

3. Methodik

Patienten

Das Gesamtkollektiv für die in dieser Arbeit inkludierten n=566 Patienten (368 männlich, 198 weiblich) mit einem Durchschnittsalter von 44.52 ± 10.32 Jahren wurde aus nicht blutsverwandten Alkoholabhängigen, die die operationalisierten Kriterien nach ICD-10 (Internationales Klassifikationssystem der WHO) und DSM-IV (Diagnostisch-statistisches Manual für psychiatrische Störungen) erfüllten und zur stationären Entgiftung in die Klinik für Psychiatrie und Psychotherapie Mainz aufgenommen wurden, rekrutiert. Der Schweregrad der Abhängigkeit war im Durchschnitt hoch bis sehr hoch, wobei körperliche Auswirkungen der Abhängigkeit (Leberzirrhose, Pankreatitis, Malignome etc.) nicht stark ausgeprägt waren. Ein Wernicke-Korsakoff-Syndrom war Ausschlussgrund.

Mit diesen Patienten wurde nach Einholung der schriftlichen Einverständniserklärung eine ausführliche Psychometrie durchgeführt und venöses Blut zum einen zur Untersuchung der Routineparameter und alkoholassoziierter Marker und zum anderen zur genetischen Sequenzierung abgenommen.

Für die in dieser Arbeit dargestellten Untersuchungen wurden dann jeweils Teilkollektive, für die die entsprechenden Daten vorlagen, ausgewählt.

Allgemeines Prozedere zur genetischen Untersuchung

Die Genotypisierung erfolgte, nachdem die genomische DNA aus venösem Gesamtblut extrahiert worden war, wobei das QIAmp Blutkit (von der Quiagen GmbH in Deutschland) verwendet wurde. Die DNA-Reinheit und Konzentration wurde über die optische Dichte (260 : 280) geprüft. Für die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) zum Detektieren der Taq I A-RFLP am DRD2-Locus wurde eine Methode angewandt, die von Grandy et al. 1993 beschrieben wurde. Eine 310 Basenpaar-Region um den Taq I A-Locus wurde durch die PCR amplifiziert. Die PCR-Reaktion wurde in einem 50 µl-Volumen, das einmal Taq-Polymerasepuffer, 200mmol Deoxynucleosidtriphosphate, 40pmol von jedem Primer, 1,5mmol Magnesiumchlorid, 1,5 Einheiten Taq-Polymerase und 100ng DNA, enthielt, durchgeführt. Nach einer initialen 5minütigen Denaturierung bei 94°C wurde der Mix nach folgendem Programm bearbeitet: 35 Zyklen bei 60 s (94°C), 60 s bei 59°C und 60 s bei 72°C mit einer finalen Extension für 5 min bei 72°C. Die Verdauung der PCR-Produkte wurde über Nacht mit

Taq I-Restriktionsenzymen vollendet. Die Verdauungsprodukte wurden in einem 1.8%igen Agarosegel visualisiert.

Apomorphin-Provokationstest

Apomorphin wurde mit intraindividuellen Placebokontrollen an zwei verschiedenen Tagen durchgeführt. Blut wurde von einer Venenverweilkanüle durch die sog. „through-the-wall“-Technik alle 15 min 3 Mal vor und 15 Mal nach Apomorphingabe (0,01 mg/kg Körpergewicht) oder Placebo abgenommen. Zwanzig abstinenten, alkoholabhängigen, männlichen Patienten, die frühestens 10 Tage nach der Detoxifikation untersucht wurden, wurden mit alters- und BMI-gematchten Kontrollen verglichen. Des Weiteren war der Raucherstatus, der ebenfalls einen Einfluss auf das dopaminerge System hat, gematcht.

Um 8.40 h wurde den Probanden ein venöser Zugang gelegt, der mit 0,9 %iger NaCl-Lösung (40 ml/h) offengehalten wurde. Ab 8.45 Uhr erfolgten viertelstündliche Blutentnahmen bis 12.15 Uhr, wobei nach der 3. Entnahme um 9.15 Uhr Placebo oder Apomorphin subkutan in der oben beschriebenen Dosierung von 0,01 mg/kg Körpergewicht, was tatsächlichen 27 – 36 I.E. entsprach, injiziert wurde. Die Blutproben wurden mit 125 I.E. Heparin versetzt und 10 min bei 1000 g zentrifugiert. Das abgetrennte Plasma wurde in Eppendorf-Gefäßen für jede Hormonbestimmung probenweise bei –20°C eingefroren. Immunenzymometrische Assays von Biochem (Freiburg, Deutschland) wurden zur Bestimmung von Prolaktin verwendet. Die Messungen erfolgten mit kleinen Modifikationen der Herstelleranweisung wie Halbierung der Proben und Reagenzienmengen und Verlängerung der Inkubationszeiten.

Der immunenzymometrische Assay für *Prolaktin* wurde mit 2 hochaffinen, monoklonalen Antikörpern und magnetischer Trennung über eine Festphase durchgeführt. Während der Inkubation der Proben mit dem Antikörperkonjugat entstand ein Antigen-Antikörper-Komplex durch Bindung an verschiedene Epitope des Hormonmoleküls. Einer dieser Antikörper war mit dem Enzym „alkalische Phosphatase“ konjugiert, der zweite mit einer Fluoresceingruppe, an welcher ein an magnetisierbare Partikel gebundener polyklonaler Anti-Fluorescein-Antikörper band. Dieser Komplex wurde unter Verwendung eines Magnetfelds sedimentiert. Nach Dekantieren und Waschen wurde das Enzymsubstrat Phenolphthaleinmonophosphat zugefügt, welches durch die gebundene alkalische Phosphatase gespalten wurde. Die Farbintensität des Phenolphthaleins war direkt proportional zur Konzentration des vorhandenen Antigens. Mit den Extinktionswerten der Standards ließ sich eine Standardkurve erstellen, aus der die Konzentrationen der Patientenproben und –kontrollen ermittelt wurde.

Die Bestimmung der *Cortisol*plasmakonzentrationen erfolgte mit einem Radioimmunoassay von Becton Dickinson GmbH (Heidelberg, Deutschland). Bei diesem Testverfahren handelte es sich um einen kompetitiven Ansatz auf der Grundlage einer Antigen-Antikörper-Reaktion. Das Plasmacortisol und das ¹²⁵Jod markierte Cortisol konkurrierten um die limitierten Cortisolantikörperbindungsstellen der beschichteten Röhrchen. Die Separation von freiem und gebundenem Antigen wurde durch das Dekantieren und Waschen erreicht. Die Menge an gebundenem, radioaktiv markiertem Cortisol war invers proportional zu der Konzentration des nicht-markierten Plasmacortisols. Die Bestimmung erfolgte gemäß Herstelleranweisung. Die mitgeführten Standardseren enthielten 0 – 1656 nmol/l Cortisol in Humanserum mit 0,1 % Natriumacid. Im Testansatz wurden je 25µl der Proben und je 500µl ¹²⁵Jodid markiertem Cortisol in die mit Cortisolantikörpern beschichteten Röhrchen pipettiert und gemischt. Für die Messung der Totalaktivität wurden je 500µl in 2 Plastikrundbodenröhrchen pipettiert. Anschließend wurden die Proben 45 min bei 37°C im Wasserbad inkubiert, dekantiert und mit 1ml demineralisiertem Wasser gewaschen. Das in den Röhrchen verbliebene radioaktive Cortisol wurde mit Hilfe eines Gammazintilationszählers gemessen. Die Erstellung der Standardkurve zur Ermittlung der unbekanntem Plasmaspiegel erfolgte durch logarithmische Transformation und gewichtete Regressionsanalyse. Bei unbefriedigender Kurvenanpassung wurde zusätzlich eine Regression der zweiten oder dritten Ordnung geprüft und die beste Anpassung gemäß statistischer Kriterien ausgewählt.

Zur Bestimmung der *Wachstumshormon*plasmaspiegel diente ein immunoradiometrischer Assay der Firma Medgenex Diagnostics GmbH (Fleuros, Belgien). Der Wachstumshormontestansatz beruhte auf einem Doppelantikörperansatz, bei dem verschiedene monoklonale Antikörper gegen unterschiedliche Epitope auf dem Wachstumshormonmolekül gerichtet waren. Die Innenseite der Röhrchen ist mit Antiwachstumshormonantikörpern beschichtet, die ein Epitop des Wachstumshormons in den zugesetzten Plasmaproben band. Die danach zugegebene zweite Antikörperfraktion, die ebenfalls mit ¹²⁵Jod markiert war, band an ein weiteres Epitop des Wachstumshormonmoleküls. Die nach dem Dekantieren und Waschen der Plastikröhrchen zurückgebliebene gebundene Radioaktivität war zur Wachstumshormonkonzentration in den Plasmaproben direkt proportional. Die Bestimmung erfolgte gemäß Herstelleranweisung, die mitgeführten Standardproben enthielten 0 – 120 µI.E./ml. Es wurden jeweils 50µl der Standards, Kontrollen und Plasmaproben mit je 50µl Tracer in die mit Wachstumshormonantikörper-beschichteten Röhrchen pipettiert. Außerdem wurde zur Bestimmung der Totalaktivität je 50µl Tracer in 2 Plastikröhrchen gegeben. Anschließend wurde der Ansatz vorsichtig geschüttelt und 2h bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Dekantieren und

Waschen der Röhren mit 3ml verdünntem Waschpuffer wurde die verbliebene Radioaktivität mit einem Gammazintilationszähler gemessen.

Psychometrie

Ein Beispiel für ein diagnostisches Interview zur Erfassung von Alkoholproblemen stellt der Addictions Severity Index (ASI) dar, für den eine validierte deutsche Version, wie oben erwähnt, mit akzeptablen psychometrischen Werten erhältlich ist [Scheurich et al., 2000].

Der MAST ist ein Selbstbeurteilungsfragebogen, der von Selzer 1971 entwickelt wurde, um Alkoholmissbrauch durch die Erhebung von Gesundheits- und sozialen Problemen, die mit exzessivem Alkoholkonsum assoziiert sind, zu erkennen. Die hohe Reliabilität und Validität dieses Instruments sind in verschiedenen Populationen bestätigt worden. In letzter Zeit richtete sich das Forschungsinteresse bezüglich der Diagnose „Alkoholabhängigkeit“ auf die Mehrdimensionalität der Items im DSM-IV, was jedoch zu einem nur geringen Interesse an der Mehrdimensionalität des MAST als weit verbreitetem Selbst-Rating-Screening-Instruments der Alkoholabhängigkeit führte.

Daher wurde in einem ersten Schritt ein Teil eine Faktorenanalyse der deutschen Version des MAST bei 204 Patienten mit Alkoholabhängigkeit oder –abusus nach DSM-IV durchgeführt. In einer Hauptkomponentenanalyse wurden zunächst sieben Faktoren nach dem Kaiserkriterium ($EW > 1$) extrahiert (Varianzaufklärung 56.2%, $h^2 > 0,31$). Auf den 2 varianzschwächsten Hauptkomponenten (EW 1.0 und 1.1) ergaben sich bedeutsame Ladungen ($> 0,35$) für lediglich 2 Items. Daher wurden, und um die Faktorenanalyse mit publizierten Ergebnissen der amerikanischen MAST-Originalversion vergleichbar zu machen, in einer nachfolgenden orthogonalen Varimax-Rotation die 5 varianzstärksten Hauptkomponenten verwendet. Es ergab sich eine weitgehende Einfachstruktur der 5 Faktoren (Varianzaufklärung 48,3 %, $h^2 > 0,30$). Diese Faktorenstruktur war interpretierbar, die Komponenten ließen sich als

1. Inanspruchnahme von Therapieangeboten,
2. antisoziales Verhalten,
3. Kontrollverlust,
4. Wahrnehmung des Alkoholproblems durch das soziale Umfeld und
5. Leberschaden

beschreiben.

Der MAST ist ein 24 Item-Fragebogen, um Alkoholmissbrauch durch die Messung von Problemen, die mit exzessivem Alkoholkonsum assoziiert sind, zu erkennen [Selzer, 1971,

Gibbs, 1983]. Der MAST-Test-Score korreliert mit den erfüllten Kriterien für Alkoholabhängigkeit gemäß DSM-III-R, wahrscheinlich auch DSM-IV [Magruder-Habid et al., 1993]. Dieser Testscore wird durch die Summation verschiedener Gewichtungen für die Einzelitems gebildet und erlaubt eine Klassifikation bei Patienten mit oder ohne Alkoholprobleme. Auch ohne einen spezifischen Cut-off ist der Testscore des MAST ein Index für den Schweregrad alkoholassoziierter Probleme des Patienten [Skinner, 1979]. Damit lässt sich unsere Absicht erklären, den oben beschriebenen Polymorphismus, der bezüglich des Erstmanifestationsalters mit den damit vergesellschafteten Problemen der Alkoholabhängigkeit nicht assoziiert ist, nochmal anhand des MAST zu testen. Der MAST wurde zunächst an stationär-behandelten Alkoholabhängigen, an für Vergehen, welche unter Alkoholeinfluss begangen worden waren, Inhaftierten, an Personen, die beantragt hatten, ihren Führerschein wieder zu erhalten und an Kontrollen validiert [Selzer, 1971].

Die ursprüngliche Validierungsgruppe bestand ausschließlich aus Männern, jedoch stammten diese aus verschiedenen Altersgruppen und klinischen sowie nicht-klinischen Populationen. Veröffentlichungen von Faktorenanalysen des MAST aus den Arbeitsgruppen um Zung und um Skinner, die jedoch bereits um 1980 erschienen sind, bildeten Ausnahmen von der Regel, dass die Mehrdimensionalität des MAST von einem nur geringen Interesse in den letzten Jahren begleitet war. Nach 1980 wurden nämlich keine weiteren Untersuchungen der Faktorenstruktur des MAST durchgeführt, insbesondere keine Faktorenanalyse für eine deutsche Version bis auf eine Ausnahme durch unsere Gruppe [Himmerich et al., 2002].

Außerdem fanden wir heraus, dass die Gesamtzahl an erfüllten Kriterien einer antisozialen Persönlichkeitsstörung als häufige Komorbidität der Alkoholabhängigkeit mit dem Score auf dem MAST-Faktor 2 positiv und signifikant korreliert. Allerdings scheint diese Assoziation nicht spezifisch zu sein, da der MAST-Faktor 2-Score auch signifikant mit den Scores der paranoiden und Borderline-Persönlichkeitsstörung (jeweils $p=0.001$) korreliert [Himmerich et al., 2002; Himmerich et al., 2004; A:4].

Als psychometrische Instrumente benutzten wir den TCI („Temperament- und Charakterinventar“, dt. Manual, 1999, übersetzt und bearbeitet von: J Richter, M Eisemann, G Richter und CR Cloninger) und den NEO-FFI (deutsche Version des „NEO-Persönlichkeitsinventars“). Cloninger hat 1994 den TCI aus dem TPQ („Three-dimensional Personality Questionnaire“) als ein Instrument entwickelt, um sieben unabhängige Basisdimensionen des Temperaments und Charakters eines Individuums zu beurteilen. „Temperament“ meint in diesem Zusammenhang automatische emotionale Antworten auf Erfahrungen, die mäßiggradig vererblich und stabil über die Lebensspanne hinweg sind. Es

gibt insgesamt 4 Dimensionen des Temperamentes, das sog. „novelty seeking“ (Neugierverhalten), „harm avoidance“ (Schadensvermeidung), „reward dependence“ (Belohnungsabhängigkeit) und „persistence“ (Beharrungsvermögen). Darunter versteht man einerseits die Neugier auf Neues, die Vermeidung von aversiven Affekten, die Abhängigkeit von äußerer Belohnung und die Zähigkeit. Der Charakter wird als ein Muster von Selbstkonzepten und individuellen Unterschieden in Zielgebung und Werten, die die Präferenzen und Intentionen genauso wie die Interpretation von Lebensereignissen bezüglich ihrer Bedeutung und ihrer Konsequenzen bestimmen, verstanden. Charakter wird in den drei Dimensionen „self directedness“ (Selbstlenkungsfähigkeit, die auf dem Konzept des „Autonomen Selbst“ basiert), „cooperativeness“ (Kooperativität, als Folge eines Selbst als wesentlicher Bestandteil einer Gesellschaft oder der Menschheit) und „self transcendence“ (Selbsttranszendenz mit dem Konzept eines Selbst als Teil des Universums) gemessen. Bei Cloningers eigenen Klassifikationen alkoholabhängiger Patienten werden früher Erkrankungsbeginn und antisoziales Verhalten, die beide mit einem hohen Anteil von Impulsivität vergesellschaftet sind, als typische Merkmale des Typ II-Patienten gesehen. So wird auch eine positive Korrelation des Neugierverhaltens mit dem Typ II-Alkoholabhängigen (mit Impulsivität, antisozialem Verhalten, Aggressivität und Kriminalität) gefunden, während Schadensvermeidung mit allen diesen Merkmalen negativ korreliert ist. Im Vergleich dazu bedient sich der NEO-FFI als NEO-Five-Factor-Inventory der sogenannten großen 5 Persönlichkeitsdimensionen [Borkenau & Ostendorf, 1993], nämlich Neurotizismus, Extraversion, Offenheit, Verträglichkeit und Pflichtbewusstsein. NEO als Akronym steht dabei für die ersten drei.

Es konnte gezeigt werden, dass das Familienrisiko für Alkoholabhängigkeit positiv assoziiert ist mit Offenheit und negativ mit Verträglichkeit und Pflichtbewusstsein, wohingegen die Alkoholabhängigkeit positiv assoziiert ist mit Neurotizismus und negativ mit Verträglichkeit und Pflichtbewusstsein [Martin & Sher, 1994].

Anhedonie bezeichnet das Fehlen der Lebensfreude und die Unfähigkeit, positive Gefühle unter Alltagsstimuli zu erleben (Anderson, 1982). Allgemein sind Charakteristika der Anhedonie das Fehlen des Empfindens von Freude bei objektiv freudigen Ereignissen [Heinz, 1999]. Dabei wird zwischen physischer und sozialer Anhedonie unterschieden [Chapman et al., 1976]. Die soziale Anhedonie entspricht der Freudlosigkeit in zwischenmenschlichen Situationen wie Unterhaltungen, Gefühlsaustausch, Liebe oder generell im Zusammensein mit anderen [Meyer & Hautzinger, 1999]. Die Anhedonie wurde zunächst als verlässliches Zeichen der Schizophrenie gesehen. Erst neuerdings wurde die Anhedonie genauer untersucht

und eine Manifestation bei verschiedenen psychiatrischen Störungen gefunden. In diesem Zusammenhang nimmt die Anhedonie bei Abhängigkeitserkrankungen immer mehr an Bedeutung zu [Ballidin et al., 1992]. Zu ihrer Erfassung benutzten wir die deutsche Version des Chapman-Fragebogens. Eine kategoriale Einteilung des Scores in „anhedon“ oder „hedon“ stellte sich dabei als schwierig heraus. Vielmehr bietet sich hier eine dimensionale Auswertung der erzielten Scores in den einzelnen Dimensionen im Sinne einer Messung der Ausprägung einer Eigenschaft an. Im Chapman-Fragebogen werden außer der sozialen und physischen Anhedonie, die oben erwähnt sind, noch 4 weitere Merkmale erfasst, die allgemein als Risikofaktoren für die Entstehung einer psychotischen Störung angenommen werden [Meyer & Hautzinger, 1999]:

1. Magisches Denken: Hier werden keine Wahrnehmungsphänomene, sondern ungewöhnliche Erfahrungen und Auffälligkeiten im Denken, im Verarbeiten von Informationen und im Schlussfolgern erfasst.
2. Wahrnehmungsabweichungen: Mit diesen Skalen werden Abweichungen und Auffälligkeiten in der Wahrnehmung des eigenen Körpers, der Umwelt und von Körperempfindungen erfasst, z.B. eine veränderte Sensitivität gegenüber akustischen und optischen Sensationen.
3. Hypomanie: Persönlichkeitsstil, der durch einen andauernden oder immer wieder episodisch auftretenden leicht manischen Zustand gekennzeichnet ist mit gesteigerter Energie, geringem Schlafbedürfnis und großem Tatendrang, zu dem auch Stimmungsschwankungen gehören können [Eckblad & Chapman, 1986].
4. Nonkonforme Impulsivität: Persönlichkeitsstil mit situationsunangepassten, impulsiven Handlungen.

Auf der Grundlage, dass bei verschiedenen Erkrankungen eine Dysfunktion des dopaminergen Systems besteht, wird postuliert, dass sich eine Störung des dopaminergen Belohnungssystems nosologieübergreifend als Anhedonie manifestiere [Heinz et al., 1994]. Die Anhedonie wird dabei übereinstimmend als Ausdruck der dopaminergen Unterfunktion gewertet, ohne dass die Mechanismen und die genaue Lokalisation der dopaminergen Dysfunktion bekannt wären [Heinz, 1999].

Statistische Analyse (beispielhaft anhand des Taq I A-Polymorphismus, mit geringfügigen Änderungen auch für die übrigen Untersuchungen geltend)

Alle statistischen Analysen wurden mittels „statistical package for the social sciences“ (SPSS) durchgeführt. Unterschiede der Genotypen und Allelfrequenzen zwischen den Patienten und den gesunden Kontrollen wurden durch χ^2 -Test oder Fischers Exakttest getestet. Um herauszufinden, ob das Alter bei Erkrankungsbeginn der Alkohol- oder Nikotinabhängigkeit als eine Funktion des A1/A2-Genotyps oder des Geschlechts variierte, wurden die Mittelwerte mit dem ungepaarten, zweiseitigen t-Test verglichen. Nonparametrische Mann-Whitney-U-Tests wurden durchgeführt, um Unterschiede in dimensional Scores für die antisoziale Persönlichkeitsstörung, bezogen auf den SKID-II, festzustellen.