

Nevrokjemiske undersøkelser av to dyremodeller for ADHD

Måling av reseptorbinding og monoaminnivåer i hjernen

Ole Rostad



Masteroppgave ved Avdeling for farmasøytisk biovitenskap

Farmasøytisk institutt

Det matematisk-naturvitenskapelige fakultet

UNIVERSITETET I OSLO

Våren 2009

Forord

Denne masteroppgaven ble utført ved Institutt for medisinske basalfag, Avdeling for biokjemi. Arbeidet ble utført høsten 2008 og våren 2009 som en del av graden Master i farmasi. Professor emeritus Frode Fonnum og professor Hege Christensen var henholdsvis ekstern og intern veileder for oppgaven. Frode Fonnum fortjener en stor takk for god veiledning underveis. Takk også til Hege Christensen for gjennomlesing av oppgaven mot slutten av arbeidet.

Post doc. Inger Lise Bogen har vært viktig under skrivearbeidet, tusen takk for hjelpen. Takk også til stipendiat Mattis Brønne Wigestrands for mye hjelp i forbindelse med labarbeidet, og til overingeniør Bjørge Roberg for opplæring i HPLC-analyse. Professor Ivar Walaas fortjener en takk for gode svar på alle spørsmålene jeg har stilt ham.

Jeg vil også takke masterstudent Kine Dervola, avdelingsingeniør Ann-Kristin Molværsmyr og stipendiat Angel-Moldes Anaya for hyggelig selskap på laben. Helt til slutt vil jeg takke familie og venner for masse støtte og oppmuntring underveis, både mens jeg holdt på med labarbeid og med skriving av oppgaven.

Oslo, 15. mai 2009, Ole Rostad.

Innhold

FORORD	2
INNHold	3
SAMMENDRAG	6
FORKORTELSER	8
1. INNLEDNING	11
1.1 NEVROTRANSMITTERSYSTEMER.....	11
1.1.1 Dopamin.....	12
1.1.2 Glutamat.....	13
1.1.3 Acetylkolin.....	13
1.2 ATTENTION-DEFICIT/HYPERACTIVITY DISORDER (ADHD).....	14
1.2.1 Epidemiologi og diagnose.....	14
1.2.2 Etiologi.....	15
1.2.3 Patofysiologi.....	17
1.2.4 Behandling.....	19
1.3 DYREMODELLER FOR ADHD.....	20
1.3.1 Charles River spontant hypertensiv rotte (SHR/NCrl).....	21
1.3.2 Charles River Wistar Kyoto-rotte (WKY/NCrl).....	22
1.3.3 Harlan Wistar Kyoto-rotte (WKY/NHsd).....	23
1.3.4 Atferdsstudier av SHR-, ADD- og WKY-rotter.....	23
1.4 POLYKLORERTE BIFENYLER (PCB) OG ADHD.....	26
1.4.1 Generelt om PCB.....	26
1.4.2 Skadevirkninger/biologiske effekter av PCB.....	28

1.5	HENSIKT MED OPPGAVEN	29
2.	MATERIALER OG METODER.....	32
2.1	KJEMIKALIER	32
2.2	DYR	34
2.2.1	<i>Harlan Wistar Kyoto-rotter (WKY/NHsd)</i>	34
2.2.2	<i>Charles River Wistar Kyoto-rotter (WKY/NCrI)</i>	34
2.2.3	<i>Charles River spontant hypertensive rotter (SHR/NCrI)</i>	34
2.2.4	<i>Dyrehold</i>	34
2.2.5	<i>In vivo-eksponering for PCB</i>	35
2.3	PRØVEOPPARBEIDING.....	35
2.3.1	<i>Tilberedning av membranhomogenat</i>	35
2.3.2	<i>Tilberedning av prøver til HPLC-analyse</i>	36
2.4	KVANTITATIV BESTEMMELSE AV PROTEINER	36
2.5	RESEPTORBINDINGSFORSØK.....	37
2.5.1	<i>Binding av [³H]-metyllycaconitin ([³H]-MLA) til α₇-nikotinreseptorer</i>	38
2.5.2	<i>Binding av [³H]-epibatidin til nikotinreseptorer</i>	39
2.5.3	<i>Binding av [³H]-MK-801 til NMDA-reseptorer</i>	39
2.6	HPLC-ANALYSE AV MONOAMINER I STRIATUM	40
2.7	TALLBEHANDLING OG STATISTIKK	41
3.	RESULTATER.....	42
3.1	METODEFORSØK	42
3.1.1	<i>Metodeforsøk med [³H]-MLA</i>	42
3.1.2	<i>Optimalisering av HPLC-metode</i>	47
3.2	SAMMENLIGNING AV RESEPTORBINDING HOS WKY-, ADD- OG SHR-ROTTER.....	49

3.2.1	<i>α₇-Nikotinreseptorbinding i cerebrum</i>	49
3.2.2	<i>α₇-Nikotinreseptorbinding i hippocampus</i>	50
3.2.3	<i>Generell nikotinreseptorbinding i cerebrum</i>	51
3.2.4	<i>Generell nikotinreseptorbinding i hippocampus</i>	52
3.2.5	<i>NMDA-reseptorbinding i cerebrum</i>	53
3.2.6	<i>NMDA-reseptorbinding i hippocampus</i>	54
3.3	SAMMENLIGNING AV MONOAMINNIVÅER HOS PCB-EKSPONERTE ROTTER OG KONTROLLROTTER	55
3.3.1	<i>Måling av monoaminer i striatum</i>	55
4.	DISKUSJON	59
4.1	SAMMENLIGNING AV RESEPTORBINDING HOS WKY-, ADD- OG SHR-ROTTER.....	59
4.1.1	<i>Nikotinreseptorbinding i cerebrum og hippocampus</i>	59
4.1.2	<i>NMDA-reseptorbinding i cerebrum og hippocampus</i>	62
4.2	SAMMENLIGNING AV MONOAMINNIVÅER HOS PCB-EKSPONERTE ROTTER OG KONTROLLROTTER	64
4.2.1	<i>Måling av monoaminer i striatum</i>	64
4.3	OPPSUMMERING	68
4.4	FORSLAG TIL VIDERE ARBEID	69
	KILDELISTE	70
	APPENDIKS	79
	BUFFERLØSNINGER BRUKT I OPPGAVEN.....	79
	<i>PBS-buffer, 25 mM, pH 7.4, 1 l</i>	79
	<i>TRIS-HCl-buffer, 50 mM, pH 7.4, 1 l</i>	79
	<i>TRIS/HEPES-buffer, 4.5/5.0 mM, pH 7.4, 1 l</i>	79

Sammendrag

Attention-deficit/hyperactivity disorder (ADHD) er en forstyrrelse som kjennetegnes av manglende oppmerksomhet, impulsivitet og hyperaktivitet. ADHD rammer i størst grad barn, men mange av barna som er rammet av forstyrrelsen vil også oppleve hemmende symptomer som voksne. Forstyrrelser i regulering av dopamin- og noradrenalinbaner ser ut til å være en sentral del av patofysiologien ved ADHD. Andre nevrotransmittersystemer er imidlertid også foreslått å kunne spille en rolle i utviklingen av sykdommen.

I denne oppgaven ble to ulike dyremodeller for ADHD – SHR- og ADD-rotter – sammenlignet med kontrolldyr (WKY) i forsøk på å finne mulige årsaker til atferdsforstyrrelsene man observerer ved ADHD. De tre rottemodellene ble sammenlignet med hensyn på nikotin- og NMDA-reseptorbinding (glutamatreseptor) i cerebrum og hippocampus. Monoaminnivåer i striatum hos SHR-rotter ble også sammenlignet med kontrolldyr (WKY). Monoaminnivåer i striatum ble dessuten undersøkt hos SHR- og WKY-rotter etter eksponering for miljøgiften PCB 153.

Det ble funnet signifikant lavere binding til $\alpha_4\beta_2$ -nikotinreseptorer i cerebrum og hippocampus hos SHR-rotter sammenlignet med både WKY- (kontrolldyr) og ADD-rotter. Det ble også funnet signifikant lavere binding til α_7 -nikotinreseptorer i cerebrum hos SHR sammenlignet med WKY og ADD, men ikke i hippocampus. Det var kun signifikante forskjeller mellom WKY- og ADD-rotter når det gjaldt binding til nikotinreseptorer av α_7 -subtypen i cerebrum. ADD hadde signifikant høyere binding enn WKY. Denne oppgaven avdekket ingen signifikante forskjeller i binding til glutamatreseptorer av NMDA-typen mellom WKY-, ADD og SHR-rotter, verken i cerebrum eller i hippocampus.

Ved sammenligning av monoaminnivåer i striatum hos SHR- og kontrollrotter (WKY), ble det funnet signifikant høyere 5-HIAA/serotonin-ratio hos ueksponerte SHR sammenlignet med ueksponerte WKY. Dette kan tyde på høyere

serotoninturnover i striatum hos SHR-rottene. Det var dessuten en tendens til lavere nivåer av dopamin hos SHR sammenlignet med WKY. Det ble ikke funnet signifikante forskjeller mellom PCB 153-eksponerte og ueksponerte WKY-rotter eller mellom PCB 153-eksponerte og ueksponerte SHR-rotter når det gjaldt monaminnivåer eller metabolitt/monoamin-ratioer i striatum. Det var imidlertid en tendens til høyere dopaminnivåer hos de PCB 153-eksponerte rottene sammenlignet med kontrollrottene både for SHR-rottene og WKY-rottene.

Forkortelser

[³ H]-MK-801	[³ H]-dizocilpin
[³ H]-MLA	[³ H]-metylycaconitin
5-HIAA	5-hydroksyindoleddiksyre
5-HT	Serotonin
AC	Adenylatsyklase
AcCoA	Acetyl-koenzym A
AchE	Acetylkolinesterase
ADD	Attention-deficit disorder
ADHD	Attention-deficit/hyperactivity disorder
ADHD-PI	ADHD, overveidende oppmerksomhetssviktstype
AMPA	α -Amino-3-hydroksy-5-metyl-4-isoksazolpropionsyre
ANOVA	Variansanalyse
BCA	Bicinkoninsyre
Bp	Basepar
BSA	Bovint serumalbumin
CA	Ammons horn
cAMP	Syklisk adenosinmonofosfat
ChAT	Kolinacetyltransferase
ChT	Kolintransportør
COMT	Katekol- <i>O</i> -metyltransferase
DA	Dopamin
DAT	Dopamintransportør
DAT-1-genet	Dopamintransportørgenet

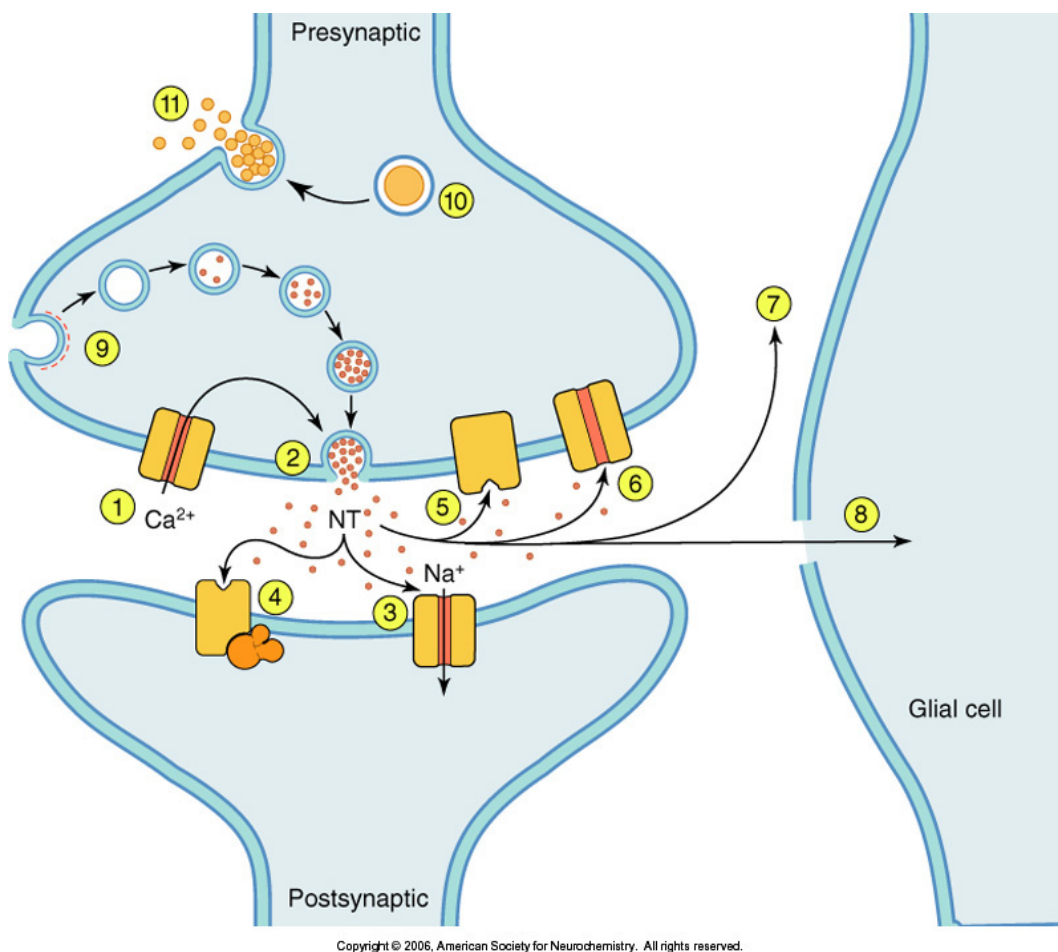
DBH-genet	Dopamin-betahydroksylasegenet
DHBA	Dihydroksybenzylamin
DNA	Deoksyribonukleinsyre
Dpm	Desintegrasjoner/minutt
DRD4-genet	Dopamin-D ₄ -reseptorgenet
DRD5-genet	Dopamin-D ₅ -reseptorgenet
DSM-IV	Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, 4. utgave
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
EAAT	Eksitatorisk aminosyretransportør
GABA	γ -aminosmørsyre
HEPES	N-2-Hydroksyetylpiiperazin-N'-2-etansulfonsyre
HKD	Hyperkinetisk forstyrrelse
HPLC	High performance liquid chromatography
HTR1B-genet	Serotonin- _{1B} -reseptorgenet
HVA	Homovanillinsyre
ICD-10	International Classification of Diseases, 10. utgave
KA	Kainat
LTD	Langtidsdepresjon
LTP	Langtidspotensering
MAO	Monoaminoksidase
MK-801	Dizocilpin
MLA	Metylycaconitin
mRNA	Messenger-ribonukleinsyre
NMDA	N-metyl-D-aspartat
NT	Nevrotransmitter

PBS	Fosfatbufret saltløsning
PCB	Polykloret bifenyl
PCP	Fensyklidin
SA-transportør	System A-transportør
SEM	Standardfeil for gjennomsnittet
SHR	Spontant hypertensiv rotte
SHRSP	Spontant hypertensiv rotte som lett får slag
SLC6A4-genet	Serotonin-transportørgenet
SNAP-25	Synaptosomal-assosiert protein-25-genet
SN-transportør	System N-transportør
TRIS	Tris(hydroksymetyl)aminometan
VAchT	Vesikulær acetylkolintransportør
VGLUT	Vesikulær glutamattransportør
VMAT	Vesikulær monoamintransportør
WKY-rotte	Wistar Kyoto-rotte

1. Innledning

1.1 Neurotransmittersystemer

Nerveceller kommuniserer med hverandre hovedsakelig gjennom kjemisk transmisjon. Denne kommunikasjonen foregår i synapser (kontaktpunkter) mellom cellene. Stoffene som overfører signalene, kalles neurotransmittere. Viktige neurotransmittere er blant annet acetylkolin, aminosyrer, slik som glutamat, γ -aminosmørsyre (GABA) og glysin, monoaminer, som dopamin, noradrenalin og serotonin, og neuropeptider. Figur 1.1 viser en generell oversikt over synaptisk transmisjon (Holz og Fisher 2006).



Figur 1.1: Generell oversikt over synaptisk transmisjon. Depolarisering åpner spenningssensitive Ca^{2+} -kanaler i den presynaptiske nerveterminalen (1). Innstrømmingen av Ca^{2+} og de påfølgende høye Ca^{2+} -konsentrasjonene ved aktive

soner på plasmamembranen utløser (2) eksocytosen av små synaptiske vesikler som lagrer neurotransmitter (NT) som er involvert i hurtig synaptisk transmisjon. Frigjort neurotransmitter interagerer med reseptorer i den postsynaptiske membranen som enten er koblet direkte til ionekanaler (3) eller virker gjennom second messengere, slik som (4) G-proteinkoblede reseptorer. Neurotransmitterreseptorer, som også finnes i membranen til den presynaptiske nerveterminalen (5), enten hemmer eller øker eksocytose etter påfølgende depolarisering. Frigjort neurotransmitter inaktiveres ved reopptak inn i nerveterminalen av (6) et transportprotein koblet til Na^+ -gradienten (for eksempel dopamin, noradrenalin, glutamat og GABA), ved (7) degradering (acetylkolin og peptider), eller ved (8) opptak og metabolisme av gliaceller (glutamat). Den synaptiske vesikkelmembranen resirkuleres ved (9) klatrin-mediert endocytose. Neuropeptider og proteiner er lagret i (10) større, dense core-granuler inne i nerveterminalen. Disse dense core-granulene frigjøres fra (11) steder utenfor de aktive sonene etter gjentatt stimulering (Holz og Fisher 2006).

1.1.1 Dopamin

Dopamin er neurotransmitter i flere viktige baner i hjernen, som den nigrostriatale banen, de mesolimbiske/mesokortikale banene og den tubero-hypofyseale banen. Dopamin er også forløperen til en annen viktig transmitter, nemlig noradrenalin. Dopamin ligger lagret inne i vesikler i (presynaptiske) nerveterminaler. Dopamin slippes ut i synapsen ved eksocytose, som følge av at et aksjonspotensiale når nerveterminalen. Reopptak av dopamin fra synapsen og inn i nerveterminalen igjen, skjer via dopamintransportører (DAT) i plasmamembranen. Inne i cellen oppkonsentreres dopamin i vesikler igjen via vesikulære monoamintransportører (VMAT). De viktigste enzymene som er involvert i metabolismen av dopamin, er monoaminoksidase (MAO) og katekol-O-metyltransferase (COMT). Dopaminreseptorer deles gjerne inn i D_1 -lignende (D_1 og D_5) og D_2 -lignende reseptorer (D_2 - D_4). Dopaminreseptorene er koblet til adenylatsyklase (AC) (via G-proteiner). De D_1 -lignende reseptorene gir en økning i syklisk adenosinmonofosfat (cAMP), mens de D_2 -lignende gir en nedgang i cAMP (ved henholdsvis stimulering og hemming av AC) (Kuhar et al. 2006). Dopamin kan modulere glutamaterg transmisjon. Blant annet ser det ut til at aktivering av dopaminreseptorer kan regulere fosforyleringsnivået hos NMDA-reseptorsubenheter gjennom en signaleringskaskade. Endret fosforylering av subenhetene kan gi endrete egenskaper, slik som endret

sensitivitet, hos reseptoren (*N*-metyl-D-aspartat-reseptor, glutamatreseptortype) (Snyder et al. 1998).

1.1.2 Glutamat

Glutamat er den viktigste eksitatoriske neurotransmitteren i hjernen. Cirka 80-90% av synapsene i hjernen er glutamaterge. Glutamat er samlet i synaptiske vesikler inne i nevronene, og slippes ut i synapsen (fra vesiklene) ved kalsiumavhengig eksocytose etter stimulering av nevronet. Glutamat i synapsen tas opp igjen av nevroner og astrocytter via eksitatoriske aminosyretransportører (EAAT). Glutamat som tas opp av astrocytter, omdannes til glutamin (som er uten transmitteregenskaper). Glutamin frigjøres fra astrocyttene via glutamintransportører (System N-transportører (SN)) og tas opp i nevroner via andre glutamintransportører (System A-transportører (SA)). I nevronene omdannes glutamin til glutamat, som tas opp i vesikler igjen via vesikulære glutamattransportører (VGLUTer). Glutamatreseptorer deles inn i to hovedgrupper: Iontrope reseptorer (ligandopererte kationkanaler) og metabotrope reseptorer (G-proteinkoblede proteiner). De ionotrope glutamatreseptorene ser ut til å være tetramere (bestå av fire subenheter), og deles inn i NMDA- (*N*-metyl-D-aspartat), AMPA- (α -amino-3-hydroksy-5-metyl-4-isoksazolpropionsyre), og kainatreseptorer (KA). De metabotrope reseptorene deles inn i klasse I, II- og III-reseptorer. Glutamatreseptorer, særlig NMDA-reseptorer, spiller en svært viktig rolle i hukommelse og læring, gjennom fenomenene langtidspotensering (LTP) og langtidsdepresjon (LTD) (Hassel og Dingleline 2006).

1.1.3 Acetylkolin

Acetylkolin er en viktig transmitter i sentralnervesystemet, og reseptorer for transmitteren har omfattende utbredelse. Acetylkolin ligger lagret inne i vesikler i (presynaptiske) nerveterminaler. Ved nervestimulering fusjonerer vesiklene med cellemembranen, og slipper acetylkolin ut i synapsen. I synapsen hydrolyseres acetylkolin til acetat og kolin (katalysert av acetylkolinesterase (AChE)). Kolin tas så

opp i nevronet igjen via kolintransportører (ChT). I cytoplasma acetyleres kolin (til acetylkolin) av acetyl-koenzym A (AcCoA) (katalyseres av kolinacetyltransferase (ChAT)). Acetylkolin tas opp igjen i vesikler via vesikulære acetylkolintransportører (VAChT). Kolinerge reseptorer deles inn i nikotinerge og muskarinerge reseptorer. De nikotinerge reseptorene er ionotrope, og hver reseptor består av fem subenheter. Muskarinerge reseptorer er G-proteinkoblede (metabotrope). Det finnes flere subtyper av både nikotinerge og muskarinerge reseptorer. Blant nikotinreseptorsubtypene er $\alpha 4\beta 2$ -reseptorer vanligst. Kolinerge baner spiller en viktig rolle blant annet når det gjelder motorisk kontroll og læring og hukommelse (Taylor og Brown 2006).

1.2 Attention-deficit/hyperactivity disorder (ADHD)

Attention-deficit/hyperactivity disorder (ADHD) er en forstyrrelse karakterisert av manglende oppmerksomhet, impulsivitet og hyperaktivitet. Sykdommen rammer i størst grad barn, men minst halvparten av barna som er rammet av forstyrrelsen vil ha hemmende symptomer også som voksne. Dysregulering av katekolaminerge baner ser ut til å være en viktig del av patofysiologien ved ADHD (Biederman og Faraone 2005).

1.2.1 Epidemiologi og diagnose

I en systematisk gjennomgang av ADHD-studier, foretatt av Polanczyk, de Lima et al. (2007), ble prevalensen av ADHD beregnet til å være 5.29% på verdensbasis. Ved diagnostisering av sykdommen, er to ulike diagnosesystemer i bruk. Den ene er Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders fra American Psychiatric Association (4. utgave, DSM-IV). Den andre er Verdens helseorganisasjons (WHO) International Classification of Diseases (10. utgave, ICD-10). I DSM-IV kalles forstyrrelsen ADHD, og man opererer med tre subtyper av sykdommen: Kombinert type, overveiende oppmerksomhetssviktstype og overveiende hyperaktiv-impulsiv type. I ICD-10 omtales sykdommen som hyperkinetisk forstyrrelse (HKD) (American Psychiatric Association 2000; Sosial- og helsedirektoratet 2006). Det blir for

omfattende å beskrive likheter og forskjeller mellom ADHD-diagnosen og HKD-diagnosen detaljert, men generelt kan det sies at ICD-10-definisjonen av sykdommen er mer restriktiv enn DSM-IV-definisjonen, ved at den krever en større grad av symptomuttrykk (se kort sammenligning i Tabell 1.1). Som en følge av dette, er ADHD (etter DSM-IV) mer utbredt enn HKD (etter ICD-10) (Biederman og Faraone 2005). I denne oppgaven vil sykdommen omtales som ADHD. ADHD er mer utbredt blant gutter/menn enn blant jenter/kvinner. Ratioen gutter:jenter varierer mellom 9:1 og 2.5:1, avhengig av hvilken populasjon som har blitt studert (Rappley 2005). Den kombinerte typen er vanligere hos gutter enn hos jenter, mens den overveiende oppmerksomhetssvikttypen er vanligere hos jenter enn hos gutter (Hartung et al. 2002). Lenge tvilte man på at ADHD vedvarte inn i voksen alder, men dette er nå slått fast at den gjør. Det er en aldersavhengig nedgang i ADHD-symptomer, men selv når symptomene ikke er så fremtredende at ADHD-diagnosen vil bli stilt, kan de ofte medføre hemninger av klinisk betydning (Biederman og Faraone 2005).

Tabell 1.1: Forskjeller mellom kriterier for diagnosene ADHD (DSM-IV) og HKD (ICD-10) (Biederman og Faraone 2005).

	DSM-IV – ADHD	ICD-10 – HKD
Symptomer	<i>En av eller begge de følgende:</i>	<i>Alle de følgende:</i>
	Minst seks av ni symptomer på uoppmerksomhet	Minst seks av åtte symptomer på uoppmerksomhet
	Minst seks av ni symptomer på hyperaktivitet eller impulsivitet	Minst tre av fem symptomer på hyperaktivitet
		Minst en av fire symptomer på impulsivitet
Grad av utbredelse	Noe svekkelse fra symptomer må være tilstede i mer enn én omgivelse	Kriteriene må være oppfylt i mer enn en omgivelse

1.2.2 Etiologi

Studier har gjennom lang tid vist at ADHD overføres i familier. Tvilling- og adopsjonsstudier har vist at gener spiller en viktig rolle i familiær overføring av

ADHD (Biederman og Faraone 2005). En gjennomgang av slike studier førte til et anslag av ADHDs arvelighet på 76% (Faraone et al. 2005). Genomundersøkelser ved hjelp av koblingsanalyse har blitt brukt for å avdekke områder på kromosomer som kan inneholde gener av betydning for utvikling av ADHD. Med denne metoden undersøker man mange DNA-markører (deoksyribonukleinsyre) i genomet, for å avgjøre hvorvidt noen kromosomale regioner deles oftere enn forventet (som følge av tilfeldigheter) av familimedlemmer med ADHD. Det har så langt vært en mangel på replikering av funn av slike regioner mellom ulike studier, noe som kan antyde at gener med moderat store effekter ikke eksisterer (Mick og Faraone 2008).

Kandidatgen-studier med bruk av assosiasjonsmetoder har også blitt utført. Flere nyere metaanalyser antyder at det er en sterk assosiasjon mellom ADHD og dopamin-D₄-reseptorgenet (DRD4, variabelt antall tandem-repetisjon (48 bp)), dopamin-D₅-reseptorgenet (DRD5, mikrosatellitt-markør (148 bp)), dopamin-betahydroksylasegenet (DBH, 5' taq1 A-allel), synaptosomal-assosiert protein-25-genet (SNAP-25, enkelt nukleotid-polymorfisme i T1065G-allelet), serotonin-transportørgenet (SLC6A4, innsetting/delesjon i promoterregionen (44 bp)) og serotonin-_{1B}-reseptorgenet (HTR1B, enkelt nukleotid-polymorfisme i G861C-allelet) (bp = basepar) (Faraone et al. 2005; Li et al. 2006).

Det har blitt hevdet at visse typer mat eller tilsetningsstoffer kan forårsake ADHD, men systematiske undersøkelser har ikke kunnet bekrefte denne teorien (Biederman og Faraone 2005). Enkelte toksiner er imidlertid antatt å spille en rolle i etiologien til ADHD. Blant annet har bly vist seg å kunne føre til ADHD-lignende symptomer i flere undersøkelser (Needleman 1982). De fleste barn med ADHD er imidlertid ikke blyforgiftet, og mange barn utsatt for høy blyeksponering utvikler ikke ADHD (Banerjee et al. 2007). Det har også blitt vist at eksponering for lave doser av kvikksølv før fødselen kan påvirke blant annet intelligenskvotient (IQ), språkutvikling, hukommelse og oppmerksomhet negativt hos barnet (U.S. EPA 2001). Manganeksponering har også blitt koblet til utvikling av ADHD-symptomer (Collipp et al. 1983). I tillegg har flere studier vist at eksponering for polyklorerte bifenyler (PCB) i fosterlivet kan relateres til dårligere konsentrasjon eller fokusert

oppmerksomhet, mindre nøyaktige prestasjoner og langsommere reaksjonstid (Schantz et al. 2003). PCB-eksponering som mulig årsak til ADHD vil bli nærmere omtalt i kapittel 1.4.

Komplikasjoner i forbindelse med svangerskap og fødsel ser også ut til å kunne predisponere barnet for ADHD. Basalgangliene, som er implisert i ADHD, bør nevnes spesielt. Disse er blant de mest metabolsk aktive strukturene i sentralnervesystemet og er dermed spesielt sårbare for skade som følge av oksygenmangel (Banerjee et al. 2007). Alkoholinntak hos moren under svangerskapet kan medføre atferdsmessige og kognitive problemer hos barnet, som hyperaktivitet og impulsivitet, samt svekkelse av læring og hukommelse, oppmerksomhet og motoriske ferdigheter (Huizink og Mulder 2006). Røyking under svangerskapet har også blitt assosiert med utvikling av ADHD hos barnet i flere studier. I tillegg til nedsatt vekst (før og etter fødselen) og økt dødelighet, kan den medfølgende nikotineksponeringen føre til at barnet blir hyperaktivt og får nedsatte motoriske ferdigheter og verbal forståelse (Wasserman et al. 1999; Banerjee et al. 2007).

Det er også foretatt studier der man mener å se en sammenheng mellom psykososiale risikofaktorer i oppvekstmiljøet og ADHD/andre mentale forstyrrelser hos barnet. Slike risikofaktorer kan være alvorlige ekteskapsproblemer (mellom foreldrene), lav sosial klasse, stor familiestørrelse, kriminell far, mentale forstyrrelser hos moren, og plassering i fosterhjem (Biederman og Faraone 2005).

1.2.3 Patofysiologi

Dysregulering av dopamin- og noradrenalinbaner ser ut til å være svært sentralt ved ADHD. Bakgrunnen for at man i sin tid foreslo dette, var virkningsmekanismen til legemidlene som brukes ved behandling av sykdommen. Legemidlene øker nemlig tilgjengeligheten av dopamin og noradrenalin i synapser (Biederman og Faraone 2005). I tillegg så man ved undersøkelse av dyr, at skader i dopaminerge baner gir opphav til dyremodeller for ADHD (Shaywitz et al. 1978). Forstyrrelser i eksekutive funksjoner er noe man ofte ser ved ADHD. Disse funksjonene kontrolleres av frontal-

subkortikale baner, og de omfatter blant annet hemning (begrensning av atferd/prosesser), arbeidshukommelse, planlegging og vedvarende oppmerksomhet. Blant de viktigste forstyrrelsene som er foreslått å forårsake symptomer og nevropsykologiske svekkelser ved ADHD, er svikt i inhibitorisk kontroll (kontroll av hemninger), dysregulering av systemer i hjernen som medierer belønnings- og responskostnader og mangler i vekking (reaksjon på stimulering), aktivering og anstrengelsesfylt kontroll (evnen til å hemme en dominerende respons for å utføre en subdominant respons). Ingen enkelt nevropsykologisk teori kan forklare alle trekk ved ADHD. Dette kan tyde på at nevropsykologiske svekkelser ved sykdommen er heterogene, noe som sannsynligvis passer sammen med heterogenitet når det gjelder årsaker (Biederman og Faraone 2005).

Hypotesen om at de nevropsykologiske svekkelsene man observerer ved ADHD, skyldes dysregulering av frontal-sukortikale baner, ser ut til å bli bekreftet av strukturelle og funksjonelle billeddiagnostikkstudier. Strukturelle undersøkelser viser at ADHD-pasienter har små reduksjoner i hjernevolum i disse områdene (Faraone og Biederman 2004). Noen studier tyder imidlertid på at avvik i de frontal-subkortikale banene ikke er tilstrekkelig til å forklare patofysiologien ved sykdommen. Andre studier har nemlig vist volumreduksjoner også i andre områder av hjernen, blant annet i corpus callosum og cerebellum, i tillegg til en global reduksjon av hjernevolum (Castellanos et al. 2002; Seidman et al. 2004). I funksjonelle studier har man undersøkt graden av hjerneaktivering i forbindelse med nevropsykologiske oppgaver knyttet til oppmerksomhet og disinhibisjon (mangel på begrensning av respons/atferd). Oppgavene er konstruert slik at ADHD- og kontrollindivider klarer seg like bra, derfor vil forskjeller i aktivering indikere forskjeller mellom gruppene når det gjelder hvilke nevralt systemer som benyttes for å gjennomføre oppgavene (Biederman og Faraone 2005). Blant annet har det vist seg at ADHD-barn ikke aktiverer fronto-striatale områder like effektivt som barn uten ADHD, ved utføring av en go-/no-go-oppgave (barnet skal utføre en handling, for eksempel trykke på en knapp, som respons et bestemt stimulus, men la være å utføre handlingen som respons på et annet stimulus). I stedet aktiverte disse barna et diffust nettverk av

regioner, deriblant flere posteriore og dorsolaterale prefrontale regioner enn tilfellet var hos kontrollbarna (Durstun et al. 2003). Blant de subkortikale strukturene som knyttes til ADHD, har man vært spesielt interessert i striatum. Striatum inneholder mange dopaminerge synapser, og er sårbar for oksygenmangel i forbindelse med fødselen (som har blitt implisert ved sykdommen). Videre har det blitt vist at skader på striatum hos (forsøks)dyr gir hyperaktivitet og dårlig inhibitorisk kontroll (Alexander et al. 1986; Lou 1996). *In vivo*-billeddiagnostikk-studier hos mennesker har vist at legemidlet metylfenidat utøver sin effekt ved å binde seg til dopamintransportører (Volkow et al. 1998; Volkow og Swanson 2003) (mer om virkningsmekanisme i kapittel 1.2.4). De fleste dopamintransportørene befinner seg i striatum. Dessuten har dopamintransportørgenet (gjennom noen genetiske studier) blitt knyttet til patofysiologien ved ADHD (Biederman og Faraone 2005).

1.2.4 Behandling

En rekke legemidler er i bruk ved behandling av ADHD. I Norge brukes i første rekke metylfenidat (Ritalin[®], Concerta[®], Equasym[®]), dekstroamfetamin (Dexedrine[®], Metamina[®], Dexamin[®]), racemisk amfetamin (Racemisk amfetamin[®]) og atomoksetin (Strattera[®]) i behandlingen. De tre førstnevnte er alle sentralstimulerende midler, mens atomoksetin er et ikke-sentralstimulerende sentraltvirkende sympatomimetikum. Ved behov for medikamentell behandling av sykdommen starter man gjerne opp med metylfenidat. Amfetamin kan forsøkes hvis metylfenidat gir utilstrekkelig effekt. Atomoksetin blir også gitt til en del pasienter, men det foreligger ikke studier som gir grunnlag for å anbefale å bytte til atomoksetinbehandling hos pasienter som er velregulerte på metylfenidat (Sosial- og helsedirektoratet 2007).

Metylfenidat interagerer spesifikt med dopamintransportøren, noe som gir en spesifikk blokkering av dopaminreopptak (hovedsakelig i prefrontale og striatale områder). Dette fører til en økning av dopamin i synapsen og økt dopaminerg neurotransmisjon. Amfetamin antas å binde seg til dopamintransportøren på utsiden av cellemembranen, og ”blokkerer” dermed dopamin-reopptak tilbake til cellen.

Amfetamin beveger seg så inn i cellen, hvor det utveksles med (cytoplasmisk) dopamin via dopamintransportøren. Konsentrasjonen av synaptisk dopamin vil dermed øke. I tillegg til effekter på dopaminerge synapser, har det blitt beskrevet at metylfenidat og amfetamin kan påvirke noradrenerge synapser. Atomoksetin hemmer presynaptisk noradrenalinopptak spesifikt, ved blokade av noradrenalintransportøren (i den prefrontale cortex), og dette medfører økt synaptisk noradrenalin. Atomoksetin utviser liten effekt på serotoninreopptak, og har svært lav affinitet for andre reseptorer, neurotransmittere eller transportører (Wilens 2006; Greydanus et al. 2007). Ikke-medikamentelle tiltak ved ADHD kan blant annet være informasjon om sykdommen til pasienten og eventuelt foreldrene, tilrettelegging av forhold hjemme, på skolen/arbeidsplassen eller andre steder, og atferdsterapi (Sosial- og helsedirektoratet 2007).

1.3 Dyremodeller for ADHD

En optimal dyremodell for en (menneskelig) sykdom bør ligne sykdommen både med hensyn til etiologi, biokjemi, symptomatologi og behandling. Bruk av dyremodeller gir flere fordeler sammenlignet med klinisk forskning: Modellene har som regel enklere nervesystemer, atferden er enklere å tolke enn ved kliniske tilfeller, de er ofte genetisk homogene, omgivelsene er enkle å kontrollere og flere intervensjoner er mulige enn i en klinisk sammenheng (Sagvolden et al. 2005). Det har blitt satt opp valideringskriterier for dyremodeller for menneskelige sykdommer, deriblant for ADHD. En ADHD-modell må tilfredsstillende tre valideringskriterier: Overflatevaliditet ("face validity"), begrepsvaliditet ("construct validity") og prediktiv validitet ("predictive validity"). Overflatevaliditet er evnen til å etterligne de fundamentale atferdsmessige kliniske kjennetegnene ved sykdommen. Begrepsvaliditet er overensstemmelse med det fundamentale eller hypoteserte patofysiologiske grunnlaget for sykdommen. Prediktiv validitet er evnen til å predikere (forutse) tidligere ukjente aspekter rundt atferd, genetik og nevrobiologi ved sykdommen, ut fra modellen (Sagvolden 2000).

1.3.1 Charles River spontant hypertensiv rotte (SHR/NCrl)

Den spontant hypertensive rotten (SHR) er den mest brukte dyremodellen for ADHD. SHR er en genetisk modell avlet fram fra forløperen Wistar Kyoto-rotten (WKY). SHR-rotten oppfyller mange av valideringskriteriene til en dyremodell for ADHD (Sagvolden et al. 2005). Komparative atferdstester brukt på dyremodeller, er basert på en systematisk kartlegging av atferd utviklet av Skinner (kalles operantanalyse) (Ferster og Skinner 1957). Atferdsmessige karakteristika kan demonstreres ved hjelp av forsterkningsprogrammer (forsterker - belønning). Impulsivitet hos SHR viser seg under atferdsforsøk som korte sekvenser av aktivitet og hurtig endring (som ved ADHD). SHR har også vist dårlig vedvarende oppmerksomhet og hyperaktivitet under atferdstesting. De er hyperaktive når det er lenge mellom hver forsterker under testingen, men ikke når forsterkerne kommer ofte (Sagvolden 2000). Man har også sett at atferden til SHR-rotter er mer variabel enn atferden til kontrollrotter (WKY-rotter), på samme måte som for barn med ADHD (Sagvolden et al. 2005). I kapittel 1.3.4 vil det bli gått nærmere inn på atferdstesting av dyremodeller for ADHD.

Ved sammenligning av SHR- og WKY-rotter, har det blitt funnet forskjeller i DAT-1-genet (genet for dopamintransportøren) (Mill et al. 2005). Som for barn med ADHD, er det kjønnsforskjeller hos SHR-rotter. For eksempel ser SHR-hunner ut til å ha dårligere oppmerksomhet enn SHR-hanner (Berger og Sagvolden 1998). Man ser også redusert hjernevolum hos SHR-rotter (likt som for barn med ADHD) (Bendel og Eilam 1992). Det er forstyrrelser i dopaminsignalering hos SHR-rotter, og det samme ser ut til å være tilfelle for noradrenalin (Russell 2003). To second messenger-systemer er også svekket hos disse dyrene: Syklisk adenosinmonofosfatdannelse (cAMP) og kalsium-innstrømming inn i nevroner (Marcil et al. 1997; Lehoula et al. 2004). D-Amfetamin reduserer motorisk aktivitet og impulsivitet hos SHR-rotter. SHR-rotter har redusert atferdsmessig aktivering i respons på metylfenidat og D-amfetamin sammenlignet med WKY (kontroll). Den reduserte

reaktiviteten for legemidlene kan være knyttet til abnormaliteter ved ekspresjonen av DAT-1-genet og dopaminhypofunksjon (Sagvolden et al. 2005).

Flere har hevdet at endrete forsterkningsprosesser er viktig i ADHDs symptomatologi, men detaljer rundt disse prosessene og konsekvenser av dem, var ukjente før man hadde en dyremodell i form av SHR (Sagvolden 2000). SHR har allerede vist prediktiv verdi på atferdsnivå, for eksempel når det gjelder mer presise beskrivelser av utvikling av hyperaktivitet og vedvarende oppmerksomhets karakter ved ADHD. SHRs betydning som ADHD-modell kan komme til å bli mer synlig også innenfor genetikk, nevrobiologi og farmakologi. For eksempel kan modellen komme til nytte ved identifisering av kandidatgener for ADHD, lokalisering av nøyaktig hvilke områder i hjernen som har forstyrret funksjon hos barn med ADHD, samt at SHR kan bli brukt ved utprøving av nye legemidler. Et problem med SHR-rotter, er at de etter hvert utvikler hypertensjon (høyt blodtrykk), derfor bør de ikke benyttes som ADHD-modell i forsøk etter at de har nådd en alder på cirka 4-5 uker (Sagvolden et al. 2005).

1.3.2 Charles River Wistar Kyoto-rotte (WKY/NCrl)

WKY/NCrl-rotten er i utgangspunktet ment å skulle fungere som kontrollrotte for SHR-rotten. Det er imidlertid gjort funn som tyder på at den ikke er så egnet til dette. WKY/NCrl-rotter har, sammenlignet med WKY/NHsd-rotter (Harlan WKY), vist uoppmerksomhet, men ikke overaktivitet eller impulsivitet i atferdsforsøk (se nærmere beskrivelse i kapittel 1.3.4). Det har også blitt funnet betydelige genomiske forskjeller mellom WKY/NCrl og WKY/NHsd for åtte korte tandem-repetisjons-loci og 2625 enkelt nukleotid-polymorfismer (som ble genotypet). Cirka 33.5 prosent av genomet er forskjellig hos de to substammene, med lange områder med divergens (forskjeller) på hvert kromosom. På bakgrunn av dette, mener man å ha atferdsmessige og genetiske bevis for regne WKY/NCrl og WKY/NHsd som to atskilte substammer. De atferdsmessige funnene hos WKY/NCrl indikerer dessuten at den kan være en nyttig modell for ADHD, overveidende oppmerksomhetssviktstype

(ADHD-PI). En slik dyremodell har til nå ikke vært tilgjengelig (Sagvolden et al. 2008). I denne oppgaven er betegnelsen attention-deficit disorder (ADD) brukt om denne varianten av sykdommen, og WKY/NCrl-rotten er brukt som modell for ADD (de er også omtalt som ADD-rotter i oppgaven).

1.3.3 Harlan Wistar Kyoto-rotte (WKY/NHsd)

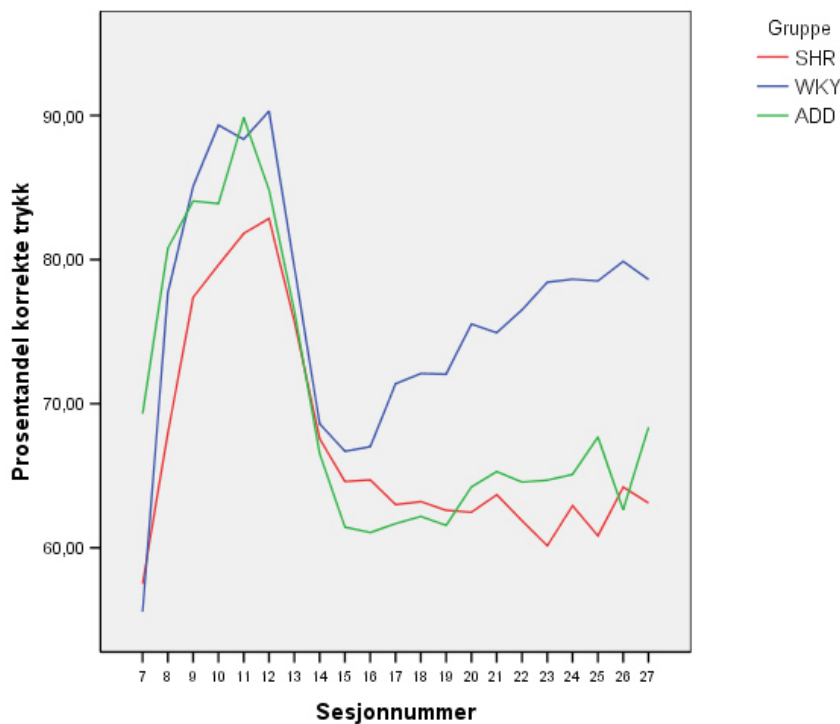
WKY-rotten (fra Harlan) brukes som kontrollrotte i forsøk der man benytter SHR-rotten (Harlan Laboratories 2009). Charles River WKY-rotten er også ment å skulle fungere som kontroll for SHR-rotten (som nevnt i kapittel 1.3.2), men på bakgrunn av opplysningene i kapittel 1.3.2 om at den sannsynligvis ikke er egnet til dette, ble det valgt å bruke Harlan WKY-rotten som kontroll i denne oppgaven.

1.3.4 Atferdsstudier av SHR-, ADD- og WKY-rotter

ADD- og SHR-rotter har blitt atferdstestet hos en samarbeidende forskningsgruppe, og sammenlignet med kontrolldyr (WKY). Undersøkelsene viser at det er tydelige forskjeller i atferd mellom disse dyrene. Forsøkene ble utført i laboratoriene til Terje Sagvolden ved Avdeling for fysiologi, Det medisinske fakultet, Universitetet i Oslo. Resultatene fra disse studiene har nylig blitt publisert (Sagvolden et al. 2008). Rottene ble atferdstestet i en såkalt Skinner-boks. Skinner-boksen inneholder to spaker, med hver sin lampe over. Mellom spakene er det en luke hvor belønning, også kalt forsterker, blir delt ut. I disse forsøkene var belønningen en vanndråpe. Hvilken spak som er den korrekte å trykke på varierer, og indikeres ved tenning av lampen over spaken. Hver gang belønning deles ut, tennes en lampe inne i luken, og lampen over spaken slukkes. Dyrene har ikke fått vann på lenge (cirka 22 timer) ved oppstart av forsøket, slik at de skal være mest mulig motiverte for å skaffe seg belønningen.

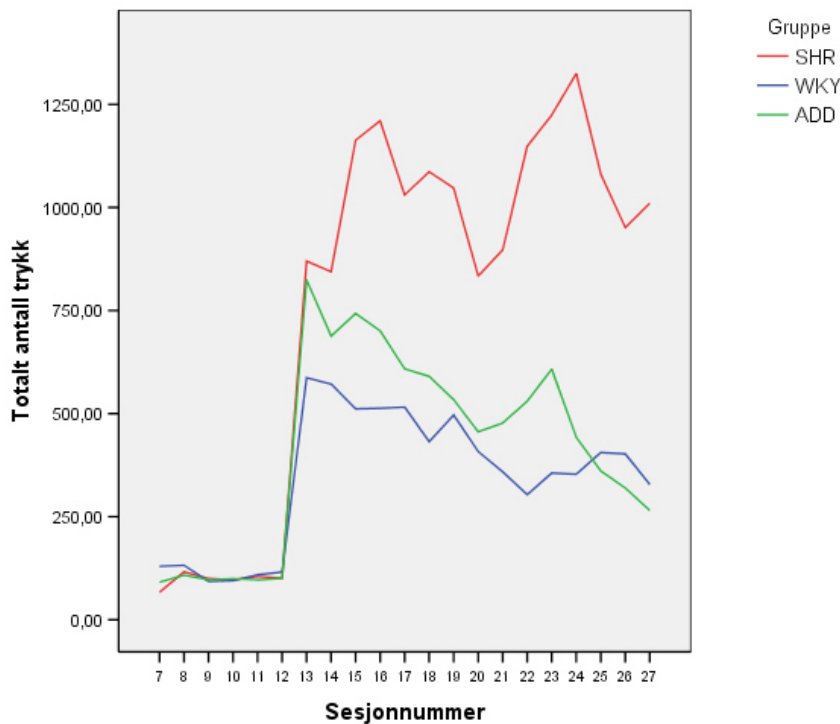
I begynnelsen av atferdstesting må dyrene læres opp til å forstå sammenhengen mellom spaktrykking og utdeling av belønning. Dette er noe alle rottene lærer raskt. Når de har forstått sammenhengen, kan den egentlige atferdstesting begynne (fra

og med sesjon (test-dag) 7 i dette tilfellet). Man begynte med å gi belønning for hvert korrekte trykk. Fra og med sesjon 13 ble det bare gitt belønning for riktige trykk etter at et visst tidsintervall hadde utløpt. Tidsintervallene varierte, men de var gjennomsnittlig på 180 sekunder. Tre ulike variabler ble registrert for hver sesjon. For det første registrerte man prosentandel korrekte trykk på spakene. Dette brukes som et mål på vedvarende oppmerksomhet hos dyrene. Figur 1.2 viser at så lenge hvert riktige trykk ga belønning, var ikke forskjellen så stor mellom gruppene, men etter at belønning for riktige trykk bare ble gitt av og til (sesjon > 12), gjorde SHR- og ADD-rottene det betydelig dårligere enn WKY-rottene.



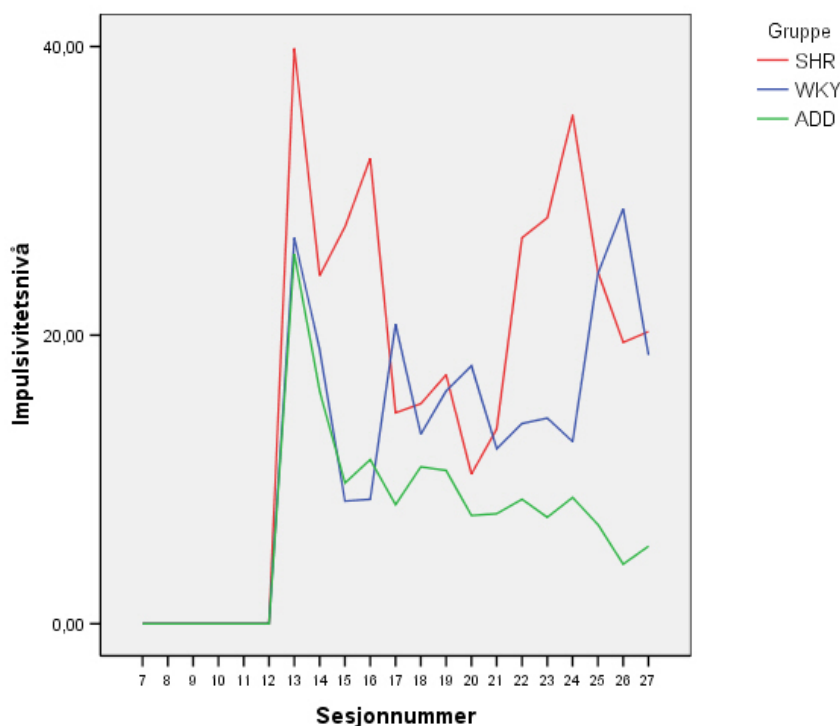
Figur 1.2: Vedvarende oppmerksomhet hos SHR-, WKY- og ADD-hanner ($n = 8$ i hver gruppe). Oppmerksomheten er målt i form av prosentandel korrekte trykk.

Totalt antall trykk ble også registrert. Denne variabelen viser totalaktiviteten hos dyrene, og benyttes som et mål på hyperaktivitet. Figur 1.3 viser at så lenge hvert riktige trykk ga belønning, var forskjellene små mellom gruppene, men etter at belønning for riktige trykk bare ble gitt av og til (sesjon > 12), var SHR-dyrene betydelig mer hyperaktive enn WKY- og ADD-dyrene.



Figur 1.3: Hyperaktivitet hos SHR-, WKY- og ADD-hanner ($n = 8$ i hver gruppe). Hyperaktiviteten er målt i form av totalt antall trykk.

Den siste variabelen som ble registrert, var antall trykk med kort interresponstid. Her ble det registrert hvor mange trykk som hadde en interresponstid på mindre enn 0.67 sekunder, det vil si hvor mange ganger det gikk mindre enn 0.67 sekunder mellom to trykk. Denne variabelen blir brukt som et mål på impulsivitet – dyrene ”klarar ikke å vente” med å trykke. Figur 1.4 viser at så lenge hvert riktige trykk ga belønning, var det nesten ingen forskjeller mellom gruppene, men etter at belønning for riktige trykk bare ble gitt av og til (sesjon > 12), var ADD-rottene betydelig mindre impulsive enn SHR- og WKY-rottene. Hvem som var mest impulsive av SHR og WKY, varierte mellom sesjonene.



Figur 1.4: Impulsivitet hos SHR-, WKY- og ADD-hanner ($n = 8$ i hver gruppe). Impulsiviteten ble målt som antall trykk med interresponstid < 0.67 sekunder.

Oppsummert viser studien til Sagvolden og medarbeidere (2008) at ADD-dyrene, som er en modell for menneskelig ADD (attention-deficit disorder – kalles gjerne ADHD, overveiende oppmerksomhetsviktstype), har oppmerksomhetsvansker og i liten grad hyperaktivitet og impulsivitet. SHR-dyrene viser oppmerksomhetsvansker, hyperaktivitet og impulsivitet, og er modell for menneskelig ADHD, kombinert type, som kjennetegnes ved disse symptomene. WKY-rottene var som nevnt kontrolldyr i disse forsøkene.

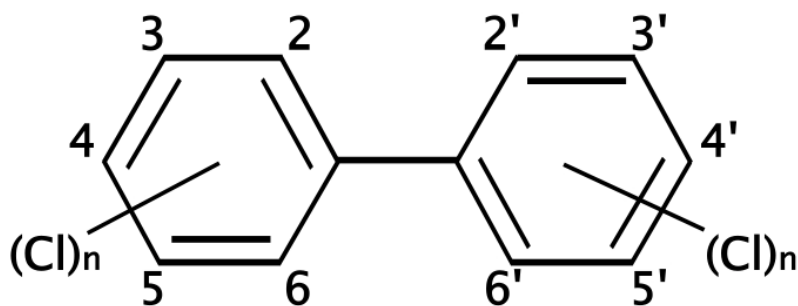
1.4 Polyklorerte bifenyler (PCB) og ADHD

1.4.1 Generelt om PCB

Polyklorerte bifenyler (PCB) er betegnelsen på en gruppe stoffer som har en struktur bygd opp av et bifenylskjelett (to benzenringer koblet sammen av en karbon-karbon-enkeltbinding) med mellom 1 og 10 klorsubstituenten (se struktur i Figur 1.5).

Teoretisk finnes det 209 forskjellige PCB-kongenerer, men bare cirka 130 av disse er påvist i kommersielle produkter. De kommersielle PCB-produktene (for eksempel Aroclor) bestod av blandinger av flere forskjellige kongenerer. PCB-molekylene er kjemisk sett meget stabile, og de er svært lite brennbare. Dette er bakgrunnen for at PCB ble brukt som isolator i kondensatorer og transformatorer. PCB har også blitt brukt i maling, trykksverte, kjølevæsker, skjæreolje, hydrauliske systemer og som bløtgjører i plast. Utstrakt bruk av PCB i industrielle produkter startet rundt 1930 (Bjerregaard 2005).

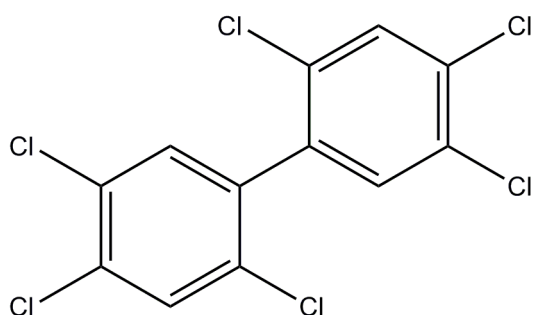
Først på 1960-tallet ble man oppmerksom på tilstedeværelsen av PCB i naturen. Ved undersøkelse av vevsprøver fra ulike organismer, ble det funnet til da ukjente stoffer, som ved kjemisk analyse viste seg å være PCB-forbindelser (Jensen 1966). PCB er svært fettløselig, og konsentreres i fettvevet hos mennesker og dyr som har blitt eksponert for dem. Det er spesielt på toppen av akvatiske næringskjeder man finner høye konsentrasjoner av PCB. PCB brytes sakte ned i naturen, og nedbrytningshastigheten avhenger i stor grad av antall og plassering av kloratomer på PCB-molekylene. Etter at man ble klar over PCBs utbredelse i naturen, samt PCBs skadelige virkninger på mennesker og dyr, ble det innført restriksjoner i bruken av dem i de fleste land. I Norge har bruk av PCB vært forbudt siden 1980. Til tross for forbud både her og andre steder, fortsetter PCB å utgjøre en trussel for mennesker og dyr (Bjerregaard 2005).



Figur 1.5: PCBs struktur. Nummereringen ved karbonatomene angir mulige posisjoner for klorsubstitueneter. For kloratomene: $n = 0-5$. For hver fenyling: Ortho-posisjoner: 2, 2', 6 og 6'. Meta-posisjoner: 3, 3', 5 og 5'. Para-posisjoner: 4 og 4' (Wikipedia 2009).

1.4.2 Skadevirkninger/biologiske effekter av PCB

PCB har vist seg å kunne ha en lang rekke skadelige effekter på levende organismer. Jeg vil i første rekke gå inn på effekter som kan være relevante i forhold til ADHD. Det er generelt akseptert at non-*ortho*-PCBer har mindre uttalte effekter på kognitiv atferd enn *ortho*-PCBer. Generelt har også nevrotoksiske effekter blitt relatert til *ortho*-PCBer, mens de koplanære (non-*ortho*) PCBene er mindre potente. PCB 153, som er brukt i denne oppgaven, er en di-*ortho*-substituert PCB (Mariussen et al. 2006). Strukturen er vist i Figur 1.6. I en studie på rotter som ble eksponert for PCB-kongenerene 153 og 126 etter fødselen (gjennom morsmelken), ble det vist at disse utviklet hyperaktivitet (i form av økt frekvens av spak-trykking under atferdsforsøk) (Holene et al. 1998). Effekter av PCB-eksponering under utviklingen er også studert hos aper. Det er blant annet observert at disse har redusert evne til å organisere atferd tidsmessig og manglende evne til å ta lærdom av konsekvensene av tidligere handlinger (Rice 2000). Det er foretatt mange epidemiologiske studier der man har undersøkt nevropsykologiske konsekvenser av PCB-eksponering under utviklingen. Flere av disse har rapportert om negative assosiasjoner mellom PCB-eksponering før fødselen og målinger av kognitiv funksjon i spedbarnsalder og barndom (Schantz et al. 2003).



Figur 1.6: Strukturen til PCB 153 (2,2',4,4',5,5'-heksaklorobifenyl). Legg merke til de to kloratomene i *ortho*-posisjon.

De atferdsmessige svekkelsene som er observert i forbindelse med PCB-eksponering førte til teorier om at PCB kan gi endret dopamin-turnover i hjernen, noe som senere har blitt fastslått gjennom en rekke dyrestudier. Det er rapportert om både nedgang og

økning av dopaminnivåer etter PCB-eksponering i ulike studier. I mange tilfeller er det vist en nedgang i dopamin hvis dyrene ble eksponert som voksne, men en økning i dopamin hvis dyret ble eksponert under utviklingen. PCB ser også ut til å kunne påvirke hjernenivåene av andre biogene aminer (som noradrenalin og serotonin) (Mariussen et al. 2006). Man har funnet at relativt lave konsentrasjoner av *ortho*-PCBer hemmet vesikulær transport av biogene aminer ved selektiv hemming av den vesikulære monoamintransportøren (VMAT2) (Mariussen et al. 1999). PCB er også foreslått å kunne hemme dopamintransportøren (Seegal et al. 2002). Også det kolinerge neurotransmittersystemet ser ut til bli påvirket av PCB. En gruppe svenske forskere studerte effekter av PCB-eksponering hos mus, og fant at eksponeringen fører til et økt nivå av muskarinerge acetylkolinreseptorer i hippocampus, og en reduksjon i nikotinerge acetylkolinreseptorer i hippocampus, men ikke i hjernebarken (Eriksson et al. 1991; Eriksson og Fredriksson 1998).

1.5 Hensikt med oppgaven

Dopamin har en sentral rolle i så godt som all ADHD-forskning. Det er imidlertid mye som peker i retning av at også andre neurotransmittersystemer kan være involvert i svekkelsene man ser ved sykdommen. Blant annet har man interessert seg for nikotinerge kolinerge systemers mulige involvering i ADHD. Som nevnt i kapittel 1.2.2, har røyking, og dermed nikotineksponering, under svangerskapet blitt assosiert med utvikling av ADHD hos barnet. Man har også observert at personer med ADHD bruker/misbruker nikotin (sigarett røyking) i mye større grad enn befolkningen for øvrig, og det er foreslått at dette kan være en "selvmedisinering" med nikotin (Potter et al. 2006). Noen kliniske studier har vist at legemidler som stimulerer nikotinreseptorer kan ha klinisk nytteverdi ved ADHD (Wilens et al. 1999; Wilens et al. 2006). Nyere genetiske studier har dessuten vist at kolinerge funksjon kan bli endret hos personer med ADHD, via endringer i spesifikke nikotinerge reseptorsubtyper (Kent et al. 2001; Todd et al. 2003).

Glutamaterg transmisjon har også blitt implisert ved ADHD. Blant annet har man sett polymorfismer i genene som koder for NMDA-reseptorsubenheter NR_{2A} og NR_{2B} hos ADHD-pasienter (Turic et al. 2004; Dorval et al. 2007). Man har også foretatt undersøkelser av hippocampus hos SHR-rotten (ADHD-modell). Her ble det blant annet funnet at NMDA-reseptorer som inneholder NR_{2B}-subenheter bidro betraktelig til induksjon av langtidpotensering (LTP) hos SHR, i motsetning til hva tilfellet var hos kontrolldyrene (WKY). Hos kontrolldyrene var NR_{2A}-subenheten primært ansvarlig for LTP-induksjon. Dessuten var AMPA-reseptor-mediert transmisjon ved CA3-til-CA1-synapser (CA – cornu ammonis, Ammons horn) i stratum radiatum, et område av hippocampus, betydelig redusert hos SHR (Jensen et al. 2009).

På bakgrunn av informasjonen om hvilke faktorer som kan bidra til utvikling av ADHD, var hensikten med denne oppgaven å foreta følgende undersøkelser:

- Måling av nikotinreseptorbinding i hippocampus og cerebrum hos WKY-, ADD- og SHR-rotter ved hjelp av radioligandbindingsforsøk. Binding til α_7 -nikotinreseptorer skulle måles, i tillegg til mer generell nikotinreseptorbinding (hovedsakelig representert ved binding til $\alpha_4\beta_2$ -reseptorer). En metode for måling av α_7 -nikotinreseptorbinding var ikke tidligere etablert i vårt laboratorium, derfor ville det være nødvendig å gjennomføre metodeforsøk før den kunne tas i bruk.
- Måling av NMDA-reseptorbinding (glutamatreseptor) i hippocampus og cerebrum hos WKY-, ADD- og SHR-rotter ved hjelp av radioligandbindingsforsøk.
- Måling av monoaminnivåer i striatum hos WKY- og SHR-rotter, PCB-eksponerte dyr og kontrolldyr, ved hjelp av HPLC-analyse. Nivåer av monoaminene dopamin og metabolitten homovanillinsyre (HVA), samt serotonin og metabolitten 5-hydroxyindoleddiksyre (5-HIAA), skulle kvantifiseres. Prosedyren for HPLC-analyse av monoaminer var ikke

tilstrekkelig innarbeidet i vårt laboratorium, så derfor var det nødvendig med optimalisering av denne.

2. Materialer og metoder

2.1 Kjemikalier

Kjemikalium	Leverandør
(-)-Nikotinhydrogentartrat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, Tyskland)
(+)-MK-801-maleat	Tocris Bioscience (Bristol, Storbritannia)
(+/-)-Epibatidin, [5,6-bisykloheptyl- ³ H]-	PerkinElmer (Boston, MA, USA)
3,4-Dihydroksybenzylaminhydrobromid (DHBA)	Sigma-Aldrich, Inc. (St. Louis, MO, USA)
3-Hydroksytyraminhydroklorid (dopamin)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, Tyskland)
5-Hydroksyindol-3-eddiksyre (5-HIAA)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, Tyskland)
Bovint serumalbumin (BSA)	Sigma-Aldrich, Inc. (St. Louis, MO, USA)
Di-Natriumhydrogenfosfatdihydrat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, Tyskland)
Filter-Count	PerkinElmer Life and Analytical Sciences (Shelton, CT, USA)
Glysin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, Tyskland)
Homovanillinsyre (HVA)	Sigma-Aldrich, Inc. (St. Louis, MO, USA)
Hydrogenklorid, 37% (saltsyre)	Fluka Chemie GmbH, Buchs, Sveits
Kaliumdihydrogenfosfat	E. Merck (Darmstadt, Tyskland)
Kaliumhydroksid	E. Merck (Darmstadt, Tyskland)
L-Askorbinsyre	Sigma-Aldrich Chemie GmbH

	(Steinheim, Tyskland)
L-Glutaminsyre (glutamat)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, Tyskland)
Metanol	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, Tyskland)
Metyllycaconitin, [³ H]- ([³ H]-MLA)	American Radiolabeled Chemicals, Inc. (St. Louis, MO, USA)
MK-801, (+)-[3- ³ H]-	PerkinElmer (Boston, MA, USA)
Mobile Phase – Catecholamines	Chromsystems GmbH (München, Tyskland)
N-2-Hydroksyetylpiiperazin-N'-2- etansulfonsyre (HEPES)	Sigma-Aldrich, Inc. (St. Louis, MO, USA)
Natriumhydroksid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, Tyskland)
Natriumklorid	Sigma-Aldrich, Inc. (St. Louis, MO, USA)
Perklorsyre, cirka 70% (w/v) i vann	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, Tyskland)
Pierce BCA Protein Assay Kit	Thermo Scientific (Rockford, IL, USA)
Polyetylenimin, 50% (w/v) i vann	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, Tyskland)
Serotoninhydroklorid (5-HT)	Sigma-Aldrich, Inc. (St. Louis, MO, USA)
Sukrose	Sigma-Aldrich, Inc. (St. Louis, MO, USA)
Tris(hydroksymetyl)aminometan (TRIS)	Sigma-Aldrich, Inc. (St. Louis, MO, USA)

Øvrige kjemikalier ble levert fra standard kommersielle leverandører.

2.2 Dyr

2.2.1 Harlan Wistar Kyoto-rotter (WKY/NHsd)

WKY-hanner på henholdsvis 1 måned og 2.5 måneder, avlet ved Harlan Laboratories i Storbritannia, ble benyttet til metodeforsøk med [³H]-MLA. 4-5 uker gamle WKY-rotter, avlet samme sted, ble benyttet som kontrolldyr ved måling av nikotin- og NMDA-reseptorbinding i cerebrum og hippocampus. 5 uker gamle WKY-rotter (hanner og hunner), avlet samme sted, og behandlet med henholdsvis maisolje (kontrolldyr) og maisolje med PCB 153, ble benyttet ved måling av monoaminer i striatum.

2.2.2 Charles River Wistar Kyoto-rotter (WKY/NCrl)

4-5 uker gamle WKY-rotter, avlet ved Charles River Laboratories i Tyskland, ble benyttet som ADD-modell i reseptorbindingsforsøkene beskrevet i kapittel 2.2.1. Disse rottene er omtalt som ADD-rotter senere i oppgaven, for å skille dem fra Harlan WKY-rotter.

2.2.3 Charles River spontant hypertensive rotter (SHR/NCrl)

SHR-rottene ble benyttet som ADHD-modell. SHR-rotter, 4-5 uker gamle, avlet ved Charles River Laboratories i Tyskland, ble benyttet i bindingsforsøkene beskrevet i kapittel 2.2.1. 5 uker gamle SHR-hanner og -hunner, avlet ved samme sted og behandlet med henholdsvis maisolje og maisolje med PCB 153, ble også benyttet til monoaminmåling i striatum.

2.2.4 Dyrehold

Dyrene ble oppstallet ved en omgivelsestemperatur på 20-24 °C og en luftfuktighet på 45-55%. Det ble brukt en 12/12-timers lys/mørke-syklus, og rottene hadde fri tilgang på mat og vann. De fikk standardfôr av typen BeeKay Feeds, og strøet var

treflis fra osp av typen BeeKay Bedding, begge fra B&K Universal. Dyrene ble behandlet i henhold til Forskrift om forsøk med dyr av 15. januar 1996, for å sikre at de fikk forsvarlig behandling og ikke ble utsatt for unødig smerte og lidelse.

2.2.5 *In vivo*-eksponering for PCB

WKY- og SHR- rotter (både hanner og hunner) ble eksponert for enten maisolje (kontroll) eller maisolje tilsatt PCB 153 (behandling). Dosene ble administrert dypt inn i munnhulen ved tre anledninger – da rottene var 8-11, 14-17 og 19-22 dager gamle. Rottene som ble gitt PCB 153, fikk en dose på 3 mg PCB per kg kroppsvekt ved hver behandling. Administrasjonen ble utført av veterinær Per Lausund ved Forsvarets forskningsinstitutt. Rottene ble avlivet, og hjernene ble dissekert ut, ved vår dyreavdeling da de var 35-38 dager gamle.

2.3 Prøveopparbeiding

2.3.1 Tilberedning av membranhomogenat

Membranhomogenat som skulle brukes til å måle reseptorbinding ble isolert fra henholdsvis cerebrum og hippocampus. WKY-, ADD- og SHR-rotter (4-5 uker gamle) ble bedøvet med CO₂ og avlivet ved dekapitering. Cerebrum og hippocampus ble dissekert ut, og fryst ned umiddelbart i flytende nitrogen (-196 °C). Hjernedelene ble oppbevart i fryser ved -80 °C fram til prøveopparbeidelsen skulle utføres. Det som senere i oppgaven er referert til som cerebrum, er altså cerebrum minus hippocampus.

Hjernedelene ble tint på is og veid. Prøvene ble holdt på is gjennom hele prosedyren. Hjernevevet ble så homogenisert i 15 ml 50 mM TRIS-HCl-buffer (pH 7.4) per g vev. Vevet ble homogenisert med 12 strøk i en Potter-Elvehjem-homogenisator. Homogenatet ble så sentrifugert i 30 minutter ved 100 000 g og 4 °C i en Beckman Optima LE-80K-ultrasentrifuge (rotor: Type 80Ti). Deretter ble supernatanten

fjernet, og pelleten resuspendert i 15 ml 50 mM TRIS-HCl-buffer (pH 7.4) per g hjernevev. Suspensjonen ble inkubert på vannbad i 30 minutter ved 25 °C, og sentrifugert i 30 minutter ved 100 000 g og 4 °C, for å fjerne endogene ligander. Supernatanten ble fjernet, og pelleten suspendert i 4 ml 0.32 M sukroseløsning per g hjerne og fryst ned i eppendorfrør ved -40 °C.

2.3.2 Tilberedning av prøver til HPLC-analyse

WKY- og SHR-rotter (5 uker gamle), behandlet med maisolje eller PCB 153, som beskrevet i kapittel 2.2.5, ble avlivet ved dekapitering. Striatum ble dissekert ut, og fryst ned umiddelbart i flytende nitrogen (-196 °C). Striataene ble oppbevart i fryser ved -80 °C fram til prøvene skulle opparbeides.

Striataene ble tint på is og veid. Prøvene ble holdt på is under hele forsøket. De tinte striataene ble homogenisert i 500 µl 0.05 M HClO₄-løsning. Det ble benyttet en Potter-Elvehjem-homogenisator, og hjernedelene ble homogenisert med cirka 20 strøk for hånd, til homogenatet var jevnt. 250 µl av dette homogenatet ble tilsatt 250 µl 0.454 µM dihydroksybenzylamin (DHBA, intern standard) i 0.12 mM askorbinsyreløsning. Blandingen ble så homogenisert igjen, med cirka 10 strøk, og deretter sentrifugert i 20 minutter ved 15 000 g og 0 °C i en Sorvall RMC-14-mikrosentrifuge (rotor: Fa-Micro). Supernatantene ble overført til eppendorfrør og fryst ned ved -40 °C. Pelletene ble også fryst ned ved -40 °C, og senere brukt til måling av protein, som beskrevet i kapittel 2.4.

2.4 Kvantitativ bestemmelse av proteiner

Pierce BCA Protein Assay Kit ble benyttet til måling av totalprotein. Metoden baserer seg på at proteiner reduserer Cu²⁺ til Cu⁺ i et basisk medium (biuretreaksjonen) og at bicinkoninsyre (BCA) deretter chelaterer Cu⁺ (2 BCA-molekyler for hvert Cu⁺-ion). Dette komplekset er lillafarget og utviser en sterk absorbans ved 562 nm (Smith et al. 1985). Proteinkonsentrasjonen kan så bestemmes

ved å gjøre absorpsjonsmålinger i prøvene, og sammenligne disse med målinger for proteinstandarder med kjente konsentrasjoner. Det ble utført proteinmålinger på membranhomogenat (se kapittel 2.3.1) og proteinpelletter fra tilberedning av HPLC-prøver (se kapittel 2.3.2). Pelletene ble løst i 1 ml 0.1 M NaOH før måling.

Løsninger av bovint serumalbumin (BSA) ble brukt som standarder. En standardkurve ble fremstilt ved å måle absorbansverdier for BSA-løsninger med konsentrasjon 0, 0.125, 0.25, 0.5, 0.75, 1.0 og 1.5 mg/ml. Alle prøver ble fortynnet med 0.1 M NaOH, slik at proteinkonsentrasjonen havnet innenfor området dekt av standardkurven, og blandet forsiktig ved vortexing. Brønnene i en 96-brønns-mikroplate ble tilsatt prøver eller standarder, 10 µl til hver brønn. Det ble benyttet duplikater av hver standard og triplikater av hver prøve. Deretter ble det tilsatt 200 µl BCA-reagens til alle brønnene. Platen ble så satt til inkubering i varmeskap ved 37 °C i 30 minutter. Til slutt ble proteinkonsentrasjonen bestemt ved 562 nm bølgelengde i en Labsystems Multiskan Bichromatic-ELISA-avleser (ELISA = enzyme-linked immunosorbent assay).

2.5 Reseptorbindingsforsøk

Bindingsstudier med bruk av radioligand er et svært nyttig verktøy når man skal studere reseptorer. Vev som inneholder reseptoren man undersøker, inkuberes sammen med en egnet radioligand tilstrekkelig lenge og deretter vaskes ubundet radioligand vekk. Radioaktiviteten som så kan måles, representerer spesifikk binding (til reseptoren) og uspesifikk binding av radioliganden. Uspesifikk binding er blant annet binding av radioligand til andre proteiner, glassfiberfilteret, adsorpsjon til vev og oppløsning i membranlipider (Bylund og Toews 1993). Den uspesifikke bindingen bestemmes ved å tilsette en umerket ligand som binder seg til reseptoren på liknende måte som radioliganden. Den umerkede liganden tilsettes i stort overskudd, og hemmer dermed all radioligandbinding til målreseptoren. Radioligandbindingen i disse prøvene vil da være uspesifikk.

Spesifikk binding kan ikke observeres direkte i slike bindingsstudier. I stedet måler man total og uspesifikk binding, og regner ut spesifikk binding ved å subtrahere uspesifikk binding fra total binding (ligning 2.1). Man ønsker høyest mulig prosentandel spesifikk binding – den bør helst ligge over 70% for at metoden skal regnes som god (Bylund og Toews 1993). Se utregning i ligning 2.2.

Ligning 2.1: Spesifikk binding = total binding – uspesifikk binding

Ligning 2.2: % spesifikk binding = $\frac{\text{total binding} - \text{uspesifikk binding} \times 100\%}{\text{total binding}}$

Reseptorbindingsforsøkene i denne oppgaven ble utført 1-4 ganger.

2.5.1 Binding av [³H]-metyllycaconitin ([³H]-MLA) til α₇-nikotinreseptorer

Binding av [³H]-MLA til α₇-nikotinreseptorer ble benyttet for å sammenligne nikotinreseptorbinding i WKY-, ADD- og SHR-rotter. Metoden var ikke tidligere etablert i vårt laboratorium, derfor måtte det gjennomføres metodeforsøk før den kunne tas i bruk (se kapittel 3.1.1). Membranhomogenat fra enten cerebrum eller hippocampus ble benyttet (se kapittel 2.3.1). Prøverør ble tilsatt 25 mM PBS-buffer (fosfatbufret saltløsning) (pH 7.4). Rørene for måling av uspesifikk binding ble tilsatt nikotin (sluttkonsentrasjon 1 mM). Membranhomogenat ble tilført for å gi en sluttkonsentrasjon på cirka 3 mg protein/ml. Radioliganden [³H]-MLA ble tilført slik at konsentrasjonen i rørene ble 1 nM. Prøvene ble så satt til inkubering ved romtemperatur (25 °C) i 1.5 timer. Inkuberingen ble avsluttet ved å tilsette 2 ml iskald 25 mM PBS-buffer (pH 7.4), og prøvene ble umiddelbart vakuumfiltrert gjennom GFB-glassmikrofiberfiltre (diameter 25 mm, fra Whatman). Det ble raskt skylt ytterligere 2 ganger med 2 ml PBS-buffer. Filtrene var på forhånd lagt i 0.5% (w/v) polytetyleniminløsning i 1 time for å redusere uspesifikk binding av [³H]-MLA til filtrene. Filtrene ble overført til polyetylen-tellerør (PerkinElmer) som ble tilsatt 4 ml Filter-Count-tellevæske. Radioaktiviteten ble målt i en scintillasjonsteller

(PerkinElmer Tri-Carb 3100TR). Det ble benyttet duplikater av totalprøvene, mens de uspesifikke prøvene ble målt uten replikater.

2.5.2 Binding av [³H]-epibatidin til nikotinreseptorer

Binding av [³H]-epibatidin ble målt i membranhomogenat fra WKY- ADD- og SHR-rotter (se prøveopparbeiding i kapittel 2.3.1). [³H]-Epibatidin er mindre selektiv enn ([³H]-MLA) når det gjelder binding til nikotinreseptorer. [³H]-Epibatidin binder seg til $\alpha_4\beta_2$ -nikotinreseptorer (den vanligste i subtypen i sentralnervesystemet) med høy affinitet, men kan også binde seg til andre nikotinreseptorsubtyper. Sannsynligvis utgjør binding til $\alpha_4\beta_2$ -reseptorer hovedbidraget når man måler nikotinreseptorbinding ved hjelp av [³H]-epibatidin (Lee et al. 2001). Rørene ble tilsatt 50 mM TRIS/HCl-buffer (pH 7.4). Nikotin ble benyttet for å bestemme uspesifikk binding (sluttkonsentrasjon 0.1 mM). Membranhomogenat ble deretter tilsatt (sluttkonsentrasjon cirka 0.2 mg protein/ml). [³H]-epibatidin ble tilført til en sluttkonsentrasjon på 1 nM. Prøvene ble inkubert i 1 time (25 °C). Inkuberingen ble avsluttet ved tilsetning av 3 ml iskald 50 mM TRIS/HCl-buffer (pH 7.4), og prøvene ble umiddelbart vakuumfiltrert gjennom GFB-glassmikrofiberfiltre (diameter 25 mm, fra Whatman). Det ble raskt skylt ytterligere 2 ganger med 3 ml TRIS/HCl-buffer. Filtrene var på forhånd lagt i 0.5% (w/v) polyetyleniminløsning i 1 time. Filtrene ble overført til polyetylen-tellerør (PerkinElmer) som ble tilsatt 4 ml Filter-Count-tellevæske. Radioaktiviteten ble målt i en scintillasjonsteller (PerkinElmer Tri-Carb 3100TR). Det ble benyttet duplikater av totalprøvene, mens de uspesifikke prøvene ble målt uten replikater.

2.5.3 Binding av [³H]-MK-801 til NMDA-reseptorer

Binding av [³H]-MK-801 ([³H]-dizocilpin) til NMDA-reseptorer ble sammenlignet i membranhomogenat fra WKY-, ADD- og SHR-rotter (prøveopparbeiding av homogenat er beskrevet i kapittel 2.3.1). Rørene ble tilsatt 4.5 mM/5.0 mM TRIS/HEPES-buffer (pH 7.4). Glutamat og glysin ble tilsatt til rørene, begge slik at

sluttkonsentrasjonen ble 0.1 mM. Binding av både glutamat og glysin til NMDA-reseptoren er nødvendig for at NMDA-reseptorens ionekanal skal åpnes/aktiveres. MK-801 binder seg til det såkalte fensyklidin-setet (PCP) som er lokalisert inne i ionekanalene (Young og Fagg 1990). Hvert rør ble tilsatt homogenat til en sluttkonsentrasjon på cirka 0.7 mg protein/ml. Umerket MK-801 ble tilsatt for å måle uspesifikk binding (sluttkonsentrasjon 1 mM). Radioliganden [³H]-MK-801 ble tilsatt til en sluttkonsentrasjon på 4 nM. Prøvene ble inkubert i 0.5 time (25 °C). Inkuberingen ble avsluttet ved å tilsette 3 ml iskald 4.5 mM/5.0 mM TRIS/HEPES-buffer (pH 7.4), og prøvene ble umiddelbart vakuumsfiltrert gjennom GFB-glassmikrofiberfiltre (diameter 25 mm, fra Whatman). Det ble skylt ytterligere 2 ganger med 3 ml TRIS/HEPES-buffer. Filtrene var på forhånd lagt i 0.5% (w/v) polyetyleniminløsning i 1 time. Filtrene ble overført til polyetylen-tellerør (PerkinElmer) som ble tilsatt 4 ml Filter-Count-tellevæske. Radioaktiviteten ble målt i en PerkinElmer Tri-Carb 3100TR-scintillasjonsteller. Det ble benyttet duplikater av totalprøvene, mens de uspesifikke prøvene ble målt uten replikater.

2.6 HPLC-analyse av monoaminer i striatum

High Performance Liquid Chromatography (HPLC) er en mye brukt metode for å måle ulike stoffer i biologisk materiale. Metoden er basert på at en mobilfase (væske) presses gjennom en kolonne pakket med et materiale, gjerne silikabasert, som retarderer (holder tilbake) stoffene i ulik grad, ut fra deres kjemiske egenskaper. Analysen kan bygge på forskjellige separasjonsprinsipper, som normalfasekromatografi eller omvendt-fase-kromatografi. Prøven som inneholder stoffene man vil måle, injiseres i mobilfasen før kolonnen. Stoffene som blir brakt med mobilfasen ut av kolonnen, detekteres ved hjelp av en detektor. Det er flere ulike deteksjonsprinsipper, blant annet massespektrometri og elektrokjemisk deteksjon. Elektrokjemiske detektorer responderer på stoffer som er oksiderbare eller reduserbare ved å måle endringer i strøm når stoffene oksideres eller reduseres, derfor

er de velegnet å bruke når man skal analysere prøver med katekolaminer, som har oksiderbare grupper (Pedersen-Bjergaard og Rasmussen 2004).

Opparbeidete prøver fra WKY- og SHR-rotter behandlet med PCB 153 eller maisolje (som beskrevet i kapittel 2.2.5 og kapittel 2.3.2), ble analysert for monoaminene dopamin og serotonin, samt metabolittene homovanillinsyre (HVA, en viktig dopaminmetabolitt) og 5-hydroxyindoleddiksyre (5-HIAA, hovedmetabolitten til serotonin). Prøvene ble tint, filtrert gjennom et 0.22 µm-sprøytefilter og overført til HPLC-prøverør. Prøvene ble separert ved omvendt-fase-kromatografi og detektert ved elektrokjemisk deteksjon. Et Shimadzu-HPLC-system med en Antec Leyden Decade II-elektrokjemisk detektor ble benyttet. HPLC-apparatet for analyse av monoaminer var ikke skikkelig innkjørt, derfor var det nødvendig med optimalisering av analyseprosedyren (se kapittel 3.1.2). Arbeidspotensialet til detektoren ble stilt inn på 600 mV. Væskestrømmen til mobilfasen ble satt til 1.3 ml/min. DHBA (3,4-hydroksybenzylamin) ble benyttet som intern standard. Eksterne standarder av dopamin, HVA, serotonin og 5-HIAA ble analysert samtidig med prøvene. Hver prøve ble analysert i 30 minutter, for å få med alle topper av interesse. Injeksjonsvolumene var 8 og 25 µl for prøver, og 25 µl for standarder. Siden monoaminene oksideres lett, ble både standarder og prøver tilsatt 0.12 mM askorbinsyre som antioksidant og oppbevart i fryser ved -40 °C.

2.7 Tallbehandling og statistikk

I de grafiske fremstillingene er dataene vist som utvalgsgjennomsnitt pluss standardfeilen for gjennomsnittet (SEM). Grubbs' test ble brukt for å avdekke uteliggere i datamaterialet. Ved signifikanstesting av dataene, ble signifikansnivået satt til 0.05. Ved sammenligning av tre eller flere grupper, ble enveis-ANOVA (variensanalyse) med Tukeys ettertest (en modifikasjon av *t*-test) for sammenligning av to og to grupper, brukt.

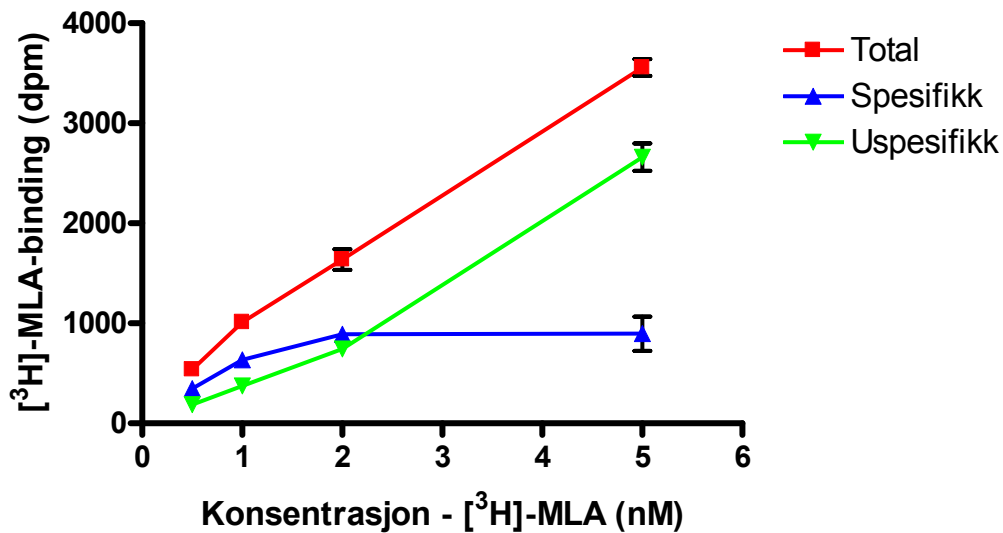
3. Resultater

3.1 Metodeforsøk

3.1.1 Metodeforsøk med [³H]-MLA

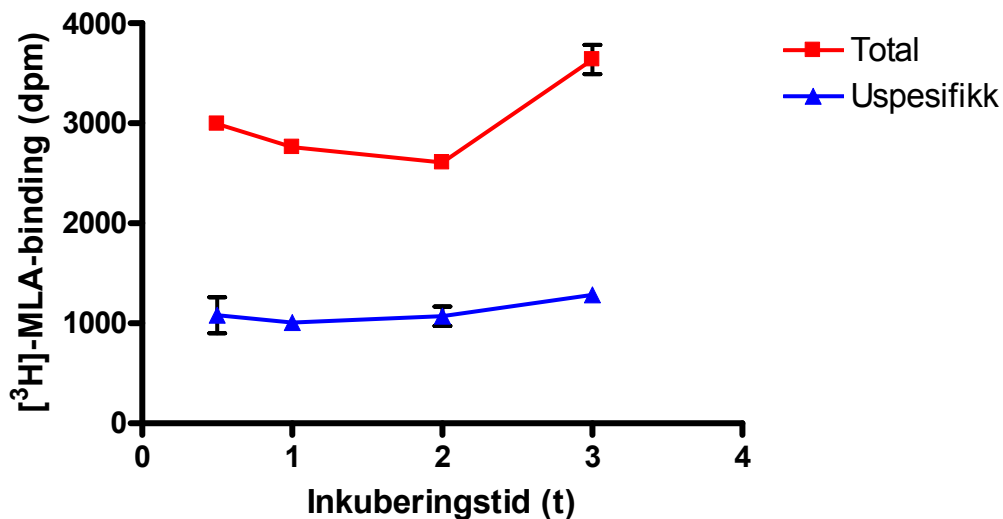
En metode for å måle binding til α_7 -nikotinreseptorer var ikke tidligere innarbeidet i vårt laboratorium, derfor var det nødvendig å gjøre metodeforsøk før vi kunne ta metoden i bruk rutinemessig. Vår metode bygger på prosedyren til Davies et al. (1999), som beskriver binding av [³H]-MLA til α_7 -nikotinreseptorer. I stedet for umerket MLA, ble nikotin benyttet for måle uspesifikk binding, som beskrevet av Lee et al. (2001). Følgende parametere ble variert under utprøvingen av metoden: Konsentrasjon av [³H]-MLA, proteinkonsentrasjon (ved å variere mengde tilsatt homogenat), antall skyllinger og skyllevolum, og inkuberingstid og -temperatur. Målet var å oppnå høyest mulig spesifikk binding i forhold til uspesifikk binding.

Til metodeforsøkene ble det benyttet membranhomogenat isolert fra cerebrum hos WKY-hanner, som beskrevet i kapittel 2.3.1. Det ble forsøkt å måle binding ved flere [³H]-MLA-konsentrasjoner: 0.5 nM, 1 nM, 2 nM og 5 nM. Total og uspesifikk binding steg med økende [³H]-MLA-konsentrasjon, mens spesifikk binding så ut til å flate ut (bli mettet) (Figur 3.1). På grunnlag av disse resultatene ble det valgt å bruke en konsentrasjon av [³H]-MLA på 1 nM i senere forsøk. Øvrige forsøksbetingelser var 1 mg/ml proteinkonsentrasjon, 1 mM nikotin, 2.5 timer inkubering ved 25 °C og 3x2 ml skylling.



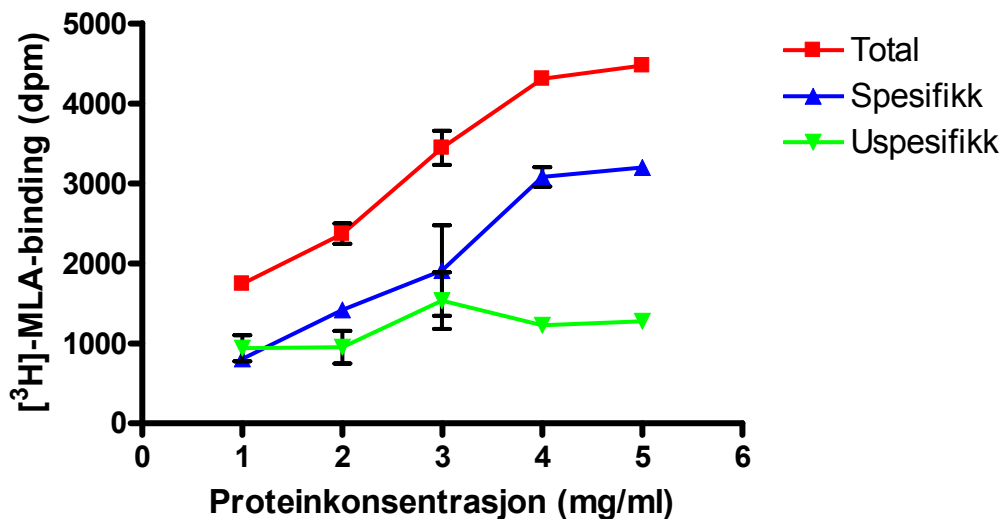
Figur 3.1: [³H]-MLA-binding ved økende [³H]-MLA-konsentrasjon. Forsøket ble utført med triplikater av hver prøve. Punktene viser gjennomsnitt ± standardfeil. Øvrige betingelser: Proteinkonsentrasjon: 1 mg/ml, nikotinkonsentrasjon: 1 mM, inkuberingsbetingelser: 2.5 timer ved 25 °C, skylling: 3x2 ml.

Betydningen av inkuberingstiden ble undersøkt ved å inkubere i henholdsvis 0.5, 1, 2 og 3 timer. Selv om både uspesifikk og total binding varierte noe ved endring av inkuberingstiden, innvirket dette ikke så mye på forholdet mellom spesifikk og total binding (andelen spesifikk binding) (Figur 3.2), derfor ble det valgt å inkubere i 1.5 timer i den endelige metoden. Øvrige forsøksbetingelser: 2 mg/ml proteinkonsentrasjon, 1 mM nikotin, 1 nM [³H]-MLA, inkubering ved 25 °C og 3x2 ml skylling.



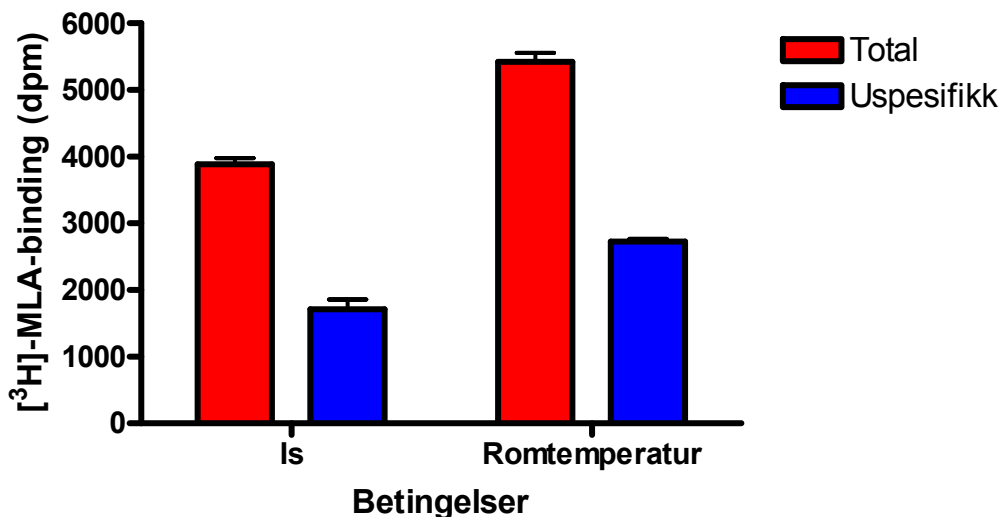
Figur 3.2: [^3H]-MLA-binding ved økende inkuberingstid. Forsøket ble utført med duplikater av hver prøve. Punktene viser gjennomsnitt \pm standardfeil. Øvrige betingelser: Proteinkonsentrasjon: 2 mg/ml, nikotinkonsentrasjon: 1 mM, [^3H]-MLA-konsentrasjon: 1 nM, inkuberingstemperatur: 25 °C, skylling: 3x2 ml.

Resultatene fra forsøkene med bruk av ulike proteinkonsentrasjoner (1, 2, 3, 4 og 5 mg/ml) viste at total binding steg med økende proteinkonsentrasjon, mens den uspesifikke bindingen ikke ble like påvirket av økt proteinkonsentrasjon (Figur 3.3). Andelen spesifikk binding steg dermed i takt med økende proteinkonsentrasjon. En proteinkonsentrasjon på 3 mg/ml ble valgt i den endelige metoden, siden det også måtte tas hensyn til begrenset tilgang på membranhomogenat. Øvrige forsøksbetingelser var 1 mM nikotin, 1 nM [^3H]-MLA, inkubering i 2.5 timer, ved 25 °C og 3x2 ml skylling.



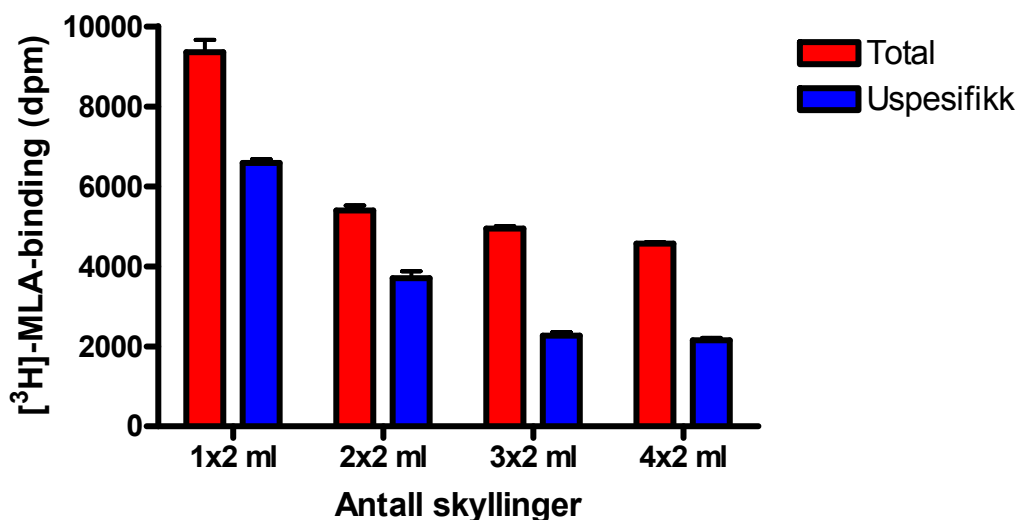
Figur 3.3: [^3H]-MLA-binding ved økende proteinkonsentrasjon. Forsøket ble utført med duplikater av hver prøve. Punktene viser gjennomsnitt \pm standardfeil. Øvrige betingelser: Nikotinkonsentrasjon: 1 mM, [^3H]-MLA-konsentrasjon: 1 nM, inkuberingsbetingelser: 2.5 timer ved: 25 °C, skylling: 3x2 ml.

Betydningen av inkuberingstemperaturen ble undersøkt ved å inkubere prøver på is, og sammenligne disse med prøver inkubert ved romtemperatur (25 °C). Både total og uspesifikk binding var høyere ved inkubering ved romtemperatur sammenlignet med inkubering på is. Forholdet mellom spesifikk og total binding var imidlertid ganske likt ved inkubering ved romtemperatur og på is (Figur 3.4). Det ble valgt å inkubere ved romtemperatur i de videre forsøkene. Øvrige forsøksbetingelser: 3 mg/ml proteinkonsentrasjon, 1 mM nikotin, 1 nM [^3H]-MLA, inkubering i 2.5 timer og 3x2 ml skylling.



Figur 3.4: $[^3\text{H}]\text{-MLA}$ -binding ved 2 ulike inkuberingsbetingelser – is og romtemperatur (25 °C). Forsøket ble utført med triplikater av hver prøve. Søylene viser gjennomsnitt og standardfeil. Øvrige betingelser: Proteinkonsentrasjon: 3 mg/ml, nikotinkonsentrasjon: 1 mM, $[^3\text{H}]\text{-MLA}$ -konsentrasjon: 1 nM, inkuberingstid: 2.5 timer, skylling: 3x2 ml.

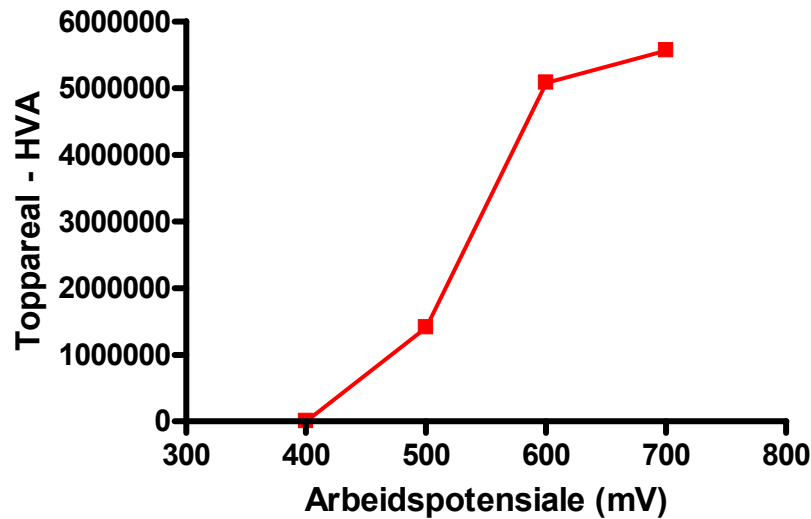
Forsøk med bruk av ulike antall skyllinger (1x2 ml, 2x2 ml, 3x2 ml og 4x2 ml) viste at uspesifikk binding gikk ned ved økt antall skyllinger. Total binding ble også lavere ved flere skyllinger, og forholdet uspesifikk/total binding ble mindre ved flere skyllinger (effekten var størst fra 1 til 2 skyllinger) (Figur 3.5). Skylling med 3x2 ml buffer ble valgt i den endelige metoden. Øvrige forsøksbetingelser var 3 mg/ml proteinkonsentrasjon, 1 mM nikotin, 1 nM $[^3\text{H}]\text{-MLA}$, inkubering i 1 time ved 25 °C og 3x2 ml skylling.



Figur 3.5: [^3H]-MLA-binding ved økende antall skyllinger (2 ml i hver skylling). Forsøket ble utført med triplikater av hver prøve. Søylene viser gjennomsnitt og standardfeil. Øvrige betingelser: Proteinkonsentrasjon: 3 mg/ml, nikotinkonsentrasjon: 1 mM, [^3H]-MLA-konsentrasjon: 1 nM, inkuberingsbetingelser: 1 time ved 25 °C.

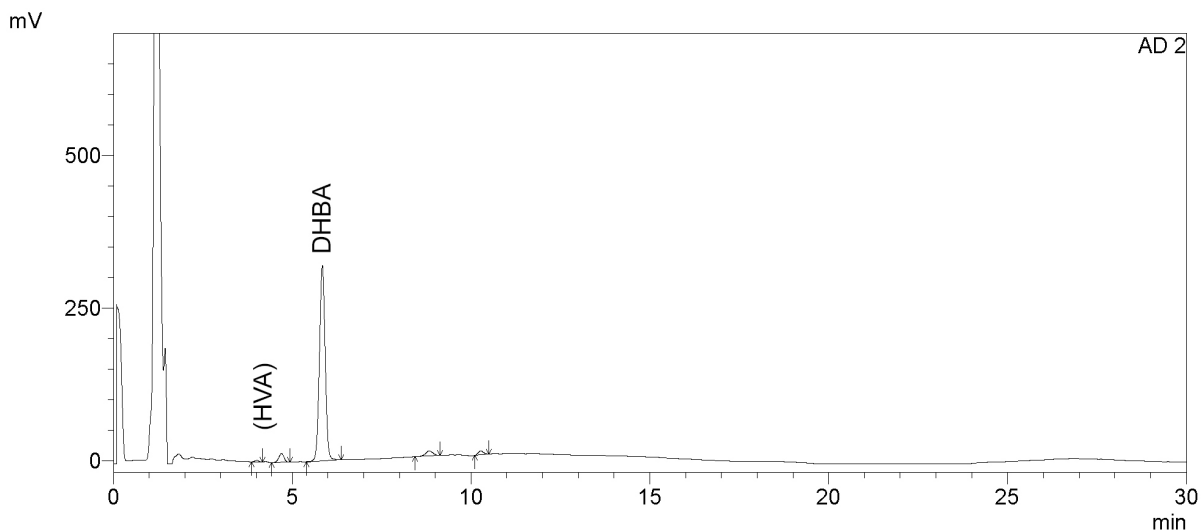
3.1.2 Optimalisering av HPLC-metode

Prosedyren for HPLC-analyse av monoaminer var ikke tilstrekkelig innarbeidet i vårt laboratorium, så prosedyren måtte derfor optimaliseres. Et problem som måtte løses, var at homovanillinsyre (HVA) ikke ble detektert ved bruk av gjeldende betingelser. Det ble derfor forsøkt å analysere en HVA-standard ved økende arbeidspotensialer i detektoren. Standarden ble først analysert ved et potensiale på 400 mV (innstillingen som til da var brukt), deretter ved 500 mV, 600 mV og 700 mV. Topparealet til HVA fra HPLC-kromatogrammet ble så plottet for hvert av de fire ulike arbeidspotensialene (Figur 3.6). Allerede ved økning av arbeidspotensialet fra 400 mV til 500 mV ga HVA en topp i kromatogrammet, og topparealet steg så kraftig ved økning til 600 mV. Fra 600 mV til 700 mV økte ikke topparealet for HVA så mye, bare med cirka 10%. Det ble derfor valgt å bruke et arbeidspotensiale på 600 mV.



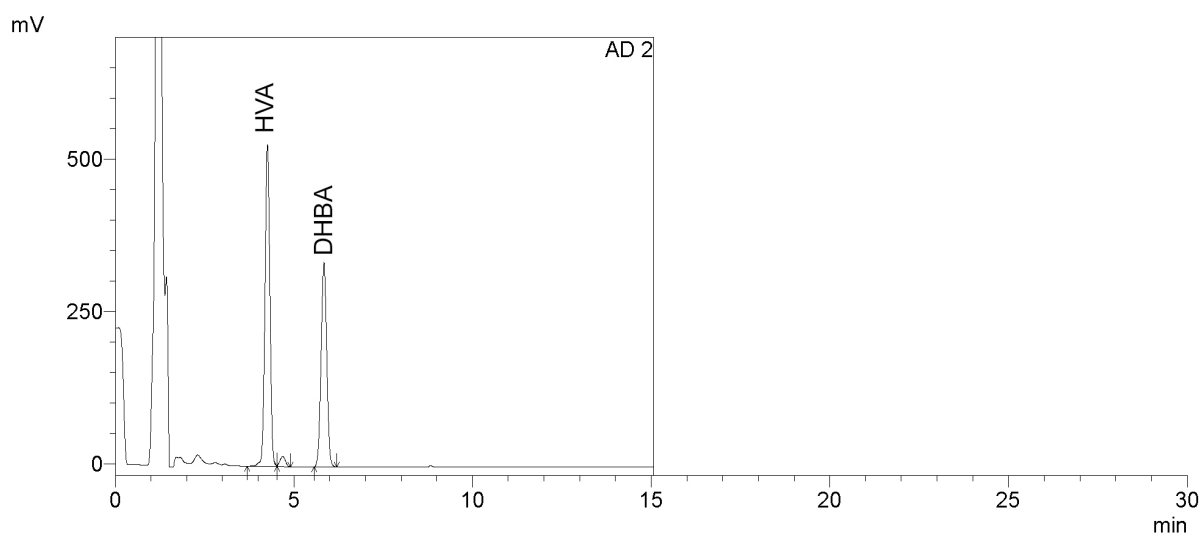
Figur 3.6: Toppareal for HVA ved økende arbeidspotensiale (fra 400-700 mV) i detektoren.

Figur 3.7 viser at HVA-standarden ikke ga noen synlig topp i kromatogrammet da den ble analysert ved et arbeidspotensiale på 400 mV. Den synlige toppen i kromatogrammet tilhører DHBA (dihydroksybenzylamin, intern standard).



Figur 3.7: HPLC-kromatogram for analysen av en HVA-standart ved et arbeidspotensiale på 400 mV. Forkortelser: HVA – homovanillinsyre, DHBA – dihydroksybenzylamin.

Ved et arbeidspotensiale på 600 mV, ga HVA en godt synlig topp. Toppen til høyre for HVAs tilhører DHBA (intern standard) (Figur 3.8).

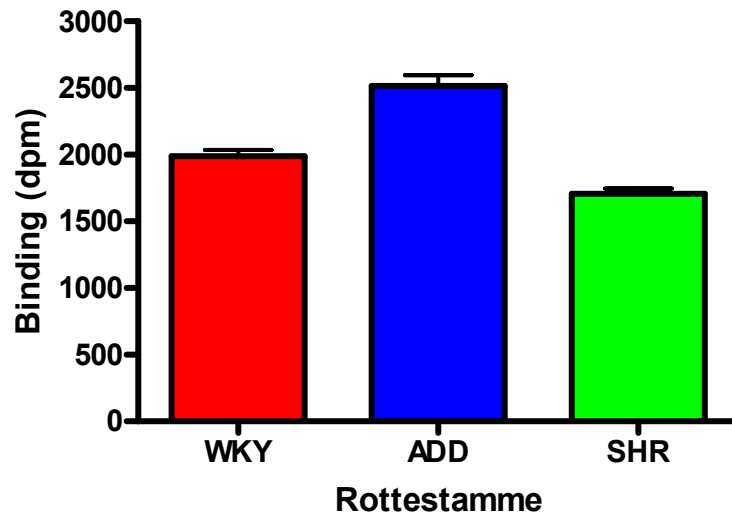


Figur 3.8: HPLC-kromatogram for analysen av en HVA-standard ved et arbeidspotensiale på 600 mV. Forkortelser: HVA – homovanillinsyre, DHBA – dihydroksybenzylamin.

3.2 Sammenligning av reseptorbinding hos WKY-, ADD- og SHR-rotter

3.2.1 α_7 -Nikotinreseptorbinding i cerebrum

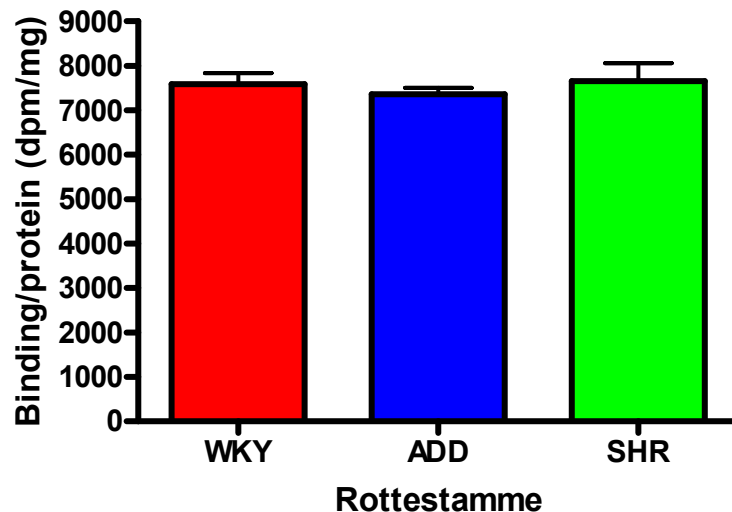
Spesifikk binding til α_7 -nikotinreseptorer i membranhomogenat isolert fra cerebrum ble målt etter metoden beskrevet i kapittel 2.5.1 og kapittel 3.1.1. Binding hos WKY- (kontroll), ADD- og SHR-rotter (ADHD-modell) ble sammenlignet. Figur 3.9 viser spesifikk binding målt som antall desintegrasjoner/minutt (dpm). α_7 -Nikotinreseptorbindingen var 26% høyere i ADD enn i WKY, og 14% lavere i SHR enn i WKY. Forskjellene mellom gruppene ble funnet å være signifikante ($P < 0.0001$). Ved sammenligning av to og to grupper, ble det funnet at SHR var signifikant forskjellig fra ADD ($P < 0.001$). SHR var også signifikant forskjellig fra WKY ($P < 0.01$), og WKY var signifikant forskjellig fra ADD ($P < 0.001$) (enveis-ANOVA med Tukeys ettertest).



Figur 3.9: α_7 -Nikotinreseptorbinding i membranhomogenat isolert fra cerebrum hos WKY-, ADD- og SHR-rotter. Søylen viser gjennomsnitt og standardfeil. $n = 16$ i hver gruppe. SHR var signifikant forskjellig fra ADD. SHR var også signifikant forskjellig fra WKY, og WKY var signifikant forskjellig fra ADD (enveis-ANOVA med Tukeys ettertest).

3.2.2 α_7 -Nikotinreseptorbinding i hippocampus

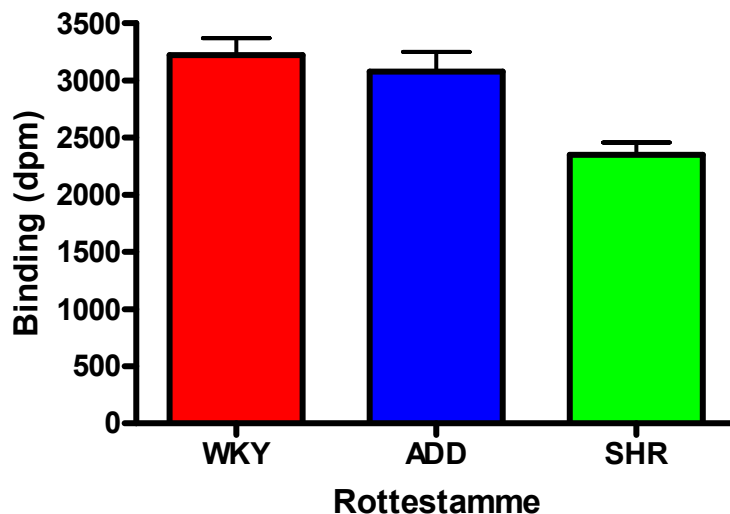
Spesifikk α_7 -nikotinreseptorbinding ble også målt i hippocampus etter metoden beskrevet i kapittel 2.5.1 og kapittel 3.1.1. Nikotinreseptorbindingen ble målt i henholdsvis WKY-, ADD- og SHR-rotter. Resultatene er uttrykt som spesifikk binding/proteinmengde (dpm/mg). Resultatene er fremstilt i Figur 3.10, og viser at det var liten forskjell i binding mellom gruppene. Statistisk analyse av resultatene viste ingen signifikante forskjeller mellom gruppene ($P = 0.7481$; enveis-ANOVA med Tukeys ettertest).



Figur 3.10: α_7 -Nikotinreseptorbinding i membranhomogenat fra hippocampus hos WKY-, ADD- og SHR-rotter. Søyene viser gjennomsnitt og standardfeil. $n = 8$ i hver gruppe. Det var ingen signifikante forskjeller mellom gruppene (enveis-ANOVA med Tukeys ettertest).

3.2.3 Generell nikotinreseptorbinding i cerebrum

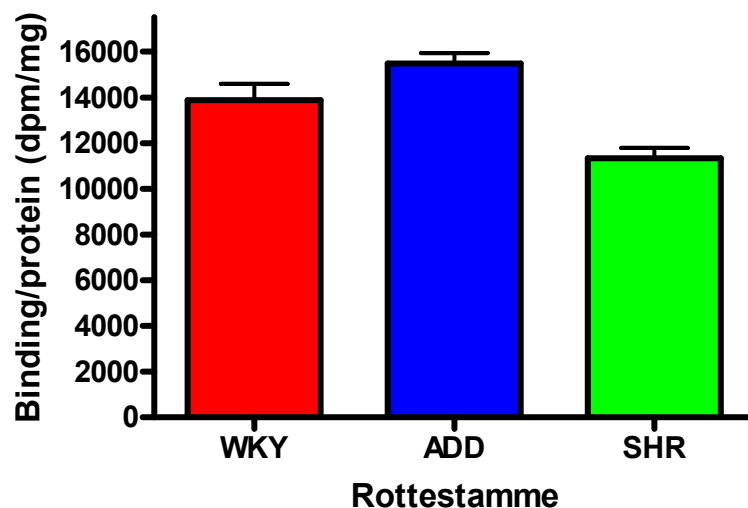
Reseptorbindingsmetoden med bruk av [3 H]-epibatidin (se kapittel 2.5.2), ble benyttet for å måle generell nikotinreseptorbinding i WKY-, ADD- og SHR-rotter. Det antas at man hovedsakelig måler $\alpha_4\beta_2$ -nikotinreseptorer med denne metoden (se kapittel 2.5.2). Nikotinreseptorbindingen (målt som dpm) var gjennomsnittlig 4% lavere i ADD-rottene enn i WKY-rottene, og 27% lavere i SHR-rottene enn i WKY-rottene (se Figur 3.11). Gruppene ble funnet å være signifikant forskjellige ($P = 0.0006$), og sammenligning av to og to grupper, viste at binding hos SHR var signifikant forskjellig fra binding hos WKY ($P < 0.001$), og at binding hos SHR også var signifikant forskjellig fra binding hos ADD ($P < 0.01$). Det ble ikke funnet signifikante forskjeller i binding ved sammenligning av ADD med WKY (enveis-ANOVA med Tukeys ettertest).



Figur 3.11: Generell nikotinreseptorbinding i cerebrum hos WKY-, ADD- og SHR-rotter. Søylen viser gjennomsnitt og standardfeil. $n = 8$ i hver gruppe. SHR var signifikant forskjellig fra både WKY og ADD (enveis-ANOVA med Tukeys ettertest).

3.2.4 Generell nikotinreseptorbinding i hippocampus

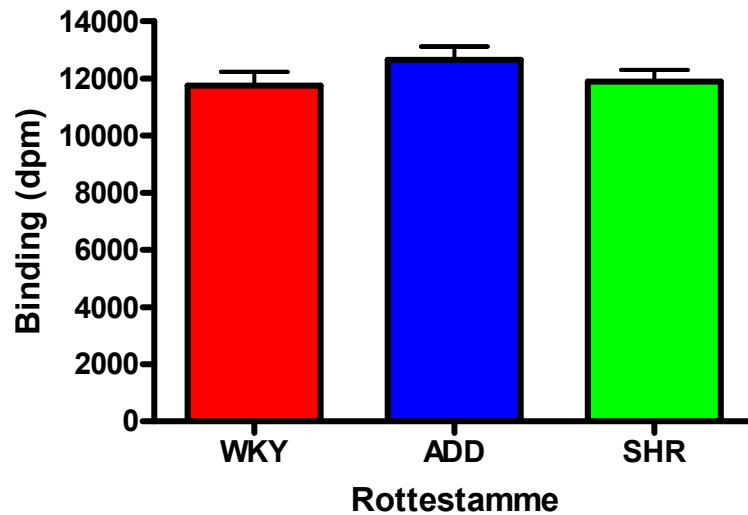
Nikotinreseptorbinding, som beskrevet i kapittel 2.5.2, ble også målt i hippocampus fra WKY-, ADD- og SHR-rotter. Figur 3.12 oppsummerer resultatene – uttrykt som spesifikk binding/proteinmengde (dpm/mg). Gjennomsnittlig binding var 12% høyere i ADD enn i WKY, og 18% lavere i SHR enn i WKY. Gruppene ble funnet å være signifikant forskjellige fra hverandre ($P = 0.0001$). Parvis sammenligning av to og to grupper viste at SHR var signifikant forskjellig fra WKY ($P < 0.05$) og at SHR også var signifikant forskjellig fra ADD ($P < 0.001$). WKY var ikke signifikant forskjellig fra ADD (enveis-ANOVA med Tukeys ettertest).



Figur 3.12: Generell nikotinreseptorbinding i membranhomogenat fra hippocampus hos WKY-, ADD-, og SHR-rotter. Søyene viser gjennomsnitt og standardfeil. $n = 8$ i hver gruppe. SHR var signifikant forskjellig fra både WKY og ADD (enveis-ANOVA med Tukeys ettertest).

3.2.5 NMDA-reseptorbinding i cerebrum

Det ble målt NMDA-reseptorbinding i membranhomogenat fra cerebrum hos WKY-, ADD- og SHR-rotter som beskrevet i kapittel 2.5.3. Resultatene er vist i Figur 3.13, og binding er uttrykt som antall desintegrasjoner/minutt (dpm). NMDA-reseptorbindingen var ganske lik i alle gruppene. Analyse av dataene viste at det ikke var signifikante forskjeller i NMDA-reseptorbinding mellom WKY-, ADD- og SHR-rotter ($P = 0.3329$; enveis-ANOVA med Tukeys ettertest).

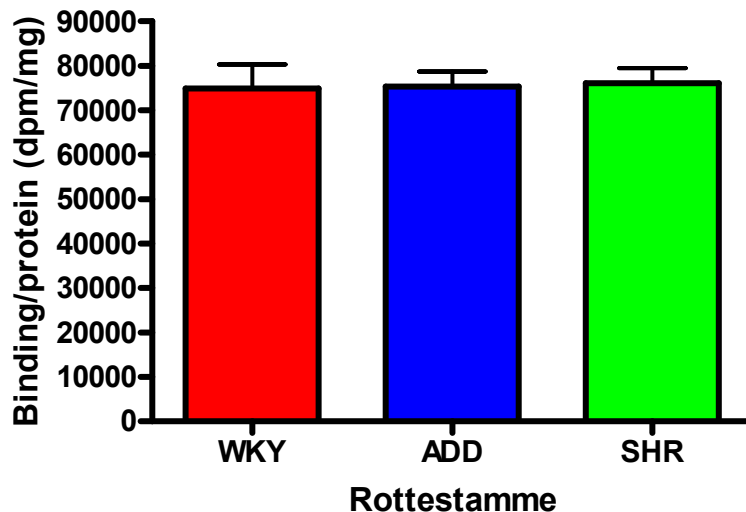


Figur 3.13: NMDA-reseptorbinding i membranhomogenat fra cerebrum hos WKY-, ADD- og SHR-rotter. $n = 16$ i hver gruppe. Søylene viser gjennomsnitt og standardfeil. Det var ingen signifikante forskjeller mellom gruppene (enveis-ANOVA med Tukeys ettertest).

3.2.6 NMDA-reseptorbinding i hippocampus

NMDA-reseptorbinding ble også målt i membranhomogenat isolert fra hippocampus hos WKY-, ADD- og SHR-rottene (metode er beskrevet i kapittel 2.5.3). Resultatene er vist i Figur 3.14, oppgitt som spesifikk binding/proteinmengde (dpm/mg).

Statistisk analyse av dataene viste at det ikke var signifikante forskjeller i NMDA-reseptorbinding mellom gruppene ($P = 0.9781$; enveis-ANOVA med Tukeys ettertest).



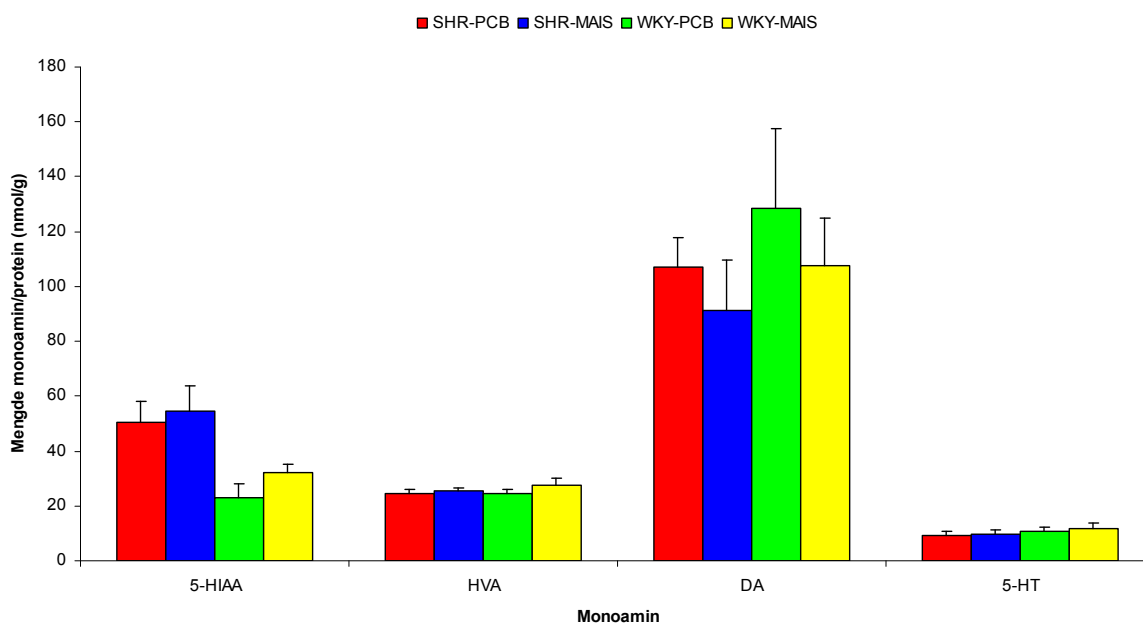
Figur 3.14: NMDA-reseptorbinding hos WKY-, ADD- og SHR-rotter. Søylene viser gjennomsnitt og standardfeil. $n = 8$ i hver gruppe. Det var ingen signifikante forskjeller mellom gruppene (enveis-ANOVA med Tukeys ettertest).

3.3 Sammenligning av monoaminnivåer hos PCB-eksponerte rotter og kontrollrotter

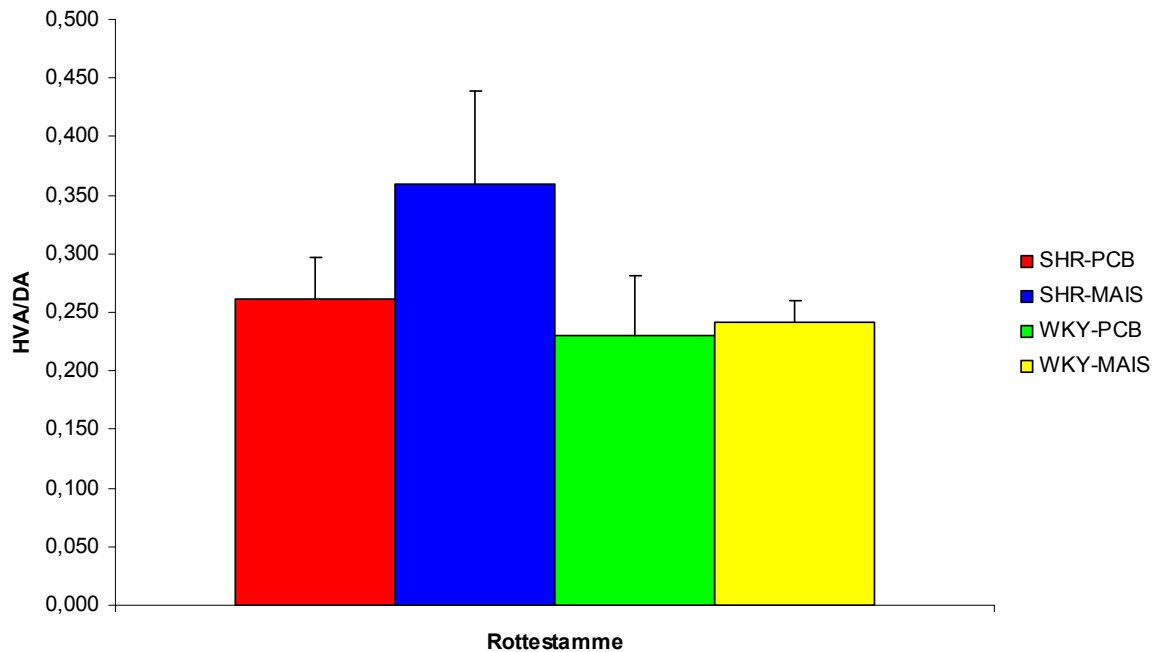
3.3.1 Måling av monoaminer i striatum

Til måling av monoaminer ble det benyttet striatumprøver fra WKY-rotter som hadde blitt eksponert for henholdsvis maisolje (8 rotter) og maisolje med PCB 153 (5 rotter) og SHR-rotter som også hadde blitt eksponert for henholdsvis maisolje (7 rotter) og maisolje med PCB 153 (8 rotter) (se PCB-eksponering i kapittel 2.2.5 og prøveopparbeiding i kapittel 2.3.2). Prøvene ble analysert ved hjelp av HPLC med elektrokjemisk deteksjon (se metode i kapittel 2.6). Hensikten var å undersøke eventuelle forskjeller i monoaminnivåer hos disse gruppene av rotter som følge av eksponering for PCB 153 eller på grunn av genetiske forskjeller mellom WKY- og SHR-rotter. Nivåer av 5-HIAA, serotonin, dopamin og HVA ble målt i hver enkelt prøve. Resultatene av disse målingene er fremstilt i Figur 3.15, vist som mengde monoamin/proteinmengde (nmol/g protein). HVA/dopamin-ratio og 5-HIAA/serotonin-ratio i prøvene er vist i henholdsvis Figur 3.16 og Figur 3.17.

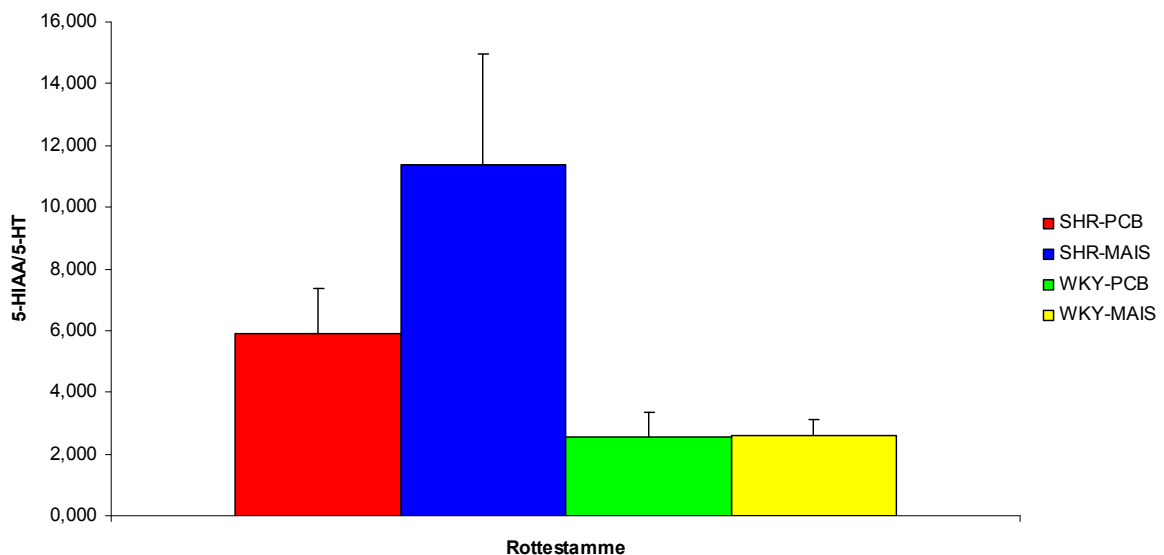
Analyse av dataene viste at det var signifikante forskjeller i 5-HIAA-nivåer mellom de fire gruppene ($P = 0.0139$), og sammenligning av to og to grupper viste at WKY eksponert for PCB 153 var signifikant forskjellig fra SHR eksponert for maisolje ($P < 0.05$). Den signifikante forskjellen mellom disse to gruppene ble ikke ansett for å være relevant, og vil derfor ikke bli diskutert nærmere. Analyser av målingene av HVA, dopamin og serotonin viste ingen signifikante forskjeller mellom de fire gruppene av rotter. Det var heller ingen signifikante forskjeller i HVA/dopamin-ratio mellom gruppene (enveis-ANOVA med Tukeys ettertest). Det ble derimot funnet signifikante forskjeller i 5-HIAA/serotonin-ratio mellom de fire gruppene ($P = 0.0232$). Sammenligning av to og to grupper viste at WKY eksponert for maisolje var signifikant forskjellig fra SHR eksponert for maisolje ($P < 0.05$).



Figur 3.15: Monoaminnivåer i striatum hos fire grupper rotter: WKY eksponert for maisolje eller maisolje med PCB 153, og SHR eksponert for maisolje eller maisolje med PCB 153. Søylene viser gjennomsnitt og standardfeil i gruppene. Det var signifikante forskjeller i 5-HIAA-nivåer mellom WKY eksponert for PCB 153 og SHR eksponert for maisolje. Det var ingen signifikante forskjeller mellom rottegruppene når det gjaldt nivåer av HVA, dopamin eller serotonin (enveis-ANOVA med Tukeys ettertest).

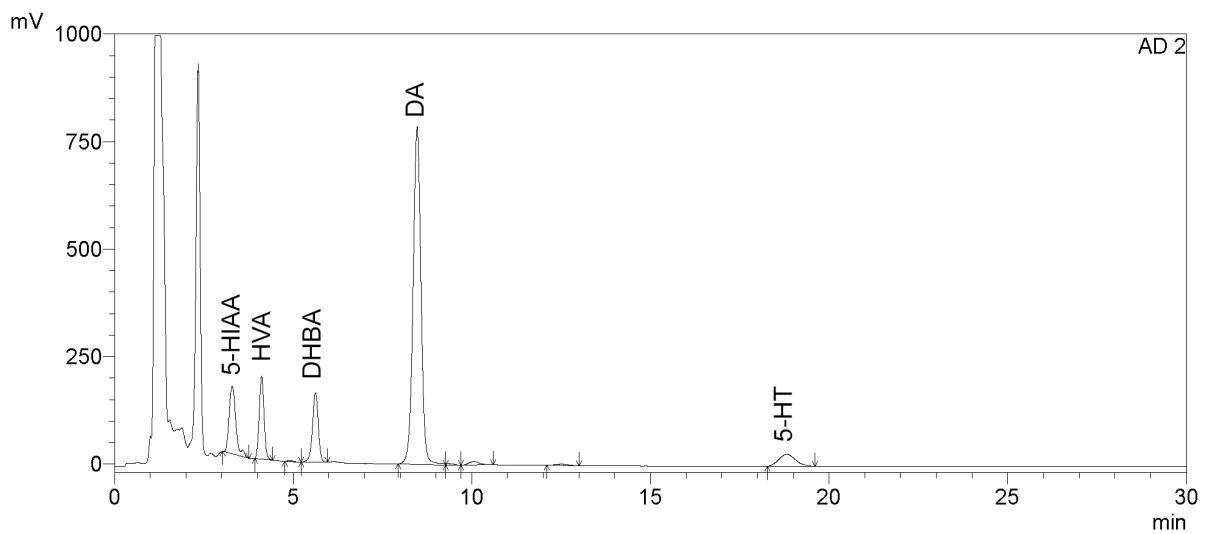


Figur 3.16: HVA/dopamin-ratio hos fire grupper rotter: WKY eksponert for maisolje eller maisolje med PCB 153, og SHR eksponert for maisolje eller maisolje med PCB 153. Søylen viser gjennomsnitt og standardfeil i gruppene. Det var ingen signifikante forskjeller i HVA/dopamin-ratio mellom de fire gruppene (enveis-ANOVA med Tukeys ettertest).



Figur 3.17: 5-HIAA/serotonin-ratio hos fire grupper rotter: WKY eksponert for maisolje eller maisolje med PCB 153, og SHR eksponert for maisolje eller maisolje med PCB 153. Søylen viser gjennomsnitt og standardfeil i gruppene. Det var signifikante forskjeller i 5-HIAA/serotonin-ratio mellom WKY eksponert for maisolje og SHR eksponert for maisolje (enveis-ANOVA med Tukeys ettertest).

Figur 3.18 viser et HPLC-kromatogram for analyse av en prøve opparbeidet fra en WKY-rotte eksponert for maisolje.



Figur 3.18: HPLC-kromatogram for en prøve som stammet fra en WKY-rotte eksponert for maisolje. Forkortelser: 5-HIAA – 5-hydroxyindoleddiksyre, HVA – homovanillinsyre, DHBA – dihydroksybenzylamin (intern standard), DA – dopamin, 5-HT – serotonin.

4. Diskusjon

I denne oppgaven ble to ulike dyremodeller for ADHD – SHR- og ADD-rotter – sammenlignet med kontrollrotter (WKY) i forsøk på å finne mulige årsaker til atferdsforstyrrelsene som observeres ved ADHD. De ulike rottemodellene ble sammenlignet med hensyn på nikotin- og NMDA-reseptorbinding (glutamatreseptor) i cerebrum og hippocampus. Monoaminnivåer i striatum hos SHR-dyr ble også sammenlignet med kontrolldyr (WKY). Monoaminnivåer i striatum ble dessuten undersøkt hos SHR- og WKY-rotter etter eksponering for miljøgiften PCB 153.

4.1 Sammenligning av reseptorbinding hos WKY-, ADD- og SHR-rotter

4.1.1 Nikotinreseptorbinding i cerebrum og hippocampus

Kolinerge baner spiller en viktig rolle når det gjelder motorisk kontroll, læring og hukommelse, og nikotinerge systemer har blitt implisert ved ADHD. Vi ønsket derfor å undersøke nivået nikotinreseptorer hos WKY-, ADD- og SHR-rotter. Reseptorer av $\alpha_4\beta_2$ -subtypen er de mest utbredte av de nikotinerge kolinerge reseptorene i hjernen. Subtypen er lokalisert i den frontale, parietale og temporale cortex, samt i hippocampus, basalgangliene og cerebellum. Det finnes også mye av nikotinreseptorer av α_7 -subtypen i hjernen. De er høyt uttrykt spesielt i cortex, hippocampus og subkortikale limbiske regioner. De forekommer i lave nivåer i områder av thalamus og i basalgangliene (Gotti et al. 2006; Gotti et al. 2007). Ved måling av generell nikotinreseptorbinding, som man antar at utgjøres hovedsakelig av binding til $\alpha_4\beta_2$ -reseptorer (se kapittel 2.5.2), ble det funnet signifikante forskjeller i binding mellom rottemodeller for ADHD og kontrollrotter. I cerebrum var den generelle nikotinreseptorbindingen signifikant lavere (gjennomsnittlig 27%) hos SHR enn hos WKY. Bindingen var også signifikant lavere (gjennomsnittlig 24%) hos SHR enn hos ADD. Også i hippocampus var den generelle nikotinreseptorbindingen

signifikant lavere (gjennomsnittlig 18%) hos SHR enn hos WKY. Bindingen hos SHR var dessuten signifikant lavere (gjennomsnittlig 27%) enn hos ADD.

Også ved måling av α_7 -nikotinreseptorbinding ble det funnet signifikante forskjeller i binding mellom rottemodeller for ADHD og kontrollrotter. I cerebrum var det signifikant lavere binding (gjennomsnittlig 14%) hos SHR- enn hos WKY-rottene. Bindingen var signifikant høyere (gjennomsnittlig 26%) hos ADD enn hos WKY. I tillegg var det signifikant lavere (gjennomsnittlig 32%) binding hos SHR- enn hos ADD-rottene. Måling av α_7 -nikotinreseptorbinding i hippocampus avdekket ingen signifikante forskjeller mellom ADHD-modellene og kontrollrottene, og heller ikke mellom de to ADHD-modellene, i motsetning til hva tilfellet var for måling av generell nikotinreseptorbinding.

Våre studier viste at SHR-rotter har et lavere nivå av nikotinreseptorer enn WKY- og ADD-rotter, mens mellom WKY- og ADD-rotter, ble det kun funnet signifikante forskjeller for måling av α_7 -nikotinreseptorbinding i cerebrum – bindingen var signifikant høyere hos ADD enn hos WKY.

I tidligere studier hvor nikotinreseptorbinding hos WKY- og SHR-rotter har blitt sammenlignet, har det stort sett blitt brukt voksne dyr, og SHR-dyrene har følgelig hatt høyt blodtrykk. Våre studier ble foretatt på 4-5 uker gamle rotter, som ikke hadde utviklet høyt blodtrykk. Det har blitt vist at høyt blodtrykk kan spille en rolle i utviklingen av kognitive svekkelser og demens. Hos SHR-rotter som har utviklet høyt blodtrykk, er det blant annet observert hjerneatrofi, tap av nerveceller og gliale reaksjoner (Amenta et al. 2003). ADHD er en forstyrrelse som i størst grad rammer barn/unge, så dette var en annen begrunnelse for å studere rotter som ikke hadde nådd voksen alder. Nikotinreseptorbinding har ikke tidligere blitt målt hos ADD-dyr, derfor var det interessant å studere disse.

I en studie av 12 uker gamle SHR-rotter som ble sammenlignet med jevngamle WKY- og Wistar-rotter (kontrollrotter, er genetisk sett svært like WKY), ble det funnet forskjeller i nikotinreseptorbinding mellom disse gruppene (Gattu et al. 1997).

Studiene ble utført ved hjelp av [³H]-cytisin og [¹²⁵I]- α -bungarotoksin (autoradiografistudier). [³H]-cytisin binder seg til nikotinerge høy-affinitets seter (hovedsakelig $\alpha_4\beta_2$ -subenheter), mens [¹²⁵I]- α -bungarotoksin hovedsakelig binder seg til nikotinreseptorer bestående av α_7 -subenheter. Man undersøkte en rekke områder i hjernen, og det ble funnet at tettheten av bindings seter for [³H]-cytisin var signifikant redusert i SHR sammenlignet med WKY for 25 av 50 hjerneregioner som ble analysert. SHR hadde også redusert antall nikotinreseptorer i flere regioner sammenlignet med Wistar. Det var imidlertid ingen signifikante forskjeller i tettheten av bindings seter mellom WKY og Wistar. Det var også signifikant færre bindings seter for [¹²⁵I]- α -bungarotoksin hos SHR sammenlignet med WKY for flere hjerneområder. Disse forskjellene var imidlertid lokalisert til spesifikke områder av hjernen, i motsetning til den mer globale nedgangen i [³H]-cytisin-bindings seter. Forskjeller ble funnet blant annet i et bestemt område av den frontale cortex og den laterale hypothalamus. Det ble ikke funnet signifikante forskjeller i hippocampus. Denne studien ser ut til å gi støtte til våre funn, ved at det ble funnet signifikant lavere nivåer av nikotinreseptorbinding hos SHR-rotter sammenlignet med kontrollrotter, men at denne forskjellen ikke gjaldt α_7 -reseptorbinding i hippocampus. Et problem når man skal sammenligne dette arbeidet med våre studier, er imidlertid at dyrene her var betydelig eldre enn våre dyr, og at SHR-rottene dermed hadde utviklet høyt blodtrykk.

Rottene i studien til Gattu et. al (1997) ble også atferdstestet, og SHR-dyrene presterte dårligere enn WKY og Wistar i en oppgave som testet romlig hukommelse (vannlabyrint-test). SHR gjorde det også dårligere enn kontrollrottene i en test av såkalt unnvikende atferd. Det vil si at de var dårligere til å lære seg å unnlate å gå inn i et tilsynelatende tryggere område (mørkt), men hvor en "straff" (elektrisk støt) tidligere hadde blitt utdelt.

En annen gruppe forskere fant forskjeller i nikotinreseptornivåer (bindingsstudier) og i mRNA-nivåer (messenger-ribonukleinsyre) for nikotinreseptorsubenheter i sentralnervesystemet hos en variant av SHR-rotter som lett får slag, SHRSP (SP =

stroke-prone), sammenlignet med WKY-rotter (Ferrari et al. 1999). Rottene i begge gruppene var 3 måneder gamle da reseptorbinding og mRNA-nivåer ble målt. Nikotinreseptorbinding ble målt ved hjelp av [³H]-epibatidin (hovedsakelig $\alpha_4\beta_2$ -nikotinreseptorbinding) og [¹²⁵I]- α -bungarotoksin (hovedsakelig α_7 -nikotinreseptorbinding). Nivåer av mRNA ble målt for de nikotinerge subenheterne α_4 , α_7 og β_2 . Det ble funnet en signifikant nedgang i [¹²⁵I]- α -bungarotoksin-bindingssteder og α_7 -subenhetet-mRNA-nivåer i kortikale områder hos SHRSP-rottene sammenlignet med WKY-rottene, men ikke i hippocampus (eller andre studerte områder). Det ble imidlertid ikke funnet signifikante forskjeller mellom SHRSP og WKY når det gjaldt [³H]-epibatidinbinding og α_4 - og β_2 -subenhet-mRNA-nivåer. Det ser ut til å være godt samsvar mellom disse studiene og våre studier når det gjelder binding til α_7 -nikotinreseptorer. Det er imidlertid ikke samsvar når det gjelder generell nikotinreseptorbinding (hovedsakelig til $\alpha_4\beta_2$ -reseptorer), siden disse forskerne ikke fant signifikante forskjeller mellom SHRSP- og WKY-rotter i noen av hjerneområdene som ble studert. Det bør pekes på at også her var rottene så gamle da de ble studert, at SHRSP-rottene hadde utviklet hypertensjon. Det bør også understrekes at ”vanlige” SHR-rotter og SHRSP-rotter ikke er identiske.

4.1.2 NMDA-reseptorbinding i cerebrum og hippocampus

Glutamatreseptorer spiller en viktig rolle i hukommelse og læring, og glutamaterg transmisjon har blitt implisert ved ADHD. På bakgrunn av dette, ønsket vi å måle NMDA-reseptorbinding hos SHR-, ADD- og kontrollrotter (WKY). Det ble ikke funnet signifikante forskjeller i NMDA-reseptorbinding i ADD- og SHR-rotter sammenlignet med kontrolldyr (WKY), verken i cerebrum eller hippocampus. Det var heller ingen signifikante forskjeller mellom ADD- og SHR-rotter. Dataene fra våre forsøk antyder dermed at nivået av NMDA-reseptorer er relativt likt hos dyremodeller for ADHD og kontrolldyr.

I en studie der man undersøkte nivåene av flere forskjellige reseptorer i hjernen, ble det funnet forskjeller i binding til NMDA-reseptorer mellom SHR- og WKY-rotter

(Yao og Lawrence 2005). Rottene i begge gruppene var 16-18 uker gamle da målingene ble utført. NMDA-reseptorbinding ble bestemt ved hjelp av [³H]-MK-801 (*in vitro*-autoradiografiforsøk). Det ble funnet en signifikant høyere tetthet i bindingssteder for [³H]-MK-801 hos SHR enn hos WKY i locus coeruleus (en kjerne i hjernestammen). Det ble imidlertid ikke funnet signifikante forskjeller i [³H]-MK-801-bindingssteder mellom de to gruppene i den sentrale grå substans i pons (et annet område i hjernestammen). En forklaring på at det ble funnet signifikante forskjeller i NMDA-reseptorbinding mellom SHR- og WKY-rotter i denne studien, men ikke i våre studier, kan være at forskjellene ble funnet i et område av hjernen vi ikke undersøkte (locus coeruleus). Rottene i studien til Yao og Lawrence (2005) var også mye eldre enn de vi studerte (våre rotter var 4-5 uker gamle), og SHR-rottene deres hadde dermed utviklet hypertensjon.

Det har blitt foreslått at svekket NMDA-reseptorfunksjon i den prefrontale cortex hos SHR kan være med på å forklare de ADHD-lignende symptomene man observerer hos denne dyremodellen. I en studie av Lehohla og medarbeidere (2004), ble NMDA-reseptorfunksjonen i den prefrontale cortex sammenlignet hos 4-6 uker gamle SHR- og WKY-rotter. Skiver fra den prefrontale cortex ble inkubert med radioaktivt merket kalsium, med og uten NMDA tilstede. Mens basalt kalsium-opptak ikke var signifikant forskjellig mellom de to gruppene, observerte man at aktivering av NMDA-reseptorer stimulerte signifikant mindre kalsium-opptak inn i prefrontal cortex-skiver hos SHR enn hos WKY. Det er foreslått at den intracellulære kalsiumkonsentrasjonen er forhøyet hos SHR, og at konsentrasjonsgradienten som driver kalsium inn i cellen dermed er redusert sammenlignet med WKY. Våre resultater antyder at det ikke er forskjeller i nivåene av NMDA-reseptorer mellom rottemodeller for ADHD og kontrollrotter. Denne studien viser at det likevel kan være svekkelser i glutamaterg neurotransmisjon hos ADHD-modellene, i form av forstyrrelser i funksjonen til NMDA-reseptoren i enkelte hjernedeler.

4.2 Sammenligning av monoaminnivåer hos PCB-eksponerte rotter og kontrollrotter

4.2.1 Måling av monoaminer i striatum

Forstyrrelser knyttet til monoaminerg signalering ser ut til å ha en sentral rolle ved ADHD. Derfor ønsket vi å sammenligne monoaminnivåer i striatum hos SHR-rotter og kontrolldyr (WKY). Det ble ikke funnet signifikante forskjeller i nivåer av verken dopamin, HVA (dopaminmetabolitt), serotonin eller 5-HIAA (serotoninmetabolitt) i striatum, mellom ueksponerte SHR-rotter og ueksponerte WKY-rotter (ueksponert = ble gitt maisolje). Det var imidlertid en tendens til lavere dopaminnivåer hos ueksponerte SHR sammenlignet med ueksponerte WKY. For 5-HIAA, var det en tendens til høyere nivåer hos ueksponerte SHR sammenlignet med ueksponerte WKY. Det var også en tendens til høyere dopamin/HVA-ratio i striatum hos SHR sammenlignet med WKY, men denne forskjellen var heller ikke signifikant. Ratioen 5-HIAA/serotonin var imidlertid signifikant høyere (gjennomsnittlig 337%) hos SHR sammenlignet med WKY. Ratioen mellom en hovedmetabolitt av et monoamin og monoaminet, er relatert til turnover (omsetning) av monoaminet i det området av hjernen hvor målingene blir foretatt. Jo høyere nivåer av metabolitt i forhold til monoamin (og dermed jo høyere metabolitt/monoamin-ratio), jo høyere turnover av monoaminet.

Miljøgiften PCB ser blant annet ut til å kunne interferere med monoaminerg signalering. Eksponering for PCB 153 forårsaket imidlertid ikke signifikante forskjeller i dopamin-, HVA-, serotonin- eller 5-HIAA-nivåer i striatum hos WKY-rotter, sammenlignet med kontrollrotter (ueksponerte WKY). Det var likevel en tendens til høyere dopaminnivåer hos de PCB 153-eksponerte rottene, sammenlignet med de ueksponerte rottene. Det var heller ingen signifikante forskjeller i HVA/dopamin-ratio eller i 5-HIAA/serotonin-ratio, mellom PCB 153-eksponerte og ueksponerte WKY-rotter.

SHR-rotter ble også eksponert for PCB 153, men eksponeringen forårsaket heller ikke her signifikante forskjeller i nivåene av dopamin, HVA, serotonin eller 5-HIAA i striatum hos eksponerte dyr, sammenlignet med kontrolldyr (ueksponerte SHR). Det var riktignok en tendens til høyere dopaminnivåer hos PCB 153-eksponerte enn hos ueksponerte SHR-rotter. Det var heller ikke signifikante forskjeller i HVA/dopamin-ratio eller i 5-HIAA/serotonin-ratio mellom de to gruppene. For begge ratioene var det imidlertid en tendens til lavere verdier hos eksponerte enn hos ueksponerte SHR-rotter.

Når det gjelder målingene av monoaminer i striatum, bør det generelt understrekes at det var stor spredning i målingene innad i hver gruppe. Dette førte blant annet til at forskjeller mellom grupper som kunne synes signifikante ved grafisk fremstilling av dataene, likevel ikke ble funnet signifikante ved statistisk analyse. Hvis gruppestørrelsene hadde vært større, kunne kanskje noen av forskjellene ha blitt signifikante. Det er dessuten viktig å få til en ren disseksjon av striatum. Det er nemlig mye høyere konsentrasjoner av dopamin i denne hjernedelen enn i vev som ligger i umiddelbar nærhet omkring (Andén et al. 1966). Derfor kan unøyaktig disseksjon være en mulig årsak til den store spredningen i dopamin innad i hver gruppe av rotter. En annen mulig feilkilde er at det ble observert at monoaminene ble utsatt for en viss nedbrytning, til tross for at prøvene ble tilsatt antioksidant (askorbinsyre) og oppbevart ved -40 °C frem til de skulle analyseres. SHR- og WKY-dyr ble imidlertid behandlet parallelt, derfor bør ikke dette ha hatt særlig stor innvirkning på resultatene.

I en studie av SHR- og WKY-rotter, ble nivåer av ulike monoaminer undersøkt blant annet i neostriatum (Boix et al. 1998). Målingene ble foretatt ved hjelp av HPLC-analyse. Ubehandlete SHR-rotter hadde signifikant lavere HVA/dopamin-ratio og signifikant høyere 5-HIAA/serotonin-ratio enn ubehandlede WKY-rotter, for neostriatum. Det ble ikke funnet signifikante forskjeller i nivåene av dopamin, HVA, serotonin og 5-HIAA mellom SHR- og WKY-rotter. Denne studien støtter våre funn av at det ikke var signifikante forskjeller i nivåene av de nevnte monoaminene

mellom (ueksponerte/ubehandlede) SHR- og WKY-rotter. Funnet av signifikant høyere 5-HIAA/serotonin-ratio hos SHR-rotter sammenlignet med WKY-rotter, er også i samsvar med våre resultater. Det er imidlertid ikke samsvar når det gjelder sammenligning av HVA/dopamin-ratio hos de to gruppene. Her fant Boix et al. (1998) signifikante forskjeller, noe vi ikke gjorde. Forskjellene gikk dessuten i motsatt retning, ved at vi fant en tendens til høyere ratio hos SHR-dyr enn hos WKY-dyr. Det gikk ikke klart frem av artikkelen nøyaktig hvor gamle rottene var da målingene ble foretatt, men de hadde nådd voksen alder. Våre dyr var 5 uker gamle da de ble undersøkt.

I en nylig publisert (Honma et al. 2009) studie ble nivåer av ulike neurotransmittere og metabolitter av disse studert hos rotteavkom, etter prenatal eksponering for PCB 153. Drektige Sprague-Dawley-hunner ble eksponert for PCB 153 daglig fra dag 10 til 16 av svangerskapet. Dosene var på 0 (kontroll), 16 og 64 mg/kg kroppsvekt. Avkommene ble delt inn i grupper, og ble avlivet henholdsvis 1, 3, 6 og 9 uker, og 1 år gamle. Neurotransmitternivåer ble målt ved hjelp av HPLC-analyse. Nivåer av dopamin, HVA, serotonin og 5-HIAA ble målt. Jeg vil bare gå inn på funnene hos rottene som var 6 og 9 uker gamle, siden disse la nærmest i alder i forhold til rottene i våre forsøk. 6 uker etter fødselen var HVA/dopamin-ratioen i striatum signifikant lavere hos de PCB 153-eksponerte rottene sammenlignet med kontrollrottene. 9 uker etter fødselen var HVA/dopamin-ratioen signifikant lavere i forhjerne og bakhjerne, og 5-HIAA/serotonin-ratioen var signifikant høyere i forhjerne hos de PCB-eksponerte rottene, sammenlignet med kontrollrottene. 5-HIAA-nivåene var signifikant høyere i alle hjerneområdene som ble studert (forhjerne, bakhjerne, medulla oblongata og cerebellum), hos de PCB-eksponerte rottene, sammenlignet med kontrollrottene. Disse studiene tyder på at PCB-eksponering kan endre vevsnivåene av monoaminer i hjernen. I motsetning til hva disse forskerne fant, ble det ikke funnet signifikante forskjeller i HVA/dopamin-ratio i striatum mellom ueksponerte og eksponerte rotter i våre studier. Årsaken til at det ble funnet ulike resultater når det gjaldt 5-HIAA-nivåer og 5-HIAA/serotonin-ratio, kan ha vært at ulike hjernedeler ble undersøkt i studiene til Honma et al. (2009) sammenlignet med

våre studier. Rottene her ble eksponert for PCB 153 før fødselen, til forskjell fra rottene i våre forsøk, som ble eksponert for PCB etter at de var født. Det er også vanskelig å sammenligne PCB-doser siden det var mødrene og ikke avkommene som ble direkte eksponert for PCB i denne studien, men dosene må kunne sies å være høye her. Forskerne benyttet dessuten Sprague-Dawley-rotter, men disse skal i likhet med WKY-rotter fungere som kontrollrotter.

Seegal og medarbeidere (2002) undersøkte nivåer av dopamin i striatum hos PCB-eksponerte Sprague-Dawley-rotter. En kommersiell PCB-blanding (Aroclor 1254) ble benyttet, og dyrene ble eksponert i voksen alder (de var cirka 12 uker gamle ved første eksponering). Dosen var på 25 mg/kg/dag, og eksponeringen skjedde hver dag i 3 dager, eller 1, 2 eller 8 uker. Det ble foretatt *in vivo*-mikrodialyse for å bestemme ekstraneuronale konsentrasjoner av dopamin. I tillegg ble vevskonsentrasjoner av dopamin i striatum bestemt post mortem. Det ble funnet at Aroclor 1254 ga en signifikant endring i ekstraneuronale dopaminkonsentrasjoner: Etter 3 dagers eksponering for Aroclor 1254, var dopaminkonsentrasjonene økt, men etter lengre perioder med eksponering (1 uke eller mer), var dopaminnivåene redusert sammenlignet med kontrolldyrene. Vevskonsentrasjoner av dopamin ble imidlertid ikke endret som følge av Aroclor 1254-eksponeringen. Denne studien ser ut til å støtte våre resultater, ved at det ikke ble funnet signifikante forskjeller i vevskonsentrasjoner av dopamin i striatum mellom PCB-eksponerte og ueksponerte rotter. Resultatene peker på at PCB kan gi forstyrrelser i dopaminsignaler (gjennom funnene av endrete ekstraneuronale dopaminkonsentrasjoner) uten at man nødvendigvis finner at vevskonsentrasjonene av dopamin har blitt endret. Det må understrekes at disse dyrene var voksne både da PCB-eksponeringen skjedde og da målingene ble foretatt, til forskjell fra dyrene i våre studier. Disse forskerne benyttet dessuten en blanding av ulike PCB-kongenerer (Aroclor 1254), mens vi undersøkte effekten av én enkelt PCB-kongener (PCB 153). Også her ble Sprague-Dawley-rotter benyttet i forsøkene, i motsetning til WKY-rotter, som vi brukte.

4.3 Oppsummering

I denne oppgaven ble det funnet signifikant lavere nivåer av $\alpha_4\beta_2$ -nikotinreseptorer i cerebrum og hippocampus hos SHR-rotter sammenlignet med både WKY- (kontrolldyr) og ADD-rotter. Det ble også funnet signifikant lavere nivåer av α_7 -nikotinreseptorer i cerebrum hos SHR sammenlignet med WKY og ADD, men ikke i hippocampus. Funnet av lavere nivåer av nikotinreseptorer hos SHR kan være en mulig medvirkende årsak til hyperaktiviteten som observeres hos SHR-dyrene i atferdsforsøk, men som ikke sees i samme grad hos de to andre dyremodellene (se kapittel 1.3.4). Kolinerge baner spiller en viktig rolle blant annet når det gjelder motorisk kontroll og læring og hukommelse (se kapittel 1.1.3).

ADD-rotter var kun signifikant forskjellige fra kontrolldyrene (WKY) når det gjaldt nivåer av nikotinreseptorer av α_7 -subtypen i cerebrum – ADD var signifikant høyere enn WKY. Det er overraskende å finne høyere nivåer hos ADD, som er mindre oppmerksomme enn WKY, på bakgrunn av at acetylkolinnivåer i hjernen er beskrevet å være knyttet til oppmerksomhet (økt oppmerksomhet ved høyere nivåer) (Hasselmo og McGaughy 2004). En mulig hypotese som kan forklare oppgangen i nikotinreseptorer hos disse rottene, kan være at nikotinreseptorene er oppregulert som følge av lave nivåer av acetylkolin. Det ble imidlertid ikke målt acetylkolinnivåer i denne studien. Denne oppgaven avdekket ingen signifikante forskjeller i nivåer av glutamatreseptorer av NMDA-typen mellom WKY-, ADD- og SHR-rotter, verken i cerebrum eller i hippocampus.

Ved sammenligning av monoaminnivåer i striatum hos SHR- og WKY-rotter, ble det funnet signifikant høyere 5-HIAA/serotonin-ratio hos ueksponerte SHR sammenlignet med ueksponerte WKY, noe som kan tyde på høyere serotoninturnover i striatum hos SHR-rottene. Det var i tillegg en tendens til lavere dopaminnivåer hos SHR sammenlignet med WKY, men denne forskjellen var ikke signifikant. Det ble ikke funnet signifikante forskjeller mellom PCB 153-eksponerte og ueksponerte WKY-rotter når det gjaldt monoaminnivåer eller metabolitt/monoamin-ratioer i striatum. Det var imidlertid en tendens til høyere dopaminnivåer hos de PCB 153-

eksponerte rottene sammenlignet med kontrollrottene. Ved sammenligning av PCB 153-eksponerte og ueksponerte SHR-rotter ble det heller ikke funnet signifikante forskjeller i monoaminnivåer eller metabolitt/monoamin-ratioer i striatum. Her var det en tendens til høyere dopaminnivåer hos PCB 153-eksponerte sammenlignet med ueksponerte SHR.

4.4 Forslag til videre arbeid

I denne oppgaven har vi utført ulike nevrokjemiske undersøkelser av to dyremodeller for ADHD. Det ble funnet interessante forskjeller i nikotinreseptornivåer i SHR- og ADD-dyr sammenlignet med kontrolldyr. I tillegg ble det funnet tendenser til forskjeller i monoaminnivåer hos SHR sammenlignet med kontroll, og også etter eksponering for PCB. For å kunne si noe mer sikkert om den eventuelle sammenhengen mellom disse observasjonene og utvikling av ADHD, bør følgende studier utføres:

- Måle acetylkolinnivåer.
- Utføre molekylære studier av nikotinreseptorer.
- Måle nikotinreseptorer i flere områder av hjernen.
- Måle flere nikotinreseptor-subenheter.
- Undersøke signalmolekyler nedstrøms for nikotinreseptorene.
- Utføre monoaminmålinger på større utvalg av rotter, for å se om tendensene til forskjeller er reelle forskjeller.

Studier av proteinnivåer av dopamintransportører i plasmamembraner og vesikler i de ulike ADHD-modellene pågår for tiden i vårt laboratorium.

Kildeliste

- Alexander, G. E., M. R. DeLong og P. L. Strick (1986). "Parallel organization of functionally segregated circuits linking basal ganglia and cortex." Annual Review of Neuroscience **9**: 357-81.
- Amenta, F., M. A. Di Tullio og D. Tomassoni (2003). "Arterial hypertension and brain damage--evidence from animal models (review)." Clinical & Experimental Hypertension **25**(6): 359-80.
- American Psychiatric Association (2000). Diagnostic and statistical manual of mental disorders: DSM-IV-TR. Washington, DC.
- Andén, N.-E., K. Fuxe, B. Hamberger og T. Hökfelt (1966). "A quantitative study on the nigro-neostriatal dopamine neuron system in the rat." Acta Physiologica Scandinavica **67**(3): 306-12.
- Banerjee, T. D., F. Middleton og S. V. Faraone (2007). "Environmental risk factors for attention-deficit hyperactivity disorder." Acta Paediatrica **96**(9): 1269-74.
- Bendel, P. og R. Eilam (1992). "Quantitation of ventricular size in normal and spontaneously hypertensive rats by magnetic resonance imaging." Brain Research **574**(1-2): 224-8.
- Berger, D. F. og T. Sagvolden (1998). "Sex differences in operant discrimination behaviour in an animal model of attention-deficit hyperactivity disorder." Behavioural Brain Research **94**(1): 73-82.
- Biederman, J. og S. V. Faraone (2005). "Attention-deficit hyperactivity disorder." Lancet **366**(9481): 237-48.
- Bjerregaard, P. (2005). Økotoksikologi. København, Gyldendal.
- Boix, F., S. W. Qiao, T. Kolpus og T. Sagvolden (1998). "Chronic L-deprenyl treatment alters brain monoamine levels and reduces impulsiveness in an animal model of Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder." Behavioural Brain Research **94**(1): 153-62.
- Bylund, D. B. og M. L. Toews (1993). "Radioligand binding methods: practical guide and tips." American Journal of Physiology **265**(5 Pt 1): L421-9.

-
- Castellanos, F. X., P. P. Lee, W. Sharp, N. O. Jeffries, D. K. Greenstein, L. S. Clasen, J. D. Blumenthal, R. S. James, C. L. Ebens, J. M. Walter, A. Zijdenbos, A. C. Evans, J. N. Giedd og J. L. Rapoport (2002). "Developmental trajectories of brain volume abnormalities in children and adolescents with attention-deficit/hyperactivity disorder." Journal of the American Medical Association **288**(14): 1740-8.
- Collipp, P. J., S. Y. Chen og S. Maitinsky (1983). "Manganese in infant formulas and learning disability." Annals of Nutrition & Metabolism **27**(6): 488-94.
- Davies, A. R., D. J. Hardick, I. S. Blagbrough, B. V. Potter, A. J. Wolstenholme, S. Wonnacott, A. R. Davies, D. J. Hardick, I. S. Blagbrough, B. V. Potter, A. J. Wolstenholme og S. Wonnacott (1999). "Characterisation of the binding of [3H]methyllycaconitine: a new radioligand for labelling alpha 7-type neuronal nicotinic acetylcholine receptors." Neuropharmacology **38**(5): 679-90.
- Dorval, K. M., K. G. Wigg, J. Crosbie, R. Tannock, J. L. Kennedy, A. Ickowicz, T. Pathare, M. Malone, R. Schachar og C. L. Barr (2007). "Association of the glutamate receptor subunit gene GRIN2B with attention-deficit/hyperactivity disorder." Genes, Brain and Behavior **6**(5): 444-52.
- Durston, S., N. T. Tottenham, K. M. Thomas, M. C. Davidson, I.-M. Eigsti, Y. Yang, A. M. Ulug og B. J. Casey (2003). "Differential patterns of striatal activation in young children with and without ADHD." Biological Psychiatry **53**(10): 871-8.
- Eriksson, P. og A. Fredriksson (1998). "Neurotoxic effects in adult mice neonatally exposed to 3,3',4,4'-pentachlorobiphenyl or 2,3,3',4'-pentachlorobiphenyl. Changes in brain nicotinic receptors and behaviour." Environmental Toxicology and Pharmacology **5**(1): 17-27.
- Eriksson, P., U. Lundkvist og A. Fredriksson (1991). "Neonatal exposure to 3,3',4,4'-tetrachlorobiphenyl: changes in spontaneous behaviour and cholinergic muscarinic receptors in the adult mouse." Toxicology **69**(1): 27-34.

-
- Faraone, S. V. og J. Biederman (2004). Neurobiology of attention deficit hyperactivity disorder. Neurobiology of mental illness. D. S. Charney og E. J. Nestler. New York, NY, Oxford University Press.
- Faraone, S. V., R. H. Perlis, A. E. Doyle, J. W. Smoller, J. J. Goralnick, M. A. Holmgren og P. Sklar (2005). "Molecular genetics of attention-deficit/hyperactivity disorder." Biological Psychiatry **57**(11): 1313-23.
- Ferrari, R., A. Frasoldati, G. Leo, C. Torri, I. Zini, L. F. Agnati og M. Zoli (1999). "Changes in nicotinic acetylcholine receptor subunit mRNAs and nicotinic binding in spontaneously hypertensive stroke prone rats." Neuroscience Letters **277**(3): 169-72.
- Ferster, C. B. og B. F. Skinner (1957). Schedules of Reinforcement. New York, Appleton-Century-Crofts.
- Gattu, M., J. R. Pauly, K. L. Boss, J. B. Summers og J. J. Buccafusco (1997). "Cognitive impairment in spontaneously hypertensive rats: role of central nicotinic receptors. I." Brain Research **771**(1): 89-103.
- Gotti, C., M. Moretti, A. Gaimarri, A. Zanardi, F. Clementi og M. Zoli (2007). "Heterogeneity and complexity of native brain nicotinic receptors." Biochemical Pharmacology **74**(8): 1102-11.
- Gotti, C., L. Riganti, S. Vailati og F. Clementi (2006). "Brain neuronal nicotinic receptors as new targets for drug discovery." Current Pharmaceutical Design **12**(4): 407-28.
- Greydanus, D. E., H. D. Pratt og D. R. Patel (2007). "Attention deficit hyperactivity disorder across the lifespan: the child, adolescent, and adult." Disease-A-Month **53**(2): 70-131.
- Harlan Laboratories. (2009). "Wistar Kyoto." Retrieved 28th April, 2009, from http://www.harlan.com/research_models_and_services/research_models_by_product_type/inbred_rats/wistar_kyoto.hl.
- Hartung, C. M., E. G. Willcutt, B. B. Lahey, W. E. Pelham, J. Loney, M. A. Stein og K. Keenan (2002). "Sex differences in young children who meet criteria for

-
- attention deficit hyperactivity disorder." Journal of Clinical Child & Adolescent Psychology **31**(4): 453-64.
- Hassel, B. og R. Dingledine (2006). Glutamate. Basic Neurochemistry: Molecular, Celular and Medical Aspects. G. J. Siegel, R. W. Albers, S. T. Brady og D. L. Price. Amsterdam, Elsevier.
- Hasselmo, M. E. og J. McGaughy (2004). "High acetylcholine levels set circuit dynamics for attention and encoding and low acetylcholine levels set dynamics for consolidation." Progress in Brain Research **145**: 207-31.
- Holene, E., I. Nafstad, J. U. Skaare og T. Sagvolden (1998). "Behavioural hyperactivity in rats following postnatal exposure to sub-toxic doses of polychlorinated biphenyl congeners 153 and 126." Behavioural Brain Research **94**(1): 213-24.
- Holz, R. W. og S. K. Fisher (2006). Synaptic Transmission and Cellular Signaling: An Overview. Basic Neurochemistry: Molecular, Celular and Medical Aspects. G. J. Siegel, R. W. Albers, S. T. Brady og D. L. Price. Amsterdam, Elsevier.
- Honma, T., M. Suda, M. Miyagawa, R. S. Wang, K. Kobayashi og S. Sekiguchi (2009). "Alteration of brain neurotransmitters in female rat offspring induced by prenatal administration of 16 and 64 mg/kg of 2,2',4,4',5,5'-hexachlorobiphenyl (PCB153)." Industrial Health **47**(1): 11-21.
- Huizink, A. C. og E. J. H. Mulder (2006). "Maternal smoking, drinking or cannabis use during pregnancy and neurobehavioral and cognitive functioning in human offspring." Neuroscience & Biobehavioral Reviews **30**(1): 24-41.
- Jensen, S. (1966). "Report of a new chemical hazard." New Scientist **32**: 612.
- Jensen, V., J. E. Rinholm, T. J. Johansen, T. Medin, J. Storm-Mathisen, T. Sagvolden, O. Hvalby og L. H. Bergersen (2009). "N-methyl-D-aspartate receptor subunit dysfunction at hippocampal glutamatergic synapses in an animal model of attention-deficit/hyperactivity disorder." Neuroscience **158**(1): 353-64.

-
- Kent, L., F. Middle, Z. Hawi, M. Fitzgerald, M. Gill, C. Feehan og N. Craddock (2001). "Nicotinic acetylcholine receptor alpha4 subunit gene polymorphism and attention deficit hyperactivity disorder." Psychiatric Genetics **11**(1): 37-40.
- Kuhar, M. J., K. Minneman og E. C. Muly (2006). Catecholamines. Basic Neurochemistry: Molecular, Celular and Medical Aspects. G. J. Siegel, R. W. Albers, S. T. Brady og D. L. Price. Amsterdam, Elsevier.
- Lee, M. J., C. R. Breese, M. L. Strook og S. Leonard (2001). "The effect of nicotine and haloperidol co-treatment on nicotinic receptor levels in the rat brain." Molecular Brain Research **86**(1-2): 115-24.
- Lehohla, M., L. Kellaway og V. A. Russell (2004). "NMDA receptor function in the prefrontal cortex of a rat model for attention-deficit hyperactivity disorder." Metabolic Brain Disease **19**(1-2): 35-42.
- Li, D., P. C. Sham, M. J. Owen og L. He (2006). "Meta-analysis shows significant association between dopamine system genes and attention deficit hyperactivity disorder (ADHD)." Human Molecular Genetics **15**(14): 2276-84.
- Lou, H. C. (1996). "Etiology and pathogenesis of attention-deficit hyperactivity disorder (ADHD): significance of prematurity and perinatal hypoxic-haemodynamic encephalopathy." Acta Paediatrica **85**(11): 1266-71.
- Marcil, J., C. Thibault og M. B. Anand-Srivastava (1997). "Enhanced expression of Gi-protein precedes the development of blood pressure in spontaneously hypertensive rats." Journal of Molecular & Cellular Cardiology **29**(3): 1009-22.
- Mariussen, E., F. Fonnum, E. Mariussen og F. Fonnum (2006). "Neurochemical targets and behavioral effects of organohalogen compounds: an update." Critical Reviews in Toxicology **36**(3): 253-89.
- Mariussen, E., J. Mørch Andersen og F. Fonnum (1999). "The effect of polychlorinated biphenyls on the uptake of dopamine and other neurotransmitters into rat brain synaptic vesicles." Toxicology & Applied Pharmacology **161**(3): 274-82.

-
- Mick, E. og S. V. Faraone (2008). "Genetics of attention deficit hyperactivity disorder." Child & Adolescent Psychiatric Clinics of North America **17**(2): 261-84.
- Mill, J., T. Sagvolden og P. Asherson (2005). "Sequence analysis of Drd2, Drd4, and Dat1 in SHR and WKY rat strains." Behavioral and Brain Functions **1**: 24.
- Needleman, H. L. (1982). "Lead and impaired abilities." Developmental Medicine & Child Neurology **24**(2): 196-8.
- Pedersen-Bjergaard, S. og K. E. Rasmussen (2004). Legemiddelanalyse. Bergen, Fagbokforlaget.
- Polanczyk, G., M. S. de Lima, B. L. Horta, J. Biederman og L. A. Rohde (2007). "The worldwide prevalence of ADHD: a systematic review and metaregression analysis." American Journal of Psychiatry **164**(6): 942-8.
- Potter, A. S., P. A. Newhouse og D. J. Bucci (2006). "Central nicotinic cholinergic systems: a role in the cognitive dysfunction in attention-deficit/hyperactivity disorder?" Behavioural Brain Research **175**(2): 201-11.
- Rappley, M. D. (2005). "Clinical practice. Attention deficit-hyperactivity disorder." New England Journal of Medicine **352**(2): 165-73.
- Rice, D. C. (2000). "Parallels between attention deficit hyperactivity disorder and behavioral deficits produced by neurotoxic exposure in monkeys." Environmental Health Perspectives **108 Suppl 3**: 405-8.
- Russell, V. A. (2003). "Dopamine hypofunction possibly results from a defect in glutamate-stimulated release of dopamine in the nucleus accumbens shell of a rat model for attention deficit hyperactivity disorder--the spontaneously hypertensive rat." Neuroscience & Biobehavioral Reviews **27**(7): 671-82.
- Sagvolden, T. (2000). "Behavioral validation of the spontaneously hypertensive rat (SHR) as an animal model of attention-deficit/hyperactivity disorder (AD/HD)." Neuroscience & Biobehavioral Reviews **24**(1): 31-9.
- Sagvolden, T., T. Dasbanerjee, Y. Zhang-James, F. Middleton og S. Faraone (2008). "Behavioral and genetic evidence for a novel animal model of Attention-

Deficit/Hyperactivity Disorder Predominantly Inattentive Subtype."

Behavioral and Brain Functions **4**: 56.

Sagvolden, T., V. A. Russell, H. Aase, E. B. Johansen og M. Farshbaf (2005).

"Rodent models of attention-deficit/hyperactivity disorder." Biological Psychiatry **57**(11): 1239-47.

Schantz, S. L., J. J. Widholm og D. C. Rice (2003). "Effects of PCB exposure on neuropsychological function in children." Environmental Health Perspectives **111**(3): 357-576.

Seegal, R. F., R. J. Okoniewski, K. O. Brosch og J. C. Bemis (2002).

"Polychlorinated biphenyls alter extraneuronal but not tissue dopamine concentrations in adult rat striatum: an in vivo microdialysis study." Environmental Health Perspectives **110**(11): 1113-7.

Seidman, L. J., E. M. Valera og G. Bush (2004). "Brain function and structure in adults with attention-deficit/hyperactivity disorder." Psychiatric Clinics of North America **27**(2): 323-47.

Shaywitz, S. E., D. J. Cohen og B. A. Shaywitz (1978). "The biochemical basis of minimal brain dysfunction." Journal of Pediatrics **92**(2): 179-87.

Smith, P. K., R. I. Krohn, G. T. Hermanson, A. K. Mallia, F. H. Gartner, M. D.

Provenzano, E. K. Fujimoto, N. M. Goeke, B. J. Olson og D. C. Klenk (1985). "Measurement of protein using bicinchoninic acid." Analytical Biochemistry **150**(1): 76-85.

Snyder, G. L., A. A. Fienberg, R. L. Huganir og P. Greengard (1998). "A dopamine/D1 receptor/protein kinase A/dopamine- and cAMP-regulated phosphoprotein (Mr 32 kDa)/protein phosphatase-1 pathway regulates dephosphorylation of the NMDA receptor." Journal of Neuroscience **18**(24): 10297-303.

Sosial- og helsedirektoratet (2006). ICD-10: den internasjonale statistiske klassifikasjonen av sykdommer og beslektede helseproblemer: systematisk del, alfabetisk indeks, opplæring. Oslo.

-
- Sosial- og helsedirektoratet (2007). Veileder i diagnostikk og behandling av AD/HD (IS-1244). Oslo.
- Taylor, P. og J. H. Brown (2006). Acetylcholine. Basic Neurochemistry: Molecular, Celular and Medical Aspects. G. J. Siegel, R. W. Albers, S. T. Brady og D. L. Price. Amsterdam, Elsevier.
- Todd, R. D., E. A. Lobos, L. W. Sun og R. J. Neuman (2003). "Mutational analysis of the nicotinic acetylcholine receptor alpha 4 subunit gene in attention deficit/hyperactivity disorder: evidence for association of an intronic polymorphism with attention problems." Molecular Psychiatry **8**(1): 103-8.
- Turic, D., K. Langley, S. Mills, M. Stephens, D. Lawson, C. Govan, N. Williams, M. Van Den Bree, N. Craddock, L. Kent, M. Owen, M. O'Donovan og A. Thapar (2004). "Follow-up of genetic linkage findings on chromosome 16p13: evidence of association of N-methyl-D aspartate glutamate receptor 2A gene polymorphism with ADHD." Molecular Psychiatry **9**(2): 169-73.
- U.S. EPA (2001). Water quality for the protection of human health: Methylmercury. Washington, DC.
- Volkow, N. D. og J. M. Swanson (2003). "Variables that affect the clinical use and abuse of methylphenidate in the treatment of ADHD." American Journal of Psychiatry **160**(11): 1909-18.
- Volkow, N. D., G. J. Wang, J. S. Fowler, S. J. Gatley, J. Logan, Y. S. Ding, R. Hitzemann og N. Pappas (1998). "Dopamine transporter occupancies in the human brain induced by therapeutic doses of oral methylphenidate." American Journal of Psychiatry **155**(10): 1325-31.
- Wasserman, R. C., K. J. Kelleher, A. Bocian, A. Baker, G. E. Childs, F. Indacochea, C. Stulp og W. P. Gardner (1999). "Identification of attentional and hyperactivity problems in primary care: a report from pediatric research in office settings and the ambulatory sentinel practice network." Pediatrics **103**(3): E38.
- Wikipedia. (2009). "Polychlorinated biphenyl." Retrieved 3rd May, 2009, from http://en.wikipedia.org/wiki/Polychlorinated_biphenyl.

-
- Wilens, T. E. (2006). "Mechanism of action of agents used in attention-deficit/hyperactivity disorder." Journal of Clinical Psychiatry **67 Suppl 8**: 32-8.
- Wilens, T. E., J. Biederman, T. J. Spencer, J. Bostic, J. Prince, M. C. Monuteaux, J. Soriano, C. Fine, A. Abrams, M. Rater og D. Polisner (1999). "A pilot controlled clinical trial of ABT-418, a cholinergic agonist, in the treatment of adults with attention deficit hyperactivity disorder." American Journal of Psychiatry **156**(12): 1931-7.
- Wilens, T. E., M. H. Verlinden, L. A. Adler, P. J. Wozniak og S. A. West (2006). "ABT-089, a neuronal nicotinic receptor partial agonist, for the treatment of attention-deficit/hyperactivity disorder in adults: results of a pilot study." Biological Psychiatry **59**(11): 1065-70.
- Yao, S. T. og A. J. Lawrence (2005). "A comparative autoradiographic study of the density of [3H]SR95531, [3H]MK-801 and [3H]cGMP binding in the locus coeruleus and central pontine grey of spontaneously hypertensive and Wistar-Kyoto rats." Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology **371**(5): 434-9.
- Young, A. B. og G. E. Fagg (1990). "Excitatory amino acid receptors in the brain: membrane binding and receptor autoradiographic approaches." Trends in Pharmacological Sciences **11**(3): 126-33.

Appendiks

Bufferløsninger brukt i oppgaven

PBS-buffer, 25 mM, pH 7.4, 1 l

Stoff	Mengde	Fremgangsmåte
Na ₂ HPO ₄	3.56 g	Løs stoffene i cirka 0.9 l destillert vann. Justér pH til 7.4 med HCl eller NaOH hvis nødvendig. Tilsett destillert vann til et totalvolum på 1 l.
KH ₂ PO ₄	0.68 g	
NaCl	8.77 g	
BSA (96%)	1.04 g	

TRIS-HCl-buffer, 50 mM, pH 7.4, 1 l

Stoff	Mengde	Fremgangsmåte
TRI S	6.06 g	Løs stoffene i cirka 0.9 l destillert vann. Justér pH til 7.4 med HCl. Tilsett destillert vann til et totalvolum på 1 l.

TRIS/HEPES-buffer, 4.5/5.0 mM, pH 7.4, 1 l

Stoff	Mengde	Fremgangsmåte
TRIS	0.55 g	Løs stoffene i cirka 0.9 l destillert vann. Justér pH til 7.4 med

HEPE S	1.19 g	KOH. Tilsett destillert vann til et totalvolum på 1 l.
-----------	--------	--