

### 3 Material und Methoden

#### 3.1 Material

##### Chemikalien

##### Alkohol und Herstellung der Alkohollösungen

Für die Versuche wurde 96%-iger Alkohol (höchster Reinheitsgrad; ohne Additive) verwendet, welcher von der Apotheke des Klinikums Benjamin Franklin (UKBF), Berlin bezogen wurde.

Zur Herstellung der Alkohollösungen wurde der Alkohol zunächst mit einem Messbecher abgemessen, danach in einem zehn Liter fassenden Plastikkanister mit Leitungswasser aufgefüllt (Volumen entsprechend dem erwünschten prozentualen Alkoholanteil). Die Alkohollösung wurde auf 300ml-Plastiktränkeflaschen mit entsprechenden Metallnippeln verteilt. Die Lösungen wurden je nach Bedarf, mindestens jedoch einmal wöchentlich, hergestellt und gewechselt.

##### Quinin (C<sub>20</sub>H<sub>24</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)

Das Quinin lag in Pulverform vor und wurde den Alkohollösungen mit 0,1g/l zugesetzt.

Saccharose (C<sub>12</sub>H<sub>22</sub>O<sub>11</sub>)

Verwendet wurde Saccharose für biochemische Zwecke (Firma Merck KGaA, Darmstadt) mit folgender Spezifikation:

Identität (IR-Spektrum)	entspricht	
Spezifische Drehung ( $\alpha$ 20/D; 26%; Wasser	+ 66.2 bis + 66,8	%
Schwermetalle (als PB)	$\leq 0,001$	%
DC-Prüfung	entspricht	
Reduzierende Zucker (als Glucose)	$\leq 0,5$	%
Trocknungsverlust (105°C)	$\leq 0,5$	%
Sulfatasche	$\leq 0,02$	%
Molarität	342,30 g/mol	

Etonitazen

Das verwendete Opiat Etonitazen wurde von der Firma Novartis (Schweiz) bezogen. Es lag in Pulverform vor und wurde in verschiedenen Dosierungen, je nach Versuchsanordnung, in Wasser gelöst. Die Lösungen wurden je nach Bedarf, mindestens jedoch einmal wöchentlich, hergestellt und gewechselt.

**Geräte**

Mittels einer *elektronischen Satorius-Waage* mit einer Genauigkeit von 1/10 g wurde der Verbrauch an Flüssigkeit und das Körpergewicht ermittelt, sowie neue Lösungen angesetzt und Futter zugewogen.

**Versuchstiere und ihre Haltung**

Für die Versuche wurden insgesamt je 27 weibliche und männliche Wistarratten verwendet. Sie entstammten dem Bundesinstitut für Gesundheitlichen Verbraucherschutz und Veterinärmedizin (BgVV), Diederndorfer Weg 1, 12277 Berlin. Das durchschnittliche Gewicht bei Lieferung betrug etwa 150g.

Umweltbedingungen im Tierhaltungs-/Versuchsraum:

Raumtemperatur (°C):	22 (± 2)
Relative Luftfeuchte (%):	50 (± 5)
Luftwechsel/h:	16-fach
Tag/Nacht-Rhythmus:	12/12
Zeitpunkt (h):	06:00 / 18:00

Die Ratten wurden unter standardisierten Bedingungen einzeln in Makrolon®-Käfigen Typ III (Maße: 20cm x 38cm x 43cm) auf Weichholzgranulat 8-15® (Fa. Altromin; Lage/Lippe BRD) gehalten. Flüssigkeiten wurden in Tränkeflaschen (Richterflaschen mit 300ml Volumen) abgefüllt und mit einem Deckel aus rostfreiem Stahl mit Tränkeöffnung verschlossen. Um eine Berührung der Tränkeflaschen mit dem Futter zu vermeiden, wurden sie durch einen Teiler aus Aluminium vom Futterkompartiment abgeteilt. Als Futter erhielten die Tiere während der gesamten Versuchszeit pelletiertes und autoklaviertes Alleinfuttermittel für Ratten (Standarddiätpellets Altromin® 1324, Fa. Altromin, Lage/Lippe BRD). Nach Angabe des Herstellers enthielt die Standarddiät folgende Rohnährstoffe (% in der Diät): Rohprotein 19,0; Rohfett 4,0; Rohfaser 6,0; Asche 7,0; Wasser 13,5; N-freie Extraktstoffe 50,5 und umsetzbare Energie 2850,0 kcal/kg.

Die Säuberung der Käfige und Erneuerung der Einstreu erfolgte wöchentlich, wobei Gesundheitskontrollen der Tiere durch Adspektion und Palpation durchgeführt wurden. Die äußeren Bedingungen, das Pflegepersonal, die Störzeiten und der Umgang mit den Tieren waren während des gesamten Versuchverlaufs gleich.

## 3.2. Methoden

### Allgemeine Versuchsanordnung

Alle Versuche haben zusammengefasst die Genehmigungsnummer G-0069/99.

Während einer einwöchigen Eingewöhnungszeit in Einzelhaltung erhielten alle Tiere Futter und Wasser ad libitum. Um einer eventuellen Prägung durch den Züchter auf eine bestimmte Position der Flaschen vorzubeugen, lagen die Flaschen bei der Hälfte einer Gruppe auf rechter Position, bei der anderen Hälfte auf linker Position im Käfig. Das Futter befand sich, von den Flaschen getrennt durch einen Aluminiumteiler, auf entsprechend anderer Position.

Es erfolgte eine Einteilung in zwei Gruppen, die wiederum in jeweils drei Untergruppen unterteilt wurden:

#### Gruppe Alkohol

- a) Versuch Alkohol (regelmäßig intermittierend mit initial 20%)
- b) Versuch Alkohol (aufsteigend)
- c) Versuch Alkohol (unregelmäßig intermittierend)

#### Gruppe Etonitazen (ETZ)

- d) Versuch ETZ (kontinuierlich)
- e) Versuch ETZ (forciert)
- f) Versuch ETZ (regelmäßig intermittierend)

### Hypothesen zur Überprüfung einer Verhaltensabhängigkeit

1. Bei freiwilliger Aufnahme der Droge kommt es im Verlauf des Versuches zu einem *Konsumanstieg*.
2. Im Verlauf des Versuches entwickelt sich über die Aufnahme der Droge ein *Kontrollverlust*. Eine Überprüfung erfolgt mittels *Kontrolltests*:

### Gruppe Alkohol

- *Quinin- (oder Negativ-) Test*

Die Alkohollösungen wurden mit 0,1 g/l Chininhydrochlorid vergällt, um zu überprüfen, ob die Höhe des Konsums der Droge trotz des bitteren Geschmacks des Quinins beibehalten wird. Die Flüssigkeitsaufnahme wurde registriert und im Verhältnis mit der Aufnahme des Suchstoffes vor, während und nach dem Quininangebot beurteilt.

- *Saccharose- (oder Positiv-) Test*

Bei diesem Kontrolltest wurde den Ratten zusätzlich eine Saccharose- oder eine Saccharose/Alkohol-Lösung angeboten. Der Anteil der Saccharose in der jeweiligen Lösung betrug 10%. Während des Tests wurde die Aufnahme der Alkohol-Lösungen gemessen und im Verhältnis zu den Werten vor, während und nach dem Saccharoseangebot beurteilt.

### Gruppe Etonitazen

- *Positionswechsel*

Die Ratten lernen im Verlauf des Versuchs durch die nach dem Konsum der ETZ-Lösung einsetzende Wirkung, auf welcher Position diese sich befindet. Man ist hierbei davon ausgegangen, dass die Tiere die Lösung weder an ihrer Farbe, ihrem Geruch oder Geschmack erkennen.

Nach einem Positionswechsel wurde daher beurteilt, inwieweit die Ratten die ETZ-Lösung auf anderer Position gezielt aufsuchen bzw. wie sich ihr Konsumverhalten ändert.

3. Die Versuchstiere entwickeln ein höheres Verlangen nach dem Suchtstoff, welches auch nach langen drogenfreien Perioden erhalten bleibt (*Retest*) oder sogar gesteigert ist.

### **Spezielle Versuchsanordnung**

#### a) Versuch Alkohol (regelmäßig intermittierend mit initial 20%)

Die Gruppe bestand aus jeweils sechs männlichen und weiblichen Ratten. Während der gesamten Versuchszeit erhielten die Tiere Wasser und Futter ad libitum.

Nach der Eingewöhnungszeit wurde ihnen zum ersten Mal eine 20%-ige Alkohollösung angeboten. Danach stand ihnen bis zum Versuchsende grundsätzlich nur jeden zweiten Tag eine oder mehrere Alkohollösungen zur Verfügung.

In der Zeit vom 128. bis 132. Versuchstag wurde der erste Quinin-Test durchgeführt; d.h. der 20%-igen Alkohollösung wurde in diesem Zeitraum Quinin (0,1g/l) beigemischt. Danach erhielten sie die 20%-ige Alkohollösung wieder ohne Zusatz.

Vom 142. bis 154. Versuchstag bekamen die Tiere als ersten Saccharose-Test neben dem 20%-igen Alkohol eine zusätzliche Flasche mit einer Saccharoselösung (10%). Danach erhielten sie wieder die 20%-ige Alkohollösung ohne Zusatz.

Ab dem 184. Tag bekamen die Tiere gleichzeitig eine Flasche mit 20%-iger und eine Flasche mit 25%-iger, ab dem 254. Tag noch eine zusätzliche Flasche mit 30%-iger Alkohollösung.

Im Zeitraum zwischen dem 304. und 308. Versuchstag wurde ein zweiter Quinin-Test durchgeführt. Den drei Alkohol-Lösungen (20%, 25% und 30%) wurde jeweils Quinin (0,1g/l) beigemischt. Danach erhielten die Ratten die Lösungen wieder ohne Zusatz.

Weil an den Käfigen maximal vier Flaschen befestigt werden konnten, wurde den Tieren ab dem 318. Tag die 25%-ige Lösung als Vorbereitung für den folgenden zweiten Saccharose-Test entzogen.

Vom Versuchstag 332 bis 346 wurde den verbleibenden Alkohollösungen (20- und 30%) Saccharose beigemischt. Es stand ihnen also keine zusatzfreie Alkohollösung mehr zur Verfügung. Zusätzlich erhielten die Tiere eine Wasser/Saccharoselösung.

Ab dem 348. Tag bekamen sie bis zum Versuchsende (353. Tag) wieder die 20%-ige und 30%-ige Alkohollösungen ohne Saccharose, weiterhin zusätzlich eine Saccharoselösung.

Versuchstag	Alkohol (20%)	Alkohol (25%)	Alkohol (30%)	Saccharose-wasser	Alkohol (20%) + Saccharose	Alkohol (30%) + Saccharose	Alkohol (20%) + Quinin	Alkohol (25%) + Quinin	Alkohol (30%) + Quinin	H <sub>2</sub> O
1 – 7										X
8 – 127	X									X
128 – 133							X			X
134 – 141	X									X
142 – 155	X			X						X
156 – 183	X									X
184 – 253	X	X								X
254 – 303	X	X	X							X
304 – 309							X	X	X	X
310 – 317	X	X	X							X
318 – 331	X		X							X
332 – 347				X	X	X				X
348 – 353	X		X	X						X

**Tabelle 3.1: Schematische Darstellung des Versuchablaufs**

[Gruppe a) „Alkohol (regelmäßig intermittierend mit initial 20%)“]

b) Versuch Alkohol (aufsteigend)

Die Gruppe bestand aus jeweils sechs männlichen und weiblichen Ratten. Während der gesamten Versuchszeit erhielten die Tiere Wasser und Futter ad libitum.

Nach der Eingewöhnungszeit wurde den Tieren bis zum 129. Versuchstag regelmäßig wiederholt eine aufsteigende Alkoholreihe (3% \_ 4% \_ 5% \_ 7% \_ 9% \_ 11% \_ 13% \_ 15% \_ 20%) nach folgendem Schema angeboten: innerhalb von neun Tagen wurde die Alkoholkonzentration bei täglicher Erhöhung bis auf 20% gesteigert. Darauf folgte eine zweitägige Pause, in welcher sie nur Wasser bekamen. Danach wurde wieder eine neue aufsteigende Alkoholreihe nach gleichem Schema begonnen.

Ab dem 130. Tag erhielten die Tiere statt der aufsteigenden Alkoholreihe für fünf Tage eine 20%-ige Alkohollösung, wiederum gefolgt von einer zweitägigen Pause.

An den Versuchstagen 222 bis 226 wurde der 20%-igen Lösung Quinin (0,1 g/l) beigemischt.

An den Versuchstagen 229 bis 233 bekamen die Ratten neben der 20%-igen Alkohollösung eine zusätzliche Flasche mit einer Saccharoselösung (10%) angeboten. Nach der zweitägigen Pause erhielten sie wieder wie bisher fünf Tage lang eine 20%-ige Alkohollösung.

Versuchstag	wiederholt aufsteigende Alkoholreihe	20 %-ige Alkohollösung (5d-Rhythmus)	20 %-ige Alkohollösung mit Quinin	Saccharose-Lösung	H <sub>2</sub> O
1 – 7					X
8 – 129	X				X
130 – 221		X			X
222 – 228			X		X
229 – 236		X		X	X
237 – 241		X			X

**Tabelle 3.2: Schematische Darstellung des Versuchablaufs  
[Gruppe b) „Alkohol (aufsteigend)“]**

c) Versuch Alkohol (unregelmäßig intermittierend)

Die Gruppe bestand aus jeweils sechs männlichen und weiblichen Ratten. Während der gesamten Versuchszeit erhielten die Tiere Wasser und Futter ad libitum.

Nach der Eingewöhnungszeit wurden den Tieren gleichzeitig zwei verschiedene Alkoholkonzentrationen angeboten, wobei die Konzentrationen und die Anzahl der Tage, an welchen die Lösungen zur Verfügung standen ständig gewechselt wurden. Eine detaillierte Auflistung der Konzentrationen und Expositionsperioden ist in Tabelle 3.3. zusammengestellt.

An den Versuchstagen 217 bis 223 wurde beiden Alkohollösungen Quinin (0,1g/l) beigemischt. Von Versuchstag 233 bis zum Versuchsende erhielten die Ratten neben den Alkohollösungen eine Saccharoselösung (10%).

Versuchstag	Niedriger %-ige Alkohollösung (in %)	Höher %-ige Alkohollösung (in %)	Niedriger %-ige Alkohollösung (in %) + Quinin	Höher %-ige Alkohollösung (in %) + Quinin	Saccharose-lösung	H <sub>2</sub> O
1 – 7						X
8 – 11	3	6				X
12 – 14						X
15 – 21	6	9				X
22 – 28						X
29 – 31	9	12				X
32 – 35						X
36 – 37	3	6				X
38 – 39						X
40 – 42	9	12				X
43 – 46						X
47 – 49	15	20				X
50 – 52						X
53 – 56	6	12				X
57 – 60						X
61 – 63	3	15				X
64 – 65						X
66 – 70	6	9				X
71 – 73						X
74 – 80	9	12				X
81 – 84						X
85 – 88	11	15				X
89 – 91						X
92 – 98	6	12				X
99 – 100						X
101 – 104	3	15				X
105 – 106						X
107 – 110	4	8				X
111 – 112						X
113 – 115	8	15				X
116						X
117 – 119	3	12				X
120 – 122						X
123 – 126	5	11				X
127 – 128						X
129 – 133	6	15				X
134 – 136						X
137 – 139	3	8				X
140						X
141 – 142	9	12				X
143 – 148						X
149 – 154	7	11				X
155 – 160						X
161 – 165	5	15				X
166 – 169						X
170 – 175	9	11				X
176 – 182						X
183 – 187	10	15				X
188 – 189						X
190 – 193	8	12				X
194 – 196						X
197 – 201	6	15				X
202 – 209						X
210 – 213	15	20				X
214 – 216						X
217 – 223			11	15		X
224 – 232						X
233 – 239	6	12			X	X

Tabelle 3.3: Schematische Darstellung des Versuchablaufs

[Gruppe c) „Alkohol (unregelmäßig intermittierend)“]

d) Versuch ETZ (kontinuierlich)

Die Gruppe bestand aus jeweils drei männlichen und weiblichen Ratten. Während der gesamten Versuchszeit erhielten die Tiere Wasser und Futter ad libitum.

Nach der Eingewöhnungszeit wurde den Tieren eine Etonitazenlösung (2µg/ml) angeboten. Diese stand ihnen konstant bis zum Versuchsende zur Verfügung. Ab dem 170. Versuchstag erhielten die Ratten zusätzlich eine zweite Etonitazenlösung (4µg/ml). Nach dem 343. Versuchstag wurde ein Positionswechsel vollzogen, d.h. die jeweilige Position (siehe Tabelle 3.5) der Etonitazenlösung mit 2µg/ml und die Wasserflasche wurden vertauscht.

Versuchstag	ETZ (2µg/ml)	ETZ (4µg/ml)	H <sub>2</sub> O
1 – 7			X
8 – 169	X		X
170 – 343	X	X	X
P O S I T I O N S W E C H S E L			
344 – 359	X	X	X

**Tabelle 3.4: Schematische Darstellung des Versuchablaufs**

[Gruppe d) „ETZ (kontinuierlich)“]

	Geschlecht	P O S I T I O N E N (bei Versuchsbeginn)		
		Flasche ETZ (2µg/ml)	Flasche ETZ (4µg/ml)	Flasche H <sub>2</sub> O
Tier 1	♀	links	Mitte	rechts
Tier 2	♀	links	Mitte	rechts
Tier 3	♀	links	Mitte	rechts
Tier 4	♂	rechts	Mitte	links
Tier 5	♂	rechts	Mitte	links
Tier 6	♂	rechts	Mitte	links

**Tabelle 3.5: Schematische Darstellung der Flaschenpositionen bei Versuchsbeginn**

[Gruppe d) „ETZ (kontinuierlich)“]

e) Versuch ETZ (forciert)

Die Gruppe bestand aus jeweils drei männlichen und weiblichen Ratten. Während der gesamten Versuchszeit erhielten die Tiere Futter ad libitum.

Nach der Eingewöhnungszeit mit freiem Zugang zum Wasser erhielten die Tiere am achten Versuchstag als einzige Flüssigkeitsquelle eine Etonitazenlösung (2 $\mu$ g/ml), danach bis zum Versuchstag 35 wieder nur Wasser ad libitum.

Ab dem 36. Versuchstag wurde den Tieren die Wasserflasche wieder entzogen. Als Flüssigkeitsquelle stand eine Etonitazenlösung in niedrigerer Dosierung (0,2 $\mu$ g/ml) zur Verfügung. Bis zum Versuchstag 259 wurde diese Konzentration in kleinen Schritten bis auf 2 $\mu$ g/ml gesteigert. Die Intervalle und jeweiligen Konzentrationen sind der Tabelle 3.6 zu entnehmen. Ab dem Versuchstag 260 wurde den Ratten zusätzlich eine Wasserflasche angeboten. Nach Versuchstag 343 erfolgte ein Positionswechsel zwischen der Etonitazenlösung und der Wasserflasche.

Versuchstag	ETZ-Lösung ( $\mu$ g/ml)	H <sub>2</sub> O
1 – 7		X
8	2,0	
9 – 35		X
36 – 133	0,2	
134 – 140	0,4	
141 – 147	0,5	
148 – 160	0,6	
161 – 168	0,7	
169 – 175	0,8	
176 – 182	0,9	
183 – 189	1,0	
190 – 196	1,1	
197 – 203	1,2	
204 – 209	1,3	
210 – 217	1,4	
218 – 224	1,5	
225 – 231	1,6	
232 – 238	1,7	
239 – 245	1,8	
246 – 252	1,9	
253 – 259	2,0	
260 – 243	2,0	X
P O S I T I O N S W E C H S E L		
244 – 359	2,0	X

**Tabelle 3.6: Schematische Darstellung des Versuchablaufs**

[Gruppe e) „ETZ (forciert)“]

	Geschlecht	P O S I T I O N E N (bei Versuchsbeginn)	
		Flasche ETZ -Lösung	Flasche H <sub>2</sub> O
Tier 1	♀	links	rechts
Tier 2	♀	links	rechts
Tier 3	♀	links	rechts
Tier 4	♂	rechts	links
Tier 5	♂	rechts	links
Tier 6	♂	rechts	links

**Tabelle 3.7: Schematische Darstellung der Flaschenpositionen bei Versuchsbeginn  
[Gruppe e) „ETZ (forciert)“]**

f) Versuch ETZ (regelmäßig intermittierend)

Die Gruppe bestand aus jeweils drei männlichen und weiblichen Ratten. Während der gesamten Versuchszeit erhielten die Tiere Wasser und Futter ad libitum.

Nach der Eingewöhnungszeit stand den Tieren regelmäßig jeden zweiten Tag eine Etonitazenlösung (2µg/ml) zur Verfügung. Ab Versuchstag 127 wurde ihnen die Etonitazenlösung entzogen.

Versuchstag	ETZ (2µg/ml)	H <sub>2</sub> O
1 – 7		X
8 – 126	X (jeden zweiten Tag)	X
127 – 133		X

**Tabelle 3.8: Schematische Darstellung des Versuchablaufs  
[Gruppe f) „ETZ (regelmäßig intermittierend)“]**

	Geschlecht	P O S I T I O N E N (bei Versuchsbeginn)	
		Flasche ETZ (2µg/ml)	Flasche H <sub>2</sub> O
Tier 1	♀	links	rechts
Tier 2	♀	links	rechts
Tier 3	♀	links	rechts
Tier 4	♂	rechts	links
Tier 5	♂	rechts	links
Tier 6	♂	rechts	links

**Tabelle 3.9: Schematische Darstellung der Flaschenpositionen bei Versuchsbeginn  
[Gruppe f) „ETZ (regelmäßig intermittierend)“ ]**

### Datenerfassung und statistische Auswertung

Die Datenerfassung der Parameter von Körpergewicht, Futtermittelverbrauch, aufgenommenem Flüssigkeitsvolumen und aufgenommener Alkohol- bzw. Etonitazenmenge erfolgte mithilfe Microsoft Excel (Version 2000).

Die für die statistische Auswertung benötigten Daten wurden in das Statistikprogramm SPSS für Windows (Version 11.0) überführt. Innerhalb der jeweiligen Versuche wurden die Mittelwertvergleiche bei zwei Vergleichswerten mittels dem t-Test bei gepaarten Stichproben, bei mehreren Vergleichswerten mittels einer Varianzanalyse durchgeführt. Dabei sollte festgestellt werden, ob auftretende Mittelwertsunterschiede sich mit zufälligen Schwankungen erklären lassen, bzw. ein Kriterium für Verhaltensabhängigkeit darstellen. Ein festgestelltes Ergebnis wurde als „signifikant“ bezeichnet, wenn die zugrundeliegende Irrtumswahrscheinlichkeit  $p < 0,05$  lag.