

3 Material und Methoden

Das Ziel der vorliegenden Arbeit ist, zu untersuchen, ob in Anlehnung an die Versuchsanordnung von WOLFFGRAMM (1990) und WOLFFGRAMM und HEYNE (1992, 1995) sowie HEYNE (1996) eine Verhaltensabhängigkeit bei Ratten auf Alkohol bzw. Etonitazen durch Präsentation der Suchtstoffe in süßen Flüssigkeiten zu induzieren ist.

3.1 Versuchstiere

Für die Versuche wurden insgesamt 54 männliche Wistarratten aus der Versuchstierzucht des Bundesinstituts für gesundheitlichen Verbraucherschutz und Veterinärmedizin verwendet. 18 Tiere wurden zunächst im Vorversuch eingesetzt. Zu Beginn der Versuchsreihen hatten alle Tiere ein Gewicht von 80-100 g.

Gruppeneinteilung

Die Gruppeneinteilung wurde folgendermaßen vorgenommen:

Die Tiere wurden nummeriert und mit B1-B54 benannt, wobei die Tiere des Vorversuches Tier B1- Tier B18 darstellen. Sie wurden dann in neun Gruppen zu je sechs Ratten eingeteilt (Gruppe 1 = B1-B6, Gruppe 2 = B7-B12, etc.). Die Gruppen 1-3 wurden dem Versuch 1, die Gruppen 4-5 dem Versuch 2 und die Gruppen 6-7 dem Versuch 3 zugeordnet.

Die Gruppen 8-9 dienten für den Fall einer entwickelten Verhaltensabhängigkeit als Kontrolltiere bei der Untersuchung biochemischer Parameter im Gehirn.

Haltung

Die Versuchsreihen an den Ratten fanden in der Forschungseinrichtung für experimentelle Medizin (FEM) des Universitätsklinikums Benjamin Franklin (UKBF) der Freien Universität Berlin statt.

Die Ratten wurden einzeln in standardisierten Makrolonkäfigen Typ IV mit entstaubtem Holzgranulat der Firma Altromin bei einer Raumtemperatur von 20-22°C, einer Luftfeuchtigkeit von 50-60% und einem zwölfstündigen Hell-Dunkel-Wechsel gehalten. Ihnen standen standardisiertes Futtermittel (Altromin 1324) und Wasser ad libitum zur Verfügung. Zusätzlich wurde ihnen nach einem speziellen Angebotsschema Erdbeersiruplösung oder Zuckerrwasser mit Alkohol bzw. Opioid angeboten.

Die Flüssigkeiten und das Wasser wurden alle in 300ml - Richterflaschen mit entsprechenden Metallnippeln dargeboten.

Die äußeren Bedingungen, das Pflegepersonal, Störzeiten und das „Handling“ waren während des gesamten Versuchsverlaufs gleich.

3.2 Versuchsbeschreibung und - planung

Vorversuch

In einem Vorversuch wurden den Tieren verschiedene süße Flüssigkeiten angeboten, um eine Vorliebe für eine bestimmte Geschmacksrichtung festzustellen. Zur Verfügung standen ihnen Apfelsaft, schwarzer Johannisbeersaft, Maracujasaft, Orangensaft, Traubensaft, Multivitamin-saft, Saccharinlösung, Zitronensiruplösung und Erdbeersiruplösung.

Der jeweilige Konsum der Säfte wurde gemessen und miteinander verglichen. Die süßen Flüssigkeiten mit der höchsten Akzeptanz (Erdbeersiruplösung und Zuckerlösung) wurden in den drei Hauptversuchen verwendet. Auf eine statistische Auswertung wurde verzichtet.

Allgemeine Versuchsanordnung

Alle Versuche haben zusammengefasst die Genehmigungsnummer G 0069 / 99

Die drei Versuche wurden auf ca. 10-15 Monate angelegt.

Bevor die Tiere in den Versuch integriert wurden, durchliefen sie eine vier- bis fünfwöchige Eingewöhnungsphase, Anschließend bekamen sie jeweils 2 oder 3 Flaschen mit Flüssigkeiten angeboten: ein oder zwei Test-Flaschen mit Alkohol oder Opioid in verschiedenen Konzentrationen in süßer Flüssigkeit sowie eine Flasche mit Wasser. Die Flaschen lagen je nach Gruppe unterschiedlich rechts oder links im Käfig. Damit wurde einer eventuell vorhandenen Prägung durch den Züchter auf eine bestimmte Position Rechnung getragen. Das Futter befand sich auf der entsprechenden anderen Seite durch einen Aluminiumteiler von den Flaschen getrennt.

Die Test-Flaschen standen nur der dritten Gruppe kontinuierlich zur Verfügung. Bei den restlichen acht Gruppen wurden diese Flaschen in einem alle 24 Stunden alternierenden Intervall angeboten: Das bedeutet, dass die Testlösungen für 24 Stunden in den Käfig gestellt wurden, dann für 24 Stunden wieder entnommen wurden. An den Wochenenden wurden die Flaschen

im zweiwöchentlichen Wechsel entweder für die drei Tage belassen oder entzogen. Im Endeffekt stand den Tieren der Suchtstoff somit in einer Woche fünf Tage, in der nächsten Woche drei Tage zur Verfügung.

Einmal wöchentlich wurden als Parameter das Gewicht der Ratten, der Futter-, Wasser-verbrauch sowie die Aufnahme an Test-Flüssigkeit mittels einer elektronischen Waage mit einer Genauigkeit von 1/10 g erhoben.

Die Messungen, das Präsentieren bzw. Entnehmen der Testflaschen sowie das Reinigen der Käfige fanden jeweils vormittags gegen 10 Uhr statt.

Kontrolltests

- Quinin-Test

Die Test-Flüssigkeiten mit dem Suchtstoff wurden mit 1 g/l Quininhydrochlorid vergällt und den Tieren für einen, drei oder sieben Tage angeboten. Die Flüssigkeitsaufnahme wurde registriert und im Verhältnis zu den anderen Werten ohne Quinin beurteilt.

- Positiv - Test

Bei diesem Test stand den Tieren eine zusätzliche Flasche mit je nach Gruppe Erdbeersiruplösung bzw. Zuckerwasser ohne Alkohol / ETZ zur Verfügung. Die Aufnahme der Alkohol- / ETZ-Lösungen währenddessen wurden gemessen und im Verhältnis zu den Werten vor dem Kontrolltest beurteilt.

Verwendete Flüssigkeiten, Alkohol / Opiat, Materialien

Den Tieren wurde je nach Gruppe Ethanol bzw. das Opiat Etonitazen (ETZ) in Erdbeersiruplösung oder in Zuckerwasser angeboten (Tab. 1).

Für die Erdbeersiruplösung wurde Erdbeersirup der Marke „göbber“ verwendet und im Verhältnis 1: 5 mit Leitungswasser gemischt.

Für die Zuckerlösung wurde einfacher Haushaltszucker im Verhältnis 1: 10 in Leitungswasser gelöst.

Der verwendete Alkohol ist 96%iges Ethanol, bezogen aus der Hausapotheke des UKBF, das in verschiedenen Volumenprozenten zu den Lösungen gemischt wurde.

Das verwendete Opioid ist der μ -Agonist Etonitazen, bezogen von der Firma Novartis (Schweiz). Das ETZ lag als Pulver vor. Es wurde in verschiedenen Dosierungen (s. Versuchsplan Tab. 4) in der Testflüssigkeit gelöst.

Gruppe	Verwendete süße Flüssigkeit	Anzahl der Flaschen	Angebotene Droge	Angebotsschema der Droge
1	Erdbeersirup	3	Alkohol 5%ig, 15%ig sowie Wasser	24h alternierend
2	Zuckerlösung	3	Alkohol 5%ig, 15%ig sowie Wasser	24h alternierend
3	Erdbeersirup	3	Alkohol 5%ig, 15%ig sowie Wasser	kontinuierlich
4	Zuckerlösung	2	Alkohol 20%ig, später 30%ig sowie Wasser	24h alternierend
5	Erdbeersirup	2	Alkohol 20%ig, später 30%ig sowie Wasser	24h alternierend
6	Zuckerlösung	3	ETZ sowie Wasser	24h alternierend
7	Erdbeersirup	3	ETZ sowie Wasser	24h alternierend
8	Zuckerlösung	2	Kontrolle ohne Alkohol/ETZ sowie Wasser	24h alternierend
9	Erdbeersirup	2	Kontrolle ohne Alkohol/ETZ sowie Wasser	24h alternierend

Tabelle 1: Einteilung der Gruppen

Versuch 1 (Gruppe 1-3)

Die Ratten bekamen neben Wasser Alkohol in zwei verschiedenen Konzentrationen in süßen Flüssigkeiten angeboten. Gruppe 1 und 2 bekamen die Testlösungen in einem 24stündigen Intervall angeboten. Bei Gruppe 3 standen die Testlösungen kontinuierlich zur Verfügung.

Versuchs- woche	Alkoholkonzentration in %	Verwendete Lösung für die Testflüssigkeit	Kontrolltest (Dauer)
1–12	7%	Erdbeer / Zucker	
13–16	5% + 15%	Erdbeer / Zucker	
16	5% + 15%	Erdbeer / Zucker	Quinin (1 Tag)
17–19	5% + 15%	Erdbeer / Zucker	
19	5% + 15%	Erdbeer / Zucker	Positivtest (3 Tage)
20–22	5% + 15%	Erdbeer / Zucker	
22	5% + 15%	Erdbeer / Zucker	Quinin (1 Tag)
23-25	5% + 15%	Erdbeer / Zucker	
25	5% + 15%	Erdbeer / Zucker	Positivtest (3 Tage)
26–33	5% + 15%	Erdbeer / Zucker	
33	5% + 15%	Erdbeer / Zucker	Quinin (1 Tag)
34-46	5% + 15%	Erdbeer / Zucker	
46-51	5% + 15%	Wasser	
52-53	5% + 15%	Wasser	Quinin (2 Wochen)
54-55	5% + 15%	Wasser	
56-57	5% + 15%	Wasser	Positivtest (2 Wochen)
58	5% + 15%	Erdbeer / Zucker	

Tabelle 2: Versuchsplan / Versuch 1

Versuch 2 (Gruppe 4 und 5)

WOLFFGRAMM (1990) stellte fest, dass Ratten in Isolationshaltung eine Vorliebe für 20%ige Alkohollösungen zeigten. Den Tieren dieses Versuchs standen daher nach einer Eingewöhnungsphase von vier Wochen eine Flasche mit Testlösung mit 20%iger Alkoholkonzentration zur Verfügung, in den letzten Wochen wurde die Konzentration auf 30% gesteigert.

Versuchs- woche	Alkoholkonzentration in %	Verwendete Lösung für die Testflüssigkeit	Kontrolltest (Dauer)
1-4	Kein Alkohol	Erdbeer / Zucker	
5-15	20%	Erdbeer / Zucker	
15	20%	Erdbeer / Zucker	Quinin (1 Tag)
16-21	20%	Erdbeer / Zucker	
22	20%	Erdbeer / Zucker	Positivtest (7 Tage)
23-29	20%	Erdbeer / Zucker	
30-32	20%	Erdbeer / Zucker (½ Konz.)	
33-35	20%	Wasser	
36-37	30%	Wasser	
38-39	30%	Wasser	Quinin (2 Wochen)
40-41	30%	Wasser	
42-43	30%	Wasser	Positivtest (2 Wochen)
44	30%	Erdbeer / Zucker	

Tabelle 3: Versuchsplan / Versuch 2

Die Kontrollgruppen (Gruppe 8 und 9) wurden analog behandelt, allerdings stand ihnen nur die entsprechende Lösung ohne Alkohol zur Verfügung.

Eine Ratte der Zucker-Kontrollgruppe musste aufgrund einer nicht heilenden Verletzung getötet werden.

Versuch 3 (Gruppe 6 und 7)

Bei diesem Versuch wurde den Ratten nach einer Eingewöhnungsphase ab der fünften Woche Etonitazen angeboten. Die Dosierung des ETZ wurde niedrig begonnen und langsam gesteigert, da vorherige Versuche ergeben haben, dass ETZ in veröffentlichten Konzentrationen (HEYNE 1996) stark toxisch sein kann. In der 14. Woche wurde die ETZ-Gabe einmalig aufgrund des schlechten Allgemeinzustandes der Tiere unterbrochen. In den Wochen 25-28 fand ein Entzug statt. Die ETZ - Konzentrationen sind im Versuchsplan zusammengefasst.

Die Deckel der Flaschen mit ETZ wurden blau eingefärbt, um den Ratten eine Unterscheidungsmöglichkeit zu anderen Flaschen zu geben. Es wurde davon ausgegangen, dass der leicht bittere Geschmack von ETZ nicht so stark ist, dass die Ratten einen Unterschied zu der Positivtestlösung ohne Suchtstoff machen können.

Versuchs- woche	ETZ-Konzentration ($\mu\text{g} / \text{ml}$)	Verwendete Lösung für Testflüssigkeit	Kontrolltest (Dauer)
5-6	1	Erdbeer / Zucker	
7-8	2	Erdbeer / Zucker	
9-11	3	Erdbeer / Zucker	
12-13	4	Erdbeer / Zucker	
14	Kein ETZ	Keine	
15-16	4	Erdbeer / Zucker	
16	4	Erdbeer / Zucker	Quinin (1 Tag)
17	4	Erdbeer / Zucker	Positivtest (7 Tage)
18	5	Erdbeer / Zucker	
19	5	Erdbeer / Zucker	Quinin (3 Tage)
20	5	Erdbeer / Zucker	
21-22	6	Erdbeer / Zucker	
23	7	Erdbeer / Zucker	
24	3,5	Erdbeer / Zucker	
25-28	Kein ETZ	Erdbeer / Zucker	
29	4	Erdbeer / Zucker	
30	6	Erdbeer / Zucker	
31-32	8	Erdbeer / Zucker	
33-35	8	Wasser	
36-37	10	Wasser	Quinin (2 Wochen)
38-39	10	Wasser	
40-41	10	Wasser	Positivtest (2 Wochen)
42-43	10	Wasser	
44	10	Erdbeer / Zucker	

Tabelle 4: Versuchsplan / Versuch 3

3.3 Hypothesen zur Überprüfung einer Verhaltensabhängigkeit

In Anlehnung an die Versuche von WOLFFGRAMM (1991), WOLFFGRAMM und HEYNE (1995), HEYNE (1996) sowie SPANAGEL (2000) können für diese Arbeit folgende Hypothesen zum Entstehen einer Verhaltensabhängigkeit aufgestellt werden:

1. Bei freiwilliger Aufnahme des Suchstoffes kommt es ab der 25.-40. Versuchswoche zu einem Anstieg des Konsums.
2. Im Verlauf des Versuchs kommt es bei den Versuchstieren zu einem Kontrollverlust über die Aufnahme des Suchstoffes, d. h. auch verschiedene externe Stimuli haben keinerlei Einfluss mehr auf die Höhe und Art des Drogenkonsums.
3. Die Versuchstiere entwickeln ein höheres Verlangen nach dem Suchstoff, das auch nach Phasen der Abstinenz erhalten bleibt, zum Teil sogar gesteigert ist.

3.4 Datenerfassung

Die Daten wurden in Microsoft Excel (Version 2000) erfasst.

Es wurden einmal wöchentlich das Gewicht der Tiere, das eingewogene sowie das übrig gebliebene Futter, das eingewogene sowie das übrig gebliebene Wasser, die eingewogenen sowie die übrig gebliebenen Testlösungen gemessen. Daraus wurde der Futter-, Wasser- und Alkohol-/ ETZ-Verbrauch pro Tag sowie pro Tag und kg Körpergewicht berechnet.

3.5 Statistische Auswertung

Für die statistische Auswertung wurden mittels SPSS für Windows (Version 10.0) die Mittelwerte und deren Standardabweichungen der Alkohol- bzw. ETZ- Aufnahme berechnet. Die Mittelwerte wurden auf Kurvendiagrammen dargestellt. Zur besseren Übersicht sind der Median sowie die 25%- und 75%-Quartile der Werte aus den Wochen mit unveränderten Versuchsbedingungen mit Ausnahme der Kontrolltests als Bezugslinien in die Kurvendiagramme eingefügt worden. Bei Versuch 1 entspricht dies den Wochen 1-45, bei Versuch 2 den Wochen 1-30 und bei Versuch 3 den Wochen 1-33.

Die Auswertung der Ergebnisse beschränkt sich für die Darstellung der Entwicklungstendenzen auf die Beschreibung der Kurvendiagramme der Gruppen und auf den Vergleich von Mittelwerten. Besonderheiten bei Einzeltieren werden erwähnt.

Weitere statistische Vergleiche erscheinen nicht sinnvoll, da mögliche Signifikanzen als solche kein Kriterium für Verhaltensabhängigkeit darstellen. Als Beispiel sei genannt, dass eine

Steigerung der mittleren Trinkmenge von 2 g Alkohol/kg KGW/d in den Wochen 5-9 auf 2,2 g Alkohol/kg KGW/d in den Wochen 36-40 durchaus signifikant sein kann, aber aufgrund des geringen Anstieges nicht als Kriterium für Verhaltensabhängigkeit zu werten ist. Ein ebenfalls signifikanter Anstieg von 2 g Alkohol/kg KGW/d auf 10 g Alkohol/kg KGW/d in den gleichen Vergleichswochen dagegen würde durch die Höhe des Anstieges ein Kriterium der Sucht erfüllen.