

Akut- und Langzeiteffekte von
3,4-Methylenedioxyamphetamin
(MDMA, „Ecstasy“) in Tiermodellen der
Sucht und Neurotoxizität.

Dissertation

der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der Eberhard-Karls-Universität Tübingen

zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften

2002

vorgelegt von
Andreas Mayerhofer

Tag der mündlichen Prüfung:

20.06.2002

Dekan:

Prof. Dr. Hansgeorg Probst

Erster Berichterstatter:

Prof. Dr. Werner J. Schmidt

Zweiter Berichterstatter:

Prof. Dr. Karl-Artur Kovar

III

Die vorliegende Arbeit wurde unter der Leitung von Prof. Dr. Werner J. Schmidt in der Zeit von Juni 1997 bis Mai 2002 am Zoologischen Institut der Eberhard-Karls-Universität Tübingen, Abteilung Neuropharmakologie angefertigt.

Ich möchte mich ganz herzlich bei meinen Doktorvätern Prof. Dr. Werner J. Schmidt und Prof. Dr. Karl-Artur Kovar für die freundliche Überlassung des Themas, viele anregende Diskussionen und die sehr nette Betreuung während der Durchführung dieser Arbeit bedanken.

Frau Dr. Beate Zadow möchte ich danken für die vielen Hilfestellungen und die Unterstützung während der ersten Phase der Arbeit und die nette und freundschaftliche Atmosphäre. Herrn Dr. Jochen Büchler 1000 Dank für die Hilfestellung bei der Synthese von MDMA. Bei Herrn PD Dr. Enck und Frau Schröder (Viktor von Bruns Laboratorien, Universitätsklinikum Tübingen) möchte ich mich für die Benutzungserlaubnis und überaus bereitwillige Unterstützung bei der mikroskopischen Auswertung bedanken. Bei Dr. Svante Ross und Dr. Carina Stenfors (Astra Zeneca, Schweden) möchte ich mich ferner für die freundliche und unbürokratische Überlassung von DSP-4 bedanken.

Der Abteilung Neuropharmakologie tausend Dank für die erstklassige und wirklich einmalige Arbeitsatmosphäre mitsamt der unzähligen Diskussionen, witzigen Grillfesten und entspannenden Abenden in der malerischen Mohlstraße. Ebenfalls ein Dank an den AK Kovar für die unvergesslichen Abende während der Nomenklaturseminare in Oberjoch. Lachen ist doch noch die beste Medizin!

Ein ganz besonderer Dank gilt Isabel für die intensive Korrekturarbeit, für viel Geduld und Aufbauarbeit bei der Entstehung dieser Arbeit und für ihren Glauben an mich, meinen Eltern, die mir das Studium der Pharmazie und die Promotion überhaupt ermöglicht haben, sowie meinen Freunden für ihre Treue und die klasse Ablenkung zur richtigen Zeit.

Nicht zuletzt möchte ich mich bei der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG) bedanken für die finanzielle Unterstützung während der Arbeit in Form eines Stipendiums des Graduiertenkollegs Neurobiologie (GKN), welches ebenfalls in hohem Maße zur Erweiterung meines neurobiologischen Horizonts beigetragen hat. Dem Land Baden Württemberg danke ich für die Förderung innerhalb des Forschungsschwerpunkts Suchtforschung Tübingen (Teilprojekt B7).

Teile dieser Arbeit wurden bereits veröffentlicht bzw. sind eingereicht zur Publikation:

Abstracts

Mayerhofer, A.; Zadow, B.; Gündisch, D.; Kovar, K.-A. & Schmidt, W.J. (1998)
Immunohistochemical analysis of the effects following acute and chronic injection of 3,4-Methylenedioxyamphetamine (MDMA, „Ecstasy“) in rats. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* **358**[Suppl 1], R62

Mayerhofer, A.; Zadow, B.; Kovar, K.-A. & Schmidt, W.J. (1999)
The immunohistochemical and neurochemical changes induced by the designer drug 3,4-Methylenedioxyamphetamine (Ecstasy). *Poster-Presentation am „The future of addiction research and treatment“-Kongress in Mannheim, Zentralinstitut für Seelische Gesundheit, 1.-2. Oktober 1999*

Mayerhofer, A. & Schmidt, W.J. (2000)
Development of sensitisation of behavioural effects of 3,4-Methylenedioxyamphetamine (MDMA). *Eur. J. Neurosci.* **12** [Suppl 11], 183.02
(Poster-Präsentation bei der FENS-Tagung, Brighton, UK, 24.-28. Juni 2000)

Schmidt, W.J., Mayerhofer, A., Meyer, A. & Kovar, K.A.
MDMA potently counteracts parkinsonian symptoms in the rat.
Behav. Pharmacol. **12** [Suppl 1], S92 (2001).

Schmidt, W.J., Mayerhofer, A., Meyer, A. & Kovar, K.A.
Unique antiparkinsonian activity of Ecstasy
Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol **365** [Suppl 1], R80 (2002)

Meyer, A., Mayerhofer, A., Kovar, K.-A. & Schmidt, W.J.
Influence of the isomers on rewarding effects of the abused drugs MDMA („Ecstasy“) and MDE („Eve“) measured as conditioned place preference in rats.
Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol **365** [Suppl 1], R82 (2002)

Mayerhofer, A., Kovar, K.-A. & Schmidt, W.J.
Noradrenaline is essential for the development of behavioural sensitization to MDMA (“Ecstasy”) in rats.
Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol **365** [Suppl 1], R83 (2002)

Originalarbeiten

Mayerhofer, A., Kovar, K.-A. & Schmidt, W.J.

Changes in serotonin, dopamine and noradrenaline levels in striatum and nucleus accumbens after repeated administration of the abused drug MDMA in rats.

Neurosci Lett. **308**, 99-102 (2001)

Schmidt, W.J., Mayerhofer, A., Meyer, A. & Kovar, K.-A.

In search of the anti-parkinsonian component of ecstasy

(eingereicht bei *Neuroscience Letters*)

Folgende Artikel sind in Vorbereitung:

Mayerhofer, A., Zadow, B., Kovar, K.-A. and Schmidt, W.J.

Acute versus long term expression of inducible transcription factors c-Fos in MDMA treated rats. (*in Vorbereitung*)

Mayerhofer, A., Kovar, K.-A. and Schmidt, W.J.

DSP-4 induced depletion of forebrain noradrenaline effectively blocks the development of behavioural sensitization to MDMA ("Ecstasy"). (*in Vorbereitung*)

Mayerhofer, A., Meyer, A., Kovar, K.-A. & Schmidt, W.J.

Influence of social environment on the expression, extinction and reinstatement of conditioned place preference to MDMA (*in Vorbereitung*)

In Verbindung mit dieser Arbeit wurde die folgende Originalarbeit eingereicht:

Meyer, A., Mayerhofer, A., Kovar, K.-A. & Schmidt, W.J.

Rewarding effects of the isomers of MDMA („Ecstasy“) and MDE („Eve“) measured as conditioned place preference in rats.

(eingereicht bei *Neurosci Lett*)

meinen Eltern und in Gedenken an meine Oma

*Wer sich nicht mehr wundern
und in Ehrfurcht verlieren kann,
ist seelisch bereits tot.*

ALBERT EINSTEIN

INHALTSVERZEICHNIS

1. ZUSAMMENFASSUNG	1
2. EINLEITUNG	3
2.1. „Designerdrogen“	3
2.1.1. Psychostimulantien.....	4
2.1.2. Halluzinogene.....	7
2.1.3. Entaktogene	7
2.2. MDMA	9
2.2.1. Allgemeines.....	9
2.2.2. Akute Wirkungen	10
2.2.3. Langzeitwirkungen.....	11
2.2.4. Wirkmechanismus	12
2.3. Neurotransmitter	14
2.4. Serotonin	15
2.4.1. Allgemeines.....	15
2.4.2. Anatomie des serotonergen Systems.....	15
2.4.3. Biosynthese und Metabolismus.....	18
2.4.4. Rezeptoren.....	18
2.4.5. Physiologische Funktionen und Therapierelevanz.....	20
2.5. Dopamin	21
2.5.1. Allgemeines.....	21
2.5.2. Anatomie des dopaminergen Systems.....	22
2.5.3. Biosynthese und Abbau.....	23
2.5.4. Dopaminerge Rezeptoren	25
2.5.5. Klinische Relevanz.....	25

2.6. Noradrenalin	27
2.6.1. Allgemeines.....	27
2.6.2. Anatomie des Noradrenalins	28
2.6.3. Biosynthese und Abbau des Noradrenalins.....	29
2.6.4. Rezeptoren.....	29
2.7. Basalganglien	31
3. FRAGESTELLUNG, ZIELE DER ARBEIT	35
4. DARSTELLUNG VON MDMA	37
4.1. Vorbemerkung	37
4.2. Material & Methoden	37
4.2.1. Substanzen.....	37
4.2.2. Geräte	37
4.3. Durchführung	38
4.3.1. Schritt 1 (Piperonal " Nitrostyrenverbindung):	38
4.3.2. Schritt 2 (Nitrostyrenverbindung " Piperonylaceton):	38
4.3.2. Schritt 3 (Piperonylaceton " MDMA):	38
4.4. Qualitätssicherung	40
4.4.1. Prüfung auf Identität.....	40
4.4.2. Prüfung auf Reinheit	40
4.4.3. Diskussion der Qualitätssicherung	43
5. ALLGEMEINE WIRKUNGEN VON MDMA (TEIL A)	45
5.1. Einleitung	45
5.2. Allgemeines Verhalten	46
5.2.1. Material und Methoden	47
5.2.2. Ergebnisse	48

5.3. Wirkung von MDMA im Tiermodell der Parkinson-Krankheit	52
5.3.1. Material & Methoden	52
5.3.2. Ergebnisse	53
5.4. Diskussion	55
5.4.1. Allgemeines Verhalten	55
5.4.2. Spezielle (antiparkinsonoide) Wirkung.....	57
6. WIRKUNGEN VON MDMA IN TIERMODELLEN DER SUCHT (TEIL B)	61
6.1. Einleitung	61
6.2. Verhaltenssensitivierung	64
6.2.1. Material & Methoden	65
6.2.2. Ergebnisse	70
6.3. Platzkonditionierung.....	78
6.3.1. Material und Methoden	79
6.3.2. Ergebnisse	85
6.4. Diskussion	94
6.4.1. Sensitivierung.....	94
6.4.2. Platzkonditionierung	99
6.4.3. Zusammenfassung	106
7. NEUROTOXISCHE WIRKUNGEN VON MDMA (TEIL C).....	108
7.1. Einleitung	108
7.1.1. MDMA-Neurotoxizität.....	108
7.1.2. Angenommene Mechanismen der serotonergen Neurotoxizität	110
7.2. Immunhistochemische Untersuchungen	117
7.2.1. Material und Methoden	117
7.2.2. Ergebnisse	124

7.3. Neurochemisch-analytische Untersuchungen	132
7.3.1. Material und Methoden	132
7.3.2. Ergebnisse	138
7.4. Diskussion	150
7.3.3. Diskussion der neurochemischen Befunde	156
8. ZUSAMMENFASSENDE DISKUSSION	164
9. ANHANG: AUSGEWÄHLTE STATISTISCHE AUSWERTUNGEN	169
9.1. Verhaltenssensitivierung	170
9.2. Neurochemische Untersuchungen	173
10. LITERATURVERZEICHNIS	180

ABKÜRZUNGEN:

5-HIAA	5-Hydroxyindolessigsäure
5-HIAAL	5-Hydroxyindolacetaldehyd
5-HT	5-Hydroxytryptamin
5-OH-Trp	5-Hydroxytryptophan
AADC	Aromatische Aminosäuren-Decarboxylase
ADH	Aldehyddehydrogenase
ADHD	Aufmerksamkeitsdefizit-Hyperaktivitäts-Störung
AMY	Amygdala
Bax	Bcl-assoziertes X-Protein
Bcl-2	Onkogen des B-Zell-Lymphoms
BLA	basolateraler Nucleus der Amygdala
BtMG	Betäubungsmittelgesetz
CeA	zentraler Nucleus der Amygdala
c-Fos	zelluläres Gegenstück zum Onkogen des Finkel-Biskis-Jinkins-murinen Osteosarkom-Virus (FBJ-MSV)
COMT	Catechol-O-methyltransferase
CPP	konditionierte Platzpräferenz
CPu	Striatum (Caudatus & Putamen)
CPu-a	anteriores Striatum
CPu-pm	posteromediales Striatum
CPu-pl	posterolaterales Striatum
DA	Dopamin
DAB	3,3'-Diaminobenzidin
DAT	Dopamin-Transporter
DG	Gyrus dentatus (Eingangsstruktur des Hippocampus)
DHBA	3,4-Dihydroxybenzylamin
DOPA	Dihydroxyphenylalanin
DOPAL	Dihydroxyphenylacetaldehyd
DOPAC	Dihydroxyphenylelessigsäure
DRN	dorsaler Raphe-Nucleus
DSP-4	N-(2-Chlorethyl)-N-ethyl-2-brombenzylamin
EtOH	Ethanol
GRP	in Gruppe gehaltene Tiere
Halo	Haloperidol (4-[4-(4-Chlorphenyl)-4-hydroxypiperidino]-4'-fluor- butyrophenon)
Hip	Hippocampus
HRP	Meerrettichperoxidase (Horseradishperoxidase)
HVA	Homovanillinsäure
i.c.v.	intracerebroventrikuläre Administration
i.p.	intraperitoneale Injektion
IL	infralimbischer Cortex

XIV

ISO	in sozialer Isolation gehaltene Tiere
LC	Locus coeruleus
LHb	laterale Habenula
MAO	Monoaminoxidase
MBDB	N-Methyl-1-(1,3-benzodioxol-5-yl)-2-butanamin
MeA	medialer Nucleus der Amygdala
METH	Methamphetamin
MDA	3,4-Methylendioxyamphetamin
MDE	3,4-Methylendioxy-N-ethylamphetamin
MDMA	3,4-Methylendioxymethamphetamin
MRN	medianer Raphe-Nucleus
NAcc	Nucleus Accumbens (ggf. unterteilt in core und shell)
NAT	Noradrenalin-Transporter
NGS	normales Ziegenserum (goat)
NHS	normales Pferdeserum (horse)
OTC	over-the-counter (freiverkäuflich)
PBS	Phosphat-gepufferte Saline
Pe-Cx	parietaler Cortex
PFC	(medialer) präfrontaler Cortex (= PrL & IL)
PrL	prälimbischer Cortex
PVN	paraventriculärer Nucleus des Thalamus
ROS	reaktive Sauerstoff-Verbindungen (... oxygen-species)
s.c.	subcutane Administration
SERT	Serotonin-Transporter
SN	Substantia nigra
t_{bel}	Zeit im belohnten Kompartiment (Platzkonditionierung)
t_{unbel}	Zeit im unbelohnten Kompartiment (Platzkonditionierung)
TBS	Tris-gepufferte Saline (0,05 M; pH 7,6)
TBS-Ni	TBS, enthaltend Ammoniumnickelsulfat (6,0 mg/ml)
TBS-Triton	TBS, enthaltend 0,5 % Triton X-100
TH	Tyrosinhydroxylase
TRP	Tryptophanhydroxylase;
L-Trp	L-Tryptophan
L-Tyr	L-Tyrosin
VMAT	vesikulärer Monoamintransporter
VNS	vegetatives Nervensystem
VTA	ventrales tegmentales Areal
XTC	Ecstasy, siehe MDMA
ZNS	Zentralnervensystem

1. Zusammenfassung

Der Missbrauch der Designerdroge MDMA („Ecstasy“) wächst trotz Evidenzen für das starke neurotoxische Potential weiterhin stetig. In dieser Arbeit sollen die Mechanismen der Neurotoxizität und der Suchtwirkung mit Hilfe immunhistochemischer, neurochemischer und verhaltenspharmakologischer Methoden im Tiermodell der Ratte näher charakterisiert werden.

In der Akutwirkung löste MDMA eine starke Hyperaktivität und stereotypes Verhalten aus. Zudem reduzierte MDMA dosisabhängig die Haloperidol-induzierte Katalepsie, was für die Entwicklung neuer Parkinson-Therapeutika von Bedeutung sein könnte. Auf zellulärer Ebene korrelierte die Hyperaktivität mit einer starken Überexpression des induzierbaren Transkriptionsfaktors c-Fos innerhalb der Basalganglien und limbischer Hirnareale. Die Funktion des nukleären c-Fos-Proteins könnte in neuroprotektive oder –degenerative Prozesse involviert sein; die c-Fos-Expression ging mit der Expression von Apoptoseproteinen der Bcl-Familie einher. Langfristig war jedoch in weiten Teilen des Vorderhirns und des DRN eine verringerte Anzahl Fos-positiver Kerne zu sehen, was hier auf verminderte Aktivität überwiegend nicht-serotonerger Neurone hindeutet.

Serotoninmarker (5-HT & 5-HIAA) waren nach einer einmaligen MDMA-Injektion hingegen nicht verändert, eine wiederholte Gabe von MDMA führte jedoch zu einer serotonergen Entleerung im präfrontalen Cortex und im Striatum, welche Noradrenalin-unabhängig war (im Gegensatz zum berichteten neuroprotektiven Einfluss des NA auf dopaminerge Neurone).

Transient waren catecholaminerge Neurone ebenfalls betroffen; bemerkenswert war jedoch eine Erhöhung der basalen DA-Konzentrationen im Nucleus Accumbens MDMA-sensitiver Tiere. Die Entwicklung eines in Zusammenhang mit der Suchtentstehung (dem Übergang vom kontrollierten Konsum zum unstillbaren Verlangen nach dem Suchtstoff, dem Craving) als sehr wichtig erachteten Phänomens, der Verhaltenssensitivierung, konnte hier für MDMA gezeigt werden: Mit wiederholter Gabe von MDMA kam es zu einer Verstärkung seiner hyperlokomotorischen Wirkungen. Ein wichtiges Ergebnis dieser Arbeit zeigt, dass für die Entwicklung der Verhaltenssensitivierung eine intakte (LC-) noradrenerge Innervation des Vorderhirns essentiell ist. Noradrenalin könnte also den Schlüssel darstellen für die Entwicklung neuer Suchttherapiestrategien.

Das neben der Sensitivierung zweite hier getestete Sucht-Paradigma war das Tiermodell der Platzkonditionierung. Hier zeigte sich, dass soziale Isolation zu einer Verstärkung des Cravings, zu Robustheit gegen Extinktionseffekte und zu einem stärkeren Rückfallverhalten führt. Auf den Menschen übertragen gewinnt die soziale Umgebung an Bedeutung hinsichtlich einer potentiellen Suchtkarriere des Individuums. Ferner konnte bei isolierten Tieren in diesem Versuch eine basale Hyperaktivität beobachtet werden, welche sehr effektiv durch MDMA antagonisiert werden konnte. Dieser Befund impliziert daher einen möglichen Einsatz von MDMA in der Therapie der Aufmerksamkeits-Defizit-Hyperaktivitäts-Störung (ADHD).

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass MDMA zwar therapeutisches Potential für wichtige medizinische Indikationen besitzt, aber auch ein ernstzunehmendes Neurotoxizitätsspektrum. Eine weitere intensive Erforschung der Wirkmechanismen ist daher für die Isolierung der therapeutischen Komponenten, aber auch für die Entwicklung neuer Strategien der Prävention und Therapie MDMA-induzierter psychiatrischer Langzeit-Schäden absolut notwendig und von größter pharmazeutischer und medizinischer Bedeutung.

2. Einleitung

Der Schwerpunkt dieser Arbeit liegt auf den MDMA-induzierten Akut- und Langzeitveränderungen auf neurochemischer und zellulärer Ebene im Gehirn (mit Fokus auf Hirnstrukturen der Basalganglien), sowie auf den daraus resultierenden Effekte auf das Verhalten.

In der Einleitung soll daher zunächst das bekannte Wirkungsspektrum und die Wirkungsweise von MDMA vorgestellt werden, eines Stoffes, welcher zu den sog. „Designerdrogen“ gezählt wird. Der Begriff „Designerdrogen“ und die zugehörigen wichtigsten Stoffklassen sollen ebenfalls näher erläutert werden; mit Schwerpunkt auf der Stoffklasse der „Entaktogene“ mit MDMA, MDE und MBDB als charakteristische Vertreter.

Es folgen sodann die für das Verständnis des Wirkmechanismus und die Effekte von MDMA notwendigen Grundlagen der Anatomie und Physiologie der drei wichtigsten biogenen Amine Serotonin (5-HT), Dopamin (DA) und Noradrenalin (NA), welche als Neurotransmitter eine entscheidende Rolle spielen in der Signalprozessierung im Gehirn von allen Vertebraten und dadurch auch bei der Verhaltenssteuerung bei der Ratte (dem in dieser Arbeit verwendeten Versuchstier) sowie beim Menschen. Da sowohl die axonalen Projektionen dieser Neuronenpopulationen in den Basalganglien und dem medialen präfrontalen Cortex konvergieren, als auch die Wirkungen von MDMA zum wesentlichen Teil über diese Hirnstrukturen vermittelt werden, soll die allgemeine Einleitung mit einer kurzen Einführung in die Anatomie und die Funktionalität der Basalganglien schließen.

2.1. „Designerdrogen“

Unter Designerdrogen oder Suchtstoffen der zweiten Generation versteht man (meist in einem Untergrundlabor) synthetisch hergestellte Suchtstoffe, wobei durch geringfügige Abwandlungen der chemischen Struktur, jedoch Beibehaltung oder Profilierung der pharmakologischen Wirkung der Muttersubstanz, versucht wird, das Betäubungsmittelgesetz zu umgehen, welches lediglich die einzelnen bekannten illegalen Stoffe erfasst [107;156]. Zu den Designerdrogen zählen verschiedene Substanzen wie: Phencyclidine, Tryptamine, Fentanyle, Prodrone und Phenylalkanamine [155;156].

Eine wichtige Gruppe der synthetischen Suchtstoffe stellen die Phenylalkylamine dar (mit Phenylethylamin als Leitsubstanz), welche mit biogenen Aminen wie Dopamin, Noradrenalin, Serotonin das gleiche Pharmakophor teilen. Nach ihrer pharmakologischen Wirkung lassen sie sich in drei Untergruppen einteilen (vgl. Abb. 2.1.):

- Psychostimulantien
- Halluzinogene
- Entaktogene

Die Substanzen können jedoch auch mehreren Gruppen zugeordnet werden; bei MDA zum Beispiel zeigt das R-Enantiomer halluzinogene Wirkungen wohingegen das S-Enantiomer psychostimulatorische Eigenschaften besitzt [100].

BKA-Bericht 2000

Der Konsum von Amphetaminen und deren Derivaten einschließlich Ecstasy zeigt eine steigende Tendenz: Im Jahr 2000 zeigten Rauschgiftdelikte mit Amphetaminderivaten die stärkste Zunahme unter den Rauschgiftklassen (+23,6%) gegenüber dem Vorjahr, die Zahl der erstaußälligen Konsumenten von Amphetaminderivaten hat sich gegenüber 1995 mehr als verdoppelt, wobei die Mehrzahl der allgemeinen Verstöße gegen das Betäubungsmittelgesetz von 18- bis 25-jährigen begangen werden [6].

2.1.1. Psychostimulantien

Als Leitsubstanz der Psychostimulantien kann das Amphetamin (1-Phenyl-2-Propanamin) angesehen werden. Es wurde bereits 1887 von Edelano synthetisch gewonnen [73], und wurde Anfang des 20. Jh. als Arzneimittel zur Behandlung akuter Rhinitis, Asthma und Schlafhemmung (bei Encephalitis lethargica) eingesetzt [125]. Die psychostimulierende Wirkung wurde bald entdeckt und die Zahl der Amphetamin-Abhängigen stieg rapide an [3]. In Deutschland wurde Amphetamin 1986 in die Anlage I des BtMG (nicht verkehrsfähige Stoffe; 2. BtMÄndV [7]) aufgenommen.

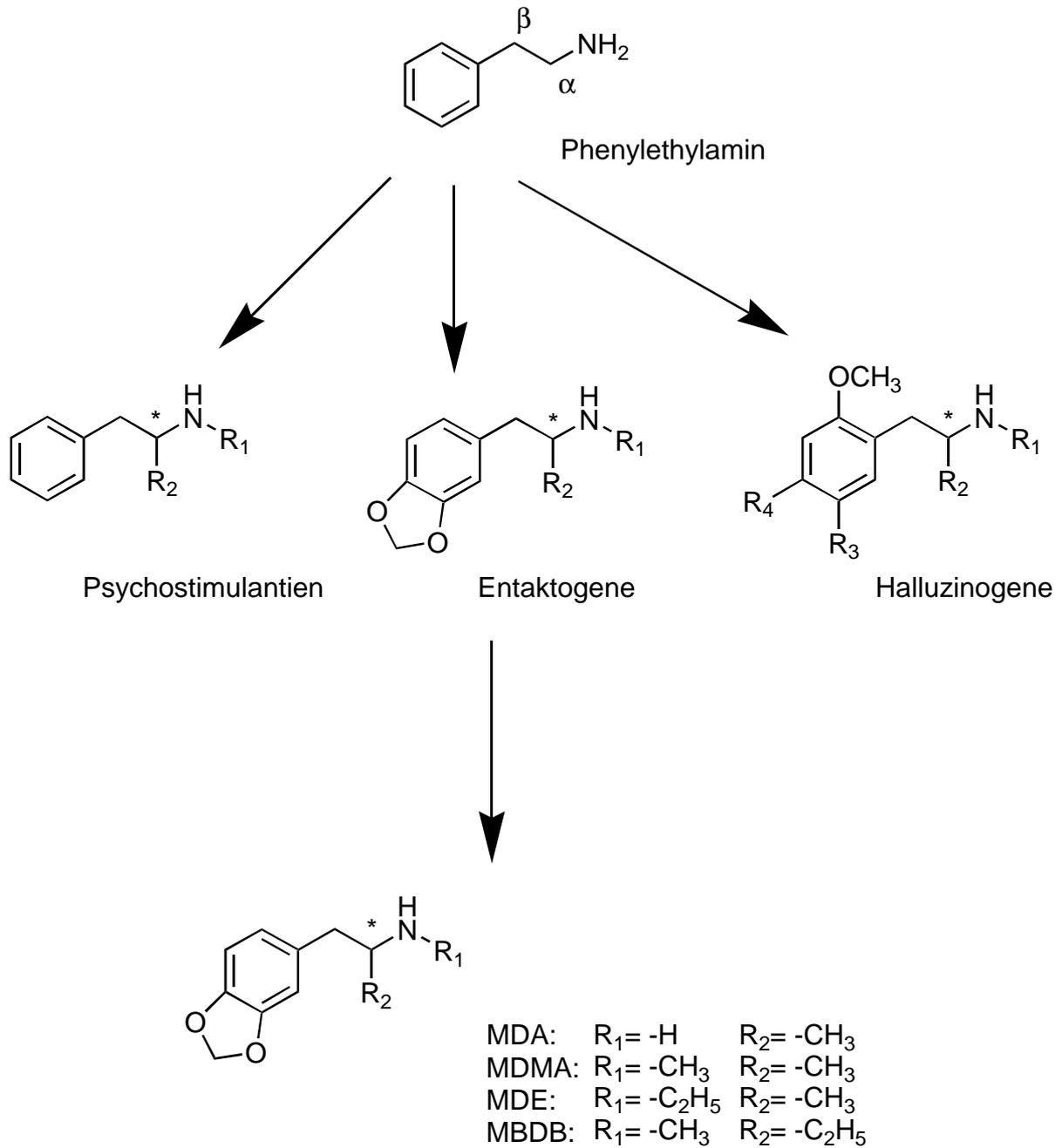


Abb. 2.1.: Klassifizierung der Phenylalkylamine in die drei Hauptklassen der Psychostimulantien (z.B. Amphetamin), Halluzinogene (z.B. DOM, DOI) und Entaktogene (z.B. MDMA). Bei allen Amphetaminderivaten kennzeichnet * den chiralen α -Kohlenstoff.

Amphetamin hat strukturelle Ähnlichkeit mit Phenylethylamin, es ist sein α -Methyl-Derivat. Phenylethylamin selbst besitzt, wenn systemisch gegeben, praktisch keine zentralen Effekte, da es sehr rasch durch die Monoaminoxidase (MAO) metabolisiert wird. Die Methylgruppe am α -Kohlenstoff des Amphetamins macht es zu einem sehr schlechten Substrat für die MAO, sodass Amphetamin kaum im Körper metabolisiert wird und die Blut-Hirnschranke leicht passieren kann. Im Gehirn führt Amphetamin zu einer massiven Freisetzung von Dopamin (DA) und in viel geringerem Maße von Noradrenalin (NA) und Serotonin (5-HT), was durch eine Blockade der Wiederaufnahme, aktive (Aktionspotential-unabhängige¹) Freisetzung der Neurotransmitter und ebenfalls eine Blockade der MAO vermittelt wird [84;205;231;261]. Der genaue Mechanismus der Transmitterfreisetzung ist bis dato nicht vollständig geklärt, jedoch gibt es einen gut belegten Erklärungsversuch: Amphetamine wirken demnach als schwache Basen, welche den pH-Gradienten der synaptischen Vesikel reduzieren. Ein beeinträchtigter pH-Gradient reicht erstens nicht aus, als treibende Kraft für ausreichenden vesikulären Monoamin-Uptake zu sorgen; zweitens deprotonieren monoaminerge Neurotransmitter im Vesikel bei steigendem pH-Wert und können frei ihrem Konzentrationsgradienten folgend durch die Vesikelmembran hindurch diffundieren. Somit steigt die Konzentration der Monoamine im Cytoplasma, und durch die daraus resultierende Reversion ihres transmembranären osmotischen Gradienten werden sie durch den membranären Transporter in den synaptischen Spalt freigesetzt [304;305].

Als Folge der neurochemischen Wirkungen von Amphetamin kommt es zur ZNS-Stimulation, Euphorie, erhöhter motorischer Aktivität und zur Appetithemmung.

Eine Methylierung am Stickstoff ergibt das Methamphetamin (METH) mit etwa der doppelten *in vivo* Potenz von Amphetamin [205]. Methamphetamin wirkt neurotoxisch auf dopaminerge Neurone: Administration hoher Dosierungen von METH führt zu einer Hemmung des Dopamin-Synthesenzym Tyrosinhydroxylase (TH) und zu einer Verarmung von Dopamin (DA) und dessen Metaboliten Dihydroxyphenylelessigsäure (DOPAC) und Homovanillinsäure (HVA) im Gehirn. Die Neurotoxizität ist jedoch nicht auf DA beschränkt, es kommt ebenfalls zu einer Hemmung des Serotonin-Synthesenzym Tryptophanhydroxylase (TPH) und zur Entleerung von Serotonin (5-HT) und dessen Metaboliten 5-Hydroxyindolessigsäure (5-HIAA) [96].

¹ Es gibt jedoch Hinweise auf zusätzliche indirekte Wirkkomponenten von Amphetamin, welche eine Exzitation der dopaminergen Neurone bewirken [63;216].

2.1.2. Halluzinogene

Die Substitution am Phenylring der Phenylalkylamine führt zu einer drastischen Wirkungsänderung. So führt eine 3,4,5-Methoxylierung des Phenethylamins zur Leitsubstanz der Halluzinogene der Phenylalkylaminklasse, dem Mescaline (Inhaltsstoff des Peyote-Kaktus *Lophophora williamsii* oder *Anhalonium lewinii*), welches erstmals durch den deutschen Toxikologen Lewin beschrieben wurde, als er die Rituale indianischer Stämme in Mexiko beobachtete [108].

Strukturelle Modifikationen dieser Substanz führen zur Erhöhung der halluzinogenen Potenz: So zeigt das 2,4,5-Trimethoxyamphetamin eine viel stärkere halluzinogene Potenz; das Austauschen der Methoxygruppe an Position 4 des Phenylrings durch hydrophobere Gruppen (Halogenatome) führt zu einer weiteren Wirkverstärkung [205]. Die Einschätzung der halluzinogenen Potenz zahlreicher Phenethylamine stützt sich zum großen Teil auf die sehr extensive Arbeit von Shulgin und Mitarbeitern, welche zu einem großen Teil im Selbstversuch durchgeführt wurde [289].

Als Wirkmechanismus der Halluzinogene gilt der Agonismus am 5-HT-Rezeptor (vor allem am 5-HT_{2A/C}-Rezeptor²) [99;100]. Mit diesem Befund wurde die ursprüngliche Definition der Halluzinogene nach Hollister [128] um den Locus der Wirkung erweitert und genau charakterisiert. Halluzinogene wie das 2,5-Dimethoxy-4-bromoamphetamin (DOB) oder 2,5-Dimethoxy-4-iodoamphetamin (DOI) gelten als potente Modell-Liganden am 5-HT₂-Rezeptor.

2.1.3. Entaktogene

Der Begriff „Entaktogen“ wurde 1986 durch Nichols eingeführt [204] als seine Arbeitsgruppe methylenedioxy-substituierte Phenylalkylamine untersuchte und dabei entdeckte, dass sich diese Substanzen in ihren Wirkungen von den chemisch verwandten Amphetaminen und Halluzinogenen deutlich unterscheiden. Etymologisch setzt sich dieser Begriff zusammen aus dem lateinischen „*tactus*“ (Bewegung) und den griechischen Wurzeln „*en*“ (innen, innerhalb) und „*gen*“ (schaffen), wodurch die zusammengesetzte Bedeutung im Sinne von „die

² Glennon schreibt noch vom 5-HT_{1C}-Rezeptor. Die Nomenklatur der Serotoninrezeptoren wurde inzwischen insofern geändert, als der (1C)-Rezeptor seiner G-Protein-Kopplung zufolge zur Klasse 2 als (2C)-Rezeptor gezählt wird. Vgl. Kapitel 2.4.

Berührung des eigenen Inneren erzeugen“ entsteht³. Diese Namensgebung stützte Nichols auf enthusiastische Berichte aus psycholytischen Therapieversuchen, welche in den 50er und 60er Jahren in den USA und der Schweiz durchgeführt wurden. Diese Therapieansätze (detaillierte Beschreibung bei [42]) wurden bei behandlungsresistenten psychiatrischen Störungen versucht, und wurden nach dem Verbot der anfänglich verwendeten Halluzinogene vorrangig mit 3,4-Methylendioxyamphetamin (MDMA, IUPAC-Bezeichnung: 1-(1,3-Benzodioxol-5-yl)-2-propanamin) durchgeführt [107]. MDMA war in diesem Zusammenhang insbesondere hilfreich bei der Überwindung starker Abwehr in der Psychotherapie und bei der Konfrontation mit angstbesetzten Inhalten.

Die meisten in der experimentellen Psychiatrie beobachteten konkreten Wirkungen von Entaktogenen lassen sich beschreiben als angenehme emotionale Erfahrungen der Entspannung, friedvolle Zufriedenheit und glückliche Selbstakzeptanz, Introspektion, Angstfreiheit, sowie kontrollierte kommunikative Offenheit [107;109].

Diese besonderen Wirkungen kommen vor allem bei den Methylendioxy-Derivaten der Phenylalkylamine vor und wurden in Drug-discrimination-Studien zum ersten Mal durch Richard Glennon als eine völlig neue Substanzgruppe neben den Psychostimulantien und den Halluzinogenen klassifiziert [100]. Zu dieser Gruppe gehören das MDMA, 3,4-Methylendioxyethylamphetamin (MDE), 1-(1,3-Benzodioxol-5-yl)-2-butanamin (BDB) und N-Methyl-1-(1,3-Benzodioxol-5-yl)-2-butanamin (MBDB). Das 3,4-Methylendioxyamphetamin (MDA) zeigt teilweise auch entaktogene Wirkungen, jedoch überwiegen hier die psychostimulatorischen (S-MDA) und halluzinatorischen Wirkungen (R-MDA).

³ „It seemed that the effect of these drugs was to enable the therapist – or patient – to reach inside and deal with painful emotional issues that are not ordinary accesible. Just as the word „tact“ has the connotation of communicating information in a sensitive and careful way so as to avoid offense, it seemed that the Latin root of this word, **tactus**, would be appropriate as part of the term. Addition of the Greek roots **en** (within or inside) and **gen** (to produce) created the term „**entactogen**“, having the connotation of **producing a touching within**.“ [204].

2.2. MDMA

2.2.1. Allgemeines

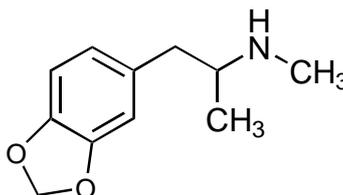


Abb. 2.2. Strukturformel von 3,4-Methylenedioxyamphetamin (MDMA)

Geschichtliches

MDMA wurde 1914 von der Firma Merck als Appetitzügler patentiert, wurde jedoch nie vermarktet, vermutlich wegen der starken psychotropen Effekte. In den 70er und 80er Jahren wurde MDMA als Adjuvans in der Psychotherapie eingesetzt (s.o.), wurde jedoch seit Mitte der 80er Jahre vermehrt missbraucht [110;258]. Trotz einiger Berichte über Todesfälle und neurotoxischer Wirkungen von MDMA und seines Metaboliten MDA [241;273;302], stieg der Konsum seit den 80ern stetig an und erlebte in den 90er Jahren trotz weiterer gesicherter Evidenzen bezüglich der Neurotoxizität sogar einen neuen Boom im Zusammenhang mit „Rave“-Parties [110]: in Deutschland stieg der Verbrauch zwischen den Jahren 1991-1996 um das 35-fache! [145].

1985 wurde MDMA von der US-amerikanischen DEA (drug enforcement agency) wegen Verdachts auf Abhängigkeitspotential und der möglichen neurotoxischen Wirkungen als „Schedule I - Substanz“ klassifiziert [182]; in Deutschland unterstehen seit der 80er Jahren ebenfalls alle Methylenedioxyamphetamin-Derivate dem Betäubungsmittelgesetz.

MDMA-Administration verursacht bei Labortieren biphasische Wirkungen: Die „Akutwirkungen“ treten innerhalb von 24 h nach Substanzgabe auf, gefolgt von der zweiten Phase, den „Langzeitwirkungen“, welche für mehrere Monate andauern können [188].

2.2.2. Akute Wirkungen

Versuchstiere

Bei Versuchstieren sind eine Reihe zentraler Effekte zu sehen: Hyperaktivität (zeigt sich vor allen Dingen in gesteigerter lokomotorischer Aktivität der Tiere [110]), amphetaminerger (DA) sowie fenfluraminerger (5-HT) Diskriminationsstimulus in höheren Dosierungen [269]. Ebenfalls sind bei der Ratte und beim Primaten „belohnende“ Wirkungen von MDMA beobachtet worden – diese Effekte sollen im Kapitel 6 näher diskutiert werden. Zu den Akutwirkungen zählen aber auch eine zentral ausgelöste, ausgeprägte Hyperthermie, d.h. ein starker Anstieg der Körpertemperatur ($>40^{\circ}\text{C}$), wenn die Tiere sich in einer Umgebungstemperatur $\geq 24^{\circ}\text{C}$ befinden; in höheren Dosierungen kommt das sogenannte Serotonin-Syndrom hinzu [110]. Das Serotoninsyndrom (bekannt als schwerwiegende Wechselwirkung von Antidepressiva) beinhaltet Symptome wie flache Körperhaltung, Piloerektion, wiederholendes Treten der Vorderpfoten, repetitives Schwenken mit dem Kopf, Abspreizen der Hinterpfoten, Proptosis, Ataxie und kann bis zu Konvulsionen und Tod führen [95;110].

Mensch

Beim Menschen konnten genauso Symptome des Serotoninsyndroms als akute Nebenwirkung der MDMA-Einnahme beobachtet werden⁴: Trismus (tonischer Kaumuskelkrampf), Tachykardie sowie starker Blutdruckanstieg, Bruxismus (Zähneknirschen), Mundtrockenheit, Tremor, Palpitationen (Herzklopfen), Diaphoresis (Schwitzen), Hitzewallungen und Kälteschauer, Kälteempfindlichkeit, Nausea und Vertigo, Mydriasis [179;225]. Hyperthermie-Reaktionen sind vom Menschen ebenfalls bekannt [110], es wurde auch von malignen Fällen berichtet [145].

Die Hyperthermie wird erwartungsgemäß als wichtiger Faktor diskutiert, welcher zur Pathologie der (akuten) peripher-toxischen Effekte von MDMA beiträgt [66]. Zu diesen schwerwiegenden körperlichen Schädigungen zählen u.a. folgende Akutkomplikationen: Rhabdomyolyse, akutes Nierenversagen, Asystolie, disseminierte intravasale Koagulopathie und Leberversagen, welche unbehandelt zum Tod führen [54;110;145].

⁴ Wegen der Gefahr des Auftretens eines Serotoninsyndroms wird übrigens trotz der neuroprotektiven Effekte von SSRI von deren Einsatz bei akuter MDMA-Intoxikation abgeraten [125].

Aus der Klinik sind ebenfalls eine Reihe von zentralen Akutwirkungen von MDMA und MDE bekannt. Hierzu zählen sowohl die oben beschriebenen entaktogenen psychischen Wirkungen, jedoch sieht man beim Menschen auch eine starke Komponente von hyperaktivierenden (psychomotorische Aktivierung, Logorrhoe) Effekten, welche sich auf die amphetaminerge Wirkung zurückführen lassen; halluzinogene Wirkungen sind eher selten und auf die R-Enantiomere beschränkt [122;126;205].

Mittels des 18-FDG-PET-Verfahrens (18-Fluorodeoxyglucose-Positronen-Emissions-Tomographie) konnte bei MDE-Gabe im Frontal- und Präfrontalcortex ein verringerter, zerebellär und striatal hingegen ein erhöhter Glucosemetabolismus festgestellt werden [280].

In einer neuen Studie mit MDMA-naiven gesunden Probanden konnte die Arbeitsgruppe um Franz X. Vollenweider mit Hilfe der „low resolution electromagnetic tomography“ (LORETA) die Wirkungen von MDMA auf cortikale Hirnaktivitäten näher charakterisieren: MDMA führt akut zu einem weitverbreiteten Abfall langsamer und mittlerer Frequenzaktivitäten neben einem starken Anstieg schneller Frequenzaktivitäten im anterior-temporalen und posterior-orbitalen Cortex gepaart mit gehobener Stimmung und erhöhter Extrovertiertheit. Ein Vergleich mit EEG-Mustern verschiedener serotonerger, dopaminerger und noradrenerger Substanzen deutet darauf hin, dass Serotonin, Noradrenalin und zu einem geringeren Anteil Dopamin zu den Effekten von MDMA auf das EEG-Muster und möglicherweise auch auf das Verhalten beitragen [87].

2.2.3. Langzeitwirkungen

Als Ricaurte et al., 1985, die Konzentrationen von 5-HT und 5-HIAA im Gehirn MDA-behandelter Ratten gemessen haben, konnten sie nachweisen, dass diese Substanz im Tierversuch neurotoxisch auf die serotonergen Neurone wirkt [241]. Dieser Befund wurde ein Jahr später auch auf das MDMA ausgeweitet [273]. Auch konnte gezeigt werden, dass MDMA auch die Aktivität des 5-HT-Syntheseenzym Tryptophanhydroxylase (TPH) hemmt und dass die neurotoxische Wirkung von MDMA selektiv ist auf das serotonerge System (im Gegensatz zu METH bleiben die dopaminergen Neurone unbeschädigt) [302]. Die neurotoxische Wirkung von MDMA auf die dünnen aufsteigenden serotonergen Axone des dorsalen Raphe-Nucleus (DRN) wurde histologisch ebenfalls bewiesen (Übersicht bei [296]). Eine detaillierte Diskussion der neurotoxischen Wirkungen findet sich in Kapitel 7.

Beim Menschen konnten gleichermaßen Anzeichen für eine neurotoxische Wirkung von MDMA beobachtet werden: In der Liquorflüssigkeit von MDMA-Konsumenten wurden

verringerte Konzentrationen an Serotoninmarkern gemessen [243]. Zudem wurden beim Menschen als Langzeitfolgen eines MDMA-Konsums zahlreiche psychiatrische Störungen beobachtet wie Änderungen der Persönlichkeit, Verhaltensauffälligkeit (vor allem Selbstüberschätzung und Leichtsinns, welche zu Unfällen mit Todesfolge führten), Panikstörung, depressives Syndrom (daneben auch Dysthymie und Stupor mit Suizid), Psychosen (meist paranoide und atypische Psychosen, welche oft chronifizieren), und selbst nach vollständiger Remission der Psychose sog. „Flashbacks“, welche Minuten bis Tage persistieren, (sehr gute Zusammenfassung bei [306]). In letzter Zeit häufen sich zudem Berichte über kognitive Störungen bei MDMA-Konsumenten (siehe Punkt 7.1.1. zur detaillierten Beschreibung).

2.2.4. Wirkmechanismus

Während Amphetamin und Methamphetamin zu einer starken Freisetzung von DA aus dopaminergen Nervenendigungen führt, bewirkt die Substitution am Aromaten eine Erweiterung des Wirkungsspektrums von den Katecholaminen auf die Indolamine: MDMA führt in erster Linie zu einer Serotoninfreisetzung, neben einer (eigentlich für Amphetamin charakteristischen) Dopaminfreisetzung aus den jeweiligen Neuronen [205].

Lange Zeit standen Serotonin und Dopamin im Vordergrund der Diskussion um die MDMA-Pharmakologie, jedoch konnte (abgesehen von vereinzelt Studien [24]) erst relativ spät gezeigt werden, dass Noradrenalin eine wichtigere Rolle als bisher angenommen in der Vermittlung der (insbesondere euphorischen) Effekte von MDMA, aber auch von anderen Amphetaminen, spielen könnte [63;87;261]!

Die Affinitäten vom racemischen MDMA an verschiedenen neuropharmakologisch relevanten Hirnproteinen hat bereits 1988 die Arbeitsgruppe um George Battaglia und Errol B. De Souza [24] sehr detailliert in verschiedenen Gehirnarealen *ex vivo* untersucht. MDMA hat in ihrem Radioligand-Bindungsassay an folgende Rezeptoren und Transporterproteine gebunden (nach Affinität sortiert): SERT > [α_2 -Rez. = 5-HT₂-Rez. = M₁-Rez. = H₁-Rez.] > [NAT = M₂-Rez. = α_1 -Rez. = β -Rez.] \geq [DAT = 5-HT₁-Rezeptoren] >> D₂- und D₁-Rezeptoren. Diese Befunde erklären sehr gut manche der Akutwirkungen von MDMA: Ein 5-HT₂-Agonismus vermittelt die teilweise halluzinogenen Effekte, 5-HT- und NA-Release führt wahrscheinlich zu den entaktogenen Wirkungen, wobei die antagonistische Wirkung am α_2 -Rezeptor zu den kardiovaskulären Komplikationen führen könnte. Es überrascht die relativ

geringe Affinität zum DAT. Dies wurde durch Rothman et al. ebenfalls gezeigt [261], jedoch scheint diese Wirkung dosisabhängig zu sein: In sehr niedrigen Dosierungen zeigt MDMA in Ratten eher amphetaminerge (dopaminerge) Wirkungen, in höheren Dosierungen kommen vermehrt fenfluraminerge (serotonerge) Wirkungen hinzu [269]. Solch eine biphasische Wirkung korrespondiert mit anderen Befunden, wonach MDMA erst in höheren Dosierungen die Prolaktinkonzentrationen im Serum erhöht [179].

Die Dopamin-freisetzenden Eigenschaften von Methylendioxyamphetaminen variieren: So verringert sich die striatale DA-Freisetzung mit der Folge der Substanzen MDA > MDMA > MDE > MBDB bei gleichbleibender 5-HT-Freisetzung [200].

Stereochemische Untersuchungen zeigen ähnliche Freisetzungseigenschaften beider Enantiomere von MDA, MDMA und MDE auf 5-HT, jedoch sind die S-Enantiomere dieser Substanzen viel potenter im Hinblick auf die DA-Freisetzung [187] und werden mitunter als die entaktogen wirkende Komponente diskutiert [295]. Die R-Enantiomere besitzen agonistische Eigenschaften am 5-HT₂-Rezeptor, jedoch nimmt diese Potenz von MDA über MDMA, MDE zu MBDB deutlich ab. R-MDA zeigt daher in Drug-Discrimination-Tests in seiner Wirkung größte Ähnlichkeiten mit halluzinogenen Substanzen [204], jedoch wird auch für MDE von einer signifikanten halluzinogenen Wirkung berichtet [295].

2.3. Neurotransmitter

Da in dieser Arbeit ein Schwerpunkt auf die MDMA-induzierten Veränderungen der aminergen Neurotransmitterkonzentrationen im Gehirn gelegt wurde, soll auf den folgenden Seiten eine kurze Synopse der Anatomie und Physiologie dieser endogenen Stoffe gegeben werden (insbesondere der in erster Linie mit dem Wirkungsmechanismus von MDMA verknüpften Monoamine 5-HT, DA und NA).

Stoffbegriff

Im Jahre 1921 konnte der Grazer Pharmakologe Otto Loewi in seiner Arbeit „Über humorale Übertragbarkeit der Herznervenwirkung“ zum ersten mal die Existenz eines Neurotransmitters, d.h. eines Stoffes beweisen, welcher Information an einer chemischen Synapse weiterleitet. Neurotransmitter werden präsynaptisch bereitgestellt, nach Bedarf freigesetzt und beeinflussen die nachgeschaltete Zelle(n) durch Wirkung an postsynaptischen Rezeptoren [2;69]. Neuere Untersuchungen zeigen sogar, dass eine monosynaptische Verbindung mit einer Quelle (präsynaptisches Neuron) und einem Ziel (postsynaptisches Neuron) nicht unbedingt die Voraussetzung ist für die Informationsübertragung im Zentralnervensystem (ZNS): Vielmehr ist eine „Volumentransmission“ (wobei Neurotransmitter, welche aus einer Quelle freigesetzt werden, viele, auch entfernte, Ziele mittels Diffusion im Extrazellulärraum erreichen) die Realität im Funktionieren der neuronalen Netzwerke des ZNS [332].

Die im Folgenden behandelten, als Neurotransmitter fungierenden biogenen Indol- (Serotonin) und Katecholamine (Dopamin, Noradrenalin) spielen eine wichtige Rolle in der Erhaltung des Transmittergleichgewichts in den Basalganglien, und Änderungen in der Bereitstellung dieser Neurotransmitter haben direkte Effekte auf das Verhalten des Organismus.

2.4. Serotonin

2.4.1. Allgemeines

Die Geschichte des Serotonins beginnt in den frühen 30er Jahren, als Dr. Vittorio Erspamer an der Universität von Pavia einen neuen Stoff aus biologischem Gewebe isolierte, welcher sehr effektiv zu einer Kontraktion der glatten Muskulatur, insbesondere des Uterus führte. Er klassifizierte diesen Stoff richtig als Indolamin und nannte ihn *Enteramin*. 1952 stellte man fest, dass Enteramin identisch war mit der Substanz *Serotonin*, deren endogenes Vorkommen und physiologische Wirkungen Irvine Page und Kollegen (während ihrer Suche nach einem blutdrucksteigernden Stoff im Serum) untersuchten [320] und zum ersten Mal 1948 beschrieben ([233] zitiert in [224]).

Serotonin ist ein phylogenetisch alter Neurotransmitter und ist bereits bei einfachen Lebewesen zu finden [98]. Bei den meisten Säugetieren kommen ~90% des Serotonins in den enterochromaffinen Zellen des Darms vor; in Mastzellen und Thrombozyten wurde es ebenfalls in hohen Konzentrationen gefunden, wobei es hierin durch einen aktiven Transport aus den Darmzellen aufgenommen wird [2]. Serotonin spielt eine wichtige Rolle in vielen peripheren Körperfunktionen, wie der Vasokonstriktion, Darmmotilität und der Thrombozytenaggregation; viel komplexer jedoch ist die Involvierung des Serotonins in die physiologischen Funktionen des ZNS [177].

2.4.2. Anatomie des serotonergen Systems

Es waren die oben bereits erwähnten Betty Twarog und Irvin Page, welche u.a. das Vorkommen von Serotonin im Gehirn nachwiesen [310]. Serotonin enthaltende Neurone kommen im Mesencephalon, der Pons und der Medulla oblongata vor, hier vor allem in medianen und paramedianen Zonen in den sogenannten Raphe-Kernen [207]; jedoch ist in den meisten Raphe-Kernen nur die Minorität an Neuronen serotonerg [207]. Eine detaillierte Kartierung führten in den 60er Jahren Dahlström und Fuxe durch: Die serotonergen Zellgruppen wurden durch den Buchstaben „B“ bezeichnet (im Gegensatz zu „A“, welches catecholaminerge Neurone klassifiziert) und in 9 Kerne eingeteilt (B1-B9) [62].

Die Raphe-Kerne können ferner in zwei große Gruppen eingeteilt werden nach ihrer Entwicklung in zwei abgeteilten Clustern während der frühen Fetalphase: die rostrale und caudale Portion. Zum caudalen Teil gehören die Kerne B1-B4, welche vorwiegend absteigend (ins Rückenmark) projizieren; die Kerne B5-B9 projizieren aufsteigend ins Vorderhirn und

setzen sich zusammen aus den folgenden Untergruppen: B5 + B8 (medianer Raphe-Nucleus, MRN), B6 + B7 (dorsaler Raphe-Nucleus, DRN) und B9 (medialer Lemniskus) (Abb 2.3.-A). Die Majorität der serotonergen Fasern ist nicht myelinisiert. Die Zahl der serotonergen Neurone in den B5-B9 Kernen nimmt während der ersten acht postnatalen Wochen stark ab (-37%), was auf eine sehr wichtige Rolle des Serotonins in der neuronalen Entwicklung hinweist. Abgesehen von der Innervation des Rückenmarks durch die Zellgruppen B1-B4, ziehen dichte Efferenzen zum Hirnstamm⁵, zum Cerebellum⁶, zum Mittelhirn⁷ und Zwischen- sowie Endhirn⁸ (zusammengefasst in [115]).

Der DRN und der MRN unterscheiden sich deutlich in der Innervation des Vorderhirns: Zwar überlappen die Innervationsareale teilweise (beide Kerne innervieren den Globus pallidus, den Nucleus accumbens (NAcc) und den Hippocampus; jedoch innerviert der DRN eher den ventralen Hippocampus, den frontalen Cortex und das dorsale Striatum, während der MRN vielmehr den dorsalen Hippocampus, den Gyrus dentatus und das Septum innerviert. Anatomisch unterscheiden sich die Eigenschaften der jeweiligen Neurone: Während die Axone des DRN fein mit kleinen fusiformen Varikositäten sind, zeigen die Axone des MRN eine grobe Struktur mit großen spherikalen Varikositäten („wie mit Perlen besetzt“) (zusammengefasst in [127]).

⁵ Formatio reticularis, Cranialnervkerne, dorsaler Vaguskern, Nucleus hypoglossus, und die (nor)adrenergen Kerne A1,2 und C1,2 werden innerviert vor allem durch den B3-Kern, welcher wiederum Afferenzen von den rostralen Serotoninkernen erhält. Ausserdem starke Innervation des periaquäduktalen Graus (PAG, durch B3, doch v.a. durch B6 + B8 in das dorsolaterale PAG: Steuerung der Aversion und Nozizeption).

⁶ Innervation durch B3 und B6, die höchste Faserdichte findet sich in der granulären Zellschicht.

⁷ Hier interessant sind die dopaminergen Neurone, welche durch den B7-Kern des DRN innerviert werden; ausserdem starke Innervation des zentralen Höhlengraus (PAG, durch B3, doch v.a. durch B6 + B8 in das dorsolaterale PAG: Steuerung der Aversion und Nozizeption).

⁸ Die Projektionen sind topographisch organisiert und innervieren den (Hypo)Thalamus, Septum, Amygdala, Striatum, Hippocampus und weite kortikale Gebiete.

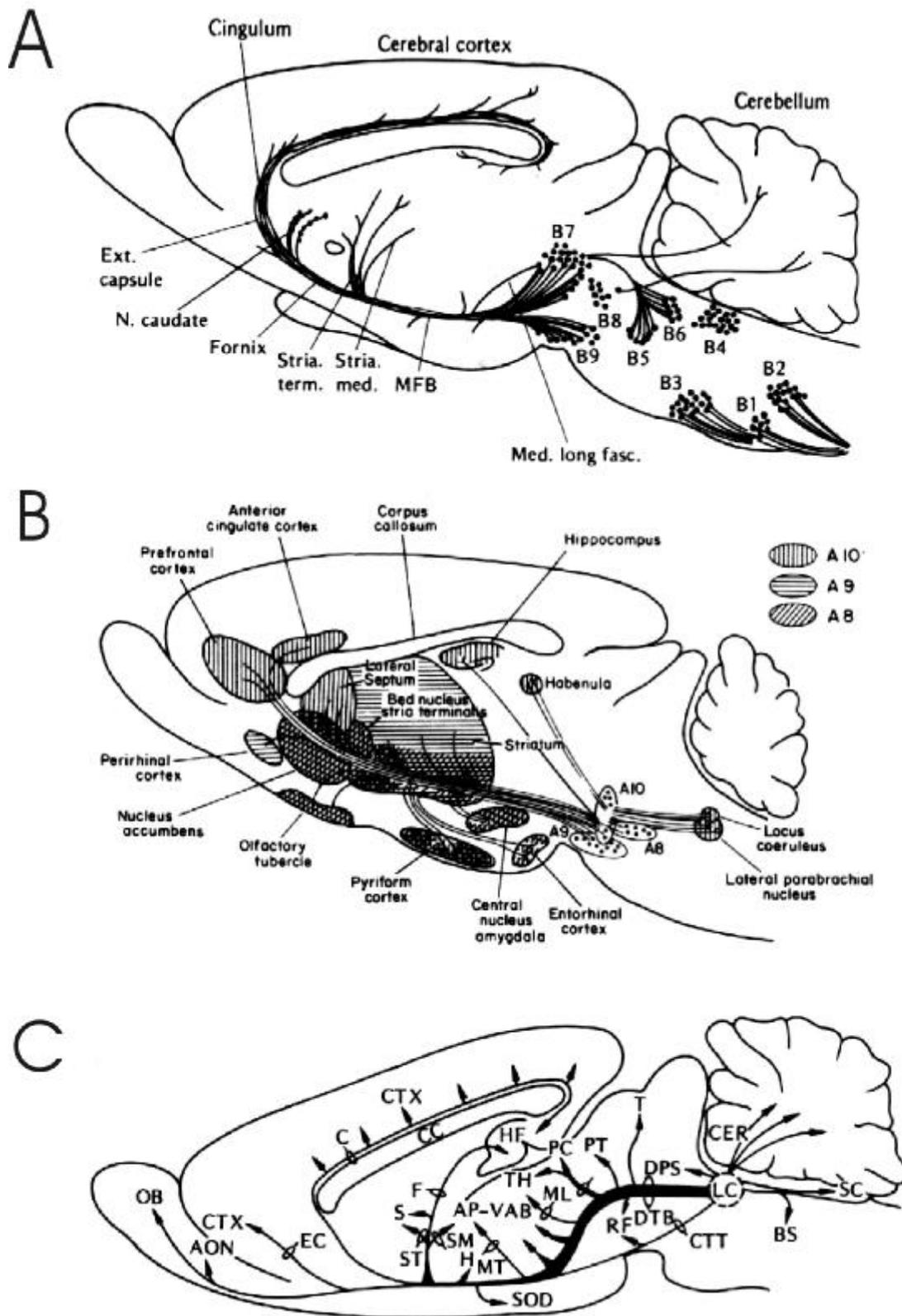


Abb 2.3.: Schematische Darstellung der wichtigsten serotonergen (A), dopaminergen (B) und noradrenergen (C) Projektionen im Rattenhirn (aus Cooper, 1991 [60]).

2.4.3. Biosynthese und Metabolismus

Serotonin ist ein Indolamin, genauer 5-Hydroxytryptamin (5-HT). Es wird aus der Aminosäure L-Tryptophan gebildet, indem zuerst über das Enzym Tryptophanhydroxylase die Position 5 am Indol hydroxyliert wird, das 5-Hydroxytryptophan wird weiter enzymatisch decarboxyliert zu 5-HT. L-Tryptophan ist daher essentiell für die Aufrechterhaltung physiologischer Serotoninspiegel im Gehirn [94].

Serotonin wird wie alle Neurotransmitter in Vesikeln gespeichert und impulsabhängig exozytotisch freigesetzt. Es kann im synaptischen Spalt an verschiedenen prä- oder postsynaptischen Rezeptoren binden und kann wiederaufgenommen werden in das serotonerge Neuron über einen selektiven Serotonintransporter (SERT). Im Zytoplasma wird 5-HT über die Monoaminoxidase (MAO) und die Aldehyddehydrogenase (ADH) metabolisiert zur 5-Hydroxyindolessigsäure (5-HIAA) (zusammengefasst in [2;60;177]).

2.4.4. Rezeptoren

Es sind 7 serotonerge Rezeptorenfamilien mit unterschiedlichen Kopplungsmechanismen bekannt. Die 5-HT₁-Rezeptorklasse enthält 5 verschiedene Rezeptoren, welche G_{i/o}-Protein-gekoppelt sind. Diese Rezeptoren inhibieren die Adenylatcyclase und somit die Bildung von cAMP aus ATP, d.h. sie wirken inhibitorisch auf die Neurotransmission. Der 5-HT_{1A}-Rezeptor ist vorwiegend somatodendritisch als Autorezeptor auf serotonergen Neuronen der Raphe-Kerne lokalisiert; der 5-HT_{1B/D}-Rezeptor fungiert als präsynaptischer Autorezeptor auf serotonergen Axonterminalen, sowie als Heterorezeptor (z.B. auf GABAergen Neuronen).

Die 5-HT₂-Rezeptorfamilie beinhaltet den 5-HT_{2A}-, 5-HT_{2B}- und neuerdings den 5-HT_{2C}-Rezeptor (welcher früher fälschlicherweise als 5-HT_{1C}-Rezeptor der falschen Rezeptorfamilie zugeordnet wurde). Diese Rezeptorfamilie ist G_{q/11}-Protein-gekoppelt und führt zur Aktivierung der Phospholipase C, wodurch Phosphatidylinositol zu Diacylglycerol und Inositoltriphosphat hydrolysiert wird und folglich zu einem Anstieg an freiem zytosolischem Calcium führt. Die Rezeptoren der 5-HT₂-Familie sind ausschließlich postsynaptisch lokalisiert im Cortex, Hippocampus, den Basalganglien (ausserhalb des ZNS auch im vaskulären Endothelium und auf Thrombozyten).

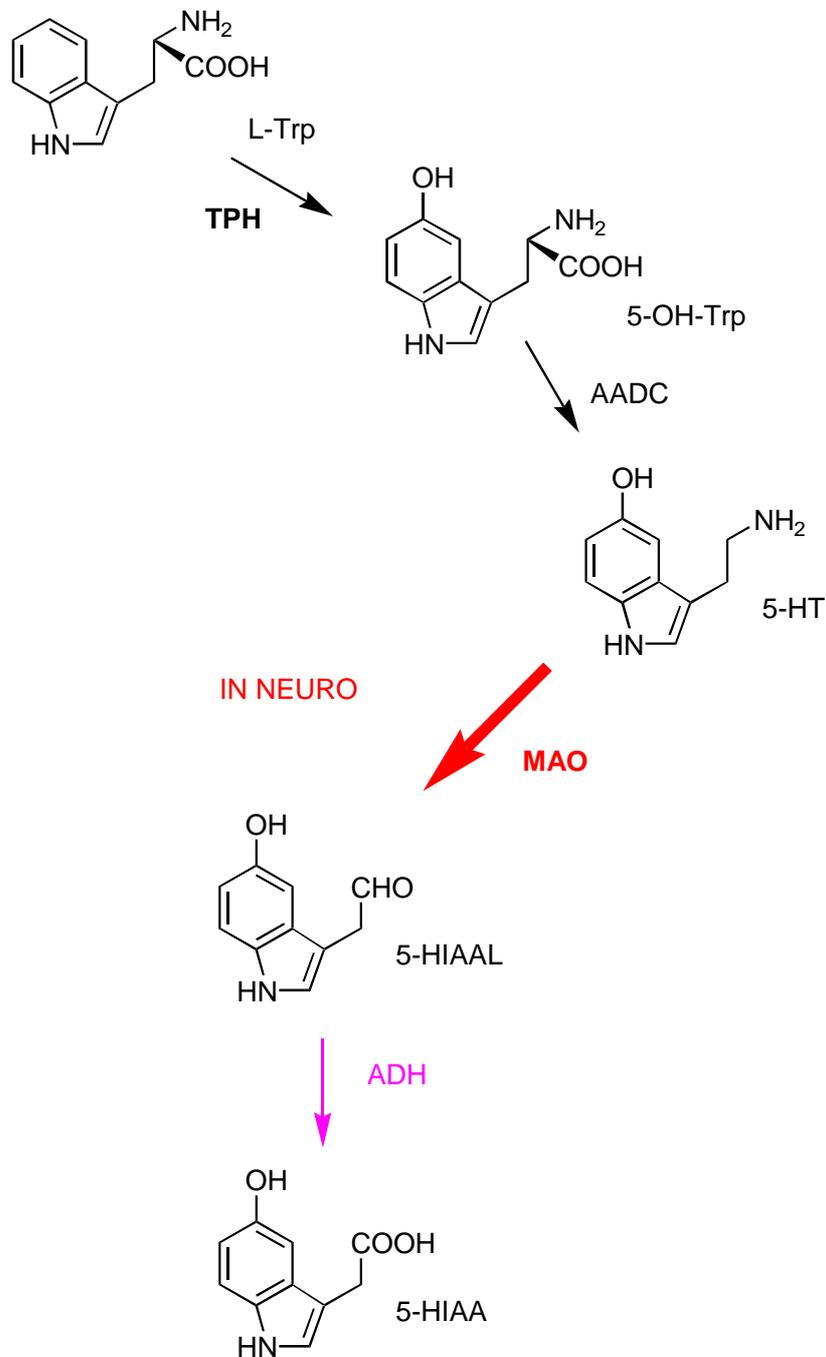


Abb. 2.4.: Neurochemie des Serotonins (Biosynthese und Metabolismus). L-Trp: L-Tryptophan; 5-OH-Trp: 5-Hydroxytryptophan; 5-HT: 5-Hydroxytryptamin; 5-HIAAL: 5-Hydroxyindolacetaldehyd; 5-HIAA: 5-Hydroxyindoleessigsäure; TRP: Tryptophanhydroxylase; AADC: Aromatische Aminosäuren-Decarboxylase; MAO: Monoaminoxidase; ADH: Aldehyddehydrogenase.

Die Rezeptoren der 5-HT₄-, 5-HT₆-, 5-HT₇-Familien sind G_s-Protein-gekoppelt und aktivieren die Adenylatcyclase mit anschließender Erhöhung des cAMP. Sie sind vor allem in den Basalganglien und im Hippocampus lokalisiert, doch ist über ihre physiologische Funktion noch wenig bekannt. Für den 5-HT₅-Rezeptortyp ist die Kopplung bisher nicht bekannt.

Eine Ausnahme unter den (überwiegend metabotropen) Serotoninrezeptoren bildet der ionotrope 5-HT₃-Rezeptor. Bei Aktivierung erhöht sich die Offen-Wahrscheinlichkeit des pentameren Rezeptor-Ionenkanals, Na⁺- und Ca²⁺-Ionen können in die Zelle einströmen - dadurch wirkt dieser Rezeptor schnell exzitatorisch. Lokalisiert ist der 5-HT₃-Rezeptor im ZNS vorwiegend im Striatum und im Hippocampus sowie der Substantia nigra; jedoch ebenfalls auf sympathischen Neuronen - dadurch kommt es bei Aktivierung zu einer sympathischen aber auch parasympathischen Neuroexzitation (zusammengefasst in [4;5]).

2.4.5. Physiologische Funktionen und Therapierelevanz

Serotonin ist an vielen Steuerungsfunktionen im ZNS beteiligt, wie etwa der Kontrolle von Schlaf-Wach-Rhythmus, Thermo-, Schmerz- und Appetitregulation, Emesis, Sexualverhalten, Emotionen, Aggressions- sowie psychotischem Verhalten [177].

Der Schlaf-Wach-Rhythmus wird in komplexer Interaktion mit NA, DA und ACh vermittelt; Applikation von 5-HT-Vorläufern (Tryptophan) oder Inhibition deren Abbaus führt zur Induktion verschiedener EEG-Schlafanzeichen und in Tieren und beim Menschen zur Erhöhung der Schlafdauer, Erniedrigung der Schlaflatenz und Blockade des REM-Schlafes [151].

Die starke serotonerge Komponente bei der Auslösung der Emesis wird therapeutisch genutzt: Neben Antihistaminika und Dopaminantagonisten werden (vor allem als Begleitmedikation zur Krebstherapie mit antineoplastischen Substanzen) als Antiemetika 5-HT₃-Rezeptor-Antagonisten wie das Ondansetron (Zofran®) verwendet.

Eine weitere wichtige therapeutische Bedeutung kommt im Einsatz der Triptane (5-HT_{1B}-Agonisten) als Antimigräne-Mittel zur Geltung [102].

Der wichtigste pharmakologische Einsatz von Substanzen, welche an der Regulation des serotonergen Systems eingreifen, ist jedoch in der Therapie der Depression zu finden. Antidepressiva steigern den vitalen Antrieb und heben pathologisch gesenkte Grundstimmungen auf.

In den frühen 50er Jahren wurden Psychiater aufmerksam, als bei der Verschreibung von Reserpin⁹ gegen Bluthochdruck in 15 % der Fälle als Nebenwirkung eine schwere Depression auftrat [202]. Ausserdem ist die Konzentration von 5-HT und 5-HIAA im Liquor depressiver Patienten vermindert, bei Tryptophangabe steigt der 5-HT-Gehalt im Liquor stärker an, während der 5-HIAA-Gehalt gleich bleibt. Dies deutet auf eine Schlüsselrolle des Serotonins (neben Noradrenalin) in der Pathophysiologie der endogenen Depression hin [2]. Neuere Arbeiten zeigen einen Zusammenhang zwischen Depression, Suiziden und einem genetischen Polymorphismus des Serotonin-Synthesenzym Tryptophanhydroxylase (jedoch nicht bei bipolaren Störungen) [309].

Trizyklische Antidepressiva sind sehr effektiv in der Therapie der Depression; durch Effekte an anderen Neurotransmittern (Histamin, Acetylcholin) muß man jedoch Nebenwirkungen in Kauf nehmen [2]. Die moderne Pharmakotherapie der Depression wird mit selektiven Serotoninreuptake-Inhibitoren (SSRI) durchgeführt. Zu dieser Klasse zählen Stoffe wie Fluoxetin, Fluvoxamin, Paroxetin und Citalopram, welches der derzeit selektivste SSRI ist [98;131].

2.5. Dopamin

2.5.1. Allgemeines

Ein zu den Katecholaminen zählender Neurotransmitter, mit großer Bedeutung in der Klinik, ist das Dopamin (DA). Die wohl bekannteste Krankheit, welche durch die Degeneration dopaminergener Neurone der Substantia nigra (-pars compacta; SNc) verursacht wird, ist Morbus Parkinson, 1817 zum ersten Mal beschrieben durch den Londoner Arzt James Parkinson („An essay on the shaking palsy“). Wie heute bekannt ist, führt der Verlust der dopaminergen Neurone zu einer Dopamin-Unterfunktion in den Basalganglien, welche in einer massiven Dysregulation des Neurotransmitter-Gleichgewichts im Vorderhirn resultiert¹⁰

⁹ Reserpin (Alkaloid von *Rauwolfia serpentina*) bewirkt eine Entleerung der Speichervesikel für Dopamin, Noradrenalin, Adrenalin und Serotonin; in hohen Dosierungen schädigt Reserpin die Speichervesikel für Monoamine wahrscheinlich irreversibel [2;92].

¹⁰ Ein Mangel an Dopamin führt über eine Überfunktion der indirekten striatalen Bahn und des subthalamischen Nucleus (STN) und über Unterfunktion der direkten striatalen Bahn zu einer Enthemmung der Substantia nigra pars reticulata sowie des internen Globus pallidus, welche dadurch den Thalamus unphysiologischer Weise hemmen. Der Feedback zum Cortex reicht somit nicht mehr aus, um normales Verhalten zu generieren;

[37;277]. Die daraus folgende Unterfunktion der extrapyramidalen Afferenzen im prämotorischen Cortex führt wiederum zu der Symptomtrias des Morbus Parkinson: Rigor (krankhaft erhöhter Muskeltonus, „Zahnradphänomen“ bei passiver Bewegung), Tremor (Zittern) und Akinese (Bewegungsarmut) [331]. Die Parkinson-Symptomatik muss jedoch auch auf kognitive Störungen erweitert werden: Parkinson-Patienten leiden an kognitiven Störungen, und zwar vorrangig an Störungen des (egozentrischen, impliziten) Gewohnheitslernens bei unbeeinträchtigtem deklarativem (expliziten) Lernen; diese Effekte sind ebenfalls in Tiermodellen des Parkinson nachgewiesen worden [150;276]. Im Hinblick auf das Zusammenwirken der verschiedenen Monoamin-Neurotransmitter ist die Tatsache, dass Symptome der Depression mit denen der Parkinson-Krankheit oft einhergehen [44;104], ebenfalls von großer klinischer Relevanz: Depression bei Parkinson-Patienten korreliert mit erniedrigten 5-HT-Spiegeln im Liquor; ausserdem wurde post mortem bei Parkinson-Patienten beobachtet, dass die noradrenergen Neurone des Locus Coeruleus ebenfalls degeneriert sind [133].

2.5.2. Anatomie des dopaminergen Systems

Die größte Ansammlung Dopamin-enthaltender Neurone ist vorrangig in den katecholaminergen Zellgruppen des ventralen Mesencephalons zu finden. Die am besten erforschten Zellgruppen sind die Kerne A8 (retrochubraler Nucleus), A9 (Substantia nigra, pars compacta; SNc) und A10 (ventrales tegmentales Areal, VTA), welche vorwiegend durch das mediale Vorderhirnbündel (mfB) in das Telencephalon projizieren.

Insgesamt kann man verschiedene Systeme der dopaminergen Projektionen einteilen: sog. „Ultrakurzstrecken-Systeme“ wie die dopaminergen Verbindungen innerhalb der Retina und des Bulbus olfaktorius; die „Mittelstrecken-Systeme“ wie das tuberoinfundibuläre und incertohypothalamische System, welche die dopaminerge Innervation vom Hypothalamus zur Hypophyse bzw. innerhalb des Hypothalamus darstellen; und schließlich die „Langstreckensysteme“, d.h. drei Hauptprojektionen der Zellgruppen A8-10 zum Telencephalon:

1. die *mesostriatale* Projektion von der SNc (A9) vorrangig zum Neostriatum
2. die *mesocortikale* Projektion von der VTA (A10) zum medialen präfrontalen (mPFC), cingulären (Cg) und insulären (Ins) Cortex

außerdem kommt es in der SN zur Überaktivität der glutamatergen Afferenzen aus dem STN, welche via NMDA-Rezeptoren zu einer starken Exzitotoxizität [221] führen kann (siehe auch „Basalganglien“-Abschnitt).

3. die *mesolimbische* Projektion der VTA zu vorrangig limbischen Hirnarealen, d.h. Septum, Olfaktorischer Tuberkel, Nucleus accumbens (NAcc), Amygdala und piriformer Cortex

Kollateralisation der genannten Bahnen ist jedoch sehr verbreitet und stellt ein wichtiges Organisationsprinzip des mesotelencephalen Systems dar (Zusammenfassung in [35;60]).

2.5.3. Biosynthese und Abbau

Dopamin wird wie alle Catecholamine aus der Aminosäure L-Tyrosin synthetisiert, indem zum Ersten durch das Enzym Tyrosinhydroxylase eine Hydroxylgruppe an der Position 3 des Phenylringes angebracht wird: Man erhält das L-3,4-Dihydroxyphenylalanin (L-DOPA). Anschließend wird durch die Aromatische-Aminosäuren-Decarboxylase die Carbonsäuregruppe der Aminosäure abgespalten: Es entsteht 3,4-Dihydroxyphenethylamin = Dopamin (DA).

Freigesetztes Dopamin kann wiederaufgenommen werden durch ein spezifisches Transporterprotein (Dopamintransporter; DAT). Innerhalb des dopaminergen Neurons wird Dopamin durch die Monoaminoxidase (MAO) zu Dihydroxyphenylelessigsäure (DOPAC) oxidiert. An einer extraneuronalen Stelle wird Dopamin auch durch das Enzym Catechol-O-methyltransferase (COMT) zu 3-Methoxytyramin (3-MT) und anschließend an der MAO weiter zur Homovanillinsäure (HVA) metabolisiert (Zusammengefasst in [60]).

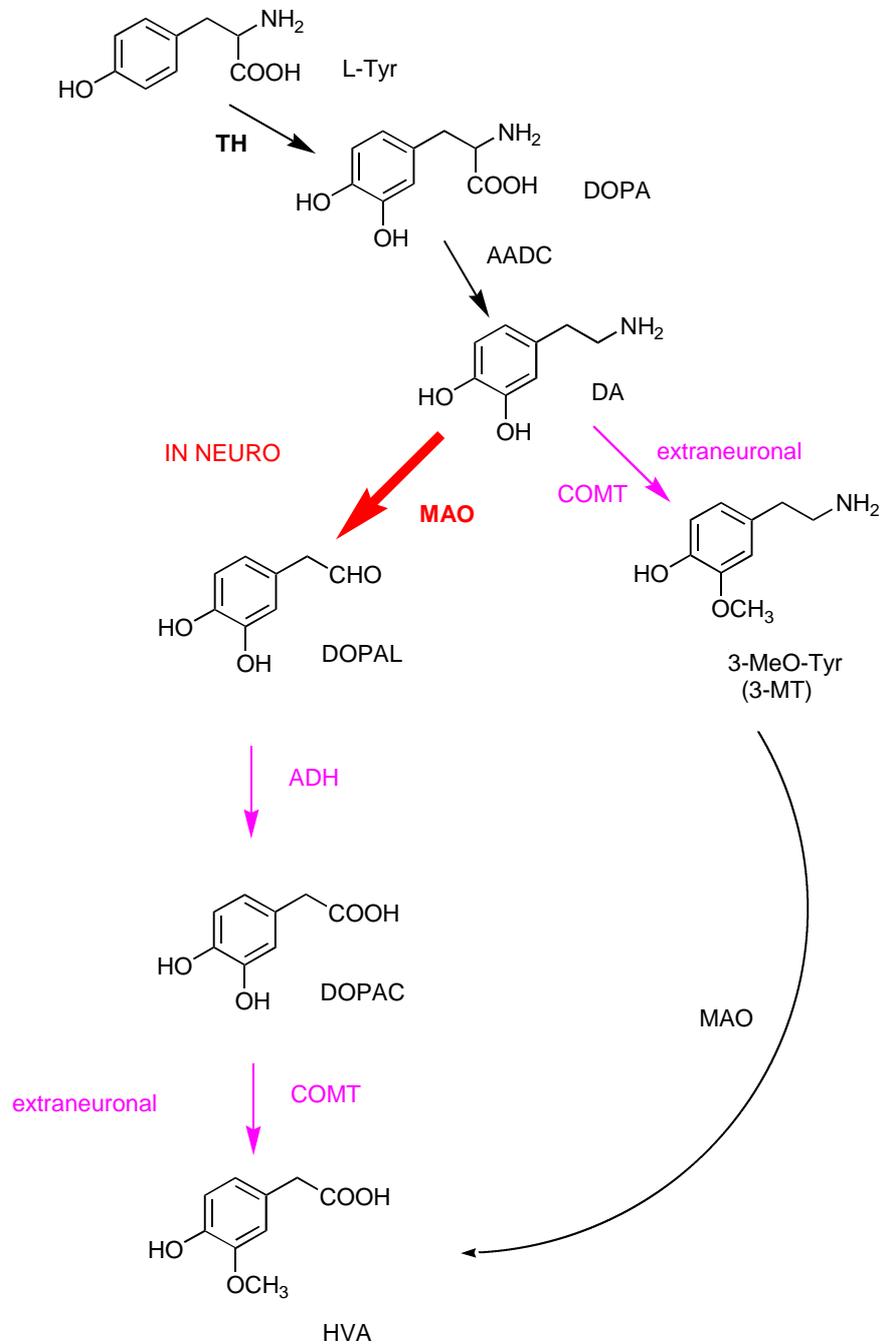


Abb. 2.5.: Neurochemie des Dopamins (Biosynthese und Metabolismus). L-Tyr: L-Tyrosin; DOPA: Dihydroxyphenylalanin; DA: Dopamin; DOPAL: Dihydroxyphenylacetaldehyd; 3-MT: 3-Methoxytyramin; DOPAC: Dihydroxyphenylelessigsäure; HVA: Homovanillinsäure; TH: Tyrosinhydroxylase; AADC: Aromatische Aminosäuren-Decarboxylase; MAO: Monoaminoxidase; ADH: Aldehyddehydrogenase; COMT: Catechol-O-methyltransferase.

2.5.4. Dopaminerge Rezeptoren

Es kommen 5 verschiedene DA-Rezeptorsubtypen vor, wobei alle metabotrop (G-Proteingekoppelt) sind. Grob werden zwei große Familien unterschieden: die D₁-Rezeptorfamilie (positive Kopplung an die Adenylatcyklase) und die D₂-Rezeptorfamilie (negative Kopplung an die Adenylatcyklase). Molekulares Klonen ergab zwei Mitglieder der D₁-Rezeptorfamilie: den D₁- und D₅-Rezeptor; und drei Mitglieder der D₂-Rezeptorfamilie: den D₂-, D₃- und D₄-Rezeptor.

Die D₁- und D₂-Rezeptoren sind mit der höchsten Dichte im dorsalen und ventralen Striatum vertreten, der D₂-Rezeptor wird als Autorezeptor auf dopaminergen Neuronen des Mittelhirns exprimiert, wobei kürzlich gezeigt werden konnte, dass der D₂-Rezeptor in zwei Isoformen vorkommt¹¹. Die D₁- und D₂-Lokalisation im Caudatoputamen (dorsalen Striatum; CPu) kommt auf den sog. „medium spiny“-Neuronen (MSN) vor, wobei die striatonigral projizierenden MSN vorrangig den D₁-Rezeptor zusammen mit Substanz P und Dynorphin exprimieren, die striatopallidal projizierenden MSN jedoch den D₂-Rezeptor kolokalisiert mit Enkephalin exprimieren. Diese fest verwurzelte Annahme wird jedoch in neuester Zeit teilweise erschüttert, da sowohl eine Kollateralisierung der striatofugalen Projektionen sowie eine Koexpression der D₁- und D₂-Rezeptoren auf MSN gefunden wurde [13;217].

Die D₃-Rezeptoren sind weniger dicht im dorsalen Striatum (CPu), dafür prominent im NAcc lokalisiert. D₄- und D₅-Rezeptoren kommen nicht im Striatum vor, sondern werden im frontalen Cortex, Hippocampus, der Amygdala und im Hypothalamus exprimiert (Übersicht in [4;283]).

2.5.5. Klinische Relevanz

Das dopaminerge System ist für die Therapie zweier wichtiger Krankheiten von Bedeutung: Zum einen ist das nigrostriatale dopaminerge System (wie oben bereits beschrieben) degeneriert in der Parkinson'schen Krankheit. Arvid Carlsson, welcher die Pionierarbeit der Dopaminforschung durchführte und Dopamin als essentiellen Transmitter im Gehirn etablierte, verglich ebenfalls als erster die Symptome nach Reserpingabe mit der Parkinsonsymptomatik. Seine Untersuchungen sowie die erfolgreiche Therapie des

¹¹ ... einer kurzen (D2S), welche präsynaptisch als Autorezeptor fungiert, und einer langen (D2L), welche postsynaptisch vorkommt. Die Isoformen rühren von unterschiedlichem Exon-Splicing her, die lange Isoform erhält somit ein zusätzliches 29-Aminosäuren-Segment innerhalb der dritten zytoplasmatischen Schleife, was in der Konsequenz unterschiedliche G-Protein-Bindung sowie unterschiedliche regionale Distribution ergibt.

Dopaminmangels in der Parkinson-Krankheit mit dem Dopamin-Vorläufer L-DOPA wurden im Jahr 2000 mit dem Nobelpreis für Medizin und Physiologie belohnt [8;51].

Zum anderen ist eine Hyperfunktion des nigrostriatalen und mesolimbischen dopaminergen Systems für einen Teil der Symptome der Schizophrenie verantwortlich. Die Behandlung der Patienten mit Neuroleptika brachte eine entscheidende Wende in der Psychiatrie. D₂-Rezeptor-Antagonisten stellen die klassische Schiene der Therapie der Schizophrenie dar, jedoch werden bei potenten D₂-Antagonisten extrapyramidale Nebenwirkungen (Parkinson-Symptomatik) beobachtet. Die Erfolge auf der Suche nach atypischen Neuroleptika brachten eine bedeutende Verbesserung der Therapie. Der Wirkmechanismus ist bislang nicht vollständig geklärt; Man geht davon aus, dass die atypischen Neuroleptika vorwiegend im ventralen Striatum (NAcc) ihre Wirkung entfalten - wahrscheinlich über einen D₃- oder D₄-Antagonismus, jedoch haben diese Substanzen ebenfalls Bindungsaffinitäten an anderen Rezeptoren. Ein gemischter D_{2/3}- / 5-HT₂-Antagonismus wird als möglicher Vorteil diskutiert (Zusammenfassung in [52]).

2.6. Noradrenalin

In der frühen Nachkriegszeit konnten von Euler und Holtz zeigen, dass sympathische Neurone der Säugetiere Noradrenalin (statt Adrenalin, wie bei Amphibien) als Transmittersubstanz verwenden. Marthe Vogt gelang es 1954 sogar, eine Neurotransmitterfunktion des Noradrenalins im Gehirn zu beweisen (als zweiter Neurotransmitter nach Acetylcholin) [60]. Inzwischen weiß man, dass im ZNS sowohl noradrenerge (NA) als auch adrenerge (Adr) Neurone vorkommen, jedoch sind sogar in Adr-reichen Gebieten wie dem Hypothalamus die Konzentrationen an NA um ein Vielfaches höher [298]. Aus diesem Grunde wird der Fokus in dieser Arbeit auf Noradrenalin gerichtet.

2.6.1. Allgemeines

Noradrenalin zählt zu den Catecholaminen wie Adrenalin und Dopamin, welche als gemeinsame Struktur das Brenzcatechin (ortho-Dihydroxybenzol) besitzen.

Es ist an der Regulation einer Vielzahl von peripheren sowie zentralen Körperfunktionen beteiligt. Die bekannteste physiologische Wirkung des Noradrenalins ist die Involvierung in die Verschaltung der sympathischen Neurone: das postganglionäre sympathische Neuron ist noradrenerg. Ferner sind noradrenerge Neurone der Peripherie ein essentieller Bestandteil des Darmnervensystems [2;331]. Im ZNS spielt Noradrenalin eine Rolle in der Regulation des Schlaf-Wach-Rhythmus, der Nahrungsaufnahme und des Kreislaufs [2]; es ist mit involviert in die Modulation der neuronalen Verschaltungen innerhalb der Basalganglien und im Cortex. Wie bereits oben beschrieben, wurden in post mortem untersuchten Gehirnen von Parkinson-Patienten verminderte Konzentrationen von Noradrenalin gemessen, was auf eine mögliche Rolle von Noradrenalin in der Pathophysiologie des Morbus Parkinson hindeutet. Tatsächlich deuten zahlreiche Studien auf eine mögliche neuroprotektive Rolle des Noradrenalins für dopaminerge Neurone (detailliertes Review: [93]).

Noradrenalin ist ebenfalls involviert in die Pathophysiologie der endogenen Depression: Mit der Besserung der Depression steigen z.B. auch die Stoffwechselprodukte des Noradrenalins [2]. Neue Arzneimittel, welche neben der selektiven Wiederaufnahmehemmung des Serotonins auch die Wiederaufnahme des Noradrenalins in die präsynaptischen Nervenendigungen hemmen (Venlafaxin) oder eine reine Wiederaufnahmehemmung des Noradrenalins vermitteln, besitzen eine exzellente antidepressive Potenz [80;141;146].

2.6.2. Anatomie des Noradrenalins

In Nagern wurden 7 noradrenerge Zellgruppen identifiziert; die meisten von ihnen (außer A3) ebenfalls beim Menschen. Sie lassen sich in zwei große Gruppen unterteilen: die medullär lokalisierten und die pontin lokalisierten Nervenzellgruppen.

In der medullären Zellgruppe finden sich die zwei Zellgruppen A1 & A2¹².

Die pontine Zellgruppe besteht aus zwei Untergruppen: Die Kerne A5 & A7 sind mehr median und caudal in der Pons lokalisiert¹³. Die Kerngruppen A4 und A6 im dorsolateralen Teil des Stammhirns bilden schließlich den größten noradrenergen Kern, welcher zusammengefasst als Locus Coeruleus (LC) - „*Blauer Kern*“ - bezeichnet wird¹⁴.

Korrespondierend mit der Haupteinteilung der noradrenergen Zellgruppen lassen sich auch zwei große Projektionsfaserstränge identifizieren: Die medulläre Zellgruppe (A1/2) innerviert lokal die Medulla und die Raphe-Kerne, projiziert jedoch als das ventrale noradrenerge Bündel (VNAB) vorrangig ins limbische Vorderhirn (Hypothalamus, periaquäduktales Grau, BNST, Septum, Habenula und Amygdala) und bildet einen großen Anteil der noradrenergen Innervation (25-75%) dieser Hirnareale, überlappt jedoch die coeruleären Projektionen (wobei jeder Nucleus abgegrenzte Areale des limbischen Vorderhirns innerviert). Der Cortex erhält keine Projektionen aus A1 und A2, sondern wird fast ausschließlich durch den LC innerviert. Der LC hat drei Hauptprojektionen: ascendierende, descendierende und cerebelläre. Von den drei ascendierenden Projektionen stellt das dorsale noradrenerge Bündel (DNAB) den wichtigsten Fasertrakt des LC dar¹⁵. Der LC innerviert somit den gesamten Neocortex, Hippocampus, cholinerge Kerne wie Septum und NBM, Thalamus, jedoch auch den DRN, dopaminerge Mittelhirnkerne (SN < VTA) und in geringerem Ausmaß das dorsale und ventrale Striatum (CPu << NAcc).

Ein weiteres interessantes Merkmal noradrenerger Axone ist der morphologische Unterschied der medullären und der coeruleären Neurone: Während die medullären Neurone große Varikositäten besitzen, sind die coeruleären Neurone stark verzweigt und haben sehr kleine

¹² A1 liegt in der lateralen Formatio reticularis (F.R.); A2 ist im Nucleus solitarius und Nucleus dorsalis nervi vagi lokalisiert – zahlreiche A2 Neurone liegen in der Area postrema.

¹³ A5 im caudolateralen Teil des pontinen Tegmentums, A7 im rostralen Teil der lateralen F.R.

¹⁴ Seinen Namen verdankt der „Blaue Kern“ den Untersuchungen von Reil, der 1809 im Boden des 4. Ventrikels im menschlichen Gehirn einen „Streifen einer blau-schwarzen Substanz“ beschrieb [16].

¹⁵ Das DNAB vereinigt sich mit Fasern des dorsalen longitudinalen Faszikulus und des ventralen Vorderhirnbündels schlussendlich im medialen Vorderhirnbündel, welches die wichtigste mesotelencephale Projektionen aller monoaminergen Axone darstellt.

Varikositäten. Ähnlich der Raphe-Neurone zeigen diese unterschiedlichen Neuronenpopulationen auch unterschiedliche Vulnerabilität auf die Behandlung mit dem noradrenergen Neurotoxin DSP-4: Eine DSP-4 Injektion schädigt selektiv die Axone der LC-Neurone (detaillierte Information in Kapitel 7; zusammengefasst in [62;82;90;194;207]).

2.6.3. Biosynthese und Abbau des Noradrenalins

Noradrenerge Neurone enthalten ebenso wie dopaminerge Neurone das Synthesenzym Tyrosinhydroxylase, welches die Aminosäure L-Tyrosin zu L-DOPA umsetzt. Aus L-DOPA wird durch die Aromatische-Aminosäuren-Decarboxylase weiter Dopamin gebildet, welches jedoch durch die Dopamin- β -hydroxylase weiter umgesetzt wird zu Noradrenalin (NA). Nach Freisetzung aus dem Neuron und Wiederaufnahme durch den spezifischen Noradrenalin-Transporter (NAT) wird NA an der MAO zur 3,4-Dihydroxymandelsäure (DOMA) oxidiert. In Nachbarzellen (Glia) kann NA durch die COMT zu Normetanephrin umgesetzt werden, welches durch die Aldehydreduktase zu 3-Methoxy-4-hydroxyphenylglykol (MOPEG bzw. MHPG) abgebaut werden kann [2;60].

2.6.4. Rezeptoren

Die noradrenergen (und adrenergen) Rezeptoren lassen sich in zwei große Familien einteilen: die α - und die β -Rezeptoren. Zur α -Familie gehören zwei Rezeptortypen: Der α_1 -Rezeptor, welcher $G_{q/11}$ -Protein-gekoppelt ist und hierdurch den Phosphatidylinositol(PI)-Umsatz fördert und zu erhöhten intrazellulären Ca^{2+} -Konzentrationen führt, kommt im ZNS in den meisten noradrenerg innervierten Zellgruppen vor. Der α_2 -Rezeptor, welcher über ein G_i -Protein negativ an die Adenylatzyklase (AC) gekoppelt ist, kommt vor allem im LC als somatodendritischer Autorezeptor vor, jedoch wird er ebenfalls als terminaler Autorezeptor, sowie als präsynaptischer Heterorezeptor auf dopaminergen und serotonergen Axonterminalen exprimiert [298;307;308]. Die Komplexität der α_2 -Rezeptoren wird noch verstärkt durch die nachgewiesene Existenz dreier Subtypen (α_{2A} , α_{2B} , α_{2C}) mit unterschiedlichen Expressionsmustern im ZNS [203].

Die zweite große Gruppe adrenerger Rezeptoren bilden die β -Rezeptoren, von welchen mindestens 3 Typen bekannt sind ($\beta_1, \beta_2, \beta_3$). Sie sind meist G_s -Protein-gekoppelt und stimulieren die Adenylatzyklase.

Der β_1 -Rezeptor kommt vor allem im Cortex, jedoch auch im Hippocampus, Dienzephalon, Cerebellum und Striatum vor. Der β_2 -Rezeptor, an den Adrenalin mit einer höheren Affinität bindet als Noradrenalin (am β_1 -Rezeptor sind Adr und NA nahezu äquipotent), ist mit der höchsten Dichte im Cerebellum exprimiert, kommt jedoch auch im Cortex, Striatum und Hippocampus und Dienzephalon vor. Der β_3 -Rezeptor war früher als „atypischer β -Rezeptor“ bekannt und kommt im ZNS nicht vor (Übersicht: [4;82]).

2.7. Basalganglien

Ein großer Teil dieser Arbeit bezieht sich auf die Neurotransmitter-Regulation in den Basalganglien. Zu den Basalganglien (BG) werden meist diejenigen neuronalen Zellgruppen des Telencephalons (Endhirns) gezählt, welche nicht zu cortikalen Strukturen, wie dem Neo- und Allocortex (Hippocampale Formation, olfaktorischer Cortex) zählen. Der Begriff „Basalganglien“ ist jedoch trotz der häufigen Benutzung nicht exakt definiert. Am ehesten kann man jedoch die Basalganglien als „parallele Anordnung zahlreicher Kanäle vom Cortex zum motorischen Thalamus“ sehen; zu diesen Strukturen gehören das telencephale Striatum, magnozellige Nuclei des basalen Vorderhirns, das diencephale Pallidum, die tuberomammillären Kerne, die Substantia nigra und die paranigralen und pigmentierten parabrachialen Kerne [39]. Die Funktionen der BG sind sehr komplex und nur zu einem kleinen Teil erforscht. Der Grund, warum die BG-Forschung sich als so schwierig darstellt, ist wohl darin zu finden, dass die einzelnen Kerne der BG keinen eindeutigen Output in das Rückenmark haben, sondern in (cortiko-BG-thalamo-cortikale) Schleifen eingebettet sind mit einer Vielzahl an beteiligten Neurotransmittern und massiver Kollateralisation [39;277].

Die Rolle der BG wird intensiv erforscht in Verbindung mit Erkrankungen des motorischen Systems (Morbus Parkinson, Chorea Huntington) [14]. Neuere Untersuchungen zeigen jedoch, dass die BG nicht nur motorische Muster generieren, sondern essentiell sind in der kognitiven Steuerung komplexer Verhaltensmuster sowie Vermittlung von (implizitem) Gewohnheitslernen [276].

Die Rolle der Basalganglien könnte zusammenfassend charakterisiert werden in einer (eher) bahrenden (als initiierenden) Rolle in der Kontrolle der Motorik (und sonstigen Verhaltensrepertoires). Da die Aktivität der Inputs ins Striatum zu einem großen Teil dessen Outputs bestimmt (und somit das gewählte Verhalten), kann man sagen, dass „[afferente] Inputs aus assoziativen und limbischen Strukturen ins Striatum die Komponenten komplexer kognitiver oder Verhaltens-Prozesse verstärken oder unterdrücken oder, mit anderen Worten, selektieren und sequenzieren“ [111].

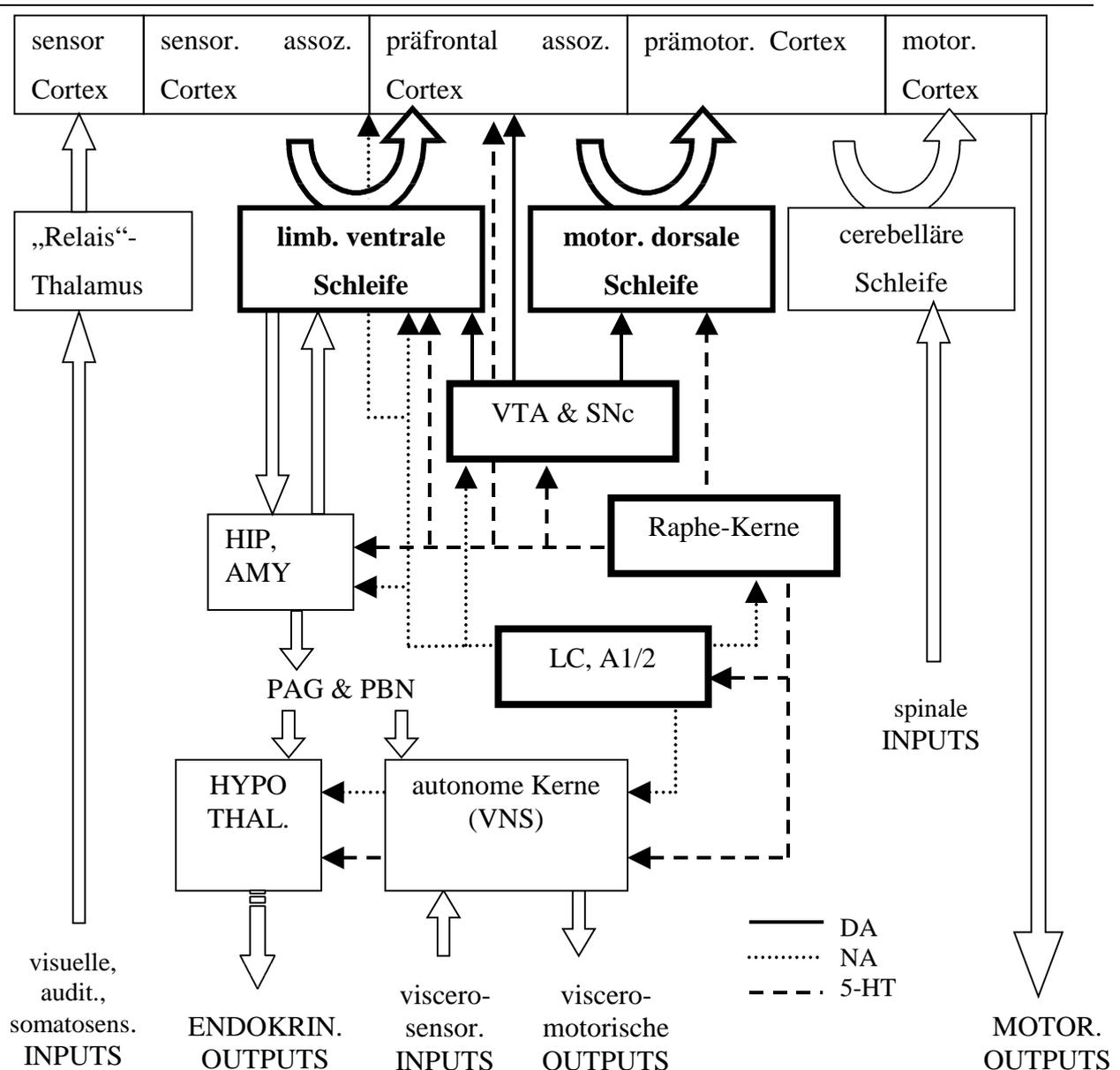


Abb. 2.6.: Vereinfachte Darstellung der Einbettung der Basalganglien in die Schaltkreise des Gehirns, welche die endokrinen, autonomen und motorischen (Verhalten) Reaktionen des Organismus auf verschiedene sensorische Eingänge steuern. Die limbische ventrale Schleife besteht aus dem ventralen Striatum (NAcc), dem ventralen Pallidum (VP) und dem mediodorsalen Thalamus (MD). Die (extrapyramidal) motorische dorsale Schleife besteht aus dem dorsalen Striatum, dem Globus pallidus externus und internus (GPe, GPi), der Substantia nigra pars reticulata (SNr) und den ventroanterioren, ventromedialen und ventrolateralen Gebieten des Thalamus (VA, VM, VL). Modifiziert nach Braak & Braak [40], unter besonderer Berücksichtigung der dopaminergen, noradrenergen und serotonergen Innervation der Basalganglien und der limbischen und autonomen Zentren.

Die Basalganglien sind in parallel verlaufende (funktional getrennte) Schaltkreise eingebunden [15]. Dabei erhält das Striatum (Nucleus caudatus und Putamen beim Primaten, Caudatoputamen bei der Ratte; CPU) generell topographisch geordnete glutamaterge Projektionen vom Cortex (und dem Thalamus), striatofugale Projektionen führen über das Pallidum oder die Substantia nigra zum Thalamus und zurück zum Cortex. Im Primaten sind fünf parallel verlaufende Schleifen zu finden, für die hier vorgenommenen Untersuchungen werden jedoch nur zwei als relevante Schaltkreise näher beschrieben.

Zum einen sind zwei dorsostriatale Schleifen an der Verarbeitung motorischer, aber auch kognitiver Informationen beteiligt. Die striatalen Ausgangsneurone („medium spiny Neurons“) erhalten Inputs aus prämotorischen, supplementär motorischen, assoziativen und sensorischen Cortexgebieten; die cortikale-Informationsverarbeitung im Striatum wird jedoch stark moduliert durch dopaminerge, serotonerge (und noradrenerge¹⁶) Afferenzen aus dem Mittelhirn, der Pons und der Medulla.

Die „direkte“ dorsostriatale Schleife beinhaltet die striatofugale Projektion auf Neurone des internen Segments des Globus pallidus (GPi) und der Substantia nigra pars reticulata (SNr) und die weiteren Projektionen auf die thalamischen Ausgangsstrukturen. Diese GABAergen Neurone tragen Substanz P und Dynorphin als Kotransmitter und exprimieren D1-RezeptormRNA. Die „indirekte“ Schleife projiziert zunächst auf Neurone des externen Segments des Globus pallidus (GPe), dann über glutamaterge Neurone des subthalamischen Nucleus (STN) und weiter über die GPi/SNr auf die Ausgangsstrukturen, d.h. den ventroanterioren, ventrolateralen und ventromedialen Thalamus (VA, VL, VM), welcher weiter vorrangig in den prämotorischen Cortex projiziert. Die striatalen Ausgangsneurone der indirekten Schleife bilden Enkephalin als Kotransmitter und exprimieren D2-Rezeptoren.

Eine dopaminerge Ausschüttung im dorsalen Striatum führt also zu einer Verstärkung der direkten Bahn und der Inhibition der indirekten Bahn; ein gestörtes Gleichgewicht der Neurotransmitter-Aktivität im Striatum (durch Hypo- oder Hyperaktivität der striatalen Afferenzen oder Gabe von Rezeptorliganden) oder gestörte Funktion der eigentlichen striatalen Ausgangsneurone führt daher zur Ausprägung der Symptomatik verschiedener neurologischer und psychiatrischer Störungen (u.a. des Morbus Parkinson, Chorea Huntington, Schizophrenie). Umgekehrt kann eine Medikation mit geeigneten Pharmaka die Symptomatik dieser Störungen – zumindest teilweise - beheben [275;277].

¹⁶ In histochemischen und autoradiographischen Studien wurden noradrenerge Axonterminale eher im ventralen als dorsalen Striatum gefunden (siehe Kap. 2.6.).

Zum anderen existiert als Pendant der dorsostriatalen Schleifen eine ventrale Schleife, welche vom ventralen Striatum (vorrangig Nucleus accumbens, NAcc) hauptsächlich zu den Neuronen des ventralen Pallidums (VP) projiziert und von hier zum mediodorsalen Thalamus (MD) und weiter zu limbischen Cortexgebieten führt. Das ventrale Striatum erhält vor allem limbische Afferenzen (vom präfrontalen Cortex, dem Hippocampus, von der Amygdala) und wird moduliert durch dopaminerge Afferenzen aus dem VTA, serotonergen Afferenzen aus dem DRN und noradrenergen Afferenzen aus dem LC und den medullären noradrenergen Zellgruppen A1 und A2. Aufgrund der engen Verbindung mit limbischen Strukturen weist der NAcc nicht nur motorische Funktionalität auf, sondern ist vielmehr in motivationalen und emotionalen Prozessen involviert, insbesondere als Bestandteil des Belohnungssystems. Diesbezüglich lässt sich anmerken, dass sich der NAcc morphologisch und funktional in zwei wichtige Bestandteile differenzieren lässt: Die ventrale Fortsetzung des Caudatoputamens (mit eher motorischen Funktionen) stellt der den Faserstrang der anterioren Kommissur umspannende „Kern“-Anteil – der „Core“ – des NAcc dar, wohingegen die medial und ventral den Core umgebende „Schale“ – die „Shell“ – des NAcc eher als Übergangszone zwischen Striatum und der „extended Amygdala“ angenommen wird, einer Zusammenstellung zentromedialer Elemente des Mandelkerns, welche rostral ins basale Vorderhirn ausläuft und eng mit der Prozessierung von Emotionen und Affektivität in Zusammenhang gebracht wird (Zusammengefasst in [111]).

3. Fragestellung, Ziele der Arbeit

Wie bereits erwähnt, wurde MDMA als Betäubungsmittel eingestuft. Nach dem BtMG werden Stoffe und Zubereitungen in die Anlagen I-III des Gesetzes aufgenommen, wenn dies „[...] wegen der Wirkungsweise [...] vor allem im Hinblick auf das Hervorrufen einer Abhängigkeit, [...] wegen des Ausmaßes der missbräuchlichen Verwendung und wegen der unmittelbaren oder mittelbaren Gefährdung der Gesundheit erforderlich ist“¹⁷. MDMA scheint all diese Kriterien zum großen Teil zu erfüllen. Um den beschriebenen negativen Wirkungen von MDMA möglichst effektiv präventiv und therapeutisch entgegenwirken zu können, ist es zwingend erforderlich, die Mechanismen der suchterzeugenden und neurotoxischen Wirkung von MDMA genau zu kennen und zu verstehen. Obwohl viele Aspekte dieser Mechanismen bekannt und beschrieben sind, ist die Forschung vom genauen und vollständigen Verständnis der MDMA-Wirkungen noch weit entfernt (BAP/CNPS Workshop: Psychopharmacology of Cannabis and Ecstasy; Brno, April 2002). Zudem weisen sowohl frühere Erfahrungen aus der Psychotherapie als auch aktuelle episodische Berichte von Parkinson-Patienten auf ein signifikantes therapeutisches Potential von MDMA hin, dessen Mechanismus ebenfalls unzulänglich oder teilweise überhaupt nicht erforscht ist.

Weitere Arbeiten in dieser Richtung sind daher (nicht nur aus wissenschaftlichem sondern auch aus öffentlichem Interesse) dringend erforderlich. Ziel dieser Arbeit ist deshalb der Versuch, einen Beitrag zu leisten zur Charakterisierung der Langzeiteffekte von MDMA bei der Ratte im Hinblick auf die Mechanismen der Neurotoxizität und Sucht.

Zu diesem Zweck soll untersucht werden, welche Veränderungen im Verhalten und auf zellulärer Ebene (unter Zuhilfenahme der immunhistochemischen und neurochemischen Methoden) eine akute und subchronische Gabe von MDMA zur Folge hat, und welche Langzeiteffekte diese Behandlung im Verhalten hervorruft.

Nachdem in Kapitel 4 die Darstellung der verwendeten Substanz und die notwendige Qualitätssicherung erläutert wird, sollen im Kapitel 5 zunächst die Akutwirkungen sowie die Langzeiteffekte einer einmaligen Injektion von MDMA auf das Verhalten untersucht werden [sowohl auf das allgemeine Verhalten (Lokomotion, Exploration, Schnüffelaktivität der Ratten), als auch die Akuteffekte von MDMA auf parkinsonoide Symptomatik (um die dopaminergen Effekte von MDMA im potentiell therapeutischen Einsatz zu testen)].

¹⁷ BtMG, §1 [7]

In Kapitel 6 sollen die Langzeitwirkungen in Tiermodellen der Sucht untersucht werden: zum einen im Tiermodell der Verhaltenssensitivierung, zum anderen im Tiermodell der Platzkonditionierung. Diese Versuche werden vor dem Hintergrund des möglichen Suchtpotentials von MDMA diskutiert: Hierbei werden Sensitivierungsprozesse als möglicher wichtiger Mechanismus in der Suchtentstehung, sowie die mögliche Entwicklung des Craving (Verlangen nach dem Suchtstoff), dessen Induktion durch konditionierte Stimuli, Extinktion und Rückfallverhalten berücksichtigt. Insbesondere soll der Einfluss des noradrenergen Systems und des sozialen Umfelds auf die Entwicklung der genannten Verhaltensparameter untersucht werden.

In Kapitel 7 schließlich werden die Effekte einer einmaligen sowie einer subchronischen Behandlung mit MDMA auf zellulärer Ebene untersucht im Hinblick auf die Expression des induzierbaren Transkriptionsfaktors c-Fos, sowie der apoptose-regulatorischen Proteine der Bcl-Familie. Bei der Diskussion der Daten wird eine mögliche Rolle dieser Proteine in Neurodegenerations- und Protektionsmechanismen, sowie die Funktion von induzierbaren Transkriptionsfaktoren als neuronale Aktivitätsmarker berücksichtigt. Zudem sollen die serotonergen Neurone angefärbt werden zum Zweck der mikroskopischen Betrachtung des Ausmaßes und der Kinetik der Serotonin-Entleerung durch einmalige und subchronische MDMA-Behandlung. Die immunhistochemische Färbung der serotonergen (und catecholaminergen) Neurone soll darüberhinaus die Zuordnung der c-Fos-Expression zu relevanten Neuronenpopulationen ermöglichen.

Die Entleerung des Serotonins sowie seines Metaboliten, aber auch Fluktuationen in Konzentrationen anderer Monoamine (DA, NA) wird in Hirn-Gewebshomogenaten mittels der HPLC-gestützten neurochemischen Analytik quantifiziert. Über die neurochemische Analytik soll das Ausmaß und die Kinetik der serotonergen Neurotoxizität, die Effekte auf andere monoaminerge Neurotransmitter sowie eine potentielle neuroprotektive Rolle des Noradrenalins untersucht werden.

Es wird ebenfalls der Versuch unternommen, die Beobachtungen im Verhalten und auf der zellulären Ebene mit dem Neurotransmissions-Status zu korrelieren, um in der zusammenfassenden Diskussion die verschiedenen Perspektiven dieser Arbeit auf einen Nenner zu bringen und die Ergebnisse in Hinsicht auf mögliche Mechanismen und ihre klinische Bedeutung zu interpretieren.

4. Darstellung von MDMA

4.1. Vorbemerkung

Das in dieser Arbeit pharmakologisch untersuchte 3,4-Methylendioxyamphetamin-HCl (MDMA; „Ecstasy“) ist zwar über den Chemikalienhandel zu beziehen, jedoch für verhaltenspharmakologische Studien absolut unwirtschaftlich. Daher wurde diese Substanz im Laboratorium des Pharmazeutischen Institutes der Universität Tübingen synthetisch hergestellt.

Die Synthese erfolgte nach der Methode von Braun et al., 1980 [41]. Piperonylacetone unterliegt dem Grundstoffüberwachungsgesetz (GÜG), daher wurde die Synthese beginnend von Piperonal (3,4-Methylendioxybenzaldehyd) ausgeweitet (vgl. [47]).

Zur Qualitätssicherung wurde eine Identitätsprüfung mittels Infrarotspektroskopie und eine Reinheitsprüfung mittels HPLC-DAD/UV durchgeführt.

4.2. Material & Methoden

4.2.1. Substanzen

Alle verwendeten Chemikalien, Lösungsmittel und Reagenzien (p.a.-Qualität) wurden von den Firmen Aldrich, Fluka, Merck und Sigma bezogen.

4.2.2. Geräte

Zur Qualitätssicherung wurden eine HPLC-Anlage (Kontron® mit ChiraDex®-Säule, Merck) mit UV-Diodenarray-Detektor (DAD, Waters) verwendet sowie ein Infrarot-Spektrometer (Bruker).

4.3. Durchführung

MDMA-HCl wurde, wie bereits erwähnt, ausgehend von Piperonal in einer 3-Schritt-Synthese nach Braun et al. [41] nach der folgenden Vorschrift synthetisiert (Abb. 4.1.).

4.3.1. Schritt 1 (Piperonal " Nitrostyrenverbindung):

30 g Piperonal wurden in 120 ml Eisessig gelöst, dann Nitroethan zugegeben. Daraufhin wurden 20 g Cyclohexylamin langsam zugetropft und anschließend wurde das Gemisch unter Rückfluss für 6 h bei $\sim 70^{\circ}\text{C}$ (Wasserbad) gehalten.

Danach wurde abgekühlt auf 30°C und 100 ml H_2O zugegeben, woraufhin das Produkt spontan auskristallisiert. Um die Fällung vollständig zu machen, wurde das Gemisch bei 4°C über Nacht gelagert.

4.3.2. Schritt 2 (Nitrostyrenverbindung " Piperonylaceton):

45 g der in Schritt 1 gewonnenen Nitrostyrenverbindung wurde in H_2O suspendiert, 60 g Eisenpulver, 1,71 g Eisen(III)chlorid zugegeben und mit einem „KPG“-Rührer intensiv gerührt. Unter Eiskühlung wurden langsam 40 ml HCl_{konz} zugetropft. Danach wurde für 3 h mit einem Heizpilz unter Rückfluss siederhitzt.

Im Anschluss wurde das Reaktionsgemisch auf $\sim 40^{\circ}\text{C}$ abgekühlt und danach 100 ml Toluol zugegeben. Nach darauffolgender Filtration wurde der Filterkuchen mit Toluol gewaschen und die Toluolphase wurde abgetrennt. Die organische Phase wurde zuerst einmal mit verdünnter HCl, danach zweimal mit H_2O gewaschen und anschliessend im Vakuum einrotiert.

Mit Hilfe einer Vakuumdestillation (0,018 mbar, 80°C) wurde ein gelbliches Öl gewonnen (Piperonylaceton).

4.3.2. Schritt 3 (Piperonylaceton " MDMA):

27,3 g Methylamin-HCl wurden in 93 ml Methanol gelöst, 7 g Piperonylaceton und anschliessend wurden (portionsweise) 3,2 g Natriumcyanoborhydrid zugegeben. Mit konzentrierter Salzsäure wurde $\text{pH} = 7,0$ eingestellt und das gesamte Reaktionsgemisch wurde bei Raumtemperatur 24 h lang gerührt. Die entstandene milchig-weiße Suspension wurde in 300 ml 10%ige Salzsäure eingegossen und mehrmals mit Dichlormethan extrahiert. Die

wäßrige Phase wurde mit 25%iger Natronlauge alkalisiert und mit Diethylether extrahiert und umkristallisiert, sowie mit Ethanol gewaschen.

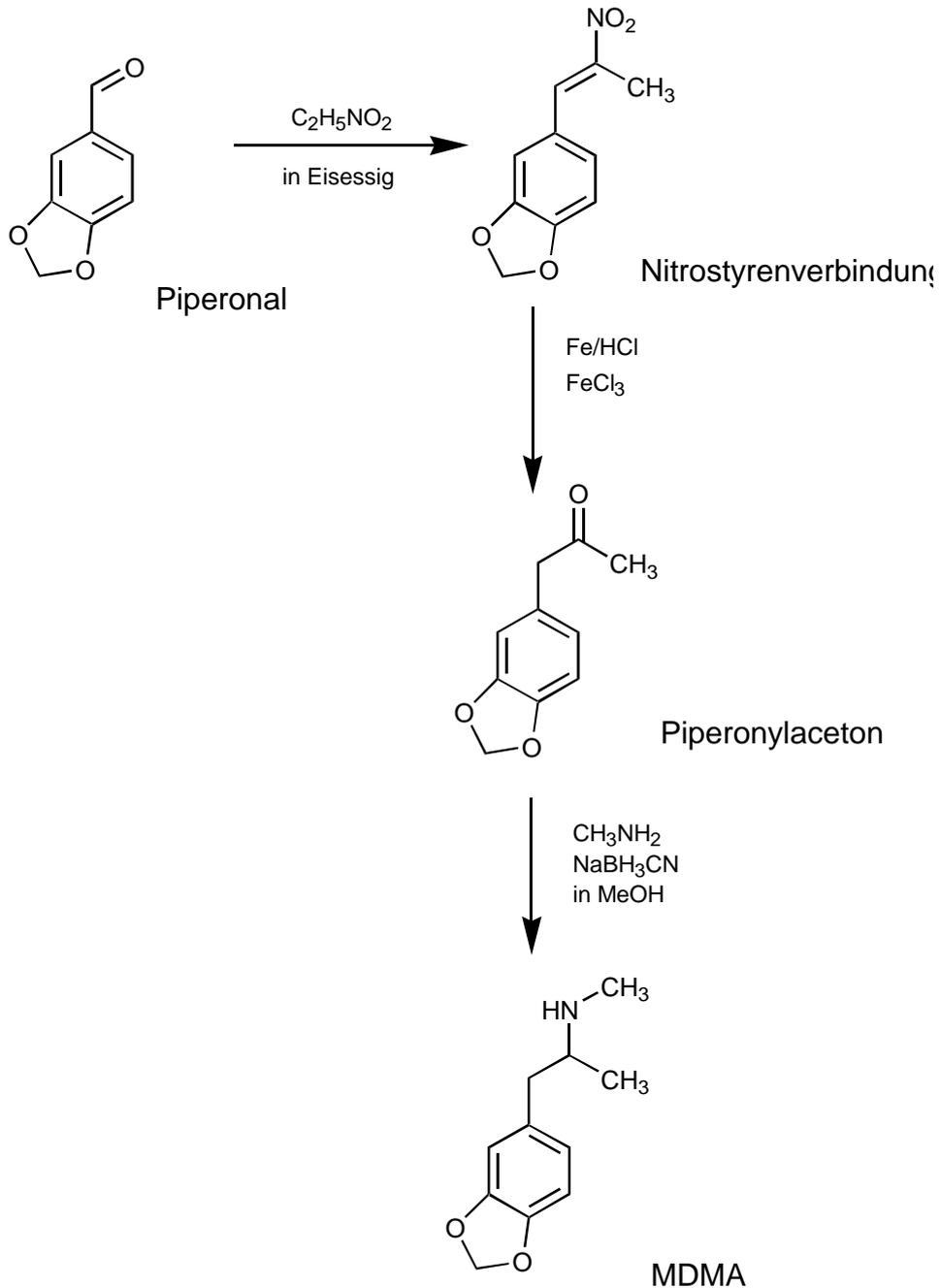


Abb. 4.1.: Darstellung von MDMA nach Braun, Shulgin und Braun [41].

4.4. Qualitätssicherung

4.4.1. Prüfung auf Identität

Die Identitätsprüfung wurde mittels der Infrarotspektroskopie durchgeführt: Ein Syntheseprodukt enthaltender KBr-Pressling wurde zur Infrarotspektromaufnahme in ein Bruker FT-IR IFS 48 Gerät eingespannt. Der Spektrumbereich (Wellenzahlbereich) betrug $400 - 4000 \text{ cm}^{-1}$. Die Daten wurden mittels firmeneigener „OPUS“-Software ausgewertet.

Der Spektrenvergleich mit einem MDMA-HCl-Referenzspektrum ergab absolute Übereinstimmung der Peaks inkl. „Fingerprintbereich“ (Abb. 4.2.).

Zusätzlich wurde mittels HPLC-UV/DAD ein Chromatogramm durchgeführt und das erhaltene Spektrum mit einem Referenzspektrum (inkl. UV-Spektrum der jeweiligen Substanz) verglichen.

4.4.2. Prüfung auf Reinheit

Die Substanz wurde mit Hilfe einer Diodenarray-UV-detektierten HPLC analysiert (für Details siehe Tabelle 4.1.): Die Analysenprobe wurde in zwei Verdünnungen auf einer ChiraDex®-Säule (Merck, Darmstadt) aufgetrennt und detektiert mittels eines Diodenarray-Detektors mit einem Wellenbereich von $200 - 350 \text{ nm}$. Da eine chirale Säule verwendet wurde, erfolgte die Auftrennung der R- und S- Enantiomere von MDMA. Mit Hilfe der chromatographischen Analyse der konzentrierten Lösung und einer unspezifischen Wellenlänge von 200 nm konnte die Analysenprobe zusätzlich auf eventuelle (UV-aktive-) Verunreinigungen untersucht werden (Methode etabliert durch Büchler, J., 2000 [47]).

So ergab die erste Analyse des Syntheseproduktes (Abb. 4.3.-A) zwar die Peaks für (R)- und (S)-MDMA ($t_1 = 10,34 \text{ min}$; $t_2 = 11,02 \text{ min}$), jedoch ebenfalls einen zusätzlichen unbekanntem Peak ($t_x = 5,95 \text{ min}$; $\lambda_{\text{max}} = 265 \text{ nm}$; $\text{AUC} = 1,549 \%$). Daher wurde ein zusätzlicher Umkristallisationsschritt des Syntheseprodukts in Diethylether angefügt. Das gereinigte MDMA zeigte bei der anschließenden Analyse keinen zusätzlichen Peak mehr (Abb. 4.3.-B), daher wurde von einer Reinheit der Substanz von $>99,9 \%$ ausgegangen.

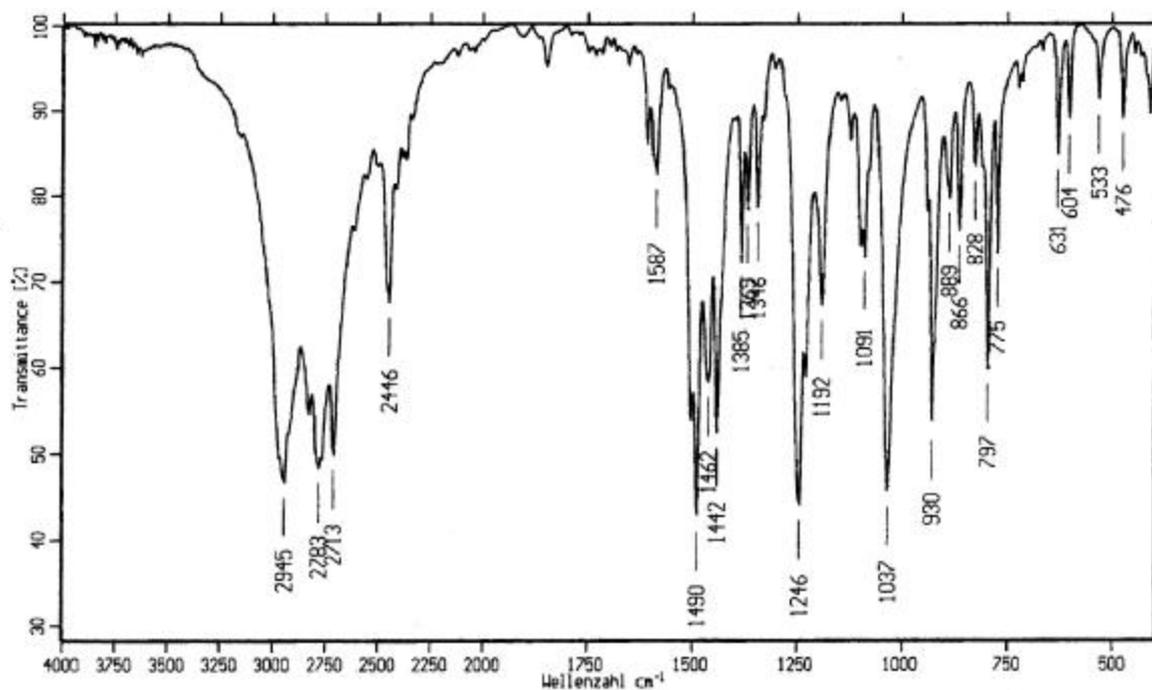


Abb. 4.2.: FT-IR-Spektrum von (RS)-MDMA-HCl (KBr-Pressling)

Tabelle 4.1.: Interpretation charakteristischer IR-Banden von (RS)-MDMA-HCl

Wellenzahl [cm ⁻¹]	Erläuterungen
2783 1246 1037 & 930 1587 & 1490 797	Benzodioxol-Grundgerüst: Methylenedioxy-Streckschwingung Streckschwingung des aromatischen Ethers (Ar-O-C) Zusätzliche Streckschwingungen der Methylenedioxygruppe Streckschwingungen des Aromaten (C=C) 1,2,4-trisubstituiertes Benzol Deformationsschw.(C-H)
1462 & 1442 1346, 1369 & 1385	Schwingungen der Alkylkette (CH ₂ , CH ₃)
2945 & 2446 1192	Amingruppe (⁺ NHR ₂) Valenz- & Deformationsschwingungen N-H N-C

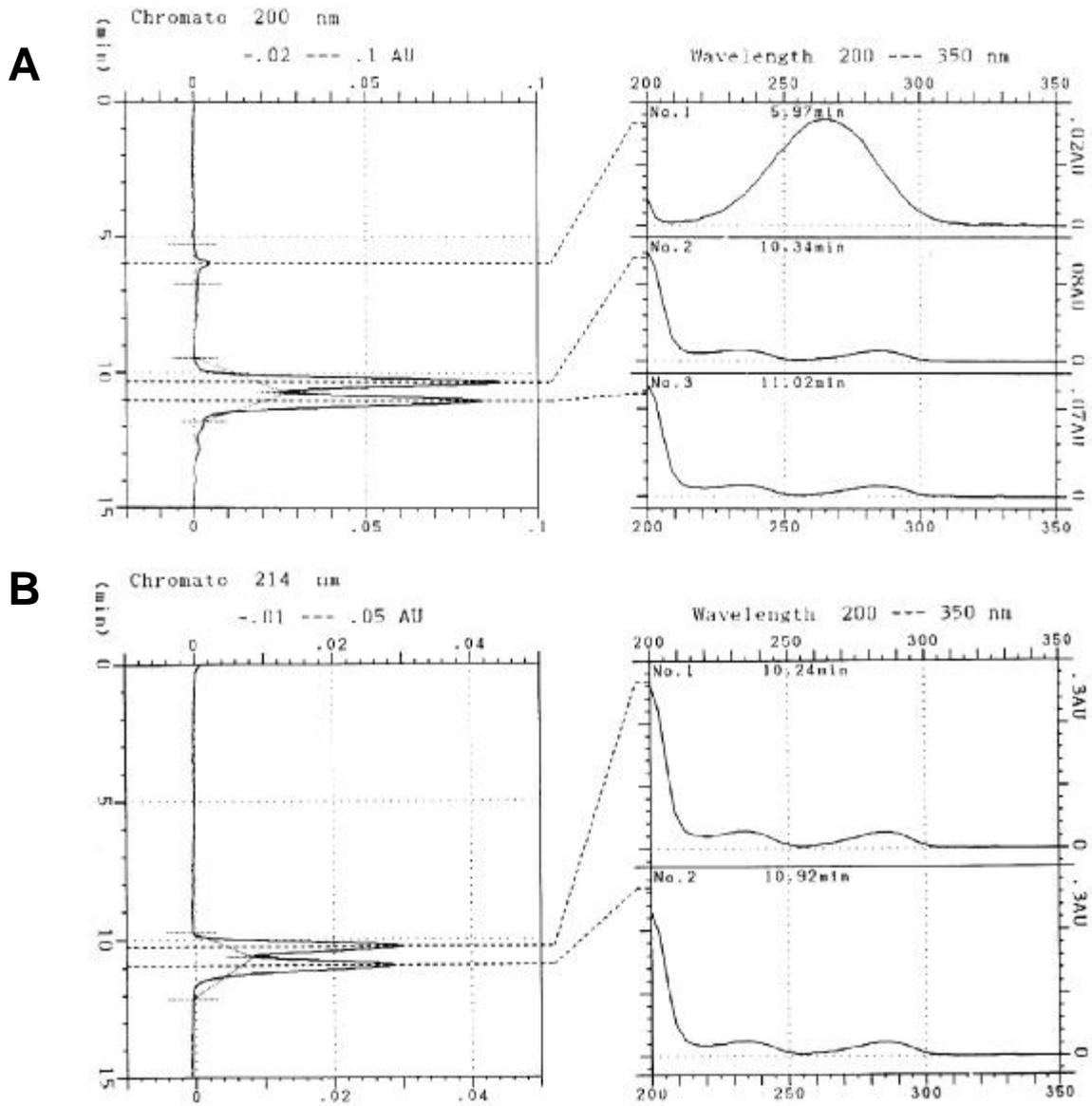


Abb. 4.3.: HPLC-UV/DAD-Spektren von MDMA-HCl vor (A) und nach (B) nochmaliger Aufreinigung.

Tabelle 4.2.: Daten der HPLC Anlage zur Reinheitsprüfung von MDMA

Pumpe	Kontron HPLC Pump 420	Flussrate: 0,5 ml/min P = 61 bar
Detektor	Waters 991 Photodiode Array	$\lambda = 200-350 \text{ nm}$
Säule	LiChro CART Cartridge, gepackt mit ChiraDex® Firma Merck, Darmstadt	250-4 mm 5 μm Korngröße 100 Å Porengröße
Fließmittel	Acetonitril KH ₂ PO ₄ 20mmol; pH 3,0	8 Teile 92 Teile

4.4.3. Diskussion der Qualitätssicherung

Das IR-Spektrum ergab charakteristische Banden des MDMA, wovon einige repräsentative Banden (charakteristisch für die Aminogruppe sowie das Benzodioxol-Grundgerüst) in der Tabelle 4.1. näher erläutert werden.

Die Auftrennung des Produkts mittels HPLC-DAD zeigte zunächst eine Verunreinigung (wahrscheinlich aromatisch, höchstwahrscheinlich Spuren von Piperonylacetone); die Verunreinigung ließ sich sehr gut nach weiterer Aufreinigung beseitigen.

Die Identitäts- und Reinheitsprüfung des Syntheseproduktes zeigt eindeutig, dass es sich hierbei um >99 % reines racemisches MDMA-HCl handelt. In allen folgenden Versuchen kann also mit an Sicherheit grenzender Wahrscheinlichkeit davon ausgegangen werden, dass es sich bei den beobachteten Effekten um alleinige Wirkungen des MDMA (bzw. dessen Metaboliten) handelt.

5. Allgemeine Wirkungen von MDMA (Teil A)

5.1. Einleitung

Akute MDMA-Administration führt zu einer starken Freisetzung von 5-HT, DA, und NA, wodurch es im Verhalten zu einer Reihe von Effekten kommt. Am charakteristischsten ist das Auftreten einer ausgeprägten Hyperaktivität, welche sich vor allen Dingen in einer gesteigerten lokomotorischen Aktivität der Tiere zeigt.

Bei sehr hohen Dosierungen (40-80 mg/kg) fällt die lokomotorische Antwort jedoch geringer aus, was dadurch erklärt wird, dass sich im höheren Dosisbereich ein sogenanntes Serotonin-Syndrom entwickelt, welches Symptome wie Ataxie, Piloerektion, flache Körperhaltung, repetitives Kopf-Wenden verursacht und über Krämpfe sogar zum Tod führen kann (vgl. [66]).

Studien mit dem „elevated-plus“-Labyrinth zeigten, dass MDMA in niedrigen Dosierungen (4 mg/kg) in Mäusen anxiogen und in höheren Dosierungen (20 mg/kg) anxiolytisch wirkt. Damit hebt sich MDMA vom Amphetamin ab (welches dosisabhängig anxiogen wirkt) [169]. Dieser biphasische Effekt könnte dadurch erklärt werden, dass MDMA in niedrigen Dosierungen dopaminerge Wirkung (Amphetamin-„state“), in höheren Dosierungen jedoch mehr serotonerge Wirkung (Fenfluramin-„state“) entfaltet [269]. In niedriger Dosierung führt MDMA sogar zur Verbesserung Pawlow'schen Lernens. Dieser Effekt wird über den Agonismus an 5-HT_{2A/C}-Rezeptoren erklärt [119].

MDMA ist bekannt als selektives Neurotoxin, welches auf die dünnen aufsteigenden Axone der serotonergen Neurone des DRN wirkt [110;273;296;302]. Es gibt jedoch auch Befunde, welche zusätzliche neurotoxische Wirkungen auf die noradrenergen und dopaminergen Neurone bei höher dosierter, aggressiverer Behandlung (8x40 mg/kg, alle 12 h) mit MDMA zeigen [59].

Über Auswirkungen dieser Neurotoxizität auf das Verhalten (Langzeiteffekte von MDMA) ist jedenfalls wenig bekannt. In zahlreichen Experimenten (inkl. Versuchen zur Schreck-, Schmerzreaktion und zum Lernen) sind keine Änderungen beobachtet worden. Die einzigen positiven Resultate beinhalten eine verstärkte Morphin-Analgesie, Störungen im Schlaf-Wach-Rhythmus, einen abgeschwächten Diskriminationsreiz und gestörtes Sexualverhalten bei Ratten nach MDMA-Behandlung (zusammengefasst in [296]).

FRAGESTELLUNG:

Ein erklärtes Ziel dieser Arbeit ist der Versuch, einen weiteren Beitrag zur Charakterisierung der Effekte von MDMA auf das Verhalten zu leisten. Hierzu wurde das Verhalten während einer subchronischen MDMA-Gabe beobachtet (siehe Kap. 6) und der Transmitter- und Funktionsstatus der Gehirne neurochemisch und immunhistochemisch analysiert (siehe Kap. 7). Zuvor jedoch wurde das Akutverhalten sowie das Verhalten nach Auswaschen der Substanz bewertet, um eine Basis zur Interpretation der folgenden Experimente zu schaffen. Da MDMA akut zu einer starken Lokomotionserhöhung führt, welche zumindest indirekt über das serotonerge und das dopaminerge System vermittelt wird, wurde die akute Wirkung von MDMA ebenfalls in einem Tiermodell der Parkinson-Krankheit getestet, um zu sehen, ob MDMA auch reversibel auf einen Hypoaktivitäts-Zustand wirkt. Vor dem Hintergrund einer möglicherweise neurotoxischen Wirkung von MDMA auf katecholaminerge Neurone (siehe oben) mag das Vorhaben, antiparkinsonoide Wirkungen von MDMA zu untersuchen, sehr überraschend und gewagt klingen. Obwohl aber in unserer Arbeitsgruppe eine noradrenerg neurotoxische Wirkung von MDMA (10x20 mg/kg, alle 24 h) gezeigt werden konnte, waren die entleerenden Effekte von MDMA auf dopaminerge Neurone nur von kurzer Dauer und die Neurone erholten sich rasch (siehe Kapitel 7); eine kataleptogene Wirkung einer subchronischen MDMA-Behandlung konnte früher ebenfalls nicht gezeigt werden [29]. Eine niedrigdosierte MDMA-Behandlung ist darüber hinaus wahrscheinlich frei von neurotoxischen Wirkungen.

5.2. Allgemeines Verhalten

Hier wurde sowohl die horizontale und vertikale Aktivität der Tiere untersucht, wenn sie in eine neue Umgebung gesetzt wurden (in der sie sich frei bewegen konnten), als auch die Aktivität in einer neuen, aber räumlich eingeschränkten Umgebung. Hier wurde dann die Ausprägung subtilerer Verhaltensweisen (Schnüffelaktivität, Fellpflege, Drehen) untersucht. Unter den MDMA-Wirkungen sind die Mechanismen lokomotorischer Aktivität teilweise gut untersucht: Es wird angenommen, dass die MDMA-induzierte Hyperlokomotion über postsynaptische 5-HT_{1B}-Rezeptoren vermittelt wird [185]. Diese 5-HT_{1B}-Rezeptoren, welche auf GABAergen Axonterminalen in der SN und VTA lokalisiert sind, verringern bei Aktivierung die GABA-Hemmung der dopaminergen Neurone und führen dadurch zu einer stärkeren verhaltensaktivierenden DA-Freisetzung im CPu und NAcc [20]. Den 5-HT_{2A}-Rezeptoren wird ebenfalls eine DA-aktivierende Rolle zugesprochen [20;171]. Ausserdem

wird ein direkter Einfluss von 5-HT-Rezeptoren auf die Lokomotion ebenfalls nicht ausgeschlossen [20].

5.2.1. Material und Methoden

5.2.1.1. Tiere

Es wurden männliche Sprague-Dawley-Ratten (Charles-River, Sulzfeld, Deutschland) verwendet mit einem Körpergewicht von 210 – 298 g bei Versuchsbeginn. Sie wurden in Gruppen gehalten unter konstanten klimatischen Bedingungen (Raumtemperatur 23 ± 3 °C; Luftfeuchte 40-60%) in einem 12/12 h Licht-Dunkel-Zyklus (Licht an: 07:00). Sie bekamen täglich 12 g/Tier Standard-Ratten-Futter (Altromin, Lage, Deutschland), Wasser stand „ad libitum“ zur Verfügung.

5.2.1.2. Substanzen

MDMA-HCl (20,0 mg/ml) wurde gelöst in Phosphat-gepuffertes isotonischer Kochsalzlösung nach der Dulbecco-Rezeptur (Dulbecco's PBS, Sigma Deisenhofen, Deutschland = 0,2 g KCl; 0,2 g KH_2PO_4 ; 8,0 g NaCl; 1,15 g Na_2HPO_4 / 1 l H_2O -dest) und subkutan (s.c.) injiziert als 1 ml/kgKG.

5.2.1.3. Versuchsdurchführung

Die Tiere wurden am Tag 0 erstmals aus der Tierhaltung in den Versuchsraum gebracht und wurden für 5 min in ein „Open Field“ und anschließend in eine „Schnüffelbox“ gesetzt¹⁸, um sich an diese neue Umgebung zu gewöhnen (zu „habituierten“).

Am Tag 1 wurden die Tiere 2 h nach einer MDMA-Injektion (20 mg/kg, s.c.) für jeweils 5 min in das Open Field und die Schnüffelbox gesetzt. Am Tag 3 und am Tag 14 wurden sie erneut für jeweils 5 min in diese Geräte hinein gesetzt. An allen Tagen erfolgte während ihres Aufenthaltes im Open Field (per PC) und der Schnüffelbox (mittels einer Videokamera) die Registrierung des Verhaltens. Für die Auswertung des Verhaltens wurden die Parameter „Weg“, „Laufzeit“, „Ruhezeit“ und Anzahl der „Aufrichtungen“ (für das Open Field), und

¹⁸ Die ausführliche Beschreibung des „open Fields“ und der „Schnüffelbox“ findet sich in Kapitel 6 unter Punkt 6.2.1.3. Es wurde PC/Lichtschranken-gestützte Open Field Auswertung benutzt.

„Schnüffeln gesamt“ (zusätzlich aufgeteilt in „Schnüffeln oben“ und „Schnüffeln unten“¹⁹), Anzahl der Drehungen um 180°, Dauer der Putzaktivität und „inaktiven Sitzens“ (für die Schnüffelbox) benutzt. An allen drei Observationstagen wurden die Tiere einzeln gewogen, um Veränderungen in ihrem Gewicht festzustellen. An jedem dieser Tage wurden (randomisiert) durchschnittlich 5 Tiere aus jeder Gruppe aus dem Versuch herausgenommen und perfundiert, um die Gehirne für die immunhistochemische Analytik zu fixieren. Dadurch verringerte sich die Stichprobenzahl der Verhaltensversuche von einem Observationstag zum nächsten ($n_{veh}(d1) = 15$; $n_{mdma}(d1) = 15$; $n_{veh}(d3) = 11$; $n_{mdma}(d3) = 9$; $n_{veh}(d14) = 5$; $n_{mdma}(d14) = 5$).

5.2.2. Ergebnisse

5.2.2.1. Körpergewicht

Während des Versuchs veränderte sich das Körpergewicht signifikant. Die einmalig MDMA-behandelten Tiere erlitten eine Gewichtsabnahme um 7,3 % (von durchschnittlich 241,1 g auf 223,6 g), während die Vehikel-behandelten Tiere eine leichte Gewichtszunahme um 3,4 % (von 245,2 auf 253,4) erfuhren.

Am Tag 14 näherten sich die MDMA-Tiere den Vehikel-Tieren wieder an (MDMA: 232,0 g; VEH: 244,8 g).

Eine 2-faktorielle ANOVA mit den Faktoren „Behandlung“ und „Zeit“ ergab einen hochsignifikanten Unterschied zwischen den zwei Tiergruppen ($F_{BEHANDLUNG(1,28)}=10,87$; $p=0,003$). Ein post-hoc Fischer's LSD-Test ergab ebenfalls einen hochsignifikanten Unterschied der Gewichte der beiden Tiergruppen am Tag 3.

5.2.2.2. Open-Field

Am Tag 1 (2 h nach Injektion von 20 mg/kg MDMA-HCl) zeigten die MDMA-behandelten Tiere, verglichen mit Vehikel-behandelten Tieren, eine profunde Hyperaktivität: Sie legten in den observierten 5 min ca. den doppelten Weg zurück; der Anteil der Laufzeit an der Gesamtzeit war ebenfalls vergrößert; die Ruhezeit war jedoch verringert, tendenziell ebenfalls die Anzahl vertikaler Aufrichtungen.

¹⁹ Das Verhältnis der Schnüffel-Richtungen wurde im Quotient $Q_{Wandkontakte} = \frac{Wandkontakte_{oben}}{Wandkontakte_{unten}}$ kodiert.

Im naiven Zustand am Tag 3 zeigten die Vehikel-vorbehandelten Tiere leicht geringere Verhaltensantworten als am Tag 1 (Weg, Laufzeit, Aufrichtungen); die Ruhezeit war erhöht. MDMA-vorbehandelte Tiere näherten sich in ihren Verhaltensantworten den Vehikel-Tieren an: Die Werte aller gemessenen Parameter bei MDMA-vorbehandelten Tieren am Tag 3 ähnelten den Werten der Vehikel-Tiere am Tag 1, die Lokomotion der MDMA-Tiere war am Tag 3 höher als die der Vehikel-vorbehandelten Tiere an diesem Versuchstag. Am Tag 14 waren die MDMA-vorbehandelten Tiere ebenfalls aktiver als die Vehikel-vorbehandelten Tiere (Zahl der Aufrichtungen nur tendenziell, Ruhezeit niedriger).

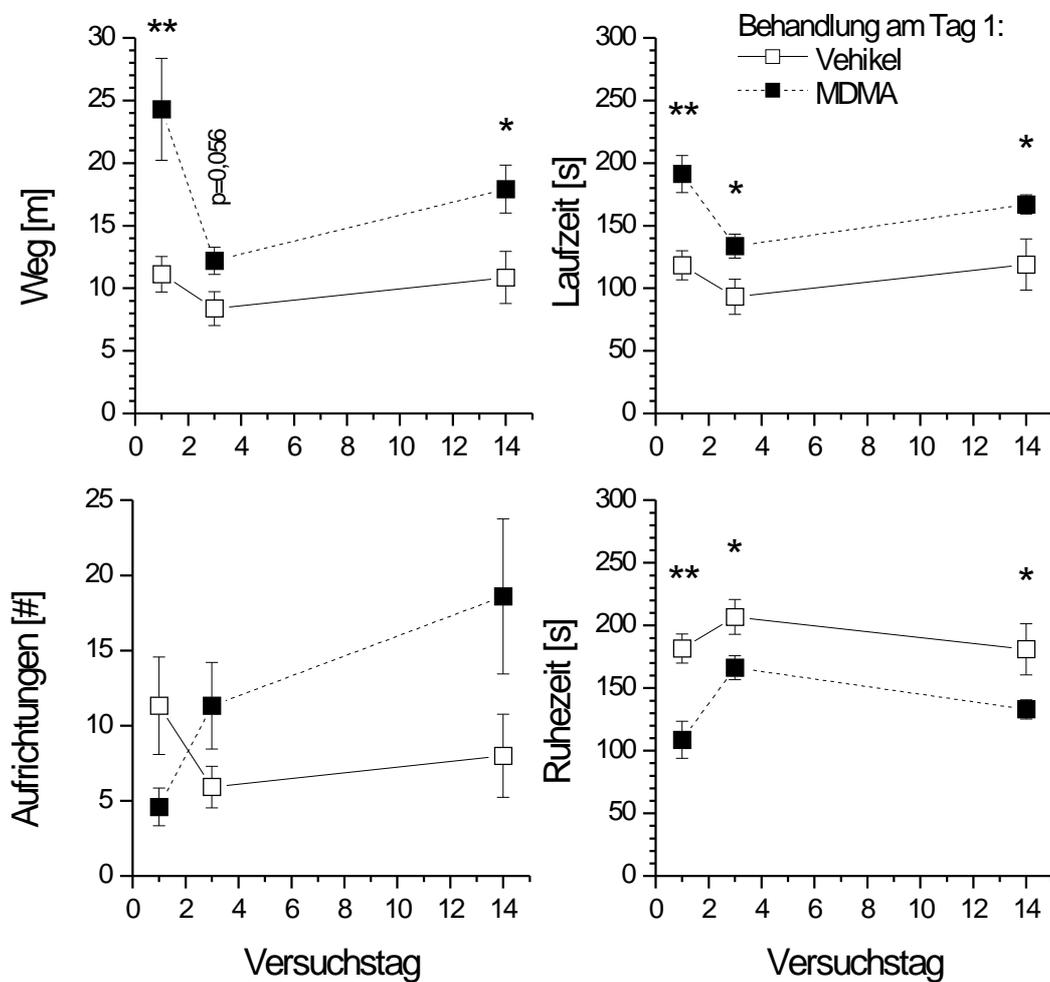


Abb. 5.1.: Verhalten im Open-Field am Tag 1 (2 h nach Gabe von MDMA: 20 mg/kg s.c. oder Vehikel) und am Tag 3 und 14 danach (alle Tiere naiv getestet).
 Statistik: Mann-Whitney-U-Test: *p<0,05; **p<0,01

5.2.2.3. Schnüffelbox

Das Verhalten der Tiere in der Schnüffelbox war teilweise vergleichbar mit dem Open Field: Am Tag 1 machten die MDMA-behandelten Tiere eine deutlich größere Anzahl von Kontakten mit der „Schnüffelbox“-Wand, wobei sie etwa doppelt so viel im oberen Bereich der Box schnüffelten als im unteren (im Vergleich dazu schnüffelten die Kontrolltiere nur etwa halb so viel oben wie unten). Die Anzahl der Drehungen um die vertikale Achse war ebenfalls stark erhöht, das Putzverhalten war gänzlich unterdrückt. 48 h später war das Verhalten in Bezug auf das Schnüffeln und Drehungen in seiner Quantität vergleichbar mit den Ergebnissen des Open-Fields: Die Kontrolltiere zeigten in der Schnüffelbox eine verringerte Anzahl der Wandkontakte und Drehungen; die MDMA-Tiere hingegen zeigten etwa die Anzahl der Wandkontakte und Drehungen wie die Kontrolltiere am Tag 1. Zudem machten die MDMA-Tiere nun vermehrt Wandkontakte im unteren Teil der Box und verbrachten, wie die Kontrolltiere, einen signifikanten Anteil der Zeit in der Schnüffelbox mit Putzen.

Am Tag 14 waren das Schnüffeln und Drehungen bei den MDMA-Tieren leicht erhöht, statistisch waren jedoch keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen nachweisbar.

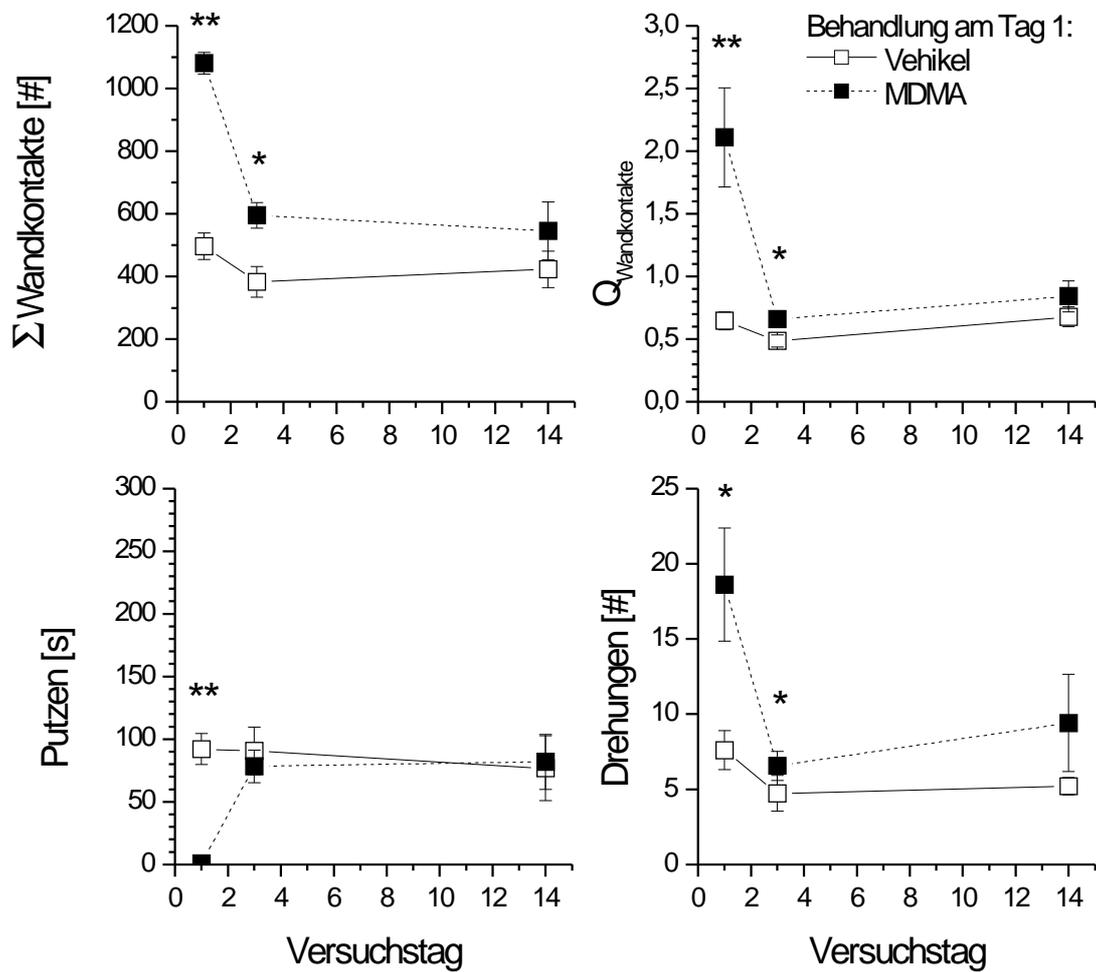


Abb. 5.2.: Verhalten in der Schnüffelbox am Tag 1 (2 h nach Gabe von MDMA: 20 mg/kg s.c. oder Vehikel), und am Tag 3 und 14 danach (alle Tiere naiv getestet).
 Statistik: Mann-Whitney-U-Test: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$

5.3. Wirkung von MDMA im Tiermodell der Parkinson-Krankheit

Nicht alle Patienten profitieren von den aktuell angewandten Parkinson-Therapie-Strategien. Vor allem die Entwicklung von Dyskinesien als Nebenwirkung bei der Behandlung mit dem DA-Vorläufer L-DOPA stellt eine nicht unerhebliche Belastung für den Patienten dar [19;211]. Die Entwicklung neuartiger Medikamente mit neuen Wirkmechanismen ist daher dringend notwendig.

Da aktuelle episodische Berichte eine mögliche antiparkinsonoide Potenz von MDMA beim Menschen zeigen [175], war dies der Anlass zu einer Überprüfung dieser potentiellen Wirkung im Tierexperiment.

In diesem Versuch sollte die antiparkinsonoide Wirkung von MDMA im Haloperidol-induzierten Katalepsie-Modell getestet werden. Haloperidol, ein D₂-Rezeptor-Antagonist, wird als ein typisches Neuroleptikum vom Butyrophenon-Typ in der Standard-Therapie der Schizophrenie eingesetzt [2] und als Modellsubstanz zur Entwicklung extrapyramidaler Nebenwirkungen (Katalepsie) in der experimentellen Neuropharmakologie benutzt [283]. Durch Blockade der D₂-Rezeptoren im Striatum kommt es zur Hyperaktivität der indirekten striatofugalen GABAergen Bahn, was wiederum zu einer übermäßigen Hemmung des VA/VL-Thalamus führt. Wegen der erniedrigten Rückmeldungsrate aus der dorsalen Basalganglienschleife im prämotorischen Cortex kommt es in letzter Konsequenz zur Induktion parkinsonoider Symptomatik des Rigors und der Akinesie, welche zusammengefasst auch als Katalepsie bezeichnet werden kann.

5.3.1. Material & Methoden

Versuchstiere

Es wurden männliche Sprague-Dawley-Ratten (Charles-River, Sulzfeld, Deutschland) verwendet mit einem Körpergewicht bei Versuchsbeginn von 220 – 300 g.

Sie wurden in Gruppen gehalten unter konstanten klimatischen Bedingungen (Raumtemperatur 23 ± 3 °C; Luftfeuchte 40-60%) in einem 12/12 h Licht-Dunkel-Zyklus (Licht an: 07:00). Sie bekamen täglich 12 g/Tier Standard-Ratten-Futter (Altromin, Lage, Deutschland), Wasser stand „ad libitum“ zur Verfügung.

Substanzen

Haloperidol (Haldol ®, Janssen, Deutschland; 0,5 mg/kg) wurde mit Phosphat-gepufferter isotonischer Kochsalzlösung (Dulbecco's PBS, Sigma Deisenhofen, Deutschland) zu einer Konzentration von 0,5 mg/ml verdünnt.

MDMA-HCl (5,0; 2,5 bzw. 1,0 mg/kg) wurde gelöst in PBS oder in der Haloperidol enthaltenden PBS-Lösung zur Endkonzentration von 5,0; 2,5 oder 1,0 mg/ml MDMA.

Die Anwendungslösung wurde subkutan (s.c.) injiziert als 1 ml/kgKG.

Verhaltenstests

Die Tiere wurden 60 min nach Behandlung einzeln an eine horizontal angebrachte Metall-Stange (Bodenabstand = 9 cm) platziert, wobei beide Vorderpfoten über die Stange gelegt wurden, sodass sich das Tier in aufgerichteter Position befand. Es wurde die Zeit bis zum Bewegen einer Pfote von der Stange gemessen (= "Abstiegslatenz"). Anschließend wurde das Tier an ein vertikales Gitter (h = 44 cm; b = 25,5 cm; Maschenweite 1 cm) gehängt, wobei wiederum die Zeit bis zur ersten Pfotenbewegung gemessen wurde. Diese Prozedur wurde zweimal wiederholt, um störende Einflüsse, wie z.B. Neuigkeit, zu unterdrücken. In der Abbildung ist der zweite Katalepsie-Test gezeigt. Als Obergrenze der Abstiegslatenz-Messung wurden 180 s festgelegt, um Ermüdungserscheinungen des Tieres zu vermeiden.

Statistik

Es wurde der nichtparametrische statistische Test für zwei unabhängige Gruppen (Mann-Whitney-,U"-Test) verwendet, da Katalepsiedaten wegen des Versuchsabbruchs bei 180 s nicht einer Normalverteilung folgen.

5.3.2. Ergebnisse

Die Injektion von 0,5 mg/kg Haloperidol führte bei Ratten zu einer ausgeprägten Katalepsie, welche als hohe Abstiegslatenzen gemessen werden konnte. Die zusätzliche Gabe von MDMA reduzierte die Abstiegslatenz-Zeiten dosisabhängig (Abb. 5.3.):

Stange: -57,0% bei 1 mg/kg; -88,7% bei 2,5 mg/kg; -97,7% bei 5 mg/kg MDMA

Gitter: -49,4% bei 1 mg/kg; -83,6% bei 2,5 mg/kg; -99,7% bei 5 mg/kg MDMA (Verringerung der Haloperidol-induzierten Katalepsie).

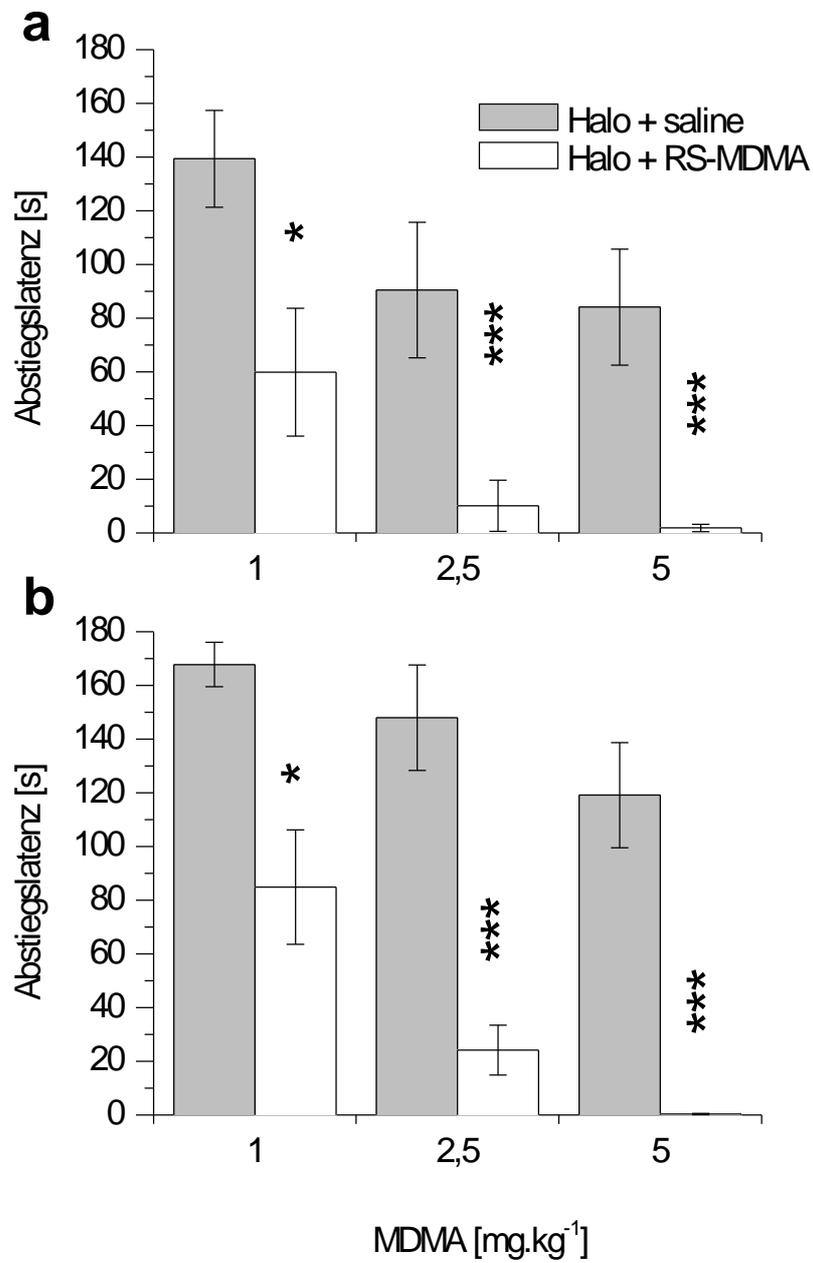


Abb. 5.3.: Antikataleptische Wirkung von MDMA bei 0,5 mg/kg-Haloperidol-induzierter Katalepsie an der Stange (a) und Gitter (b).

Statistik: Mann-Whitney-U-Tests: * $p < 0,05$; ** $p = 0,01$; *** $p < 0,001$

5.4. Diskussion

5.4.1. Allgemeines Verhalten

Während dieses Versuchs war ein deutlicher anorektischer Effekt bei akuter Wirkung von MDMA zu sehen: Die MDMA-Behandlung führte zu einer starken Gewichtsreduktion innerhalb von 48 h; nach Abklingen der MDMA-Wirkung erholten sich die Tiere wieder. Dieser Effekt ist charakteristisch für die Amphetamine und wird wahrscheinlich über erhöhte 5-HT-Spiegel im Hypothalamus vermittelt.

Während akuter MDMA-Wirkung zeigen die Tiere eine Hyperaktivität, welche sich in erhöhter Lokomotion ausdrückt. Die Hyperlokomotion wird, wie bereits erwähnt, indirekt über erhöhte 5-HT-Freisetzung und Aktivierung der 5-HT_{1B}- und 5-HT₂-Rezeptoren in den Basalganglien vermittelt, was zur erhöhten DA-Freisetzung im Striatum führt [20;296]. Die vertikale Aktivität (Anzahl der Aufrichtungen) ist im Vergleich zur horizontalen Aktivität (Weg) nicht erhöht, sondern eher leicht unterdrückt: Dies könnte damit zusammenhängen, dass MDMA zur Expression des sog. „Serotonin-Syndroms“ führt, einem Zustand, welcher durch eine massiv gesteigerte 5-HT-Aktivität hervorgerufen wird und sich in Symptomen wie flacher Körperhaltung, Kopf-Wiegen, reflexivem Treten mit den Vorderpfoten zeigt [95;110]. Die flache Körperhaltung wurde hier ebenfalls beobachtet, d.h. die Tiere sind hierdurch bei akuter Wirkung von MDMA möglicherweise eher horizontal-lokomotorisch orientiert, die vertikale Exploration ist eher gehemmt.

Nach Abklingen der akuten Wirkung sind die Tiere in ihrem Verhalten ähnlich den Vehikel-Tieren, wie sie sich am ersten Tag verhalten. Während die Vehikel-vorbehandelten Tiere deutlich habituierten (d.h. ihre exploratorische Aktivität nimmt im Open-Field ab, da bereits Information über die Umgebung im Gedächtnis vorliegt), zeigen die MDMA-vorbehandelten Tiere tendenziell höhere (horizontal- und vertikal-) exploratorische Aktivität. Dieser Umstand lässt sich dadurch erklären, dass diese Tiere sich mit dem sie umgebenden Open-Field noch nicht in der Weise bekannt gemacht haben wie die Kontrolltiere. Dies kann durch eine MDMA-vermittelte Blockade des Lernens am Tag 1 erfolgt sein, jedoch ist eine Erklärung durch die „state-dependent-learning“-Hypothese weitaus treffender: Wird eine Information in einem bestimmten Kontext (extern als Umgebungsvariablen oder intern als ein durch ein Pharmakon hervorgerufener Zustand oder „state“) erworben, ist es möglich, dass das spätere Abrufen des gelernten Wissens in einem veränderten Kontext erschwert oder sogar gänzlich gehemmt wird. Dieses Phänomen wird „state-dependency“ genannt [58;215], wobei ein state-

abhängiges Lernen vor allem im striatalen prozeduralen (nicht hippocampalen deklarativen) Lernen gezeigt wurde [158;240]. Neueste Erkenntnisse deuten auf eine elementare Rolle der „state-dependency“ in Mechanismen der Sensitivierung sowohl der psychostimulierenden Effekte der Suchtstoffe als auch der kataleptogenen Effekte der Neuroleptika [164;279;313].

Zwei Wochen nach der Behandlung sind MDMA-Tiere deutlich aktiver als die Kontrolltiere. Hier kann es sich um Langzeiteffekte einer toxischen Dosis von MDMA handeln, d.h. die entsprechenden Tiere könnten durch leicht erniedrigte Serotoninspiegel höhere Impulsivität zeigen. Im Vergleich zur subchronischen Gabe von MDMA sind die Auswirkungen einer einmaligen MDMA-Gabe auf die Serotoninparameter im Vorderhirn sehr gering, können jedoch zu einer veränderten Gen-Expression in zahlreichen Vorderhirngebieten führen (vgl. Kapitel 7).

In der Schnüffelbox war das Verhalten entsprechend: Am Tag 1 zeigten die Tiere eine Hyperaktivität im motorischen Verhalten, welche sich wegen der Bewegungseinschränkung in der Enge der Observationsbox in einer größeren Anzahl der Drehungen niederschlug; außerdem zeigten die Tiere eine deutliche Schnüffelstereotypie. Ein solch stereotypes Verhalten wird in Zusammenhang gebracht mit stark erhöhter Dopamin-Aktivität in den Basalganglien. Dopamin wird benötigt, um ein Umschalten von einem Verhalten zum anderen zu ermöglichen (zu „switchen“). Bei leicht erhöhter DA-Aktivität nimmt sowohl die Aktivität des Tieres, als auch das „Switching“ zwischen verschiedenen Verhaltensarten aus dem Repertoire des Tieres zu, was die charakteristischen Wirkungen einer moderat dosierten DA-freisetzenden Substanz (z.B. Amphetamin) erklärt. Wenn die DA-Aktivität jedoch extrem gesteigert wird, entgleist dieser „Switching“-Mechanismus, was sich darin äußert, dass nur noch die Frequenz einer bestimmten Verhaltensart, vom Steuerungsmechanismus entkoppelt, erhöht wird (der „Switch frisst sich fest“). Bei einem DA-Mangelzustand, wie etwa der Parkinson-Krankheit, reicht die verbliebene DA-Aktivität nicht mehr aus, um willkürlich auf ein neues Verhalten umzuschalten: Es kommt zu einem charakteristischen Parkinson-Symptom, der Akinesie, d.h. der Patient ist in seiner Fähigkeit, neue motorische Programme willkürlich zu initiieren, extrem beeinträchtigt. Dieses Defizit darf jedoch nicht nur auf motorisches Verhalten beschränkt werden – neuere Erkenntnisse aus Tierversuch und Klinik zeigen ebenfalls kognitive Beeinträchtigungen im DA-Mangel-Syndrom, welche sich in erschwertem bzw. gänzlich inhibiertem Gewohnheitslernen zeigen (zusammengefasst bei [276]). In dem hier beschriebenen Versuch ist eine Zwischenform zu sehen: Sowohl erhöhte Lokomotion, als auch stereotypes Verhalten ist zu sehen bei einer Gabe von 20 mg/kg MDMA, wobei sich beide Phänomene auf eine erhöhte DA-Aktivität zurückführen lassen.

Diese Dosis reicht zudem völlig aus, um biologisch wichtige Verhaltensweisen, wie das Putzen, bereits gänzlich zu unterdrücken und im Gegensatz dazu die Frequenz anderer (Schnüffeln) unphysiologisch zu steigern.

5.4.2. Spezielle (antiparkinsonoide) Wirkung

Die subkutane Gabe von Haloperidol, eines D₂-Rezeptor-Antagonisten, führte zu einer starken Ausprägung der Katalapsie-Symptomatik.

MDMA reduzierte sehr effektiv und dosisabhängig diese katalaptogene Wirkung von Haloperidol in der Ratte. Die überraschend gute Wirksamkeit von MDMA soll nun näher diskutiert werden: MDMA führt, wie bereits beschrieben, zu einer starken Freisetzung der biogenen Amine (5-HT, DA, NA).

Dass der antikatalaptische Effekt von MDMA durch akute allgemeine Serotoninfreisetzung vermittelt wird, ist eher unwahrscheinlich, da 5-HT an sich nicht Parkinson-Symptome hemmt; im Gegenteil, erhöhte 5-HT-Konzentrationen im synaptischen Spalt verstärken Katalapsie im Tiermodell [316], im Menschen kann die Gabe von selektiven Serotonin-Wiederaufnahmehemmern (SSRI) sogar zu einem *de novo* Auslösen der Parkinson-Symptomatik führen [297]. Die prokatalaptischen Effekte von 5-HT werden wahrscheinlich über die Hemmung der Feuerrate einer Subpopulation nigraler Dopaminneurone bewirkt [132;142].

Nichtsdestotrotz kann die Gabe von 5-HT_{1A}- und 5-HT_{2A}- Agonisten die D₂- und D₁-Rezeptor-vermittelte Katalapsie effektiv hemmen [201;315-317]. Interessanterweise scheint der 5-HT_{1A}-vermittelte antikatalaptische Effekt des Serotonins im medianen Raphe-Nucleus (MRN) lokalisiert zu sein [317].

MDMA selbst scheint eine 5-HT_{1A}-Rezeptor-Wirkkomponente zu besitzen [101], zudem besitzt das R(+)-Enantiomer des MDMA eine Affinität zum 5-HT_{2A}-Rezeptor [205;271]. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass die DA-freisetzenden Eigenschaften von MDMA *in vivo* (zumindest teilweise) durch den 5-HT_{2A}-Rezeptor vermittelt werden, da eine Vorbehandlung durch den selektiven 5-HT_{2A}-Antagonisten MDL 100,907 die MDMA-induzierte DA-Freisetzung stark vermindert [271]. Obwohl alle MDMA-Derivate 5-HT äquipotent freisetzen [134], zeigen sowohl MDE als auch MBDB viel geringere antikatalaptische Aktivität im Haloperidol-Modell [Schmidt, W.J. et al.: „In search of the anti-parkinsonian component of Ecstasy“, eingereichte Publikation: [278]].

Die DA-freisetzenden Eigenschaften von MDMA müssen ebenfalls bei der Suche nach dem antikataleptischen Mechanismus von MDMA berücksichtigt werden. Die direkte Bindung an D₁- oder D₂-Rezeptoren und damit eine kompetitive Verdrängung von Haloperidol von der Bindungsstelle des D₂-Rezeptors kann mit ziemlicher Sicherheit ausgeschlossen werden, da MDMA nur marginale Bindungsaffinität zu den DA-Rezeptoren besitzt [24]. Nash & Nichols beschrieben in einer Arbeit über die neurotoxischen Wirkungen von Methylenedioxyamphetaminen, dass die DA-freisetzende Aktivität dieser Substanzen in der Folge MDA > MDMA > MDE > MBDB abnimmt [200]. Sowohl MDA, welches am stärksten DA in den synaptischen Spalt freisetzt, als auch eine mittlere Dosis von d-Amphetamin konnten die Haloperidol-induzierte Katalepsie nicht in dem Maße hemmen, wie es MDMA tat [eingereichte Publ.: [278]].

Nicht ausgeschlossen werden darf die Rolle des Noradrenalins: Zum einen setzt MDMA zu einem beträchtlichen Teil NA frei [261], zum anderen besitzt MDMA starke Bindungsaffinität (wahrscheinlich antagonistisch) zum α_2 -Rezeptor [24]. Dies würde bedeuten, dass MDMA in zweifacher Weise zu einer Freisetzung von NA in den Zielgebieten noradrenerger Neurone führen kann. Es konnte bereits in anderen Experimenten gezeigt werden, dass eine α_2 -Rezeptor-Blockade antikataleptisch wirkt [263] bzw. die Dopamin-Syntheserate steigert [267]. Eine Vorbehandlung mit DSP-4, einem selektiven Neurotoxin, welches die noradrenergen Axone des Locus coeruleus (LC) schädigt, konnte jedoch keine veränderte antikataleptische Wirkung von MDMA zeigen [unveröffentlichte Daten].

Der Mechanismus der antikataleptischen Wirkung von MDMA kann nicht vollständig geklärt werden. Eine schwächere antikataleptische Potenz der Enantiomere von MDMA und MDE, verglichen mit dem Racemat [278], deutet darauf hin, dass der Mechanismus komplexer Natur ist und die sehr effektive antikataleptische Wirkung von MDMA aus einer synergistischen, supraadditiven Wirkung beider Enantiomere an verschiedenen Angriffsorten resultiert.

Die Anwendung von MDMA in der klinischen Parkinson-Therapie darf natürlich nicht unüberlegt forciert werden. Die MDMA-Derivate besitzen suchterzeugendes oder zumindest suchtbegünstigendes und neurotoxisches Potential (siehe folgende Kapitel), doch könnten in einem bereits vorliegenden Dopamin-Mangel-Zustand wie dem Morbus Parkinson sowohl die Sucheigenschaften als auch die neurotoxischen Wirkungen abgeschwächt sein. Zudem zeigt das MDE, welches ebenfalls antikataleptisch wirksam war, ein geringeres Neurotoxizitätspotential [200;242] und könnte in der niedrigen Anwendungsdosierung im

Dopamin-verarmten Organismus u.U. ohne neurotoxische Wirkungen sein. Zusammengefasst kann man in den vorliegenden Ergebnissen, d.h. potentiell neurotoxisch bedingte Veränderung im Verhalten bei hoher Dosis und möglicherweise therapeutisches Potential bei niedriger Dosierung von MDMA, verglichen mit der allgemeinen Datenlage, den berühmten Leitsatz „*dosis sola facit venenum*“²⁰ bestätigt sehen.

²⁰ Der Autor dieses Leitsatzes ist wahrscheinlich Schüler von Paracelsus gewesen, welcher aber ebenfalls in seinen „Defensiones“ schrieb: „*Wenn ihr jedes Gift erklären wollet, was ist dann kein Gift? Alle Dinge sind ein Gift und nichts ist ohne Gift, nur allein Dosis bewirkt, dass ein Ding kein Gift ist*“ [86;172].

6. Wirkungen von MDMA in Tiermodellen der Sucht (Teil B)

6.1. Einleitung

Der Begriff „**Sucht**“ oder „**Abhängigkeit**“²¹ kennzeichnet einen psychischen und gegebenenfalls auch physischen Zustand, welcher sich aus der Wechselwirkung eines Individuums mit einer pharmakologischen Substanz („Droge“²²) ergibt und mit drei Phänomenen verknüpft sein kann: (1.) mit der Entwicklung einer Toleranz, (2.) mit einer körperlichen Abhängigkeit oder/und (3.) mit einer psychischen Abhängigkeit [2].

Gewöhnung oder **Toleranz** kennzeichnet eine regulatorische Leistung, mit welcher der Organismus kompensatorisch auf wiederholte Gabe von Pharmaka reagiert: Die Effekte des Pharmakons lassen mit wiederholter Gabe nach oder können nur aufrecht erhalten werden, wenn die Dosis erhöht wird. Die Toleranz ist jedoch nicht spezifisch für Suchtstoffe [2;274].

Körperliche Abhängigkeit ist ein Phänomen, welches nach abruptem Absetzen mancher Suchtstoffe auftritt und äußert sich vorwiegend in vegetativen Reaktionen, die meist den initialen Wirkungen des Stoffes entgegengesetzt sind. Sie tritt vor allem im akuten Entzug von Opiaten, Alkohol (EtOH) und zentraldämpfenden Pharmaka (speziell Barbituraten) und bedingt bei Cocain auf. Das Auftreten dieses Phänomens ist ebenfalls nicht selektiv für Suchtstoffe, sondern kann auch bei plötzlicher Beendigung einer Arzneimittel-Therapie auftreten (z.B. Antikonvulsiva, Neuroleptika, Antihypertensiva; im Speziellen Clonidin). Die aversiven Entzugssymptome werden in einer Vielzahl von zentralnervösen Kernen lokalisiert vermutet, wobei der Locus Coeruleus (LC) eine Schlüsselrolle²³ spielen soll [234]. Einen Therapieansatz der physischen Entzugssymptomatik stellt die Gabe von Clonidin dar, eines α_2 -Agonisten, welcher durch Aktivierung der somatodendritischen Autorezeptoren die überaktiven noradrenergen Neurone des LC in ihrer Aktivität hemmt.

²¹ Von der WHO als präziserer Begriff vorgeschlagen

²² Um der pharmazeutisch-biologischen Definition des Begriffs „Droge“ Rechnung zu tragen [250], soll hier im Weiteren der Begriff „Suchtstoff“ verwendet werden.

²³ Neuere Arbeiten zeigen eine stärkere Rolle der tegmentalen noradrenergen Kerne anstatt des LC und damit die Beteiligung des ventralen Vorderhins (d.h. des zum „extended Amygdala“ gehörenden und in intensiver Wechselwirkung mit motivationalen Bereichen des ZNS stehenden BNST-Kerns) [67].

Die **psychische Abhängigkeit** ist jedoch ein allen Suchtstoffen gemeinsamer Effekt. Gemeint ist das starke, unwiderstehliche Verlangen („craving“) nach der missbrauchten Substanz, um positive Effekte herbeizuführen und negative zu vermeiden. Hieraus ergeben sich zwei bedeutende Hypothesen, welche die Gründe für eine Suchtentstehung bzw. das Aufrechterhalten der Sucht zu erklären versuchen: die klassische „negative-reinforcement“- und die etwas neuere „positive-reinforcement“-Hypothese²⁴.

Die „**negative-reinforcement**“-Hypothese versucht die Sucht dadurch zu erklären, dass die aversiven, negativen Wirkungen eines Suchtmittelentzugs zu einer neuen Suchtmittelleinnahme als Vermeidungsstrategie führen. Man geht heute jedoch weitestgehend davon aus, dass belohnende, positive Stimuli des Suchtmittels primär zu einer erneuten Suchtmittelleinnahme und zur Entwicklung der Sucht führen („**positive-reinforcement**“). Für die letztere Hypothese sprechen eine Reihe von Gründen: So verabreichen Versuchstiere die meisten Suchtstoffe selbst, ohne einen vorherigen Entzug (und damit verbundene negative Symptomatik) zu erfahren. Beobachtungen aus aktueller klinischer Suchttherapie zeigen, dass viele Abstinente rückfällig werden selbst nach Jahren suchtmittelfreien Lebens (der Rückfall kann daher nur durch ein erneutes Craving ausgelöst werden). Die Entdeckung eines Belohnungssystems im ZNS und seine strikte anatomische Trennung von Arealen, welche die somatische Entzugssymptomatik bedingen, unterstützt ebenfalls die „positive-reinforcement“-Hypothese (zusammengefasst in [274]).

Das neurologische Substrat, welches den Übergang von der kontrollierten, gelegentlichen Einnahme eines Suchtstoffes zu einer Sucht (unkontrollierte massive Einnahme mit den oben beschriebenen Symptomen²⁵) kodiert, ist bis dato nicht eindeutig identifiziert worden. Bekannt sind jedoch die Hirnareale, welche aktiv mit dem Belohnungssystem verknüpft sind. Die Erforschung des **Belohnungssystems** hängt intensiv mit der Motivationsforschung zusammen. Da der Hypothalamus essentiell ist für die Ausführung und Kontrolle vieler lebenswichtiger Funktionen des Organismus (Nahrungsaufnahme, Durst, Temperaturregulation, Sexualverhalten und Aggression), war dies auch das erste Hirnareal, welches in Verbindung gebracht wurde mit der Motivationskontrolle. Läsionen des Hypothalamus führten etwa zum Verlust dieser motivationalen Funktionen. Es stellte sich jedoch heraus, dass die hypothalamischen Mechanismen vielmehr auf der Ebene der Kontrolle konsumatorischen Verhaltens statt gelernten instrumentellen (zielorientierten)

²⁴ Reinforcement: „Das, was das Habit schafft, stärkt oder bekräftigt“ [1].

²⁵ WHO-Definition der Sucht: „Compulsion to take a drug with a loss of control in limiting intake“ [153].

Verhaltens operieren. Man fand jedoch heraus, dass die Hypothalamus-Läsionen oft dessen lateralen Teil (LH²⁶) beeinträchtigten, eine Struktur, welche durch eine Masse von axonalen Projektionen durchzogen wird, welche eine der wichtigsten Verbindungen zwischen dem Mittel- und Vorderhirn darstellen und einen erheblichen Teil monoaminerger Neurotransmitter führen (mediales Vorderhirnbündel; mfb). Das mfb ist gleichzeitig die zentrale Projektionsbahn der nigrostriatalen und mesolimbischen dopaminergen Neurone ins Telenzephalon. So stellte sich heraus, dass die dopaminerge Verbindung vom VTA zum NAcc in höchstem Maße mit dem motivationalen Teil des Belohnungssystems zusammenhängt: Der dopaminerge Eingang ins ventrale Striatum ist modulatorisch tätig in der Auswahl geeigneter Antworten auf eingehende sensorische Informationen (explizit: Stimuli, welche das Auftreten von Belohnung vorhersagen²⁷). Diese Form der Informationsverarbeitung scheint charakteristisch für striatale Strukturen zu sein (vgl. „switching“-Funktion und -Defizit bei DA-Mangel [276]). Das ventrale Striatum ist eingebettet als „Schaltstation“ zwischen limbischen Arealen (Amygdala, Hippocampus, PFC) und den motorischen, autonomen und endokrinen Ausgängen (Pallidum, Hypothalamus) innerhalb der ventralen cortiko-striato-(pallido-thalamo)-cortikalen Schleife [79;111;192;251;281;301]. Suchtstoffe bedienen sich dieses Mechanismus und erhöhen die DA-Freisetzung (über ihre eigenen Wirk-Mechanismen) im ventralen Striatum, was zur psychomotorischen Aktivierung und über diesen Mechanismus auch zur Belohnungsempfindung führt [152;153;294]. Die Einnahme von Suchtstoffen scheint im Gegensatz zu natürlichen belohnenden Stimuli (Nahrung) die Mechanismen im NAcc zusätzlich zu entkoppeln [22].

FRAGESTELLUNG:

Zwei mit Hilfe verhaltenspharmakologischer Methoden quantifizierbare Phänomene scheinen mit der Entwicklung einer Sucht in kausalem Zusammenhang zu stehen: die Sensitivierung bestimmter Suchtstoff-assoziiierter Effekte und das unwiderstehliche Verlangen nach erneuter Suchtstoffeinnahme (Craving). Für MDMA ist sowohl eine Verhaltenssensitivierung als auch das Craving im Platzkonditionierungsparadigma bereits beschrieben worden und soll im Rahmen dieser Arbeit näher bewertet werden, insbesondere im Hinblick auf die Rolle

²⁶ Eine elektrische Stimulation dieses Areals wirkt selbst belohnend und führt in Versuchstieren operant zu einer massiven Selbst-Stimulation [214].

²⁷ Oder genauer beschrieben, das Auftreten möglicher wichtiger (meist neuer) Stimuli, welche mit einer Belohnung zusammenhängen, sog. Vorhersagefehler [282].

noradrenerger Neurotransmission und das soziale Umfeld des Individuums. Der Einfluss neurotoxischer Effekte von MDMA sowie möglicher kompensatorischer Prozesse soll ebenfalls diskutiert werden im Hinblick auf das Suchtpotenzial von MDMA.

6.2. Verhaltenssensitivierung

Die Beobachtung einer Verhaltens-Sensitivierung könnte ein wichtiger Hinweis sein auf den Mechanismus der Suchtentstehung, d.h. des Übergangs von der kontrollierten zur unkontrollierten Einnahme der Suchstoffe. Als Sensitivierung (auch „reversed tolerance“) wird, im Gegensatz zur Toleranz, die Verstärkung der durch Suchtmittel hervorgerufenen Wirkungen (meist im Verhalten sichtbar) bei intermittierender wiederholter Gabe eines Suchtmittels bezeichnet. Die Sensitivierung betrifft jedoch nicht alle Effekte einer Substanz, sondern nur einige wenige, und kann parallel zur Toleranz anderer Effekte auftreten (beispielsweise kann eine wiederholte Morphingabe eine Toleranz der analgetischen Effekte entwickeln neben einer Sensitivierung der lokomotorischen Stimulation) [300]. Das Ausmaß und die Art der Sensitivierung hängen zudem vom Kontext ab, in welchem der Stoff appliziert wurde [213;254]. Neben der Sensitivierung von einigen Verhaltensvariablen kommt es bei wiederholter Gabe von Suchtstoffen ebenfalls zu einer Verstärkung einiger neuronaler Schaltkreise im Gehirn, speziell des Belohnungssystems: In diesem Mechanismus spielen exzitatorische Eingänge aus dem PFC im VTA wahrscheinlich eine Schlüsselrolle und führen während der wiederholten Substanz-Gabe zu einer Induktion verschiedener Gene (TH-mRNA, DAT-mRNA und relevanter Transkripte für neuronale Plastizität) sowie Suppression anderer (Gi-Protein-mRNA), was sekundär zu einer Verstärkung der mesoaccumbalen dopaminergen Neurotransmission führt. Dies resultiert in einer stärkeren Suchtstoff-induzierten DA-Freisetzung im sensitivierten Tier im Vergleich zum Kontrolltier. In einem (Psychostimulantien-) sensitivierten Gehirn ist eine verstärkte Neurotransmission der präfrontocortikalen Eingänge in das VTA, der mesoaccumbalen dopaminergen Projektion, sowie der accumbulo-pallidalen Bahn beobachtet worden [138;228].

Die Wichtigkeit der Sensitivierung ist besonders zu betonen, da sie als der zentrale Prozess in der Suchtentstehung gesehen wird: „incentive sensitization theory“. Robinson und Berridge postulieren hierbei eine Dissoziation des Belohnungssystems in zwei Komponenten mit getrennter Vermittlung der hedonischen Empfindungen durch eine Suchtmittelleinnahme („liking“) und das Verlangen nach dem Suchtmittel („wanting“). In der Anfangsphase einer Suchtkarriere steht das „liking“ im Vordergrund, wird jedoch durch ein bei wiederholter

Suchtmittelleinnahme zunehmend sensitivierendes „wanting“ verdrängt, sodass in einer entwickelten Sucht das „wanting“-System eine zwanghafte Suche nach dem Suchtmittel vermittelt [253]. Sensitivierte Tiere erfahren sogar eine Verstärkung des belohnenden Effekts von natürlichen Belohnungsstimuli [326].

Eine Sensitivierung mit MDMA führt ebenfalls zu einer Verstärkung von belohnenden Effekten: Cocain führt bei MDMA-sensitivierten Tieren zu einer stärkeren DA-Freisetzung im NAcc, sowie stärkeren Platzpräferenz auf Cocain [129;195], was auf ein Potential von MDMA als „Einstiegsdroge“ hinweist, d.h. durch wiederholte Einnahme des als „harmlos“ geltenden Ecstasy²⁸ kommt trotzdem eine Sensitivierung zustande, welche das „wanting“ oder „craving“ für andere Suchtstoffe verstärkt.

In dieser Arbeit wird der Einfluss von MDMA auf die Entwicklung einer Verhaltenssensitivierung untersucht sowie die sensitivierten Gehirne neurochemisch analysiert. MDMA führt neben einem starken Serotonin- und Dopaminrelease ebenfalls zu einer sehr starken Noradrenalin-Freisetzung und bindet hochaffin an α_2 -Rezeptoren [24;261]. Daher wird - wie bereits erwähnt - in dieser Studie die Rolle intakter noradrenerger Vorderhirninnervation im Zusammenhang mit der Entwicklung einer Verhaltenssensitivierung ebenfalls untersucht.

6.2.1. Material & Methoden

6.2.1.1. Tiere

Es wurden männliche Sprague-Dawley-Ratten (Charles-River, Sulzfeld, Deutschland) verwendet mit einem Körpergewicht von 210 – 260 g im Versuchsteil I bzw. 210 – 320 g im Versuchsteil II. Sie wurden in Gruppen gehalten unter konstanten klimatischen Bedingungen (Raumtemperatur 23 ± 3 °C; Luftfeuchte 40-60%) in einem 12/12 h Licht-Dunkel-Zyklus (Licht an: 07:00). Sie bekamen täglich 12 g/Tier Standard-Ratten-Futter (Altromin, Lage), Wasser stand „ad libitum“ zur Verfügung.

²⁸ Da es eine große Zahl abstinenter MDMA-Konsumenten gibt, wird MDMA oftmals als „weiche Droge“ bezeichnet. In einem Versuch unserer Abteilungen zeigte MDMA im Gegensatz zu Amphetamin keine konditionierte Platzpräferenz [Meyer, A. et al., eingereichte Publikation].

6.2.1.2. Substanzen

MDMA-HCl (20,0 mg/ml) wurde gelöst in Phosphat-gepufferter isotonischer Kochsalzlösung nach der Dulbecco-Rezeptur (Dulbecco's PBS, Sigma Deisenhofen, Deutschland = 0,2 g KCl; 0,2 g KH₂PO₄; 8,0 g NaCl; 1,15 g Na₂HPO₄ / 1 l H₂O-dest) und subkutan (s.c.) injiziert als 1 ml/kgKG.

DSP-4 (50,0 mg/ml) (Astra-Zeneca, Södertälje, Schweden) wurde für jedes Tier jeweils frisch gelöst in isotonischer Kochsalzlösung (Saline) und innerhalb 1 min intraperitoneal (i.p.) injiziert als 1 ml/kgKG.

6.2.1.3. Verhaltenstests

Für das Sensitivierungsparadigma wurden sogenannte „Open Fields“ benutzt, d.h. die Tiere wurden in eine würfelförmige Kammer gesetzt, mittels welcher das Verhalten ausgewertet werden konnte. Im Versuchsteil I (Ergebnisse siehe Punkt 6.2.2.1.) hatten diese Boxen die Abmessungen (47 cm x 47 cm x 44 cm) und die Bewegung der Tiere wurde mittels in zwei Ebenen angeordneten Lichtschranken registriert (Abb. 6.1.). Mit Hilfe eines angeschlossenen Rechners und Software (TSE, Bad Homburg) konnte aus diesen Daten die horizontale und vertikale Aktivität der Tiere ausgewertet (Aktivität in x-, y-, z-Richtung) und somit die Parameter „Weg“, „Laufzeit“ und Anzahl der „Aufrichtungen“ bestimmt werden.

Im Versuchsteil II (Ergebnisse siehe Punkt 6.2.2.2.) bestanden die Open Fields aus einer von 30 cm hohen Wänden umrahmten Bodenfläche (70 cm x 70 cm) aus Kunststoff, welche sich in einer Box mit den Abmessungen 70 cm x 70 cm x 105 cm befand (Abb. 6.2.). Die Bodenfläche wurde durch weiße Linien in 16 gleichgroße Quadrate/Felder unterteilt, welche

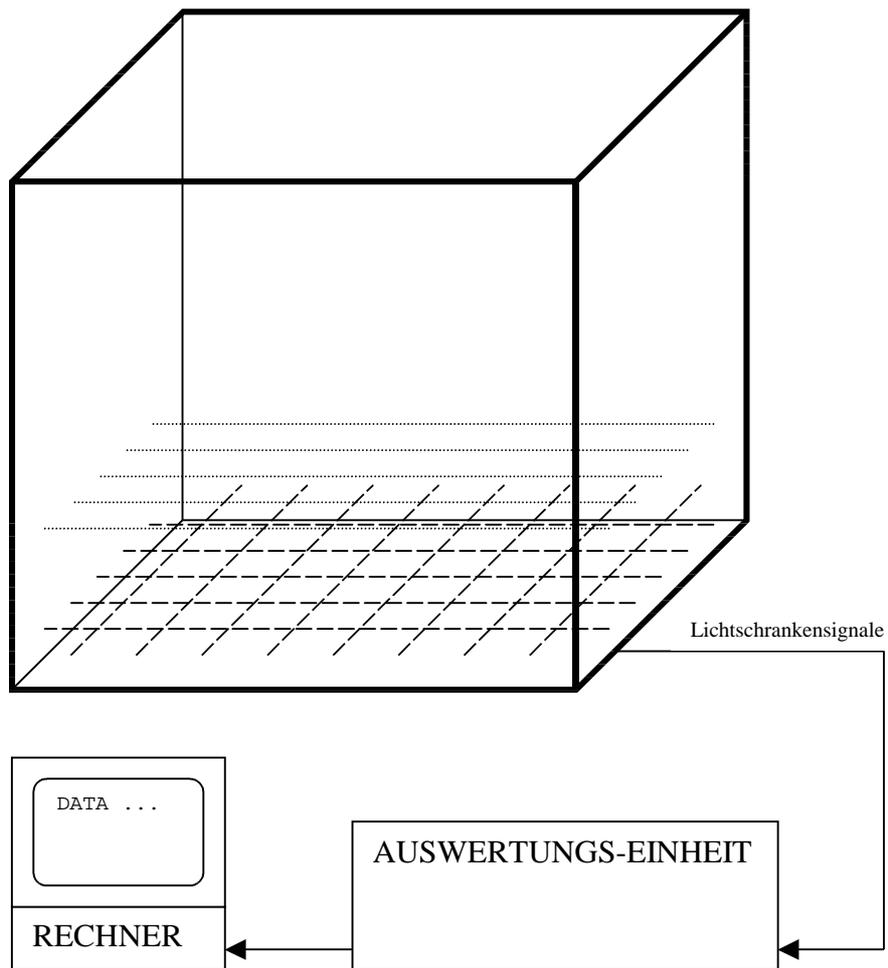


Abb. 6.1.: „Open Field“ mit zwei Lichtschrankengittern und angeschlossener Auswertungseinheit (TSE) zur Berechnung des Schwerpunktes der Ratte und ihrer horizontalen und vertikalen Aktivität.

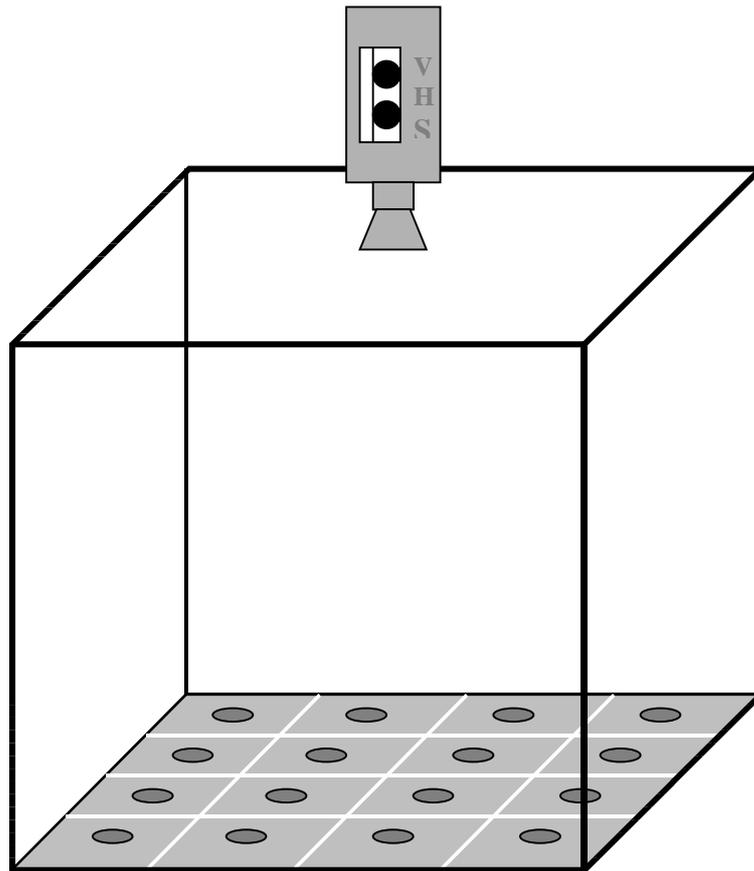


Abb. 6.2.: „Open Field“ mit Linienraster und Bodenöffnungen zur videounterstützten Auswertung der lokomotorischen und exploratorischen Aktivität der Ratte.

in der Mitte jeweils eine runde Öffnung von 5 cm Durchmesser und 3 cm Tiefe enthielten. Die Box wurde von oben durch 4 rote 25W-Glühlampen illuminiert und ein Ventilator sorgte für die notwendige Luftzufuhr und Hintergrundrauschen. Die Registrierung des Verhaltens der Tiere erfolgte mittels einer Videokamera. Die Videobänder wurden im Nachhinein ausgewertet im Hinblick auf die Parameter „Felderwechsel“ (Überqueren der weißen Felder-Trennlinien mit dem Körperschwerpunkt), Anzahl der „Aufrichtungen“ (vertikales Aufrichten des Körpers unter Loslösen beider Vorderpfoten vom Boden), Anzahl der „Head-dips“ (Exploration = Hineinblicken in die Öffnungen) und „inaktives Sitzen“.

Im Versuchsteil II wurden die Tiere zusätzlich für 5 min in eine „Schnüffelbox“ (30 cm x 10 cm x 10 cm) gesetzt. Die Wände bestanden aus Acrylglas, was ebenfalls eine Videoaufnahme

des Verhaltens ermöglichte. Die folgenden Parameter wurden analysiert: „Schnüffeln gesamt“ (Wandkontakte mit der Schnauze), Anzahl der Drehungen um 180°, Dauer der Putzaktivität (Fellpflege) und „inaktives Sitzen“.

Zusätzlich zur Auswertung der oben genannten Parameter mit Hilfe der Videobänder erfolgte eine halbquantitative Einschätzung des „Serotonin-Score“: Diese Methode wurde bereits von Kutscher & Yamamoto [160] angewandt, um die Expressionsstärke des Serotonin-Syndroms zu messen. Leicht abgewandelt wurde dieser Score auch hier zum Zweck der Quantifizierung des Serotonin-Syndroms angewandt, wobei die Stärke bzw. Dauer der folgenden Symptome mit einer Zahl von 0 (überhaupt nicht) bis 3 (voll entfaltet / über den gesamten Beobachtungszeitraum) bewertet wurde: Piloerektion, Straub'scher Schwanz, flache Körperhaltung und repetitives Kopf-Wenden („headwaving“).

6.2.1.4. Prozedur

Im **Versuchsteil I** wurden die Tiere an den Versuchstagen 1-11 und 18 für insgesamt 45 min täglich beobachtet. Zuerst wurden sie im unbehandelten Zustand ins Open Field gesetzt, nach 15 min wurden sie herausgenommen und es wurde ihnen eine Lösung injiziert, woraufhin die Tiere für weitere 30 min zur Verhaltensbeobachtung zurück ins Open Field gesetzt wurden.

An den Versuchstagen 1 bis 10 wurde jeweils eine Tiergruppe (n=20) mit MDMA behandelt, die andere Tiergruppe (n=12) mit Vehikel; am Tag 11 und 18 wurden alle Tiere mit Vehikel behandelt.

Am Versuchstag 24 wurde jeweils die Hälfte der Tiere jeder Behandlungsgruppe dekapitiert und die Gehirne für die Neurochemie aufgearbeitet, am Versuchstag 40 die andere Hälfte der Tiere. Nähere Details zur Methodik der neurochemischen Analytik sind in Kapitel 7.3. nachzulesen.

Im **Versuchsteil II** wurde einer Hälfte der Tiere (n=40) am Tag -5 50 mg/kg DSP-4 injiziert (=DSP-Gruppe), die andere Hälfte (n=40) erhielt Vehikel (Saline=SAL-Gruppe: scheinlädiert). Am Tag 0 wurden alle Tiere mit Vehikel behandelt und ihr Spontanverhalten im Open Field und der Schnüffelbox jeweils 5 min lang beobachtet („Baseline“). Von Tag 1 bis 10 erhielt jeweils die Hälfte der Tiere der Vorbehandlungsgruppen an jedem Tag 20 mg/kg.d MDMA-HCl, die andere Hälfte Vehikel. So entstanden vier Behandlungsgruppen mit

jeweils n=20 Tieren. Am Tag 1, 4, 7 und 10 wurden die Tiere 60 min nach der Injektion für jeweils 5 min im Open Field und der Schnüffelbox getestet.

Am Tag 40 wurden 8 Tiere aus jeder Gruppe dekapitiert und die Hirne wurden für die Neurochemie aufgearbeitet. Nähere Details hierzu sind in Kapitel 7.3. nachzulesen.

6.2.1.5. Statistik

Zur statistischen Auswertung wurden parametrische Tests herangezogen. Im Sensitivierungsversuch I wurde eine 2- bzw. 3-faktorielle ANOVA gerechnet mit anschließenden „protected Fischer’s LSD-t-Tests“. Im Sensitivierungsversuch II wurde ebenfalls eine 3-faktorielle ANOVA gerechnet mit anschließender post-hoc „Tukey’s t-Test“-Berechnung.

6.2.2. Ergebnisse

6.2.2.1. Verhaltenssensitivierung - Versuch I.

Verhalten im „Open Field“

Die Tiere zeigten am Tag 1 und 10 im Open Field folgendes Verhalten: Als sie im unbehandelten Zustand in das Open Field gesetzt wurden, zeigten sie zunächst (min 0-15) eine Abnahme der horizontalen (Weg, Laufzeit) und vertikalen (Aufrichtungen) Aktivität, wobei diese Parameter von Tag 1 bis hin zum Tag 10 ebenfalls signifikant abgenommen haben (Statistik siehe Anhang, Tabelle 9.1.).

Nach jeweiliger MDMA-Behandlung und erneutem Einsetzen ins Open Field zeigten die MDMA-behandelten Tiere im Vergleich zu Vehikel-behandelten Tieren die Entwicklung einer starken horizontalen Hyperaktivität, jedoch nicht einer vertikalen Hyperaktivität (Anzahl der Aufrichtungen). Am Tag 10 war die Ausprägung der Hyperaktivität jedoch stark vergrößert: Die Tiere legten eine viel größere Strecke zurück als am Tag 1, sie zeigten eine relativ erhöhte Laufzeit und die Hyperaktivität war jetzt ebenfalls in vertikaler Richtung ausgeprägt. Der Weg, die Laufzeit und die Anzahl der Aufrichtungen waren bei der Vehikel-Gruppe am Tag 10 quantitativ gleich den Werten am Tag 1. (Abb. 6.3., Tabelle 9.1.)

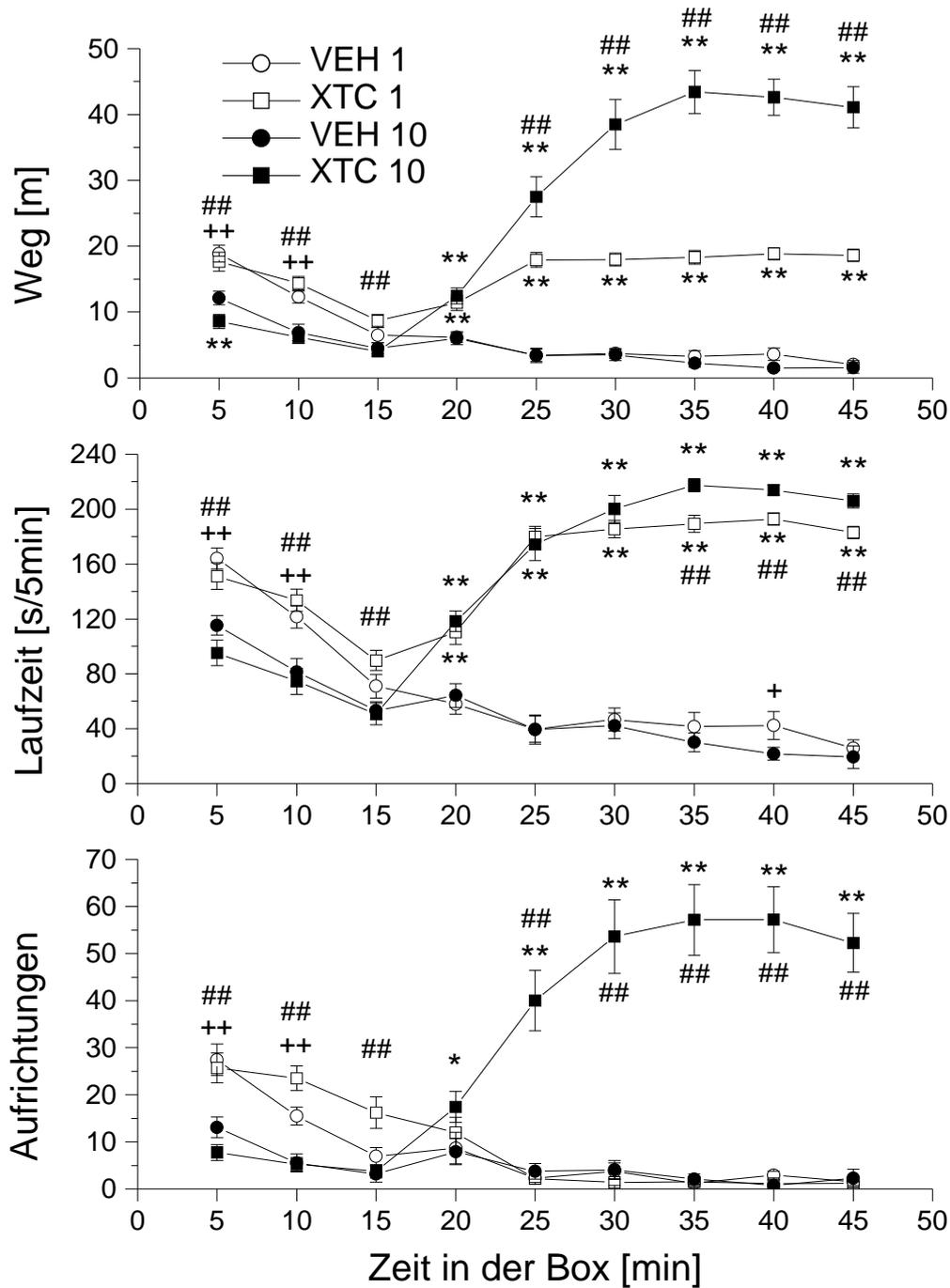


Abb. 6.3.: Verhalten der Tiere im Open Field am Tag 1 (offene Symbole) und 10 (geschlossene Symbole) der subchronischen MDMA-Behandlung. Die MDMA- (Rechtecke) bzw. Vehikel-Injektion (Kreise) erfolgte jeden Tag 15 min nach Einsetzen in das Open Field.

Statistik: post-hoc-Tukey's t-Tests: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ jeweils MDMA vs. Vehikel; # $p < 0,05$; ## $p < 0,01$ jeweils MDMA Tag 10 vs. Tag 1; + $p < 0,05$; ++ $p < 0,01$ VEH Tag 10 vs. Tag 1

Am Tag 11 wurden nach dem Herausnehmen aus dem Open Field bei $t=15$ min, im Gegensatz zu den Tagen 1-10 (MDMA-Behandlung bei der Hälfte der Tiere), alle Tiere mit Vehikel behandelt. Die statistische Auswertung (Tabelle 9.2.) zeigte keine Änderung der Aktivität (Weg, Laufzeit, Aufrichtungen) im Vergleich der beiden Tiergruppen (Abb. 6.4.).

Am Tag 18 wurde verfahren wie am Tag 11, jedoch zeigte sich nach der Injektion mit Vehikel diesmal eine leichte, aber signifikante (Tabelle 9.3.) Erhöhung der Lokomotion (Weg, Laufzeit) wie auch eine gesteigerte vertikale Aktivität (Anzahl Aufrichtungen) bei den MDMA-vorbehandelten Tieren (Abb. 6.5.).

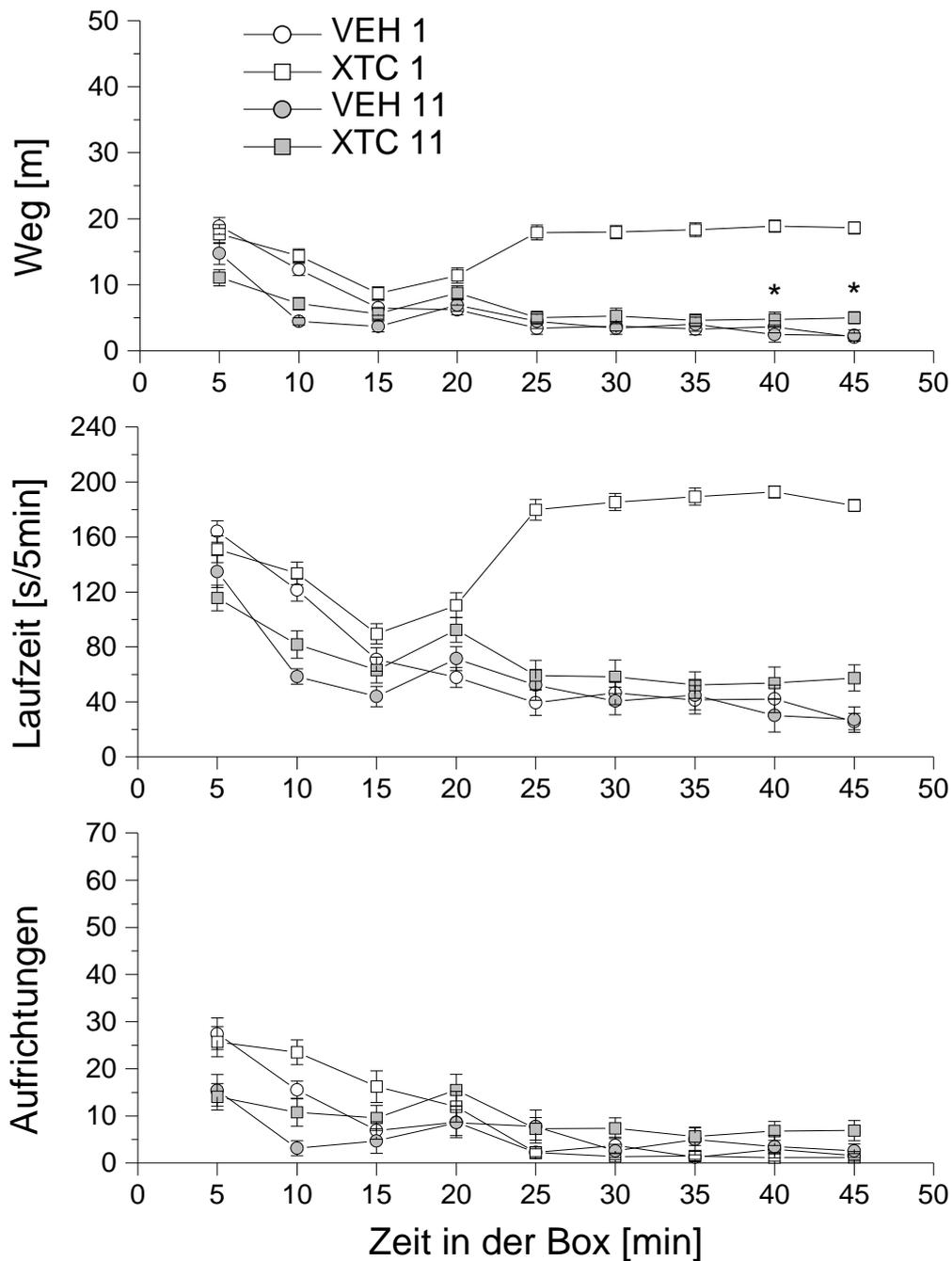


Abb. 6.4.: Verhalten der Tiere im Open Field am Tag 11 (graue Symbole) verglichen mit Tag 10 (offene Symbole) der subchronischen MDMA-Behandlung. An diesem Tag erfolgte 15 min nach Einsetzen in das Open Field bei beiden Gruppen eine Vehikelinjektion. Unterschieden wird zwischen MDMA- (Rechtecke) bzw. Vehikel-vorbehandelten (Kreise) Tieren.

Statistik: post-hoc-Tukey's t-Tests: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ jeweils MDMA-Gruppe vs. VEH-Gruppe am Tag 11.

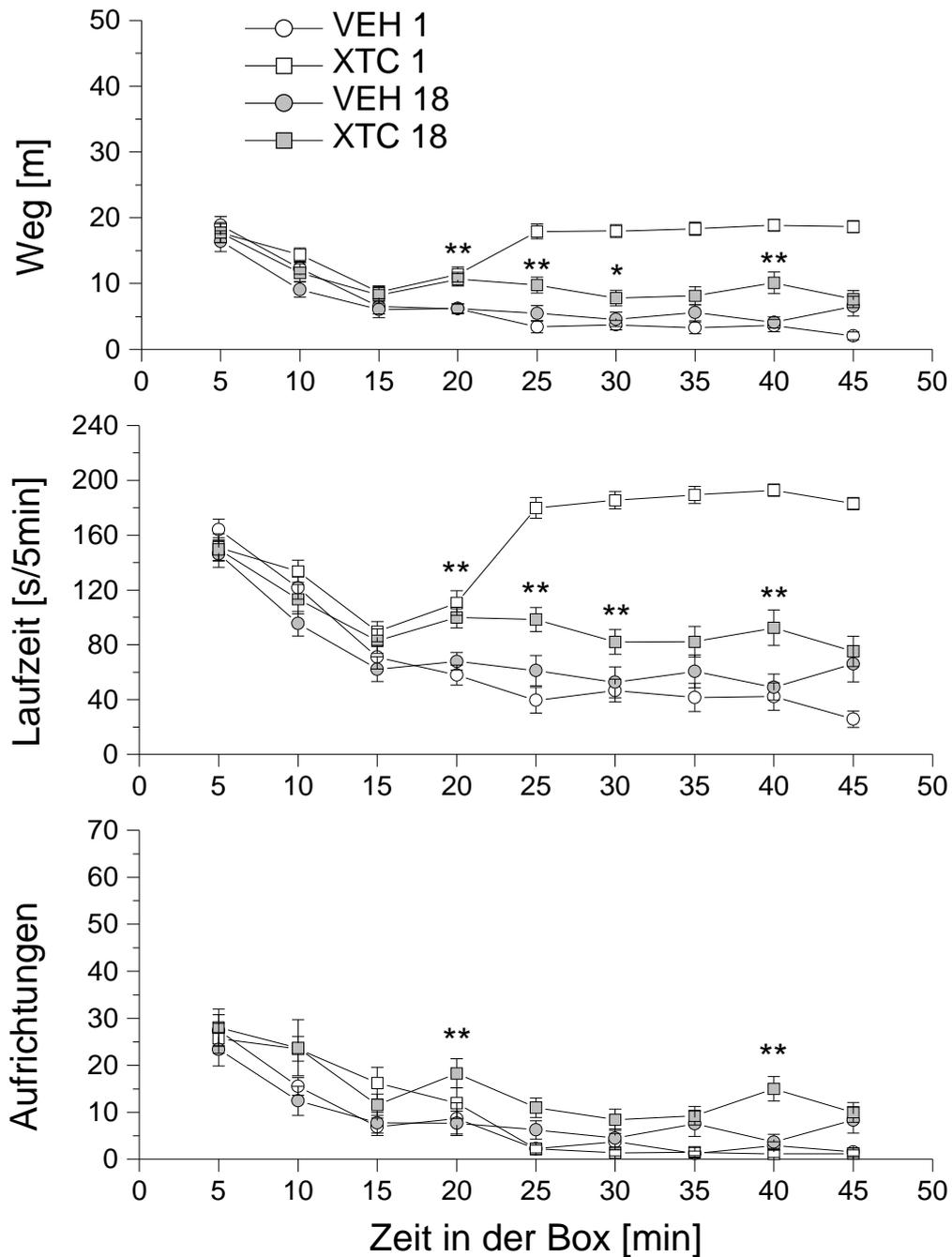


Abb. 6.5.: Verhalten der Tiere im Open Field am Tag 18 (graue Symbole) verglichen mit Tag 10 (offene Symbole) der subchronischen MDMA-Behandlung. An diesem Tag erfolgte 15 min nach Einsetzen in das Open Field bei beiden Gruppen eine Vehikelinjektion. Unterschieden wird zwischen MDMA- (Rechtecke) bzw. Vehikel-vorbehandelten (Kreise) Tieren.

Statistik: post-hoc-Tukey's t-Tests: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ jeweils MDMA-Gruppe vs. VEH-Gruppe am Tag 18.

6.2.2.2. Verhaltenssensitivierung II.

Verhalten im „Open Field“

Die Versuchstiere zeigten im „Open Field“ während der intermittierenden Behandlung mit MDMA folgendes Verhalten (Abb. 6.6.):

MDMA-Gaben induzierten eine eindeutige, vorwärtsgerichtete Hyperlokomotion (gemessen an der Anzahl der Felderwechsel) bei DSP-4-lädierten sowie scheinlädierten Tieren. **Jedoch nur nichtlädierte Tiere entwickelten eine hochsignifikante Sensitivierung** der Felderwechsel. Gestützt werden diese Befunde durch eine 3-faktorielle repeated measures ANOVA; der Unterschied in der Sensitivierungsentwicklung bei lädierten und nichtlädierten Tieren bzw. das Fehlen einer Sensitivierung bei lädierten Tieren wird ausserdem ebenfalls eindeutig belegt durch die ANOVA-Ergebnisse (gesamte Statistik: vgl. Anhang, Tab. 9.4.)

Immobilität (inaktives Sitzen) ist sehr gering ausgeprägt, jedoch ist ein Unterschied zwischen den MDMA-behandelten und unbehandelten Gruppen zu sehen. Es ist ebenfalls eine Entwicklung über die Zeit zu sehen, was auf eine Habituation hinweist.

Die Anzahl der Aufrichtungen (vertikale Lokomotion/Exploration) war stark erniedrigt bei MDMA-behandelten Tieren.

Die Anzahl der head-dips nahm im Versuchsverlauf bei den beiden MDMA-behandelten Gruppen kontinuierlich ab. Die DSP-4-vorbehandelten Tiere zeigten ausserdem eine signifikant niedrigere head-dips-Anzahl.

Verhalten in der „Experimentierkammer“

Die MDMA-behandelten Tiere zeigten an allen Tagen ein erhöhtes Schnüffeln, jedoch war die MDMA-induzierte Schnüffelstereotypie bei DSP-4-lädierten Tieren nicht so stark erhöht wie bei nichtlädierten (siehe Tab. 9.4.; Abb. 6.7.). Es kam jedoch zu **keiner Sensitivierung** der Schnüffelstereotypien!

Die Behandlung mit MDMA hatte ebenfalls eine Steigerung der Anzahl der Drehungen um die eigene Achse zur Folge, jedoch kam es im Verlauf der Zeit zu einer kontinuierlichen Abschwächung dieses Effekts. Zwischen lädierten und nichtlädierten Gruppen war durch die ANOVA kein signifikanter Unterschied nachzuweisen.

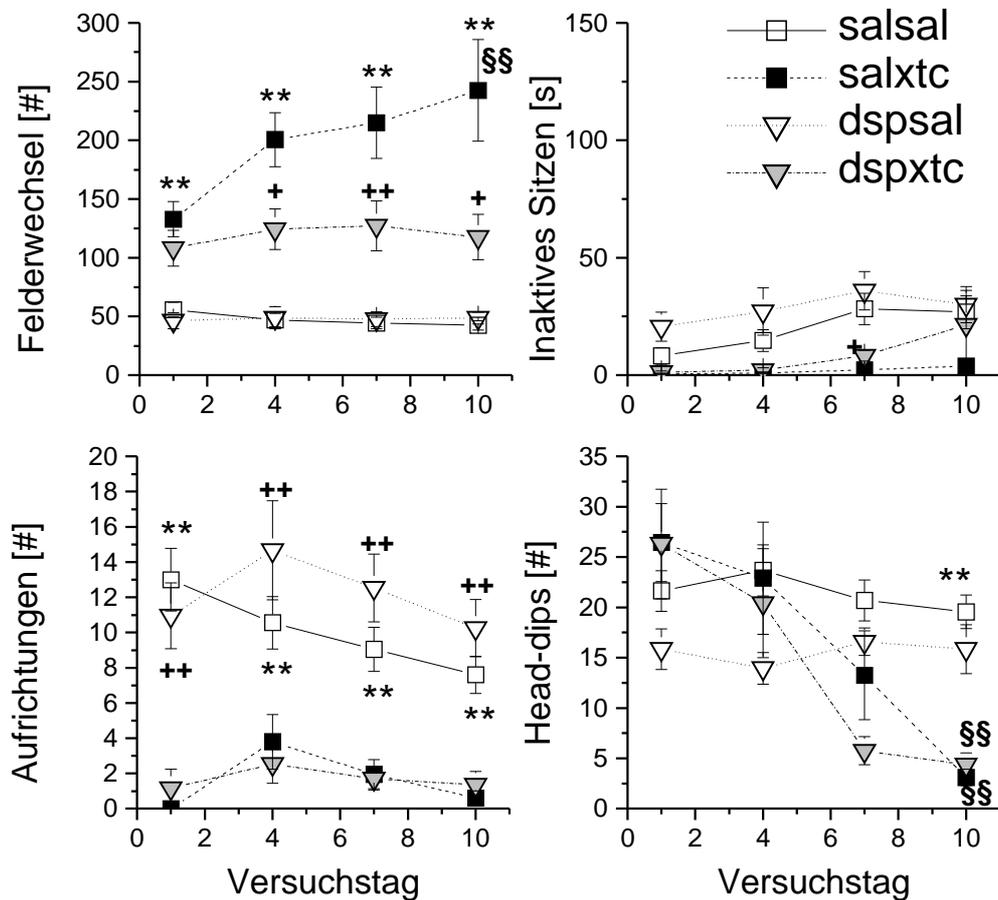


Abb. 6.6.: Verhalten der Tiere im „Open Field“. DSP-4- („dsp...“) bzw. scheinläderte („sal...“) Tiere wurden jeden Tag (1-10) mit MDMA („...xtc“) bzw. Vehikel („...sal“) behandelt und in das Open-Field für 5 min platziert. An den Tagen 1,4,7,10 wurde ihre Aktivität (Anzahl der Felderwechsel, Aufrichtungen und head-dips in Bodenöffnungen; sowie inaktive Zeit) registriert. Statistik: Post-hoc-Tukey's t-Tests: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ salxtc gegen salsal; + $p < 0,05$; ++ $p < 0,01$ dspxtc gegen dspal; (# $p < 0,05$; ## $p < 0,01$ dspxtc gegen salxtc); § $p < 0,05$; §§ $p < 0,01$ gegen Tag 1 der jeweiligen Gruppe.

Das Putzverhalten der Tiere war an allen Tagen nach MDMA-Injektion praktisch eliminiert, unabhängig von der Vorbehandlung mit DSP-4. Die Läsion hatte jedoch einen Effekt auf Kontrolltiere: Im Verlauf des zehntägigen Versuches wurde die Putzdauer bei lädierten Tieren eher vermindert.

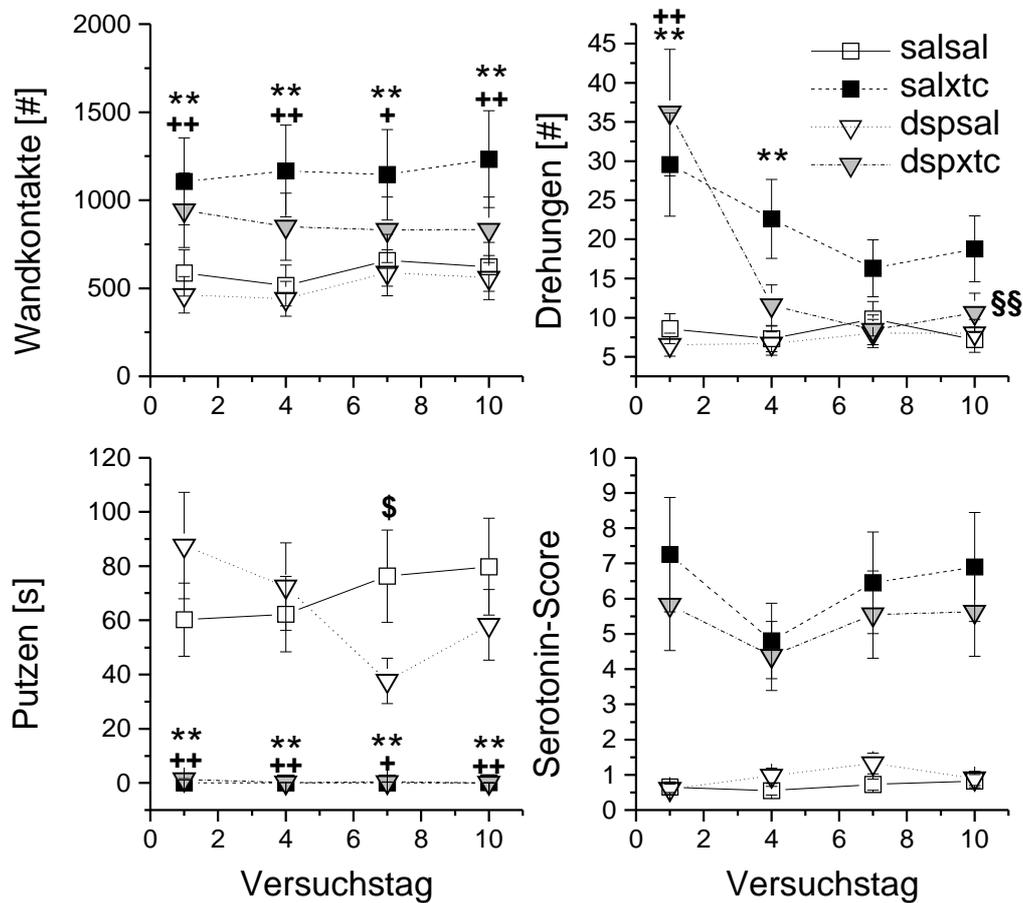


Abb. 6.7.: Verhalten der Tiere in der „Experimentier-, oder „Schnüffelbox“. DSP-4- („dsp...“) bzw. scheinladierte („sal...“) Tiere wurden jeden Tag (1-10) mit MDMA („...xtc“) bzw. Vehikel („...sal“) behandelt und in die Experimentierbox für 5 min platziert. An den Tagen 1,4,7,10 wurde ihre Aktivität (Anzahl der Wandkontakte (=Schnüffeln), Drehungen um 180°, Dauer der Fellpflege/Putzen sowie das Maß für Bewertung des Serotonin-Syndroms =“Serotonin-Score“ (zur näheren Erläuterung des Scores siehe Text) registriert.

Statistik: Post-hoc-Tukey's t-Tests: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ salxtc gegen salsal; + $p < 0,05$; ++ $p < 0,01$ dspxtc gegen dspisal; (# $p < 0,05$; ## $p < 0,01$ dspxtc gegen salxtc); § $p < 0,05$; §§ $p < 0,01$ gegen Tag 1 der jeweiligen Gruppe; § $p < 0,05$ dspisal gegen salsal.

Die Auswertung der Symptome des Serotonin-Syndroms („Serotonin-Score“) ergab, dass die MDMA-Behandlung zu einem starken Anstieg des Scores führt. Bei wiederholter Verabreichung von MDMA blieben die Serotonin-Score-Werte auf dem gleichen Level bestehen. Es ist kein Unterschied zwischen DSP-4-ladierten und nichtladierten Tieren zu sehen. (Wegen der subjektiven Einschätzung und Bewertung der Symptome wurde auf eine Statistik verzichtet).

Neurochemie

Eine genaue Beschreibung der Neurochemie-Ergebnisse findet sich in Kapitel 7.

Es sei hier jedoch hervorgehoben, dass im Versuchsteil I, neben einer starken 5-HT-Entleerung im Vorderhirn, es im NAcc auch zu einer regioselektiven DA-Erhöhung neben einer NA-Verarmung kam.

Die DSP-4-Behandlung im Versuchsteil II führte zu einer NA-Entleerung im PFC. Die 5-HT-Konzentrationen wurden durch MDMA im PFC und Striatum ebenfalls vermindert, jedoch war das Ausmaß dieser Entleerung nicht durch DSP-4 modifiziert.

6.3. Platzkonditionierung

Die Platzkonditionierung wird verwendet, um die motivationalen Eigenschaften eines Stoffes zu bewerten. Sie wurde in den frühen 80er Jahren eingeführt, um die Interpretationsschwierigkeiten bei der Methode der Selbstadministration zu kompensieren. Zum ersten Mal ist 1954 Olds & Milner [214] aufgefallen, dass Tiere, die an einem bestimmten Ort belohnende Wirkungen (z.B. durch intracraniale Selbststimulation) erfahren haben, im späteren Versuch zu diesem Ort immer wieder zurückkehren. Die Platzkonditionierung läuft ganz nach dem Pawlow'schen Prinzip ab: Primäre motivationale Eigenschaften einer Substanz können als unkonditionierter Stimulus (US) fungieren und werden wiederholt gepaart mit charakteristischen Umgebungsstimuli, welche im Zuge der Konditionierung sekundäre motivationale Eigenschaften erwerben und als konditionierte Stimuli (CS) agieren. Wenn die Tiere vermehrt dem CS ausgesetzt werden (in Abwesenheit des US) kann ebenfalls eine Extinktion der Konditionierung eintreten (zusammengefasst in [311]). In diesem Rahmen ist es einleuchtend, dass sich die Platzkonditionierung in Bezug auf den Lernprozess (klassische Konditionierung) fundamental vom Tiermodell der Selbstverabreichung (operante Konditionierung) unterscheidet. Das Paradigma der Platzkonditionierung beinhaltet insofern bedeutende Vorteile, als: (1) die Tiere in einem Substanz-freien Zustand getestet werden können, (2) sie sensitiv ist sowohl gegenüber Belohnung als auch Aversion, (3) sie die simultane Registrierung der Platzpräferenz und der lokomotorischen Aktivität erlaubt, (4) sie anwendbar ist auf eine Vielzahl von Spezies, (5) sie normalerweise monophasische Dosis-Wirkungs-Beziehungen ergibt und (6) sie zur Erforschung in Belohnungssysteme involvierter neuronaler Schaltkreise geeignet ist [21].

Trotz mancher Einschränkungen²⁹ stellt die Platzkonditionierung ein wichtiges Werkzeug dar, um die sekundär belohnenden Reize des Drogen-assoziierten Kontext (in Abwesenheit der Primärreize des eigentlichen Suchtstoffes) zu bewerten. Insbesondere die Erforschung des „Craving“-Phänomens stellt sich als Herausforderung, könnte es ja ausgelöst werden durch Kontextstimuli und in erster Linie verantwortlich sein für einen Rückfall sogar nach langen Abstinenzphasen.

In dieser Arbeit wird die Platzkonditionierung mit MDMA erneut bewertet im Hinblick auf eine MDMA-Vorexposition und den Einfluss des sozialen Umfelds auf die sekundär belohnenden Wirkungen von MDMA-assoziiertem Kontext (aber auch auf mögliches Rückfallverhalten). Die Konzipierung der Platzkonditionierungsapparatur erlaubt jedoch parallel auch weitere Beobachtung der Tieraktivität (Lokomotion) und somit ebenfalls einer eventuellen Verhaltenssensitivierung.

6.3.1. Material und Methoden

6.3.1.1. Tiere

Es wurden männliche Sprague-Dawley-Ratten (Charles-River, Sulzfeld, Deutschland) verwendet mit einem Körpergewicht bei Versuchsbeginn von 210 – 240 g beim Versuchsteil I bzw. 210 – 260 g beim Versuchsteil II. Sie wurden in Gruppen gehalten unter konstanten klimatischen Bedingungen (Raumtemperatur 23 ± 3 °C; Luftfeuchte 40-60%) in einem 12/12 h Licht-Dunkel-Zyklus (Licht an: 07:00). Sie bekamen täglich 12 g/Tier (Ausnahme Versuchsteil II: in der ersten Aufenthaltswoche ad libitum) Standard-Ratten-Futter (Ssniff, Soest), Wasser stand ad libitum zur Verfügung .

6.3.1.2. Substanzen

MDMA-HCl (20,0 bzw. 6,0 bzw. 5,0 mg/ml) wurde gelöst in Phosphat-gepuffertes isotonischer Kochsalzlösung nach der Dulbecco-Rezeptur (Dulbecco's PBS, Sigma Deisenhofen, Deutschland = 0,2 g KCl; 0,2 g KH_2PO_4 ; 8,0 g NaCl; 1,15 g Na_2HPO_4 / 1 l H_2O -dest) und subkutan (s.c.) injiziert als 1 ml/kgKG.

²⁹ Natürlich birgt diese Methode auch Nachteile: So ist die Erstellung von Dosis-Wirkungskurven sehr aufwändig, ferner können Störfaktoren wie der Effekt des „Neuen“ oder eine Grundpräferenz für ein Kompartiment ohne jegliche Substanzgabe auftreten. Außerdem fehlt diesem Paradigma die „face-validity“ (vgl. [74]) eines Experiments zur tierexperimentellen Modellierung der Sucht [21].

6.3.1.3. Verhaltenstests

Für das Platzkonditionierungsparadigma wurden fünf parallel geschaltete Platzpräferenzboxen (TSE, Bad Homburg) benutzt, welche aus jeweils drei Kompartimenten aufgebaut waren: Zwei gleichgroße Hauptkammern (auch Kompartimente: 25 x 31 x 29,5 cm) waren jeweils mit einem Mittekompartment (25 x 11 x 29,5 cm) verbunden (Abb. 6.8.). Die Innenwände der Hauptkammern waren bei einer Kammer grau, bei der anderen schwarz-weiß gestreift gestrichen, die Mittekammer hatte weiße Wände. Die Bodenplatte der grau gestrichenen Kammer war von rauher Beschaffenheit, die des gestreiften Kompartiments hatte eine glatte Oberfläche.

Die Trennwände zwischen der Mittekammer und den Hauptkammern konnten wahlweise mit geöffneten oder geschlossenen Durchgängen eingebaut werden.

Jede Kammer war mit einer transparenten Acrylglasplatte abgedeckt, in deren Mitte sich eine Glühlampe befand. Somit konnte die Beleuchtung jeder Kammer einzeln/separat ein- bzw. ausgeschaltet werden. Die Beleuchtung variierte in den einzelnen Versuchsteilen: Im Versuch I waren alle Lichter an, bis auf den Testtag 4, wo nur das Mittekompartment beleuchtet war. Im Versuchsteil II waren nur die vorderen Kompartimente und das Mittekompartment beleuchtet.

In der Höhe von 2,4 cm über der Bodenplatte befanden sich in jedem Kompartiment horizontal angeordnete Lichtschranken, welche an eine Auswertungseinheit angeschlossen waren. Mit Hilfe eines PCs und firmeneigener Software (TSE, Bad Homburg) konnten Unterbrechungen der Lichtschranken simultan in allen fünf Boxen erfasst werden.

Der Platzkonditionierungsversuch wurde in drei Abschnitte gegliedert: eine Vortest-Phase, eine Konditionierungs-Phase (evtl. unterbrochen durch einen Zwischentest) und einen Nachttest. An den Testtagen wurden die Durchgänge in den Trennwänden geöffnet und die Tiere hatten für 15 min freien Zugang zu allen Kompartimenten. An den Konditionierungstagen wurden die Tiere 10 min nach der Injektion des entsprechenden Pharmakons für 30 min in das entsprechende Hauptkompartment (bei Vehikelinjektion das als unbelohnt definierte, bei MDMA-Injektion das als belohnt definierte Kompartiment) gesetzt, wobei die Durchgänge verschlossen waren, sodass das Tier in dem zugeordneten Kompartiment verbleiben musste. Während der Konditionierung wurden die Tiere zudem

abwechselnd behandelt: Am ersten Tag erhielten sie MDMA, am nächsten Vehikel, am dritten Tag wiederum MDMA, usw.

Die Zuordnung des belohnten Kompartiments erfolgte „counterbalanced“, d.h. jeweils bei der Hälfte der Tiere war das graue Kompartiment belohnt, die andere Hälfte wurde im gestreiften

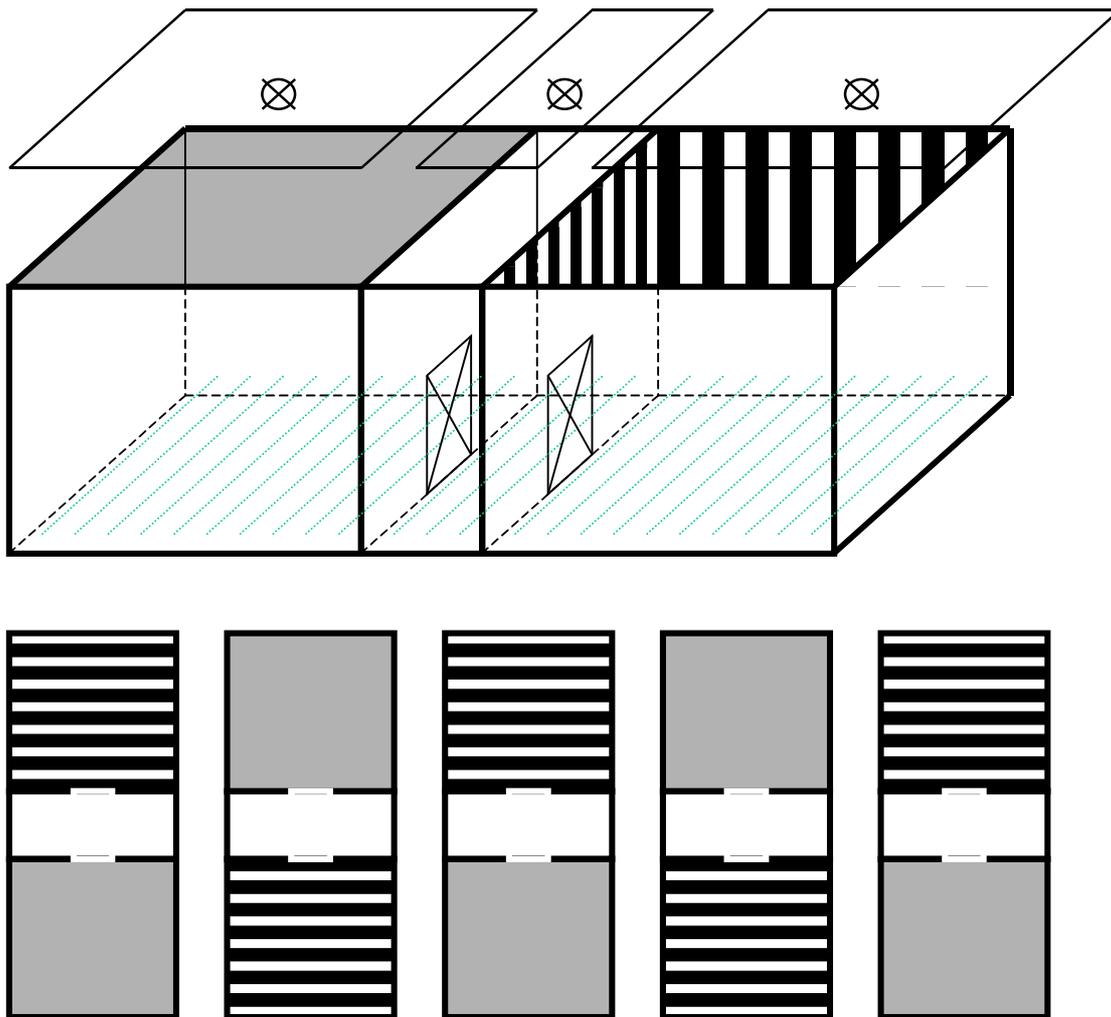


Abb. 6.8.: Platzkonditionierungsboxen. Jede Box besteht aus drei Kompartimenten, wobei jeweils ein graues, ein schwarz-weiß gestreiftes Außenkompartiment und ein weißes Mittelkompartiment vorhanden ist. Die Türen in den Verbindungswänden können wahlweise offen oder geschlossen gehalten werden. 2,4 cm über dem Boden sind Lichtschranken angeordnet, mit deren Hilfe die jeweilige Position des Tieres registriert werden kann. Jedes Kompartiment besitzt einen transparenten Acrylglasdeckel, in dessen Mitte eine Glühbirne lokalisiert ist, welche separat ein-/ausgeschaltet werden kann.

Der gesamte Versuchsaufbau besteht aus fünf parallel angeordneten Boxen, welche simultan angesteuert werden können.

Kompartiment belohnt; zudem war bei der Hälfte der Tiere das vordere (zur Raummitte nähere) Kompartiment belohnt, bei der anderen Hälfte wiederum wurde das hintere Kompartiment belohnt. Somit ergab sich ein „unbiased“ Versuchsdesign, welches eine

neutrale, unvoreingenommene und unverfälschte Auswertung der Konditionierung garantiert (vgl. [311]).

6.3.1.4. Prozedur

Im **Versuchsteil I** wurden der Hälfte der Tiere (n=20) am Versuchstag -28 20 mg/kg MDMA-HCl subcutan injiziert, die andere Hälfte erhielt Vehikel.

Am Tag 0, 1 und 4 wurden die Tiere jeweils für 15 min bei geöffneten Durchgängen in die Boxen gesetzt. Der Tag 4 („Baseline“) wurde registriert und als Vortest ausgewertet.

Die Konditionierungsphase wurde hier in zwei Abschnitte unterteilt: Die erste Hälfte der Konditionierungsphase stellten die Tage 5-8 dar, die zweite Hälfte die Tage 10-13. An den Tagen 5,7,10,12 wurden die Tiere mit 6 mg/kg MDMA-HCl s.c. behandelt und 10 min später für 30 min in das belohnte (als belohnt definierte) Kompartiment gesetzt. An den Tagen 6,8,11,13 wurde den Tiere Vehikel injiziert und 10 min später wurden sie für 30 min in das unbelohnte Kompartiment gesetzt.

Die Testtage waren wie folgt angeordnet: Der Zwischentest („Test1“) erfolgte ohne jegliche Behandlung der Tiere am Tag 9, der Nachtest („Test2“) ebenfalls ohne Vorbehandlung am Tag 14. Am darauffolgenden Tag (Tag 15) erfolgte 10 min nach Behandlung der Tiere mit 6 mg/kg MDMA-HCl der „Test3“. Am Tag 16 erfolgte erneut ein Test ohne Vorbehandlung („Test4“), jedoch wurde hier die Beleuchtung beider Hauptkompartimente abgeschaltet.

Im **Versuchsteil II** wurden die Tiere eine Woche nach Ankunft in der Abteilung randomisiert in zwei Gruppen aufgeteilt. Danach wurden die Tiere einer Gruppe für zwei Wochen bis zum eigentlichen Versuchsbeginn (Tag 0) isoliert in Einzelkäfige gesetzt. Am Tag 0 wurden die Tiere für 15 min bei geöffneten Durchgängen in das jeweilige Mittelkompartiment der Boxen gesetzt; dieser Tag wurde als „Baseline“ registriert. Danach folgte die Konditionierungsphase (Tag 1-10; Durchgänge geschlossen): An den Tagen 1,3,5,7,9 wurden die Tiere mit jeweils 5,0 mg/kg MDMA-HCl s.c. behandelt und 10 min später für 30 min in das als belohnt definierte Kompartiment platziert. An den Tagen 2,4,6,8,10 wurden die Tiere mit Vehikel behandelt und 10 min später für 30 min in das korrespondierende, als unbelohnt definierte Kompartiment gesetzt. Am Tag 11 folgte der Testtag, die Tiere wurden nun unbelohnt bei offenen Durchgängen in das jeweilige Mittelkompartiment der Boxen gesetzt und ihre Aktivität wurde 15 min lang registriert. Im Unterschied zum Versuchsteil I wurde die Aktivität der Tiere an allen Tagen registriert und mit Hilfe der Auswertungssoftware zusätzlich die jeweilige lokomotorische Leistung der Tiere (= zurückgelegter Weg) berechnet.

Nach einer Pause von Tag 12 bis 17 folgte eine erneute zweitägige Zusatzkonditionierung („Challenge“): Am Tag 18 wurden alle Tiere mit Vehikel behandelt und 10 min später für 30 min in das als unbelohnt definierte Kompartiment gesetzt; am Tag 19 erfolgte die Behandlung mit 5 mg/kg MDMA, die Tiere wurden 10 min später für 30 min in das belohnte Kompartiment platziert.

Nach einer erneuten eintägigen Pause (Tag 20) wurden die Tiere von Tag 21 bis Tag 29 einer Extinktion unterzogen: Die Tiere wurden hierbei an jedem Tag unbelohnt für 15 min in das jeweilige Mittelkompartiment der Boxen bei geöffneten Durchgängen platziert (Prozedur entspricht dem Testtag). Nach wiederum 2 Tagen Pause wurden die Tiere am Tag 32 einem Reinstatement-Test unterzogen: Es erfolgte ein zusätzlicher Test, mit gleichen Bedingungen wie am Testtag und den Extinktionstagen, jedoch erhielten alle Tiere 10 min vor Einsetzen in die Boxen eine Injektion mit der halben MDMA-Dosis (2,5 mg/kg).

6.3.1.5. Statistik

Zur statistischen Auswertung wurden parametrische Tests herangezogen.

Im **Versuchsteil I** wurden die Testtage der Platzkonditionierung mit Hilfe von „correlated t-Tests“ (Zeit im belohnten versus Zeit im unbelohnten Kompartiment) ausgewertet. Die Entwicklung in der Lokomotion während der Konditionierung (Baseline – Test1 – Test2) wurde mit Hilfe einer 2-faktoriellen „repeated measures“-ANOVA gerechnet mit anschließenden „post-hoc Fischer’s LSD protected t-Tests“.

Der Unterschied der Lokomotion zwischen Test2 und Test3 bzw. Test2 und Test4 wurde mit Hilfe eines „correlated t-Tests“ gerechnet.

Im **Versuchsteil II** wurden zur Berechnung einer Platzpräferenz am Tag 0 (Baseline), Tag 11 (Test), den Tagen 21-29 (Extinktion) und 32 (Reinstatement) für die jeweilige Gruppe die Aufenthaltszeiten im belohnten vs. unbelohnten Kompartiment mittels eines „correlated t-Test“ statistisch verglichen.

Die Lokomotionsdaten während der jeweiligen Testtage wurden mit Hilfe einer 2-faktoriellen „repeated measures“-ANOVA mit den Faktoren „Haltungsbedingungen“ und „Zeit“ ausgewertet. Während der Konditionierungsphase wurde die registrierte Lokomotion der Tiere statistisch mit Hilfe einer 3-faktoriellen „repeated-measures“-ANOVA ausgewertet mit den Faktoren „Haltungsbedingungen“, „Behandlung“ und „Zeit“.

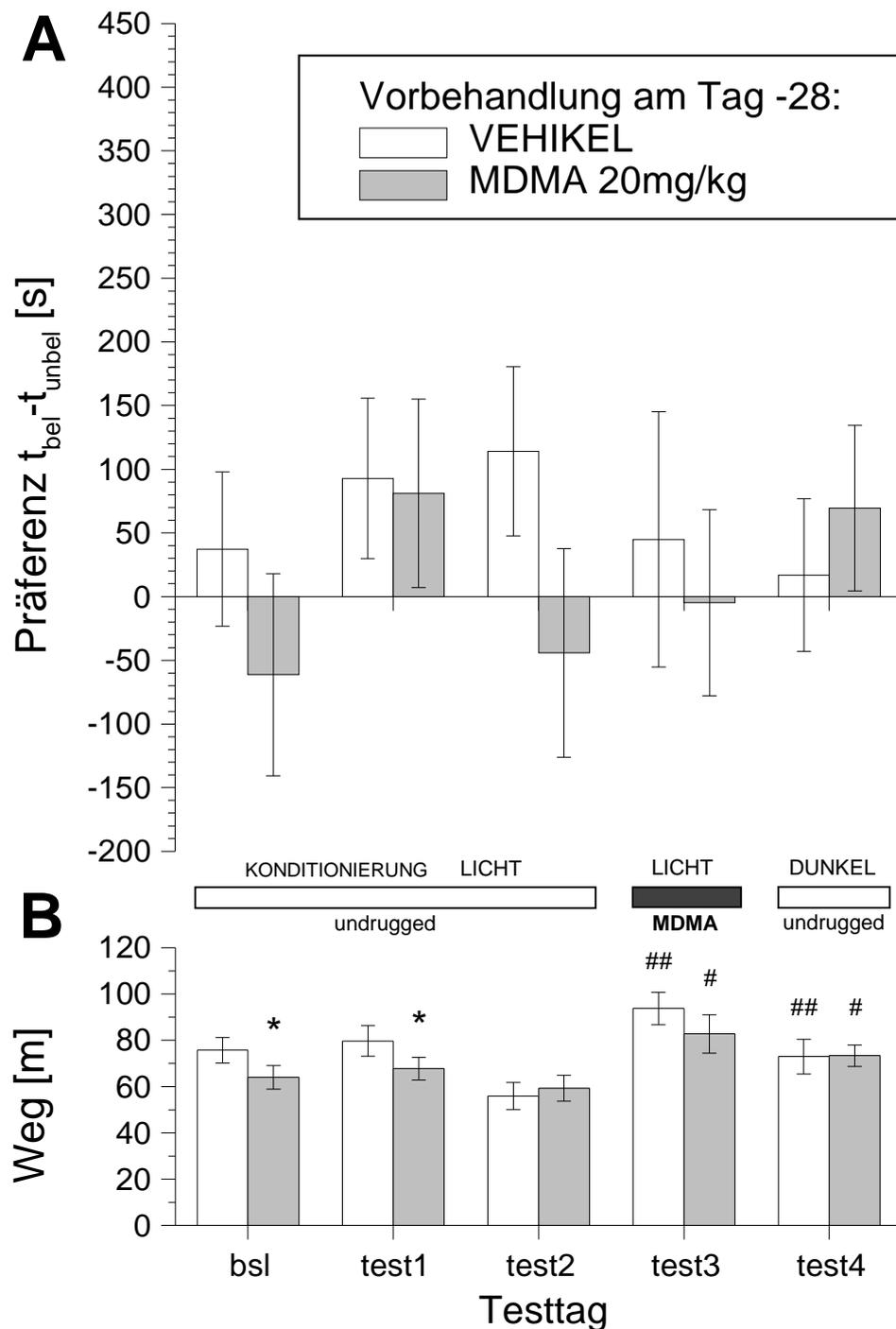


Abb. 6.9.: Einfluß einer Hochdosis-MDMA-Vorbehandlung auf die MDMA-CPP. **A:** Präferenzzeiten (Zeit im belohnten – Zeit im unbelohnten Komp.) von am Tag –28 mit Vehikel- und MDMA-vorbehandelten Tieren am jeweiligen Testtag (bsl=Test vor-; test1=“undrugged“ Test nach 4 Tagen Konditionierung abwechselnd mit 6 mg/kg MDMA und Vehikel; test2=“undrugged“ Test nach weiteren 4 Tagen Konditionierung; test3=Test auf „state dependency der CPP“ unter 6 mg/kg MDMA; test4=“undrugged“ Test, diesmal jedoch mit ausgeschalteter Beleuchtung der Kammern). **B:** Lokomotion am jeweiligen Testtag.

Statistik: Fishers protected t-Tests: * p<0,05; ** p<0,01 = VEH vs MDMA am jeweiligen Testtag; # p<0,05; ## p<0,01 = jeweils gegen Test2.

6.3.2. Ergebnisse

6.3.2.1. Platzkonditionierung – Versuch I

Die Hälfte der Versuchstiere wurde am Tag -28 mit einer einmaligen Dosis MDMA (20 mg/kg) vorbehandelt, die andere Hälfte mit Vehikel. Bei beiden Gruppen konnte zu keinem Test-Zeitpunkt eine signifikante Ausbildung einer konditionierten Platzpräferenz (CPP) beobachtet werden (Abb. 6.9.-A).

Die lokomotorische Aktivität der MDMA-vorbehandelten Tiere war am Baseline-Tag sowie den Testtagen 1 und 3 leicht niedriger als bei den Kontrolltieren. Am Testtag 3 und 4 war die Lokomotion gegenüber dem Testtag 2 bei beiden Gruppen leicht erhöht (Abb. 6.9.-B).

6.3.2.2. Platzkonditionierung – Versuch II

Konditionierte Platzpräferenz

Die Versuchstiere wurden nach einem „Vortest“ (Baseline, „bsl“) am ersten Versuchstag insgesamt 10 Tage lang konditioniert. Danach wurde - unter gleichen Bedingungen wie beim Vortest - der Test auf konditionierte Platzpräferenz („test“) durchgeführt.

Bei der Baseline ergaben sich nur minimale Präferenzzeiten für die in Gruppe gehaltenen Tiere (GRP) sowie isoliert gehaltenen Tiere (ISO) [$t_{\text{pref}}(\text{GRP}) = -8,05 \text{ s}$; $t_{\text{pref}}(\text{ISO}) = +4,50 \text{ s}$]. Die statistische Auswertung mittels „correlated t-Tests“ der Zeiten im belohnten vs. unbelohnten Kompartiment ergab keine Signifikanz, somit kann dieser Versuch als vollkommen „**unbiased**“ angesehen werden.

Der Nachtest ergab hochsignifikante Präferenzzeiten für beide Tiergruppen [corr. t-Tests: $t_{\text{GRP}}=3,45$; $df=14$; $t_{\text{ISO}}=3,29$; $df=14$] (Abb. 6.10.-A: bsl, test).

Extinktion und Reinstatement

Nach der erfolgten Konditionierung wurde versucht, die konditionierte Information zu löschen (Extinktion). Dazu wurden die Tiere an neun aufeinanderfolgenden Tagen (Versuchstag 15 - 23) - bei gleichen Bedingungen wie an den Testtagen - in die Apparatur gesetzt. Am Extinktionstag 1 zeigten nur die ISO-Tiere eine hochsignifikante CPP [$t_{\text{ISO}}=3,52$; $df=14$], am Extinktionstag 3 zeigten ebenfalls nur die ISO-Tiere noch eine signifikante CPP [$t_{\text{ISO}}=2,72$; $df=14$]. An den anderen Tagen zeigte keine der Gruppen eine CPP oder CPA.

Am Versuchstag 24 wurde den Tieren 10 min vor dem Test MDMA injiziert (2,5 mg/kg). An diesem Tag zeigten wiederum beide Gruppen eine CPP, die ISO-Tiere sogar hochsignifikant [corr. t-Tests: $t_{\text{GRP}}=2,71$; $df=14$; $t_{\text{ISO}}=4,03$; $df=14$] (Abb. 6.10.-A: ex1-ex9, ris).

Lokomotion während des Versuchs

Sowohl während der Konditionierungsphase, als auch an den Testtagen wurde der von den Tieren zurückgelegte Weg registriert.

An den **Testtagen**, an welchen die Tiere ohne pharmakologische Behandlung in die Apparaturen gesetzt wurden, haben die ISO-Tiere durchweg einen größeren Weg zurückgelegt als die GRP-Tiere (gestützt durch eine 2-faktorielle „repeated measures“-ANOVA der Daten sowohl am Testtag [$F_{\text{HALTUNG}}(1,28)=14,20$; $p=0,0008$] als auch während der Extinktionsphase [$F_{\text{HALTUNG}}(1,28)=27,89$; $p<0,0001$]). Bei den GRP-Tieren ist ebenfalls eine leichte kontinuierliche Verminderung in der Lokomotion zu beobachten [$F_{\text{ZEIT}}(8,224)=2,86$; $p=0,0047$] (Abb. 6.10.-B: bsl-ex9).

Am „Reinstatement“-Testtag, als alle Tiere eine Injektion von 2,5 mg/kg MDMA-HCl erhielten, verhielten sich die GRP-Tiere bezüglich ihrer Lokomotion exakt gleich wie am letzten Extinktionstag, die ISO-Tiere zeigten jedoch eine erheblich geringere (und den GRP-Tieren angeglichen!) Lokomotion [corr. t-Test „ex9“ vs „ris“: $t_{\text{GRP}}=0,12$; $df=14$; $p=0,91$; $t_{\text{ISO}}=4,75$; $df=14$; $p=0,0003$] (Abb. 6.10.-B: ris).

An den **Konditionierungstagen** verhielt sich die lokomotorische Aktivität folgendermaßen:

Alle Tiere erhielten wie beschrieben abwechselnd an einem Tag (Tage 1,3,5,7,9 & 19) 5,0 mg/kg MDMA-HCl, am nächsten Tag (Tage 2,4,6,8,10 & 18) das Vehikel PBS. Eine 3-faktorielle „repeated-measures“-ANOVA-Analyse der Lokomotionsdaten zeigt einen signifikanten Unterschied zwischen der GRP- und ISO-Gruppe, aber abhängig von der Behandlung [$F_{\text{HALTUNG}}(1,28)=6,35$; $p=0,03$; $F_{\text{BEHANDLUNG}}(1,28)=5,24$; $p=0,03$; $F_{\text{HALTUNG} \times \text{BEHANDLUNG}}(1,28)=7,39$; $p=0,011$]: Die Lokomotion der GRP-Tiere war an den MDMA-Tagen entschieden höher als an den Vehikel-Tagen, die ISO-Tiere zeigten zu Beginn des Versuchs unter MDMA-Behandlung (belohnte Tage) überraschend eine hochsignifikante Hypolokomotion verglichen mit den Vehikel-Tagen (Abb. 6.11.).

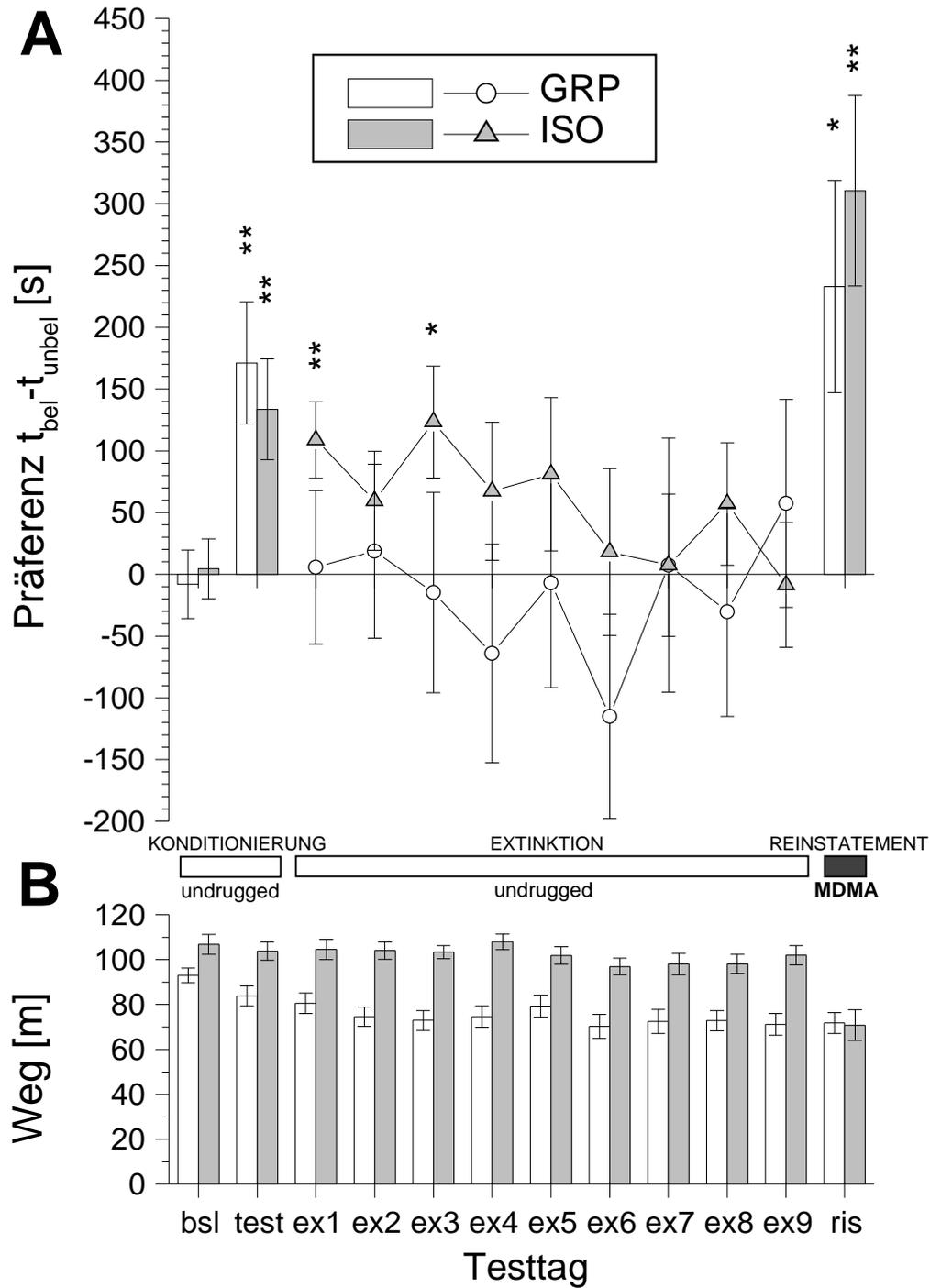


Abb. 6.10.: Einfluß von sozialer Isolation auf die CPP. **A:** Präferenzzeiten von in Gruppe („GRP“) und isoliert („ISO“) gehaltenen Tieren am jeweiligen Testtag (bsl=Test vor-; test=Test nach 10 Tagen Konditionierung mit 5 mg/kg MDMA; ex1-ex9=wiederholte Tests zur Extinktion der CPP; ris=Test zum „Reinstatement“ des „Craving“ unter 2,5 mg/kg MDMA). **B:** Lokomotion am jeweiligen Testtag. Statistik: corr. t-Tests (t_{bel} vs t_{unbel}): * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

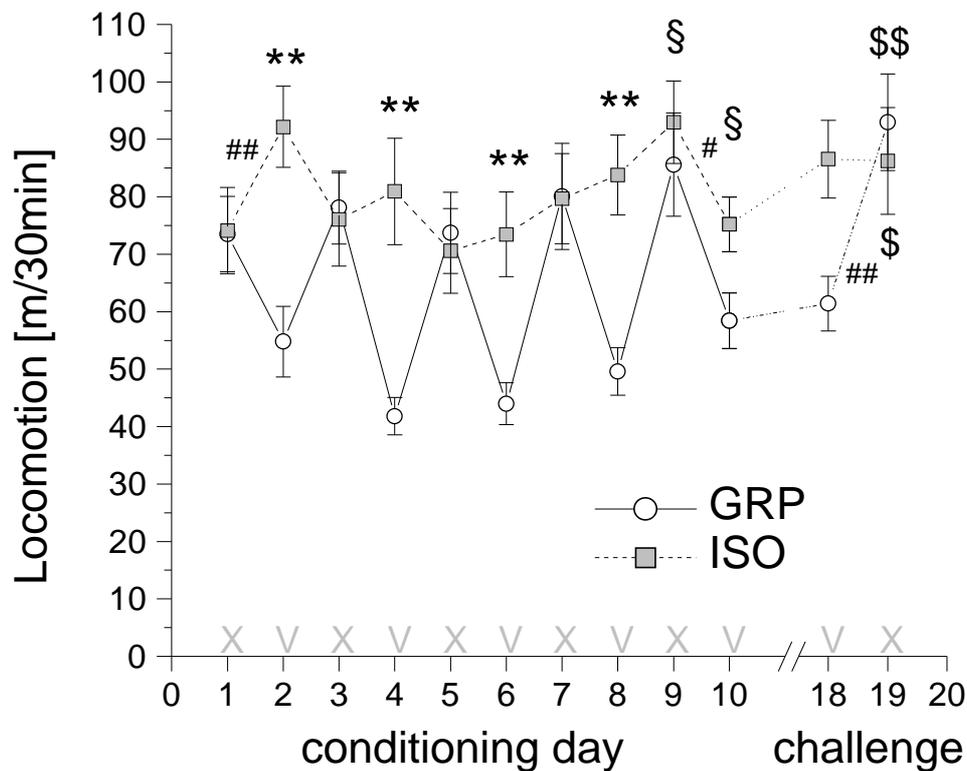


Abb. 6.11.: Lokomotion während der Konditionierung von in Gruppe („GRP“) und isoliert („ISO“) gehaltenen Tieren. Am Versuchstag 1,3,5,7,9,19 erhielten die Tiere 5,0 mg/kg MDMA; am Versuchstag 2,4,6,8,10,18 Vehikel.

Statistik: (3-faktorielle ANOVA über Tag 1-10) Newman-Keuls post hoc t-Tests: * $p < 0,05$ ** $p < 0,01$: Vergleich von GRP und ISO am jeweiligen Tag. # $p < 0,05$ ## $p < 0,01$: Vergleich von zwei aufeinanderfolgenden Tagen; § $p < 0,05$: Tag 9 vs Tag 1 bzw. Tag 10 vs Tag 2.

Correlated t-Tests: ## $p < 0,01$: Tag 18 vs Tag 19; § $p < 0,05$ §§ $p < 0,01$: Tag 19 vs Tag 1 (Tag 18 vs Tag 2 n.s.).

Es zeigte sich jedoch, dass sich die lokomotorische Aktivität der Tiere über den Versuch hinweg sehr stark verändert [$F_{ZEIT}(4,112)=7,84$; $p < 0,0001$; $F_{BEHANDLUNG \times ZEIT}(4,112)=3,85$; $p=0,006$; $F_{HALTUNG \times BEHANDLUNG \times ZEIT}(4,112)=2,31$; $p=0,06$]: Die ISO-Tiere zeigen (unter MDMA) am Tag 9 eine größere Lokomotion als am Tag 1, am Tag 10 (unter Vehikel) legen sie wiederum einen deutlich kürzeren Weg zurück als am Tag 2 (Abb. 6.11.).

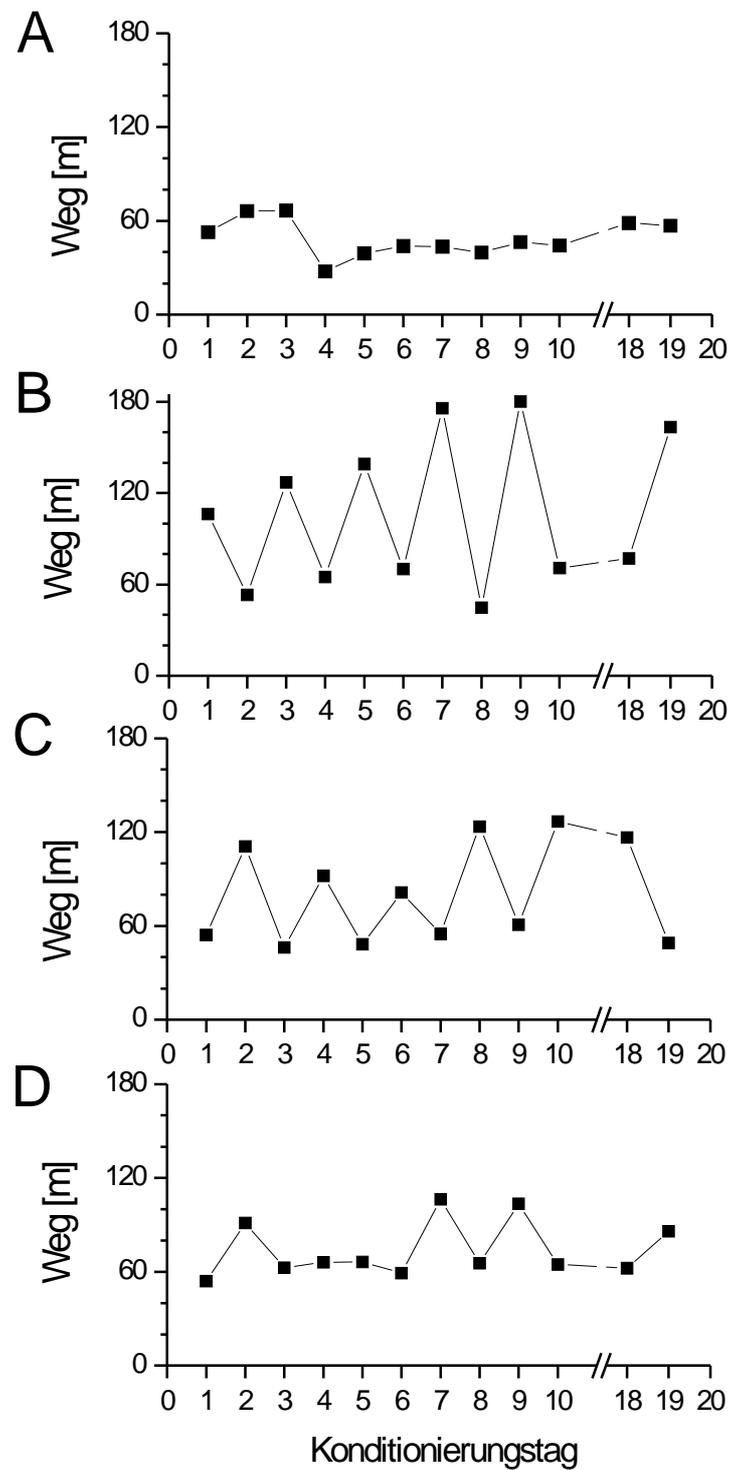


Abb. 6.12.: Lokomotionsverhalten ausgewählter Einzeltiere (A,B: Gruppentiere; C,D: Isolationstiere) während der Konditionierungsphase und „Challenge“. Am Versuchstag 1,3,5,7,9,19 erhielten die Tiere 5,0 mg/kg MDMA, am Versuchstag 2,4,6,8,10,18 Vehikel.

Man beachte die verschiedenen Formen der Lokomotion: Tier A zeigt praktisch keine Reaktion auf MDMA-Behandlung; Tier B zeigt unter MDMA eine Hyperlokomotion und eine stabile Verhaltenssensitivierung; Tier C zeigt unter MDMA eine stabile Hypolokomotion; Tier D zeigt anfangs ebenfalls eine Hypolokomotion unter MDMA, die Wirkung invertiert jedoch und ab Tag 7 zeigt es eine Hyperlokomotion unter MDMA.

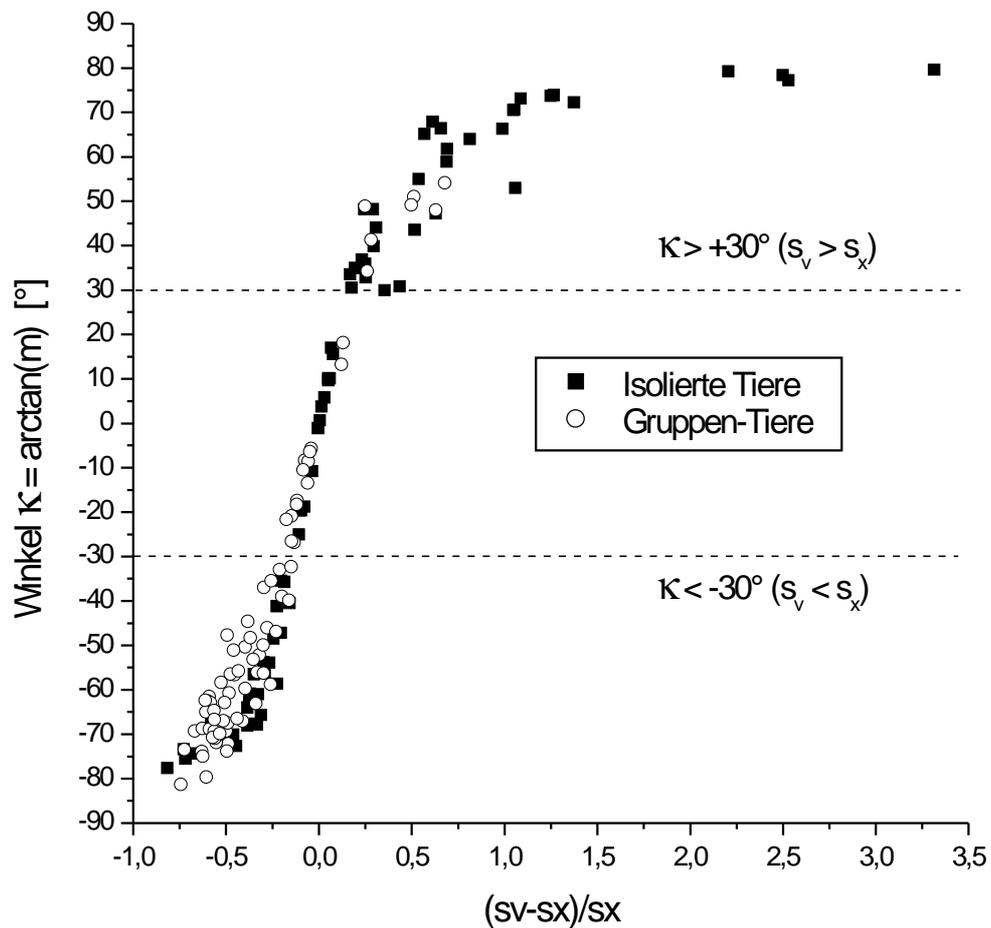


Abb. 6.13.: Darstellung der Datentransformation der gesamten Lokomotionsaktivitäten individueller Tiere während der Konditionierungsphase. Aufgetragen ist jeweils der Steigungswinkel „ κ “, welcher berechnet wurde aus der Lokomotionsveränderung während jeder Konditionierungspaarung ($\Delta s = s_v - s_x$; wobei s_v den zurückgelegten Weg unter Vehikelbehandlung, s_x den zurückgelegten Weg unter MDMA-Behandlung darstellt), gegen die relative Veränderung der Lokomotion, bezogen auf s_x . Das obere Kurvendrittel wurde als MDMA-Hypolokomotion definiert, das untere Kurvendrittel als MDMA-Hyperlokomotion (Nähere Erläuterungen siehe Text). Man beachte, dass die Daten der arcustangens-Kurve folgen; außerdem kommt es zur unterschiedlichen Verteilung der Werte für die zwei Tiergruppen.

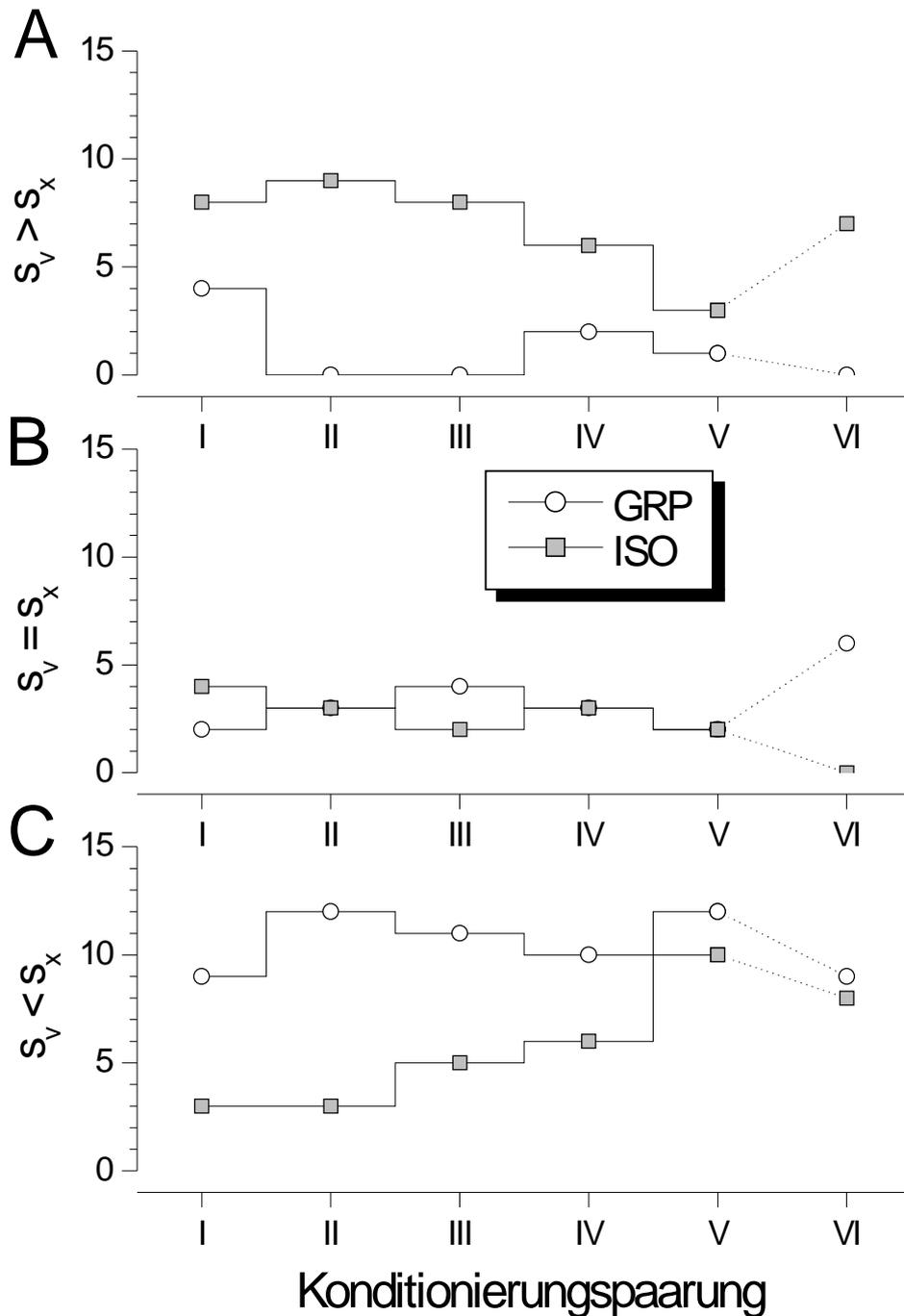


Abb. 6.14.: Lokomotionsscores während der Konditionierungsphase von in Gruppe („GRP“) und isoliert („ISO“) gehaltenen Tieren. Dargestellt sind die Scores der jeweiligen Konditionierungspaarungen, d.h. von jeweils zwei aufeinanderfolgenden Tagen, wobei die Tiere am jeweils ersten Tag MDMA, am zweiten Vehikel erhielten (*I*: Tag 1,2; *II*: Tag 3,4; *III*: Tag 5,6; *IV*: Tag 7,8; *V*: Tag 9,10; *VI*: Tag 18,19).

Score = jeweilige Anzahl der Tiere, welche unter MDMA-Gabe (relativ zur Vehikel-Gabe am korrespondierenden Tag) eine hypoaktive (A), hyperaktive (C) oder keine Reaktion (B) zeigen. Details zur Score-Berechnung siehe Text (vgl. auch Abb. 6.13.).

Eine detaillierte Betrachtung des Verhaltens der Einzeltiere (repräsentative Auswahl: Abb. 6.12.) gibt mehr Auskunft über das komplexe Verhalten der Tiere. Die Betrachtung der Tage 1 und 2 zeigt, dass die meisten Tiere der GRP-Gruppe eine Hyperlokomotion unter MDMA (im Vergleich zu Vehikel) zeigen. Bei den ISO-Tieren sind ebenfalls einzelne Ratten zu finden, welche unter MDMA hyperaktiv sind, der Großteil der Tiere zeigt jedoch eine Hyperlokomotion unter Vehikel. Zur vereinfachten Analyse der Datenfülle sollte ein neuartiger Score dienen, der hier zur Vereinfachung der „*Lokomotions-Score*“ genannt werden soll. Da in diesem Versuch die Tiere immer abwechselnd jeweils an einem Tag mit MDMA behandelt und auf das belohnte Kompartiment der CPP-Boxen konditioniert wurden, am anderen Tag mit Vehikel behandelt und auf das unbelohnte Kompartiment konditioniert wurden, wurden diese zwei Tage zu einer „*Konditionierungspaarung*“³⁰ zusammengefasst. Zur Berechnung des Scores wurde nun die Veränderung der lokomotorischen Aktivität herangezogen, welche sich in der Abb. 6.12. als Steigung der einzelnen Lokomotionskurven der Tiere darstellt. Die Steigung dieser Kurvenabschnitte lässt sich mathematisch wie folgt berechnen:

$$m = \frac{\Delta y}{\Delta x} \quad (1)$$

Mit

$$\Delta y = \frac{S_{Vehikel} - S_{MDMA}}{f_{CPP}} \quad (2)$$

(wobei der Faktor f_{CPP} aus der Skalierung abgeleitet und als = 20 gesetzt wurde, d.h. es wurde der Weg innerhalb 1,5 min Aufenthalt in der Konditionierungskammer berechnet)

... und

$$\Delta x = t_{Vehikel} - t_{MDMA} \quad (3)$$

... ergibt sich für m:

$$m = \frac{\left(\frac{S_{Vehikel} - S_{MDMA}}{f_{CPP}} \right)}{t_{Vehikel} - t_{MDMA}} \quad (4)$$

³⁰ Nicht zu verwechseln mit der Paarung des unconditionierten (US) mit dem konditionierten Stimulus (CS) an jedem Konditionierungstag.

Da $t_{Vehikel} - t_{MDMA} = 1$ Tag (gilt für Paarung I – V, bei der Paarung VI sind die jeweiligen s- und t-Variablen vertauscht), ergibt sich aus (4):

$$m = \frac{s_{Vehikel} - s_{MDMA}}{20} \quad (5)$$

Aus der Steigung m kann nun der Steigungs-Winkel k ³¹ berechnet werden:

$$\tan(k) = m$$

also gilt:

$$\boxed{\tan(k) = \frac{s_{Vehikel} - s_{MDMA}}{20}} \quad (6)$$

In Abb. 6.13. ist zu sehen, dass die berechneten Winkelwerte (über $\arctan(m)$) ziemlich gut einer „arctan“-Kurve folgen, wenn die Ergebnisse der Berechnungen für die Konditionierungspaarungen I-V gegen die tatsächliche, relative Lokomotionsveränderung ($\Delta s/s_X$) aufgetragen werden. Trotz der leichten Streuung der Werte wurde auf eine genauere Bewertung der relativen Lokomotionsänderung verzichtet, da die Winkelwerte sich viel deutlicher klassifizieren lassen: Der Bereich einer geringen Lokomotionsänderung wird über einen sehr breiten Bereich aufgetragen (ähnlich einer Titrationskurve), wodurch die Punkte im oberen und unteren Drittel (Bereiche $k < -30^\circ$ und $k > +30^\circ$) des Winkelbereichs von -90° bis $+90^\circ$ ganz eindeutig als hyper- oder hypoaktive Tiere klassifiziert werden können. Der Winkel k macht also eine halbquantitative Aussage über den Effekt von MDMA (im Verhältnis zu Vehikel) auf ein einzelnes Tier. In diesem Versuch wurden zur Scorebewertung, wie erwähnt, drei mögliche Bereiche für den Steigungswinkel k definiert (mit $s_X = s_{MDMA}$ = zurückgelegter Weg unter MDMA; $s_V = s_{Vehikel}$ = Weg unter Vehikel):

Bei $s_X \gg s_V$ (MDMA-Hyperaktivität) ergeben sich für k Werte $< -30^\circ$ (vgl. Abb. 6.12.-B);

bei $s_X \ll s_V$ (Vehikel-Hyperaktivität) ergeben sich für k Werte $< +30^\circ$ (vgl. Abb. 6.12.-C);

und bei ungefähr gleichen Wegen unter MDMA und Vehikel ergeben sich Winkel vom Wert $-30^\circ \leq k \leq +30^\circ$, welche im mittleren (quasilinearen) Bereich der arctan-Kurve liegen (entspricht 18,7 % aller Werte; vgl. auch Abb. 6.12.-A).

³¹ Der griechische Buchstabe kappa wurde in Anlehnung an das Wort „Konditionierung“ gewählt.

Eine graphische Darstellung der Ergebnisse des „Lokomotionsscores“ (Anzahl der jeweils zutreffenden Tiere) ist in Abb. 6.14. dargestellt. Es ist deutlich zu sehen, dass bei in Gruppe gehaltenen Tieren der Großteil der Tiere unter MDMA-Behandlung eine Hyperaktivität zeigt. Isolierte Tiere zeigen anfangs vorwiegend eine MDMA-Hypoaktivität, während des Versuchs werden jedoch immer mehr Tiere hyperaktiv durch MDMA (vgl. auch Tier D in Abb. 6.12). Bei beiden Tiergruppen gibt es einen kleinen Anteil an Tieren, welche praktisch keine Verhaltensänderung unter MDMA erfahren.

An den „Challenge“-Tagen (Paarung VI) geht der Anteil von unter MDMA hyperaktiven Tieren leicht zurück. Bei isolierten Tieren geht die Zahl unter MDMA hypoaktiver Tiere deutlich hoch; diese Tiere rekrutieren sich jedoch aus dem Anteil der sich bisher neutral verhaltenden Tieren, wobei die Zahl der MDMA-hyperaktiven Tiere konstant bleibt.

6.4. Diskussion

6.4.1. Sensitivierung

Die wiederholte Gabe von hoch dosiertem MDMA über 10 Tage führte zu der Entwicklung einer starken Sensitivierung vor allem der Hyperlokomotion sowie der vertikalen Aktivität. Die Entwicklung einer Verhaltenssensitivierung wurde bereits von anderen Arbeitsgruppen beschrieben [139;185]. Obwohl Kalivas et al. eine Unabhängigkeit der Entwicklung sensitivierter Verhaltenseffekte von MDMA von einer serotonergen Entleerung postulieren, konnte in unserem Labor im klassischen „Open Field“-Experiment bislang keine Sensitivierung mit wiederholt applizierten, niedrig dosierten MDMA-Injektionen (5 mg/kg) gezeigt werden [165]. Andere Arbeiten zeigten bereits, dass bei einer 5-HT-Überaktivität das Suchtpotential von Suchtstoffen vermindert ist [117;118;186;244]. Dies lässt vermuten, dass Serotonin hemmend auf Suchtmechanismen wirkt und in einem Gehirn mit verminderter serotonerger Neurotransmission (durch neurotoxische Prozesse etwa) die Suchtwirkung eher verstärkt ist. Tatsächlich zeigen Tiere, welche mit 5,7-DHT (einem serotonerger Neurotoxin) behandelt wurden, stärkere Selbstadministration von Amphetamin [166]. In diesem Zusammenhang könnte die Beteiligung von 5-HT_{2C}-Rezeptoren (lokalisiert auf GABAergen Terminalen in der SNc) involviert sein, da systemische Administration von 5-HT_{2C}-Rezeptor-Antagonisten die Feuerrate der dopaminergen Neurone und DA-Freisetzung im Striatum erhöhen [70]. Andererseits hemmt die lokal intra-striatale Gabe von 5-HT₂-Antagonisten sowohl die MDMA-induzierte als auch Cocain-induzierte Freisetzung von DA [171;272].

Für MDMA ist jedoch durchaus auch eine nicht-neurotoxische Vermittlung der Sensitivierungseffekte und Dopaminmodulation im NAcc denkbar: Es wurde bereits von einer anderen Arbeitsgruppe (welche mit niedrig dosiertem S-MDMA erfolgreich eine Verhaltenssensitivierung induzieren konnte) beobachtet, dass MDMA-induzierte Hyperlokomotion stark vom 5-HT_{1B}-Rezeptor abhängt und dass in einem MDMA-sensitivierten Tier diese Rezeptoren supersensitiv sind [185]. Zudem zeigen Daten der Arbeitsgruppe um René Hen eine wichtige Rolle des 5-HT_{1B}-Rezeptors in der Kontrolle der mesolimbischen DA-Transmission: In 5-HT_{1B}-Rezeptor-Knockout-Mäusen³² sind die Wirkungen von Cocain stark erhöht (gemessen als Selbstadministrationsverhalten und DA-Freisetzung im NAcc) [255;288]. Dies zeigt Parallelen zwischen einer MDMA-Sensitivierung und den kompensatorischen Prozessen infolge eines 5-HT_{1B}-Rezeptor-Knockouts³³. Desweiteren führt auch eine „Vorsensitivierung“ mit MDMA zum erhöhten Cocain-induzierten DA-release [195].

Über welchen Mechanismus die MDMA-induzierte Verhaltenssensitivierung auch vermittelt wird, es deutet alles darauf hin, dass 5-HT hier eine essentielle Rolle spielt. Die Erhöhung der DA-Konzentrationen im NAcc steht offensichtlich mit den beschriebenen Mechanismen in unmittelbarem Zusammenhang. Weiter wird diese (im speziellen die 5-HT_{1B}-) Hypothese dadurch unterstützt, dass während nach einem 5-HT_{1B}-Knockout die basalen DA-Level im dorsalen Striatum unverändert gewesen sind, im NAcc erhöhte basale DA-Konzentrationen gemessen wurden, wodurch eine Cocain-Gabe zu einer gleichen relativen DA-Erhöhung in Knockout- sowie Kontrolltieren führt, trotzdem aber im NAcc von Knockout-Tieren signifikant höhere Netto-DA-Konzentrationen gemessen werden [288]. Insbesondere das Vorhandensein und die Regioselektivität der basalen DA-Erhöhung in dieser Arbeit sprechen dafür, dass die Wirkungen einer wiederholten MDMA-Gabe (zumindest zum Teil) über den Mechanismus einer 5-HT_{1B}-Supersensitivität vermittelt werden (vgl. auch Kap. 7).

Im Übrigen war das Versuchsdesign so gewählt, dass die Tiere erst naiv das Open Field erkunden konnten, bevor sie die MDMA-Injektion erhielten. Dies erlaubte die Beobachtung der Tieraktivität unmittelbar vor der MDMA-Injektion. In anderen Versuchen konnte bereits

³² Mäuse mit ausgeschaltetem 5-HT_{1B}-Gen, sodass dieser Rezeptor ihnen von Geburt an fehlt.

³³ Die 5-HT_{1B}-Rezeptoren werden als Heterorezeptoren auf striatofugalen GABAergen Terminalen in der SNC und VTA vermutet, daher geht die Arbeitsgruppe davon aus, dass die GABA-Neurotransmission in diesem Gebiet während der Entwicklung des Tieres kompensatorisch herunterreguliert wird, womit die verstärkte Hemmung der dopaminergen Neurone durch fehlende 5-HT_{1B}-Rezeptoren wieder aufgehoben wird.

gezeigt werden, dass Tiere, welche auf einen Suchtstoff konditioniert wurden (Platzkonditionierung, s.u.), in der Suchtstoff-assoziierten Umgebung eine erhöhte Unruhe zeigten, die als antizipatorisches Verhalten und Zeichen für das Verlangen nach dem Suchtstoff („Craving“) interpretiert wurde [325].

In unserem Versuch konnten wir ein solches Verhalten nicht zeigen, d.h. die MDMA-behandelten Tiere zeigten keine motorische Unruhe in Erwartung der Substanz-Injektion während der Versuchsdauer von 10 Tagen, lediglich eine Habituation auf die Versuchsumgebung war zu sehen. Am Tag 11 und 18, d.h. einen Tag und eine Woche nach Beendigung der subchronischen MDMA-Behandlung, waren die Lokomotionsparameter jedoch tendenziell erhöht. Die Stärke eines möglichen antizipatorischen Cravings war hier jedoch nicht groß genug, um eine statistisch signifikante Aktivitätserhöhung zu messen.

An diesen beiden Tagen wurden die Tiere behandelt wie an den Tagen 1 – 10, jedoch mit der Ausnahme, dass sie nach Einsetzen in die Apparatur mit Vehikel behandelt wurden, um den konditionierten Anteil der sensitivierten Lokomotion herauszufiltern. Zahlreiche Versuche zur Erforschung der Natur des Sensitivierungsphänomens zeigen, dass die Expression der Sensitivierung einen großen konditionierten Anteil hat. So zeigen Tiere, welche mehrmals in einer bestimmten Umgebung mit einem Suchtstoff behandelt wurden, auch in Abwesenheit der Substanz erhöhte (konditionierte) Aktivität. Andererseits zeigen diese Tiere eine sensitivierte Antwort auf die Injektion dieses Suchstoffes nur dann, wenn sie in dieser Umgebung getestet werden. Berichtet wurde ebenfalls vom Auftreten einer Kreuzsensitivierung mit anderen Suchtstoffen, wenn Tiere in derselben Umgebung getestet werden. Dies bedeutet, dass gelernte Assoziationen zwischen der Suchtstoff-Injektion und Umgebungs-Stimuli die Expression der Verhaltenssensitivierung verstärken: Die Verhaltenssensitivierung ist Kontext-abhängig (zusammengefasst bei [300]). Der Einfluss der Konditionierung wurde für MDMA bereits in anderen Versuchen gezeigt, jedoch nur geringe Dosierungen von MDMA zeigten eine konditionierte Lokomotion [103;139]. Parallel mit dieser Beobachtung ist ebenfalls das Auftreten einer Verzögerung der Sensitivierung, welche verstärkt eintritt, wenn die Dosis oder die Frequenz der Behandlung zunimmt [219]; bei zu großer Frequenz oder kontinuierlicher Gabe der Substanz kann sogar eine Toleranz eintreten [300]. In der hier vorliegenden Arbeit wurde jedoch nur die Entwicklung einer Sensitivierung beobachtet, die Untersuchung der Expression war lediglich auf konditionierte Effekte beschränkt (auf einen wiederholten Test mit MDMA wurde verzichtet, um die Aussagen über neurotoxische Effekte nicht zu stören), jedoch ist hier die zeitliche Verzögerung ebenfalls zu sehen: Erhöhte Lokomotion ist erst eine Woche nach Beendigung der MDMA-Behandlung zu

sehen. Dies, ebenso wie das geringe Ausmaß der Effekte, ist wohl auf die hohe Dosierung von MDMA zurückzuführen. Der Vergleich der zwei Observationsabschnitte im Open Field (vor und nach Injektion) lässt die zusätzliche Schlussfolgerung zu, dass die Präsentation der mit der Suchtstoffwirkung assoziierten Umgebung nicht alleine ausreicht, um den konditionierten Anteil der Verhaltenssensitivierung abzurufen. Die Erfahrung der Injektion als Stimulus ist ebenfalls ein wichtiger Bestandteil des Kontext: Erst durch die Kombination des Umgebungs- mit dem Injektionsstimulus (Vehikelinjektion in den Open Fields) zeigen die Tiere eine erhöhte (konditionierte) Lokomotion.

Im zweiten Versuch zur Verhaltenssensitivierung war ebenfalls die Entwicklung einer deutlichen Sensitivierung der horizontalen Aktivität (Lokomotion) zu sehen. Die stereotypen Verhaltensweisen (Schnüffeln = Wandkontakte) waren durch MDMA zwar erhöht, verstärkten sich jedoch nicht über die Dauer des Versuchs hinweg. Dies bedeutet, dass - obwohl die MDMA-Dosierung hoch gewählt war - durch eventuelle neurochemische Sensitivierungseffekte die dopaminerge Neurotransmission nicht in dem Maße verstärkt wurde, dass Stereotypen zu Lasten der Lokomotion sensitivierten. Zu erklären ist diese Tatsache auch dadurch, dass die MDMA-Sensitivierung sich nur bedingt paralleler Mechanismen mit anderen Psychostimulantien wie Cocain und Amphetamin bedient: Beispielsweise reagiert das Gehirn in Bezug auf D1-Rezeptor-Sensitivität bei subchronischer Behandlung mit Cocain oder MDMA jeweils in umgekehrte Richtung [123;321].

Die vertikale Aktivität (Aufrichtungen) war über die gesamte Versuchsdauer hinweg unterdrückt, andererseits war der Serotonin-Score an allen vier Auswertungstagen stark erhöht und die oft beobachtete flache Körperhaltung kann durchaus dazu beigetragen haben, dass die vertikale Aktivität der Tiere stärker unterdrückt wurde.

Die Explorationsaktivität ging während fortdauernder Behandlung mit MDMA immer mehr zurück, dieser Rückgang ist jedoch im Gegensatz zur Entwicklung der Lokomotionssensitivierung nicht abhängig von einer intakten LC-noradrenergen Innervation des Vorderhirns: Die Sensitivierung der hyperlokomotorischen Effekte war bei DSP-4-vorbehandelten Tieren nicht vorhanden. Dies deutet auf eine Schlüsselrolle des Noradrenalins in der Entwicklung der Sensitivierung der Verhaltenswirkungen von MDMA und möglicherweise aller Psychostimulantien.

Generell ist festzustellen, dass NA wohl eher in der emotionalen und neuro-endokrinen Prozessierung eine Rolle spielt (noradrenerge Axone innervieren den Hypothalamus, Amygdala, PFC, ventrales Striatum, DRN). Eine direkte Modulation der serotonergen

Neurotransmission über verminderte Aktivität noradrenerger Afferenzen direkt im DRN wäre theoretisch möglich, jedoch wurden hier keine erniedrigten NA-Konzentrationen im DRN gemessen. Die von einer anderen Arbeitsgruppe durchgeführte immunhistochemische Färbung des DRN in DSP-4-behandelten Tieren zeigt ebenfalls keine feststellbaren Schäden an noradrenergen Terminalen in diesem Nucleus durch DSP-4 [88]. Eine Rolle des stark noradrenerg innervierten Hypothalamus (HThal) wäre ebenfalls denkbar, doch besitzt der HThal zwar motivationale Zentren, aber insgesamt gesehen ist der HThal vielmehr in die Kontrolle konsumatorischer Verhaltensweisen involviert als in die Steuerung gelernten zielorientierten instrumentellen Verhaltens oder der präparatorischen Phase der Belohnungswirkung [251].

Das ventrale Striatum mit seiner wichtigen Rolle bei der Entwicklung und Expression der Verhaltenssensitivierung sowie Belohnungsvermittlung stellt ein wahrscheinlicheres Target der Wirkung des Noradrenalins dar innerhalb der Sensitivierungsprozesse. Zum einen ist bereits gezeigt worden, dass das LC-NA eine essentiell protektive Rolle in der dopaminergen Neurotoxizität besitzt und den Symptomen eines Dopamin-Mangels (Parkinson-Symptomatik) entgegenwirkt [93;264]. Ein Experiment der Arbeitsgruppe um Jean-Pol Tassin und Jacques Glowinski unterstützt weiter die wichtige modulatorische Rolle der noradrenergen Vorderhirn-Innervation auf die Aktivität dopaminerg Neurone: Diese Gruppe zeigte, dass die systemische oder lokal präfrontocorticale Gabe von Prazosin (eines α_1 -Antagonisten) die Verhaltenseffekte systemisch applizierten Amphetamins (Hyperaktivität und accumbale DA-Freisetzung) effektiv hemmen kann [63]. Es wird davon ausgegangen, dass die im PFC lokalisierten α_1 -Rezeptoren positiv auf glutamaterge, in das VTA projizierende Pyramidenneurone einwirken und dadurch indirekt an der Aktivierung der mesolimbischen dopaminergen Projektion beteiligt sind. Unter Berücksichtigung der Kalivas-Hypothese der Sensitivierungsentwicklung [138] könnte weiter angenommen werden, dass in einem hypoaktiven noradrenergen System die ausschließlich dopaminerg vermittelte Aktivierung der glutamatergen Afferenzen zu den dopaminergen Neuronensomata und Dendriten des VTA nicht für die Induktion der intrazellulären Prozesse ausreicht, welche für die synaptische Verstärkung im NAcc notwendig sind.

Die Bedeutung des PFC für die Entwicklung der Sensitivierung wird ebenfalls aus anderen Arbeiten deutlich: So konnte in unserer Abteilung bereits gezeigt werden, dass die exzitotoxische Läsion bestimmter Areale des PFC die Entwicklung der Platzpräferenz und Sensitivierung für Cocain (pl-PFC) und Morphin (il-PFC) hemmt (jedoch keine dieser Läsionen die Effekte von Amphetamin) [314]. Die fehlenden Effekte auf die Amphetamin-

Sensitivierung jedoch, sowie die Befunde einer kürzlich publizierten anatomischen Arbeit, welche besagt, dass die glutamatergen Projektionsaxone vom PFC zum VTA ihre Synapsen nicht auf dopaminergen Zellen ausbilden [53], komplizieren die oben beschriebene Hypothese. Nichtsdestotrotz zeigen die Befunde von Tzschentke & Schmidt [314], dass zumindest die Sensitivierung und Belohnungseffekte von Cocain und Morphin abhängig sind vom intakten PFC. Noradrenerge Innervation des PFC könnte zu der Funktion des PFC innerhalb des Belohnungssystems beitragen oder sogar notwendig sein für ein intaktes Gleichgewicht der Neurotransmitter in den Subdivisionen des Belohnungssystems. Es gibt Hinweise auf α_1 - und 5-HT_{2A}-Rezeptoren, welche auf glutamatergen Afferenzen zu den apikalen Dendriten der Pyramidenzellen der Schicht V des Neocortex vermutet werden (und ebenfalls auf glutamatergen Afferenzen zum LC), wodurch NA und 5-HT eine wichtige modulatorische Rolle in der Kontrolle sensorischer Antworten spielen könnten (wodurch auch die Effekte der Halluzinogene vermittelt werden könnten) [9]. Tatsächlich konnte Gary Aston-Jones in Primatenstudien zeigen, dass die noradrenergen Neurone des LC eine Schlüsselrolle in der Regulation der Aufmerksamkeit spielen: niedrige Aktivität des LC korrelierte mit Unaufmerksamkeit, phasische „bursting“-Aktivität mit (auf ein wichtiges Ereignis) fokussierter Aufmerksamkeit und hohe tonische Aktivität mit „scannender“, labiler Aufmerksamkeit [18].

Vor dem Hintergrund des gewichtigen konditionierten (kontextabhängigen) Anteils im Mechanismus der Verhaltenssensitivierung muss also angenommen werden, dass die Aufmerksamkeit in Form der noradrenergen Afferenzen des präfrontalen Cortex eine wichtige Rolle spielt als Modulator kontextbezogener sensorischer Prozessierung vom PFC zum ventralen Striatum. Dem LC wird eine wichtige Rolle im somatischen Entzug und der Vermittlung der aversiven Stimuli während des Entzugs zugeschrieben, obwohl die Aversion nach neueren Forschungsergebnissen eher von den caudal lokalisierten, noradrenergen Zellgruppen A1/A2 vermittelt wird [67]. Im Gegenzug zu dieser „negative-reinforcement“-Rolle des NA kommt nun eine „positive-reinforcement“-Funktion hinzu als wichtiger Modulator der Bewertung sensorischer Eingänge in das Belohnungssystem.

6.4.2. Platzkonditionierung

Im ersten Versuchsteil sollte getestet werden, ob eine einmalige Vorexposition der Tiere mit einer hohen Dosis MDMA eventuell langfristige Auswirkungen auf die belohnenden Effekte einer späteren Einnahme von MDMA hat. Dieser Gedanke ist im Prinzip nicht ganz neu:

Horan et al. konnten zeigen, dass MDMA-sensitivierte Tiere eine stärkere Ausprägung der CPP mit Cocain zeigen, ein Befund, welcher auf eine mögliche Wirkung des MDMA als „Einstiegsdroge“ hinweist [129]. Parallel wurde im Rahmen einer Diplomarbeit unserer Abteilung versucht, die Wirkungen einer Sensitivierung mit niedrig dosierter subchronischer MDMA-Gabe auf eine spätere Platzkonditionierung mit MDMA zu charakterisieren; dieser Versuch zeigte, dass eine Vorbehandlung mit sehr niedrigen Dosierungen (2,5 mg/kg) zu einer leichten Verstärkung der CPP führt, die Vorbehandlung mit einer höheren Dosis (5,0 mg/kg) mehr zu einer konditionierten Platzaversion (CPA) führt [165]. Die Etablierung einer klaren CPP war jedoch sowohl in der genannten Diplomarbeit, als auch im Rahmen einer parallel durchgeführten Dissertation nicht konsistent bzw. überhaupt nicht möglich [Meyer, A. et al., eingereichte Publikation]. Dies war insofern sehr überraschend, als mehrere Publikationen bereits veröffentlicht wurden mit nachgewiesener MDMA-CPP im gleichen Dosisbereich [31-34;176]. Bei der Kontrolle unseres Versuchdesigns, welches sich an diesen Publikationen orientierte, fiel uns auf, dass die publizierten CPP-Versuche mit einem „unbiased“ Versuchsdesign und/oder isoliert gehaltenen Tieren durchgeführt wurde. Der Einfluss sozialer Isolation wurde in der Dissertation von Anja Meyer (Pharmazeutisches Institut) näher untersucht, sowie in dieser Arbeit innerhalb des Versuchsteils II. Zunächst jedoch zurück zu den Befunden des ersten Versuchsteils. Am Testtag 3 wurden die Tieren vor dem Test auf CPP zusätzlich mit MDMA behandelt, um mögliche „state-dependency“-Effekte auszuschließen. Die „state-dependency“-Hypothese besagt, dass Tiere, welche unter einem bestimmten endogenen Zustand („state“, welcher z.B. durch die Gabe eines Pharmakons hervorgerufen wird) eine Information erlernt haben, diese Information (Konditionierung) nur unter diesem „state“ wieder abrufen können [215]. Da die Platzkonditionierung ebenfalls auf assoziativem Lernen basiert, könnte der Ausgang einer solchen ebenfalls vom endogenen Zustand des Tieres bei der Aquisition der Information (Konditionierungsphase) und beim Test abhängen, d.h. „state-dependent“ sein. In der Tat zeigen manche Formen (obwohl nicht alle) der Platzkonditionierung eine „state-dependency“ [311]. In diesem Versuch wurde ebenfalls keine state-dependency beobachtet auf die MDMA-CPP, d.h. unter einer zusätzlichen Gabe von MDMA am Testtag war der Aufenthalt im belohnten (MDMA-gepaarten) Kompartiment nicht signifikant erhöht.

Wenn wir die Lokomotion der Tiere an den Testtagen betrachten, fällt auf, dass die MDMA-vorbehandelten Tiere einen kleineren Weg in den Boxen zurücklegen als Kontrolltiere. Dies steht zunächst im Widerspruch mit den Befunden aus dem Open Field, wo ebenfalls mit gleicher Dosis MDMA-vorbehandelte Tiere im Langzeitexperiment eine höhere

lokomotorische Aktivität zeigten als Kontrolltiere (vgl. Kap. 5). Es muss jedoch bedacht werden, dass diese zwei Versuche einen völlig verschiedenen Aufbau besitzen und durch die Konditionierungsprozedur möglicherweise andere Auswirkungen auf das lokomotorische Verhalten haben. Da in diesem Versuchsteil die Beleuchtung in allen drei Kompartimenten der Konditionierungsboxen eingeschaltet war, könnte die starke Helligkeit auf die Tiere aversiv gewirkt haben: Tatsächlich wurde im Versuchsteil II die Beleuchtung der hinteren Kammern abgeschaltet, was bewirkte, dass die Tiere sich in der gesamten Versuchsanordnung gleichmäßig verteilten, während sie bei gleichmäßiger Helligkeitsverteilung (Licht an in allen Kammern) *a priori* die vorderen Kammern präferierten. Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass eine Vorbehandlung mit MDMA die Aversion auf die gesamte Apparatur steigert. Diese Hypothese wird durch zwei Argumente gestützt: Zum einen zeigten die Tiere im späteren Test („Test2“) angeglichenen Lokomotion, d.h. die zunächst ängstlichen MDMA-vorbehandelten Tiere haben sich mit der Apparatur bereits vertraut gemacht, zum anderen zeigen beide Tiergruppen am Testtag 4 (Lichter aller Kammern ausgeschaltet) eine höhere und gleichwertige Lokomotion. Dieser Umstand kann dadurch interpretiert werden, dass die neurotoxische Wirkung der MDMA-Vorbehandlung zu einer erhöhten Angstbereitschaft führt, welche sich in einer neuen Umgebung auswirkt als geringere Aktivität. Eine starke Ausprägung der anxiogenen Effekte von MDMA konnte ebenfalls beobachtet werden, wenn Tiere subchronisch mit MDMA und unter Stress im Vorfeld einer MDMA-Platzkonditionierung behandelt wurden: Diese Tiere zeigten eine Platzaversion, d.h. sie mieden beim Test die MDMA-gepaarte Kammer [165]. Im Übrigen kann auch beim Menschen das Auftreten einer Panikstörung bei MDMA-Konsumenten als langfristig anxiogene Effekte von MDMA interpretiert werden [306].

Im Versuchsteil II wurde der Einfluss sozialer Isolation auf die Ausprägung der CPP und Extinktion, sowie auf einen substanzinduzierten „Craving“-Rückfall näher untersucht. Es ist bekannt, dass MDMA belohnende Wirkungen entfaltet: In Studien mit Primaten und Ratten wird MDMA selbstverabreicht, jedoch ist das Suchtpotential von MDMA deutlich geringer als das von Cocain [28;162;236]. Die negativen Ergebnisse der Vorversuche mit MDMA-CPP ließ uns die Versuchsbedingungen überprüfen und ebenfalls die belohnenden Wirkungen von MDMA mit einem anderen Stoff mit starkem Suchtpotential vergleichen: Anja Meyer konnte zeigen, dass Amphetamin eine robuste CPP induzierte, MDMA jedoch nicht. Weitere Untersuchungen führten zu der Arbeitshypothese, dass die soziale Umgebung der Tiere einen starken Einfluss hat auf die Ausprägung der (sekundär) belohnenden Effekte von MDMA: MDMA zeigte bei isolierten Ratten im Gegensatz zu Tieren in Gruppenhaltung eine deutliche

CPP [Meyer, A. et al., eingereichte Publikation]. Dies zeigt, dass epigenetische Faktoren wie zum Beispiel Störungen der sozialen Umgebung die Vulnerabilität für die suchterzeugenden Eigenschaften von MDMA und möglicherweise auch anderer Suchtstoffe verstärken können: Mit anderen Worten könnten sozial benachteiligte Personen oder Menschen, welche unter sozialem Stress oder in sozialer Isolation leben, viel eher eine Sucht entwickeln als Menschen im stabilen sozialen Umfeld. Hinweise, welche auf eine Entwicklung von antisozialem Verhalten durch MDMA deuten, könnten sehr wichtig werden, da MDMA bei längerem Gebrauch in einer positiven Rückkopplung die suchterzeugenden und sozial isolierenden Faktoren verstärken könnte.

Neurochemisch wurde bereits gezeigt, dass eine Unterbrechung des Flusses sozialer Information (experimentell simuliert durch soziale Isolation) zu Veränderungen verschiedener Neurotransmittersysteme führt (u.a. DA, NA und 5-HT) [247-249;323]. Es wäre denkbar, dass diese Veränderungen zu einer verstärkten Antwort der im Belohnungssystem implementierten neuronalen Systeme und ebenfalls zu einer Verstärkung der sekundären, mit der Suchstoffgabe assoziierten Belohnungsreize führen. Andere Arbeitsgruppen haben ebenfalls vermutet, dass die soziale Situation einen wichtigen Faktor darstellt für die Suchtentstehung, d.h. für das Eintreten des „point of no return“ (Übergang von kontrollierter zu unkontrollierter Substanzeinnahme) [324].

In dieser Arbeit sollten die Auswirkungen der sozialen Isolation auf die Platzkonditionierung mit MDMA näher untersucht werden: Überraschenderweise wurden hier bei beiden Gruppen (Gruppen- und Isolationshaltung) die Ausprägung einer starken CPP beobachtet. Diese Diskrepanz zu allen anderen Experimenten bezüglich einer MDMA-CPP ist nicht ohne weiteres zu erklären; möglicherweise haben unbekannte Stressfaktoren bei dieser Tierpopulation zu einer stärkeren CPP geführt – ein wichtiger Einfluss von Stress auf eventuelle Suchtentstehung konnte bereits gezeigt werden [48;227].

Der Versuch wurde daraufhin jedoch weitergeführt: Nach einer Woche Pause und darauf folgender, zusätzlicher Konditionierungspaarung mit umgekehrter Reihenfolge der Behandlungen (jedoch gleichbleibender Zuordnung MDMA – belohntes Kompartiment, Vehikel – unbelohntes Kompartiment) wurde nochmals unbehindert ein Test durchgeführt. An diesem Testtag zeigten nur die isolierten Tiere und nicht die in Gruppe-gehaltenen Tiere eine signifikante CPP (Abb. 6.10.-A „ex1“). Das Fehlen der CPP im Kontrast zum ersten Test könnte dadurch erklärt werden, dass entweder die Tiere nur am Testtag durch ein unbekanntes Ereignis Stress erfahren hatten, welcher die Expression der CPP verstärkt hat, die verschiedenen Ergebnisse könnten jedoch vielmehr den Einfluss eines Fehlers in der

Versuchsdurchführung zeigen: Die Konditionierung erfolgte (wie in der Literatur beschrieben) immer abwechselnd mal im belohnten, mal im unbelohnten Kompartiment und könnte eine Perseveration eines alternierenden Tierverhaltens insofern ausgelöst haben, als die Tiere am Testtag sich in dem theoretisch auf das zuletzt erfahrene Kompartiment folgende vermehrt aufhielten. Ein solches Phänomen wurde bereits in Lernversuchen mit dem T-Labyrinth beobachtet und könnte (wie hier gezeigt) ebenfalls in der Methodik von Platzkonditionierungsversuchen wichtig sein. Nichtsdestotrotz war am zweiten Testtag („ex1“) ein deutlicher Unterschied zu sehen zwischen den zwei Tiergruppen in Abhängigkeit von ihren Haltungsbedingungen, womit die Daten dieser Arbeit mit früheren Daten konsistent sind [Meyer, A. et al., eingereichte Publikation]. Auch in nachfolgend immer wieder durchgeführten CPP-Tests (ohne Behandlung, „ex1-ex9“) zeigten die isolierten Tiere eine robustere CPP: Die Extinktion der Präferenzantwort kam langsamer zustande. Am Versuchstag 32 (Reinstatement: „ris“) wurden alle Tiere, bevor sie auf eine CPP getestet wurden, mit einer halbdosierten MDMA-Injektion behandelt. Beide Gruppen zeigten daraufhin eine sehr starke CPP-Antwort, tendenziell war die Antwort bei den isolierten Tieren stärker ausgeprägt. Diese Befunde deuten auf einen exzessiven Rückfall in das Craving-Verhalten, wenn nach einer Extinktion die endogenen Stimuli des Suchtstoffes nochmals präsentiert werden. Während der wiederholten Präsentation der vorher konditionierten Umgebung verlieren die Kontext-Stimuli allmählich an Belohnungs-assoziierter Bedeutung; es kommt zu einer Extinktion der Suchtstoff-assozierten konditionierten Stimuli [311]. Wenn es nach dieser Extinktion zu einem erneuten Kontakt mit dem Suchtstoff kommt, können die Anreizwerte der Suchtstoff-assozierten Stimuli erneuert werden und es kann zum Rückfall des unwiderstehlichen Verlangens nach dem Stoff (Craving) kommen, wie bereits für Cocain gezeigt wurde [198]. Übertragen auf den Menschen bedeutet dies, dass es bei langjährig Abstinenten durch eine einzelne Präsentation eines Suchtstoff-Stimulus oder eines Suchtstoff-assozierten Stimulus zu einem starken Craving kommt, welches zum Rückfall in den Drogengebrauch führt. Im Tierexperiment kann das durch einen Stimulus induzierte Craving wiederum in dem antizipatorischen Verhalten der Tiere gezeigt werden, welche die Suchtstoff-assozierte Umgebung in der Platzkonditionierungs-Box in Erwartung der Injektion und Belohnung aufsuchen, wie hier erstmals auch für MDMA gezeigt wurde.

Parallel zur Betrachtung der Platzkonditionierung wurde die lokomotorische Aktivität der Tiere während der Konditionierungsphase, aber auch während der Testtage und der Extinktion betrachtet. An den Test- bzw. Extinktionstagen zeigten die isoliert gehaltenen

Tiere im unbehandelten Zustand eine über den gesamten Versuchsverlauf erhöhte lokomotorische Aktivität im Vergleich zu den in Gruppe gehaltenen Tieren. Da diese Hyperaktivität bereits am Versuchstag 0 (Baseline) auftritt und sich auch nicht durch die Konditionierung oder Extinktion der konditionierten Assoziation (Suchtstoff-Kontext) ändert, ist davon auszugehen, dass diese Hyperaktivität nicht durch die Wirkung von MDMA oder durch die Konditionierungseffekte hervorgerufen wird. Vielmehr scheint diese Hyperaktivität das Ergebnis der sozialen Isolation zu sein. Von einer isolationsbedingten gesteigerten Aktivität und Aggressivität wird in der Literatur mehrfach berichtet, jedoch sind die Beobachtungen, insbesondere bezüglich der Hyperaktivität, nicht immer konsistent und in dem Maße ausgeprägt wie in dieser Arbeit [246;248;256]. Der Grund für die Unterschiede kann ein unterschiedlicher Versuchsaufbau sein. Eine sehr neue japanische Arbeit konnte zeigen, dass zwar Konzentrationen der Neurotransmitter DA und 5-HT in manchen Hirnarealen (PFC, NAcc, DRN) grundsätzlich erniedrigt waren in isoliert aufgezüchteten Ratten, eine Exposition von „novelty-Stress“ (die Tiere wurden in unbekannte, ungewohnte Umgebung gesetzt) die Konzentrationen in den meisten Hirngebieten jedoch wieder normalisiert hatte, außer im NAcc: Hier war ein massives Überschiesens der DA- und DOPAC-Gehalte weit über Normalwerte hinaus zu sehen. Die Umsatzraten der Neurotransmitter wurden andererseits in den meisten Hirn-Gebieten durch „novelty-Stress“ erhöht bei Gruppen-Tieren, aber erniedrigt bei isolierten Tieren [191]. Trotzdem ist deutlich zu sehen, dass die Versuchsbedingungen eine wichtige Rolle spielen für Beobachtungen eventueller isolationsbedingter Veränderungen im Gleichgewicht der Neurotransmitter.

Sehr interessant war in dieser Arbeit jedoch die Beobachtung, dass eine MDMA-Gabe die Hyperaktivität der isoliert gehaltenen Tiere voll antagonisierte. Dies ist sowohl am Tag 32 (Reinstatement) zu sehen bei der Gabe einer sehr niedrigen Dosis MDMA (2,5 mg/kg), als auch während der Konditionierungsphase mit jeweils 5 mg/kg MDMA. Diese Beobachtung erinnert an die paradoxen beruhigenden Effekte von Methylphenidat (Ritalin®) und anderen Psychostimulantien in der Therapie des Aufmerksamkeits-Defizit-Hyperaktivitäts-Syndroms (ADHD) bei Kindern und Jugendlichen und an die Effekte von Methylphenidat im Tiermodell der ADHD (vgl. [159;262]). Eine beruhigende Rolle von MDMA ist in einem solchen Hyperaktivitätszustand ebenfalls nicht auszuschließen, da MDMA eine starke NA- und 5-HT-Freisetzung verursacht, beides Neurotransmitter, welche im Mechanismus der paradoxen Effekte von Methylphenidat in der Therapie der ADHD diskutiert werden; im Übrigen wurde kürzlich im Tiermodell eine wichtige Rolle des 5-HT und dadurch ein möglicher Einsatz der SSRI in der Therapie der ADHD gefunden [89;159].

Eine veränderte Verhaltensantwort isolierter Tiere auf dopaminerge Substanzen (Amphetamin, Apomorphin) ist bereits gezeigt worden, allerdings eher positiv modulierend [12;135]; jedoch konnte dieser Effekt nicht immer reproduziert werden [319]. Es muss daher bedacht werden, dass die Veränderungen in der serotonergen und dopaminergen Neurotransmission und im Verhalten durch soziale Isolation stark fluktuieren können in Abhängigkeit von der Dauer und dem Zeitpunkt der Isolation, und dass es einen Unterschied macht, ob Tiere gänzlich isoliert aufgezüchtet wurden oder eine Kurzzeit- oder Intermediär-Isolation erfuhren [212;246-248].

Über die möglicherweise verstärkende Wirkung sozialer Isolation auf Amphetamin-induzierte Hyperlokomotion hinaus konnte ebenfalls eine erhöhte Bereitschaft der isolierten Tiere für Sensitivierungseffekte von Amphetamin gezeigt werden [12]. Charakteristisch für diesen Effekt war ebenfalls eine Abhängigkeit von der zeitlichen Lokalisation der sozialen Isolation (vgl. keine oder umgekehrte Effekte bei [319]). Interessanterweise wurde in unserem Kurzzeit-Isolationsmodell ebenfalls eine Form der Sensitivierung gefunden: Während bei in Gruppe gehaltenen Tieren sich die lokomotorischen Antworten an den MDMA-Konditionierungstagen allmählich verstärkten und am MDMA-Challenge-Tag (Tag 19) die Hyperlokomotion stärker ausgeprägt war als am Tag 1, dem ersten MDMA-Konditionierungstag (Zeichen für die Entwicklung und Expression einer Verhaltenssensitivierung), waren zwar die Effekte der Hyperlokomotion durch MDMA am Tag 19 bei isolierten Tieren nicht verschieden von den Effekten am Tag 1, jedoch waren bei detaillierter Betrachtung des Verhaltens der Tiere andere Effekte sichtbar. Im Lokomotions-Score während der Konditionierungsphase (jeweiliger Vergleich der lokomotorischen Aktivität am MDMA- und am Vehikel-Konditionierungstag, ausgedrückt als Anzahl der Tiere, welche innerhalb einer solchen Paarung am MDMA-Tag verglichen mit dem Vehikel-Tag hyperaktiv / hypoaktiv / unverändert aktiv waren; vgl. Abb 6.11. – 6.14) war zu sehen, dass bei Isolations-Tieren anfangs (Paarung I) ein viel größerer Anteil der Tiere unter MDMA hypoaktiv war. Diese Zahl verkleinerte sich jedoch deutlich im Laufe des Versuchs, während die Zahl der Tiere, welche mit Hyperaktivität auf die MDMA-Behandlung reagierten, wuchs. Dieser Umstand könnte ebenfalls als eine Form der Verhaltenssensitivierung gedeutet werden, jedoch bedarf es noch weiterer Untersuchungen dieses Phänomens, um die Sensitivierung zu validieren und auch die neurochemischen Veränderungen bei diesen Tieren zu charakterisieren.

6.4.3. Zusammenfassung

Trotz der Fokussierung dieser Arbeit auf Neurotoxizität und Sucht in Zusammenhang mit MDMA-Behandlung wurde hier eine paradox-beruhigende Wirkung des MDMA bei isolationsbedingter Hyperaktivität beobachtet; dieser Befund könnte wichtig sein für eventuelle Wirkungen von MDMA in Tiermodellen des ADHD-Syndroms und für die Erforschung der Wirkmechanismen klinisch eingesetzter und potentiell wirksamer Pharmaka. Zu diesem Zweck müssen jedoch weitere Untersuchungen durchgeführt werden, welche allerdings den Rahmen dieser Arbeit sprengen würden.

Bezüglich der Suchtwirkung von MDMA wurden im Rahmen dieser Arbeit folgende Beobachtungen gemacht:

Der Zusammenhang zwischen der Entwicklung einer Verhaltenssensitivierung und Craving scheint bei MDMA dosisabhängig zu sein. Hoch-dosiert MDMA-behandelte Ratten zeigten in dieser Arbeit eine Sensitivierung der Verhaltenseffekte (beschränkt auf die Hyperlokomotion), jedoch kein Craving. Eine niedrig dosierte MDMA-Behandlung führte ebenfalls zur Entwicklung einer mehr subtilen, jedoch stabilen (Expression dauert mindestens eine Woche an) Form der Verhaltenssensitivierung und bezüglich der sekundär belohnenden Stimuli sowohl zu einem starken Craving als auch einem drastischen Rückfallverhalten bei erneuter Drogenexposition. Dieser Unterschied ist zunächst überraschend (wenn man von einer Dosis-Wirkungs-Beziehung in allen Substanzwirkungen ausgeht), doch wollen wir die Effekte von Cocain in die Diskussion mit einbeziehen. Cocain ist sehr gut als Vergleichssubstanz für die Craving- und Sensitivierungsdiskussion von MDMA geeignet, weil es eine Kreuzsensitivierung (in Verhalten und Neurochemie) mit MDMA zeigt [139]. Daher kann davon ausgegangen werden, dass Cocain (und Amphetamin) und MDMA gleiche präsynaptische Veränderungen an dopaminergen Synapsen im NAcc induzieren³⁴. Kalivas et al postulieren die Hypothese, dass die pharmakologische Neuroadaptation auf die direkten Wirkungen von Cocain eher für Langzeiteffekte wie Paranoia verantwortlich ist, während neuronale Veränderungen, welche vom Lernen der Assoziationen zwischen Cocain-Injektion und seiner endogenen Wirkung herrühren, essentiell sind für wichtige Suchtphänomene wie Craving und Rückfall [140]. In unserem Versuch scheinen die Verhältnisse ähnlicher Natur zu sein: Während hoch dosierte MDMA-Gabe zwar eine Verhaltenssensitivierung und

³⁴ Jedoch sollte nicht außer acht gelassen werden, dass die postsynaptischen Adaptationen bei Cocain und MDMA umgekehrte Vorzeichen haben können: Wiederholte Cocain-Gabe führt zur stärkeren Antwort der accumbalen „spiny“-Neurone auf die Gabe eines D1-Agonisten, während die Antwort nach wiederholter MDMA-Gabe schwächer ausfällt [123;321].

neurochemische Adaptation induziert, scheint die Entwicklung eines Cravings nur durch niedrig dosierte MDMA-Gaben stattzufinden. Der Grund dafür könnte in dem Umstand zu finden sein, dass nur in niedrigem Dosisbereich Lernen noch möglich ist (vgl. Kap. 5: Bei hoher MDMA-Dosis nehmen die Tiere weniger Informationen über die Umgebung auf), welches für die Rezeption der Assoziation zwischen Injektion, Umgebung und Wirkung von MDMA und nach der Kalivas-Hypothese folglich auch für die Entwicklung von Craving wichtig ist. Ferner konnte hier gezeigt werden, dass eine intakte noradrenerge Innervation des Vorderhirns essentiell ist für die Entwicklung einer Verhaltenssensitivierung. Ob diese Bedingung auch für andere Psychostimulantien oder Suchtstoffe im Allgemeinen gilt, bleibt noch zu klären, könnte aber die Entwicklung neuartiger Therapiestrategien der Sucht implizieren.

Das konditionierte antizipatorische Verhalten der Tiere im Platzkonditionierungsexperiment ist zudem stark von Umgebungsfaktoren abhängig. So zeigen nur isoliert gehaltene Tiere eine stabile CPP, eine größere Robustheit gegenüber Extinktionsprozessen, sowie tendenziell ein stärkeres Rückfallverhalten. Diese erhöhte Vulnerabilität für Suchtphänomene bei sozialer Isolation rührt wahrscheinlich von Veränderungen des Neurotransmittergleichgewichts im Belohnungssystem des Gehirns und wurde bereits von anderen Autoren neben Stressfaktoren [48;227] als wichtiger Faktor bei der Suchtentstehung vermutet [324]. MDMA führt zwar zum Selbstadministrationsverhalten bei Primaten, jedoch ist dies geringer ausgeprägt als bei Cocain [162]; dasselbe gilt für die Eigenschaft von MDMA, eine CPP auszulösen. Dieses eher geringer ausgeprägte Suchtpotential von MDMA kann durch epigenetische Faktoren (wie z.B. soziale Isolation) jedoch dramatisch verstärkt werden, sodass MDMA ein Suchtpotential vergleichbar dem anderer „harter Drogen“ erhält. Für den Missbrauch von MDMA in der Öffentlichkeit würde dies bedeuten, dass sozialer Stress bei Jugendlichen zu einer erhöhten Vulnerabilität für eine Ecstasy-Sucht führt und diese Vulnerabilität sogar weiter verstärkt wird durch antisoziales Verhalten, welches als Folge übermäßigen MDMA-Konsums beim Menschen vermutet und im Tierversuch bereits nachgewiesen wurde [85].

7. Neurotoxische Wirkungen von MDMA (Teil C)

7.1. Einleitung

7.1.1. MDMA-Neurotoxizität

Wie bereits beschrieben, führt MDMA-Gabe bei Nagern³⁵ und Primaten zur selektiven Schädigung der aus dem dorsalen Raphe-Nucleus stammenden, ascendierenden serotonergen Axone³⁶. Zum ersten Mal beschrieb die Arbeitsgruppe um Ricaurte und Seiden 1985 die neurotoxischen Effekte eines ringsubstituierten Amphetamins [241]; es handelte sich damals um das 3,4-Methylenedioxyamphetamin (MDA). Ähnliche Befunde zeigten ebenfalls eine serotonerg-neurotoxische Wirkung des N-methyl-Analogons des MDA, welches als MDMA oder Ecstasy bereits missbraucht wurde [273]. Im Gegensatz zum Methamphetamin (METH), welches gleichermaßen serotonerge und dopaminerge Neurone schädigt, zeigt MDMA eine selektive Wirkung auf das serotonerge System [302].

Die Evidenz für die neurotoxische Wirkung von MDMA wurde in den 80er Jahren durch intensive Untersuchungen erhärtet: Man fand bei MDMA-behandelten Ratten erniedrigte 5-HT- und 5-HIAA-Konzentrationen im Gehirn, verringerte Bindung von [³H]-Paroxetin ([26]: Bmax ist erniedrigt bei gleichbleibenden Kd-Werten, was als Maß für eine erniedrigte Zahl der Serotonintransporter (SERT) angesehen und wiederum als Degeneration der serotonergen Axonterminale interpretiert wird), außerdem wurde eine erniedrigte Tryptophanhydroxylase-Aktivität nachgewiesen [302]. Immunhistochemische Färbungen zeigten ebenfalls den Verlust dünner serotonerger Axone im Vorderhirn (vor allem im Cortex, Hippocampus und Striatum), welche im DRN ihren Ursprung haben [296].

Es gibt Hinweise, dass der MDMA-Konsum auch beim Menschen zu neurotoxischen Effekten führt. In der Zerebrospinalflüssigkeit von MDMA-Usern wurden erniedrigte Werte von 5-HT und 5-HIAA gemessen [243]; zudem konnten zahlreiche psychopathologischen Symptome beobachtet werden (u.a. Depression, Schlafstörungen, „flashbacks“, Angststörung,

³⁵ Ausgenommen: Maus

³⁶ Die Neurone des medianen Raphe-Nucleus (MRN) sind im Kontrast zu denen des DRN allgemein relativ resistent gegenüber der Schädigung durch serotonerg-neurotoxische Amphetamine (MDMA, MDA, PCA) [127].

Impulsivität und Feindseligkeit, Störungen des Gedächtnisses und der Aufmerksamkeit) [196;306]. Trotzdem können diese Effekte nicht mit hundertprozentiger Sicherheit der Wirkung von MDMA zugeordnet werden, da bei den meisten Humanstudien das Patientenkollektiv aus Polytoxikomanen bestand [107].

Im Jahr 2000 waren von 43 gemeldeten Todesfällen in Zusammenhang mit Ecstasyderivaten 22 in Folge von Mischintoxikationen³⁷ eingetreten [6]. In den meisten Fällen schien der Beigebrauch anderer Suchtstoffe eher beabsichtigt als unbeabsichtigt³⁸ gewesen zu sein: In der Tat sollen Jugendliche laut einer Umfrage in jeweils über 85 % der Fälle Cannabis, Nicotin oder Ethanol (auch in Kombination) beikonsumieren, in jeweils 50-60 % der Fälle Cocain, Speed oder LSD (zur Verstärkung der psychotropen und aktivitätsfördernden Effekte von MDMA) [232]. Eine norwegische Sozialstudie zeigte 1999, dass Großstadt-Jugendliche Ecstasy meist zusammen mit Cannabis, Amphetamin oder Heroin konsumieren. Interessant war aber, dass nur bei Ecstasy die Assoziation mit „House/Techno“-Musikpräferenz gezeigt werden konnte [222]. Dieses Ergebnis ist zwar zu erwarten gewesen, jedoch insofern von Wichtigkeit, als eine frühere Tier-Studie mit Amphetamin einen starken Einfluss der Umgebung auf die Amphetamin-induzierte Neurotoxizität hatte: In Gruppe gehaltene oder mit lautem externen Geräuschpegel beschallte, bei hohen Temperaturen und schlechter Hydratation gehaltene Mäuse zeigten höhere Verhaltens- und Neurotoxizitätseffekte auf Amphetamin: „*Aggregationstoxizität*“ (Grunn & Gurd, 1940; Chance, 1946 & 1947, zitiert und zusammengefasst bei [110]). Mit MDMA wurde dieser Versuch bis dato nicht durchgeführt, jedoch ist es durchaus denkbar, dass die Enge, extrem laute Musik, Hitze und starke Dehydratation bei „Rave“-Parties die neurotoxischen Effekte von MDMA verstärken.

In neuester Zeit häufen sich Berichte über kognitive Defizite bei Ecstasy-Konsumenten: erniedrigte Lern- und Gedächtnisleistungen, Störungen der Aufmerksamkeit [105;106;184;196;239]; wobei anzumerken wäre, dass diese Störungen mit der Intensität des MDMA-Konsums korrelieren (sogar nach Herausrechnen anderer (polytoxikoman)

³⁷ 11 Fälle hatten aber reinen Ecstasy-Konsum zur Ursache. Diese Todesfälle waren wohl durch akute peripher-toxische Wirkungen verursacht, jedoch waren auch 5 Suizidfälle in Zusammenhang mit Ecstasy gemeldet [6], welche u.U. durch Langzeiteffekte (Entwicklung eines depressiven Syndroms) verursacht sein könnten.

³⁸ Etwa durch Beimischungen anderer Suchtstoffe in den Ecstasy-Tabletten. Die Reinheit der polizeilich beschlagnahmten Ecstasy-Konsumeinheiten (KE) war aber vergleichbar sehr gut: 92,7 % der forensisch analysierten KE waren Monopräparate. Davon enthielten 98,4 % der Monopräparate MDMA (mit durchschnittlich 64 mg/KE), 1,2 % Amphetamin (mit durchschnittlich 34 mg/KE) und 0,4 % andere Amphetaminderivate (Methamphetamin, MDE, MDA, DOB). Bei den Kombinationspräparaten handelte es sich um Mischungen von MDMA und MDA/MDE/Amphetamin/Methamphetamin [6].

konsumierten Drogenarten, insbesondere Cannabis [105]). Bildgebende Verfahren ermöglichen die Untersuchung der Serotonin-Transporter(SERT)-Dichte in Gehirnen von MDMA-Konsumenten. Studien mit einem PET/SPECT-Radioliganden für SERT ([¹²³I]-β-CIT) zeigten zwar erniedrigte SERT-Dichte bei akutem Ecstasy-Konsum [239;284], jedoch keine Effekte bei abstinenten Versuchspersonen [239]. Es muss aber betont werden, dass dieser Ligand ebenfalls am Dopamintransporter (DAT) bindet [114]; eine Überprüfung der Ergebnisse mit einem selektiveren SERT-Radioliganden wäre angebracht: etwa mit [¹¹C]-McN-5652, mit dessen Hilfe ebenfalls eine erniedrigte SERT-Dichte demonstriert werden konnte [184]. Ebenfalls dürfen PET/SPECT-Studien trotz ihrer Modernität nicht uneingeschränkt in Richtung einer Neurotoxizität oder Regeneration interpretiert werden, da eine starke serotonerge Entleerung gemessen an Hirngewebshomogenaten nicht unbedingt mit einer starken Abnahme der SERT-Dichte korrelieren muss [183].

Neben den Effekten auf das SERT-Protein konnte auch eine Aufregulation von 5-HT_{1A}-Rezeptoren im Okzipitalcortex beobachtet werden (ein Effekt, welcher ebenfalls im Tierversuch bestätigt wurde [10]), was ebenfalls auf eine gestörte serotonerge Neurotransmission in Gehirnen von Ecstasy-Konsumenten hinweist [238].

7.1.2. Angenommene Mechanismen der serotonergen Neurotoxizität

Der Mechanismus der neurotoxischen Wirkung von MDMA ist bislang nicht geklärt, jedoch gibt es einige Hinweise auf mögliche Wege, über welche MDMA zur Schädigung der serotonergen Axonendigungen führen könnte. Eine sehr gute Zusammenfassung der bisherigen Arbeiten zum Mechanismus der MDMA-vermittelten Neurotoxizität findet sich bei Sprague et al. [296].

Im Folgenden sollen die wichtigsten bekannten Aspekte der neurotoxischen Wirkung von MDMA kurz angerissen werden. Vor diesem Hintergrund sollen die durchgeführten Untersuchungen diskutiert werden.

Sicher belegt ist der Umstand, dass der Serotonintransporter eine Schlüsselrolle im neurotoxischen Wirkmechanismus von MDMA spielt. Blockiert man den Transportermechanismus (mit Hilfe von SSRI, vorzugsweise Fluoxetin), werden die neurotoxischen Effekte von MDMA ebenfalls gehemmt, jedoch ohne die Hyperthermieeffekte von MDMA zu hemmen oder den MDMA-Metabolismus oder dessen Akkumulation zu modulieren [265].

Kinetik der MDMA-Neurotoxizität

Christopher J. Schmidt untersuchte auch die **Kinetik** der MDMA-induzierten Neurotoxizität und fand heraus, dass der Abfall der 5-HT-Konzentrationen im Gehirn einer biphasischen Kinetik folgt: 3 und 6 Stunden nach MDMA-Gabe (10 mg/kg, s.c.) kommt es zu einer massiven Entleerung von 5-HT; 12 und 24 h nach Injektion sind die 5-HT-Gehalte wieder den Kontrollen angeglichen. Erst dann setzt eine langfristige serotonerge Entleerung ein, welche z.B. 7 Tage nach Injektion gemessen werden kann [270].

Rolle der MDMA-Metaboliten

Wenn MDA oder MDMA direkt ins Gehirn injiziert werden, wirken diese Substanzen nicht neurotoxisch [77;193]. Deshalb muss diskutiert werden, ob Metaboliten der Methylenedioxyamphetamine, welche in der Peripherie gebildet werden, die neurotoxische Wirkung vermitteln. Der Hauptabbau von MDMA geschieht in der menschlichen Leber hochaffin durch das zu den Cytochrom P450 Oxidasen gehörende Enzym CYP2D6 (biphasische Reaktion, neben einer niederaffinen Beteiligung anderer CYP-Isoenzyme), wobei der Dioxol-Ring enzymatisch geöffnet wird und das 3,4-Dihydroxymethamphetamin (DHMA) entsteht [157]. Das DHMA wird an der Catechol-O-methyltransferase (COMT) weiter zu den Hydroxy-methoxy-Metaboliten abgebaut. Einen Nebenabbauweg beim Menschen (und wahrscheinlich einen Hauptabbauweg bei der Ratte [55]) bildet die N-desalkylierung, wobei am CYP2B6 (mit Beteiligung von CYP1A2 und CYP3A4) MDMA zu MDA umgesetzt wird. Die weitere Metabolitenpalette des MDA (u.a. mit Piperonylaceton- und Hippursäurederivaten) findet sich bei Ensslin et al. [75] und [154]. Dieser Nebenabbauweg könnte insofern von Bedeutung sein, als MDA toxischer als MDMA wirkt und maßgeblich zur MDMA-vermittelten Neurotoxizität beitragen kann (s.u.).

Dihydroxyamphetamine (DHMA) bilden leicht ortho-Chinone und könnten zur Bildung von reaktiven Sauerstoffverbindungen („-species“ = ROS) maßgeblich beitragen, welche in den meisten Neurodegenerationstheorien das neurotoxische Substrat darstellen [49;163]. In serotonergen Neuronen wäre es denkbar, dass ROS zur Lipidperoxidierung und zum anschließenden Terminalverlust neben der Inaktivierung der Tryptophanhydroxylase führen. Poor-Metabolizer, welchen durch einen genetischen Polymorphismus die hochaffine Komponente (CYP2D6) der Demethylierung (Ringöffnung) fehlt, kommen sowohl beim Menschen als auch im Tierreich vor. Bei Tieren sind es die weiblichen Dark-Agouti-Ratten, welchen die CYP2D6 fehlt: Diese müssten also weniger DHMA aus MDMA bilden und

somit weniger neurotoxische Wirkungen durch MDMA erfahren. Im Vergleich mit Männchen gibt es jedoch keinen Unterschied³⁹, d.h. dass es andere Wege geben muss, durch welche Chinone oder/und ROS entstehen können. Trihydroxyamphetamine (Analoge des dopaminergen Neurotoxins 6-OH-Dopamin), welche durch weitere Oxidation entstehen können, sind zwar wirksam, jedoch unspezifisch: Es werden in hohem Maße ebenfalls dopaminerge Axone geschädigt (zusammengefasst bei [296]).

Ein spezieller Metabolit jedoch scheint ein geeigneter Kandidat für die Vermittlung der neurotoxischen Effekte von MDMA zu sein: Die i.c.v.-Administration des Glutathion-Konjugats von Dihydroxyamphetamin (2,5-Bis-(glutathion-S-yl)- α -methyldopamin = 2,5-Di-(glutathion-S-yl)-3,4-dihydroxyamphetamin), welches einen möglichen Metaboliten des MDA (und des N-demethylierten MDMA) darstellt, führte zu erniedrigten Konzentrationen von 5-HT und 5-HIAA im Cortex, Hippocampus und Striatum bei gleichbleibenden Dopaminparametern [190]. Diskutiert wird die Rolle von daraus gebildeten Thioether-Orthochinonen als Sauerstoff-Radikalbildnern und Oxidantien an Sulfhydrylgruppen von Proteinen wie dem transmembranären Serotonintransporter (SERT) oder dem Syntheseenzym Tryptophanhydroxylase (TPH).

Rolle der Neurotransmitter

SEROTONIN

Für die Vermittlung der serotonergen Neuronenschädigung könnten durchaus ebenfalls die eigentlichen Neurotransmitter 5-HT und DA verantwortlich sein. Es gibt Hinweise, welche für 5-HT sprechen: 5-HT_{2A}-Antagonisten vermindern die neurotoxischen Effekte von MDMA; dies könnte dadurch erklärt werden, dass dieser PLC-gekoppelte Rezeptor eine intrazelluläre Ca²⁺-Erhöhung verursacht und somit eine Exzitotoxizität nachahmen könnte. Gegen die 5-HT-Hypothese spricht jedoch, dass die Gabe von Tryptophan oder 5-Hydroxytryptophan die Neurotoxizität ebenfalls hemmt. Die Rolle des 5-HT_{2A}-Rezeptors wird eher in der Aktivierung dopaminerger Neurone begründet sein (s.u. und [296]).

³⁹ Trotzdem zeigt eine Arbeit, dass Dark-Agouti-Weibchen eine geringere Neurotoxizität erfahren. Hier wird aber gezeigt, dass der N-demethylierungsweg keinen Einfluss auf die MDMA-Neurotoxizität hat: Sprague-Dawley-Weibchen, welche geringere Hirnkonzentrationen von MDA (nach MDMA-Gabe) zeigen als SD-Männchen, zeigen die gleiche 5-HT-Entleerung wie die Männchen [55].

DOPAMIN

Eine Rolle von Dopamin ist viel wahrscheinlicher, da sowohl eine Dopaminentleerung des Gehirns die neurotoxischen Effekte von MDMA hemmt, als auch die Gabe von L-DOPA, welche die Konzentrationen von DA im Gehirn stark erhöht, die MDMA-Neurotoxizität verstärkt [296]. Weiterhin spricht für die DA-Hypothese, dass bei der Methylenedioxyamphetamin-Reihe die Stärke der Dopaminfreisetzung (MDA > MDMA > MDE > MBDB) mit ihrer serotonergen Neurotoxizität korreliert [200]. Außerdem konnte eine molekularbiologische Arbeitsgruppe zeigen, dass die MDMA-Induktion des programmierten Zelltodes bei serotonergen Zellen durch DA und nicht durch 5-HT potenziert werden konnte [290].

Als möglicher Mechanismus für *neurotoxisches* DA wäre denkbar, dass starke DA-Freisetzung (welche durch 5-HT_{2A}-Rezeptoren noch verstärkt wird) zu einer unspezifischen (jedoch SERT-abhängigen) Aufnahme von DA in entleerte serotonerge Axonterminale führt. DA verweilt dort im Cytoplasma und wird folglich durch die MAO-B abgebaut. Dabei können in hohem Maße „reaktive Sauerstoffspezies“ (ROS) entstehen, u.U. über DOPAL, den Zwischenmetaboliten des DA, oder ebenfalls über einen Thioether-Metaboliten [163;168;296;329].

Gegen DA als Mediator der Neurotoxizität spricht jedoch, dass zwar im Striatum, wo hohe DA-Konzentrationen vorliegen können, die Neurotoxizität von MDMA erklärt werden kann; der Cortex und Hippocampus jedoch, wo ebenfalls serotonerge Neurone geschädigt werden, wird nur gering dopaminerg innerviert.

Reaktive Sauerstoffspezies (ROS)

Ein weiteres Argument gegen die DA-Hypothese ist die fehlende Bildung von Hydroxylradikalen durch d-Amphetamin (welches ebenfalls ein mächtiger DA-Freisetzer ist), MDMA jedoch bildet effektiv ROS (beidesmal gemessen als Umsatz von Salicylsäure zur Dihydroxybenzoesäure *in vivo* [285]). Andererseits blockierten Inhibitoren beider monoaminergen Transporterproteine, Fluoxetin (SSRI) und Mazindol (DAT-Inhibitor), die Bildung von ROS durch MDMA [286].

Ascorbinsäure oder Cystein wirken als Antioxidantien ebenfalls protektiv bei MDMA-induzierter Neurotoxizität [112;287]. Acetylsalicylsäure jedoch, ein Hydroxyl-Radikal-Fänger, wirkte nicht protektiv gegen MDMA-induzierte Schäden am serotonergen System, daher wird diskutiert, ob die MDMA-Neurotoxizität eher über Peroxid- und andere Radikale

vermittelt wird. Acetylsalicylsäure verstärkte in dieser Studie sogar die MDMA-induzierte Hyperthermie und Letalität [327]!

Apoptose

Neurotoxische Noxen, wie ein exzitotoxisches Ereignis (Glutamat-Überaktivität, welche über NMDA-Rezeptoren zu einem starken $[Ca^{2+}]_i$ -Anstieg führt), können zu der Induktion einer Zellnekrose (schneller Zelltod bei starker Exzitotoxizität) oder Apoptose (Induktion des programmierten Zelltodes bei milder Exzitotoxizität) führen [206]. Bei vielen neurodegenerativen Erkrankungen werden apoptotische Veränderungen als wichtiger Mechanismus und Schlüssel zu neuen Therapiestrategien angesehen [43;148;208;221].

Sowohl Hyperthermie als auch viele Toxine führen als Apoptose-charakteristische Faktoren zu einer subnekrotischen Zellschädigung [43]; darüber hinaus konnte für MDMA eine klare Induktion apoptotischer Mechanismen *in vitro* gezeigt werden [290;303]. Der Mechanismus, welcher zur Apoptose-Induktion durch MDMA führt, ist bisher nicht bekannt, Glutamat-Freisetzung wird im Striatum zumindest erniedrigt; trotzdem wirkt der nicht kompetitive NMDA-Antagonist MK-801 (Dizocilpin) sehr gut protektiv bei der MDMA-vermittelten Neurotoxizität [296]. Ausserdem wird angenommen, dass oxidative Schädigung durch ROS ebenfalls zur Apoptose (neben Nekrose) führen kann; es wird die Rolle von Dopamin und NO diskutiert.

FRAGESTELLUNG

In der vorliegenden Arbeit sollte neben induzierbaren Transkriptionsfaktoren (c-Fos als Marker neuronaler Aktivität, aber auch in neurodegenerative Prozesse involviert) ebenfalls die Expression zweier Apoptose-regulatorischer Proteine (Bcl-2, Bax) im Gehirn MDMA-behandelter Ratten untersucht werden. Das Gen, welches für Bcl-2 kodiert, wurde 1984 zum ersten Mal aus B-Zell-Lymphomen geklont; das Protein ist hier abnormal exprimiert und wirkt Apoptose-hemmend [43]. Bax („Bcl-assoziiertes X-Protein“) ist ebenfalls ein zur Bcl-Familie gehörendes Onkoprotein und das proapoptotische Homolog zu Bcl-2. Es wird angenommen, dass Apoptose reguliert wird durch das Gleichgewicht von Bcl-2 zu Bax, welche Homo- und Heterodimere bilden können und deren Expressionsmuster zueinander das Überleben oder Sterben einer Zelle bestimmen, indem andere Proteinkaskaden gehemmt oder

induziert werden⁴⁰. Außerdem gibt es Hinweise darauf, dass im ZNS verschiedene Expressionsmuster dieser regulatorischen Proteine je nach Neuronenpopulation vorkommen (z.B. exprimieren Purkinje-Zellen relativ hohe Levels an Bax verglichen zu Bcl-2, was zu einer stärkeren Vulnerabilität gegen Noxen führt; zusammengefasst in [43]).

Neben den immunhistochemischen Untersuchungen sollten ebenfalls die Gewebkonzentrationen relevanter monoaminerger Neurotransmitter (5-HT, DA, NA) in striatalen Hirnkernen der Basalganglien nach verschiedenen MDMA-Behandlungsschemata untersucht werden und die Ergebnisse vor dem bekannten theoretischen Hintergrund zum Mechanismus der MDMA-Neurotoxizität diskutiert werden. Insbesondere wurde aus nachstehend benannten Gründen der Fokus auf die Rolle von Noradrenalin in der MDMA-induzierten, serotonergen Neurodegeneration gerichtet.

Rolle von Noradrenalin in neurodegenerativen Erkrankungen

Noradrenalin wird in der Parkinson'schen Erkrankung als potentiell neuroprotektive Substanz diskutiert: Es wird angenommen, dass noradrenerge Neurone primär bereits im frühen Stadium der Krankheit degenerieren und der fehlende Schutz sekundär die dopaminergen Neurone vulnerabel macht für andere (exzitotoxische) Noxen. Diese Hypothese baut auf mehreren Beobachtungen auf:

Erstens ist zu beobachten, dass neben einer Degeneration der dopaminergen Neurone ebenfalls noradrenerge Neurone degeneriert sind, dies insbesondere bei Patienten mit zusätzlich diagnostizierter Demenz [90;230].

Zweitens konnte im Tierversuch gezeigt werden, dass eine zusätzliche Läsion des Locus Coeruleus (LC) zu einer stärkeren Parkinson-Symptomatik bei MPTP-behandelten Affen führt [180;181]; außerdem intensiviert sie Neuroleptika-induzierte Parkinson-Symptomatik und verringert antiakinetische Wirkung von Glutamat-Antagonisten und L-DOPA [263;264].

Drittens wirken α 2-Antagonisten, welche die Feuerrate der noradrenergen Neurone erhöhen, antikataleptisch und modulieren positiv die Dopaminsynthese [263;267]. Eine neuere Studie

⁴⁰ Induktion sog. Caspasen: Bcl-2 ist in der äußeren Mitochondrienmembran lokalisiert und verhindert die Freisetzung von Cytochrom C, kann jedoch durch andere proapoptotische Regulatoren (Bad, Bax) inhibiert werden. Freies Bax kann aber auch durch Bildung von Megaporen in der Mitochondrienmembran die Freisetzung von Cytochrom C aus Mitochondrien induzieren, welches an den Caspase-Aktivator APAF1 bindet. Dadurch wird die Pro-Caspase-9 aktiviert, welche wiederum Caspase-3 aktivieren kann und so die Proteinkaskade in Gang setzt, welche letzten Endes zum Zelltod führt [237].

zeigt ferner sogar einen neuroprotektiven Effekt von NA (oder Blockade der α_2 -Rez.) bei exzitotoxischer Neuronenschädigung [178]. Es wird vermutet, dass Noradrenalin auf das dopaminerge System neuroprotektiv wirkt (sehr ausführlich dargestellt bei Gesi et al. [93]).

Aus diesen Gründen wurde in dieser Arbeit ebenfalls der potentiell neuroprotektive Einfluss von Noradrenalin auf die neurotoxische Wirkung von MDMA untersucht. Hierzu wurde der LC selektiv durch das Neurotoxin DSP-4 lädiert. DSP-4 [N-(2-Chloroethyl)-N-ethyl-2-bromobenzylamin-hydrochlorid] ist ein noradrenerges Neurotoxin, welches selektiv die aufsteigenden Axone der noradrenergen Neurone des Locus Coeruleus (LC-NA) zerstört [88;93;173].

7.2. Immunhistochemische Untersuchungen

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Neurotransmitter Serotonin und Dopamin (indirekt über Antikörper gegen das Synthesenzym Tyrosinhydroxylase) für die Lichtmikroskopie visualisiert mittels einer immunhistochemischen Färbung in koronaren Hirnschnitten.

Ferner wurden auch die Expressionsmuster der apoptotisch-regulatorischen Proteine Bcl-2 und Bax in striatalen Hirnschnitten untersucht (Hintergrund siehe oben), sowie das Expressionsmuster des induzierbaren Transkriptionsfaktors c-Fos. Dieser Faktor wurde als v-Fos-Onkogen ursprünglich 1982 in Osteosarcoma-Virallinien entdeckt. Das zelluläre Homolog (c-Fos) wurde in Experimenten zu Wachstumsfaktor-Zell-Interaktionen als nukleäres Phosphoprotein identifiziert, welches schnell und transient als Transkriptionsregulator für unterschiedliche Gene induziert werden kann [130].

7.2.1. Material und Methoden

Die Histochemie-Ursprünge sind eng mit zwei Neuroanatomen verknüpft: Die Silber-Imprägnierung, entwickelt durch den italienischen Neuroanatom Camillo Golgi und extensiv genutzt durch den Spanier Santiago Ramón y Cajal, ermöglichte erstmals die Visualisierung der Nervenzellen für die Lichtmikroskopie [69].

Ende der 60er bzw. Anfang der 70er Jahre wurden die ersten Arbeiten publiziert, wobei Antikörper angewandt wurden zur Visualisierung von spezifischen Enzymen und Zell-Proteinen; seitdem kam es zu einem regelrechten Boom dieser Technik als mächtige Anwendung in der Neurobiologie, mit deren Hilfe viele grundlegende Arbeiten über neurologische Probleme und das Verständnis der Hirnanatomie erst möglich gemacht wurden [61].

In dieser Arbeit wurde die Methode der Immunhistochemie angewandt zur Visualisierung bestimmter Neurotransmitter bzw. deren Synthesenzym (5-HT und TH) und Proteine (induzierbare Transkriptionsfaktoren, ITF; Apoptose-regulatorische Proteine der Bcl-Familie). Dazu wurden Tiere nach Abschluss der Verhaltensbeobachtung der Wirkung einer einmaligen hoch dosierten MDMA-Gabe narkotisiert, perfundiert und deren Gehirne für die immunhistochemische Färbung vorbereitet, geschnitten und immunhistochemisch angefärbt.

7.2.1.1. Tiere

Es wurden männliche Sprague-Dawley-Ratten (Charles-River, Sulzfeld, Deutschland) verwendet mit einem Körpergewicht von 210 – 298 g bei Versuchsbeginn. Sie wurden in Gruppen gehalten unter konstanten klimatischen Bedingungen (Raumtemperatur 23 ± 3 °C; Luftfeuchte 40-60%), in einem 12/12 h Licht-Dunkel-Zyklus (Licht an: 07:00). Sie bekamen täglich 12 g/Tier Standard-Ratten-Futter (Altromin, Lage), Wasser stand „ad libitum“ zur Verfügung.

7.2.1.2. Substanzen

MDMA-HCl (20,0 mg/ml) wurde gelöst in Phosphat-gepuffertter isotonischer Kochsalzlösung nach der Dulbecco-Rezeptur (Dulbecco's PBS, Sigma Deisenhofen, Deutschland = 0,2 g KCl; 0,2 g KH_2PO_4 ; 8,0 g NaCl; 1,15 g Na_2HPO_4 / 1 l H_2O -dest) und subkutan (s.c.) injiziert als 1 ml/kgKG.

2 Teile **Pentobarbital-Natrium** („Narcoren“=16%, Merial GmbH, Hallbergmoos, Deutschland) wurden mit 3 Teilen Aqua ad iniectabilia (Delta Pharma, Pfullingen, Deutschland) verdünnt, sodass sich eine anwendungsfertige Lösung mit einer Konzentration von 64,0 mg/ml ergab.

0,5 ml einer gebrauchsfertigen **Heparin**-Injektionslösung (Vetren 200® = 200 I.E./ml; Byk-Gulden, Konstanz, Deutschland) wurden in einer Insulinspritze aufgezogen (entspricht 50 I.E. / Spritze) und intraperitoneal injiziert.

7.2.1.3. Gewebspräparation und Fixierung

Um die Gehirne der Tiere in möglichst perfekt fixiertem Zustand zu erhalten, wurden sie 3 h, 48 h und 2 wo nach Gabe von 20 mg/kg MDMA oder Vehikel perfundiert (jeweilige n=5). Zu diesem Zweck wurden sie 15 min vor geplante Perfusionsbeginn mit Natriumpentobarbital (64 mg/kg, i.p.; bei akut MDMA-behandelten Tieren wurde die Dosis auf 80% reduziert) narkotisiert, 10 min danach wurde ihnen Heparin (50 I.E. Festdosis, i.p.) injiziert. In tiefer Narkose (~15 min nach Barbiturat-Injektion wurde der Bauchraum auf der Höhe des Sternums chirurgisch geöffnet und das Diaphragma entlang des Brustkorbs durchtrennt. Durch die linke Herzkammer hindurch in die aufsteigende Aorta wurde eine Sondenkanüle eingeführt und fixiert, durch welche erst 50 ml 0,9% NaCl und im Anschluss 250 ml

Fixierlösung (2,5 % PFA, 0,1 % GDA in 0,125 M Phosphatpuffer, pH 7,4) perfundiert wurden. Die herauspräparierten Gehirne wurden in der Fixierlösung für 2 h nachfixiert und über 24 h in 0,125 M Phosphatpuffer, pH 7,4 bei 4°C gespült. Danach wurden sie für weitere 24 h in Saccharoselösung 5 % und weiter bis zum Absinken in Saccharoselösung 30 % (beide Lösungen in 0,125 M Phosphatpuffer, pH 7,4; 4°C) kryogeschützt und anschließend auf gepulvertem Trockeneis schockgefroren und bei -80°C bis auf weiteres gelagert.

7.2.1.4. Gewebsaufbereitung

Die perfusionsfixierten Gehirne wurden in einem Kryostaten (Leica CM 3050, Bensheim, Deutschland) bei -20°C Kammertemperatur in 40 µm dicke Frontalschnitte geschnitten, welche in 0,05 M Tris-gepufferter Saline (TBS), pH 7,6 aufgefangen wurden. Zum Auffangen und Aufbewahren der Schnitte wurden 24-well-Zellkulturgefäßrahmen (Costar®, Corning Inc., Corning, NY, USA) verwendet mit einem Raster von 6 Spalten x 4 Reihen, wobei jede Reihe eine Schnittserie darstellte bei einer Summe von 4 Serien.

Bis zur Färbung wurden die Schnitte unter Zusatz von 0,1 % Natriumazid bei 4°C gelagert. Bei längeren Lagerzeiten wurden die Schnitte in eine Kryoschutz-Lösung (Ethylenglykol (p.a., Merck) / TBS, 1:1) in Eppendorf-Cups überführt und bei -20°C gelagert.

7.2.1.5. Objektträger

Die Objektträger (3 x 1 inch, geputzt/gebrauchsfertig, R. Langenbrink, Emmendingen, Deutschland) wurden zweimal in eine Gelatinelösung 0,7% (1,4 g Gelatine (Merck); 140 mg $\text{KCr}(\text{SO}_4)_2$; eine Spatelspitze Thymol in 200 ml H_2O) getaucht mit zwischenzeitlichem und abschließendem Trocknen bei RT.

7.2.1.6. Nisslfärbung

Für die Nisslfärbung wurden die Schnitte einer Serie unmittelbar aus der TBS-Lösung auf gelatinisierte Objektträger aufgezogen, luftgetrocknet und 24 h lang in n-Propanol/EtOH (1:1) entfettet. Am nächsten Tag wurden sie für jeweils 5 min in absteigender Alkoholreihe (EtOH 100% - 100% - 90% - 70% - 50% - H_2O) rehydriert, für 40 s in die Thioninlösung (4,35 mM Thionin = 3,7-Diamino-5-phenothiaziniumacetat, Sigma Deisenhofen, in 100 mM Essigsäure + 36 mM NaOH) getaucht und unmittelbar darauf 10 min bei fließendem demineralisierten Wasser vom überschüssigen Farbstoff freigespült. Dann folgte eine aufsteigende Alkoholreihe

(je 5 min EtOH 50% - 70% - 90% - 96%), eine Differenzierung der Färbung (variabel 1-4 min EtOH 96% + Eisessig (wenige Spritzer auf 200ml)) und weitere Dehydrierung mit 10 min EtOH 100%; Klärung durch jeweils 15 min α -Terpineol/Xylol (1:1) – Xylol – Xylol, und abschließendem Bad (1h) in Xylol.

Danach wurden die Schnitte direkt aus dem Xylolbad mit Entellan (Merck, Darmstadt, Deutschland) eingedeckelt.

7.2.1.7. Immunhistochemie

Die immunhistochemische Methode dient dem Nachweis und der Identifikation bestimmter antigener Komponenten in Zellen und Gewebeschnitten durch spezifische Antikörper [61;257]. So wurden hier die Neurotransmitter Serotonin (5-HT) und indirekt Dopamin über sein Synthesenzym Tyrosinhydroxylase (TH), sowie der Transkriptionsfaktor c-Fos als antigene Komponenten indirekt angefärbt und für die Lichtmikroskopie sichtbar gemacht.

Für den immunhistochemischen Nachweis der relevanten Neurotransmitter und Proteine wurden die perfusionsfixierten Gehirnschnitte in einer „free-floating“-Methode mittels spezifischer Antikörper gefärbt. Die eigentliche Färbung der Antigen-präsentierenden Substanzen erfolgte mittels der Avidin-Biotin-Methode [61], wobei die Hirnschnitte zuerst für 48 h bei 4°C mit einem Primärantikörper inkubiert wurden, welcher an das jeweilige Antigen spezifisch binden sollte; nach einer Waschphase wurden die Schnitte mit einem Biotin-konjugierten Sekundärantikörper (gegen die Wirtspezies des Primärantikörpers) inkubiert. Nach erneutem Abwaschen des überschüssigen Antikörpers wurde mit einem Meerrettichperoxidase(HRP)-konjugierten Avidin-Biotin-Komplex inkubiert, und anschließend wurde an der HRP eine enzymatische Reaktion durchgeführt, wobei unter Zusatz von Wasserstoffperoxid der chromogene Elektronendonator 3,3'-Diaminobenzidin (DAB) zu einem unlöslichen braunen Farbstoff oxidiert wurde.

Zur Verstärkung der Färbung können verschiedene Schwermetallionen (Os, Co, Cu, Ni) verwendet werden, wobei meist schwarze Niederschläge entstehen. Diese Variation der immunhistochemischen Reaktion wurde verwendet bei Doppelfärbungen, wobei zuerst c-Fos-aktive Zellkerne mit einem Schwermetall-verstärkten DAB-Produkt gefärbt wurden (mit $\text{Ni}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2$, Ammoniumnickelsulfat-Hexahydrat, Fluka Chemie, Buchs, Schweiz) und

anschließend, in einem erneuten Färbedurchgang, der Neurotransmitter der Neurone mit einer einfachen (nicht Ni-verstärkten) Färbereaktion gefärbt wurde.

Um falsch-positive Resultate dieser Nachweismethode zu vermeiden, wurden die Schnitte zu Beginn der Färbeprozedur mit EtOH 50% / H₂O₂ 3% behandelt. Somit wurde die peroxidatische Aktivität des Häm-Moleküls (in Gefäßkapillaren verbliebene Erythrozyten) und die endogene Peroxidaseaktivität wirksam gehemmt.

Die Spezifität der Immunreaktion wurde zudem an Kontrollschnitten nachgewiesen, die ohne den Primär- bzw. Sekundärantikörper inkubiert wurden, bzw. der Primärantikörper mit der korrespondierenden Peptidsequenz (geliefert vom jeweiligen Hersteller) präadsorbiert wurde, wobei jeweils keine Immunreaktion zu sehen war.

Im Detail wurde die Färbemethode wie folgt durchgeführt (nähere Informationen zu den verwendeten Antikörpern und Reagenzien finden sich in Tabelle 7.1.):

Die Schnitte wurden 3x10 min in 0,05 M TBS-Triton, pH 7,6 (TBS-Puffer, enthaltend 0,5% Triton X-100 zur Permeabilisierung der Zellmembranen und Unterdrückung der hydrophoben Wechselwirkungen zwischen Antikörpern und Geweben [257], Triton X-100, Sigma Chemicals, St. Louis, MO, USA) gewaschen, und danach für 20 min in H₂O₂ 3% / EtOH 50% gebadet zur Inaktivierung der endogenen Peroxidase und verstärkten Permeabilisierung der biologischen Membranen. Nach 45 min Inkubation in 12 % normalem Ziegen- (NGS) bzw. Pferdeserum (NHS) in Triton-TBS (entsprechend der Wirtsspezies des Sekundärantikörpers; bezweckend die Absättigung freier reaktiver Gruppen im Gewebe, welche besonders nach Aldehydfixation zur starken unspezifischen Bindung der IgG führen können [257]) wurden die Schnitte ohne nochmaliges Waschen in der jeweiligen Primärantikörperlösung (in 2% NGS bzw. NHS in TBS-Triton) bei 4°C für 48 h inkubiert. Danach wurden sie nacheinander für 45 min bei RT im entsprechenden biotinylierten Sekundärantikörper (Ziege-anti-Kaninchen bzw. Pferd-anti-Maus, jeder in 2% entsprechendem Serum in TBS-Triton) und für 90 min bei RT im Avidin-Biotin-Reagenz (ABC-Kit frisch 30 min vor Gebrauch angesetzt in TBS) inkubiert. Jeder Antikörper-Inkubationsschritt wurde mit einer Waschphase von 3x10 min TBS-Triton, der Avidin-Biotin-Inkubationsschritt mit einer Waschphase von 1x10 min TBS-Triton + 2x10 min TBS beendet.

Tabelle 7.1.: Übersicht über die in immunhistochemischen Methodik verwendeten Antikörper.

Antikörper	Art	Epitop	Hersteller	verw. Verdünnung
Primärantikörper				
rabbit-anti-5HT	polyklonal		Protos Biotech, New York, NY, USA	1:15000 bzw. 1:16000
mouse-anti-TH (LNC1)	monoklonal	Peptidsequenz im mittleren Abschnitt des Proteins	DiaSorin, Stillwater, MN, USA	1:40000
rabbit-anti-cFos (4)	polyklonal IgG	N-terminales Peptid (Aminosäuren 3-16) des humanen c-Fos p62 Protein	Santa Cruz Biotech, Santa Cruz, CA, USA	1 :16000
rabbit-anti-Bcl-2 (N19)	polyklonal IgG	N-terminale Sequenz des humanen Bcl-2 Proteins	Santa Cruz Biotech, Santa Cruz, CA, USA	0,5 µg/ml
rabbit-anti-Bax (B-9)	polyklonal IgG	N-terminales Peptid (Aminosäuren 43-61) des Maus-Bax- Proteins	Santa Cruz Biotech, Santa Cruz, CA, USA	0,5 µg/ml
Sekundärantikörper				
biotinylated goat anti-rabbit	polyklonal IgG (H+L)		Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA	0,5 µg/ml
biotinylated horse anti-mouse	polyklonal IgG (H+L)		Vector Laboratories	1:1000
Sera und weitere Reagenzien				
normal goat serum			Vector Laboratories	-
normal horse serum			Vector Laboratories	-
Vectastain Elite ABC Kit	Avidin-Biotin-HRP-Reagenz		Vector Laboratories	1:500
3,3'-Diaminobenzidin (DAB)	als gebrauchsfertige Tabletten (10mg/Tbl) bzw. selbsthergestellte aliquotierte Stammlösung aus DAB.4HCl in H ₂ O 40mg/1,5ml		Sigma Chemicals, St. Louis, MO, USA	
H ₂ O ₂ 0,3%	frisch hergestellt aus H ₂ O ₂ 30% PhEur (medizinisch, reinst)		Merck, Darmstadt, Deutschland	45 µl/1,5ml

In der eigentlichen Färbereaktion folgte anschließend erst eine Vorinkubation in DAB (15 min RT in 0,25 mg/ml in TBS bzw. 0,10 mg/ml TBS-Ni), nach Zusatz von 45µl/1,5 ml DAB-Lösung H₂O₂ 0,3% wurde die enzymatische Reaktion gestartet und die immunhistochemische Färbung sichtbar gemacht. Die Schnitte wurden auf gelatinisierte Objektträger aufgezogen, luftgetrocknet, in einer aufsteigenden Alkoholreihe dehydriert, in Xylol geklärt und eingedeckelt mit Entellan®.

7.2.1.8. Mikroskopische Auswertung

Die qualitative und quantitative Auswertung wurde an einem Zeiss Axiophot I Mikroskop (Carl Zeiss, Jena, Deutschland) sowie einem Leica Mikroskop (Leica, Bensheim, Deutschland) mit einer angeschlossenen Bildauswertung (Quantimet Q600, Leica, Bensheim, Deutschland) durchgeführt.

Mit Hilfe der Nissl-Färbung konnten einzelne Hirnareale innerhalb der relevanten Hirnschnitte genau definiert und an korrespondierenden, immunhistochemisch gefärbten Schnitten genau zugeordnet werden.

Eine qualitative Beschreibung erfolgte für die Expression der apoptotischen Proteine und die Einfach-Färbungen der serotonergen Neurone.

Zur halbquantitativen Auswertung der immunhistochemisch angefärbten Hirnschnitte wurden jeweils die Hirnschnitte MDMA-behandelter Tiere mit denen der Kontrolltiere verglichen. Eine leichte bis starke Zunahme der Expression (c-Fos) wurde mit +1 bis +3 notiert, eine Abnahme mit entsprechenden negativen Werten.

Die vollquantitative Auswertung der c-Fos-Expression wurde zweidimensional (da relativ dünne, nicht benachbarte Schnitte verwendet wurden), mittels stereologischer Methoden nach Gundersen et al. [113] durchgeführt. Es wurden repräsentative Ausschnitte der Gehirnareale ausgezählt: Zwei Segmente, jeweils innerhalb des medialen und des lateralen CPu, NAcc-shell und NAcc-core (jeweils der gesamte Hirnkern); repräsentative Segmente innerhalb des medialen, zentralen und basolateralen Nucleus der Amygdala, der gesamte mediale PFC (PrL und IL), der gesamte paraventriculäre Nucleus des Thalamus (PVN), die gesamte laterale Habenula (LHb) und der Gyrus dentatus des Hippocampus. Mit Hilfe der PC-unterstützten

Video-Bildauswertung konnten die Areal-Grenzen exakt definiert werden, wie auch eventuelle Fehl-Flächen (Löcher im Gewebe) exakt subtrahiert werden konnten.

Die Ergebnisse wurden als Quotient $Q = \frac{n_{IR-Kerne}}{A_{Segment}}$ [mm^{-2}] angegeben (mit $n_{IR-Kerne}$ als

Anzahl der immunreaktiven Zellkerne pro Segment und $A_{Segment}$ als Fläche des Segments). Das Mittel der einzelnen Quotienten pro Hirngebiet und Tier ergab die relative Expressionsdichte der c-Fos-Kerne .

7.2.2. Ergebnisse

Die immunhistochemische Färbung der Hirnschnitte durch den DRN mit Antikörpern gegen 5-HT ergab folgendes Ergebnis: 48 h nach einer einmaligen MDMA-Behandlung mit 20 mg/kg war im gesamten DRN eine stark erniedrigte Immunreaktivität (IR) zu sehen (Abb. 7.1.). Zwei Wochen nach der MDMA-Gabe war die 5-HT-IR jedoch gleich derjenigen der Kontrolltiere. Außerdem war zwei Wochen nach MDMA-Gabe im PFC eine verringerte Dichte an serotonerg angefärbten Axonterminalen verglichen mit den Kontrolltieren zu beobachten.

Die Ergebnisse der Expression der Apoptose-Proteine waren nicht konsistent. Einzig innerhalb der Fasertrakte des Corpus callosum (cc) und Cingulum (cg) sowie innerhalb des dorsalen Striatums (dorsaler, an cc angrenzender Teil) waren akut (3h) nach MDMA-Gabe Glia-ähnliche (Astrozyten) Strukturen zu sehen, welche eine Bax-positive Immunreaktivität zeigten (Abb. 7.2.). Bcl-2-Immunreaktivität war zu diesem Zeitpunkt ebenfalls hochreguliert, eine genaue Zuordnung zu neuronalen Strukturen war jedoch nicht möglich: Es schienen sowohl Zellkörper als auch dünne Axonsegmente mit Bcl-Antikörpern angefärbt zu sein (Abb. 7.3.). In den anderen Geweben war die Qualität der Färbungen für eine Auswertung nicht zufriedenstellend.

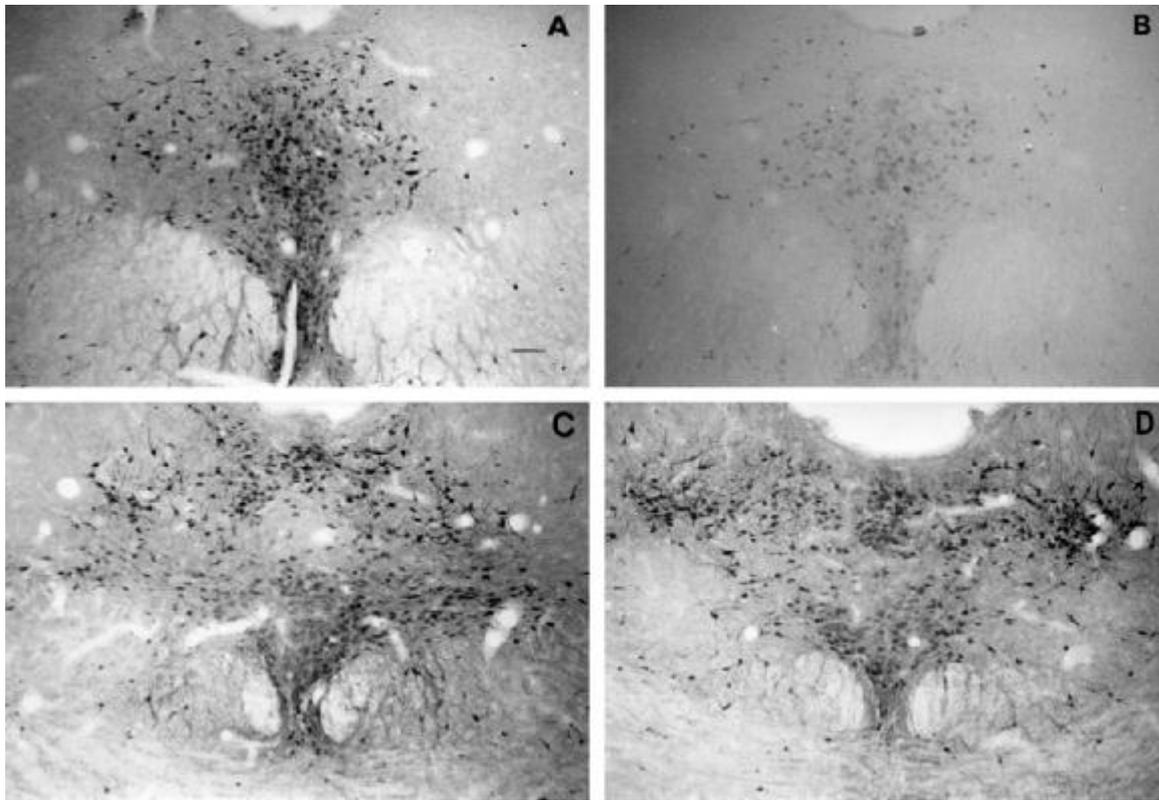


Abb. 7.1.: Mikrophotographien frontaler Schnitte durch den DRN immunhistochemisch für 5-HT gefärbt. Bild A, C: Vehikel-behandelte Tiere; B, D: MDMA(20mg/kg)-behandelte Tiere; 48 h (A,B) bzw. 16 d (C,D) nach der Injektion.
Bregma (AP) = - 8,0 mm; Balkenlänge = 0,1 mm

Akut nach MDMA-Gabe konnte qualitativ und halbquantitativ ebenfalls eine Aufregulation des c-Fos-Proteins festgestellt werden: 3h nach MDMA-Injektion war die Expression von c-Fos stark erhöht im PFC, pe-Cx (parietaler = motorischer und sensorischer Cortex), CPu, NAcc, Hip, Amy (vor allem CeA) und im DRN (v.a. in lateralen Subarealen des DRN).

Im Striatum konnte bei differenzierter Betrachtung starke Färbung von c-Fos-positiven Zellkernen in medialen und ventralen Abschnitten des CPu (Übergangsgebiete zum NAcc), neben einer diffusen Verstärkung der Hintergrundfärbung in dorsalen Teilen (angrenzend an das cc), beobachtet werden.

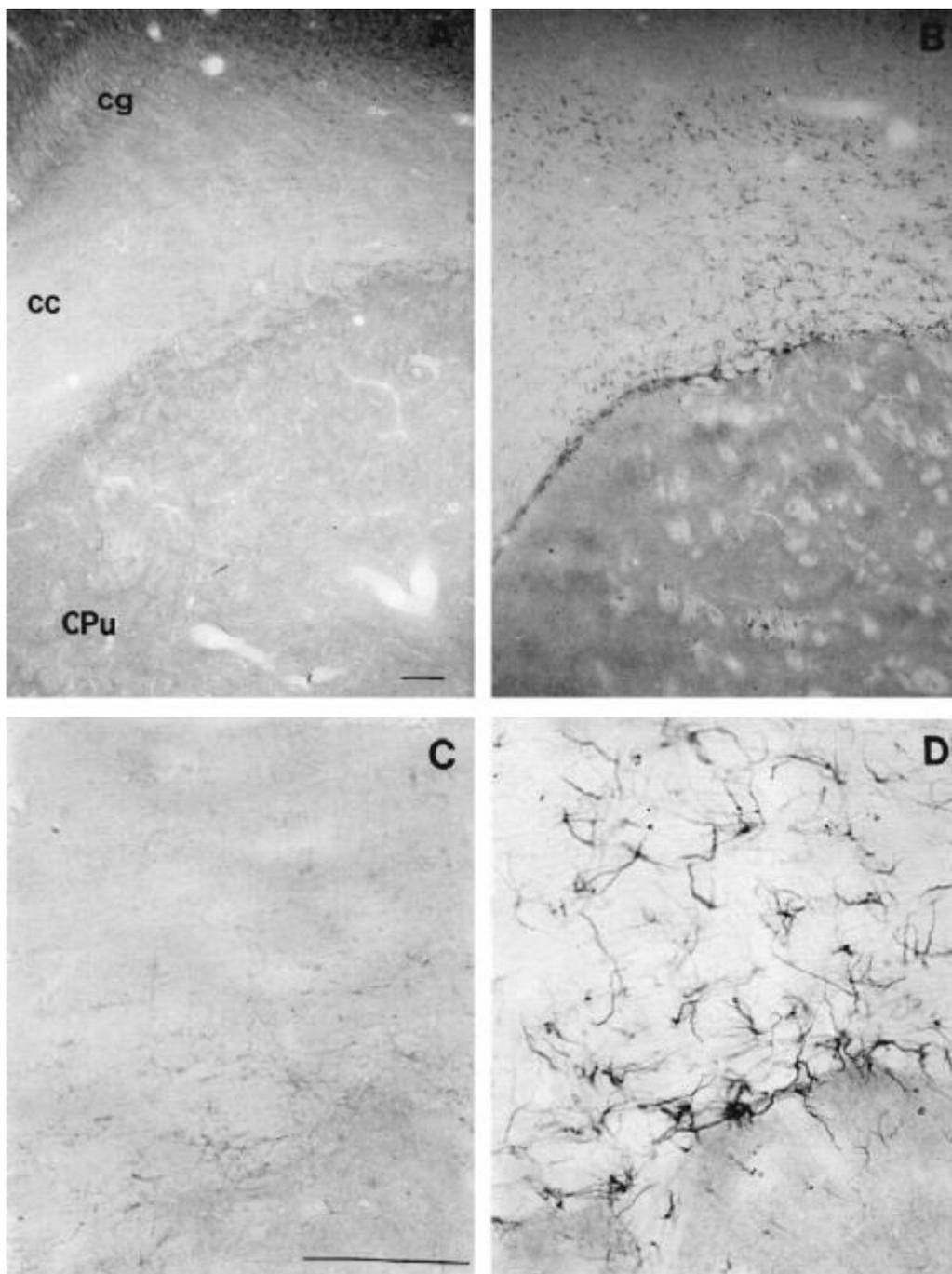


Abb. 7.2.: Mikrophotographien frontaler Schnitte durch das anteriore Striatum (CPu), corpus callosum (cc) und cingulum (cg), immunhistochemisch gefärbt für Bax.

Bild A,C: Vehikel-behandeltes Tier; Bild B,D: MDMA(20mg/kg)-behandeltes Tier; 3 h nach der Injektion. Bregma (AP) = + 1,0 mm; Balkenlänge = 1,0 mm (niedrige Vergrößerung; A,B) bzw. 0,1 mm (hohe Vergrößerung; C,D)

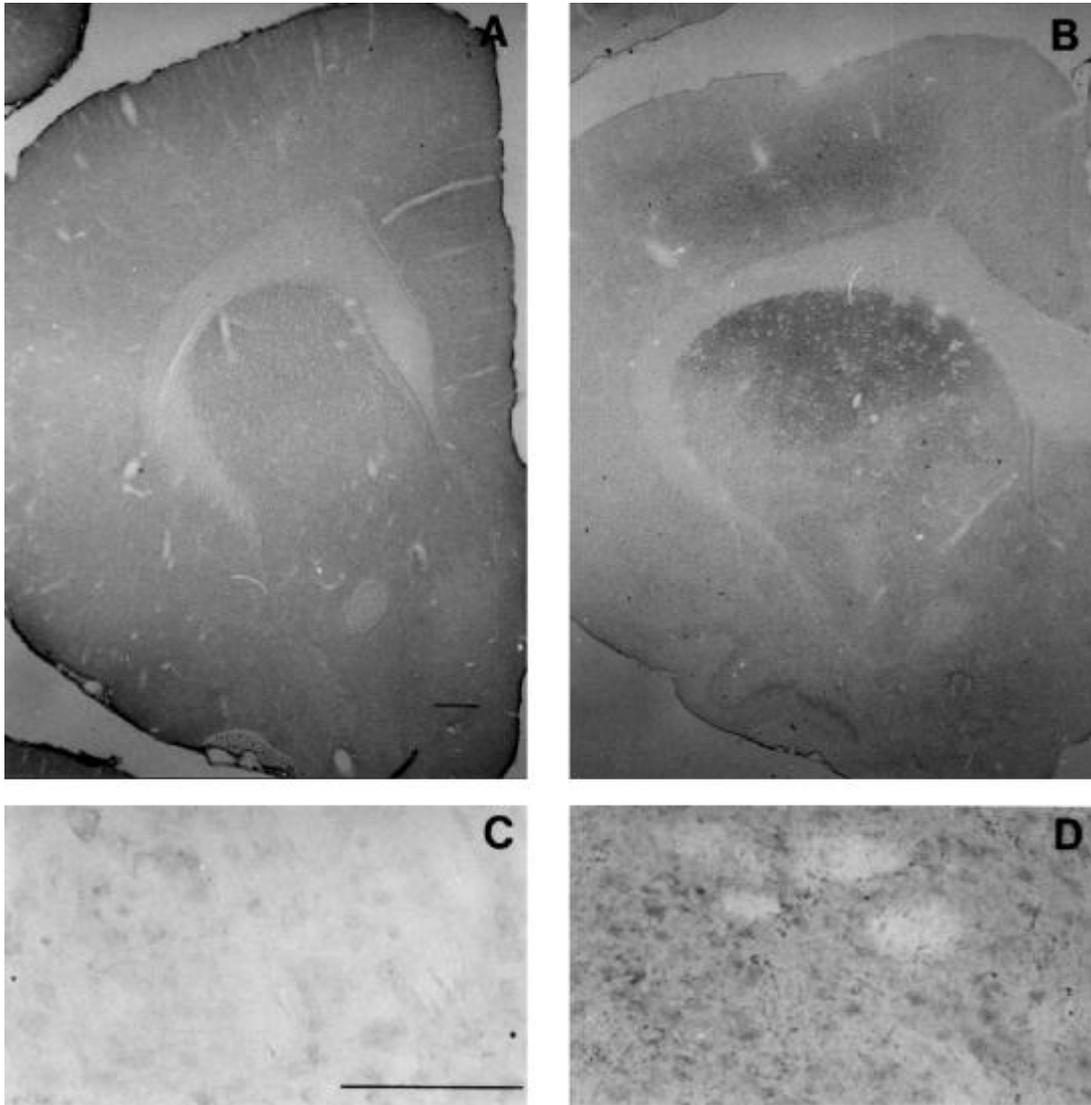


Abb. 7.3.: Mikrophotographien frontaler Schnitte durch das anteriore Striatum, immunhistochemisch gefärbt für Bcl-2. Bild A,C: Vehikel-behandeltes Tier; Bild B,D: MDMA(20mg/kg)-behandeltes Tier; 3 h nach der Injektion. Bregma (AP) = + 1,6 mm; Balkenlänge = 1,0 mm (niedrige Vergrößerung; A,B) bzw. 0,1 mm (hohe Vergrößerung; C,D)

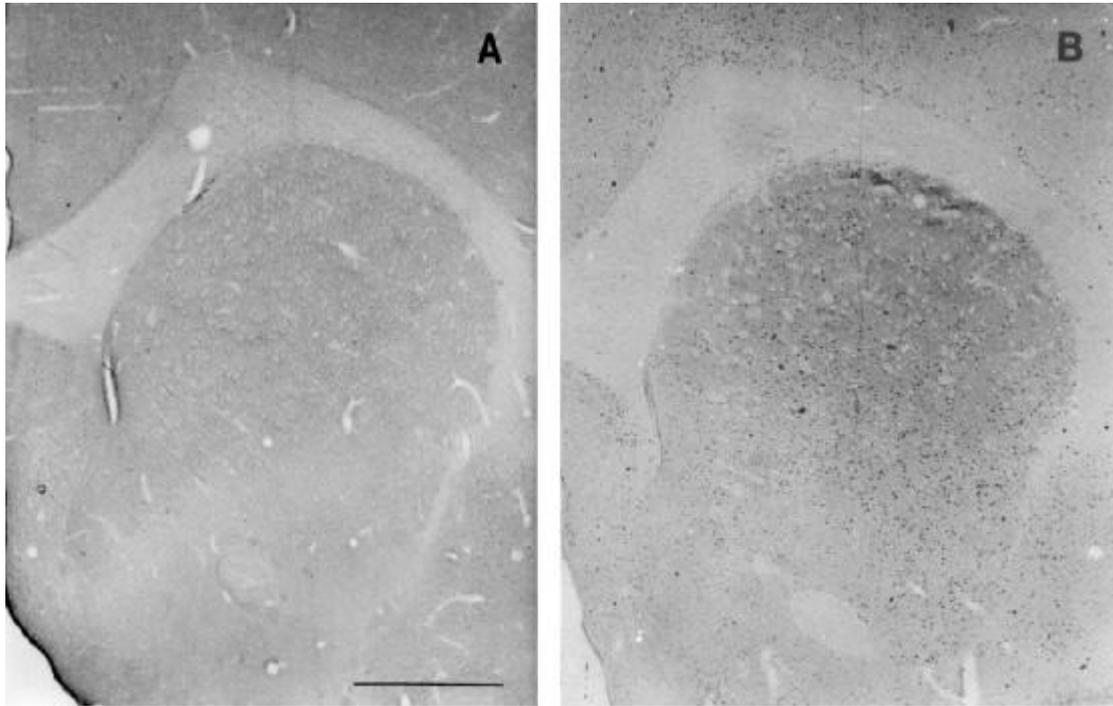


Abb. 7.4.: Mikrophotographien frontaler Schnitte durch das anteriore Striatum, immunhistochemisch gefärbt für c-Fos. Bild A: Vehikel-behandeltes Tier; Bild B: MDMA(20mg/kg)-behandeltes Tier; 3 h nach der Injektion.

Bregma (AP) = + 1,2 mm; Balkenlänge = 1,0 mm

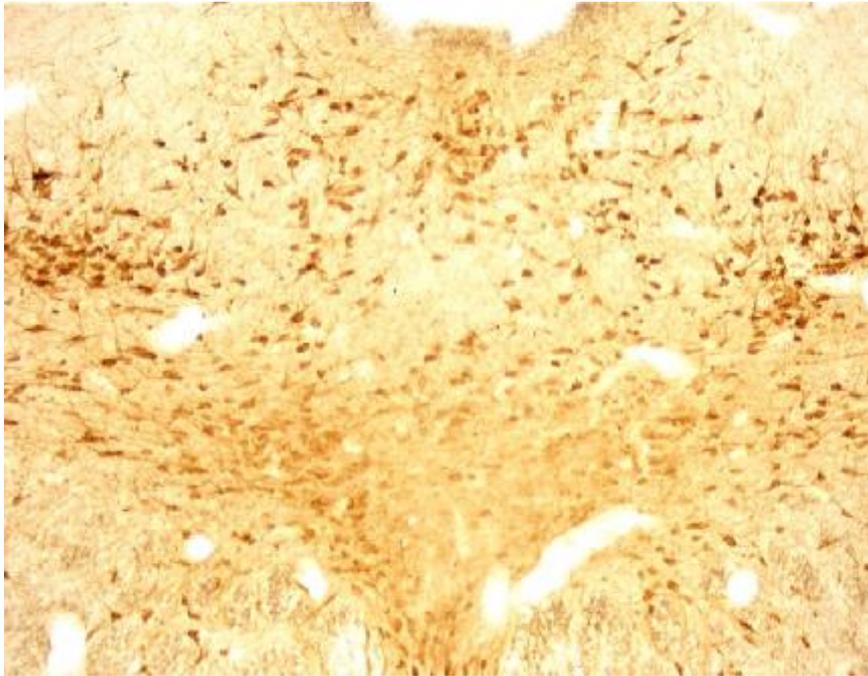
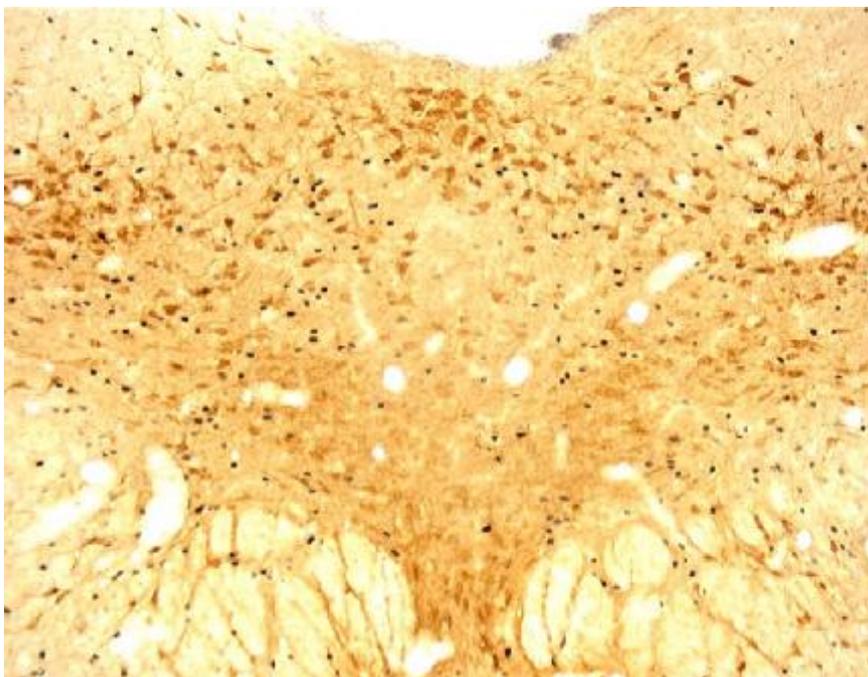
A**B**

Abb. 7.5.: Akutexpression des c-Fos-Proteins in einem Koronarschnitt durch den DRN 3 h nach Behandlung mit Vehikel (A) oder 20 mg/kg MDMA-HCl (B). Die dargestellten Hirnschnitte wurden doppelgefärbt mit Antikörpern gegen Serotonin (braun) und gegen c-Fos (schwarz). Bregma = - 8,0 mm.

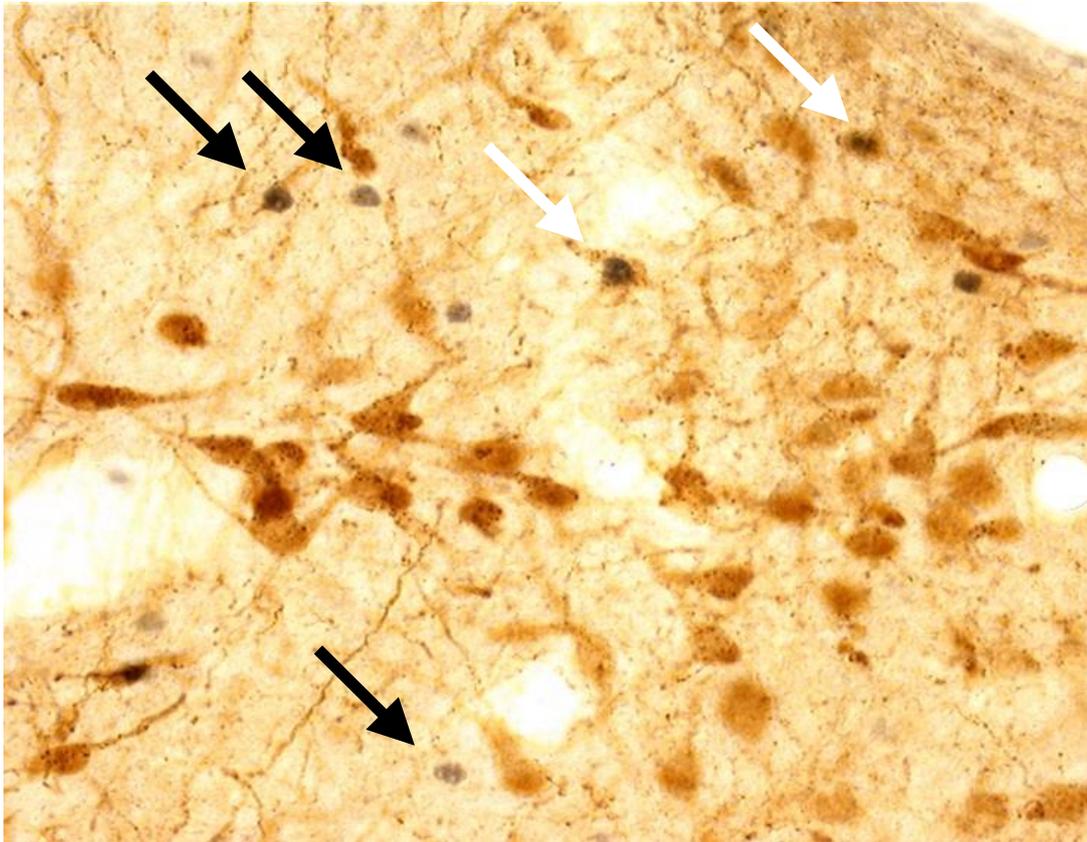


Abb. 7.6.: Vergrößerte Darstellung des doppelgefärbten Raphe-Präparats: serotonerge Neurone (braun), c-Fos-positive Zellkerne (schwarz). Zu beachten: serotonin-negative & c-Fos-positive Zellkerne (schwarze Pfeile); serotonin-positive & c-Fos-positive Zellkerne (weiße Pfeile).

Die vollquantitative Auszählung der c-Fos-immunreaktiven Zellkerne im Vorderhirn MDMA-vorbehandelter Tiere (vgl. Abb. 7.7.) ergab folgende Ergebnisse: In der basolateralen Amygdala und im gesamten Striatum war die c-Fos-Expression 14 Tage nach Behandlung mit einer einmaligen MDMA-Gabe leicht, jedoch statistisch signifikant erniedrigt ($t_{BLA}=3,08$; $t_{amCPu}=4,43$; $t_{alCPu}=5,00$; $t_{pmCPu}=3,59$; $t_{plCPu}=2,50$; $t_{NAcc-co}=2,43$; $t_{NAcc-sh}=3,43$; $n=8/Gruppe$). Der paraventriculäre Thalamuskern (PVN) behielt seine hohe Fos-Expressionsdichte bei, in der benachbarten lateralen Habenula jedoch war die c-Fos-Expression tendenziell erniedrigt. Im Gyrus dentatus der hippocampalen Formation (DG) war die c-Fos-Immunreaktivität stark erhöht ($t=4,78$; $n=8/Gruppe$). Im Ursprungsgebiet der serotonergen Neurone, dem DRN selbst, war die Gesamt-Expression von c-Fos leicht erniedrigt, statistisch signifikant war diese Erniedrigung jedoch nur im ventromedialen Subareal des DRN ($t=2,88$; $n=4/Gruppe$).

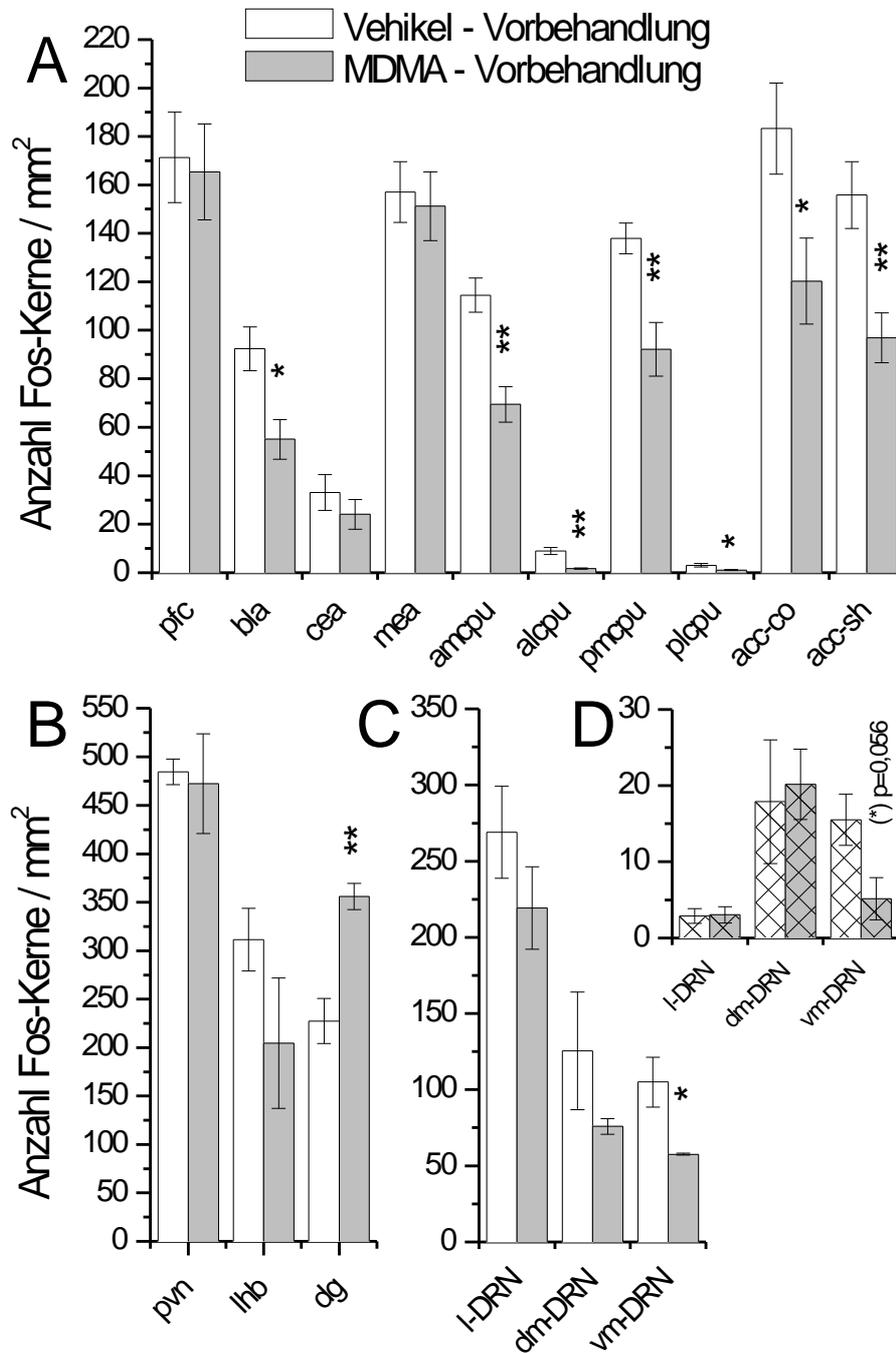


Abb. 7.7.: Expression des induzierbaren Transkriptionsfaktors c-Fos in verschiedenen Gebieten des Gehirns 14 Tage nach Behandlung mit 20 mg/kg MDMA-HCl. **A:** Präfrontaler Cortex (pfc), Amygdala (bla, cea, mea), dorsales anteriores (alcpu, amcpu) und posteriores (plcpu, pmcpu) Striatum, NAcc-core und -shell (acc-co, acc-sh); **B:** Paraventriculärer Thalamus (pvn), laterale Habenula (lhb), Gyrus dentatus (dg); **C:** Dorsaler Raphe-Nucleus, lateraler, dorsomedialer und ventromedialer Teil (l-, dm-, vm-DRN), Gesamt-Fos-Expression und **D:** c-Fos/5-5-HT-überlappende Färbung, d.h. c-Fos-aktive Serotonin-Neurone.

Statistik: t-Test Vehikel- vs. MDMA-Vorbehandlung: *p<0,05; **p<0,01

7.3. Neurochemisch-analytische Untersuchungen

Mit Hilfe der HPLC wurden die Konzentrationen der biogenen Amine 5-HT, DA und NA und deren Metaboliten aus Gehirn-Homogenaten bestimmt. Diese Methode ist in der Abteilung Neuropharmakologie bereits lange etabliert: Sie wurde auf der Grundlage von neurochemischen Untersuchungen der ZNS-Monoamine durch Kilpatrick et al. [147] durch Michael Bubser ausführlich beschrieben und validiert [45]. Als Analyse-Material wurden Gehirne von bereits in Verhaltensversuchen getesteten Ratten verwendet mit dem Ziel, die Neurotransmittergehalte in verschiedenen relevanten Hirn-Arealen mit den Veränderungen im Verhalten zu korrelieren. Im Detail wurden Tiere aus den Versuchen zur Verhaltenssensitivierung (Versuchsteil I und II; siehe Punkt 6.2.) sowie zur Platzkonditionierung (Versuch I; siehe Punkt 6.3.) nach Versuchsabschluss dekapitiert, deren Gehirne herauspräpariert und für die neurochemische Analytik vorbereitet.

7.3.1. Material und Methoden

7.3.1.1. Tiere

Es wurden männliche Sprague-Dawley-Ratten (Charles-River, Sulzfeld, Deutschland) verwendet mit einem Körpergewicht bei Versuchsbeginn von 210 – 260 g beim Versuchsteil „Sensitivierung I“ bzw. 210 – 320 g beim Versuchsteil „Sensitivierung II“ bzw. 210 – 240 g beim Versuchsteil „Platzkonditionierung I“.

Sie wurden in Gruppen gehalten unter konstanten klimatischen Bedingungen (Raumtemperatur 23 ± 3 °C; Luftfeuchte 40-60%), in einem 12/12 h Licht-Dunkel-Zyklus (Licht an: 07:00). Sie bekamen täglich 12 g/Tier Standard-Ratten-Futter (Altromin, Lage bzw. Ssniff, Soest, Deutschland), Wasser stand „ad libitum“ zur Verfügung.

7.3.1.2. Substanzen

MDMA-HCl (20,0 bzw. 6,0 mg/ml) wurde gelöst in Phosphat-gepufferter isotonischer Kochsalzlösung nach der Dulbecco-Rezeptur (Dulbecco's PBS, Sigma Deisenhofen, Deutschland = 0,2 g KCl; 0,2 g KH₂PO₄; 8,0 g NaCl; 1,15 g Na₂HPO₄ / 1 l H₂O-dest) und subkutan (s.c.) injiziert als 1 ml/kgKG.

DSP-4-HCl (50 mg/ml; Astra Zeneca, Södertälje, Schweden) wurde im Versuchsteil „Sensitivierung II“ eingesetzt: Es wurde individuell gelöst in isotonischer Kochsalzlösung und innerhalb 1 min nach Lösen i.p. injiziert als 1 ml/kgKG.

7.3.1.3. Gewebspräparation

Die Tiere wurden im naiven Zustand dekapitiert und die Gehirne zügig herauspräpariert. Nach der Präparation und anschließender Kühlung (1 min in eiskalter 0,9%iger Kochsalzlösung) wurden die Gehirne in einem eiskalten Aluminiumblock nach der Methode von Heffner et al. [121] geschnitten: Die Gehirne wurden dazu caudal nach oben in eine Mulde (b=12,0 mm, t=11,0 mm entlang des Blocks) gelegt; mit Hilfe von Mikrotomklingen, welche in Abständen zu 1,5 mm (und 2,0 mm) im Block rechtwinklig zur Ausrichtung des Gehirns geführt wurden, in Frontalschnitte seziiert.

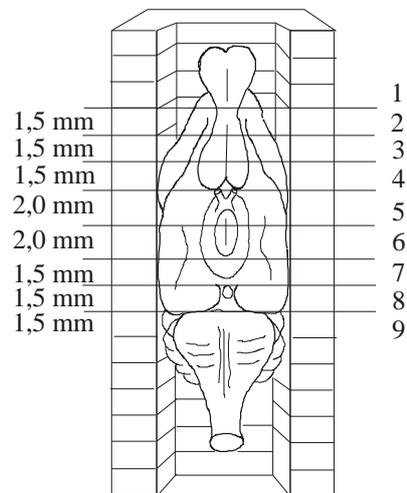


Abb. 7.8.: Schematische Darstellung der Sektion der Gehirne für die neurochemische Analytik (adaptiert aus Heffner et al. [121]).

Zur detaillierten Präparation der relevanten Gehirnareale wurden die gewonnenen Schnitte auf eine eisgekühlte Aluminiumplatte gelegt und mit Hilfe von Mikroskalpellen (Feather, vertrieben durch Medizin AG, Köln, Fig.11) wurden der PFC (=PrL+IL, Schnitt Nr. 2), NAC und a-CPu (Schnitt Nr. 3), pm- und pl-CPu (Schnitt Nr. 4) und DRN (Schnitt Nr. 9) herausgeschnitten (Abb. 7.8. & 7.9.), gewogen und bis zur Analyse in flüssigem Stickstoff (bzw. bei -80°C) aufbewahrt.

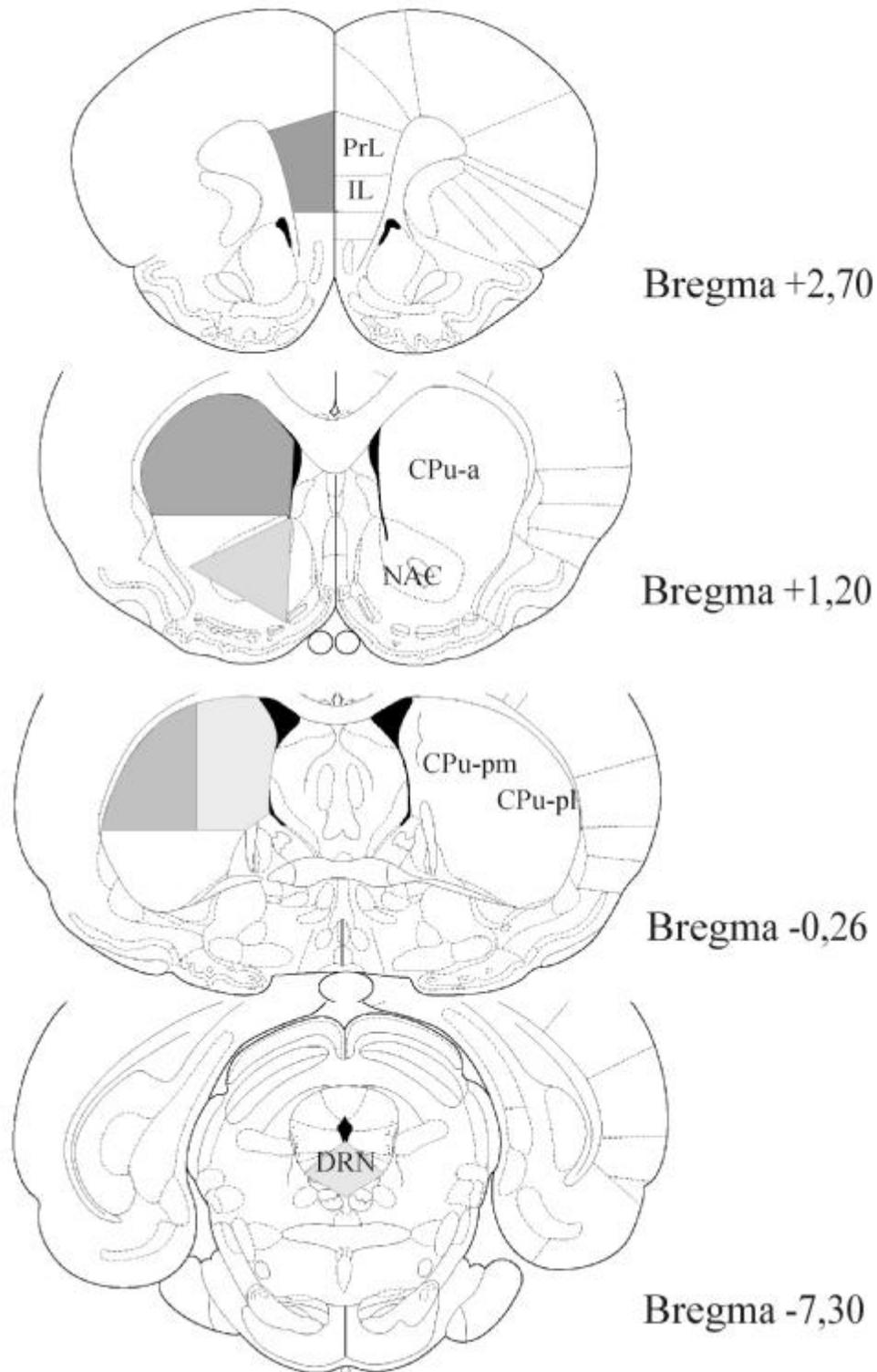


Abb. 7.9.: Schematische Darstellung der präparativ gewonnenen Frontalschnitte (Bregma = AP(anterior-posterior)-Position [mm] nach Paxinos & Watson, [220]) und der Präparationsmethode der einzelnen Gehirnareale. PrL, prälimbisches Areal des medialen präfrontalen Cortex; IL, infralimbisches Areal des medialen präfrontalen Cortex; NAC, Nucleus accumbens; CPu-a, anteriores Striatum; CPu-pm, posteriomediales Striatum; CPu-pl, posterolaterales Striatum; DRN, dorsaler Raphe-Nucleus.

7.3.1.4. Probenaufbereitung

Die gefrorenen Gewebeproben wurden in 500 µl eiskaltem Eluent (mobile Phase der HPLC: 6,983 g Natriumacetat; 7,355 g Zitronensäure; 48 mg Dinatrium-EDTA; 105 mg Natriumoctansulfonat; 7,0% [V/V] Methanol in 1000 ml H₂O, mittels Ultraschall 30 min entgast), welcher den internen Standard 3,4-Dihydroxybenzylamin (DHBA, Sigma Deisenhofen, Deutschland) enthielt, homogenisiert und mit Hilfe einer hochoberflächigen Tischzentrifuge 30 s bei 12500 g zentrifugiert. Der Überstand wurde filtriert (Teflon Spritzenfilter, 0,2 µm, Schleicher & Schuell, Dassel, Deutschland) und in den gekühlten (4°C) Probenhalter des HPLC-Autosamplers (CMA200, CMA Microdialysis, Schweden) zur Analyse bereitgestellt [147].

7.3.1.5. HPLC-ECD-Analyse

Die HPLC-Apparatur (Abb. 7.10.) arbeitete im Rückfluss der mobilen Phase, welche vor Eintreten in den Probenaufgeber des Autosamplers (CMA200, s.o.) an einer Guardzelle regeneriert wurde (ESA 5020; Oxidation der Verunreinigungen an einem Potential von $U = +450$ mV). Die Flussrate der isokratischen HPLC-Pumpe (ESA 2200, Bischoff, Leonberg, Deutschland) betrug 0,8 ml/min. Die durch den Autosampler injizierten Proben (19,5 µl/Probe) wurden an einer „reversed phase“-Säule (60x3,1 mm ProntoSIL 120-3-C18-AQ = 3,0µm Partikel- und 120Å Porengröße bzw. 33x4,0 mm ProntoSIL 120-3-C18-AQ) aufgetrennt und an einer 2-Kanal-Analysenzelle (ESA 5011, Bischoff) coulometrisch detektiert (ESA Coulochem, Bischoff). An der Analysenzelle lagen zwei Potentiale an ($U_1 = +20$ mV; $U_2 = +320$ mV): U_1 diente zur Oxidation löslicher Begleitstoffe und Verunreinigungen der Gewebeprobe, U_2 diente der Oxidation der biogenen Amine.

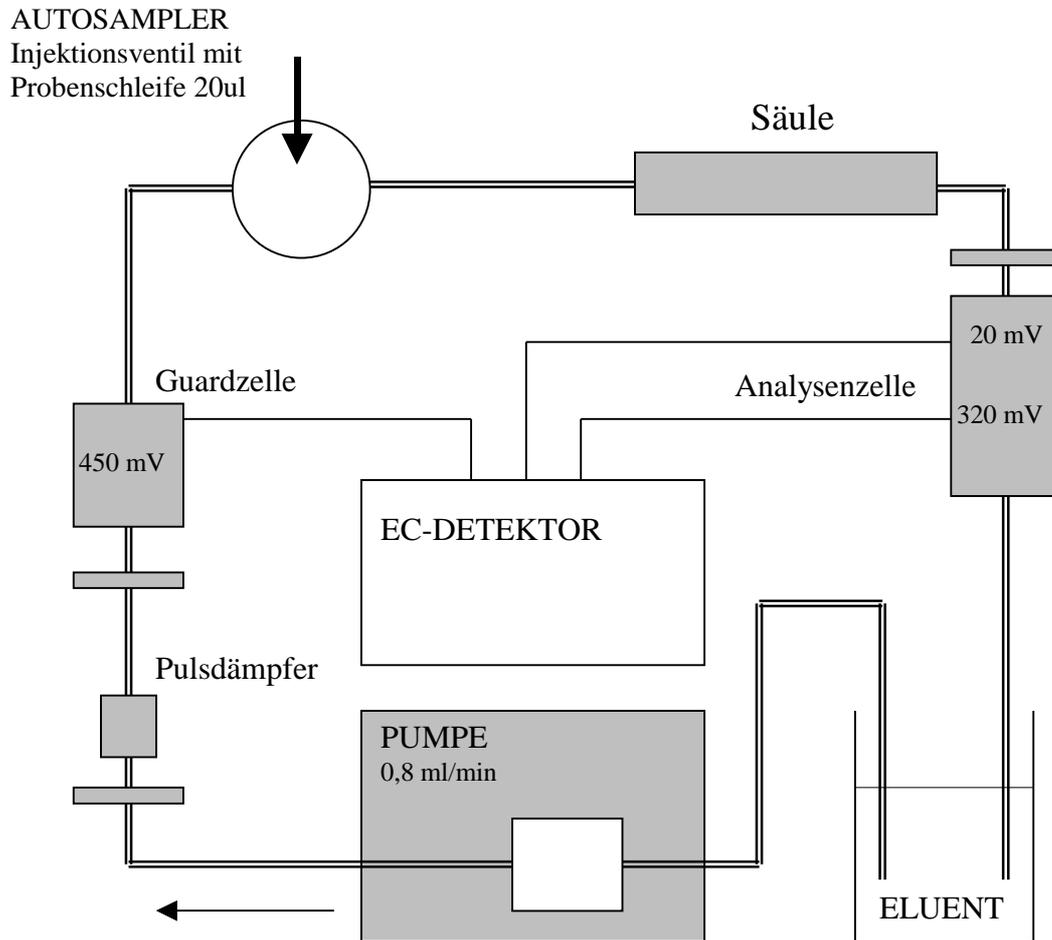


Abb. 7.10.: Aufbau der HPLC-ECD-Anlage zur Analytik der biogenen Amine. Für Erläuterungen siehe Text.

7.3.1.6. HPLC-Datenauswertung

Die Chromatogramme wurden mit Hilfe eines Chromatographie-Auswertungssystems (Axxiom 727, Sykam, Gilching, Deutschland) ausgewertet. Mittels der Retentionszeiten von Referenzsubstanzen wurden die erhaltenen Peaks den Neurotransmittern Noradrenalin (NA), Dopamin (DA) und Serotonin (5-Hydroxytryptamin, 5-HT), sowie deren Metaboliten 3,4-Dihydroxyphenylelessigsäure (DOPAC), Homovanillinsäure (HVA) und 5-Hydroxyindolessigsäure (5-HIAA) zugeordnet. Zur Berechnung des Gehaltes der Neurotransmitter in den jeweiligen Proben wurde die Interne-Standard-Methode mit 3,4-Dihydroxybenzylamin (DHBA) als interner Standard durch Integration der Peakflächen

hinzugezogen. Die Transmittergehalte wurden als Substanzmenge pro Masse Frischgewebe [pg/mg Frischgewicht] angegeben.

7.3.2. Ergebnisse

7.3.2.1. Langzeiteffekte einer einmaligen Administration von MDMA (mit anschließender niedrig dosierter MDMA-Behandlung zur Platzkonditionierung)

Bei den MDMA-hoch dosiert-vorbehandelten Tieren waren tendenziell erniedrigte 5-HT-Konzentrationen im präfrontalen Cortex und signifikant erniedrigte 5-HT-Konzentrationen im anterioren Striatum zu beobachten. Die 5-HIAA-Konzentrationen waren im präfrontalen Cortex und posteromedialen Striatum tendenziell leicht erhöht (Abb. 7.11.; Statistik: Anhang, Tab. 9.5.). Der Quotient 5-HIAA/5-HT war im anterioren Striatum ebenfalls erhöht (Tab. 7.2.).

Änderungen in den Katecholaminkonzentrationen traten lediglich bei DA und dessen Metaboliten auf: DA war demnach erhöht im Nucleus Accumbens und im anterioren Striatum, DOPAC und HVA waren hochsignifikant erhöht im anterioren Striatum (Abb. 7.12.; Tab. 9.6.). Die Quotienten DOPAC/DA und HVA/DA (~Turnover-Werte = Umsatz an Transmitter) waren annähernd gleich in allen observierten Hirnarealen (Tab. 7.2.).

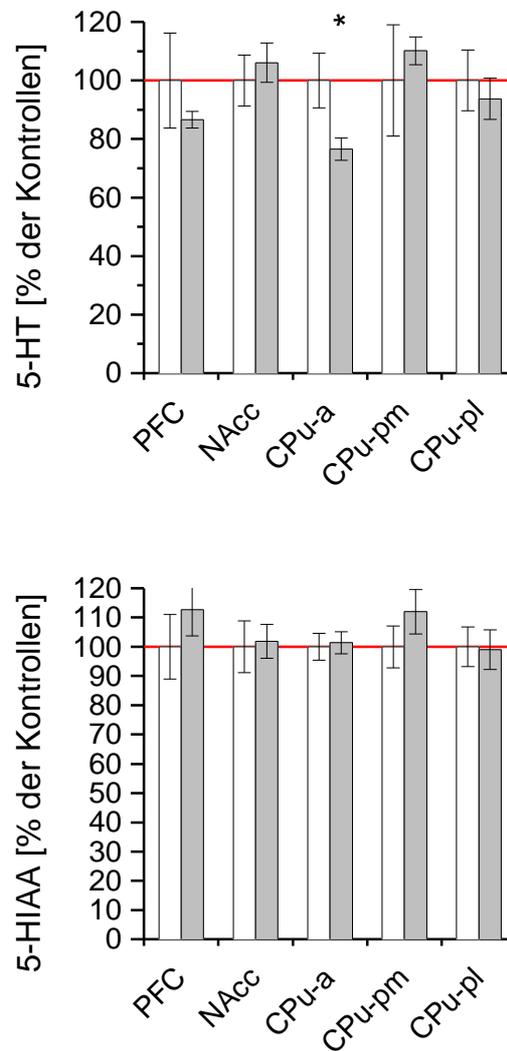


Abb. 7.11.: Veränderungen der Konzentrationen der Indolamine 5-HT und dessen Metaboliten 5-HIAA in Gehirnhomogenaten von einmalig hoch dosiert-MDMA-behandelten Tieren. Die MDMA-Behandlung erfolgte subcutan in der Konzentration 20 mg/kg.d. Am Tag 33, 35, 38, 40, 43 erhielten alle Tiere je eine Niedrigdosis MDMA (5 mg/kg). Das Gehirngewebe und relevante Gehirnareale wurden 14 Tage nach der letzten MDMA-Injektion präpariert. Weiße Balken: Kontrolltiere; graue Balken: MDMA-vorbehandelte Tiere.

Statistik für jedes Gehirnareal: Student's t-Test: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ verglichen mit Kontrolltieren.

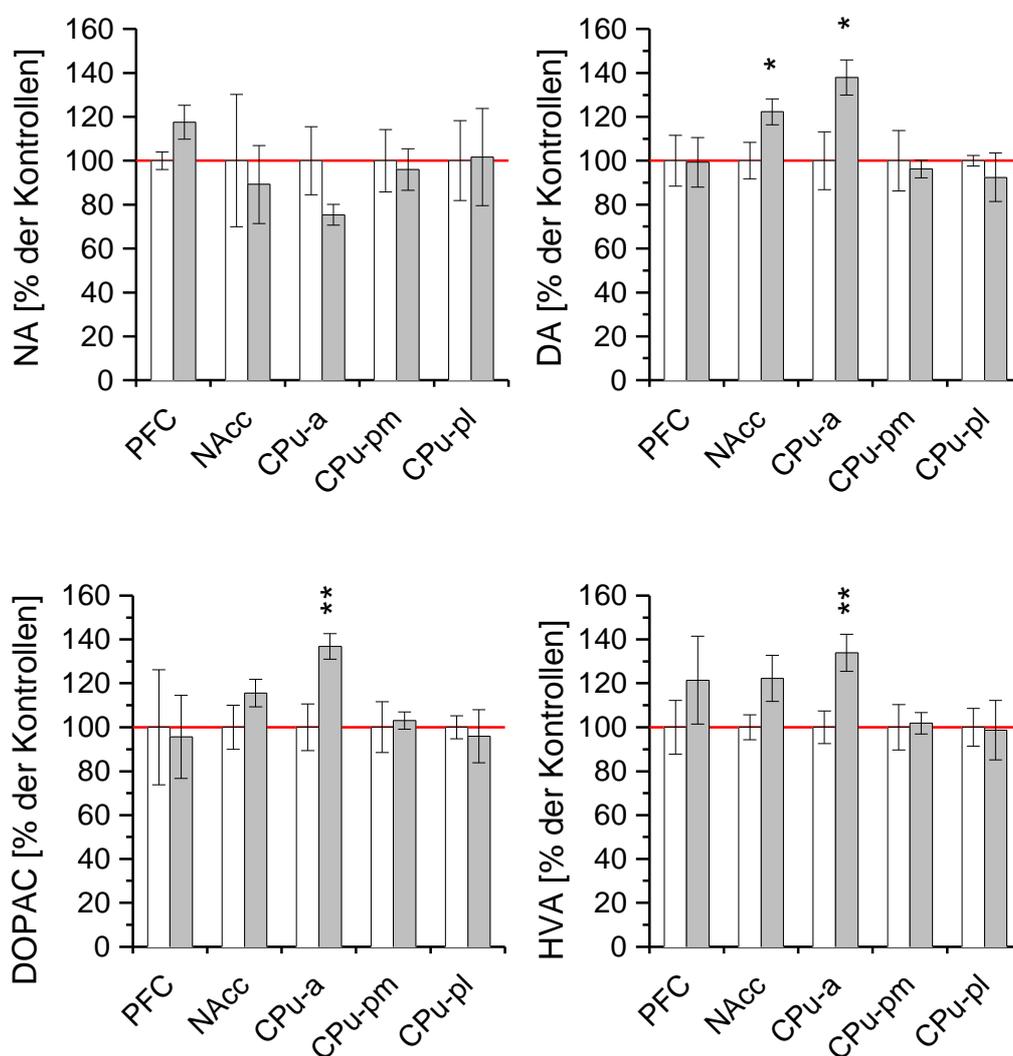


Abb. 7.12.: Veränderungen der Konzentrationen der Katecholamine NA, DA und dessen Metaboliten DOPAC und HVA in Gehirnhomogenaten von einmalig hoch dosiert-MDMA-behandelnten Tieren. Die MDMA-Behandlung erfolgte subcutan in der Konzentration 20 mg/kg.d. Am Tag 33, 35, 38, 40, 43 erhielten alle Tiere je eine Niedrigdosis MDMA (5 mg/kg). Das Gehirngewebe und relevante Gehirnareale wurden 14 Tage nach der letzten MDMA-Injektion präpariert. Weiße Balken: Kontrolltiere; graue Balken: MDMA-vorbehandelte Tiere. Statistik für jedes Gehirnareal: Student's t-Test: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ verglichen mit Kontrolltieren.

Tabelle 7.2.: Neurochemie-Analytik einmalig MDMA-vorbehandelter Tiere: **Turnover**-Daten von Dopamin und Serotonin. Statistik: Student's t-Test: *p<0,05; **p<0,01: Vergleich MDMA-Vorbehandlung mit Kontrolltieren.

Hirnareal	Kontrolltiere	MDMA vorbehandelt	t =	p =
DOPAC/DA				
PFC	0,198 ± 0,076	0,139 ± 0,016	0,77 (df=14)	p>0,05
NACC	0,155 ± 0,007	0,147 ± 0,005	0,91 (df=14)	p>0,05
CPu-a	0,105 ± 0,009	0,100 ± 0,004	0,56 (df=14)	p>0,05
CPu-pm	0,140 ± 0,006	0,146 ± 0,006	1,04 (df=12)	p>0,05
CPu-pl	0,123 ± 0,008	0,129 ± 0,005	0,60 (df=14)	p>0,05
HVA/DA				
PFC	0,585 ± 0,124	0,614 ± 0,052	0,21 (df=14)	p>0,05
NACC	0,055 ± 0,003	0,053 ± 0,003	0,33 (df=14)	p>0,05
CPu-a	0,065 ± 0,009	0,057 ± 0,003	0,91 (df=14)	p>0,05
CPu-pm	0,065 ± 0,009	0,064 ± 0,003	0,09 (df=12)	p>0,05
CPu-pl	0,068 ± 0,007	0,070 ± 0,004	0,26 (df=14)	p>0,05
5-HIAA/5-HT				
PFC	0,776 ± 0,122	0,898 ± 0,059	0,90 (df=14)	p>0,05
NACC	0,697 ± 0,029	0,675 ± 0,039	0,47 (df=14)	p>0,05
CPu-a	1,469 ± 0,100	1,916 ± 0,135	2,66 (df=14)	p<0,05 *
CPu-pm	0,925 ± 0,155	0,783 ± 0,050	0,82 (df=12)	p>0,05
CPu-pl	1,199 ± 0,083	1,250 ± 0,114	0,36 (df=14)	p>0,05

7.3.2.2. Langzeiteffekte subchronischer Administration von MDMA

Sowohl zwei als auch vier Wochen nach Abschluss der subchronischen, zehntägigen Behandlung der Ratten mit 20 mg/kg.d MDMA waren signifikante Veränderungen der Konzentrationen sowohl von Serotonin und 5-HIAA als auch der Katecholamine Noradrenalin und Dopamin, nebst Metaboliten, zu sehen.

Die Konzentrationen von 5-HT und 5-HIAA waren bei MDMA-vorbehandelten Tieren im Vergleich zu den Kontrolltieren zu beiden Zeitpunkten stark erniedrigt (bis auf 49% 5-HT und 44% 5-HIAA) im präfrontalen Cortex, Nucleus Accumbens, dem anterioren sowie dem gesamten posterioren Striatum. Im dorsalen Raphe-Nucleus waren keine statistisch signifikanten Effekte zu sehen (Abb. 7.13.; Statistik: Anhang, Tab. 9.7.). Im Nucleus Accumbens und posteromedialen Striatum erholten sich die Konzentrationen von 5-HT und 5-HIAA im Laufe von zwei Wochen, also zwischen den zwei Observations-Zeitpunkten.

Die Konzentrationen der Katecholamine zeigten ein etwas komplexeres Muster: Die Noradrenalin-Konzentrationen waren im Nucleus Accumbens bei MDMA-vorbehandelten Tieren zu beiden Zeitpunkten stark erniedrigt (Abb. 7.14.; Statistik: Anhang, Tab. 9.8.).

Die Dopamin-Gehalte waren im anterioren Striatum zum frühen Zeitpunkt (2 Wochen) leicht erniedrigt, erholten sich jedoch bis zum zweiten Messzeitpunkt (4 Wochen) wieder. Im Nucleus Accumbens waren die Dopamin-Konzentrationen hingegen 2 Wochen nach Behandlung tendenziell und 4 Wochen nach MDMA-Administration sogar signifikant erhöht (Abb. 7.14.).

Die dopaminergen Metaboliten DOPAC und HVA zeigten fast ausschließlich geringe, statistisch nicht erfassbare Veränderungen, ausgenommen im posteromedialen Striatum, wo die DOPAC-Konzentrationen bei MDMA-vorbehandelten Tieren signifikant um 28% erhöht waren.

Die Quotienten DOPAC/DA und HVA/DA („Turnover-Raten“) waren 2 Wochen nach Behandlung bei den MDMA-Tieren hochsignifikant erhöht im anterioren Striatum. Der Quotient HVA/DA war zum selben Beobachtungszeitpunkt erhöht im posterolateralen Striatum (Tab. 7.3.). Diese Veränderungen bildeten sich zum späteren Messzeitpunkt (4 Wochen) vollständig und statistisch belegt zurück.

Entgegengesetzt den erhöhten Quotientwerten von HVA/DA im Striatum, erfuhr dieser Quotient eine stetige Verringerung im Nucleus Accumbens, wobei nur der zweite Messzeitpunkt eine signifikante Verringerung gegenüber Kontrolltieren zeigte.

Für 5-HIAA/5-HT zeigten sich kaum Effekte, ausgenommen im Nucleus Accumbens ein leicht erniedrigter Quotient 4 Wochen nach MDMA-Behandlung.

Tabelle 7.3.: Neurochemie-Analytik subchronisch MDMA-vorbehandelter Tiere: Turnover-Daten von Dopamin und Serotonin. 1-faktorielle ANOVA (Vergleich Kontrolltiere, MDMA-behandelte Tiere 2 Wochen und 4 Wochen nach Behandlungsende). Anschließender Newman-Keuls-post-hoc t-Test: *p<0,05; **p<0,01: Vergleich MDMA-Vorbehandlung mit Kontrolltieren; #p<0,05; ##p<0,01: Vergleich MDMA 2 Wochen mit MDMA 4 Wochen.

Hirnareal	Kontrolltiere	2 Wo nach MDMA	4 Wo nach MDMA	ANOVA (df=2,27)
DOPAC/DA				
PFC	0,300 ± 0,036	0,255 ± 0,039	0,372 ± 0,046	n.s.
NAcc	0,220 ± 0,010	0,214 ± 0,009	0,193 ± 0,006	n.s.
CPu-a	0,163 ± 0,005	0,196 ± 0,010 **	0,157 ± 0,005 ##	F=9,24 ; p<0,001
CPu-pm	0,176 ± 0,008	0,186 ± 0,013	0,159 ± 0,004	n.s.
CPu-pl	0,153 ± 0,008	0,177 ± 0,015	0,140 ± 0,004 #	F=3,69 ; p=0,038
DRN	0,566 ± 0,074	0,736 ± 0,174	0,369 ± 0,029	n.s.
HVA/DA				
PFC	0,700 ± 0,071	0,818 ± 0,102	0,784 ± 0,064	n.s.
NAcc	0,082 ± 0,005	0,077 ± 0,006	0,063 ± 0,002 **	F=4,91 ; p=0,015
CPu-a	0,085 ± 0,005	0,113 ± 0,008 **	0,080 ± 0,004 ##	F=8,72 ; p<0,001
CPu-pm	0,074 ± 0,003	0,084 ± 0,007	0,072 ± 0,006	n.s.
CPu-pl	0,081 ± 0,004	0,104 ± 0,008 **	0,083 ± 0,003 ##	F=6,96; p=0,004
DRN	nicht gemessen			
5-HIAA/5-HT				
PFC	0,949 ± 0,076	0,835 ± 0,100	1,015 ± 0,081	n.s.
NAcc	0,773 ± 0,018	0,690 ± 0,035	0,684 ± 0,032 *	F=3,48 ; p=0,045
CPu-a	1,434 ± 0,099	1,384 ± 0,126	1,330 ± 0,083	n.s.
CPu-pm	0,948 ± 0,048	1,187 ± 0,152	0,986 ± 0,091	n.s.
CPu-pl	1,214 ± 0,088	1,419 ± 0,088	1,304 ± 0,072	n.s.
DRN	0,840 ± 0,054	0,876 ± 0,040	0,788 ± 0,041	n.s.

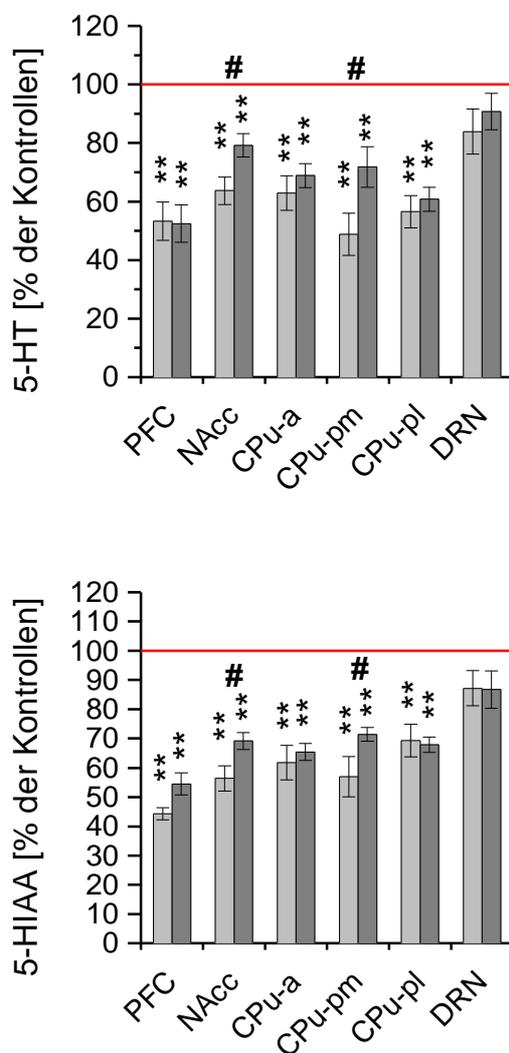


Abb. 7.13.: Veränderungen der Konzentrationen der Indolamine 5-HT und dessen Metaboliten 5-HIAA in Gehirnhomogenaten von subchronisch MDMA-behandelten Tieren. Die MDMA-Behandlung erfolgte subcutan an 10 aufeinanderfolgenden Tagen in der Konzentration 20 mg/kg.d. Das Gehirngewebe und relevante Gehirnareale wurden 14 (hellgraue Balken) bzw. 30 (dunkelgraue Balken) Tage nach der letzten MDMA-Injektion präpariert.

Statistik: Jedes Gehirnareal: 1-faktorielle ANOVA gefolgt von post-hoc Newman-Keuls-Tests: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ verglichen mit Kontrolltieren (100%); # $p < 0,05$; ## $p < 0,01$ MDMA behandelte Tiere 2 Wochen verglichen mit 4 Wochen.

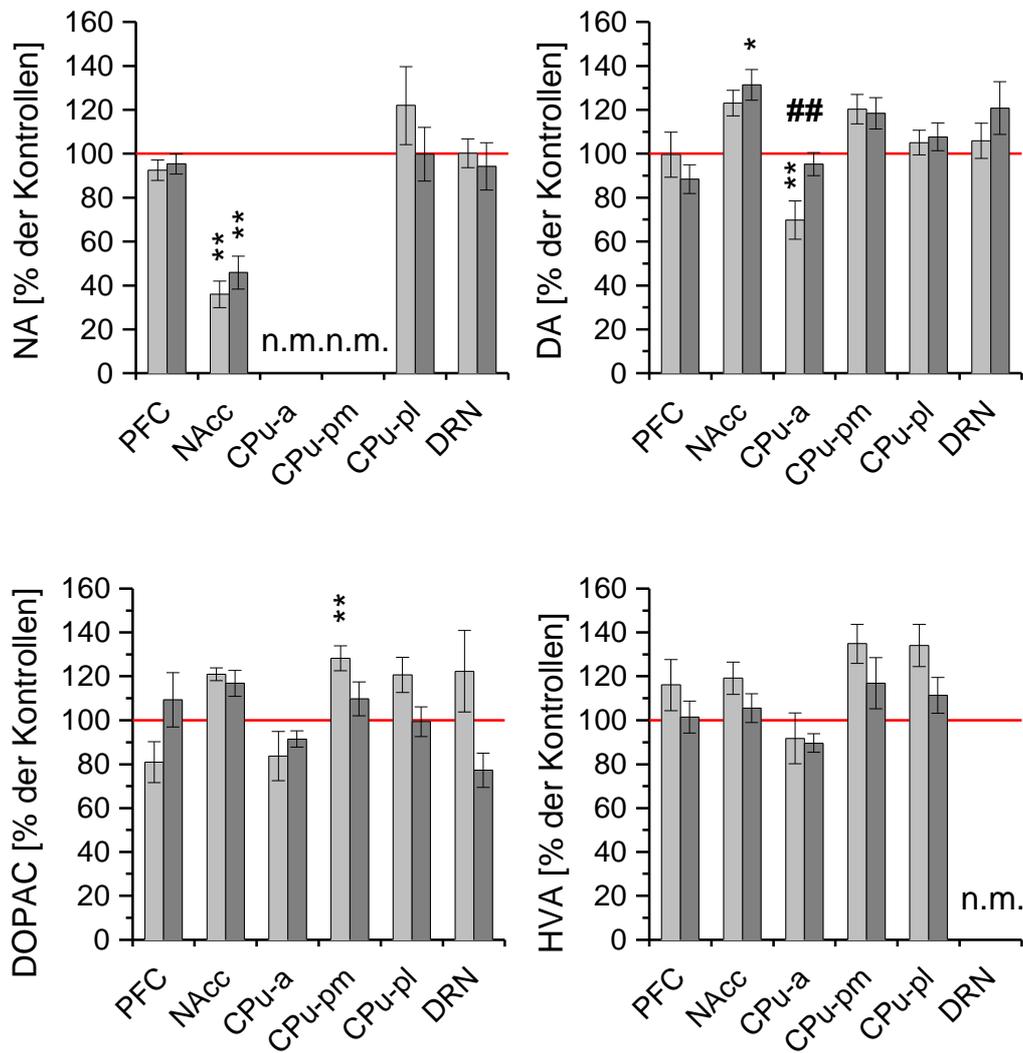


Abb. 7.14.: Veränderungen der Konzentrationen der Katecholamine NA, DA und dessen Metaboliten DOPAC und HVA in Gehirnhomogenaten von subchronisch MDMA-behandelten Tieren. Die MDMA-Behandlung erfolgte subcutan an 10 aufeinanderfolgenden Tagen in der Konzentration 20 mg/kg.d. Das Gehirngewebe und relevante Gehirnnareale wurden 14 (hellgraue Balken) bzw. 30 (dunkelgraue Balken) Tage nach der letzten MDMA-Injektion präpariert.

Statistik: Jedes Gehirnnareal: 1-faktorielle ANOVA gefolgt von post-hoc Newman-Keuls-Tests: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ verglichen mit Kontrolltieren (100%); # $p < 0,05$; ## $p < 0,01$ MDMA behandelte Tiere 2 vs. 4 Wochen.

7.3.2.3. Langzeiteffekte subchronischer Administration von MDMA im Hinblick auf die Rolle des Noradrenalins

Die Konzentrationen des Indolamins 5-HT und dessen Metaboliten 5-HIAA waren 30 Tage nach der letzten Injektion des 10-Tage-MDMA-Behandlungsschemas im präfrontalen Cortex, Nucleus Accumbens und dem gesamten (anterioren und posterioren) Striatum bei MDMA-vorbehandelten Tieren stark verringert (5-HT: auf 47 % der Kontrolltiere im PFC bei scheinläderten und 36 % der Kontrollwerte im PFC bei DSP-4 läderten Tieren; 5-HIAA: auf 52 % der Kontrollwerte im CPu-a bei scheinläderten und auf 55 % der Kontrollwerte bei DSP-4-läderten Tieren). Zwischen scheinläderten und DSP-4-läderten Tieren waren keine statistischen Unterschiede im Effekt der MDMA-Vorbehandlung auf die Konzentrationen der Serotoninmarker zu sehen.

Bei den Vehikel-vorbehandelten Tieren war jedoch ein Effekt der DSP-4-Läsion zu sehen: Im CPu-pm waren die 5-HT-Konzentrationen, im PFC, NAcc und CPu-pm waren die 5-HIAA-Konzentrationen signifikant leicht bis mäßig erhöht (am stärksten war dieser Effekt im PFC ausgeprägt: +44 %), in übrigen striatalen Gebieten und im DRN waren teilweise tendenzielle Erhöhungen zu beobachten (Abb. 7.15.; Tab. 9.9.).

Der Quotient 5-HIAA/5-HT (5-HT-„turnover“) war bei DSP-4-läderten vehikel-Vorbehandelten Tieren im Nucleus Accumbens ebenfalls stark erhöht. DSP-4-Läsion kombiniert mit MDMA-Vorbehandlung führte im NAcc und CPu-pm zu verringerten Werten.

Die Konzentrationen der Katecholamine erfuhren folgende Veränderungen:

Die NA-Konzentrationen waren stark erniedrigt im präfrontalen Cortex bei DSP-4-läderten Tieren (45 % bei Vehikel-Vorbehandlung; 35 % bei MDMA-Vorbehandlung), im Nucleus Accumbens waren sie in diesen Tiergruppen erhöht (ANOVA, siehe Tabelle 9.10.).

Die Dopaminparameter (DA, DOPAC, HVA) waren ebenfalls nach DSP-4-Läsion teilweise erniedrigt: DA war im CPu-pm signifikant, im CPu-pl tendenziell erniedrigt (im CPu-a sogar tendenziell erhöht); DOPAC war im CPu-pm und NAcc ebenfalls signifikant erniedrigt; HVA war nur im CPu-pm signifikant erniedrigt, hier jedoch abhängig von der zusätzlichen MDMA-Behandlung (Abb. 7.16.; Tabelle 9.10.).

Keinen Einfluss hatte die DSP-4-Vorbehandlung auf die DA- und DOPAC-Konzentrationen im PFC: Hier waren die Werte eher erniedrigt durch die MDMA-Vorbehandlung (DA tendenziell, DOPAC signifikant).

Der Quotient DOPAC/DA war im DRN tendenziell erniedrigt durch MDMA-Behandlung; im NAcc war HVA/DA bei MDMA-vorbehandelten und DSP-4-lädierten Tieren signifikant erniedrigt.

Tabelle 7.4.: Neurochemie-Analytik subchronisch MDMA-vorbehandelter Tiere mit/ohne DSP-4 Läsion: Turnover-Daten von Dopamin und Serotonin. 2-faktorielle ANOVA (Details siehe Anhang, Tabelle 9.11.). Anschließender Newman-Keuls-post-hoc t-Test: *p<0,05; **p<0,01: Vergleich mit scheinlädierten Kontrolltieren; #p<0,05; ##p<0,01: Vergleich mit scheinlädierten MDMA-Tieren; §p<0,05; §§p<0,01: Vergleich mit DSP-lädierten Kontrolltieren.

Hirnareal	scheinläd. + VehI	scheinläd. + MDMA	DSP-4 + Vehikel	DSP-4 + MDMA
DOPAC/DA				
PFC	0,230 ± 0,039	0,209 ± 0,030	0,183 ± 0,019	0,170 ± 0,011
NAcc	0,143 ± 0,006	0,137 ± 0,005	0,134 ± 0,005	0,127 ± 0,004
CPu-a	0,103 ± 0,006	0,096 ± 0,003	0,089 ± 0,005	0,087 ± 0,010
CPu-pm	0,116 ± 0,005	0,116 ± 0,002	0,116 ± 0,009	0,124 ± 0,004
CPu-pl	0,106 ± 0,010	0,090 ± 0,005	0,099 ± 0,005	0,105 ± 0,005
DRN	0,338 ± 0,029	0,246 ± 0,027	0,270 ± 0,026	0,253 ± 0,024
HVA/DA				
PFC	0,463 ± 0,084	0,705 ± 0,223	0,478 ± 0,060	0,555 ± 0,083
NAcc	0,051 ± 0,002	0,050 ± 0,003	0,059 ± 0,006	0,041 ± 0,002 §
CPu-a	0,051 ± 0,004	0,053 ± 0,003	0,055 ± 0,007	0,050 ± 0,005
CPu-pm	0,053 ± 0,004	0,062 ± 0,006	0,070 ± 0,012	0,054 ± 0,003
CPu-pl	0,061 ± 0,012	0,054 ± 0,006	0,063 ± 0,006	0,081 ± 0,014
DRN	HVA nicht gemessen			
5-HIAA/5-HT				
PFC *	0,689 ± 0,084	0,908 ± 0,095	1,012 ± 0,079	1,053 ± 0,133
NAcc	0,643 ± 0,034	0,568 ± 0,035	0,704 ± 0,039 #	0,512 ± 0,028 *§§
CPu-a	1,476 ± 0,141	1,478 ± 0,075	1,394 ± 0,036	1,601 ± 0,200
CPu-pm	0,968 ± 0,049	0,886 ± 0,056	0,929 ± 0,026	0,757 ± 0,040 *§
CPu-pl	1,324 ± 0,097	1,311 ± 0,236	1,221 ± 0,098	1,176 ± 0,124
DRN	0,998 ± 0,034	0,919 ± 0,046	1,049 ± 0,039	0,862 ± 0,026 §

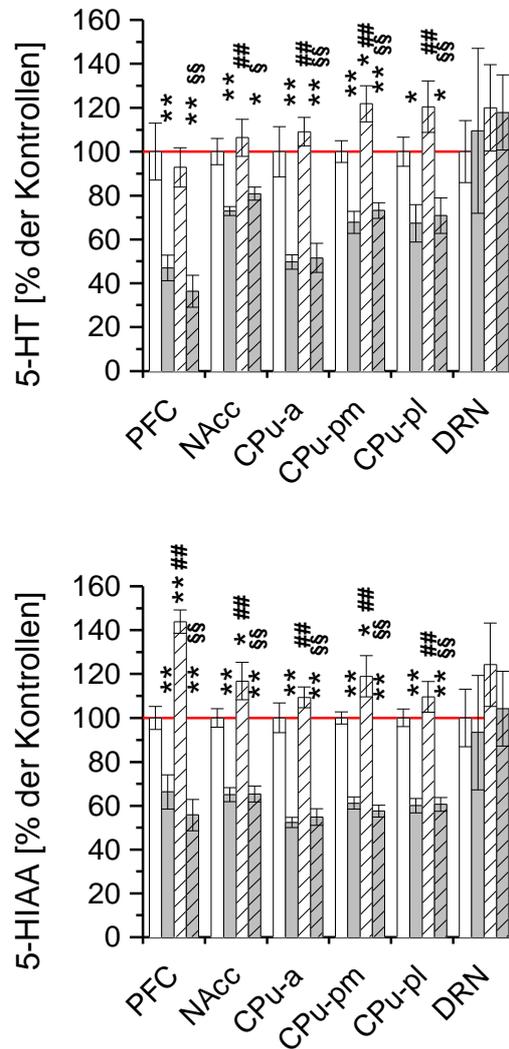


Abb. 7.15.: Veränderungen der Konzentrationen der Indolamine 5-HT und dessen Metaboliten 5-HIAA in Gehirnhomogenaten von subchronisch MDMA-behandelten Tieren mit/ohne DSP-4 Vorbehandlung (50 mg/kg i.p. 5 Tage vor Beginn der MDMA-Administration). Die MDMA-Behandlung erfolgte subcutan an 10 aufeinanderfolgenden Tagen in der Konzentration 20 mg/kg.d. Das Gehirngewebe und relevante Gehirnareale wurden 30 Tage nach der letzten MDMA-Injektion präpariert. Dargestellt sind Tiere mit Scheinläsion und Vehikel-Behandlung (weiße Balken) oder MDMA-Behandlung (graue Balken); Tiere mit DSP-4-Läsion des LC und Vehikel-Behandlung (weiße gestreifte Balken) oder MDMA-Behandlung (graue gestreifte Balken).

Statistik: Jedes Gehirnareal: 1-faktorielle ANOVA gefolgt von post-hoc Newman-Keuls-Tests: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ verglichen mit scheinläderten Kontrolltieren; # $p < 0,05$; ## $p < 0,01$ verglichen mit scheinläderten MDMA-Tieren; \$ $p < 0,05$; \$\$ $p < 0,01$ verglichen mit DSP-läderten Kontrolltieren.

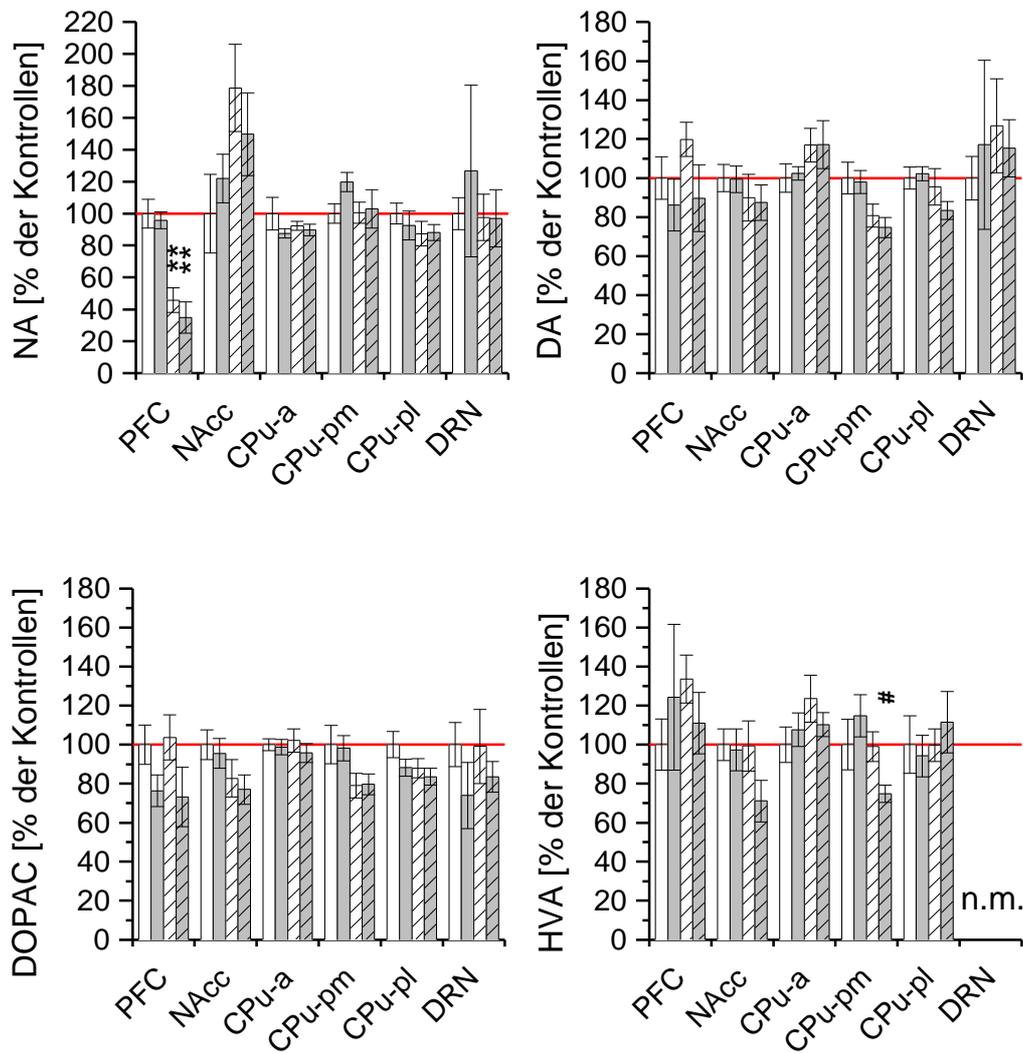


Abb. 7.16.: Veränderungen der Konzentrationen der Katecholamine NA, DA und dessen Metaboliten DOPAC und HVA in Gehirnhomogenaten von subchronisch MDMA-behandelten Tieren mit/ohne DSP-4 Vorbehandlung (50 mg/kg i.p. 5 Tage vor Beginn der MDMA-Administration). Die MDMA-Behandlung erfolgte subcutan an 10 aufeinanderfolgenden Tagen in der Konzentration 20 mg/kg.d. Das Gehirngewebe und relevante Gehirnareale wurden 30 Tage nach der letzten MDMA-Injektion präpariert. Dargestellt sind Tiere mit Scheinläsion und Vehikel-Bbehandlung (weiße Balken) oder MDMA-Behandlung (graue Balken); Tiere mit DSP-4-Läsion des LC und Vehikel-Behandlung (weiße gestreifte Balken) oder MDMA-Behandlung (graue gestreifte Balken).

Statistik: Jedes Gehirnareal: 1-faktorielle ANOVA gefolgt von post-hoc Newman-Keuls-Tests: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ verglichen mit scheinladierten Kontrolltieren; # $p < 0,05$; ## $p < 0,01$ verglichen mit scheinladierten MDMA-Tieren; § $p < 0,05$; §§ $p < 0,01$ verglichen mit DSP-ladierten Kontrolltieren.

7.4. Diskussion

7.4.1. Diskussion der immunhistochemischen Ergebnisse

Bei akuter MDMA-Wirkung ist eine starke Glia-Aktivierung (für charakteristische Glia-Färbung siehe [161]) zu sehen, welche sich als Bax-Protein-Immunreaktivität zeigt. Der Glia, insbesondere den reaktiven Astrozyten, werden Schlüsselrollen in der Reparatur und neuem Aussprossen von beschädigten Axonen zugesprochen [245].

Akute c-Fos-Aufregulation (sowohl als immun-positive Zellkerne im Striatum als auch in stärkerer Hintergrundfärbung bei MDMA-behandelten Tieren sichtbar - vgl. Abb. 7.4.) deutet darauf hin, dass sowohl funktionales (im Zellkern lokalisiertes c-Fos-Protein) als auch gerade (aus der c-fos-mRNA) neu gebildetes c-Fos-Protein 3 h nach MDMA Injektion vorliegt. Die immer noch anhaltende Bildung von c-Fos könnte auf weitere Zellaktivierung durch MDMA (welches im Serum über längere Zeit vorliegt) hindeuten, als auch auf sekundäre Aktivierungsmechanismen wie etwa Exzitation durch NMDA-Rezeptoren [91;223], welche aber wahrscheinlich auch im Ursprungsgebiet der serotonergen Neurone, dem DRN, geschieht (vgl. Abb. 7.5.). Dann darf c-Fos nicht nur als Indikator für Zellaktivierung diskutiert werden, sondern es muss ebenfalls seine potentielle Rolle in neurodegenerativen und/oder neuroprotektiven Prozessen in Betracht gezogen werden. Zusammen mit der Aktivierung von Bax und Bcl-2 kann die Involvierung apoptotischer Prozesse im Mechanismus der MDMA-vermittelten Neurotoxizität als wahrscheinlich betrachtet werden. Vor allem die Überexpression von Bcl-2 im Striatum deutet auf die reaktive Induktion neuroprotektiver Mechanismen hin. Diese Theorie wird unterstützt durch andere Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe: Einen Monat nach Abschluss einer viertägigen hoch dosierten (20 mg/kg.d) MDMA-Administration ist in vielen Vorderhirnarealen erhöhte Immunreaktivität von c-Jun (pe-Cx, NAcc, Hip, PVN, LHb, SN) und Krox-24 (PFC, pe-Cx, NAcc, AMY) zu beobachten [*B. Zadow, unveröffentlichte Ergebnisse*]. Diese Proteine gehören ebenfalls zu den induzierbaren Transkriptionsfaktoren (ITF), wobei c-Jun mit c-Fos verwandt ist und Homo- bzw. Heterodimere mit c-Fos bildet zum Zweck der Transkriptionsregulation bestimmter Gene [130]. Krox-24 gehört zu den Zink-Finger-Transkriptionsfaktoren und reguliert ebenfalls die Gen-Transkription im Zellkern. Beide ITF werden noch stärker als c-Fos als Schlüsselproteine der Apoptoseregulation verstanden,

obwohl bislang ebenfalls unklar ist, ob sie eine neuroprotektive Rolle übernehmen oder ein Glied in der Ausführung des Zelltötungs-Programmes sind [91;322]. Weiterhin sind nach diesem MDMA-Behandlungsschema auch die Apoptose-Proteine Bcl-2 (im pe-Cx, NAcc, CPu, AMY, SN und DRN) und Bax (im pe-Cx, CPu, AMY, Hip, SN) erhöht [B. Zadow, *unveröffentlichte Ergebnisse*]. Arbeiten mit serotonergen Zellen *in vitro* zeigen ebenfalls eine Involvierung apoptotischer Mechanismen [290].

Diese Befunde weisen zusammengefasst auf eine wichtige Rolle apoptotischer Mechanismen in der Vermittlung der MDMA-induzierten Neurotoxizität hin. Die Beteiligung der Apoptoseproteine *in vivo* könnte einen wichtigen Therapieansatz der neurotoxischen Schäden von MDMA darstellen, doch werden die Kaskaden der intrazellulären Apoptose-Mechanismen wahrscheinlich erst sekundär induziert durch primär erhöhte ROS-Verbindungen.

Aber nochmals zurück zur c-Fos-Expression: Akut wird in vielen Hirnarealen die c-Fos-Expression stark erhöht. Dies wurde bereits in anderen Arbeiten berichtet [268;299] und wird korreliert mit den verhaltensaktivierenden Effekten von MDMA.

Der dieser Expression zugrundeliegende Mechanismus scheint über eine Aktivierung von D₁- und NMDA-Rezeptoren vermittelt zu sein [72;120], jedoch ist in cortikalen Arealen eine mehr dominante Rolle der 5-HT_{2A}-Rezeptoren in der Fos-Induktion gezeigt worden [130]. All diese Rezeptoren vermitteln neuronale Exzitation, daher wird die Expression der ITF (besonders c-Fos) oft als Indikator für neuronale Aktivität interpretiert: Die ITF werden auch als 3rd-Messenger angesehen, welche die späten Antworten auf ein Signal vermitteln (neben der schnellen Antwort, welche die 1st-Messenger (Neurotransmitter) und die nachgeschalteten 2nd-Messenger (z.B. cAMP, DAG) durch Aktivierung von Proteinkinasen vermitteln) [130].

Während der akuten Wirkung von MDMA führt die starke 5-HT- und DA-Freisetzung zweifelsfrei zur Aktivierung von 5-HT- und DA-Rezeptoren in verschiedenen Vorderhirnbereichen. D₁-Rezeptoren werden im Striatum stark auf GABAergen medium spiny Neurons der direkten striatofugalen Bahn exprimiert. Quantitatives autoradiographisches Mapping von 5-HT-Rezeptoren zeigt eine hohe Dichte von 5-HT_{2A}-Rezeptoren im Cortex (hier vor allem im Layer IV), Striatum, NAcc, Hippocampus (da vor allem im Gyrus dentatus); im DRN ist eine eher niedrige 5-HT_{2A}-Dichte gemessen worden, jedoch erhält der DRN starke exzitatorische Afferenzen aus der Amygdala und der lateralen Habenula (LHb, detaillierte Besprechung s.u.). Im Striatum ist die genaue Lokalisation der 5-HT_{2A}-Rezeptoren noch umstritten: Während viele Befunde darauf hinweisen, dass 5-HT₂-

Rezeptoren auf den striatalen Ausgangsneuronen der direkten striatofugalen Bahn lokalisiert sind (Studien über Modulation der PPT-mRNA [23;50]), zeigen andere Untersuchungen, dass 5-HT_{2A}-Rezeptoren auf GABAergen striatalen Interneuronen und als Heterorezeptoren auf kortikalen und pallidalen Afferenzen des Striatums exprimiert sind [46]. Dieses Detail könnte die zusätzliche DA-Freisetzung über den 5-HT₂-Agonismus des MDMA erklären: Nigrale Dopaminneurone werden über eine GABAerge Feedbackschleife negativ moduliert; diese GABAergen Neurone exprimieren wahrscheinlich terminale 5-HT_{2C}-Rezeptoren, während sie selbst im Striatum gehemmt werden durch 5-HT_{2A}-Rezeptoren-tragende GABA-Interneurone. Eine Stimulation der 5-HT_{2C}-Rezeptoren würde die dopaminergen Neurone verstärkt hemmen, eine Stimulation der striatalen 5-HT_{2A}-Rezeptoren die nigralen DA-Neurone enthemmen (das durch MDMA oder Amphetamin freigesetzte DA hemmt jedoch auch selbst die Feuerrate der dopaminergen Neurone über D₂-Autorezeptoren und über weitere Aktivierung der „Feedback“-Schleife) [46;170;229;271].

In der Amygdala war ebenfalls eine akute Erhöhung der nucleären Fos-Expression zu sehen, dies aber vor allem im zentralen Nucleus (CeA), welcher am wenigsten serotonerg innerviert war⁴¹. Die Fos-Expressionserhöhung scheint hier also eher durch DA- und Glutamat-Rezeptoren vermittelt zu sein.

Im DRN korreliert die Fos-Expression ebenfalls mit einer allgemein höheren neuronalen Aktivität. Obwohl ein starker 5-HT-Release eine Hemmung dieser Neurone vermitteln müsste (über somatodendritische 5-HT_{1A}-Autorezeptoren), ist die Dichte der Fos-positiven Zellkerne in diesem Gebiet trotzdem stark erhöht. Bei differenzierter Betrachtung (Doppelfärbung Fos/5-HT) fällt jedoch auf, dass nur sehr wenige serotonerge Neurone c-Fos exprimieren (Abb. 7.5. – 7.7.). Es ist ebenfalls bekannt, dass im DRN nur etwa 1/3 aller Neurone serotonergen Phänotyps sind, es kommen ebenfalls dopaminerge Zellen⁴² und GABAerge Interneurone vor [207;328].

Da eine zusätzliche Doppelfärbung (Fos/TH) kaum überlappende Immunreaktivitäten zeigt, muss davon ausgegangen werden, dass diese Fos-reaktiven Neurone im DRN vorwiegend GABAerg sind. Tatsächlich zeigt eine Handvoll Studien eine Involvierung dieser Interneurone in der Modulation der Aktivität der serotonergen Ausgangsneurone: Während

⁴¹ Die 5-HT-Färbung zeigte höchste IR in der BLA > MeA > CeA, während die TH-IR in der CeA > BLA war; dies zeigt wiederum die komplementäre Innervation einer Struktur durch DA und 5-HT (vgl. dorsostriataler DA- und 5-HT-Gradient: DA anterior > posterior; 5-HT posterior > anterior).

⁴² Über diese dopaminerge Neuronenpopulation ist relativ wenig bekannt, außer dass sie in den medialen PFC projiziert und als eine Extension der Zellgruppe A10 angesehen wird.

man früher angenommen hatte, dass die Raphe-Nuclei (neben anderen Afferenzen aus dem Hypothalamus, SN, VTA, Thalamus, Claustrum) inhibitorisch durch die laterale Habenula (LHb) innerviert werden [318], weiß man heute, dass die LHb (neben PFC und Amygdala) den DRN exzitatorisch innerviert [226]. Vor allem die glutamaterge Innervation aus der LHb treibt die serotonergen Ausgangsneurone der Raphe an, jedoch innerviert sie auch die GABAergen Interneurone des DRN, sodass eine mittelfrequente elektrische Stimulation der LHb die langsam feuernden 5-HT-Neurone und die schnell feuernden GABA-Neurone des DRN aktiviert; eine hochfrequente Stimulation der LHb inhibiert jedoch die 5-HT-Neurone; außerdem ist eine intakte LHb-DRN-Projektion (fasciculus retroflexus) notwendig für eine Inhibition der 5-HT-Neurone durch GABA_A-Agonisten [81;137;167;209;210].

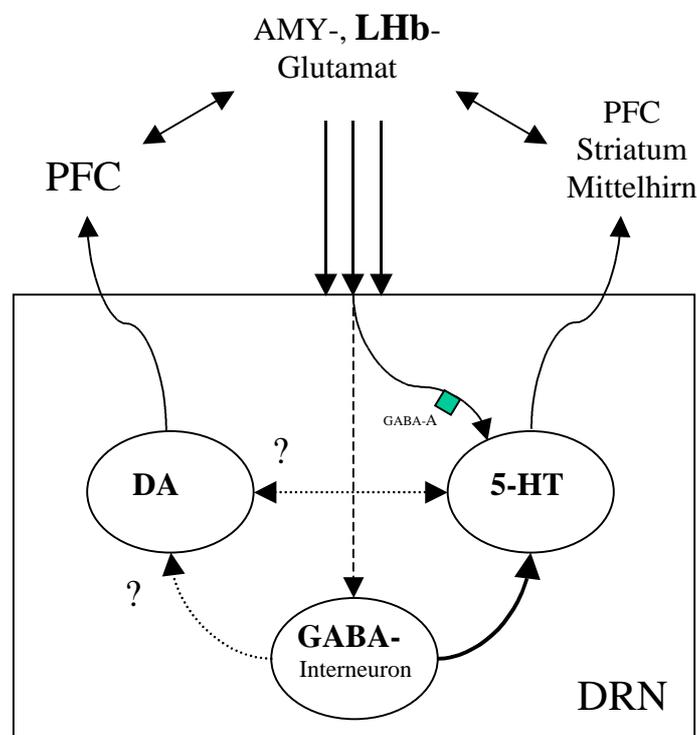


Abb. 7.17.: Schematische Darstellung der wichtigsten Neuronenpopulationen im DRN und der Regulation der striatalen Raphe-Projektionsneurone durch exzitatorischen Input aus der Amygdala und der lateralen Habenula. Andere (GABAerge, katecholaminerge, cholinerge, neuropeptiderge) Afferenzen sind hier nicht dargestellt.

Dieser Befund hat ebenfalls eine klinische Bedeutung, da die LHb in der Entstehung und Symptomatik der Depression eine wichtige Rolle zu spielen scheint [17;197]. In der akuten Verhaltenssymptomatik der Gabe von MDMA könnte die LHb ebenfalls eine Rolle spielen, zumal sie neben dem pedunculo-pontinen tegmentalen Nucleus (PPTg) als eine weitere direkte Ausgangsstruktur zur Motoriksteuerung diskutiert wird⁴³ [65]. Eine Zunahme des exzitatorischen Eingangs im DRN kann jedoch auch bedeuten, dass (vor allem eine wiederholte) Gabe von MDMA diesen exzitatorischen Input im DRN über die Toleranzschwelle hebt und sogenannte Exzitotoxizität induziert. Die Theorie der Exzitotoxizität ist aus Beobachtungen über Zellschädigungen durch Glutamat entstanden und besagt, dass eine übermäßige glutamaterge Transmission (im physiologischen Zustand ist diese transient) zu einer Depolarisation der Neurone führt und es nachfolgend über NMDA-Rezeptoren, spannungsabhängige Calcium-Kanäle und Öffnung intrazellulärer Ca^{2+} -Speicher zu einem drastischen Anstieg von $[Ca^{2+}]_i$ kommt, welches zur Aktivierung zahlreicher intrazellulärer Kinasen, Proteasen und Lipasen führt und wiederum einen Anstieg an ROS bewirkt. Da sich dieser Prozess selbst verstärkt, kommt es ebenfalls zu einer Energieverarmung der betroffenen Neurone und somit zu einer gesteigerten Vulnerabilität (zusammengefasst in [71]). In unserem Fall ist dieser Prozess sicherlich nicht zu unterschätzen und könnte mit dem durch den Abbau von MDMA- (oder DA-) Metaboliten resultierenden Anstieg von ROS synergistisch wirken und auf diesem Weg u.U. apoptotische Mechanismen und schließlich Zellschädigung induzieren.

Die Langzeiteffekte einer einmaligen MDMA-Gabe auf die Expression des ITF c-Fos lassen sich zusammenfassend als die Umkehrsituation der akuten Wirkung beschreiben. Es sind vor allem in striatalen Strukturen die basalen c-Fos-Level erniedrigt, außerdem in der Amygdala, nun jedoch in dem präferentiell serotonerg innervierten Gebiet der BLA. Dies deutet darauf hin, dass vor allem Gebiete, welche exzitatorische 5-HT-Rezeptoren exprimieren, von einer wahrscheinlichen Serotonin-Unterfunktion betroffen sind. Tatsächlich sind die 5-HT-Konzentrationen im Vorderhirn durch eine einmalige höhere Dosis von MDMA nicht stark erniedrigt (außer im anterioren CPU und tendenziell im PFC; vgl. Punkt 7.3.2.). Es ist jedoch eine tendenziell erniedrigte Zahl Fos-immunreaktiver Zellkerne in der LHb zu beobachten. Vor dem Hintergrund einer glutamaterg exzitatorischen „Schrittmacher“-Projektion über den fasciculus retroflexus zum DRN kann man annehmen, dass eine verminderte Aktivierung der

⁴³ LHb projiziert neben den Efferenzen zur SN, Hypothalamus, Septum auch massiv zum DRN und der tegmentalen Formatio reticularis [124].

serotonergen Neurone des DRN zu einer leicht erniedrigten serotonergen Neurotransmission vieler Vorderhirnareale führt. Tatsächlich konnte eine Inhibierung der 5-HT-Freisetzung im Striatum erreicht werden durch Läsion des fasciculus retroflexus oder durch lokale Injektion von Glutamat-Antagonisten in den DRN [137].

Im DRN ist ebenfalls eine Abnahme der Zahl Fos-immunreaktiver Zellkerne zu sehen, insbesondere im ventromedialen Teil des DRN. Vor allem sind dies nicht-serotonerge Neurone, trotzdem ist ebenfalls die Zahl Fos-positiver 5-HT-Neurone in diesem Gebiet erniedrigt (Abb. 7.7.). Dieser Effekt ist insofern interessant, als im Vergleich der SERT-mRNA-Dichten innerhalb des DRN gefunden wurde, dass im ventromedialen DRN die SERT-Transporter am höchsten exprimiert waren: vm-DRN > dm-DRN > l-DRN. Es wird angenommen, dass diese Subpopulation serotonerger Neurone (vm-DRN), welche hohe Mengen an SERT-mRNA bildet, folglich auch vermehrt vulnerabel ist gegen amphetaminerge Neurotoxine, welche selektiv über den SERT die Zelle betreten [235].

Im Übrigen muss eine kleine Zahl Fos-positiver Neurone nicht unbedingt mit einer generellen Hypoaktivität korrelieren: c-Fos darf nicht absolut als Aktivitätsmarker interpretiert werden, da eine neuronale Aktivierung auch die Expression anderer intrazellulären Kaskaden und ITF induzieren kann.

Eine Hyperexpression von c-Fos ist in der granulären Schicht des Gyrus dentatus zu sehen. Dieser Effekt könnte erklärt werden durch kompensatorische Aktivierung des medianen Raphe-Kerns (MRN), welcher robuster ist gegen MDMA-induzierte Neurotoxizität und wahrscheinlich die Unterfunktion des DRN-5-HT zu kompensieren versucht durch eigene Funktions-Aufregulation. Dies könnte vermittelt sein durch mangelnde Aktivierung der MRN-somatodendritischen 5-HT_{1A}-Autorezeptoren, welche aus verminderter serotonerger Innervation des MRN aus dem DRN resultiert.

Der mediale präfrontale Cortex (PFC) und paraventriculäre Nucleus des Thalamus (PVN), welche ebenfalls starke serotonerge Afferenzen aus dem DRN erhalten, sind nicht betroffen. Dies könnte mit ihrer Funktion bzw. ihrer starken Einbindung in andere (v.a. exzitatorisch) regulatorische Systeme zusammenhängen⁴⁴, wodurch sie etwas robuster wären gegen die Auswirkungen einer leichten serotonergen Dysfunktion.

⁴⁴ Der PFC ist stark in limbische Prozessierung involviert und erhält Afferenzen aus dem MD- (und PVN-) Thalamus und anderen Cortices, v.a. dem contralateralen PFC, dem Hip und der AMY [312]; der PVN ist in der zirkadianen Rhythmik-Regulation und im limbischen System involviert und erhält ebenfalls Afferenzen aus

7.3.3. Diskussion der neurochemischen Befunde

Einmalige hoch dosierte MDMA-Gabe

Die Gabe von MDMA hat keinen großen Langzeiteffekt auf die 5-HT oder 5-HIAA-Konzentrationen im Vorderhirn. Lediglich im anterioren Striatum waren die 5-HT-Konzentrationen leicht, aber signifikant vermindert, im PFC nur tendenziell. Es wurde zwar bereits berichtet, dass sogar eine einmalige Injektion von 20 mg/kg MDMA eine neurotoxische Wirkung entfalten kann, jedoch waren die Effekte von MDMA auf das Gesamt-5-HT von ähnlichem Ausmaß [270]. Zudem muss berücksichtigt werden, dass die Tiere im Anschluss an die hoch dosierte Gabe (20 mg/kg) einen Versuch zur Platzkonditionierung durchlaufen haben (kumulative Dosis: 5 x 6 mg/kg MDMA). Obwohl dies bei beiden Tiergruppen durchgeführt wurde, können während dieser langen Zeit ebenfalls Regenerationsprozesse angelaufen sein, d.h. eventuelle stärkere Schäden sind zum Zeitpunkt der Tötung der Tiere eventuell nicht mehr zu sehen. Einen „Schatten“ dieser Regenerationsprozesse kann der erhöhte 5-HT-Umsatz („turnover“) im anterioren Striatum darstellen: Die serotonergen Neurone würden demnach in diesem Gebiet die leichten Schäden zu kompensieren versuchen durch eine erhöhte Aktivität, wodurch wiederum vermehrt Metaboliten im Verhältnis zum funktionalen Neurotransmitter anfallen. Folglich wird der Quotient 5-HIAA/5-HT leicht erhöht. Dies könnte durch verschiedene Mechanismen zustande kommen: Es könnten Veränderungen auf der zellulären Ebene verantwortlich sein, die das proapoptotische-/antiapoptotische Faktorengleichgewicht modulieren (siehe oben) oder durch Veränderungen der Genexpression die Produktion wichtiger regulatorischer Proteine inkl. Serotonintransporter (SERT) oder -rezeptoren (siehe oben: c-Fos-Diskussion) verändern. Als geeigneter Kandidat kommt der 5-HT_{1A}-Rezeptor in Frage, da nachgewiesen wurde, dass sowohl eine SSRI-Gabe als auch MDMA zu einer Modulation der Dichte dieser Autorezeptoren führt [10;11;78].

Interessant sind jedoch die beobachteten Effekte auf die Konzentrationen der Katecholamine: NA ist leicht erniedrigt im anterioren Striatum, DA (und seine Metaboliten DOPAC, HVA) sind leicht erhöht im NAcc und im anterioren Striatum bei MDMA (20mg/kg)-vorbehandelten Tieren. Die Quantität dieser Effekte ist relativ gering, jedoch scheinen sie bereits die Effekte einer subchronischen Administration anzudeuten, welche im nächsten Abschnitt näher beschrieben und ausführlich diskutiert werden.

anderen thalamischen und limbischen Arealen, aus dem Hypothalamus und Hirnstamm, insbesondere dem suprachiasmatischen Nucleus, weshalb seine Aktivität zirkadian oszilliert [174].

Subchronische hoch dosierte Gabe von MDMA

Im zweiten Versuch sollten die Auswirkungen einer wiederholten MDMA-Behandlung auf das Neurotransmittergleichgewicht der Indolamine und Katecholamine untersucht werden. Das zehntägige Administrations-Schema wurde wohlüberlegt deshalb gewählt, damit zwischen den MDMA-Gaben kleine Mikroentzüge entstehen können, welche möglicherweise einen wichtigen Faktor bei der Entwicklung einer Sensitivierung des Verhaltens darstellen (siehe Kapitel 6.). Zwar ist es in der MDMA-Literatur üblich, ein strenges Protokoll mit 8 x 20 mg/kg MDMA alle 12 h einzuhalten, um Neurotoxizität zu untersuchen, jedoch zeigte sich ebenfalls, dass es bei dieser Behandlungsmethode zu keiner Verhaltenssensitivierung kommen kann [189].

In MDMA-behandelten Tieren ist zu beiden Zeitpunkten eine starke Depletion von 5-HT und 5-HIAA im präfrontalen Cortex, Nucleus Accumbens und allen untersuchten striatalen Gebieten zu beobachten, im Ursprungsgebiet der serotonergen Neurone, dem DRN, sind jedoch keine signifikanten Effekte zu sehen. Dies korreliert sehr gut mit den bereits bekannten und gut umschriebenen Zeichen der neurotoxischen Wirkung von MDMA auf das aufsteigende serotonerge System: Die feinen, aufsteigenden, serotonergen Terminale degenerieren im gesamten Vorderhirn bei hohen Dosierungen von MDMA, während die Zellkörper im DRN größtenteils von den Schäden verschont bleiben [296].

Im Laufe von zwei Wochen (zwischen der ersten und zweiten Präparationsphase) beobachtet man weniger stark erniedrigte 5-HT- und 5-HIAA-Konzentrationen im Nucleus Accumbens und dem posteriomedialen Striatum: Es kommt zu einer Regeneration der Serotonin-Parameter. Frühere Studien konnten bereits eine Erholung serotonerger Neurone von MDMA-induzierten Schäden zeigen [25], jedoch muss man im Auge behalten, dass das erneute Aussprossen und das Reinnervationsmuster beschädigter serotonerger Fasern höchst abnormal und in unphysiologischer Weise abläuft: Als Ergebnis wurden weiterhin serotonerg denervierte distale Innervationsgebiete neben serotonerg hyperinnervierten proximalen Arealen gezeigt [83]. In einer PET-Studie mit aktuellen und abstinenten MDMA-Konsumenten konnte eine Erholung der SERT-Dichte bei abstinenten Versuchspersonen beobachtet werden, jedoch könnte dieser Befund auf unzureichende Selektivität des verwendeten Liganden ($[^{123}\text{I}]\text{-}\beta\text{-CIT}$) zurückzuführen sein; außerdem waren kognitive Defizite bei diesen Versuchspersonen auch weiterhin ausgeprägt (Studie von Reneman et al., 2001 [239]; zur Diskussion siehe [183]; Übersicht über *state of the art*-PET und SPECT-Radioliganden bei [114]).

Da die serotonerge Innervation der Basalganglien im physiologischen Zustand einen rostro-caudalen und latero-medialen Gradienten (bei einem komplementären Dopamin-Gradienten) zeigt [27;292], kann davon ausgegangen werden, dass diese zwei Neurotransmitter spezifische regulatorische Funktionen in verschiedenen Bereichen der Basalganglien übernehmen und dass eine Dysregulation dieses Gleichgewichts zur Pathogenese psychiatrischer Symptome führen kann, wie sie bei Patienten mit einer Ecstasy-Vorgeschichte beobachtet werden.

In unserem Experiment ist die Erholung der Serotonin-Konzentrationen in stark serotonerg innervierten Bereichen am stärksten ausgeprägt (NAcc und CPu-pm). Der Zeitraum, der für die Beobachtung einer möglichen Reinnervation zur Verfügung stand, war jedoch eher kurz; deshalb waren die Effekte eher gering und nicht in allen Arealen nachweisbar. Nichtsdestotrotz zeigt dieses Experiment ebenfalls, dass die serotonergen Neurone fähig sind, sich von Schäden durch selektive Neurotoxine zu erholen.

MDMA ist ein Amphetaminderivat, welches eine starke 5-HT-, aber auch DA- und NA-Freisetzung verursacht. Interessanterweise führt MDMA jedoch zu einer selektiven Neurotoxizität der dünnen serotonergen Neurone des DRN, die dopaminergen und noradrenergen Neurone bleiben verschont [302]. Die Dopaminparameter (DA, DOPAC, HVA) zeigen in diesem Experiment konsistent mit der aktuellen Literatur keine langfristige Abnahme der Gewebs-Konzentrationen, außer einer transienten Erniedrigung der DA-Konzentration im anterioren Striatum zwei Wochen nach MDMA-Behandlungsende. Diese Konzentrationsverringern ist begleitet von einem Anstieg des Dopamin-Turnovers (DOPAC/DA, HVA/DA), was auf die Induktion von neuronalen Kompensationsprozessen hinweist, welche zu einer raschen Erholung der Parameter vier Wochen nach Beendigung der intermittierenden MDMA-Behandlung führen.

Im Nucleus Accumbens sind die Dopamin-Konzentrationen nach MDMA-Behandlung sogar leicht erhöht, dieser Effekt ist signifikant vier Wochen nach Beendigung der MDMA-Behandlung. Die Diskrepanz zwischen den entgegengerichteten Effekten im Nucleus Accumbens und anterioren Striatum ist nicht ohne weiteres erklärbar. In einer Studie von De Deurwaerdere wurde bereits eine unterschiedliche serotonerge Modulation der dopaminergen Neurone gezeigt: Elektrische Stimulation im DRN führt zu einer erhöhten accumbalen, bei gleichzeitig erniedrigter ipsilateral-striatalen DA-Freisetzung [64]. Die positiv-modulatorische Wirkung von 5-HT auf die DA-Freisetzung im NAcc scheint unter anderem über 5-HT₃-Rezeptoren im ventralen tegmentalen Areal (VTA) vermittelt zu werden [64;97;199], in

manchen Studien führt auch eine direkte 5-HT-Perfusion im NAcc zu einem verstärkten DA-release [218]. Eine chronische systemische Behandlung mit dem 5-HT₂-Antagonisten MDL 100,907 reduziert, ähnlich wie Clozapin, selektiv die Zahl spontanaktiver Neurone im VTA (Haloperidol wirkt unspezifisch hemmend auf SNc und VTA-Neurone) – hier liegt wohl die atypische neuroleptische Potenz von Substanzen begründet, welche eine kombinierte D₂- und 5-HT₂-antagonistische Potenz besitzen [293].

Im dorsalen Striatum kommt es ebenfalls zu einer verstärkten DA-Freisetzung durch 5-HT₂-, 5-HT₃- und/oder 5-HT₄-Rezeptoren [30;36;38]. Die serotonergen Afferenzen aus dem DRN scheinen jedoch einen inhibitorischen Effekt auf (zumindest langsam feuernde) dopaminerge SNc-Neurone zu haben [132;142-144;291]. Kelland und Kollegen konnten sogar einen inhibitorischen Effekt der DRN-Stimulation auf alle VTA-Neurone zeigen [144]. Die genaue serotonerge Regulation der dopaminergen Mittelhirnneurone scheint bislang nicht geklärt zu sein, zumal die vorhandenen Daten aus der Literatur sehr widersprüchlich sind. Daher können die beobachteten Fluktuationen der Dopamin-Konzentrationen im hier beschriebenen Experiment nur unzulänglich über einen serotonergen Mechanismus diskutiert werden.

Als ein anderer möglicher Grund könnte zum einen die Entwicklung einer Verhaltenssensitivierung durch wiederholte Gabe von MDMA sein. Die Beobachtung der Verhaltenssensitivierung steht im Einklang mit Daten von Kalivas et al. [139] und wird näher beschrieben in Kapitel 6. (Sucht-Teil). Obwohl Kalivas et al. eine Unabhängigkeit der Entwicklung sensitivierter Verhaltenseffekte von MDMA von einer serotonergen Entleerung postulieren, konnte in unserem Labor keine Sensitivierung mit wiederholt applizierten niedrig dosiertem MDMA (5 mg/kg) gezeigt werden [165]. Ob die Verhaltenssensitivierung nun durch einen MDMA-neurotoxisch bedingten 5-HT-Mangel oder (subtoxisch) über supersensitive 5-HT_{1B}-Rezeptoren⁴⁵ vermittelt wird, Serotonin spielt eine essentielle Rolle in der Regulation der dopaminergen Neurotransmission. Sensitivierungsbedingte Modulation des Serotoninsystems hätte das Potential, die beobachtete Erhöhung der accumbalen DA-Konzentrationen zu bewirken. Für eine 5-HT_{1B}-vermittelte regioselektive Aktivierung der mesoaccumbalen dopaminergen Aktivität sprechen ebenfalls Befunde aus der Arbeitsgruppe um René Hen: Während in 5-HT_{1B}-Knockout-Mäusen die basalen DA-Level im dorsalen Striatum unverändert gewesen sind, wurden im NAcc erhöhte basale DA-Konzentrationen gemessen; eine Cocain-Gabe führte zwar in beiden Tiergruppen zu einer gleichwertigen

⁴⁵ ... welche auf den GABAergen Terminalen im VTA lokalisiert sind und die dopaminergen Neurone indirekt enthemmen [185]. Arbeiten der Arbeitsgruppe Hen zeigen ebenfalls eine wichtige Rolle der 5-HT_{1B}-Rez. für die mesoaccumbale DA-Neurotransmission [255;288].

relativen Erhöhung des extrazellulären DA, im NAcc von Knockout-Tieren waren aber trotzdem signifikant höhere Netto-DA-Konzentrationen gemessen worden [288].

Nicht zuletzt kann auch das beobachtete erniedrigte Noradrenalin für die erhöhten Dopamin-Konzentrationen im Nucleus Accumbens mitverantwortlich sein:

Es wurde gefunden, dass α_2 -Rezeptoren, welche auf zahlreichen Axonendigungen als präsynaptische Heterorezeptoren lokalisiert sind [298], die Tyrosinhydroxylase- und Tryptophanhydroxylaseaktivität modulieren [76] und die Freisetzung von Dopamin und Serotonin herabsetzen können [307;308]. Ein verminderter NA-Tonus an diesen Heterorezeptoren könnte also zu einer DA-Überaktivität führen. In anderen Experimenten wurde bereits gezeigt, dass eine α_2 -Rezeptor-Blockade antikataleptisch wirkt [263] und die Dopamin-Syntheserate steigert [267]; ein Mechanismus, welcher aber wahrscheinlich über eine Enthemmung der Locus Coeruleus-Neurone führt und zu einer Überaktivität von NA im Cortex.

Die α_2 -Rezeptoren sind jedoch in Zusammenhang mit wiederholter MDMA-Gabe noch nicht untersucht worden, kompensatorische Aufregulation wäre prinzipiell möglich, da MDMA sowohl starke Bindungsaffinität (wahrscheinlich antagonistisch) zum α_2 -Rezeptor [24] besitzt, als auch in großem Maße zur NA-Freisetzung führt [261]. Selektive NA-Wiederaufnahmehemmer (SNRI) desensitivieren jedoch bei wiederholter Gabe die α_2 -Rezeptoren (vgl. SSRI, welche die 5-HT_{1A}-Rezeptoren desensitivieren) [78]. Wiederholte MDMA-Administration führt im Vergleich zu den SSRI ebenfalls zu einer 5-HT_{1A}-Rezeptor-down-Regulation im Hippocampus und Hirnstamm, jedoch zu einer up-Regulation im Cortex und Hypothalamus [10;11]: Ähnliche Effekte könnte man auch bei den α_2 -Rezeptoren erwarten. Es werden dringend neue Daten zu diesem Problem benötigt, um einen möglichen Einfluss von NA auf die MDMA-Sensitivierung und damit verbundene neurochemische Effekte näher zu beleuchten.

In erster Linie verblüffend ist jedoch die wiederum selektive Hypoaktivität von NA im NAcc bei MDMA-behandelten Tieren. Ein Grund für diese Regioselektivität könnte der Umstand sein, dass das Vorderhirn von zwei noradrenergen Neuron-Subpopulationen innerviert wird. Es gibt Hinweise darauf, dass der NAcc hauptsächlich von den tegmental-noradrenergen Zellgruppen A1 und insbesondere A2 (gelegen im Nucleus tractus solitarius) afferent noradrenerg innerviert wird und der LC lediglich rostrale Gebiete des NAcc versorgt [68]. Dieser Mangel an NA könnte als Resultat regulatorischer Prozesse entstehen (z.B. Hemmung der A2-Aktivität durch den LC) oder ebenfalls neurotoxischen Ursprungs sein: Eine ältere

Studie (u.a. mit Ratten) [59] zeigt eine eindeutige Ausweitung der Neurotoxizität von MDMA auch auf dopaminerge und noradrenerge Neurone bei höheren Dosierungen⁴⁶. Ein Vergleich mit anderen Arbeiten ist kaum möglich, weil meistens in anderen Gebieten gemessen wurde [139;149;189].

In striatalen Arealen (NAcc, CPu) gibt es also Anzeichen für eine Catecholamin-Dysregulation, welche wahrscheinlich durch den abgeschwächten modulatorischen Einfluss von Serotonin hervorgerufen wird. Diese Veränderungen in der dopaminergen Neurotransmission könnten in erster Linie verantwortlich sein für Veränderungen im Verhalten und die Pathogenese psychiatrischer Komplikationen als Langzeitfolgen übermäßigen MDMA-Gebrauchs. Unterstützt wird dieser Verdacht durch die Ergebnisse der Verhaltensbeobachtung: Bei mehrere Tage andauernder, intermittierender MDMA-Behandlung kommt es zu einer ausgeprägten Sensitivierung der Verhaltenseffekte von MDMA (siehe 6.2.2.1.), welche wahrscheinlich durch eine biochemische Sensitivierung (DA-Überfunktion im NAcc) begründet ist.

Die beobachteten Veränderungen in NA-Konzentrationen im Vorderhirn und eine potentiell neuroprotektive Rolle von NA in Tiermodellen des Morbus Parkinson (s.o.) führte uns zu der Idee, die MDMA-induzierte Neurotoxizität in Tieren mit lädiertem Locus Coeruleus zu untersuchen. Hierzu wurde die Substanz DSP-4 verwendet, deren entscheidender Vorteil es ist, dass sie nach i.p.-Injektion die Blut-Hirn-Schranke passiert, im ZNS selektiv in noradrenerge Neurone des LC aufgenommen wird und diese schädigt [93;259;260]. DSP-4 muss jedoch relativ zügig gelöst und injiziert werden, da das sich in wässriger Lösung (MAO-abhängig [116]) sehr schnell bildende Aziridinium-Kation ($t_{1/2} = 7$ min bei pH 7,4), welches den wirksamen Metaboliten darstellt, wegen seiner Ladung nicht die Blut-Hirn-Schranke passieren kann und dann nur an peripheren noradrenergen Axonen wirkt [330]. Aus diesem Grund wurde DSP-4 unmittelbar nach dem Lösen injiziert (Latenz < 1 min: garantierte Anreicherung des Prodrugs DSP-4 im ZNS), und zur Kontrolle der Läsion wurden die NA-Konzentrationen in den relevanten Hirnarealen gemessen: Im PFC waren die NA-

⁴⁶ Leider wurde nicht der NAcc untersucht; im Striatum war NA generell nicht nachweisbar, DA war 2 Wochen nach Behandlungsende signifikant erniedrigt bei der Höchstdosis MDMA (8x40 mg/kg alle 12 h), NA war im Hippocampus und Cortex leicht erniedrigt bereits bei niedrigeren Dosierungen (8x10 mg/kg, alle 12 h) und stark erniedrigt bei der Höchstdosierung.

Konzentrationen stark vermindert. Im NAcc waren die NA-Konzentrationen eher erhöht (vor allem bei Tieren, die nach der DSP-Läsion nur Vehikel erhielten, im Gegensatz zu später MDMA-behandelten Tieren), im dorsalen Striatum und DRN unverändert. Nun finden sich zwar geringe Mengen an NA in dorsostriatalen Homogenaten, immunhistochemische Färbungen zeigen jedoch im dorsalen Striatum keine noradrenergen Zellkörper oder Fasern: Das wenige Noradrenalin muss also durch Diffusion aus benachbarten Hirnkernen stammen (es gibt überdies neuere Hinweise, dass eine Volumentransmission statt einer monosynaptischen Neurotransmission die vorherrschende Form der Informationsübertragung im ZNS darstellt, insbesondere die monoaminergen Neurotransmitter betreffend [332]). Die (ventral) benachbarten Hirnkerne scheinen vorwiegend durch die A1- und A2- Kerne NA-innerviert zu sein [67;68], welche für DSP-4 nicht vulnerabel sind. Der DRN wird zwar durch den LC innerviert, trotzdem ist auch anderswo bei DSP-4-Läsion keine Schädigung der noradrenergen Fasern im DRN beobachtet worden [88]. Die noradrenerge Entleerung im PFC betrug etwa 50 – 70 %, was durchaus im Normbereich des Ausmaßes einer DSP-4 Läsion liegt (starke Entleerung findet v.a. im Hip statt oder im Cortex durch eine selektive operative Läsion des dorsalen noradrenergen Bündels [67;93;264]).

Im NAcc ist die NA-Konzentration bei MDMA-behandelten Tieren nicht wie beim vorhergehenden Versuchsteil abgefallen, jedoch waren die Versuchsbedingungen leicht unterschiedlich: Hier wurden die Tiere nur für max. 2 x 5 min MDMA-behandelt in die Verhaltens-Testapparatur gesetzt, wobei sie beim ersten Sensitivierungsversuch für insgesamt 45 min in das Open Field platziert wurden. Dies könnte einen erhöhten Stressfaktor bedeuten, welcher u.U. die Neurotoxizität verstärkt hat im Sinne einer „*Aggregationstoxizität*“ (Amphetamin wirkt toxischer bei Tieren, welche bei Behandlung in Gruppe, lauter Umgebung und Dehydratation verweilen [110]). Geringe Effekte sind jedoch zu sehen: Während DSP-4 bei naiv behandelten Tieren die NA-Werte im NAcc tendenziell erhöht ($t = 5,71$), ist die Erhöhung bei zusätzlich mit MDMA-behandelten Tieren nicht so deutlich. Es ist naheliegend, dass eine LC-Läsion zur Hyperaktivität der A2-Kerne führt, welche sich in erhöhten NA-Konzentrationen im NAcc zeigt; wenn die A2-Kerne zusätzlich durch MDMA geschädigt werden, gleichen sich die Effekte wieder aus.

Die DA-Parameter (DA, DOPAC, HVA) sind bei der Kombination von DSP-4 und MDMA-Behandlung ebenfalls stärker beeinträchtigt, obwohl zusammengefasst nur Tendenzen sichtbar sind. Dies deutet jedoch darauf hin, dass die neurotoxischen Effekte von MDMA in einem LC-lädierten Tier verstärkt auftreten können, da der neuroprotektive Effekt des LC auf dopaminerge Neurone entfällt (vgl. [93]).

Die durch MDMA verursachten bekannten neurotoxischen Effekte auf das Serotoninsystem sind voll entfaltet: Im PFC, CPU und NAcc sind die 5-HT und 5-HIAA-Konzentrationen stark erniedrigt, während im DRN die Konzentrationen nach wie vor unverändert sind. Eine defekte LC-NA-Innervation des Vorderhirns hat jedoch keinen Einfluss auf die neurotoxischen Effekte von MDMA - das Ausmaß der 5-HT-Entleerung ist vergleichbar mit intaktem LC. Dies bedeutet, dass der LC im MDMA-Neurotoxizitäts-Mechanismus nicht involviert ist, wie aus DA-Neurotoxizität des METH und MPTP bekannt ist. Der Mechanismus selbst dieser neuroprotektiven Wirkung des LC-NA ist noch unbekannt, und es kann nur spekuliert werden: da der DRN ebenfalls durch die Zellgruppen A1 und A2 innerviert wird und die NA-Innervation durch DSP-4 nicht abgeschwächt wird, könnte man annehmen, dass hier ganz andere Mechanismen zum Tragen kommen. Um Klarheit zu erhalten, müssen jedoch weiterführende Experimente durchgeführt werden, beispielsweise selektive (und auch kombinierte) Läsionen der separaten noradrenergen Bündel, um eine mögliche Beteiligung anderer Kerne in der serotonergen Neurotoxizität zu verifizieren.

Generell werden auch eine Reihe weiterer Experimente nötig sein, um den Versuch auch in die Tat umzusetzen, den Mechanismus der MDMA-induzierten Neurotoxizität der dünnen, aufsteigenden, serotonergen Nervenfasern des DRN zu charakterisieren. So sind weitere Faktoren u.U. wichtig – beispielsweise die MDMA-induzierte Hyperthermie, welche hier jedoch absichtlich nicht untersucht wurde, um die Stressor-Belastung der Tiere während der empfindlichen Verhaltensversuche zu minimieren. Die Körper-Temperatur scheint zur Neurotoxizität beizutragen, jedoch wird sie nur die Rolle eines Modulators haben: Z.B. besitzt das N-ethyl-Derivat des MDMA (MDE) nur etwa $\frac{1}{4}$ der neurotoxischen Potenz bei $\frac{1}{2}$ rectalem Temperaturanstieg [56]. Darüber hinaus gibt es auch andere nicht erklärte Phänomene: Bei der Maus wird das serotonerge System (im Gegensatz zum dopaminergen) nicht geschädigt [25], *in utero* kommen ebenfalls keine neurotoxischen Effekte von MDMA zustande [57].

8. Zusammenfassende Diskussion

In dieser Arbeit wurden die akuten Wirkungen und Langzeiteffekte des ringsubstituierten Amphetamins MDMA („Ecstasy“) untersucht. Der Schwerpunkt dieser Untersuchung lag auf den neurotoxischen Effekten der Substanz sowie der näheren Betrachtung seines Suchtpotentials. Nichtsdestotrotz wurde in Vorversuchen ebenfalls die akute Wirkung von MDMA auf das Verhalten im Open Field sowie im Tiermodell der Katalepsie untersucht.

Dieser (letztere) Versuch zeigte eine deutliche dosisabhängige antikataleptische Wirkung von MDMA in der Haloperidol-induzierten Katalepsie. Der genaue Mechanismus ist unklar: Da ein dopaminerges Mechanismus im Vergleichsexperiment mit dem stärker DA-freisetzenden MDA, sowie ein rein serotonerges Mechanismus mit dem rein 5-HT-freisetzenden MBDB nahezu ausgeschlossen werden kann [278], kommen vielmehr komplexere Mechanismen in Frage. Untersuchungen mit den Enantiomeren von MDMA [278], welche in ihrem molekularen Wirkmechanismus stark divergieren (S-MDMA ist potenter an SERT und der stärkere DA-Freisetzer, während R-MDMA am 5-HT₂-Rezeptor wirken soll [187;205]), zeigen leichte antikataleptische Wirkung bei beiden Enantiomeren, das Racemat antagonisiert die Haloperidol-Wirkung jedoch supraadditiv. Dies deutet daraufhin, dass MDMA sich zweier Wirkmechanismen bedient, welche in der antikataleptischen Wirkung synergistisch zusammenarbeiten.

Versuche zu Langzeitwirkungen von MDMA zeigen, dass bereits eine einmalige Injektion einer hohen MDMA-Dosis zu langfristigen Veränderungen im Verhalten führt. So bewirkt die Gabe von MDMA eine langfristig erhöhte lokomotorische Aktivität im Open Field, erniedrigte Serotonin-Parameter im PFC und anterioren Striatum, jedoch einen erhöhten 5-HT-Umsatz in diesen Hirnarealen. Der erhöhte Serotonin-Umsatz könnte ein Zeichen für Kompensationsprozesse sein bzw. für Bestrebungen des Organismus, eine Regeneration der 5-HT-Gehalte zu bewirken. Tatsächlich wurden in immunhistochemischen Färbungen von Apoptoseproteinen kurzfristig erhöhte Expression der Proteine Bax und Bcl-2 gefunden, das antiapoptotische Protein Bcl-2 war insbesondere exprimiert in axonalen Strukturen sowie in Zellen des dorsoanterioren Striatums. Es scheinen apoptotische Prozesse mit involviert zu sein im Mechanismus der MDMA-Neurotoxizität [290;303] und die Induktion des Bcl-2-Proteins könnte hier eine neuroprotektive Rolle übernehmen. Die starke Überexpression des induzierbaren Transkriptionsfaktors c-Fos kommt wahrscheinlich durch Aktivierung der D₁-

und 5-HT₂-Rezeptoren durch freigesetztes DA und 5-HT oder durch direkte Wirkung von MDMA am 5-HT₂-Rezeptor zustande.

Eine bereits berichtete biphasische Wirkung von MDMA auf die 5-HT-Gehalte in Gehirnhomogenaten [270] wurde hier auch bestätigt; ferner sind biphasische Effekte ebenfalls immunhistochemisch zu beobachten: Zum einen zeigen MDMA-behandelte Tiere 48 h nach Injektion eine serotonerge Entleerung sogar im Ursprungsgebiet der serotonergen Fasern, dem DRN. Die Zellkörper erholen sich jedoch schnell wieder vom 5-HT-Defizit, ein Phänomen, welches auch in neurochemischen Untersuchungen beobachtet wurde und eine Fähigkeit der serotonergen Neurone zur Regeneration zeigt (s.u.). Zum anderen sind biphasische Effekte auch in der Fos-Expression zu sehen. Auf die starke Fos-Überexpression während der Akutwirkung folgt ein „rebound“-Effekt als Langzeitfolge: Zwei Wochen nach MDMA-Gabe ist die Zahl Fos-reaktiver Kerne in weiten Teilen des (DRN-innervierten) Gehirns verringert. Diese verminderte Fos-Expression kann nur schwer über einen direkten Mangel an 5-HT in diesen Gebieten erklärt werden, da neurochemische Daten nur einen geringen Abfall der 5-HT-Konzentrationen bei dieser MDMA-Dosierung zeigen, und dann auch nur in manchen Gehirnarealen. Vielmehr rührt dieser Aktivitätsmangel von einer generell erniedrigten Aktivität der serotonergen DRN-Neurone her, welche im Normalfall exzitatorisch durch Afferenzen vor allem aus der lateralen Habenula angetrieben werden. Erniedrigte Aktivität der LHb selbst kann verantwortlich sein für eine schwächere Aktivität der serotonergen Neurone des DRN. Dieses Phänomen könnte - kombiniert mit dem Zusammenhang der LHb und dem Auftreten von Depression - von Wichtigkeit sein für die Entwicklung eines depressiven Syndroms als Langzeitfolge exzessiven MDMA-Konsums [17;197;306]. Die LHb wird als Link zwischen limbischen und striatalen Vorderhirn angesehen und wirkt diesbezüglich aktivierend auf monoaminerge Systeme des Hirnstamms und des Mittelhirns [136;266].

Im Übrigen zeigt nur ein kleiner Anteil der serotonergen Neurone im DRN eine c-Fos-Immunreaktivität. Während der MDMA-Akutwirkung sind wahrscheinlich GABAerge Interneurone im DRN überaktiv und hemmen im Rahmen einer Feedback-Schleife die serotonergen Neurone. Die Fos-Hypoexpression zwei Wochen nach Abklingen der MDMA-Wirkung scheint jedoch, wie erwähnt, vor allem die serotonergen Neurone eines Subareals des DRN zu betreffen, was neben der verringerten serotonergen Funktion (s.o.) auch darauf hindeutet, dass bereits eine einmalige MDMA-Injektion eine langfristig veränderte Genexpression in serotonergen Zellkörpern bewirken kann, obwohl auch eine subchronische, hoch dosierte MDMA-Behandlung nicht zu einer Serotoninentleerung im DRN führt.

Wenn die MDMA-Administrationsrate erhöht wird, sind aber im serotonerg innervierten Vorderhirn stärkere neurotoxische Effekte sichtbar: Im PFC und in striatalen Gebieten ist eine starke Entleerung serotonerger Konzentrationen sichtbar. In stark serotonerg innervierten Regionen ist zudem eine Regeneration der 5-HT-Gehalte innerhalb von zwei Wochen messbar. Regenerationsprozesse, insbesondere ein erneutes Aussprossen der beschädigten serotonergen Axonfasern, wurden bereits beobachtet, jedoch erfolgte dies in unphysiologischer Weise und kann dadurch also keineswegs die Langzeiteffekte im Verhalten kompensieren [83].

Parallel zur 5-HT-Entleerung wurde bei der subchronischen Gabe von MDMA neben einem transienten Abfall von Dopaminparametern im dorsalen Striatum eine dauerhafte Erhöhung der DA- und DOPAC-Konzentrationen im NAcc beobachtet. Es wäre eine Dysregulation der dopaminergen Neurotransmission durch Veränderung der 5-HT- und NA-Gehalte im NAcc denkbar, jedoch wurde die DA-Erhöhung bei auf MDMA sensitivierten Tieren beobachtet – daher ist ein Effekt der MDMA-Sensitivierung durchaus als primäre Ursache möglich. In der Sensitivierungsforschung geht man davon aus, dass der Verhaltenssensitivierung eine neurochemische Sensitivierung insofern zugrunde liegt, als dass bestimmte neuronale Bahnen, u.a. auch die mesoaccumbale dopaminerge Projektion, in sensitivierten Tieren verstärkt vorliegen, wodurch eine Gabe des Suchstoffes in einem sensitivierten Tier zu einer höheren DA-Freisetzung im NAcc führt [138;228]. In diesem Versuch sind die DA-Konzentrationen jedoch bereits basal erhöht. Diese Eigenschaft könnte in Zusammenhang stehen mit der durch MDMA-Sensitivierung induzierten Supersensitivität der 5-HT_{1B}-Rezeptoren, welche auf GABAergen Terminalen im VTA lokalisiert sind [185]. Arbeiten mit genetisch ausgeschaltetem 5-HT_{1B}-Rezeptor unterstützen diese Hypothese, da bei diesen Tieren ebenfalls regioselektiv die basalen accumbalen DA-Konzentrationen erhöht sind [288].

Wie bereits erwähnt, induzierte eine intermittierende MDMA-Behandlung eine Verhaltenssensitivierung. Diese Sensitivierung der MDMA-induzierten Hyperlokomotion könnte zwar neurotoxischen Ursprungs sein, jedoch spricht dagegen, dass in Noradrenalin-entleerten Tieren (durch DSP-4-Gabe) keine Verstärkung der Neurotoxizität, jedoch eine völlige Blockade der Entwicklung der Verhaltenssensitivierung eingetreten war. Eine neuroprotektive Wirkung von LC-NA wird zur Zeit intensiv erforscht als möglicher Therapieansatz bei der Parkinson-Erkrankung [93]. Eine essentielle Rolle in der Entwicklung der Sensitivierung auf die wiederholte Gabe von Psychostimulantien war bislang nicht

bekannt, es könnte sich hierbei jedoch um einen im PFC lokalisierten Mechanismus handeln, wobei über $\alpha 1$ -Rezeptoren die fokussierte Aufmerksamkeit und indirekt die mesoaccumbale dopaminerge Aktivität positiv moduliert werden könnten [18;63]. Ferner konnte im Platzkonditionierungsversuch parallel ebenfalls eine Verhaltenssensitivierung mit geringen, nicht-neurotoxischen Dosierungen von MDMA induziert werden. Die robuste, in mehreren Laboratorien und Versuchsdesigns reproduzierbare Entwicklung der Verhaltenssensitivierung ist von großer Bedeutung, weil die Sensitivierung als der essentielle Mechanismus der Suchtentstehung und der Entstehung der Amphetamin-Psychose angesehen wird [252;253] - beides also teils vermutete, teils bewiesene Langzeiteffekte eines MDMA-Konsums auch beim Menschen. Es wurde auch bereits gezeigt, dass MDMA-sensitivierete Tiere eine erhöhte Vulnerabilität gegenüber den suchtinduzierenden Wirkungen von Cocain zeigen [129].

Als ein besonderes Merkmal ist es im Rahmen dieser Arbeit gelungen zu zeigen, dass für die MDMA-induzierte Verhaltenssensitivierung eine intakte LC-noradrenerge Innervation des Vorderhirns essentiell ist. Diese Bedingung könnte ebenfalls für andere Psychostimulantien gelten und möglicherweise einen vielversprechenden Therapieansatz der Sucht mit klinischer Relevanz darstellen.

Im Platzkonditionierungsversuch konnte das Suchtpotential weiter charakterisiert werden. Insbesondere konnte gezeigt werden, dass die Craving-induzierenden Effekte von MDMA stark von Umgebungsfaktoren abhängen, welche auf das Individuum einwirken. Die Arbeitsgruppen um Piazza und Wolffgramm konnten bereits zeigen, dass weniger das genetische Profil des Individuums, sondern vielmehr die epigenetischen Faktoren (Stress, soziale Umgebung) wichtig sind für die Suchtentstehung [48;324]. In der hier vorliegenden Arbeit konnte erfolgreich gezeigt werden, dass die soziale Umgebung ebenfalls bei MDMA-Konsum für die Entwicklung, Aufrechterhaltung und Rückfall in das durch sekundäre Stimuli (Kontext) assoziierte Craving von primärer Bedeutung ist. Wenn man bedenkt, dass MDMA ein antisoziales Verhalten induzieren kann [85] (vgl. auch [232]), gewinnt der soziale Faktor bei der Suchtentstehung eine besondere Bedeutung, da die Substanz in einer positiven Rückkopplung ihre langfristig suchtinduzierenden und antisozialen Wirkkomponenten drastisch verstärken könnte.

Zweifelsohne sind die Suchtwirkung und die neurotoxische Wirkung von MDMA auf serotonerge Neurone (und bei ausreichend hoher Dosierung ebenfalls auf die katecholaminergen Neurone) nicht zu unterschätzen. Ergebnisse aus Arbeiten zur

„Aggregationstoxizität“ von Amphetaminen zeigen jedoch, dass Faktoren wie die Umgebung in welcher die Droge eingenommen wird einen großen Einfluss auf die Art der Langzeiteffekte haben können. Für MDMA müsste dieser Aspekt noch weiter untersucht werden; unsere Arbeiten haben diesbezüglich bereits den Versuch unternommen, die suchtsinduzierenden Wirkungen von MDMA in Zusammenhang mit dem sozialen Umfeld zu untersuchen. Unter Umständen könnte man annehmen, dass MDMA in genügend niedriger Dosierung und bei Beachtung der Umgebungsvariablen ein mögliches therapeutisches, insbesondere antiparkinsonoides Potential besitzt, welches jedoch keinesfalls zu einem unbedachten Einsatz als Therapeutikum führen darf. Die beschriebenen Wirkungen von MDMA im Tierversuch und im Menschen zwingen zu höchst kritischer Abwägung eines solchen Einsatzes. Jedoch ist es andererseits ebenfalls zwingend für die medizinische Forschung, die beschriebenen Wirkungen weiter zu erforschen und in präklinischen Experimenten die Suche nach dem antiparkinsonoiden Mechanismus fortzusetzen, und in Verbindung mit weiterer MDMA-bezogener Neurotoxizitäts- und Suchtforschung die Entwicklung einer neuen antiparkinsonoiden Wirkklasse auf der Basis von MDMA, jedoch ohne sein neurotoxisches und suchtsinduzierendes Potential, zu forcieren.

9. Anhang: Ausgewählte statistische Auswertungen

Vor allem platzintensive statistische Ergebnisse sind aus Gründen der Übersichtlichkeit in diesem Anhang zu finden. Dies sind insbesondere ANOVA-Auswertungen des Versuchs zur Verhaltenssensitivierung I und II sowie Auswertungen zur neurochemischen Analytik. In den Tabellen werden Verweise zum jeweiligen Ergebniskapitel angegeben.

9.1. Verhaltenssensitivierung

Tabelle 9.1.: Statistische Daten zur Verhaltenssensitivierung Teil I, **Versuchstag 1-10.** 3-faktorielle repeated measures ANOVA. Faktor A = Behandlung [VEH, MDMA]; B = Versuchstag [1, 10]; C = Zeit im Open Field [0 – 45 min]. (Kap. 6.2.2.1.)

FAKTOR	df	F=	p=
WEG, Phase 1 (unbehandelt, 15 min):			
Faktor Versuchstag	1, 30	85,53	< 0,0001
Faktor Zeit	2, 60	98,63	< 0,0001
Faktor Behandlung x Zeit	2, 60	4,38	0,017
Faktor Versuchstag x Zeit	2, 60	11,02	< 0,0001
LAUFZEIT, Phase 1 (unbehandelt, 15 min):			
Faktor Versuchstag	1, 30	64,51	< 0,0001
Faktor Zeit	2, 60	99,08	< 0,0001
Faktor Behandlung x Zeit	2, 60	3,86	0,026
Faktor Versuchstag x Zeit	2, 60	4,45	0,016
AUFRIHTUNGEN, Phase 1 (unbehandelt, 15 min):			
Faktor Versuchstag	1, 30	97,70	< 0,0001
Faktor Behandlung	1, 30	7,03	0,013
Faktor Zeit	2, 60	33,48	< 0,0001
Faktor Behandlung x Zeit	2, 60	5,87	0,005
Faktor Versuchstag x Zeit	2, 60	6,70	0,002
WEG, Phase 2 (Vehikel oder MDMA, 30 min):			
Faktor Behandlung	1, 30	218,97	< 0,0001
Faktor Versuchstag	1, 30	42,28	< 0,0001
Faktor Behandlung x Versuchstag	1, 30	49,43	< 0,0001
Faktor Zeit	5, 150	27,50	< 0,0001
Faktor Behandlung x Zeit	5, 150	56,61	< 0,0001
Faktor Versuchstag x Zeit	5, 150	17,69	< 0,0001
Faktor Behandlung x Versuchstag x Zeit	5, 150	21,06	< 0,0001
LAUFZEIT, Phase 2 (Vehikel oder MDMA, 30 min):			
Faktor Behandlung	1, 30	803,00	< 0,0001
Faktor Behandlung x Versuchstag	1, 30	5,33	0,028
Faktor Zeit	5, 150	21,14	< 0,0001
Faktor Behandlung x Zeit	5, 150	74,98	< 0,0001
Faktor Behandlung x Versuchstag x Zeit	5, 150	3,43	0,006
AUFRIHTUNGEN, Phase 2 (Vehikel oder MDMA, 30 min):			
Faktor Behandlung	1, 30	45,94	< 0,0001
Faktor Versuchstag	1, 30	63,06	< 0,0001
Faktor Behandlung x Versuchstag	1, 30	62,66	< 0,0001
Faktor Zeit	5, 150	2,32	0,046
Faktor Behandlung x Zeit	5, 150	10,78	< 0,0001
Faktor Versuchstag x Zeit	5, 150	16,13	< 0,0001
Faktor Behandlung x Versuchstag x Zeit	5, 150	15,77	< 0,0001

Tabelle 9.2.: Statistische Daten zur Verhaltenssensitivierung Teil I, **Versuchstag 11.** 2-faktorielle repeated measures ANOVA. Faktor A = Behandlung [VEH, MDMA]; B = Zeit im Open Field [0 – 45 min]. (Kap. 6.2.2.1.)

FAKTOR	df	F=	p=
WEG, Phase 1 (unbehandelt, 15 min):			
Faktor Zeit	2, 56	45,74	< 0,0001
Faktor Behandlung x Zeit	2, 56	7,65	0,0012
LAUFZEIT, Phase 1 (unbehandelt, 15 min):			
Faktor Zeit	2, 56	42,27	< 0,0001
Faktor Behandlung x Zeit	2, 56	4,14	0,021
AUFRICHTUNGEN, Phase 1 (unbehandelt, 15 min):			
Faktor Zeit	2, 56	10,69	0,0001
Faktor Behandlung x Zeit	2, 56	2,86	0,065
WEG, Phase 2 (Vehikel, 30 min):			
Faktor Zeit	5, 140	9,72	< 0,0001
LAUFZEIT, Phase 2 (Vehikel, 30 min):			
Faktor Zeit	5, 140	8,04	< 0,0001
AUFRICHTUNGEN, Phase 2 (Vehikel, 30 min):			
Faktor Zeit	5, 140	5,47	0,0001

Tabelle 9.3.: Statistische Daten zur Verhaltenssensitivierung Teil I, **Versuchstag 18.** 2-faktorielle repeated measures ANOVA. Faktor A = Behandlung [VEH, MDMA]; B = Zeit im Open Field [0 – 45 min]. (Kap. 6.2.2.1.)

FAKTOR	df	F=	p=
WEG, Phase 1 (unbehandelt, 15 min):			
Faktor Zeit	2, 60	54,75	< 0,0001
LAUFZEIT, Phase 1 (unbehandelt, 15 min):			
Faktor Zeit	2, 60	58,80	< 0,0001
AUFRICHTUNGEN, Phase 1 (unbehandelt, 15 min):			
Faktor Zeit	2, 60	14,55	< 0,0001
WEG, Phase 2 (Vehikel, 30 min):			
Faktor Behandlung	1, 30	6,40	0,017
LAUFZEIT, Phase 2 (Vehikel, 30 min):			
Faktor Behandlung	1, 30	5,83	0,022
AUFRICHTUNGEN, Phase 2 (Vehikel, 30 min):			
Faktor Behandlung	1, 30	5,18	0,030
Faktor Zeit	5, 150	2,33	0,045
Faktor Behandlung x Zeit	5, 150	2,36	0,043

Tabelle 9.4.: Statistische Daten zur Verhaltenssensitivierung Teil II, 3-faktorielle repeated measures ANOVA. Faktor A = Behandlung [VEH, MDMA]; B = Läsion [SAL, DSP]; C = Zeit [Tag 1 – 10]. **(Kap. 6.2.2.2.)**

FAKTOR	df	F=	p=
OPEN FIELD			
FELDERWECHSEL:			
Faktor Behandlung	1, 76	65,33	< 0,0001
Faktor Behandlung x Läsion	1, 76	8,29	0,0052
Faktor Behandlung x Zeit	3, 228	7,90	0,0026
Faktor Läsion	1, 76	8,06	0,0058
Faktor Läsion x Zeit	3, 228	1,79	0,15
Faktor Behandlung x Läsion x Zeit	3, 228	3,42	0,018
IMMOBILITÄT			
Faktor Behandlung	1, 76	22,01	< 0,0001
Faktor Zeit	3, 228	5,51	0,011
AUFRICHTUNGEN			
Faktor Behandlung	1, 76	92,32	< 0,0001
HEAD-DIPS			
Faktor Läsion	1, 76	4,37	0,04
Faktor Behandlung x Zeit	3, 228	14,06	<0,0001
Faktor Zeit	3, 228	16,48	<0,0001
SCHNÜFFELBOX			
SCHNÜFFELN			
Faktor Behandlung	1, 76	82,19	< 0,0001
Faktor Läsion	1, 76	14,15	0,0003
Faktor Behandlung x Läsion	1, 76	4,54	0,036
DREHUNGEN			
Faktor Behandlung	1, 76	36,32	< 0,0001
Faktor Zeit	3, 228	13,57	<0,0001
Faktor Behandlung x Zeit	3, 228	15,39	<0,0001
FELLPFLEGE			
Faktor Behandlung	1, 76	128,8	< 0,0001
Faktor Läsion x Zeit	3, 228	4,52	0,0042

9.2. Neurochemische Untersuchungen

Tabelle 9.5: Statistische Daten zur Neurochemie-Analytik einmalig MDMA-vorbehandelter Tiere (mit intermediär wiederholter Niedrigdosis-MDMA-Behandlung während CPP-Konditionierung): Konzentrationen der Indolamine 5-HT, 5-HIAA. Statistik: Student's t-Test: *p<0,05; **p<0,01: Vergleich MDMA-Vorbehandlung mit Kontrolltieren.

è **Versuchsergebnisse 7.3.2.1.**

HIRNAREAL:	df	t=	p=
5-HT-Konzentrationen:			
PFC	14	nicht signifikant	
NAC	14	nicht signifikant	
CPu-anterior	14	2,32	0,036
CPu-posteromedial	12	nicht signifikant	
CPu-posterolateral	14	nicht signifikant	
5-HIAA-Konzentrationen:			
PFC	14	nicht signifikant	
NAC	14	nicht signifikant	
CPu-anterior	14	nicht signifikant	
CPu-posteromedial	12	nicht signifikant	
CPu-posterolateral	14	nicht signifikant	

Tabelle 9.6.: Statistische Daten zur Neurochemie-Analytik einmalig MDMA-vorbehandelter Tiere (mit intermediär wiederholter Niedrigdosis-MDMA-Behandlung während CPP-Konditionierung): Konzentrationen der Katecholamine und Metaboliten. Statistik: Student's t-Test: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$: Vergleich MDMA-Vorbehandlung mit Kontrolltieren.

è **Versuchsergebnisse 7.3.2.1.**

HIRNAREAL:	df	t=	p=
NA-Konzentrationen:			
PFC	14	nicht signifikant	
NAC	14	nicht signifikant	
CPu-anterior	14	nicht signifikant	
CPu-posteromedial	12	nicht signifikant	
CPu-posterolateral	14	nicht signifikant	
DA-Konzentrationen:			
PFC	14	nicht signifikant	
NAC	14	2,19	0,046
CPu-anterior	14	2,72	0,027
CPu-posteromedial	12	nicht signifikant	
CPu-posterolateral	14	nicht signifikant	
DOPAC-Konzentrationen:			
PFC	14	nicht signifikant	
NAC	14	nicht signifikant	
CPu-anterior	14	4,07	0,0286
CPu-posteromedial	12	nicht signifikant	
CPu-posterolateral	14	nicht signifikant	
HVA-Konzentrationen:			
PFC	14	nicht signifikant	
NAC	14	nicht signifikant	
CPu-anterior	14	3,01	0,0094
CPu-posteromedial	12	nicht signifikant	
CPu-posterolateral	14	nicht signifikant	

Tabelle 9.7.: Statistische Daten zur Neurochemie-Analytik subchronisch MDMA-vorbehandelter Tiere: Konzentrationen **5-HT, 5-HIAA**. 1-faktorielle ANOVA (Vergleich Kontrolltiere mit MDMA-behandelten Tieren 2 Wochen und 4 Wochen nach Behandlungsende). → **Versuchsergebnisse 7.3.2.2.**

HIRNAREAL:	df	F=	p=
5-HT-Konzentrationen:			
PFC	2, 27	59,1	< 0,0001
NAC	2, 27	21,4	< 0,0001
CPu-anterior	2, 27	10,2	0,0005
CPu-posteromedial	2, 27	12,93	0,0001
CPu-posterolateral	2, 27	10,74	0,0004
DRN	2, 27	n.s.	n.s.
5-HIAA-Konzentrationen:			
PFC	2, 27	19,2	< 0,0001
NAC	2, 27	38,95	< 0,0001
CPu-anterior	2, 27	27,5	<0,0001
CPu-posteromedial	2, 27	22,9	<0,0001
CPu-posterolateral	2, 27	12,55	0,0001
DRN	2, 27	n.s.	n.s.

Tabelle 9.8.: Statistische Daten zur Neurochemie-Analytik subchronisch MDMA-vorbehandelter Tiere: Konzentrationen der **Katecholamine und Metaboliten**. 1-faktorielle ANOVA (Vergleich Kontrolltiere mit MDMA-behandelten Tieren 2 Wochen und 4 Wochen nach Behandlungsende). ➔ **Versuchsergebnisse 7.3.2.2.**

HIRNAREAL:	df	F=	p=
NA-Konzentrationen:			
PFC	2, 27	nicht signifikant	
NAC	2, 27	8,81	0,0011
CPu-anterior	2, 27	nicht gemessen	
CPu-posteromedial	2, 27	nicht gemessen	
CPu-posterolateral	2, 27	nicht signifikant	
DRN	2, 27	nicht signifikant	
DA-Konzentrationen:			
PFC	2, 27	nicht signifikant	
NAC	2, 27	4,10	0,0279
CPu-anterior	2, 27	6,68	0,0044
CPu-posteromedial	2, 27	nicht signifikant	
CPu-posterolateral	2, 27	nicht signifikant	
DRN	2, 27	nicht signifikant	
DOPAC-Konzentrationen:			
PFC	2, 27	nicht signifikant	
NAC	2, 27	nicht signifikant	
CPu-anterior	2, 27	nicht signifikant	
CPu-posteromedial	2, 27	4,07	0,0286
CPu-posterolateral	2, 27	nicht signifikant	
DRN	2, 27	nicht signifikant	
HVA-Konzentrationen:			
PFC	2, 27	nicht signifikant	
NAC	2, 27	nicht signifikant	
CPu-anterior	2, 27	nicht signifikant	
CPu-posteromedial	2, 27	nicht signifikant	
CPu-posterolateral	2, 27	nicht signifikant	
DRN	2, 27	nicht gemessen	

Tabelle 9.9.: Statistische Daten zur Neurochemie-Analytik subchronisch MDMA-vorbehandelter Tiere mit/ohne DSP-4 Läsion: Konzentrationen **5-HT**, **5-HIAA**. 2-faktorielle ANOVA (Faktor A: Läsion; Faktor B: MDMA-Behandlung). **è Versuchsergebnisse 7.3.2.3.**

HIRNAREAL:	F(A)=	p=	F(B)=	p=	F(AxB)=	p=
5-HT-Konzentrationen:						
PFC		n.s.	$F_{1,27}=34,72$	<0,0001		n.s.
NAC		n.s.	$F_{1,27}=21,74$	<0,0001		n.s.
CPu-anterior		n.s.	$F_{1,27}=50,21$	<0,0001		n.s.
CPu-posteromedial	$F_{1,27}=5,38$	0,028	$F_{1,27}=47,61$	<0,0001		n.s.
CPu-posterolateral		n.s.	$F_{1,26}=20,10$	=0,0001		n.s.
DRN		n.s.		n.s.		n.s.
5-HIAA-Konzentrationen:						
PFC	$F_{1,27}=6,71$	0,015	$F_{1,27}=89,13$	<0,0001	$F_{1,27}=17,74$	0,0003
NAC		n.s.	$F_{1,27}=63,28$	<0,0001		n.s.
CPu-anterior		n.s.	$F_{1,27}=114,4$	<0,0001		n.s.
CPu-posteromedial		n.s.	$F_{1,27}=84,56$	<0,0001	$F_{1,27}=4,30$	0,048
CPu-posterolateral		n.s.	$F_{1,26}=87,14$	<0,0001		n.s.
DRN		n.s.		n.s.		n.s.

Tabelle 9.10.: Statistische Daten zur Neurochemie-Analytik subchronisch MDMA-vorbehandelter Tiere mit/ohne DSP-4 Läsion: Konzentrationen der Katecholamine **NA, DA, DOPAC, HVA**. 2-faktorielle ANOVA (Faktor A: Läsion; Faktor B: MDMA-Behandlung).
 ↳ Versuchsergebnisse 7.3.2.3.

HIRNAREAL:	F(A)=	p=	F(B)=	p=	F(AxB)=	p=
NA-Konzentrationen:						
PFC	$F_{1,27}=51,97$	<0,0001		n.s.		n.s.
NAC	$F_{1,27}=5,04$	0,033		n.s.		n.s.
CPu-anterior		n.s.		n.s.		n.s.
CPu-posteromedial		n.s.		n.s.		n.s.
CPu-posterolateral		n.s.		n.s.		n.s.
DRN		n.s.		n.s.		n.s.
DA-Konzentrationen:						
PFC		n.s.	$F_{1,27}=3,04$	n.s.(0,09)		n.s.
NAC		n.s.		n.s.		n.s.
CPu-anterior	$F_{1,27}=3,69$	n.s.(0,07)		n.s.		n.s.
CPu-posteromedial	$F_{1,27}=10,94$	0,027		n.s.		n.s.
CPu-posterolateral	$F_{1,26}=3,42$	n.s.(0,08)		n.s.		n.s.
DRN		n.s.		n.s.		n.s.
DOPAC-Konzentrationen:						
PFC		n.s.	$F_{1,27}=5,64$	0,025		n.s.
NAC	$F_{1,27}=4,74$	0,038		n.s.		n.s.
CPu-anterior		n.s.		n.s.		n.s.
CPu-posteromedial	$F_{1,27}=7,26$	0,012		n.s.		n.s.
CPu-posterolateral		n.s.		n.s.		n.s.
DRN		n.s.		n.s.		n.s.
HVA-Konzentrationen:						
PFC		n.s.		n.s.		n.s.
NAC		n.s.		n.s.		n.s.
CPu-anterior		n.s.		n.s.		n.s.
CPu-posteromedial	$F_{1,27}=4,41$	0,045		n.s.	$F_{1,27}=4,01$	n.s.(0,06)
CPu-posterolateral		n.s.		n.s.		n.s.
DRN	n.m.		n.m.		n.m.	

Tabelle 9.11.: Statistische Daten zur Neurochemie-Analytik subchronisch MDMA-vorbehandelter Tiere mit/ohne DSP-4 Läsion: **Turnoverdaten** von **DA** und **5-HT**. 2-faktorielle ANOVA (Faktor A: Läsion; Faktor B: MDMA-Behandlung; df=1,27). \bar{e} **Versuchsergebnisse 7.3.2.3.**

Hirnareal	Faktor A (DSP-4)	Faktor B (MDMA)	Faktor AxB (Kombination)
DOPAC/DA			
PFC	n.s.	n.s.	n.s.
NAC	$F_A(1,27)=3,59; (p=0,07)$	n.s.	n.s.
CPu-a	$F_A(1,27)=3,37; (p=0,08)$	n.s.	n.s.
CPu-pm	n.s.	n.s.	n.s.
CPu-pl	n.s.	n.s.	$F_{A,B}(1,27)=3,22; (p=0,08)$
DRN	n.s.	$F_B(1,27)=4,17; (p=0,051)$	n.s.
HVA/DA			
PFC	n.s.	n.s.	n.s.
NAC	n.s.	$F_B(1,27)=6,17; p=0,019$	$F_{A,B}(1,27)=3,96; (p=0,06)$
CPu-a	n.s.	n.s.	n.s.
CPu-pm	n.s.	n.s.	$F_{A,B}(1,27)=2,98; (p=0,096)$
CPu-pl	n.s.	n.s.	n.s.
DRN	HVA nicht gemessen		
5-HIAA/5-HT			
PFC	$F_A(1,27)=5,68; p=0,025$	n.s.	n.s.
NAC	n.s.	$F_B(1,27)=14,69; p<0,001$	n.s.
CPu-a	n.s.	n.s.	n.s.
CPu-pm	$F_A(1,27)=3,54; (p=0,07)$	$F_B(1,27)=8,18; p=0,008$	n.s.
CPu-pl	n.s.	n.s.	n.s.
DRN	n.s.	$F_B(1,27)=12,47; p=0,0015$	n.s.

10. Literaturverzeichnis

- [1] DUDEN Fremdwörterbuch, Dudenverlag, Mannheim, 1990.
- [2] Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie, BI-Wiss.-Verlag, Mannheim, Leipzig, Zürich, 1992.
- [3] Amphetamine and its analogs: psychopharmacology, toxicology, and abuse, Academic Press, San Diego, 1994.
- [4] The IUPHAR compendium of receptor characterisation and classification, The Burlington Press, Foxton, Cambridge, 1998.
- [5] 2000 Receptor & ion channel nomenclature supplement, Current Trends, London, UK, 2000.
- [6] Rauschgift-Jahresbericht. 2000. Wiesbaden, Bundeskriminalamt.
- [7] Betäubungsmittelgesetz (BtMG). In Cyran,W (Ed.), Apothekenvorschriften in Baden Württemberg Deutscher Apothekerverlag, Stuttgart, 2001.
- [8] The Nobel Prize in Physiology or Medicine 2000. 2002. <http://www.nobel.se/medicine/laureates/2000/index.html>, The Nobel Foundation.
- [9] Aghajanian,G.K., Marek,G.J., Serotonin and hallucinogens, Neuropsychopharmacology, 21 (1999) 16S-23S.
- [10] Aguirre,N., Ballaz,S., Lasheras,B., Del Rio,J., MDMA ('Ecstasy') enhances 5-HT1A receptor density and 8-OH-DPAT-induced hypothermia: blockade by drugs preventing 5-hydroxytryptamine depletion, Eur. J Pharmacol., 346 (1998) 181-188.
- [11] Aguirre,N., Frechilla,D., Garcia-Osta,A., Lasheras,B., Del Rio,J., Differential regulation by methylenedioxymethamphetamine of 5- hydroxytryptamine1A receptor density and mRNA expression in rat hippocampus, frontal cortex, and brainstem: the role of corticosteroids, J Neurochem., 68 (1997) 1099-1105.
- [12] Ahmed,S.H., Stinus,L., Le Moal,M., Cador,M., Social deprivation enhances the vulnerability of male Wistar rats to stre, Psychopharmacology (Berl), 117 (1995) 116-124.

-
- [13] Aizman,O., Brismar,H., Uhlen,P., Zettergren,E., Levey,A.I., Forssberg,H., Greengard,P., Aperia,A., Anatomical and physiological evidence for D1 and D2 dopamine receptor colocalization in neostriatal neurons, *Nat. Neurosci*, 3 (2000) 226-230.
- [14] Albin,R.L., Young,A.B., Penney,J.B., The functional anatomy of basal ganglia disorders, *Trends Neurosci*, 12 (1989) 366-375.
- [15] Alexander,G.E., DeLong,M.R., Strick,P.L., Parallel organization of functionally segregated circuits linking basal ganglia and cortex, *Annu. Rev Neurosci*, 9 (1986) 357-381.
- [16] Amaral,D.G., Sinnamon,H.M., The locus coeruleus: neurobiology of a central noradrenergic nucleus, *Progress in Neurobiology*, 9 (1977) 147-196.
- [17] Amat,J., Sparks,P.D., Matus-Amat,P., Griggs,J., Watkins,L.R., Maier,S.F., The role of the habenular complex in the elevation of dorsal raphe nucleus serotonin and the changes in the behavioral responses produced by uncontrollable stress, *Brain Res.*, 917 (2001) 118-126.
- [18] Aston-Jones,G., Rajkowski,J., Cohen,J., Locus coeruleus and regulation of behavioral flexibility and attention, *Prog. Brain Res.*, 126 (2000) 165-182.
- [19] Ball,J., Current advances in Parkinson's disease, *Trends Neurosci*, 24 (2001) 367-369.
- [20] Bankson,M.G., Cunningham,K.A., 3,4-Methylenedioxymethamphetamine (MDMA) as a unique model of serotonin receptor function and serotonin-dopamine interactions, *J Pharmacol. Exp. Ther.*, 297 (2001) 846-852.
- [21] Bardo,M.T., Bevins,R.A., Conditioned place preference: what does it add to our preclinical understanding of drug reward?, *Psychopharmacology (Berl)*, 153 (2000) 31-43.
- [22] Bassareo,V., Di Chiara,G., Differential responsiveness of dopamine transmission to food-stimuli in nucleus accumbens shell/core compartments, *Neuroscience*, 89 (1999) 637-641.
- [23] Basura,G.J., Walker,P.D., Serotonin 2A receptor regulation of striatal neuropeptide gene expression is selective for tachykinin, but not enkephalin neurons following dopamine depletion, *Brain Res. Mol. Brain Res.*, 92 (2001) 66-77.
- [24] Battaglia,G., Brooks,B.P., Kulsakdinun,C., De Souza,E.B., Pharmacologic profile of MDMA (3,4-methylenedioxymethamphetamine) at various brain recognition sites, *Eur. J Pharmacol.*, 149 (1988) 159-163.

-
- [25] Battaglia,G., Yeh,S.Y., De Souza,E.B., MDMA-induced neurotoxicity: parameters of degeneration and recovery of brain serotonin neurons, *Pharmacol. Biochem. Behav.*, 29 (1988) 269-274.
- [26] Battaglia,G., Yeh,S.Y., O'Hearn,E., Molliver,M.E., Kuhar,M.J., De Souza,E.B., 3,4-Methylenedioxyamphetamine and 3,4-methylenedioxyamphetamine destroy serotonin terminals in rat brain: quantification of neurodegeneration by measurement of [3H]paroxetine-labeled serotonin uptake sites, *J Pharmacol. Exp. Ther.*, 242 (1987) 911-916.
- [27] Beal,M.F., Martin,J.B., Topographical dopamine and serotonin distribution and turnover in rat striatum, *Brain Research*, 358 (1985) 10-15.
- [28] Beardsley,P.M., Balster,R.L., Harris,L.S., Self-administration of methylenedioxyamphetamine (MDMA) by rhesus monkeys, *Drug Alcohol Depend.*, 18 (1986) 149-157.
- [29] Beese,G. Langzeiteffekte von MDMA bei dopaminerg vermitteltem Verhalten in der Ratte. 1999. Fakultät für Biologie der Universität Tübingen. Diplomarbeit.
- [30] Benloucif,S., Galloway,M.P., Facilitation of dopamine release in vivo by serotonin agonists: studies with microdialysis, *Eur. J. Pharmacol.*, 200 (1991) 1-8.
- [31] Bilsky,E.J., Hubbel,C.L., Delconte,J.D., Reid,L.D., MDMA produces a conditioned place preference and elicits ejaculation in male rats: a modulatory role for the endogenous opioids, *Pharmacol Biochem Behav*, 40 (1991) 443-447.
- [32] Bilsky,E.J., Hui,Y.Z., Hubbel,C.L., Reid,L.D., Methylenedioxyamphetamine's capacity to establish place preferences and modify intake of an alcoholic beverage, *Pharmacol Biochem Behav*, 37 (1990) 633-638.
- [33] Bilsky,E.J., Montegut,M.J., Nichols,M.L., Reid,L.D., CGS 10746B, a novel dopamine release inhibitor, blocks the establishment of cocaine and MDMA conditioned place preference, *Pharmacol Biochem Behav*, 59 (1998) 215-220.
- [34] Bilsky,E.J., Reid,L.D., MDL72222, a serotonin 5-HT₃ receptor antagonist, blocks MDMA's ability to establish a conditioned place preference, *Pharmacol Biochem Behav*, 39 (1991) 509-512.
- [35] Björklund,A., Lindvall,O., Dopamine-containing systems in the CNS. In Björklund,A, Hökfelt,T (Eds.), *Handbook of Chemical Neuroanatomy: Vol. 2: Classical Transmitters in the CNS, Part I*. Elsevier Science, 1984, pp. 55-121.

-
- [36] Blandina,P., Goldfarb,J., Craddock-Royal,B., Green,J.P., Release of endogenous dopamine by stimulation of 5-hydroxytryptamine₃ receptors in rat striatum, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 251 (1989) 803-809.
- [37] Blandini,F., Nappi,G., Tassorelli,C., Martignoni,E., Functional changes of the basal ganglia circuitry in Parkinson's disease, *Prog. Neurobiol.*, 62 (2000) 63-88.
- [38] Bonhomme,N., De Deurwaerdere,P., Le Moal,M., Spampinato,U., Evidence for 5-HT₄ receptor subtype involvement in the enhancement of striatal dopamine release induced by serotonin: a microdialysis study in the halothane-anesthetized rat, *Neuropharmacology*, 34 (1995) 269-279.
- [39] Braak,H., Braak,E., Anatomy of the human basal ganglia. In Szelenyi,I (Ed.), *Inhibitors of Monoamine Oxidase B* Birkhäuser Verlag, Basel, 1993.
- [40] Braak,H., Braak,E., Pathoanatomy of Parkinson's disease, *J Neurol*, 247 Suppl 2 (2000) II/3-II/10.
- [41] Braun,U., Shulgin,A.T., Braun,G., Centrally active N-substituted analogs of 3,4-methylenedioxyphenylisopropylamine (3,4-methylenedioxyamphetamine), *J. Pharm. Sci.*, 69 (1980) 192-195.
- [42] Bravo,G., Grob,C., Shamans, sacraments, and psychiatrists, *J Psychoactive Drugs*, 21 (1989) 123-128.
- [43] Bredesen,D.E., Neural apoptosis, *Ann. Neurol*, 38 (1995) 839-851.
- [44] Brooks,D.J., Doder,M., Depression in Parkinson's disease, *Curr. Opin. Neurol*, 14 (2001) 465-470.
- [45] Bubser,M. Verhaltenspharmakologische und neurochemische Charakterisierung der Funktion von Dopamin im medialen präfrontalen Cortex der Ratte. 1992. Fakultät für Geo- und Biowissenschaften der Universität Stuttgart. Dissertation
- [46] Bubser,M., Backstrom,J.R., Sanders-Bush,E., Roth,B.L., Deutch,A.Y., Distribution of serotonin 5-HT_{2A} receptors in afferents of the rat striatum, *Synapse*, 39 (2001) 297-304.
- [47] Büchler,J. Stereoselektive Gewinnung, Analytik und Pharmakokinetik der Enantiomere des Ecstasy-Analogons N-Ethyl-3,4-methylenedioxyamphetamin (MDE) und seiner Metabolite. 2000. Fakultät für Chemie und Pharmazie der Universität Tübingen. Dissertation

-
- [48] Cabib,S., Orsini,C., Le Moal,M., Piazza,P.V., Abolition and reversal of strain differences in behavioral responses to drugs of abuse after a brief experience, *Science*, 289 (2000) 463-465.
- [49] Cadet,J.L., Brannock,C., Free radicals and the pathobiology of brain dopamine systems, *Neurochem. Int.*, 32 (1998) 117-131.
- [50] Campbell,B.M., Walker,P.D., MK-801 prevents dopamine D1 but not serotonin 2A stimulation of striatal preprotachykinin mRNA expression, *Neuroreport*, 12 (2001) 953-955.
- [51] Carlsson,A., Lundqvist,M., Magnusson,T., 3,4-Dihydroxyphenylalanin and 5-hydroxytryptophan as reserpin antagonists, *Nature*, 180 (1957) 1200.
- [52] Carlsson,M., Carlsson,A., Interactions between glutamatergic and monoaminergic systems within the basal ganglia--implications for schizophrenia and Parkinson's disease, *Trends Neurosci*, 13 (1990) 272-276.
- [53] Carr,D.B., Sesack,S.R., Projections from the rat prefrontal cortex to the ventral tegmental area: target specificity in the synaptic associations with mesoaccumbens and mesocortical neurons, *J Neurosci*, 20 (2000) 3864-3873.
- [54] Carvalho,M., Carvalho,F., Bastos,M.L., Is hyperthermia the triggering factor for hepatotoxicity induced by 3,4- methylenedioxyamphetamine (ecstasy)? An in vitro study using freshly isolated mouse hepatocytes, *Arch. Toxicol.*, 74 (2001) 789-793.
- [55] Chu,T., Kumagai,Y., DiStefano,E.W., Cho,A.K., Disposition of methylenedioxyamphetamine and three metabolites in the brains of different rat strains and their possible roles in acute serotonin depletion, *Biochem. Pharmacol.*, 51 (1996) 789-796.
- [56] Colado,M.I., Granados,R., O'Shea,E., Esteban,B., Green,A.R., The acute effect in rats of 3,4-methylenedioxyamphetamine (MDEA, "Eve") on body temperature and long term degeneration of 5-HT neurones in brain: a comparison with MDMA ("Ecstasy"), *Pharmacology & Toxicology*, 84 (1999) 261-266.
- [57] Colado,M.I., O'Shea,E., Granados,R., Misra,A., Murray,T.K., Green,A.R., A study of the neurotoxic effect of MDMA ('ecstasy') on 5-HT neurones in the brains of mothers and neonates following administration of the drug during pregnancy, *Br. J Pharmacol.*, 121 (1997) 827-833.
- [58] Colpaert,F.C., A method for quantifying state-dependency with chlordiazepoxide in rats, *Psychopharmacology (Berl)*, 90 (1986) 144-146.

-
- [59] Commins,D.L., Vosmer,G., Virus,R.M., Woolverton,W.L., Schuster,C.R., Seiden,L.S., Biochemical and histological evidence that methylenedioxymethylamphetamine (MDMA) is toxic to neurons in the rat brain, *J Pharmacol. Exp. Ther.*, 241 (1987) 338-345.
- [60] Cooper,J.R., Bloom,F.E., Roth,R.H., *The biochemical basis of neuropharmacology*, Oxford University Press, New York, Oxford, 1991.
- [61] Cuello,A.C., Priestley,J.V., Sofroniew,M.V., Immunocytochemistry and neurobiology, *Q. J Exp. Physiol*, 68 (1983) 545-578.
- [62] Dahlström,A., Fuxe,K., Evidence for the existence of monoamine-containing neurons in the central nervous system. I. Demonstration of monoamines in the cell bodies of brainstem neurones., *Acta Physiol Scand Suppl*, 232 (1964) 1-55.
- [63] Darracq,L., Blanc,G., Glowinski,J., Tassin,J.P., Importance of the noradrenaline-dopamine coupling in the locomotor activating effects of D-amphetamine, *J Neurosci*, 18 (1998) 2729-2739.
- [64] De Deurwaerdere,P., Stinus,L., Spampinato,U., Opposite change of in vivo dopamine release in the rat nucleus accumbens and striatum that follows electrical stimulation of dorsal raphe nucleus: role of 5-HT₃ receptors, *J. Neurosci.*, 18 (1998) 6528-6538.
- [65] De Sarro,G., Meldrum,B.S., De Sarro,A., Patel,S., Excitatory neurotransmitters in the lateral habenula and pedunculopontine nucleus of rat modulate limbic seizures induced by pilocarpine, *Brain Res.*, 591 (1992) 209-222.
- [66] De Souza,I., Kelly,J.P., Harkin,A.J., Leonard,B.E., An appraisal of the pharmacological and toxicological effects of a single oral administration of 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA) in the rat, *Pharmacology & Toxicology*, 80 (1997) 207-210.
- [67] Delfs,J.M., Zhu,Y., Druhan,J.P., Aston-Jones,G., Noradrenaline in the ventral forebrain is critical for opiate withdrawal-induced aversion, *Nature*, 403 (2000) 430-434.
- [68] Delfs,J.M., Zhu,Y., Druhan,J.P., Aston-Jones,G.S., Origin of noradrenergic afferents to the shell subregion of the nucleus accumbens: anterograde and retrograde tract-tracing studies in the rat, *Brain Res.*, 806 (1998) 127-140.
- [69] Deutch,A.Y., Roth,R.H., Neurotransmitters. In Zigmond,MJ, Bloom,FE, Landis,SC, Roberts,JL, Squire,LR (Eds.), *Fundamental Neuroscience* Academic Press, San Diego, 1999.
- [70] Di Giovanni,G., De Deurwaerdere,P., Di Mascio,M., Di Matteo,V., Esposito,E., Spampinato,U., Selective blockade of serotonin-2C/2B receptors enhances mesolimbic and

- mesostriatal dopaminergic function: a combined electrophysiological and microdialysis study, *Neuroscience*, 91 (1999) 587-597.
- [71] Doble,A., The role of excitotoxicity in neurodegenerative disease: implications for therapy, *Pharmacol. Ther.*, 81 (1999) 163-221.
- [72] Dragunow,M., Logan,B., Lavery,R., 3,4-Methylenedioxyamphetamine induces Fos-like proteins in rat basal ganglia: reversal with MK 801, *Eur. J Pharmacol.*, 206 (1991) 255-258.
- [73] Edelano,L., Über einige Derivate der Phenylmethacrylsäure und der Phenylisobuttersäure, *Ber Dtsch Chem Ges*, 20 (1887) 616-622.
- [74] Ellenbroek,B.A., Cools,A.R., Animal models with construct validity for schizophrenia, *Behav. Pharmacol.*, 1 (1990) 469-490.
- [75] Ensslin,H.K., Maurer,H.H., Gouzoulis,E., Hermle,L., Kovar,K.A., Metabolism of racemic 3,4-methylenedioxyethylamphetamine in humans. Isolation, identification, quantification, and synthesis of urinary metabolites, *Drug Metab Dispos.*, 24 (1996) 813-820.
- [76] Esteban,B., Llado,J., García-Sevilla,J.A. Alpha 2-autoreceptors and alpha 2-heteroreceptors modulating tyrosine and tryptophan hydroxylase activity in the rat brain in vivo: an investigation into the alpha 2-adrenoceptor subtypes. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 353[4], 391-399. 1996.
- [77] Esteban,B., O'Shea,E., Camarero,J., Sanchez,V., Green,A.R., Colado,M.I., 3,4-Methylenedioxyamphetamine induces monoamine release, but not toxicity, when administered centrally at a concentration occurring following a peripherally injected neurotoxic dose, *Psychopharmacology (Berl)*, 154 (2001) 251-260.
- [78] Esteban,S., Lladó,J., Sastre-Coll,A., García-Sevilla,J.A., Activation and desensitization by cyclic antidepressant drugs of α_2 -autoreceptors, α_2 -heteroreceptors and 5-HT_{1A}-autoreceptors regulating monoamine synthesis in the rat brain in vivo, *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, 360 (1999) 135-143.
- [79] Everitt,B.J., Morris,K.A., O'Brien,A., Robbins,T.W., The basolateral amygdala-ventral striatal system and conditioned place preference: further evidence of limbic-striatal interactions underlying reward-related processes, *Neuroscience*, 42 (1991) 1-18.
- [80] Ferguson,J.M., Mendels,J., Schwart,G.E., Effects of reboxetine on Hamilton Depression Rating Scale factors from randomized, placebo-controlled trials in major depression, *Int. Clin. Psychopharmacol.*, 17 (2002) 45-51.

-
- [81] Ferraro,G., Montalbano,M.E., Sardo,P., La,G., V, Lateral habenular influence on dorsal raphe neurons, *Brain Res. Bull.*, 41 (1996) 47-52.
- [82] Fillenz,M., *Noradrenergic neurons*, Cambridge University Press, Cambridge, 1990.
- [83] Fischer,C., Hatzidimitriou,G., Wlos,J., Katz,J., Ricaurte,G., Reorganization of ascending 5-HT axon projections in animals previously exposed to the recreational drug (+/-)3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA, "ecstasy"), *J. Neurosci.*, 15 (1995) 5476-5485.
- [84] Fischer,J.F., Cho,A.K., Chemical release of dopamine from striatal homogenates: evidence for an exchange diffusion model, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 208 (1979) 203-209.
- [85] Fone,K.F., Beckett,S.G., Topham,I.A., Swettenham,J., Ball,M., Maddocks,L., Long-term changes in social interaction and reward following repeated MDMA administration to adolescent rats without accompanying serotonergic neurotoxicity, *Psychopharmacology (Berl)*, 159 (2002) 437-444.
- [86] Forth,W., Habs,H., Habs,M., *Arzneimittel*. In Amberger-Lahrman,M, Schmähl,D (Eds.), *Gifte: Geschichte der Toxikologie* Fourier Verlag, Wiesbaden, 1988.
- [87] Frei,E., Gamma,A., Pascual-Marqui,R., Lehmann,D., Hell,D., Vollenweider,F.X., Localization of MDMA-induced brain activity in healthy volunteers using low resolution brain electromagnetic tomography (LORETA), *Hum. Brain Mapp.*, 14 (2001) 152-165.
- [88] Fritschy,J.-M., Grzanna,R., Immunohistochemical analysis of the neurotoxic effects of DSP-4 identifies two populations of noradrenergic axon terminals, *Neuroscience*, 30 (1989) 181-197.
- [89] Gainetdinov,R.R., Wetsel,W.C., Jones,S.R., Levin,E.D., Jaber,M., Caron,M.G. Role of serotonin in the paradoxical calming effect of psychostimulants on hyperactivity. *Science* 283, 397-401. 1999.
- [90] Gaspar,P., Anatomy of the noradrenergic pathways in the primate brain: Alterations in Parkinson's Disease. In Briley,M, Marien,M (Eds.), *Noradrenergic mechanisms in Parkinson's Disease* CRC Press, Boca Raton, 1994, pp. 73-88.
- [91] Gass,P., Herdegen,T., Neuronal expression of AP-1 proteins in excitotoxic neurodegenerative disorders and following nerve fiber lesions, *Progress in Neurobiology*, 47 (1995) 257-290.
- [92] Gerlach,M., Riederer,P., Animal models of Parkinson's disease: an empirical comparison with the phenomenology of the brain disease in man, *J Neural Transm*, 103 (1996) 987-1041.

-
- [93] Gesi,M., Soldani,P., Giorgi,F.S., Santinami,A., Bonaccorsi,I., Fornai,F., The role of the locus coeruleus in the development of Parkinson's disease, *Neurosci Biobehav. Rev*, 24 (2000) 655-668.
- [94] Gessa,G.L., Biggio,G., Fadda,F., Corsini,G.U., Tagliamonte,A., Effect of the oral administration of tryptophan-free amino acid mixtures on serum tryptophan, brain tryptophan and serotonin metabolism, *J Neurochem*, 22 (1974) 869-870.
- [95] Geyer,M.A., Callaway,C.W., Behavioural pharmacology of ring-substituted amphetamine analogs. In Cho,AK, Segal,DS (Eds.), *Amphetamine and its analogs: Psychopharmacology, toxicology, and abuse* Academic Press, San Diego, 1994, pp. 177-208.
- [96] Gibb,J.W., Hanson,G.R., Johnson,M., Neurochemical mechanisms of toxicity. In Cho,AK, Segal,DS (Eds.), *Amphetamine and its Analogs* Academic Press, San Diego, 1994, pp. 269-295.
- [97] Gillies,D.M., Mylecharane,E.J., Jackson,D.M., Effects of 5-HT₃ receptor-selective agents on locomotor activity in rats following injection into the nucleus accumbens and the ventral tegmental area, *Eur. J. Pharmacol.*, 303 (1996) 1-12.
- [98] Gleiter,Ch.H., Volz,H.-P., Möller,H.J., *Serotonin-Wiederaufnahmehemmer*, Wiss.Verl.-Ges., Stuttgart, 1999.
- [99] Glennon,R.A., Animal models for assessing hallucinogenic agents. In Boulton,A, Baker,G, Wu,PH (Eds.), *Animal models of drug addiction*, Vol. 24, Humana Press Inc., Totowa, New Jersey, 1992, pp. 345-381.
- [100] Glennon,R.A. Arylalkylamine drugs of abuse: An overview of drug discrimination studies. *Pharmacology Biochemistry and Behavior* 64[2], 251-256. 2000.
- [101] Glennon,R.A., Young,R., MDMA Stimulus Generalization to the 5-HT_{1A} Serotonin Agonist 8-Hydroxy-2-(di-n-propylamino)tetralin, *Pharmacol Biochem Behav*, 66 (2000) 483-488.
- [102] Goadsby,P.J., The pharmacology of headache, *Prog. Neurobiol.*, 62 (2000) 509-525.
- [103] Gold,L.H., Koob,G.F., MDMA produces stimulant-like conditioned locomotor activity, *Psychopharmacology*, 99 (1989) 352-356.
- [104] Gotham,A.M., Brown,R.G., Marsden,C.D., Depression in Parkinson's disease: a quantitative and qualitative analysis, *J Neurol Neurosurg. Psychiatry*, 49 (1986) 381-389.

-
- [105] Gouzoulis-Mayfrank,E., Daumann,J., Thimm,B., Hensen,G. Ecstasy (MDMA) use and memory performance. *Pharmacopsychiatry* 34, 174. 2001.
- [106] Gouzoulis-Mayfrank,E., Daumann,J., Tuchtenhagen,F., Pelz,S., Becker,S., Kunert,H.J., Fimm,B., Sass,H., Impaired cognitive performance in drug free users of recreational ecstasy (MDMA), *J Neurol Neurosurg. Psychiatry*, 68 (2000) 719-725.
- [107] Gouzoulis-Mayfrank,E., Hermle,L., Kovar,K.-A., Sass,H., The entactogens: Ecstasy (MDMA), Eve (MDE) and other ring-substituted methamphetamine derivatives. A novel pharmacological class among the illicit designer drugs?, *Nervenarzt*, 67 (1996) 369-380.
- [108] Gouzoulis-Mayfrank,E., Hermle,L., Thelen,B., Sass,H., History, rationale and potential of human experimental hallucinogenic drug research in psychiatry, *Pharmacopsychiatry*, 31 (Suppl) (1998) 63-68.
- [109] Gouzoulis-Mayfrank,E., Thelen,B., Habermeyer,E., Kunert,H.J., Kovar,K.-A., Lindenblatt,H., Hermle,L., Spitzer,M., Sass,H., Psychopathological, neuroendocrine and autonomic effects of 3,4-methylenedioxyethylamphetamine (MDE), psilocybin and d-methamphetamine in healthy volunteers, *Psychopharmacology*, 142 (1999) 41-50.
- [110] Green,A.R., Cross,A.J., Goodwin,G.M., Review of the pharmacology and clinical pharmacology of 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA or "Ecstasy"), *Psychopharmacology*, 119 (1995) 247-260.
- [111] Groenewegen,H.J., Wright,C.I., Beijer,A.V., The nucleus accumbens: gateway for limbic structures to reach the motor system?, *Prog. Brain Res.*, 107 (1996) 485-511.
- [112] Gudelsky,G.A., Effect of ascorbate and cysteine on the 3,4-methylenedioxymethamphetamine-induced depletion of brain serotonin, *J Neural Transm*, 103 (1996) 1397-1404.
- [113] Gundersen,H.J., Bendtsen,T.F., Korbo,L., Marcussen,N., Moller,A., Nielsen,K., Nyengaard,J.R., Pakkenberg,B., Sorensen,F.B., Vesterby,A., ., Some new, simple and efficient stereological methods and their use in pathological research and diagnosis, *APMIS*, 96 (1988) 379-394.
- [114] Halldin,C., Gulyas,B., Langer,O., Farde,L., Brain radioligands--state of the art and new trends, *Q. J. Nucl. Med.*, 45 (2001) 139-152.
- [115] Halliday,G., Harding,A., Paxinos,G., Serotonin and tachykinin systems. In Paxinos,G (Ed.), *The rat nervous system* Academic Press, San Diego, 1995, pp. 929-974.

- [116] Hallman,H., Jonsson,G., Pharmacological modifications of the neurotoxic action of the noradrenaline neurotoxin DSP4 on central noradrenaline neurons, *Eur J Pharmacol*, 103 (1984) 269-278.
- [117] Harris,G.C., Altomare,K., Aston-Jones,G., Preference for a cocaine-associated environment is attenuated by augmented accumbal serotonin in cocaine withdrawn rats, *Psychopharmacology (Berl)*, 156 (2001) 14-22.
- [118] Harris,G.C., Aston-Jones,G., Augmented accumbal serotonin levels decrease the preference for a morphine associated environment during withdrawal, *Neuropsychopharmacology*, 24 (2001) 75-85.
- [119] Harvey,J.A., Serotonergic regulation of associative learning, *Behav. Brain Res.*, 73 (1996) 47-50.
- [120] Hashimoto,K., Tomitaka,S.-I., Narita,N., Minabe,Y., Iyo,M., Induction of Fos protein by 3,4-methylenedioxymethamphetamine (Ecstasy) in rat brain: regional differences in pharmacological manipulation, *Addiction Biology*, 2 (1997) 317-326.
- [121] Heffner,T.G., Hartman,J.A., Seiden,L.S., A rapid method for the regional dissection of the rat brain, *Pharmacol Biochem Behav*, 13 (1980) 453-456.
- [122] Hegadoren,K.M., Martin-Iverson,M.T., Baker,G.B., Comparative behavioural and neurochemical studies with a psychomotor stimulant, an hallucinogen and 3,4-methylenedioxy analogues of amphetamine, *Psychopharmacology (Berl)*, 118 (1995) 295-304.
- [123] Henry,D.J., White,F.J., Repeated cocaine administration causes persistent enhancement of D1 dopamine receptor sensitivity within the rat nucleus accumbens, *J Pharmacol. Exp. Ther.*, 258 (1991) 882-890.
- [124] Herkenham,M., Nauta,W.J., Efferent connections of the habenular nuclei in the rat, *J Comp Neurol*, 187 (1979) 19-47.
- [125] Hermle,L., Kovar,K.-A., Klinische Erscheinungsbilder und pharmakologische Wirkungen von Designerdrogen der Ecstasy-Reihe. In König,F, Kaschka,WP (Eds.), *Interaktionen und Wirkmechanismen ausgewählter Psychopharmaka* Thieme Verlag, Stuttgart, 2000.
- [126] Hermle,L., Spitzer,M., Borchardt,D., Kovar,K.A., Gouzoulis,E., Psychological effects of MDE in normal subjects. Are entactogens a new class of psychoactive agents?, *Neuropsychopharmacology*, 8 (1993) 171-176.

-
- [127] Hjorth,S., Functional differences between ascending 5-HT systems, *Advances in the Biosciences*, 85 (1992) 203-218.
- [128] Hollister,L.E., *Chemical psychoses*, Charles C. Thomas, Springfield, IL, USA, 1968.
- [129] Horan,B., Gardner,E.L., Ashby,Ch.R.Jr., Enhancement of conditioned place preference response to cocaine in rats following subchronic administration of 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA), *Synapse*, 35 (2000) 160-162.
- [130] Hughes,P., Dragunow,M., Induction of immediate-early genes and the control of neurotransmitter- regulated gene expression within the nervous system, *Pharmacol. Rev*, 47 (1995) 133-178.
- [131] Hyttel,J., Arnt,J., Sánchez,C., The Pharmacology of Citalopram, *Rev Contemp Pharmacother*, 7 (1996) G1-G16.
- [132] James,T.A., Starr,M.S., Rotational behaviour elicited by 5-HT in the rat: evidence for an inhibitory role of 5-HT in the substantia nigra and corpus striatum, *J. Pharm. Pharmacol.*, 32 (1980) 196-200.
- [133] Jellinger,K.A., Pathology of Parkinson's disease. Changes other than the nigrostriatal pathway, *Mol. Chem Neuropathol.*, 14 (1991) 153-197.
- [134] Johnson,M.P., Hoffman,A.J., Nichols,D.E., Effects of the enantiomers of MDA, MDMA and related analogues on [³H]serotonin and [³H]dopamine release from superfused rat brain slices, *Eur J Pharmacol*, 132 (1986) 269-276.
- [135] Jones,G.H., Hernandez,T.D., Kendall,D.A., Marsden,C.A., Robbins,T.W., Dopaminergic and serotonergic function following isolation rearing in rats: study of behavioural responses and postmortem and in vivo neurochemistry, *Pharmacol. Biochem. Behav.*, 43 (1992) 17-35.
- [136] Kalen,P., Lindvall,O., Bjorklund,A., Electrical stimulation of the lateral habenula increases hippocampal noradrenaline release as monitored by in vivo microdialysis, *Exp. Brain Res.*, 76 (1989) 239-245.
- [137] Kalen,P., Strecker,R.E., Rosengren,E., Bjorklund,A., Regulation of striatal serotonin release by the lateral habenula-dorsal raphe pathway in the rat as demonstrated by in vivo microdialysis: role of excitatory amino acids and GABA, *Brain Res.*, 492 (1989) 187-202.
- [138] Kalivas,P.W., Interactions between dopamine and excitatory amino acids in behavioral sensitization to psychostimulants, *Drug Alcohol Depend.*, 37 (1995) 95-100.

- [139] Kalivas,P.W., Duffy,P., White,S.R., MDMA elicits behavioural and neurochemical sensitization in rats, *Neuropsychopharmacology*, 18 (1998) 469-479.
- [140] Kalivas,P.W., Pierce,R.C., Cornish,J., Sorg,B.A., A role for sensitization in craving and relapse in cocaine addiction, *J Psychopharmacol.*, 12 (1998) 49-53.
- [141] Kasper,S., el Giamal,N., Hilger,E., Reboxetine: the first selective noradrenaline re-uptake inhibitor, *Expert. Opin. Pharmacother*, 1 (2000) 771-782.
- [142] Kelland,M.D., Chiodo,L.A., Serotonergic modulation of midbrain dopaminergic systems. In Ashby,ChR Jr (Ed.), *The modulation of dopaminergic neurotransmission by other neurotransmitters* CRC Press, New York, 1996, pp. 87-122.
- [143] Kelland,M.D., Freeman,A.S., Chiodo,L.A., Serotonergic afferent regulation of the basic physiology and pharmacological responsiveness of nigrostriatal dopamine neurons, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 253 (1990) 803-811.
- [144] Kelland,M.D., Freeman,A.S., Rubin,J., Chiodo,L.A., Ascending afferent regulation of rat midbrain dopamine neurons, *Brain Res. Bull.*, 31 (1993) 539-546.
- [145] Keupp,W., Das aktuelle Mißbrauchsprofil: MDMA - "Ecstasy", *Medizinische Monatsschrift für Pharmazeuten*, 19 (1996) 2-5.
- [146] Kienke,A.S., Rosenbaum,J.F., Efficacy of venlafaxine in the treatment of severe depression, *Depress. Anxiety.*, 12 Suppl 1 (2000) 50-54.
- [147] Kilpatrick,I.C., Jones,M.W., Phillipson,O.T., A semiautomated analysis method for catecholamines, indoleamines, and some prominent metabolites in microdissected regions of the nervous system: an isocratic HPLC technique employing coulometric detection and minimal sample preparation, *J Neurochem.*, 46 (1986) 1865-1876.
- [148] Kinloch,R.A., Treherne,J.M., Furness,L.M., Hajimohamadreza,I., The pharmacology of apoptosis, *Trends Pharmacol. Sci.*, 20 (1999) 35-42.
- [149] Kleven,M.S., Woolverton,W.L., Seiden,L.S., Evidence that both intragastric and subcutaneous administration of methylenedioxymethylamphetamine (MDMA) produce serotonin neurotoxicity in rhesus monkeys, *Brain Res.*, 488 (1989) 121-125.
- [150] Knowlton,B.J., Mangels,J.A., Squire,L.R., A neostriatal habit learning system in humans, *Science*, 273 (1996) 1399-1402.

-
- [151] Koella,W.P., Serotonin and sleep. In Osborne,NN, Hamon,M (Eds.), *Neuronal Serotonin* John Wiley & Sons, 1988, pp. 153.
- [152] Koob,G.F., Drugs of abuse: anatomy, pharmacology and function of reward pathways, *Trends Pharmacol Sci*, 13 (1992) 177-184.
- [153] Koob,G.F., Drug Reward and Addiction. In Zigmond,MJ, Bloom,FE, Landis,SC, Roberts,JL, Squire,LR (Eds.), *Fundamental Neuroscience* Academic Press, San Diego, 1999.
- [154] Kovar,K.-A., Drogen in der Szene: Cannabis, Arzneistoffe und Ecstasy, *Pharmazeutische Zeitung*, 140 (1995) 1843-1849.
- [155] Kovar,K.-A., Chemistry and pharmacology of hallucinogens, entactogens and stimulants, *Pharmacopsychiatry*, 31 (1998) 69-72.
- [156] Kovar,K.-A., Rösch,C., Rupp,A., Hermle,L., Synthetische Suchtstoffe der 2. Generation (sog. Designer Drugs), *Pharmazie in unserer Zeit*, 19 (1990) 99-107.
- [157] Kreth,K., Kovar,K., Schwab,M., Zanger,U.M., Identification of the human cytochromes P450 involved in the oxidative metabolism of "Ecstasy"-related designer drugs, *Biochem. Pharmacol.*, 59 (2000) 1563-1571.
- [158] Kretschmer,B.D., Fink,S., Spatial learning deficit after NMDA receptor blockade and state-dependency, *Behav. Pharmacol.*, 10 (1999) 423-428.
- [159] Kuczenski,R., Segal,D.S., Locomotor effects of acute and repeated threshold doses of amphetamine and methylphenidate: relative roles of dopamine and norepinephrine, *J Pharmacol. Exp. Ther.*, 296 (2001) 876-883.
- [160] Kutscher,C.L., Yamamoto,B.K., A frequency analysis of behavior components of the serotonin syndrome produced by p-chloroamphetamine, *Pharmacol. Biochem. Behav.*, 11 (1979) 611-616.
- [161] Kühnel,W., *Taschenatlas der Zytologie, Histologie und mikroskopischen Anatomie*, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York, 1992.
- [162] Lamb,R.J., Griffiths,R.R., Self-injection of d,1-3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA) in the baboon, *Psychopharmacology (Berl)*, 91 (1987) 268-272.
- [163] Lange,K.W., Youdim,M.B., Riederer,P., Neurotoxicity and neuroprotection in Parkinson's disease, *J Neural Transm Suppl*, 38 (1992) 27-44.

-
- [164] Lanis,A., Schmidt,W.J., NMDA receptor antagonists do not block the development of sensitization of catalepsy, but make its expression state-dependent, *Behav. Pharmacol.*, 12 (2001) 143-149.
- [165] Lebsanft,H. Auswirkungen von Dizocilpin auf MDMA-induziertes Verhalten in Tiermodellen der Sucht. 2001. Fakultät für Biologie, Eberhard-Karls-Universität, Tübingen. Diplomarbeit.
- [166] Leccese,A.P., Lyness,W.H., The effects of putative 5-hydroxytryptamine receptor active agents on D-amphetamine self-stimulation in controls and rats with 5,7-dihydroxytryptamine median forebrain bundle lesions, *Brain Research*, 303 (1984) 153-162.
- [167] Levine,E.S., Jacobs,B.L., Neurochemical afferents controlling the activity of serotonergic neurons in the dorsal raphe nucleus: microiontophoretic studies in the awake cat, *J Neurosci*, 12 (1992) 4037-4044.
- [168] Li,S.W., Lin,T.S., Menteer,S., Burke,W.J., 3,4-Dihydroxyphenylacetaldehyde and hydrogen peroxide generate a hydroxyl radical: possible role in Parkinson's disease pathogenesis, *Brain Res. Mol. Brain Res.*, 93 (2001) 1-7.
- [169] Lin,H.Q., Burden,P.M., Christie,M.J., Johnston,G.A., The anxiogenic-like and anxiolytic-like effects of MDMA on mice in the elevated plus-maze: a comparison with amphetamine, *Pharmacol. Biochem. Behav.*, 62 (1999) 403-408.
- [170] Lucas,G., De Deurwaerdere,P., Caccia,S., Spampinato,U., The effect of serotonergic agents on haloperidol-induced striatal dopamine release in vivo: opposite role of 5-HT(2A) and 5-HT(2C) receptor subtypes and significance of the haloperidol dose used, *Neuropharmacology*, 39 (2000) 1053-1063.
- [171] Lucas,G., Spampinato,U., Role of striatal serotonin_{2A} and serotonin_{2C} subtypes in the control of in vivo dopamine outflow in the rat striatum, *J Neurochem*, 74 (2000) 693-701.
- [172] Lüllmann,H., Mohr,K., Ziegler,A., Taschenatlas der Pharmakologie, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York, 1990.
- [173] Lyons,W.E., Fritschy,J.-M., Grzanna,R., The noradrenergic neurotoxin DSP-4 eliminates the coeruleospinal projection but spares projections of the A5 and A7 groups to the ventral horn of the rat spinal cord, *J Neurosci*, 9 (1989) 1481-1489.
- [174] Macchi,G., Bentivoglio,M., Is the "nonspecific" thalamus still "nonspecific"?, *Arch. Ital. Biol.*, 137 (1999) 201-226.
- [175] Margolis,J. Ecstasy's dividend. *Time* [19], 58-59. 2001. Ref Type: Magazine Article

-
- [176] Marona-Lewicka,D., Rhee,G.S., Sprague,J.E., Nichols,D.E., Reinforcing effects of certain serotonin-releasing amphetamine derivatives, *Pharmacol Biochem Behav*, 53 (1996) 99-105.
- [177] Marsden,Ch.A., The neuropharmacology of serotonin in central nervous system. In Feighner,JP, Boyer,WF (Eds.), *Selective Serotonin Re-uptake Inhibitors* John Wiley & Sons, Chichester, 1996, pp. 1-33.
- [178] Martel,J.C., Chopin,P., Colpaert,F., Marien,M., Drug treatments to reduce excitotoxicity in vivo: a potential for alpha2-adrenoceptor antagonists?, *Amino. Acids*, 19 (2000) 239-252.
- [179] Mas,M., Farre,M., De la Torre,R., Roset,P.N., Ortuño,J., Segura,J., Cami,J., Cardiovascular and neuroendocrine effects and pharmacokinetics of 3,4-methylenedioxymethamphetamine in humans, *J Pharmacol Exp Ther*, 290 (1999) 136-145.
- [180] Mavridis,M., Degryse,A., Lategan,A., Marien,M., Colpaert,F., Recovery form MPTP-induced parkinsonian manifestations following locus coeruleus lesions in squirrel monkeys. In Briley,M, Marien,M (Eds.), *Noradrenergic mechanisms in Parkinson's Disease* CRC Press, Boca Raton, 1994, pp. 25-58.
- [181] Mavridis,M., Degryse,A.D., Lategan,A.J., Marien,M.R., Colpaert,F.C. Effects of locus coeruleus lesions on parkinsonian signs, striatal dopamine and substantia nigra cell loss after 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine in monkeys: a possible role for the locus coeruleus in the progression of Parkinson's disease. *Neuroscience* 41[2-3], 507-523. 1991.
- [182] McCann,U.D., Ricaurte,G., Use and abuse of ring-substituted amphetamines. In Cho,AK, Segal,DS (Eds.), *Amphetamine and its analogs: psychopharmacology, toxicology and abuse* Academic Press, San Diego, CA, USA, 1994, pp. 371-385.
- [183] McCann,U.D., Ricaurte,G.A., Molliver,M.E., "Ecstasy" and serotonin neurotoxicity: new findings raise more questions, *Arch. Gen. Psychiatry*, 58 (2001) 907-908.
- [184] McCann,U.D., Szabo,Z., Scheffel,U., Dannals,R.F., Ricaurte,G.A., Positron emission tomographic evidence of toxic effect of MDMA ("Ecstasy") on brain serotonin neurons in human beings., *Lancet*, 352 (1998) 1433-1437.
- [185] McCreary,A.C., Bankson,M.G., Cunningham,K.A., Pharmacological studies of the acute and chronic effects of (+)-3,4-methylenedioxymethamphetamine on locomotor activity: role of 5-hydroxytryptamine_{1A} and 5-hydroxytryptamine_{1B/1D} receptors, *J Pharmacol Exp Ther*, 290 (1999) 965-973.

-
- [186] McGregor,A., Lacosta,S., Roberts,D.C.S., L-Tryptophan decreases the breaking point under a progressive ratio schedule of intravenous cocaine reinforcement in the rat, *Pharmacol Biochem Behav*, 44 (1993) 651-655.
- [187] McKenna,D.J., Guan,X.M., Shulgin,A.T., 3,4-Methylenedioxyamphetamine (MDA) analogues exhibit differential effects on synaptosomal release of 3H-dopamine and 3H-5-hydroxytryptamine, *Pharmacol. Biochem. Behav.*, 38 (1991) 505-512.
- [188] McKenna,D.J., Peroutka,S.J., Neurochemistry and neurotoxicity of 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA, "ecstasy"), *J Neurochem.*, 54 (1990) 14-22.
- [189] McNamara,M.G., Kelly,J.P., Leonard,B.E., Some behavioural and neurochemical aspects of subacute (+/-)3,4-methylenedioxyamphetamine administration in rats, *Pharmacol Biochem Behav*, 52 (1995) 479-484.
- [190] Miller,R.T., Lau,S.S., Monks,T.J., 2,5-Bis-(glutathion-S-yl)-alpha-methyldopamine, a putative metabolite of (+/-)-3,4-methylenedioxyamphetamine, decreases brain serotonin concentrations, *Eur. J. Pharmacol.*, 323 (1997) 173-180.
- [191] Miura,H., Qiao,H., Ohta,T., Attenuating effects of the isolated rearing condition on increased brain serotonin and dopamine turnover elicited by novelty stress, *Brain Research*, 926 (2002) 10-17.
- [192] Mogenson,G.J., Jones,D.L., Yim,C.Y., From motivation to action: functional interface between the limbic system and the motor system, *Prog. Neurobiol.*, 14 (1980) 69-97.
- [193] Molliver,M.E., O'Hearn,E., Battaglia,G., De Souza,E.B. Direct intracerebral administration of MDA and MDMA does not produce serotonin neurotoxicity. *Soc Neurosci Abstr* 12, 1234. 1986.
- [194] Moore,R.Y., Bloom,F.E., Central catecholamine neuron systems: anatomy and physiology of the norepinephrine and epinephrine systems, *Ann Rev Neurosci*, 2 (1979) 113-168.
- [195] Morgan,A.E., Horan,B., Dewey,S.L., Ashby,Ch.R.Jr., Repeated administration of 3,4-methylenedioxyamphetamine augments cocaine's action on dopamine in the nucleus accumbens: A microdialysis study, *Eur J Pharmacol*, 331 (1997) R1-R3.
- [196] Morgan,M.J., Ecstasy (MDMA): a review of its possible persistent psychological effects, *Psychopharmacology (Berl)*, 152 (2000) 230-248.

-
- [197] Morris,J.S., Smith,K.A., Cowen,P.J., Friston,K.J., Dolan,R.J., Covariation of activity in habenula and dorsal raphe nuclei following tryptophan depletion, *Neuroimage.*, 10 (1999) 163-172.
- [198] Mueller,D., Stewart,J., Cocaine-induced conditioned place preference: reinstatement by priming injections of cocaine after extinction, *Behav. Brain Res.*, 115 (2000) 39-47.
- [199] Mylecharane,E.J., Ventral tegmental area 5-HT receptors: mesolimbic dopamine release and behavioural studies, *Behav. Brain Res.*, 73 (1996) 1-5.
- [200] Nash,J.F., Nichols,D.E., Microdialysis studies on 3,4-methylenedioxymethamphetamine and structurally related analogues, *Eur J Pharmacol*, 200 (1991) 53-58.
- [201] Neal-Beliveau,B.S., Joyce,J.N., Lucki,I., Serotonergic involvement in haloperidol-induced catalepsy, *J Pharmacol. Exp. Ther.*, 265 (1993) 207-217.
- [202] Nemeroff,C.B. *Neurobiologie der Depression. Spektrum der Wissenschaft [Digest 2]*, 82-90. 2001. Ref Type: Magazine Article
- [203] Nicholas,A.P., Pieribone,V., Hokfelt,T., Distributions of mRNAs for alpha-2 adrenergic receptor subtypes in rat brain: an in situ hybridization study, *J Comp Neurol*, 328 (1993) 575-594.
- [204] Nichols,D.E., Differences between the mechanism of action of MDMA, MBDB, and the classic hallucinogens. Identification of a new therapeutic class: entactogens, *J Psychoactive Drugs*, 18 (1986) 305-313.
- [205] Nichols,D.E., *Medicinal Chemistry and Structure-Activity Relationships*. In Cho,AK, Segal,DS (Eds.), *Amphetamine and its analogs: Psychopharmacology, toxicology, and abuse* Academic Press, San Diego, 1994, pp. 3-42.
- [206] Nicotera,P., Leist,M., Fava,E., Berliocchi,L., Volbracht,C., Energy requirement for caspase activation and neuronal cell death, *Brain Pathol.*, 10 (2000) 276-282.
- [207] Nieuwenhuys,R., *Chemoarchitecture of the brain*, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, 1985.
- [208] Nijhawan,D., Honarpour,N., Wang,X., Apoptosis in neural development and disease, *Annu. Rev Neurosci*, 23 (2000) 73-87.
- [209] Nishikawa,T., Scatton,B., Inhibitory influence of GABA on central serotonergic transmission. Involvement of the habenulo-raphé pathways in the GABAergic inhibition of ascending cerebral serotonergic neurons, *Brain Res.*, 331 (1985) 81-90.

- [210] Nishikawa,T., Scatton,B., Inhibitory influence of GABA on central serotonergic transmission. Raphe nuclei as the neuroanatomical site of the GABAergic inhibition of cerebral serotonergic neurons, *Brain Res.*, 331 (1985) 91-103.
- [211] Obeso,J.A., Olanow,C.W., Nutt,J.G., Levodopa motor complications in Parkinson's disease, *Trends Neurosci*, 23 (2000) S2-S7.
- [212] Oehler,J., Jahkel,M., Schmidt,J., Neuronal transmitter sensitivity after social isolation in rats, *Physiol Behav.*, 41 (1987) 187-191.
- [213] Ohmori,T., Abekawa,T., Ito,K., Koyama,T., Context determines the type of sensitized behaviour: a brief review and a hypothesis on the role of environment in behavioural sensitization, *Behav. Pharmacol.*, 11 (2000) 211-221.
- [214] Olds,J., Milner,P., Positive reinforcement produced by electrical stimulation of septal area and other regions of rat brain, *J Comp Physiol Psychol*, 47 (1954) 419-427.
- [215] Overton,D.A., State-dependent or dissociated learning produced with pentobarbital, *J. Comp. Physiol. Psychol.*, 57 (1964) 3-12.
- [216] Paladini,C.A., Fiorillo,C.D., Morikawa,H., Williams,J.T., Amphetamine selectively blocks inhibitory glutamate transmission in dopamine neurons, *Nat. Neurosci.*, 4 (2001) 275-281.
- [217] Parent,A., Sato,F., Wu,Y., Gauthier,J., Levesque,M., Parent,M., Organization of the basal ganglia: the importance of axonal collateralization, *Trends Neurosci*, 23 (2000) S20-S27.
- [218] Parsons,L.H., Justice,J.B., Jr., Perfusate serotonin increases extracellular dopamine in the nucleus accumbens as measured by in vivo microdialysis, *Brain Res.*, 606 (1993) 195-199.
- [219] Paulson,P.E., Robinson,T.E., Amphetamine-induced time-dependent sensitization of dopamine neurotransmission in the dorsal and ventral striatum: a microdialysis study in behaving rats, *Synapse*, 19 (1995) 56-65.
- [220] Paxinos,G., Watson,C., *The rat brain in stereotaxic coordinates*, Academic Press, 2002.
- [221] Pedersen,V., Schmidt,W.J., The neuroprotectant properties of glutamate antagonists and antiglutamatergic drugs, *Neurotoxicity Research*, 2 (2000) 179-204.
- [222] Pedersen,W., Skrandal,A., Ecstasy and new patterns of drug use: a normal population study, *Addiction*, 94 (1999) 1695-1706.

-
- [223] Pennypacker,K.R., Hong,J.S., McMillian,M.K., Implications of prolonged expression of Fos-related antigens, *Trends Pharmacol. Sci.*, 16 (1995) 317-321.
- [224] Peroutka,S.J., A tribute to Dr. Irvine H. Page. In Fozard,JR, Saxena,PR (Eds.), *Serotonin: molecular biology, receptors and functional effects* Birkhäuser, Basel, 1991, pp. 3-4.
- [225] Peroutka,S.J., Newman,H., Harris,H., Subjective effects of 3,4-methylenedioxymethamphetamine in recreational users, *Neuropsychopharmacology*, 1 (1988) 273-277.
- [226] Peyron,C., Petit,J.M., Rampon,C., Jouvet,M., Luppi,P.H., Forebrain afferents to the rat dorsal raphe nucleus demonstrated by retrograde and anterograde tracing methods, *Neuroscience*, 82 (1998) 443-468.
- [227] Piazza,P.V., Le Moal,M., The role of stress in drug self-administration, *Trends Pharmacol Sci*, 19 (1998) 67-74.
- [228] Pierce,R.Ch., Kalivas,P.W., A circuitry model of the expression of behavioural sensitization to amphetamine-like psychostimulants, *Brain Res Reviews*, 25 (1997) 192-216.
- [229] Porras,G., Di,M., V, Fracasso,C., Lucas,G., De Deurwaerdere,P., Caccia,S., Esposito,E., Spampinato,U., 5-HT(2A) and 5-HT(2C/2B) receptor subtypes modulate dopamine release induced in vivo by amphetamine and morphine in both the rat nucleus accumbens and striatum, *Neuropsychopharmacology*, 26 (2002) 311-324.
- [230] Raisman-Vozari,R., The locus coeruleus in Parkinson's Disease. In Briley,M, Marien,M (Eds.), *Noradrenergic mechanisms in Parkinson's Disease* CRC Press, Boca Raton, 1994, pp. 89-105.
- [231] Raiteri,M., Bertollini,A., Angelini,F., Levi,G., d-Amphetamine as a releaser or reuptake inhibitor of biogenic amines in synaptosomes, *Eur. J. Pharmacol.*, 34 (1975) 189-195.
- [232] Rakete,G., Flüßmeier,U., *Der Konsum von Ecstasy - eine empirische Studie zu Mustern und psychosozialen Effekten des Ecstasykonsums. In Prävention des Ecstasykonsums - Empirische Forschungsergebnisse und Leitlinien Bundeszentrale für gesundheitliche Aufklärung (BzgA), Köln, 2000.*
- [233] Rapport,M.M., Green,A.A., Page,I.H., Crystalline serotonin, *Science*, 108 (1948) 329.
- [234] Rasmussen,K., Beitner-Johnson,D.B., Krystal,J.H., Aghajanian,G.K., Nestler,E.J., Opiate withdrawal and the rat locus coeruleus: behavioral, electrophysiological, and biochemical correlates, *J Neurosci*, 10 (1990) 2308-2317.

-
- [235] Rattray,M., Michael,G.J., Lee,J., Wotherspoon,G., Bendotti,C., Priestley,J.V., Intraregional variation in expression of serotonin transporter messenger RNA by 5-hydroxytryptamine neurons, *Neuroscience*, 88 (1999) 169-183.
- [236] Ratzenboeck,E., Saria,A., Kriechbaum,N., Zernig,G., Reinforcing effects of MDMA ("ecstasy") in drug-naive and cocaine- trained rats, *Pharmacology*, 62 (2001) 138-144.
- [237] Reed,J.C., Mechanisms of apoptosis, *Am J Pathol.*, 157 (2000) 1415-1430.
- [238] Reneman,L., Booij,J., Schmand,B., van den,B.W., Gunning,B., Memory disturbances in "Ecstasy" users are correlated with an altered brain serotonin neurotransmission, *Psychopharmacology (Berl)*, 148 (2000) 322-324.
- [239] Reneman,L., Lavalaye,J., Schmand,B., de Wolff,F.A., van den,B.W., den Heeten,G.J., Booij,J., Cortical serotonin transporter density and verbal memory in individuals who stopped using 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA or "ecstasy"): preliminary findings, *Arch. Gen. Psychiatry*, 58 (2001) 901-906.
- [240] Reus,V.I., A neuroanatomic perspective on state-dependent learning: The role of the striatum, *Acta Neurol Scand*, 74 [Suppl 109] (1986) 31-36.
- [241] Ricaurte,G., Bryan,G., Strauss,L., Seiden,L., Schuster,C., Hallucinogenic amphetamine selectively destroys brain serotonin nerve terminals, *Science*, 229 (1985) 986-988.
- [242] Ricaurte,G.A., Finnegan,K.F., Nichols,D.E., DeLanney,L.E., Irwin,I., Langston,J.W., 3,4-Methylenedioxyethylamphetamine (MDE), a novel analogue of MDMA, produces long-lasting depletion of serotonin in the rat brain, *Eur. J Pharmacol.*, 137 (1987) 265-268.
- [243] Ricaurte,G.A., Finnegan,K.T., Irwin,I., Langston,J.W., Aminergic metabolites in cerebrospinal fluid of humans previously exposed to MDMA: preliminary observations, *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 600 (1990) 699-708.
- [244] Richardson,N.R., Roberts,D.C.S., Fluoxetine pretreatment reduces breaking points on a progressive ratio schedule reinforced by intravenous cocaine self-administration in the rat, *Life Sciences*, 49 (1991) 833-840.
- [245] Ridet,J.L., Malhotra,S.K., Privat,A., Gage,F.H., Reactive astrocytes: cellular and molecular cues to biological function, *Trends Neurosci*, 20 (1997) 570-577.
- [246] Rilke,O. Neurobiologische Untersuchungen zur sozialen Isolation unter besonderer Berücksichtigung von Alkoholaufnahme bei Ratten sowie individuellen Disposition bei Mäusen. 1996. Dissertation

-
- [247] Rilke,O., Freier,D., Jahkel,M., Oehler,J., Dynamic alterations of serotonergic metabolism and receptors during social isolation of low- and high-active mice, *Pharmacol. Biochem. Behav.*, 59 (1998) 891-896.
- [248] Rilke,O., Jahkel,M., Oehler,J., Dopaminergic parameters during social isolation in low- and high-active mice, *Pharmacol. Biochem. Behav.*, 60 (1998) 499-505.
- [249] Rilke,O., May,T., Oehler,J., Wolffgramm,J., Influences of housing conditions and ethanol intake on binding characteristics of D2, 5-HT1A, and benzodiazepine receptors of rats, *Pharmacol. Biochem. Behav.*, 52 (1995) 23-28.
- [250] Rimpler,H., *Pharmazeitische Biologie II.: Biogene Arzneistoffe*, Thieme Verlag, Stuttgart, 1990.
- [251] Robbins,T.W., Everitt,B.J., Motivation and Reward. In Zigmond,MJ, Bloom,FE, Landis,SC, Roberts,JL, Squire,LR (Eds.), *Fundamental Neuroscience* Academic Press, San Diego, 1999.
- [252] Robinson,T.E., Becker,J.B., Enduring changes in brain and behavior produced by chronic amphetamine administration: a review and evaluation of animal models of amphetamine psychosis, *Brain Res.*, 396 (1986) 157-198.
- [253] Robinson,T.E., Berridge,K.C., The neural basis of drug craving: an incentive-sensitization theory of addiction, *Brain Res Reviews*, 18 (1993) 247-291.
- [254] Robinson,T.E., Browman,K.E., Crombag,H.S., Badiani,A., Modulation of the induction or expression of psychostimulant sensitization by the circumstances surrounding drug administration, *Neurosci Biobehav Rev*, 22 (1998) 347-354.
- [255] Rocha,B.A., Scarce-Levie,K., Lucas,J.J., Hiroi,N., Castanon,N., Crabbe,J.C., Nestler,E.J., Hen,R., Increased vulnerability to cocaine in mice lacking the serotonin-1B receptor, *Nature*, 393 (1998) 175-178.
- [256] Rodriguez-Arias,M., Minarro,J., Aguilar,M.A., Pinazo,J., Simon,V.M., Effects of risperidone and SCH 23390 on isolation-induced aggression in male mice, *Eur. Neuropsychopharmacol.*, 8 (1998) 95-103.
- [257] Romeis,B., *Mikroskopische Technik*, Urban & Schwarzenberg, München, Wien, Baltimore, 1989.
- [258] Ropero-Miller,J.D., Goldberger,B.A., Recreational drugs: Current trends in the 90s, *Clinics in laboratory medicine*, 18 (1998) 727-746.

- [259] Ross,S.B., Long term effects of N-2-chloroethyl-N-ethyl-2-bromobenzylamine hydrochloride on noradrenergic neurones in the rat brain and heart, *Br J Pharmacol*, 58 (1976) 527.
- [260] Ross,S.B., Renyi,A.L., On the long-lasting inhibitory effect of N-(2-chloroethyl)-N-ethyl-2-bromobenzylamine (DSP 4) on the active uptake of noradrenaline, *J Pharm Pharmacol*, 28 (1976) 458-459.
- [261] Rothman,R.B., Baumann,M.H., Dersch,C.M., Romero,D.V., Rice,K.C., Carroll,F.I., Partilla,J.S., Amphetamine-type central nervous system stimulants release norepinephrine more potently than they release dopamine and serotonin, *Synapse*, 39 (2001) 32-41.
- [262] Russell,V.A., de Villiers,A.S., Sagvolden,T., Lamm,M.C., Taljaard,J.J., Methylphenidate affects striatal dopamine differently in an animal model for attention-deficit/hyperactivity disorder--the spontaneously hypertensive rat, *Brain Res. Bull.*, 53 (2000) 187-192.
- [263] Rückert,N. Verhaltenspharmakologische und neurochemische Untersuchungen zur Beteiligung des zentral nervösen noradrenergen Systems an der Ausprägung von Parkinson-Symptomen bei der Ratte nach 6-OHDA-Läsion des Locus coeruleus. 2001. Fakultät der Biologie der Universität Tübingen. Dissertation
- [264] Rückert,N., Bubser,M., Schmidt,W.J., 6-Hydroxydopamine lesion of locus coeruleus and the antiparkinsonian potential of NMDA-receptor antagonists in rats, *J Neural Transm*, 104 (1997) 363-377.
- [265] Sanchez,V., Camamero,J., Esteban,B., Peter,M.J., Green,A.R., Colado,M.I., The mechanisms involved in the long-lasting neuroprotective effect of fluoxetine against MDMA ('ecstasy')-induced degeneration of 5-HT nerve endings in rat brain, *Br J Pharmacol*, 134 (2001) 46-57.
- [266] Sasaki,K., Suda,H., Watanabe,H., Yagi,H., Involvement of the entopeduncular nucleus and the habenula in methamphetamine-induced inhibition of dopamine neurons in the substantia nigra of rats, *Brain Res. Bull.*, 25 (1990) 121-127.
- [267] Sastre-Coll,A., Esteban,S., García-Sevilla,J.A., Effects of imidazoline receptor ligands on monoamine synthesis in the rat brain in vivo, *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, 360 (1999) 50-62.
- [268] Schatz,D.S., Kaufmann,W.A., Schuligoi,R., Humpel,Ch., Saria,A., 3,4-Methylenedioxymetamphetamine (Ecstasy) induces c-fos-like protein and mRNA in rat organotypic dorsal striatal slices, *Synapse*, 36 (2000) 75-83.

-
- [269] Schechter,M.D., Drug-drug discrimination: stimulus properties of drugs of abuse upon a serotonergic-dopaminergic continuum, *Pharmacol. Biochem. Behav.*, 56 (1997) 89-96.
- [270] Schmidt,C.J., Neurotoxicity of the psychedelic amphetamine, methylenedioxymethamphetamine, *J Pharmacol Exp Ther*, 240 (1987) 1-7.
- [271] Schmidt,C.J., Neurochemistry of ring-substituted amphetamine analogs. In Cho,AK, Segal,DS (Eds.), *Amphetamine and its analogs: Psychopharmacology, toxicology, and abuse* Academic Press, San Diego, 1994, pp. 151-175.
- [272] Schmidt,C.J., Sullivan,C.K., Fadayel,G.M., Blockade of striatal 5-hydroxytryptamine₂ receptors reduces the increase in extracellular concentrations of dopamine produced by the amphetamine analogue 3,4-methylenedioxymethamphetamine, *J Neurochem.*, 62 (1994) 1382-1389.
- [273] Schmidt,C.J., Wu,L., Lovenberg,W., Methylenedioxymethamphetamine: a potentially neurotoxic amphetamine analogue, *Eur. J Pharmacol.*, 124 (1986) 175-178.
- [274] Schmidt,W.J., *Biologische Grundlagen der Sucht*, B. I. F. Futura, 12 (1997) 172-178.
- [275] Schmidt,W.J., Bedeutung der Glutamat-Rezeptor-Subtypen für psychiatrische Erkrankungen. In Gaebel,W, Falkai,P (Eds.), *Zwischen Spezialisierung und Integration - Perspektiven der Psychiatrie und Psychotherapie* Springer, Wien, N.Y., 1998, pp. 11-15.
- [276] Schmidt,W.J., Zur Verhaltensbiologie der Parkinson-Krankheit, *Neuroforum*, 6 (2000) 229-234.
- [277] Schmidt,W.J., Kretschmer,B.D., Behavioural pharmacology of glutamate receptors in the basal ganglia, *Neurosci Biobehav Rev*, 21 (1997) 381-392.
- [278] Schmidt,W.J., Mayerhofer,A., Meyer,A., Kovar,K.-A., In search of the anti-parkinsonian component of Ecstasy, eingereichte Publikation, (2002).
- [279] Schmidt,W.J., Tzschentke,T.M., Kretschmer,B.D., State-dependent blockade of haloperidol-induced sensitization of catalepsy by MK-801, *Eur. J Neurosci*, 11 (1999) 3365-3368.
- [280] Schreckenberger,M., Gouzoulis-Mayfrank,E., Sabri,O., Arning,C., Tuttass,T., Schulz,G., Kaiser,H.J., Wagenknecht,G., Sass,H., Bull,U., [Investigations on the effect of "ecstasy" on cerebral glucose metabolism: an 18-FDG PET study], *Nuklearmedizin*, 37 (1998) 262-267.
- [281] Schultz,W., Apicella,P., Ljungberg,T., Romo,R., Scarnati,E., Reward-related activity in the monkey striatum and substantia nigra, *Prog Brain Res*, 99 (1993) 227-235.

- [282] Schultz,W., Dickinson,A., Neuronal coding of prediction errors, *Annu. Rev Neurosci*, 23 (2000) 473-500.
- [283] Sealfon,S.C., Olanow,C.W., Dopamine receptors: from structure to behavior, *Trends Neurosci*, 23 (2000) S34-S40.
- [284] Semple,D.M., Ebmeier,K.P., Glabus,M.F., O'Carroll,R.E., Johnstone,E.C., Reduced in vivo binding to the serotonin transporter in the cerebral cortex of MDMA ('ecstasy') users, *British Journal of Psychiatry*, 175 (1999) 63-69.
- [285] Shankaran,H., Yamamoto,B.K., Gudelsky,G.A., Involvement of the serotonin transporter in the formation of hydroxyl radicals induced by 3,4-methylenedioxymethamphetamine, *Eur J Pharmacol*, 385 (1999) 103-110.
- [286] Shankaran,M., Yamamoto,B.K., Gudelsky,G.A., Mazindol attenuates the 3,4-methylenedioxymethamphetamine-induced formation of hydroxyl radicals and long-term depletion of serotonin in the striatum, *J Neurochem*, 72 (1999) 2516-2522.
- [287] Shankaran,M., Yamamoto,B.K., Gudelsky,G.A., Ascorbic acid prevents 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA)-induced hydroxyl radical formation and the behavioral and neurochemical consequences of the depletion of brain 5-HT, *Synapse*, 40 (2001) 55-64.
- [288] Shippenberg,T.S., Hen,R., He,M., Region-specific enhancement of basal extracellular and cocaine-evoked dopamine levels following constitutive deletion of the Serotonin(1B) receptor, *J Neurochem.*, 75 (2000) 258-265.
- [289] Shulgin,A., Shulgin,A., *PIHKAL: A chemical love story*, Transform Press, Berkeley, CA, USA, 1998.
- [290] Simantov,R., Tauber,M., The abused drug MDMA (Ecstasy) induces programmed death of human serotonergic cells, *FASEB J*, 11 (1997) 141-146.
- [291] Sinton,C.M., Fallon,S.L., Electrophysiological evidence for a functional differentiation between subtypes of the 5-HT₁ receptor, *Eur. J. Pharmacol.*, 157 (1988) 173-181.
- [292] Soghomonian,J.J., Doucet,G., Descarries,L., Serotonin innervation in adult rat neostriatum. I. Quantified regional distribution, *Brain Research*, 425 (1987) 85-100.
- [293] Sorensen,S.M., Kehne,J.H., FadayeI,G.M., Humphreys,T.M., Ketteler,H.J., Sullivan,C.K., Taylor,V.L., Schmidt,C.J., Characterization of the 5-HT₂ receptor antagonist MDL 100907 as

- a putative atypical antipsychotic: behavioral, electrophysiological and neurochemical studies, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 266 (1993) 684-691.
- [294] Spanagel,R.W., Weiss,F. The dopamine hypothesis of reward: past and current status. *Trends Neurosci* 22[11], 521-527. 1999.
- [295] Spitzer,M., Franke,B., Walter,H., Buechler,J., Wunderlich,A.P., Schwab,M., Kovar,K.A., Hermle,L., Gron,G., Enantio-selective cognitive and brain activation effects of N-ethyl-3,4-methylenedioxyamphetamine in humans, *Neuropharmacology*, 41 (2001) 263-271.
- [296] Sprague,J.E., Everman,S.L., Nichols,D.E., An integrated hypothesis for the serotonergic axonal loss induced by 3,4-methylenedioxymethamphetamine, *Neurotoxicology*, 19 (1998) 427-442.
- [297] Stadtland,C., Erfurth,A., Arolt,V., De novo onset of Parkinson's disease after antidepressant treatment with citalopram, *Pharmacopsychiatry*, 33 (2000) 194-195.
- [298] Starke,K., Gothert,M., Kilbinger,H., Modulation of neurotransmitter release by presynaptic autoreceptors, *Physiol Rev*, 69 (1989) 864-989.
- [299] Stephenson,C.P., Hunt,G.E., Topple,A.N., McGregor,I.S., The distribution of 3,4-methylenedioxymethamphetamine "Ecstasy"-induced c-fos expression in rat brain, *Neuroscience*, 92 (1999) 1011-1023.
- [300] Stewart,J., Badiani,A., Tolerance and sensitization to the behavioral effects of drugs, *Behavioural Pharmacology*, 4 (1993) 289-312.
- [301] Stolerman,I., Drugs of abuse: behavioural principles, methods and terms, *Trends Pharmacol Sci*, 13 (1992) 170-176.
- [302] Stone,D.M., Stahl,D.C., Hanson,G.R., Gibb,J.W., The effects of 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA) and 3,4-methylenedioxyamphetamine (MDA) on monoaminergic systems in the rat brain, *Eur J Pharmacol*, 128 (1986) 41-48.
- [303] Stumm,G., Schlegel,J., Schafer,T., Wurz,C., Mennel,H.D., Krieg,J.C., Vedder,H., Amphetamines induce apoptosis and regulation of bcl-x splice variants in neocortical neurons, *FASEB J*, 13 (1999) 1065-1072.
- [304] Sulzer,D., Maidment,N.T., Rayport,S., Amphetamine and other weak bases act to promote reverse transport of dopamine in ventral midbrain neurons, *J. Neurochem.*, 60 (1993) 527-535.

-
- [305] Sulzer,D., Pothos,E., Sung,H.M., Maidment,N.T., Hoebel,B.G., Rayport,S., Weak base model of amphetamine action, *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 654 (1992) 525-528.
- [306] Thomasius,R., Schmolke,M., Kraus,D., MDMA ("Ecstasy")-Konsum - ein Überblick zu psychiatrischen und medizinischen Folgen, *Fortschr Neurol Psychiat*, 65 (1997) 49-61.
- [307] Trendelenburg,A.U., Starke,K., Limberger,N., Presynaptic alpha 2A-adrenoceptors inhibit the release of endogenous dopamine in rabbit caudate nucleus slices, *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, 350 (1994) 473-481.
- [308] Trendelenburg,A.U., Trendelenburg,M., Starke,K., Limberger,N., Release-inhibiting alpha 2-adrenoceptors at serotonergic axons in rat and rabbit brain cortex: evidence for pharmacological identity with alpha 2-autoreceptors, *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.*, 349 (1994) 25-33.
- [309] Tsai,S.-J., Hong,C.-J., Wang,Y.-C., Tryptophan hydroxylase gene polymorphism (A218C) and suicidal behaviors, *Neuroreport*, 10 (1999) 3773-3775.
- [310] Twarog,B.M., Page,I.H., Serotonin content of some mammalian tissues and urine and method for its determination, *Am J Physiol*, 175 (1953) 157-161.
- [311] Tzschentke,T.M., Measuring reward with the conditioned place preference paradigm: a comprehensive review of drug effects, recent progress and new issues, *Progress in Neurobiology*, 56 (1998) 613-672.
- [312] Tzschentke,T.M., Pharmacology and behavioural pharmacology of the mesocortical dopamine system, *Prog Neurobiol*, 63 (2001) 241-320.
- [313] Tzschentke,T.M., Schmidt,W.J., Does the noncompetitive NMDA receptor antagonist dizocilpine (MK801) really block behavioural sensitization associated with repeated drug administration?, *Trends Pharmacol. Sci.*, 19 (1998) 447-451.
- [314] Tzschentke,T.M., Schmidt,W.J., Functional heterogeneity of the rat medial prefrontal cortex: effects of discrete subarea-specific lesions on drug-induced conditioned place preference and behavioural sensitization, *Eur. J Neurosci*, 11 (1999) 4099-4109.
- [315] Wadenberg,M.L., Antagonism by 8-OH-DPAT, but not ritanserin, of catalepsy induced by SCH 23390 in the rat, *J Neural Transm Gen. Sect.*, 89 (1992) 49-59.
- [316] Wadenberg,M.L., Serotonergic mechanisms in neuroleptic-induced catalepsy in the rat, *Neurosci Biobehav. Rev*, 20 (1996) 325-339.

-
- [317] Wadenberg,M.L., Hillegaart,V., Stimulation of median, but not dorsal, raphe 5-HT_{1A} autoreceptors by the local application of 8-OH-DPAT reverses raclopride-induced catalepsy in the rat, *Neuropharmacology*, 34 (1995) 495-499.
- [318] Wang,R.Y., Aghajanian,G.K., Physiological evidence for habenula as major link between forebrain and midbrain raphe, *Science*, 197 (1977) 89-91.
- [319] Weiss,I.C., Domeney,A.M., Heidbreder,C.A., Moreau,J.L., Feldon,J., Early social isolation, but not maternal separation, affects behavioral sensitization to amphetamine in male and female adult rats, *Pharmacol. Biochem. Behav.*, 70 (2001) 397-409.
- [320] Whitaker-Azmitia,P.M., The discovery of serotonin and its role in neuroscience, *Neuropsychopharmacology*, 21 (1999) 2S-8S.
- [321] White,S.R., Obradovic,T., Imel,K.M., Wheaton,M.J., The effects of methylenedioxymethamphetamine (MDMA, "Ecstasy") on monoaminergic neurotransmission in the central nervous system, *Progress in Neurobiology*, 49 (1996) 455-479.
- [322] Winter,C., Schenkel,J., Bürger,E., Eickmeier,C., Zimmermann,M., Herdegen,T., The immunophilin ligand FK506, but not GPI-1046, protects against neuronal death and inhibits c-Jun expression in the substantia nigra pars compacta following transection of the rat medial forebrain bundle, *Neuroscience*, 95 (2000) 753-762.
- [323] Winterfeld,K.T., Teuchert-Noodt,G., Dawirs,R.R., Social environment alters both ontogeny of dopamine innervation of the medial prefrontal cortex and maturation of working memory in gerbils (*Meriones unguiculatus*), *J Neurosci Res*, 52 (1998) 201-209.
- [324] Wolffgramm,J., An ethopharmacological approach to the development of drug addiction, *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 15 (1991) 515-519.
- [325] Wolffgramm,J., Drogenappetenz und Craving im Tiermodell der Suchtentwicklung. In Gaebel,W, Falkai,P (Eds.), *Zwischen Spezialisierung und Integration - Perspektiven der Psychiatrie und Psychotherapie* Springer-Verlag, Wien, New York, 1998, pp. 24-31.
- [326] Wyvell,C.L., Berridge,K.C., Incentive sensitization by previous amphetamine exposure: increased cue- triggered "wanting" for sucrose reward, *J Neurosci*, 21 (2001) 7831-7840.
- [327] Yeh,S.Y., Effects of salicylate on 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA)- induced neurotoxicity in rats, *Pharmacol. Biochem. Behav.*, 58 (1997) 701-708.

- [328] Yoshida,M., Shirouzu,M., Tanaka,M., Semba,K., Fibiger,H.C., Dopaminergic neurons in the nucleus raphe dorsalis innervate the prefrontal cortex in the rat: a combined retrograde tracing and immunohistochemical study using anti-dopamine serum, *Brain Res.*, 496 (1989) 373-376.
- [329] Zhang,J., Kravtsov,V., Amarnath,V., Picklo,M.J., Graham,D.G., Montine,T.J., Enhancement of dopaminergic neurotoxicity by the mercapturate of dopamine: relevance to Parkinson's disease, *J Neurochem*, 74 (2000) 970-978.
- [330] Zieher,L.M., Jaim-Etcheverry,G., Neurotoxicity of N-(2-chloroethyl)-N-ethyl-2-bromobenzylamine hydrochloride (DSP 4) on noradrenergic neurons is mimicked by its cyclic aziridinium derivative, *Eur J Pharmacol*, 65 (1980) 249-256.
- [331] Zilles,K., Rehkämper,G., *Funktionelle Neuroanatomie*, Springer, Berlin, Heidelberg, ..., 1998.
- [332] Zoli,M., Jansson,A., Sykova,E., Agnati,L.F., Fuxe,K., Volume transmission in the CNS and its relevance for neuropsychopharmacology, *Trends Pharmacol. Sci.*, 20 (1999) 142-150.

Meine akademischen Lehrer waren die Herren Professoren und Dozenten:

C. Allgaier	Pharmakologie und Toxikologie
K. H. Bauer	Pharmazeutische Technologie
H. Bochow	Pharmazeutische Technologie
P. Düll	Pharmazeutische Biologie
A. W. Frahm	Pharmazeutische Chemie
L. Heide	Pharmazeutische Biologie
M. Heinrich	Pharmazeutische Biologie
J. Hoyer	Pharmazeutische Chemie
P. Illes	Pharmakologie und Toxikologie
G. Isele	Pharmazeutische Chemie
R. Jakisch	Pharmakologie und Toxikologie
M. Kist	Medizinische Mikrobiologie
M. Kohlhardt	Physiologie
K.-A. Kovar	Pharmazeutische Chemie
J. Lehmann	Organische Chemie
H.-J. Meyer	Klinische Pharmazie
G. Modjesch	Pharmazeutische Chemie
H.-H. Otto	Pharmazeutische Chemie
M. Plehn	Pharmazie - Geschichte
H. Rimpler	Pharmazeutische Biologie
T. Schirmeister	Pharmazeutische Chemie
W. J. Schmidt	Neuropharmakologie
H. Schmitt	Physik für Pharmazeuten
R. Schubert	Pharmazeutische Technologie
K. Starke	Pharmakologie und Toxikologie
R. Wallmichrath	Pharmazeutische Chemie

LEBENS LAUFPersönliche Daten

Name: Andreas Mayerhofer
Geburtstag, -ort: 01.05.1970 in Bratislava (Slowakische Republik)

Schulbildung:

1976 – 1984 Achtjährige Grundschule Bratislava
1984 – 1985 Kettelerheim Schwäbisch Gmünd (Erlernen der deutschen Sprache)
1985 – 1990 Schelztorgymnasium Esslingen am Neckar
15.05.1990 Abitur

Studium und Ausbildung:

1990 – 1995 Studium der Pharmazie an der Albert-Ludwigs-Universität Freiburg
11.03.-07.04.1991 Famulatur in der Rheinapotheke, Freiburg i. Br.
22.07.-17.08.1991 Famulatur in der Charlottenapotheke, Esslingen am Neckar
03.09.1992 Erster Abschnitt der Pharmazeutischen Prüfung
27.03.1995 Zweiter Abschnitt der Pharmazeutischen Prüfung

05/1995 – 10/1995 Pharmazeutisches Praktikum in der Apotheke des Städtischen Krankenhauses Sindelfingen
11/1995 – 04/1996 Pharmazeutisches Praktikum in der Apotheke am Fischbrunnen, Esslingen am Neckar
21.05.1996 Dritter Abschnitt der Pharmazeutischen Prüfung
30.05.1996 Approbation als Apotheker
07/1996 Sanitätsakademie der Bundeswehr, München
06/1997 – 05/2002 Anfertigung der vorliegenden Arbeit mit dem Titel „Akut- und Langzeiteffekte von 3,4-Methylendioxyamphetamin (MDMA, „Ecstasy“) in Tiermodellen der Sucht und Neurotoxizität“ unter der Leitung von Prof. Dr. Werner J.

01/1998 – 12/2000 Schmidt am Zoologischen Institut der Eberhard-Karls-Universität Tübingen, Abteilung Neuropharmakologie
Stipendium des Graduiertenkollegs Neurobiologie, Universität Tübingen

Berufliche Tätigkeiten:

06/1996 Apotheke am Fischbrunnen, Esslingen am Neckar
07/1996 – 04/1997 Wehrdienst als Stabsapotheker in der Bundeswehrapotheke der Luftwaffe, Landsberg am Lech
05/1997 Apotheke am Fischbrunnen, Esslingen am Neckar
seit 04/1998 Aushilfstätigkeit in der Kachel'schen Apotheke, Reutlingen
06/1998 u. 08/1999 Apotheke des Städtischen Krankenhauses Sindelfingen
seit 01/2002 Apotheke des Städtischen Krankenhauses Sindelfingen