley (2003). Child psychopathology. New York (u.a.), Guilford Press.
- McCabe, S. E., C. J. Teter, et al. (2005). "Nonmedical use of prescription opioids among U.S. college students: prevalence and correlates from a national survey." Addict Behav **30**(4): 789-805.
- Milberger, S., J. Biederman, et al. (1997). "Pregnancy, delivery and infancy complications and attention deficit hyperactivity disorder: issues of gene-environment interaction." Biol Psychiatry **41**(1): 65-75.
- Moll, G. H., H. Heinrich, et al. (2003). "Methylphenidate and intracortical excitability: opposite effects in healthy subjects and attention-deficit hyperactivity disorder." Acta Psychiatr Scand **107**(1): 69-72.
- Möller, H.-J., G. Laux, et al. (2009). Psychiatrie und Psychotherapie, Georg Thieme Verlag Stuttgart.
- Möller, H.-J., G. Laux, et al. (2009). Psychiatrie und Psychotherapie. Stuttgart, Thieme.
- Moore, L. E., M. L. Warner, et al. (1996). "Use of the fluorescent micronucleus assay to detect the genotoxic effects of radiation and arsenic exposure in exfoliated human epithelial cells." Environ Mol Mutagen **27**(3): 176-184.
- Morris, S. M., D. M. Petibone, et al. (2012). "The genetic toxicity of methylphenidate: a review of the current literature." J Appl Toxicol.
- Mortelmans, K., S. Haworth, et al. (1986). "Salmonella mutagenicity tests: II. Results from the testing of 270 chemicals." Environ Mutagen **8 Suppl 7**: 1-119.
- Neri, M., M. Ceppi, et al. (2005). "Baseline micronuclei frequency in children: estimates from meta- and pooled analyses." Environ Health Perspect **113**(9): 1226-1229.
- Neri, M., A. Fucic, et al. (2003). "Micronuclei frequency in children exposed to environmental mutagens: a review." Mutat Res **544**(2-3): 243-254.
- OECD Test No. 487: In Vitro Mammalian Cell Micronucleus Test, OECD Publishing.
- Oestreicher, N., G. D. Friedman, et al. (2007). "Methylphenidate use in children and risk of cancer at 18 sites: results of surveillance analyses." Pharmacoepidemiol Drug Saf **16**(12): 1268-1272.
- Pastor, S., S. Gutierrez, et al. (2001). "Cytogenetic analysis of Greek farmers using the micronucleus assay in peripheral lymphocytes and buccal cells." Mutagenesis **16**(6): 539-545.
- Ponsa, I., J. A. Ramos-Quiroga, et al. (2009). "Absence of cytogenetic effects in children and adults with attention-deficit/hyperactivity disorder treated with methylphenidate." Mutat Res **666**(1-2): 44-49.
- Preston, R. J., S. H. Kollins, et al. (2005). "Comments on 'Cytogenetic effects in children treated with methylphenidate' by El-Zein et al." Cancer Lett **230**(2): 292-294.
- Pschyrembel, W. and O. Dornblüth (2004). Pschyrembel Klinisches Wörterbuch : [... enthält ... 330 Tabellen]. Berlin [u.a.], de Gruyter.
- Ramirez, A. and P. H. Saldanha (2002). "Micronucleus investigation of alcoholic patients with oral carcinomas." Genet Mol Res **1**(3): 246-260.
- Ramos-Remus, C., G. Dorazco-Barragan, et al. (2002). "Genotoxicity assessment using micronuclei assay in rheumatoid arthritis patients." Clin Exp Rheumatol **20**(2): 208-212.

- Remschmidt, H. (2009). Multiaxiales Klassifikationsschema für psychische Störungen des Kindes- und Jugendalters nach ICD-10 der WHO : mit einem synoptischen Vergleich von ICD-10 mit DSM-IV. Bern, Huber.
- Remschmidt, H. and Bundesärztekammer (2007). Aufmerksamkeitsdefizit-/Hyperaktivitätsstörung (ADHS) : Stellungnahme ; mit 7 Tabellen. Köln, Dt. Ärzte-Verl.
- Russell, V. A., A. S. de Villiers, et al. (2000). "Methylphenidate affects striatal dopamine differently in an animal model for attention-deficit/hyperactivity disorder--the spontaneously hypertensive rat." Brain Res Bull **53**(2): 187-192.
- Ryffel-Rawak, D. (2004). ADHS bei Frauen : den Gefühlen ausgeliefert. Bern [u.a.], Huber.
- Salbach, H., M. Huss, et al. (2002). "[Impulsiveness in children with hyperkinetic syndrome]." Prax Kinderpsychol Kinderpsychiatr **51**(6): 466-475.
- Sandberg, S. (2002). Hyperactivity and attention disorders of childhood. Cambridge, Cambridge Univ. Press.
- Schachter, H. M., B. Pham, et al. (2001). "How efficacious and safe is short-acting methylphenidate for the treatment of attention-deficit disorder in children and adolescents? A meta-analysis." CMAJ **165**(11): 1475-1488.
- Schiffmann, D. and U. De Boni (1991). "Dislocation of chromatin elements in prophase induced by diethylstilbestrol: a novel mechanism by which micronuclei can arise." Mutat Res **246**(1): 113-122.
- Schneider, S. (2009). Kinder-DIPS : diagnostisches Interview bei psychischen Störungen im Kindes- und Jugendalter ; [Handbuch] ; [Protokollbögen auf CD-ROM]. Heidelberg, Springer.
- Schulte-Markwort, M. and M. Huss (2004). Methylphenidat : 7 Tabellen. Stuttgart [u.a.], Thieme.
- Schupp, N., E. M. Dette, et al. (2008). "Benfotiamine reduces genomic damage in peripheral lymphocytes of hemodialysis patients." Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol **378**(3): 283-291.
- Schwabe, U. and D. Paffrath (2010). Arzneiverordnungs-Report 2010 : Aktuelle Daten, Kosten, Trends und Kommentare. Berlin, Springer Berlin.
- Seeman, P. and B. Madras (2002). "Methylphenidate elevates resting dopamine which lowers the impulse-triggered release of dopamine: a hypothesis." Behav Brain Res **130**(1-2): 79-83.
- Selby, J. V., G. D. Friedman, et al. (1989). "Screening prescription drugs for possible carcinogenicity: eleven to fifteen years of follow-up." Cancer Res **49**(20): 5736-5747.
- Sergeant, J. A., H. Geurts, et al. (2003). "The top and the bottom of ADHD: a neuropsychological perspective." Neurosci Biobehav Rev **27**(7): 583-592.
- Sergeant, J. A., H. Geurts, et al. (2002). "How specific is a deficit of executive functioning for attention-deficit/hyperactivity disorder?" Behav Brain Res **130**(1-2): 3-28.
- Shin, D. M., W. N. Hittelman, et al. (1994). "Biomarkers in upper aerodigestive tract tumorigenesis: a review." Cancer Epidemiol Biomarkers Prev **3**(8): 697-709.
- Slusarek, M., S. Velling, et al. (2001). "Motivational effects on inhibitory control in children with ADHD." J Am Acad Child Adolesc Psychiatry **40**(3): 355-363.
- Sonuga-Barke, E. J. (2002). "Psychological heterogeneity in AD/HD--a dual pathway model of behaviour and cognition." Behav Brain Res **130**(1-2): 29-36.
- Spencer, T., J. Biederman, et al. (2002). "A double-blind comparison of desipramine and placebo in children and adolescents with chronic tic disorder and comorbid attention-deficit/hyperactivity disorder." Arch Gen Psychiatry **59**(7): 649-656.
- Steinhausen, H.-C. and R. Blank (1995). Hyperkinetische Störungen im Kindes- und Jugendalter. Stuttgart [u.a.], Kohlhammer.

- Stopper, H. and S. O. Müller (1997). "Micronuclei as a biological endpoint for genotoxicity: A minireview." Toxicology in Vitro **11**(5): 661-667.
- Stopper, H., S. Walitza, et al. (2008). "Brief review of available evidence concerning the potential induction of genomic damage by methylphenidate." J Neural Transm **115**(2): 331-334.
- Suter, W., H. J. Martus, et al. (2006). "Methylphenidate is not clastogenic in cultured human lymphocytes and in the mouse bone-marrow micronucleus test." Mutat Res **607**(2): 153-159.
- Swanson, J. M. and N. D. Volkow (2002). "Pharmacokinetic and pharmacodynamic properties of stimulants: implications for the design of new treatments for ADHD." Behav Brain Res **130**(1-2): 73-78.
- Swanson, J. M., S. B. Wigal, et al. (2004). "A comparison of once-daily extended-release methylphenidate formulations in children with attention-deficit/hyperactivity disorder in the laboratory school (the Comacs Study)." Pediatrics **113**(3 Pt 1): e206-216.
- Taylor, E. (1999). "Developmental neuropsychopathology of attention deficit and impulsiveness." Dev Psychopathol **11**(3): 607-628.
- Taylor, E., M. Dopfner, et al. (2004). "European clinical guidelines for hyperkinetic disorder - first upgrade." Eur Child Adolesc Psychiatry **13 Suppl 1**: I7-30.
- Taylor, E., J. Sergeant, et al. (1998). "Clinical guidelines for hyperkinetic disorder. European Society for Child and Adolescent Psychiatry." Eur Child Adolesc Psychiatry **7**(4): 184-200.
- Teo, S. K., R. H. San, et al. (2003). "D-Methylphenidate is non-genotoxic in in vitro and in vivo assays." Mutat Res **537**(1): 67-79.
- Thome, J. and K. A. Jacobs (2004). "Attention deficit hyperactivity disorder (ADHD) in a 19th century children's book." Eur Psychiatry **19**(5): 303-306.
- Titenko-Holland, N., R. A. Jacob, et al. (1998). "Micronuclei in lymphocytes and exfoliated buccal cells of postmenopausal women with dietary changes in folate." Mutat Res **417**(2-3): 101-114.
- Tredaniel, J., F. Savinelli, et al. (2006). "[The consequences of passive smoking in adults]." Rev Mal Respir **23 Suppl 2**: 4S67-64S73.
- Van Schooten, F. J., A. Besaratinia, et al. (2002). "Effects of oral administration of N-acetyl-L-cysteine: a multi-biomarker study in smokers." Cancer Epidemiol Biomarkers Prev **11**(2): 167-175.
- Vles, J. S., F. J. Feron, et al. (2003). "Methylphenidate down-regulates the dopamine receptor and transporter system in children with attention deficit hyperkinetic disorder (ADHD)." Neuropediatrics **34**(2): 77-80.
- Von Hoff, D. D., J. R. McGill, et al. (1992). "Elimination of extrachromosomally amplified MYC genes from human tumor cells reduces their tumorigenicity." Proc Natl Acad Sci U S A **89**(17): 8165-8169.
- Walitza, S., K. Kampf, et al. (2009). "No elevated genomic damage in children and adolescents with attention deficit/hyperactivity disorder after methylphenidate therapy." Toxicol Lett **184**(1): 38-43.
- Walitza, S., K. Kampf, et al. (2010). "Prospective follow-up studies found no chromosomal mutagenicity of methylphenidate therapy in ADHD affected children." Toxicol Lett **193**(1): 4-8.
- Walitza, S., B. Werner, et al. (2007). "Does methylphenidate cause a cytogenetic effect in children with attention deficit hyperactivity disorder?" Environ Health Perspect **115**(6): 936-940.

- Weyandt, L. L., G. Janusis, et al. (2009). "Nonmedical prescription stimulant use among a sample of college students: relationship with psychological variables." J Atten Disord **13**(3): 284-296.
- Wilens, T. E., L. A. Adler, et al. (2008). "Misuse and diversion of stimulants prescribed for ADHD: a systematic review of the literature." J Am Acad Child Adolesc Psychiatry **47**(1): 21-31.
- Wilens, T. E., S. V. Faraone, et al. (2003). "Does stimulant therapy of attention-deficit/hyperactivity disorder beget later substance abuse? A meta-analytic review of the literature." Pediatrics **111**(1): 179-185.
- Wilens, T. E., M. Gignac, et al. (2006). "Characteristics of adolescents and young adults with ADHD who divert or misuse their prescribed medications." J Am Acad Child Adolesc Psychiatry **45**(4): 408-414.
- Wisniewski, A. (2004). "[Application of actigraphy in psychiatry]." Psychiatr Pol **38**(6): 1127-1143.
- World Health Organization (1993). The ICD-10 classification of mental and behavioural disorders [...]. Diagnostic criteria for research. Geneva,.

Danksagung

Frau Prof. Dr. H. Stopper danke ich für die Bereitstellung des Themas und für die hervorragende Betreuung und Unterstützung.

Allen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Stopper des toxikologischen Instituts der Universität Würzburg danke ich für ihre Herzlichkeit und ihre Hilfsbereitschaft.

Ich danke Frau Maria Scheurich, die mir mit sehr viel Geduld grundlegende Labortechniken beibrachte, und allen anderen, die jederzeit erklärend und helfend für mich da waren.

Danke an meine Eltern, meine Schwestern und natürlich an meinen Mann!