

*Aus dem Physiologisch-chemischen Institut der Johannes-Gutenberg-Universität Mainz
(Direktor: Prof. Dr. Dr. K. Lang)*

Vitamin A-Wachstums- und Leberspeichertest bei Ratten, mit gleichzeitiger Prüfung eines wasser- und fettlöslichen Präparates

Von W. KIECKEBUSCH

Mit 3 Tabellen

(Eingegangen am 14. November 1960)

Einleitung und Problemstellung

Zwei Vitamin A-Prüfmethoden haben sich von den vielen entwickelten durchgesetzt: Der Wachstumstest, wie er von der United States Pharmacopeia anerkannt wird und der Leberspeichertest, den GUGGENHEIM u. a. (1944) einführten, und der von zahlreichen Autoren abgewandelt wurde. Aufgabe vorliegender Arbeit sollte es sein, Genauigkeit und Schwankungsbreite beider Methoden zu prüfen und miteinander zu vergleichen. Gleichzeitig wollten wir das Wachstum und die Leberspeicherung bei dem pulverförmigen wasserlöslichen Palmitinsäureester und dem fettlöslichen Vitamin A-acetat feststellen.

Methodik

Frühzeitig entwöhnte männliche Ratten des Elberfelder Stammes, mit einem Anfangsgewicht von 30–35 g, erhielten bei einer Raumtemperatur von $23^{\circ} \pm 1^{\circ}$ C und 50–60% rel. Luftfeuchtigkeit, in Drahtboden einzeln käfigen, über die ganze Versuchsdauer ein Vitamin A-freies, in allen anderen Nahrungsstoffen ausreichendes Futter. Die Diät setzte sich aus folgenden Substanzen zusammen:

vitaminfreies Casein	18%
Reisstärke	52%
Kokosfett ¹⁾	13%
Salzmischung Roche	5%
Zellulose	2%
Hefe	10%

Nachstehende Vitamingaben wurden verabreicht:

20 IE Vitamin D und 100 γ Vitamin E/Tier/Woche. 0,02 g Cholinchlorid in 0,1 ml Wasser gelöst per os mit der Pipette/Tier/Woche. Die Vitamin B-Komplex-Lösung erhielten die Tiere auf das Futter aufgetropft. Die jeweilige Tagesdosis betrug: B₁ 10γ, B₂ 40γ, B₆ 20γ, Ca-Panthothenat 100γ und Nicotinsäureamid 500γ.

¹⁾ 8 Stunden bei 30° C mit Luft an der Wasserstrahlpumpe durchgeblasen, um vorhandenes Vitamin A zu zerstören.

Durch tägliche Wägung verfolgten wir während der Vorperiode das Gewicht und die Futteraufnahme. Wachstumsstillstand trat nach ca. 3 Wochen ein. Zu diesem Zeitpunkt sind alle Körpervorräte an Vitamin A soweit erschöpft, daß analytisch kein Vitamin A mehr nachzuweisen ist. Augenschäden treten noch nicht auf. In der Hauptperiode, die weitere 4 Wochen dauerte, teilten wir die verwendeten Männchen (120 Tiere) in Gruppen zu je 30 Tieren auf. Die Ratten erhielten mit der Pipette in je 2 Versuchsgruppen 1,5 bzw. 2,5 IE Vitamin A/Tier/Tag, als wasserlöslichen Palmitinsäureester bzw. fettlösliches Vitamin A-Acetat in 0,01 ml Wasser, oder Vitamin A-freiem Arachisöl gelöst. Durch die tägliche Wägung waren die Tiere so an den Menschen gewöhnt, daß sie das Vitamin schnell aufnahmen.

Bei der zweiten von uns durchgeführten Methode, dem Leberspeichertest, richteten wir uns nach der Arbeit von AMES u. a. (1956). Die Ratten bekamen wieder in 4 Gruppen zu 30 Männchen (also wiederum 120 Tiere), nach gleicher Vorperiode wie beim Wachstumsversuch, drei Tage hintereinander mit der Pipette per os entweder 3×1000 IE oder 3×2000 IE Vitamin A/Tier/Tag, jeweils des wasser- oder fettlöslichen Präparates. 24 Stunden nach der letzten Gabe töteten wir die Tiere durch Genickschlag, entnahmen und wogen die Lebern und bewahrten sie bis zur weiteren Aufarbeitung, die innerhalb 10 Tagen erfolgte, bei -15°C auf. (Nach 10 Tagen ist ein allmähliches Absinken der Konzentration um ca. 5–7%, jedoch ohne Regelmäßigkeit festzustellen.) Der Nachweis von Vitamin A in den Rattenlebern wurde nach der Methode von MÜLLER, BOLDINGH, WODSACK, ZSCHELLE u. a., GRIDGEMAN u. a., OSER u. a., abgewandelt nach H. MOOR (1953), der die Carr-Price-Reaktion zu Grunde liegt, durchgeführt. Die Blaufärbung maßen wir bei einer Wellenlänge von $610 \text{ m}\mu$ im Zeissphotometer.

Den Vitamin A-Gehalt lasen wir auf einer, mit einem US-Standardpräparat hergestellten, Eichkurve ab. Die statistischen Auswertungen führten wir nach dem t-Test von STUDENT (FISHER 1956, FISHER and YATES 1957) durch.

Ergebnisse

In Tabelle 1 sind die Mittelwerte für alle 4 Gruppen des Wachstumstestes zusammengefaßt.

Tabelle 1
Wachstumstest

Gruppe	I	II	III	IV
Präparat	H_2O -lös.	fettlös.	H_2O -lös.	fettlös.
Dosis	1,5 IE A	1,5 IE A	2,5 IE A	2,5 IE A
Anfangsgewicht	94 g	99 g	85 g	101 g
Endgewicht	168 g	155 g	150 g	155 g
Zunahme	74 g	54 g	65 g	56 g

Am Beginn der vierwöchigen Test-Wachstumsperiode steht das Anfangsgewicht. Die Endgewichte sind die erreichten absoluten Durchschnittswerte, die Zunahmen die Differenz zwischen Anfangs- und Endgewichten. Hiervon berechneten wir die Wahrscheinlichkeit p . Sie ergab eine Signifikanz von $p = 0,01$ für den Unterschied zwischen der geringen Dosis des wasser- und des fettlöslichen Präparates. Die Tiere nahmen bei 1,5 IE des wasserlöslichen Vitamin A 20 g mehr zu, als bei 1,5 IE des fettlöslichen A-Acetats. Für die höhere Dosis von 2,5 IE A der gleichen Präparate/Tier/Tag, wurde für die Zunahmedifferenz von 11 g für $p = 0,02$ errechnet. Diese Werte zeigen, daß bei der Gabe von 1,5 IE Vitamin A, dem täglichen Mindestbedarf der Ratte, in Form des hier verwendeten wasserlöslichen Palmitinsäureesters, die beste

Ausnutzung stattfand. Bei Steigerung der Dosis um 1 IE/Tier/Tag sinkt die Differenz um 40%.

Uns interessierte bei diesem Versuch auch, ob der Futterverzehr beim Ergebnis des Wachstumstestes eine Rolle spielt. Dazu bestimmten wir die Nahrungsaufnahme durch tägliche Einwaage und wöchentliche Rückwaage der gesammelten Reste. Die Futterefficiency erhielten wir, indem wir die Gewichtszunahme in Gramm durch die aufgenommene Futtermenge in Gramm dividierten.

Das Ergebnis dieser Auswertung ist in Tabelle 2 angegeben.

Tabelle 2
Futterefficiency

Gruppe	I		II		III		IV	
Präparat	H ₂ O-lösl.		fettlösl.		H ₂ O-lösl.		fettlösl.	
Dosis	1,5 IE A		1,5 IE A		2,5 IE A		2,5 IE A	
Zeit in Versuchswochen	1-2	3-4	1-2	3-4	1-2	3-4	1-2	3-4
Zunahme	45 g	29 g	32 g	22 g	35 g	30 g	32 g	34 g
Futteraufnahme	141 g	131 g	140 g	122 g	117 g	128 g	121 g	128 g
Efficiency	0,319	0,222	0,228	0,180	0,300	0,234	0,264	0,118

Da die Fraßmengen in den beiden ersten Wochen in Gruppe I und II praktisch gleich sind, wird deutlich, daß die Zunahmedifferenz von 13 g auf den einzigen variierten Faktor, die beiden in verschiedenen Medien gelösten Vitamin A-Präparate, zurückzuführen ist. Für die 3. und 4. Woche ist in diesen Gruppen die Differenz geringer. Wenn man die Daten der Gruppen III und IV vergleicht, sieht man wieder, daß sowohl in der 1. und 2. als auch in der 3. und 4. Woche, beim fettlöslichen Vitamin A-Acetat die Futterefficiency niedriger ist. Dies ist nicht auf eine geringere Futteraufnahme zurückzuführen. Die Mittelwerte sind mit $p = 0,001$ sehr gut statistisch gesichert.

Tabelle 3
Leberspeichertest

Gruppe	A	B	C	D
Präparat	H ₂ O-lösl.	fettlösl.	H ₂ O-lösl.	fettlösl.
Dosis	3 × 1000 IE	3 × 1000 IE	3 × 2000 IE	3 × 2000 IE
IE Vit-A/ Gesamtleber	1478	1317	2957	3260

Ergänzend zu den Tabellenwerten ist zu sagen, daß die Einzeldaten für Gruppe A von 1030-1820, für Gruppe B von 673-2100, für Gruppe C von 1600-4800 und für Gruppe D von 1580-4790 IE Vitamin A/Rattenleber schwanken.

Es besteht keine, für einen Test erforderliche Häufung der Werte um den errechneten Mittelwert. Der hohe Wert für $p = 0,2$ drückt dies exakt aus. Mit dem Leberspeichertest konnten wir, wegen der großen Streuung der Zahlen, die Verwertbarkeit der untersuchten Vitaminpräparate nicht beurteilen. Ebenso konnten wir auch keine Differenz zwischen ihnen feststellen.

Diskussion

Durch die starke Beschleunigung des Wachstums bei der geringen Dosis von 1,5 IE/Tier/Tag des wasserlöslichen Palmitinsäureesters gegenüber dem fettlöslichen Acetat, wird die Frage nach der Ursache dieser Wirkung aufgeworfen. BERNHARD u. a. (1955) fanden bei Ratten mit Fisteln im ductus thoracicus, daß wässrige Suspensionen ebenso gut wie Vitamin A-Öl und besser als ölige Suspensionen resorbiert werden. Bei den von uns verwendeten kleinen Mengen ist kaum anzunehmen, daß die Tiere die fettlöslichen Präparate nicht genug resorbieren können. Diesem Problem experimentell nachzugehen ging über den Rahmen unserer Fragestellung hinaus.

Nach BERNHARD u. a. (1952) und AMES u. a. (1956) werden bei hohen Dosen 50–60% des verabreichten Vitamin A in der Leber gespeichert. Natürlich muß die Speicherung nicht mit dem Resorptionsumfang identisch sein. — Wir fanden beim Speichertest ca. 50% der Gaben in der Leber wieder. Unsere Ergebnisse stimmen nicht mit den Befunden von LEMLEY u. a. (1947), die eine geringe Streuung der Werte angeben, überein. Die Resultate von SOBEL u. a. (1948), die eine 2–3fache Speicherung bei Verwendung einer wässrigen Dispersion gegenüber einer ölichen Lösung fanden, ließen sich durch unsere Experimente nicht bestätigen. Auf Grund unserer Ergebnisse des Leberspeichertestes drängt sich die Frage auf: Ist eine Methode, die bei Gruppen zu 30 Tieren zu keinem signifikanten Ergebnis führt, als Methode anzuerkennen? Ferner, hat ein biologischer Test einen Sinn, bei dem die 2–4000fache Menge des Mindestbedarfs, also eine ganz unphysiologische Dosis gegeben wird?

Der Firma Hoffmann La Roche danken wir für die Unterstützung, die uns die Durchführung der Versuche ermöglichte.

Zusammenfassung

1. Wir führten den Vitamin A-Wachstumstest mit dem wasserlöslichen Palmitinsäureester und dem fettlöslichen Vitamin A-Acetat durch. Die Tagesdosis betrug 1,5 bzw. 2,5 IE/Tier. Jede der 4 Gruppen bestand aus 30 Männchen. Das Ergebnis wurde nach dem t-Test von STUDENT ausgewertet.

2. Unter den Bedingungen unseres Experimentes erhöht der wasserlösliche Palmitinsäureester das Wachstum gegenüber dem fettlöslichen A-Acetat signifikant. Die Differenz ist bei der geringen Dosis von 1,5 IE am größten. Der Einfluß des Futterverzehrs auf das Wachstum wird diskutiert.

3. Beim Leberspeichertest arbeiteten wir wieder mit 4 Rattengruppen zu je 30 Tieren. Verwendet wurden die gleichen Präparate wie beim Wachstumstest. Die Dosierung betrug 3×1000 bzw. 3×2000 IE Vitamin A.

4. Die chemischen Analysen ergaben keine signifikanten Mittelwerte und Differenzen in der Leberspeicherung zwischen den beiden Präparaten. Wir halten daher den Leberspeichertest als Methode für unzureichend.

Summary

1. We used the conditional vitamin-A growth technic with the watersoluble palmitinic acid ester and the fat-soluble vitamin-A acetate. The dayly level was 1.5 or 2.5 IU./rat. There were 4 groups with 30 males each. With the statistical test of STUDENT we examined the results.

2. Under the conditions of our experiments the water-soluble palmitinic acid ester rises significantly the growth compared with the fat-soluble A-acetate. The greatest difference we got at the small dose of 1.5 IU. The effect of the food consume on the growth is discussed.

3. For the liver-storage bioessay we used also 4 groups 30 animals each. We used the same preparation as for the growth technic. The level was 3×1000 or 3×2000 IU vitamin A.

4. The chemical analyses showed no significant means and differences for both substances as for liver-storage is concerned. In our opinion the liver-storage test is not adequate.

Résumé

1. Pour le test de croissance nous avons utilisé l'ester d'acide de la palmitine hydro-soluble et l'acétate de vitamine A liposoluble. La dose journalière était 1,5 et 2,5 UI. Chaque groupe consistait en 30 mâles. Nous avons vérifié les résultats par le t-test de STUDENT.

2. En comparant l'ester d'acide de la palmitine hydro-soluble avec l'acétate de vitamine A liposoluble, nous avons trouvé sous les conditions de notre expériment, que l'ester de l'acide de la palmitine élève la croissance. La différence est la plus grande dans les groupes qui ont reçus la petite dose de 1,5 UI. L'influence de l'ingestion quantitative à la croissance est discutée.

3. Pour le test d'accumulation dans la foie nous avons expérimenté encore avec 4 groupes de 30 mâles. Nous avons utilisé les mêmes préparations que pour le test de croissance. La dose était 3×1000 et 3×2000 UI de vitamine A.

4. Pour l'accumulation de la foie les analyses chimiques montraient qu'il n'y a pas des différences et des valeurs moyennes statistiquement significatives entre les deux préparations. A cause de cela nous sommes d'avis, que le test d'accumulation est insuffisant comme méthode.

Literatur

1. AMES, S. R., und HARRIS, P. L.: *Anal. Chem.* **28**, 874-878 (1956). — 2. BERNHARD, K., SCHEITLIN, E. und RITZEL, G.: *Helvet. chim. acta* **35**, 1914-1924 (1952) — 3. BERNHARD, K. und HEINZELMANN, F.: *Intern. Z. Vitaminforschg.* **26**, 91-95 (1955). — 4. FISHER, R. A. and YATES, F.: *Statistic Tables* (Edinburgh 1957). — 5. FISHER, R. A.: *Stat. Meth. f. d. Wissenschaft* (Edinburgh 1956). — 6. GUGGENHEIM, K. und KOCH, W.: *Biochem. J.* **38**, 256-264 (1944). — 7. HELPERN, G. R., BIELY, J. and HARDY, F.: *Science* **106**, 40, (1947). — 8. LEMLEY, J. M., BROWN, R. A., BIRD, O. D. and EMELT, A. D.: *J. Nutrit.* **33**, 53 (1947). — 9. MCGILLIVRAY, W. A., THOMPSON, S. J. and WORKER, N. A.: *Brit. J. Nutrit.* **11**, 57-61 (1957). — 10. SOBEL, A. E., SHERMAN, M., LICHTBLAU, J., SNOW, S. and KRAMER, B.: *J. Nutrit.* **35**, 225 (1948). — 11. THIEWS, J.: *Vit. Hormone*, **8**, 185-242, 297-349 (1959).

Anschrift des Verfassers:

Dr. W. KIECKEBUSCH, Physiol.-Chem. Univ.-Inst. Mainz