

Aus dem Institut für Toxikologie
der Universität Würzburg
Vorstand: Frau Professor Dr.
Helga Stopper

**Mikrokernfrequenzanalyse unter dem Einfluss von Methylphenidat und
chronischem Stress bei adultem ADHS**

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

vorgelegt von
Silvana Spiegel
aus Oranienburg

Würzburg, September 2015

Referentin: Univ. - Prof. Dr. rer. Nat. Helga Stopper

Korreferent: Priv. - Doz. Dr. Martin J. Herrmann

Dekan: Prof. Dr. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 14.06.2016

Die Promovendin ist Ärztin

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Aufmerksamkeitsdefizit - Hyperaktivitätsstörung (ADHS)	2
1.1.1	Das Störungsbild ADHS/ ADS	2
1.1.2	Ursachen und Einflussfaktoren des ADHS / ADS	6
1.1.3	Besonderheiten des adulten ADHS	8
1.2	Therapie mit MPH	9
1.2.1	Indikation	9
1.2.2	Wirkungsweise.....	10
1.2.3	Nebenwirkungen und Kontraindikationen	11
1.3	Stress.....	11
1.3.1	Definition Stress.....	11
1.3.2	Stressbelastung speziell beim ADHS	13
1.3.3	Stresseinfluss auf das endokrine System	13
1.3.4	Einfluss von Stress auf die Tumorgenese	16
1.4	Mikrokernfrequenzanalyse	17
1.4.1	Definition Mikrokerne (MK)	17
1.4.2	Hypothesen zur Entstehung von MK	18
1.4.3	Einflussfaktoren auf die MK - Entstehung.....	19
1.4.4	Bedeutung der MK - Frequenzen.....	19
1.5	Fragestellung	20
2	Material und Methoden.....	22
2.1	Material	22
2.1.1	Probanden	22
2.1.2	Lymphozyten	26
2.1.3	Speichel.....	26
2.1.4	Chemikalien.....	27
2.1.5	Geräte, sonstige Materialien	29
2.1.6	Software	30
2.2	Labormethoden.....	31

2.2.1	Lymphozytenkultur.....	31
2.2.2	Fixierung der Lymphozytenpräparate	33
2.2.3	Herstellung von Positivkontrollen mit MMC und MMS	34
2.2.4	Auswertung der Lymphozytenpräparate	38
2.3	Interviewmethoden.....	43
2.3.1	Diagnostisches Kurzinterview bei psychischen Störungen (Mini - DIPS)	43
2.3.2	Semistrukturiertes Interview zur Erfassung weiterer toxischer Einflüsse.....	44
2.3.3	Trier Inventar (TICS) zur Erfassung chronischen Stressses.....	45
2.4	Cortisolanalyse	48
2.5	Statistik	49
3	Ergebnisse des Vorexperimentes	50
3.1	Ergebnisse für Mauslymphomzellen	50
3.2	Ergebnisse für Humanlymphozyten	53
4	Ergebnisse der Studie	58
4.1	Zytogenetische Endpunkte.....	58
4.1.1	Ergebnisse der Gruppengesamtheit	58
4.1.2	Gruppenunterschiede in den zytogenetischen Endpunkten.....	59
4.1.3	Zytogenetische Endpunkte unter MPH - Einnahme	62
4.2	Chronische psychosoziale Stressbelastung.....	63
4.2.1	Gruppenunterschiede in der psychosozialen Stressbelastung	63
4.2.1	Psychosoziale Stressbelastung unter MPH - Einnahme.....	68
4.2.2	Zytogenetische Endpunkte unter psychosozialer Stressbelastung.....	72
4.3	Cortisolspiegel	77
4.3.1	Gruppenunterschiede im Cortisolspiegel	77
4.3.2	Cortisolspiegel und zytogenetische Endpunkte	80
4.3.3	Cortisolspiegel unter MPH - Einnahme.....	81
4.3.4	Cortisolspiegel unter psychosozialem Stress	83
4.4	Weitere Confounder	83
4.4.1	Kontinentalflüge	83
4.4.2	Bildungsniveau	84

4.4.3	Rauchen	88
4.4.4	BMI	89
4.4.5	Schwankungen in der Labormethode	90
5	Diskussion	93
5.1	Hypothese 1: MPH verursacht keine MK - Frequenzerhöhung	93
5.2	Hypothese 2: MPH senkt das Stresslevel	93
5.2.1	Stressbelastung der Probanden	93
5.2.2	Cortisolspiegel unter Stressbelastung	95
5.2.3	Einfluss der MPH - Einnahme auf die Stresslevel.....	96
5.3	Hypothese 3: Erhöhte chronische Stressbelastung führt zu erhöhten zytotoxischen Markern	97
5.3.1	Korrelationen von hohem subjektiven Stress mit zytotoxischen Markern bei ADHS mit Komorbidität Depression	97
5.3.2	Stressabhängige Lifestylefaktoren als Krebsursache	98
5.3.3	Veränderte Mitose und Apoptose als Risikofaktoren für die Krebsentstehung	98
6	Limitationen der Studie.....	100
7	Zusammenfassung.....	101
8	Abbildungs - und Tabellenverzeichnis.....	103
9	Abkürzungsverzeichnis	108
10	Literaturverzeichnis	110

1 Einleitung

ADHS ist mit einer weltweiten Prävalenz von ca. 8% - 11,4% [1] die häufigste diagnostizierte neuropsychiatrische Erkrankung im Kindesalter. Bei ca. 45% - 60% der Patienten besteht sie in teilweiser bis voller Ausprägung auch ins Erwachsenenalter fort, so dass man von einer Prävalenz in der erwachsenen Bevölkerung von 5% ausgeht [1].

Die Prävalenz der Störung ist in den letzten 30 Jahren weitgehend konstant geblieben. Der scheinbare Anstieg ist eher den veränderten Diagnosekriterien geschuldet. Laut einer Metaanalyse beträgt beispielsweise die Differenz der Prävalenz von ICD - 10 zu DSM IV ca. 4,09 % [2]. Umso kritischer wird der folglich steigende Einsatz des Medikamentes Methylphenidat (MPH), das zu den Stimulanzien gehört und in der medikamentösen Therapie des ADHS am Häufigsten eingesetzt wird, von der allgemeinen Bevölkerung gesehen.

Nichtsdestotrotz bleibt MPH die Therapie der Wahl. Eine positive Wirkung auf die exekutive und nicht - exekutive Erinnerungsfähigkeit, Reaktionszeit, Reaktionszeitvariabilität, Reaktionshemmung durch MPH - Einnahme wurde in vielen Studien nachgewiesen [3]. Auch eine gesteigerte Aufmerksamkeit, verminderte Hyperaktivität [4] sind positive Effekte des Medikamentes. Darüber hinaus können auch mit ADHS assoziiertes Verhalten wie ein erhöhtes Kriminalitätsrisiko unter MPH vermindert werden [5].

Jedoch gelangte das Medikament durch die Studie von El - Zein und Kollegen [6] bezüglich Nebenwirkungen stark in die Kritik. In dieser Studie wurde ein signifikanter 3 - facher Anstieg der chromosomalen Aberrationen, ein 4,3 - facher Anstieg des Schwesterchromatidaustausches und ein 2,4 - facher Anstieg der Mikrokernfrequenz nach dreimonatiger Einnahme des Medikamentes gefunden. Da diese Marker alle die genomische Stabilität repräsentieren und eine beeinträchtigte Genomstabilität mit einem erhöhten Krebsrisiko korreliert, resultierten

daraus große Bedenken hinsichtlich der Sicherheit des Medikamentes, besonders in Bezug auf ein erhöhtes Krebsrisiko.

Das Studienergebnis von El - Zein und Kollegen konnte in nachfolgenden zahlreichen Studien nicht reproduziert werden. Der Einnahmezeitraum dieser Studien betrug überwiegend 3 Monate, der längste Einnahmezeitraum in diesen Studien lag bei 12 Monate mit 21 Probanden [7].

Im Hinblick auf die jahrelange Einnahmedauer bei adultem ADHS bleibt die Frage offen, ob auch eine längere Einnahmezeit bezogen auf potentielle DNA-Schäden unbedenklich ist.

Betrachtet man die Mikrokernfrequenzanzahl vergangener Studien im Allgemeinen, fällt auf, dass ADHS - Patienten einen Trend zu einer höheren Anzahl an Mikrokernen unabhängig von der MPH - Einnahme aufweisen [8].

Was kann für diese allgemeine erhöhte Mikrokernfrequenzen ursächlich sein? Einer möglichen Antwort auf diese Frage soll in dieser Studie nachgegangen werden. So soll ein erhöhtes chronisches Stresslevel als Ursache untersucht werden. In vitro wurde bereits nachgewiesen, dass das Katecholaminanalogon Isoproterenol über β_2 - Adrenorezeptoren zu einer Akkumulation von DNA - Schäden führt. Katecholamine sowie der β_2 - Adrenorezeptor sind unter anderem bei der Stressantwort in vivo beteiligt. [9].

1.1 Aufmerksamkeitsdefizit - Hyperaktivitätsstörung (ADHS)

1.1.1 Das Störungsbild ADHS/ ADS

Diese neuropsychiatrische Störung beginnt charakteristischerweise, auch bei der retrospektiven Diagnosestellung, immer im Kindesalter. Die Grundmerkmale von ADHS sind:

- Störung der Aufmerksamkeit mit Mangel an Ausdauer bei Beschäftigungen und die Tendenz, Tätigkeiten zu wechseln, bevor sie zu Ende gebracht wurden
- Unruhiges Verhalten insbesondere mit der Unfähigkeit, stillsitzen zu können
- Impulsivität z. B. mit abrupten motorischen und / oder verbalen Aktionen, die nicht in den sozialen Kontext passen

Nach überwiegen einzelner Symptomkomplexe wird die Störung in Subtypen klassifiziert (Tabelle 1). Die Diagnosestellung erfolgt nach dem DSM - V (Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders - V) oder nach ICD - 10 (The International Classification of Mental and Behavioural Disorders - 10), wobei die DSM - Kriterien besser beschrieben sind und sie deshalb meistens für Studien verwendet werden.

Diese Kriterien werden regelmäßig aktualisiert. Seit einigen Monaten gibt es auch schon das DSM - VI mit überarbeiteten Kriterien. Zur Zeit der Probandenrekrutierung dieser Studie 2011 wurde noch das DSM - IV verwendet.

Tabelle 1 Subtypen von ADHS bzw. der hyperkinetischen Störung

DSM – IV		ICD – 10	
ADHS, kombinierter Typ	314.01	Einfache Störung der Aktivität und Aufmerksamkeit	F90.0
ADHS, vorwiegend unaufmerksamer Typ (auch ADS)	314.00	Andere näher bezeichnete Verhaltens - und emotionale Störungen, Beginn in der Kindheit und Jugend: Aufmerksamkeitsstörung ohne Hyperaktivität	F98.8

ADHS, vorwiegend hyperaktiv - impulsiver Typ	314.01		
ADHS, nicht näher bezeichnet, „Residualtyp“	314.9		

Hauptkriterien A - E zur Diagnosestellung nach DSM - IV [10]:

A. Für entweder Punkt 1. (Unaufmerksamkeit) und / oder Punkt 2. (Hyperaktivität und Impulsivität) müssen \geq sechs der neun Symptome während der letzten sechs Monate beständig in einem mit dem Entwicklungsstand des Kindes nicht zu vereinbarenden und unangemessenen Ausmaß vorhanden gewesen sein.

Tabelle 2 Klassifikationskriterien nach DSM - IV

A.1: Unaufmerksamkeit
<ul style="list-style-type: none"> - beachtet häufig Einzelheiten nicht oder macht Flüchtigkeitsfehler bei den Schularbeiten, bei der Arbeit oder bei anderen Tätigkeiten, - hat oft Schwierigkeiten, längere Zeit die Aufmerksamkeit bei Aufgaben oder beim Spielen aufrecht zu erhalten, - scheint häufig nicht zuzuhören, wenn andere ihn / sie ansprechen, - führt häufig Anweisungen anderer nicht vollständig durch und kann Schularbeiten, andere Arbeiten oder Pflichten am Arbeitsplatz nicht zu Ende bringen (nicht aufgrund oppositionellen Verhaltens oder von Verständnisschwierigkeiten), - hat häufig Schwierigkeiten, Aufgaben und Aktivitäten zu organisieren, - vermeidet häufig, hat eine Abneigung gegen oder beschäftigt sich häufig nur widerwillig mit Aufgaben, die länger andauernde geistige Anstrengungen erfordern wie Mitarbeit im Unterricht oder Hausaufgaben,

<ul style="list-style-type: none"> - verliert häufig Gegenstände, die er / sie für Aufgaben oder Aktivitäten benötigt (z.B. Spielsachen, Hausaufgabenhefte, Stifte, Bücher oder Werkzeug), - lässt sich öfter durch äußere Reize leicht ablenken, - ist bei Alltagstätigkeiten häufig vergesslich.
A.2: Hyperaktivität
<ul style="list-style-type: none"> - zappelt häufig mit Händen oder Füßen oder rutscht auf dem Stuhl herum, - steht in der Klasse und anderen Situationen, in denen Sitzenbleiben erwartet wird, häufig auf, - läuft häufig herum oder klettert exzessiv in Situationen, in denen dies unpassend ist (bei Jugendlichen oder Erwachsenen kann dies auf ein subjektives Unruhegefühl beschränkt bleiben), - hat häufig Schwierigkeiten, ruhig zu spielen oder sich mit Freizeitaktivitäten ruhig zu beschäftigen, - ist häufig "auf Achse" oder handelt oftmals, als wäre er / sie "getrieben", - redet häufig übermäßig viel (in ICD - 10 als Impulsivitätsmerkmal gewertet).
Impulsivität
<ul style="list-style-type: none"> - platzt häufig mit den Antworten heraus, bevor die Frage zu Ende gestellt ist, - kann nur schwer warten, bis er / sie an der Reihe ist, - unterbricht und stört andere häufig (platzt z.B. in Gespräche oder Spiele anderer hinein).

B. Einige Symptome der Hyperaktivität, Impulsivität oder Unaufmerksamkeit, die Beeinträchtigungen verursachen, treten bereits vor dem Alter von sieben Jahren (bzw. sechs Jahren nach ICD - 10) auf.

C. Beeinträchtigungen durch diese Symptome zeigen sich in zwei oder mehr Bereichen (z.B. in der Schule bzw. am Arbeitsplatz oder zu Hause).

D. Es müssen deutliche Hinweise auf klinisch bedeutsame Beeinträchtigungen der sozialen, schulischen oder beruflichen Funktionsfähigkeit vorhanden sein.

E. Die Symptome treten nicht ausschließlich im Verlauf einer tiefgreifenden Entwicklungsstörung, Schizophrenie oder einer anderen psychotischen Störung auf und können auch nicht durch eine andere psychische Störung besser erklärt werden (z.B. affektive Störung, Angststörung, dissoziative Störung oder eine Persönlichkeitsstörung).

Für die Diagnosestellung zum adulten ADHS ab dem 17. Lebensjahr werden nun im DSM - V fünf der neun Hauptkriterien gefordert. Auch ist die Erstmanifestation der Symptome auf das 12. Lebensjahr angehoben und die Autismus – Spektrum - Störung als Komorbidität zulässig.

Zusätzlich zum Überprüfen der in DSM und ICD genannten Kriterien wurden zur Diagnosestellung der CAARS (Conners`Adult ADHD Rating Scale, misst die aktuelle Symptomatik) und der WURS (Wender Utah Rating Scale, misst den Schweregrad in der Kindheit retrospektiv) in unserer Stichprobe verwendet [11].

1.1.2 Ursachen und Einflussfaktoren des ADHS / ADS

Ursächlich für die Entstehung von ADHS wird eine komplexe Gen - Umwelt - Entwicklungs - Interaktion, möglicherweise auch über epigenetische Mechanismen, angenommen [12], [13].

Für einen genetischen Hintergrund sprechen unter anderem Zwillings- und Familienstudien. Eine hohe Heritabilität von bis zu 80 % wird angenommen [14].

Genomweite Assoziationsstudien erbrachten häufige Risikogenvarianten mit geringem Effekt [15] und aber auch seltene Genvarianten mit höherem Effekt, z.B. copy number variants wie PARK2 [16] und NPY [17], auf das Erkrankungsrisiko.

Auch in hypothesengetriebenen Kandidatengenstudien fanden sich zum Teil replizierte Assoziationen mit ADHS. Gehäufte Befunde fanden sich beispielsweise in den Genen für die Serotonintransporter 5HTT, die Dopamintransporter SLC6A3 und DAT, die Dopaminrezeptoren DRD2, DRD4 und DRD5, die Tryptophanhydroxylase TPH2, die Nitritoxid - Synthase NOS1 und das synaptosomal - assoziierte Protein SNAP25 [13].

Als Umweltfaktoren können maternaler pränataler Stress [18] zum Beispiel durch Verlust eines Familienangehörigen [12], Präeklampsie, Harnwegsinfektionen, Rauchen der Mutter während der Schwangerschaft, Frühgeburt [19], ein Wechsel des primär Versorgenden in den ersten drei Lebensjahren oder traumatische Erlebnisse [20] eine Rolle spielen.

Es wird angenommen, dass diese Gen - Umwelt - Entwicklungs - Interaktion auf der neurobiologischen Ebene unter anderem zu einer Reifungsstörung des Gehirns und Dysregulationen im Noradrenalin- und Dopaminstoffwechsel führt [4].

Einflussfaktoren auf die Persistenz und den Schweregrad der ADHS / ADS sollen weiterhin im Verlauf vor allem durch der Erziehungsstil bzw. die Interaktion zwischen Eltern und Kind sein [21]. Die Ausprägung der Symptome und damit assoziierte Folgen ist unter anderem auch vom Intelligenzniveau und Ressourcen des Einzelnen abhängig [neue Akzente, Alltag mit ADHS, Nr. 90, 3 / 2011]

1.1.3 Besonderheiten des adulten ADHS

Adultes ADHS geht mit einem erhöhten Risiko für psychische Komorbiditäten wie Persönlichkeitsstörungen, insbesondere narzisstische, histrionische, vermeidende und Borderline - Persönlichkeitsstörungen [22], Depression, bipolare Störung und Alkohol - und Drogenabhängigkeit einher und weist eine hohe Korrelation zu stressreichen Liveevents wie Beziehungsqualitäten, ernste familiäre Probleme, Arbeitsplatzverluste, finanzielle Belastungen, Einschränkungen in Gesundheit und Wohlergehen auf [23], [24], (Tabelle 3).

Sozialer Rückzug, Ängstlichkeit und Depression sowie Aufmerksamkeitsprobleme und internalisierte Probleme werden dabei mit zunehmendem Alter problematischer, dagegen nehmen soziale Probleme, externalisierte Probleme und aggressives Verhalten ab [25].

Tabelle 3 Übersicht über die häufigsten Komorbiditäten des adulten ADHS [26]

Alkohol- und Drogensucht	bis 60%
Depressive Störungen Bipolare Störungen	bis 40%, Unsicherheit bei bipolaren Störungen wegen methodischer Probleme und Überlappung der Diagnosekriterien
Persönlichkeitsstörungen (PS): Antisoziale PS Emotional instabile PS Selbstunsichere PS Zwanghafte PS	bis ca. 35% (Einzeldiagnose) Mehrfachdiagnosen sind häufig
Angststörungen	ca. 20%
Restless Legs	ca. 5%
Essstörungen (Frauen)	ca. 4%

Verschiedene somatische internistische Leiden	bis 50% (Muskulatur / Skelett) bis 40% (gastrointestinale Störungen) ca. 30% (metabolische S., Respiration)
---	---

1.2 Therapie mit MPH

1.2.1 Indikation

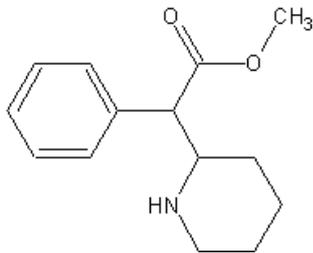
Methylphenidat (MPH) ist bei symptomatisch belastendem ADHS ab dem 6. Lebensjahr Therapiemittel der ersten Wahl (bei Kindern von 6 - 11 Jahren neben Amphetaminsulfatderivaten). Im Alter von 4 - 6 Jahren wird eine Therapieempfehlung zu MPH ausgesprochen, wenn ein evaluiertes Elterntaining und eine Anleitung der Erzieher ohne Wirkung bleiben [Clinical Practice Guidelines für ADHS, veröffentlicht 16.10.2011; in neue Akzente, Alltag mit ADHS, ISSN 0948-4507, Nr.90, 3 / 11].

Die Kombination der medikamentösen Therapie mit psychotherapeutischen Interventionen ist besonders bei persistierenden Symptomen und bei Komorbiditäten eine weitere Therapieoption. Hier hat sich besonders die kognitive Verhaltenstherapie etabliert. Eine allgemeine Aussage hinsichtlich der Effektivität der Wirksamkeit multimodaler Therapien im Vergleich zur medikamentösen Therapie ist allerdings nur unzureichend möglich, da es bisher nur wenige Studien hierzu gibt [27].

MPH ist in verschiedene Formen verfügbar. Die Trägersubstanzen beeinflussen dabei die Wirkdauer, wobei diese von 2 - 3 Stunden bis zu 12 Stunden bei Retardpräparaten reicht. Präparate sind u.a. Medikinet (Maisstärke), Medikinet adult oder ret., Equasym Ret., Concerta, Ritalin LA (Weizenstärke).

1.2.2 Wirkungsweise

Abbildung 1 Strukturformel MPH [28]



MPH ist ein zentralnervöses Stimulanz, das zur großen Gruppe der indirekten Sympathomimetika gehört und ein klassisches Phenethylamin, d.h. von der Wirkungsweise her amphetaminähnlich, ist. Die chemische Struktur ähnelt denen von Katecholaminen. MPH unterliegt somit dem

Betäubungsmittelgesetz.

Der Wirkmechanismus des Medikamentes ist jedoch noch nicht vollständig geklärt. Diskutiert wird eine Hemmung der Transportsysteme für die Wiederaufnahme der Katecholamine Dopamin und Noradrenalin, weniger für Serotonin, in den Präsynapsen, sodass die Konzentration im präsynaptischen Spalt erhöht wird.

Als peripherer und zentraler indirekter Agonist ist MPH Blut - Hirn - Schranken - gängig und soll an dopaminergen und noradrenergen Rezeptoren wirken. Dadurch soll es zu einer stärkeren Signalübertragung und einer Erhöhung des Sympathikotonus kommen [29].

Die Wirkungsweise des MPH unterscheidet sich zwischen ADHS - Patienten und Gesunden. Bei ADHS - Patienten wird eine paradoxe Reaktion beobachtet, das heißt, es kommt unter Psychostimulanzientherapie zu einer Verminderung bzw. Normalisierung des gesteigerten Antriebs [29]. Außerdem wirkt es zentral anregend und erhöht die Wachheit und Aufmerksamkeit. Es hat einen positiven Effekt auf kognitive Funktionen wie exekutive und nicht - exekutive Erinnerungsfähigkeit, Reaktionszeit, Reaktionszeitvariabilität und Reaktionshemmung [3]. Besonders der Einfluss auf die Hyperaktivität und die Impulsivität zeigen einen engen Zusammenhang zur Verbesserung der Lebensqualität [30].

1.2.3 Nebenwirkungen und Kontraindikationen

Unerwünschte Wirkungen sind vor allem dosisabhängig. Hierzu zählen häufig, aber eher transient bei Behandlungsbeginn bzw. bei schneller Dosissteigerung, Appetitlosigkeit, Bauch - und Kopfschmerzen, Mundtrockenheit, Dysphorie, Reizbarkeit, Puls - und Blutdruckerhöhung und bei später abendlicher Gabe auch Schlaflosigkeit.

Depressive Verstimmung, sozialer Rückzug oder psychotische Reaktionen treten insgesamt selten, meist nur bei Überdosierung auf. Selten werden auch Schwindel, erhöhte Hyperaktivität bei Nachlassen der Wirkung und häufig vegetative Blässe und Ringe unter den Augen, Auslösung oder Verstärkung von Tics, allergische Reaktionen und Haarausfall beobachtet. Sehr selten werden Konvulsionen, Leberfunktionsstörungen oder Blutbildveränderungen beobachtet [31], [32].

Um unerwünschte Wirkungen zu vermeiden, muss das Medikament langsam auftitriert werden, bis die optimale Dosis erreicht ist, die sich nicht am Körpergewicht sondern an der klinischen Einschätzung der Symptome orientiert. Die Dosen liegen in der Regel zwischen 20 - 60 mg, wobei die Höchstdosis bei 1mg/ kg KG bis maximal 80 mg / Tag liegt.

1.3 Stress

1.3.1 Definition Stress

Stress kommt aus dem Englischen und bedeutet Druck, Last, Belastung.

Auch wenn das Thema schon lange Gegenstand der Wissenschaft ist, so existiert keine einheitliche Definition des Begriffes Stress. Es gibt eine Vielzahl von zum Teil sehr umfangreichen Definitionen zu Stress, die sich nach dem Bereich, dem sie zugeordnet sind, auf verschiedene Schwerpunkte stützen.

In einer Publikation von Zimbardo / Gerring wird Stress definiert als „[...] Reaktionsmuster eines Organismus auf Stimulusereignisse, die dessen Gleichgewicht stören und dessen Fähigkeit, die Einflüsse zu bewältigen, stark beansprucht oder übersteigt. Die Stimulusereignisse umfassen eine große Bandbreite an externen und internen Bedingungen, die zusammen genommen Stressoren genannt werden. Ein Stressor ist ein Ereignis, das von einem Organismus eine Art von Anpassungsreaktion erfordert. [...] Die Reaktion eines Individuums auf die Notwendigkeit einer Veränderung besteht in einer unterschiedlichen Kombination von Reaktionen auf unterschiedlichen Ebenen, dies umfasst physiologische, behaviorale, emotionale und kognitive Reaktionen.“ [Zimbardo / Gerring, 2004, S. 562.]

Weiterhin kann Stress in akut und chronisch untergliedert werden. Auch eine Einteilung in Eustress (positiver Stress) und Distress (negativer Stress) abhängig von der persönlichen Bewertung der Situation und abhängig von vorhandenen Bewältigungsstrategien ist möglich. Chronischer Stress ist ausschließlich negativ assoziiert. Er hat weitreichende Konsequenzen auf sämtlichen Ebenen des Verhaltens und der körperlichen Prozesse. So steht er auch in Zusammenhang mit verschiedenen körperlichen Erkrankungen [24] wie Arteriosklerose und Magengeschwüren [25]. Schon 1914 veröffentlichte Dr. Cannon eine wissenschaftliche Arbeit zum Thema Stress, in der er eine Beziehung zwischen Stress, Emotionen und kardiovaskulären Veränderungen darstellte [33]. Hans Selye (1907 - 1982), der den Begriff prägte und als der „Vater der Stressforschung“ bezeichnet wird, beschäftigte sich mit dem allgemeinen Adaptationssyndrom und verbundenen neuroendokrinen Phänomenen [34], [35].

1.3.2 Stressbelastung speziell beim ADHS

Eine vermehrte Stressbelastung bei erwachsenen ADHS - Patienten wurde bisher besonders im sozialen Bereich gefunden, einhergehend mit verringerter sozialer Unterstützung und korrelierender Einschränkung der psychischen Gesundheit und Wohlergehen [36].

1.3.3 Stresseinfluss auf das endokrine System

Stress führt zu einer Flucht- oder Kampfreaktion des Organismus. Dazu werden verschiedene hormonelle Regelkreise modifiziert. Insbesondere laufen diese über die Transmitter des sympathischen Nervensystems wie Noradrenalin, Adrenalin und über die Hypothalamus - Hypophysen - Nebennierenachse wie Cortisol. Aber auch andere Hormone wie Dopamin und Serotonin sind bei der Anpassung des Körpers an Stress involviert [37].

In dieser Studie wird besonders der Zusammenhang mit Cortisol untersucht, so dass auf diese näher eingegangen werden soll.

Bildung und Regulation von Cortisol:

Cortisol ist ein überlebensnotwendiges Kortikosteroid und gehört zur Untergruppe der Glukokortikoide. Es wird in der Zona fasciculata der Nebennierenrinde aus dem Grundgerüst Cholesterin unter Einfluss des Feedbackmechanismus der Hypothalamus (CRH = Corticotropin - Releasing - Hormon) - Hypophysen (ACTH = Adrenocorticotropinhormon) - Nebennierenachse (Cortisol) gebildet. Cortisol unterliegt einem zirkadianen Rhythmus mit einem physiologischen Peak der Blutcortisolkonzentration (ca. 70% der Tageskonzentration) um 6:00 - 8:00 Uhr am Morgen bzw. direkt nach dem Aufwachen bis 90 Minuten danach und einem im Tagesverlauf abfallenden Cortisol - Serumspiegel mit einem Tiefpunkt um Mitternacht.

Im Blut ist Cortisol zu 75% an das Transportprotein Transkortin (= CBG = Cortikosteroidbindendes Globulin) und zu 15% an Albumin gebunden und liegt zu 10% in freier Form vor. Die Plasmahalbwertszeit beträgt ca. 90 Minuten [Herold, Innere Medizin, 2012].

Cortisol gelangt aber auch in gebundener und freier Form in den Blutkreislauf und ist damit als mäßig verlässlicher Biomarker für Stress leicht für eine Hormonanalyse zugänglich [38]. Ein weiterer Vorteil der Messung im Speichel ist neben der belastungsfreieren Gewinnung auch der schnellere Anstieg bei Stimulations-tests und damit verbunden wahrscheinlich auch eine höhere Sensitivität [39].

Cortisol wird bei Stress ausgeschüttet und wirkt langsamer als die anderen beteiligten Katecholamine. Die Hormonfreisetzung ist dabei von der Dauer des Stresses abhängig.

Insgesamt sind Beobachtungen zum Cortisolspiegel bei Stress sehr inhomogen: In Metaanalysen findet man bei akutem Stress ein überwiegend erhöhten Cortisolspiegel, während er bei Fortbestehen des Stressors zumeist abnimmt [40]. Aber auch erhöhte Cortisolwerte unter chronischem Stress sind beobachtet worden [41], genauso wie erniedrigte Cortisolspiegel bei erhöhten ACTH-Werten unter akutem Stress.

Einfluss anderer Regelkreise auf die Cortisolausschüttung:

Wegen der inhomogenen Ergebnisse wird ein zweiter Signalweg für die Cortisolstimulation diskutiert, wie z.B. über Endothelin oder ANP (Atrial Natriuretic Hormon). Außerdem scheint Cortisol auch durch Dopamin beeinflusst werden zu können [42]. Dafür spricht auch eine durch externe Gabe von Stimulantien, die u.a. auch auf Dopaminspiegel einen Einfluss haben, hervorgerufene Reduktion des basalen Cortisolwertes [43], [44]. In Tierstudien führte Stress zu einer Reduktion des mesokortikalen Dopamins wahrscheinlich durch stressabhängige verminderte Corticosterone, die kortikale dopaminerge Nervenfaserverbindungen vermindern [45].

Veränderungen des Cortisolspiegels bei ADHS:

Auch eine Dysfunktion der HPA - Achse wird bei mehreren psychischen Erkrankungen, so auch bei ADHS, diskutiert. Es wurden mehrheitlich verminderte Morgencortisolspiegel im Vergleich zu Kontrollen gefunden [46]. Es wurden aber auch andere Studien publiziert, die lediglich einen höheren Cortisolanstieg nach Stresseinfluss bei normalem zirkadianen Rhythmus und Cortisolgesamtmenge beschreiben [47]. Wieder andere Studien zeigen eine unterschiedliche Cortisolausschüttung bei den verschiedenen Subtypen des ADHS, eine verminderte Ausschüttung bei ADHS des kombinierten Typs und eine erhöhte Cortisolausschüttung beim unaufmerksamen Subtyp [48], [49]. Bei bestehenden Komorbiditäten wie Depression wurden höhere Spiegel, bei Patienten mit Komorbidität wie oppositionelles aggressives Verhalten hingegen niedrigere Cortisolspiegel als bei ADHS-Patienten mit alleiniger ADHS-Diagnose gefunden [50].

Es finden sich auch in diesen Studien inhomogene Ergebnisse und diese spiegeln hier möglicherweise die Komplexität der hormonellen Regelkreise wieder.

Wirkung von Cortisol:

Cortisol aktiviert katabole Stoffwechselforgänge für die Energiebereitstellung. Es führt zur Gluconeogenese, greift in den Knochen-, Fett- und Eiweißstoffwechsel ein. Es hat Einfluss auf den Elektrolythaushalt (hypokalzämisch, mineralkortikoid). Erythrozyten und Thrombozyten werden vermehrt gebildet, sodass dadurch neben Verminderung der Antithrombine eine thrombosefördernde Wirkung des Cortisols besteht [Herold, Innere Medizin 2012], was mit einem schnelleren Wundverschluss im Rahmen der Kampf - oder Fluchtreaktion assoziiert ist.

Bedeutend im Zusammenhang mit dieser Studie ist aber besonders der Einfluss von Cortisol auf das Immunsystem, insbesondere auf die Verteilung und Produktion von Leukozyten.

Eine Cortisolausschüttung führt zu einer Verminderung der Leukozyten, Erhöhung der Eosinophilen und Lymphozyten, einer Verminderung des lymphatischen Gewebes und Unterdrückung der B- und T- Lymphozytenaktivität. Daraus folgt eine erhöhte Infektanfälligkeit, aber auch eine antiallergische und immunsuppressive Wirkung [Herold, Innere Medizin, 2012].

Therapeutisch macht man sich das synthetisch hergestellte Cortison deshalb auch zur Eindämmung von chronischen Entzündungen zunutze, z.B. bei Allergien. Bei ADHS - Patienten wird eine erhöhte Prävalenz von Atopien diskutiert [51], [52].

Nicht nur die Quantität der Lymphozyten wird cortisolabhängig reguliert, sondern auch die durch chronischen psychosozialen Stress beeinflusste Cortisolrezeptorempfindlichkeit von Lymphozyten [53].

1.3.4 Einfluss von Stress auf die Tumorgenese

Ein Einfluss von Stress auf die Krebsentstehung wird seit Langem diskutiert. Bisher konnte ein direkter Zusammenhang aber nicht nachgewiesen werden [54]. Hinweise fanden sich in wenigen einzelnen Studien. So wurde beispielsweise beschrieben, dass hoher psychosozialer Stress mit einem höheren Risiko einhergeht, an Krebs zu versterben [55].

Hinweise zum negativen Einfluss von Stress auf Krebs finden sich vor allem in Studien zum Progress von Krebserkrankungen. Hierbei sollen dann Persönlichkeit und Copingstile eine Rolle spielen [56] oder auch psychosoziale Faktoren, einschließlich chronischer Stress, Depression und soziale Isolation, gehen mit einer geringeren Überlebenszeit einher [57].

In vitro wurde gezeigt, dass Stress über die Aktivierung des sympathischen Nervensystems durch eine Adrenalinausschüttung zu einer herabgesetzten Apoptosefähigkeit der Zelle führt. Das Haupteffektorprotein soll p53 sein, welches die Rolle eines Tumorsuppressorgenes hat, indem es bei irreparablen DNA - Schäden eine Apoptose der Zelle induziert. Durch die aktivierte Signalkaskade wird es ubiquiniert und damit unwirksam gemacht. Parallel dazu kann auch das in dieser Signalkaskade involvierte aktivierte MDM2 als Protoonkogen wirken. Das Risiko für DNA - Schäden, die sich in die nächsten Zellgenerationen durch Zellteilung fortsetzen und aggregieren können, ist dadurch erhöht. Mögliche Folgen wären unter anderem Tumorentstehung, zelluläre Alterung und neuropsychiatrische Erkrankungen [9].

Die Signalkaskaden des beschriebenen Regelkreises setzen ihrerseits wieder unzählige Signalkaskaden in Gang. So kommt auch dem Protein Akt als Vermittler eine zentrale Rolle zu.

Akt setzt je nach Zelltyp nicht nur die Apoptose in Gang und beeinflusst die Proliferation, es hat auch Einfluss auf die Proteinsynthese, auf den Glukosestoffwechsel und auf neuropsychiatrische Erkrankungen (wie die Schizophrenie) [58]. Anhand dieser Signalkaskaden wird deutlich wie komplex die molekularen Zusammenhänge allein um das Protein Akt herum sind.

1.4 Mikrokernfrequenzanalyse

1.4.1 Definition Mikrokerne (MK)

MK sind DNA - haltige Strukturen, die unter dem Fluoreszenzmikroskop durch Anfärbung mit fluoreszierenden Farbstoffen sichtbar gemacht werden können. Sie sind von einer Membran umschlossen, die der Kernmembran sehr ähnlich ist, und sind im Zytoplasma von Zellen lokalisiert. Es können chromosomale

Fragmente oder ganze Chromatiden/ Chromosomen in MK eingeschlossen werden.

Im Bereich des Humanbiomonitorings werden üblicherweise periphere Lymphozyten oder Erythrozyten, aber auch exfoliative Epithelzellen verwendet. Im Fall der Lymphozyten werden die MK in zweikernigen Zellen, d.h. in Zellen, die sich einmal ex vivo geteilt haben, gezählt. Diese haben dann einen in vivo vorhandenen Chromosomenschaden als MK exprimiert, d.h. z.B. ein Chromosomenbruchstück nach der Mitose mit einer eigenen Membran umgeben und abseits des Hauptkerns lokalisiert. Um die Lymphozyten zur Mitose zu aktivieren, wird für den CBMNT (Cytokinesis Block Micronucleus Test) zuerst Phytohämagglutinin (PHA) zur Zellsuspension und dann 44 ± 4 Stunden später der Zytokinesehemmer Cytochalasin B dazugegeben. Dadurch erfolgt eine Teilung des Zellkernes, jedoch keine Zytokinese, sodass beide Tochterkerne in einer Zelle verbleiben und mitotisch aktive Zellen als doppelkernig identifiziert werden können.

1.4.2 Hypothesen zur Entstehung von MK

Die Entstehung von MK ist bis heute nicht hinreichend geklärt. Es gibt verschiedene Hypothesen zu deren Ursprung:

In vivo

Die MK entstehen durch schädigende Einflüsse bereits im Körper. Auf welcher Ebene die MK in vivo entstehen ist allerdings unklar. Genotoxische Einflüsse können zum einen die Lymphozyten direkt betreffen oder aber bereits im Knochenmark die Vorläuferzellen schädigen. Solche MK können zur detektierten Frequenz im CBMN nur beitragen, wenn die MK - haltige Zelle sich in vitro normal teilt und den MK nicht verliert oder in den Kern reintegriert [59].

Ex vivo

Die MK entstehen während der Zellteilung im Verlauf der Kultivierung. Fehlende oder fehlerhafte Reparaturmechanismen von Chromosomenschäden von in vivo entstandenen Schäden führen während der Zellteilung zur Separierung von Chromatin in MK.

Ebenso ist aber auch eine direkte Schädigung während der Kultur denkbar [59], jedoch nur, wenn vor der Mitose in Kultur ein Doppelstrangbruch direkt induziert wird oder aus einer anderen Läsion durch fehlerhafte Reparatur entsteht.

1.4.3 Einflussfaktoren auf die MK - Entstehung

MK - Frequenzen schwanken inter - und intraindividuell.

In einigen Studien wurde ein Anstieg der MK mit steigendem Alter [59] und eine erhöhte MK - Anzahl beim weiblichen Geschlecht beobachtet. Dabei stieg auch die Differenz zwischen den Geschlechtern mit dem Alter an [60].

Daneben spielen auch allgemeine toxische Einflussfaktoren eine Rolle. So können Lifestylefaktoren wie Rauchen, Alkohol [61] und Drogenkonsum (MDMA / Methamphetamine und Kokain, Vertreter der Gruppe von Stoffen, zu denen auch MPH gehört) [62] mit einer erhöhten Anzahl von MK einhergehen. Auch Röntgenstrahlen können in Abhängigkeit von der Dauer und Dosis einen schädigenden Einfluss auf das Genom haben [63], [64].

1.4.4 Bedeutung der MK - Frequenzen

Die MK - Frequenzanalyse kann für das Biomonitoring genotoxischer Exposition in vivo genutzt werden, worunter auch die Therapie mit MPH bei ADHS -

Patienten fällt [65].

Assoziierte Erkrankungen bei erhöhter MK - Frequenz sind verschiedene Krebserkrankungen (u.a. Brust, Lunge, Gastrointestinaltrakt) [66], [67], aber auch Syndrome mit chromosomaler Instabilität und Karzinomprädisposition wie Fanconi - Anämie, Bloom - Syndrom, Ataxia teleangiectasia, Werner - Syndrom, wie auch eine Vielzahl erblicher Mutationen in Tumorsuppressorgenen [68].

Die Ergebnisse der Methode besitzen jedoch lediglich einen prognostischen und keinesfalls einen diagnostischen Wert. Selbst der prognostische Wert ist nur auf Gruppen - Durchschnitts - Ebene nutzbar, bislang keinesfalls für Individuen.

In vitro wird der MK - Test für die Überprüfung von Genotoxizität häufig genutzt. Für die Zulassung von Substanzen (auch Medikamenten) ist der MK - Test ein wichtiger Bestandteil der Mutagenitätsprüfung geworden. Dies gilt für die in vitro Variante sowie auch für den in vivo MK - Test mit der Analyse von Maus - oder Ratten - Erythrozyten aus Knochenmark oder peripherem Blut. Weiterhin wird der MK - Test für verschiedene Forschungsfelder wie Nutrigenomik und Pharmakogenomik, sowie auch als Prädiktor für normales und krebserkranktes Gewebe verwendet [65].

1.5 Fragestellung

Das Hauptziel der Studie war, zu untersuchen ob MPH in der Langzeiteinnahme bei adulten ADHS - Patienten Chromosomenschäden hervorrufen kann. Hier sind bisher nur unzureichend Daten vorhanden.

Das zweite Ziel der Studie war herauszufinden, ob die Einnahme des Medikamentes eine aus Voruntersuchungen vermutete erhöhte Stressbelastung bei ADHS - Patienten beeinflusst.

Da vermutet wird, dass eine chronische Stressbelastung ein Risikofaktor für Tumorentstehung sein könnte, ist das dritte Ziel dieser Studie, einen möglichen Zusammenhang zwischen einer Chromosomenschädigung und erhöhten Stresswerten zu untersuchen. Dies ist angesichts der steigenden Stressbelastung und der damit assoziierten Erkrankungen und sozialen Folgen als generelles gesellschaftliches Phänomen besonders interessant.

Da es Anhaltspunkte gibt, dass ADHS - Patienten im Allgemeinen einen Trend zu erhöhten MK - Frequenzen unabhängig von der MPH - Einnahme haben und damit ein erhöhtes Risiko für eine Chromosomenschädigung vorliegt [69] und darüber hinaus in vitro Stress zu einer vermehrten DNA - Schädigung führt [9], soll diese Studie Nachweise für diesen möglichen Zusammenhang aufzeigen.

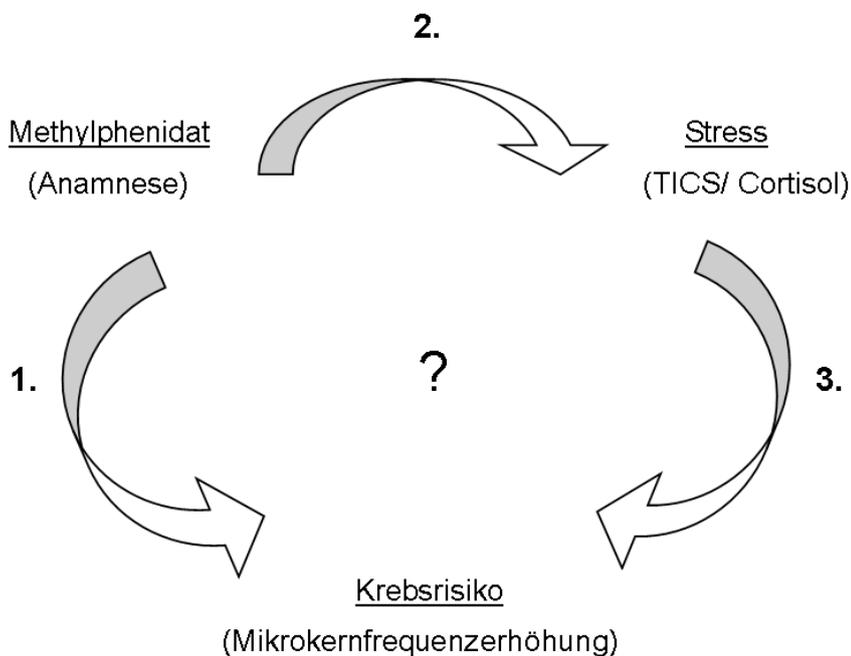


Abbildung 2 Übersichtsskizze zur Fragestellung

2 Material und Methoden

2.1 *Material*

2.1.1 **Probanden**

72 Probanden im Alter von 18 - 28 Jahren wurden von August 2011 bis Dezember 2012 an der Klinik und Poliklinik für Psychiatrie, Psychosomatik und Psychotherapie der Universitätsklinik Würzburg rekrutiert. Alle Probanden nahmen nach einer entsprechenden Aufklärung und schriftlichen Einverständniserklärung an der Studie teil, die mit der Deklaration von Helsinki im Einklang steht und durch das Ethikkomitee der Universität Würzburg geprüft wurde.

Die ADHS - Gruppe umfasste 42 Personen (24 Männer, 18 Frauen, Durchschnittsalter $22,21 \pm 0,52$ (SD), $\pm 3,35$ Jahre (SEM), Rang 18 - 28Jahre).

Die Diagnose ADHS / ADS wurde durch 2 voneinander unabhängige, geschulte Psychiater in der ADHS - Ambulanz der Klinik und Poliklinik für Psychiatrie, Psychosomatik und Psychotherapie der Universität Würzburg in mindestens 2 Terminen gesichert. Die Patienten erfüllten die mit dem semistrukturierten Interview des CAARS [70], dem Wender - Reimherr - Interview und WURS [71] erhobenen diagnostischen Kriterien für ADHS des Kindes - und Erwachsenenalters. Zur Erfassung von Differentialdiagnosen wurde bei den Patienten ein semistrukturiertes Interview für DSM IV TR Achse-1-Störungen (SCID - I) und Achse-2-Störungen (SCID - II) durchgeführt.

5 zuvor mitrekrutierte Patienten wurden komplett von der Statistik wegen Komorbidität Anorexie (1), fehlenden Fragebögen zu chronischem Stress (TICS) (3), fehlenden Labors (1) und zu hohen Alters (1) ausgeschlossen.

37 Patienten wiesen ein kombiniertes ADHS und 5 Patienten ein ADS auf. Nachfolgend werden alle Patienten als ADHS - Patienten zusammengefasst.

Es wurden Patienten mit und ohne MPH - Einnahme (Ritalin, Medikinet, Medikinet ret. oder adult, Concerta) rekrutiert. Um innerhalb der ADHS - Patientengruppe statistische Unterschiede zu sehen, wurden diese in 5 Gruppen nach der Einnahmedauer von MPH eingeteilt (Details Tabelle 4).

Tabelle 4 Gruppeneinteilung der Studienteilnehmer nach der Dauer der Methylphenidateinnahme

Gruppennummer	Anzahl	Beschreibung	MPH-Einnahme (Monate)
1	7	ADHS: Aktuelle MPH – Einnahme	24 - 180
2	4	ADHS: MPH – Einnahme früher und aktuell >1 Monat, Unterbrechung > 1 Jahr	30 - 84
3	12	ADHS: MPH – Einnahme früher und diskontinuierlich seit > 1 Jahr (aktuelle Einnahme < 1 Monat)	36 - 132
4	12	ADHS: Keine MPH – Einnahme	0 - 1,5
5	7	ADHS: MPH – Einnahme < 1 Jahr	1,5 - 11,5
6	28	Kontrolle: keine MPH – Einnahme	0

10 der Patienten wiesen zusätzlich eine aktuelle Depression oder depressive Episoden in der Vorgeschichte auf, 2 der Patienten einen Alkoholabusus. Die weitere Medikation und Substanzkonsum sind in Tabelle 5 und 6 dargestellt.

12 der ADHS - Patienten nahmen auch an einer früheren Studie der Klinik und Poliklinik für Kinder - und Jugendpsychiatrie und Psychotherapie der Universitätsklinik Würzburg im Jahr 2007 teil [72].

Die Kontrollgruppe bestand aus 28 deutschen, gesunden, dem Alter einander angepassten Kontrollen (11 Männer, 17 Frauen, Altersdurchschnitt $22,57 \pm 0,48$ (SD), $\pm 2,54$ Jahren (SEM), Rang 18 - 29 Jahre). Die Probanden waren überwiegend Angestellte oder Studenten der Universität Würzburg oder wurden über eine Annonce der Internetseite „wuewowas“ rekrutiert.

Tabelle 5 Übersicht zur aktuellen Medikamenteneinnahme in den Gruppen Kontrollen und ADHS

Medikation	Kontrollen	ADHS
Orale Kontrazeptiva	12 (von 18)	5 (von 15)
Antidepressiva (Venlafaxin, Clomipramin, Bupropion, Agomelatin, Mirtazapin, Moclobemid, Nortriptylin)		10
Atypische Antipsychotika (Risperidon, Aripiprazol)		2
Antipsychotika (Dipiperon)		1
Benzodiazepine (Temazepam)		1
Antikonvulsiva (Valproat, Pregabalin)		2
Lithiumcarbonat ret.		2
Antihistaminika (Hexofenadin, Cetericin)		2
β_2 - Sympathomimetikum (Fenoterol, Salbutamol) - Inhalation	1	1
Glucocorticoid / β_2 - Sympathomimetikum (Symbicord, Fluticabeta, Foster) – Inhalation	3	3
PPI (Pantoprazol, Omeprazol)		3
Metoclopramid		1
Metamizol	1	
Antihypertensiva (Eprosartan, Amlodipin, Bisoprolol, Metoprolol)	2	
Midodrin		1
Eisen, Selen		2

Iodid, L – Thyroxin		2
---------------------	--	---

Tabelle 6 Übersicht zum Drogenkonsum in den Gruppen Kontrollen und ADHS - Patienten

Drogen	Kontrollen	ADHS
Cannabis (einmalig)	4	6
Cannabis (regelmäßig)	5	16
Cannabis (aktuell)	5	7
LSD		2
Ecstasy		1
Ecstasy (einmalig)	1	
Amphetamine		6
Amphetamine (einmalig)	1	1
Kokain (einmalig)		3
Kokain		2
Poppers		1
Poppers (einmalig)	1	
Koffeintabletten		1
Salvia		1
Spice		1
Multipler Substanzkonsum	1	7

Ausschlusskriterien:

Ausgeschlossen wurde Patienten mit Intelligenzminderung, geistiger Behinderung und Fetalem Alkoholsyndrom wegen Differenzierungsschwierigkeiten zur Diagnose ADHS. Aufgrund einer Beeinflussung der Lymphozyten wurden auch

Probanden mit Anorexia nervosa [73], [74] und Autoimmunerkrankungen (außer Allergien) ausgeschlossen.

Weitere allgemeine Ausschlusskriterien waren akute fieberhafte Infekte in den letzten 14 Tagen, chronische schwere Erkrankungen wie Diabetes, maligne Erkrankungen, aktuelle Essstörungen, aktuelle systemische Glukokortikoid - Therapie und bei Kontrollprobanden zusätzlich psychische Erkrankungen (mit Mini - DIPS gescreent [75]).

2.1.2 Lymphozyten

Für die Vorarbeit zur Studie wurden eingefrorene Mauslymphomzellen (Linie L5178Y) verwendet.

Für die Studie selbst und zur Herstellung der eigentlichen Positivkontrollen wurden aus 15 ml Vollblut in Heparin - und Lithiumröhrchen gewonnene mononukleäre Zellen, bestehend aus Monozyten und Lymphozyten, verwendet. Die Blutentnahme erfolgte zwischen 7:00 und 11:00 Uhr. Bei 4 Probanden erfolgte sie aus terminlichen Gründen erst am Nachmittag.

2.1.3 Speichel

Aus dem Speichel der nüchternen Probanden wurde der basale Cortisolspiegel zwischen 7:00 - 10:00 Uhr mit Hilfe von Salivetten (Sarstedt) gesammelt. Bei Beginn des Ausfüllens des Trier Inventar zum chronischen Stress (TICS) - Fragebogens wurde dem Probanden das Zellulosestück aus der Salivette ausgehändigt, auf dem er ca. 2 Minuten kaute und dann in die Salivette zurückgab. Der Speichel wurde dann bis max. 4 Tage im Kühlschrank gelagert, aliquotiert und

bei -80°C eingefroren. Die Analyse des Cortisolgehaltes wurde von der Arbeitsgruppe unter Professor Dr. Clemens Kirschbaum, Technische Universität Dresden, Deutschland, durchgeführt.

2.1.4 Chemikalien

Chemikalien für die Lymphozytenisolierung, Zellkultur und MK - Assay wurden von Sigma - Aldrich (Steinheim, Deutschland), PAA Laboratories GmbH (Pasching, Australien) oder Biochrom (Berlin, Deutschland) bezogen. Phosphate buffered saline (PBS) bestand aus 8 g NaCl, 0.2 g KCl, 0.56 g Na₂HPO₄ und 0.2 g KH₂PO₄ gelöst in 1 l entmineralisiertem Wasser. Dabco - Lösung bestand aus 250 mg Dabco, gelöst in 10 ml PBS und vermischt mit 90 ml Glycerol. (Detaillierte Herstellerangaben siehe Tabelle 7).

Tabelle 7 verwendete Chemikalien

Chemikalie	Hersteller (Firmenname, Stadt, Land)
RPMI 1640	PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich
Pferdeserum	Biochrom AG, Leonorenstr.2 - 6, 12247 Berlin, Deutschland
L - Glutamin (200mM)	Sigma - Aldrich Chemie GmbH, Riedstr.2, 89555 Steinheim, Deutschland
Penicillin - Streptomycin (10000 Units Penicillin + 10 mg Streptomycin per ml in 0,9% NaCl)	Sigma - Aldrich, Co. 3050 Spruce Street, St. Luis, MO 63103 USA
Sodium - Pyruvat - Solution (100 mM)	PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich
Fetales Kälberserum	Biochrom AG, Leonorenstr. 2 - 6, 12247 Berlin, Deutschland

Chemikalie	Hersteller (Firmenname, Stadt, Land)
Nichtessentielle Aminosäuren	PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich
Tylosin Solution T3397 (8 mg Tylosin / ml in 0,9% sodium chloride)	Sigma - Aldrich Chemie GmbH, Riedstr.2, 89555 Steinheim, Deutschland
Histopaque 1077 (zur Verwendung im Wasserbad auf 37°C erwärmen)	Sigma - Aldrich Chemie GmbH, Riedstr.2, 89555 Steinheim, Deutschland
Phytohämagglutinin (PHA, PHA - M) L 8902	Sigma - Aldrich Chemie GmbH, Riedstr.2, 89555 Steinheim, Deutschland
Cytochalasin B (C ₂₉ H ₃₇ NO ₅ , M=479,62 g / mol))	Sigma - Aldrich Chemie GmbH, Riedstr.2, 89555 Steinheim, Deutschland
DMSO (C ₂ H ₆ OS, 78,13 g / mol, Dichte 1,1	Carl Roth GmbH + Co KG Schoemperlenstr.3 - 5, 76185 Karlsruhe
MMS	Sigma - Aldrich Chemie GmbH, Riedstr.2, 89555 Steinheim, Deutschland
MMC (Mitomycin von Streptomyces coepitosus)	Sigma - Aldrich Chemie GmbH, Riedstr.2, 89555 Steinheim, Deutschland
Methanol (CH ₄ O)	Carl Roth GmbH + Co KG Schoemperlenstr.3 - 5, 76185 Karlsruhe
GelGreen nucleic Acid Gel Stain	Biotum, Hayward
PBS (Phosphat Buffered Saline)	Zusammengesetzt aus: 8g NaCl (137mM), 0,2g KCl (2,7mM), 0,575g Na ₂ HPO ₄ x 2H ₂ O (3,2mM), 0,2g KH ₂ PO ₄ (1,4mM) ad 1l ddH ₂ O
DABCO (1,4-Diazabicyclo (2,2,2)octan)	Zusammengesetzt aus: 10ml PBS, 250mg DABCO (Sigma, D - 27802), 90 ml Glycerol
Mauslymphomzellen (MOLY L5178Y TK+/- Mauslymphozyten)	

Das Mauslymphozyten - (Moly -) und Humanlymphozytenmedium wurde wie folgt unter sterilen Bedingungen in der Sicherheitswerkbank angesetzt:

Molymedium: Einer 1l - Flasche RPMI 1640 wurde 10 % Pferdeserum, 1 % L-Glutamin, 0,4 % Penstreptokinase und 1 % Natrium - Pyruvat zugesetzt.

Humanlymphozytenmedium: Einer 1l - Flasche RPMI 1640 wurden 75 ml Fetales Kälberserum, 5 ml L - Glutamin (200 mM), 2 ml Antibiotika ((50 U / ml Penicillin und 50 µg / ml Streptomycin), 5 ml Natrium - Pyruvat (100 mM), 5ml nichtessen-tielle Aminosäuren und 0,5 ml Tylosin (Stammlösung 8 mg / ml) zugesetzt.

Zur Verwendung der Medien wurden diese vor Gebrauch im Wasserbad auf 37°C erwärmt, um den Zellen von Anfang an ein optimales temperiertes Milieu zu ermöglichen.

2.1.5 Geräte, sonstige Materialien

Detaillierte Informationen zu verwendeten Geräten sind Tabelle 8 zu entnehmen. Standard - Labor - Verbrauchsartikel wurden bei den Firmen Hartenstein, Sarstedt, Roth und Greiner gekauft (ergänzende Informationen Tabelle 9).

Tabelle 8 verwendete Geräte

Gerät	Hersteller
Zentrifuge D2700 Typ 1302	Hettrich, Bj 1997, Tuttlingen, Deutschland
Zentrifuge	Kendro Laboratory Products, Labofuge 400e, Heraeus Instruments
Sicherheitswerkbank	Modell Gelaire, Fa. Gruppo Flow
CasyCounter	Fa. Innovatis
Vortex – Mischer	Scientific Industries Inc.
Minizentrifuge	Qualitron Inc.
Wärmeinkubator (37 °C, 5% CO ₂)	Modell HeraCell 150, Fa. Thermo Fisher Scientific Inc

Gerät	Hersteller
Autoklav	Melag Typ 28
Mikroskope (für Zellzählungen)	Nikon TMS, 10x (Nikon) und Thermo-Dux Precision Line, 10x
Floureszenzmikroskop + Objektiv	Nikon Eclipse, 20x / 40x (Nikon)
Mikroskop + Objektiv (für Fotodokumentation)	Leitz Diavert + LUCA Kamera, 20x (Öl)
Wasserbad	Hartenstein
Zellcounter (Mikroskop)	Neubauer-Kammer (Marienfeld), bezogen über Fa. Hartenstein
Pipette	Eppendorf, Gilson, Labnet

Table 9 sonstiges verwendetes Material

Sonstiges Material	Hersteller
Blutentnahmeröhrchen	Li Heparin LH 9 ml Monovette, Sarstedt
Kulturflaschen mit rotem / weißem Deckel	Greiner
Salivetten	Sarstedt

2.1.6 Software

Die Arbeit wurde anfangs mit OpenOffice, später mit Microsoft Office geschrieben. Für die Literaturrecherche wurde das Programm Endnote X5 verwendet. Die Statistik wurde mit Statistica berechnet. Weitere Informationen und Programme sind Tabelle 10 zu entnehmen.

Tabelle 10 verwendete Software

Software	Datum, Hersteller
OpenOffice.org Writer, Calc und Base 3.2.1 2010	2010, Apache Software Foundation
Statistica	StatSoft, inc. 1984 - 2011, USA
OriginPro 9.1	2014, STATCON
Endnote X5	2011, Thomson Reuters
Microsoft Office 365 ProPlus -Word	2013, Microsoft Office
ChemBioOffice Ultra 14	1998 - 2014 CambridgeSoft corporation, a subsidiary of PerkinElmer, Inc.
Corel Paint Shop Pro X2	2007, Corel

2.2 Labormethoden

2.2.1 Lymphozytenkultur

Die Lymphozytenkultur wurde nach der Standard - Methode der Arbeitsgruppe Professor H. Stopper im Institut für Pharmakologie und Toxikologie, Würzburg, durchgeführt.

Das Arbeiten mit den Zellen erfolgte unter sterilen Bedingungen unter der Sicherheitswerkbank.

Lymphozytenisolation

7 ml im Wasserbad auf 37°C erwärmtes Histopaque wurde in ein Zentrifugenröhrchen gegeben und vorsichtig mit 7 ml Vollblut überschichtet. Die Probe wurde 30 Min. bei 1600 rpm (370 x g) zentrifugiert.

Dadurch kam es zur Phasentrennung in eine obere gelbe plasmahaltige Phase, einen weißen Buffycoat mit Lymphozyten und Thrombozyten, eine mittlere wässrige Phase mit Histopaque und eine untere dunkelrote Phase mit Erythrozyten und Granulozyten. Die obere Plasmaphase wurde mit der Pasteurpipette bis zu 1 cm oberhalb des Lymphozytenringes abpipettiert. Der Lymphozytenring wurde großzügig mit der Pasteurpipette in ein Zentrifugenröhrchen gegeben und mit 10 ml Lymphozytenmedium aufgefüllt. Ein eventuell vorhandener Thrombozytenkoagel im Buffycoat wurde nicht mitpipettiert. Zum Entfernen von Zelltrümmern und Thrombozyten wurde das Röhrchen 10 Min. bei 1300 rpm (250 x g) zentrifugiert und der Überstand anschließend abgekippt. Es erfolgte eine zweite Waschung des Pellets mit 10 ml Lymphozytenmedium für 10 Min. bei 1300 rpm. Der Überstand wurde erneut abgekippt. Anschließend wurde das Pellet mit 5 ml Lymphozytenmedium vorsichtig resuspendiert.

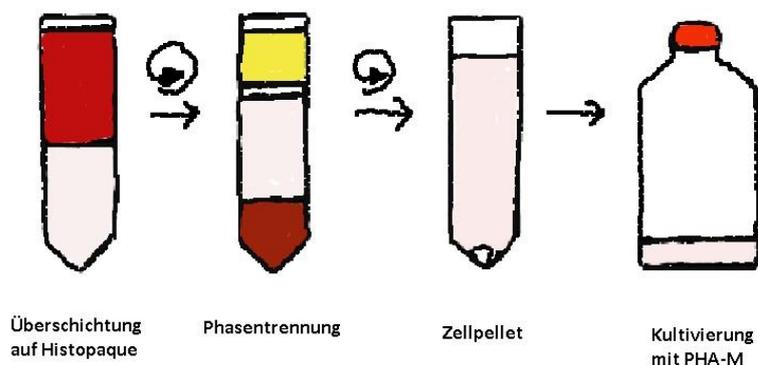


Abbildung 3 Skizze des Versuchsaufbaus

Ziel war es, eine Kulturf Flasche mit 5 ml Lymphozytenmedium und 1 Mio. Humanlymphozyten / ml anzulegen, um den Zellen genug Abstand zur Proliferation und ausreichend Medium zu bieten und andererseits den Abstand möglichst doch so klein zu halten, damit ausgeschüttete Zytokine proliferationsstimulierend wirken

können. Erfahrungsgemäß ist das bei dieser Zelldichte der Fall. Dazu wurden die Zellen im CasyCounter gezählt. Nach technischen Problemen mit dem Gerät musste auf die Zählung mit der Neubauer Zelle ausgewichen werden (Probe 049 - 072). In die Kulturflasche wurden 50 µl PHA, ein Phytohämagglutinin zur Stimulation der Zellproliferation, hinzupipetiert.

Lymphozytenkultur

Nach 48 Stunden im Wärmeinkubator befanden sich die Zellen nach einer Regenerationszeit in der Teilungsphase. Zu diesem Zeitpunkt wurden 50 µl Cytochalasin B in die Kulturflasche pipetiert und die Zellsuspension vorsichtig geschwenkt, um die Chemikalie zu verteilen. Die Zellen wurden weitere 24 Stunden im Wärmeinkubator belassen. Cytochalasin B stoppt die Mitose nach der Anaphase, sodass eine Zellteilung ausbleibt und eine mehrkernige Zelle entsteht. Somit lassen sich Zellen erkennen, die sich in der Kultur geteilt haben und entstandene MK dieser Zellgeneration zuordnen.

2.2.2 Fixierung der Lymphozytenpräparate

Der Inhalt der Kulturflasche wurde zunächst mikroskopisch auf Dichte und Vitalität der Zellen kontrolliert und dann solange mit Hilfe eines Vortex - Mixers gerührt, bis sich die Mehrheit der Zellverbände in einzelne Zellen aufgelöst hatte. Dann wurden ca. 80 µl Zellsuspension (je nach Dichte der Zellen) in die vorbereiteten Trichter der Cytospin gegeben und bei Programm 8 (= 1000 rpm, 5 Min.) zentrifugiert. Es erfolgte eine erneute mikroskopische Kontrolle. Ziel der Fixierung sollte ein mikroskopisches Bild mit dicht aneinanderliegenden, ohne sich in weiten Teilen überlagernden Zellen sein.

Insgesamt wurden mindestens 4 Slides fixiert, indem sie für mindestens 30 Minuten in mit Methanol befüllte, vorgekühlte Küvetten gegeben wurden und dort auch bei - 20 °C bis zur abschließenden Anfärbung verblieben.

2.2.3 Herstellung von Positivkontrollen mit MMC und MMS

Um eine Qualitätskontrolle der Reproduzierbarkeit des Ergebnisses (Retest - Reliabilität) für die relativ subjektive Methode der MK - Auszählung zu erhalten, wurden Proben mit einer bekannten MK - Anzahl hergestellt.

Ziel war eine MK - Anzahl zwischen dem 2 - bis 3 - fachen einer durchschnittlichen Studienteilnehmerprobe, um die Positivkontrolle signifikant von normalen Proben unterscheiden zu können, diese jedoch nicht auf den ersten Blick erkennen zu lassen. Um einen Anhalt für einen normalen Wert zu erhalten, wurde sich an den MK - Frequenzwerten von bisher vorhandenen Auszählungen orientiert. Hier lagen die MK - Frequenzen bei Kindern im Alter von $8,2 \pm 1,3$ bis $11,3 \pm 2,8$ Jahren zwischen $1,0 \pm 0,1$ bis $8,5 \pm 1,1$ / 1000 zweikerniger Zellen und bei Erwachsenen im Alter von $36,6 \pm 12,6$ Jahren bei $16,2 \pm 2,3$ / 1000 zweikerniger Zellen [8].

Als Ziel wurde somit eine MK - Frequenz von ungefähr 16 - 32 Zellen mit 1 MK / 1000 zweikerniger Zellen festgelegt, abgeschätzt aus der zweifachen MK - Frequenz der Höchstwerte der Kinder und der durchschnittlichen Werte der jungen Erwachsenen.

Laborchemisch induzierte MK mit MMS und MMC

In der Zellkultur kann man MK induzieren, indem man chemisch DNA - Schäden hervorruft. Verwendung hierfür finden z.B. Methylmethansulfonat (MMS) und Mitomycin C (MMC). Die Alkylanzien werden als Chemotherapeutika sowie auch als Positivkontrolle in Mutationstests eingesetzt, MMC zusätzlich als Antibiotikum.

MMS methyliert die Basen Guanin und Adenin und führt dadurch zu Basen-Fehlpaarungen und zu Replikationsblöcken. In der Folge kommt es zu Doppelstrangbrüchen, und Apoptose sowie Nekrose werden ausgelöst [76].

MMC wird aus dem Bakterium *Streptomyces caespitosus* gewonnen. Über die Induktion von Crosslinks zwischen den komplementären DNA - Strängen hemmt es die DNA - Synthese [Sigma - Aldrich - Produktinformation].

Die Entstehung der MK ist dabei dosis - und zeitabhängig. Bei Zusatz von Wachstumsstimulanzien vor der Zugabe des Alkylanzes erzielt man höhere MK - Frequenzen als bei Zugabe direkt zu Beginn der Zellkultur oder bei alleiniger Zugabe des reinen Lymphozytenmediums [77], [78].

Um die Methode der MK - Erzeugung besser einschätzen zu können, wurden Vorversuche mit Mauslymphomzellen gemacht, bevor die Versuche mit den Humanlymphozyten begannen.

Positivkontrollen mit Mauslymphomzellen:

Die aufgetauten Mauslymphomzellen wurden zur Entfernung des Frostschutzmittels (DMSO) und der Zelltrümmer mit 2 ml Kulturmedium bei 1000 rpm / Min. 5 Min. bei Raumtemperatur zentrifugiert. Dann wurde der Überstand abgekippt, das Pellet mit 5 ml Moly - Lymphozytenmedium resuspendiert und diese Suspension zu 15 ml vorgelegtem Moly - Lymphozytenmedium in eine 20 ml Kulturflasche gegeben. Der Nährmediumwechsel des Moly - Lymphozytenmediums erfolgt alle 2 - 4 Tage, je nach Zustand der Zellen, die bei vitalem Zustand unter dem Mikroskop hellleuchtend mit einer annähernd runden Zellform erscheinen. Insgesamt wurden die Zellen 9 Tage kultiviert. Dann wurde die Zellsuspension bei 1000 rpm / Min. für 5 Min. bei Raumtemperatur zentrifugiert und der Überstand abgekippt. Das Pellet wurde mit 20 ml bzw. 5 ml Molymedium erneut angesetzt.

Einen ersten Versuch zur MK - Erzeugung mit 150 μM MMS und 1,5 μM MMC, nach Auskunft des Labors gängige Konzentrationen, über 24 Stunden, überlebten die Mauslymphomzellen nicht.

Publikationen zu Versuchen mit MMC [79] und MMS [77] bestätigten die Vermutung über die Relevanz der Inkubationszeit sowie die Konzentration der verwendeten Substanzen. An den in diesen Publikationen verwendeten Einwirkzeiten orientierten sich die weiteren Versuche.

Zu einer Kulturflasche mit 5 ml Moly - medium und 1 Mio. Mauslymphomzellen / ml wurden nachfolgende entsprechende Konzentrationen an MMS bzw. MMC gegeben und im Wärmeinkubator inkubiert:

1. Kulturflasche: + 50 μl DMSO - 4 Stunden inkubiert (Negativkontrolle)
2. Kulturflasche: + 100 μM MMS - 4 Stunden inkubiert
3. Kulturflasche: + 150 μM MMS - 4 Stunden inkubiert
4. Kulturflasche: + 0,9 μM MMC - 4 Stunden inkubiert
5. Kulturflasche: + 1,5 μM MMC - 4 Stunden inkubiert

Danach wurde die Zellsuspension der jeweiligen 5 Kulturflaschen bei 1000 rpm / Min. für 5 Min. bei Raumtemperatur zentrifugiert, der Überstand abgekippt und erneut mit PBS gewaschen und nochmals bei 1000 rpm / Min. für 5 Min. bei Raumtemperatur zentrifugiert. Abschließend wurden die Zellen noch einmal mit 2 ml Moly - Lymphozytenmedium gewaschen und bei 1000 rpm / Min. für 5 Min. bei Raumtemperatur zentrifugiert. Zur Kultivierung wurde das Pellet dann in 5 ml Moly - Lymphozytenmedium gelöst und 50 μl Cytochalasin B zugegeben und für 18 Stunden inkubiert.

Die Zellsuspensionen wurden bei 1000 rpm / Min. für 5 Min. zentrifugiert um bestehende Zelltrümmer zu entfernen. Dann wurde das Pellet in 1ml Moly - Lymphozytenmedium gelöst und auf einem Objektträger und in Methanol bei - 20 °C für mindestens 20 Min. fixiert. Anschließend wurde jeweils ein Präparat ausgezählt und anhand des Ergebnisses (siehe Ergebnisteil Vorexperiment, Tabelle 16) die Entscheidung über die Konzentrationen der Alkylanzien für die Positivkontrollen der Humanlymphozyten getroffen. Die Einwirkzeit von 2 und 4 Stunden mit den Konzentrationen 150 µM MMS und 1,5 µM MMC schienen am geeigneten, wenn man annahm, dass Humanlymphozyten etwas weniger sensibel als die vorher eingefrorenen, mehrfach kultivierten und mit DMSO behandelten Mauslymphomzellen reagieren würden.

Positivkontrollen mit Humanlymphozyten

Insgesamt wurden 6 Lymphozytenkulturen angelegt:

Isolation und Kultivierung von Humanlymphozyten siehe oben, dann wie folgt:

1. Kulturflasche: Negativkontrolle (Probennummer 033)
2. I., II., III, IV., V. Kulturflasche: Positivkontrollen

Zu 4 Kulturflaschen mit jeweils 5 ml Humanlymphozytenmedium und 1 Mio. Humanlymphozyten/ ml wurde gegeben:

- I.: + 150 µM MMS - 2 Stunden inkubiert
- II.: + 150 µM MMS - 4 Stunden inkubiert
- IV.: + 1,5 µM MMC - 2 Stunden inkubiert
- V.: + 1,5 µM MMC - 4 Stunden inkubiert

Nach der Substanzinkubation wurden die Proben 5 Min. bei 1000 rpm / Min. zentrifugiert und das Pellet anschließend mit 5 ml Lymphozytenmedium gelöst und PHA dazugegeben. Nach 20 Stunden Kultivierung im Wärmeschrank wurden die Zellsuspensionen wieder jeweils 5 Min. bei 1000 rpm / Min. bei Raumtemperatur zentrifugiert, der Überstand abgekippt, um überschüssige Zytotoxine zu entfernen. Dann wurde das Pellet mit 5 ml Lymphozytenmedium gevortext, um das Pellet zu lösen und in eine neue 5 ml Kulturflasche zusammen mit 50 µl Cytochalasin B zu geben und für weitere 22 Stunden zu inkubieren. Anschließend wurden 20 Slides fixiert.

III. Kulturflasche:

Nach 48 Stunden Zellkultur wurde eine Substanzinkubation mit 150 µM MMS durchgeführt. 22 Stunden später erfolgte die Waschung, Substanzinkubation mit Cytochalasin B und die Fixierung von 20 Slides.

2.2.4 Auswertung der Lymphozytenpräparate

Anfärbung der Lymphozytenpräparate:

Jeweils 2 Slides einer Lymphozytenkultur eines Probanden sowie 4 Positivkontrollen mit je 2 Proben MMC und MMS wurden für die Auszählung angefärbt.

Dafür wurden die Slides aus den Methanolküvetten genommen und auf einem Tablett unter dem Abzug ca. 10 Minuten zum Trocknen gelegt. Danach wurde 10 µl GelGreen - Gebrauchslösung auf die Zellen pipettiert und sofort mit einem Deckgläschen bedeckt, um ein Verdunsten der Lösung zu verhindern. Die Färbelösung wurde 7 Minuten inkubiert und anschließend mit PBS mitsamt Deckgläschen abgespült, da ein zu intensives Einwirken der Färbelösung zu einer unspezifischen Überfärbung führen kann. Die Slides trockneten anschließend noch

einmal. Das PBS wurde am Rand vorsichtig mit Papiertüchern abgetupft, um unschöne Trockenränder zu verhindern und den Trockenprozess zu beschleunigen. Anschließend wurde 12 µl DABCO aufpipettiert. Die Pipettenspitze wurde dazu 2 mm abgeschnitten, um das stark visköse DABCO besser auf den Objektträger zu bringen. Abschließend erfolgte die Abdeckung der Zellen mit einem Deckgläschen.

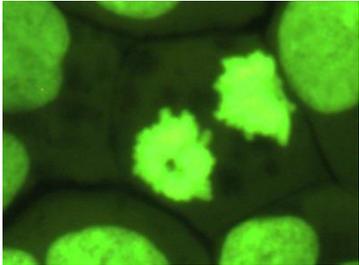
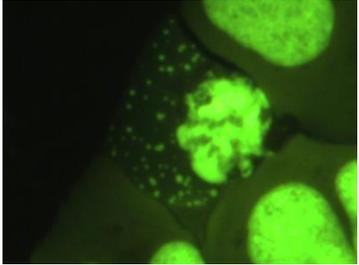
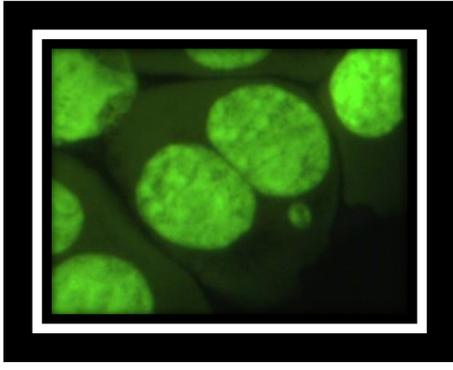
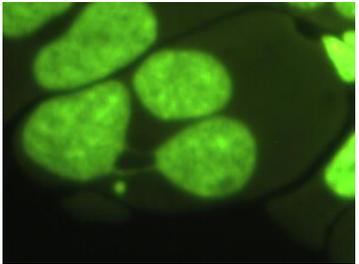
Doppelte Verblindung der Slides:

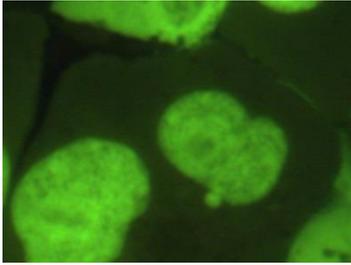
Die gefärbten Slides wurden von der MTA Frau I. Richter verblindet. Sie bekam die Slides von Positivkontrollen und Studienteilnehmern ohne Angaben über die Zuordnung der Probennummern zu Kontrollprobanden oder ADHS - Patienten und codierte die Slides neu, so dass die Zuordnung für die anschließende Auswertung unbekannt war. Die Zuordnung der Verblindungscodes zu den eigentlichen Probandennummern erfolgte nach Abschluss der jeweiligen Auszählrunde. Insgesamt gab es zwei Auszählrunden, eine Zwischenauswertung nach 42 Proben und eine Abschlussauswertung nach 72 Proben.

Zytogenetische Endpunkte der MK - Fluoreszenzanalyse

Neben den MK als Biomarker für den Verlust von Chromosomen oder Teilen derselben gibt es im MK - Frequenztest noch die Möglichkeit zur Bestimmung weiterer Biomarker [65] (Details Tabelle 11):

Tabelle 11 Zusammenfassung weiterer zytogenetischer Endpunkte

Zytogeneti- sche End- punkt	Biomarker für:	Abbildung
Mitose	Aus der Mitose und Apoptosefrequenz ergibt sich ein Status zur Lebensfähigkeit der Zellen.	
Apoptose		
Mikrokern	<p>Chromosomenbrüche und / oder Verlust ganzer Chromosomen</p> <p>Status zur Chromosomenschädigung und zur Instabilität</p>	
NPB (nucleoplasmic bridges)	<p>dizentrische Chromosomen. Diese entstehen bei der End-zu-End-Fusion von Telomeren oder bei der DNA-Fehlreparatur</p> <p>Status zur Chromosomenschädigung und zur Instabilität</p>	

NBUD (nuclear buds)	Beseitigung amplifizierter DNA und / oder von DNA - Reparaturkomplexen. Status zur Chromosomenschädigung und zur Instabilität	
Ein - , Zwei - und Mehrkernige Zellen	Aus der Anzahl der Ein - , Zwei - und Mehrkernigen Zellen kann die Proliferationsgeschwindigkeit abgeleitet werden	
Mikrokerne, NPB und NBUD	Der Status zur Chromosomenschädigung und zur Instabilität kann durch die Frequenz von Mikrokernen, NPBs und NBUDs abgeleitet werden	
Sonstiges	Nicht in eine der anderen Kategorien einzuordnendes Material wie z.B. Zelltrümmer, Marker für die Qualität des Präparates	

Auszählungsmethode

Die Mauslymphomzellen sowie die Humanlymphozyten wurden einmalig ausgezählt.

Dazu wurden für jede Probe 1000 Zellen per Hand mit Hilfe eines Counters gezählt. Dabei wurden nur doppelkernige Zellen berücksichtigt, wenn diese mindestens von zwei weiteren Zellen benachbart waren. Große Zellverbände mit stark überlagerten, nicht zählbaren Zellen blieben ebenso unberücksichtigt, da hier eindeutige Interpretationen nicht möglich wären.

In der ersten Zählrunde wurden die Zellen nach Einkernige, Zweikernige, Mehrkernige, Apoptose und Mitose und Zelltrümmer (Sonstiges) differenziert.

In der zweiten Zählrunde wurden 1000 zweikernige unbeschädigte Zellen nach kein MK, 1 MK, 2 MK, mehr als 2 MK, NBUDs und NPBs differenziert.

Diese in der AG Stopper verwendete Methode steht in Kongruenz zu den Methoden 25 anderer Labore, die veröffentlicht wurden, da mit dieser für eine in Zukunft angestrebte Leitlinie eine größtmögliche Vergleichbarkeit zur Auszählung der MK erreicht werden soll. (In Klammern stehende Zahlen als Häufigkeiten zu den verwendeten Kriterien [80]): Zusätzlich wurden jedoch unter „Sonstiges“ Zellen mit beschädigten Zellmembranen erfasst. Dies ist ein weiterer Marker zur Qualitätskontrolle.

➤ Identifikations - und Auszählkriterien zweikerniger Zellen:

1. Müssen 2 runde oder ovale Kerne haben (99%)
2. Die zwei Kerne müssen im gleichen Kondensationsstadium sein (83%)
3. Die zwei Kerne müssen eine ähnliche Größe besitzen (99%)
4. Die zwei Kerne können sich berühren oder sich teilweise überlappen - müssen aber als einzelne Kerne erkennbar sein (83%)
5. Die Zytoplasmagrenzen müssen klar und intakt sein (100%) → andere Zellen wurden unter Zelltrümmer erfasst bzw. in der zweiten Runde nicht mitgezählt
6. Die Zwei Kerne können durch eine feine Plasmabrücke verbunden sein (60%)
→ NPBs
7. Die Kerne dürfen sich nicht in einem frühen Stadium der Apoptose befinden (70%)

➤ Identifikations - und Auszählkriterien von MK in zweikernigen Zellen:

1. Morphologisch identifizierbar, aber kleiner als Kerne (82%)
2. Rund oder oval in der Form (99%)
3. Hauptdurchmesser zwischen $\frac{1}{3}$ und einem $\frac{1}{16}$ der Hauptkerne (91%) → kleiner als $\frac{1}{3}$ der Hauptkerne

4. Nicht refraktär (95%)
5. Nicht mit dem Hauptkern verbunden (73%) → sonst als NBUD bezeichnet
6. Können den Hauptkern überlappen oder berühren (49%) → dann als NBUD bezeichnet, da eine Differenzierung zwischen Überlappung und Ausbeulung des Kernes in den meisten Fällen nicht sicher möglich war
7. Gleiche Farbe wie der Hauptkern (85%)
8. Ähnliche Farbintensität wie der Kern (83%)

2.3 Interviewmethoden

2.3.1 Diagnostisches Kurzinterview bei psychischen Störungen (Mini - DIPS)

Gesunde Kontrollpersonen wurden durch das Diagnostische Kurzinterview bei Psychischen Störungen (Mini - DIPS, J. Markgraf, 1994, Springer-Verlag), das auf DSM IV - Kriterien und dem ICD - 10 basiert, gescreent. Der Interviewleitfaden beinhaltet einen Überblicksteil mit offener Problembeschreibung, einen Teil der 5 großen Problembereiche (Angst, affektive Störungen, somatoforme Störung, Essstörungen, Alkohol-, Medikamenten- und Drogeneinnahme) differenziert, einen Teil zum Ausschluss von Psychosen und einen Kurzanamneseteil. Auffälligkeiten führten zum Ausschluss aus der Studie.

2.3.2 Semistrukturiertes Interview zur Erfassung weiterer toxischer Einflüsse

Zur Erfassung möglicher Confounder für die MK - Entstehung wurde ein teilstandardisiertes Interview durchgeführt. Dieses erfolgte direkt nach der Begrüßung, Aufklärung und Einwilligung in die Studie.

Als erstes erfolgte wiederholt das Prüfen der Ein - und Ausschlusskriterien, anschließend die Befragung zu den 10 Themen:

- Ob innerhalb der letzten 2 Jahre eine Röntgen - / CT - Untersuchung stattgefunden hat und wenn ja, in welchem Bereich. Nach Zahnuntersuchungen wurde noch einmal gesondert gefragt, da an diese oft nicht von selbst erinnert wurden.
- Anzahl der Interkontinentalflüge innerhalb der letzten 2 Jahre einschließlich Reiseziel.
- Ausgeübter Beruf und in diesem Zusammenhang, ob es eine Exposition mit giftigen Substanzen im Beruf oder Hobby gibt und wenn ja, welche Substanzen.
- Anamnese zum Nikotinkonsum, d.h. Anzahl der Zigaretten pro Tag, sowie die Konsumdauer und Schwankungen im Laufe des Lebens. Anamnese zu Passivrauchen im näheren Umfeld wie z.B. Arbeit oder Zuhause und wenn ja, wie lange und in welcher räumlichen Situation.
- Anamnese zu Alkoholkonsum, wie viel Alkohol durchschnittlich pro Woche, oder wenn das schwer einzuschätzen war, pro Monat getrunken wurde. Außerdem wurde gefragt, welche Getränke bevorzugt wurden.
- Anamnese zu Drogenkonsum, ob schon einmal konsumiert wurde und wenn ja, welche Substanz und Zeitpunkt und wenn möglich, auch zu Angaben über die Menge.

- Erhebung von Gewicht und Größe für die BMI - Berechnung
- Erhebung des Alters
- Aktuelle Medikation mit Medikamentenname, Einnahmezeit und Dosis
- Aktuelle somatische Erkrankungen. Hier wurde speziell noch einmal nach Schilddrüsenerkrankungen, Bluthochdruck und Allergien gefragt.

2.3.3 Trier Inventar (TICS) zur Erfassung chronischen Stresses

Nach dem teilstandardisierten Interview wurde der Trier Inventar zum chronischen Stress (TICS, Göttingen, Hogrefe - Verlag GmbH & Co. KG, 2004) durchgeführt. Die Probanden wurden über das Ziel der chronischen Stresserfassung als mögliche Ursache für eine DNA - Veränderung noch einmal informiert und gebeten, sich ausreichend Zeit zu nehmen und den Fragebogen mit den 57 Items so genau wie möglich auszufüllen, auch wenn die Antworten subjektiv ausfallen würden. Es wurde explizit darauf hingewiesen, dass es sich um die Reflexion der letzten 3 Monate handelt.

Der Test untersucht mit 57 Items über die Likert - Skala die Häufigkeit des Erlebens (0 = nie, 1 = selten, 2 = manchmal, 3 = häufig, 4 = sehr häufig) verschiedener Situationen der Stressbelastung aus den 9 Bereichen Arbeitsüberlastung (UEBE), soziale Überlastung (SOUE), Erfolgsdruck (ERDR), Arbeitsunzufriedenheit (UNZU), Arbeitsüberforderung (UEFO), Mangel an sozialer Anerkennung (MANG), soziale Spannungen (SOZS) und soziale Isolation (SOZI). Weiterhin kann aus einem Teil dieser Bereiche eine Screeningskala für chronischen Stress (SSCS) erstellt und Bereiche zu den Blöcken hohe Anforderung und Mangel an Bedürfnisbefriedigung zusammengestellt werden (Details Tabelle 12).

Tabelle 12: Abkürzung und Bedeutung der 12 Bereiche der TICS - Items

UEBE = Arbeitsüberlastung	fühlten sich häufig / selten (h. / s.) durch zu viele Aufgaben und Verpflichtungen überfordert, mangelte es h. / s. an Zeit zu Erledigung alltäglicher Aufgaben, waren h. / s. mit nicht zu bewältigenden Problem-mengen konfrontiert, fehlte h. / s. die Zeit zur Erholung
SOUE = Soziale Überlastung	fühlten sich h. / s. durch zu viele soziale Kontakte und Verpflichtungen anderer Menschen gegenüber überlastet, hatten h. / s. zu viel Verantwortung für andere, waren h. / s. mit Problemen anderer konfrontiert, fehlte h. / s. Zeit für sich selbst
ERDR = Erfolgsdruck	hatten h. / s. Aufgaben und Verpflichtungen zu erfüllen, bei denen sie keine Fehler machen durften, hatten h. / s. Aufgaben zu erledigen, bei denen sie sich bewähren mussten, mussten h. / s. Aufgaben erfüllen, die mit hohen Erwartungen verbunden waren, mussten sich h. / s. anstrengen, um das Vertrauen anderer zu gewinnen, hatten h. / s. soziale Situationen zu bewältigen, bei denen sie einen guten Eindruck hinterlassen mussten
UNZU = Arbeitsunzufriedenheit	mussten h. / s. Aufgaben erledigen, die keine Freude bereiteten, mangelte es h. / s. an interessanten Aufgaben, mussten h. / s. Verpflichtungen erfüllen, die sie innerlich ablehnten, mussten h. / s. Aufgaben erledigen, bei denen ihre Fähigkeiten nicht zum Einsatz kamen, machten h. / s. ihre alltägliche Arbeit eher widerwillig
UEFO = Arbeitsüberforderung	fühlten sich h. / s. durch zu schwierige Aufgaben überfordert, machten h. / s. Fehler bei der Arbeit, machten h. / s. mit nicht zu überwältigenden Problemen konfrontiert, konnten h. / s. nicht die Leistung bringen, die von ihnen erwartet wird
MANG = Mangel an sozialer Anerkennung	bekamen h. / s. zu wenig oder keine Anerkennung für ihre Leistungen, wurden von anderen h. / s. abgelehnt, obwohl sie sich Mühe gaben, es allen recht zu machen, wurden h. / s. für ihre Leistungen schlechter bewertet als andere, wurden für ihre Arbeit h. / s. nicht angemessen belohnt
SOZS = Soziale Spannungen	gerieten h. / s. in Konflikte und Auseinandersetzungen mit anderen Menschen, konnten h. / s. bestehende Konflikte nicht lösen, stritten sich h. / s. mit anderen Personen um Dinge, die ihnen wichtig waren / sind, hatten h. / s. belastende Erlebnisse mit anderen Menschen

SOZI = Soziale Isolation	fühlten sich h. / s. allein, mangelte h. / s. an sozialen Konflikten, hatten h. / s. keine Gelegenheit sich mit anderen auszusprechen
SORG = Chronische Besorgnisneigung	machen sich übermäßig viele/ wenig Sorgen, haben h. / s. keine Kontrolle über sorgenvolle Gedanken, erlebten h. / s. Zeiten, in denen sie sorgenvolle Gedanken nicht unterdrücken konnten, abhängig von Persönlichkeitsdisposition Besorgnisneigung
SSCS = Screening-Skala für chron. Stress	fühlten sich h. / s. besorgt, überlastet, überfordert, nicht anerkannt, enger Zusammenhang physischen und psychischen Beschwerden und Krankheiten
1. Block = hohe Anforderungen	= Repräsentation externer Stressbelastung; Zusammensetzung aus: Arbeitsüberlastung, soziale Überlastung, Erfolgsdruck, eher abhängig von demographischen Variablen
2. Block = Mangel an Bedürfnisbefriedigung	= Repräsentation interner Stressbelastung; Zusammensetzung aus Arbeitsunzufriedenheit, Überforderung bei der Arbeit, Mangel an sozialer Anerkennung, soziale Spannungen, soziale Isolation, eher abhängig von Persönlichkeitseigenschaften (v.a. Neurotizismus)

Anschließend wurden die Ergebnisse in t - Werte der Altersklasse 16 - 30 umgerechnet, wobei die Studienteilnehmer mit 18 - 28 Jahren genau in diesem Altersabschnitt lagen.

Insgesamt sind die Reliabilitäten für die Skalen als gut bis sehr gut einzustufen. Die interne Konsistenzen (Cronbachs α) liegen für alle 10 TICS - Skalen über 0,83 (Mittelwert = 0,87; Ränge von 0,84 bis 0,91). Für die probabilistische Testtheorie (Rasch - Reliabilität) liegt der Mittelwert bei 0,83 (Ränge von 0,78 bis 0,89). Die Profilreliabilität beträgt $\text{prof } r_{\alpha} = 0,72$ und ist damit als gut zu bewerten.

Für die Inhaltsvalidität liegen keine empirischen Befunde vor, jedoch wird davon ausgegangen, dass sie im Sinne einer logischen Validität durch die Klassifikation verschiedener Stressarten angenommen werden kann.

Die Konstruktvalidität wird mit einer Interkorrelation der neun spezifischen Skalen über einen Bereich von 0,15 bis 0,63 und einem Mittelwert von 0,40 als angemessen bewertet.

Ein Zusammenhang von einzelnen TICS - Skalen zu verschiedenen somatischen Beschwerden wurde berichtet. So ist u.a. ein Zusammenhang eines Mangels sozialer Anerkennung mit einer schlechten Schlafqualität gezeigt worden [TICS].

Depression hängt mit allen TICS - Skalen außer mit Erfolgsdruck zusammen, am deutlichsten aber mit chronischer Besorgnisneigung und der Screening - Skala für chronischen Stress [TICS].

Psychische und körperliche Erschöpfung zeigt einen starken Zusammenhang zu Überforderung bei der Arbeit [TICS].

Der Zusammenhang zu psychischen Beschwerden ist insgesamt höher zu werten als der Zusammenhang zu körperlichen Beschwerden [TICS].

Weiterhin gibt es Beläge dafür, dass der TICS auch mit physiologischen Stressindikatoren wie dem Cortisol zusammenhängt. Es wurde gezeigt, dass Arbeitsüberlastung und Besorgnis mit der Cortisol - Aufwach - Reaktion (CAR) an Arbeitstagen, nicht aber am Wochenende zusammenhängen [TICS] und dass darüber hinaus auch eine erhöhte CAR bei sozialem Stress und einem Mangel an Bedürfnisbefriedigung besteht [81].

2.4 Cortisolanalyse

Der bei der Ausfüllung des TICS - Fragebogens gesammelte Speichel für die Cortisolbestimmung wurde in der Salivette für maximal 14 Tage im Kühlschrank bei 4°C gelagert. Die weitere Aufarbeitung übernahmen Labormitarbeiter der AG Reif in der Klinik und Poliklinik für Psychiatrie, Psychosomatik und Psychothera-

pie der Universität Würzburg. Die Salivetten wurden zentrifugiert und der Speichel wurde aliquotiert und bis zur endgültigen Aufarbeitung bei -80°C eingefroren. Die weitere Verarbeitung und Analyse erfolgte im Institut für Biopsychologie, Universität Dresden, Leiter: Herrn Prof. Clemens Kirschbaum.

Zur weiteren Verarbeitung taute man den Speichel wieder auf und zentrifugierte die Salivetten bei 3000 rpm für 5 Minuten, sodass sich ein klarer, leicht visköser Überstand bildete. Die Cortisolkonzentration wurde mit dem kompetitiven Chemilumineszenz - Immunoassay mit hoher Sensitivität (IBL International, Hamburg, Germany) gemessen. Der Inter - und Intraassay - Koeffizient für Cortisol lag unter 8%. Bekannte Kreuzreaktivitäten für den Antikörper liegen bei 2% für Cortison, 2,5% für Corticosteron und 1% für Prednison.

2.5 Statistik

Da nicht alle Daten einer Normalverteilung folgten (mit Kolmogorov - Smirnov - Test und Shapiro - Wilk-Test geprüft), wurden die Gruppenvergleiche mit Mann - Whitney - U - Test, multipler Vergleich der mittleren Ränge und mit Kruskal - Wallis und Median - Test durchgeführt. Korrelationen wurden mit Spearman's Rangkorrelation oder Pearson's Korrelation berechnet. Unterschiede mit $p < 0,05$ wurden als signifikant gekennzeichnet.

3 Ergebnisse des Vorexperimentes

3.1 Ergebnisse für Mauslymphomzellen

Die Mauslymphomzellen teilten sich nach der Substanzinkubation mit MMC und MMS weniger häufig. Dies ist ersichtlich aus der niedrigeren Anzahl zweikerniger und dementsprechend höherer Anzahl einkerniger Mauslymphomzellen sowie aus dem niedrigeren Proliferationsindex (CPBI). Der CPBI fiel von 1,3 bei der Negativkontrolle (DMSO) auf 1,08 (MMC) - 1,18 (MMS) ab. Die Mitoserate fiel von 3,1 (DMSO) auf 1,0 (MMC) - 1,8 (MMS) ab. Die Apoptoserate fiel teilweise stark ab, von 0,7 bei DMSO auf 0 (MMS) - 0,5 (MMS), nur bei 1,0 µM MMC lag sie mit 1,1 höher (Details Tabelle 15).

Tabelle 13 Proliferation der Mauslymphomzellen (in %) unter 4 - stündiger Substanzinkubation mit MMC, MMS und DMSO (Negativkontrolle), $CPBI = (Einkernige + 2 \cdot Zweikernige + 3 \cdot Mehrkernige) / (Einkernige + Zweikernige + Mehrkernige)$

Mauslymphomzellen	Einkernige	Zweikernige	Mehrkernige	Apoptose	Mitose	Sonstige	CPBI
50 µl DMSO	63,3	25,9	0,6	0,7	3,1	1,4	1,302
1,0 µM MMC	89,8	7,3	0,29	1,1	1,19	0,29	1,081
1,5 µM MMC	86,4	8,5	0,20	0,1	1,0	3,8	1,094
100 µM MMS	77,0	15,2	1,0	0,5	1,9	4,4	1,185
150 µM MMS	83,4	14,0	0,4	0,0	1,8	0,4	1,151

Die Auswirkung der Substanzinkubation war ein Anstieg beinahe aller zytogenetischen Ereignisse (MK, NBUDs und NPBs).

Bei MMC war ein deutlicher Anstieg der zytogenetischen Marker mit zunehmender Dosis zu beobachten.

Bei MMS gab es einen höheren Anstieg der MK bei der niedrigeren Dosis von 100 µM MMS. Die Frequenz der NBUDs stieg mit zunehmender Dosis der Toxine, die NPB - Frequenz bei beiden Dosierungen lag ähnlich bei ca. 2,75 (Details Tabelle 14).

Tabelle 14 Zytogenetische Ereignisse in Mauslymphomzellen (in %) unter 4 - stündiger Substanzinkubation mit MMC, MMS und DMSO (Negativkontrolle)

Mauslymphomzellen	Zweiker-nige	Son-stige	1 MK	2 MK	>2 MK	NBUD	NPB
50 µM DMSO	94,50	0,50	1,60	0,50	0,00	1,60	1,30
1,0 µM MMC	85,50	0,20	6,80	0,80	0,20	2,39	4,10
1,5 µM MMC	77,00	0,46	10,95	1,42	0,41	3,74	5,99
100 µM MMS	88,50	1,30	4,69	0,80	0,10	1,80	2,80
150 µM MMS	88,40	0,50	3,00	0,50	0,00	4,90	2,70

Das Ziel sollte eine Herstellung von Positivkontrollen mit einer ca. 2 - 3 - fachen Erhöhung der MK - Frequenz sein. Für die Mauslymphomzellen bedeutete das eine Erhöhung der Lymphomzellen von 1,6 % auf ca. 3 % - 5 %.

Unter der Substanzinkubation mit MMS (100 und 150 µM) lag die MK - Frequenz beinahe in dem angestrebten Bereich (Abbildung 4).

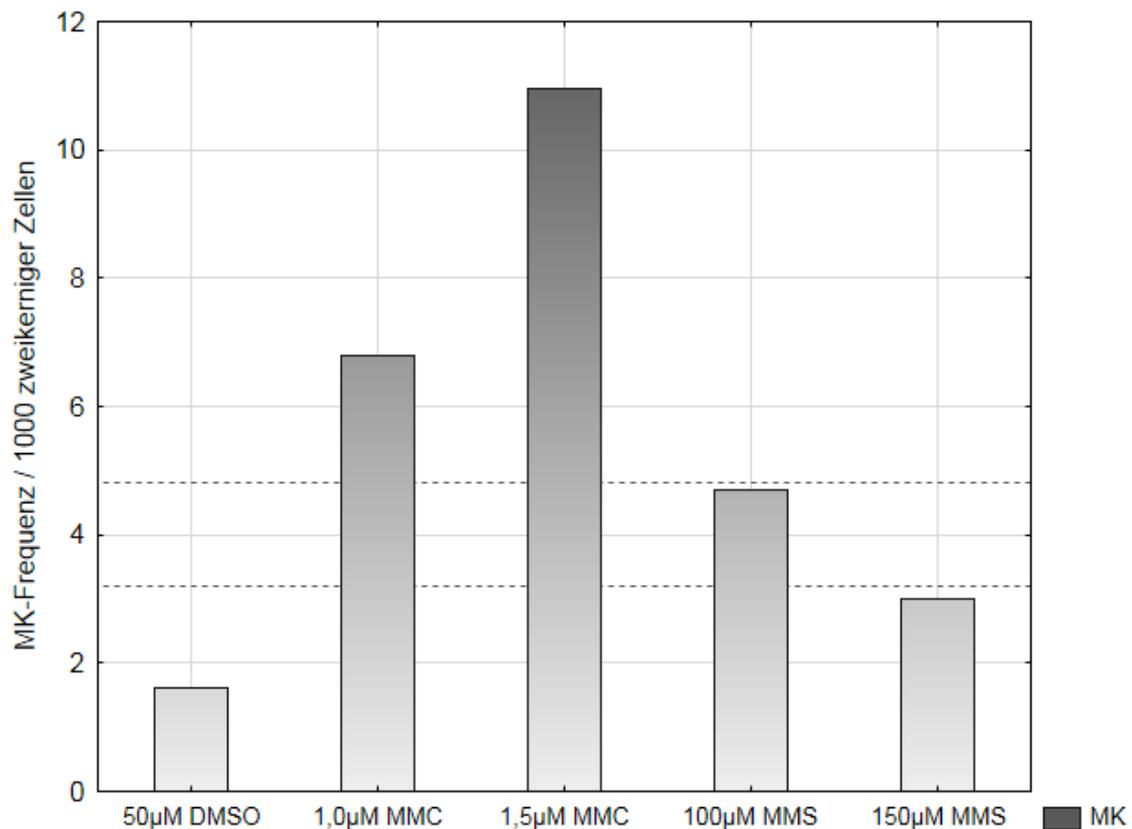


Abbildung 4 Balkenplots: Frequenz 1 MK / 1000 zweikerniger Zellen nach 4 - stündiger Inkubation von Mauslymphomzellen von DMSO (Negativkontrolle), MMS und MMC (mit 18 Std. Nachinkubation zur Expression der MK), Zielbereich für MK mit gestrichelter Linie gekennzeichnet

Die Ergebnisse einer früheren Studie über Einfluss von MMS (unter einer anderen Fragestellung) zeigten, dass bei höheren Konzentrationen des Toxins und mit zunehmender Zellkulturzeit (auch bei konstanter einmaliger Substanzinkubation) meist eine höhere MK - Frequenzanzahl provoziert wird [77]. Dies konnte hier für MMS nicht gezeigt werden.

Unter der Annahme, dass es eine Vorschädigung der Zellen durch das DMSO gab und es dadurch zu einer erhöhten Suszeptibilität für Toxine kam, wurde mit der höheren Konzentration von MMS an den Humanlymphozyten weiterexperimentiert. Eine Entscheidung für die hohe Konzentration von MMC wurde aus

demselben Grund getroffen. Um jedoch die MK - Frequenzanzahl nach unten zu korrigieren, wurde die Zeit der Substanzinkubation mit einer halb so langen Inkubationszeit von 2 Stunden variiert. Eine Publikation von Benning et al. [79] legte den Zeiteinfluss sehr nahe. Als Bestätigung für diese Überlegung wurde auch noch eine Probe mit 4 - und 22 - stündiger Inkubationszeit angelegt.

3.2 Ergebnisse für Humanlymphozyten

Unter dem Einfluss beider Substanzen fiel die Mitoserate mit steigender Einwirkzeit der Zytotoxine deutlich ab, außer bei der 22 - stündigen Inkubation, bei der sie stieg.

Die Apoptoserate verhielt sich unterschiedlich. Bei MMC stieg sie bei zunehmender Dauer der Substanzinkubation, bei MMS sank die Rate dagegen.

Als Folge bei längerer Substanzinkubation mit MMC und MMS war ein abnehmender Proliferationsindex (CPBI) zu finden, und ebenfalls eine deutlich höhere Anzahl an Einkernigen (Details Tabelle 15).

Tabelle 15 Zytogenetische Ereignisse in Humanlymphozyten (in %) unter Substanzinkubation mit MMC und MMS, $CPBI = (Einkernige + 2 \cdot Zweikernige + 3 \cdot Mehrkernige) / (Einkernige + Zweikernige + Mehrkernige)$

Humanlymphozyten	Ein-kernig	Zwei-kernig	Mehr-kernig	Apoptose	Mitose	Sonstige	CPBI
Probennr. 033	13,1	65,8	11,8	0,4	2,9	6,0	1,986
1,5µM MMC (2 Std)	34,2	53,2	3,9	0,2	2,7	5,8	1,668
1,5µM MMC(4 Std)	26,6	60,1	8,2	0,7	1,4	3,0	1,806
150µM MMS (2 Std)	34,8	51,4	3,6	1,3	2,3	0,6	1,653
150µM MMS (4 Std)	35,3	52,4	3,6	1,1	1,8	5,8	1,653

150µM MMS (22 Std)	90,1	3,0	0,29	0,9	2,5	3,2	1,038
--------------------	------	-----	------	-----	-----	-----	-------

Mit zunehmender Dauer der Substanzinkubation war auch ein Anstieg an zytogenetischen Ereignissen (MK und NBUDs) zu verzeichnen. NPBs blieben konstant und zeigten nur bei der vierstündigen Inkubation einen starken Frequenzanstieg (Details Tabelle 16).

Die Inkubation über 22 Stunden erbrachte kein verwendbares Ergebnis. Insgesamt gab es fast nur einkernige Zellen, die auch MK hatten. Selbst in den Zellen mit Mitosen fanden sich MK. Die Anzahl der zweikernigen Zellen war so gering, dass eine Auszählung der MK in einem einzelnen Präparat nicht möglich und damit als Positivkontrolle ungeeignet war.

Die einkernigen Zellen mit MK stammen laut der in vitro - Hypothese zur MK - Entstehung aus der ersten Generation und sind vor der Zugabe von Cytochalasin B entstanden. Dies stimmt überein mit der Vorgehensweise, bei der Cytochalasin B in dieser Probe durch die lange Substanzinkubation 22 Stunden später hinzugegeben wurde. Weiterhin lässt sich vermuten, dass die entstandenen Schäden so ausgeprägt waren, dass die Mitose nach Zugabe von Cytochalasin B zu stark beeinträchtigt war, um noch einem normalen Zellzyklus zu folgen. Da in vitro nur eine begrenzte Anzahl an Zellteilungen mit Humanlymphozyten gelingt, könnte auch die späte Zugabe nach 48 Stunden ein limitierender Faktor für die Mitosefähigkeit der Zellen sein.

Tabelle 16 Zytogenetische Ereignisse in Humanlymphozyten (in %) unter Substanzinkubation mit MMC und MMS

Humanlymphozyten	Zweikernige	Sonstige	1 MK	2 MK	> 2 MK	NBUD	NPB
Probennr. 033	98,4	0,1	0,8	0,1	0	0,4	0,2

1,5µM MMC (2 Std)	97,6	0,0	1,6	0	0	0,56	0,2
1,5µM MMC (4 Std)	93,0	0,1	4,69	0,4	0	1,6	2,0
150µM MMS (2 Std)	97,4	0,1	1,6	0	0	0,7	0,2
150µM MMS (4 Std)	93,9	0,4	3,2	0	0	2,3	0,2

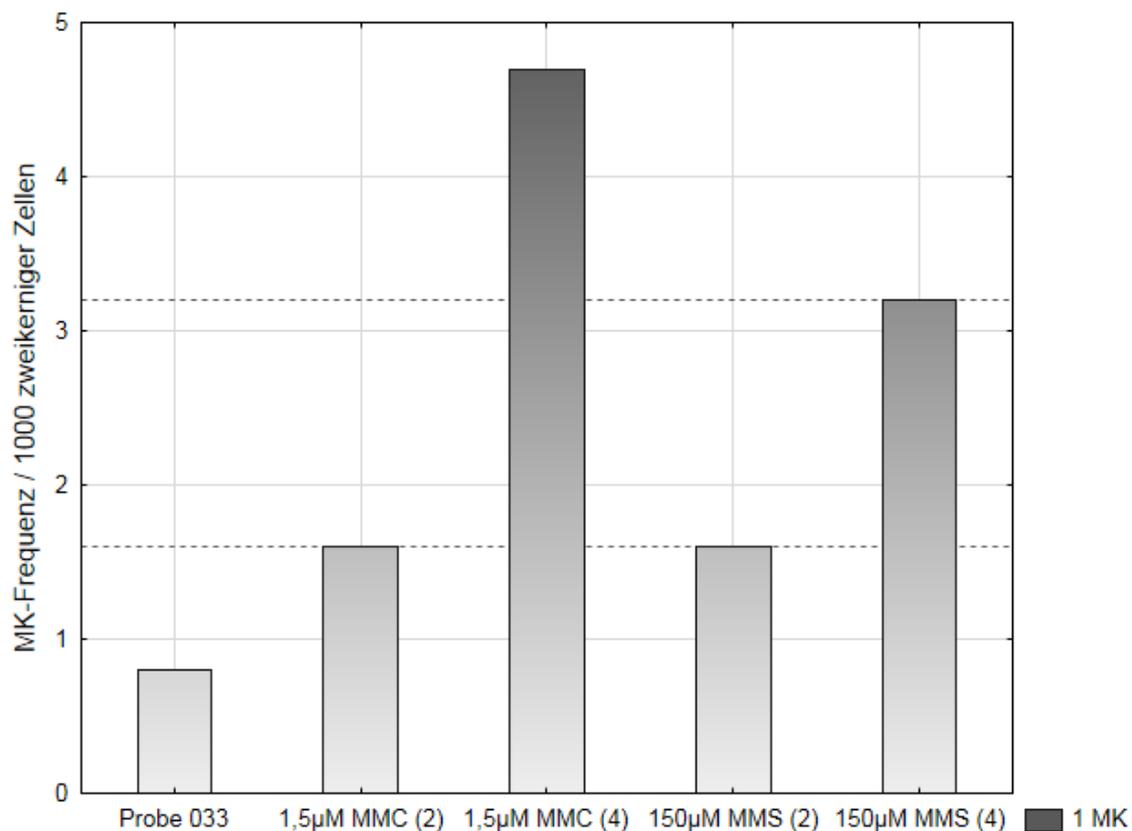


Abbildung 5 Balkenplots: Frequenz 1 MK / 1000 zweikerniger Zellen unter 4 - stündiger Inkubation von Humanlymphozyten von DMSO (Negativkontrolle), MMS und MMC (mit 18 Std. Nachinkubation zur Expression der MK), Zielbereich für MK mit gestrichelter Linie gekennzeichnet

Als Präparate für die Positivkontrollen mit der angestrebten, aus einer früheren Studie [8] abgeschätzten MK - Frequenz von 1,6 - 3,2 %, wurden die Proben mit

zweistündiger 1,5 μM MMC - Inkubation und beide Proben mit zwei - und vierstündiger 150 μM MMS - Inkubation verwendet. Die erzielten Frequenzen entsprachen retrospektiv auch dem zwei - bis vierfachen Wert der Ausgangsprobe.

Im Vergleich von Maus - zu Humanlymphozyten war die Anzahl von einem MK / 1000 zweikerniger Zellen sowie Zweikernige und Zelltrümmer / 1000 Zellen in der vierstündigen MMS - Inkubation (150 μM) vergleichbar. Deutliche Unterschiede gab es hingegen zwischen den NBUDs und NPBs. Bei der vierstündigen MMC - Inkubation (1,5 μM) ließen sich bei den Mauslymphomzellen 2,5 - fach so viele zytogenetische Ereignisse (MK, NPBs, NBUDs, Sonstiges) wie in den Humanlymphozyten finden.

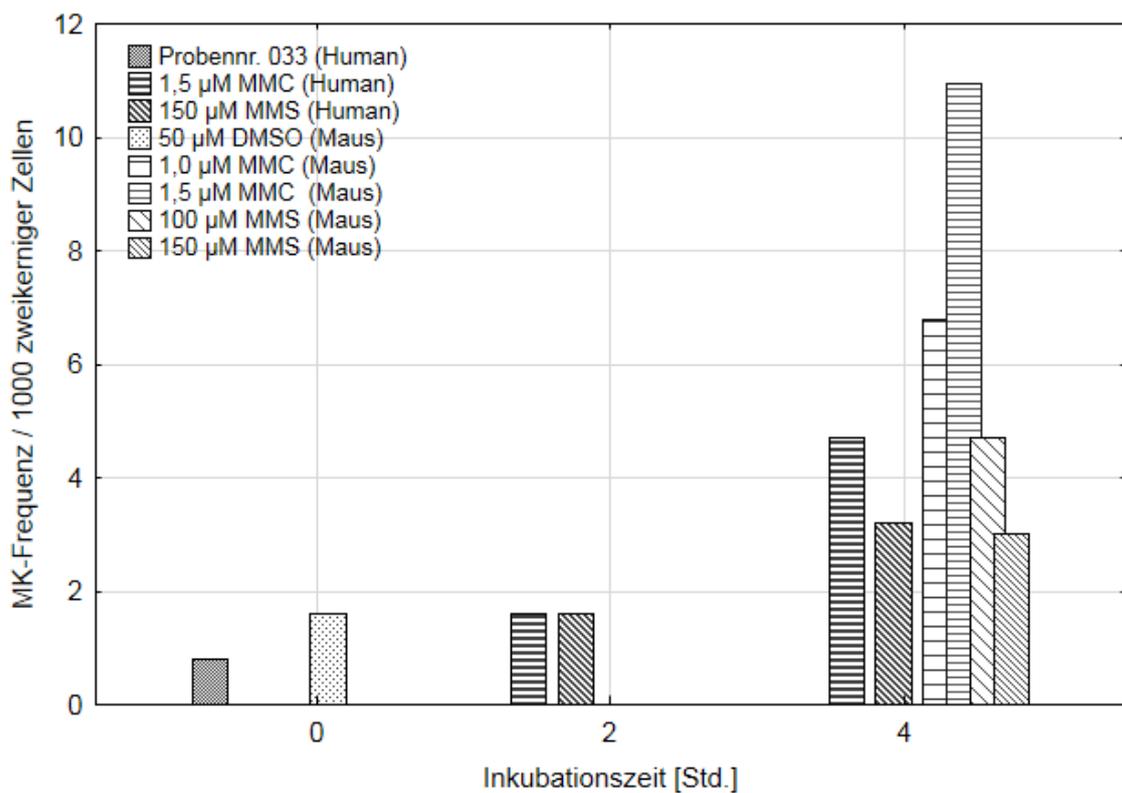


Abbildung 6 Balkenplots: Zusammenfassung der MK - Frequenz unter Substanzinkubation mit MMC und MMS (mit 18 Std. Nachinkubation zur Expression der MK) von Maus - und Humanlymphozyten

Insgesamt ähnelten Proliferationsverhalten und Zunahme zytogenetischer Ereignisse denen von Mauslymphomzellen. Eine Ausnahme bildete das Apoptoseverhalten, das sich bei den Humanlymphozyten sehr variabel verhielt.

4 Ergebnisse der Studie

Hier werden zunächst rein rechnerisch ermittelte Korrelationen dargestellt. Eine Diskussion anhand möglicher kausaler Hypothesen erfolgt in Kapitel 5 (Diskussion)

4.1 Zytogenetische Endpunkte

4.1.1 Ergebnisse der Gruppengesamtheit

Alter und MK

In der Gruppengesamtheit konnte ein Anstieg der MK - Frequenz mit zunehmendem Alter beobachtet werden (Abbildung 7). Jedoch gab es keinen signifikanten Altersunterschied zwischen Probanden mit ADHS und den Kontrollen (Kolmogorov - Smirnov - Test, $p > 0,05$). Andere zytogenetische Endpunkte zeigten keine signifikante Korrelation zum Alter.

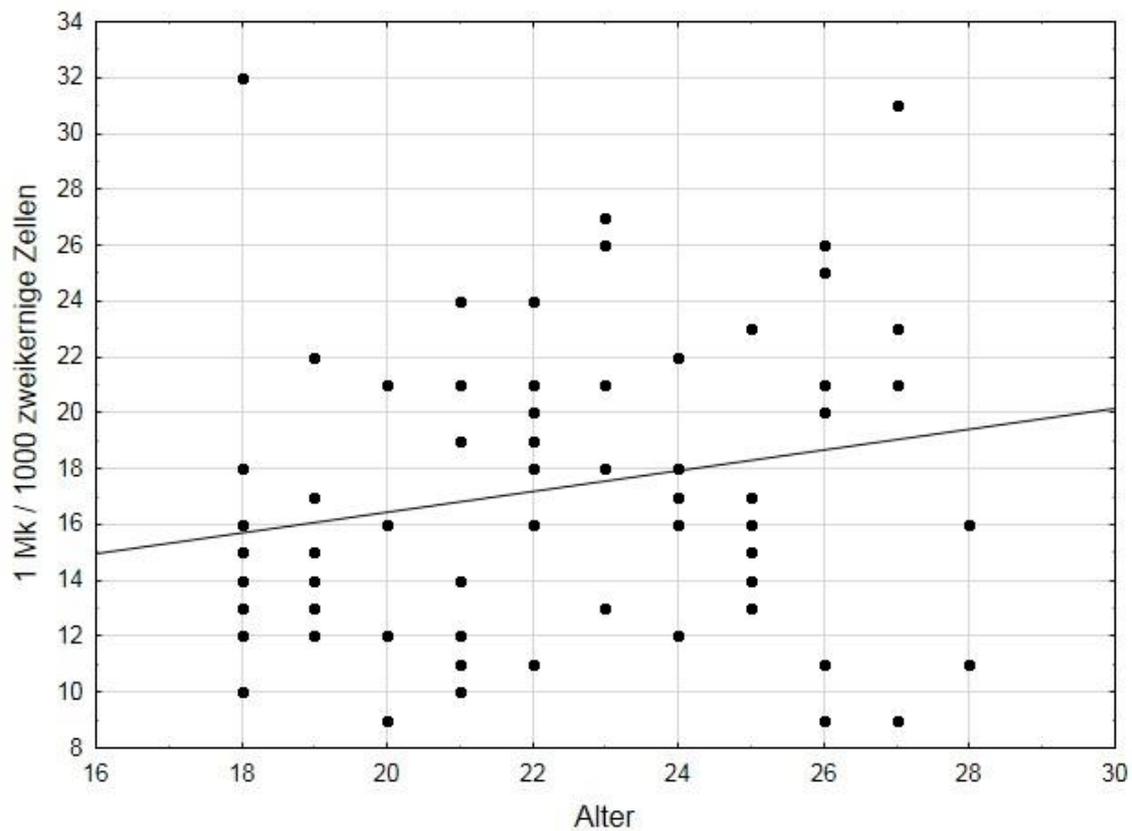


Abbildung 7 Scatterplot für Alter und 1 MK / 1000 zweikernige Zellen, Spearman's Rangkorrelation: $r_s = 0,26$, $p < 0,05$

4.1.2 Gruppenunterschiede in den zytogenetischen Endpunkten

Es gab keinen signifikanten Gruppenunterschied zwischen ADHS - Patienten und Kontrollprobanden hinsichtlich aller zytogenetischen Endpunkte. Auch ein Gruppenunterschied zwischen ADHS - Patienten mit und ohne Depression war nicht zu finden. (Mann - Whitney - U - Test für alle zytogenetischen Endpunkte $p > 0,05$, deskriptive Statistik siehe Tabelle 17).

Tabelle 17 deskriptive Statistik der zytogenetischen Ereignisse für die Gruppen ADHS (N = 42) und Kontrollen (N = 28)

	ADHS			Kontrolle		
	Mittelwerte	± SEM	± SD	Mittelwerte	± SEM	± SD
Einkernige	249,12	15,25	98,81	225,11	13,88	73,43
Zweikernige	555,02	14,14	91,63	572,11	8,30	43,90
Mehrkernige	106,31	6,045	39,17	111,89	8,66	45,83
Apoptose	21,26	1,79	11,57	19,89	2,57	13,59
Mitose	22,05	1,26	8,17	24,21	1,38	7,28
Sonstige	54,05	4,86	31,48	47,54	6,76	35,79
Zweikernig o. MK	971,81	1,40	9,07	972,86	1,44	7,63
1 MK	17,60	0,88	5,71	16,89	0,89	4,71
2 MK	0,62	0,16	1,01	0,64	0,18	0,95
>2 MK	0,14	0,08	0,52	0,14	0,07	0,36
alle MK	19,50	1,10	7,11	18,68	1,02	5,40
Zellen mit MK	18,36	0,94	6,09	17,68	0,94	4,97
NBUDs	8,88	0,86	5,60	8,93	0,95	5,01
NPBs	0,79	0,16	1,05	0,46	0,13	0,69
CPBI	1,653	0,025	0,163	1,707	0,025	0,134

MK

Die durchschnittliche Zellzahl mit MK bei ADHS - Patienten betrug $18,36 \pm 0,94$ SEM ($\pm 6,09$ SD), und lag ebenfalls nicht signifikant über der von den Kontrollprobanden mit $17,68 \pm 0,94$ SEM ($\pm 4,97$ SD).

Eine signifikante Korrelation von MK zu NBUDs und NPBs gab es nicht (Spearman`s Rangkorrelation, deskriptive Statistik Tabelle 20).

CPBI

Auch konnte nur ein Trend zu einem höheren Proliferationsindex (CPBI) bei den Kontrollprobanden beobachtet werden (Mann - Whitney - U - Test, $p = 0,08$, deskriptive Statistik Tabelle 17).

Der CPBI selbst korrelierte signifikant mit der Anzahl ein -, zwei - und mehrkerniger Zellen, da er sich aus diesen berechnet, sowie signifikant mit der Mitoserate. Die Apoptose korrelierte nur in der Gesamtheit aller Probanden signifikant schwach positiv (Tabelle 18), wies in den zwei Gruppen aber nur einen Trend auf.

Tabelle 18 Spearman's Rangkorrelation r_s , für CPBI und Proliferationsereignisse in ADHS - Patienten ($N = 42$), Kontrollen ($N = 28$) und Gesamtheit ($N = 70$), alle Ereignisse $p < 0,05$, außer für Apoptose

	Gruppe	Einkernige	Zweikernige	Mehrkernige	Apoptose	Mitose
CPBI	ADHS	-0,75	0,61	0,51	0,17	0,54
CPBI	Kontrolle	-0,8	0,47	0,75	0,36	0,59
CPBI	gesamt	-0,78	0,63	0,64	0,26	0,58

Mitose und Apoptose

Ebenfalls konnte nur ein Trend zu einer niedrigeren Mitose - und einer höheren Apoptoserate bei den Kontrollprobanden im Vergleich zu den ADHS - Patienten beobachtet werden. Bei beiden Gruppen überwog die Mitose, wobei dies bei den ADHS - Patienten nur minimal war (Details Tabelle 17).

Ein statistischer Zusammenhang für Mitose und Apoptose und dem BMI war zu finden. Hier wurde ein signifikanter positiver Zusammenhang bei Kontrollprobanden zwischen Mitose und BMI mit $r_s = 0,43$, $p < 0,05$, und ein signifikanter negativer Zusammenhang zwischen BMI und einkernigen Zellen r_s

= - 0,44, $p < 0,05$, beobachtet.

Beim zytogenetischen Marker Apoptose ließ sich ein statistischer Zusammenhang zum Geschlecht bei den ADHS - Patienten finden. Hier wiesen die männlichen ADHS - Patienten ($N = 24$) eine signifikant höhere Apoptoserate als die weiblichen Patientinnen ($N = 18$) auf (Mann - Whitney - U - Test, $p = 0,02$).

Der Unterschied ließ sich nicht zwischen ADHS - und Kontrollprobanden finden und auch nicht innerhalb derselben Geschlechtergruppe (Mann - Whitney - U - Test, $p > 0,05$).

4.1.3 Zytogenetische Endpunkte unter MPH - Einnahme

Ebenso fand sich kein statistischer Zusammenhang von zytogenetischen Endpunkten und der MPH - Einnahme. Die nach der MPH - Einnahme erstellten Subgruppen wiesen keine signifikanten Unterschiede auf (Kruskal - Wallis Test, $p > 0,1$, Daten nicht gezeigt) und auch die berechnete kumulative Einnahmedauer zeigte keinen Hinweis für verursachte DNA - Schäden. Ebenso zeigte die verwendete Medikamentendosis von 0 - 60mg keinen Zusammenhang zu zytogenetischen Endpunkten (Tabelle 19).

Tabelle 19 Spearman's Rangkorrelation zwischen MPH - Therapie (Dauer und Dosis) und allen zytogenetischen Endpunkten, für alle r_s $p > 0,05$, $N = 37$

Zytogenetische Endpunkte	Dauer (Monate)	Dosis (mg)
Einkernige	-0,29	-0,08
Zweikernige	0,22	0,01
Mehrkernige	-0,15	0,01
Apoptose	0,14	0,20
Mitose	0,12	-0,17

Zweikernig ohne MK	0,04	0,07
Zellen mit MK	-0,19	-0,08
NBUD	0,14	-0,11
NPB	0,16	0,12
CPBI	0,19	-0,02

4.2 Chronische psychosoziale Stressbelastung

4.2.1 Gruppenunterschiede in der psychosozialen Stressbelastung

ADHS - Patienten gaben in fast allen Stressbereichen signifikant höhere Stresswerte als die Kontrollprobanden an (Mann - Whitney - U - Test, $p < 0,05$, Abbildung 8.1). Allein den Erfolgsdruck (ERDR) empfanden beide Gruppen etwa gleich belastend.

Die höchsten Werte fanden sich bei beiden Gruppen in den Bereichen Erfolgsdruck (ERDR), Arbeitsüberlastung (UEBE) und Arbeitsunzufriedenheit (UNZU) (Abbildung 8.1).

Eine Darstellung der mittleren Stresswerte in altersvergleichbaren Normwerten (t - Wert - Profile) zeigte, dass die Stresswerte beider Gruppen trotzdem noch im Normalbereich lagen. Die Stresswerte der ADHS - Patienten lagen dabei über dem Durchschnitt und die Werte bei den Kontrollprobanden darunter. Ausnahmen bildete der Erfolgsdruck (ERDR) bei den ADHS - Patienten und die Arbeitsüberforderung (UEFO) bei den Kontrollprobanden. Diese Werte lagen genau im Durchschnitt der altersvergleichenden Norm (Abbildung 8.2).

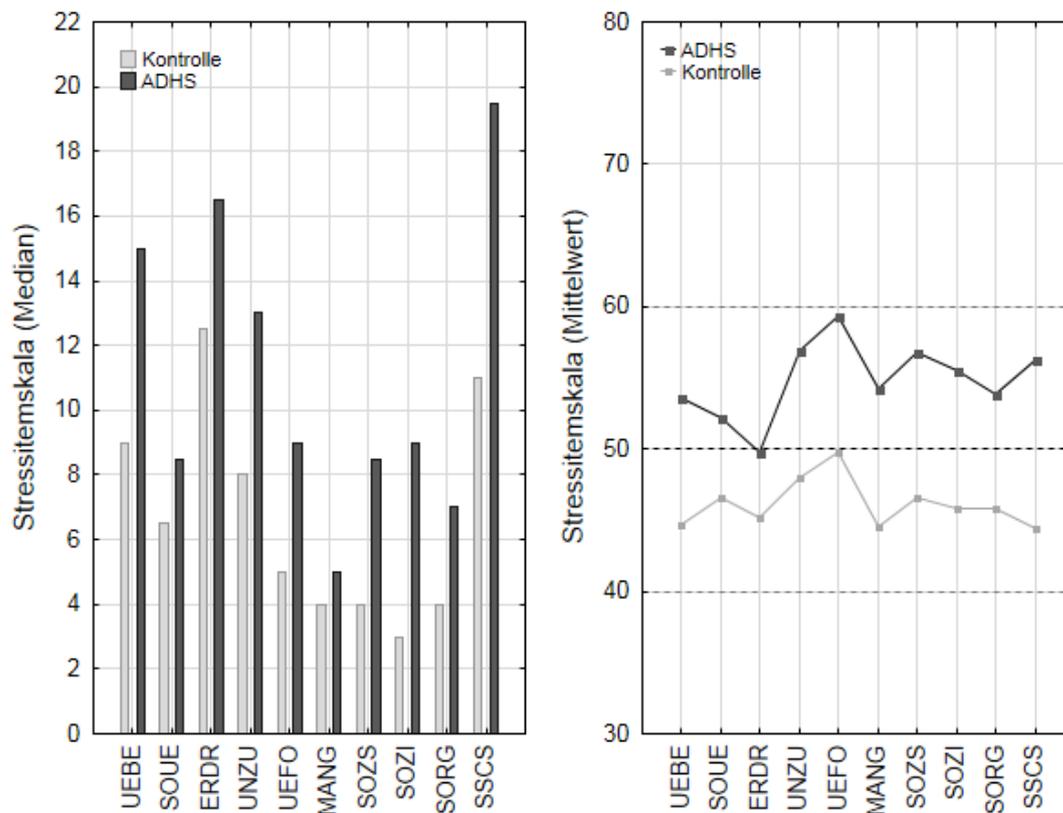


Abbildung 8 1: Balkendiagramm: Median der Rohwerte der Stressitems

2: Linienplots für multiple Variablen: Darstellung der t - Wert - Profile der Stress - Items; ADHS (N = 42), Kontrolle (N = 28), ---- Normalverteilung mit unterer, durchschnittlicher und oberer Grenze der Altersgruppe 16 - 30 Jahre, Abkürzungen Stressitems siehe 2.3.3 Tabelle 12

Die größten Differenzen (Kolmogorov - Smirnov - Test, Abbildung 8.2) nach Transformation der Werte zum Vergleich mit der Altersnorm fanden sich bei sozialer Isolation (SOZI) und sozialen Spannungen (SOZS). Danach rangierte Mangel an sozialer Anerkennung (MANG) und Bereiche, die die Arbeit betreffen. Dies waren Überforderung bei der Arbeit (UEFO), Arbeitsunzufriedenheit (UNZU) und Arbeitsüberlastung (UEBE).

Das vom Trier Inventar zum chronischen Stress vorgeschlagene Globalmaß für die Stressbelastung (SSCS), war auch in diesem Bereich bei ADHS - Patienten

erhöht. Es soll einen besonders engen Zusammenhang mit psychischen und physischen Beschwerden und Krankheiten geben [TICS].

Der Parameter der Persönlichkeitseigenschaft „Besorgnisneigung“ (SORG), war bei ADHS - Patienten ebenfalls signifikant erhöht.

Isolierte man die ADHS - Gruppe mit Komorbidität Depression aktuell oder in der Vergangenheit von denen mit reinem ADHS, zeigten sich bei den Patienten mit zusätzlicher Depression in allen Stressbereichen noch höhere Stresswerte, wobei auch wieder die drei Stressbereiche Arbeitsunzufriedenheit (UNZU), Erfolgsdruck (ERDR) und Arbeitsüberforderung (UEBE) am meisten belastend eingestuft wurden (Abbildung 9.1). Die größte Differenz zwischen ADHS mit Depression und den Kontrollen fanden sich bei sozialer Isolation (SOZI), chronischer Besorgnis (SORG) und dem Globalmaß für chronischen Stress (SSCS) (Tabelle 20).

Tabelle 20 Kolmogorov - Smirnov - Test: Stressitems (*t* - Werte) in den Gruppen ADHS mit Komorbidität Depression (*N* = 8) und Kontrolle (*N* = 28), alle *p* < 0,05, außer ERDR, max .pos. Differenz für alle Tests = 0, Abkürzungen der Stressitems siehe 2.3.3 Tabelle 12

t - Wert	Max.Neg - Diff.	p - Wert	Mittelwert ± SD (Kontrolle)	Mittelwert ± SD (ADHS + Depr.)
UEBE	-0,70	p < .005	44,68 ± 10,42	64,13 ± 11,29
SOUE	-0,77	p < .005	46,54 ± 7,74	59,00 ± 7,98
ERDR	-0,55	p < .05	45,14 ± 7,46	55,50 ± 9,86
UNZU	-0,86	p < .001	48,00 ± 9,97	67,00 ± 7,01
UEFO	-0,68	p < .01	49,79 ± 9,23	68,00 ± 10,20
MANG	-0,88	p < .001	44,54 ± 8,50	65,25 ± 9,42
SOZS	-0,71	p < .005	46,57 ± 8,12	64,50 ± 10,25
SOZI	-0,89	p < .001	45,82 ± 7,84	64,25 ± 7,89
SORG	-0,96	p < .001	44,21 ± 9,13	67,38 ± 7,09
SSCS	-0,93	p < .001	44,36 ± 11,77	68,75 ± 7,34

Auch im Vergleich mit der Altersnorm konnte gezeigt werden, dass sich Patienten mit Komorbidität Depression im Vergleich mit Normwerten ihrer Altersgruppe in beinahe allen erfassten Bereichen belasteter fühlten. Einzige Ausnahmen waren soziale Überlastungen (SOUE) und Erfolgsdruck (ERDR) (Abbildung 9.2).

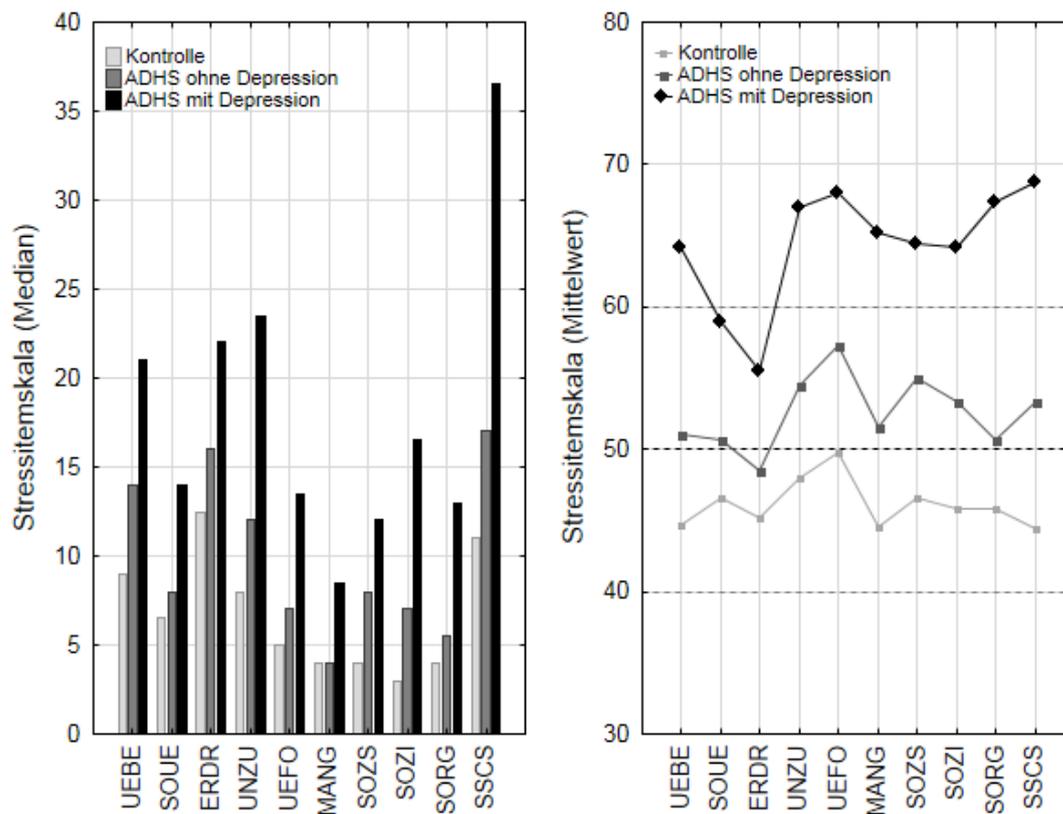


Abbildung 9 1: Balkendiagramm: Median der Rohwerte der Stressitems

2: Linienplots für multiple Variablen: Darstellung der t - Wert - Profile der Stress - Items; 1. ADHS (N = 42), Kontrolle (N = 28), 2. ADHS ohne Depression (N = 34), ADHS mit Depression (N = 8), Kontrollen (N = 28); ---- Normalverteilung mit unterer, durchschnittlicher und oberer Grenze der Altersgruppe 16 - 30 Jahre, Abkürzungen der Stressitems siehe 2.3.3 Tabelle 12

Die ADHS - Patienten mit und ohne Depression wiesen eine ähnliche prozentuale Verteilung der Stressbelastung auf. Sie unterschieden sich am meisten in den Bereichen chronische Besorgnisneigung (SORG) und dem Mangel an sozialer

Anerkennung (MANG) und im Gesamtscore für den chronischen Stress (SSCS) (Tabelle 21).

Tabelle 21 Kolmogorov - Smirnov - Test: Stressitems (*t* - Werte) in den Gruppen ADHS mit (*N* = 8) und ohne (*N* = 34) Komorbidität, markierte Tests für *p* < 0,05, Abkürzungen der Stressitems siehe 2.3.3 Tabelle 12

T-Wert	Max.Neg . - Diff.	Max.Pos . - Diff.	p-Wert	Mittelwert ± SD (ADHS o. Depression)	Mittelwert ± SD (ADHS m. Depression)
UEBE *	-0,63	0,00	p < .025	51,09 ± 8,38	64,13 ± 11,29
SOUE *	-0,61	0,00	p < .025	50,65 ± 7,45	59,00 ± 7,98
ERDR	-0,43	0,00	p > .10	48,47 ± 6,88	55,50 ± 9,86
UNZU *	-0,61	0,03	p < .025	54,53 ± 7,94	67,00 ± 7,01
UEFO	-0,38	0,00	p > .10	57,35 ± 10,49	68,00 ± 10,20
MANG *	-0,67	0,00	p < .01	51,62 ± 7,98	65,25 ± 9,42
SOZS	-0,41	0,00	p > .10	54,94 ± 8,28	64,50 ± 10,25
SOZI *	-0,57	0,00	p < .05	53,38 ± 7,63	64,25 ± 7,89
SORG *	-0,76	0,00	p < .005	50,71 ± 12,28	67,38 ± 7,09
SSCS *	-0,68	0,00	p < .01	53,35 ± 10,44	68,75 ± 7,34

Weiterhin fasst der Test die verschiedenen Stressbereiche zu zwei Blöcken zusammen: Der erste Block, welcher besonders von äußeren Bedingungen und von demographischen Variablen (Lebensalter, berufliche Situation, Familienstand) beeinflusst wird, wies bei ADHS - Patienten höhere Werte auf als bei den Kontrollprobanden und noch wesentlich höhere Werte bei den depressiven ADHS - Patienten. Das Gleiche war für die Ergebnisse des zweiten Blockes zu beobachten, der die interne Stressbelastung widerspiegelt und besonders von Persönlichkeitseigenschaften abhängig ist, wobei hier ein naher Bezug zum Neurotizismus nachgewiesen wurde. Einflussfaktoren sind Mangel an Sicherheit, Erfolge, Kontakte, sinnvolle Aufgaben und Anerkennung (Abbildung 10)

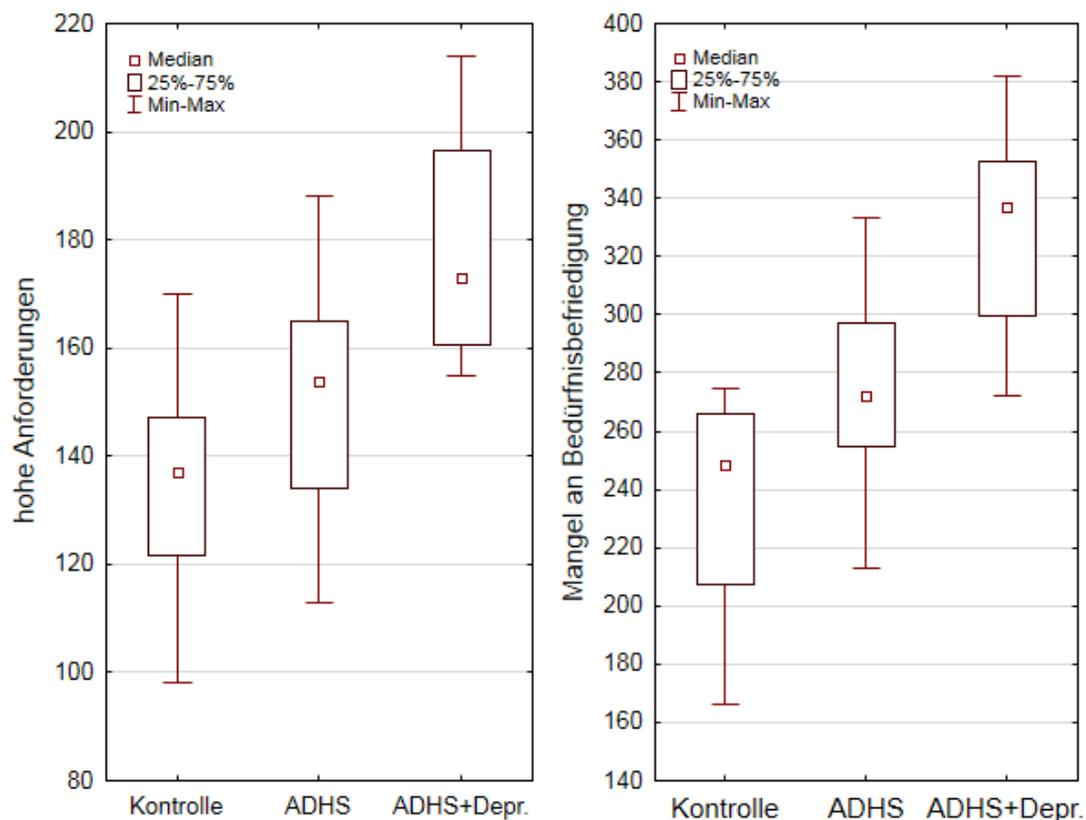


Abbildung 10 Boxplots: für die zwei Blöcke hohe Anforderungen und Mangel an Bedürfnisbefriedigung in den Gruppen Kontrolle (N = 28), ADHS ohne (N = 34) und mit Komorbidität Depression (N = 8)

4.2.1 Psychosoziale Stressbelastung unter MPH - Einnahme

Signifikante Unterschiede in den meisten Stressbereichen konnten nur zwischen der Kontrollgruppe (Gruppe 6) und ADHS - Patienten, die MPH für weniger als 11,5 Monate (Gruppe 4 und 5) eingenommen haben, beobachtet werden (Kolmogorov - Smirnov - Test, $p < 0,05$) (Tabelle 22, 23)

Zwischen den Subgruppen 4 und 5 gab es keinen signifikanten Unterschied (Kolmogorov - Smirnov - Test, $p > 0,05$, Daten nicht gezeigt).

Tabelle 22 Kolmogorov - Smirnov - Test: Gruppenvergleich für Stressitems zwischen ADHS - Patienten (MPH 0 - 1,5 Monate, N = 9) und Kontrollprobanden (N = 28), Ausschluss von ADHS - Patienten mit Komorbidität Depression, *markierte Tests für $p < 0,05$, Abkürzungen der Stressitems siehe 2.3.3 Tabelle 12

Stressbereich	Max. Diff.		Durchschnitt \pm SD	
	Neg.	Pos	ADHS (MPH 0-1,5 Monate)	Kontrolle
UEBE *	0,00	0,60	57,67 \pm 7,31	44,68 \pm 10,42
SOUE	0,00	0,49	56,00 \pm 7,58	46,54 \pm 7,74
ERDR	-0,07	0,27	48,11 \pm 7,15	45,14 \pm 7,47
UNZU *	0,00	0,52	56,44 \pm 10,97	48,00 \pm 9,97
UEFO	0,00	0,48	60,33 \pm 10,52	49,79 \pm 9,23
MANG	0,00	0,41	53,56 \pm 6,71	44,54 \pm 8,50
SOZS *	0,00	0,63	57,89 \pm 6,95	46,57 \pm 8,12
SOZI *	0,00	0,78	58,00 \pm 4,97	45,82 \pm 7,84
SORG *	0,00	0,63	58,89 \pm 12,73	44,21 \pm 9,13
SSCS *	0,00	0,60	59,00 \pm 10,04	44,36 \pm 11,77
1. hohe Anforderungen *	0,00	0,57	161,78 \pm 15,39	136,36 \pm 18,97
2. Mangel an Bedürfnisbefriedigung *	0,00	0,71	286,22 \pm 34,21	234,71 \pm 33,34

Tabelle 23 Kolmogorov - Smirnov - Test: Gruppenvergleich für Stressitems zwischen ADHS - Patienten (MPH 1,5 - 11,5 Monate, N = 5) und Kontrollprobanden (N = 28), Ausschluss von ADHS - Patienten mit Komorbidität Depression, * markierte Tests für $p < 0,05$, Abkürzungen der Stressitems siehe 2.3.3 Tabelle 12

Stressbereich	Max. Diff.		Durchschnitt \pm SD	
	Neg.	Pos.	ADHS (MPH 1,5-11,5 Monate)	Kontrolle
UEBE *	-0,11	0,68	53,60 \pm 3,78	44,68 \pm 10,42
SOUE	0,00	0,62	56,20 \pm 6,57	46,54 \pm 7,74
ERDR	0,00	0,61	52,00 \pm 5,43	45,14 \pm 7,47

UNZU	-0,14	0,46	54,60 ± 3,97	48,00 ± 9,97
UEFO	0,00	0,48	59,20 ± 9,63	49,79 ± 9,23
MANG *	0,00	0,82	56,60 ± 6,50	44,54 ± 8,50
SOZS *	0,00	0,82	59,40 ± 3,44	46,57 ± 8,12
SOZI	-0,11	0,57	50,80 ± 1,10	45,82 ± 7,84
SORG	-0,04	0,26	47,40 ± 8,26	44,21 ± 9,13
SSCS	-0,04	0,44	54,00 ± 6,78	44,36 ± 11,77
1. hohe Anforderungen *	0,00	0,79	161,80 ± 7,53	136,36 ± 18,97
2. Mangel an Bedürfnis- befriedigung *	0,00	0,80	280,60 ± 16,67	234,71 ± 33,34

Die subjektive Stressbelastung der meisten Bereiche zeigte einen Trend zur negativen Korrelation für die Dosis 0, 30 und 60 mg. Einzige signifikante Ausnahme war die soziale Isolation (SOZI) (Spearman's Rangkorrelation, $p < 0,05$).

Die kumulative MPH - Einnahmezeit (entspricht der berechneten zusammenaddierten Einnahmezeit für MPH) ließ in den meisten Bereichen einen signifikanten negativen Zusammenhang zum Niveau der Stressbereiche erkennen. Dies waren die Bereiche Arbeitsüberforderung (UEBE), soziale Überlastung und Stress (SOUE, SOZS), gefolgt von sozialer Isolation (SOZI), chronischer Besorgnisneigung (SORG), Mangel an sozialer Anerkennung (MANG), und der chronischen Stressbelastung (SSCS). Bei Betrachtung der Items in Blöcken ließ sich auch hier ein signifikanter negativer Zusammenhang erkennen.

Tabelle 24 Spearman's Rangkorrelation der kumulativen MPH - Therapie und Stressbereiche bei ADHS-Patienten, * markierte Korrelationen für $p < 0,05$, $N = 37$, Abkürzungen der Stressitems siehe 2.3.3 Tabelle 12

Stressbereich	Dauer (Monate)	Dosis (mg)
UEBE	-0,51*	-0,32
SOUE	-0,47*	-0,26
ERDR	-0,29	-0,01

UNZU	-0,31	-0,16
UEFO	-0,31	-0,09
MANG	-0,40*	-0,12
SOZS	-0,47*	-0,22
SOZI	-0,42*	-0,41*
SORG	-0,41*	-0,26
SSCS	-0,37*	-0,27
1. Hohe Anforderungen	-0,49*	-0,25
2. Mangel an Bedürfnisbefriedigung	-0,47*	-0,17

Auch unter Ausschluss von Patienten mit Depression wurden diese Ergebnisse bestätigt (Abbildung 11).

Die Patienten, die zusätzlich Depressionen in der Vorgeschichte aufwiesen, hatten interessanterweise keine signifikante Stressreduktion unter der MPH - Therapie. Hier war lediglich ein Trend aller t - Werte zu niedrigeren Stresswerten bei zunehmender Einnahmezeit zu beobachten (Spearman's Rangkorrelation, $p > 0,05$, Daten nicht gezeigt).

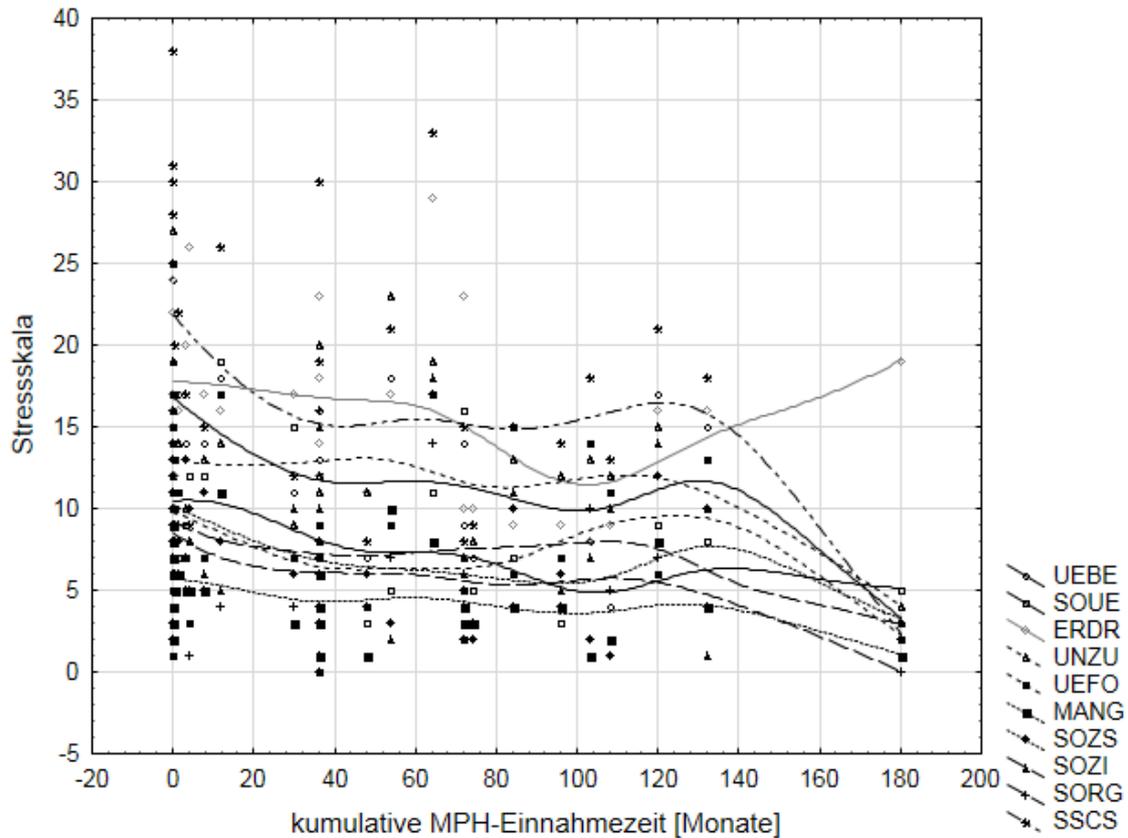


Abbildung 11 Scatterplot für kumulative MPH - Einnahmezeit und Stressitems von ADHS - Patienten ohne Depression (N = 34), Anpassung: distanzgewichtete kleinste Quadrate, Abkürzungen der Stressitems siehe 2.3.3 Tabelle 12

4.2.2 Zytogenetische Endpunkte unter psychosozialer Stressbelastung

Es konnte kein signifikanter Zusammenhang zwischen MK, NBUDs und NPBs und der psychosozialen Stressbelastung im Gesamten und bei den Kontrollprobanden gefunden werden (Spearman`s Rangkorrelation, $p > 0,05$, Daten nicht gezeigt).

Bei ADHS - Patienten ohne Komorbidität Depression konnte ein signifikanter negativer statistischer Zusammenhang der NBUDs mit Erfolgsdruck (ERDR, $r_s = -0,35$), soziale Isolation (SOZI, $r_s = -0,44$) und hohe Anforderungen ($r_s = -0,35$)

gefunden werden. NPBs ließen einen negativen Zusammenhang zu chronischen Stress (SSCS, $r_s = -0,36$) erkennen (Spearman's Rangkorrelation, Daten nicht gezeigt).

Bei der Untergruppe ADHS mit Depression ($N = 8$) zeigte sich im Gegensatz dazu eine signifikant starke positive Korrelationen zwischen Zellen mit MK und den Stressitems. Dabei wiesen Zellen mit MK / 1000 zweikerniger Zelle signifikant positive Korrelationen zu Arbeitsüberforderung ($r_s = 0,73$), sozialer Isolation (SOZI, $r_s = 0,76$), sozialen Spannungen ($r_s = 0,72$) und zum Globalmaß für chronischen Stress (SSCS, $r_s = 0,77$) auf. Die stärkste Korrelation ließ sich bei der chronischen Besorgnisneigung (SORG, $r_s = 0,90$) finden (Spearman's Rangkorrelation, $p < 0,05$, Tabelle 25).

Tabelle 25 Spearman's Rangkorrelation: Stressitems mit Zellen mit MK / 1000 Zellen der Gruppe ADHS mit Komorbidität Depression ($N = 8$), Abkürzungen der Stressitems siehe 2.3.3 Tabelle 12

Stressitem	Zellen mit MK	Bemerkung
UEBE	0,73 *	
SOUE	-0,21	Nicht über die Norm erhöht
ERDR	0,28	Nicht über die Norm erhöht
UNZU	0,20	
UEFO	0,38	
MANG	0,52	
SOZS	0,72 *	
SOZI	0,76 *	
SORG	0,90 *	
SSCS / Globalmaß	0,77 *	
1. hohe Anforderungen	0,21	
2. Mangel an Bedürfnisbefriedigung	0,58	

Weiterhin fanden sich Unterschiede zwischen ADHS - Patienten und Kontrollprobanden unter Einfluss von erhöhter Stressbelastung im Mitose - und Apoptoseverhalten (Korrelationsmatrix, Tabelle 26). Bei ADHS - Patienten korrelierten Mitose - und Apoptoseraten überwiegend negativ mit der Stressbelastung. Für Apoptose war dies signifikant ($p < 0,05$) für Arbeitsüberlastung (UEBE), soziale Überlastung (SOUE), Erfolgsdruck (ERDR) und soziale Isolation (SOZI), aber auch für die Blöcke hohe Anforderungen und Mangel an Bedürfnisbefriedigung. Zur Mitoserate wies nur die Arbeitsunzufriedenheit (UNZU) eine signifikante Korrelation ($p < 0,05$) auf.

Bei ADHS mit Depression zeigte allein der Bereich Arbeitsüberlastung (UEBE, $r_s = - 0,76$) eine starke signifikante negative Korrelation zur Mitoserate, während fast alle anderen Bereiche einen schwachen negativen Trend aufwiesen.

Bei den Kontrollen zeigte sich im Gegensatz dazu rein rechnerisch eine überwiegend positive Korrelation der Mitose - und Apoptoserate mit der Stressbelastung ($p < 0,05$). Für Korrelationen mit der Mitoserate waren das Arbeitsüberlastung (UEBE), Arbeitsüberforderung (UEFO), soziale Spannungen (SOZS) und chronische Besorgnis (SORG). Auch die Stressskala für chronischen Stress (SSCS) und der Block Mangel an Bedürfnisbefriedigung zeigten signifikante positive Korrelationen (Tabelle 26).

Im Gegenzug dazu war der Proliferationsindex zwischen den Gruppen annähernd gleich. Für ADHS - Patienten zeigte sich ein leichter Trend zu negativen Korrelationen, für Kontrollprobanden zu positiven. Es gab nur wenige signifikante Korrelationen (Korrelationsmatrix, $p < 0,05$). Dies waren bei den ADHS - Patienten die Stressbereiche Arbeitsüberforderung (UEFO, $r_s = - 0,33$), soziale Isolation (SOZI, $r_s = - 0,34$) und Mangel an Bedürfnisbefriedigung ($r_s = - 0,35$). Bei den Kontrollprobanden war die Korrelation für den CPBI mit der Arbeitsüberforderung (UEFO, $r_s = - 0,34$) signifikant (Tabelle 26).

Tabelle 26 Spearman's Rangkorrelation: Einfluss von psychosozialen Stress auf Raten der Mitose, Apoptose und CPBI bei ADHS - Patienten ohne Komorbidität Depression (N = 34) und Kontrollen (N = 28), *markierte Korrelationskoeffizienten für $p < 0,05$, Abkürzungen der Stressitems siehe 2.3.3 Tabelle 12

Stressbereich	Apoptose		Mitose		CPBI	
	ADHS	Kontrolle	ADHS	Kontrolle	ADHS	Kontrolle
UEBE	-0,20	0,14	0,05	0,52 *	-0,14	0,19
SOUE	-0,49 *	-0,10	0,11	0,06	-0,07	0,14
ERDR	-0,49 *	0,14	0,19	0,12	-0,01	0,23
UNZU	-0,10	-0,002	-0,10	0,36	-0,24	0,22
UEFO	-0,11	0,32	-0,28	0,61 *	-0,25	0,39 *
MANG	-0,28	0,30	0,05	0,28	-0,10	0,36
SOZS	-0,22	-0,15	0,03	0,38 *	0,07	0,14
SOZI	-0,36 *	0,17	0,14	0,33	-0,25	0,05
SORG	-0,11	0,16	0,05	0,45 *	-0,11	0,11
SSCS	-0,17	0,27	-0,04	0,50 *	-0,13	0,22
1. hohe Anforderungen	-0,52 *	0,08	0,10	0,33	-0,16	0,24
2. Mangel an Bedürfnisbefriedigung	-0,28	0,19	-0,08	0,51 *	-0,24	0,31

Stellte man die Ergebnisse für Mitose und Apoptose gruppenunabhängig in einem Scatterplot dar und legte eine Anpassungskurve für die distanzgewichteten kleinsten Quadrate hinein, konnte man für die Stressbereiche zwei parallel verlaufende Kurven, etwa in der Funktion zweiter Ordnung sehen. Beachtet man, dass Kontrollen eher niedrige Stresswerte, am Beginn der x - Achse, ADHS - Patienten eher hohe Stresswerte, dementsprechend eher rechts gelegen sind (verdeutlicht durch die Mittelwerte in der Graphik), ließen sich damit die unterschiedlich gerichteten Korrelationen erklären (Abbildung 12). Auch zeigen die Mittelwerte in den Grafiken, dass sich die ADHS - Patienten mit Depression am weitesten entfernt vom Scheitelpunkt der parabelähnlichen Kurve befinden.

Die Subgruppen für die MPH - Einnahme zeigten hinsichtlich der Mitose - und Apoptoseraten keine signifikanten Unterschiede (Kruskal - Wallis Test, $p > 0,05$, Daten nicht gezeigt).

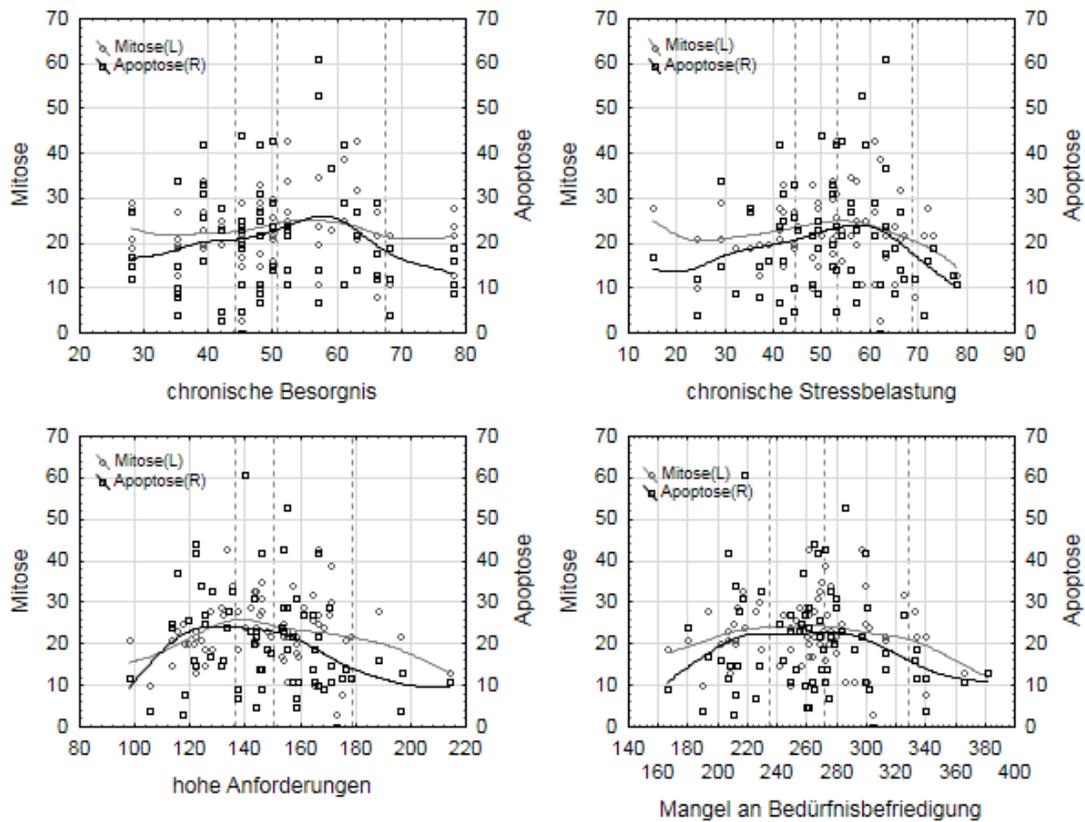


Abbildung 12 Scatterplots für Stressitems und Mitose sowie Apoptose / 1000 zweier-niger Zellen für alle Studienteilnehmer, Anpassung: kleinste gewichtete Quadrate, --- Mittelwerte der Stressitems für 1. Kontrolle, 2. ADHS ohne Depression, 3. ADHS mit Depression

4.3 Cortisolspiegel

4.3.1 Gruppenunterschiede im Cortisolspiegel

Der basale Cortisolspiegel lag mit einem Mittelwert von 15,21 (SEM \pm 2,11, SD \pm 7,22) nmol / l bei ADHS - Patienten signifikant niedriger als bei der Kontrollgruppe mit 20,45 (SEM \pm 1,95, SD \pm 10,15) nmol / l (Mann - Whitney - U - Test, $p < 0,05$, Abbildung 13).

Auch ein signifikanter Unterschied zwischen Raucher und Nichtraucher im Speichelcortisolspiegel ließ sich finden. Raucher hatten einen ca. 25% - ig niedrigeren Cortisolspiegel als Nichtraucher (Kruskal - Wallis Test , $p < 0,05$) (Abbildung 14).

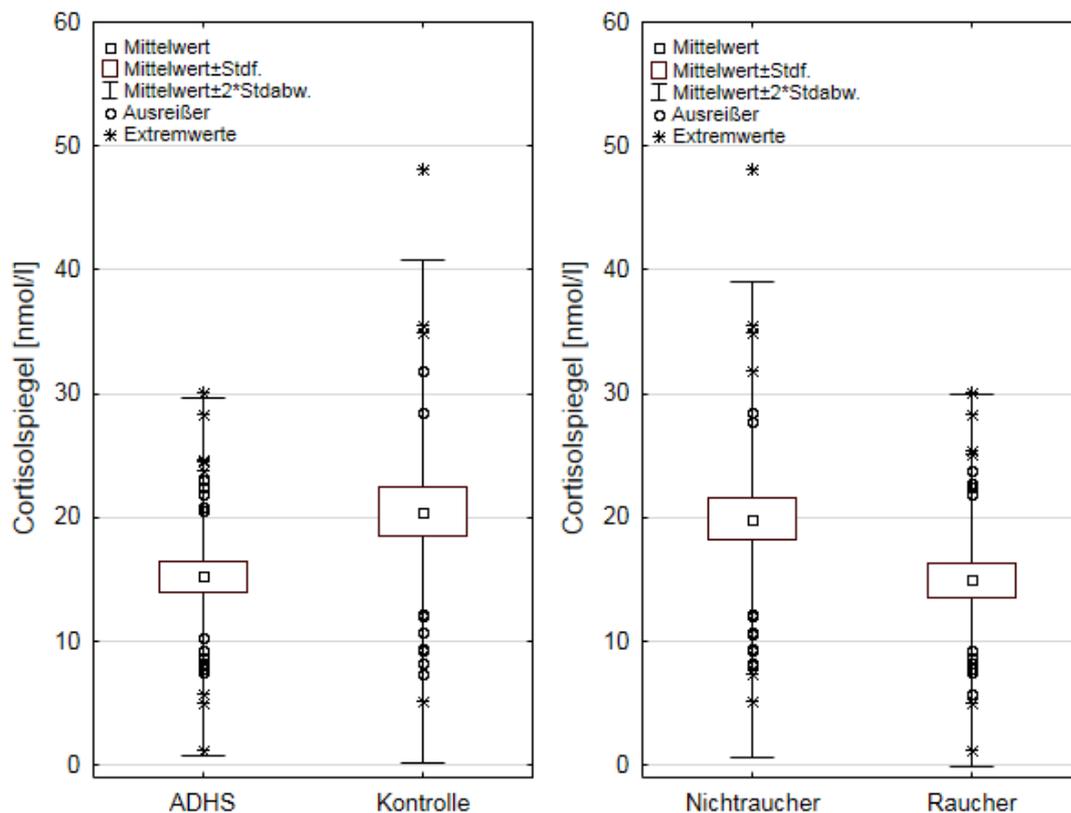


Abbildung 13 Boxplots: für Speichelcortisol der Gruppen 1. ADHS (N = 35) und Kontrolle (N = 27) $p < 0,05$, 2. Nichtraucher (N = 32) und Raucher (N = 30)

Da die Raucher in den Gruppen ADHS und Kontrolle sehr ungleich verteilt waren (Nichtraucher bei ADHS 35,9%, bei Kontrollprobanden 81,48%, Abbildung 14), wurden diese für die weitere Berechnung in die beiden Gruppen Raucher und Nichtraucher aufgeteilt, um zu sehen, ob der signifikante Unterschied in der Speichelcortisolkonzentration auf das Vorliegen eines ADHS oder eher auf den erhöhten Anteil an Rauchern in der ADHS-Gruppe zurückzuführen ist.

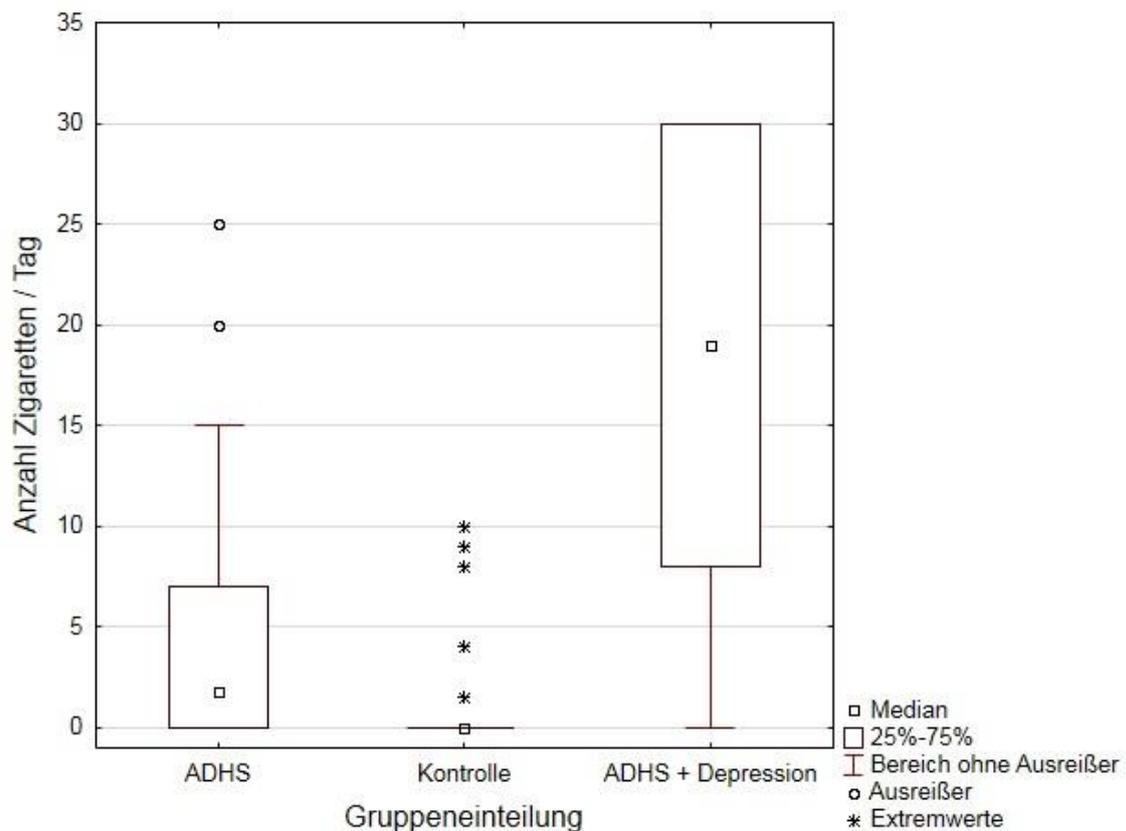


Abbildung 14 Boxplots: Anzahl der Zigaretten / Tag bei den Gruppen ADHS (N = 27), Kontrolle (N = 27) und ADHS mit Depression (N = 8). $P < 0,005$ für ADHS / Kontrolle

Dabei wiesen die rauchenden ADHS - Patienten einen signifikant ($p < 0,05$) niedrigeren Speichelcortisolspiegel als nichtrauchende ADHS - Patienten auf, auch unter Berücksichtigung der Komorbidität Depression. Die rauchenden Kontrollen

wiesen nur einen Trend zu niedrigeren Werten im Vergleich zu den Nichtrauchern auf ($p > 0,05$, Kolmogorov - Smirnov - Test, Tabelle 27). Dies weist darauf hin, dass das Rauchen nicht der einzige Grund für die Verminderung des Cortisolspiegels ist.

Tabelle 27 Kolmogorov - Smirnov - Test von Nichtrauchern (NR) / Rauchern (R) für den Cortisolspiegel innerhalb der Gruppen ADHS ohne ($N = 9 / 18$) und mit Depression ($N = 1 / 7$) und Kontrollen ($N = 22 / 5$), mit * markierte Tests signifikant, $p < 0,05$

	Max.Neg . - Diff.	Max.Pos . - Diff.	p-Wert	Mittelwert \pm SD (NR)	Mittelwert \pm SD (R)
ADHS *	-0,056	0,556	$p < .05$	$18,15 \pm 5,45$	$13,36 \pm 6,72$
ADHS + Depr. *			----	$24,66 \pm 0,00$	$14,84 \pm 9,46$
Kontrollen	-0,364	0,273	$p > .10$	$20,34 \pm 11,06$	$20,92 \pm 5,25$

Ein signifikanter Gruppenunterschied ließ sich nur zwischen rauchenden ADHS - Patienten und rauchenden Kontrollprobanden feststellen. Die Cortisolspiegel waren bei Kontrollprobanden signifikant höher als bei ADHS - Patienten ($p < 0,05$, Mann - Whitney - U - Test, Daten nicht gezeigt), was ebenfalls zeigt, dass der niedrigere Cortisolspiegel nicht allein dem Rauchen verschuldet ist (Abbildung 15).

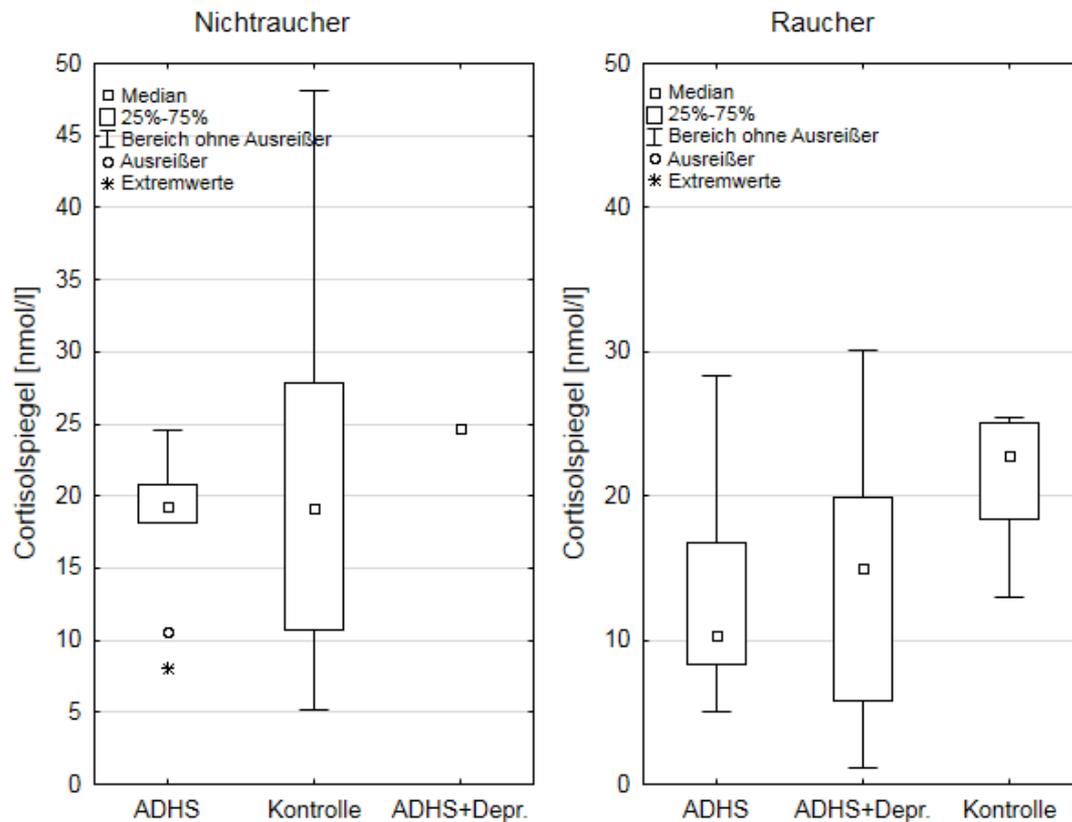


Abbildung 15 Boxplots: 1. Nichtraucher: Cortisolspiegel bei Kontrollen (N = 22), ADHS - Patienten ohne (N = 13) und mit Depression (N = 1), $p < 0,05$ für alle der Gruppen
 2. Raucher: Cortisolspiegel bei Kontrollen (N = 6), ADHS - Patienten ohne (N = 21) und mit Depression (N = 7), $p < 0,05$ für alle drei Gruppen

4.3.2 Cortisolspiegel und zytogenetische Endpunkte

Eine Korrelation zwischen der Höhe des Cortisolspiegels und zytotoxischen Ereignissen (MK, NPBs, NBUDs, ein -, zwei - und mehrkernige Zellen, Apoptose, Mitose, CPBI) zwischen ADHS - Patienten und Kontrollprobanden auch unter Berücksichtigung des Raucherstatus führte zu keinen signifikanten Ergebnissen (Spearman's Rangkorrelation, $p > 0,05$, Daten nicht gezeigt).

Nur in den Gruppen Raucher / Nichtraucher zeigten sich einzelne signifikante Korrelationen. Bei Kontrollprobanden waren es die Korrelation von Cortisol mit

zweikernigen Zellen mit $r_s = 0,54$ und Zellen ohne intakte Plasmagrenzen mit $r_s = -0,54$ bei Nichtrauchern ($N = 22$), sowie nicht mehr intakte Zellen mit $r_s = 0,90$ und CPBI mit $r_s = -0,90$ bei Rauchern ($N = 6$). Bei nichtrauchenden ADHS - Patienten ($N = 14$) war allein die Mitoserate signifikant mit $r_s = -0,77$ mit dem Cortisolspiegel korreliert. Bei rauchenden ADHS - Patienten ($N = 28$) zeigte sich dahingehend ein Trend in dieselbe Richtung (Spearman's Rangkorrelation, $p > 0,05$, Daten nicht gezeigt).

4.3.3 Cortisolspiegel unter MPH - Einnahme

Es wurden keine Gruppenunterschiede zwischen den Gruppen, aufgeteilt nach der MPH - Einnahme (Subgruppen 1 - 6), gefunden (Abbildung 16).

Angesichts der geringen Fallzahlen in den Subgruppen der ADHS - Patienten und der nicht signifikanten Subgruppenunterschiede im Hinblick auf Zigarettenanzahl pro Tag bzw. geschätzter Anzahl der Zigaretten im ganzen Leben (Dauer des Rauchens [Tage] x Zigarettenanzahl pro Tag), schien eine weitere Unterteilung nach Raucherstatus für die weitere statistische Berechnung nicht sinnvoll.

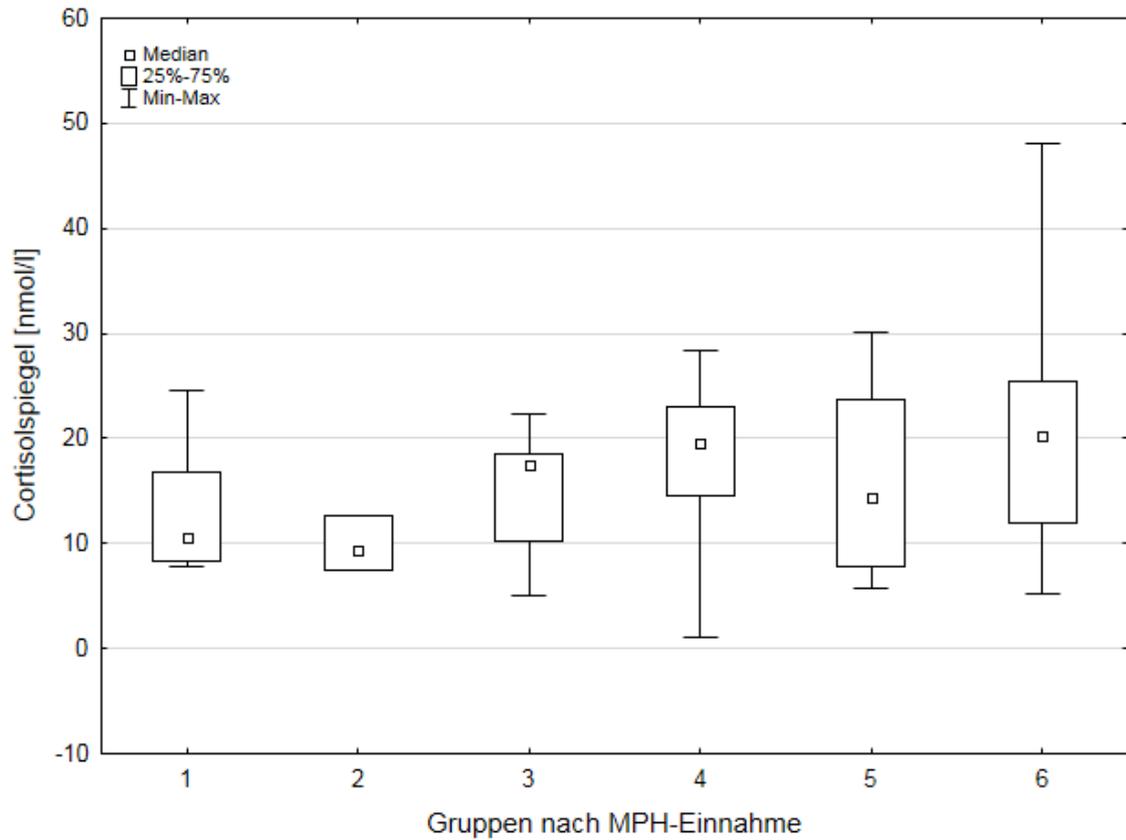


Abbildung 16 Boxplots: Cortisolspiegel bei ADHS (nach MPH - Einnahme, 1: N = 7, 2: N = 4, 3: N = 12, 4: N = 12, 5: N = 7) und Kontrollen (6: N = 28)

Ein negativer statistischer Zusammenhang des Cortisolspiegels und der MPH - Einnahmedauer (kumulative MPH - Einnahmezeit) ($r_s = -0,38$) bei ADHS - Patienten konnte beobachtet werden (Spearman's Rangkorrelation, $p < 0,05$), jedoch kein Dosisinfluss des Medikamentes (Multiple Vergleiche für mittlere Ränge aller Gruppen, $p > 0,05$).

4.3.4 Cortisolspiegel unter psychosozialem Stress

Es fanden sich in der Gesamtheit aller Probanden signifikante Korrelationen für Cortisol mit den t - Werten soziale Isolation (SOZI, $r = - 0,29$) und soziale Spannungen (SOZS, $r = - 0,26$) (Korrelationsmatrix, $p < 0,05$, für die restlichen t - Werte fanden sich negativ korrelierende Tendenzen). In die Gruppen ADHS und Kontrollprobanden unterteilte Statistik ergab keine signifikanten Korrelationen zwischen Cortisolspiegel und psychosozialen Stressleveln (Spearman's Rangkorrelation, $p > 0,05$, Daten nicht gezeigt).

4.4 Weitere Confounder

Unter den erhobenen potentiellen Confoundern für die Ergebnisse der Analyse der Hauptzielgrößen (zytogenetische Marker und Cortisolspiegel) gab es keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen ADHS - und Kontrollprobanden beim Alter, Geschlecht und Anzahl der Röntgenuntersuchungen (Mann - Whitney - U - Test, $p > 0,05$, Daten nicht gezeigt). Signifikant unterschied sich der Raucherstatus, der BMI, die Anzahl der Kontinentalflüge, die die Probanden in den letzten 2 Jahren mitgemacht hatten und das Bildungsniveau (Mann - Whitney - U - Test, $p < 0,05$).

Kontrazeptiva wurden von mehr Frauen in der Kontrollgruppe als in der ADHS - Gruppe eingenommen. Es ergab sich jedoch in diesem Zusammenhang kein signifikanter statistischen Unterschied in Bezug auf die Cortisolspiegel.

4.4.1 Kontinentalflüge

ADHS - Patienten sind signifikant häufiger zwischen den Kontinenten geflogen als Kontrollprobanden. Signifikante Korrelationen ließen sich nur zu 2 MK finden

(Spearman`s Rangkorrelation, $r_s = 0,31$, $p < 0,05$), nicht jedoch zu 1 MK / 1000 zweikerniger Zellen oder zu Zellen mit MK / 1000 zweikerniger Zellen.

4.4.2 Bildungsniveau

Das Bildungsniveau war sehr ungleich verteilt. Wesentlich mehr ADHS - Patienten absolvierten eine Ausbildung (26 / 41 = 63,4%) als ein Studium bzw. einen Gymnasialbesuch. Bei den Kontrollprobanden waren dies nur (4 / 28) 14,3%.

Probanden mit niedrigerem Bildungsniveau wiesen in den Stressitems soziale Überlastung (SOUE) und den beiden Blöcken hohe Anforderung und Mangel an Bedürfnisbefriedigung signifikant höhere Stresslevel auf (Tabelle 28).

Tabelle 28 Kolmogorov - Smirnov - Test für signifikante Stressitems (t - Werte) in den Gruppen Ausbildung ($N = 30$) und Universität ($N = 39$) bei ADHS - und Kontrollprobanden, alle Tests für $p < 0,05$, Abkürzungen der Stressitems siehe 2.3.3 Tabelle 12

Stressitem	p-Wert	Mittelwert \pm SD		N	
		Ausbildung	Universität	Ausbildung	Universität
SOUE	$p < 0.005$	$53,57 \pm 8,25$	$47,28 \pm 7,66$	30	39
1. höhe Anforderung	$p < 0.025$	$155,00 \pm 24,48$	$142,62 \pm 20,61$	30	39
2. Mangel an Bedürfnisbefriedigung	$p < 0.05$	$272,77 \pm 53,85$	$256,62 \pm 34,68$	30	39

Innerhalb der Kontrollgruppe gab es zwischen den Bildungsniveaus signifikante Differenzen in den t - Werten Arbeitsüberlastung (UEBE), Arbeitsunzufriedenheit (UNZU), Arbeitsüberforderung (UEFO), Mangel an sozialer Anerkennung (MANG) und Mangel an Bedürfnisbefriedigung, wobei hier die Probanden mit höherem Bildungsniveau (2) höhere Stresswerte aufzeigten.

Hingegen fanden sich innerhalb der ADHS - Gruppe tendenziell höhere Werte in allen Stressbereichen bei den Patienten, die einen niedrigeren Bildungsweg (1) genommen haben, allerdings war dies nur bei der sozialen Überforderung (SOUE) signifikant (Tabelle 29 - 31).

Tabelle 29 Mann - Whitney - U - Test für die Bildungsniveaus Gesamtschule / Ausbildung ((1), N = 30) und Gymnasium / Universität ((2), N = 39) in allen Gruppen, * markierte Tests signifikant für $p < 0,05$

	Rang- summe (1)	Rang- summe (2)	U	Z	p- Wert	Z - korr.	p- Wert	2*ein s. - exakt p
UEBE	1149,50	1265,50	485,50	1,198	0,230	1,200	0,230	0,230
SOUE *	1322,50	1092,50	312,50	3,292	0,001	3,304	0,001	0,001
ERDR	1152,50	1262,50	482,50	1,235	0,217	1,237	0,216	0,216
UNZU	1089,50	1325,50	545,50	0,472	0,637	0,473	0,636	0,635
UEFO	1066,00	1349,00	569,00	0,188	0,851	0,188	0,851	0,852
MANG	1187,00	1228,00	448,00	1,652	0,098	1,670	0,095	0,099
SOZS *	1237,50	1177,50	397,50	2,264	0,024	2,271	0,023	0,023
SOZI *	1226,00	1189,00	409,00	2,124	0,034	2,131	0,033	0,033
SORG	1136,00	1279,00	499,00	1,035	0,301	1,038	0,299	0,303
SSCS	1160,50	1254,50	474,50	1,332	0,183	1,333	0,183	0,182
1. hohe Anford. *	1243,00	1172,00	392,00	2,330	0,020	2,331	0,020	0,019

Mangel an Bedürfnisbefried.	1180,50	1234,50	454,50	1,574	0,116	1,574	0,116	0,115
------------------------------------	---------	---------	--------	-------	-------	-------	-------	-------

Tabelle 30 Mann - Whitney - U - Test für die Bildungsniveaus Gesamtschule / Ausbildung ((1), N = 26) und Gymnasium / Universität ((2), N = 15) in der ADHS - Gruppe (1, N = 26), (2), N = 15), * markierte Tests für $p < 0,05$

	Rangsumme (1)	Rangsumme (2)	U	Z	p-Wert	Z - korr.	p-Wert	2*exakt p
UEBE	572,50	288,50	168,50	0,704	0,482	0,705	0,481	0,478
SOUE *	635,00	226,00	106,00	2,395	0,017	2,404	0,016	0,015
ERDR	592,00	269,00	149,00	1,232	0,218	1,235	0,217	0,221
UNZU	542,50	318,50	191,50	-0,081	0,935	-0,081	0,935	0,925
UEFO	522,50	338,50	171,50	-0,623	0,534	-0,624	0,532	0,529
MANG	593,50	267,50	147,50	1,272	0,203	1,281	0,200	0,201
SOZS	581,00	280,00	160,00	0,934	0,350	0,937	0,349	0,355
SOZI	572,50	288,50	168,50	0,704	0,482	0,705	0,481	0,478
SORG	557,50	303,50	183,50	0,298	0,766	0,299	0,765	0,758
SSCS	566,50	294,50	174,50	0,541	0,588	0,541	0,588	0,583
1. hohe Anford.	609,50	251,50	131,50	1,705	0,088	1,706	0,088	0,086
Mangel an Bedürfnisbefried.	566,00	295,00	175,00	0,528	0,598	0,528	0,598	0,602

Tabelle 31 Mann - Whitney - U - Test für die Bildungsniveaus Gesamtschule / Ausbildung ((1), N = 4) und Gymnasium / Universität ((2), N = 24) in der Kontrollgruppe (1, N = 26), (2), N = 15), * markierte Tests für $p < 0,05$

	Rang- summe (1)	Rang- summe (2)	U	Z	p- Wert	Z - korr.	p- Wert	2*ein s. - exakt p
UEBE *	20,50	385,50	10,50	-2,429	0,015	-2,437	0,015	0,009
SOUE	54,00	352,00	44,00	-0,230	0,818	-0,232	0,816	0,825
ERDR	35,50	370,50	25,50	-1,444	0,149	-1,448	0,148	0,144
UNZU *	15,00	391,00	5,00	-2,790	0,005	-2,799	0,006	0,002
UEFO *	19,00	387,00	9,00	-2,528	0,011	-2,542	0,011	0,007
MANG *	14,00	392,00	4,00	-2,856	0,004	-2,946	0,003	0,001
SOZS	41,00	365,00	31,00	-1,083	0,279	-1,090	0,276	0,291
SOZI	38,50	367,50	28,50	-1,247	0,212	-1,258	0,208	0,209
SORG	30,50	375,50	20,50	-1,773	0,076	-1,791	0,073	0,070
SSCS *	18,50	387,50	8,50	-2,560	0,010	-2,567	0,010	0,005
1. hohe Anford.	29,50	376,50	19,50	-1,838	0,066	-1,840	0,066	0,059
Mangel an Be- dürfnis- befried. *	13,00	393,00	3,00	-2,922	0,003	-2,922	0,003	0,001

Ein signifikanter statistischer Zusammenhang zwischen zytogenetischen Markern und Bildungsniveau konnte nicht gefunden werden (Spearman's Rangkorrelation, $p > 0,05$, Daten nicht gezeigt).

4.4.3 Rauchen

Der Raucheranteil war bei ADHS - Patienten mit 64% höher als bei den Kontrollprobanden mit 19% (Details 4.3.1).

Die Anzahl der Zigaretten pro Tag korrelierte signifikant positiv mit allen t - Werten der Stressbereiche (Spearman`s Rangkorrelation, $p < 0,05$, Tabelle 32).

Aufgeteilt nach der Gruppe ADHS / Kontrolle ließen sich bei den ADHS - Patienten diese Korrelationen bis auf die Items soziale Überlastung (SOUE) und soziale Isolation (SOZI) wiederfinden, wohingegen bei den Kontrollen nur die Items Arbeitsunzufriedenheit (UNZU, $r_s = 0,56$), Mangel an sozialer Anerkennung (MANG, $r_s = 0,46$), Überforderung bei der Arbeit (UEFO, $r_s = 0,39$) und der 2. Block Mangel an Bedürfnisbefriedigung ($r_s = 0,52$) signifikant korrelierten.

Tabelle 32 Spearman`s Rangkorrelation für t - Werte der Stressbereiche und Zigaretten / Tag ($N = 66$), für alle Tests signifikant, $p < 0,05$, Abkürzungen der Stressitems siehe 2.3.3 Tabelle 12

UEBE	SOUE	ERDR	UNZU	UEFO	MANG	SOZS	SOZI	SORG
0,38	0,30	0,27	0,47	0,38	0,41	0,46	0,28	0,41
SSCS		1. hohe Anforderungen			Mangel an Bedürfnisbefriedigung			
0,45		0,38			0,46			

Ein statistischer Zusammenhang von Zigarettenanzahl / Tag und zytogenetischen Endpunkten konnte nicht gefunden werden (Spearman`s Rangkorrelation, $p > 0,05$).

4.4.4 BMI

Der Body - Maß - Index (BMI) unterschied sich zwischen ADHS - Patienten und Kontrollprobanden. Bei ADHS - Patienten betrug der durchschnittliche BMI 26,23 ($\pm 6,52$ SD, $\pm 1,03$ SEM, N = 40, darunter ein Extremwert mit BMI = 53 einer Adipositaspatientin Grad III), was nach WHO - Einteilung einer Präadipositas entspricht (25,0 - 29,99). Bei Kontrollprobanden betrug der durchschnittliche BMI 22,27 ($\pm 2,13$ SD, $\pm 0,40$ SEM, N = 28), was nach WHO - Einteilung einem Normalgewicht entspricht (18,50 - 24,99).

Die BMI - Unterschiede waren aber nur bei den weiblichen Studienteilnehmerinnen signifikant (Mann - Whitney - U - Test, Rangsumme: ADHS: 362,5 / Kontrollprobanden: 232,5; U: 79,5, Z: 2.22, $p = 0,026$, N = 17). Diese statistische Signifikanz blieb auch bei Ausschluss des Extremwertes durch die Patientin mit Adipositas dritten Grades erhalten ($p = 0,04$). Für männliche ADHS - Patienten (N = 23) konnte nur ein Trend zu höheren BMI - Werten gefunden werden.

Ein signifikanter allgemeiner statistischer Unterschied im Hinblick auf den BMI in den Subgruppen für MPH - Einnahme ließ sich nicht finden (Kruskal - Wallis Test, $p > 0,05$, Daten nicht gezeigt). Auch eine Korrelation mit der kumulativen MPH - Einnahme war nicht signifikant ($r_s = 0,17$, $r_s = 0,21$ unter Ausschluss des Extremwertes, $p > 0,05$, Spearman`s Rangkorrelation).

Der BMI korrelierte positiv mit dem zytogenetischen Marker Mitose. Signifikante Korrelationen zu weiteren zytogenetischen Markern, einschließlich MK, waren nicht vorhanden (Details siehe 4.2.2).

4.4.5 Schwankungen in der Labormethode

Liegedauer der Proben

Einen Einfluss durch die Liegedauer vor der Aufarbeitung der Proben auf die Proliferation wurde beobachtet. So nahm der Anteil einkerniger Zellen mit steigender Liegedauer zu ($r_s = 0,26$), wohingegen der Anteil mehrkerniger Zellen abnahm ($r_s = - 0,33$) (Spearman`s Rangkorrelation, $p < 0,05$; Abbildung 17). Der Proliferationsindex zeigte keine signifikanten Korrelation, jedoch einen Trend zu negativen Korrelation ($r_s = - 0,21$, $p > 0,05$). Ein statistischer Zusammenhang zu anderen zytogenetischen Endpunkten fand sich nicht.

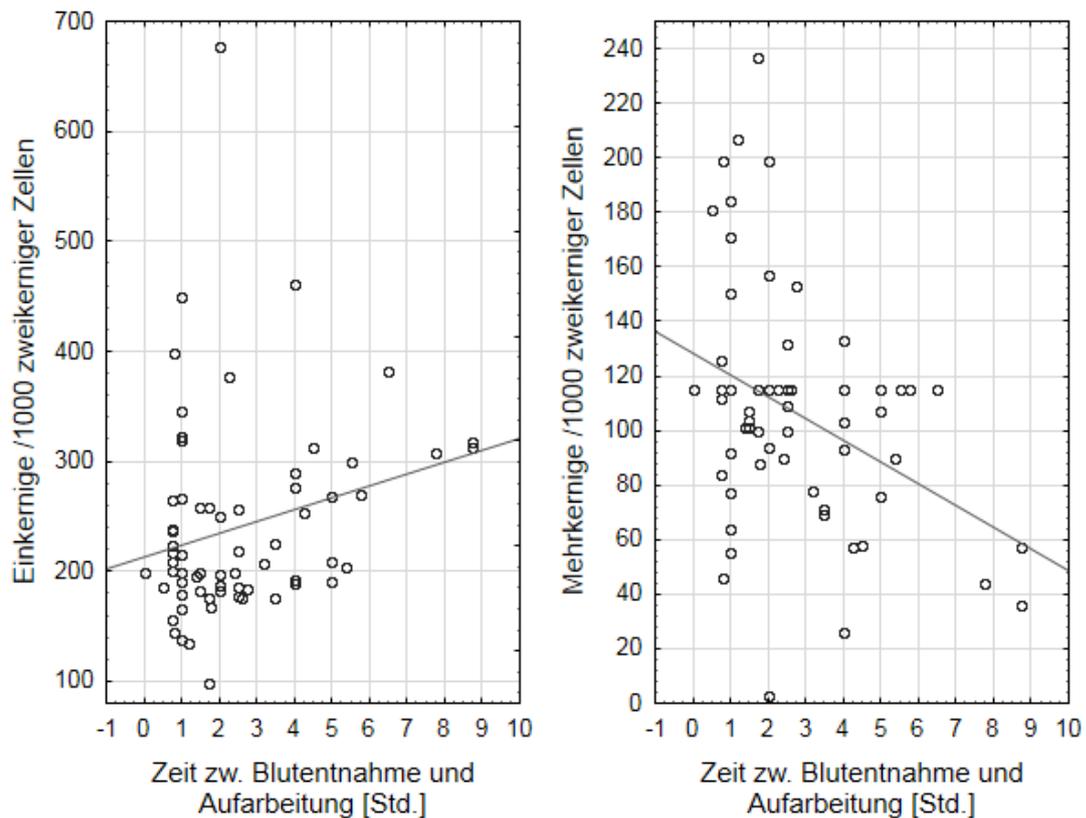


Abbildung 17 Scatterplots: für die Liegedauer der Proben vor der Aufarbeitung im Zusammenhang mit der Proliferation (Spearman`s Rangkorrelation: Einkernige $r_s = 0,26$, Mehrkernige $r_s = - 0,33$)

Einen signifikanten Gruppenunterschied zwischen Kontroll - und ADHS - Patienten (ADHS - Patienten mit und ohne Komorbidität Depression) in der Liegedauer konnte ausgeschlossen werden (Mann - Whitney - U - Test, Kruskal - Wallis Test), sodass ein direkter Einfluss der Liegedauer auf die Resultate der Studie unwahrscheinlich ist.

Reproduzierbarkeit der Ergebnisse der MK - Frequenzanalyse

Um die subjektive Auszählung der MK - Frequenzanalyse einzuschätzen und einen Anhalt für die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse zu erhalten, wurden der Standardfehler und die Standardabweichung für den Mittelwert berechnet.

Die zwei Proben mit den häufigsten Auszählungen für dieselbe Kultur wurden hierfür verwendet.

Bei 150 μ M MMS (Inkubationszeit 4 Stunden, N = 5) lag der Mittelwert bei $20,6 \pm 6,77$ (SD), $\pm 3,03$ (SEM) für 1 MK / 1000 zweikerniger Zellen. Für 2 MK / 1000 zweikerniger Zellen lag der Wert bei $0,6 \pm 0,89$ (SD), $\pm 0,4$ (SEM) und für mehr als 2 MK / 1000 zweikerniger Zellen bei $0,2 \pm 0,45$ (SD), $\pm 0,2$ (SEM). Die Anzahl an Zellen mit nicht intakten Plasmagrenzen als Marker für die Qualität der Präparate ergab die Mittelwerte $48,6 \pm 27,29$ (SD), $\pm 12,21$ (SEM).

Bei 1,5 MMC (Inkubationszeit 4 Stunden, N = 7) lag der Mittelwert für 1 MK / 1000 zweikerniger Zellen bei $48,29 \pm 7,5$ (SD), $\pm 2,83$ (SEM), für 2 MK bei $1,71 \pm 1,6$ (SD), $\pm 0,61$ (SEM) und für mehr als 2 MK bei $0,14 \pm 0,38$ (SD), $\pm 0,14$ (SEM). Die Anzahl an Zellen mit nicht intakten Plasmagrenzen ergaben die Mittelwerte $38,29 \pm 24,46$ (SD), $\pm 9,24$ (SEM) (Abbildung 18, Tabelle 33).

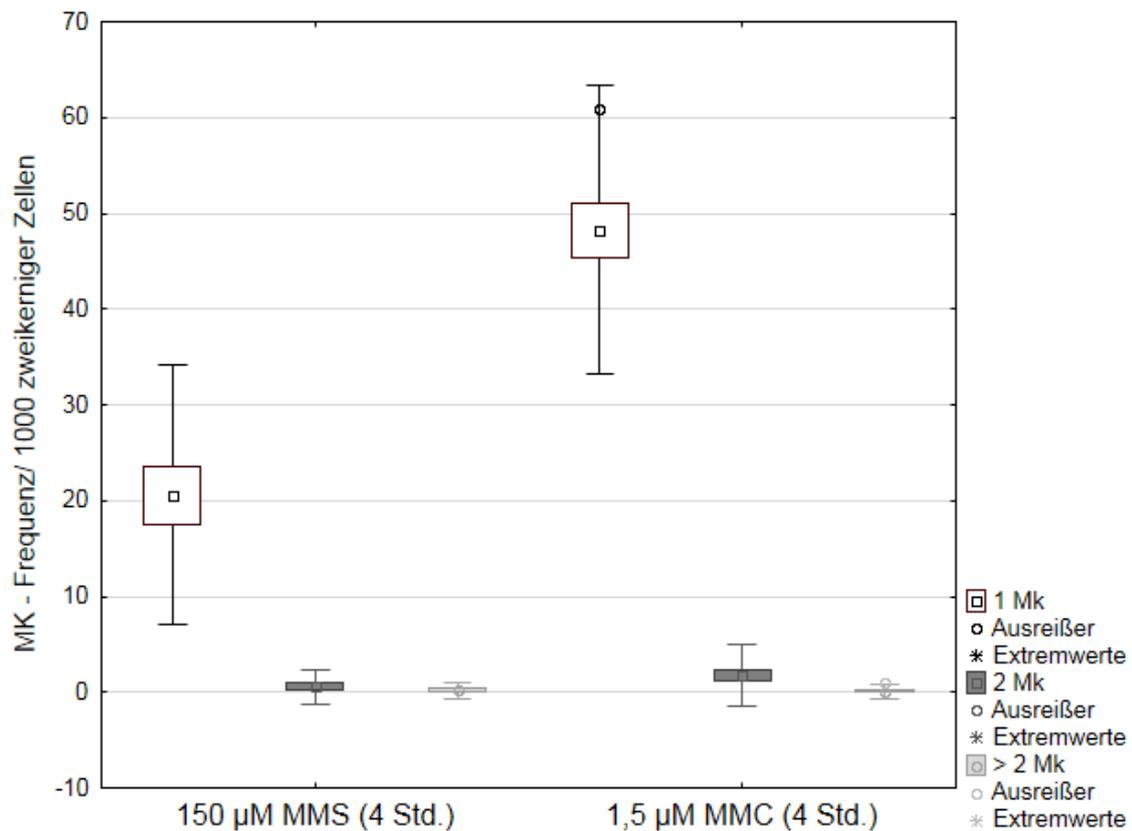


Abbildung 18 Boxplots: mit Mittelwerten, Box = Mittelwert \pm SEM und Whisker = Mittelwert \pm 2*SD der MK - Frequenzen für mehrfache Auszählungen der Positivkontrollen, MMS: N = 7, MMC: N = 5

Tabelle 33 Zusammenfassung der MK - Frequenzen / 1000 zweikerniger Zellen \pm SD des Vorexperimentes

	1,5 µM MMC (4 Std.)(N = 7)	150 µM MMS (4 Std.) (N = 5)	ADHS (N = 42)	Kontrolle (N = 28)
1 MK	48,29 \pm 7,5	20,6 \pm 6,77	17,6 \pm 5,71	16,89 \pm 4,7
2 MK	1,71 \pm 1,6	0,6 \pm 0,89	0,62 \pm 1,01	0,64 \pm 0,95
>2 MK	0,14 \pm 0,38	0,2 \pm 0,45	0,41 \pm 0,52	0,14 \pm 0,36

5 Diskussion

5.1 Hypothese 1: MPH verursacht keine MK - Frequenzerhöhung

Die MK - Frequenz unterschied sich nicht signifikant zwischen den ADHS - Patienten und den Kontrollprobanden. Es gab jedoch einen Trend zu höheren Werten bei ADHS - Patienten. MPH hatte keinen Einfluss auf die MK - Frequenz. Somit wurden in dieser Studie die Ergebnisse der meisten bereits vorhandenen Studien für MK - Frequenzanalysen bei ADHS - Patienten unter MPH - Einnahme [8] reproduziert und damit ebenfalls die Studienergebnisse von El Zein und Kollegen [6] widerlegt. Auch ein Zusammenhang von MK oder anderen zytogenetischen Ereignissen mit der Einnahmezeit oder der Dosis von MPH konnte nicht gefunden werden.

Da keine erhöhte MK - Frequenz im Zusammenhang mit der MPH - Medikation gefunden wurde, liegt folglich kein Hinweis für eine erhöhten Genotoxizität mit einem assoziierten erhöhten Krebsrisiko [65], [66], [67] durch die Medikamenteneinnahme vor.

5.2 Hypothese 2: MPH senkt das Stresslevel

5.2.1 Stressbelastung der Probanden

Die Studie zeigt, dass die Stresslevel der ADHS - Patienten in fast allen Bereichen erhöht waren. Besonders betroffen waren die Bereiche Arbeitsüberlastung und Arbeitsunzufriedenheit, vergleichbar mit den Kontrollprobanden. Desweiteren waren die sozialen Bereiche soziale Isolation und Spannungen betroffen.

Trotzdem liegen die erhöhten Werte für die Stressbereiche bei ADHS - Probanden noch im allgemeinen Durchschnitt dieser Altersgruppe.

Weiterhin zeigte die Studie, dass man bei den Patienten unterscheiden muss, ob diese unter einer zusätzlichen Depression leiden. Hier waren die Stressbereiche wesentlich höher angegeben als bei den ADHS - Patienten ohne Depression und lagen dann auch häufig über der angegebenen Altersnorm. Betroffen war dann neben der Arbeitsüberlastung und der Arbeitsüberforderung vor allem auch die Persönlichkeitseigenschaft „chronische Besorgnisneigung“. Möglicherweise liegt in diesem erfassten Stressbereich auch der Schlüssel zur Erhöhung der anderen Werte. Im Trier Inventar für chronischen Stress (TICS) wird darauf verwiesen, dass bei erhöhten Werten dieser Persönlichkeitseigenschaft auch andere Stressbereiche erhöht wahrgenommen werden können. Mit dem Stressmodell [Zimbardo] ließe sich erklären, dass besonders ADHS - Patienten mit zusätzlicher Depression nicht über adäquate Anpassungsreaktionen auf verschiedene Stimuli verfügen. Diese betreffen nach dem Modell vor allem die behaviorale und emotionale Reaktion, welche im Zusammenhang mit der Dysregulation der Emotionen [82] stehen könnten.

Es findet sich eine Interaktion der beiden Störungsbilder ADHS und Depression. Während eines der Kennzeichen der Depression auch das Grübeln bzw. die chronische Besorgnis ist, beeinflusst das wiederum die negative Wahrnehmung der anderen Bereiche des täglichen Lebens. Andersherum können auch die Kerndefizite der ADHS die Depression triggern. Da jedoch die Persönlichkeitseigenschaft im Vordergrund zu stehen scheint und mit ihr auch die subjektive Wertung der Defizite durch die ADHS, sollte in Zukunft auf die Diagnostik einer möglicherweise bestehenden Komorbidität Depression, chronisch oder rezidivierend, noch bewusster geachtet werden. Patienten, die derartige erhöhte Stresswerte aufwiesen, hatten rezidivierende Depressionen in der Vorgeschichte und keine akute depressive Phase.

5.2.2 Cortisolspiegel unter Stressbelastung

Die Morgencortisolspiegel waren bei den ADHS - Probanden dieser Studie signifikant gegenüber den Kontrollprobanden erniedrigt. Das Ergebnis reiht sich damit in den Anteil der Studienergebnisse, die einen niedrigeren Cortisolspiegel bei Kindern und Erwachsenen mit ADHS aufzeigen [48], [49]. [50]. Insgesamt bleibt die Studienlage dazu jedoch widersprüchlich.

Erklärungen für den niedrigeren Cortisolspiegel, wie eine verminderte Reaktionsfähigkeit der HPA - Achse, sind diskutiert worden. Eine solche Veränderung ist nach negativen frühen stressreichen Lebensereignissen des Kindes, auch bereits in utero bei stressreichen Erlebnissen der Mutter, als Anpassung an chronischen Stress, beobachtet worden [83], [84].

In dieser Studie ließ sich in der Gesamtgruppe, der jungen erwachsenen Studienteilnehmer, ADHS - unabhängig, ein Zusammenhang von niedrigeren Cortisolwerten mit höheren t - Werten der sozialen Spannung und sozialen Isolation finden.

Gerade diese Stressbereiche sind bei ADHS - Patienten in der vorliegenden Untersuchung signifikant chronisch erhöht. Es wäre ein Ansatzpunkt für weitere epidemiologische Studien mit einer größeren Probandenanzahl, zu untersuchen, ob diese zwei Bereiche auch die größte Auswirkung auf eine mögliche transgenerativen Entwicklung einer ADHS unter dem Einfluss der HPA - Achse der Mutter haben.

Auch ein signifikanter Cortisolabfall durch Rauchen wurde beobachtet. Möglicherweise könnte der Zusammenhang von Rauchen und einem erniedrigten Cortisolspiegel auch durch Interaktionen mit dem Immunoassay beeinflusst werden (Dr. T. Deutschbein, Universitätsklinikum Würzburg, Endokrinologie, persönliche Kommunikation).

Auch ein abfallender Cortisolspiegel bei zunehmender MPH - Einnahmezeit als Einflussfaktor auf den Cortisolspiegel wurde beobachtet. Dies war jedoch nicht dosisabhängig und auch nicht subgruppenspezifisch unter den ADHS - Patienten. Das lässt vermuten, dass kein direkter Zusammenhang vorliegt, sondern weitere Einflussfaktoren eine Rolle spielen, wie beispielsweise ein Feedbackmechanismus auf die endokrine Achse des Cortisols durch chronischen Stress.

5.2.3 Einfluss der MPH - Einnahme auf die Stresslevel

Es wurden sinkende Stresswerte in den meisten Stressbereichen mit zunehmender MPH - Einnahmedauer beobachtet. Dieser Unterschied war jedoch erst bei einer Einnahme von über einem Jahr signifikant. Die Stressreduktion war im Allgemeinen unabhängig von der Dosierung. Lediglich der t - Wert für soziale Isolation sank mit steigender Dosis.

In anderen Studien wurde bereits bestätigt, dass MPH einen positiven Einfluss auf die Aufmerksamkeit und die Hyperaktivität schon bei einmaliger Einnahme hat [4]. Die spätere signifikante Stressreduktion lässt vermuten, dass der empfundene Stress besonders durch die Folgen dieser Defizite verursacht wird, und erst eine längere Einnahme von MPH zu einer Verhaltensänderung und nachfolgender veränderter Interaktion mit dem Arbeits - und sozialem Umfeld führt. Die Annahme, dass Stressreduktion durch MPH aus der Verhaltensänderung resultiert, lässt sich auch durch die Beobachtung stützen, dass die Stressreduktion in den sozialen Bereichen besonders signifikant war.

5.3 Hypothese 3: Erhöhte chronische Stressbelastung führt zu erhöhten zytotoxischen Markern

5.3.1 Korrelationen von hohem subjektiven Stress mit zytotoxischen Markern bei ADHS mit Komorbidität Depression

Dass chronischer Stress zu einem erhöhten Krebsrisiko führt, konnte bisher nicht belegt werden [54]. Auch diese Studie kann dies nicht nachweisen.

Die Untergruppe der ADHS - Patienten mit Komorbidität Depression wies eine wesentlich höhere Stressbelastung in fast allen Bereichen im Vergleich zur durchschnittlichen Altersnorm auf.

Bei dieser Probandengruppe ließ sich eine signifikante Korrelation zum zytogenetischen Endpunkt MK mit psychosozialem Stress (soziale Isolation, soziale Spannungen), chronischem Stress und in besonderem Maße zur chronischen Besorgnisneigung finden. Jedoch gab es letztendlich keinen signifikanten Gruppenunterschied zu ADHS - Patienten ohne Depression in Bezug auf den Endpunkt MK selbst, der in Zusammenhang mit einem erhöhten Krebsrisiko steht [65], [66].

Möglicherweise steht chronischer Stress und ein erhöhtes Krebsrisiko nicht in einem linearen Zusammenhang, sondern tritt erst ab einem bestimmten erhöhten Stresswert auf. Hinweise dazu liefert auch eine prospektive Studie, die zeigt, dass hoher psychosozialer Stress im Zusammenhang mit einem höheren Risiko steht, an Krebs zu versterben [55].

Die Nichtsignifikanz im Gruppenunterschied könnte eventuell auch dem geringen Probandenanteil von 8 ADHS - Patienten mit Depression verschuldet sein.

Möglicherweise sind auch die Auswirkungen auf die MK in der Gesamtheit nicht groß genug, um ein erhöhtes Krebsrisiko hervorzurufen.

Da die Statistik nur acht Probanden mit Komorbidität Depression untersucht, sollte das Ergebnis vorsichtig interpretiert werden. Weitere Studien mit einem größeren Probandenumfang sind hier nötig, um die Ergebnisse zu bestätigen.

5.3.2 Stressabhängige Lifestylefaktoren als Krebsursache

Es wurde ein erhöhter Nikotinkonsum bei ADHS - Patienten beobachtet, was ebenfalls in Studien beschrieben ist, in denen die Probanden hinsichtlich des Bildungsstandes aneinander angepasst waren [85].

Weiterhin zeigt diese Studie eine gruppenunabhängige signifikante Korrelation der Stressbereiche mit dem Konsum von Alkohol und Zigaretten, wobei besonders die chronische Arbeitsunzufriedenheit eine starke Korrelation hierzu aufwies.

Beim Zigarettenkonsum konnte in dieser Studie keine signifikante Korrelation von der täglichen Menge und den zytogenetischen Endpunkten beobachtet werden. Die Studie von Fenech et al belegt einen statistischen Zusammenhang zu einer erhöhten MK - Anzahl erst ab einer Zigarettenanzahl pro Tag von 30 Zigaretten [60]. In dieser Studie wies nur ein einziger Proband einen Konsum von 30 Zigaretten pro Tag auf, alle anderen Probanden konsumierten weniger.

5.3.3 Veränderte Mitose und Apoptose als Risikofaktoren für die Krebsentstehung

Die Studie lieferte Hinweise, dass Gruppenunterschiede zwischen Kontrollprobanden und ADHS - Patienten in den Proliferationseigenschaften Mitose und Apoptose bestehen. Während sich die Raten, genauso wie der Proliferationsin-

dex, gemittelt in den beiden Gruppen nicht unterscheiden, fand sich eine signifikante, beinahe gegensätzliche, MPH - unabhängige Korrelation der Mitose - und Apoptoserate bei der ADHS - und Kontrollgruppe. Dies ist womöglich im Zusammenhang mit den Stressparametern zu sehen.

Bei sehr niedrigem und sehr hohem Stresswerten waren die Mitose - und Apoptoseraten niedriger als bei mittleren Stressniveaus. Da die beiden Gruppen auf zwei unterschiedlichen Polen der Stresslevel zu finden waren, die Kontrollen hatten deutlich weniger Stress als die ADHS - Patienten, vor allem mit Depression, kann diskutiert werden, ob möglicherweise ein zu viel als auch ein zu wenig an Stress einen Einfluss auf die Zellzyklusaktivität haben könnte.

Möglicherweise könnte dies über die in der Studie von in vitro beschriebenen β_2 - adrenergen Signalkaskade über das Protein Akt ablaufen. Hier wurde eine verminderte Apoptoserate bei erhöhtem Stress gefunden und dann als möglicher Faktor für ein erhöhtes Tumorrisiko diskutiert [9]. Möglicherweise wird die Mitose ebenso über dieses Protein beeinflusst [58]. Eine Korrelation der Mitose - oder Apoptoserate zu einer erhöhten MK - Frequenz wurde in dieser Studie nicht gefunden.

Die Mitose - und Apoptoseeigenschaften wurden als Marker für die Lebensfähigkeit und damit als Marker für die Qualität der Zellkultur für diese Studie bestimmt und zeigten gruppenabhängig keine Unterschiede. Der gegensätzliche Zusammenhang zu einer Anzahl der Stressparameter war ein Zufallsergebnis und nicht Gegenstand der Fragestellung dieser Studie. Das Studiendesign ist nicht geeignet, eine Aussage aus dem Ergebnis zu formulieren, bietet aber einen möglichen Ansatzpunkt für weitere Studien, die einen Zusammenhang von Zellproliferation und chronischem Stress untersuchen wollen. Hierbei sollte zukünftig berücksichtigt werden, dass auch ein über - sowie unterdurchschnittliches Ausmaß an subjektivem Stress einen Einfluss haben könnte und dies nicht unbedingt einem linearem Zusammenhang folgen muss.

6 Limitationen der Studie

Die größte Limitation dieser Studie war, dass die Probandenanzahl für die Analyse für Subgruppen nach der Medikamenteneinnahme sehr klein war und dadurch nur eingeschränkt statistische Aussagen gemacht werden können.

Die Ergebnisse zum Rauchen und zur Stressbelastung waren auch bildungsgradabhängig und zwischen ADHS - und Kontrollprobanden gab es diesbezüglich signifikante Unterschiede. Es kann somit keine klare Aussage über die Kausalität der Unterschiede in den Stressbereichen gemacht werden.

Weiterhin waren in der ADHS - Gruppe mehr Männer vertreten als in der Kontrollgruppe. Da von anderen Studien bekannt ist, dass die MK - Frequenz bei Frauen höher als bei Männern ist [60], könnte der Wert der MK in der ADHS - Gruppe möglicherweise in dieser Studie unterschätzt werden. Wobei kein signifikanter Unterschied zwischen Männern und Frauen in der vorliegenden Stichprobe hinsichtlich der MK - Frequenz zu erkennen war.

Die Erhebung der Stresslevel umfasst nur den subjektiven Stresswert, alle Ergebnisse sind im Hinblick auf das individuelle Stressempfinden zu interpretieren. Für ADHS - Patienten ist bekannt, dass die Selbsteinschätzung häufig von der Fremdeinschätzung für Stress abweicht [86], [25].

7 Zusammenfassung

Lange Zeit war ADHS auf eine neuropsychiatrische Erkrankung des Kindesalters beschränkt. ADHS besteht jedoch in bis zu 60% der Fälle in teilweiser oder voller Ausprägung auch ins Erwachsenenalter fort [1]. MPH als First - line - Therapie wird seit 2011 auch offiziell bei Erwachsenen eingesetzt.

Obwohl die gute Symptomkontrolle durch MPH belegt ist [Clinical Practice Guidelines für ADHS, 2011] werden immer noch Bedenken hinsichtlich der Wirksamkeit und Sicherheit, insbesondere auf ein erhöhtes Krebsrisiko bezogen, laut [6].

Ziel dieser Studie ist es, die Sicherheit bezüglich eines möglicherweise erhöhten Krebsrisikos auch bei jungen erwachsenen Patienten mit einer Langzeittherapie zu überprüfen.

Auch soll eine allgemeine Einschätzung zu subjektiv empfundenen Stressbereichen der Probanden gemacht werden.

Darüber hinaus soll der Einfluss von MPH auf diese subjektive Stressbelastung untersucht werden.

Das Ergebnis dieser Studie ist, dass auch bei langjährigem Einnahmezeitraum keine Hinweise für ein erhöhtes Krebsrisikos in gewichts - und symptomadaptierter Dosis gefunden werden konnten. Somit kann das Medikament MPH zur Reduktion der ADHS - Symptomatik und sekundär zur Stresssenkung auch in der Langzeittherapie aus unserer Sicht bedenkenlos eingesetzt werden was die Sicherheit in Bezug auf zellschädigende unmittelbar genotoxische Effekte angeht.

Weiterhin kann diese Studie aufzeigen, dass ADHS - Patienten tatsächlich in vielen Bereichen höhere Stresswerte als die Kontrollprobanden erzielten, die Stresswerte jedoch noch immer im Durchschnitt der Altersnorm liegen. Davon ausgenommen sind Patienten, die unter der Komorbidität Depression leiden. Hier lagen die Stresswerte deutlich über dem Altersdurchschnitt.

Eine positive Wirkung von MPH auf die subjektive Stressbelastung kann nachgewiesen werden. Im Gegensatz zu den Kernsymptomen, die durch das Medikament auch schon bei einmaliger Gabe reduziert werden können [4], werden die Stresslevel in den verschiedenen Bereichen jedoch erst ab einer Einnahmezeit von mindestens einem Jahr gesenkt, was wahrscheinlich durch die Interaktionsänderung mit anderen Menschen und im Arbeitsumfeld und damit durch die Reduktion der Kernsymptomatik zu erklären ist.

Chronischer Stress kann mit ernsthaften psychischen und physischen Schäden einhergehen [36]. Auch wenn Studien mehrheitlich ein erhöhtes Krebsrisiko bei chronischem Stress ablehnen [87], wird ein möglicher Zusammenhang dennoch weiter diskutiert [57]. Diese Studie zeigt, dass chronischer Stress nicht direkt zu Chromosomenschäden führt.

Bei subjektivem psychosozialen Stress über die Norm hinaus, besonders in den Bereichen chronische Besorgnisneigung und soziale Isolation, wie sie bei ADHS - Patienten mit Komorbidität Depression auftraten, fand sich jedoch eine signifikante positive Korrelation mit diesen Stressbereichen und den MK - Frequenzen, die wiederum mit einem erhöhten Krebsrisiko assoziiert sind [66].

Der Fokus sollte deshalb bei den folgenden Studien auf eine Einbeziehung von einem Cutoff - Wert von subjektiv gemessenem Stress liegen. Zudem sollte in Studien mit größeren Studienteilnehmerzahlen dieses Ergebnis reproduziert werden und geklärt werden, ob die dabei gefundenen Stressbereiche chronische Besorgnisneigung, soziale Isolation und Spannungen selbst für den MK - Anstieg verantwortlich sind oder ob die Komorbidität Depression pathogenetisch in diesem Zusammenhang eine Rolle spielt.

8 Abbildungs - und Tabellenverzeichnis

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 Strukturformel MPH [28]	10
Abbildung 2 Übersichtsskizze zur Fragestellung	21
Abbildung 3 Skizze des Versuchsaufbaus.....	32
Abbildung 4 Balkenplots: Frequenz 1 MK / 1000 zweikerniger Zellen nach 4 - stündiger Inkubation von Mauslymphomzellen von DMSO (Negativkontrolle), MMS und MMC (mit 18 Std. Nachinkubation zur Expression der MK), Zielbereich für MK mit gestrichelter Linie gekennzeichnet	52
Abbildung 5 Balkenplots: Frequenz 1 MK / 1000 zweikerniger Zellen unter 4 - stündiger Inkubation von Humanlymphozyten von DMSO (Negativkontrolle), MMS und MMC (mit 18 Std. Nachinkubation zur Expression der MK), Zielbereich für MK mit gestrichelter Linie gekennzeichnet	55
Abbildung 6 Balkenplots: Zusammenfassung der MK - Frequenz unter Substanzinkubation mit MMC und MMS (mit 18 Std. Nachinkubation zur Expression der MK) von Maus - und Humanlymphozyten.....	56
Abbildung 7 Scatterplot für Alter und 1 MK / 1000 zweikernige Zellen, Spearman's Rangkorrelation: $r_s = 0,26$, $p < 0,05$	59
Abbildung 8 1: Balkendiagramm: Median der Rohwerte der Stressitems.....	64
Abbildung 9 1: Balkendiagramm: Median der Rohwerte der Stressitems.....	66
Abbildung 10 Boxplots: für die zwei Blöcke hohe Anforderungen und Mangel an Bedürfnisbefriedigung in den Gruppen Kontrolle (N = 28), ADHS ohne (N = 34) und mit Komorbidität Depression (N = 8)	68

Abbildung 11 Scatterplot für kumulative MPH - Einnahmezeit und Stressitems von ADHS - Patienten ohne Depression (N = 34), Anpassung: distanzgewichtete kleinste Quadrate, Abkürzungen der Stressitems siehe 2.3.3 Tabelle 12.....	72
Abbildung 12 Scatterplots für Stressitems und Mitose sowie Apoptose / 1000 zweikerniger Zellen für alle Studienteilnehmer, Anpassung: kleinste gewichtete Quadrate, --- Mittelwerte der Stressitems für 1. Kontrolle, 2. ADHS ohne Depression, 3. ADHS mit Depression	76
Abbildung 13 Boxplots: für Speichelcortisol der Gruppen 1. ADHS (N = 35) und Kontrolle (N = 27) $p < 0,05$, 2. Nichtraucher (N = 32) und Raucher (N = 30) ...	77
Abbildung 14 Boxplots: Anzahl der Zigaretten / Tag bei den Gruppen ADHS (N = 27), Kontrolle (N = 27) und ADHS mit Depression (N = 8). $P < 0,005$ für ADHS / Kontrolle	78
Abbildung 15 Boxplots: 1. Nichtraucher: Cortisolspiegel bei Kontrollen (N = 22), ADHS - Patienten ohne (N = 13)und mit Depression (N = 1), $p < 0,05$ für alle der Gruppen.....	80
Abbildung 16 Boxplots: Cortisolspiegel bei ADHS (nach MPH - Einnahme, 1: N = 7, 2: N = 4, 3: N = 12, 4: N = 12, 5: N = 7) und Kontrollen (6: N = 28).....	82
Abbildung 17 Scatterplots: für die Liegedauer der Proben vor der Aufarbeitung im Zusammenhang mit der Proliferation (Spearman`s Rangkorrelation: Einkernige $r_s = 0,26$, Mehrkernige $r_s = - 0,33$)	90
Abbildung 18 Boxplots: mit Mittelwerten, Box = Mittelwert \pm SEM und Whisker = Mittelwert $\pm 2*SD$ der MK - Frequenzen für mehrfache Auszählungen der Positivkontrollen, MMS: N = 7, MMC: N = 5	92

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 Subtypen von ADHS bzw. der hyperkinetischen Störung	3
Tabelle 2 Klassifikationskriterien nach DSM - IV	4
Tabelle 3 Übersicht über die häufigsten Komorbiditäten des adulten ADHS[26]	8
Tabelle 4 Gruppeneinteilung der Studienteilnehmer nach der Dauer der Methylphenidateinnahme	23
Tabelle 5 Übersicht zur aktuellen Medikamenteneinnahme in den Gruppen Kontrollen und ADHS	24
Tabelle 6 Übersicht zum Drogenkonsum in den Gruppen Kontrollen und ADHS - Patienten	25
Tabelle 7 verwendete Chemikalien	27
Tabelle 8 verwendete Geräte	29
Tabelle 9 sonstiges verwendetes Material	30
Tabelle 10 verwendete Software	31
Tabelle 11 Zusammenfassung weiterer zytogenetischer Endpunkte	40
Tabelle 12: Abkürzung und Bedeutung der 12 Bereiche der TICS - Items	46
Tabelle 13 Proliferation der Mauslymphomzellen (in %) unter 4 - stündiger Substanzinkubation mit MMC, MMS und DMSO (Negativkontrolle), CPBI = (Einkernige + 2*Zweikernige + 3*Mehrkernige) / (Einkernige + Zweikernige + Mehrkernige)	50
Tabelle 14 Zytogenetische Ereignisse in Mauslymphomzellen (in %) unter 4 - stündiger Substanzinkubation mit MMC, MMS und DMSO (Negativkontrolle) .	51
Tabelle 15 Zytogenetische Ereignisse in Humanlymphozyten (in %) unter Substanzinkubation mit MMC und MMS, CPBI = (Einkernige + 2*Zweikernige + 3*Mehrkernige) / (Einkernige + Zweikernige + Mehrkernige)	53
Tabelle 16 Zytogenetische Ereignisse in Humanlymphozyten (in %) unter Substanzinkubation mit MMC und MMS	54
Tabelle 17 deskriptive Statistik der zytogenetischen Ereignisse für die Gruppen ADHS (N = 42) und Kontrollen (N = 28)	60

Tabelle 18 Spearman's Rangkorrelation r_s , für CPBI und Proliferationsereignisse in ADHS - Patienten (N = 42), Kontrollen (N = 28) und Gesamtheit (N = 70), alle Ereignisse $p < 0,05$, außer für Apoptose	61
Tabelle 19 Spearman's Rangkorrelation zwischen MPH - Therapie (Dauer und Dosis) und allen zytogenetischen Endpunkten, für alle r_s $p > 0,05$, N = 37	62
Tabelle 20 Kolmogorov - Smirnov - Test: Stressitems (t - Werte) in den Gruppen ADHS mit Komorbidität Depression (N = 8) und Kontrolle (N = 28), alle $p < 0,05$, außer ERDR, max .pos. Differenz für alle Tests = 0, Abkürzungen der Stressitems siehe 2.3.3 Tabelle 12	65
Tabelle 21 Kolmogorov - Smirnov - Test: Stressitems (t - Werte) in den Gruppen ADHS mit (N = 8) und ohne (N = 34) Komorbidität, markierte Tests für $p < 0,05$, Abkürzungen der Stressitems siehe 2.3.3 Tabelle 12	67
Tabelle 22 Kolmogorov - Smirnov - Test: Gruppenvergleich für Stressitems zwischen ADHS - Patienten (MPH 0 - 1,5 Monate, N = 9) und Kontrollprobanden (N = 28), Ausschluss von ADHS - Patienten mit Komorbidität Depression, *markierte Tests für $p < 0,05$, Abkürzungen der Stressitems siehe 2.3.3 Tabelle 12.....	69
Tabelle 23 Kolmogorov - Smirnov - Test: Gruppenvergleich für Stressitems zwischen ADHS - Patienten (MPH 1,5 - 11,5 Monate, N = 5) und Kontrollprobanden (N = 28), Ausschluss von ADHS - Patienten mit Komorbidität Depression, * markierte Tests für $p < 0,05$, Abkürzungen der Stressitems siehe 2.3.3 Tabelle 12.....	69
Tabelle 24 Spearman's Rangkorrelation der kumulativen MPH - Therapie und Stressbereiche bei ADHS-Patienten, * markierte Korrelationen für $p < 0,05$, N = 37, Abkürzungen der Stressitems siehe 2.3.3 Tabelle 12	70
Tabelle 25 Spearman's Rangkorrelation: Stressitems mit Zellen mit MK / 1000 Zellen der Gruppe ADHS mit Komorbidität Depression (N = 8), Abkürzungen der Stressitems siehe 2.3.3 Tabelle 12	73
Tabelle 26 Spearman's Rangkorrelation: Einfluss von psychosozialen Stress auf Raten der Mitose, Apoptose und CPBI bei ADHS - Patienten ohne Komorbidität Depression (N = 34) und Kontrollen (N = 28), *markierte	

Korrelationskoeffizienten für $p < 0,05$, Abkürzungen der Stressitems siehe 2.3.3 Tabelle 12.....	75
Tabelle 27 Kolmogorov - Smirnov - Test von Nichtrauchern (NR) / Rauchern (R) für den Cortisolspiegel innerhalb der Gruppen ADHS ohne (N = 9 / 18) und mit Depression (N = 1 / 7) und Kontrollen (N = 22 / 5), mit * markierte Tests signifikant, $p < 0,05$	79
Tabelle 28 Kolmogorov - Smirnov - Test für signifikante Stressitems (t - Werte) in den Gruppen Ausbildung (N = 30) und Universität (N = 39) bei ADHS - und Kontrollprobanden, alle Tests für $p < 0,05$, Abkürzungen der Stressitems siehe 2.3.3 Tabelle 12.....	84
Tabelle 29 Mann - Whitney - U - Test für die Bildungsniveaus Gesamtschule / Ausbildung ((1), N = 30) und Gymnasium / Universität ((2), N = 39) in allen Gruppen, * markierte Tests signifikant für $p < 0,05$	85
Tabelle 30 Mann - Whitney - U - Test für die Bildungsniveaus Gesamtschule / Ausbildung ((1), N = 26) und Gymnasium / Universität ((2), N = 15) in der ADHS - Gruppe (1, N = 26), (2), N = 15), * markierte Tests für $p < 0,05$	86
Tabelle 31 Mann - Whitney - U - Test für die Bildungsniveaus Gesamtschule / Ausbildung ((1), N = 4) und Gymnasium / Universität ((2), N = 24) in der Kontrollgruppe (1, N = 26), (2), N = 15), * markierte Tests für $p < 0,05$	87
Tabelle 32 Spearman`s Rangkorrelation für t - Werte der Stressbereiche und Zigaretten / Tag (N = 66), für alle Tests signifikant, $p < 0,05$, Abkürzungen der Stressitems siehe 2.3.3 Tabelle 12	88

9 Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildungen
ADHS	Aufmerksamkeitsdefizit-Hyperaktivitäts-Syndrom
ADS	Aufmerksamkeitsdefizit-Syndrom
AG	Arbeitsgemeinschaft
BMI	Body Mass Index (= [Körpergewicht in kg] / [Körperlänge in m x Körperlänge in m])
CAARS	Conners' Adult ADHD Rating Scales (Fremdbeurteilungsbogen nach Conners`)
CPBI	cytokinesis-block-proliferations index
DABCO	1,4-diazabicyclo[2.2.2]octane
DSM	Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNS, DNA	Desoxynucleinsäure, Desoxynukleinacid
ERDR	Erfolgsdruck
KCl	Kaliumchlorid
MTA	Medizinisch - technische Assistentin
MANG	Mangel an sozialer Anerkennung
Min.	Minute
Mini-DIPS	Diagnostisches Kurz-Interview bei psychischen Störungen
MK	Mikrokerne
MMC	Mitomycin C
MMS	Methylmethansulfonat

Moly	Mauslymphozyten
MPH	Methylphenidat
Na ₂ HPO ₄	di-Natriumhydrogenphosphat
NaCl	Natriumchlorid
NBUDs	Nuclear buds
NPBs	nucleoplasmic bridges
PBS	Phosphate buffered saline/ Phosphatgepufferte Salzlösung
PHA, PHA-M	Phytohämagglutinin
r _s	Spearman`s Rangkorrelationskoeffizient
Rpm	Revolutions per minute = Umdrehungen pro Minute
SCID-I	Structured Clinical Interview for DSM Disorders
SD	Standard deviation = Standardabweichung
SEM.	Standard Error of the Mean = Standardabweichung
SORG	Chronische Besorgnis
SOUE	Soziale Überlastung
SOZI	Soziale Isolation
SOZS	Soziale Spannungen
SSCS	Screening-Skala zum chronischen Stress
TICS	Trier Inventar zum chronischen Stress
UEBE	Arbeitsüberlastung
UEFO	Überforderung bei der Arbeit
UNZU	Arbeitsunzufriedenheit
WURS	Wender Utah Rating Scale

10 Literaturverzeichnis

1. Willcutt, E.G., *The prevalence of DSM-IV attention-deficit/hyperactivity disorder: a meta-analytic review*. Neurotherapeutics, 2012. **9**(3): p. 490-9.
2. Polanczyk, G.V., et al., *ADHD prevalence estimates across three decades: an updated systematic review and meta-regression analysis*. Int J Epidemiol, 2014. **43**(2): p. 434-42.
3. Coghill, D.R., et al., *Effects of Methylphenidate on Cognitive Functions in Children and Adolescents with Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder: Evidence from a Systematic Review and a Meta-Analysis*. Biol Psychiatry, 2013.
4. Volkow, N.D., et al., *Methylphenidate-elicited dopamine increases in ventral striatum are associated with long-term symptom improvement in adults with attention deficit hyperactivity disorder*. J Neurosci, 2012. **32**(3): p. 841-9.
5. Lichtenstein, P., et al., *Medication for attention deficit-hyperactivity disorder and criminality*. N Engl J Med, 2012. **367**(21): p. 2006-14.
6. El-Zein, R.A., et al., *Cytogenetic effects in children treated with methylphenidate*. Cancer Lett, 2005. **230**(2): p. 284-91.
7. Walitza, S., et al., *No elevated genomic damage in children and adolescents with attention deficit/hyperactivity disorder after methylphenidate therapy*. Toxicol Lett, 2009. **184**(1): p. 38-43.
8. Walitza, S., et al., *Prospective follow-up studies found no chromosomal mutagenicity of methylphenidate therapy in ADHD affected children*. Toxicol Lett, 2010. **193**(1): p. 4-8.
9. Hara, M.R., et al., *A stress response pathway regulates DNA damage through beta2-adrenoreceptors and beta-arrestin-1*. Nature, 2011. **477**(7364): p. 349-53.
10. Association, A.-A.P., ed. *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders - DSM-IV-TR 4th ed*. Washington DC: American Psychiatric Association. 2000, APA - American Psychiatric Association
11. Stewart, A. and L. Liljequist, *Specificity of the CAARS in Discriminating ADHD Symptoms in Adults From Other Axis I Symptoms*. J Atten Disord, 2012.
12. Bale, T.L., *Lifetime stress experience: transgenerational epigenetics and germ cell programming*. Dialogues Clin Neurosci, 2014. **16**(3): p. 297-305.
13. Hawi, Z., et al., *The molecular genetic architecture of attention deficit hyperactivity disorder*. Mol Psychiatry, 2015. **20**(3): p. 289-97.
14. Franke, B., et al., *The genetics of attention deficit/hyperactivity disorder in adults, a review*. Mol Psychiatry, 2012. **17**(10): p. 960-87.
15. Neale, B.M., et al., *Meta-analysis of genome-wide association studies of attention-deficit/hyperactivity disorder*. J Am Acad Child Adolesc Psychiatry, 2010. **49**(9): p. 884-97.
16. Jarick, I., et al., *Genome-wide analysis of rare copy number variations reveals PARK2 as a candidate gene for attention-deficit/hyperactivity disorder*. Mol Psychiatry, 2014. **19**(1): p. 115-21.

17. Lesch, K.P., et al., *Genome-wide copy number variation analysis in attention-deficit/hyperactivity disorder: association with neuropeptide Y gene dosage in an extended pedigree*. Mol Psychiatry, 2011. **16**(5): p. 491-503.
18. Ronald, A., C.E. Pennell, and A.J. Whitehouse, *Prenatal Maternal Stress Associated with ADHD and Autistic Traits in early Childhood*. Front Psychol, 2010. **1**: p. 223.
19. Silva, D., et al., *Environmental risk factors by gender associated with attention-deficit/hyperactivity disorder*. Pediatrics, 2014. **133**(1): p. e14-22.
20. Park, S., et al., *Interactions Between Early Trauma and Catechol-O-Methyltransferase Genes on Inhibitory Deficits in Children With ADHD*. J Atten Disord, 2014.
21. Modesto-Lowe, V., J.S. Danforth, and D. Brooks, *ADHD: does parenting style matter?* Clin Pediatr (Phila), 2008. **47**(9): p. 865-72.
22. Jacob, C.P., et al., *Sex- and Subtype-Related Differences of Personality Disorders (Axis II) and Personality Traits in Persistent ADHD*. J Atten Disord, 2014.
23. Friedrichs, B., et al., *Coexisting psychiatric problems and stressful life events in adults with symptoms of ADHD--a large Swedish population-based study of twins*. J Atten Disord, 2012. **16**(1): p. 13-22.
24. Das, D., et al., *A population-based study of attention deficit/hyperactivity disorder symptoms and associated impairment in middle-aged adults*. PLoS One, 2012. **7**(2): p. e31500.
25. Oncu, B., et al., *Symptoms defined by parents' and teachers' ratings in attention-deficit hyperactivity disorder: changes with age*. Can J Psychiatry, 2004. **49**(7): p. 487-91.
26. Retz, M.R.u.W., *Diagnosis, differential diagnosis and comorbidity in adult ADHD*. Psychotherapie 13. Jahrg. 2008, Bd. 13, Heft 2 © CIP-Medien, München, 2008: p. S. 175-183.
27. Moriyama, T.S., et al., *Psychopharmacology and psychotherapy for the treatment of adults with ADHD-a systematic review of available meta-analyses*. CNS Spectr, 2013. **18**(6): p. 296-306.
28. Kim, D.I., et al., *Synthesis and pharmacology of site-specific cocaine abuse treatment agents: restricted rotation analogues of methylphenidate*. J Med Chem, 2007. **50**(11): p. 2718-31.
29. <Gerlach_B5-1 dopamintransport mph.pdf>.
30. Buitelaar, J.K., et al., *Functional improvement and correlations with symptomatic improvement in adults with attention deficit hyperactivity disorder receiving long-acting methylphenidate*. Psychol Med, 2012. **42**(1): p. 195-204.
31. S. Walitza, M.R., J. Seifert, A. Warnke, M. Gerlach, *B.5 Psychostimulanzien*, in *Neuro-Psychopharmaka im Kindes - und Jugendalter, Grundlagen und Therapie*. 2009, Springer Verlag, Wien New York: Wien. p. 575.
32. Wender, P.H., et al., *A one year trial of methylphenidate in the treatment of ADHD*. J Atten Disord, 2011. **15**(1): p. 36-45.
33. Gwartz, P.A., *Teaching the interrelationship between stress, emotions, and cardiovascular risk using a classic paper by Walter Cannon*. Adv Physiol Educ, 2008. **32**(1): p. 18-22.

34. *Abstracts of the Hans Selye Symposium on Neuroendocrinology and Stress. September 13-15, 1989, Esterel, Quebec, Canada. Neuroendocrine aspects of gastrointestinal (GI) ulceration.* Dig Dis Sci, 1989. **34**(8): p. 1311-23.
35. Szabo, S., Y. Tache, and A. Somogyi, *The legacy of Hans Selye and the origins of stress research: a retrospective 75 years after his landmark brief "letter" to the editor# of nature.* Stress, 2012. **15**(5): p. 472-8.
36. Brod, M., et al., *ADHD burden of illness in older adults: a life course perspective.* Qual Life Res, 2012. **21**(5): p. 795-9.
37. Wilson, C.B., et al., *Predator exposure/psychosocial stress animal model of post-traumatic stress disorder modulates neurotransmitters in the rat hippocampus and prefrontal cortex.* PLoS One, 2014. **9**(2): p. e89104.
38. Hellhammer, D.H., S. Wust, and B.M. Kudielka, *Salivary cortisol as a biomarker in stress research.* Psychoneuroendocrinology, 2009. **34**(2): p. 163-71.
39. Vining, R.F., et al., *Salivary cortisol: a better measure of adrenal cortical function than serum cortisol.* Ann Clin Biochem, 1983. **20** (Pt 6): p. 329-35.
40. Miller, G.E., E. Chen, and E.S. Zhou, *If it goes up, must it come down? Chronic stress and the hypothalamic-pituitary-adrenocortical axis in humans.* Psychol Bull, 2007. **133**(1): p. 25-45.
41. Gonzalez-Cabrera, J., et al., *Acute and chronic stress increase salivary cortisol: a study in the real-life setting of a national examination undertaken by medical graduates.* Stress, 2014. **17**(2): p. 149-56.
42. Van den Berghe, G. and F. de Zegher, *Anterior pituitary function during critical illness and dopamine treatment.* Crit Care Med, 1996. **24**(9): p. 1580-90.
43. Chen, Y.H., et al., *The change of the cortisol levels in children with ADHD treated by methylphenidate or atomoxetine.* J Psychiatr Res, 2012. **46**(3): p. 415-6.
44. Chamberlain, S.R., et al., *Atomoxetine increases salivary cortisol in healthy volunteers.* J Psychopharmacol, 2007. **21**(5): p. 545-9.
45. Burke, A.R. and K.A. Miczek, *Stress in adolescence and drugs of abuse in rodent models: role of dopamine, CRF, and HPA axis.* Psychopharmacology (Berl), 2014. **231**(8): p. 1557-80.
46. Pesonen, A.K., et al., *Symptoms of attention deficit hyperactivity disorder in children are associated with cortisol responses to psychosocial stress but not with daily cortisol levels.* J Psychiatr Res, 2011. **45**(11): p. 1471-6.
47. Hirvikoski, T., et al., *High self-perceived stress and many stressors, but normal diurnal cortisol rhythm, in adults with ADHD (attention-deficit/hyperactivity disorder).* Horm Behav, 2009. **55**(3): p. 418-24.
48. van West, D., S. Claes, and D. Deboutte, *Differences in hypothalamic-pituitary-adrenal axis functioning among children with ADHD predominantly inattentive and combined types.* Eur Child Adolesc Psychiatry, 2009. **18**(9): p. 543-53.
49. Randazzo, W.T., S. Dockray, and E.J. Susman, *The stress response in adolescents with inattentive type ADHD symptoms.* Child Psychiatry Hum Dev, 2008. **39**(1): p. 27-38.
50. Corominas, M., et al., *Cortisol responses in children and adults with attention deficit hyperactivity disorder (ADHD): a possible marker of inhibition deficits.* Atten Defic Hyperact Disord, 2012. **4**(2): p. 63-75.

51. Kleinsasser, N.H., et al., *DNA repair capacity in lymphocytes of nasopharyngeal cancer patients*. Eur Arch Otorhinolaryngol, 2005. **262**(7): p. 561-6.
52. Sherman, B., et al., *Further studies of the effects of inhaled glucocorticoids on pituitary-adrenal function in healthy adults*. J Allergy Clin Immunol, 1982. **69**(2): p. 208-12.
53. Cole, S.W., S.P. Mendoza, and J.P. Capitanio, *Social stress desensitizes lymphocytes to regulation by endogenous glucocorticoids: insights from in vivo cell trafficking dynamics in rhesus macaques*. Psychosom Med, 2009. **71**(6): p. 591-7.
54. Stanley, P.L., et al., *Mouse skin inflammation induced by multiple topical applications of 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate*. Skin Pharmacol, 1991. **4**(4): p. 262-71.
55. Bowler, R.M., et al., *Psychological, psychosocial, and psychophysiological sequelae in a community affected by a railroad chemical disaster*. J Trauma Stress, 1994. **7**(4): p. 601-24.
56. Beatty, L.J., et al., *A randomised controlled trial to evaluate the effects of a self-help workbook intervention on distress, coping and quality of life after breast cancer diagnosis*. Med J Aust, 2010. **193**(5 Suppl): p. S68-73.
57. Moreno-Smith, M., S.K. Lutgendorf, and A.K. Sood, *Impact of stress on cancer metastasis*. Future Oncol, 2010. **6**(12): p. 1863-81.
58. Emamian, E.S., *AKT/GSK3 signaling pathway and schizophrenia*. Front Mol Neurosci, 2012. **5**: p. 33.
59. Speit, G., J. Zeller, and S. Neuss, *The in vivo or ex vivo origin of micronuclei measured in human biomonitoring studies*. Mutagenesis, 2011. **26**(1): p. 107-10.
60. Fenech, M. and S. Bonassi, *The effect of age, gender, diet and lifestyle on DNA damage measured using micronucleus frequency in human peripheral blood lymphocytes*. Mutagenesis, 2011. **26**(1): p. 43-9.
61. Huang, P., et al., *Effects of lifestyle on micronuclei frequency in human lymphocytes in Japanese hard-metal workers*. Prev Med, 2009. **48**(4): p. 383-8.
62. Alvarenga, T.A., et al., *Single exposure to cocaine or ecstasy induces DNA damage in brain and other organs of mice*. Addict Biol, 2010. **15**(1): p. 96-9.
63. Sari-Minodier, I., et al., *Cytogenetic monitoring by use of the micronucleus assay among hospital workers exposed to low doses of ionizing radiation*. Mutat Res, 2007. **629**(2): p. 111-21.
64. Milkovic, D., et al., *Primary DNA damage assessed with the comet assay and comparison to the absorbed dose of diagnostic X-rays in children*. Int J Toxicol, 2009. **28**(5): p. 405-16.
65. Fenech, M., *Cytokinesis-block micronucleus cytome assay*. Nat Protoc, 2007. **2**(5): p. 1084-104.
66. Bhatia, A. and Y. Kumar, *Cancer cell micronucleus: an update on clinical and diagnostic applications*. APMIS, 2012.
67. Bonassi, S., et al., *Micronuclei frequency in peripheral blood lymphocytes and cancer risk: evidence from human studies*. Mutagenesis, 2011. **26**(1): p. 93-100.
68. Cazier, J.B.a.T., I., *General lessons from large-scale studies to identify human cancer predisposition genes*. J. Pathol., 220, 255–262, 2010.

69. Beule, A.G., et al., *Effects of a dexamethasone-releasing stent on osteoneogenesis in a rabbit model*. Am J Rhinol Allergy, 2009. **23**(4): p. 433-6.
70. Christiansen, H., et al., *German validation of the Conners Adult ADHD Rating Scales (CAARS) II: reliability, validity, diagnostic sensitivity and specificity*. Eur Psychiatry, 2012. **27**(5): p. 321-8.
71. Retz-Junginger, P., et al., [*Wender Utah rating scale. The short-version for the assessment of the attention-deficit hyperactivity disorder in adults*]. Nervenarzt, 2002. **73**(9): p. 830-8.
72. Walitza, S., et al., *Does methylphenidate cause a cytogenetic effect in children with attention deficit hyperactivity disorder?* Environ Health Perspect, 2007. **115**(6): p. 936-40.
73. Saito, H., et al., *Malnutrition induces dissociated changes in lymphocyte count and subset proportion in patients with anorexia nervosa*. Int J Eat Disord, 2007. **40**(6): p. 575-9.
74. Hutter, G., S. Ganepola, and W.K. Hofmann, *The hematology of anorexia nervosa*. Int J Eat Disord, 2009. **42**(4): p. 293-300.
75. Markgraf, J. Diagnostisches Kurzinterview bei psychischen Störungen: Mini - DIPS. Berlin Heidelberg New York: Springer Verlag 1994
76. Lundin, C., et al., *Methyl methanesulfonate (MMS) produces heat-labile DNA damage but no detectable in vivo DNA double-strand breaks*. Nucleic Acids Res, 2005. **33**(12): p. 3799-811.
77. Andreoli, C., et al., *Processing of DNA damage induced by hydrogen peroxide and methyl methanesulfonate in human lymphocytes: analysis by alkaline single cell gel electrophoresis and cytogenetic methods*. Mutagenesis, 1999. **14**(5): p. 497-504.
78. Speit, G., et al., *Insensitivity of the in vitro cytokinesis-block micronucleus assay with human lymphocytes for the detection of DNA damage present at the start of the cell culture*. Mutagenesis, 2012. **27**(6): p. 743-7.
79. Benning, V., et al., *Detection of micronuclei after exposure to mitomycin C, cyclophosphamide and diethylnitrosamine by the in vivo micronucleus test in mouse splenocytes*. Mutat Res, 1992. **280**(2): p. 137-42.
80. Bonassi, S., et al., *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, 2001. **37**(1): p. 31-45.
81. Wust, S., et al., *Genetic factors, perceived chronic stress, and the free cortisol response to awakening*. Psychoneuroendocrinology, 2000. **25**(7): p. 707-20.
82. Sjowall, D., et al., *Multiple deficits in ADHD: executive dysfunction, delay aversion, reaction time variability, and emotional deficits*. J Child Psychol Psychiatry, 2013. **54**(6): p. 619-27.
83. Juruena, M.F., et al., *Early life stress in depressive patients: role of glucocorticoid and mineralocorticoid receptors and of hypothalamic-pituitary-adrenal axis activity*. Curr Pharm Des, 2015. **21**(11): p. 1369-78.
84. Bjorntorp, P., G. Holm, and R. Rosmond, *Hypothalamic arousal, insulin resistance and Type 2 diabetes mellitus*. Diabet Med, 1999. **16**(5): p. 373-83.

85. Upadhyaya, H.P. and M.J. Carpenter, *Is attention deficit hyperactivity disorder (ADHD) symptom severity associated with tobacco use?* Am J Addict, 2008. **17**(3): p. 195-8.
86. Hoza, B., et al., *Do boys with attention-deficit/hyperactivity disorder have positive illusory self-concepts?* J Abnorm Psychol, 2002. **111**(2): p. 268-78.
87. Schraub, S., H. Sancho-Garnier, and M. Velten, *[Should psychological events be considered cancer risk factors?]*. Rev Epidemiol Sante Publique, 2009. **57**(2): p. 113-23.

Danksagung

Ich möchte mich bei Frau Prof. H. Stopper, Universität Würzburg, Lehrstuhl für Toxikologie, und Priv. Doz. Dr. C. Jacob, ehemals Universität Würzburg, Klinik und Poliklinik für Psychiatrie, Psychosomatik und Psychotherapie, jetzt Kreiskliniken Esslingen, Klinikum Kirchheim - Nürtingen, Klinik für Psychiatrie und Psychotherapie Nürtingen, für die Überlassung des Themas und die Betreuung der Arbeit herzlich bedanken.

Danken möchte ich auch Frau Dr. S. Kittel - Schneider, Universität Frankfurt, für ihre konstante Ansprechbarkeit und schnelle Rückmeldung bei Fragen und für ihre Anregungen zu Aspekten in der Arbeit.

Herrn Prof. C. Kirschbaum, Institut für Biopsychologie, Universität Dresden danke ich für die Analyse des Speichelcortisols.

Weiterhin danke ich T. Töpner, Universität Würzburg, Klinik und Poliklinik für Psychiatrie, Psychosomatik und Psychotherapie, und I. Richter, Universität Würzburg, Institut für Toxikologie, für ihre exzellente technische Assistenz und I. Richter für ihre wertvollen methodischen Tipps.

Herzlichen Dank gilt auch S. Hermann für die Anregungen und Tipps im Besonderen in der Diskussion für meine Arbeit.

Lebenslauf

Zu meiner Person:

Name: Silvana Spiegel
Geburtsdatum: 31.12.1984
Geburtsort: Oranienburg

Ausbildungen:

04.2009 - 05.2015 Studium der Humanmedizin an der Julius - Maximilians - Universität Würzburg

09.2005 - 08.2008 Ausbildung zur Gesundheits - und Krankenpflegerin im Stift Bethlehem gGmbH, Ludwigslust

Arbeitserfahrungen:

08.2016 Beginn als Assistenzärztin zur Weiterbildung der Inneren Medizin im Dietrich - Bonhoeffer - Klinikum Neubrandenburg

08.2015 - 07.2016 Assistenzärztin zur Weiterbildung der Allgemeinmedizin im Katholischen Karl - Leisner - Klinikum Kleve