Ein Modell zur langfristigen parenteralen Ernährung der Ratte

U.		Brenner
J.M.		Müller
H.W.		Keller
M.		Walter

Chirurgische Universitätsklinik Köln (Direktor: Prof. Dr. Dr. H. Pichlmaier)

Schlüsselwörter

Parenterale Ernährung
Ratten
Stickstoffbilanz

Zusammenfassung

Es wurde ein Modell zur parenteralen Ernährung der nicht fixierten oder sedierten Ratte, basierend auf einfachsten technischen Hilfsmitteln und auf Nährlösungen, wie sie in jeder Klinik greifbar sind, erarbeitet. Die durchschnittliche Überlebenszeit beträgt 6–8 Wochen. Die Ratten nehmen unter der parenteralen Ernährung an Gewicht zu und sind in einem guten gesundheitlichen Zustand. Die kumulative Stickstoffbilanz ist bei einer medianen Retention von 95 % der zugeführten Menge hoch positiv.

Sonderdruckbestellungen an: Dr. U. Brenner, Chirurgische Universitätsklinik Köln-Lindenthal, Joseph-Stelzmann-Str. 9, D-5000 Köln 41

Summary and Key Words

A model has been developed for the intravenous feeding in unrestrained rats, with use of simple technique and nutritional solutions, available in every hospital. The major survival time is 6–8 weeks. During the parenteral nutrition the rats gain weight and are in a excellent general health. The cumulative nitrogen balance is with a 95 % retention highly positive.
Parenteral nutrition – Rats – Nitrogen balance

Einleitung

Zur Untersuchung verschiedenster Fragestellungen auf dem Gebiet der experimentellen parenteralen Ernährung, insbesondere des uns interessierenden Tumorstadiums bei verschiedenen Ernährungsformen, hat sich das von Steiger [5] beschriebene Rattenmodell bewährt [2, 4, 7]. Nachteilig erschien aus unserer Sicht der mit dieser Methode verbundene Aufwand, wie z. B. die komplizierte Halfterkonstruktion und Halterung zum Schutz des Venenkatheters sowie die Verwendung speziell für Ratten hergestellter Nährlösungen. Wir versuchten deshalb das Modell dahingehend zu modifizieren, daß es bei geringen Kosten eine mehrwöchige parenterale Ernährung mit einfachen Hilfsmitteln erlaubt, wie sie in jeder Klinik erhältlich sind. Unter aseptischen Bedingungen wird ein 1 cm langer Hautschnitt zwischen dem Kieferwinkel und der Claviculamitte gelegt. Die V. jugularis interna wird freipräpariert und angeschlungen. Vom gleichen Schnitt aus wird stumpf unter dem Panniculus carnosus ein Hauttunnel zur Nackenregion präpariert. Hier wird die Haut auf etwa 2 mm inzidiert. Das freie Ende des Katheters wird mit einem Klemmchen gefaßt und vom Nacken zum Hals durchgezogen. Man

unterbindet die V. jugularis interna nach kranial und eröffnet sie distal der Ligatur. Der Katheter wird mit Kochsalz gefüllt und je nach Größe des Tieres 3–4 cm weit in die Vene vorgeschoben. Seine Spitze kommt dann, wie wir an seziierten Tieren sehen konnten, regelmäßig in der V. cava superior kurz vor dem rechten Vorhof zu liegen. Der Katheter wird mit einer doppelten Ligatur in die Vene eingebunden. Man näht dann den Steg der Tuberkulinspritze mit einem nicht resorbierbaren Faden auf der Rückenhaut der Ratte fest. Der Verlauf des Katheters in der Halsfett-Tasche wird nicht gestreckt, sondern bogenförmig hergestellt.

Methodik

Versuchstiere: Für die parenterale Ernährung im Rattenmodell hat sich die Rasse Sprague-Dawley als sehr geeignet erwiesen [3], Es handelt sich hierbei um eine Auszuchtratte, die leicht anzüchtbar ist und bei Versuchsbeginn im Alter von 3 Monaten ein Gewicht von 400–500 g hat. Kathetermaterial und Implantationstechnik: Als Katheter verwenden wir einen Siliconschlauch mit einem Innendurchmesser von 0,7 mm und einem Außendurchmesser von 1,2 mm, der als Meterware erhältlich ist. Der Siliconschlauch wird auf eine Länge von 14 cm zurechtgeschnitten und in ein Ende eine 12er-Kanüle mit 0,7 mm Außendurchmesser eingeführt und verklebt.¹ Zur Fixation des Katheters an der Ratte wird eine Tuberkulinspritze benutzt. Nach Entfernung des Kolbens wird sie auf 4,5 cm gekürzt. In ihren Steg werden 4 Löcher gebohrt. Sie dienen zur Befestigung der Spritze am Nackenfell der Ratte. Der Konus der präparierten Kanüle wird in die abgesägte Spritze geklebt¹ (Abb. 1). Nach 24 Stunden wird der Katheter gas-sterilisiert und ist dann gebrauchsfertig. Als venöser Zugang eignet sich bei der Ratte die V. jugularis interna.

¹ Klebstoff: Cyanoacrylat

Abb. 1. Zentralvenöser Katheter.

- A. Kanüle (No. 12)
- B. Tuberkulinspritze
- C. Siliconschlauch

Brenner et al.: Ein Modell zur langfristigen parenteralen Ernährung der Ratte

203

Tabelle I. Nährlösung zur parenteralen Ernährung der Ratte

kg KG/Tag

Wasser Energie Stickstoff

140 ml 140 kcal

0,6 g

Abb. 2. Katheterimplantation.

Die Wunden werden mit physiologischer Kochsalzlösung, in der ein Antibiotikum aufgelöst wurde, gespült und dann schichtweise verschlossen (Abb. 2).

Tierhaltung und Infusionsschema: Die Tiere werden einzeln in Stoffwechselkäfigen gehalten, die eine Bilanzierung von Stuhl und Urin erlauben. Außer der parenteralen Ernährung dürfen sie lediglich Wasser zu sich nehmen. Die Zufuhr der Nährlösung erfolgt kontinuierlich über 24 Stunden mittels einer Perfusorspritze und einem Injektomat. Die Infusionsleitung wird in etwa 40 cm Höhe senkrecht über dem Tier federnd an einem Gummi aufgehängt und hat eine Gesamtlänge von etwa 1,5 m (Abb. 3).

¹ Aminomel® L10 o. KH mit Elektrolyten; Salvia, Homburg/Saar

- 2 Intralipid® 20% Vitrum; Kabi Vitrum, München
- 3 Multibionta®, Merck, Darmstadt/Vitratra Adult; Kabi Vitrum, München
- 4 Addel®, Kabi Vitrum, München

Bei der Herstellung der Nährlösung (Tab. I) gehen wir von einem Energiebedarf von 140 kcal/kg KG/Tag und einem Stickstoffbedarf von 0,6 g/kg KG/Tag aus [3]. Neben den Elektrolyten werden auch täglich Spurenelemente und Vitamine zugeführt. Die Nährlösung, die ausschließlich aus Präparaten besteht, die auch in der Klinik Verwendung finden, wird täglich unter sterilen Bedingungen für jeweils mehrere Tiere gemischt und in Perfusorspritzen aufgezogen. Da wir zu Beginn der parenteralen Ernährung eine Gewichtszunahme anstreben, verabreichen wir das 1,2fache des errechneten Bedarfs.

Abb. 3. System zur parenteralen Ernährung von Ratten.

Ergebnisse

Für Untersuchungen zum Tumorwachstum bei parenteraler Ernährung am Rattenmodell ist je nach Tumortyp und Versuchsanordnung eine Überlebenszeit der Tiere von 2–4 Wochen notwendig. Mit dem oben dargestellten Modell betrug bei 30 Sprague-Dawley-Ratten die durchschnittliche Überlebenszeit $37,1 \pm 19,6$ Tage. 77 % der Tiere lebten länger als 6 Wochen. Die Todesursache bei den 7 verstorbenen Tieren ist in 3 Fällen auf ein Verstopfen des zentralen Venenkatheters und in 2 Fällen auf eine V.-cava-superior-Thrombose zurückzuführen. Bei 2 weiteren Tieren ist die Todesursache unklar, die Sektion ergab intakte Verhältnisse am Katheter sowie eine offene Strombahn der V. cava.

Bei den überlebenden Tieren betrug die durchschnittliche Gewichtszunahme $29,7 \pm 7,6$ g pro Woche. Wir verzichteten auf eine tägliche Gewichtskontrolle, da jede Manipulation an der Ratte mit einem erheblichen Streß für das Tier verbunden ist. Eine Infusionsmenge von durchschnittlich 70 ml pro 24 Stunden wurde von den 400–500 g schweren Ratten problemlos toleriert. Die tägliche Urinmenge betrug $61,7 \pm 13,2$ ml. Bei 17 Tieren wurde nach einer Adaptationsphase von 7 Tagen an 14 aufeinanderfolgenden Tagen die Stickstoffausscheidung im Urin bestimmt und die kumulative Stickstoffbilanz für jeweils eine Woche berechnet. Diese war mit $+2,31 \pm 0,53$ g in der ersten Woche und $+2,40 \pm 0,67$ g in der

204

Brenner et al.: Ein Modell zur langfristigen parenteralen Ernährung der Ratte

zweiten Woche hoch positiv. Im Mittel wurden 95 % des mit der Aminosäurelösung zugeführten Stickstoffs retiniert.

Diskussion

Wie die oben dargestellten Ergebnisse zeigen, erlaubt das von uns vorgestellte einfache Modell eine mehrwöchige parenterale Ernährung von Ratten bei einer geringen Ausfallrate. Die erreichte Lebenszeit ist für Versuche zur Untersuchung des Tumorwachstums bei parenteraler Ernährung ausreichend. Voraussetzung ist jedoch, daß die von uns geschilderte Technik exakt eingehalten wird. Nach unseren Erfahrungen eignet sich nur Silicon als Kathetermaterial. Katheter aus PVC oder Polyäthylen haben sich nicht bewährt. PVC erwies sich als nicht flexibel genug. Von 30 Tieren, denen wir einen PVC-Katheter implantiert hatten, verloren wir 12 innerhalb der ersten postoperativen Woche.

Der starre Katheter hatte bei den in ihrer Bewegungsfreiheit nicht eingeschränkten Tieren den rechten Vorhof oder die V cava superior penetriert. Bei 13 Ratten, denen ein Polyäthylen-Katheter implantiert worden war, kam es bereits wenige Tage nach Beginn der parenteralen

Ernährung zu wiederhol-ten Katheterverschlüssen. In 4 Fällen propfte sich hieraus eine V.-cava-superior-Thrombose auf. Die Überlebenszeit dieser Tiere betrug maximal 10–14 Tage.

Entscheidend ist auch, daß der Katheter bogenförmig in die Halsfett-Tasche gelegt wird, damit er auch bei sehr agilen Tieren und extremer Drehbewe-gung des Halses nicht verrutschen kann. Die Fixation des Katheters auf dem Rücken mit Hilfe einer Tuberkulinspritze verhindert ohne aufwendige Halfterkonstruktion eine Torsion des Katheters und läßt auch nicht zu, daß das Tier den Katheter durchbeißt. Eine relativ lange Infusionsleitung, an einem einfachen Gummi aufgehängt, macht jede Bewegung der Ratte mit und verhindert ein Abknicken des Infusions-schlauchs.

Die Verwendung anderer Rattenstämme hat sich in unseren Händen nicht bewährt. Von jeweils 10 Tieren des Stammes Holtzmann oder Long-Evans, die nach der oben beschriebe-nen Methode parenteral ernährt wurden, überlebte keines länger als 3 Wochen. Häufig zeigten die Tiere eine Glukosu-rie. Ferner traten in 8 Fällen thrombo-embolische Komplika-tionen auf, die zum Tod führten.

Das angegebene Infusionsschema wurde aufbauend auf den Erfahrungen von Neuhäuser [3] mit speziell für Ratten konzi-pierten Lösungen empirisch erarbeitet. Wir hatten zunächst entsprechend den Empfehlungen aus der Literatur [1,5,6] mit einer parenteralen Ernährung begonnen, die ausschließlich auf der Zufuhr von Aminosäuren, Glukose, Natrium, Kalium, Chlorid, Kalzium, Magnesium und einem Vitaminpräparat basierte. Keines der so ernährten Tiere überlebte länger als 10 Tage.

Wir können diese Erfahrung nur dadurch erklären, daß von den oben genannten Autoren ein anderer Rattenstamm ver-wendet wurde, die zur parenteralen Ernährung verwandten Präparate in ihrer spezifischen Zusammensetzung wesentliche Unterschiede aufwiesen bzw. die publizierten Infusionspläne unvollständig waren. Nachdem ein Teil der Glukoselösung durch eine Fettemulsion ersetzt und gleichzeitig die Kaliumzu-fuhr reduziert wurde, waren die Tiere zunächst 14 Tage in gutem Zustand, bekamen dann jedoch Diarrhoen und verstar-ben innerhalb von 48 Stunden. Wurden dem Lösungsgemisch keine Spurenelemente und Vitamine zugefügt, begannen die Tiere ihre Haare zu fressen. Einige von ihnen verstarben am Ileus aufgrund eines Haarbezoars. Bei der jetzt gewählten Form der parenteralen Ernährung erfahren die Tiere eine Gewichtszunahme, die geringfügig über dem Nomogramm liegt. Bei etwa einem Viertel von ihnen ist eine geringgradige Fettleber vom nutritiv-toxischen Typ histologisch nachzuwei-sen, die wir auf die von uns gewollte, über dem Bedarf liegende Zufuhr der Energieträger, insbesondere jedoch auf den hohen Glukoseanteil am Nährlösungsgemisch zurück-führen.

Literatur

Dalton, R. G.; Touraine, J. L.; Wilson, T. R.: A simple technique for continuous intravenous infusion in rats. *J. Lab. clin. Med.* 74: 813 (1969).

Daly, J. M.; Reynolds, H. M.; Rowlands, B. J.; Dudrick, S. J.; Copeland, E. M.: Tumor growth in experimental animals. Nutritional manipulation and chemotherapeutic response in the rat. *Ann. Surg.* 191: 316 (1980).

Neuhäuser, M.: *Physiol.-chem. Institut der Universität Mainz: Persönliche Mitteilung.*

Oram-Smith, J. C; Stein, T. P.; Wallace, H. W.; Mullen, J. L.: Intravenous nutrition and tumor host protein metabolism. *J. Surg. Res.* 22: 499 (1977).

Steiger, E.; Vars, H. M.; Dudrick, S. J.: A technique for long-term intravenous feeding in unrestrained rats. *Arch. Surg.* 104: 330 (1972).

Stein, T. P.; Oram-Smith, J. C; Leskiw, M. J.; Wallace, H. W. et al.: Effect of nitrogen and caloric restriction on protein synthesis in the rat. *Am. J. Physiol.* 230:1321 (1976).