

**Einfluss von Seltenen Erden auf die
Körperzusammensetzung und Glukosetoleranz
von Ratten**

von Dominik Daniel Tobias Pommerening

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität
München

**Einfluss von Seltenen Erden auf die
Körperzusammensetzung und Glukosetoleranz
von Ratten**

von
Dominik Daniel Tobias Pommerening
aus Hameln

München 2017

Aus dem Veterinärwissenschaftlichen Department der Tierärztlichen
Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München

Lehrstuhl für Tierernährung und Diätetik

Angefertigt unter der Leitung von Univ.-Prof. Dr. Ellen Kienzle

Mitbreuung durch Prof. Dr. Walter Rambeck Dr. Sylvia von Rosenberg

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Joachim Braun

Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. Ellen Kienzle

Korreferent: Priv.-Doz. Dr. Stefan Unterer

Tag der Promotion: 11. Februar 2017

Für meine Mutter und meinen Vater

INHALTSVERZEICHNIS

I.	EINLEITUNG	1
II.	LITERATURÜBERSICHT	3
2.1	Seltene Erden	3
2.1.1	Einteilung und Stellung im Periodensystem	3
2.1.2	Chemische und physikalische Eigenschaften	3
2.1.3	Biochemische und Pharmakologische Eigenschaften mit Relevanz für die vorliegende Dissertation	5
2.1.4	Stoffwechsel und Toxizität	6
2.1.5	Landwirtschaftliche Bedeutung der Seltenen Erden	8
2.1.6	In-vivo-Untersuchungen zu Seltenen Erden.....	9
2.2.	Theorien zur Wirkung der Seltenen Erden auf die Leistung.....	12
2.2.1	Seltenen Erden und ihre lokale Wirkung im Gastrointestinaltrakt.....	12
2.2.2	Seltenen Erden und ihre Wirkung auf den Intermediärstoffwechsel	13
2.2.2.1	Wirkung der Seltenen Erden auf verschiedene Hormone und Enzyme	13
2.2.2.2	Seltene Erden und ihre Wirkung auf den Glukosestoffwechsel	15
2.2.3	Untersuchungen zur Wirkung von oral verabreichten Seltenen Erden auf den Glukosehaushalt.....	17
III.	TIERE, MATERIAL UND METHODEN	19
3.1	Versuchstiere	19
3.2	Versuchstierhaltung	19
3.3	Tierfutter	20
3.4	Versuchsaufbau	24
3.4.1	Gruppeneinteilung.....	24

3.5	Versuchsablauf	26
3.5.1	Technik der Blutentnahme	26
3.5.2	Versuchsende	27
3.6	Ganzkörperanalyse	27
3.6.1	Weender Analyse	28
3.6.1.1	Bestimmung der Ursprungssubstanz (US) und der Trockensubstanz (TS)	28
3.6.1.2	Bestimmung der Rohasche (Ra)	28
3.6.1.3	Bestimmung des Rohfetts (Rfe)	29
3.6.1.4	Bestimmung des Rohproteins (Rp).....	30
3.7	Glukosetoleranztest und Insulinmessung	30
3.8	Statistische Auswertung.....	36
3.8.1	Mittelwertvergleiche	36
IV.	ERGEBNISSE	37
4.1	Fütterungsversuch mit Ratten	37
4.1.1	Allgemeinzustand der Ratten	37
4.1.2	Gewichtszunahme der Ratten.....	37
4.1.3	Futteraufnahme	39
4.2	Glukosetoleranztest	41
4.2.1	Glukosetoleranztest mit oraler Glukoseeingabe	41
4.2.2	Orale Eingabe von Glukose- und REE-Citrat-Lösung.....	43
4.2.3	Intraperitoneale Glukose-Applikation.....	47
4.3	Insulinmessungen	49
4.4	Protein- und Fettgehalt der Restkörper.....	51
V.	DISKUSSION	55
5.1	Kritik der Methoden	55
5.1.1	Zum Tiermodell	55
5.1.2	Zur Fütterungsart	56

5.1.3	Zum Glukosetoleranztest.....	57
5.2	Besprechung der Ergebnisse	58
5.2.1	Besprechung der Ergebnisse der Glukosetoleranztests	58
5.2.2	Besprechung der Ergebnisse der Mastleistung und der Ganzkörperanalyse.....	60
5.2.3	Möglichkeiten der Wirkungsweise der Seltenen Erden.....	62
5.2.3.1	Mögliche lokale Auswirkungen auf die Darmwand	62
5.2.3.2	Mögliche Auswirkungen auf Enzyme	65
5.2.4	Schlussfolgerung.....	67
VI.	ZUSAMMENFASSUNG	68
VII.	SUMMARY.....	71
VIII.	LITERATURVERZEICHNIS.....	73
IX.	DANKSAGUNG	82

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Auflistung der Ergebnisse von westlichen in-vivo-Untersuchungen an Ferkeln und Broilern zu Gesamtzunahmen (GZ) und Futtermittelverwertung (FCR) in prozentualem Unterschied zur Kontrollgruppe.....	9
Tabelle 2: Zusammensetzung des Versuchsfutters ohne Zusatz an REE.....	21
Tabelle 3: Bestandteile der Mineralfuttermittelvermischung.....	21
Tabelle 4: Zusatzstoffe des Versuchsfutters.....	22
Tabelle 5: Zusatzstoffe der Mineralfuttermittelvermischung	22
Tabelle 6: Inhaltsstoffe der Futtermischung (analysiert)	23
Tabelle 7: Inhaltsstoffe der Mineralfuttermittelvermischung (analysiert)	23
Tabelle 8: Konzentration des beigemischten REE-Citrats in mg pro kg Versuchsfutter	23
Tabelle 9: Zusammensetzung der Seltene- Erden-Verbindung: REE-Citrat.	24
Tabelle 10: Gruppeneinteilung in Kontrollgruppe und Versuchsgruppen, sowie deren Gehalte an REE-Citrat und die jeweilige Fütterungsart.....	25
Tabelle 11: Glukosetoleranztests.	31
Tabelle 12: Menge an REE-Citrat in mg und Glukose in g, die oral eingegeben wurde, aufgelistet pro Tier der Gruppe L250 ad lib und L1250 ad lib (n=10), der Gruppe L250 pf (n=13) und der Gruppe L1250 pf (n=12).....	31
Tabelle 13: Durchschnittliches Gewicht in g aller Tiere der Kontrollgruppe und der Versuchsgruppen zu Versuchsbeginn an Tag 0, an Tag 33, an Tag 81 und zu Versuchsende an Tag 133... ..	38
Tabelle 14: Durchschnittliche tägliche Gewichtszunahme in g pro Tier der Kontrollgruppe und der Versuchsgruppen über den gesamten Versuch.....	39
Tabelle 15: Mittlere tägliche Futteraufnahme in g aller Käfige der Kontrollgruppe und der Versuchsgruppen in verschiedenen Abschnitten des Versuches.....	40
Tabelle 16: Gesamte Futteraufnahme in g der Kontrollgruppe und der Versuchsgruppen über den ganzen Versuch (Tag 0-133).....	40
Tabelle 17: Mittelwerte der Glukosekonzentration in mg/dl Blut der Kontrollgruppe und der Versuchsgruppen nach oraler Glukoseeinnahme.....	42
Tabelle 18: Mittelwerte der Glukosekonzentration in mg/dl Blut der Versuchsgruppen nach der oralen Einnahme von Glukose- (2g/kg) und REE-Citrat-Lösung (250mg/kg Futter).....	45
Tabelle 19: Mittelwerte der Glukosekonzentration in mg/dl Blut der Kontrollgruppe	

aus dem oralen Glukosetoleranztest und der Versuchsgruppen nach der oralen Eingabe von Glukose- (2g/kg) und REE-Citrat-Lösung (250mg/kg Futter).	46
Tabelle 20: Mittelwerte der Glukosekonzentration in mg/dl Blut der Kontrollgruppe und der Versuchsgruppen nach der intraperitonealen Glukoseapplikation.....	48
Tabelle 21: Mittelwerte der Glukosekonzentration in mg/dl Blut der Tiere 4,5,6,8,9&11 der Kontrollgruppe und der Tiere 39,40,41,43,44&45 der Gruppe L1250 ad lib.....	49
Tabelle 22: Mittelwerte der Insulinkonzentration im Blut der Tiere 4,5,6,8,9&11 der Kontrollgruppe und der Tiere 39,40,41,43,44&45 der Gruppe L1250 ad lib. Der Insulingehalt ist in ng/ml Serum angegeben.	50
Tabelle 23: Mittelwerte des Insulin/Glukose-Verhältnisses der Tiere 4,5,6,8,9&11 der Kontrollgruppe und der Tiere 39,40,41,43,44&45 der Gruppe L1250 ad lib. Die Werte sind in mg/dl *10 ⁻⁷ angegeben.	51
Tabelle 24: Mittelwerte des Proteingehalts im Restkörper der Kontrollgruppe und der Versuchsgruppen.....	52
Tabelle 25: Mittelwerte des Proteingehalts der weiblichen und männlichen Tiere der Kontrollgruppe und der Versuchsgruppen.....	52
Tabelle 26: Mittelwerte des Fettgehalts im Restkörper der Kontrollgruppe und der Versuchsgruppen.....	53
Tabelle 27: Mittelwerte des Fettgehalts der weiblichen und männlichen Tiere der Kontrollgruppe und der Versuchsgruppen.....	53
Tabelle 28: Mittelwerte des Gesamtenergiegehalts (Protein- und Fettgehalt) der Restkörper der Kontrollgruppe und der Versuchsgruppen.....	54
Tabelle 29: Mittelwerte der Area under the curve-Berechnung (AUC) der Glukosekonzentrationen vom Zeitpunkt T -15 bis T 180 der drei Glukosetoleranztests.....	68
Tabelle 30: Mittelwerte des Protein-, Fett- und Aschegehalts im Restkörper der Kontrollgruppe und der Versuchsgruppen bezogen auf die Ursprungssubstanz.....	69
Table 31: Average of the Area under the curve (AUC) calculation of all glucose tolerance tests in between T -15 and T 180.....	71
Table 32: Average of protein-, fat- and ash-content in % related to the original substance of the whole body in the groups of trial.....	72

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Gesamfutteraufnahme in g der Gruppen mit ad-libitum-Fütterung und pair-feed-Fütterung im Vergleich (MW±SD).	56
Abbildung 2: Mittelwerte der Area under the Curve (AUC) - Berechnung vom Zeitpunkt T-15 bis T180 aller Gruppen in den drei Glukosetoleranztests (MW±SD) .	60
Abbildung 3: Mittelwerte der Glukosekonzentration der Kontrollgruppe und der Versuchsgruppen vor und nach der oralen Glukosegabe (2g/kg KGW) und der intraperitonealen Glukosegabe (2g/kg) im Vergleich. Die Gruppen sind beim intraperitonealen Glukosetoleranztest zur Unterscheidung mit dem Kürzel IP (Intraperitoneal) versehen.	63
Abbildung 4: Vergleich der mittleren Glukosekonzentration der Kontrollgruppe (n=12) und aller Wirkstoffgruppen während der oralen Glukoseeingabe (MW _{Glu}) (2g/kg) (n=47) und während der Eingabe der oralen Glukose-(2g/kg) und REE-Citrat-Lösung (MW REE) (250mg/kg Futter) (n=45).....	64

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

α	Alpha
ad lib	ad libitum (nach Bedarf)
ALT	Alanin-Amino-Transferase
AP	Alkalische Phosphatase
Art.Nr.	Artikelnummer
AST	Aspartat-Aminotransferase
β	Beta
Ca^{2+}	Calcium
cAMP	cyclisches Adenosin-Monophosphat
cm	Zentimeter
Cu	Kupfer
CuSO_4	Kupfersulfat
dl	Deziliter
Dr.	Doktor
EIA	Enzyme Immuno Assay
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
et al.	et alii (Maskulinum), et aliae (Femininum), et alia (Neutrum) = "und andere"
FAL	Bundesforschungsanstalt für Landwirtschaft in Braunschweig
FCR	Feeding Conversion Ratio
G	Gauge
g	Gramm
GH	growth hormone (Wachstumshormon)

GIP	Glukoseabhängiges Insulinotrophes Peptid
GLP-1	Glukagon-like-peptide-1
Glu	Glukose
GZ	Gesamtzunahmen
h	Stunde
H ₂ O	Wasser
H ₂ SO ₄	Schwefelsäure
HRP	Horseradish peroxidase enzyme (Meerrettich-Peroxidase-Enzym)
K ⁺	Kalium
K ₂ SO ₄	Kaliumsulfat
kg	Kilogramm
l	Liter
La ³⁺	Lanthanoid-Ionen
Ln	Lanthanoide
LCD	Liquid Cristal Display
LD50	Lethale Dosis 50
m	Meter
Mg ²⁺	Magnesium
mg	Milligramm
min	Minute
ml	Milliliter
mm	Millimeter
MW	Mittelwert
n	Anzahl der Proben

N	Stickstoff
Na ⁺	Natrium
NH ₃	Ammoniak
NH ₄ OH	Ammoniumhydroxid
nm	Nanometer
Nr.	Nummer
OS	original substance
p	Irrtumswahrscheinlichkeit
Per Os	Orale Eingabe
pf	Pair-feeding
ppm	parts per million 10 ⁻⁶ gleicht µg/g
Pr ³⁺	Praeseodym
Ra	Rohasche
REE	Rare Earth Elements
REE-Ci	Rare Earth Elements-Citrat
Rfe	Rohfett
Rp	Rohprotein
SD	Standardabweichung
Sek	Sekunde
SPF	spezifisch pathogenfrei
T	Zeitpunkt
T ₃	Trijodthyronin
T ₄	Thyroxin
TP	Gesamtprotein
TS	Trockensubstanz

U/min	Umdrehungen pro Minute
US	Ursprungssubstanz
UV	Ultraviolet
γ -GT	Gamma-Glutamyltransferase
μ g	Mikrogramm
μ l	Mikroliter
μ m	Mikrometer

I. EINLEITUNG

In China werden Seltene Erden schon sehr lange in der Landwirtschaft und Tierproduktion eingesetzt. Seit den 70er Jahren wurden dort auch wissenschaftliche Untersuchungen durchgeführt, die teilweise herausragende Leistungssteigerungen sowohl in der Pflanzenproduktion (Xiong, 1995), als auch in der Gewichtszunahme und Futtermittelverwertung von Nutztieren (Shen et al., 1991; Chen & Xiong, 1994; Fan et al., 1997; Hu et al., 1999) zeigten. Die bisher durchgeführten Studien unter westlichen Bedingungen zeigten sehr unterschiedliche Ergebnisse (Rambeck et al., 1999; He & Rambeck, 2000; Schuller et al., 2002; Borger, 2003; Eisele, 2003; Halle et al., 2003; He et al., 2003; Knebel, 2004; Prause et al., 2004; Renard, 2005; Feldhaus, 2006; Förster et al., 2006; Franzke, 2007; He et al., 2008; van Gemmeren, 2008; Finkenzeller, 2011; Kroth, 2011; Fritsche, 2012; Krogmann, 2015). Zum Teil konnten wie in China deutlich positive Effekte, insbesondere bei Gewichtszunahme und Futtermittelverwertung, beschrieben werden (Wehr et al., 2006), zum Teil konnten keine Effekte beobachtet werden und es gab Studien, in denen die mit Seltenen Erden supplementierten Tiere eine Leistungsverschlechterung zeigten (Franzke, 2007). Finkenzeller (2011) und Fritsche (2012) wiesen in ihren Untersuchungen einen Repartitioning-Effekt nach. Bei ihnen zeigten die weiblichen Tiere einen erhöhten Protein- und verminderten Fettansatz. Um Kenntnisse über die Wirkungsweise der Seltenen Erden zu erlangen, wurden bereits Untersuchungen zu Wachstums- und Schilddrüsenhormonen (He & Rambeck, 2000; Borger, 2003; Franzke, 2007; van Gemmeren, 2008), zur Zusammensetzung der Mikroflora im Darm (Schuller et al., 2002; Knebel, 2004) zur Verdaulichkeit von Nährstoffen (Prause et al., 2004; Kroth, 2011; Fritsche, 2012; Krogmann, 2015) und zum Glukosestoffwechsel (He et al. 2008) durchgeführt.

Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, weitere Erkenntnisse über die Auswirkung der Seltenen Erden auf die Körperzusammensetzung und Glukosetoleranz am Modelltier Ratte zu gewinnen. Hierzu sollte ein Seltene-Erden-Citrat in zwei Dosierungen im Futter zur freien Aufnahme und im Pair-feeding-Verfahren zur Kontrollgruppe an Ratten verabreicht werden. Neben den Bestimmungen von Gewichtszunahme und Futtermittelverwertung wurden Glukosetoleranztests

durchgeführt, bei einer Auswahl an Tieren Insulin bestimmt und am Versuchsende eine Ganzkörperanalyse zur Bestimmung des Fett- und Proteingehaltes gemacht.

II. LITERATURÜBERSICHT

2.1 Seltene Erden

Das Schrifttum zu Seltenen Erden wurde in bisherigen Dissertationen bereits mehrfach zusammengefasst (Schuller, 2002; Borger, 2003; Eisele, 2003; Knebel, 2004; Prause, 2004; Recht, 2005; Renard, 2005; Feldhaus, 2006; Miller, 2006; Redling, 2006; Franzke, 2007; van Gemmeren, 2008; Finkenzeller, 2011; Kroth, 2011; Fritsche, 2012; Krogmann, 2015). Da es zum Verständnis der vorliegenden Dissertation aber erforderlich ist, wird es hier nochmals erläutert.

2.1.1 Einteilung und Stellung im Periodensystem

Seltene Erden, im Englischen „Rare Earth Elements“ (REE) genannt, sind eine Gruppe von 17 Übergangsmetallen, die in der 3. Nebengruppe des Periodensystems stehen.

Es handelt sich um Scandium (Ordnungszahl 21), Yttrium (39), Lanthanum (57) und die dem Lanthanum folgenden 14 Elemente, die als Lanthanoide bezeichnet werden: Cer (Ce), Praeseodym (Pr), Neodym (Nd), Promethium (Pm), Samarium (Sm), Europium (Eu), Gadolinium (Gd), Terbium (Tb), Dysprosium (Dy), Holmium (Ho), Erbium (Er), Thulium (Tm), Ytterbium (Yb) und Lutetium (Lu).

Seltene Erden werden nach ihrer atomaren Masse in zwei Gruppen unterteilt: die leichten Seltenen Erden („light-REEs“), Ordnungszahlen 57-63, und die schweren Seltenen Erden („heavy-REEs“), Ordnungszahlen 64-71 und Yttrium (39) (Tyler, 2004).

2.1.2 Chemische und physikalische Eigenschaften

Seltene Erden sind weiche, verformbare und chemisch sehr aktive Metalle. Im Anschnitt sind sie silbrig-glänzend, oxidieren allerdings sehr schnell bei Kontakt

mit Sauerstoff und werden bräunlich. Auch mit Wasser reagieren sie schnell und bilden unlösliche Hydroxide (Evans, 1990).

Lanthanoide haben sehr ähnliche chemische Eigenschaften. Das liegt daran, dass sie mit steigender Ordnungszahl ihre 4f-Orbitale auffüllen, die weit im Inneren der Atome liegen und im Gegensatz zu den 4d-Orbitalen der anderen Nebengruppenelemente wenig Einfluss auf die chemischen Eigenschaften nehmen (Mortimer, 1973). Sie sind stark elektropositiv mit einer Oxidationszahl von 3+. Es werden auch tetravalente und bivalente Formen gebildet, die aber von untergeordneter biochemischer Bedeutung sind, da sie sehr instabil sind (Evans, 1990). Die Seltenen Erden haben ein starkes Reduktionspotential und somit eine hohe Affinität für die Bindung an sauerstoffhaltige Liganden (Bulman, 2003). Unter physiologischen Bedingungen wird der Sauerstoff von Carboxyl- oder Phosphatgruppen bereitgestellt, welche an Proteinen, Nukleotiden und Nukleinsäuren gefunden werden (Evans, 1990). Die hohe Affinität für Ionenbindungen führt außerdem zur Bildung einer großen Menge von Salzen. Ihre Hydroxide, Phosphate, Carbonate, Oxalate und Fluoride sind unlöslich in Wasser, ihre Chloride, Nitrate und Perchloride sind löslich (Evans, 1990).

Bei der Bindung von Seltenen Erden mit organischen Säuren hat sich insbesondere Citrat als hochstabil, verglichen mit anderen biologischen Liganden, herausgestellt. Citrate haben außerdem eine geringe Affinität zu Lanthanoidionen und geben sie leicht wieder ab (Evans, 1990). Deswegen haben sie sich als geeignete Bindungen beim Einsatz der Erforschung von Leistungssteigerungen durch Seltene Erden bei Tieren und Pflanzen herausgestellt.

Des Weiteren haben Seltene Erden-Metalle gute magnetische Eigenschaften, sind lumineszierend und absorbieren Strahlung. Lanthanum hat bei Temperaturen um den absoluten Nullpunkt auch supraleitende Eigenschaften (Gschneider und Eyring, 1994). Ihren Einsatz finden Seltene Erden hauptsächlich im technischen Bereich. Etwa jeweils 20% der weltweiten Fördermenge wird für die Produktion von Katalysatoren und Magneten verwendet. Des Weiteren finden Seltene Erden Einsatz in der Metallurgie zur Verstärkung von Legierungen, in Polituren, in der Herstellung von Spezialgläsern mit hoher Brechzahl für UV-Schutz oder zum Einfärben der Gläser, als Leuchtmittel z.B. in Plasma- und LCD-Bildschirmen oder Energiesparlampen, in Radargeräten und als Laser (Liedke und Elsner, 2009).

2.1.3 Biochemische und pharmakologische Eigenschaften mit Relevanz für die vorliegende Dissertation

Es besteht eine große Ähnlichkeit zwischen Ln^{3+} - und Ca^{2+} -Ionen im Bezug auf Ionenradius, Koordinationsgeometrie und Bindungsart und damit sind Ln^{3+} -Ionen in der Lage Ca^{2+} -Ionen zu ersetzen (Evans, 1990). Sie können sich an Membranproteine binden, jedoch nicht in gesunde Zellen eindringen. Sie stabilisieren die Phospholipidmembran, erhöhen deren Rigidität und verändern ihre Oberfläche hin zu erhöhter Elektropositivität (Smith et al., 1972).

Ca^{2+} - Na^{+} -Pumpen, Ca^{2+} - Ca^{2+} -Pumpen und damit Ca^{2+} -Efflux und -Influx können durch Ln^{3+} -Ionen gehemmt werden (Evans, 1990). Betroffen davon sind die Weiterleitung nervaler Impulse (Vaccari et al., 1999), die Freisetzung von Neurotransmittern, die Blutgerinnungskaskade (Jakupec et al., 2005), die Kontraktion von Skelett-, Herz- und glatter Muskulatur (Weiss und Goodman, 1969), die Freisetzung von Mastzellen (Beaven et al., 1984), Funktionen des Retikuloendothelialen Systems (Farkas und Karacsonyi, 1985) und einige hormonelle Antworten, wie z.B. durch die Wirkung als Rezeptor-Antagonist für ACTH (Enyeart et al., 2002).

Meist wird der Ca^{2+} -Influx gehemmt, da Lanthanoide nicht durch die Zellmembran gesunder Zellen treten können (Evans, 1990). Demnach könnten alle physiologischen Prozesse, die vom Ca^{2+} -Einstrom abhängig sind, gehemmt werden und die, die von intrazellulärer Ca^{2+} -Freisetzung abhängig sind, wären nicht betroffen (Nachshen, 1984).

Allerdings gibt es Vermutungen, dass diese Prozesse anderweitig beeinflusst werden können. So hemmen Lanthanoidionen zum Beispiel die Freisetzung von Insulin und Amylase aus dem Pankreas (Lorenz, 1979; Flatt et al., 1980), obwohl diese von intrazellulärer Ca^{2+} -Freisetzung abhängig ist. Wahrscheinlich erschöpfen Lanthanoide die extrazellulären Ca^{2+} -Reservoirs durch eine wiederholte Aktivierung von zellulären Funktionen. Dadurch, dass die Erhaltung des intrazellulären Ca^{2+} -Pools stark von der extrazellulären Ca^{2+} -Konzentration abhängig ist, werden so weitere Reaktionen wie etwa eine Hormonfreisetzung verhindert (Evans, 1990).

Weitere Wirkungen von Lanthanoiden, wie etwa die Bindung an Rezeptoren für Acetylcholin (Rübsamen et al., 1976) und für Insulin (Williams und Turtle, 1984),

die Interaktion mit Adenylatcyclase (Nathanson et al., 1976) und Na-K-ATPase (David und Karlish, 1991) werden vermutet.

2.1.4 Stoffwechsel und Toxizität

Die physiologischen Eigenschaften der Lanthanoide lassen sich größtenteils von ihrer Bindung an die Außenseite von Zellmembranen und den damit verbundenen Einfluss auf den zellulären Transport von Ionen erklären. Seltenen Erden ist es allein nicht möglich, durch die Zellmembran zu treten. Ihre Bindung an unlösliche Liganden (Phosphate, Carbonate) kann Präzipitation und Aufnahme durch phagozytotische Zellen auslösen (Evans, 1990).

Die Metabolisierung von Seltenen Erden ist stark abhängig von der Applikationsart und ihrer chemischen Form. Die orale Eingabe von Seltenen Erden ist natürlich die wichtigste Applikationsart für die angestrebte Nutzung als Leistungsförderer in der Tierhaltung.

Im Allgemeinen werden Seltene Erden im Gastrointestinaltrakt nur gering absorbiert (Hamilton, 1949; Haley, 1979; Ji et al., 1985b).

Hamilton wies schon 1949 nach, dass nur 0,05-0,4% der oral eingegebenen Seltenen Erden im Körper verblieb. Hutchison und Albaaj (2005) fanden bei Ratten über 99% des oral eingegebenen Lanthancarbons im Kot wieder.

Redling (2006) hat die systemische Absorption von Lanthanoiden schematisch, aufsteigend dargestellt: per Os << subkutan < intramuskulär < intraperitoneal < per inhalation < intravenös.

Bei intravenöser Injektion bilden Seltene Erden hauptsächlich lösliche Komplexe mit Aminosäuren, Proteinen, Phospholipiden und Nukleotiden. Die Clearance aus dem Blut hängt stark vom gebundenen Liganden ab (Evans, 1990). Die Halbwertszeit beträgt etwa 10-20min. .

Nach intravenöser Injektion kommt es zu einer Akkumulation in Leber, Niere, Lunge, Milz und Knochen (Ji et al., 1985; Evans, 1990). Bei anderen Injektionsarten verbleiben Seltene Erden hauptsächlich an der Injektionsstelle. Bei intraperitonealer Injektion verbleiben die Seltenen Erden in der Bauchhöhle, überziehen die Organe und werden nur geringfügig aufgenommen (Evans, 1990). Nach Graul und Hundeshagen (1959) kam es allerdings bei Meerschweinchen zu einer außergewöhnlich hohen Absorption von Yttrium durch den Pankreas.

Bei Fox et al. (1977) wurde keine systemische Absorption bei der lokalen Behandlung einer Brandwunde mit Cerium-Nitrat haltiger Salbe nachgewiesen.

Die Ausscheidung findet hauptsächlich über den Kot, aber auch zum Teil über den Urin statt.

Grundsätzlich ist zu sagen, dass die Toxizität der Seltenen Erden als gering einzustufen ist (Haley, 1979). Hier kommt es auf die Art der Applikation und somit der Verfügbarkeit und die chemische Bindung der Seltenen Erden an (Bulman, 2003). Bindungen mit Nitrat sind z.B. toxischer als Bindungen an Acetat oder Chlorid (Zimakow, 1973, zitiert von Haley 1979).

Da sie nur in geringem Maße durch den Gastrointestinaltrakt aufgenommen werden, ist die Toxizität bei oraler Gabe sehr viel niedriger als bei intravenöser Applikation. Die LD50 liegt bei Ratten bei oraler Aufnahme, je nach REE-Verbindung, bei 3,5-10g/kg (Haley, 1965) und bei intravenöser Injektion, je nach REE-Verbindung, bei 3-100mg/kg (Haley, 1965&1979). Cochran et al. (1950) haben bei oraler Eingabe von Lanthan-Chlorid an Ratten eine LD50 von 4200mg/kg und bei oraler Eingabe von Lanthan-Nitrat eine LD50 von 4500mg/kg nachgewiesen.

Akute Symptome einer Intoxikation nach intravenöser Applikation sind Ataxie, Sedation, Rückenkrümmen, Zehenspitzenang. Der Tod tritt durch Atemlähmung und Herzstillstand ein (Haley, 1965). Jede intravenöse Gabe Seltener Erden verursacht Blutdruckabfall. Chronische Symptome einer Intoxikation sind Magenschleimhautentzündungen, Leberverfettung und Milznekrosen sowie verminderte Blutgerinnung (Evans, 1990). Mutagene und teratogene Effekte wurden nicht festgestellt (Ji et al., 1985).

Um die orale Toxizität zu bestimmen, wurden bereits viele Untersuchungen an verschiedenen Tierarten durchgeführt: Cochran et al. (1950) hat bei Ratten je nach REE-Verbindung eine LD50 von 3400 bis >10000 mg/kg KGW festgestellt, Ji et al. (1985) an Ratten, Mäusen und Meerschweinchen mit REE-Nitrat eine LD50 von 1397-1832mg/kg KGW, Haley (1965&1979) an Mäusen je nach REE-Verbindung eine LD50 von 2000-8186mg/kg KGW und Shimomura et al. (1980) an Mäusen eine LD50 von 1959-2652mg/kg KGW je nach REE-Verbindung.

Ratten und Meerschweinchen scheinen empfindlicher zu sein als Mäuse (Bulman, 2003). In einem Versuch von Borger (2003) ergab die Messung von Seltenen Erden in Muskulatur und inneren Organen nach einem Fütterungsversuch an Schweinen nur eine geringgradige Anreicherung von Lanthan und kaum

Veränderungen im Gehalt an Cer. Selbiges stellte auch Eisele (2003) durch Organuntersuchungen an Schweinen fest.

2.1.5 Landwirtschaftliche Bedeutung der Seltenen Erden

Vor fast 50 Jahren begann man in China mit Untersuchungen zu Seltenen Erden in der landwirtschaftlichen Produktion. Kurze Zeit später wurden herausragende Ergebnisse präsentiert. Bereits geringe Konzentrationen an Seltenen Erden führten bei verschiedensten Pflanzensorten zu einer hohen Leistungssteigerung. In der Pflanzenproduktion werden die Seltenen Erden in China als Dünger durch Besprühen der Blätter oder Einweichen der Samen eingesetzt. Verschiedene Theorien über die Effekte auf das Pflanzenwachstum wurden aufgestellt, etwa die Ansammlung von Ionen, das Speichern von Nitrat, Auswirkungen auf den Calciummetabolismus, die Photosynthese oder bakterizide Eigenschaften (Redling, 2006).

In der chinesischen Literatur wurden Ertragsverbesserungen von 5-20% bei Getreide (Xiong, 1995; Xia und He, 1997), 8-20% bei Zucker (Xiong, 1995) und 8-30% bei Früchten und Gemüse festgestellt (Xiong, 1995; Guo, 1993). Auch in der Tierproduktion wurden die Seltenen Erden in China eingesetzt und schon bei niedriger Dosierung Verbesserungen in Futtermittelverwertung und Gewichtszunahme bei allen landwirtschaftlichen Nutztieren erreicht. Bei Mastschweinen wurden von Hu et al. (1999) bis zu 32% höhere Gewichtszunahmen und eine 11% bessere Futtermittelverwertung erreicht, bei Broilern durch Xia und He (1997) eine über 23% höhere Gewichtszunahme und eine um fast 17% verbesserte Futtermittelverwertung. An Schafen stellte Xiong (1995) eine 8% höhere Wollmenge und eine erhöhte Gewichtszunahme von 6-11% fest. Sogar verbesserte Lege- und Milchleistung wurde beobachtet (Shen et al., 1991).

In der westlichen Welt war dies lange unbekannt und wurde erst durch das EU-weite Einsatzverbot von antibiotischen Leistungsförderern im Jahr 2006 interessant, weswegen legale, sichere und günstige Futtermittelzusatzstoffe gesucht wurden. Da sich aber die chinesischen Haltungs- und Fütterungsbedingungen schlecht mit unseren vergleichen lassen, war es nötig, die Wirkung Seltener Erden unter westlichen Bedingungen zu erproben, insbesondere im Hinblick auf eine angestrebte Zulassung als Futtermittelzusatzstoff im Sinne

der Verordnung (EG) Nr. 1831/2003. Sie besagt unter anderem, dass ein Futtermittelzusatzstoff die Leistung und das Wohlbefinden der Tiere verbessern soll, sich aber nicht negativ auf Mensch oder Umwelt auswirken darf.

In Deutschland begann Prof. W.A. Rambeck 1999 an unserem Lehrstuhl mit den Untersuchungen zu Seltenen Erden. Es folgten eine Vielzahl an Fütterungsstudien sowohl in München als auch in der Bundesforschungsanstalt für Landwirtschaft in Braunschweig (FAL), im Institut für Tierernährung der Freien Universität Berlin und in der Schweiz mit Schweinen, Broilern, Japanischen Wachteln, Ratten und Fischen (Rambeck et al., 1999; He et al., 2001, 2003; Schuller, 2001; Borger, 2003; Eisele, 2003; Knebel, 2004; Prause et al., 2004; Recht, 2005; Renard, 2005; Förster et al., 2006; Miller, 2006; Franzke, 2007; Van Gemmeren, 2008)

Im Folgenden sollen die westlichen Studien zu Seltenen Erden kurz dargestellt werden.

2.1.6 In-vivo-Untersuchungen zu Seltenen Erden

1999 begannen Rambeck et al. mit dem ersten Fütterungsversuch Seltener Erden unter westlichen Haltungsbedingungen. Hierzu wurden Ferkel der Kreuzung Deutsche Landrasse x Pietrain über fünf Wochen gemästet. Rambeck et al. (1999) fanden Tendenzen zur besseren Zunahmen der Seltene-Erden-Gruppen, konnten dies aber statistisch nicht nachweisen. Es folgten viele weitere westliche Studien zur Mastleistung mit Seltenen Erden an Schweinen und Broilern, die zur Übersicht in Tabelle 1 dargestellt sind.

Tabelle 1: Auflistung der Ergebnisse von westlichen in-vivo-Untersuchungen an Ferkeln und Broilern zu Gesamtzunahmen (GZ) und Futtermittelverwertung (FCR) in prozentualen Unterschied zur Kontrollgruppe.

Autor	Tierart	REE- Verbind-ung	REE- Konzentration (mg/kg)	Gesamt- zunahme (GZ) in % zur Kontrollgruppe	Futter- verwertung (FCR) in % zur Kontrollgruppe
Rambeck et al. 1999	Ferkel 7kg	REE- Chlorid	75	n.s.	n.s.
			150	n.s.	n.s.
		Lanthan- chlorid	75	n.s.	n.s.
			150	n.s.	n.s.

He et Rambeck 2000 Experiment 1	Ferkel 7,3kg	Lanthan- chlorid	75	n.s.	n.s.
			150	n.s.	n.s.
		REE- Chlorid	75	n.s.	n.s.
			150	n.s.	n.s.
He et Rambeck 2000 Experiment 2*	Ferkel 17kg	REE- Chlorid	150 *	+19	-10
Borger 2003 *	Ferkel 17kg	REE- Chlorid	300 *	+19	-11
Eisele 2003	Ferkel 18kg	REE- Chlorid	200 über 16 Tage	n.s.	n.s.
			200 über 30 Tage	n.s.	n.s.
Knebel 2004 *	Ferkel 8,6kg	REE- Citrat	50	n.s.	n.s.
			100 *	+8,6	n.s.
			200 *	+22,6	n.s.
Prause et al. 2004 *	Ferkel 8,6kg	REE- Citrat	150 *	n.s.	+7
			300	n.s.	n.s.
Förster et al. 2006 *	Ferkel 7,2kg	REE- Citrat	100 *	+3,5	/
			200 *	-10,3	/
			400	n.s.	/
			800	n.s.	/
Schuller 2001	Broiler	Lanthan- chlorid	150	n.s.	n.s.
			300	n.s.	n.s.
		REE-Chlorid	150	n.s.	n.s.
			300	n.s.	n.s.
Halle et al. 2003, Versuch 1 *	Broiler	REE-Ascorbat	400 *	+7	-3
		REE-Citrat	400 *	+6,6	-1
		REE-Nitrat	300 *	+2	n.s.
		Lanthan- Chlorid	225 *	+5	-0,5
Halle et al. 2003, Versuch 2 *	Broiler	Sorbinsäure	/ *	n.s.	- 4,3
		REE-Ascorbat	400 *	n.s.	- 4,8
		REE-Citrat	400 *	n.s.	- 6,3
		Lanthan- Chlorid	225 *	n.s.	- 13
Franzke 2007 *	Broiler	REE-Citrat	70 *	n.s.	-3
			100 *	n.s.	-4
		Cer-Anion	50	n.s.	n.s.
			100	n.s.	n.s.

* signifikante Unterschiede zur Kontrollgruppe

n.s. = nicht signifikant

Von 37 verschiedenen REE-Verbindungen und -Konzentrationen in 12 Versuchen an Broilern und Ferkeln konnten nur bei neun eine signifikante Verbesserung und einmal eine signifikante Verschlechterung der Mastleistung nachgewiesen werden.

An Fischen wurden von Renard (2005) Fütterungsversuche mit Regenbogenforellen und Karpfen durchgeführt. Hier zeigte sich keine Verbesserung durch die Supplementierung von Seltenen Erden.

Bei Ratten stellten He et al. 2003 signifikante Verbesserungen in der Gewichtszunahme um bis zu 9% und in der Futterverwertung um bis zu 11% fest. In dem Versuch mit 50 Ratten in 5 Gruppen wurden ein REE-Gemisch sowie ein Lanthanchlorid in den Konzentrationen 75mg/kg und 150mg/kg verfüttert.

Franzke (2007) untersuchte in zwei Teilversuchen mit 560 Ratten verschiedene organische und anorganische REE-Verbindungen in unterschiedlichen Konzentrationen. Er konnte allerdings keine positiven Effekte der Mastleistungsparameter der mit Seltenen Erden supplementierten Tiere feststellen. Im zweiten Teilversuch stellte er bei der Futterverwertung sogar signifikante Verschlechterungen der Seltene-Erden-Gemisch-Gruppen und der Cer-Gruppen gegenüber der Kontrollgruppe fest.

Van Gemmeren führte 2008 einen weiteren Fütterungsversuch mit Ratten, aufgeteilt in zwei Teilversuche mit 220 bzw. 252 Tieren, durch. Im ersten Versuch erhielten fünf Gruppen ein REE-Citrat und fünf weitere Gruppen ein Lanthanarbonat in jeweils unterschiedlichen Dosierungen. Van Gemmeren konnte vereinzelt statistisch signifikante Verbesserung der Gewichtszunahme im Vergleich zur Kontrollgruppe feststellen.

Im zweiten Versuch wurden zehn verschiedene REE-Gemische und einzelne REE-Salze in jeweils zwei Dosierungen verfüttert. Hier zeigten sich ebenfalls nur vereinzelt statistisch verbesserte Gewichtszunahmen gegenüber der Kontrollgruppe.

2011 wurde von Finkenzeller ein Feldversuch zur leistungssteigernden Wirkung von Seltenen Erden (250mg REE-Citrat/kg Futter) bei Flüssigfütterung durchgeführt. Auch hier stellten sich keine statistisch signifikanten Unterschiede der Gewichtsentwicklung oder Futterverwertung im Vergleich zur Kontrollgruppe ein. Auffällig war, dass der Magerfleischanteil der mit Seltenen Erden gefütterten Tiere 2,1% und damit statistisch hochsignifikant über dem der Kontrolltiere lag. Dies führte bei der Klassifizierung der Schlachtkörper insgesamt zu einer besseren

Bewertung der REE-Gruppe.

2.2. Theorien zur Wirkung der Seltene Erden auf die Leistung

Über die genaue Wirkungsweise der Seltenen Erden als Leistungssteigerer ist noch wenig bekannt. Bisher wurde in vielen Studien bei den Versuchstieren eine Gewichtszunahme festgestellt, deren Ursache allerdings noch diskutiert wird. Insbesondere zwei Theorien sind hier zu nennen: entweder eine lokale Wirkung der Seltenen Erden im Gastrointestinaltrakt oder eine Wirkung auf den Intermediärstoffwechsel.

2.2.1 Seltene Erden und ihre lokale Wirkung im Gastrointestinaltrakt

Die niedrige Resorptionsrate von Seltenen Erden im Gastrointestinaltrakt (Durbin et al., 1956) führt zu einer Anreicherung im Chymus und könnte somit lokal im Darm wirken. Einige chinesische Autoren berichteten von einer besseren Verdaulichkeit der Nährstoffe (Li et al., 1992; Cheng et al., 1994; Lu und Yang, 1996; Xu et al., 1998). Böhme (2003) konnte mit Bilanzversuchen an Mastschweinen allerdings keine Verbesserung der Verdaulichkeit feststellen. Auch Prause et al. führten 2004 einen Bilanzversuch an Mastschweinen durch, bei denen in der niedriger dosierten Seltene-Erden-Gruppe zwar eine deutliche Verbesserung der Futtermittelverwertung nachgewiesen wurde, aber keine signifikante Änderung der Stickstoffverdaulichkeit. Dennoch wiesen sie auf eine mögliche Einflussnahme der Seltenen Erden auf Enzyme des Verdauungstraktes oder des Stoffwechsels hin. Kroth (2011) konnte in seinem Versuch mit Ratten eine signifikant höhere Verdaulichkeit von Trockensubstanz, Rohprotein und Bruttoenergie bei den mit Seltenen Erden zugefütterten Tieren nachweisen. Dies ging mit einem signifikant niedrigeren pH-Wert des Kots im Vergleich zur Kontrollgruppe einher. Er vermutete daher eine selektive Veränderung der Darmflora durch die Seltenen Erden. Fritsche (2012) konnte die Ergebnisse von Kroth in ihren Versuchen allerdings nicht bestätigen. Sie fand bei den mit Seltenen Erden supplementierten Ratten keine verbesserte Verdaulichkeit der Rohnährstoffe, Mengen- und Spurenelemente und einen unveränderten pH-Wert des Kots im Vergleich zur Kontrollgruppe vor. Sie vermutete aber, dass ein

selektiv antimikrobieller oder möglicherweise auch ein selektiv wachstumsfördernder Effekt auf Mikroorganismen von der Ausgangsflora des Darms mit abhängig war oder aber, dass die Verfügbarkeit der Seltenen Erden für die Mikroorganismen pH-abhängig war. Krogmann (2015) konnte weder das eine noch das andere bei ihren Versuchen verifizieren. Sie konnte in ihren Versuchen durch verschiedene Futtermittel den pH-Wert von Kot und Chymus nicht beeinflussen und fand keine systematischen Veränderungen der Verdaulichkeit von Nährstoffen bei den mit seltenen Erden supplementierten Tieren wieder. Zwischen den Kot-pH-Werten der Kontroll- und Versuchsgruppen fand sie auch keine systematischen Unterschiede.

Mögliche Einflüsse auf die Darmflora durch die bakteriostatischen und bakteriziden Eigenschaften der Seltenen Erden (Wurm, 1951, Muroma, 1958/1959) wurden 2002 von Schuller et al. an Broilern untersucht. Die Untersuchung ergab allerdings keine Unterschiede in der Zusammensetzung der Darmflora zwischen supplementierten und nicht supplementierten Gruppen. Knebel untersuchte 2004 die Wirkung der Seltenen Erden auf die Mikroflora anhand eines künstlichen Pansenmodells und konnte keine Veränderungen feststellen. In einer Studie von Kraatz et al. (2006) mit REE/Citrat (200mg/kg Futter) supplementierten Schweinen konnten ebenfalls keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich der bakteriellen Zusammensetzung der Magen-Darm-Flora im Vergleich der mit Seltenen Erden gefütterten Tiere mit der Kontrollgruppe festgestellt werden.

2.2.2 Seltene Erden und ihre Wirkung auf den Intermediärstoffwechsel

2.2.2.1 Wirkung der Seltenen Erden auf verschiedene Hormone und Enzyme

Eine Einflussnahme auf Wachstums- und Schilddrüsenhormone wurde vielfach untersucht (Xie et al., 1995; Xu et al., 1999; He & Rambeck, 2000; Borger, 2003; Franzke, 2007; van Gemmeren, 2008). Xie et al. (1995) belegten eine erhöhte Konzentration von Wachstumshormonen und Trijodthyronin (T3) sowie eine erniedrigte Konzentration von Thyroxin (T4) bei mit Seltenen Erden zugefütterten Broilern. Borger (2003) stellte bei ihren Versuchen an Schweinen allerdings Gegenteiliges fest. Hier waren bei den supplementierten Tieren die

Trijodthyronin-Werte erniedrigt und die Thyroxin-Werte erhöht. Xu et al. (1999) wiesen bei Schweinen ebenfalls eine Erhöhung von Wachstumshormonen (GH: 88,88%), Trijodthyronin (T3: 36,7%) und auch von Thyroxin (T4: 28,96%) durch die Zugabe von Seltenen Erden nach. Auch bei Förster et al. (2006) waren T3 und T4-Werte der supplementierten Ferkel statistisch signifikant erhöht. In anderen Versuchen wurde eine signifikante Erniedrigung der Trijodthyronin-Werte bei Mastschweinen belegt. (He & Rambeck, 2000, He et al., 2001, Schuller et al., 2002) So auch bei Eisele (2003), wo bei Mastschweinen T4 erniedrigt war.

An Ratten stellte Franzke (2007) lediglich an den mit Cer supplementierten Tieren eine signifikante Erniedrigung des T3-Serumspiegels fest. Van Gemmeren (2008) beobachtete eine Erniedrigung von T3- und Erhöhung von T4-Werten im Vergleich zur Kontrollgruppe.

Im Hinblick auf Enzymaktivitäten beobachteten Xie und Wang (1998) bei Hühnern eine Tendenz von erhöhter Lipase- und Peroxidase-Aktivität im Blut. Auch Xu et al. (1999) fanden an supplementierten Mastschweinen erhöhte Aktivität von γ -GT sowie erhöhte Glukose- und TP-Konzentrationen im Serum vor.

He et al. (2003) wiederum fanden signifikant niedrigere Glukose-Konzentrationen im Serum von Ratten. Der Kreatinin-Level und die Aktivität der Leberenzyme AP und ALT war hingegen erhöht. Zwei Jahre zuvor konnten He et al. (2001) im Serum von Schweinen keine Effekte der Seltenen Erden auf die Aktivität der Leberenzyme AP, ALT und AST feststellen. Knebel (2004) konnte im Serum von Ferkeln auch keinen Unterschied in der Aktivität der alkalischen Phosphatase (AP) zwischen der Kontrollgruppe und den mit Seltenen Erden supplementierten Tieren finden.

Gomez et al. (1974) stellten fest, dass Cer die Aktivität von α -Amylase aus dem Pankreas im Blut von Schweinen erhöhte, wenn es in niedrigen Konzentrationen verabreicht wurde. In hohen Konzentrationen hatte es wiederum eine hemmende Eigenschaft. Hershberg et al. (1976) demonstrierten, dass Gadolinium Ca^{2+} an der pankreatischen Phospholipase A2 von Schweinen kompetitiv ersetzen konnte.

Durch ihre fluoreszierenden Eigenschaften werden Seltene Erden bei einer Vielzahl von Untersuchungen anderer Stoffwechselwirkungen eingesetzt.

In einer Studie von Williams und Turtle (1984) wurden die fluoreszierenden Eigenschaften von Terbium (Tb^{3+}) genutzt, um die Insulinbindung an Insulinrezeptoren zu untersuchen. Terbium bindet sich an Ca^{2+} -Bindungsstellen

der Insulinrezeptoren. Dabei wurde festgestellt, dass Terbium die Bindung von Insulin an seinen Rezeptor 50mal mehr verstärkte als Ca^{2+} .

2.2.2.2 Seltene Erden und ihre Wirkung auf den Glukosestoffwechsel

Glukose ist der wichtigste Energielieferant im Körper. Der im Blut zirkulierende Glukosespiegel muss weitgehend konstant gehalten werden.

Er variiert trotz des Wechsels zwischen Nahrungszufuhr und Hungerperioden nur zwischen 4 und 7 mmol/l (72 und 126 mg/dl). Das garantiert eine ausreichend hohe Glukoseversorgung des Zentralnervensystems (Schaaf und Usadel, 1999).

Ein deutlicher biochemischer Effekt nach intravenöser Injektion von Seltenen Erden ist die Hypoglykämie (Arvela, 1977).

Sie wurde erstmals 1938 von Fischler und Röckl nachgewiesen. Sechs Stunden nach der Injektion von Lanthanoiden begann die Abnahme der Glukosekonzentration und erreichte nach zwei bis drei Tagen ihr Minimum von unter 70 mg/dl. Nach sechs Tagen erreichte sie erst wieder ihre normale Konzentration.

Die Hormone Insulin und das antagonistisch wirkende Glukagon sind die bedeutsamsten Regulatoren der Blutglukosehomöostase im Organismus (Löffler und Petrides, 1997). Ein ansteigender Glukosespiegel im Plasma bewirkt im Pankreas direkt die Insulinausschüttung und -synthese. Gleichzeitig hat die Insulinausschüttung einen negativ parakrinen Effekt auf die Glukagonsynthese und -ausschüttung. Ein geringer Plasmaglukosegehalt stimuliert die Glukagonsynthese- und ausschüttung und diese wiederum parakrin die Insulinausschüttung und -synthese.

Die Wirkung von Insulin erfolgt über die Bindung an seinen Rezeptor. Der Rezeptor selbst ist eine Tyrosin-Kinase (Hubbard et al., 1994), die durch die extrazelluläre Insulinbindung aktiviert wird und durch Phosphorylierung andere intrazelluläre Enzyme aktivieren kann. Das bewirkt unter anderem die Translokation von GLUT-4-Transportern an die Zellmembran und dadurch die Glukoseaufnahme in die Zellen. So wird einer Hyper- und Hypoglykämie entgegengewirkt.

Wie oben erwähnt, verstärken Seltene Erden (Tb^{3+}) die Bindung von Insulin an

seinen Rezeptor (Williams und Turtle, 1984). Demnach müsste es auch eine erhöhte Insulinwirkung am Rezeptor geben und es wäre zu erwarten, dass mehr Glukose in die Zellen aufgenommen wird und daraus die Hypoglykämie resultiert. Röhling (1974) fand aber heraus, dass die Hypoglykämie nicht durch die erhöhte Aufnahme von Glukose ins Gewebe entsteht. Er stellte im Gegenteil dazu fest, dass intravenös verabreichte Glukose bei den mit Praeseodym (Pr^{3+}) behandelten Tieren sogar langsamer aus dem Blut eliminiert wurde. Insulin scheint also nicht der Grund gewesen zu sein. Die Insulinkonzentration verdoppelte sich zwar eine Stunde nach der intravenösen Injektion von Pr^{3+} , erreichte allerdings schon nach sechs Stunden wieder ihre basale Konzentration. Auf diese folgte ein Rückgang zu sehr geringen Insulin-Plasmakonzentrationen, die nicht auf Glukose ansprachen.

Der Gehalt an Freien Fettsäuren (FFS) im Blut stieg im Gegenzug dazu deutlich an (Snyder und Stephens, 1961). Hyperinsulinämie würde den Gehalt der FFS senken.

Schurig und Oberdisse (1972) fanden heraus, dass die Glukoneogenese und hier insbesondere die Aktivität der Enzyme Pyruvat-Carboxylase und Phosphoenolpyruvatcarboxykinase durch die Injektion von Praeseodym (Pr^{3+}) in die Leber von Ratten gehemmt wird. Das kann ebenfalls zu einem Anstieg der FFS im Blut führen.

Glukose kann kurz- bis mittelfristig in Form von Glykogen in Leber und Muskulatur gespeichert werden. Glukagon wird in den α -Zellen des endokrinen Pankreas synthetisiert und bewirkt die Glykogenolyse und die Lipolyse und damit in der Leber die Glukoneogenese aus freiwerdendem Glycerin. Der Hauptanteil der endogenen Glukoseproduktion findet in der Leber statt (ca. 85%), ein Teil aber auch in der Niere (Ekberg et al., 1999). In der Niere wurden die oben genannten Schlüsselenzyme der Glukoneogenese allerdings nicht gehemmt (Schurig, 1974), was wahrscheinlich auf die unterschiedliche Konzentration der Seltenen Erden in den Organen zurückzuführen ist (Arvela, 1977). Magnusson (1963) fand heraus, dass nur 1% der Seltenen Erden in der Niere, aber über 50% in der Leber konzentriert ist.

Insulin wird in den β -Zellen der Langerhans'schen Inseln des endokrinen Pankreas synthetisiert. Die Sekretion kann durch Glukose, Lysin, Arginin, freie Fettsäuren oder Ketonkörper, durch parasymphatische Neurotransmitter (Acetylcholin) oder Peptide wie Glukagon, GIP, GLP-1 und Sekretin stimuliert

werden. Eine Hemmung der Ausschüttung kann durch sympathische Neurotransmitter wie Adrenalin und Noradrenalin, durch das Neuropeptid Y oder durch Somatostatin erfolgen (Löffler und Petrides, 1997).

An in-vitro Untersuchungen von isolierten Langerhans'schen Inseln fanden Flatt et al. (1980) heraus, dass La^{3+} -Ionen in einer Konzentration von 0,5 Millimol die basale und auch die Glukose-stimulierte Insulinfreisetzung hemmte. Nachdem die La^{3+} -Ionen von den Proben gewaschen wurden, erholten sich die Inseln sehr schnell und produzierten einen deutlichen Rebound-Effekt von spontaner Insulinfreisetzung. Der erneute Kontakt mit La^{3+} -Ionen führte zum Aussetzen des Rebound-Effektes. Flatt et al. vermuteten, dass intrazelluläres Ca^{2+} durch die Anwesenheit der La^{3+} -Ionen akkumulierte und die Seltenen Erden den Ca^{2+} -Influx und Ca^{2+} -Efflux gehemmt haben. Lorenz (1979) konnte keine spontane Insulinfreisetzung nach dem Entfernen der La^{3+} -Ionen feststellen. Er bemerkte aber eine dauerhafte Suppression der Glukose-stimulierten Insulinfreisetzung. Glukose löst die Freisetzung von Insulin über eine Erhöhung der cAMP-Konzentration aus. Arvela (1977) vermutete entweder eine direkte Interaktion der Seltenen Erden mit cAMP oder eine Hemmung des Ca^{2+} -Influges oder der intrazellulären Ca^{2+} -Freisetzung.

Auch das autonome Nervensystem, sympathisch über α_2 -Rezeptoren und parasympathisch über den Nervus Vagus, kontrolliert den Glukosespiegel im Blut. Bei der Nahrungsaufnahme wird in der Maulhöhle über den parasympathischen Nervus Vagus bereits die Insulinsynthese stimuliert. Van Breemen und de Weer (1970) und Kalix (1971) fanden in ihren Untersuchungen allerdings nur hemmende Wirkungen der Seltenen Erden auf große Axone und den Nervus Vagus.

2.2.3 Untersuchungen zur Wirkung von oral verabreichten Seltenen Erden auf den Glukosehaushalt

Über die Wirkung von oral verabreichten Seltenen Erden auf den Glukosehaushalt ist bisher wenig bekannt. 1999 fanden Xu et al. bei Mastschweinen, die mit 100mg/kg Lanthan im Futter supplementiert wurden, einen um 19,72% signifikant ($p < 0,05$) erhöhten Blutglukosegehalt gegenüber der Kontrollgruppe vor. 2003

fürten He et al. einen Versuch mit 50 Ratten in fünf Gruppen durch, bei dem ein Lanthanchlorid und eine REE-Mischung, bestehend aus Lanthanchlorid, Ceriumchlorid und Präsodymchlorid, jeweils in den Konzentrationen 75mg/kg und 150mg/kg im Futter verabreicht wurden. Neben den positiven Ergebnissen zur Gewichtsentwicklung und Futtermittelverwertung wurden am Versuchsende auch Blutparameter bestimmt. Die Glukosekonzentrationen im Blut lagen bei allen Versuchsgruppen signifikant ($p < 0,05$) unter denen der Kontrollgruppe. Wang et al. untersuchten 2006 die Auswirkungen von andauernder Lanthanchloridgabe auf den Glukose- und Lipidgehalt im Blut. Den Ratten wurden 90 Tage lang Dosen von 0,1, 2 und 40mg Lanthanchlorid oral verabreicht. Zum Versuchsende wurde das Blut auf glycosyliertes Hämoglobin A (HbA1c), Glukose, Total Cholesterol (TC), Triglyceride (TG), high density lipoprotein cholesterol (HDL-C) und low density lipoprotein cholesterol (LDL-C) untersucht. Hierbei wurden keine Unterschiede zwischen der Kontrollgruppe und den Versuchsgruppen festgestellt. 2008 wurde von He et al. ein weiterer Versuch mit 56 männlichen Ratten durchgeführt. Sie wurden in vier Gruppen eingeteilt und erhielten eine REE-Mischung in den Konzentrationen 75, 150 und 300mg/kg. Bei den Ratten wurde in der sechsten Woche ein Glukosetoleranztest durchgeführt. Nachdem sie 12 Stunden nüchtern gehalten wurden, wurde ihnen 1g Glukose oral verabreicht. 30, 60, 120 und 180 Minuten nach der oralen Eingabe wurde der Glukosegehalt bestimmt. Dann erhielten sie 30 Minuten lang wieder Zugang zu ihrem jeweiligen Futter. Direkt postprandial sowie zu den Zeitpunkten 60, 120, 240 und 360 Minuten nach dem Zugang zum Futter, wurde erneut der Glukosegehalt bestimmt. In der ersten Phase des Tests erreichte der Blutglukosegehalt sein Maximum 60 Minuten nach der oralen Glukoseeinnahme und sank dann deutlich ab. In der zweiten Phase nach dem Zugang zum Futter erreichte der Blutglukosegehalt erst nach 120 Minuten sein Maximum. Die mit Seltenen Erden supplementierten Gruppen zeigten tendenzielle, aber nicht signifikant niedrigere Plasmaglukosemaxima als die Kontrollgruppe. Danach fielen die Glukosegehalte im Blut aller Gruppen deutlich geringer ab als in der ersten Phase nach oraler Glukoseeinnahme.

III. TIERE, MATERIAL UND METHODEN

In der vorliegenden Arbeit wurde die Wirkung Seltener Erden, im englischen "Rare Earth Elements" (REE) auf den Glukosestoffwechsel und die Körperzusammensetzung untersucht.

Die Seltenen Erden wurden in zwei Dosierungen verwendet und über das Grundfutter verabreicht.

3.1 Versuchstiere

Es wurden 30 männliche und 32 weibliche Wistar Han Ratten eingesetzt. Sie entstammten einer SPF-Zucht (spezifisch pathogenfrei) der Firma JANVIER (Le Genest-St-Isle, Frankreich).

Die Ratten wurden im Alter von drei Wochen geliefert und nach einer dreiwöchigen Eingewöhnungsphase in den Versuch genommen.

Sie wiesen beim Versuchsstart ein durchschnittliches Gewicht von 171g auf.

Die Studie wurde nach Anmeldung des Versuchsvorhabens mit einer Tierversuchsgenehmigung (Zeichen: 55.2-1-54-2531-132-09) durch die Regierung von Oberbayern durchgeführt.

3.2 Versuchstierhaltung

Die Versuchstiere wurden in einem fensterlosen, vollklimatisierten Raum paarweise in Makrolonkäfigen vom Typ IV, der Firma TECHNIPLAST (Hohenpeißenberg), gehalten. Die Käfiggröße betrug 59,5 cm x 38 cm x 20 cm. Makrolon ist ein aus Polycarbonat bestehendes bruchsicheres Plastikmaterial, welches sich im Autoklaven bei bis zu 120°C sterilisieren lässt. Die Käfige besaßen einen erhöhten Deckel aus geschweißtem Draht mit einer eingesenkten Futterraufe und einer Halterung für die Trinkflasche. In einem handelsüblichen Käfigständer hatten 20 Käfige (4x5) à 2 Tiere, d.h. 40 Tiere Platz.

Während der Versuchsdurchführung wurde ein konstantes Lichtprogramm mit 12h Licht und 12h Dunkelheit gefahren. Die Raumtemperatur lag durchschnittlich

bei 22°C und die Luftfeuchte bei 42%.

Den Tieren stand Wasser ad libitum aus 0,5l Makrolon-Nippeltränken zur Verfügung. Als Einstreu wurde Sägemehl der Marke „Lignocel®“ (J.Rettenmaier&Söhne GmbH&Co KG, Rosenberg) verwendet. Die Einstreu wurde wöchentlich gewechselt. Zur Beschäftigung standen den Tieren Holzklötzchen mit einer Kantenlänge von 7,5cm x 7,5cm zur Verfügung.

Die Ratten wurden in fünf Gruppen eingeteilt.

Die Kontrollgruppe, Gruppe L250 ad lib, Gruppe L1250 ad lib und Gruppe L1250 pf mit jeweils 12 Tieren, Gruppe L250 pf mit 14 Tieren.

Die Einteilung der Käfige in die Ständer erfolgte durch eine Randomisierung.

Die Gruppenbezeichnung leitet sich aus der Konzentration an zugefüttertem Seltene-Erden-Citrat in mg pro kg Futter und der Fütterungsart ab.

Die Kontrollgruppe, Gruppe L250 ad lib und Gruppe L1250 ad lib erhielten Futter ad libitum. Den Gruppen L250 pf und L1250 pf wurde täglich das Futter nach dem „Pair Feed“- Verfahren zugeteilt.

Es wurde täglich ausgewogen, wie viel Futter die Kontrollgruppe gefressen hat und danach, nach männlichen und weiblichen Tieren getrennt, der Durchschnitt errechnet und diese Menge den korrespondierenden Gruppen L250 pf und L1250 pf von ihrem jeweiligen Futter zugeteilt.

Eine Erklärung zur Gruppeneinteilung ist unter Punkt 3.4.1 aufgeführt.

3.3 Tierfutter

Das Futter des Versuchs wurde von der Firma ZIMMERER-WERKE (Chemische Fabrik, Landshut, Deutschland) hergestellt. Dessen Zusammensetzung ist in Tabelle 2 aufgelistet. Die Bestandteile der Mineralfuttermischung sind in Tabelle 3 aufgelistet. Ihr Anteil am Futter beträgt 5%.

Dem Futter wurde die pulverförmige Seltene-Erden-Mischung, gebunden an Citrat (REE-Citrat), für die Gruppen L250 ad lib, L250 pf, L1250 ad lib und L1250 pf bereits in den ZIMMERER-WERKEN in zwei verschiedenen Konzentrationen zugemischt. Diese werden in Tabelle 8 gezeigt. Das Pulver ist eine eins zu eins Mischung mit Weizenstärke. Die Menge der REE-Einmischung bezieht sich auf vorherige Untersuchungen hier am Lehrstuhl für Tierernährung der LMU-München (He et al., 2003; Franzke, 2007; Van Gemmeren, 2008).

Das REE-Citrat wird in der Schweiz unter dem Produktnamen Lancer[®] vertrieben und wurde uns von der Firma Zehentmayer AG (Berg SG, Schweiz) zur Verfügung gestellt. Es enthielt eine Mischung aus 55% Cer, 30% Lanthan, 10% Neodym und 5% Praseodym, gebunden an Citrat. Der gesamte REE-Anteil am Produkt betrug 27,2%. Das molare Gewicht des REE-Citrats war 515,32 g/mol. Die Zusammensetzung wird in Tabelle 9 beschrieben.

Das Futter wurde den Tieren in pelletierter Form angeboten. Die Lagerung erfolgte bei Raumtemperatur.

Der Kontrollgruppe wurde ausschließlich das Futter ohne REE-Zusatz gefüttert.

Tabelle 2: Zusammensetzung des Versuchsfutters ohne Zusatz an REE

Zusammensetzung:	
25%	Apfeltrester
15%	Grünmehl
15%	Melasseschnitzel
10%	Maiscops
10%	Weizenkleie
5%	Malzkeime
5%	Rapsschrot
5%	Sonnenblumenschrot
5%	Melasse
5%	Mineralfutter

Tabelle 3: Bestandteile der Mineralfuttervormischung

Bestandteile:		
Calciumcarbonat,	Viehsalz,	Monocalciumphosphat,
Magnesiumoxid,	Rübenmelasse,	Zinkoxid, Cholin, Eisensulfat,
Manganoxid,	Kupfersulfat,	Kobaltcarbonat, Calciumjodat,
Natriumselenit,	Vitamine	

Tabelle 4: Zusatzstoffe des Versuchsfutters

Zusatzstoffe je kg:	
16250 I.E.	Vitamin A E672
2500 I.E.	Vitamin D3 E671
200mg	Vitamin E
125mg	Cholin (Cholinchlorid)
250mg	Biotin
250mg	Zink
150mg	Mangan
50mg	Eisen
3mg	Kupfer
5mg	Kobald
5mg	Jod

Tabelle 5: Zusatzstoffe der Mineralfuttermischung

Gehalt an Zusatzstoffen je kg:	
325.000 I.E.	Vitamin A
50.000 I.E.	Vitamin D3
6000 mg	Zink
5000 mg	Biotin
4000 mg	Vitamin E
3000 mg	Mangan
2500 mg	Biotin
1500 mg	Eisen
800 mg	Niacin
800 mg	Vitamin B12
300 mg	Pantothensäure
200 mg	Vitamin B2
150 mg	Vitamin B6
117,6 mg	Chlor
100 mg	Kobald
100 mg	Jod
50 mg	Kupfer
50 mg	Vitamin B1

50 mg	Vitamin K3
49 mg	Selen
20 mg	Folsäure

Tabelle 6: Inhaltsstoffe der Futtermischung (analysiert)

Inhaltsstoffe:			
Gruppen	Kontrollgruppe	250mg REE-Citrat/kg	1250mg REE-Citrat/kg
Rohprotein	20,3%	19,2%	21,1%
Rohfaser	6,2%	5,3%	5,8%
Rohfett	3,2%	3,4%	3,1%
Rohasche	7,4%	5,1%	7,1%

Tabelle 7: Inhaltsstoffe der Mineralfuttermischung (analysiert)

Gehalte an Inhaltsstoffen:	
0,20 %	Rohprotein
0,34 %	Rohfett
0,01 %	Rohfaser
49,29 %	Rohasche
18,37 %	Calcium
3,91 %	Phosphor
10,65 %	Natrium
3,01 %	Magnesium

Tabelle 8: Konzentration des beigemischten REE-Citrats in mg pro kg Versuchsfutter

Dosierungen des REE-Citrats	
Gruppe	Konzentration in mg/kg
L250 ad lib	250
L250 pf	250
L1250 ad lib	1250
L1250 pf	1250

(Es wurde doppelt so viel REE-Citrat-Vormischung eingesetzt, da das REE-Citrat in einer eins zu eins Mischung mit Weizenstärke geliefert wurde.)

Tabelle 9: Zusammensetzung der Seltene-Erden-Verbindung: REE-Citrat

Zusammensetzung des REE-Citrats	
Seltene Erden Element	Anteil an der Mischung
Cerium	15 %
Lanthanum	8 %
Neodymium	2,7 %
Praseodymium	1,3 %
Citrat	73 %

Das Futter wurde alle sechs Tage zurückgewogen. Der Futterverzehr ergab sich aus der Differenz der vollen Futterraufe bei Zuteilung und dem Gewicht der Futterraufe bei erneutem Wiegen. Somit konnte ein durchschnittlicher Futterverzehr pro Käfig ermittelt werden.

3.4 Versuchsaufbau

3.4.1 Gruppeneinteilung

Die drei Wochen alten Ratten wurden vor dem Beginn der Studie jeweils zu acht Tieren gleichen Geschlechts in einen Käfig eingestallt.

Nach einer dreiwöchigen Eingewöhnungsphase wurde bei allen Tieren das Gewicht bestimmt. Sie wurden dann jeweils paarweise gleichen Geschlechts in einen Käfig umgesetzt. Zur Unterscheidung der beiden Tiere in einem Käfig wurde jeweils eine Ratte mit einem schwarzen Punkt am Schwanzansatz markiert. Die Einteilung in die Gruppen erfolgte nach Gewicht, so dass am Ende jede Gruppe ein durchschnittliches Gewicht von 171g aufwies.

Jeder Gruppe wurden jeweils sechs männliche und sechs weibliche Tiere zugeteilt. Der Gruppe L250 pf wurden noch zusätzlich zwei weibliche Tiere als Reserve zugeteilt.

In der Zeit der Eingewöhnungsphase bekamen die Ratten ein nagerübliches Alleinfutter der Firma ZIMMERER-WERKE (Landshut) sowie Leitungswasser ad libitum.

Nach der Gruppeneinteilung (siehe Tabelle 10) erfolgte die Futterumstellung auf die jeweiligen Versuchsfutter.

Kontrollgruppe:

Keine Zumischung von REE-Citrat.

Gruppe L250 ad lib und L250 pf:

Versuchsgruppe, der pro kg Versuchsfutter im Werk 250mg REE-Citrat zugemischt wurde.

Gruppe L1250 ad lib und L250 pf:

Versuchsgruppe, der pro kg Versuchsfutter im Werk 1250mg REE-Citrat zugemischt wurde.

Tabelle 10: Gruppeneinteilung in Kontrollgruppe und Versuchsgruppen, sowie deren Gehalte an REE-Citrat und die jeweilige Fütterungsart

Gruppe	Konzentration an REE-Citrat in mg pro kg Futter	Fütterungsart
Kontrollgruppe	0	ad libitum
L250 ad lib	250	ad libitum
L250 pf	250	pair feed zur Kontrollgruppe
L1250 ad lib	1250	ad libitum
L1250 pf	1250	pair feed zur Kontrollgruppe

Die Gruppen L250 ad lib und L250 pf wurden mit demselben Futter gefüttert, dem eine Konzentration von 250mg REE-Citrat pro kg zugemischt wurde.

Gruppe L250 ad lib bekam das Futter ad libitum, Gruppe L250 pf wurde im pair-feed-Verfahren gefüttert. Dazu wurde täglich das Futter der Kontrollgruppe ausgewogen, der Durchschnitt der aufgenommenen Futtermenge des letzten Tages berechnet und den Tieren der Gruppe L250 pf zugeteilt. Das Verfahren wurde nach männlichen und weiblichen Tieren getrennt, so dass die weiblichen Tiere der Gruppe L250 pf die durchschnittliche Futtermenge der weiblichen Tiere der

Kontrollgruppe bekamen und die männlichen Tiere der Gruppe L250 pf die durchschnittliche Futtermenge der männlichen Tiere aus der Kontrollgruppe.

Die nicht aufgenommene Futtermenge der pair-feed-Tiere wurde vor der Neuzuteilung zurückgewogen. So wurde die maximale Futteraufnahme der Gruppe L250 pf auf die der Kontrollgruppe beschränkt, um mögliche positive Effekte des REE-Citrats durch höhere Futteraufnahme auszuschließen.

Die Gruppe L1250 ad lib und L1250 pf wurden mit demselben Futter gefüttert, dem pro kg mit 1250mg eine fünffach höhere Konzentration vom REE-Citrat beigemischt wurde.

Gruppe L1250 ad lib bekam das Futter ad libitum, Gruppe L1250 pf wurde im pair-feed-Verfahren wie Gruppe L250 pf gefüttert.

3.5 Versuchsablauf

3.5.1 Technik der Blutentnahme

Nach dreimonatiger Fütterung wurden Glukosetoleranztests und eine Insulinbestimmung durchgeführt.

Hierzu wurde täglich von jeweils sechs Tieren unterschiedlicher Gruppen Blut entnommen. Die Einteilung der Gruppen zur Blutentnahme erfolgte nach einer Randomisierung, so dass mögliche Schwankungen der Blut- und Serumparameter innerhalb des Tages der Blutentnahme ausgeglichen wurden.

Den Tieren wurde am Tag zuvor das Futter entzogen, so dass eine mindestens 16 stündige Nüchternphase der Blutentnahme vorausging. Wasser stand in der Zeit weiterhin ad libitum zur Verfügung.

Zur Blutentnahme wurden die Tiere von einer Hilfsperson in einem Handtuch so fixiert, dass nur noch eine Hintergliedmaße herausschaute. Dieses wurde von der Hilfsperson ebenfalls fixiert und gleichzeitig gestaut. Nach der Entfernung der Haare konnte nun aus der gestauten Vena saphena Blut entnommen werden.

Es wurden Neolus[®] - Kanülen der Firma BSN medical GmbH + Co. KG der Größe 22G x 1 ¼“ (0,7x30mm) verwendet. Der Plastikonus der Kanüle wurde zuvor abgebrochen, um eine Koagulation der geringen Blutmenge im Konus zu vermeiden. Die Vene wurde somit nur mit der Metallspitze der Kanüle punktiert.

Um die Belastung für die Tiere möglichst gering zu halten, wurden für die

mehrfachen Blutentnahmen beide Hintergliedmaßen zur Entnahme herangezogen. Pro Blutentnahme wurde den Tieren ca. 150µl Blut in eine Eppendorf-Cup (Eppendorf AG, Hamburg) entnommen.

3.5.2 Versuchsende

Zum Versuchsende wurden die Ratten mittels einer Triple-Narkose, bestehend aus Medetomidin als Sedativum, Midazolam als Muskelrelaxans und Fentanyl als Analgetikum im Verhältnis 9: 24: 9 mit einer Dosierung von 1,4 ml/ kg KGW, betäubt. Danach erfolgte die Tötung unter Blutentzug.

Hierzu wurden Bauch- und Brusthöhle eröffnet, mit einer Kanüle die linke Herzkammer perforiert und die Vena cava abdominalis durchtrennt. Im Rahmen einer weiteren Studie von Kroth (2011) erfolgte eine Perfusion mit PBS-Puffer, wodurch die Bauchorgane blutleer gespült wurden.

Anschließend wurde die Leber, der Darm, die Nieren und eine Muskelprobe aus der langen Sitzbeinmuskulatur entnommen, welche für weiterführende Untersuchungen im Rahmen dieser anderen Studie benötigt wurden.

Der Restkörper wurde für weitere Untersuchungen bei -18°C eingefroren.

3.6 Ganzkörperanalyse

Zur Bestimmung des Rohprotein- (Rp), Rohfett- (Rfe) und Rohaschegehalts (Ra) der Tiere wurde eine Weender Analyse durchgeführt.

Dazu wurden die ganzen restlichen Körper ohne die zuvor entnommene Leber, den Darm und die Nieren verwendet.

3.6.1 Weender Analyse

3.6.1.1 Bestimmung der Ursprungssubstanz (US) und der Trockensubstanz (TS)

Durch Wiegen wurde zu Beginn die Ursprungssubstanz (US) des Körpers eines jeden Tieres ermittelt. Danach wurden die Restkörper in Aluschälchen (Neolab, Heidelberg) über drei Tage im Lyophilisator gefriergetrocknet und anschließend unter Abzug des Leergewichts des Aluschälchens die Trockensubstanz (TS) ermittelt.

Nach dem Mahlen in einer Retschmühle (GM200, Retsch GmbH, Haan) konnten mit der TS nun die weiteren Analysen durchgeführt werden.

Um Restfeuchte auszuschließen, wurde zusätzlich die 2.Trockensubstanz bestimmt. Hierzu wurden die lyophilisierten und gemahlten Restkörper im Trockenschrank bei 103°C so lange getrocknet, bis sie keine Gewichtsschwankungen mehr aufwiesen. Die 2.TS wurde bei den Analysen berücksichtigt.

Die Körper wurden in Schraubdeckeldosen (Rotilabo[®], 120ml, unsteril, Carl Roth GmbH, Karlsruhe) aufbewahrt.

3.6.1.2 Bestimmung der Rohasche (Ra)

Die Rohasche ist die anorganische Komponente des Ausgangsmaterials. Sie wird in % der Ursprungssubstanz angegeben.

Hierzu wurden ca. 2-3g der Proben in Porzellantiegeln eingewogen und im Muffelofen (Thermicon[®]II4021, HERAEUS, Hanau) verascht. Der Veraschungsprozess fand bei 550°C statt und dauerte etwa drei Tage. Danach wurden die Tiegel ausgewogen und der Rohaschegehalt in % der Ursprungssubstanz errechnet.

3.6.1.3 Bestimmung des Rohfetts (Rfe)

Der Rohfettgehalt wurde nach vorheriger Säurehydrolyse (Methode nach Weibull-Stoldt) im Soxhlet- Verfahren bestimmt.

Geräte

- Soxtec Avanti 2050, Foss, Hamburg
- Glas capsule, Foss, Hamburg
- SoxCap Filter, Foss, Hamburg
- Soxlet-Hülsen, Foss, Hamburg
- SoxCap 2047, Foss, Hamburg
- Salzsäure 3n, Merck, Darmstadt
- Celite 545, ungeglüht, Merck, Darmstadt
- Siedesteinchen (Glasperlen), bezogen von VWR International GmbH, Wien, Österreich
- Petrolether (40-60°C), Art.Nr. T173.3, ROTH, Karlsruhe
- Trockenschrank, Memmert, Schwabach
- Glasmörser (AH00 Staatl. Berlin)

Säurehydrolyse nach Weibull- Stoldt

In die Glaskapsel, die zuvor mit dem SoxCap-Filter versehen wurde, wurden ca. 1,5- 3g der Probe eingewogen und eine Spatelspitze ungeglühtes Celite zugegeben.

Die Glaskapsel wurde anschließend in den SoxCap eingesetzt und in Salzsäure für eine Stunde gekocht. Anschließend mussten die Proben bis zur pH Neutralität mit Wasser gespült werden.

Nach einer Trockenphase von mindestens acht Stunden bei 103°C erfolgte die Fettextraktion nach Soxleth.

Fettextraktion nach Soxhlet

Für die Fettextraktion wurden ca. 2g der Proben mittels eines Hülsenträgers direkt in die Filterhülsen eingewogen. Das Gewicht des unteren Topfes mit drei Siedesteinchen wurde notiert. Anschließend wurde der Fettextraktor mit den Probengefäßen bestückt, die Extraktionshülsen mit 80ml Petrolether gefüllt und bei 135°C extrahiert. Danach wurden die Töpfe mit den Siedesteinchen und dem Fett über 60min bei 103°C im Trockenschrank getrocknet und anschließend im Exsikkator abgekühlt. Nun konnte durch die Gewichts Differenz das Rohfett in Prozent bestimmt werden.

3.6.1.4 Bestimmung des Rohproteins (Rp)

Die Bestimmung des Rohproteingehalts erfolgte nach dem Kjeldahl-Verfahren, bei dem der im Körper enthaltene Stickstoff ermittelt wurde. Anschließend wurde der Proteingehalt in Prozent errechnet. Da in 100g Protein 16 g Stickstoff enthalten sind, ist der Umrechnungsfaktor: $N \times 6,25$.

Geräte und Material

- Foss Kjeltec 2400, Dispenser 0-25ml, Foss, Hamburg
- Schwefelsäure 98%ig, Art.Nr. 100748, Merck, Darmstadt
- Natronlauge 21%ig, Art.Nr. 105593, Merck, Darmstadt
- Natronlauge 32%ig, Art.Nr. 105590, Merck, Darmstadt
- Salzsäure 0,2n, Art.Nr. 113134, Merck, Darmstadt
- Borsäurelösung 1%ig, Art.Nr. 100160, Merck, Darmstadt
- Kjeltabs Cu/3,5 (3,5g K_2SO_4 + 0,4g $CuSO_4 \times 5 H_2O$), VWR International GmbH, Wien, Österreich

Durchführung

In eine 250ml Tube wurde ca. 1g der 1.TS der Restkörper eingewogen, zwei Kjeltabs und 15ml konzentrierte H_2SO_4 mit dem Dispenser zugegeben. Anschließend wurden die Proben bei $410^\circ C$ für 50min im Aufschlussblock gekocht, wobei der Stickstoff in Ammoniumsulfat übergeht. In einem sich anschließenden Destillierprozess wurde der Stickstoff unter Zugabe von Natronlauge als NH_3 in eine Vorlage aus Borsäure überführt. Schließlich konnte mit Salzsäure der NH_4OH -Gehalt der Vorlage durch Titration ermittelt und so die Stickstoffmenge erfasst werden. Der Rohproteingehalt entspricht dem 6,25 fachen des enthaltenen Stickstoffes.

3.7 Glukosetoleranztest und Insulinmessung

Der Glukosetoleranztest wurde dreimal im Abstand von jeweils drei Wochen durchgeführt. Zweimal fand eine orale Eingabe unterschiedlicher Glukoselösungen statt und einmal eine intraperitoneale Eingabe einer Glukoselösung (Siehe auch Tabelle 11).

Für den ersten Glukosetoleranztest wurde 40%ige Glukose-Lösung (Glucose-Lösung G40, B. BRAUN MELSUNGEN AG, Melsungen) in einer Menge von 2g

Glukose pro kg Körpergewicht Ratte oral eingegeben.

Für den zweiten Glukosetoleranztest wurde 40%ige Glukose-Lösung in einer Menge von 2g/kg sowie zusätzlich, je nach aufgenommenener Futtermenge, eine Lösung von REE-Citrat oral eingegeben.

Die REE-Citrat-Lösung bestand aus derselben Seltene-Erden-Mischung, die auch im Futter verwendet wurde. Diese wurde mit 0,9%igem Natriumchlorid in Lösung gebracht und nach der durchschnittlichen täglichen Futteraufnahme der letzten Woche der jeweiligen Tiere dosiert, so dass die Tiere mit den 2g Glukose pro kg Körpergewicht zusätzlich die Dosis an REE-Citrat aufgenommen haben, die sie auch mit dem Futter täglich zu sich nahmen. In Tabelle 12 sind die Menge an REE-Citrat in mg und Glukose in g aufgelistet, die jedes Tier individuell bekommen hat.

Für den dritten Glukosetoleranztest wurde 40%ige Glukose-Lösung in einer Menge von 2g/kg intraperitoneal eingegeben.

Tabelle 11: Glukosetoleranztests

Eingabe	Art der Eingabe	Menge
Glukose	oral	2g/kg
Glukose+REE-Citrat	oral	2g/kg Glu + REE-Citrat ¹
Glukose	intraperitoneal	2g/kg

¹: Siehe Tabelle 12, entsprechend der in der letzten Woche täglich aufgenommenen REE-Menge

Tabelle 12: Menge an REE-Citrat in mg und Glukose in g, die oral eingegeben wurde, aufgelistet pro Tier der Gruppe L250 ad lib und L1250 ad lib (n=10), der Gruppe L250 pf (n=13) und der Gruppe L1250 pf (n=12).

Gruppe	Tiernummer	REE-Citrat in mg	Glukose in g
L 250 ad lib	15	4,34	0,46
	16	4,34	0,63
	17	4,43	0,61

	18	4,43	0,62
	19	6,63	0,99
	20	6,63	1,00
	21	6,42	1,02
	22	6,42	1,13
	23	5,78	0,87
	24	5,78	0,92
L 250 pf	25	4,29	0,53
	26	4,29	0,62
	27	4,39	0,56
	28	4,39	0,55
	29	4,38	0,58
	30	4,38	0,56
	31	6,36	1,13
	32	6,36	1,02
	33	6,5	1,20
	34	6,5	1,02
	35	6,18	0,97
	81	4,38	0,54
	82	4,38	0,54
L 1250 ad lib	39	4,67	0,61
	40	4,67	0,50
	41	4,33	0,53
	42	4,33	0,57

	43	6,71	1,13
	44	6,71	1,08
	45	6,47	1,09
	46	6,47	0,97
	47	5,90	0,84
	48	5,90	1,00
L 1250 pf	49	4,36	0,52
	50	4,36	0,66
	51	4,43	0,57
	52	4,43	0,58
	53	4,22	0,61
	54	4,22	0,58
	55	6,23	0,91
	56	6,23	1,00
	57	6,75	1,00
	58	6,75	1,13
	59	6,39	0,97
	60	6,39	0,90

Die orale Eingabe erfolgte nach einer kurzen Sedierung in Narkosegas (Isofluran, Baxter AG, Deerfield, Illinois, USA) über eine Knopfkanüle mit 2,5 bzw. 5ml Terumo[®]-Einmalspritzen (TERUMO Europe, Leuven, Belgien), je nach Eingabevolumen.

Die intraperitoneale Glukoseverabreichung erfolgte ebenfalls nach einer kurzen Narkotisierung im Narkosegas mit Neolus[®] - Kanülen der Firma BSN medical GmbH + Co. KG, der Größe 20G x 1 1/2“ (0,9x40mm) und 2,5 bzw. 5ml

Terumo[®]-Einmalspritzen.

Im 15minütigen Abstand wurde den Tieren zuerst zweimal Blut als sogenannter „Nullwert“ entnommen. Dann wurde den Tieren die Glukose verabreicht.

Für die oralen Glukosetoleranztests wurde anschließend nach 15, 30, 45, 60, 120 und 180 Minuten Blut entnommen.

Für den intraperitonealen Glukosetoleranztest wurde nach der Eingabe nach 5, 15, 30, 45, 60, 120 und 180 Minuten Blut entnommen.

Die Phase des Glukosetoleranztests erstreckte sich über mehrere Tage, da an einem Tag aus technischen Gründen nur von jeweils sechs Tieren die Blutentnahmen durchgeführt werden konnten. Die Einteilung der Tiere fand nach einer Randomisierung statt, so dass mögliche Schwankungen der Tageszeit in den Gruppen ausgeglichen werden konnten.

Den Ratten wurde am Tag zuvor das Futter entzogen, so dass der Glukosebestimmung eine mindestens 16stündige Nüchternphase vorausging. Wasser stand in der Zeit weiterhin ad libitum zur Verfügung.

Zur Blutentnahme wurden die Tiere von einer Hilfsperson in einem Handtuch fixiert. Die Hintergliedmaße wurde außerhalb des Handtuchs fixiert und gleichzeitig gestaut.

Um die Belastung für die Tiere möglichst gering zu halten, wurden für die Blutentnahmen abwechselnd beide Hintergliedmaßen herangezogen.

Es wurden Neolus[®] - Kanülen der Firma BSN medical GmbH + Co. KG der Größe 22G x 1 ¼“ (0,7x30mm) verwendet. Der Plastikkonus der Kanüle wurde zuvor abgebrochen, um eine Koagulation der geringen Blutmenge im Konus zu vermeiden. Die Vene wurde somit nur mit der Metallspitze der Kanüle punktiert.

Pro Entnahme wurden der Ratte ca. 150µl Blut entnommen. 140µl wurden in Eppendorf-Tubes (Save-Lock Eppendorf Tubes, 1,5ml, farblos, EPPENDORF AG, Hamburg) für die Serumgewinnung gefüllt, um damit das Insulin zu bestimmen, 10µl wurden mit einer Kapillare für die Glukosemessung entnommen.

Für die Glukosemessung wurde das Glucocapil-System (Dr. Müller Gerätebau GmbH, Freital) verwendet. Das Blut wurde mit einer heparinbeschichteten Kapillare entnommen, die exakt 10µl Volumen beßa. Anschließend wurde die Kapillare in ein Reaktionsgefäß (2ml Volumen, 1000Hämolisierlösung, Dr. Müller Gerätebau GmbH, Freital) überführt und kräftig geschüttelt, damit das Blut hämolisierte.

Die Messung der Glukosekonzentration in mg/dl aus dem Glucocapil-Reaktionsgefäß fand anschließend mit dem Gerät Super GL ambulance (Dr. Müller Gerätebau GmbH, Freital) statt.

Für die Insulinbestimmung wurde Serum aus den Blutentnahmen während des oralen Glukosetoleranztests (2g/kg) gewonnen. Die Eppendorf-Tubes mit dem Blut wurden dazu bis zur Koagulation stehen gelassen und anschließend in einer Zentrifuge (MiniSpin Plus, EPPENDORF AG, Hamburg) zentrifugiert. Je nach Blutmenge 2-4min bei 4000-8000 Umdrehungen/min.

Danach wurde der Serumüberstand in neue Eppendorf-Tubes abpipettiert und bei -18°C eingefroren.

Die quantitative Bestimmung des Insulingehalts erfolgte durch einen Enzym Immuno Assay (EIA) (Insulin (Rat) Ultrasensitive EIA, ALPCO Diagnostics, Salem, New Hampshire, USA).

Prinzip

Es handelt sich hier um einen nicht-kompetitiven, sogenannten Sandwich Immunoassay. Hierbei wird das Antigen (Insulin) nachgewiesen, indem es von zwei verschiedenen Antikörpern gebunden wird. Einer der beiden Antikörper wird in einer festen Phase immobilisiert und befindet sich schon auf der Mikrotiterplatte. Er dient dazu, die Antigene in der festen Phase zu binden. Das nachzuweisende Antigen und ein bekannter Standard zur Kontrolle werden dazugegeben. Das Antigen bindet sich an den festen Antikörper und ein zweiter Antikörper mit einem gebundenen Enzym wird auf die feste Phase gegeben. Dieser bindet sich in einer Inkubationsphase ebenfalls an das Antigen. Danach werden in einer Waschung überschüssige, nicht-gebundene Antikörper entfernt. Anschließend wird ein Substrat dazugegeben. In einer zweiten Inkubationsphase reagiert das gebundene Enzym mit dem Substrat und verursacht einen Farbumschlag. Die Farbintensität ist direkt proportional zur Antigenkonzentration und wird Photometrisch bestimmt.

Bestimmung

Bei dem hier verwendeten ALPCO Insulin (Rat) Ultrasensitiv EIA ist die 96-Loch-Mikrotiterplatte überzogen mit einem monoklonalen Antikörper, spezifisch für Insulin. Die Proben, Insulin-Standards (0, 0.02, 0.05, 0.15, 0.4, 1, 3, 5.5

ng/ml), Kontrolle (Säugetier-Insulin) und ein an einen zweiten monoklonalen Antikörper gebundenes Meerrettich-Peroxidase-Enzym (HRP Horseradish peroxidase enzyme) werden auf die Platte pipetiert.

Die Platte wird dann in einem Mikrotiterplatten-Rüttler bei 700-900 U/min für 2 Stunden bei Raumtemperatur (18-25°C) inkubiert. Danach werden die Platten mit einer Waschlösung sechs Mal gewaschen und getrocknet. Ein Substrat (Tetramethylbenzidin) wird dazugegeben, und die Platte wird erneut bei 700-900 U/min 30min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Meerrettich-Peroxidase oxidiert das Substrat und verursacht einen Farbumschlag unter Bildung von Wasser. Nach der zweiten Inkubation wird Stopplösung dazugegeben und die optische Dichte im Spectrometer mit einer Wellenlänge von 450nm gemessen. Die Farbintensität ist direkt proportional zur Insulinmenge in den Proben.

3.8 Statistische Auswertung

Die Auswertung der Daten fand mit Hilfe des Statistikprogramms SIGMASTAT, Version 3.0 (SYSTAT SOFTWARE Inc., Richmond, CA, USA) statt.

Die Resultate der Analysen wurden als arithmetischer Gruppenmittelwert (MW) und der dazugehörigen Standardabweichung (SD) angegeben.

3.8.1 Mittelwertsvergleiche

Die Ergebnisse wurden mittels einfacher Varianzanalyse (One way ANOVA) analysiert. Wenn keine Normalverteilung gegeben und ein „Equal Variance Test“ nicht möglich war, wurde eine „Kruskal-Wallis One Way Analysis of Variance on Ranks“ durchgeführt. Um die Gruppen zu differenzieren, die signifikant voneinander verschieden waren, wurde ein multipler Verfahrensvergleich durchgeführt (multiple comparison procedure, Dunn's method, Holm-Sidak-method, wenn $p < 0,05$ war).

Mittelwerte, die nicht mit demselben Buchstaben überschrieben sind, unterscheiden sich signifikant ($p < 0,05$).

IV. ERGEBNISSE

4.1 Fütterungsversuch mit Ratten

4.1.1 Allgemeinzustand der Ratten

Die Ratten wurden im Alter von 21 Tagen in Gruppen von jeweils acht Tieren aufgestellt. Nach einer dreiwöchigen Eingewöhnungsphase, in der alle Tiere das Futter der Kontrollgruppe bekamen, wurden sie in den Versuch aufgenommen und dann jeweils paarweise gleichen Geschlechts in einen Käfig umgesetzt.

Sie wiesen bei Versuchsstart ein durchschnittliches Gewicht von 171g auf.

Ihr Allgemeinzustand war gut. In Gruppe L250 pf wurde nach einer Woche als Vorsichtsmaßnahme ein weiterer Käfig mit zwei weiblichen Ratten aufgenommen, da zwei weibliche Tiere in einem Käfig aus der Gruppe klinische Symptomatik - in Form von geröteter Schleimhaut um beide Augen - aufwiesen. Diese besserte sich allerdings sehr schnell und erwies sich aufgrund von kontinuierlicher Futteraufnahme und Gewichtszunahme als unerheblich für den weiteren Versuch, so dass sie ebenfalls in der Gruppe L250 pf verblieben und die Gruppe nun aus 14 Tieren in 7 Käfigen bestand.

Für die Applikationen im Rahmen der Glukosetoleranztests wurden die Ratten kurzzeitig sediert. Hierfür wurde jede Ratte einzeln für etwa 10 Sek in einen Plastikbehälter mit Deckel gesetzt. In dem Behälter befand sich ein Tuch, das mit dem Narkosegas Isofluran getränkt war.

Bei dieser kurzen Narkose verstarben die männliche Ratte Nr. 36 sowie die weiblichen Ratten Nr. 37 und 38. Sie zeigten vorher keine klinische Symptomatik. Die Untersuchung ergab keine pathologischen Veränderungen.

4.1.2 Gewichtszunahme der Ratten

Zu Versuchsbeginn wurden die Ratten nach ihrem Gewicht in Gruppen eingeteilt, so dass jede Gruppe ein durchschnittliches Gewicht von $171\text{g} \pm 28\text{g}$ aufwies.

Bis zur 10. Versuchswoche nahmen die Ratten kontinuierlich an Gewicht zu. Danach blieb das Gewicht relativ konstant. Damit konnten sie im Alter von 16 Wochen (ca. 90. Versuchstag) als ausgewachsen betrachtet werden.

Die Ergebnisse zum Körpergewicht, Gewichtszunahme und Futteraufnahme wurden bereits in einer Dissertation veröffentlicht (Kroth, 2011). Zur Vollständigkeit werden sie hier ebenfalls aufgeführt.

Bei den Körpergewichten und Gewichtszunahmen gab es zwischen den Gruppen keine statistisch signifikanten Unterschiede.

In Tabelle 13 sind die durchschnittlichen Gewichte der Versuchstiere in g (MW \pm SD) zu Versuchsbeginn an Tag 0, zum Ende der Wachstumsphase an Tag 33, zu Beginn der Blutentnahmen an Tag 81 und zum Versuchsende an Tag 133 dargestellt.

Tabelle 13: Durchschnittliches Gewicht in g aller Tiere der Kontrollgruppe und der Versuchsgruppen zu Versuchsbeginn an Tag 0, an Tag 33, an Tag 81 und zu Versuchsende an Tag 133.

	Tag 0	Tag 33	Tag 81	Tag 133
Kontrolle	171 \pm 15	308 \pm 72	378 \pm 99	414 \pm 111
L250 ad lib	171 \pm 15	317 \pm 69	395 \pm 104	413 \pm 110
L250 pf	171 \pm 20	304 \pm 83	381 \pm 125	392 \pm 135
L1250 ad lib	171 \pm 17	322 \pm 83	392 \pm 127	448 \pm 132
L1250 pf	171 \pm 17	313 \pm 73	390 \pm 107	417 \pm 118

Keine statistisch Signifikanten Differenzen zwischen den Gruppen.

Tabelle 14 zeigt die durchschnittlichen täglichen Zunahmen in g (MW \pm SD) der fünf Gruppen. (Das Tier 36 der Gruppe L250 pf ist nur bis Tag 98 sowie Tier 37 und 38 der Gruppe L 1250 ad lib sind nur bis Tag 88 berücksichtigt.) Über die gesamte Dauer des Versuches zeigen sich kaum Unterschiede zwischen den fünf Gruppen.

Tabelle 14: Durchschnittliche tägliche Gewichtszunahme in g pro Tier der Kontrollgruppe und der Versuchsgruppen über den gesamten Versuch.

	Gewichtszunahme in g von Tag 0-133
Kontrolle	1,81 ±0,72
L250 ad lib	1,80 ±0,72
L 250 pf	1,72 ±0,85
L1250 ad lib	1,88 ±0,88
L1250 pf	1,84 ±0,76

Keine Statistisch signifikanten Differenzen zwischen den Gruppen.

4.1.3 Futteraufnahme

Da die Ratten immer zu zweit in einem Käfig gehalten wurden, konnte kein individueller Futterverbrauch festgestellt werden, sondern die Futteraufnahme eines Käfigs wurde jeweils ausgewogen. Daher konnte auch keine statistische Auswertung der Daten pro Tier aus der Futteraufnahme gemacht werden.

In Tabelle 15 sind die durchschnittlichen täglichen Futteraufnahmen aller Käfige einer Gruppe über den gesamten Versuch von 133 Tagen sowie verschiedenen Abschnitten des Versuches dargestellt (MW±SD). Bei der Gruppe L1250 ad lib sind die Tiere 37 und 38 nur bis Tag 88 und bei der Gruppe L250 pf das Tier 36 nur bis zum Tag 98 mit einbezogen. Die Ergebnisse wurden bereits von Kroth (2011) veröffentlicht.

Die gesamte Futteraufnahme aller Gruppen (MW±SD) ist in Tabelle 16 dargestellt (Kroth, 2011). Zwischen den Gruppen gab es keine auffälligen Unterschiede.

Tabelle 15: Mittlere tägliche Futteraufnahme in g aller Käfige der Kontrollgruppe und der Versuchsgruppen in verschiedenen Abschnitten des Versuches.

	Gesamt	Tag 0-81	Tag 82-133	Wachstumsphase	Haltungsphase
Kontrolle	45,39 ±9,04	47,19 ±9,21	43,41 ±9,14	48,33 ± 7,90	44,68 ±9,57
L250 ad lib	44,65 ±9,11	46,46 ±9,19	42,65 ±9,18	46,89 ± 8,52	44,35 ±9,41
L250 pf	41,30 ±8,89	43,42 ±10,28	38,75 ±8,86	43,42 ± 10,01	41,01 ±8,82
L1250 ad lib	44,76 ±9,90	46,34 ±10,29	44,65 ±9,80	48,09 ± 9,19	43,87 ±10,55
L1250 pf	43,46 ±9,56	44,84 ±9,60	42,12 ±9,68	45,65 ± 8,75	43,17 ±9,94

Keine Statistisch signifikanten Differenzen zwischen den Gruppen.

Gesamt = Tag 0-133 des Versuches

Tag 0-81 des Versuches = vor der Blutentnahme

Tag 82-133 des Versuches = während und nach der Blutentnahme

Wachstumsphase = bis 33. Versuchstag (<10. Lebenswoche)

Haltungsphase = ab 34. Versuchstag (>10. Lebenswoche)

Tabelle 16: Gesamte Futteraufnahme in g der Kontrollgruppe und der Versuchsgruppen über den ganzen Versuch (Tag 0 - 133).

	Futteraufnahme in g
Kontrolle	6036 ± 1203
L250 ad lib	5938 ± 1211
L250 pf	5511 ± 1182
L1250 ad lib	6009 ± 1706
L1250 pf	5780 ± 1271

Keine Statistisch signifikanten Differenzen zwischen den Gruppen.

4.2 Glukosetoleranztest

Bei den drei durchgeführten Glukosetoleranztests sind keine systematischen Unterschiede im Vergleich zur Kontrollgruppe und zwischen den Gruppen festgestellt worden.

4.2.1 Glukosetoleranztest mit oraler Glukoseeingabe

Tabelle 17 zeigt die Glukosekonzentration in mg/dl Blut der Tiere aller fünf Gruppen (MW \pm SD). Sie ist zu den jeweiligen Zeitpunkten der Blutentnahme in Minuten vor und nach der oralen Applikation der Glukoselösung (2g/kg KGW) angegeben.

Die basale Glukosekonzentration im Blut lag 15 Minuten vor der oralen Glukoseeingabe bei durchschnittlich 80,81 mg/dl und stieg mit Ausnahme der Gruppe L1250 ad lib bis zur zweiten Blutentnahme leicht an.

15 Minuten nach der Applikation zeigten die Kontrollgruppe und die Gruppen L250 ad lib, L250 pf und L1250 ad lib den höchsten Blutglukosegehalt. Bei der Gruppe L1250 pf stieg der Gehalt weiter kontinuierlich an und erreichte 60 Minuten nach der Applikation sein Maximum von 129,97mg/dl. Dieser Gehalt lag signifikant über dem der Kontrollgruppe ($p < 0,05$). Die Glukosekonzentration der Gruppe L250 ad lib lag signifikant ($p < 0,05$), die der Gruppe L250 pf und L1250 ad lib sogar hochsignifikant ($p < 0,01$) unter dem Maximum der Gruppe L1250 pf. Nach dem Erreichen des Maximums sanken die Glukosekonzentrationen der Gruppen L250 ad lib, L250 pf und L1250 ad lib zum Zeitpunkt T30 leicht ab, um dann erneut bis zum Zeitpunkt T60 etwas anzusteigen. Die Glukosekonzentration der Kontrollgruppe sank kontinuierlich bis zum Zeitpunkt T45 ab, stieg zum Zeitpunkt T60 wieder leicht, um danach, wie alle Gruppen, langsam abzusinken. Die Gruppe L250 pf zeigte sowohl 120 Minuten als auch 180 Minuten nach der oralen Glukoseapplikation noch deutlich höhere Glukosekonzentrationen als die anderen Gruppen. Zum letzten gemessenen Zeitpunkt, 180 Minuten nach der Glukoseeingabe, lag die Glukosekonzentration der Gruppe L250 pf mit 98,29mg/dl sogar signifikant ($p < 0,05$) über der Kontrollgruppe.

Tabelle 17: Mittelwerte der Glukosekonzentration in mg/dl Blut der Kontrollgruppe und der Versuchsgruppen nach oraler Glukoseeingabe.

Zeitpunkt Gruppe	T-15	T 0	T 15	T 30	T 45	T 60	T 120	T 180
Kontrolle	82,23 ^a ± 10,67	87,03 ^a ± 7,02	129,33 ^a ± 22,42	120,28 ^a ± 21,48	111,59 ^a ± 10,81	115,60 ^a ± 11,96	93,99 ^a ± 20,38	86,12 ^a ± 4,08
L 250 ad lib	83,73 ^a ± 9,41	85,27 ^a ± 10,99	118,00 ^a ± 9,27	114,34 ^a ± 14,0	116,00 ^a ± 12,95	115,32 ^a ± 12,02	92,72 ^a ± 11,53	88,92 ^a ± 6,43
L 250 pf	76,73 ^a ± 8,08	91,08 ^a ± 13,89	123,23 ^a ± 22,76	110,17 ^a ± 18,99	120,54 ^a ± 20,24	113,82 ^a ± 14,18	99,12 ^a ± 13,9	98,29 ^b ± 11,01
L 1250 ad lib	84,25 ^a ± 8,28	81,94 ^a ± 7,81	116,03 ^a ± 11,65	108,34 ^a ± 10,39	110,80 ^a ± 7,5	111,46 ^a ± 13,8	91,74 ^a ± 11,04	86,86 ^a ± 8,88
L 1250 pf	77,11 ^a ± 9,08	85,46 ^a ± 6,71	114,53 ^a ± 14,19	118,16 ^a ± 12,73	117,83 ^a ± 7,48	129,97 ^b ± 15,79	95,38 ^a ± 12,58	90,11 ^a ± 11,91

Mittelwerte, die nicht mit demselben Buchstaben überschrieben sind, unterscheiden sich signifikant ($p < 0,05$) (Kruskal-Wallis One Way Analysis of Variance on Ranks)

b ($p < 0,05$) vs. Kontrolle

4.2.2 Orale Eingabe von Glukose- und REE-Citrat-Lösung

Die Tabelle 18 zeigt die Glukosekonzentration in mg/dl Blut der Tiere der Gruppen L250 ad lib (n=10), L250 pf (n=13), L1250 ad lib (n=10) und L1250 pf (n=12) zu den jeweiligen Zeitpunkten der Blutentnahme in Minuten vor und nach der oralen Applikation von Glukose- und REE-Citrat-Lösung (MW \pm SD). Die Konzentration der Glukoselösung betrug 2g Glukose/kg Körpergewicht.

Die einzugebende Menge an REE-Citrat wurde für jedes Tier individuell berechnet. Zuerst wurde die durchschnittlich tägliche Futteraufnahme der letzten sieben Tage des jeweiligen Tieres berechnet. Hochgerechnet auf 1 kg Futteraufnahme wurden dann 250mg REE-Citrat eingegeben.

Somit sollte jedem Tier die gleiche Menge REE-Citrat, die es durchschnittlich täglich mit dem Futter aufnimmt, zusätzlich oral verabreicht werden (siehe Tabelle 12). Die Kontrollgruppe wurde in diesen Versuch nicht mit aufgenommen, da den Tieren dieser Gruppe zu keiner Zeit Seltene Erden verabreicht wurden. Aus technischen Gründen wurde diese Versuchsreihe mit Tier 13 und 14 nicht durchgeführt.

Im nüchternen Zustand lag 15 Minuten vor der oralen Glukose- und REE-Citrat-Applikation die Glukosekonzentration der Gruppe L250 pf signifikant ($p<0,05$), die der Gruppen L1250 ad lib und L1250 pf hochsignifikant ($p<0,01$) unter der Glukosekonzentration der Gruppe L250 ad lib. Zum zweiten Blutentnahmezeitpunkt T0 stieg sie bei allen Gruppen leicht an. Hier lag nur noch die Glukosekonzentration der Gruppe L1250 ad lib signifikant ($p<0,05$) unter der Gruppe L250 ad lib. 15 Minuten nach der Applikation erreichte der Glukosegehalt im Blut der Gruppen L250 ad lib und L1250 pf sein Maximum von 123,53mg/dl bzw. 123,13mg/dl. Der Glukosegehalt der Gruppe L1250 ad lib lag hier mit 98,94mg/dl immer noch signifikant ($p<0,05$) unter dem Gehalt der Gruppe L250 ad lib und ebenfalls signifikant ($p<0,05$) unter dem Gehalt der Gruppe L1250 pf. Der Gehalt der Gruppe L1250 pf sank zum Zeitpunkt T30 sogar auf 97,26mg/dl und erreichte erst 45 Minuten nach der Applikation sein Maximum von 107,96mg/dl. Insgesamt blieb die Glukosekonzentration im Blut der Gruppe L1250 ad lib, außer zum Zeitpunkt T45, zu allen Blutentnahmezeitpunkten unter

dem der anderen Gruppen. Zum Zeitpunkt T30 sank auch der Gehalt der anderen Gruppen ab und stieg danach wieder geringfügig an. Die Gruppe L250 pf erreichte die maximale Glukosekonzentration von 109,64mg/dl erst 60 Minuten nach der Eingabe. 120 Minuten nach der Applikation lagen die Glukosekonzentrationen der Gruppen L250 pf und L1250 ad lib mit 89,56mg/dl und 87,75mg/dl hochsignifikant ($p < 0,01$) unter dem Gehalt von 101,44mg/dl der Gruppe L250 ad lib. Auch zum letzten Blutentnahmezeitpunkt, 180 Minuten nach der Eingabe, lag die Glukosekonzentration der Gruppe L250 pf signifikant ($p < 0,05$) und die der Gruppe L1250 ad lib hochsignifikant ($p < 0,001$) unter der Gruppe L250 ad lib. Die Gruppe L1250 pf unterschied sich hier ebenfalls signifikant ($p < 0,05$) zur niedrigen Glukosekonzentration der Gruppe L1250 ad lib.

In Tabelle 19 ist der Vergleich der Versuchsgruppen aus dem zweiten Glukosetoleranztest mit oraler Eingabe von REE-Citrat und der Kontrollgruppe aus dem oralen Glukosetoleranztest dargestellt (MW \pm SD). Hier lagen die Blutglukosekonzentrationen der Gruppen L250 pf, L1250 ad lib und L1250 pf zum Zeitpunkt T-15 hochsignifikant ($p < 0,001$) unter dem Glukosegehalt der Kontrollgruppe. Zum Zeitpunkt T0 lagen die Blutglukosekonzentrationen aller Versuchsgruppen signifikant ($p < 0,05$) unter dem Gehalt der Kontrollgruppe. Die Gruppe L250 pf lag auch noch bei T15 und die Gruppe L1250 ad lib bei T30 und T180 signifikant ($p < 0,05$) und bei T15 hochsignifikant ($p < 0,001$) unter dem Glukosegehalt der Kontrollgruppe. Zu den Zeitpunkten T45 und T60 gab es keine signifikanten Unterschiede. Bei T120 lag der Blutglukosegehalt der Gruppe L250 ad lib signifikant ($p < 0,05$) über dem Gehalt der Kontrollgruppe.

Tabelle 18: Mittelwerte der Glukosekonzentration in mg/dl Blut der Versuchsgruppen nach der oralen Eingabe von Glukose- (2g/kg) und REE-Citrat-Lösung (250mg/kg Futter).

Zeitpunkt Gruppe	T-15	T 0	T 15	T 30	T 45	T 60	T 120	T 180
L 250 ad lib	77,25 ^a ± 7,29	79,52 ^a ± 6,79	123,53 ^a ± 21,52	107,09 ^a ± 11,16	111,89 ^a ± 12,3	116,30 ^a ± 11,41	101,44 ^a ± 9,08	89,2 ^a ± 6,42
L 250 pf	69,82 ^b ± 6,08	77,81 ^a ± 7,36	105,41 ^a ± 13,07	103,89 ^a ± 8,01	107,88 ^a ± 10,15	109,64 ^a ± 11,23	89,56 ^b ± 7,11	82,02 ^b ± 6,31
L 1250 ad lib	64,72 ^b ± 9,8	68,05 ^b ± 6,92	98,94 ^b ± 10,72	97,26 ^a ± 9,41	107,96 ^a ± 8,86	105,41 ^a ± 5,93	87,75 ^b ± 5,67	76,96 ^b ± 6,99
L 1250 pf	66,33 ^b ± 3,91	76,38 ^a ± 12,82	123,13 ^a ± 28,72	103,67 ^a ± 11,32	108,64 ^a ± 16,82	116,75 ^a ± 17,75	93,92 ^a ± 11,62	85,28 ^b ± 9,9

Mittelwerte, die nicht mit demselben Buchstaben überschrieben sind, unterscheiden sich signifikant ($p < 0,05$) (Kruskal-Wallis One Way Analysis of Variance on Ranks)

b ($p < 0,05$) vs. L 250 ad lib

Tabelle 19: Mittelwerte der Glukosekonzentration in mg/dl Blut der Kontrollgruppe aus dem oralen Glukosetoleranztest und der Versuchsgruppen nach der oralen Eingabe von Glukose- (2g/kg) und REE-Citrat-Lösung (250mg/kg Futter).

Zeitpunkt Gruppe	T-15	T 0	T 15	T 30	T 45	T 60	T 120	T 180
Kontrolle	82,23 ^a ± 10,67	87,03 ^a ± 7,02	129,33 ^a ± 22,42	120,28 ^a ± 21,48	111,59 ^a ± 10,81	115,60 ^a ± 11,96	93,99 ^a ± 20,38	86,12 ^a ± 4,08
L 250 ad lib	77,25 ^a ± 7,29	79,52 ^b ± 6,79	123,53 ^a ± 21,52	107,09 ^a ± 11,16	111,89 ^a ± 12,30	116,30 ^a ± 11,41	101,44 ^b ± 9,08	89,21 ^a ± 6,42
L 250 pf	69,82 ^b ± 6,08	77,81 ^b ± 7,36	105,41 ^b ± 13,07	103,89 ^a ± 8,01	107,88 ^a ± 10,15	109,64 ^a ± 11,23	89,56 ^a ± 7,11	82,02 ^a ± 6,31
L 1250 ad lib	64,72 ^b ± 9,8	68,05 ^b ± 6,92	98,94 ^b ± 10,72	97,26 ^b ± 9,41	107,96 ^a ± 8,86	105,41 ^a ± 5,93	87,75 ^a ± 5,67	76,96 ^b ± 6,99
L 1250 pf	66,33 ^b ± 3,91	76,38 ^b ± 12,82	123,13 ^a ± 28,72	103,67 ^a ± 11,32	108,64 ^a ± 16,82	116,75 ^a ± 17,75	93,92 ^a ± 11,62	85,28 ^a ± 9,9

Mittelwerte, die nicht mit demselben Buchstaben überschrieben sind, unterscheiden sich signifikant ($p < 0,05$) (Kruskal-Wallis One Way Analysis of Variance on Ranks)

b ($p < 0,05$) vs. Kontrolle

4.2.3 Intraperitoneale Glukose-Applikation

Die Tabelle 20 zeigt die Glukosekonzentration in mg/dl Blut (MW \pm SD) einer randomisierten Auswahl an Ratten aller fünf Gruppen (n=6 pro Gruppe). Den Tieren wurde intraperitoneal Glukoselösung in der Konzentration 2g/kg Körpergewicht appliziert.

Im nüchternen Zustand lagen die Glukosekonzentrationen im Blut der Versuchsgruppen unter denen der Kontrollgruppe. Zum Zeitpunkt T-15 lagen sie bei Gruppe L250 pf signifikant ($p<0,05$), bei Gruppe L250 ad lib und L1250 pf sogar hochsignifikant ($p<0,01$ und $p<0,001$) unter dem Glukosegehalt der Kontrollgruppe. Nach der intraperitonealen Applikation der Glukoselösung stiegen die Blutglukosekonzentrationen aller Versuchsgruppen deutlich höher an als die der Kontrollgruppe. Alle Gruppen erreichten das Maximum zum Zeitpunkt T15. Danach blieben die Konzentrationen der Versuchsgruppen bis zum Zeitpunkt T60 über denen der Kontrollgruppe. Der Glukosegehalt der Gruppe L1250 pf lag zu allen Blutentnahmezeitpunkten nach der Applikation über dem der Kontrollgruppe. Die Werte der Gruppen L250 ad lib, L250 pf und L1250 ad lib sanken 120 Minuten nach der Applikation deutlich gegenüber der Kontrollgruppe und der Gruppe L1250 pf ab.

Tabelle 20: Mittelwerte der Glukosekonzentration in mg/dl Blut der Kontrollgruppe und der Versuchsgruppen nach der intraperitonealen Glukoseapplikation.

Zeitpunkt Gruppe	T-15	T 0	T 5	T 15	T 30	T 45	T 60	T 120	T 180
Kontrolle	81,15 ^a ± 5,8	86,17 ^a ± 4,5	167,17 ^a ± 36,15	187,50 ^a ± 43,69	155,83 ^a ± 44,23	137,17 ^a ± 32,32	137,50 ^a ± 7,82	109,78 ^a ± 15,78	104,37 ^a ± 13,79
L 250 ad lib	69,05 ^b ± 6,32	75,47 ^a ± 7,74	218,67 ^a ± 75,15	256,00 ^a ± 88,1	220,17 ^a ± 69,07	156,50 ^a ± 41,54	137,83 ^a ± 25,71	99,50 ^a ± 9,27	93,85 ^a ± 6,29
L 250 pf	73,17 ^b ± 10,26	76,70 ^a ± 8,22	192,17 ^a ± 65,14	215,00 ^a ± 52,05	180,00 ^a ± 39,97	146,50 ^a ± 24,35	134,33 ^a ± 12,93	99,67 ^a ± 16,5	99,50 ^a ± 8,01
L 1250 ad lib	75,75 ^a ± 4,81	75,48 ^a ± 10,03	186,67 ^a ± 89,21	251,00 ^a ± 85,81	191,50 ^a ± 55,74	147,33 ^a ± 24,7	133,50 ^a ± 21,7	99,80 ^a ± 9,21	92,97 ^a ± 8,07
L 1250 pf	66,73 ^b ± 3,48	77,27 ^a ± 10,13	192,00 ^a ± 43,29	256,33 ^a ± 66,73	211,50 ^a ± 99,30	178,67 ^a ± 81,91	171,17 ^a ± 79,26	114,62 ^a ± 22,57	105,58 ^a ± 12,41

Mittelwerte, die nicht mit demselben Buchstaben überschrieben sind, unterscheiden sich signifikant ($p < 0,05$) (Kruskal-Wallis One Way Analysis of Variance on Ranks)

b ($p < 0,05$) vs. Kontrolle

4.3 Insulinmessungen

An einer Auswahl von Tieren der Kontrollgruppe und der Gruppe L1250 ad lib wurde der Insulingehalt bestimmt. Hierzu wurden jeweils drei weibliche und drei männliche Tiere jeder Gruppe ausgewählt: aus der Kontrollgruppe die weiblichen Tiere 4, 5 und 6 sowie die männlichen Tiere 8, 9 und 11, aus der Gruppe L1250 ad lib die weiblichen Tiere 39, 40 und 41 und die männlichen Tiere 43, 44 und 45. Hierzu wurde Serum aus Vollblut verwendet. Das Blut stammt von den Entnahmen beim oralen Glukosetoleranztest.

Es wurde sowohl der Glukose- als auch der Insulingehalt (MW \pm SD) bestimmt.

In Tabelle 21 sind die Mittelwerte der Glukosekonzentration beider Gruppen in mg Glukose pro dl Blut zum Zeitpunkt T 0 vor der Glukoseapplikation und sechs weiteren Zeitpunkten in Minuten nach der Glukoseapplikation dargestellt.

Die Unterschiede zwischen den Gruppen waren statistisch nicht signifikant.

Tabelle 21: Mittelwerte der Glukosekonzentration in mg/dl Blut der Tiere 4,5,6,8,9&11 der Kontrollgruppe und der Tiere 39,40,41,43,44&45 der Gruppe L1250 ad lib.

Zeitpunkt Gruppe	T 0	T 15	T 30	T 45	T 60	T 120	T 180
Kontrolle	86,9 ^a ± 7,59	133,33 ^a ± 12,88	126,55 ^a ± 22,95	111,85 ^a ± 9,3	120,37 ^a ± 13,76	92,1 ^a ± 9,37	88,0 ^a ± 3,36
L250 ad lib	84,17 ^a ± 9,2	117,17 ^a ± 5,12	112,0 ^a ± 8,29	112,33 ^a ± 6,15	115,13 ^a ± 15,83	92,78 ^a ± 14,12	86,23 ^a ± 11,14

Mittelwerte, die nicht mit demselben Buchstaben überschrieben sind, unterscheiden sich signifikant ($p < 0,05$) (Kruskal-Wallis One Way Analysis of Variance on Ranks)

In Tabelle 22 sind die Mittelwerte der Insulinkonzentration im Blut der beiden Gruppen in ng Insulin pro ml Serum zu den jeweiligen Zeitpunkten der Blutentnahme dargestellt. Die Insulinkonzentration stieg bei der Gruppe L1250 ad lib nach der Glukoseapplikation etwas stärker an als die der Kontrollgruppe. Beide sanken dann bis zum Zeitpunkt T45 in etwa gleich stark ab. Zum Zeitpunkt

T60 stieg der Insulingehalt der Kontrollgruppe wieder an und ist dann mit 0,59ng/ml doppelt so hoch wie der Gehalt von 0,28ng/ml der Gruppe L1250 ad lib. Bis zum Zeitpunkt T120 fiel der Gehalt der Kontrollgruppe allerdings wieder stark und lag dann mit 0,16ng/ml um die Hälfte unter dem Gehalt von 0,33ng/ml der Gruppe L1250 ad lib. Trotz dieser Unterschiede gibt es zwischen den Gruppen keine statistischen Signifikanzen bei der Insulinkonzentration.

Tabelle 22: Mittelwerte der Insulinkonzentration im Blut der Tiere 4,5,6,8,9&11 der Kontrollgruppe und der Tiere 39,40,41,43,44&45 der Gruppe L1250 ad lib. Der Insulingehalt ist in ng/ml Serum angegeben.

Zeitpunkt Gruppe	T 0	T 15	T 30	T 45	T 60	T 120	T 180
Kontrolle	0,23 ^a ± 0,08	1,04 ^a ± 1,27	0,67 ^a ± 0,70	0,43 ^a ± 0,43	0,59 ^a ± 0,85	0,16 ^a ± 0,06	0,18 ^a ± 0,08
L250 ad lib	0,31 ^a ± 0,22	1,17 ^a ± 1,25	0,63 ^a ± 0,33	0,38 ^a ± 0,13	0,28 ^a ± 0,17	0,33 ^a ± 0,15	0,25 ^a ± 0,15

Mittelwerte, die nicht mit demselben Buchstaben überschrieben sind, unterscheiden sich signifikant ($p < 0,05$) (Kruskal-Wallis One Way Analysis of Variance on Ranks)

Tabelle 23 zeigt das Verhältnis von Insulin zu Glukose. Die Insulinwerte wurden hierzu von ng/ml in mg/dl umgerechnet ($1 \text{ ng/ml} = 1/10000 \text{ mg/dl}$) und durch die Glukosewerte geteilt. Die Tabelle zeigt die Mittelwerte zu den jeweiligen Zeitpunkten nach der Glukoseapplikation.

Das Insulin/Glukose-Verhältnis zeigt, wie viel Insulin für die ins Blut aufgenommene Glukose freigesetzt wurde. 15 Minuten nach der Glukosegabe wurde bei der Gruppe L1250 ad lib mehr Insulin im Verhältnis zur Glukosekonzentration im Blut freigesetzt als bei der Kontrollgruppe. Danach sank das Verhältnis etwas unter das der Kontrollgruppe. Zum Zeitpunkt T60 stieg bei der Kontrollgruppe der Blutglukosegehalt noch einmal an und es wird mehr Insulin im Verhältnis zum Glukosegehalt freigesetzt als bei der Gruppe L1250 ad lib, bei der der Glukosegehalt zwar etwas stieg, der Insulingehalt im Blut aber sank. Zu den letzten gemessenen Zeitpunkten bei T120 und T180 wurde bei Gruppe L1250 ad lib wieder mehr Insulin freigesetzt als bei der Kontrollgruppe, obwohl die Glukosekonzentration in etwa gleich gegenüber der Kontrollgruppe

geblieben ist. Dadurch verdoppelte sich das Insulin/Glukose-Verhältnis zum Zeitpunkt T120 bei Gruppe L1250 ad lib gegenüber der Kontrollgruppe. Zwischen den Gruppen gab es keine statistisch signifikanten Unterschiede.

Tabelle 23: Mittelwerte des Insulin/Glukose-Verhältnisses der Tiere 4,5,6,8,9&11 der Kontrollgruppe und der Tiere 39,40,41,43,44&45 der Gruppe L1250 ad lib. Die Werte sind in mg/dl *10⁻⁷ angegeben.

Zeitpunkt Gruppe	T 0	T 15	T 30	T 45	T 60	T 120	T 180
Kontrolle	2,72 ^a ± 1,24	8,39 ^a ± 10,71	5,45 ^a ± 6,01	3,77 ^a ± 3,61	4,53 ^a ± 6,11	1,77 ^a ± 0,71	2,01 ^a ± 0,90
L250 ad lib	3,50 ^a ± 2,29	9,90 ^a ± 10,67	5,65 ^a ± 3,08	3,41 ^a ± 1,29	2,53 ^a ± 1,56	3,68 ^a ± 2,24	3,00 ^a ± 1,94

Mittelwerte, die nicht mit demselben Buchstaben überschrieben sind, unterscheiden sich signifikant ($p < 0,05$) (Kruskal-Wallis One Way Analysis of Variance on Ranks)

4.4 Protein- und Fettgehalt der Restkörper

Bei der Ganzkörperanalyse (ohne die zuvor entnommene Leber, den Darm und die Nieren) wurden der Protein- und Fettgehalt (MW±SD) durch die Weender Analyse bestimmt. Die Tabelle 24 zeigt den mittleren Proteingehalt aus der Trockensubstanz (TS) der Kontrollgruppe (n=12) und der Gruppen L250 ad lib (n=12), L250 pf (n=13), L1250 ad lib (n=10) und L1250 pf (n=12) sowie den mittleren Proteingehalt, berechnet auf 100% Ursprungssubstanz (US) aller Gruppen. Die Tabelle 26 zeigt den mittleren Fettgehalt aus der Trockensubstanz (TS) und den mittleren Fettgehalt, berechnet auf 100% Ursprungssubstanz (US) aller Gruppen.

Den höchsten Proteingehalt wies die Gruppe L1250 ad lib auf, den niedrigsten die Gruppe L250 pf, die auch den höchsten Fettanteil von allen Gruppen zeigt. Allerdings sind die Differenzen zwischen den Gruppen mit 3% beim Protein- und 4,5% beim Fettgehalt sehr gering.

Deswegen sind die Unterschiede der Protein- und Fettgehalte zwischen den

Gruppen sowie im Vergleich mit der Kontrollgruppe nicht signifikant.

In Tabelle 25 und 27 sind die Mittelwerte der Protein- und Fettgehalte nach weiblichen und männlichen Tieren getrennt aufgelistet. Hier unterscheidet sich nur bei den männlichen Tieren, beim Proteingehalt in % der Ursprungssubstanz, die Gruppe L250 pf hochsignifikant ($p < 0,01$) zur Kontrollgruppe.

Tabelle 28 zeigt die Bruttoenergie der Rattenkörper in kJ. Hier gibt es keine statistischen Signifikanzen zwischen den Gruppen.

Tabelle 24: Mittelwerte des Proteingehalts im Restkörper der Kontrollgruppe und der Versuchsgruppen.

	Proteingehalt in % der TS	Proteingehalt in % der US
Kontrolle	49,68 ^a ± 5,51	18,66 ^a ±0,92
L250 ad lib	49,02 ^a ± 3,13	19,10 ^a ±0,98
L250 pf	47,22 ^a ± 4,90	18,19 ^a ±0,79
L1250 ad lib	50,34 ^a ± 3,02	19,02 ^a ±0,89
L1250 pf	47,60 ^a ± 4,15	18,62 ^a ±0,92

Mittelwerte, die nicht mit demselben Buchstaben überschrieben sind, unterscheiden sich signifikant ($p < 0,05$) (Kruskal-Wallis One Way Analysis of Variance on Ranks)

Tabelle 25: Mittelwerte des Proteingehalts im Restkörper der weiblichen und männlichen Tiere der Kontrollgruppe und der Versuchsgruppen.

	Proteingehalt in % der TS Weibliche Tiere	Proteingehalt in % der US Weibliche Tiere	Proteingehalt in % der TS Männliche Tiere	Proteingehalt in % der US Männliche Tiere
Kontrolle	46,53 ^a ± 3,27	17,95 ^a ± 0,52	52,80 ^a ± 5,69	19,40 ^a ± 0,59
L250 ad lib	46,83 ^a ± 2,10	18,33 ^a ± 0,44	51,20 ^a ± 2,38	19,90 ^a ± 0,71
L250 pf	49,10 ^a ± 2,28	18,34 ^a ± 0,41	44,20 ^a ± 6,67	18,00 ^b ± 1,22

L1250 ad lib	50,35 ^a ± 2,93	18,18 ^a ± 0,56	50,30 ^a ± 3,35	19,60 ^a ± 0,52
L1250 pf	47,65 ^a ± 3,49	18,43 ^a ± 0,95	47,60 ^a ± 5,06	18,80 ^a ± 0,94

Mittelwerte, die nicht mit demselben Buchstaben überschrieben sind, unterscheiden sich signifikant ($p < 0,05$) (Kruskal-Wallis One Way Analysis of Variance on Ranks)

b ($p < 0,01$) vs. Kontrolle

Tabelle 26: Mittelwerte des Fettgehalts im Restkörper der Kontrollgruppe und der Versuchsgruppen.

	Fettgehalt in % der TS	Fettgehalt in % der US
Kontrolle	34,22 ^a ± 5,39	13,04 ^a ± 2,69
L250 ad lib	32,72 ^a ± 4,2	12,80 ^a ± 2,01
L250 pf	37,27 ^a ± 8,38	14,69 ^a ± 4,66
L1250 ad lib	33,34 ^a ± 3,9	12,70 ^a ± 2,22
L1250 pf	36,78 ^a ± 5,04	14,52 ^a ± 2,68

Mittelwerte, die nicht mit demselben Buchstaben überschrieben sind, unterscheiden sich signifikant ($p < 0,05$) (Kruskal-Wallis One Way Analysis of Variance on Ranks)

Tabelle 27: Mittelwerte des Fettgehalts im Restkörper der weiblichen und männlichen Tiere der Kontrollgruppe und der Versuchsgruppen.

Gruppen	Fettgehalt in % der TS Weibliche Tiere	Fettgehalt in % der US Weibliche Tiere	Fettgehalt in % der TS Männliche Tiere	Fettgehalt in % der US Männliche Tiere
Kontrolle	36,88 ^a ± 3,84	14,31 ^a ± 2,11	31,60 ^a ± 5,68	11,80 ^a ± 2,76
L250 ad lib	35,25 ^a ± 3,86	13,86 ^a ± 2,10	30,20 ^a ± 2,92	11,70 ^a ± 1,32
L250 pf	33,78 ^a ± 3,42	12,66 ^a ± 1,68	42,90 ^a ± 11,26	17,90 ^a ± 6,23
L1250 ad lib	29,85 ^a	10,82 ^a	35,70 ^a	14,00 ^a

	± 0,83	± 1,08	± 3,28	± 1,86
L1250 pf	34,55 ^a ± 3,75	13,41 ^a ± 1,76	39,00 ^a ± 5,47	15,60 ^a ± 3,13

Mittelwerte, die nicht mit demselben Buchstaben überschrieben sind, unterscheiden sich signifikant ($p < 0,05$) (Kruskal-Wallis One Way Analysis of Variance on Ranks)

Tabelle 28: Mittelwerte des Gesamtenergiegehalts (Protein- und Fettgehalt) der Restkörper der Kontrollgruppe und der Versuchsgruppen.

	GE Ratte (Protein&Fett) in kJ
Kontrolle	3838 ^a ±1103
L250 ad lib	3787 ^a ±995
L250 pf	4103 ^a ±2117
L1250 ad lib	4278 ^a ±1646
L1250 pf	4200 ^a ±1466

Mittelwerte, die nicht mit demselben Buchstaben überschrieben sind, unterscheiden sich signifikant ($p < 0,05$) (Kruskal-Wallis One Way Analysis of Variance on Ranks)

V. DISKUSSION

5.1 Kritik der Methoden

5.1.1 Zum Tiermodell

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Auswirkungen der Supplementation von Seltenen Erden im Futter auf den Stoffwechsel und hierbei insbesondere auf den Glukosehaushalt zu untersuchen. Es wurde als Tiermodell die Ratte gewählt, da diese Tierart eine relativ kleine Körpergröße hat und kostengünstig ist. So kann eine große Anzahl von Versuchstieren unter standardisierten Bedingungen in Versuchsstallungen gehalten werden. Das Handling der Tiere mit Wiegen und Blutentnahmen kann ohne großen Aufwand durchgeführt werden. Für die Glukosetoleranztests und weitere Versuche im Rahmen einer anderen Dissertation (Kroth, 2011) mussten jeder Gruppe 12 Tiere zugeteilt werden, um die Unterschiede entsprechend der Streuung statistisch absichern zu können. Außerdem gibt es für dieses Tiermodell einen speziesspezifischen ELISA zur Insulinbestimmung.

Fütterungsversuche mit Seltenen Erden und anschließende Stoffwechseluntersuchungen zum Hormonhaushalt (Wachstumshormone, Schilddrüsenhormone) und zu Organparametern wurden bereits an Ratten durchgeführt (He et al., 2003; Feldhaus, 2006; Franzke, 2007; van Gemmeren, 2008). Der Vergleich zu Fütterungsversuchen und Untersuchungen zu Mastleistungsparametern an Schweinen (Rambeck, 1999; He et al., 2001; Borger, 2003; Eisele, 2003; Knebel 2004), Broilern (Schuller, 2001; Schuller et al., 2003; Halle et al., 2003; Franzke, 2007), Wachteln (Schuller, 2001) und Regenbogenforellen (Renard, 2005) hat gezeigt, dass Ratten in ähnlicher Weise auf Seltene Erden reagieren wie andere Tierarten.

5.1.2 Zur Fütterungsart

Da der durchschnittliche tägliche Futtermittelverbrauch der mit Seltenen Erden supplementierten Tiere in einigen Versuchen (He et al., 2001; Borger, 2003; Knebel 2004; Franzke 2007) tendenziell höher war, wurden im vorliegenden Versuch neben den zwei unterschiedlichen Dosierungen an REE-Citrat auch zwei verschiedene Fütterungsarten angewandt. Pro Dosierung wurde jeweils eine Gruppe ad libitum und eine Gruppe nach dem Pair-feed-Verfahren gefüttert. Das heißt, sie bekam ihr Futter nach dem Verbrauch der Kontrollgruppe zugeteilt. So sollte überprüft werden, ob eine höhere Gewichtszunahme durch eine höhere Futteraufnahme bedingt ist, also die Seltenen Erden einen möglichen appetitsteigernden Effekt haben könnten. Dieses wurde nicht bestätigt. Die Unterschiede waren statistisch nicht signifikant. Es gab keinen appetitsteigernden Effekt.

Die Abbildung 1 zeigt den direkten Vergleich der Gesamtfutteraufnahme beider ad-libitum- und pair-feed-Gruppen über den gesamten Versuchszeitraum (Tag 0-133), im 1.Abschnitt (Tag 0-81), im 2.Abschnitt (Tag 82-133), während der Wachstumsphase (Tag 0-33) und der Haltungsphase (Tag 34-133).

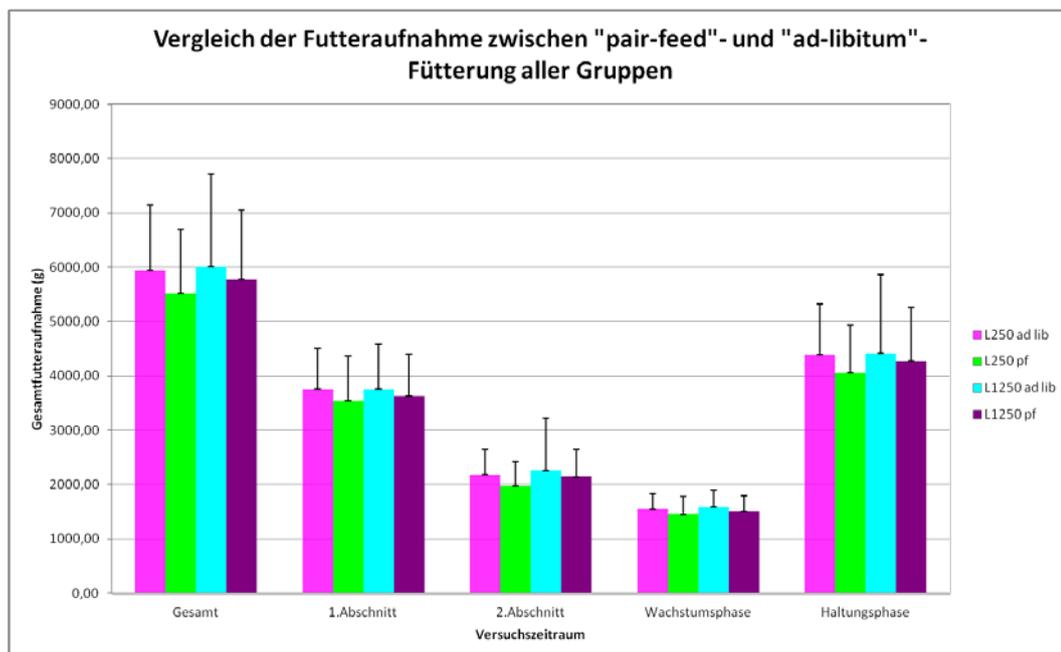


Abbildung 1: Gesamtfutteraufnahme in g der Gruppen mit ad-libitum-Fütterung und pair-feed-Fütterung im Vergleich (MW \pm SD).

5.1.3 Zum Glukosetoleranztest

Die Reaktion der Glukose im Blut ist so zuverlässig, dass sie zur Grundlage von Tests zur Untersuchung von Kohlenhydratstoffwechselstörungen gemacht wurde. Der „Gold-Standard“ für die Ganzkörper-Glukose-Utilisation ist die Glukose-Clamp-Technik (DeFronzo et al., 1979). In der vorliegenden Arbeit wurde allerdings der Glukosetoleranztest eingesetzt, um mögliche Auswirkungen der Seltenen Erden auf den Kohlenhydrathaushalt festzustellen. Die Ergebnisse sind nicht so genau wie die der Glukose-Clamp-Technik, dafür ist der Versuchsablauf im Wesentlichen einfacher und tierfreundlicher. Bei der Glukose-Clamp-Technik können über zwei Venenverweilkatheter dauerhaft exakte Insulin- und Glukosemengen injiziert werden und so die Glukose- oder Insulinkonzentration auf einem Niveau gehalten werden. Es gibt die Hyperglykämische Clamp-Technik, um die β -Zell-Sensitivität im Pankreas zu testen und die Euglykämisch-Hyperinsulinämische Clamp-Technik. Hier wird, ausgehend von einer konstanten Glukosekonzentration bei allen Tieren, die Sensitivität des Gewebes auf Insulin getestet. Da die Tiere in Narkose liegen, kann stressfrei Blut entnommen werden. Dafür sind für den Versuch ein operativer Eingriff und eine mehrstündige Narkose notwendig. Außerdem wird den Tieren für den Zugang zur Trachea die Speicheldrüse entfernt.

Da die Glukose-Clamp-Technik sehr zeitaufwendig ist, kann pro Tag oft nur ein Tier untersucht werden.

In den vorliegenden Versuchen wurde drei Mal ein Glukosetoleranztest durchgeführt. Die Glukose wurde in einer Kurznarkose oral bzw. intraperitoneal appliziert. Das Narkoserisiko wurde dadurch so gering wie möglich gehalten und die körperliche Belastung durch eine Operation vermieden.

Die Blutentnahmen wurden ohne Betäubung durchgeführt und verursachten bei den Tieren Stress. Bei Stress wird die Insulinausschüttung über das sympathische Nervensystem gehemmt (Löffler und Petrides, 1997) und kann so Auswirkungen auf die Ergebnisse haben. Andererseits kann aber in kurzer Zeit eine größere Anzahl von Tieren getestet werden.

Da bei den Tieren von individuellen Nüchternwerten ausgegangen werden muss, braucht man auch eine größere Anzahl an Versuchstieren, um statistische

Signifikanzen zu erhalten.

Bei den vorangegangenen Untersuchungen zur Wirkung der Seltenen Erden fielen meist erhebliche Differenzen auf, weshalb davon ausgegangen wurde, dass auch über den einfachen Glukosetoleranztest signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen festgestellt werden können.

5.2 Besprechung der Ergebnisse

5.2.1 Besprechung der Ergebnisse der Glukosetoleranztests

Die Ergebnisse der Glukosetoleranztests fielen sehr unterschiedlich aus. Zwischen der ersten Blutglukosemessung 15 Minuten vor der Glukoseapplikation bis zum Zeitpunkt T0 kam es bei fast allen Tieren zu einem leichten Anstieg des Glukosegehalts. Es ist davon auszugehen, dass der Anstieg durch Stress während der Blutentnahme bedingt war. Bei Stress wird die Insulinausschüttung über das sympathische Nervensystem gehemmt (Löffler und Petrides, 1997).

Im ersten oralen Glukosetoleranztest gab es signifikante Unterschiede zum Zeitpunkt T60 zwischen der Gruppe L1250 pf und den Gruppen L1250 ad lib, L250 pf und L250 ad lib, sowie zum Zeitpunkt T180 zwischen der Gruppe L250 pf und der Kontrollgruppe. Diese beiden signifikant höheren Werte fallen aus dem Rahmen. Es waren beides Gruppen, die nach dem „Pair-Feed“-Verfahren gefüttert wurden, allerdings gab es bei keinem anderen Parameter Differenzen zwischen pair-feed- und ad-libitum-Fütterung. Des Weiteren ließen sich die signifikanten Unterschiede zu diesen Zeitpunkten in den anderen beiden Glukosetoleranztests nicht wiederholen. Das späte Erreichen der maximalen Glukosekonzentration im Blut der Gruppe L1250 pf passt zwar zu den Beobachtungen von He et al. (2008). Hier erreichten die Tiere in der ersten Phase des oralen Glukosetoleranztests ihren maximalen Blutglukosegehalt auch erst 60 Minuten nach der oralen Glukoseeinnahme; es gab aber keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen. Der direkte Vergleich beider Versuche ist auch insofern mit Vorsicht zu betrachten, da He für die erste Phase des Glukosetoleranztests 1g Glukose, unabhängig vom Gewicht der Tiere, verabreicht hatte und der zweite

Glukosetoleranztest nach einem 30minütigen Zugang zum Futter durchgeführt wurde. Außerdem umfasste die Nahrungskarenz vor dem Test nur 12 Stunden.

Bei den eigenen Versuchen gab es im zweiten Glukosetoleranztest zum Zeitpunkt T-15 signifikant niedrigere Glukosekonzentrationen bei allen Gruppen im Vergleich zur Gruppe L250 ad lib. Vergleicht man die Versuchsgruppen des zweiten Glukosetoleranztests mit der Kontrollgruppe des ersten (siehe Tabelle 19), kann man zum Zeitpunkt T-15 und T0 signifikant niedrigere Glukosekonzentrationen fast aller Versuchsgruppen feststellen. Diese signifikant niedrigen Werte im nüchternen Zustand fallen auch beim intraperitonealen Glukosetoleranztest gegenüber der Kontrollgruppe auf. Beim ersten oralen Glukosetoleranztest traten diese niedrigen Konzentrationen der Versuchsgruppen allerdings nicht auf. He et al. (2003) hat in seinem Fütterungsversuch mit Ratten ebenfalls signifikant ($p < 0,05$) niedrigere Glukosekonzentrationen der Versuchsgruppen im Vergleich zur Kontrollgruppe gefunden. Er hat allerdings sehr junge Ratten im Alter von 4 Wochen eingesetzt und nur 18 Tage lang mit Seltenen Erden gefüttert. Außerdem waren die Tiere vor der Blutentnahme nicht nüchtern. In der Abbildung 2 ist ein Vergleich aller Gruppen und aller drei Glukosetoleranztests der eigenen Untersuchung in einer „Area under the curve-Berechnung“ dargestellt. Hier gab es keine signifikanten Unterschiede. Die Abkürzung oGTT steht hier für oraler Glukosetoleranztest, +REE für die zusätzliche orale Eingabe von REE-Citrat-Lösung (siehe Tabelle 12) und IP-GTT für intraperitonealer Glukosetoleranztest.

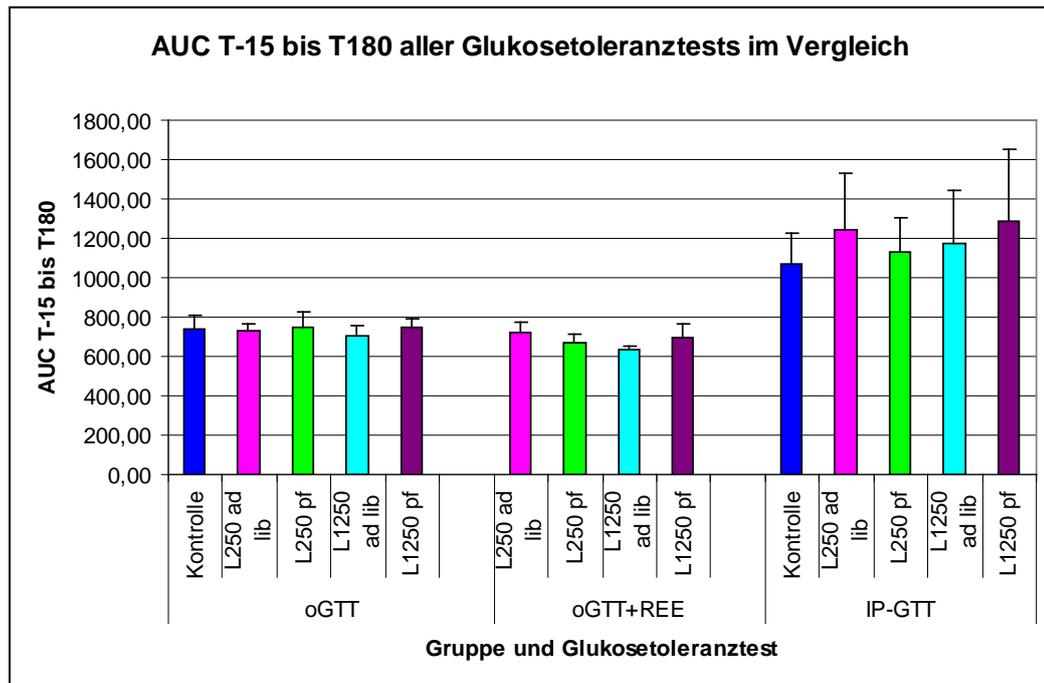


Abbildung 2: Mittelwerte der Area under the Curve (AUC) - Berechnung vom Zeitpunkt T-15 bis T180 aller Gruppen in den drei Glukosetoleranztests (MW \pm SD).

Die Unwiederholbarkeit findet sich häufig in Fütterungsversuchen mit Seltenen Erden. Franzke (2007) wies in seinen Fütterungsversuchen mit Seltenen Erden an Ratten keine Verbesserung, teilweise sogar eine signifikante Verschlechterung der Mastleistung nach. Van Gemmeren (2008) führte einen ähnlichen Versuch unter gleichen Bedingungen an Ratten durch und erhielt signifikante Verbesserungen der Mastleistung. Franzke vermutete als möglichen Grund die Haltungsbedingungen, van Gemmeren widerlegte die Theorie. Im eigenen Versuch wurden die Haltungsbedingungen an Franzke und van Gemmeren angepasst. Hier gab es keine Effekte auf die Mastleistung, also Futteraufnahme, Gewichtszunahme und Futterverwertung, die Kroth (2011) bereits in seiner Dissertation veröffentlicht hat. Kroth konnte jedoch signifikant verbesserte Verdaulichkeiten von Trockensubstanz, Bruttoenergie und Rohprotein bei allen Gruppen, die ein Seltene-Erden-Gemisch zugefüttert bekamen, gegenüber der Kontrollgruppe feststellen. Fritsche (2012) wiederum konnte in einem anschließenden Versuch mit gleichen Konzentrationen an Seltenen Erden diese Ergebnisse nicht wiederholen. Es gab bei ihr in der scheinbaren Nährstoffverdaulichkeit keine systematischen Unterschiede zwischen den Gruppen.

Da es sich bei Kroth (2011) und der vorliegenden Studie um dieselben Ratten

handelt, scheinen die signifikanten Verbesserungen der Verdaulichkeit bei unveränderter Wachstumsleistung, die Kroth (2011) feststellte, nicht mit der Körperzusammensetzung und dem Glukosestoffwechsel zusammenzuhängen.

5.2.2 Besprechung der Ergebnisse der Mastleistung und der Ganzkörperanalyse

Kroth (2011) fand als Erklärung für das Ausbleiben von Effekten in der Mastleistung die spätere Aufnahme der Ratten in den Versuch. Die Tiere wurden erst mit einem Alter von sechs Wochen und einem Gewicht von $\pm 171\text{g}$ in die Studie aufgenommen. Als Hauptwachstumsphase wird aber die Zeit bis zur zehnten Lebenswoche angenommen (GV-Solas, 1998). Die Tiere befanden sich also nur bis zum 33. Versuchstag im Wachstum. Er vermutete, dass die Ratten danach bei gleicher Futteraufnahme, aber verbesserter scheinbarer Verdaulichkeit einen erhöhten Energieansatz zeigen müssten. Das konnte im eigenen Versuch widerlegt werden, da der mittlere Energiegehalt (GE) der Rattenkörper sich nicht voneinander unterschieden. Er hätte, aufgrund der signifikant höheren scheinbaren Verdaulichkeit, die Kroth (2011) gefunden hat, bei den Versuchsgruppen deutlich höher als bei der Kontrollgruppe sein müssen. Die scheinbare Verdaulichkeit scheint somit nicht konstant variiert zu haben und war bei Kroth wahrscheinlich nur transient verbessert.

Zwischen Kontroll- und Versuchsgruppen gab es keinen Unterschied im Ganzkörperfett- und Proteingehalt.

Hier wiederum fand Fritsche (2012) an Ratten einen Repartitioning-Effekt. Bei ihr zeigten sich die weiblichen mit Seltenen Erden supplementierten Tiere als proteinreicher und fettärmer, nicht aber die männlichen. Auch bei Finkenzeller (2011) zeigten die mit Seltenen Erden supplementierten Schweine einen signifikant höheren Magerfleischanteil als die der Kontrollgruppe. Im eigenen Versuch gab es nur einen signifikanten Unterschied bei den männlichen Tieren, bei dem die Versuchsgruppe L250 pf allerdings einen signifikant niedrigeren Proteingehalt, bezogen auf die US, als die Kontrollgruppe aufwies. Der Fettgehalt hingegen war bei den männlichen Tieren dieser Gruppe deutlich, aber nicht signifikant erhöht.

Die Ganzkörperanalyse war aber auch im Hinblick auf den Einfluss von Lipiden

auf den Insulin- und Glukosehaushalt von Interesse.

Koyama et al. (1997) stellten fest, dass der Lipidgehalt im Muskelgewebe mit der Wirksamkeit von Insulin korrelierte. Je mehr Lipid in Nicht-Adipozyten abgelagert wird, desto geringer ist die Insulinsensitivität (Shulman, 2000). Im vorliegenden Versuch gab es keine besonderen Unterschiede zwischen den Fettgehalten im Gesamtkörper der verschiedenen Gruppen.

He (2003), Franzke (2007) und van Gemmeren (2008) vermuteten, dass eventuell eine dosisabhängige Wirkung der Seltenen Erden auf die Mastleistung vorlag. Bei He und Franzke lag das Dosisoptimum bei 75 bzw. 300mg REE-Citrat (79,6mg Gesamtoxidgehalt an Seltenen Erden), bei van Gemmeren lag es bei 200mg und 400mg REE-Citrat (53mg und 106mg Gesamtoxidgehalt). Höhere Dosierungen zeigten wieder eine Verschlechterung der positiven Effekte. In der vorliegenden Arbeit hatte keine der Dosierungen einen Effekt.

5.2.3 Möglichkeiten der Wirkungsweise der Seltenen Erden

5.2.3.1 Mögliche lokale Auswirkungen auf die Darmwand

Neben der Vermutung eines erhöhten Energieansatzes kam für Kroth als weitere mögliche Ursache für die verbesserte scheinbare Verdaulichkeit die Erhöhung der Menge an Nährstofftransportsystemen im Darm in Frage. Tatsächlich wird vermutet, dass Kalzium und Kalzium-ähnliche Substanzen wie Seltene Erden kompetitiv Natrium- und Kaliumkanäle hemmen oder sogar verschließen können. (Enyaert et al., 1998; Lesage und Lazdunski, 2000; Enyaert et al., 2002) Das wurde allerdings bisher nur in-vitro an bovinen Nebennieren bewiesen. Die Seltenen Erden könnten also eventuell hemmenden Einfluss auf den carriervermittelten Natrium-Cotransport nehmen und so die Glukoseaufnahme in die Epithelzellen des Darms beeinflussen. Prause et al. (2004) wiederum vermuteten, dass Seltene Erden die Permeabilität des Dünndarms beeinflussen könnten und deshalb die Aufnahme bestimmter Nährstoffe verbessert werden könnte.

Das Ausbleiben eines signifikanten Anstiegs der Blutglukosekonzentration nach der Glukoseeingabe im eigenen Versuch spricht allerdings eher gegen positive

Effekte auf die Glukoseaufnahme aus dem Darm. Tendenziell war es sogar so, dass bei den oralen Glukosetoleranztests die Blutglukosekonzentrationen der Versuchsgruppen insgesamt niedriger als bei der Kontrollgruppe waren. Beim intraperitonealen Glukosetoleranztest verhielt es sich genau umgekehrt. Allerdings gab es in keinem Fall signifikante Unterschiede. Hinzu kam, dass die Ausgangswerte sich bereits unterschieden.

Der Vergleich zwischen intraperitonealem und oralem Glukosetoleranztest ist in Abbildung 3 dargestellt.

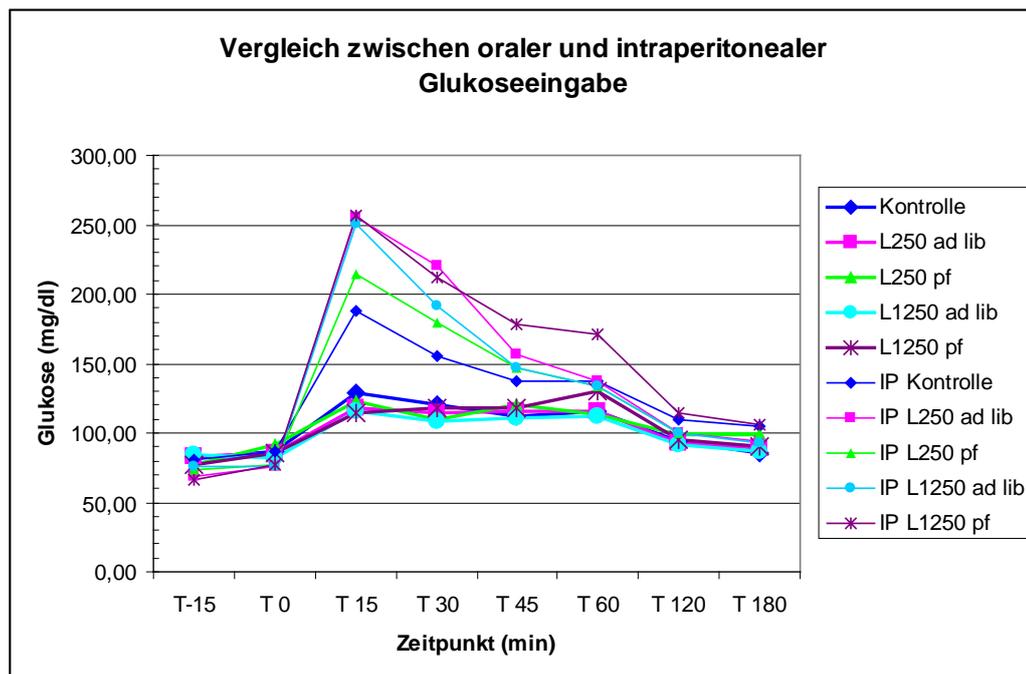


Abbildung 3: Mittelwerte der Glukosekonzentration der Kontrollgruppe und der Versuchsgruppen vor und nach der oralen Glukosegabe (2g/kg KGW) und der intraperitonealen Glukosegabe (2g/kg) im Vergleich. Die Gruppen sind beim intraperitonealen Glukosetoleranztest zur Unterscheidung mit dem Kürzel IP (Intraperitoneal) versehen.

Da es laut Eisele et al. (1980) ab einem Alter von drei Wochen nur noch minimale Unterschiede in der Absorptionsmenge von Seltenen Erden im Darm zwischen Adulten und Jungtieren gibt, wurde der zweite orale Glukosetoleranztest mit der zusätzlichen oralen REE-Citrat-Eingabe dazu durchgeführt, um mögliche lokale Effekte der Seltenen Erden im Darm zu verstärken. Vor der Glukose, bzw. Glukose+REE-Citrat-Eingabe zum Zeitpunkt T -15 und T 0 zeigten die Versuchsgruppen des zweiten Glukosetoleranztests signifikant niedrigere Blutglukosekonzentrationen im Vergleich mit der Kontrollgruppe des ersten

Glukosetoleranztests. Nach der Eingabe zeigten sich aber nur noch vereinzelte signifikanten Unterschiede zum oralen Glukosetoleranztest mit solitärer Glukoseeinnahme. Die Abbildung 4 zeigt den graphischen Verlauf der Glukosekonzentrationen im Blut der Versuchsgruppen der beiden oralen Glukosetoleranztests und der Kontrollgruppe im Vergleich.

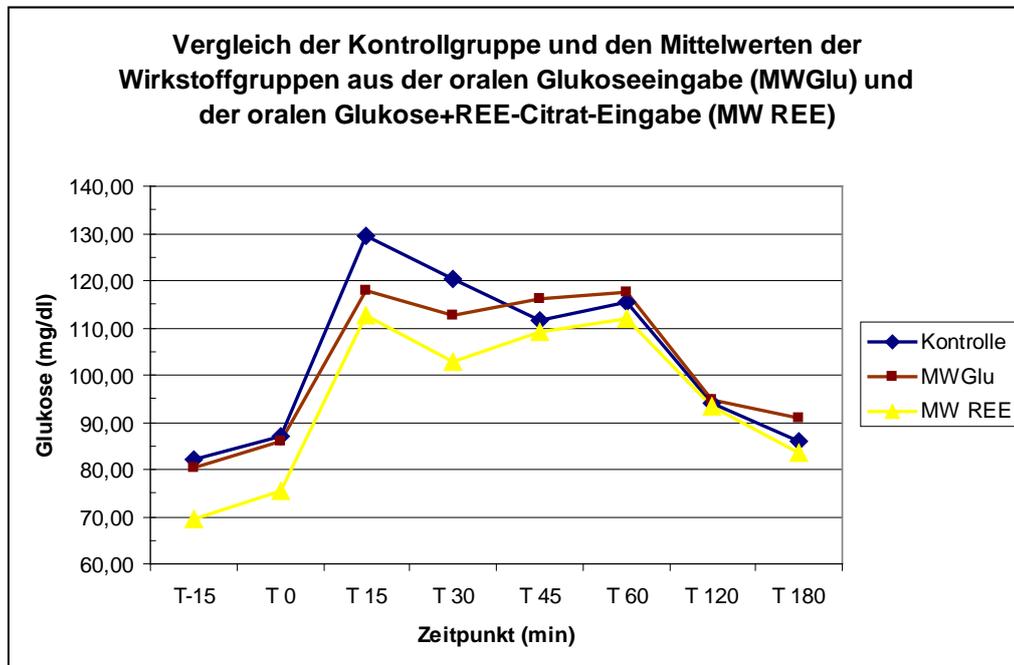


Abbildung 4: Vergleich der mittleren Glukosekonzentration der Kontrollgruppe (n=12) und aller Versuchsgruppen während der oralen Glukoseeinnahme (MWGlu) (2g/kg) (n=47) und während der Eingabe der oralen Glukose-(2g/kg) und REE-Citrat-Lösung (MW REE) (250mg/kg Futter) (n=45).

Einige chinesische Autoren, unter anderem Xie et al. (1995), vermuteten, dass die Nutzbarkeit von Proteinen und Kohlenhydraten nicht über lokale Effekte der Seltenen Erden, sondern über den Einfluss auf verschiedene Hormone gesteigert wird. Eine direkte Wirkung von Seltenen Erden im Pankreas und in der Leber wurde bereits von einigen Autoren bestätigt. Powis et al. (1994) vermuteten, dass Seltene Erden durch $\text{Na}^+\text{-Ca}^{2+}$ -Kanäle transportiert werden können und so möglicherweise Hormonfreisetzungen auslösen könnten. Auch eine Interaktion mit cAMP wird immer wieder vermutet (Nathanson et al., 1976; Arvela, 1977). Eine insulinfreisetzende Wirkung nach intravenöser Injektion von Seltenen Erden wurde bereits festgestellt (Schurig und Oberdisse, 1972; Röhling, 1974; Arvela, 1977). Durch die geringe Bioverfügbarkeit von oral verabreichten Seltenen Erden (Arvela, 1977) ist dieser Effekt mit dem vorliegenden Versuch aber nur bedingt

vergleichbar.

So konnten auch keine Unterschiede zwischen den Insulinkonzentrationen der Wirkstoffgruppe und der Kontrollgruppe im eigenen Versuch festgestellt werden. Zusammenfassend konnte mit Hilfe der hier verwendeten Tests kein systematischer REE-Effekt auf den Glukosestoffwechsel festgestellt werden, weder intestinal, noch intermediär. Die verwendeten Methoden waren zwar relativ einfach, hätten jedoch Unterschiede abbilden müssen, die so erheblich sind, dass sie in vielen Studien zu Leistungssteigerungen in der Größenordnung von über 10% führten.

5.2.3.2 Mögliche Auswirkungen auf Enzyme

Als weiteren möglichen Grund für die bessere scheinbare Verdaulichkeit nennt Kroth (2011) die Auswirkung auf Enzyme im Gastrointestinaltrakt. Die Ähnlichkeit der Lanthanoide zu Calciumionen spielt dabei eine wichtige Rolle. Buck et al. (1962) stellten fest, dass die Umformung von Trypsinogen in die aktive Form Trypsin durch Ca^{2+} katalytisch beschleunigt und Trypsin vor der Autodigestion geschützt wird. Lanthanoide können dabei Ca^{2+} in den Bindungen ersetzen und die autokatalytische Trypsinogenaktivierung in 100mal niedrigerer Konzentration beschleunigen (Evans, 1990). Tatsächlich könnte das ein Hinweis auf die verbesserte Proteinverdaulichkeit im Verdauungsversuch von Kroth sein. Höhere Konzentrationen an Seltenen Erden sollen aber das Gegenteil bewirken und Trypsin in seiner Aktivität hemmen (Gomez et al., 1974). Auf ähnliche Weise sind Seltene Erden auch in der Lage, andere für die Verdauung wichtige Enzyme zu beeinflussen, die mit Ca^{2+} oder Mg^{2+} interagieren wie α -Amylase, Enolase und Phospholipase (Smolka et al., 1971; Hershberg et al., 1976; Brewer et al., 1981; Evans, 1990). Eine Anreicherung von Seltenen Erden könnte also je nach Konzentration die Verdauungsenzyme und damit den Stärkeaufschluss aus der Nahrung hemmen oder anregen. Auch eine Veränderung der Darmmotilität und damit der Passagezeit könnte Auswirkungen auf die Aufnahme von Nährstoffen haben. Seltene Erden wirken demnach meist kontraktionshemmend, können aber zeitlich begrenzt die Motilität erhöhen (Weiss und Goodman, 1969; Goodman und Weiss, 1971; Evans, 1990). Auswirkungen auf das vegetative Nervensystem und damit die Darmmotilität und Sekretion von Verdauungssäften werden ebenfalls diskutiert (Evans, 1990). Kroth (2011) hat bei den Versuchstieren insgesamt

niedrige und bei den Wirkstoffgruppen signifikant niedrigere pH-Werte gegenüber der Kontrollgruppe im Kot gefunden. Ein leicht saures Milieu im Duodenum und Jejunum beeinflusst die Sekretinsekretion und Sekretin wiederum stimuliert die Bildung von großen Mengen bicarbonatreichem und enzymarmem Pankreassaft, um den pH-Wert zu neutralisieren. Andersherum kann der niedrige pH-Wert aber auch dadurch zustande gekommen sein, dass wenig bicarbonatreicher Pankreassaft aus den Gangzellen und mehr enzymreicher Saft aus den Acinuszellen freigesetzt wurde (Engelhardt und Breves, 1999). Das würde also eine vermehrte Freisetzung von Verdauungsenzymen wie etwa Amylase bedeuten. Fritsche (2011) hat in ihren Versuchen nahezu neutrale pH-Werte im Kot gefunden und konnte einen möglichen Citrat-Effekt ausschließen. Sie hatte zusätzlich ein Gruppe in den Versuch aufgenommen, der im Futter eine Natriumcitratzulage beigemischt wurde. Citrat wird, wie alle anderen mikrobiell abbaubaren Kohlenhydrate, zu Laktat verstoffwechselt. Der Kot-pH-Wert dieser Gruppe lag ebenfalls im neutralen Bereich. Auch bei Krogmann (2015) gab es bei den Kot-pH-Werten der Kontroll- und Versuchsgruppen keine signifikanten Unterschiede. So bleibt noch die Vermutung, dass die pH-Absenkung bei Kroth (2011) durch im Darmtrakt von Mikroben gebildete organische Säuren verursacht wurde. Er selbst vermutete, dass die Darmflora an der verbesserten Verdaulichkeit beteiligt war. Selektive antimikrobielle Effekte wurden bereits von einigen Autoren erwähnt (Feldmann, 2003; Flachowski, 2003; Rambeck und Wehr, 2005). Fritsche (2011) hat die Vermutung aufgestellt, dass die Verfügbarkeit der Seltenen Erden für die Mikroorganismen pH-abhängig ist. Die Wirkung Seltener Erden auf die Verdauung könnte also auch pH-Wert-abhängig sein. Krogmann (2015) hat bei ihren Untersuchungen deshalb versucht mit verschiedenen Futtermitteln den pH-Wertes von Kot und Chymus gezielt zu beeinflussen, konnte dies aber nicht erreichen. Sie fand auch keine systematischen Veränderungen der Verdaulichkeit von Nährstoffen bei den mit Seltenen Erden supplementierten Tieren wieder. Die Hypothese einer antimikrobiellen Wirkung der Seltenen Erden in einem bereits induzierten sauren Milieu des Gastrointestinaltraktes konnte also nicht bestätigt werden.

5.2.4 Schlussfolgerung

Ein Effekt der Seltenen Erden auf die Körperzusammensetzung und den Energiegehalt der Ratten konnte in den eigenen Versuchen nicht festgestellt werden.

Kroth (2011) hat an denselben Ratten eine signifikant höhere scheinbare Verdaulichkeit der Energie, aber keine Unterschiede in Futteraufnahme und Gewichtsentwicklung gefunden. Das legt nahe, dass der Effekt der Seltenen Erden auf die scheinbare Verdaulichkeit transient war, so dass es insgesamt über den Versuchszeitraum nicht zu einem wesentlichen Unterschied der Aufnahme an verdaulicher Energie (DE) in Abhängigkeit von der Seltene-Erden-Zulage kam.

Alternativ kann bei Seltene-Erden-Fütterung auch eine schlechtere Verwertung der verdaulichen Energie für den Ansatz angenommen werden.

Ein systematischer Effekt der Seltenen Erden auf die Glukosetoleranz trat in den eigenen Versuchen auch nicht auf. Es gab in den Versuchsgruppen lediglich häufiger niedrigere Blutglukose-Werte als in der Kontrollgruppe, sowohl bei den nüchternen Tieren als auch bei der letzten Messung zwei Stunden nach Glukoseapplikation. Im ersten oralen Glukosetoleranztest gab es hier gar keine Unterschiede.

Allerdings wurden die Verdaulichkeitsversuche bei den Tieren ab einem Alter von neun Wochen durchgeführt, die Glukosetoleranztests erst zwei Monate später. So wäre es möglich, dass es nur kurzfristig eine Veränderung der Verdaulichkeit bei den noch wachsenden Tieren gab, die langfristig wieder nivelliert wurde.

Seltene Erden scheinen keine permanenten, sondern allenfalls transiente Effekte zu verursachen, die häufig nicht wiederholbar sind.

VI. ZUSAMMENFASSUNG

In der vorliegenden Arbeit wurde die Auswirkung von Seltenen Erden auf den Glukose- und Insulinstoffwechsel und die Körperzusammensetzung untersucht.

62 Wistar Han Ratten wurden, getrennt nach Geschlecht, in fünf Gruppen eingeteilt. Die Unterteilung erfolgte in eine Kontrollgruppe und vier Gruppen, denen im Futter eine Konzentration von 250mg bzw. 1250mg Seltene-Erden-Citrat zugemischt und über einen Zeitraum von 133 Tagen verfüttert wurde. Jeweils eine Gruppe pro Dosierung bekam das Futter ad libitum und eine Gruppe nach dem Pair-feed-Verfahren zur Kontrollgruppe zugeteilt.

Drei Monate nach Versuchsbeginn wurden bei den Tieren drei Glukosetoleranztests im Abstand von drei Wochen durchgeführt. Zu festgelegten Zeitpunkten wurde Blut entnommen und der Glukosegehalt bestimmt. Beim ersten Glukosetoleranztest wurde 2g Glukose pro kg Körpergewicht oral verabreicht. Beim zweiten Glukosetoleranztest wurde zusätzlich zur Glukose eine REE-Citrat-Lösung oral verabreicht, um eventuelle lokale Effekte der Seltenen Erden im Gastrointestinaltrakt, die mit dem Glukosestoffwechsel zusammenhängen, zu verstärken. Beim dritten Glukosetoleranztest wurde die Glukose (2g/kg) an einer randomisierten Auswahl von Tieren (n=6 pro Gruppe) intraperitoneal appliziert, um die lokale Wirkung des Darms zu umgehen.

In Tabelle 29 sind die Mittelwerte der Glukosekonzentrationen in einer "Area under the curve"-Berechnung (AUC) dargestellt. Die Abkürzung oGTT steht hier für oraler Glukosetoleranztest, +REE für die zusätzliche orale Eingabe von REE-Citrat-Lösung (siehe Tabelle 12) und IP-GTT für intraperitonealer Glukosetoleranztest.

Tabelle 29: Mittelwerte der Area under the curve-Berechnung (AUC) der Glukosekonzentrationen vom Zeitpunkt T -15 bis T 180 der drei Glukosetoleranztests.

	AUC T -15 bis T 180 oGTT	AUC T -15 bis T 180 oGTT+REE	AUC T -15 bis T 180 IP-GTT
Kontrollgruppe	742 ± 71	/	1074 ± 154

L250 ad lib	728 ± 34	723 ± 51	1246 ± 289
L250 pf	745 ± 85	670 ± 44	1131 ± 178
L1250 ad lib	706 ± 46	636 ± 17	1170 ± 271
L1250 pf	745 ± 47	698 ± 71	1288 ± 366

Um festzustellen, ob Auswirkungen auf Insulin bestehen, wurde von einer Auswahl an Tieren der Kontrollgruppe und der Gruppe L1250 ad lib aus Serum, das während des oralen Glukosetoleranztests gewonnen wurde, der Insulingehalt bestimmt.

Am Versuchsende wurde eine Ganzkörperanalyse durchgeführt, um den Protein- und Fettansatz zu bestimmen. Tabelle 30 zeigt die Mittelwerte des Protein-, Fett- und Aschegehalts aller Gruppen.

Tabelle 30: Mittelwerte des Protein-, Fett- und Aschegehalts im Restkörper der Kontrollgruppe und der Versuchsgruppen bezogen auf die Ursprungssubstanz.

	Proteingehalt in % der US	Fettgehalt in % der US	Aschegehalt in % der US
Kontrolle	18,66 ± 0,91	13,04 ± 2,69	4,34 ± 0,22
L250 ad lib	19,10 ± 0,98	12,80 ± 2,01	4,48 ± 0,30
L250 pf	18,19 ± 0,79	14,69 ± 4,66	4,12 ± 0,66
L1250 ad lib	19,02 ± 0,89	12,70 ± 2,22	4,33 ± 0,45
L1250 pf	18,62 ± 0,92	14,52 ± 2,68	4,10 ± 0,47

Bei den Messungen zur Gewichtszunahme und Futteraufnahme, die bereits in der Dissertation von Kroth (2011) veröffentlicht wurden, sowie bei den Insulinbestimmungen und dem Protein- und Fettansatz der Versuchstiere gab es keine signifikanten Unterschiede.

In den Glukosetoleranztests gab es wenige signifikante Unterschiede, die aber nicht nach System auftraten oder sich nicht wiederholen ließen.

VII. SUMMARY

In the current study the impact of rare earth elements on glucose and insulin metabolism and the body composition was observed. 62 Wistar Han rats were sexed and divided into five groups. One control group and four groups to whose food was added a concentration of 250 mg respectively 1250mg rare earth citrate fed over a period of 133 days. One group at a time was fed ad libitum and the other group according to the pair feed method of the control group.

Three months after test begin there were three glucose tolerance tests run on the animals at intervals of three weeks. At given times blood was taken and its glucose contents were determined. During the first glucose tolerance test there was 2g glucose per kg body weight administered orally. On the second glucose tolerance test there was a REE citrate solution administered orally in addition to glucose to increase possible local effects of rare earth elements in the gastrointestinal tract which relates to the glucose metabolism. Within the third glucose tolerance test glucose (2g/kg) was applied intraperitoneal to a random selection of animals (n=6 per group) to avoid the local impact on the bowels. Table 29 summarizes the glucose concentrations of all groups in an area under the curve-calculation. The short cut oGTT means oral glucose tolerance test, oGTT+REE means oral glucose tolerance test plus oral administration of REE-citrate solution (see table 12) and IP-GTT means intraperitoneal glucose tolerance test.

Table 31: Average of the Area under the curve (AUC) calculation of all glucose tolerance tests in between T -15 and T 180.

	AUC T -15 to T 180 oGTT	AUC T -15 to T 180 oGTT+REE	AUC T -15 to T 180 IP-GTT
Control group	742 ± 71	/	1074 ± 154
L250 ad lib	728 ± 34	723 ± 51	1246 ± 289
L250 pf	745 ± 85	670 ± 44	1131 ± 178

L1250 ad lib	706 ± 46	636 ± 17	1170 ± 271
L1250 pf	745 ± 47	698 ± 71	1288 ± 366

To find out if there was an impact on insulin there was a selection of animals of the control group and the group L1250 ad libitum taken from serum that was extracted during the oral glucose tolerance tests to determine the insulin contents. In order to determine an impact of rare earth elements on the increase of protein and body fat there was made a whole body analysis. The protein, fat and ash content are listed in table 30.

Table 32: Average of protein-, fat- and ash-content in % related to the original substance of the whole body in the groups of trial.

	Protein content in % of the OS	Fat content in % of the OS	Ash content in % of the OS
Control group	18,66 ± 0,91	13,04 ± 2,69	4,34 ± 0,22
L250 ad lib	19,10 ± 0,98	12,80 ± 2,01	4,48 ± 0,30
L250 pf	18,19 ± 0,79	14,69 ± 4,66	4,12 ± 0,66
L1250 ad lib	19,02 ± 0,89	12,70 ± 2,22	4,33 ± 0,45
L1250 pf	18,62 ± 0,92	14,52 ± 2,68	4,10 ± 0,47

During the measurements on weight increase and food absorption which were already published in the dissertation of Kroth (2011), during the insulin measurements and the whole body protein and fat content there were no significant differences between the groups.

In the glucose tolerance tests there were few significant differences that did not occur systematically and were not repeatable.

VIII. LITERATURVERZEICHNIS

Arvela P.. Toxicity of Rare-Earths. *Progress in Pharmacology*, Band 2(3): Seite 69 – 73, 1977.

Beaven M.A., Rogers J., Moore J.P., Hesketh R., Smith G.A., Metcalfe J.C.. The mechanism of the calcium signal and correlation with histamine release in 2H3 cells. *Journal of Biological Chemistry*, Band 259: Seite 7129-7236, 1984.

Böhme H., Fleckenstein J., Hu Z. und Schnug E.. Bilanzversuche zum Einsatz von Seltenen Erden in der Schweinemast. In *114. VDLUFA Kongress Ressourcen und Produktsicherheit-Qualitätssicherung in der Landwirtschaft*, 16. - 20. September 2002, Leipzig, 2002a.

Böhme H., Fleckenstein J. und Schnug E.. *Einfluss von Seltenen Erden auf die Verdaulichkeit beim Schwein*. Report, Bundesforschungsanstalt für Landwirtschaft, 2002b.

Borger C.. *Alternative Methoden in der Schweinemast. Untersuchungen zum leistungssteigernden Potential Seltener Erden und zur Jodanreicherung im Gewebe durch die Verfütterung von Meeresalgen*. Dissertation, Ludwig-Maximilians-Universität, München, 2003.

Van Breemen C. und de Weer P.. Lanthanum inhibition of ⁴⁵Ca Efflux from the Squid Giant Axon. *Nature*, Band 226: Seite 760-761, 1970.

Brewer J.M., Carreira L.A., Irwin R.M. und Elliott J.I.. Binding of terbium(III) to yeast enolase. *Journal of Inorganic Biochemistry*, Band 14, Seite 33-44, 1981.

Buck F.F., Vithayathil A.J., Bier M. und Nord F.F.. On the mechanism of enzyme action. LXXIII. Studies on trypsins from beef, sheep and pig pancreas. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, Band 97, Seite 417-424, 1962.

Bulman R. A.. *Metabolism and Toxicity of the Lanthanides*, in: Sigel, A., Sigel, H. (Eds.), *The Lanthanides and their interrelations with biosystems*, Band 40: Seite 683 - 706. Marcel Dekker, New York, 2003

Chen H. und Xiong B.. A study of feeding new type organic Rare Earth Element compound (RCT-3) to pigs and chicks. *Feed Research*, Band 8(4): Seite 4 – 7, 1994.

Cheng Q., Gao J., Jing B. und Yuan D.. The apparent digestibility of rare earth elements and their effect on crude protein and fat digestibility in pigs. *Jiangsu Agriculture Science*, Band 1: Seite 59 – 61, 1994.

Cochran K. W., Daull J., Mazur M. und DuBois K. P.. Acute toxicity of zirconium, columbium, strontium, lanthanum, cesium, tantalum and yttrium. *Archives of Industrial Hygiene and Occupational Medicine*, Band 1: Seite 637 – 650, 1950.

David P. und Karlish S.J.D.. Characterization of Lanthanides as Competitors of

Na⁺ and K⁺ in Occlusion Sites of Renal Na⁺, K⁺-ATPase. *The Journal of Biological Chemistry*, Band 266(23): Seite 14896-14902, 1991.

De Fronzo R.A., Tobin J.D., Andres R.. Glucose clamp technique: A method for quantifying insulin secretion and resistance. *American Journal of Physiology*, band 237(3): Seite E214-223, 1979.

Durbin P. W., Williams M. H., Gee M., Newman R. H. und Hamilton J. G.. Metabolism of the lanthanons in the rat. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine. Society for Experimental Biology and Medicine (New York, N. Y.)*, Band 91: Seite 78 – 85, 1956.

Eisele G. R., Mraz F. R. und Woody M. C.. Gastrointestinal uptake of ¹⁴⁴Ce in the neonatal mouse, rat and pig. *Health Physics Society*, Band 39: Seite 185-192, 1980.

Eisele N.. *Untersuchungen zum Einsatz Seltener Erden als Leistungsförderer beim Schwein*. Dissertation, Ludwig-Maximilians-Universität, München, 2003.

Ekberg K., Landau B.R., Wajngot A., Chandramouli V., Efendic S., Brunengraber H. und Wahren J.. Contributions by kidney and liver to glucose production in the post absorptive state and after 60h of fasting. *Diabetes*, Band 48: Seite 292-298, 1999.

Von Engelhardt W. und Breves G.. *Physiologie der Haustiere*. Enke-Verlag, Stuttgart, 1999.

Enyeart J. J., Xu L., Gomora J. C und Enyeart J. A.. Modulation of IA potassium current in adrenal cortical cells by a series of ten lanthanide elements. *Journal of Membrane Biology*, Band 164: Seite 139 – 153, 1998.

Enyeart J.J., Xu L., Enyeart J.A.. Dual action of lanthanides on ACTH-inhibited leak K⁺ channels. *American Journal of Physiology: Endocrinology and Metabolism*, Band 282(6): Seite 1255-1266, 2002.

Evans C.H.. *Biochemistry of the lanthanides*. Plenum Press, New York und London, 1990.

Fan C., Zhang F., Wu Y., Zhang G. und Ren J.. A study of feeding organic REE additives on growing pork pigs. *QingHai Journal of Husbandry and Veterinary*, Band 27(3): Seite 23 – 24, 1997.

Farkas B., Karacsonyi G.. The effect of ketoconazole on Candida Albicans infection following depression of the reticuloendothelia activity with gadolinium chloride. *Mykosen*, Band 28: Seite 338-341, 1985.

Feldhaus A.. *Wirkung von Seltenen Erden auf den osteoporotisch veränderten Knochen im Tiermodell der ovariectomierten Ratte*, Dissertation, Ludwig-Maximilians-Universität, München, 2006.

Feldmann A.. *Seltene Erden in der Schweinemast*. Report, Gesellschaft zur

Erhaltung alter und gefährdeter Haustierrassen e.V. (GEH), <http://www.g-e-h.de>, 2003.

Finkenzeller P.. *Ein Feldversuch zur Wirksamkeit Seltener Erden bei Mastschweinen*. Dissertation, Ludwig-Maximilians-Universität, München, 2011.

Fischler F. und Röckl K.W.. Über experimentelle Beeinflussung der Leberfunktionen und der anatomischen Leberstruktur durch Einwirkung Seltener Erden. *Naunyn Schmiedeberg's Archiv der experimentellen Pathologie und Pharmakologie*, Band 189: Seite 4-21, 1938.

Flachowski G.. Huhn und Schwein und Seltene Erden. *Wirtschaft erleben*, Band 1:1, Seite 6 – 7, 2003.

Flatt P. B., Boquist L. und Hellman B.. Calcium and pancreatic beta cell function. The mechanism of insulin secretion studied with the aid of lanthanum. *The Biochemical Journal*, Band 190: Seite 371 – 372, 1980.

Förster D., Berk A., Hoppen H. O. und Rambeck W.A.. Effect of rare earth elements (REE) on the performance and thyroid hormone status of rearing piglets. *Proceedings of the Society of Nutrition Physiology*, 21. - 23. März, Göttingen, 2006.

Fox C. L., Monafó W. W., Ayvazian V. H., Skinner A. M., Modak S., Stanford J., und Condict C.. Topical chemotherapy for burns using cerium salts and silver sulfadiazine. *Surgery Gynecology and Obstetrics*, band 144(5):Seite 668 – 672, 1977.

Franzke T.. *Untersuchungen zur leistungsfördernden Wirkung sowie zum Einfluß auf ausgewählte Stoffwechselformparameter von Seltenen Erden an Ratten und Broilern*, Dissertation, Ludwig-Maximilians-Universität, München, 2007.

Fritsche N.. *Überprüfung der Wirkung Seltener Erden (Lanthanoide) auf die scheinbare Verdaulichkeit der Nährstoffe und die Körperzusammensetzung wachsender Ratten*. Dissertation, Ludwig-Maximilians-Universität, München, 2012.

Van Gemmeren H.. *Untersuchungen zum Effekt Seltener Erden auf Gewichtsentwicklung sowie Organ- und Serumparameter bei wachsenden Ratten*, Dissertation, München, 2008.

Gomez J. E., Birnbaum E. R. und Darnall D. W.. Metal ion acceleration of the conversion of trypsinogen to trypsin. Lanthanide ions as calcium ion substitutes. *Biochemistry*, Band 13: Seite 3745 –3750, 1974.

Goodman F. R. und Weiss G. B.. Dissociation by lanthanum of smooth muscle responses to potassium and acetylcholine. *The American Journal of Pathology*, Band 220: Seite 759 – 766, 1971.

Graul H. E. und Hundeshagen H.. Investigations of radio-yttrium (Y90) metabolism. Studies of organ-distribution with special regard to the radioautographic method of demonstration and to paper electrophoresis under

various experimental conditions. *International Journal of Applied Radiation and Isotopes*, Band 5:Seite 243 – 252, 1959.

Gschneider K.A. und Eyring L.R.. Handbook on the Physics and Chemistry of Rare Earths, Band 1-33. North Holland Elsevier Science Publishers BV, Amsterdam, New York, Tokio, 1978-2003.

Guo B. S.. The Application of rare earth elements on agriculture and breeding. *Chinese Rare Earths*, Band 15(6): Seite 37 – 43, 1993. (Auf Chinesisch.)

GV-Solas. Ratte. Fütterungskonzepte und –methoden in der Versuchstierhaltung und im Tierversuch, 1998.

Haley T. J.. Pharmacology and toxicology of the rare earth elements. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 54(5):663 – 670, 1965.

Haley T. J.. Toxicity, in: Gschneidner Jr. K. A., Eyring, L. Roy (Eds.), *Handbook on the physics and chemistry of rare earths*, Band 4. Amsterdam, New York, Oxford: Elsevier Nord-Holland, Seite 553 - 579, 1979.

Halle I., Fleckenstein J., Hu Z., Flachowsky G. und Schnug E.. Untersuchungen zum Einsatz von Seltenen Erden auf das Wachstum und die Schlachtleistung von Broilern. In *114. VDLUFA Kongress Ressourcen und Produktsicherheit-Qualitätssicherung in der Landwirtschaft, 16. - 20. September 2002*, Leipzig, Germany, 2002a. (Poster).

Halle I., Fleckenstein J., Hu Z. Y., Flachowsky G. und Schnug E.. Untersuchungen zum Einfluss von Seltenen Erden auf das Wachstum und die Ganzkörperzusammensetzung von Broilern. In *Vitamine und Zusatzstoffe in der Ernährung von Mensch und Tier, 9. Symposium, 24. und 25. September 2003*, Seite 376 – 379, Jena, Germany, 2003.

Hamilton J. G.. The metabolism of the radioactive elements created by nuclear fission. *New England Journal of Medicine*, Band 240: Seite 863 – 870, 1949.

He M.L. und Rambeck, W.A.. *Rare Earth Elements – a new generation of growth promoters for pigs?* Archives of Animal Nutrition, Band 53(4): Seite 323-334, 2000.

He M. L., Ranz D. und Rambeck W. A.. Study on performance enhancing effect of rare earth elements in growing and fattening pigs. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, Band 85: Seite 263 – 270, 2001.

He M. L., Wang Y. Z., Xu Z. R., Chen M. L. und Rambeck W. A.. Effect of dietary rare earth elements on growth performance and blood parameters of rats. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, Band 87: Seite 229 – 235, 2003a.

He M.L., Yang W.Z., McAllister T.A.. Effect of dietary supplementation with rare earth elements on growth performance and glucose tolerance of Wistar rats. Agriculture and Agri-Food Canada, Lethbridge Research centre, Lethbridge, Alberta, Canada, 2008.

Hershberg R. D., Reed G. H., Slotboom A. J. und De Haas G. H.. Phospholipase A2 complexes with gadolinium(III) and interaction of the enzyme-metal ion complex with monomeric and micellar alkylphosphorylcholines. Water proton nuclear magnetic relaxation studies. *Biochemistry*, Band 15: Seite 2268 – 2274, 1976.

Hu Z., Wang J., Yang Y. und Ma Y.. Effect of REE on the nutrients digestibility for growing pigs. *Feed World*, Band 11(1): Seite 29 – 31, 1999.

Hubbard S.R., Wei L., Ellis L. und Hendrickson W.A.. Crystal structure of the tyrosine kinase domain of the human insulin receptor. *Nature*, Band 372(6508): Seite 746-754, New York, 1994.

Hutchison A. J. und Albaaj F.. Lanthanum carbonate for the treatment of hyperphosphataemia in renal failure and dialysis patients. *Expert Opinion on Pharmacotherapy*, Band 6(2): Seite 319 – 328, 2005.

Jakupec M.A., Unfried P., Keppler B.K.. Pharmacological properties of cerium compounds. *Reviews of Physiology, Biochemistry and Pharmacology*, Band 153: Seite 101-111, 2005.

Ji Y., Cui M., Wang Y., Zhang X.. Toxicological study on safety evaluation of rare earth elements used in agriculture. In (G. Xu und J.Xiao) *New frontiers in rare earth science and applications, Proceedings of the 1st international conference on rare earth development and applications*, 1985b. Beijing, September 10.-14. 1985, Seite 700-704. Science Press, Beijing 1985.

Kalix P.. Uptake and release of calcium in rabbit vagus nerve. *Pflügers Archiv : European Journal of Physiology*, Band 326: Seite 1 – 4, 1971.

Knebel C.. *Untersuchungen zum Einfluss Seltener-Erd-Citrate auf Leistungsparameter beim Schwein und die ruminale Fermentation im künstlichen Pansen (RUSITEC)*. Dissertation, Ludwig-Maximilians-Universität, München, 2004.

Knopp M.V.. Primary and Secondary Brain Tumors at MR Imaging: Bicentric Intraindividual Crossover Comparison of Gadobenate Dimeglumine and Gadopentate Dimeglumine. *Radiology*, Band 230(1): Seite 55-64, 2004.

Koyama K., Chen G., Lee Y. und Unger R.H.. Tissue triglycerides, insulin resistance and insulin production: implications for hyperinsulinemia of obesity. *American Journal of Physiology: Endocrinology and Metabolism*, Band 273: Seite E708-E713, 1997.

Kraatz M., Taraz D., Männer K. und Simon O.. Eine Untersuchung zur Wirksamkeit Seltener Erden bei Ferkeln. In *8. Tagung Schweine und Geflügelernährung, am Institut für Ernährungswissenschaften, 23. - 25. November 2004*, Halle (Saale), 2004.

Kraatz M., Taraz D., Männer K. und Simon O.. Weaning pig performance and faecal microbiota with and without in-feed addition of rare earth elements.

Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition, Band 90: Seite 361-368, 2006.

Krogmann T.. *Einfluss von Lanthanoiden auf die scheinbare Verdaulichkeit der Rohnährstoffe bei schwerverdaulichen Kohlenhydraten und Proteinen in der Ratte*. Dissertation, Ludwig-Maximilians-Universität, München, 2015.

Kroth T.. *Einfluss von Seltenen Erden auf die scheinbare Verdaulichkeit der Rohnährstoffe bei wachsenden Ratten*. Dissertation, Ludwig-Maximilians-Universität, München, 2011.

Lesage F. und Lazdunski M.. Molecular and functional properties of two-pore-domain potassium channels. *American Journal of Physiology: Renal Physiology*, Band 279: Seite F793–F801, 2000.

Li D., She W., Gong L., Yang W. und Yang S.. Effects of rare earth elements on the growth and nitrogen balance of growing pigs. *Feed BoLan*, Band 4: Seite 3 – 4, 1992a.

Liedke M., Elsner H.. Seltene Erden, Commodity Top News Nr.31, Bundesanstalt für Geowissenschaften und Rohstoffe, Hannover, 2009.

Löffler G. und Petrides P.E.. *Biochemie und Pathobiochemie*, Springer Verlag, 5.Auflage, 1997.

Lorenz R., Sharp R. und Burr I.M.. Effects of calcium, lanthanum and bicarbonate ion on epinephrine modification of insulin release in vitro. *Diabetes*, Band 28: Seite 52-55, 1979.

Lu K.W. und Yang W. Z.. Effects of rare earth elements on availability of energy and amino acids in broilers. *Acta Agriculturae Shanghai*, Band 12: Seite 78 – 82, 1996.

Magnusson G.. The behavior of certain lanthanons in rats. *Acta Pharmacologica et Toxicologica Suppl*, Band 20(3): Seite 1 – 95, 1963.

Müller T.. *Einfluss Seltener Erden in der Schweine und Kälbermast*. Dissertation, Ludwig-Maximilians-Universität, München, 2006.

Mortimer C.E.. *Chemie – Das Basiswissen der Chemie*, 7. korrigierte Auflage bearbeitet von U. Müller. Thieme-Verlag, Stuttgart, New York, 2001.

Muroma A.. Studies on the bactericidal action of salts of certain rare earth metals. *Annales Medicinae Experimentalis et Biologiae Fenniae*, Band 36(Suppl. 6): Seite 1 – 54, 1958.

Nachshen D.A.. Selectivity of the Ca binding site in synaptosome Ca channels. Inhibition of Ca influx by multivalent metal cations. *The Journal of General Physiology*, Band 83: Seite 941-967, 1984.

Nathanson J.A., Freedman R., Hoffer B.J.. Lanthanum inhibits brain adenylate cyclase and blocks noradrenergic depression of Purkinje cell discharge

independent of calcium. *Nature*, Band 261(5558): Seite 330-332, 1976.

Powis D. A., Clark C. L. und O'Brien K. J.. Lanthanum can be transported by the sodiumcalcium exchange pathway and directly triggers catecholamine release from bovine chromaffin cells. *Cell Calcium*, Band 16(5): Seite 377 – 390, 1994.

Prause B., Gebert S., Wenk C., Rambeck W.A., Wanner M.. Seltene Erden – alternative Leistungsförderer beim Schwein – ein Überblick und erste Ergebnisse eines Gesamtstoffwechselversuches. In 3. *BOKU Symposium für Tierernährung, Fütterungsstrategien und Produktqualität*. Seite 38-44, Wien, 4.11.2004.

Prause B., Gebert S., Wenk C., Rambeck W.A., Wanner M.. Der Einfluss Seltener Erden auf den Kohlenstoff-, Stickstoff- und Energiestoffwechsel wachsender Ferkel. Aus M. Kreuzer, C. Wenk und T. Lanzini (Verfasser), *Fokus Verdauung – Schlüssel für eine effiziente Tierernährung, Schriftenreihe Institut für Nutztierwissenschaften, Ernährung-Produkte-Umwelt, ETH Zürich*, Band 26, Seite 192-195, 2005a.

Rambeck W.A., He M.L., Chang J., Arnold R., Henkelmann R. Süß A.. Possible role of Rare Earth Elements as growth promoters. *Vitamine und Zusatzstoffe in der Ernährung von Mensch und Tier, 7. Symposium, 22. - 23. September 1999*, Jena, Germany, 1999.

Rambeck W. A. und Wehr U.. Use of rare earth elements as feed additives in pig production. *Pig News and Information*, Band 26(2): Seite 41 N – 47 N, 2005.

Recht J.. *Einfluss Seltener Erden in Verbindung mit phytogenen Zusatzstoffen auf Leistungsparameter beim Ferkel*. Dissertation, Ludwig-Maximilians-Universität, München, 2005.

Redling K..*Rare Earth Elements in Agriculture with Emphasis on Animal Husbandry*, Dissertation, DVG-Verlag, München, 2006.

Renard B.. *Seltene Erden als Leistungsförderer in der Fischzucht - Untersuchungen an Regenbogenforellen und Karpfen*. Dissertation, Ludwig-Maximilians-Universität, München, 2005.

Röhling G.. Einfluß von Praseodym auf den Kohlenhydratstoffwechsel und die Insulinsekretion, These, Freie Universität Berlin, 1974.

Rübsamen H., Hess G.P., Eldefrawi A.T. Eldefrawi M.E.. Interaction between calcium and ligand-binding sites of the purified acetylcholine receptor studied by use of a fluorescent lanthanide. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, Band 68(12): Seite 56-63, 1976.

Schaaf L. und Usadel K.H.. Hypoglykämie. In *Mehnert H., Standl E., Usadel K.H.: Diabetologie in Klinik und Praxis*, Thieme-Verlag, 4.Auflage, Seite 637-644, 1999.

Schuller S.. *Seltene Erden als Leistungsförderer beim Geflügel. Untersuchungen an Broilern und japanischen Wachteln*. Dissertation, Ludwig-Maximilians-Universität, München, 2001.

Schuller S., Borger C., He M.L., Henkelmann R., Jadamus A., Simon O., Rambeck W.A.. Untersuchungen zur Wirkung von Seltenen Erden als mögliche Alternative zu Leistungsförderern bei Schweinen und Geflügel. *Berliner Münchner Tierärztliche Wochenschrift*, Band 115: Seite 16-23, 2002.

Schurig R.. Einfluß von Praseodym auf Reaktionen des Kohlenhydratstoffwechsels. These, Freie Universität Berlin, 1974.

Schurig R. und Oberdisse E.. The influence of rare earths on hepatic gluconeogenesis. *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.*, Band 275: Seite 419-433, 1972.

Shen Q., Zhang J. und Wang C.. Application of Rare Earth Elements on animal production. *Feed Industry*, Band 12: Seite 21 – 22, 1991.

Shimomura H., Tsutsumi S., Mizobuchi J., Takuma S., Nakagawa K. und Asai Y.. Experimental studies on acute toxicity of rare earth elements. *Shika Gakuho*, Band 80(9): Seite 1303 – 1307, 1980.

Shulman G.I. Cellular mechanisms of insulin resistance. *Journal of Clinical Investigation*, Band 106: Seite 171-176, 2000.

Smith T.C., Mikiten T.M., Levinson C.. The effect of multivalent cations on the membrane potential of the Ehrlich ascites tumor cell. *Journal of Cellular Physiology*, Band 79, Seite 117-126, 1972.

Smolka G.E., Birnbaum E.R. und Darnall D.W.. Rare earth metal ions as substitutes for the calcium ion in Bacillus subtilis alpha-amylase. *Biochemistry*, Band 10, Seite 4556-4561, 1971.

Snyder F. und Stephens N.. Plasma free fatty acids and the rare-earth fatty liver. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, Band 106: Seite 202-204, 1961.

Tyler G., Rare Earth Elements in Soil and plant systems – A review. *Plant and Soil*, 267(1-2): Seite 191-206, 2004.

Vaccari A., Saba P., Mocci I., Ruiu S.. Lanthanides stimulate (3H) tyramine binding in the rat striatum. *Neuroscience letters*, Band 261(1): Seite 49-52, 1999.

Verordnung (EG) Nr. 1831/2003 des Europäischen Parlaments und des Rates vom 22. September 2003 über Zusatzstoffe zur Verwendung in der Tierernährung. ABL. EG Nr. L 268: Seite 29-43.

Wang T.C., He X., Zhang Z.Y., Jia G., Wang X., Shen H.Q., Zhao Y.L.. Effects on serum glucose and lipids in chronic exposure to lanthanum chloride in rat. Article in chinese, *Zhonghua Yu Fang Yi Xue Za Zhi*, Band 40(6), Seite 419-421, Nov. 2006.

Wehr U., He M.L., Rambeck W.A., Korte F., Seltene Erden als Kraftfutterzusatzstoff, Kraftfutter 8-9, Seite 16-18, 2006.

Weiss G.B., Goodman F.R.. Effect of lanthanum on contraction, calcium distribution and Ca⁴⁵ movements in intestinal smooth muscle. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, Band 169(1): Seite 46-55, 1969.

Williams P.F. und Turtle J.R.. Terbium, a fluorescent probe for insulin receptor binding. Evidence for a conformational change in the receptor protein due to insulin binding. *Diabetes*, Band 33(11): Seite 1106-1111, 1984.

Wurm M.. The effect of lanthanum on growth and metabolism of *Streptococcus faecalis*. *The Journal of Biological Chemistry*, Band 192(2): Seite 707-714, 1951.

Xia Z. und He R.. A Review of applying Rare Earth Elements in agriculture production. Chinese, 1997.

Xie J. und Wang Z.. The effect of organic rare-earth compounds on production performance of chicken. In *2nd International Symposium on Trace Elements and Food Chain*, 12. - 15. November 1998, Seite 74, Wuhan, China, 1998.

Xie J., Xia Z., und Wang Z.. Studies on the effects of rare earth compound added to diets of Guangxi Broiler Chickens. Unveröffentlicht, 1995.

Xiong B.K.. Application of Rare Earths in Chinese Agriculture and their perspectives of Development. Aus *Proceeding of the Rare Earths in Agriculture Seminar*, 20. September 1995, Seite 5-9, Canberra, ACT Australien, 1995.

Xu S., Harrison J. H. und Chalupa W.. The effect of ruminal bypass Lysine and Methionine on milk-yield and composition of lactating cows. *Journal of Dairy Science*, Band 81: Seite 1062 – 1077, 1998.

Xu Z., Wang M. und Chen L.. Growth response of pigs fed supplemental lanthanum and approach of mechanism. *Journal of the Chinese Rare Earth Society*, Band 17: Seite 53 – 59, 1999.

Zimakow Y. A.. *Mater Povolzh Konf Fisol Uachstiem Biokhim Farmakol Morfol*, Band 2(6):Seite 28, 1973.

IX. DANKSAGUNG

Als Erstes möchte ich mich bei Herrn Prof. Rambeck für die Überlassung des Themas und hilfsbereite Betreuung bedanken.

Mein ganz herzlicher Dank gilt auch Frau Dr. Sylvia von Rosenberg für die liebevolle Betreuung während der Versuchsreihe und Frau Prof. Kienzle, ohne deren großzügige Unterstützung ich die Arbeit wohl nie hätte fertigstellen können.

Dem gesamten Labor-Team des Instituts für Tierernährung, allen voran Herrn Christian Overdiek, danke ich sehr für die große Hilfe bei den Analysen.

Herrn Dr. Max Bielohuby danke ich für die Unterstützung bei den Glukose- und Insulinbestimmungen.

Ein ganz besonders großer Dank gilt Gabi Neumann für die Korrekturen und die ständige Motivation, nicht aufzugeben.

Und natürlich einen riesigen Dank an die, ohne die ich niemals eine Dissertation geschrieben hätte: meine Kerstin, meinen Patrik und meine lieben Eltern.