

Die Bedeutung von Tiermodellen für den Fortschritt der Wissenschaft*)

H. Weiser

Abteilung für Vitamin- und Ernährungsforschung; F. Hoffmann-La Roche & Co., A.G., 4002 Basel, Schweiz

Zusammenfassung: Versuchstiere können als Modell für den Menschen herangezogen werden, wenn Analogien zwischen tierischen und menschlichen Funktionen bestehen. Deshalb kommt der Wahl von Spezies und Stamm bei der Entwicklung solcher Modelle eine besondere Bedeutung zu. Die Kenntnis der ernährungsphysiologischen Besonderheiten einer Spezies ist die Voraussetzung für die Herstellung vollwertiger Diäten. Oft sind Vorleistungen bereits in der Zuchtstation zu erbringen, um kurative Modelle überhaupt erst anwenden zu können. Nur wenn die hohen Anforderungen an die Standardisierung des tierexperimentellen Teiles einer Untersuchung erfüllt sind, können klinische und subklinische Symptome eindeutig zugeordnet werden. Mit empfindlichen biochemischen Reaktionen lassen sich sowohl Imbalanzen und Interaktionen von Nähr- und Wirkstoffen sowie Substitutionserfolge erfassen. Ebenso können die Resorption und der Stoffwechsel von Präparaten verfolgt werden.

Negative Auswirkungen auf das Analysenergebnis sind bereits bei der Wahl des Narkotikums, der Entnahme und Lagerung von Organproben auszuschließen. Wegen ihrer Bedeutung für die Planung und Auswertung stellt auch die Biometrie einen integrierenden Bestandteil eines jeden Forschungsprojektes dar.

Die am Ganztier erzielte wissenschaftliche Information kann weder mit isolierten Organen und Zellkulturen, noch mit Hilfe simulierender Computersysteme erreicht werden.

Große Anstrengungen, auch unter Einbeziehung biotechnologischer Methoden, sind erforderlich, um die Tierzahlen weiterhin zu reduzieren und gleichzeitig die Aussagekraft der Experimente zu erhöhen. In jedem Fall jedoch müssen die wissenschaftlichen Zielsetzungen mit den ethischen Anliegen des Tierschutzes in Einklang gebracht werden.

Summary: Experimental animals may serve as models for human beings, if analogies between animal and human functions exist. Therefore, the selection of species and strain plays an important role in the development of such models. Knowledge of the nutritional and physiological characteristics of a species is a prerequisite for the composition of complete diets. Often, preliminary work has to begin at the breeding farm in order to make use of such curative models possible. Only when the high requirements of standardization of experimental animals are met can clinical and subclinical symptoms be determined distinctly. By means of sensitive biochemical reactions, imbalances and interactions of nutritive and active ingredients, as well as successful substitutions, can be recorded. The study of absorption and metabolism of preparations is made possible by observing these reactions.

*) Herrn Prof. Dr. med. Karl Heinz Bässler zum 65. Geburtstag gewidmet

However, negative influence on the results of analysis must be eliminated by correct selection of narcotics, and the proper excision and storage of organs. Because of its importance for the planning and evaluation of experiments, biometry is an integral part of every research project.

The scientific information which must be gained from the whole experimental animal cannot be substituted by either isolated organs and cell cultures, or by means of computer simulation.

A demanding effort, which includes biotechnological methods, is necessary to further reduce the number of experimental animals and, simultaneously, to enhance experimental evidence. In any case, all scientific aims must be in accordance with the ethical principles of the Society for the Prevention of Cruelty to Animals.

Schlüsselwörter: geeignete Spezies, analoge Reaktionen, optimale Standardisierung, ethische Grundsätze, spezifische Alternativen

Key words: suitable species, analogous reactions, optimal standardization, ethical principles, specific alternatives

Einleitung

Grundsätzlich ist ein Versuchstier dann Modell, wenn die mit einem Tierversuch erzielten Resultate auf eine andere Tierart oder auf den Menschen übertragen werden.

Damit das Tier zum Modell werden kann, benötigen wir Vorstellungen, die auf Analogien zwischen tierischen und menschlichen Funktionen oder Verhaltensweisen beruhen.

Als erstes verlangt der Einsatz von Tiermodellen in der Forschung theoretische Vorausberechnungen, die zur Aufstellung einer Hypothese führt. Darauf folgt die Überprüfung der Hypothese mit dem gewählten Modell.

Schließlich bedarf es noch der Humanexperimente, um zu beweisen, daß Analogie zwischen Tier und Mensch besteht.

Es liegen Erfahrungswerte vor, daß sich etwa 70 % der Wirkungen von Pharmaka auf den Menschen direkt voraussagen lassen. Das ist eine sehr große Treffsicherheit, die es jedoch noch zu verbessern gilt.

Durch Anstrengungen auf vielen Gebieten ist die Aussagekraft der Tierversuche in den letzten Jahren stark angestiegen. Die Fortschritte wurden aber nicht durch eine Erhöhung der Tierzahlen erreicht, sondern sogar bei einer beachtlichen Abnahme derselben.

Jeder tierexperimentell arbeitende Wissenschaftler ist heute bemüht, in seinem Zuständigkeitsbereich die ethischen Forderungen mit den wissenschaftlichen Zielsetzungen zu vereinen.

Aus dem Bedürfnis heraus, dem Tier nicht ohne vertretbaren Grund Angst oder Leid zuzufügen, wird stets versucht, auch Alternativen zum Tierversuch in das wissenschaftliche Programm aufzunehmen.

Wenn es auch keine echten Alternativen gibt, sondern nur ergänzende Methoden, so tragen sie doch indirekt dazu bei, die Zahl der Tierversuche noch weiter zu reduzieren.

Aber Resorption, Organverteilung, Metabolismus und Ausscheidung von einzelnen Verbindungen sowie die Wechselbeziehungen von Präparatkombinationen lassen sich nicht an isolierten Organen, mit Hilfe

Tab. 1. Anteil verschiedener Tierarten am Gesamtbedarf der Versuchstiere.

Tierspezies	BRD (BPI) 1979		CH (Interpharma, BS) 1982	
	Abs.	%	Abs.	%
Mäuse	1 969 103	55,8	1 137 852	60,8
Ratten, Hamster	1 174 306	33,3	620 138	33,2
Meerschweinchen	121 288	3,4	37 973	2,0
Kaninchen	110 567	3,1	15 136	0,81
Katzen	13 109	0,37	3 530	0,19
Hunde	13 167	0,37	2 499	0,13
	1 818	0,05	210	0,01
Landw. Nutztiere	3 762	0,11	762	0,04
Vögel	92 805	2,60	24 266	1,30
Kaltblüter	28 894	0,82	27 738	1,50

BPI = Bundesverband Pharmazeut. Industrie e.V., Tiere in der Arzneimittelforschung

Interpharma Firmen Ciba-Geigy, Sandoz, Hoffmann-La Roche
Umfrage Juli 1983

von Gewebekulturen oder simulierenden Computersystemen studieren. Hierfür gibt es keine anderen Möglichkeiten als den Versuch am lebenden Tier (Tab. 1).

Auch mit diesen Ausführungen soll ein Beitrag zur Optimierung von Tierversuchen geleistet werden. Da das Meerschweinchen zusammen mit Ratte und Maus etwa 95 % aller verwendeten Labortiere ausmacht, soll es in diesem Beitrag stärker berücksichtigt werden (1).

Standardisierung der Versuchsbedingungen

Viele wissenschaftliche Probleme konnten erst angegangen werden, nachdem eine große Anzahl Tierspezies und -stämme zur Verfügung standen. Durch züchterische Maßnahmen war es möglich, die genetisch fixierten Reaktionsmuster der Versuchstiere zu vereinheitlichen. Die Tiere sind gesünder, da Zucht und Aufzucht unter besonders kontrollierten Bedingungen (SPF, specified pathogen free) durchgeführt werden. Aufwendige Verbesserungen der Umweltbedingungen ermöglichen die gleichbleibende Haltung der Versuchstiere.

Diesen positiven Leistungen der Versuchstierkunde standen aber auch negative gegenüber, die ein Experiment erschweren. So wurde z. B. mit hohen Wirkstoffzulagen die Reproduktionsleistung der Tiere und die Rentabilität einer Farm erhöht.

Solche Tiere waren jedoch nicht mehr für Teste zu verwenden, die eine Depletierung an dem zu prüfenden Wirkstoff erforderlich machten. Besonders deutlich zeigte sich dies im Falle der fettlöslichen Vitamine mit ihrer Neigung zur Depotbildung. Durch die enge Zusammenarbeit zwischen Züchter und Forscher können heute Tierspezies und -stämme bereitgestellt werden, die für das jeweilige Experiment am besten geeignet sind.

Tab. 2. Vorleistungen in der Zuchtstation, unentbehrliche Voraussetzung für eine optimale Versuchsdurchführung.

Ratte/Stamm	Wirkstoff-anpassung im Zuchtfutter	Zuchtleistungen pro Weibchen und Jahr		
		Anzahl Würfe %	Abgesetzte Würfe %	Abgesetzte Junge %
Fü-Albino SPF	keine	100,0	100,0	100,0
	zwei Wirkstoffe (Vitamine A + D)	95,2	89,8	82,3
Holtzman SPF	keine	100,0	100,0	100,0
	zwei Wirkstoffe (Vitamine A + D)	91,8	87,0	83,3

Vorleistungen auf der Versuchstierseite

Die Vorleistungen zur Optimierung der Tierexperimente sind mit einem beachtlichen Mehraufwand an Arbeit verbunden. Bei den fettlöslichen Vitaminen A und D wurde z. B. deren Gehalt im Futter reduziert und jede Charge analysiert. Damit die Zuchtleistungen nicht unter 85 % im Vergleich zu dem voll ernährten Kollektiv absinken, werden Anzahl Würfe, abgesetzte Würfe und Junge registriert (2) (Tab. 2).

Der Vorteil einer solchen Maßnahme lässt sich an Tieren mit und ohne angepasster Vitamin-A-Versorgung aufzeigen. Die Anpassung ergab eine Verkürzung der Depletierungszeit um 25 Tage und etwa 100 g leichtere Tiere, was sich auf die spätere Gewichtsentwicklung günstig auswirkt. Die Dosis-Wirkungs-Beziehung war eine bessere, da die Wachstumskurven steiler verliefen.

Bei Übernahme von Versuchstieren unbekannter Herkunft ist es deshalb notwendig, deren Status zu überprüfen, z. B. den bestimmter wasserlöslicher Vitamine mit Hilfe funktioneller Tests und den der fettlöslichen Vitamine mit Gehaltsbestimmungen in Leber und Plasma. Bei Vitamin A wurden große Unterschiede im Leberspiegel gefunden, die Werte lagen zwischen 250 und 2500 IEA (Tab. 3).

Aufstellung im Tierlabor

Dem Aufstellungssystem kommt eine große Bedeutung zu, da es sich nach den Möglichkeiten der Regulierung von Temperatur, Feuchtigkeit und Luftumwälzung richten muß. Im Makrolonkäfig können die Tiere mit Vorteil ihr eigenes, individuell verschiedenes Mikroklima schaffen. Als Nachteil ist die schlechte Hygiene anzuführen, da eine erhöhte Ammoniakbildung einen Störfaktor bei geschwächten Tieren darstellt. Im Falle von Drahtkäfigen sind die Kontrolle und Anpassung der Umgebungs faktoren bedeutend aufwendiger. Mit zunehmender Vitaminverarmung steigt z. B. die Temperaturempfindlichkeit, und eine nicht zugfreie Lüftung führt zu vermehrten Ausfällen. Bei Meerschweinchen hat sich ein Käfigtyp bewährt, der auf drei Seiten geschlossen ist.

Tab. 3. Teste zur Überprüfung der Versorgung mit Vitaminen und Mikronährstoffen.

Vitamine und Mikronährstoffe	Nachweismethode	Bevorzugtes Organsystem	Beurteilung
Vitamin B ₁	Transketolasetest	Erythrozyten	
Vitamin B ₂	Glutathionreduktase- test	Vollblut/Erythro- zyten	Spezifisch: Aktivie- rung durch Coenzym in vitro
Vitamin B ₆	Glutamat-Oxalacetat- Transaminasetest	Erythrozyten	
Vitamin E	Hämolysetest, Kreatin- phosphokinasetest	Erythrozyten Serum/Plasma	Spezifisch Diffe- rentialdiagnose
Vitamin K	Gerinnungstest	Vollblut/Plasma	Spezifisch
Vitamin C	Alk. Phosphatase- test	Plasma	Differentialdia- gnose
Selen	Glutathionperoxydase- test	Erythrozyten/ Plasma	Spezifisch
Vitamin A	Speicheltest	Leber	Spezifisch

Ernährung des Meerschweinchens

Auf dem Ernährungssektor hat sich die offene Formel durchgesetzt und die Komponenten werden auf Wunsch bekanntgegeben. Die meisten Hersteller von Standarddiäten erfüllen die Forderungen der GLP-Regulations- und GV-Solas-Empfehlungen. Auch Sonderdiäten sind auf dem Markt, die eine den Versuchsbedingungen angepaßte Versorgung ermöglichen. Es kommt aber immer wieder vor, daß bei der Analyse von Nähr- und Wirkstoffen große Differenzen zu den deklarierten Werten gefunden werden. Bei mehreren Alleinfuttermitteln für Meerschweinchen wurden in den Rohnährstoffen Abweichungen von $\pm 30\%$ festgestellt. Die angegebenen Gehalte der Aminosäuren waren im Extremfall nur zu etwa $\frac{1}{3}$ vorhanden oder wurden um den Faktor 4,5 überschritten. Auch in der Verdaulichkeit der Futtermittel wurden große Unterschiede festgestellt. Pellets waren nicht nur in der Form, sondern auch in der Härte verschieden. Außerdem lag der Vitamin-C-Gehalt bei allen Analysen unter 50 % der deklarierten Angaben (3). Das dürften häufig die Gründe sein, daß unerwartete Schwierigkeiten bei Tierexperimenten auftreten.

Auch wir analysierten pelletiertes Meerschweinchenfutter auf Vitamin C und fanden im besten Falle etwa 50 %, gelegentlich war aber kein Vitamin C nachweisbar (Tab. 4).

Bei der Herstellung von Spezialdiäten für Meerschweinchen erhöhen sich die von anderen Tierarten her bekannten Schwierigkeiten noch um einige weitere. Meerschweinchen sind absolute Herbivoren und auf eine ausreichende Vitamin-C-Zufuhr mit der Nahrung angewiesen, da ihnen das Enzym L-Gulonolacton-Oxidase fehlt.

Zum Energiebedarf läßt sich sagen, daß das Meerschweinchen für Wachstum und Zucht 11,7 MJ (2800 kcal) und für Haltung 10,5 MJ (2500 kcal) pro kg an umsetzbarer Energie benötigt (4). Werden die Energiebedarfsangaben auf das metabolische Körpergewicht bezogen, dann

Tab. 4. Wirkstoffkontrolle von kommerziell erhältlichem, pelletiertem Haltungsfutter für Meerschweinchen. Parameter: Vitamin-C-Gehalt in mg/kg Futtermittel.

Hersteller	Vitamin C (mg/kg)	
	Deklaration	Analyse
A KU	580	240
B KUN	580	20
C AL	580	< 20
D FU-S	1000	0

gelten diese für eine ganze Reihe von Funktionen bei verschiedenen Tierspezies: Haltung 0,45, Wachstum 1,20, Trächtigkeit und Laktation 1,30 MJ/Tag (5).

Physiologisch am günstigsten wirken Rohfasergehalte von 10–15 % für Zuchttiere, 15–18 % für Haltung und etwa 12 % für Jungtiere (6).

Aufgrund der Spezialisierung seines Verdauungstraktes ist das Meerschweinchen in der Lage, den rohfaserhaltigen Anteil der Nahrung enzymatisch und mikrobiell aufzuschließen. Zellulose wird in Caecum und proximalem Colon in kurzkettige Fettsäuren überführt, die zur Deckung des Energiebedarfs beitragen. Beim Meerschweinchen werden Flüssigkeit und Partikel verschiedener Größen von 0,08–0,2 mm in Caecum/Colon nicht getrennt, wie das beim Kaninchen der Fall ist. Die Verweildauer der Nahrung ist in diesem Darmabschnitt mit 9 Stunden etwa dreimal so lang wie in Magen/Dünndarm und distalem Colon/Rektum (7, 8).

Es ist interessant, daß auch der tägliche Proteinerhaltungsbedarf bei einer Reihe untersuchter Tiere (Meerschweinchen, Ratte, Maus, Hund, Schwein) einheitlich hoch bei 1,6 g verwertbarem Protein pro kg metabolischem Körpergewicht liegt (9, 10).

Während bei der Ratte viele Untersuchungen zur Ermittlung des Aminosäurebedarfs vorliegen, sind diese bei Meerschweinchen selten.

Es wird ein Aminosäuremuster angegeben, das auch dem Bedarf anderer Nager (Ratte, Maus, Hamster), Karnivoren (Hund, Katze) und Affen entspricht (5, 11).

Für Mineralstoffe, Mikronährstoffe und Vitamine ist es ebenfalls sinnvoll sich nach den Empfehlungen für die oben erwähnten Versuchstiere zu richten.

Über den Bedarf des Meerschweinchens an ungesättigten Fettsäuren ist wenig bekannt. Ein Gehalt von 1 % Maisöl verhindert Hautläsionen und ermöglicht ein gutes Wachstum.

Entwicklung einer semisynthetischen Diät

Die Diät sollte so optimiert sein, daß sie Langzeitversuche ermöglicht, ohne daß höhere Verluste auftreten (Tab. 5).

Als Energieträger wurden hydrolysierte Maisstärke, Gerste, Holzzellulose und Zucker ausgewählt. Mit dem Anteil von Sojaöl erreichte die umsetzbare Energie 11,3 MJ pro kg. Mit dem Öl wurden gleichzeitig essentielle Fettsäuren (0,13 % Linolsäure) in die Diät gebracht.

Tab. 5. Semisynthetische Diät für Meerschweinchen Nr. 5. Vitamin A und Vitamin C analytisch nicht nachweisbar.

Ingredienzen	g/ kg Diät	Prämix 1: Salze, Aminosäuren	Einwaage
Sojamin 90	120,0	CaCO ₃	15,00 g
Casein, technisch	120,0	CaHPO ₄ (wasserfrei)	14,00 g
Magermilchpulver	50,0	K ₂ HPO ₄	16,90 g
Hydrol. Maisstärke	100,0	KCl	13,85 g
Zucker, krist.	83,2	MgSO ₄ · 3 H ₂ O	15,00 g
Gerste, gemahlen	200,0	NaCl	6,50 g
Luzerneheumehl	80,0	NaHCO ₃	2,00 g
Holzzellulosepulver	80,0	C ₁₂ H ₂₂ FeO ₁₄ · 2 H ₂ O	1,30 g
Sojaöl, raff.	50,0	MnSO ₄ · 2 H ₂ O	0,15 g
Prämix 1:		CuSO ₄ · 5 H ₂ O	0,02 g
Mineral- und Mikro- nährstoffe, Amino- säuren	96,8	ZnO	0,03 g
Prämix 2:		Na ₂ MoO ₄ · 2 H ₂ O	0,50 mg
Vitamine + Träger	20,0	KJ	0,70 mg
Verd. Rohprotein (%)	27,1	CoCl · 6 H ₂ O	1,20 mg
Umsetzb. Energie (MJ/kg)	11,3	Na ₂ SeO ₃ · 5 H ₂ O	0,50 mg
Fett (Cal%)	16,3	Glycin	5,00 g
		L-Arginin	5,00 g
		L-Methionin	3,00 g

Der Anteil von 27,1 % an verdaulichem Rohprotein stammte aus isoliertem Sojaprotein, technischem Casein und Magermilchpulver. An kristallinen Aminosäuren wurden 0,3 % L-Methionin, 0,5 % L-Arginin und 0,5 % Glycin zugesetzt.

Bei den Mineralstoffen Ca und P wurden die aus den Ingredienzen stammenden Anteile mitgerechnet und ergaben nach Zusatz von CaCO₃, CaHPO₄ (wasserfrei) und K₂HPO₄ prozentuale Gehalte von 1,34 % Ca und 0,90 % P. Die Kalium-, Natrium- und Magnesiumgehalte der Diät betragen 1,1, 0,32 und 0,20 %. Mikronährstoffe und Vitamine wurden in Anlehnung an die für Ratten geltenden Bedarfsszahlen eingesetzt.

Luzerneheumehl wurde als Ingredienz gewählt, da es Faktoren enthält, die sich auf Langzeitversuche günstig auswirken.

Überprüfung der neu entwickelten Diät

Zur Überprüfung mit den Parametern Wachstum und Überlebensrate wurde die Diät als Pulver angeboten. Dadurch wird ausgeschlossen, daß weniger stabile Wirkstoffe nach der Pelletierung unterdosiert sind oder daß die Preßverluste durch höhere Einwaagen ausgeglichen werden. In jedem Fall können Degradationsprodukte auftreten, deren Auswirkung auf ein Experiment nicht einmal abgeschätzt werden kann.

Der große Nachteil bei der Verfütterung nicht pelletierter Diäten an Nager besteht darin, daß die Schneidezähne weiter wachsen und nicht abgenutzt werden.

Tab. 6. Entwicklung einer semisynthetischen, pulverförmigen Diät für Langzeitversuche bei Meerschweinchen. Grunddiät (MS Nr. 5) Vitamin C, Vitamin A in allen Chargen analytisch nicht nachweisbar. Parameter: Vitamin-C-Gehalt von 12, im Abstand von je 2 Monaten hergestellten Futtermischungen.

Chargen Nr.	Vitamin-C-Gehalt in mg/kg Diät		
	Zusatz 75 mg	Zusatz 1500 mg	Zusatz 3000 mg
1	71	1370	2895
2	74	1460	3050
3	78	1310	2830
4	76	1330	2830
5	84	1430	2900
6	82	1380	2990
7	85	1420	2840
8	79	1390	2800
9	72	1470	2840
10	81	1450	3020
11	66	1475	2950
12	74	1305	2893
Mittelwert	76,8 mg	1400 mg	2903 mg
SD	5,71	61,3	82,3
SE	1,65	17,7	23,7

Wir haben diese Probleme zu lösen versucht, indem Weichholzklötze in den Drahtkäfig gelegt wurden. Außerdem wurden einmal pro Woche 50 g sterilisiertes Heu (15 min, 117 °C) angeboten. Damit beide Meerschweinchen eines Käfigs freien Zugang zum Futter hatten, wurden zwei Behälter installiert.

Da für die Erstellung von Meerschweinchendiäten Kenntnisse über die tatsächlich benötigte Vitamin-C-Menge von Bedeutung sind, wurden drei Dosierungen verabreicht. Nämlich 75 ppm (N = 48), 1500 ppm (N = 32) und 3000 ppm (N = 32). Um Abweichungen zwischen Soll- und Istgehalt erfassen zu können, wurde jede neu hergestellte Futtercharge analytisch untersucht (Tab. 6).

Körpergewicht und Futterverbrauch

Bis zum Ende des ersten Jahres wurden Körpergewicht und Futteraufnahme wöchentlich registriert und zeigten für alle drei Dosierungen eine gute Übereinstimmung (Abb. 1).

Zur weiteren Bewertung der Diät wurden nach einem Jahr je vier Tiere einer Gruppe getötet, um den Vitamin-C-Gehalt in verschiedenen Organen sowie in Thrombozyten und Plasma zu bestimmen. Die mit 75 ppm Vitamin C behandelte Gruppe zeigte signifikant tiefere Werte als die beiden anderen Gruppen (Tab. 7).

Histologische Untersuchung wichtiger Organe

Auch die histologische Untersuchung wurde für die Beurteilung der Diät herangezogen. Nach 1½ und 2 Jahren Versuchsdauer wurden von je

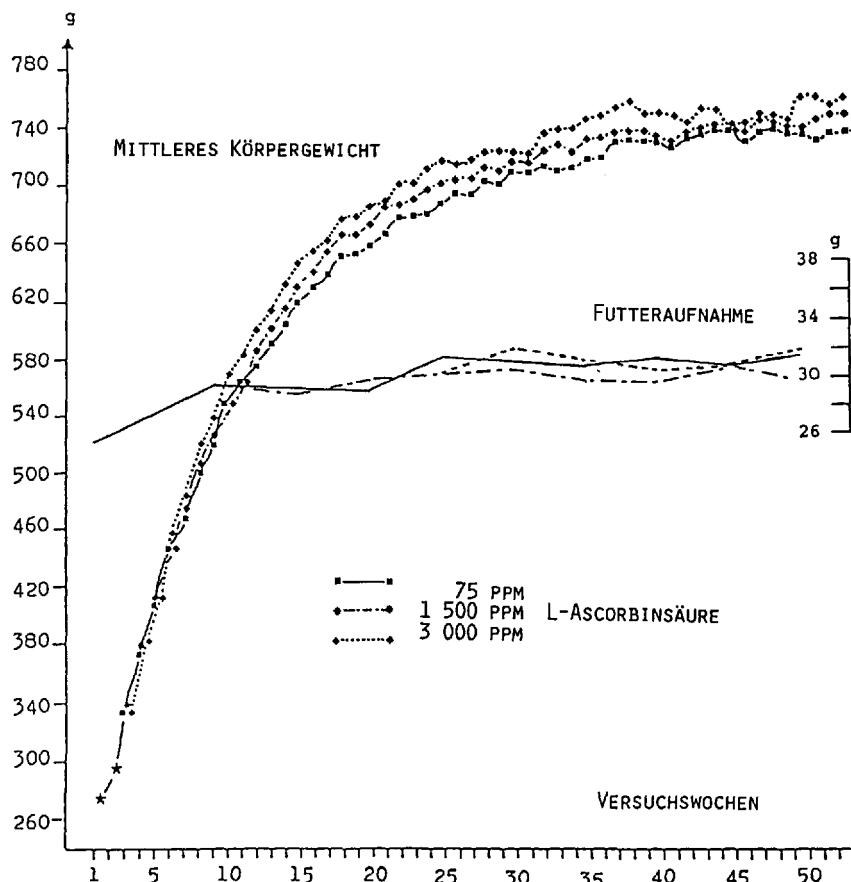


Abb. 1. Diät-Entwicklung. Einfluß der Vitamin-C-Versorgung auf das Körpergewicht von Meerschweinchen. Pulverförmige Vitamin-C-Mangel-Diät (Nr. 5), supplementiert mit L-Ascorbinsäure. Versuch MS 1/80 vom 7.1.1980–5.1.1981.

zwei Tieren einer Behandlung die Organe Herz, Lunge, Milz, Leber, Niere, Nebenniere und Hoden histologisch untersucht. Nach 1½ Jahren ergaben sich keinerlei Hinweise auf Organläsionen, die mit der Versuchsdauer oder der Vitamin-C-Dosis zusammenhängen konnten.

Bei den Tieren, die 1500 und 3000 ppm Vitamin C erhalten hatten, wurden auch nach zwei Jahren keine pathologischen Veränderungen gefunden. Dagegen wurden bei der mit 75 ppm Vitamin C behandelten Gruppe etwas vermehrt histio-lymphozytäre Infiltrate in Lunge und Niere sowie auffällig viele Konkremente in der Niere festgestellt.

In der Zona reticularis der Nebenniere wurden gelbbraune Granula gefunden, die nach zusätzlicher Färbung mit Berliner Blau auf eine Belastung mit Eisenverbindungen hindeuten.

Die Dosis von 75 ppm Vitamin C ist für eine längerfristige Anwendung zu tief, da die Infektabwehr vermindert und der Eisenstoffwechsel gestört sind.

Tab. 7. Langzeit-Vitamin-C-Verabreichung über das Futter. Grunddiät (MS Nr. 5): Vitamin C und A analytisch nicht nachweisbar. Parameter: Vitamin-C-Gehalt verschiedener Organe (mg/100 g) nach 12monatiger Versuchsdauer. N = 4 ♂ Meerschweinchen je Dosis. Mittelwerte ± SE.

Untersuchte Proben	mg/100 g Organ		
	Vitamin-C-Gehalt: Futter	mg/100 ml Plasma $\mu\text{g}/10^8 \text{ Zellen}$	
	75 mg C/kg Futter	1500 mg C/kg Futter	3000 mg C/kg Futter
Nebenniere	21,8 ± 2,7	154,0 ± 21,0	135,0 ± 14,0
Leber	2,5 ± 0,4	32,4 ± 2,2	35,2 ± 1,7
Gehirn	5,5 ± 0,8	20,5 ± 0,6	20,5 ± 1,8
Niere	1,3 ± 0,5	11,8 ± 0,3	15,2 ± 1,3
Herz	< 0,1	3,5 ± 0,7	2,8 ± 0,8
Muskel	0,4 ± 0,1	1,2 ± 0,6	1,7 ± 0,2
Plasma	0,028 ± 0,003	0,89 ± 0,04	1,22 ± 0,15
Thrombozyten	0,061 ± 0,004	0,222 ± 0,004	0,322 ± 0,056

Mortalität

Ein weiteres Kriterium zur Beurteilung einer Diät sind die spontanen Todesfälle, die während der Prüfperiode auftreten. Von Versuchsbeginn ab wurde deshalb die Zahl der Ausfälle registriert. Viermal (nach $\frac{1}{2}$, 1, $1\frac{1}{2}$ und 2 Jahren Versuchsdauer) wurde die Häufigkeit der Ausfälle statistisch mit Hilfe des Chi-Quadrat-Testes untersucht. Zu keinem der Zeitpunkte konnten gesicherte Unterschiede zwischen den Behandlungen festgestellt werden (Abb. 2).

Schlußfolgernd kann gesagt werden, daß die neu entwickelte Diät sicher vollwertig ist, wenn ein Vitamin-C-Gehalt zwischen 250 und 1000 ppm analytisch nachgewiesen wird.

Unter dem beschriebenen Fütterungsregime und den Haltungsbedingungen bleiben Meerschweinchen während mehreren Jahren gesund und eignen sich für ernährungsphysiologische Untersuchungen.

Heilung oberflächlicher Wunden

An Ratten konnte mit dem von uns entwickelten Wundheilungsmodell gezeigt werden, daß sich die Qualität einer Diät über den Heilverlauf einer Wunde beurteilen läßt. Mit Hilfe der standardisierten Blistertechnik werden gleich große und gleich tiefe Wunden gesetzt. Durch tägliche Messung der Feuchtigkeitsabgabe wird der Heilverlauf einer Wunde verfolgt. Wird die Regressionsgerade mit der x-Achse zum Schnitt gebracht, dann läßt sich die Heildauer exakt ermitteln. Mit der Berechnung des Quotienten aus den x-Achsen-Abschnitten wird das Wirksamkeitsverhältnis ausgedrückt. Im Vergleich zu einer vollwertigen Diät ergab die Verminderung des Gehaltes von einem Vitamin (Ca-D-Pantothenat) oder von vier Vitaminen (A, E, Biotin, Calpan) eine Verlängerung der Heildauer um das 1,12- bzw. 1,52fache (Tab. 8).

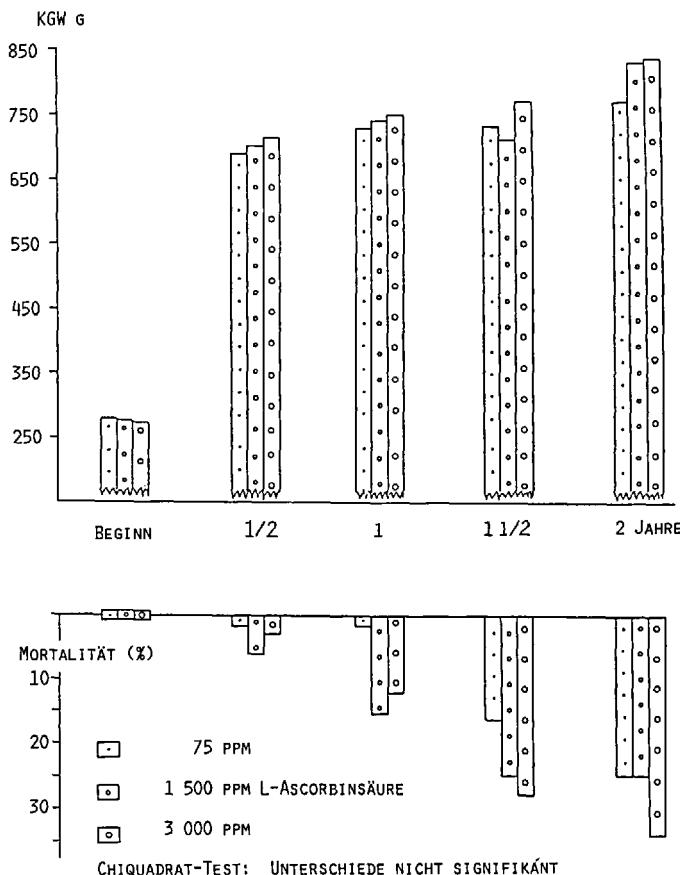


Abb. 2. Entwicklung einer semisynthetischen, pulverförmigen Diät für Meerschweinchen. Überprüfung anhand von Gewichtsentwicklung und Mortalitätsrate.

Einfluß der Wirkstoffversorgung auf biochemische Parameter

Ein funktioneller Parameter, der sich zur Überprüfung des Vitamin-C-Status eignet, ist die alkalische Phosphatase (AP) im Plasma. Durch Verfütterung der nicht mit Vitamin C angereicherten Grunddiät sank bei Meerschweinchen die Aktivität der AP von 120 auf 37 und nach weiteren zehn Tagen auf $22,0 \text{ U} \cdot \text{l}^{-1}$. Auch die Redepletionierung solcher Mangeltiere ließ sich demonstrieren. Mit 0,2 mg Vitamin C täglich wurde innerhalb von 8 Tagen nur eine geringfügige Aktivitätsveränderung erreicht, während mit 0,4 mg ein Anstieg von 22,8 auf 130,9 und mit 0,8 mg ein solcher von 25,7 auf $184,7 \text{ U} \cdot \text{l}^{-1}$ zu verzeichnen war (Abb. 3).

Diese Befunde dienten zum Aufbau eines Testes zur Bestimmung der Wirksamkeit von Vitamin-C-aktiven Verbindungen. Auf molekularer Basis waren L-Ascorbinsäure und 6-Palmitoyl-L-Ascorbinsäure gleich wirksam. Von jeder Verbindung wurden 1,70 und 3,40 μmol während 6

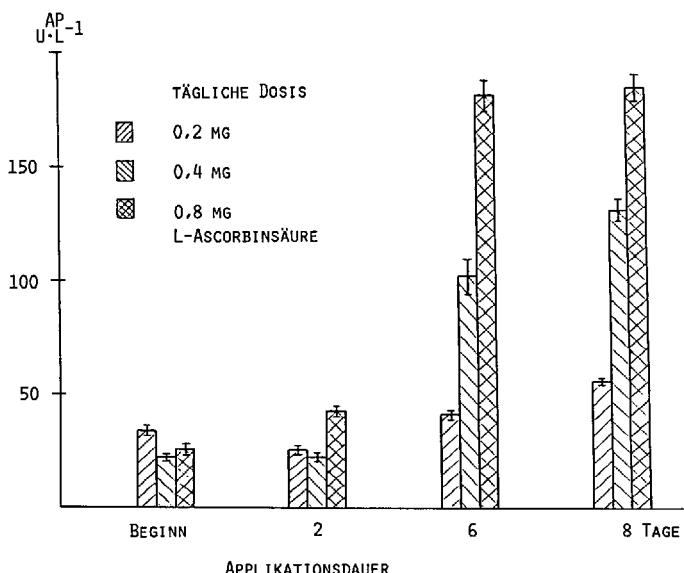


Abb. 3. Vitamin C. Kurative Wirkung bei Meerschweinchen. Parameter: Alkalische Serumphosphatase (AP), $\mu\text{mol p-Nitrophenol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{l}^{-1}$; 6 männliche Tiere pro Dosierung.

Tagen täglich oral verabreicht und die Aktivitätsveränderungen der AP gemessen.

Der Versorgungszustand mit einem anderen Vitamin, nämlich Vitamin E, lässt sich über die Aktivität der Kreatinkinase (CPK) erfassen. Dieses Enzym ist für die Muskelkontraktion wichtig, da es die Bereitstellung von Adenosintriphosphat aus Kreatinphosphat gewährleistet. Es ist bei Mensch und Tier gut muskelspezifisch. Bei durch Vitamin-E-Mangel bedingter Muskeldystrophie tritt eine signifikante Enzymverminderung in der Skelettmuskulatur und eine Hyperenzymämie im Plasma auf.

An diesem Beispiel lassen sich auch tierstammspezifische Unterschiede bei der Wirkstoffversorgung aufzeigen. Während eine mehr als 200 Tage lange Vitamin-E-Mangel-Fütterung bei Tieren des Stammes Himalayan, spotted nötig war, um CPK-Aktivitäten von 1700 bis 3000 mU·ml⁻¹ zu ergeben, konnten beim Stamm BFA/ZH/Kisslegg in etwa 100 Tagen Aktivitäten von 7000 bis 11 000 mU·ml⁻¹ erreicht werden.

Die tägliche intramuskuläre Injektion einer Kombination aus 0,05 mg Se + 15,0 mg Vitamin E führte während 9 Tagen zur Heilung der Dystrophie mit Rückgang der hohen CPK-Aktivitäten auf Werte zwischen 208,1 und 416,3 mU·ml⁻¹ (Tab. 9).

In einem weiteren Versuch wurden Vitamin-E-Mangel-Meerschweinchen mit einer mittleren CPK-Aktivität von 2200 mU·ml⁻¹ mit Se/Vit. E behandelt. Vierzehn Tage nach der i.m. Injektion war ein starker Rückgang der CPK-Werte, aber keine Veränderung in den Aktivitäten von ASAT (GOT) und ALAT (GPT) festzustellen. Die Aktivitäten der Se-abhängigen GSH-Px waren stark erhöht und die Differenz der Mittelwerte

Tab. 8. Prüfung der Wertigkeit einer Diät am Heilverfahren oberflächlicher Wunden. Versuchstiere: männliche Fü-Albino-n/n-Ratten (SPF), N = 10 Tiere/Gruppe. Parameter: Standardisierte Wundsetzung; Dampfdruck über der Wundfläche (Meßwert zur Zeit der Wundsetzung = 100 %). Biometrie: Regressionsrechnung; Schnittrechnung; Quotient der x-Achsen-Abschnitte

Grunddiät mit unterschiedlichen Vit.-Gehalten	Relativer Dampfdruck (%) Stunden nach der Wundsetzung				x-Achsen-Ab schnitt = Heildauer	Verhältnis x-Achsen- Abschnitte
	0 h	24 h	48 h	72 h		
Optimaler Gehalt aller Vitamine	100	82,5	66,0	31,6	0,0	1,00
Ca-D-Pantothenat reduziert	100	87,6	71,2	52,8	16,1	1,12
Mehrere Vitamine reduziert	100	89,8	83,9	67,1	36,9	1,52

Tab. 9. Vitamin-E-Mangel bedingte Muskeldystrophie bei unterschiedlich sensitiyen Meerschweinchen-Stämmen. Heilung durch intramuskuläre Injektion einer Se/Vit.-E-Kombination (1:300). Parameter: Kreatinkinase-Aktivität, mU · ml⁻¹ Serum. Grundfutter: 5 mg α-Tocopherol, 0,045 mg Se pro kg.

Positive Kontrolle	BFA/ZH/Kisslegg			
	231 Tage	266 Tage	89 Tage	117 Tage
250 ppm dl-α-Isophenol-acetat im Futter		Vitamin-E-Mangel-Fütterung		
139,8 (8)	1720,8 (10)	2918,1 (11)	7343,2 (15)	11354,1 (19)
32,0	395,3	740,6	1068,8	1453,0
Gleichzeitige Messung	I.m. Injektion: tgl. 0,05 mg Se + 15,0 mg Vit. E, 9 Tage			
124,8 (8)	204,1 (10)	247,8 (11)	255,3 (15)	416,3 (19)
33,1	45,8	24,6	21,6	50,5

statistisch hoch gesichert. Die Wirkung der Se-Injektion zeigte sich auch im Anstieg des Se-Gehaltes in Blut und Leber (Tab. 10).

Präparate mit einem engeren Se/Vit.E-Verhältnis als 1:300 wirken bei zu niedrigem Vitamin-E-Gehalt im Futter toxisch und führen zu Verlusten.

Wie spezifisch die Kreatinkinase für die Skelettmuskulatur ist, zeigte sich bei der Aktivitätsprüfung dieses Enzyms in den Organen Herzmuskel, Hirn, Leber und Niere bei den Spezies Ratte, Meerschweinchen und Katze. Das Enzym ASAT ist dagegen weniger organspezifisch. Es erreicht zwar mit Ausnahme der Katze die höchsten Aktivitäten im Herzmuskel, besitzt jedoch auch relativ hohe Aktivitäten in Leber und Niere. Beim Enzym ALAT wurden bei allen Spezies einheitlich die höchsten Aktivitäten in der Leber gefunden, bei Meerschweinchen zusätzlich noch im Herzmuskel (12).

Kombination von biologischen und biochemischen Parametern

Ein zytoplasmatisches Enzym, das bereits bei Permeabilitätsveränderungen der Zellmembran ins Plasma übertritt, ist die Pyruvatkinase (PK) bei der Ratte. Nach viermonatiger Verfütterung einer Vitamin-E-Mangel-Diät an weibliche Fü-Albino-Ratten wurde nach der Paarung eine vollständige Resorption der Föten und eine Erhöhung der PK-Aktivität auf Werte von 2000–3000 U·l⁻¹ festgestellt. Bei Wirksamkeitsvergleichen von Vitamin-E-aktiven Verbindungen werden depletierte Tiere vom 5. Schwangerschaftstag ab behandelt. Am 20. Tag wird Blut für die PK-Bestimmung durch Herzpunktion entnommen, und Implantationsstellen sowie lebende Föten werden gezählt. Für die statistische Auswertung des Parameters Resorption-Gestation mit Hilfe der gewichteten Probitanalyse wird das Verhältnis der Weibchen mit lebenden Föten zur Gesamtzahl der trächtigen Tiere einer Gruppe gebildet. Der Parameter PK-Aktivität wird mit Hilfe des 12-Punkt-Parallel-Line-Assay ausgewertet. Mit dem Vergleich von dl- α - und d- α -Tocopherolacetat – Aktivitätsverhältnisse 1:1,41 bzw. 1:1,52 – konnte gezeigt werden, daß sich beide Parameter in einer Versuchsanordnung bestimmen lassen. Resorption-Gestation und Myopathie können noch durch Plasma- und Lebertocopherolgehalte ergänzt werden. Die Parameter sind hoch korreliert, Resorption-Gestation und Organspiegel positiv, dagegen die Myopathie negativ zur applizierten Dosis.

Durch die quantitative Auswertung mehrerer Parameter kann der Informationsgewinn erhöht werden bei gleichzeitiger Einsparung von Versuchstieren und Kosten (13).

Die Qualität solcher Untersuchungen hängt weitgehend vom Beitrag der chemischen Analytik ab, die die Charakterisierung der zu prüfenden Verbindungen mittels GLC-Methoden und die Gehaltskontrolle von allen Lösungen mit HPLC durchführt.

Werden diese Kriterien berücksichtigt, dann ist eine gute Reproduzierbarkeit der Resultate möglich, wie am Beispiel des wiederholten Vergleichs von dl- α -Tocopherolacetat und d- α -Tocopherol gezeigt werden konnte. Mit dem Parameter Resorption-Gestation wurden Aktivitätsverhältnisse von 1:0,70, 0,74, 0,62 (Mittelwert 0,69) und mit dem Parameter Myopathie von 1:0,77, 0,70 (Mittelwert 0,74) erzielt, die allerdings nicht das in der US-Pharmakopöe beschriebene Verhältnis von 1:1,49 bestätigen (14).

Tab. 10. Vitamin-E-Mangelbedingte Muskeldystrophie bei Meerschweinchen (BFA/ZH/Kisslegg). Einmalige intramuskuläre Injektion einer Se/Vitamin-E-Kombination (1:300). Parameter: CPK im Serum; ASAT (GOT), ALAT (GPT), GSH-Px im Plasma ($\text{mU} \cdot \text{ml}^{-1}$), Selengehalt in Blut ($\mu\text{g Se/g}$) und Leber ($\mu\text{g Se/g}$, $\mu\text{g Se/Organ}$); $\bar{x} \pm \text{SE}$.

Parameter	Untersuchungszeit	Vitamin-E-Mangel-Futter (5 mg α -TOH, 0,045 mg Se/kg)			250 ppm im M-Futter		
		(0,45 mg Se, 135 IEE/ml) (N = 20)	1 ml Placebo (N = 16)	1 ml Placebo (N = 5)			
CPK	auto injectionem	2413,0 143,1 223,9 69,6 134,6 137,8	$\pm 340,9$ $\pm 18,5^{***}$ $\pm 19,2$ $\pm 6,4$ $\pm 12,5^{**}$ $\pm 7,4^{***}$	2206,1 2299,1 243,9 83,9 59,1 74,1	$\pm 343,3$ $\pm 189,7$ $\pm 21,4$ $\pm 5,7$ $\pm 5,4$ $\pm 10,7$	124,5 102,4 247,7 87,5 48,5 77,5	$\pm 21,9^{**}$ $\pm 29,8^{***}$ $\pm 30,7$ $\pm 13,9$ $\pm 7,7$ $\pm 16,1$
ASAT	13 Tage p.i.						
ALAT	14 Tage p.i.						
GSH-Px	6 Tage p.i.						
	14 Tage p.i.						
$\mu\text{g Se}$	/g Blut	0,151	$\pm 0,003^{***}$	0,095	$\pm 0,003$	0,103	$\pm 0,006$
	/g Leber 14 Tage p.i.	0,523	$\pm 0,018^{***}$	0,174	$\pm 0,004$	0,212	$\pm 0,009$
	/Leber	22,450	$\pm 1,20^{***}$	8,030	$\pm 0,20$	7,700	$\pm 0,48$

Statistik: Student's t-test für unabhängige Stichproben, bezogen auf die mit Placebo behandelte Mangelgruppe
 $^{**} p < 0,01$, $^{***} p < 0,001$.

Verminderung der Streuung durch einheitliche Reaktionslage der Tiere

Eine wichtige Maßnahme, die oft große Streuung der Meßgrößen bei Tierversuchen zu reduzieren, stellt die bessere Standardisierung der Tiere dar. Die Streuung kommt dadurch zustande, daß üblicherweise mit der Behandlung aller Tiere gleichzeitig begonnen wird.

Arbeitstechnisch ist das sehr vorteilhaft, denn sobald ein Tier das spezifische Syndrom aufweist, wird es nicht mehr kontrolliert. Infolge der unterschiedlich langen Wartezeiten bis zur Supplementierung kommt es bei den am längsten depletierten Tieren zu erhöhter Kortikoidbildung mit katabolen Effekten. Auf eine Behandlung mit kleinen Dosen reagieren solche Tiere verzögert oder nicht mehr.

Für einen Hauptversuch sollten deshalb nur Tiere verwendet werden, die eine einheitliche physiologische Reaktionslage besitzen. Das macht eine Kontrolle in sehr kurzen Zeitabständen erforderlich. Sobald bei einer bestimmten Anzahl Tiere der gewünschte Grad des Anfangskriteriums festgestellt wird, werden sie den verschiedenen Versuchsgruppen rein zufällig zugewiesen, und es wird mit der Behandlung begonnen. Allerdings dauert es oft mehrere Tage, bis die erforderliche Gruppenstärke erreicht ist, und die Versuchsdauer wird um diese Zeitspanne verlängert. Der Arbeitsaufwand sowie die Anforderungen an die Verantwortlichkeit und das technische Können der Mitarbeiter erhöhen sich beträchtlich (Tab. 11).

Interaktionen von Wirkstoffen

Während bei der Heilung der Myopathie die Wirkung von Vitamin E durch Selen verstärkt werden kann, führt ein höheres Angebot von essentiellen Fettsäuren und vor allem von Vitamin A zu einem gesteigerten Bedarf an Vitamin E. Mit Hilfe des Dialursäure-induzierten Hämolysetestes konnte bei Ratten gezeigt werden, daß je Gramm essentieller Fettsäuren das Vitamin-E-Angebot im Futter um 1 mg erhöht werden muß, damit der Vitamin-E-Status der Tiere erhalten bleibt. Diese Untersuchungen wurden mit Linolsäuremethylester und Maisöl durchgeführt. In Abhängigkeit von der Spezies und den gewählten Parametern liegt der Mehrverbrauch an Vitamin E pro Gramm Linolsäure zwischen 0,5 und 3,0 mg (Abb. 4).

Diese Erkenntnisse sind besonders wichtig, da die Aufnahme von vegetabilen Ölen und Fischölen in den letzten Jahren stark angestiegen ist, um das Risiko von kardiovaskulären Erkrankungen zu vermindern (15).

Die Wechselbeziehungen zwischen Vitamin A und Vitamin E haben wir in Tiermodellen mit Ratte und Küken untersucht, da verschiedene Erkrankungen die Anwendung hoher Vitamin-A-Dosen erforderlich machen. Im Hämolysetest bei Ratten wurde der Einfluß von Vit. A auf die Erythrozytenmembran gemessen. Der mit 1,5 mg dl- α -TAc erreichte Schutzeffekt wurde durch die gleichzeitige Verabreichung von 10 000 IEA um 30 % reduziert.

Bei gleichbleibender Vitamin-E-Versorgung (80 mg dl- α -TAc) und zunehmenden Vitamin-A-Gehalten (1500 bis 96 000 IEA) pro kg Futter wurde im Abdominalfett eine Abnahme von 60 auf 1 mg α -Tocopherol (α -

Tab. 11. Einheitliche Reaktionslage der Tiere zu Versuchsbeginn. Verminderung der Streuung von Resultaten.

Lfd. Tier-Nr./ Gruppe	Zeitlich verschobener Versuchsbeginn				Kurative Methoden	Einheitliche Anfangskriterien
	1.	2.	3.	4. 5. Tag		
1					Wachstumstest (Meerschweinchen, Ratte) AP-Test (Meerschweinchen) Bradykardietest (Ratte) Myopathietest (CPK Meerschw., PK Ratte) Resorptions-Gestationstest (Ratte) Kolpokeratotest (Ratte) Röntgentest (Ratte)	$\Delta G = 0$ bis -2 g an zwei Tagen Aktivität: 25 bis 45 U \cdot l $^{-1}$ Plasma 380 bis 420 Herzschläge \cdot min $^{-1}$ Aktivität > 2000 bis 3000 U \cdot l $^{-1}$ Plasma Resorption der Fötten bei 4wöchiger Kontrolle Reine Schollen an zwei Tagen Schattenfreie Epiphyserfüge an zwei Tagen

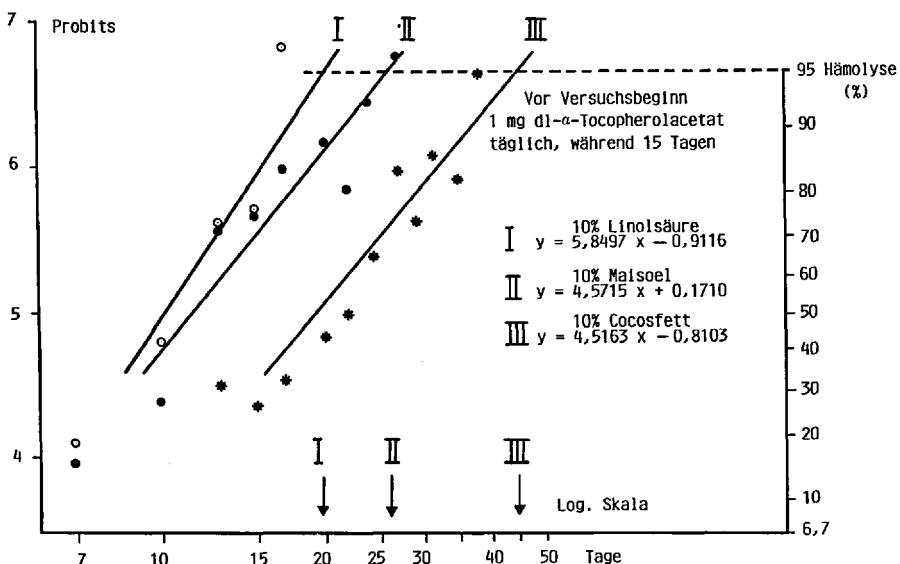


Abb. 4. Einfluß von Linolsäure auf die Vitamin-E-Verarmung von Ratten.

TOH) pro kg Gewebe und im Plasma von 12 auf 2,5 mg α -TOH pro Liter gefunden.

Durch die kombinierte Anwendung verschiedener Vitamin-A- (10, 30, 60, $120 \cdot 10^3$ IEA) und Vitamin-E-Gehalte (60, 120, 240 mg dl- α -TAc) pro kg Futter konnten Korrelationen zwischen der Aufnahme der beiden Vitamine und dem α -TOH-Spiegel im Plasma berechnet werden.

Gleichung (1) zur Berechnung des Vitamin-E-Gehaltes im Futter zum Erreichen eines gewünschten Plasmaspiegels:

$$X_E = (Y - 0,7790 + 0,4621 X_A) / 0,7890 \quad (1)$$

X_E = Gesuchte Vitamin-E-Dosierung (mg α -TAc \cdot kg $^{-1}$)

Y = Gewünschter Plasmaspiegel (mg α -TOH \cdot l $^{-1}$)

X_A = Gewählte Vitamin-A-Dosierung (IEA \cdot kg $^{-1}$ \cdot 10 $^{-3}$)
(Transformation in natürliche Logarithmen).

Durch Umformung wird Gleichung (2) erhalten, die es bei gegebener Vitamin-A- und -E-Dosierung erlaubt, die zu erwartenden α -TOH-Spiegel im Plasma zu berechnen:

$$Y = 0,7790 - 0,4621 X_A + 0,7890 X_E \quad (2)$$

Diese beim Versuchstier Küken erzielten Ergebnisse wurden auf den Menschen übertragen, da bei beiden Spezies ein Plasmaspiegel von 10 mg α -TOH \cdot l $^{-1}$ als normal angesehen wird. Mit Hilfe des Modells ließ sich für den Menschen und die langfristige Einnahme von 30 000 IEA pro Tag (= 428,6 IEA \cdot kg $^{-1}$) ein täglicher Vitamin-E-Bedarf von etwa 120 mg dl- α -Tocopherolacetat berechnen (Tab. 12).

Tab. 12. Anwendung des Tiermodells (Kükens) auf den Menschen. Berechnung der Vitamin-E-Dosis zum Erreichen eines gewünschten α -Tocopherol-Spiegels im Plasma bei bekannter Vitamin-A-Dosis

Gleichung:

$$X_E = (Y - 0,7790 + 0,4621 \cdot X_A)/0,7890$$

Gesucht: X_E Vitamin-E-Dosis für einmalige Applikation (mg/70 kg schwerer Mensch)

Gegeben: X_A Vitamin-A-Dosis (IEA/70 kg schwerer Mensch)

$$X_A = 30 \cdot 10^3 \text{ IEA}$$

$$Y \text{ Vitamin-E-Spiegel im Plasma (mg } \alpha\text{-TOH} \cdot l^{-1})$$

$$Y = 10 \text{ mg}$$

Brücke Mensch – Kükens Futteraufnahme 100 g/Tag

Gegeben: $30 \cdot 10^3 \text{ IEA/Mensch} = 428,6 \text{ IEA/kg KGW} = 4286 \text{ IEA/kg Futter}$

$$X_A = 4,286 \cdot 10^3 \text{ IEA; ln } 4,286 = 1,4554$$

$$Y = 10 \text{ mg; ln } 10 = 2,3026$$

$$X_E = (2,3026 - 0,7790 + 0,4621 \cdot 1,4554)/0,7890$$

$$X_E = 2,1961/0,7890 = 2,7836$$

$$e^{2,7836} = 16,1775 \text{ ppm dl-}\alpha\text{-TAc (Futter)}$$

$$= 1,6177 \text{ mg dl-}\alpha\text{-TAc/kg KGW (Kükens)}$$

$$= 1,6177 \cdot 70 \rightarrow 113,2 \text{ mg/70 kg (Mensch)}$$

Beispiel für Probenentnahmen und Aufbereitung

Von dem behandelten Versuchstier erwarten wir eine Reaktion, die es abzulesen gilt. Diese kann physiologischer, hämatologischer oder biochemischer Art sein. Die physiologischen Parameter erfordern meist keine besonderen Maßnahmen. Für die Entnahme von Blut- und Organproben sind die am besten geeigneten Methoden auszuwählen.

Eine Hämolyse ist in jedem Fall zu vermeiden, wenn die Konzentration von Stoffen (z. B. LDH, ASAT, Kalium) in den Erythrozyten größer ist als im Plasma; wenn Hämoglobin mit sichtbarem Licht interferiert (z. B. Bestimmung von Bilirubin, Eisen, Harnstoff); wenn Hämoglobin mit chemischen Reaktionen interferiert (z. B. Hemmung der Lipaseaktivität, Hemmung der Diazotierung bei der Bilirubinbestimmung).

Das sind wichtige Gründe, weshalb vermehrt Plasma anstelle von Serum gewonnen wird. Bei Verwendung von Gerinnungshemmern ist die Gefahr der Hämolyse bei der Blutentnahme, beim Transport und während der Aufbereitung der Proben vermindert. Ausnahmen bilden Enzyme (saure Phosphatase, Aldolase), die bei der Gerinnung aus Thrombozyten freigesetzt werden. Die Entnahme von Nüchternblut ist angezeigt, wenn lipämisches Plasma die Analyse stört oder Glucose bestimmt werden soll.

Für die Organentnahme sind solche Verfahren zu wählen, welche die Stoffwechselvorgänge blockieren und dennoch Enzyme und Metaboliten schonen. Für Gewebeproben gilt die Frierstoptechnik als Methode der Wahl. Am einfachsten ist die Probengewinnung und Aufbewahrung von Substanzen, die keinem metabolischen Umbau unterworfen sind bzw. Endprodukte des Stoffwechsels darstellen (z. B. anorganische Ionen,

Creatinin, Bilirubin). Bei den meisten Metaboliten wird zum Zeitpunkt der Probeentnahme die physiologische Regulierung unterbrochen, während bei Enzymen die Funktionen weiterlaufen.

Zur Messung der Metaboliten ist Enteiweißung und Lagerung bei einem bestimmten pH-Wert notwendig. Sollen mehrere Metaboliten bestimmt werden, deren Stabilitätsoptima bei verschiedenen pH-Werten liegen, dann müssen Homogenate oder Extrakte geteilt und getrennt behandelt werden. Aliquots eignen sich besser für Wiederholungen, da Auftauen und wieder Einfrieren der Proben vermieden wird. Bei Enzymen kann dies sowohl zu Verlust wie zu Erhöhung der Aktivität führen. Da aber keine allgemein gültigen Regeln aufgestellt werden können, ist für jeden Parameter die Richtigkeit der gewählten Methode zu überprüfen.

Anästhesie von Versuchstieren

Unter die Wahl der geeigneten Methoden für die Organentnahme sollte auch die der Anästhesie fallen. Das Narkotikum ist von besonderer Bedeutung, da Stoffwechselprozesse verändert und die Resultate der nachfolgenden biochemischen Analyse beeinflußt werden können. Am Beispiel des Meerschweinchens läßt sich demonstrieren, daß unvorhergesehene Reaktionen aus verschiedenen Gründen auftreten können:

- Nervöses Verhalten und schnelles Erreichen der Belastbarkeitsgrenze
- Sehr aktiver Stoffwechsel
- Besonderheiten des Atmungssystems
 - Schnelle Atmung; Anhalten der Atmung über längere Zeit
- Schlechte Zugänglichkeit oberflächlicher Venen
- Gewisse Unsicherheit bei der i.p. Injektion
- Auftreten von Nekrosen bei i.m. Applikation
- Verminderte Detoxifizierung infolge erniedrigtem Glucose- und Ascorbinsäurespiegel

Für die *Inhalationsnarkose* eignen sich Äther, Lachgas, Halothan und Methoxyfluran. Zur Sicherheit sollte 30 min vor jeder Inhalationsnarkose eine Prämedikation mit 0,03–0,05 mg Atropin/kg KGW erfolgen, da Meerschweinchens viel Speichel produzieren (16, 17). Die sicherste Inhalationsnarkose bei kleinen Versuchstieren ist die mit Lachgas-Sauerstoff (1:1) und einer geringen Konzentration Methoxyfluran (18). Methoxyfluran selbst ist ein sehr gutes Anästhetikum, vor allem dann, wenn es mit 25–44 mg Ketamin · HCl pro kg KGW kombiniert wird.

Bei Halothan und Äther treten in der Einleitungsphase häufig Exzitationen auf, die dazu verleiten, die Narkose weiter zu vertiefen. Hohe Konzentrationen führen jedoch häufig zu Atem- und Herzstillstand.

Äther hat eine sehr gute muskelrelaxierende Wirkung, reizt aber Schleimhäute in Atemtrakt und Pharynx.

Bei der *intramuskulären Injektion* eines Narkotikums läßt sich durch Verteilung der Injektionsflüssigkeit auf mehrere Stellen eine schnellere Wirkung erzielen. Eine weitere Beschleunigung kann durch Hyaluronidase erreicht werden (19, 20).

Hypnorm®, eine Kombination von Fluanison-Fentanyl, wird in einer Dosierung von 0,5–0,7 ml pro Tier i.m. verabreicht. Innerhalb von 20 min wird eine Anästhesie für die Dauer von 45 min erreicht. Die halbe Dosis

kann nachinjiziert werden (21). Die Wirkungsdauer lässt sich auf 120 min verlängern, wenn 0,5 ml Hypnorm und 25 mg Metomidat pro kg KGW getrennt i.m. verabreicht werden. Zur Nachinjektion wird ein Fünftel der Basisdosierung von Metomidat verwendet (17).

Innovar-Vet® enthält pro ml 0,4 mg Fentanyl und 20 mg Properidol. Mit 0,8 ml/kg KGW wird ein guter analgetischer Effekt erreicht, der eine Stunde anhält. Die Sedationsdauer beträgt 3–4 h.

Sehr gut hat sich die Kombination von 100 mg Ketamin · HCl mit 2 mg Xylazin pro kg KGW bewährt. Nach 5 min Einleitungszeit zeigen die Tiere für 20 min gute Analgesie und Muskelrelaxation. Der Nachschlaf dauert in der Regel eine halbe bis eine Stunde (22).

Bei der *intraperitonealen Injektion* ist ein schneller Wirkungseintritt der Narkose zu beobachten, denn das Bauchfell besitzt eine große Resorptionsfläche. Zur intravenösen Injektion sind keine sehr großen Unterschiede vorhanden, was die Zeit und die Dosierung betrifft.

Damit die Mortalitätsrate niedrig gehalten wird, sollte das Futter vor der Anästhesie entzogen und das Körpergewicht genau ermittelt werden.

Na-Pentobarbital ist ein gebräuchliches Narkosemittel für Meerschweinchen. Die i.p. verabreichte Dosis variiert von 28–40 mg/kg KGW. Die Narkosedauer von 20 min lässt sich auf 50 min verlängern, wenn als Prämedikation 25 mg Chlorpromazin i.m. verabreicht werden (16).

Biometrie, eine wichtige Disziplin für die Optimierung

Mit dem Wissen um die Auswirkungen von Interaktionen gewisser Substanzen auf das Ergebnis ist es leichter, diese bei der Planung zu berücksichtigen. Ein hoher Grad an Präzision und eine gute Reproduzierbarkeit der Versuche lässt sich nur durch die Standardisierung möglichst vieler Teile erreichen, die sowohl Haltung, Ernährung, Testorganisation, Kenntnis der zu prüfenden Substanzen, analytische Kontrollen als auch Entnahme von Organproben einschließt. Der Biometrie kommt bei diesem Zusammenspiel der Disziplinen eine große Bedeutung zu, da sie eine exakte Organisation der Untersuchungen und die saubere Auswertung der Ergebnisse ermöglicht. Anhand von quantitativen, kurativen Testverfahren bei Ratten soll der Anteil der Statistik bei der Optimierung von Versuchen aufgezeigt werden.

Der Kolpokeratosetest zur Bestimmung der Vitamin-A-Aktivität von Substanzen, Präparaten und Lebensmitteln beruht auf der antimetaplastischen Wirkung von Vitamin A. Das squämöse Zellbild des Vitamin-A-Mangels entspricht dem einer verlängerten Brunst. Sobald bei einem Tier im Vitamin-A-Mangel ein reines Schollenstadium auftritt, wird es in den Versuch genommen. Um die statistische Auswertung der Ergebnisse mit dem 6-Punkt-Parallel-Verfahren vornehmen zu können, werden die Dosierungen geometrisch angeordnet. Als Parameter wird die Zeit in Tagen von Beginn der Dosierung über die Normalisierung des Abstrichbildes bis zum Wiederauftreten von squämösen Zellen nach dem Vitamin-A-Verbrauch ermittelt.

Die Wirksamkeit einer Vitamin-A-Tropfenlösung (Probe) wurde im Vergleich zu reinstem Vitamin-A-Acetat ($2906 \cdot 10^3$ IEA · g⁻¹) ermittelt. Die statistische Auswertung ergab, basierend auf der chemischen Analyse, ein

Tab. 13. Biologische Wirksamkeit von Vitamin-A-Palmitat-Isomeren. Methode: Epithelschutztest bei Ratten. Versuchsanlage: Für Auswertung mit 6-Punkt-Parallel-Line-Assay.

Vit.-A-Palmitat-Isomere	Reinheit	Rel. biol. Wirksamkeit (Vertrauensgrenzen, P 0,05)
all-trans	99,2 % (GC)	100,0 %:
13-mono-cis	99,2 % (HPLC, Fl. %)	77,3 % (71,6–83,4 %)
11-mono-cis	98,2 % (HPLC, Fl. %)	75,0 % (71,7–78,5 %) 36,3 % (33,5–39,4 %) 34,4 % (33,5–35,4 %)

Wirksamkeitsverhältnis von 1:1,03 (1,01–1,05; P 0,05) bei einem Standardfehler von 0,9 %. Mit Hilfe der Prüfparameter wurde gezeigt, daß eine gute Dosis-Wirkungs-Beziehung vorliegt, die Regressionsgeraden parallel verlaufen und nicht gekrümmt sind. Der Quotient aus Standardabweichung und Steigung ($s/b = \lambda$) stellt ein Empfindlichkeitsmaß dar und lag mit 0,06 weit unter dem noch zulässigen Wert von 0,3.

Mit dieser Methode wurde auch die Aktivität der 3 mono-cis- und 3 di-cis-Isomeren von Vitamin-A-Acetat und Vitamin-A-Palmitat im Vergleich zu all-trans-Verbindungen ermittelt. Die Ergebnisse sollen demnächst publiziert werden. Die gute Reproduzierbarkeit der Methode zeigte sich beim wiederholten Vergleich des 13-mono-cis- und 11-mono-cis-Isomeren von Vitamin-A-Palmitat (Tab. 13).

Mit dem Röntgentest lassen sich Vitamin-D-Aktivitäten der Vitamine D₃ und D₂ sowie von Metaboliten und Lebensmitteln bestimmen. In diesem Test wird die Vitamin-D-abhängige Verkalkung der Epiphysenfuge der Tibia beurteilt.

Der Test soll mit der Prüfung eines Vitamin-A,D₂-Konzentrates für die Margarineherstellung und des Vitamin-D₃-Gehalts in Milch-Drink (UP) vorgestellt werden. Die Anlage des Testes erfolgt so, daß die statistische Auswertung der Ergebnisse mit Hilfe des 6-Punkt-Parallel-Verfahrens erfolgen kann. Die Dosierungen werden in geometrischer Reihe angeordnet und richten sich nach der physikalisch-chemischen Analyse. Nach 7tägiger Applikation werden die Tiere geröntgt, und der Verkalkungsgrad wird nach einer 12teiligen Skala eingestuft (23). Um jede Kontamination erkennen zu können, werden auch unbehandelte Tiere mitgeführt, deren Epiphysenfugen frei von Schatten sein sollten.

Die statistische Auswertung ergab ein Wirksamkeitsverhältnis von 1:1,05 (0,98–1,13; P 0,05) bei einem Standardfehler von 3,8 %. Bei Anwendung der Prüfverfahren sollte die Nullhypothese im Falle der kombinierten Steigung, als Hinweis auf eine gute Dosis-Wirkungs-Beziehung, zu verwerfen sein. Bei den Parametern Parallelität und Krümmung bestätigt die Nullhypothese, daß die Geraden parallel verlaufen und nicht gekrümmt sind.

Der Gesetzgeber erlaubt bei Milch ein Über- oder Unterschreiten des Gehaltes um 15 %. Wird das Lebensmittel appliziert und nicht der extrahierte Wirkstoff, dann handelt es sich um eine Aktivitäts- und keine Gehaltsbestimmung. Die hohe Aktivität konnte erklärt werden, nachdem

Tab. 14. Einfluß der Lagerungstemperatur von Vitamin D₃ in öliger Lösung auf das Isomerisierungsverhältnis von Vitamin D₃ zu Prä-Vitamin D₃.

Temperatur °C	Anteile in %		Zeit zur Einstellung des Gleichgewichtes
	Prä-Vitamin D ₃	Vitamin D ₃	
0	4	96	ein Jahr
20	7	93	ein Monat
40	11	89	3,5 Tage
80	22	78	0,1 Tage
120	35	65	7 Minuten

Nach Literaturangaben beträgt die biologische Wirksamkeit von Prä-Vitamin D₃ 1/3–1/2 der von Vitamin D₃.

auch die Wirksamkeit der nicht mit dem Vitamin-A,D₃-Konzentrat angereicherten Milch bestimmt worden war. Die über +15 % hinausgehende Abweichung war auf den Grundgehalt der angelieferten Milch zurückzuführen.

Die relative Wirksamkeit einer Vitamin-D-Probe hängt auch weitgehend von der Qualität des Standards ab. Es ist deshalb wichtig, den gelösten Vitamin-D₃-Standard bei 0 °C aufzubewahren, damit das Isomerenverhältnis Prä-Vitamin D₃:Vitamin D₃ konstant 4:96 beträgt. Temperaturerhöhungen haben eine Veränderung dieses Verhältnisses zugunsten des Prä-Anteiles zur Folge (Tab. 14). Aktivitätsmessungen zwischen solchen bei 0 °C und 40 °C gelagerten Proben ergaben bei einer nur kleinen Prä-Vitamin-D₃-Differenz von 9 % eine unerwartet große Abnahme der Wirksamkeit (Tab. 15).

Wurden aber die Standardverdünnungen konstant bei 0 °C aufbewahrt, dann ließen sich über Jahre hinaus nicht nur relativ, sondern auch absolut gleiche Ergebnisse erzielen (Tab. 16).

Schlußfolgerungen

An ausgewählten Beispielen wurde versucht, die Vielschichtigkeit eines Tierversuches aufzuzeigen. Es ist ein beschwerlicher Weg von der Bereitstellung der Versuchstiere bis zur Bestimmung der verschiedenen Parameter und der statistischen Auswertung der Ergebnisse.

- Die Überprüfung der aufgestellten Hypothese macht ein geeignetes Modell erforderlich.
- Die Optimierung des tierexperimentellen Teiles einer Untersuchung ist nur durch sorgfältiges Planen und sachgemäßes Einsetzen der Versuchstiere möglich.
- Die für das Experiment geeignete Spezies und der passende Stamm sind auszuwählen.
- Die Durchführung spezieller Experimente verlangt die Vorbereitung der Tiere in der Zuchtstation.
- Im Tierlaboratorium sind die Versuchstiere an die veränderten Haltungsbedingungen zu gewöhnen.

Tab. 15. Untersuchung des Einflusses der Lagerungstemperatur (0 °C und 40 °C) auf die Isomerisierung von Vitamin D₃ in öiger Lösung und auf die relative biologische Wirksamkeit im kurativen Röntgentest bei Ratten.

Kurativer Röntgentest Vers.-Nr.	Verhältnis Vit. D ₃ :Prä-Vit. D ₃	Lagerung bei 0 °C		Δ Prä-D ₃	Relative Wirksamkeit (Vertrauensgrenzen, P 0,05)
		Lagerung bei 0 °C	Lagerung bei 40 °C		
I	95,7:4,3	86,0:14,0	84,0:16,0	9,7 %	1:0,64 (0,52-0,73)
II	93,2:6,8	84,0:16,0	85,4:14,6	9,2 %	1:0,63 (0,63-0,76)
III	93,5:6,5	85,4:14,6	85,4:14,6	8,1 %	1:0,63 (0,64-0,74)

Tab. 16. Reproduzierbarkeit von Ergebnissen des kurativen Röntgentests bei Ratten. Mittlere Scoring-Werte des Verkalkungsgrades der Epiphysenfuge der Tibia (12teilige Skala nach Bourdillon et al.) des Standardpräparates Vitamin D₃ krist. Lagerung bei 0 °C: D₃ + Prä-D₃ = 95 % + 5 %.

Vitamin D₃ krist., gelöst in 0,1 ml Olivenöl Ph.H.VI

Jahr	Vers.-Nr.	0,7 IED ₃	1,05 IED ₃	1,575 IED ₃
1977	R 8	3,1	5,9	9,1
	R 14	3,1	5,8	9,2
1978	R 10	3,1	6,0	9,1
	R 24	3,0	6,0	8,8
1979	R 2	3,4	6,0	9,1
	R 8	3,2	6,1	9,3
1980	R 20	3,3	6,4	9,1
	R 30	3,2	6,1	9,1
1981	R 5	3,4	6,3	9,3
	R 2	3,25	6,5	9,2
1982	R 15	3,3	6,4	9,5
	R 42	3,1	6,3	9,1

Vitamin D₃ krist., gelöst in 0,1 ml Äthanol/Propylenglykol 1:10

1984	R 6	3,5	6,5	10,1
	R 12	3,6	7,1	9,6

- Bei Versuchen, die eine gute Reproduzierbarkeit verlangen, sind Spezialdiäten einzusetzen.
- Die Überprüfung der Vollwertigkeit geschieht durch Erfassen des Körpergewichts, Heilung oberflächlicher Wunden, Beurteilung klinisch-chemischer Parameter, Histologie wichtiger Organe.
- Den Interaktionen von Wirkstoffen in einer Diät ist besondere Aufmerksamkeit zu widmen.
- Eingesetzte Präparate müssen charakterisiert und Lösungen analytisch kontrolliert werden.
- Um die Aussagekraft angewandter Methoden zu erhöhen und Tiere sowie Kosten zu sparen, werden physiologische und biochemische Parameter gleichzeitig bestimmt.
- Die Streuung der Resultate wird reduziert, indem Tiere einheitlicher Reaktionslage in den Versuch genommen werden. Das geschieht durch objektive Messung und subjektive Tierbeobachtung.
- Die Anästhesie, die Entnahme von Organproben sowie deren Aufbereitung und Aufbewahrung können von wesentlichem Einfluß auf die zu bestimmenden Parameter sein.
- Bei der Verbesserung der Aussagekraft von Tierversuchen kommt der Biometrie eine wichtige Aufgabe zu.
- Versuche werden so geplant, daß sie nach der vorher festgelegten statistischen Methode ausgewertet werden können.
- Die Güte einer Untersuchung wird mit Hilfe statistischer Prüfverfahren beurteilt.

In der langen Kette der einzelnen Phasen sollte an keiner Stelle ein schwaches Glied enthalten sein.

Literatur

1. Wagner EJ, Manning PJ (1976) *The Biology of the Guinea Pig*. Academic Press New York San Francisco London
2. Weiser H (1978) Biologische Qualitätskontrolle mit optimierten Modellen. In: Weihe WH (Hrsg) *Das Tier im Experiment*. Verlag Hans Huber, Bern Stuttgart Wien
3. Mannstaedt N (1981) Variabilität biologischer Merkmale bei Meerschweinchen nach Ernährung mit unterschiedlichen Alleinfuttermitteln verschiedener Hersteller. *Vet Med Diss*, Berlin J Nr 1035
4. Drepper K, Weik H (1972) Standard- und Spezialdiäten für warmblütige Versuchstiere. *Schriftenreihe Versuchstierk* 1:19–24
5. Clarke HE, Caotes ME, Eva JK, Ford DJ, Milner CK, O'Donoghue PN, Scott PP, Ward RJ (1977) Dietary standards for laboratory animals: report of the Laboratory Animals Centre Diets Advisory Committee. *Lab Animals* 11:1–28
6. Drepper K, Weik H (1971) In: Deutsche Forschungsgemeinschaft, Grundinformation über Versuchstierfragen – Anforderungen an Erbgut, Gesundheitszustand, Ernährung und Haltungsbedingungen von Versuchstieren – Kommission für Versuchstierforschung, Mitt 1
7. Sakaguchi E, Becker G, Rechkemmer G, Engelhardt W (1985) Volume, solute concentrations and production of short-chain fatty acids in the caecum and upper colon of the guinea pig. *Z Tierphysiol Tierernährg u Futtermittelkd* 54:276–285
8. Sakaguchi E, Heller R, Becker G, Engelhardt W (1986) Retention of digesta in the gastrointestinal tract of the guinea pig. *J Anim Physiol Anim Nutr* 55:44–50
9. Payne PR (1967) The relationship between protein and calorie requirement of laboratory animals. In: Conalty HL (ed) *Husbandry of laboratory animals*. Academic Press, London New York
10. Hegsted DM (1957) Theoretical estimates of the protein requirements of children. *J Am Diet Assoc* 33:225–232
11. Weik H, Drepper K (1970) Fütterung von Laboratoriumstieren in der Zucht und im Experiment. *Z Versuchstierk* 12:379–383
12. Keller P (1979) Enzymaktivitäten bei kleinen Haus- und Laboratoriumstieren: Organanalysen, Plasmaspiegel und intrazelluläre Verteilung. *Kleintier-Praxis* 24:51–68
13. Weiser H, Vecchi M, Schlachter M (1985) Stereoisomers of α -Tocopheryl Acetate III. Simultaneous Determination of Resorption-Gestation and Myopathy in Rats as a Means of Evaluation Biopotency Ratios of all-rac- and RRR- α -Tocopheryl Acetate. *Internat J Nutr Res* 55:149–158
14. Weiser H, Vecchi M, Schlachter M (1986) Stereoisomers of α -Tocopheryl Acetate IV. USP Units and α -Tocopherol Equivalents of all-rac-, 2-ambo- and RRR- α -Tocopherol Evaluated by Simultaneous Determination of Resorption-Gestation, Myopathy and Storage Capacity in Rats. *Internat J Nutr Res* 56:45–56
15. Weiser H, Kormann AW (1985) Interrelationships between Polyunsaturated Fatty Acids and Vitamin E. XIII International Congress of Nutrition in Brighton, August 18–23
16. Soma LW (1971) *Textbook of veterinary anaesthesia*. The Williams and Wilkins Company, Baltimore
17. Erhardt W, Wriedt-Lübbe I, Schmeller ML, Neumann G, Pfeiffer C, Pfeiffer U, Tölle W, Blümel G (1979) Anaesthesiologische Erfahrungen in der experimentellen Chirurgie. *Anaesthetist* 28:359–367

18. Green CJ (1975) Neuroleptanalgesic drug combinations in the anaesthetic management of small laboratory animals. *Lab Animals* 9:161-178
19. Boltz, W (1961) Allgemeinnarkose beim Tier. Enke-Verlag, Berlin.
20. Westhues M, Fritsch R (1961) Die Narkose des Tieres, Band II. Paul-Parey-Verlag, Berlin
21. Wasel E (1977) Narkose bei kleinen Heimtieren. *Der praktische Tierarzt* 58:127-131
22. Tobler-Meyer B (1977) Vorschläge zur Narkose bei Kaminchen, Meerschweinchen und kleinen Nagern. *Kleintierpraxis* 22:335-346
23. Bourdillon RB, Bruce HM, Fischmann C, Webster TA (1932) The Quantitative Estimation of Vitamin D by Radiography. Med Res Council; Special Report Series, No 158, Her Majesty's Stationery Office, London

Eingegangen 24. Februar 1989

Anschrift des Verfassers:

Dr. H. Weiser, Abteilung für Vitamin- und Ernährungsforschung, F. Hoffmann-La Roche & Co., A. G., 4002 Basel, Schweiz