

**Untersuchung scavengerbasierter
Wirkstoffkandidaten für die Therapie
nach Organophosphatvergiftung
bei Ratten**

von Lisa Sofie Scheidegger (geb. Stigler)

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

**Untersuchung scavengerbasierter
Wirkstoffkandidaten für die Therapie
nach Organophosphatvergiftung
bei Ratten**

**von Lisa Sofie Scheidegger (geb. Stigler)
aus München**

München 2023

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

**Lehrstuhl für Pharmakologie, Toxikologie und
Pharmazie**

Arbeit angefertigt unter der Leitung von:

Univ.-Prof. Dr. Heidrun Potschka

Angefertigt am/in:

Institut für Pharmakologie und Toxikologie
der Bundeswehr

Mentor:

Prof. Dr. Timo Wille

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

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Reinhard
K. Straubinger, Ph.D.

Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. Heidrun
Potschka

Korreferent/en: Prof. Dr. Sabine André

Tag der Promotion: 22. Juli 2023

Widmung

Meiner Familie

*„Diejenigen, die [...] an Tieren experimentieren
[...],
sollen niemals den inneren Vorwurf beruhigen
[...].*

*Sie müssen zuerst,
in jedem einzelnen Fall, überlegt haben,
ob eine Notwendigkeit besteht,
einem Tier das Opfer zuzumuten
zum Vorteil der Menschheit.
Und sie müssen die größte Sorge tragen,
soweit wie möglich
den zugefügten Schmerz zu mildern.“*

Albert Schweitzer (1875 – 1965)

Inhaltsverzeichnis

I.	EINLEITUNG	1
II.	LITERATURÜBERSICHT	3
II.1	TOXIKOLOGIE PHOSPHORORGANISCHER VERBINDUNGEN	3
II.1.1	<i>Phosphororganische Verbindungen als Nervenkampfstoffe und Pestizide</i>	3
II.1.2	<i>Das cholinerge System</i>	8
II.1.3	<i>Wirkmechanismus der phosphororganischen Vergiftung</i>	14
II.2	DIAGNOSTIK UND THERAPIE DER PHOSPHORORGANISCHEN VERGIFTUNG	20
II.2.1	<i>Klinisches Bild der phosphororganischen Vergiftung</i>	20
II.2.2	<i>Labordiagnostik</i>	23
II.2.3	<i>Aktuelle therapeutische Maßnahmen und ihre Limitationen</i>	27
II.2.4	<i>Alternativer Therapieansatz: Bioscavenger</i>	35
II.2.4.1	Wirkkonzept von Bioscavengern und Klassifizierung	35
II.2.4.2	Katalytische Bioscavenger: Phosphotriesterasen	43
II.3	KURZÜBERBLICK HÄUFIGER VERGIFTUNGEN BEI TIEREN	53

II.4	TIERVERSUCHE	59
II.4.1	<i>Rechtliche Grundlagen und allgemeine Informationen über Tierversuche in Deutschland</i>	59
II.4.2	<i>Tierversuche in der Geschichte</i>	80
II.4.3	<i>Ratte als Versuchstier</i>	83
II.4.4	<i>Ethik bei Tierversuchen</i>	89
II.4.4.1	Ethische Positionen	89
II.4.4.2	Ethische Vertretbarkeit	95
II.4.4.3	Notwendigkeit von Tierversuchen	100
II.4.4.4	Übertragbarkeit von Tierversuchen	103
II.5	ANÄSTHESIE	105
II.5.1	<i>Definition</i>	105
II.5.2	<i>Anästhesiestadien und Überprüfung der Anästhesietiefe bei der Ratte</i>	106
II.5.3	<i>Anästhesiemöglichkeiten bei der Ratte</i>	112
II.5.3.1	Inhalationsanästhesie	112
II.5.3.2	Injektionsanästhesie	116
II.5.4	<i>Inhalationsanästhetikum Isofluran</i>	121
II.5.5	<i>Kombinationsanästhesie mit Medetomidin, Midazolam und Fentanyl</i>	127
II.5.5.1	Medetomidin	128
II.5.5.2	Midazolam	131
II.5.5.3	Fentanyl	134
II.5.6	<i>Risiken bei der Anästhesie der Ratte</i>	137
III.	ZIELSETZUNG	142
IV.	PUBLIKATION	146

V.	ÜBERGREIFENDE DISKUSSION	159
V.1	IDENTIFIZIERUNG.....	159
V.1.1	<i>Versuchsabschnitt Pharmakokinetik.....</i>	<i>161</i>
V.1.2	<i>Versuchsabschnitt therapeutische Wirksamkeit</i> <i>.....</i>	<i>164</i>
V.2	SCHLUSSFOLGERUNG	169
V.3	LIMITATIONEN UND AUSBLICK.....	172
V.3.1	<i>Limitationen</i>	<i>172</i>
V.3.1.1	Phosphotriesterase	172
V.3.1.2	Organophosphatvergiftung durch s. c. VX- Applikation.....	174
V.3.1.3	Einfluss der Versuchstiere	174
V.3.1.4	Einfluss von Medetomidin, Midazolam und Fentanyl	177
V.3.1.5	Datenerhebung	181
V.3.2	<i>Ausblick</i>	<i>184</i>
VI.	ZUSAMMENFASSUNG.....	187
VII.	SUMMARY	192
VIII.	LITERATURVERZEICHNIS.....	197
IX.	DANKSAGUNG.....	317

Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
2-PAM	Pralidoxim
Abb.	Abbildung
Abs.	Absatz
ACh	Acetylcholin
AChE	Acetylcholinesterase
AG	Arbeitsgruppe
Ala	Alanin
Art.	Artikel
Asp	Asparaginsäure
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
Cd	Cadmium
ChAT	Cholin-Acetyl-Transferase
C_{max}	maximale Plasmakonzentration in mol L ⁻¹
Cn	Copernicium
Co	Cobalt
CVX	chinesisches VX
CWC	Chemiewaffenkonvention
Cys	Cystein
DFG	Deutsche Forschungsgemeinschaft
DTNB	5,5'-Dithio-bis-nitrobenzoat
EC	Europäische Kommission
engl.	englisch
F	Fluor
g	Gramm
GA	Tabun
GABA	γ -Aminobuttersäure
GB	Sarin
GD	Soman
GF	Cyclosarin
GG	Grundgesetz
GMP	<i>Good Manufacturing Practice</i>
h	Stunden

His	Histidin
i. m.	intramuskulär
i. o.	intraossär
i. p.	intraperitoneal
i. v.	intravenös
IMS	Intermediate Syndrome
k_{cat}	katalytische Konstante
k_{cat}/K_M	katalytische Aktivität in $\text{M}^{-1} \text{min}^{-1}$
kg	Kilogramm
KGW	Körpergewicht
K_m	Michaelis-Menten-Konstante
L	Liter
LC-MS/MS	Liquid-Chromatographie- Massenspektrometrie/Massenspektrometrie
Leu	Leucin
Lys	Lysin
M	Molare Masse
mAChR	muskarinerner Acetylcholinrezeptor
mg	Milligramm
min	Minuten
MMB-4	Methoxim
MMF	Medetomidin-Midazolam-Fentanyl
Mn	Mangan
mol	Mol
N	Stickstoff
nAChR	nikotinerger Acetylcholinrezeptor
Ni	Nickel
nm	Nanometer
nmol	Nanomol
Nr.	Nummer
NTE	Neurotoxische Esterase
O	Sauerstoff
OPCW	<i>Organisation for the Prohibition of Chemical Weapons</i>
OPIDN	<i>Organophosphate-induced delayed neuropathy</i>
P	Phosphor

PAS	Prolin/Alanin/Serin
PEG	PEGylierung
PNS	Peripheres Nervensystem
PON1	Paraoxonase 1
POX	Phosphyl-Oxim
PTE	Phosphotriesterase(n)
PTE $t_{1/2}$	Plasma-Halbwertszeit der PTE in s
RL	Richtlinie
RVX	russisches VX
s	Sekunde
S	Schwefel
s. c.	subkutan
TierSchG	Tierschutzgesetz
TierSchVersV	Tierschutzversuchstierverordnung
TMB-4	Trimedoxim
TNB ⁻	5-Mercapto-Nitrobenzoat
Val	Valin
vgl.	vergleiche
Vol	Volumen
VX $t_{1/2}$	VX-Hydrolyse-Halbwertszeit in s
z. B.	zum Beispiel
Zn	Zink
ZNS	zentrales Nervensystem
μg	Mikrogramm

I. EINLEITUNG

Phosphororganische Verbindungen umfassen eine heterogene Gruppe von chemischen Verbindungen mit unterschiedlichen physikochemischen, toxikodynamischen und toxikokinetischen Eigenschaften. Sie werden vereinfachend als Organophosphate bezeichnet (Thiermann et al. 2016). Eine Vielzahl von Nervenkampfstoffen und Pestiziden gehören dieser Gruppe an und stellen sowohl im militärischen, als auch im zivilen Bereich eine große Gefahr und ein medizinisches Problem dar (Bajgar et al. 2015; Haines und Fox 2014; Rosman et al. 2014). Jährlich sterben hunderttausende Menschen sowohl in suicidalen Absicht, als auch infolge akzidenteller Vergiftungen durch phosphororganische Verbindungen (Eddleston 2019; Gunnell et al. 2007; Mew et al. 2017). Jedoch ist in der öffentlichen Wahrnehmung der Einsatz von Organophosphaten als chemischer Kampfstoff deutlich präsenter. So wurde Alexei Nawalny 2020 Opfer eines Attentats mittels des Nervenkampfstoffes Novitschok, der von der früheren Sowjetunion während des kalten Krieges entwickelt wurde, ebenso Sergei und Yulia Skripal im Jahr 2018 in Salisbury, UK (Chai et al. 2018; Simon et al. 2013; Steindl et al. 2021; Vale et al.

2018). Kim Jong-Nam, Halbbruder des obersten Führers von Nordkorea Kim Jong-Un, wurde 2017 mit VX ermordet (Berlinger 2017; Chai et al. 2017). 1995 wurde in Tokio bei einem Anschlag Sarin gegen die Zivilbevölkerung eingesetzt (Miyaki et al. 2005; Morita et al. 1995; Okumura et al. 1996; Suzuki et al. 1995; Vale 2005; Yanagisawa et al. 2006). Zwischen 2013 und 2018 wurde in Syrien mehrmals Sarin und Chlor angewandt. Tausende Zivilisten kamen hierbei zu Tode (John et al. 2018; Nguyen 2022; Rosman et al. 2014; Sellström 2013; Zarocostas 2017).

Phosphororganische Verbindungen wirken primär als Inhibitor des lebenswichtigen Enzyms Acetylcholinesterase (AChE). Die irreversible Hemmung von AChE führt zu einer Anreicherung von Acetylcholin (ACh) im synaptischen Spalt und induziert eine gesteigerte Aktivität an cholinergen Synapsen. Dies führt zu vielseitigen Organfunktionsstörungen (Aldridge und Reiner 1975; Grob 1956; Holmstedt 1959; Kwong 2002; Lee 2003; Taylor et al. 1995). Standardmäßig werden als symptomatisch wirkendes Antidot der muskarinerge Rezeptorantagonist Atropin, zur kausalen Behandlung ein Oxim als Enzymreaktivator sowie bei Krampfanfällen Benzodiazepine als

Antikonvulsivum verabreicht (Cannard 2006; Eyer 2003; Eyer et al. 2009; Jett 2007, 2016; Thiermann et al. 2013). Dieses Standardtherapieschema weist jedoch eine begrenzte Wirksamkeit auf. Infolgedessen ist die Entwicklung eines verbesserten Therapieansatzes zur Behandlung von Organophosphatvergiftungen erforderlich (Thiermann et al. 2013; Worek und Thiermann 2013).

II. LITERATURÜBERSICHT

II.1 Toxikologie phosphororganischer Verbindungen

II.1.1 Phosphororganische Verbindungen als Nerven- kampfstoffe und Pestizide

Die ersten Nerven-
kampfstoffe wurden in den 1930er Jahren in Wuppertal-Elberfeld im Rahmen der Pestizidforschung von Gerhard Schrader und seinen Kollegen in den Laboratorien der IG Farben entwickelt. Es sollte ein wirksames Pestizid gegen die Ausbreitung von Schädlingen gefunden werden, die eine Bedrohung für Weinreben darstellten (Rice 2016). So wurde 1936 als erstes Nervengift die phosphororganische Verbindung

Tabun (GA) synthetisiert, die auch das militärische Interesse des Dritten Reichs weckte und als geheim eingestuft wurde. Im Jahr 1938 folgte die Entwicklung von Sarin (GB) (Rice 2016; Szinicz 2005). Aufgrund der extrem hohen Toxizität der Substanzen wurde die Entwicklung weiterer Substanzen während der Zeit des Nationalsozialismus durch das Heereswaffenamt in Auftrag gegeben mit dem Ziel, diese im Zweiten Weltkrieg einzusetzen. Dazu zählten Cyclosarin (GF) und Soman (GD), das erstmals 1944 durch den späteren Nobelpreisträger Richard Kuhn beschrieben wurde (Rice 2016; Tammelin 1957). Diese als Nervenkampfstoffe betitelten Substanzen, deren Hauptwirkmechanismus gegen das Nervensystem gerichtet ist, sind jedoch im Zweiten Weltkrieg nicht zum Einsatz gekommen. Sie werden aufgrund ihrer Herkunft als Substanzen der G-Reihe (G für *german*) bezeichnet. Diese Zuordnung hat auch in der offiziellen NATO-Klassifizierung Gebrauch gefunden (Rice 2016).

Als Reaktion auf die Bedrohung durch die Nervenkampfstoffe der G-Reihe haben Chemiker in Schweden, Großbritannien, USA und Russland nach dem Zweiten Weltkrieg die Erforschung von Nervenkampfstoffen mit noch

höherer Toxizität fortgesetzt. Aus der weiteren Forschung an Pestiziden (Gosh und Newman 1955) und der Untersuchung von Struktur-Wirkungsbeziehungen (Frederiksson 1957; Tammelin 1957) sind in den 1950er Jahren die Substanzen einer weiteren Klasse, der sogenannten V-Reihe (V für *venom* oder *viscous*), entstanden (Tammelin 1957). Hierzu zählt VX, das im Rahmen einer britisch-amerikanischen Kooperation synthetisiert wurde (Timperley 2015). Kurz darauf wurden in der Sowjetunion das geringfügig modifizierte Strukturanalogon RVX (russisches VX) und in China CVX (chinesisches VX) entwickelt (Black und Harrison 1996).

Die Grundstruktur der erläuterten G- und V-Stoffe lässt sich von der „Schraderschen Alkyl-Formel“ (vgl. Abbildung 1) ableiten, die bereits im Jahre 1937 aufgestellt und im darauffolgenden Jahr patentiert wurde (Schrader 1950, 1963). Diese Phosphor- und Phosphonsäurederivate mit einer Abgangsgruppe und zwei Alkylgruppen unterscheiden sich nicht nur bezüglich ihrer toxischen, sondern auch hinsichtlich ihrer physikochemischen Eigenschaften (Barr et al. 2004; Thiermann et al. 2016).



Grundstruktur nach Schrader

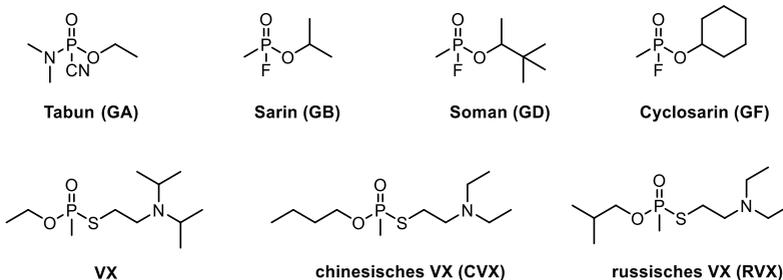


Abbildung 1: Grundstruktur nach Schrader und Nervenkampfstoffe der G- und V-Reihe. Erstellt nach Black (2016), Eyer (2003) und Worek et al. (2004) mit ChemDraw Version 22.0.

Phosphororganische Nervenkampfstoffe sind chirale Moleküle. Sie weisen als Substituenten ein asymmetrisches Phosphoratom auf, sodass sie sich in ihrem optischen Drehsinn [(+)-P/(-)-P] unterscheiden. Es gibt also immer mindestens zwei Enantiomere. Abhängig vom Drehsinn zeigen die Stereoisomere unterschiedliche toxikodynamische und toxikokinetische Eigenschaften (Benschop und Jong 1991). Verallgemeinert besitzen (-)-Enantiomere wie im Fall von (-)-VX eine um einige Zehnerpotenzen höhere biologische Stabilität und Toxizität im Vergleich zum entsprechenden Enantiomer mit

positivem Drehsinn (Benschop und Jong 1988; Reiter et al. 2008; Tenberken et al. 2010; Tsai et al. 2010). Folglich könnten Therapeutika die vorrangig das toxischere Enantiomer mit negativem Drehsinn binden und/oder abbauen, zu einer verbesserten Therapie führen.

Neben der militärischen Nutzung spielen Organophosphate auch im Bereich der Pestizide eine bedeutende Rolle. Als Pestizide werden allgemein Substanzen definiert, die unerwünschte Organismen abtöten. Dazu gehören Insektizide wie Malathion, Parathion und Chlorpyrifos sowie Akarizide, Rodentizide, Fungizide, Holzschutzmittel, Molluskizide, Herbizide und Bakterizide oder auch Anthelminthika (Caloni et al. 2018; Gupta und Robin 2022). Phosphororganische Pestizide weisen eine geringere Toxizität als phosphororganische Nerven-kampfstoffe auf, wobei sie eine gemeinsame Grundstruktur mit ähnlichen Wirkmechanismus zeigen (vgl. Abbildung 1). Alle phosphororganischen Verbindungen mit einem elektrophilen Phosphor-Zentralatom, einer PO-Doppelbindung, zwei basischen Substituenten R1 und R2 sowie einer elektronenziehenden, guten Abgangsgruppe X, haben eine kontaklinsektizide Wirkung (Quitschau et al. 2008). Die bis heute bekannten und

teils noch immer eingesetzten Pestizide Parathion (E 605) und Paraoxon (E 600, PXE) sind ebenfalls von Schrader synthetisiert worden (Schrader 1951). In der modernen Landwirtschaft ist der Einsatz von Organophosphaten nicht mehr wegzudenken. Aufgrund der Übernutzung reichern sich die Rückstände der phosphororganischen Pestizide im Boden an und werden ins Grundwasser ausgewaschen, sodass aquatische und terrestrische Nahrungsketten kontaminiert werden. Pestizidrückstände werden regelmäßig im Boden, Wasser und der Luft nachgewiesen (Golfiopoulos et al. 2003; Kumar et al. 2018; Mali et al. 2023). Akute Expositionen können sich nicht nur auf Menschen und Pflanzen, sondern auch Insekten und Tiere toxisch auswirken (Black 2016; Mali et al. 2023; Marican und Durán-Lara 2018; Rice 2016).

II.1.2 Das cholinerge System

Über das vegetative Nervensystem wird ein Großteil unserer lebensnotwendigen Körperfunktionen, wie Atmung und Kreislauf, gesteuert. Es wird in drei Teile unterteilt. Hierzu zählen der Sympathikus und Parasympathikus, die komplementär zueinander wirken, sowie das

enterische Nervensystem (vgl. Abbildung 2) (Jänig und Baron 2019).

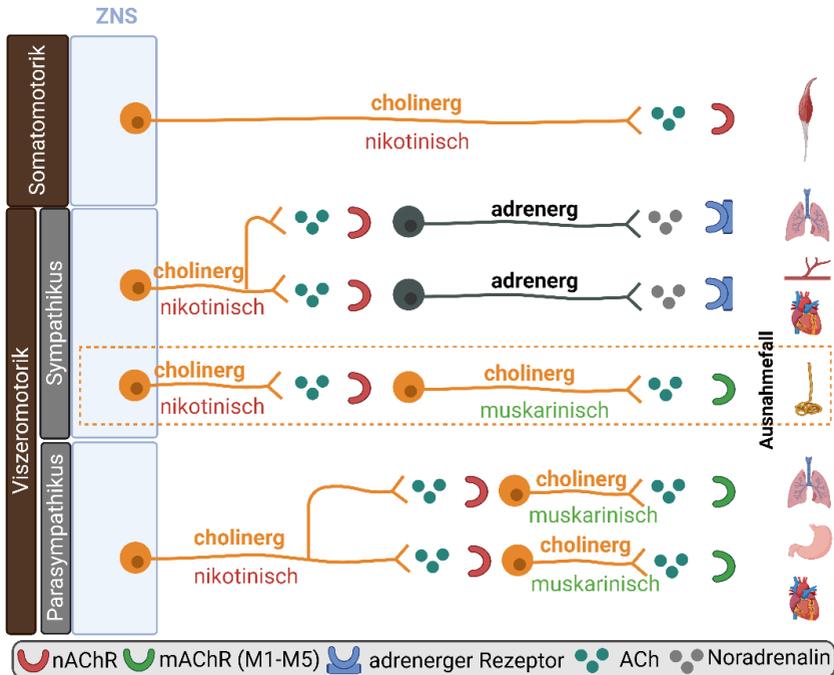


Abbildung 2: Vereinfachte Darstellung des vegetativen Nervensystems mit Fokus auf das cholinerge System (orange). Erstellt nach Jänig und Baron (2019) mit BioRender.com.

Eine wichtige Rolle zur Signalübertragung im vegetativen Nervensystem spielen der Neurotransmitter ACh, der an metabotrope muskarinerge Acetylcholinrezeptoren (mAChR) und ionotrope nikotinerge Acetylcholinrezeptoren (nAChR) des zentralen Nervensystems (ZNS)

und peripheren Nervensystems (PNS) bindet, sowie die Katecholamine Noradrenalin und Adrenalin (vgl. Abbildung 2) (Aumüller et al. 2007; Bloom 2001; Hoffman 2001; Jänig und Baron 2019; Taylor 2001).

Die Synthese des Transmitters ACh erfolgt im Zytoplasma in der Präsynapse aus Cholin und Acetyl-Coenzym A katalysiert durch das Enzym ChAT. Anschließend wird er in neuronalen Zellen in Transportvesikeln gespeichert und nach Eintreffen eines Aktionspotentials an der präsynaptischen Endigung in den synaptischen Spalt mittels Exozytose freigesetzt, um einen Reiz an der postsynaptischen Nervenzelle über nAChR oder mAChR auszulösen und so seine Wirkung zu vermitteln. Nach der Transmitterausschüttung, hydrolysiert das Enzym AChE den Neurotransmitter ACh in die Spaltprodukte Acetat und Cholin, die wieder in die präsynaptische Nervenzelle aufgenommen werden (vgl. Abbildung 3) (Berkaloff et al. 1990; Hallermann und Schmidt 2019; Nachmansohn und Machado 1943; Purves et al. 2004).

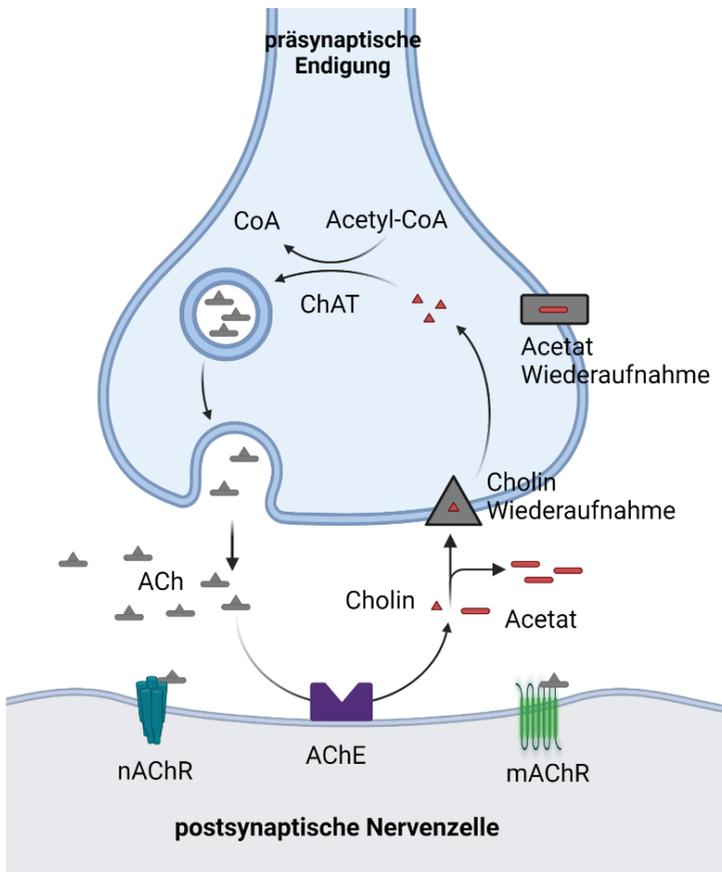


Abbildung 3: Schematische Darstellung der cholinergen Synapse. Erstellt nach Kummer et al. (2008) sowie Soreq und Seidman (2001) mit BioRender.com.

Die Wirkung auf die postsynaptische Zelle wird dadurch aufgehoben. Im cholinergen System fungiert die AChE als Schlüsselenzym. Sie weist bereits bei einer geringen

ACh-Konzentration eine hohe Hydrolyseaktivität auf, indem es mit einer äußerst hohen Geschwindigkeit von ca. 10.000 Molekülen pro Sekunde (s) den Neurotransmitter in Acetat und Cholin im synaptischen Spalt hydrolysiert, was einer Umsatzzeit von 1×10^{-4} s entspricht (Taylor 2001). Dadurch erfolgt eine ausreichend schnelle Inaktivierung der Signaltransmission, sodass die Wirkung von ACh auf die regionale Freisetzung beschränkt bleibt. Das Enzym AChE steuert folglich die Wirkungsdauer von ACh (Purves et al. 2004).

Das cholinerge System bildet im Körper ein Netzwerk, das verschiedene komplexe Funktionen ausführt. Es kommt sowohl in neuronalen als auch in nicht-neuronalen Geweben vor (Prado et al. 2017). In nicht neuronalem Gewebe wird von einem nicht-neuronalen cholinergen System gesprochen, wohingegen im Zusammenhang mit der Synthese, Speicherung und Freisetzung von ACh in cholinergen Neuronen sowie der anschließenden Aktivierung von mAChR und nAChR an den jeweiligen Effektorzellen vom neuronalen cholinergen System gesprochen wird (Fujii et al. 2017; Grando et al. 2003; Kása et al. 1997).

Die präganglionären sympathischen und parasympathischen Neurone werden beide über den Transmitter ACh gesteuert, das an nAChR bindet. Im Gegensatz dazu werden die postganglionären Fasern des Sympathikus durch Noradrenalin als Transmitter für adrenerge Rezeptoren reguliert. Die postganglionären Fasern des Parasympathikus werden über ACh gesteuert, das an mAChR bindet. Eine Besonderheit stellen die postganglionären, sympathischen Fasern der Schweißdrüsen dar, da die Reizübertragung über mAChR statt adrenerger Rezeptoren funktioniert (vgl. Abbildung 2) (Aumüller et al. 2007; Drenckhahn 2008; Jänig und Baron 2019; Mumenthaler und Mattle 2006; Schmidt et al. 2010; Schünke et al. 2015).

Die cholinergen Transmembranrezeptoren, die sich sowohl im zentralen als auch peripheren Nervensystem befinden, steuern eine Vielzahl von Funktionen durch vegetative Signaltransmission an unterschiedlichen Erfolgsorganen. Die ligandengesteuerten nAChR regulieren beispielsweise die somatomotorische Vermittlung an der neuromuskulären Endplatte. Die G-Proteingekoppelten mAChR werden unter anderem an den Bronchien, der glatten Muskulatur, dem Herzmuskel und

der Pupille exprimiert (vgl. Abbildung 2) (Jänig und Baron 2019). Da über die AChR lebenswichtige Funktionen geregelt werden, stellt die Verhinderung der Inhibition aktuell eine wichtige therapeutische Ansatzstelle dar.

II.1.3 Wirkmechanismus der phosphororganischen Vergiftung

Wie bereits in den 1940er Jahren festgestellt wurde ist die kovalente Bindung und irreversible Hemmung der AChE der Hauptpathomechanismus der phosphororganischen Vergiftung (Mackworth und Webb 1948). Hierbei wird der Serin-Rest im aktiven Zentrum der AChE phosphoryliert und es kommt zur Hemmung des Enzyms (vgl. Abbildung 4).

Phosphorylierung dient als Oberbegriff für Phosphorylierung, und Phosphonylierung oder Phosphinylierung. Hierdurch kommt es zu einem Überschuss an Acetylcholin (ACh) im synaptischen Spalt, da kein Abbau mehr erfolgt. Dies induziert eine stete Reizübertragung an cholinergen Synapsen.

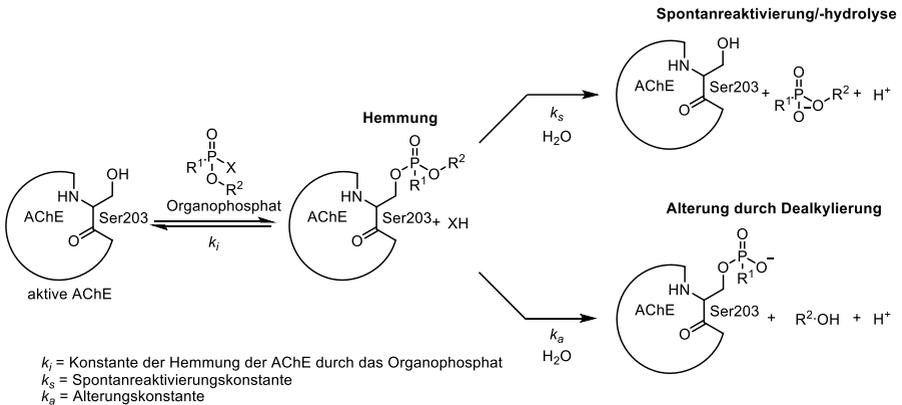


Abbildung 4: Reaktionsmöglichkeiten des Serin-Restes (Ser203) im aktiven Zentrum der AChE mit Organophosphaten. Erstellt nach Millard et al. (1999) und Worek et al. (2004) mit ChemDraw 22.0.

Die Bindung zwischen der AChE und dem Organophosphat kann hydrolysiert werden, wodurch es zu einer Spontanreaktivierung kommt (vgl. Abbildung 4). Auch eine Dealkylierung der gehemmten AChE ist möglich. Hierbei spricht man von einer sogenannten „Alterung“ des Enzyms (vgl. Abbildung 4). Eine Reaktivierung einer gealterten AChE, also eines Phosphyl-Enzym-Komplexes, durch den Enzymreaktivator Oxim ist nicht mehr möglich (Millard et al. 1999; Worek et al. 2004). Die Halbwertszeit variiert dabei von 2–3 Minuten (min) für AChE gehemmt durch Soman und bis zu 40 Stunden

(h) für AChE gehemmt durch VX (Worek et al. 2004). Ein möglichst früher Therapiebeginn ist daher für eine erfolgreiche Behandlung entscheidend.

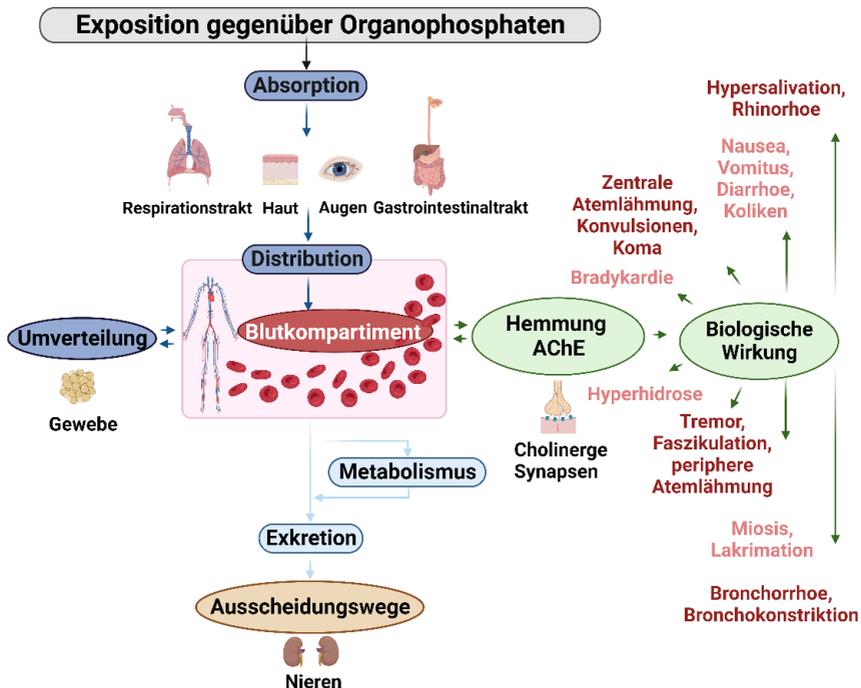


Abbildung 5: Exposition mit Organophosphaten - Verbleib und Verhalten im Körper. Erstellt nach Aktories et al. (2005), Masson und Rochu (2009) sowie Masson (2016) mit BioRender.com.

Im Allgemeinen kommt es bei Aufnahme von phosphororganischen Verbindungen einerseits zur Wirkung des Organismus auf die phosphororganischen Verbindungen

(Pharmakokinetik), andererseits zur Wirkung der Organophosphate auf den Organismus (Pharmakodynamik) (vgl. Abbildung 5).

Das Prinzip der Pharmakokinetik wird mit dem Akronym LADME beschrieben (Aktories et al. 2005; Kullak-Ublick et al. 2012). Nach der Freisetzung (**L**iberation), in diesem Fall als Exposition gegenüber Organophosphaten beschrieben, kommt es zur Aufnahme (**A**bsorption) über Haut, Respirations-, Gastrointestinaltrakt oder Schleimhäute der Augen. Über das Blutkompartiment findet die Verteilung (**D**istribution) statt. Im Anschluss daran wird die jeweilige Substanz verstoffwechselt (**M**etabolismus) und ausgeschieden (**E**xkretion). In Abhängigkeit der Lipophilie des jeweiligen Stoffes kommt es auch zu einer reversiblen Umverteilung in Gewebe. In den verschiedenen Teilbereichen des Organismus laufen somit parallel unterschiedliche Vorgänge ab. Die Kombination dieser Abläufe bestimmt die Gesamtkonzentration im Organismus. Einflussfaktoren sind mitunter die Expositionsmenge, -art und -dauer, sowie die physikochemischen Eigenschaften des Stoffes, die zu einer unterschiedlich schnellen Symptombildung führen (Aktories et al. 2005; Freissmuth 2020; Masson und Rochu 2009). Die

Substanzen der G-Reihe sind im Vergleich zu denjenigen der V-Reihe volatil und hydrolyselabiler, wodurch ihre Aufnahme meist inhalativ erfolgt. Sarin beispielsweise weist eine Volatilität von 18700 mg m^{-3} bei $25 \text{ }^\circ\text{C}$ auf, wohingegen diese von VX bei $12,6 \text{ mg m}^{-3}$ bei $25 \text{ }^\circ\text{C}$ liegt (Black 2016). Die inhalative Aufnahme von G-Stoffen über muköse Membranen führt zu einem raschen Einsetzen von Vergiftungszeichen, sodass unverzüglich mit einer Behandlung begonnen werden muss (Thiermann et al. 2016). Im Gegensatz dazu sind die V-Stoffe wesentlich hydrolysestabiler und die Aufnahme erfolgt meist perkutan (Barr et al. 2004; Birtley et al. 1966; Black und Read 2013; Black 2016). Die perkutane Aufnahme von geringflüchtigen V-Stoffen, wie VX, führt zu sich langsam entwickelnden und länger andauernden Vergiftungsverläufen. Hierbei wird die Hypothese vertreten, dass die Substanz ein subkutanen Depot bildet, von welchem es sich aufgrund der Lipophilie in andere Kompartimente über einen verlängerten Zeitraum verteilt und akkumuliert (Thiermann et al. 2016). Dies hat eine verlängerte Elimination zur Folge und schränkt die Wirksamkeit von Therapeutika ein. Die klinischen Symptome der Intoxikation können sich über Tage verschlechtern und selbst bei anfänglicher Verbesserung zu einem

Rückfall führen (Vale 1998). VX mit einer geschätzten perkutanen LD₅₀-Dosis von 0,07 mg kg⁻¹ für Menschen, die immer noch als zu hoch angezweifelt wird (National Academies Press (US) 1997), verbindet dadurch die Eigenschaften einer extrem hohen Toxizität und hohen Lagerstabilität (Black 2016). Das Blutkompartiment als gemeinsamer Verteilungsweg präsentiert sich hierbei als äußerst attraktive therapeutische Ansatzstelle und offenbart eine mögliche Schlüsselstelle für die Behandlung. Es wäre von erheblichem Vorteil, wenn eine Detoxifikation bereits im Blutkompartiment erfolgen könnte und so eine Verteilung in das Gewebe und Bindung an die AChE verhindert werden kann. Die Bindung der Organophosphate an AChE cholinergere Synapsen führt zur biologischen Wirkung auf das cholinerge System und somit den Körper, welche sich in einem charakteristischen symptomatischen Erscheinungsbild (Pharmakodynamik) zeigt (Aktories et al. 2005; Casida und Quistad 2004; Costa 2006; Masson und Rochu 2009; Masson 2016).

II.2 Diagnostik und Therapie der phosphororganischen Vergiftung

II.2.1 Klinisches Bild der phosphororganischen Vergiftung

Das klinische Bild, also die Summe aller Symptome, der Symptombeginn und der chronologische Verlauf, ist abhängig von der Art der Aufnahme (perkutan, inhalativ, oral), der Menge und der lipophilen Eigenschaft des Stoffes. Liegt die Hemmung der peripheren AChE bei 50–80 %, treten erste Symptome auf (Lotti 2001). Mit einer schweren Vergiftung ist zu rechnen, sobald 90 % des Enzyms gehemmt sind. Bei der phosphororganischen Vergiftung können kurzfristige und langfristige Folgen unterschieden werden.

Kurzfristig führt die Überregulation durch ACh an nAChR zu einer sukzessiven Reduktion der nikotinergen Reizweiterleitung bis hin zur Unterbrechung der Signaltransmission mit neuromuskulärer Blockade, die epileptiforme Krämpfe und eine zentrale Atemlähmung bedingt (Aldridge und Reiner 1975; Holmstedt 1959; Papke 2014; Taylor et al. 1995; Thiermann et al. 2010). An mAChR kann die Überstimulation durch ACh zu den typischen muskarinerg vermittelten Symptomen wie

Bronchokonstriktion, Abdominalkrämpfen, Hypersekretion an Schleim- und Speicheldrüsen, Hyperhidrose, Herzrhythmusstörungen und Miosis führen (vgl. Abbildung 2) (Aurbek et al. 2009; Grob 1956; Marrs 1993; Thiermann et al. 2016). Das Akronym SLUDGE (Abkürzung der jeweiligen Anfangsbuchstaben: *Salivation, Lacrimation, Urination, Diarrhea, Gastrointestinal Discomfort and Emesis* – Salivation, Lakrimation, Miktion, Diarrhoe, gastrointestinale Beschwerden und Emesis) beschreibt den parasymphatischen Anteil des cholinergen Toxidroms einer Organophosphatvergiftung (Peter et al. 2014; Ventura et al. 2021).

Treten eine starke Bronchosekretion in den Atemwegen zeitgleich mit einer Lähmung der peripheren Atemmuskulatur und einer zentralen Atemantriebsstörung auf, führt dies oftmals zum Atemstillstand und selbst trotz adäquater Therapie häufig zum Tod (Eyer et al. 2004; Grob 1956; Kwong 2002; Lee 2003; Namba 1971; Sidell und Borak 1992; Sidell 1994; Thiermann et al. 2016; Zilker 2008).

Als langfristige Folge kann bei Überleben des Patienten nach Organophosphataufnahme nach 24 bis 96 h im Anschluss an die cholinerge Krise das sogenannte *In-*

termediate Syndrome (IMS) eintreten, welches durch Myasthenie charakterisiert ist. Die genaue Pathogenese des IMS ist bisher ungeklärt. Ein erhöhtes Vorkommen wird mit einer verspäteten oder inadäquaten Therapie mit Atropin und Pyridinium Oximen, einer hohen Dosisaufnahme, verminderter AChE-Aktivität und Erhöhung von Muskelenzymen in Verbindung gebracht (Jokanović 2018; Karalliedde et al. 2006; Senanayake und Karalliedde 1987; Thiermann et al. 2016).

Nach zwei Wochen kann sich als weitere Phase die *Organophosphate-induced delayed neuropathy* (OPIDN) entwickeln. Die sensomotorische Neuropathie äußert sich durch unwillkürliche, schmerzhafte Kontraktionen der Beugemuskulatur des Unterschenkels, Parästhesien der Füße und Hände sowie Hyporeflexie (Reflexabschwächung) und Gleichgewichtsstörung. Ätiologisch betrachtet scheint hierbei die AChE keinen Einfluss zu nehmen. Stattdessen steht das an die Axonmembran gebundene Enzym *Neuropathy target esterase* (NTE) als mögliche Ursache in der Diskussion. Die Hemmung von NTE führt zu Störungen in der Kalziumfunktion, Signaltransduktion und Phosphatidylcholinomöostase (Eyer et

al. 2004; Jokanović 2018; Lotti 1991; Lotti und Moretto 2005).

Bei chronischen und schweren Vergiftungen durch Organophosphate sind mit einer zeitlichen Verzögerung neuropsychopathologische Komplikationen möglich, die über Jahre persistieren können. Diese zeigen sich durch Störungen in der Sprache und Motorik, kognitive Defizite, Demenz und Persönlichkeitsveränderung (Jokanović 2018; Thiermann et al. 2013; Thiermann et al. 2016).

II.2.2 Labordiagnostik

Zur Erkennung einer Vergiftung durch phosphororganische Verbindungen gilt die klinische Symptomatik als primäres Diagnostikum. Die Therapie wird direkt gestartet.

Neben der klinischen Symptomatik gibt es eine Spezialdiagnostik. Hierbei wird die Aktivität der auf den Erythrozytenmembranen gebundenen AChE gemessen, die sich relativ einfach und schnell bestimmen lässt. Die auf der Erythrozytenmembran gebundene AChE und die synaptische AChE weisen einen hohen Grad an Homologie zueinander auf. Dadurch wird die AChE-Aktivität einer hergestellten Blutverdünnung über peripher abge-

nommenes Blut als Surrogatparameter für die synaptische AChE-Aktivität herangezogen (Massoulié et al. 1993). Ein enger Zusammenhang konnte zwischen der Aktivität der Erythrozytenmembran gebundenen AChE und der neuromuskulären Transmission mit Organophosphat vergifteter Patienten festgestellt werden (Thiermann et al. 2005).

Das Prinzip beruht auf der Messung der AChE- und Butyrylcholinesterase (BChE)-Aktivität im Vollblut bzw. Plasma über den sogenannten Ellman-Assay (Grob 1956; Gunderson et al. 1992; Marrs et al. 2007). Die Esterasen wie BChE kommen im Plasma vor. Sie werden ebenfalls von Organophosphaten angegriffen, aber ihre Inhibition ist im Gegensatz zur AChE klinisch inapparent (Lockridge 2015; Lockridge et al. 2016; Masson und Lockridge 2010). Das Prinzip der photometrischen Messmethode beruht auf der Spaltung des Substrats Acetylthiocholin durch AChE, was proportional zur Aktivität des Enzyms AChE verläuft. Im Anschluss reagiert die Thiolgruppe des dadurch freigesetzten Thiocholins mit dem Chromogen 5,5'-Dithio-bis-nitrobenzoat (DTNB) und es bildet sich 5-Mercapto-nitrobenzoat (TNB⁻), welches photometrisch gemessen werden kann. Die Intensi-

tät des gelben Farbumschlags korreliert proportional mit der AChE-Aktivität. Die Detektion erfolgt bei einer Wellenlänge von 412 nm, bei Vollblutproben bei 436 nm (vgl. Abbildung 6) (Ellman et al. 1961; Worek et al. 2012).

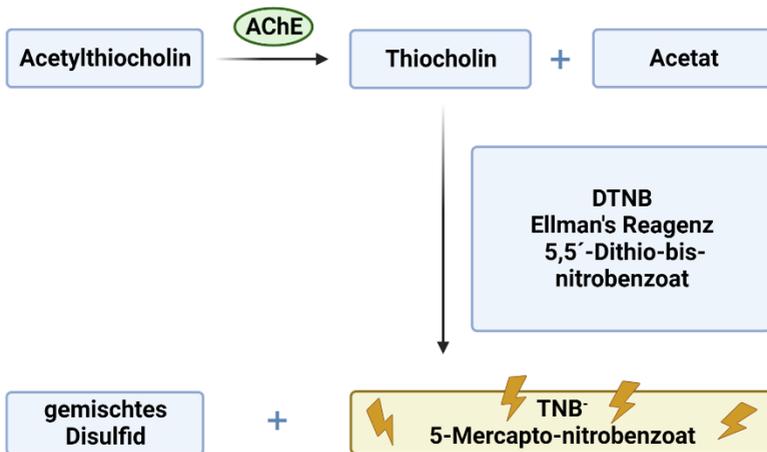


Abbildung 6: Mechanismus der Methode nach Ellman. Erstellt nach Ali-Shtayeh et al. (2014), Ellman et al. (1961) und Worek et al. (2012) mit BioRender.com.

Bei einer V-Stoff-Intoxikation, die mit einer langsamen Resorption einhergeht, bietet sich so die Möglichkeit des Vergiftungsnachweises bei Verdacht schon vor Auftreten der Symptome, sodass unmittelbar mit der Therapie begonnen werden könnte. Da bei einer inhalativen Organophosphatvergiftung die rasch einsetzende Symptoma-

tik Anlass für einen direkten Therapiebeginn ist, wird hier der Nachweis als rein confirmatorisch angesehen (Thiermann et al. 2016).

Die Analytik mittels massenspektromischer Verfahren ermöglicht eine qualitative und quantitative Analyse von Organophosphaten sowie deren Metaboliten und Proteinaddukten in Urin, Vollblut und Plasma. Die ausgefeilte Ausstattung, das Repertoire unterschiedlicher, aufwendiger Analysemethoden und die spezifische Expertise sind nur wenigen ausgewählten Laboren vorenthalten. Jedoch ist die Nachweismethode mittels Massenspektrometrie von hoher Relevanz für eine eindeutige Verifikation von Organophosphateinsatz (auch von sogenannten *Low-Level* Expositionen) und schafft die Grundlage für die Handlungsfähigkeit der Organisation zur Verhinderung von Chemiewaffen (OPCW - *Organisation for the Prohibition of Chemical Weapons*). Als Methode zur Einleitung und Steuerung der therapeutischen Behandlung ist sie hingegen nachrangig (Hamilton und Lundy 1989; Herbert et al. 2017; Horn et al. 2015; Jespersen et al. 2015; John et al. 2010; Worek et al. 2005).

II.2.3 Aktuelle therapeutische Maßnahmen und ihre Limitationen

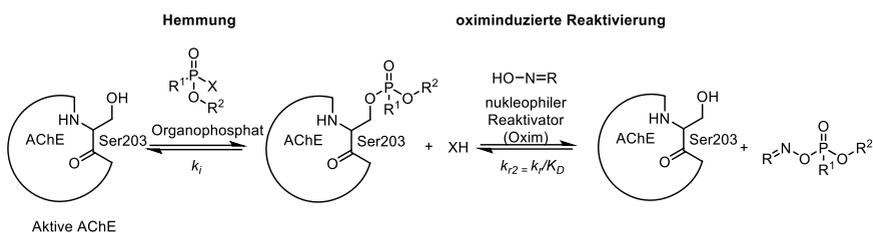
Bei Organophosphatvergiftungen wird zu Beginn, sofern möglich, eine rasche und vollständige Dekontamination des Betroffenen zum Schutz des Patienten und der behandelnden Personen durchgeführt. Die Atemwege werden gesichert, der Patient oxygeniert und die kardiorespiratorischen Parameter stabilisiert. Benzodiazepine werden zur Sedierung und Verhinderung einer neurotoxischen Wirkung, wie zerebraler Krampfanfälle, als Antikonvulsiva eingesetzt. Bei bestehenden cholinergen Symptomen haben sich über viele Jahre eine Kombination aus Atropin und Oximen als Standardtherapie etabliert (Cannard 2006; Eyer 2003; Eyer et al. 2009; Jett 2007, 2016; Thiermann et al. 2013). Um IMS vorzubeugen beziehungsweise den Verlauf abzumildern, wird zu einer rechtzeitigen und entsprechenden Behandlung mit Atropin und Oxim geraten. Zuweilen kann für zwei bis drei Wochen zur Vermeidung eines Atemstillstands eine Atmungsunterstützung notwendig sein (Eyer et al. 2004; Jokanović 2018). OPIDN ist nur symptomatisch therapierbar, wobei den sensorischen Neuronen gegenüber den motorischen Nerven eine bessere Prognose zugesprochen wird (Jokanović 2018).

Atropin, ein kompetitiver Muskarinrezeptorantagonist, wirkt rein symptomatisch. Hierbei soll durch die sofortige intravenöse Atropinisierung das endogene Acetylcholin antagonisiert werden, um die pathologisch erhöhte Erregungsweiterleitung zu reduzieren (Eyer 2003). Die Bronchosekretion und Hyperhidrose sollen beendet sowie die Herzfrequenz des Patienten auf ungefähr 80 Schlägen pro min eingestellt werden. Die Dosierungsempfehlungen in der Literatur weichen teils stark voneinander ab. Hierzulande hat sich eine initiale intravenöse Bolusgabe von 2 mg Atropin etabliert. Anschließend findet bis zum Sistieren der Symptome alle fünf min eine Dosisverdoppelung statt (2 mg, 4 mg, 8 mg, ...) (Grob 1956). Eine Überatropinisierung ist zu vermeiden, da anticholinerge Symptome, wie beispielsweise eine Darmparalyse, zu einer prognostischen Verschlechterung führen (Eddleston et al. 2004; Eddleston 2019; Eyer et al. 2004; Thiermann et al. 2016).

Oxime werden als kausaler Therapieansatz verabreicht. Sie wirken als AChE-Reaktivatoren der Organophosphat gehemmten AChE (Marrs et al. 2007). Es kommt zu einem nukleophilen Angriff des Oxims auf den Phosphyl-AChE-Komplex. Nach Bildung einer Übergangsverbin-

ung kommt es zur Spaltung zwischen der phosphororganischen Verbindung und dem Serinrest, der Seitenkette im aktiven Zentrum der AChE (Eyer 2003; Marrs et al. 2007; Worek und Thiermann 2013). Durch diese Reaktion wird ein Phosphyl-Oxim (POX) gebildet und die AChE in ihre ungehemmte Form zurückgeführt (vgl.

Abbildung 7).



k_i = Konstante der Hemmung der AChE durch das Organophosphat
 k_{r2} = Reaktivierungskonstante zweiter Ordnung durch ein Oxim
 k_r = Reaktivierungskonstante
 k_D = Dissoziationskonstante

Abbildung 7: Reaktionsmöglichkeiten des Serin-Restes (Ser203) im aktiven Zentrum der AChE mit Organophosphaten und Oxim-induzierter Aktivierung. Erstellt nach Millard et al. (1999) und Worek et al. (2004) mit Chemdraw 22.0.

Die reaktivierte AChE kann wieder den Neurotransmitter ACh abbauen. Aktuell sind die vier zwischen den 1950er und 1960er Jahren hergestellten Pyridinium-Oxime Pralidoxim (2-PAM), Trimedoxim (TMB-4), Obidoxim und HI-

6 im klinischen Einsatz (Jokanović 2018; Worek et al. 2016b).

Das Monopyridiniumoxim 2-PAM, das vor nahezu 70 Jahren von amerikanischen und britischen Wissenschaftlern unabhängig voneinander entwickelt wurde, stellt nach wie vor das Standardantidot in Frankreich, Großbritannien und den USA sowie auf dem Kontinent Asien dar. Die standardmäßige Dosierung von 2-PAM startet mit einer Bolusgabe von 2 g. Anschließend folgt eine kontinuierliche Applikation von 500 mg des Oxims pro Stunde (Childs et al. 1955; Eddleston et al. 2009; Ginsburg und Wilson 1957; Lundy et al. 2011). Das Oxim 2-PAM erwies sich bei Vergiftungen mit phosphororganischen Pestiziden, Cyclosarin und Tabun als unzureichend wirksam (Buckley et al. 2011; Clement 1992; Elsinghorst et al. 2013; Worek et al. 1998b; Worek et al. 2004). Dies könnte jedoch auf eine zu geringe Dosierung oder verspäteten Therapiebeginn zurückzuführen sein. Nichtsdestotrotz befinden sich Staaten, die sich allein auf 2-PAM stützen, in einer Therapielücke, weil das Oxim nur eine geringe Reaktivierungsleistung zeigt sowie eine unbefriedigende therapeutische Wirksamkeit gegenüber verschiedenen Nervenkampfstoffen hat (Eyer et

al. 2007; Marrs et al. 2007; Winter et al. 2016; Worek et al. 1998a; Worek et al. 2004; Worek et al. 2007). Durch die bereits beschriebene einfache Zugänglichkeit zu Pestiziden, ist auch ein terroristischer oder militärischer Einsatz möglich, weshalb therapeutische Behandlungslücken eine große gesundheitliche Gefahr darstellen (Worek et al. 2004).

Zu den darauffolgend entwickelten Oximpräparaten zählen die Bispyridiniumoxime TMB-4, Obidoxim und HI-6.

TMB-4, das kurze Zeit nach 2-PAM entwickelt wurde, weist eine erhöhte Toxizität auf, weshalb es nur noch in Israel und wenigen osteuropäischen Ländern in Form von Autoinjektoren hauptsächlich im militärischen Bereich Gebrauch findet (Antonijevic und Stojiljkovic 2007; Poziomek et al. 1958; Stojiljkovic und Jakanović 2007). Obidoxim wurde in den 1960er Jahren synthetisiert und wird in vielen europäischen Staaten als Standardoxim verwendet (Lüttringhaus und Hagedorn 1964). Die Anwendung erfolgt als Bolus von 250 mg, gefolgt von einer Applikation von 750 mg über 24 h (Eyer 2003). Im Vergleich zu 2-PAM zeigt es eine bessere Reaktivierung für die Nervenkampfstoffe Sarin und VX sowie für die meisten gängigen phosphororganischen Pestizide

(Elsinghorst et al. 2013; Worek et al. 2004). Auch weist es im Vergleich zu bekannten Oximen die höchste Reaktivierbarkeit gegenüber Tabun gehemmter AChE auf. Jedoch verfügt es auch wie 2-PAM gegenüber Cyclosarin nur über eine geringe Reaktivität (Lundy et al. 1992; Worek et al. 1998b). Ursache ist die geringe Affinität der Oxime gegenüber der gehemmten AChE. Als Nachteil von Obidoxim gegenüber 2-PAM gilt die Entstehung stabiler POX nach Reaktivierung bei In-vitro-Versuchen, die eine toxische Wirkung gegenüber der nativen, nicht inhibierten AChE aufweisen (Ashani et al. 2003; Black 2016). Diese Ergebnisse konnten In-vivo bisher aber nicht bestätigt werden (Marrs et al. 2007). Das 1959 synthetisierte Methoxim (MMB-4) sowie das Ende der 1960er Jahre entwickelte HI-6 weisen ein breiteres Wirkungsspektrum als 2-PAM und Obidoxim auf. HI-6 erweist sich in klinischen Studien als ungefährlich und zusätzlich als stärkerer Reaktivator bei Cyclosarin und VR gehemmter AChE im Unterschied zu Obidoxim (Elsinghorst et al. 2013; Lundy et al. 2006; Worek et al. 2004). Es zeigte sich jedoch abhängig von der Spezies, dass beispielsweise bei Nagern eine Reaktivierung nicht möglich war, sowie auch bei In-vitro-Versuchen mit Soman inhibierten Muskelstreifen, selbst bei suprathérapeutischer Dosie-

rung (Seeger et al. 2012; Tattersall et al. 1998; van Helden et al. 1991). Auch wenn MMB-4 im Vergleich mit 2-PAM hinsichtlich der Reaktivität gegenüber Vergiftungen durch Sarin, Cyclosarin, VR und VX überlegen ist, sind hierfür hohe Dosen notwendig, um vergleichbare Ergebnisse zu erhalten (Worek et al. 2010).

Auch wenn bei einer akuten Vergiftung durch Organophosphate die Behandlung mit Atropin und Oximen lebensrettend wirken kann, birgt diese Standardtherapie eindeutige Schwächen (Thiermann et al. 2016). So können subletale und akute cholinerge Symptome mittels anticholinerg Antidote und Beatmung reduziert werden und der Tod abgewendet werden. Aber eine Verhinderung irreversibler neurotoxischer Schäden, wie Neuroinflammation und Neurodegeneration, ist nicht möglich, sodass es zu Folgeerscheinungen der Vergiftung in Form von Krampfanfällen, dauerhafter Gehirnschädigung, Leistungseinschränkungen bis hin zur Arbeitsunfähigkeit kommt (Gupta et al. 2011; Nachon et al. 2013; Saxena et al. 2011; Thiermann et al. 2013; Worek und Thiermann 2013; Worek et al. 2016b). Die Effektivität der Oxime bleibt unter Toxikologen ein ständiger Diskussionsgegenstand, insbesondere bei Vergiftungen durch

phosphororganische Pestizide (Bajgar et al. 2007; Eddleston et al. 2005). Fallberichte und kleinere Studien zeigen bei schweren Vergiftungen durch phosphororganische Pestizide, dass Oximtherapien oftmals scheitern, wobei die Ursache unverständlich ist (Banerjee et al. 2014; Eddleston et al. 2002; Lin et al. 2016; Peter et al. 2006). Trotz der Synthese tausender neuer Oxime gibt es bisher kein Oxim, das die therapeutischen Lücken schließt. Als allgemeine Schwächen der Oximtherapie zählen sowohl das limitierte Reaktivierungspotenzial in Abhängigkeit von der Art des verwendeten Organophosphates und dessen Alterungskinetik als auch die eingeschränkte In-vivo-Stabilität und schlechte Blut-Hirn-Schranken Passage aufgrund der Hydrophilie der Pyridiniumoxime (Kása et al. 1997; Nachon et al. 2013; Worek und Thiermann 2013; Worek et al. 2020).

Auch die Kombination von Oximen konnte In-vitro zu keiner Steigerung der Reaktivierungsleistung im Vergleich zu den einzeln verabreichten Oximen Obidoxim und HI-6 führen. Aber da sich das Wirkspektrum durch Gabe der beiden Oxime erweitert, wurde vorgeschlagen diese in Autoinjektoren zu kombinieren (Worek et al. 2007). So kann insbesondere bei unbekannter Organo-

phosphatexposition ein breiteres Spektrum an Organophosphaten abgedeckt werden. Abhängig vom Organophosphat ist auch die Länge des gegebenen Therapiefensters. Nach Dealkylierung des phosphylierten AChE-Komplexes, ist keine effektive Reaktivierung durch Oxime mehr möglich, weil die aktuellen Oximtherapeutika keine ausreichende nukleophile Wirkung aufweisen. Die Alterung von Soman beträgt, wie bereits erwähnt, nur 2–3 min, sodass eine sofortige Behandlung durchzuführen ist (Thiermann et al. 2013; Worek et al. 2004).

Da phosphororganische Vergiftungen als therapierefraktär angesehen werden, beschäftigt sich die Forschung seit vielen Jahren mit dringend benötigten alternativen Lösungsansätzen. Bisher ist es jedoch nicht gelungen, neue Oxime oder alternative Reaktivatoren als Wirkstoffkandidaten zu entwickeln, die sich aktuellen Limitationen entziehen (Worek et al. 2020).

II.2.4 Alternativer Therapieansatz: *Bioscavenger*

II.2.4.1 Wirkkonzept von *Bioscavengern* und Klassifizierung

Gegenstand aktueller intensiver Forschung sind sogenannte *Bioscavenger*. Der Wirkmechanismus basiert auf

dem seit über 100 Jahren etablierten Prinzip, dass Makromoleküle toxische Substanzen abfangen, indem der Antikörper an das zirkulierende Toxin bindet. Antiseren gegen das Diphtherie- und Tetanustoxin wurden bereits Ende des 19. Jahrhunderts zum ersten Mal erfolgreich eingesetzt, gefolgt von therapeutischen Antikörpern gegen die Herzglykoside Digoxin und Digitoxin im 20. Jahrhundert (Butler 1982; Elsingerhorst et al. 2013). Auch Antiseren bei Vergiftungen durch Schlangen, Insekten- oder Spinnenbisse und oder -stiche funktionieren nach demselben Prinzip.

Heutzutage findet das Konzept des *Bioscavenging* unter anderem im Kontext von phosphororganischen Vergiftungen Gebrauch. Die Wirkweise beruht auf dem Ziel freie Organophosphatmoleküle bereits in der Blutbahn abzufangen, um zu verhindern, dass es zu einer weiteren Verteilung im Zielgewebe kommt, wo es seine toxische Wirkung durch Hemmung der AChE entfaltet (Elsingerhorst et al. 2013; Masson und Rochu 2009; Mumford et al. 2013). Im Gegensatz zu Oximen, die als AChE-Reaktivatoren funktionieren, greifen sie also ein, bevor eine Inhibition der synaptischen AChE stattfindet und zu systemischen Vergiftungserscheinungen führt,

sofern die Verabreichung zeitnah erfolgt (Lenz et al. 2007; Nachon et al. 2013).

Das Therapiekonzept der *Bioscavenger*-Behandlung ist bereits erfolgreich etabliert und im klinischen Einsatz. Beispielsweise wird bei Methotrexatvergiftungen die schnell wirksame und vollständig hydrolysierende Glucarpidase (Carboxypeptidase G2), ein katalytischer *Bioscavenger*, verabreicht (Widemann et al. 2014).

Ebenso findet der *small molecule scavenger* Cyclodextrin in Form des γ -Cyclodextrins Sugammadex in der klinischen Anästhesie therapeutische Anwendung. Die Bezeichnung *Small molecule scavenger* beruht auf der geringen Größe gegenüber Antiveninen und Antikörpern. Er wirkt als Antidot bei Rocuronium, einem nicht-depolarisierenden Muskelrelaxans mit kurzer Dauer bis zum Wirkeintritt, indem Einschlussverbindungen eingegangen werden, die mittels renaler Exkretion ausgeschieden werden. So gibt es eine Alternative, wenn bei der *Rapid-Sequence-Induction* (Blitzeinleitung) kein Succinylcholin verwendet werden darf. Es erleichtert die Narkoseeinleitung bei erschwertem Atemwegsmanagement (Larsen 2016; Naguib 2007; Nicholson et al. 2007). B-Cyclodextrine haben die Fähigkeit G-Kampfstoffe ein-

zuschließen und das Organophosphat im Anschluss mittels einer reaktiven Gruppe an einer der Hydroxylgruppen des β -Cyclodextrins zu entgiften (Estour et al. 2013; Wille et al. 2009). Mit einem durch ein Oxim substituierten Cyclodextrin wurden am Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Bundeswehr bei einem In-vivo-Versuch mit Meerschweinchen bereits hoffnungsvolle Ergebnisse erzielt (Worek et al. 2014c). Jedoch zeigten für Kampfstoffe der V-Reihe Cyclodextrine bisher keine ausreichende detoxifizierende Wirkung (Désiré und Saint-André 1987).

Es gibt verschiedene Arten von *Bioscavengern*: stöchiometrische und katalytische *Bioscavenger*. Die stöchiometrischen *Bioscavenger* verbrauchen sich bei dem Prozess der Detoxifikation, sodass sie bei einer weiteren Intoxikation nicht mehr einsetzbar sind (vgl. Abbildung 8). Humane AChE und BChE werden deshalb den stöchiometrischen *Bioscavengern* zugeschrieben (Goedde und Altland 1971). Um eine ausreichende Entgiftung zu erwirken, sind große Mengen notwendig, was einen hohen Produktions- und Kostenaufwand bedeutet (Masson und Nachon 2017; Nachon et al. 2013).

Katalytische *Bioscavenger* haben die Eigenschaft Organophosphate zu hydrolysieren, indem sie die PO- oder PS-Bindung des jeweiligen Organophosphates spalten und dadurch inaktivieren bzw. zu weniger toxischen Verbindungen abbauen. Durch ihren enzymatischen Wirkmechanismus stehen sie im Anschluss wieder für eine weitere Reaktion zur Verfügung, sodass eine deutlich niedrigere Behandlungsdosis im Gegensatz zu stöchiometrischen *Bioscavengern* notwendig ist (vgl. Abbildung 8) (Masson et al. 2008; Masson und Rochu 2009; Masson und Nachon 2017; Nachon et al. 2013).

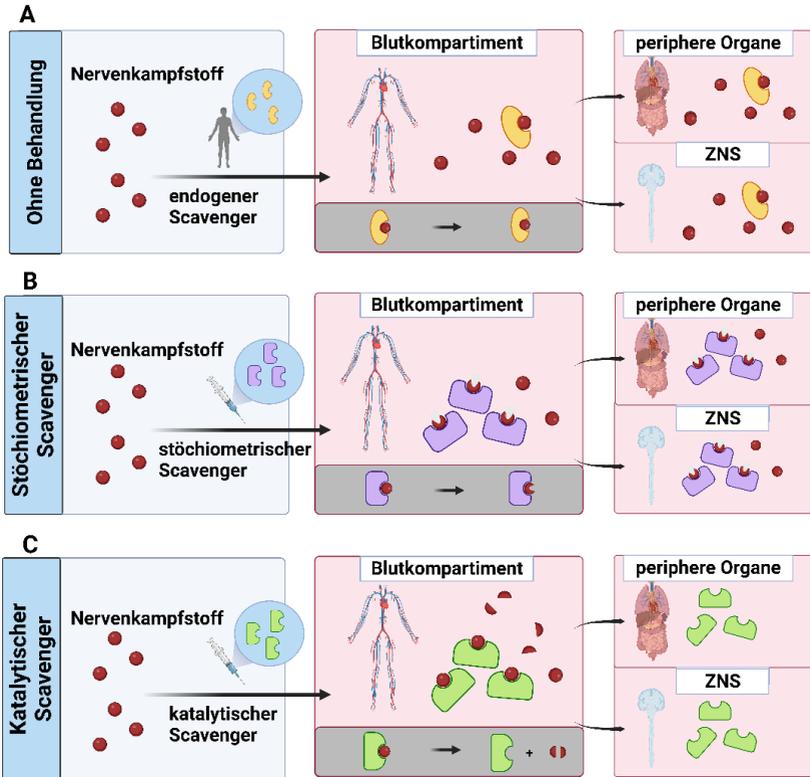


Abbildung 8: Behandlungsstrategien bei Nervenkampfstoffvergiftung. (A) Die Nervenkampfstoffe gelangen in das Blutkompartiment. Von dort verteilen sie sich ohne Behandlung in periphere Organe und das ZNS, wo sie die AChE inhibieren. (B) Bei einer Behandlung mit großen Mengen von stöchiometrischen *Bioscavengern* ist es möglich die Nervenkampfstoffe noch im Blutsystem abzufangen, um zu verhindern, dass sie periphere und zentrale AChE hemmen. Die stöchiometrischen *Scavenger* verbrauchen sich hierbei. (C) Katalytische *Scavenger* hydrolysieren die Nervenkampfstoffe im Blutkompartiment vor Erreichen der peripheren Organe und des ZNS, ohne sich zu verbrauchen, wodurch die Hemmung der AChE unterbunden wird.

Erstellt nach Masson und Nachon (2017) und Nachon et al. (2013) mit BioRender.com.

Die hydrophoben und elektrostatischen Wechselwirkungen zwischen dem Organophosphat und der Substratbindungstasche des Enzyms wirken sich auf die katalytische Aktivität aus (Bigley et al. 2013; Despotović et al. 2019; Hong und Raushel 1999; Vanhooke et al. 1996). Eine katalytische Aktivität von mindestens $5 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ min}^{-1}$ werden laut theoretischer Kalkulationen für den klinischen Einsatz von *Bioscavengern* postuliert, um bei einer praktikablen Applikationsdosis von 1 mg kg^{-1} Körpergewicht (KGW) die Halbwertszeit von $< 5 \text{ s}$ für den Abbau von Organophosphaten für eine erfolgreiche Detoxifikation zu erreichen (Ashani et al. 2016; Worek et al. 2016a). Hierbei kann bei einer gut applizierbaren Behandlungsdosis von Enzymen ein schützender Effekt erzielt werden.

Die Paraoxonase 1 (PON1), welche natürlich im humanen Plasma vorkommt, stellt ein vielversprechendes Enzym dar (Costa et al. 2013; Rochu et al. 2007). Es ist in der Lage, verschiedene Substrate zu erkennen und unterschiedliche Organophosphate zu hydrolysieren. So hydrolysiert PON1 zahlreiche G-Stoffe mit der postulierten

ten katalytischen Aktivitätsrate (Goldsmith et al. 2012) und konnte sich bei Cyclosarin-vergifteten Meerschweinchen als wirksam erweisen (Worek et al. 2014a). Jedoch schafft es keine der hervorgebrachten Enzymvarianten V-Stoffe mit ihrer typischen PS-Bindung zu spalten. Zudem erwies sich sowohl die gentechnische Herstellung als auch die Lagerung in Bezug auf eine ausreichende Stabilität als schwierig. Hinsichtlich der zu geringen Stabilität bei der Herstellung, der Lagerung und im Organismus, der geringen Hydrolyseraten und der Abdeckung zu kleiner Wirkspektren stellt sich die Entwicklung katalytischer *Bioscavenger* grundsätzlich als große Herausforderung dar (Worek et al. 2016a). Neben menschlichen Enzymen zur Detoxifizierung von Organophosphaten wurden folglich auch bakterielle Enzyme als mögliche Kandidaten herangezogen. Hierbei ist die physiologische Bedeutung der in bakteriellen Mikroorganismen entdeckten Enzyme, die phosphororganische Verbindungen spalten, noch unklar. Es wird spekuliert, dass sich die Vorläuferenzyme durch ihren unspezifischen Abbau von Organophosphaten rasch an evolutionäre Veränderungen anpassen konnten, wodurch ein Selektionsvorteil entstand (Singh und Walker 2006; Singh 2009).

Bisher basieren die entwickelten katalytischen *Bioscavenger* auf Phosphotri-, Acetylcholin- und Butyrylcholinesterasen (Masson et al. 2008; Masson und Rochu 2009; Masson und Nachon 2017; Nachon et al. 2013).

II.2.4.2 Katalytische Bioscavenger: Phosphotriesterasen

Phosphotriesterasen (PTE) zählen zu den katalytischen *Bioscavengern* und stammen ursprünglich aus Bakterien wie *Agrobacterium radiobacter* (Uniprot: Q93LD7) (Horne et al. 2002) und *Brevundimonas diminuta* (Uniprot: P0434) (Serdar et al. 1982). Sie gehören zur Amidohydrolase-Proteinsuperfamilie und sind sogenannte Aryldialkylphosphatasen (EC 3.1.8.1) (Punta et al. 2012). Es handelt sich um zweiwertige Metalloproteine, die in der Regel katalytische und/oder strukturelle Zn^{2+} -Ionen enthalten, welche ohne Verlust der katalytischen Aktivität durch Cd^{2+} , Mn^{2+} , Ni^{2+} oder Co^{2+} ersetzt werden können (Bigley und Raushel 2019; Omburo et al. 1992; Reeves et al. 2008). Zn^{2+} -Komplexe sind jedoch am stabilsten. Die metallabhängige Hydrolase ist ein homologes Homodimer, wobei die Quartärstruktur eine zwei-zählige Symmetrieachse (C2) aufweist. Die Proteinfaltung der Untereinheiten bildet einen TIM-Fass und weist

336 Aminosäuren pro Untereinheit auf (Goldsmith und Ashani 2018; Jackson et al. 2006; Raushel 2002; Yang et al. 2003). Die aktive Seite ist am carboxyterminalen Ende des zentralen β -Faltblatt-Kerns lokalisiert und wird durch ein Paar Zink (Zn^{2+})-Ionen gebildet. Das binukleare Metallzentrum wird durch vier Histidin (His)-Seitenketten (His 55, His 57, His 201 und His 230), einen Asparaginsäure (Asp)-Rest (Asp 306) und eine carbamylierte Lysin (Lys)-Seitenkette (Lys 169) gebunden sowie durch ein nucleophiles Hydroxidion überbrückt (Raushel 2002; Tsai et al. 2010).

Der Wirkmechanismus der PTE beruht auf der Hydrolyse der phosphororganischen PO- bzw. PS-Bindung, welcher durch den nucleophilen Angriff des Hydroxidions am Phosphorzentrum ausgelöst wird (Cherny et al. 2013; Goldsmith et al. 2017; Raushel 2002; Tsai et al. 2010).

PTE haben, wie bereits erläutert, das Ziel, das freie Organophosphat vor Hemmung der AChE abzufangen. Im Beispiel einer Vergiftung durch VX hydrolysiert die PTE das hochtoxische VX in eine nicht toxische und eine ge-

ring toxische Verbindung, die keine AChE inhibieren kann (vgl. Abbildung 9).

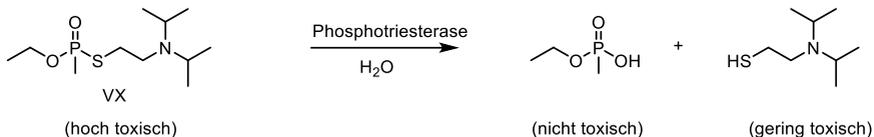


Abbildung 9: Interaktion VX-PTE bei optimal wirksamer PTE. Erstellt nach Bigley et al. (2013) mit ChemDraw 22.0.

Als verheißungsvoller katalytischer *Bioscavenger* erfahren die PTE große Aufmerksamkeit und werden intensiv erforscht. Dabei konnten sie sich bereits als vielversprechender Kandidat präsentieren (Masson und Rochu 2009; Masson 2016; Worek et al. 2016a). Ziel ist es mittels Protein-*Engineering* PTE zu entwickeln, die nicht nur gegen bedeutsame phosphororganische Verbindungen eine hohe katalytische Effizienz aufweisen, sondern auch bei Stoffen der V-Reihe in Hinblick auf das toxischere (–)-P-Enantiomer. PTE, welche von *Brevundimonas diminuta* abstammen, zeigen im Vergleich zu PTE von *Agrobacterium radiobacter* eine höhere katalytische Aktivität gegenüber Kampfstoffen (Bigley et al. 2013; Bigley et al. 2015; Cherny et al. 2013; Goldsmith et al. 2012; Goldsmith et al. 2016; Goldsmith et al. 2017).

Erwähnenswert sind hierbei sowohl die Variante 10-2-C3, die es schafft VX mit einer katalytischen Aktivität von $5 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ min}^{-1}$ zu hydrolysieren, als auch die Mutante 10-2-C3(I106A), entstanden durch Punktmutation, die eine hohe Substratspezifität gegenüber VR aufweist (Cherny et al. 2013; Goldsmith et al. 2017). Die unterschiedlichen enzymatischen Aktivitäten gegenüber V-Stoffen beruhen auf den angepassten Substrat-Bindungstaschen hinsichtlich ihrer strukturellen Größe, wobei die Mutation I106A eine Schlüsselfunktion einnimmt (Cherny et al. 2013; Goldsmith et al. 2016; Goldsmith et al. 2017). Weitere Optimierungsversuche durch computerbasiertes *Engineering* stagnierten und mündeten auf einem Optimierungsplateau (Goldsmith et al. 2017). Jedoch konnte durch fortgesetzte Forschung bei diesen Varianten eine Verbesserung hinsichtlich der Enzymstabilität erreicht werden, indem die reaktiven Thiolgruppen der Cystein (Cys)-Reste (Position 59 und 227) in diesem Fall durch inerte Seitenketten wie zum Beispiel Alanin (Ala), Valin (Val) oder Leucin (Leu) ausgetauscht wurden, sodass nicht-physiologische Disulfidbrücken verhindert werden konnten. Diese können sich unter der Einwirkung von oxidativem Stress bilden (Job et al. 2020). Die beiden Mutanten wurden darüber hin-

aus für die vorliegende Studie (PTE-2 und PTE-3) mittels weiterer Techniken optimiert, auf welche nachfolgend näher eingegangen wird (Escher et al. 2020; Job et al. 2020).

10-2-C3 und 10-2-C3(I106A) teilen die gemeinsame Vorgängermutante C23 (Cherny et al. 2013; Goldsmith et al. 2016), welche zwar ein geringgradig breiteres Substratspektrum abdeckt, aber eine niedrigere Effizienz aufweist. Trotzdem erwies sich die Variante als erfolgversprechendes Therapeutikum gegen VX-Vergiftung bei Meerschweinchen (Worek et al. 2014b). Die Effizienz der genannten PTE ist gegenüber beinahe allen Stoffen der G-Reihe und Paraoxon ähnlich hoch. Jedoch zeigt sich bei einer Vielzahl von bedeutsamen phosphororganischen Pestiziden nur eine schwache hydrolytische Aktivität. Die Entwicklung eines Breitspektrum-*Bioscavengers*, der sowohl phosphororganische Kampfstoffe als auch Pestizide abdeckt ist derzeitiger Forschungsgegenstand, da die Steigerung der enzymatischen Aktivität im Rahmen der gerichteten und ungerichteten Evolution, in der Regel zu einer Begrenzung des Substratspektrums geführt hat (Ashani et al. 2016;

Goldsmith et al. 2016; Goldsmith et al. 2017; Khersonsky und Tawfik 2010).

Die in diesem Versuch getesteten PTE: PTE-1, PTE-2 und PTE-3 stammen aus *Brevundimonas diminuta*. Bei PTE-1 handelt es sich um die Wildtyp-PTE. Sie zeigt bei Vergiftung durch phosphororganische Nervenkampfstoffe einen bevorzugten Abbau der (+)-P-Enantiomere (Caldwell und Raushel 1991; Cherny et al. 2013; Goldsmith et al. 2017; Tsai et al. 2010). Die beiden neuartigen, genetisch modifizierten PTE-Mutanten PTE-2 (PTE-C23(R152E)-PAS(100)-10-2-C3(I106A/C59V/C227V/E71K)-PAS(200)) (Escher et al. 2020; Köhler et al. 2021) und PTE-3 (10-2-C3(C59V/C227V)-PAS(200)) (Job et al. 2020; Köhler et al. 2021) weisen eine PASylierung auf. Die PASylierung, bei der eine Polypeptidkette aus den Aminosäuren Prolin, Alanin und Serin (PAS) mit verschiedenen Längen, z. B. PAS-100 oder PAS-200, an die PTE angefügt wird, stellt einen innovativen Ansatz dar. Die Methode basiert auf dem Wirkmechanismus einer verzögerten glomerulären Filtration durch die Niere aufgrund der Vergrößerung des hydrodynamischen Volumens (Gebauer und Skerra 2018; Schlapschy et al. 2013). Zusätzlich ermöglicht die

PASylierung die Verbindung von zwei unterschiedlichen PTE, wie im Fall von PTE-2 (Escher et al. 2020). PTE-2 ist ein bispezifisches Heterodimer. Es ist in der Lage, zwei unterschiedliche Substrate durch seine beiden aktiven Zentren umzusetzen. Das Konzept dieser bispezifischen PTE ist analog zu einem bispezifischen Antikörper zu sehen, der zwei verschiedene Antigene binden kann. Die homodimere Quartärstruktur erlaubt es dabei, zwei verschiedene Untereinheiten bestehend aus unterschiedlichen Mutanten herzustellen, wodurch die C2 Symmetrie gebrochen wird. Der flexible PAS-*Linker* mit 100 Resten fungiert als Verbindungsstück, um die Substratprofile der Untereinheiten zu kombinieren und diese folglich zu verbreitern, ohne dass die individuelle katalytische Aktivität beeinträchtigt wird. Dies erlaubt es PTE mit vielversprechenden katalytischen Aktivitäten miteinander zu kombinieren. Um das Heterodimer zu stabilisieren, wurde an beiden Monomeren je eine elektrostatische Steuerungsmutation durchgeführt (Position R152D und Position E71K). Gemäß dem Prinzip *Electrostatic Steering* wird dadurch verhindert, dass eine elektrostatische Abstoßung zu einer Homodimerisierung führt. Hierfür wurde die Polarität an den Dimer Grenzflächen umgekehrt (Escher 2021). Zusätzlich wurde ein PAS-

Anhängsel mit 200 Resten durch C-terminale Fusion zur Verzögerung der *Clearance* angehängt. Hierzu wurden zwei invertierte Sap I Restriktionsstellen anhand von PCR vor dem Stopcodon eingefügt, um ein nahtloses Einfügen zu ermöglichen. Das hydrodynamische Volumen vergrößerte sich dadurch um den Faktor 2,5 (Escher et al. 2020; Köhler et al. 2021). PTE-3 hat eine PAS-Sequenz mit 200 Resten, die auch mit Hilfe der Sap I Restriktionsstellen eingefügt wurde. Auch diese Variante basiert auf zahlreichen Optimierungsversuchen, wobei der Austausch zwei freier Cys mit Val zu einer Erhöhung der oxidativen Stabilität führte und in die Variante 10-2-C3(C59V/C227V) mündete (Job et al. 2020).

Für eine effektive Behandlung bei Organophosphatvergiftungen ist nicht nur eine ausreichend hohe katalytische Aktivität, sondern auch biologische Stabilität der Therapeutika notwendig (Ashani et al. 2016). Dies trifft insbesondere im Fall einer Vergiftung durch V-Stoffe, wie VX zu, die aufgrund ihrer hydrolysestabilen und lipophilen Eigenschaften sowie hohen Toxizität zu langanhaltenden und schwerwiegenden Vergiftungsverläufen führen (Black 2016; Worek et al. 2014b).

PTE-2 und PTE-3 konnten im Vergleich zu ihren Vorgängermutanten eine leicht erhöhte katalytische Aktivität aufweisen (Köhler et al. 2021). Der Ansatz eines heterodimeren Scavengers, kombiniert aus verschiedenen Untereinheiten von phosphororganischen Hydrolasen, wie in PTE-2, stellt sich als äußerst vielversprechend dar. PTE-2 konnte eine angemessene bis hohe katalytische Aktivität gegenüber einem breiten Spektrum an G- und V-Stoffen vorweisen (Köhler et al. 2021). Hinsichtlich der stereoselektiven Hydrolyse des racemischen VX zeigten PTE-2 und PTE-3 eine höhere stereochemische Präferenz gegenüber dem giftigeren (-)-VX-Enantiomer (Köhler et al. 2021). Zudem wird aufgrund einer PASylierung von PTE-2 und PTE-3 eine reduzierte Clearance-Zeit erwartet (Escher et al. 2020; Köhler et al. 2021), denn noch immer weisen Versuche mit Nagern zu geringe Plasma-Halbwertszeiten von ungefähr einer Stunde auf (Ashani et al. 2016; Black 2016; Despotović et al. 2019).

Die PTE stellen daher einen optimalen Therapieansatz zur Behandlungsunterstützung und Verkürzung der intensivmedizinischen Beatmungszeit dar. Bei einer hohen Wirksamkeit der Bioscavenger soll die Oximtherapie

nach Möglichkeit sogar ersetzt werden (Elsinghorst et al. 2013).

Zur weiteren Untersuchung der erfolgversprechenden Ergebnisse der In-vitro-PTE-Untersuchungen wurde daher in der vorliegenden Studie ein In-vivo-Versuch in Ratten mit den scavengerbasierten Wirkstoffkandidaten PTE-1, PTE-2 und PTE-3 nach VX-Vergiftung durchgeführt.

II.3 Kurzüberblick häufiger Vergiftungen bei Tieren

Pestizide stellen eine häufige Vergiftungsursache für Tiere dar mit oftmals fatalen Konsequenzen. Hauptsächlich sind AChE-Hemmer wie Organophosphate oder Carbamate und Antikoagulantien wie Cumarinderivate hierfür verantwortlich (Guitart et al. 2010b; Gupta et al. 2018; Meerdink 1989). Es handelt sich sowohl um vorsätzliche Vergiftungen als auch ungewollte Intoxikationen von Nicht-Zieltierarten (Berny et al. 2010; Guitart et al. 2010a; Guitart et al. 2010b; Martínez-Haro et al. 2008; Nakayama et al. 2019; Sánchez-Barbudo et al. 2012). Die Aufnahme des Giftes geschieht entweder direkt (Primärvergiftung), beispielsweise durch Futter oder Köder, oder indirekt durch Aufnahme vergifteter Beutetiere (Sekundärvergiftung) (Guitart et al. 2010a; Sánchez-Barbudo et al. 2012; Valchev et al. 2008).

Unter den Haustieren zählen überwiegend Hunde (Berny et al. 2010; Means und Wismer 2018; Valchev et al. 2008) und bei den Nutztieren Rinder zu den Vergiftungsopfern (Guitart et al. 2010a). Im Bereich der Wildtiere sind insbesondere Vögel, wie Greifvögel oder Wasservögel, betroffen, wobei auch Blei als häufige Intoxikationsursache benannt wird (Berny und Gaillet 2008;

Fisher et al. 2006; Guillemain et al. 2007; Guitart et al. 2010b; Pain et al. 2005; Sanderson).

Carbamate sind im Gegensatz zu Organophosphaten strukturell nicht komplex aufgebaut. Sie sind Ester der Carbaminsäure. Da Carbamate bei der Anwendung als sicherer gegenüber Organophosphaten eingestuft werden, übersteigt ihre Einsatzmenge die von Organophosphaten. Der Wirkmechanismus unterscheidet sich gegenüber Organophosphaten, indem sie die AChE reversibel durch Carbamylierung hemmen (Gupta und Miatovic; Gupta et al. 2018; Mdeni et al. 2022). Dadurch besitzen Organophosphate und Carbamate beide eine akarizide und insektizide Wirkung (Gupta 2005; Gupta und Robin 2022).

Die klinischen Symptome und folglich die Therapie einer Organophosphat- oder Carbamatvergiftung bei Tieren sind mit denen des Menschen vergleichbar. Dabei ist zu beachten, dass Organophosphate grundsätzlich zu ernsthafteren und länger anhaltenden Vergiftungsercheinungen führen als Carbamate (Gupta et al. 2018; Gupta 2019; Mazzaferro 2017).

Bei Intoxikation ist initial eine Stabilisation der Atmung und des Kreislaufes vorzunehmen. Zudem erfolgt auch in der Veterinärmedizin eine Therapie mittels Atropin nach Wirkung, bis sich eine leichte Tachykardie zeigt. Zusätzlich kann als weiterer klinischer Parameter die Beurteilung der Pupillenweite und die Maultrockenheit als Bewertungsmaßstab dienen (CliniTox; Gupta et al. 2018; Nägeli und Wegemann Ehrensperger 2017; Osweiler et al. 2011; Wismer und Means 2012). Im Fall einer Organophosphatvergiftung kann ein Oxim (Obidoxim, 2-PAM) langsam verabreicht werden (CliniTox; DeClementi 2018; Fikes 1990; Gupta et al. 2018; Osweiler et al. 2011; Plumb 2015). Bei einer Intoxikation mit Carbamaten ist dies nicht indiziert (Arnot et al. 2011; Jokanović 2009; Natoff und Reiff 1973). Antikonvulsiva sind zur Kontrolle der Krämpfe geeignet (CliniTox; Gupta et al. 2018; Osweiler et al. 2011; Tinson et al. 2017; Wismer und Means 2012). Des Weiteren sollte eine rasche und angemessene Dekontamination erfolgen. Je nach Intoxikationsweg und Tierart wird bei peroraler Giftaufnahme Aktivkohle empfohlen oder ein Emetikum, sofern noch keine neurologischen Symptome vorliegen und die Gefahr einer Aspirationspneumonie besteht (CliniTox; DeClementi 2018; Gupta et al. 2018; Löscher

2014; Osweiler et al. 2011; Wismer und Means 2012). Bei perkutaner Aufnahme wird zum Auswaschen des Fells geraten (Nägeli und Wegemann Ehrensperger 2017). Hierbei ist, sofern die Vergiftungssubstanz bekannt ist, auf die jeweilige Löslichkeit zu achten. Auch das Scheren von langem Fell kann ratsam sein (Nägeli und Wegemann Ehrensperger 2017). Wie auch in der Humanmedizin sind die Erfolgsaussichten einer Behandlung abhängig von der Art der Vergiftung, der Dosisaufnahme sowie vom Therapiestart (Gupta et al. 2018; Osweiler et al. 2011; Wismer und Means 2012).

Cumarinderivate verhindern die Bildung von Vitamin-K₁-abhängigen Gerinnungsfaktoren und haben dadurch eine gerinnungshemmende Eigenschaft. Sie hemmen kompetitiv das Enzym Vitamin-K-Epoxid-Reduktase, sodass Vitamin K nicht mehr regeneriert werden kann und ein Vitamin-K₁-Mangel entsteht (Valchev et al. 2008; Waddell et al. 2013). Werden Cumarinderivate in toxischen Konzentrationen aufgenommen, führt dies zu hämorrhagischen Diathesen (Kammermann-Lüscher 1978; Mackintosh et al. 1988; Woody et al. 1992). Sie finden als Rodentizide weltweiten Einsatz zur Bekämpfung von Nagetieren (Fisher et al. 2019).

Grundsätzlich wird dazu angehalten, Tiere, bei denen eine orale Aufnahme von Cumarinderivaten beobachtet wurde, innerhalb von vier h erbrechen zu lassen. So kann durch die Dekontaminationsmaßnahme eine Vergiftung verhindert werden (DeClementi und Sobczak 2018; Valchev et al. 2008). Bei diagnostizierter Intoxikation existiert kein allgemeingültiges Therapieschema. In der Literatur werden verschiedene Behandlungsansätze geschildert. Im Fall von lebensbedrohlichen Notfällen liefert ein frühzeitiger Therapiestart mit hochdosiertem i. v. verabreichten Vitamin K₁ eine gute Prognose (CliniTox; Merola 2002; Mount 1988). Mit einer anaphylaktischen Reaktion ist nicht zu rechnen, insbesondere wenn als Prophylaxe Prednisolon verabreicht wurde. Transfusionen mit Erythrozyten sind nur bei schweren Blutungsanämien notwendig (CliniTox). Eine andere Studie schildert prognostisch schlechte Aussichten für Cumarin-vergiftete Tiere (Valchev et al. 2008), wohingegen in einer weiteren Arbeit die Prognose je nach Grad der Intoxikation bei Start der Therapie von vorsichtig bis sehr optimistisch variiert (Merola 2002).

Idealerweise sollten Insektizide, Akarizide oder Rodentizide nur am gewünschten Zielort ihre Wirkung entfalten.

Jedoch kommt es nach wie vor zu zahlreichen ungewollten Vergiftungen, bei denen Menschen und Tiere zu Schaden kommen, sodass Verbesserungen von Therapieregimen weiterhin notwendig sind.

II.4 Tierversuche

In der vorliegenden Studie wurde ein Tierversuch durchgeführt. Tierversuche in der Forschung stehen im Brennpunkt der gesellschaftspolitischen Diskussion und polarisieren. Daher soll der nachfolgende Abschnitt zunächst einen Überblick verschaffen über rechtliche Grundlagen bis hin zu ethischen Aspekten. Diese Informationen sollen zu einer objektiven Meinungsbildung beitragen und folglich den Prozess der Abwägung der ethischen Vertretbarkeit ermöglichen.

II.4.1 Rechtliche Grundlagen und allgemeine Informationen über Tierversuche in Deutschland

Im Bereich der Versuchstierkunde sind auf EU-Ebene das Europäische Übereinkommen des Europarats vom 18. März 1986 zum Schutz der für Versuche und andere wissenschaftliche Zwecke verwendeten Wirbeltiere, der überarbeitete Anhang A dieses Übereinkommens, die Leitlinie (LL) 2007/526/EG vom 18. Juni 2007 für die Unterbringung und Pflege von Tieren, die für Versuche und andere Zwecke verwendet werden und die Richtlinie (RL) 2010/63/EU des Europäischen Parlaments und des Rates vom 22. September 2010 zum Schutz der für wissenschaftliche Zwecke verwendeten Tiere von Bedeu-

tung (Europäisches Übereinkommen zum Schutz der für Versuche und andere wissenschaftliche Zwecke verwendeten Wirbeltiere; LL 2007/526/EG; RL 2010/63/EU).

Ziele der RL 2010/63/EU sind unter anderem die Harmonisierung der Rechtsvorschriften in allen Mitgliedsstaaten, die Anhebung des Mindeststandards zum Schutz von Versuchstieren auf neueste wissenschaftliche Entwicklungen und Erkenntnisse, die Einschränkung des Einsatzes von Primaten, die Förderung und Erleichterung der Weiterentwicklung von Alternativmethoden und die konsequente Anwendung der 3R, auf die nachfolgend noch genauer eingegangen wird sowie als finales Ziel der vollständige Ersatz von Tierversuchen (RL 2010/63/EU).

Die RL 2010/63/EU wurde in nationale Rechts- und Verwaltungsvorschriften umgesetzt. Auf nationaler Ebene spielen das Tierschutzgesetz (TierSchG) in der Fassung der Bekanntmachung vom 18. Mai 2006, welches zuletzt am 20. Dezember 2022 geändert wurde, die Allgemeine Verwaltungsvorschrift zur Durchführung des Tierschutzgesetzes (AVV) vom 09. Februar 2000, welche noch einer Aktualisierung bedarf, die Tierschutzversuchstier-

verordnung (TierSchVersV) vom 1. August 2013, zuletzt aktualisiert am 11. August 2021, sowie die Verordnung über die Meldung zu Versuchszwecken verwendeter Wirbeltiere oder Kopffüßer oder zu bestimmten anderen Zwecken verwendeter Wirbeltiere (Versuchstiermeldeverordnung) vom 12. Dezember 2013, zuletzt geändert am 11. August 2021, eine gesetzliche Rolle (AVV; TierSchG; Versuchstiermeldeverordnung; TierSchVersV).

Neben diesen zentralen Rechtsnormen gibt es auf nationaler Ebene zahlreiche Empfehlungen zum verantwortungsvollen Umgang mit Versuchstieren. Hierzu zählt die GV-SOLAS (Gesellschaft für Versuchstierkunde – *Society of Laboratory Animal Science*) als eingetragener Verein, der viele Fachinformationen bereithält oder auch das Bf3R (Deutsches Zentrum zum Schutz von Versuchstieren).

Der Tierschutz in Deutschland hat Verfassungsrang. Indem „der Staat [...] die Tiere im Rahmen der verfassungsmäßigen Ordnung durch die Gesetzgebung und nach Maßgabe von Gesetz und Recht durch die vollziehende Gewalt und die Rechtsprechung [schützt]“, wurde

2002 der Grundstein für einen verfassungsrechtlichen Schutz der Tiere gelegt und der Tierschutz als Staatsziel im Grundgesetz (GG) Art. 20a verankert (GG).

Laut § 1 TierSchG ist der „Zweck dieses Gesetzes [...] aus der Verantwortung des Menschen für das Tier als Mitgeschöpf, dessen Leben und Wohlbefinden zu schützen“. Dadurch wird dem Tier ein hoher Stellenwert durch einen sittlich verantwortungsvollen Umgang des Menschen beigemessen. Zudem ist es niemandem erlaubt, „einem Tier ohne vernünftigen Grund Schmerzen, Leiden oder Schaden“ [zu]zufügen (§ 1 TierSchG). Der vernünftige Grund wird nicht näher definiert und lässt, wie in anderen Teilen des TierSchG, Interpretationsspielraum zu (TierSchG).

Dies steht dem deutschen GG gegenüber, in dem gemäß Art. 5 Abs. 3 die „Wissenschaft, Forschung und Lehre [als] frei“ und somit gewährleistetes Grundrecht ohne Vorbehalt festgeschrieben steht (GG). Folglich findet bei der Beantwortung der Frage der Rechtmäßigkeit von Tierversuchen eine Interessenabwägung zwischen den Belangen des Tierschutzes und dem Grundgesetz statt.

Gemäß der RL 2010/63/EU und dem nationalen Recht des TierSchG in § 7 Abs. 2 versteht man unter Tierversuchen verallgemeinert mitunter jede Form von „[...] Eingriffe[n] oder Behandlung[en] zu Versuchszwecken [...], wenn sie mit Schmerzen, Leiden oder Schäden für diese Tiere verbunden sein können [...]“, es dazu führen kann „[...]“, dass Tiere geboren werden oder schlüpfen, die Schmerzen, Leiden oder Schäden erleiden oder am Erbgut von Tieren, wenn sie mit Schmerzen, Leiden oder Schäden für die erbgutveränderten Tiere oder deren Trägartiere verbunden sein können.“ Aber „auch Eingriffe oder Behandlungen, die nicht Versuchszwecken dienen“, wie „die [...] Herstellung, Gewinnung, Aufbewahrung oder Vermehrung von Stoffen, Produkten oder Organismen“, „Organe oder Gewebe ganz oder teilweise [...] zu entnehmen, um zu wissenschaftlichen Zwecken [...] [beispielsweise] isolierte Organe, Gewebe oder Zellen zu untersuchen“ sowie die Durchführungen zu „[...] Aus-, Fort- oder Weiterbildungszwecken [...]“ werden hierzu gezählt (RL 2010/63/EU; TierSchG). Das beinhaltet jede Verwendung oder jedes Verfahren, das mit einem Einstich einer Injektionskanüle nach guter tierärztlicher Praxis gleichkommt oder darüber hinausgeht. Zu den Tierversuchen zählen demnach alle Eingriffe an

Tieren zu Versuchszwecken in der biomedizinischen Forschung, wie Operationen oder Untersuchungen bei Herz-Kreislauf-Erkrankungen. Auch Tiere, die für die Antikörper- oder Impfstoffproduktion im Rahmen der Diagnostik oder Therapie verwendet werden, fallen unter Tierversuche. Das Gleiche trifft auf Untersuchungen zu, die der Verbesserung von Haltungsbedingungen von landwirtschaftlichen Nutztieren dienen sowie Verhaltensstudien, wenn nicht ausgeschlossen werden kann, dass die Tiere aufgrund dessen leiden oder Stress empfinden. Es gelten aber auch Eingriffe an Tieren, die nicht zu Versuchszwecken dienen, als Tierversuch. Ein Beispiel stellen Untersuchungen von Tieren durch Tierärzt*innen im Rahmen der Aus-, Fort-, und Weiterbildung dar (Thein et al. 2018).

Im TierSchG wird die Durchführung von Tierversuchen in den §§ 7–9 weiter eingeschränkt. So ist in § 7 Abs. 1 TierSchG die „Pflicht der Beschränkung der Tierversuche auf das unermessliche Maß“ beschrieben im Hinblick auf die dem Tier zugefügten „Schmerzen, Leiden und Schäden, [...] [der] Zahl der verwendeten Tiere [...] und der artspezifischen Fähigkeit [...] unter den Versuchseinwirkungen zu leiden [...]“. § 7a TierSchG be-

nennt unter anderem die Zwecke, die für eine Unerlässlichkeit der Durchführung von Tierversuchen sprechen und weist auf zu beachtende Grundsätze hin (TierSchG). Diese Grundsätze schließen nach § 7a Abs. 2 TierSchG den aktuellen Stand der wissenschaftlichen Erkenntnis ein, die Erreichbarkeit des verfolgten Zweckes durch keine anderen Methoden oder Verfahren, die Außerachtlassung von Gründen der Arbeits-, Zeit-, oder Kostenersparnis für die Unerlässlichkeit und die Verwendung der am wenigsten leidensfähigen Tiere (TierSchG).

In der TierSchVersV ist festgelegt, welche Tiere für Tierversuche verwendet werden dürfen. Die TierSchVersV beinhaltet unter anderem auch Anforderungen zur Haltung von Versuchstieren, sowie die Durchführung und Genehmigung von Tierversuchen (TierSchVersV). In Art. 19 Abs. 1 TierSchVersV steht geschrieben, dass für einen Tierversuch nur Wirbeltiere und Kopffüßer verwendet werden dürfen, die zu diesem Zweck gezüchtet wurden (TierSchVersV). Die gesetzlichen Bestimmungen des TierSchG und der TierSchVersV hinsichtlich Tierversuchen gelten gemäß § 14 TierSchVersV zusätzlich für Tiere in einem frühen Entwicklungsstadium, wie Larven von Wirbeltieren, sobald sie selbständig Nahrung

aufnehmen können und Föten von Säugetieren ab dem letzten Drittel der Embryonalentwicklung (TierSchVersV). Dadurch verbietet der Gesetzgeber, dass widerrechtlich gefangene, wildlebende oder geschützte Tiere in einem Tierversuch eingesetzt werden dürfen. Für jedes Tier muss die legale Herkunft und der Verbleib dokumentiert werden. Die Genehmigung einer Ausnahme kann nur durch die zuständige Behörde erfolgen, soweit sie mit dem Schutz der Tiere vereinbar und wissenschaftlich begründet ist. Diese Ausnahmegenehmigungen werden in der Regel zur Beobachtung von Wildtieren in der natürlichen Umgebung zum Erkenntnisgewinn im Artenschutz erteilt. Art. 19 Abs. 1 TierSchVersV „[...] gilt nicht für die Verwendung von Pferden, Rindern, Schweinen, Schafen, Ziegen, Hühnern, Tauben, Puten, Enten, Gänsen oder Fischen, ausgenommen Zebrabärblinge [...]“ (TierSchVersV). Zusätzlich besteht bei Hunden, Katzen und Primaten nach § 9 TierSchVersV die Pflicht, diese dauerhaft beispielsweise mittels Chip oder Tätowierung so zu kennzeichnen, dass jederzeit eine eindeutige Identifikation möglich ist. Darüber hinaus muss gemäß § 7 und § 8 TierSchVersV für jedes einzelne Tier dieser Spezies eine genaue Dokumentation vergleichbar mit einem Lebenslauf geführt werden, die das Tier sein gan-

zes Leben begleitet. Tierversuche an großen Menschenaffen, wie Schimpansen oder Orang-Utans, werden seit 1991 in Deutschland nicht mehr durchgeführt. Wohingegen Tierversuche mit Affen (Makaken, Paviane, ...), auch als nicht menschliche Primaten bezeichnet, nach § 23 TierSchVersV mittels Ausnahmeerteilung durch die zuständige Behörde möglich sind (TierSchVersV).

Grundsätzlich sind alle Tierversuche an Wirbeltieren und Kopffüßern genehmigungspflichtig. Die Bearbeitungsfristen variieren, je nachdem, ob es sich um eine Genehmigung nach § 32 TierSchVersV, oder um ein vereinfachtes Genehmigungsverfahren nach § 36 TierSchVersV handelt (TierSchVersV). Bei jedem Tierversuchsantrag muss eine Darlegung des vernünftigen Grundes erfolgen. Andernfalls wird der Antrag zur Durchführung abgelehnt. Es muss beispielsweise dargestellt werden, dass die Fragestellung nicht ohne Tierversuch, also auch durch keine Alternativmethode beantwortet werden kann. Der Begriff Alternativmethoden wird oftmals als Sammelbegriff für Ersatz- und Ergänzungsmethoden verwendet mit dem Ziel, die Anzahl der Tiere zu reduzieren. Ersatzmethode meint dabei tierversuchsfreie Me-

thoden, es können aber auch weniger belastende Tierversuche gemeint sein. Ergänzungsmethoden impliziert im Sinne der 3R, welche nachfolgend genauer erläutert werden, Verbesserungen (*Refinement*) und Ersatz (*Reduction*) von Tierversuchen. Es gibt spezielle Datenbanken, in denen Alternativmethoden hinterlegt sind (BfR; Europäische Kommission). Ist der Tierversuch jedoch unerlässlich, so ist gemäß § 7a Abs. 2 Nr. 3 TierSchG zu prüfen, ob „zu erwartende[n] Schmerzen, Leiden oder Schäden der Tiere im Hinblick auf den Versuchszweck ethisch vertretbar sind“ (TierSchG). Wie unter II.4.4 Ethik bei Tierversuchen näher beschrieben, stellt die Ethik ein wichtiges Instrument des Entscheidungsfindungsprozesses dar. Die Ermittlung der ethischen Vertretbarkeit findet unter Abwägung der Güter statt (Wolf 2012).

In Summe ist es nicht möglich eine Allgemeinaussage über die Belastung von Tieren im Tierversuch zu treffen, da darunter eine Vielzahl von Verwendungen fällt.

Um den Schweregrad von Versuchstiermodellen einschätzen und Versuche mit einer geringeren Belastung für das Tier vorziehen zu können, ist eine Belastungseinschätzung anhand aussagekräftiger tier- und versuchsspezifischer Parameter notwendig (Lidster et al.

2016; Nationale Behörden für die Durchführung der Richtlinie 2010/63/EU; Wolfensohn und Lloyd 2015).

Es gibt eine gesetzliche Vorgabe zur Einteilung der Schweregrade. Diese muss für jeden Tierversuch erhoben werden. Es stehen zahlreiche Veröffentlichungen und Empfehlungen zur Verfügung und es gibt die Möglichkeit an interaktiven Trainings zur Einstufung der Belastung teilzunehmen (BfR 2015a, 2015b; FSVO 2022; Nationale Behörden für die Durchführung der Richtlinie 2010/63/EU; Norecopa; Smith et al. 2018; Zintzsch et al. 2017).

In der RL 2010/63/EU Art. 15 Abs. 1 wird eine Einteilung der Belastung der Versuchstiere im Tierversuch in vier Schweregrade gefordert. Diese sind in Anhang VIII der RL 2010/63/EU „Klassifizierung des Schweregrads der Verfahren“ näher begrenzt und wurden mit Inkrafttreten des neuen TierSchG 2013 festgelegt (RL 2010/63/EU; TierSchG). Die Einstufungen der Schweregrade lauten „keine Wiederherstellung der Lebensfunktion“, wenn sich beispielsweise das Versuchstier während des kompletten Tierversuchs unter Vollnarkose befand und nicht mehr aus dem Tierversuch erwacht, „gering“, beispielsweise bei Anwendung nicht-invasiver bildgebender Ver-

fahren, wie CT oder MRT in Sedierung oder Narkose, wenn keine „[...] wesentliche Beeinträchtigung des Wohlergehens oder Allgemeinzustands [...]“ und nur „[...] kurzzeitig, geringe Schmerzen, Leiden oder Ängste [...]“ zu erwarten sind. Vom Belastungsgrad „mittel“ wird gesprochen, wenn zum Beispiel in Vollnarkose unter angemessener Analgesie ein chirurgischer Eingriff erfolgt, der mit „[...] kurzzeitige[n], mittelstarke[n] [postoperativen] Schmerzen, mittelschwere[n] Leiden oder Ängsten oder langanhaltende[n] geringe[n] Schmerzen“, verbunden ist, als auch einer „mittelschwere[n] Beeinträchtigung des Wohlergehens oder des Allgemeinzustands [...]“. Als „schwere“ Belastung zählt beispielsweise eine Organtransplantation, bei der davon auszugehen ist, dass eine Abstoßung des Organs mit „starke[n] Schmerzen, schwere[n] Leiden oder Ängsten [...] [einer] schwere[n] Beeinträchtigung des Wohlergehens oder Allgemeinzustands [oder] langanhaltende[n] mittelstarke[n] Schmerzen, mittelschweren Leiden oder Ängste[n] [...]“ einhergeht (RL 2010/63/EU).

Unter Vorbehalt der Schutzklausel nach Art. 55 Abs. 3 RL 2010/63/EU darf ein Verfahren nicht durchgeführt werden, wenn es „starke Schmerzen, schwere Leiden

oder Ängste verursacht, die voraussichtlich lang anhalten und nicht gelindert werden können“ (RL 2010/63/EU).

In § 25 der TierSchVersV wird die Durchführung dieser besonders belastenden Tierversuche näher geregelt. So dürfen Tierversuche, die mit „[...] länger anhaltenden oder sich wiederholenden erheblichen Schmerzen oder Leiden [...]“ einhergehen nicht durchgeführt werden, außer, „[...] wenn die angestrebten Ergebnisse vermuten lassen, dass sie für wesentliche Bedürfnisse von Mensch oder Tier einschließlich der Lösung wissenschaftlicher Probleme von hervorragender Bedeutung sein werden“. Die Genehmigung erfolgt zunächst unter Vorbehalt und wird durch die EU-Kommission geprüft (TierSchVersV).

Das Arbeitspapier „Rahmen für die Bewertung des Schweregrades (Belastungsbeurteilung)“, das von einer Sachverständigen-Arbeitsgruppe (AG), initiiert durch die Europäische Kommission (EC), erarbeitet wurde, dient den EU-Mitgliedstaaten als Leitlinie, um den Bestimmungen der RL 2010/63/EU zum Schutz der für wissenschaftliche Zwecke verwendeten Tiere und Harmonisierung innerhalb der EU-Mitgliedstaaten nachzukommen

(Nationale Behörden für die Durchführung der Richtlinie 2010/63/EU).

Bereits bei der Beantragung des Tierversuches wird der Belastungsgrad prospektiv abgeschätzt und muss nach § 31 Abs.1 Nr. 2b der TierSchVersV wissenschaftlich begründet werden (TierSchVersV). Diese vorausschauende Belastungseinschätzung soll dazu beitragen, eine möglichst gering belastende Versuchsdurchführung zu fördern. Es wird hierbei immer von den möglichen belastendsten tier- und versuchsspezifischen Folgen ausgegangen, also auch einem Fehlschlagen der Umsetzung aller Verbesserungsmöglichkeiten. Die Einstufung des Schweregrades der Belastung sollte modellspezifisch und evidenzbasiert erfolgen (Lidster et al. 2016).

Tier- und versuchsspezifisch entsprechend angepasste Belastungsprotokolle (sogenannte *Score Sheets*) müssen dem Versuchsantrag genehmigungspflichtiger Tierversuche beiliegen und unterliegen der Kontrolle und Genehmigung der zuständigen Behörde bei Antragstellung. Während des Versuchs ermöglichen *Score Sheets* den klinischen Status der Tiere systematisch und objektiv zu beurteilen. Die *Score Sheets* beinhalten auch verpflichtende Handlungsanweisungen bei bestimmten Vor-

kommissionen und genau definierte Abbruchkriterien. Je nach Definition können die Tiere bei Erreichen des Abbruchkriteriums aus dem Versuch genommen, therapiert oder euthanasiert werden. Von Beginn bis Ende des Tierversuchs muss eine genaue Kontrolle der Tiere durch geschultes Personal erfolgen, wobei Befunde exakt dokumentiert werden müssen. Der Belastungskatalog ist kein Ersatz für die ethische Abwägung. Gemäß dem Arbeitspapier „Rahmen für die Bewertung des Schweregrades (Belastungsbeurteilung)“ sollen geeignete Indikatoren gewählt werden, die das Wohlergehen des Tieres einfach und zuverlässig erkennen. Zudem sollen sie ein guter Maßstab für das Wohlergehen der Tiere sein, der nicht nur für die wissenschaftliche Studie, sondern auch für die Tierart bzw. den Stamm von Bedeutung ist. Eine praktikable Umsetzung, die Tiere nicht unverhältnismäßig stört und brauchbar ist für eine einheitliche Messung, Auswertung und Analyse, ist empfohlen (Nationale Behörden für die Durchführung der Richtlinie 2010/63/EU).

Die tatsächliche Belastung nach Versuchsdurchführung muss jährlich im Rahmen der Versuchstiermeldung an die zuständige Behörde gemeldet werden, die vom Bun-

desinstitut für Risikobewertung (BfR) veröffentlicht wird. Bei schwer belastenden Versuchen ist zusätzlich eine retrospektive Belastungsbewertung durchzuführen. So können belastende Versuchsmodelle erkannt und hinsichtlich des 3R Prinzips intensiv überarbeitet werden.

Im Jahr 2020 wurden vom Deutschen Zentrum zum Schutz von Versuchstieren (Bf3R) unter dem BfR in der jährlichen Versuchstierstatistik insgesamt 2 533 664 Millionen Versuchstiere erfasst. 1 899 880 Millionen Wirbeltiere und Kopffüßer wurden nach § 7 Abs. 2 TierSchG für wissenschaftliche Zwecke in einem Tierversuch verwendet und 633 784 zu wissenschaftlichen Zwecken nach § 4 Abs. 3 TierSchG getötet, um ihre Organe oder Gewebe zu verwenden, was laut Gesetz nicht als Tierversuch definiert ist. Um diese Zahlen in Relation zu setzen, soll auf die im Jahr 2019 ungefähr 760 Millionen geschlachteten Geflügel, Schweine, Rinder, Schafe und Ziegen in Deutschland hingewiesen werden (Bundesinformationszentrum Landwirtschaft und Statistisches Bundesamt). Dies stellt jedoch keineswegs eine Rechtfertigung dar.

Die Einstufung der Schweregrade nach § 7 Abs. 2 TierSchG ist wie folgt: Auf „keine Wiederherstellung der

Lebensfunktion“ entfielen 6 % der Versuchstiere, auf „höchstens gering belastend“ 67 %, auf „mittel belastend“ 24 % und „schwer belastend“ 4 % (Bundesinstitut für Risikobewertung).

Nach § 7 Abs. 2 TierSchG entfällt der größte Anteil der Tiere dem Versuchszweck der Grundlagenforschung mit 58 % und auf die translationale und angewandte Forschung mit 13 %. Der überwiegende Anteil mit insgesamt 71 % wird somit der medizinischen Forschung zugeschrieben (Bundesinstitut für Risikobewertung). Die Grundlagenforschung sowie die translationale und angewandte Forschung sind eng miteinander verwoben. Ziel ist es Erkenntnisse über biologische Zusammenhänge zu erlangen, um damit eine Grundlage für diagnostische und therapeutische Maßnahmen zu schaffen (DFG-Senatskommission 2016). Auf regulatorische Zwecke und Routineproduktionen, also gesetzliche vorgeschriebene Versuche, die dem Verbraucherschutz dienen, verteilen sich im Jahr 2020 19 % (Bundesinstitut für Risikobewertung). Diese toxikologischen Prüfungen, Sicherheitsprüfungen oder Qualitätskontrollen sind durch das Arzneimittel-, Chemikalien- oder Lebensmittelhygienerecht vorgeschrieben und werden für die Zulassung

von Stoffen, wie Medikamenten, vorausgesetzt (DFG-Senatskommission 2016). Sonstige Zwecke, wie die Erhaltung von Kolonien und der Art, sowie der Schutz der Umwelt oder Hochschulausbildung zum Erwerb der beruflichen Fähigkeiten machen insgesamt 10 % aus (Bundesinstitut für Risikobewertung).

Bereits 1959 haben W. Russell und R. Burch das sogenannte 3R Konzept in ihrem Buch *The Principles of Humane Experimental Techniques* formuliert, welches in der RL 2010/63/EU verankert und sinngemäß im TierSchG § 7 Abs.1 Nr. 1 aufgenommen ist. Das Prinzip fordert eine kritische Hinterfragung jedes Tierversuchs. Die 3R, die bei der Planung und Durchführung von Tierversuchen Anwendung finden, stehen für *Replacement* (engl. für Ersatz), *Reduction* (engl. für Reduzierung) und *Refinement* (engl. für Verbesserung) (Russell und Burch 1959). Mit *Replacement* ist gemeint, dass bei jeder wissenschaftlichen Fragestellung ausführlich geprüft werden muss, ob eine aussagekräftige alternative Methode zu einem Tierversuch möglich ist oder dieser gänzlich zu vermeiden ist und stattdessen In-vitro- oder In-silico-Versuche stattfinden können. *Reduction* bedeutet das Ziel, dass die Zahl der Versuchstiere auf so wenige wie

möglich reduziert wird. Hierzu können Verbesserungen in der Methodik, also der Auswahl eines geeigneten Tierversuchmodells, automatisierte Auswertungsmethoden zur Maximierung der Datenerhebung, die zusätzliche Versuche überflüssig macht, als auch die statistische Berechnung der unbedingt notwendigen Versuchstieranzahl ihren Beitrag leisten. Negative Versuchsergebnisse sind oftmals nur schwer zu veröffentlichen oder werden gar nicht veröffentlicht (Lidster et al. 2016). Dies kann dazu führen, dass Versuche mehrfach durchgeführt werden, was dem Prinzip der *Reduction* widerspricht. Unter dem Begriff *Refinement* werden Optimierungsmaßnahmen zur bestmöglichen Belastungsminimierung im Bereich der Tierhaltungsbedingungen, als auch der Tierversuchsmethoden verstanden. Aber auch die Erfassung und Minimierung nicht erwünschter Vorkommnisse werden zum *Refinement* gezählt (Golledge und Jirkof 2016). Essenziell für eine erfolgreiche Umsetzung von *Refinement*-Maßnahmen ist die rasche Identifikation von Schmerzen und Leiden (Hawkins et al. 2011). Dies gestaltet sich jedoch mitunter schwierig, da Versuchstiere, insbesondere Nager, im Gegensatz zu Menschen. Schmerzen und Leiden nicht direkt zeigen, sondern diese möglichst lange zu verbergen versuchen. Können

diese jedoch erkannt werden, ist eine Reaktion auf die auslösende Ursache möglich und der Versuchsablauf kann entweder vermieden oder abgeändert werden (Blakemore et al. 2012). Daher sind evidenzbasierte und möglichst genaue Belastungsschemata von absoluter Notwendigkeit. Mit der ethischen Rechtfertigung beschäftigen sich die 3R folglich nur minimal (Ferdowsian und Gluck 2015).

Bundesweit werden die Zielvorstellungen und Förderung des 3R Konzepts am Deutschen Zentrum zum Schutz von Versuchstieren (Bf3R) am Bundesinstitut für Risikobewertung (BfR) in Berlin koordiniert, indem sie beraten, aber auch *Refinement* und Alternativmethoden betreffende Fragestellungen bearbeiten (Bundesinstitut für Risikobewertung). Auch wissenschaftliche Verbände, wie die *European science foundation* (ESF) appellieren zur Anerkennung des 3R Prinzips und verdeutlichen dies in einem Positionspapier zur RL 2010/63/EU über den Schutz der für wissenschaftliche Zwecke verwendeten Tiere (ESF–EMRC 2011). Das *National Centre for the Replacement, Refinement, and Reduction of Animals in Research* (NC3Rs), eine unabhängige von der Regierung gegründete Wissenschaftsorganisation mit Sitz im

Vereinigten Königreich Großbritannien und Nordirland, hat sich verpflichtet die 3R in der wissenschaftlichen Forschung voranzutreiben, um so den Weg für eine bessere Wissenschaft zu ebnen (Burden et al. 2015; National Centre for the Replacement, Refinement, and Reduction of Animals in Research). Eine Reduktion der Belastung hat eine positive Auswirkung auf die Qualität der Studienergebnisse (Baumans 2004; Lilley et al. 2020). Ebenso verpflichtet sich die 2011 gegründete *Basel Declaration Society* in der Basler Deklaration mit ihren zahlreichen Mitgliedern der Wissenschaft die 3R und weitere ethische Prinzipien in allen Forschungsvorhaben, in denen Tiere involviert sind, umzusetzen und kontinuierlich weiterzuentwickeln (Animal Research Tomorrow; Basel Declaration Society). Die ARRIVE-Richtlinien (*Animal Research: Reporting of In-vivo Experiments*) wurden 2010 entwickelt. Sie bieten eine Empfehlung an standardisierten und detaillierten Informationen, die bei Veröffentlichung eines Tierversuchs angegeben werden sollten, um eine volle Wissenserschöpfung und Transparenz der Ergebnisse zu gewährleisten (ARRIVE; Du Percie Sert et al. 2020a). 2016 hat sich die Max-Planck-Gesellschaft zu einem weiteren „R“ in ihrer Grundsatzverpflichtung ausgesprochen. Es steht

für *Responsibility* (engl. für Verantwortung), um den Tierschutz zu verbessern (Max-Planck-Gesellschaft).

Das Prinzip der 3 bzw. 4-R ist maßgeblich im Umgang mit Versuchstieren und muss Einzug in den Alltag mit Versuchstieren erhalten. Gemäß Art. 20a GG muss der Mensch aus der Verantwortung gegenüber dem Tier alle Parameter, die Einfluss auf die Versuchstiere haben, kritisch identifizieren, validieren und verbessern (GG). Dies betrifft die Haltung der Versuchstiere ebenso wie die gesamte Methodik bei den Versuchen.

II.4.2 Tierversuche in der Geschichte

Um sich die Relevanz von Tierversuchen vor Augen zu führen, gilt es einen Blick in die Historie zu werfen. Zahlreiche Beispiele belegen den immensen Wissensgewinn in der medizinischen Forschung durch Tierversuche.

Die Entwicklung eines Antiserums gegen Diphtherie, worunter Ende des 19. Jahrhunderts fast jedes zweite Kind verstorben ist, stützte sich maßgeblich auf Untersuchungen an Meerschweinchen, aber auch Mäusen, Ratten und Kaninchen. Hierfür erhielt der Deutsche E. von Behring 1909 den Nobelpreis (Behring 1890; Hansson und Enke 2015; Marx 1914). Auch Impfstoffe gegen

Gelbfieber und Kinderlähmung sowie die Pathogenese von Typhus, Tuberkulose, Malaria und antiretrovirale Wirkstoffe gegen AIDS waren ausschlaggebend für den medizinischen Fortschritt und basierten auf zahlreichen Tierversuchen (Cegielski und McMurray 2004; DFG-Senatskommission 2016; Edens et al. 2015; Francis 1958; Leven et al. 2017; Monath 2008; Santos et al. 2001; Sturma und Heinrichs 2015; Szu et al. 1987; Veazey 2013). Bei der Entwicklung der Behandlung von Diabetes mellitus haben Tierversuche an Kaninchen, Schweinen, Kühen und Hunden geholfen, die Auswirkung des Hormons Insulin auf den Blutzuckerspiegel zu verstehen. Die kanadischen Wissenschaftler F. Banting und John J. R. Macleod wurden 1923 dafür mit dem Nobelpreis ausgezeichnet (Banting et al. 1922; DFG-Senatskommission 2016; Hegele und Maltman 2020). Im Bereich der Diagnostik bei der Entwicklung der Computertomographie (CT) wurden vor allem Schweine eingesetzt. Auch diese Errungenschaften wurden im Jahre 1979 mit dem Nobelpreis ausgezeichnet (DFG-Senatskommission 2016; Shampo und Kyle 1996). Beim Verständnis für die Interaktion zwischen Viren und deren Wirtszellen, wie dem am Gebärmutterhalskrebs beteiligten Papillomaviren und dessen Impfstoffentwicklung,

waren unter anderem Tierversuche an Mäusen, Pferden, Ziegen und Schafen essenziell. 2008 wurde der deutsche Wissenschaftler H. zur Hausen hierfür mit dem Medizin-Nobelpreis ausgezeichnet (Breitburd et al. 1995; DFG-Senatskommission 2016; Suzich et al. 1995; zur Hausen 2002). Cochlea-Implantate für Gehörlose stützen sich auf Modelle mit Kaninchen, Hühnern, Katzen, Schweinen und nicht-humanen Primaten (DFG-Senatskommission 2016; Kretzmer et al. 2004). Neben dem Bereich der Xenotransplantationen basieren insbesondere im Gebiet der Neurowissenschaften zahlreiche wissenschaftlich bedeutsame Entdeckungen auf Tierversuchsmodellen (Ekser et al. 2009; Rice und Barone 2000; Yang und Sykes 2007). Das Pandemiegeschehen verursacht durch das Coronavirus SARS-CoV-2 (engl. für *Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus Type 2*) verdeutlichte, dass Tiermodelle auch aktuell von hoher Relevanz sind, um Krankheitsmechanismen zu verstehen, als auch Impfstoffe sicher und effizient entwickeln zu können (Genzel et al. 2020). Insbesondere Untersuchungen am Hamster haben neben vielen anderen Tiermodellen zur Entdeckung des Zielproteins des Virus, dem sogenannten ACE2 (engl. für *Angiotensin Converting Enzyme 2*), beträchtlich beigetragen. Da innerhalb

kurzer Zeit viele Menschen geimpft werden wollten, war eine frühzeitige Erkennung von Nebenwirkungen bei Impfstoffkandidaten von großer Bedeutung (Chan et al. 2020; Cohen 2020). Auch konnten Hunde darauf trainiert werden COVID-19 erkrankte Menschen olfaktorisch zu identifizieren (Jendry et al. 2021).

Wichtig ist auch zu erwähnen, dass diese medizinischen Errungenschaften nicht nur bei Diagnose- und Behandlungsverfahren in der Human-, sondern auch in der Veterinärmedizin genutzt werden. Viele Erkrankungen, wie Diabetes mellitus, Arteriosklerose, spezielle Tumorformen oder Hämophilie können auch Tiere bekommen (Löscher 2014; Nelson et al. 2023). Auch konnten in der Veterinärmedizin durch Erkenntnisse aus Tierversuchen Impfstrategien gegen Leukose, Bovine Tuberkulose oder Staupe entwickelt werden, die tödlich sind (DFG-Senatskommission 2016; Tobler et al. 2021).

II.4.3 Ratte als Versuchstier

Laut letzter veröffentlichter Zahlen des Deutschen Zentrums zum Schutz von Versuchstieren (Bf3R) unter dem Bundesinstitut für Risikobewertung aus dem Jahr 2020 waren 78 % der insgesamt knapp 1 900 000 Millionen Wirbeltiere und Kopffüßler, die nach § 7 Abs. 2 Tier-

schutzgesetz (TierSchG) für wissenschaftliche Zwecke in einem Tierversuch eingesetzt wurden, Nagetiere (Mäuse, Kaninchen, Ratten). Ratten machten hierbei mit einer Gesamtzahl von 138 249 Tieren 7 % aus und stellen nach Mäusen und Fischen die am zweithäufigsten verwendete Versuchstierart dar (Bundesinstitut für Risikobewertung; Bundesinstitut für Risikobewertung 2021). Nagetiere, vor allem Mäuse und Ratten, zählen schon seit Jahren zu den am häufigsten verwendeten Versuchstierarten (Genzel et al. 2020; Nestler und Hyman 2010).

Die domestizierte Ratte stammt von der Wanderratte *Rattus norvegicus* ab. Ursprünglich beheimatet ist die Wanderratte in China, Sibirien und Ostasien. Eine Verbreitung über die ganze Welt mit Hilfe von Verkehrsmitteln erfolgte sehr rasch. Ab Mitte des 19. Jahrhunderts hat sie über Naturalienhändler oder über Privatzuchten von Schaustellern in Laboratorien Einzug gehalten. Vor über 200 Jahren zählten Albino-Ratten noch zu den am häufigsten verwendeten Versuchstieren in vielen Bereichen der biomedizinischen Forschung (Sengupta 2013; Weiß et al. 1996). Anfang des 20. Jahrhunderts wurden die ersten Laborratten gezielt für Versuchsmodelle im

Wistar Institut in Philadelphia, USA, gezüchtet (The Wistar Institute).

Die Wildnager und Labortiere unterscheiden sich durch anerkannte Merkmale. Laborratten besitzen im Vergleich zu ihren freilaufenden Wildformen kleinere Präputialdrüsen und Nebennieren. Sie kommen früher in die Geschlechtsreife und haben keinen saisonalen Fortpflanzungszyklus. Des Weiteren weisen sie eine bessere Fruchtbarkeit auf und zeigen eine kürzere Lebensdauer (Sengupta 2013).

Die Größe der Tiere sowie die verhältnismäßig schnelle Reproduktion und Zutraulichkeit stellen in zahlreichen Versuchsmodellen einen großen Vorteil dar (Barré-Sinoussi und Montagutelli 2015). Das Erbgut der Ratte ist, wie das der Maus, vollständig entschlüsselt und deckt sich zu 90 % mit dem des Menschen. Aktuell gibt es für alle menschlichen krankheitsauslösenden Gene auch ein analoges Gen bei der Ratte (Tierversuche verstehen).

Bis Ende der 1970er Jahre wurde sie sehr häufig als Standardversuchstier bei Nervenkampfstoffvergiftungen eingesetzt. Nachdem jedoch festgestellt wurde, dass

Meerschweinchen und nicht-menschliche Affen bei Versuchen im Gegensatz zur Ratte auf Behandlungen besser ansprechen, nahm ihre Verwendung ab (Rice 2016). Nichtsdestotrotz sind Studien mit Ratten im Bereich phosphororganischer Verbindungen noch immer weit verbreitet (Araujo Furtado et al. 2010; Bleecker et al. 1994; Bruun et al. 2019; Gage et al. 2021; Goncharov et al. 2019; Guignet et al. 2020; Higgins et al. 2018; Rojas et al. 2020; Satar et al. 2005; Yamanaka et al. 1996; Zhang et al. 2019). Auch in Studien über Ernährung, Stoffwechsel- und Herz-Kreislauf-Erkrankungen, Nervenregeneration, Wundheilung, Diabetes, und Krebs sowie Wirksamkeits- und Sicherheitsprüfungen von Medikamenten werden sie häufig eingesetzt (Tierversuche verstehen). Zudem sind genetische Modifikationen mittels CRISPR-Cas bei Ratten möglich (Li et al. 2013). Damit ein Tiermodell übertragbar ist, sollten die wichtigsten Aspekte der zu untersuchenden Fragestellung abgebildet werden können, wobei diese nicht zwingend mit der menschlichen Erkrankung deckungsgleich sein müssen (Barré-Sinoussi und Montagutelli 2015).

Wichtig ist, wie in jedem Versuchsmodell, bei dem eine geringe Streuung in den Versuchen und gleichmäßige

Basalwerte erwünscht sind, die Minimierung von Stress zu beachten. Die Stressempfindlichkeit konnte durch *Environmental Enrichment* bei Laborratten belegt werden (Ravenelle et al. 2014; Segovia et al. 2009). Es ist erwiesen, dass eine strukturierte Haltungsumgebung einen Einfluss auf verhaltens-, neurobiologische sowie stressphysiologische Merkmale der Ratte hat. Die Auswirkung einzelner Veränderungen bedarf bei der Ratte noch weiterer Validierung (Wagner und Kluge 2013). Bei Mäusen konnte bisher keine Veränderung der Varianz verschiedener Parameter durch derartige Verhaltensanreicherungen festgestellt werden (Augustsson et al. 2003; Lewejohann et al. 2006; van de Weerd et al. 2002; Wolfer et al. 2004). Nur unter Einbezug der speziesrelevanten Faktoren ist es möglich Ratten, aber auch jede andere Tierart, in wissenschaftlichen Bereichen zielführend einzusetzen (Busch et al. 2017).

Grundsätzlich ist bei Kleinsäugetieren zu berücksichtigen, dass sie als Beute- und Fluchttiere ihre Symptome bei Erkrankungen und Schmerzen lange nicht anzeigen, obwohl bei messbaren vegetativen Veränderungen bereits ein ausgeprägtes Schmerzempfinden besteht (Henke et al. 2012a; Henke et al. 2014). Ein Schmerzreiz wird

nach IASP (International Association for the Study of Pain – engl. für Internationale Gesellschaft zur Erforschung des Schmerzes) als unangenehme sensorische und emotionale Erfahrung definiert, die durch eine tatsächliche oder potenzielle Gewebeschädigung ausgelöst wurde oder in Zusammenhang mit einer derartigen Schädigung steht (Boyd et al. 2023). Eine adäquate analgetische Versorgung verhindert, dass es durch den Schmerz zu einer Aktivierung des sympathischen Nervensystems mit Katecholaminausschüttung kommt. Die bedingte Katecholaminausschüttung führt zu einer Erhöhung der Herzkontraktilität, Herzfrequenz und Vasokonstriktion peripherer Gefäße und folglich zu einer Kreislaufzentralisation. Die Sauerstoffversorgung in der Peripherie verschlechtert sich und es entwickelt sich eine Azidose. Es folgt ein manifestes dekompenziertes Schockgeschehen, was mit Bradykardie, Hypothermie und Hypotonie sowie einer disseminierten intravasalen Gerinnung einhergehen kann. (Henke et al. 2012a; Henke et al. 2014). Je nach Versuchsaufbau bedarf es im Rahmen der präventiven Analgesie bei chirurgischen oder schmerzhaften Eingriffen nicht nur der Berücksichtigung der intraoperativen, sondern auch der präemptiven und postoperativen Analgesie.

Die Wahl eines geeigneten Versuchsmodells ist schlussendlich auch von der Wirtschaftlichkeit und der Praktikabilität der Versuchsdurchführung sowie der Beantwortung der ethischen Vertretbarkeit abhängig (Lidster et al. 2016).

II.4.4 Ethik bei Tierversuchen

II.4.4.1 Ethische Positionen

Mensch-Tier-Beziehungen sind durch kulturelle, religiöse, gesellschaftliche und staatliche Einflüsse geprägt. Welche Eigenschaft ist ausschlaggebend für den moralischen Wert eines Lebewesens? Stehen Menschen an der Spitze der Moral? Nach welchen Maßstäben teilen wir die Gruppen der Tiere ein? Bei Tierversuchen steht das Interesse des Menschen dem des Tieres (oder sollte man besser nichtmenschlicher Tiere sagen) gegenüber. Es stellt sich die Frage, ob das Wohl des Tieres für einen Erkenntnisgewinn in der Forschung, die sich für Mensch, Tier oder Umwelt vorteilhaft auswirken könnte, beeinträchtigt werden darf. Der Ethik kommt bei der Abwägung eine bedeutende Rolle zu, da bei Handlungen gemäß moralischer Normen das Zufügen von Leid gerechtfertigt werden muss (Wolf 2012).

Die Bioethik (βίος: altgriechisch für Leben; ἠθική: altgriechisch für das sittliche (Verständnis); ἦθος: altgriechisch für Charakter, Sinnesart), die unter die angewandte Ethik fällt, setzt sich mit allem, was unter das Themenspektrum Leben fällt, auseinander. Die Bioethik wird auch als Synonym für die zunehmenden wissenschaftlichen und öffentlichen Auseinandersetzungen mit Fragen der angewandten Ethik verwendet (Düwell und Steigleder 2003). Die Tierethik zählt zur Teildisziplin der Bioethik und widmet sich Fragestellungen und Begründungen in Bezug auf einen ethisch angemessenen Umgang von Mensch und Tier (Sandkühler 2010; Sturma und Heinrichs 2015).

Es gibt unterschiedliche bioethische Positionen. Die grundsätzliche Unterscheidung bezieht sich auf die moralische Verantwortlichkeit. Liegt eine moralische Verantwortung vor, gibt es analytisch-philosophische oder nicht-philosophische Ansätze, wie Religionen und die Phänomenologie. Unter die analytisch-philosophischen Ansätze fallen mitunter der Anthropozentrismus, Pathozentrismus, Biozentrismus, Holismus, Utilitarismus, Tierrechte-Ansatz, Wohlbefinden-Ansatz und Fähigkeiten-Ansatz. Häufig werden im Sinne der Tierethik die bio-

ethischen Grundpositionen des Anthropozentrismus, Pathozentrismus, Biozentrismus und Holismus diskutiert, die anschließend genauer erläutert werden (Düwell und Steigleder 2003; Sandkühler 2010; Sturma und Heinrichs 2015).

In der anthropozentrischen (ἄνθρωπος: altgriechisch für Mensch; κέντρον: altgriechisch für Mittelpunkt) Ethik, mit Kant als Vertreter, wird der Mensch als das „Maß aller Dinge“ in den Mittelpunkt gestellt mit Vorrechten, aber auch Verpflichtungen. Er wird als moralisches Wesen angesehen und der Schutz der Tiere ergibt sich aus der Selbstachtung des Menschen. Diese verbietet ihm, grausam zu handeln, da die daraus resultierende Verrohung die Moral im Umgang mit Menschen beeinträchtigen würde. Folglich liegt es aber an ihm, wie mit Tieren umgegangen wird. Die Durchführung eines Tierversuchs ist dieser Ansicht nach also ethisch zu rechtfertigen (Kant 2014).

Das pathozentrische (πάθος: altgriechisch für Leid) Weltbild postuliert, dass alle leidens- und empfindungsfähigen Lebewesen hinsichtlich der Moral Berücksichtigung finden müssen und als moralische Wesen zählen, woraus sich die Pflicht zu deren Schutz ergibt. Leidens-

fähigkeit bezieht sich dabei darauf, ob Lebewesen ein ZNS bzw. Cephalopoden verschmolzene Cerebralganglien besitzen (Westheide und Rieger 2013). Jeremy Bentham war einer der ersten Vertreter des Pathozentrismus und Begründer des Utilitarismus. Er schrieb allen leidensfähigen Wesen einen Eigenwert zu unabhängig davon, ob sie reden oder denken können (Warnock 2008). Der Vertreter Arthur Schopenhauer war der Auffassung, dass Tiere die entsprechenden Wesensmerkmale wie Menschen tragen und dementsprechend gleichermaßen empfinden und leiden. Aus dem entscheidenden Kriterium der Leidensfähigkeit resultiert die Verpflichtung des Menschen gegenüber dem Tier, Leiden zu vermeiden. Empfindungsfähige Tiere sind aber dem Interesse, der Gesundheit, dem Erkenntnisgewinn und den Genussgütern des Menschen untergeordnet. Dem Leiden der Tiere wird somit eine geringere Gewichtung zugesprochen. Gemäß dieser Sichtweise sind Tierversuche nach ethischer Abwägung erlaubt. Peter Singer und Tom Regan zählen zu den Vertretern des modernen Pathozentrismus und weisen eine utilitaristische Grundposition auf (Regan und Singer 1989; Regan 2011). Ihre Bücher *Animal Liberation* (Singer 2009), *Practical Ethics* (Singer 1993) und *The Case for Animal*

Rights (Regan 2004) sind wegweisend für nachfolgende tierethische Auseinandersetzungen (Grimm 2012). Der Utilitarismus verfolgt das Ziel, dass moralisches Handeln den Nutzen für alle inklusive nicht-menschlicher Tiere maximiert. Die Konsequenzen einer Handlung sind von Bedeutung und die Empfindungs- und Leidensfähigkeit ist die Voraussetzung für Lust und Interesse (Höffe 2013).

Ein radikaler Vertreter des Biozentrismus (βίος: altgriechisch für Leben) war Albert Schweizer. In dieser ethischen Anschauung wird allen lebendigen Wesen, aber auch „niederer“ Tieren und Pflanzen ein moralischer Eigenwert zugeschrieben. Eine Differenzierung der verschiedenen Arten existiert nicht (Wolf 2012). Folglich sind Tierversuche abzulehnen.

Im holistischen (ὅλος: altgriechisch für ganz) Ethikmodell, das auf Jan Smuts zurückgeht, wird das „Sein“ an sich, als moralisch wesentliches Kriterium angesehen. So spielen nicht nur Lebewesen, sondern auch die unbelebte Natur eine entscheidende Rolle für ethisches Handeln. Alle Systeme, ob natürlich oder nicht, müssen als Ganzes angesehen werden. Auch gemäß dieser Auffassung sind Tierversuche nicht vertretbar (Dancy 2004).

Die nationale Rechtslage zum Umgang mit Tieren ist geprägt vom gemäßigten Pathozentrismus. Bei jedem Tierversuch muss geklärt werden, ob die Höhe des Erkenntnisgewinns das Ausmaß der Belastung rechtfertigen kann. Es ist eine Abwägung der ethischen Vertretbarkeit von Tierversuchen durchzuführen gemäß §7a Abs. 2 Nr. 3 TierSchG bezüglich der „Schmerzen, Leiden und Schäden“ nach §1 TierSchG, die auf das Tier einwirken könnten (TierSchG). Laut dem TierSchG hat der Mensch einen grundlegenden moralischen Anspruch, über Tiere zu verfügen und zu seinen eigenen Zwecken zu nutzen, sofern ein vernünftiger Grund vorliegt. So hat der Mensch eine moralische Sonderstellung gegenüber dem Tier, indem er die Entscheidungsgewalt über dessen Leben und Wohlbefinden hat, aber nach den gesetzlichen Vorschriften (siehe II.4.1) keine absolute Verfügungsgewalt. Der Schutz der Tiere gründet dieser ethischen Auffassung nach auf der Leidensfähigkeit. Dies wird auch in § 7a Abs. 2 Nr. 5 TierSchG eindeutig beschrieben, indem diejenigen Versuchstiere zu verwenden sind, die aufgrund ihrer Ausprägung der artspezifischen Fähigkeit geringer leiden, es sei denn, diese sind für den Zweck ungeeignet (TierSchG). Die Sichtweise die Leidensfähigkeit an das Vorhandensein eines ZNS

bzw. verschmolzener Cerebralganglien bei Cephalopoden zu knüpfen, findet sich auch im TierSchG § 8 Abs. 1 wieder, wo eine Genehmigung von Tierversuchen bei Wirbeltieren und Kopffüßern vorgeschrieben wird (TierSchG). Die Intensität des Leidens einschließlich der Schmerzen, Schäden und Ängste durch den Menschen korreliert mit dem Ausmaß des Schutzes, den das Tier bedarf. Diese Eigenschaft ist maßgebend. Folglich existiert daraus eine Abstufung des moralischen Status zwischen den Arten. Der Mensch steht nach pathozentrischer Anschauung über empfindungsfähigen Tieren, die wiederum über nicht empfindungsfähigen Tieren oder Pflanzen angesiedelt sind (TierSchG).

II.4.4.2 Ethische Vertretbarkeit

Für ein Urteil zur ethischen Vertretbarkeit von Tierversuchen müssen verschiedene ethische Fragestellungen beantwortet werden. Hierzu zählen unter anderem der Wert von Tier und Mensch, die Bewertung von Interessen und Bedürfnissen von Tieren und Menschen sowie die Vertretbarkeit von Schmerzen, Leiden und Schäden. Zu diskutieren ist ebenfalls, ob es Abstufungen hinsichtlich des Entwicklungsgrades gibt und der höhere

Schutzstatus von Wirbeltieren gegenüber Wirbellosen zu vertreten ist (Tierversuche verstehen).

Tierversuche in der wissenschaftlichen Forschung sind ein dauerhaftes Reizthema in der gesellschaftlichen und politischen Diskussion. Öffentlich wahrgenommene Reaktionen gegenüber Tierversuchen sind in der Regel negativ konnotiert, wohingegen beispielsweise die Schadnagerbekämpfung als gemeinschaftlich akzeptiert gilt. Mögliche Ursachen könnten der abstrakte, lebensferne und unsichere Nutzen von Tierversuchen sein. Auch wird unter anderem die Aussagekraft, die Reproduzierbarkeit und die Übertragbarkeit in Frage gestellt.

Ethische Betrachtungen decken grundsätzlich die ganze Bandbreite von einer strikten Ablehnung von Tierversuchen, über eine Akzeptanz durch Interesse an neuen Erkenntnissen, bis zu einem uneingeschränkten Bejahen ab (Gross und Tolba 2015). Das *Nuffield Council* diskutiert insgesamt vier Positionen: den *Abolitionist View* (Abschaffung von Tierversuchen), den *On Balance Justification View* (Abwägung von Belastung und Nutzen für Mensch, Tier und Umwelt), den *Moral Dilemma View* (Moralisches Dilemma zwischen den in Kauf genommenen Schmerzen, Leiden und Schäden sowie dem medi-

zinischen Fortschritt) und *Anything Goes* (Alles ist möglich, sofern der Mensch profitiert) (Nuffield Council on Bioethics 2005). Zudem wirft das *Nuffield Council* die Frage auf, ob es eine *Moral Obligation* (moralische Verpflichtung) für den Tierversuch gibt, wenn der mögliche lebensweltliche Nutzen hoch genug ist und dementsprechend die Unterlassung des Versuchs selbst wieder ethisch fraglich ist.

Aktuell bedeutet ein Verzicht von Tierversuchen in der Grundlagenforschung nach Prof. Dr. Vollmar, Vorsitzende der ständigen Senatskommission für tierexperimentelle Forschung, langfristig eine inadäquate Patientenversorgung, weil ein wissenschaftlicher Fortschritt nicht mehr gewährleistet ist (DFG-Magazin 2019). Tierversuche erweisen sich derzeit als wichtiges Standbein im wissenschaftlichen Wissensgewinn und bilden die Grundlage für die Entwicklung neuer Medikamente und Medizinalprodukte zum Wohl für Mensch und Tier (DFG-Senatskommission 2016).

Das Solidaritätsprinzip und der Tierschutz stehen folglich in einem Spannungsverhältnis. Das Solidaritätsprinzip, das eine vieler Grundlagen für das menschliche Zusammenleben ist, besagt, dass die Pflicht besteht,

Schwache, Kranke und Hilfsbedürftige bestmöglich zu unterstützen. Wenn der Mensch aber Tierversuche durchführt, befindet er sich als moralisches Wesen in einer Kontroverse. Einerseits besagt die positive Pflicht, dass eigenes Wissen und eigene Befähigungen zur Minderung menschlichen und tierischen Leids eingesetzt werden sollen. Andererseits fordert die andere negative Pflicht, dass man anderen Lebewesen kein vermeidbares Leid zufügen darf. Hier stellt sich also die Frage, ob und wie sich ethische und wissenschaftliche Erfordernisse in Einklang bringen lassen. Das Grundproblem ist, dass zwei unterschiedliche Größen miteinander verglichen werden, die nicht zu vergleichen sind (Grimm 2015). Dieses ethische Dilemma zeigt, dass sich kein klares „richtig oder falsch“ findet (DFG-Senatskommission 2016). Es kann bei aktueller Rechtsgrundlage erst gelöst werden, sobald Tierversuche durch Alternativmethoden ersetzt werden können. Stehen aktuell keine tierversuchsfreien Alternativen zur Verfügung, wird der Einsatz von Tieren zu Versuchszwecken erwogen. Nach §12 der RL 2010/63/EU muss der intrinsische Wert eines jeden Tieres respektiert werden und es bedarf einer Behandlung als fühlendes Wesen (RL 2010/63/EU).

Versuchstiere sind unvermeidbaren Schmerzen, Leiden und Schäden ausgesetzt. Um diese so gering wie möglich zu halten, sind hohe Standards und ein hohes Engagement aller in den Versuchstiereinrichtungen beteiligten Personen unerlässlich. In diesem Spannungsfeld zwischen Tierschutz und Tierversuchen in der biomedizinischen Forschung muss die Genehmigung von Tierversuchen einer ethischen Prüfung unterzogen werden, in der die Belastung der Tiere gegen den wissenschaftlichen Erkenntnisgewinn aufgewogen und konkret anhand der Fragestellung überprüft wird, ob Alternativmethoden gegenüber Tierversuchen einsetzbar sind und wo die Grenzen liegen (TierSchG).

Grundsätzlich ist es wichtig, Transparenz bei Tierversuchen zu schaffen. Dies betrifft eine offene Informationspolitik und Kommunikation über Tierversuche aller Wissenschaftsorganisationen. So klärt die durch einen Verbund von Wissenschaftlern getragene Informationsplattform „Tierversuche verstehen“, die auch gemeinsam mit der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG) die Initiative Transparente Tierversuche im Juli 2021 gestartet hat, zur Aufklärung bei (DFG 2021). Auch Forschungseinrichtungen selbst gehen dazu über, Informationen auf

ihren Webseiten zu veröffentlichen und der Bevölkerung, wie zu einem Tag der offenen Tür, Zutritt zu gewähren und Raum für Diskussion zu bieten. Dadurch wird eine Basis geschaffen, um Diskurse zu führen.

II.4.4.3 Notwendigkeit von Tierversuchen

Die biomedizinische Forschung, aber auch zahlreiche andere Forschungsgebiete, wie die Technik, teilen das gemeinsame Ziel, Zusammenhänge zu verstehen und durch Wissen die Lebensbedingungen von Tier und Mensch zu verbessern. Im Vordergrund steht in der Biomedizin Erkenntniszuwachs des Grundlagenwissens und der Prophylaxe sowie Therapie von Krankheiten. Die intensive Forschung über die letzten Jahrzehnte hinweg führte auch zur Entwicklung und Optimierung zahlreicher alternativer Methoden zu Tierversuchen, wie In-vivo-(z. B. Mikrodosierung), In-vitro-(z. B. permanente Zellkultur, 3-D-Zellkultur – Organoid, Multi-Organchips) oder In-silico-Verfahren, sogenannter Computersimulationen. Sie ermöglichen eine Nachahmung biologischer Zusammenhänge und Abläufe (Doke und Dhawale 2015; Thein et al. 2018). Gemäß § 7a Abs. 2 TierSchG dürfen Tierversuche nur durchgeführt werden, wenn keine Alternativmethoden für den geplanten Versuch zur Verfü-

gung stehen (TierSchG). Diese Methoden sind von unverzichtbarer Bedeutung für die Reduktion von Tierversuchen, wenn sie sinnvoll eingesetzt werden. Neben ethischen Gründen sind Alternativmethoden auch hinsichtlich der Effizienz vorzuziehen, da die Durchführung von Tierversuchen immens kostspielig und zeitaufwendig ist (Doke und Dhawale 2015).

Um die Forschung an Alternativmethoden weiterhin voranzutreiben, wird sie länder- und bundesweit mittels verschiedener Programme gefördert, beispielsweise durch das Bundesministerium für Ernährung und Landwirtschaft (BMEL), das Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF) und die DFG. Die Zentralstelle zur Erfassung und Beurteilung von Ersatz- und Ergänzungsmethoden (ZEBET), die 1989 durch das Bundesinstitut für Risikobewertung (BfR) gegründet wurde, bietet unter anderem eine Beratung von Behörden zu Alternativmethoden an, stellt Informationen diesbezüglich bereit und ist auch an der Entwicklung neuer Alternativmethoden beteiligt (Deutsches Zentrum zum Schutz von Versuchstieren - Bf3R; Liebsch et al. 2011). Das Europäische Zentrum zur Validierung alternativer Methoden (EURL-ECVAM) übernimmt diese Rolle auf Europaebene.

ne. Auch der Katalog *EURL ECVAM SEARCH GUIDE – Good search practice on animal alternatives* enthält zahlreiche Informationen über Alternativmethoden. Zudem sind in den Richtlinien der Organisation für wirtschaftliche Zusammenarbeit und Entwicklung (OECD) sowie der EU-Richtlinie EG 761/2009 alle regulatorisch anerkannten alternativen Methoden gelistet.

Jedoch sind Alternativmethoden bisher nicht in der Lage, alle Tierversuche vollständig zu ersetzen. Häufig werden nur Teilbereiche der hochkomplexen Vorgänge im menschlichen Organismus nachgebildet. Der menschliche Körper besteht aus über 300 unterschiedlich differenzierten Zelltypen mit insgesamt etwa 100 Billionen Zellen (Kühnel 2003). Das Zusammenwirken von Geweben und Organen als hochkomplexen Gesamtorganismus nachzubilden, ist aktuell mittels isolierter, künstlicher Methoden nicht vollständig umsetzbar (Graw 2015; Kim et al. 2020). Die biomedizinische Forschung wird daher in absehbarer Zeit nicht gänzlich auf Tierversuche verzichten können (DFG-Senatskommission 2016; Hendriksen 2006).

II.4.4.4 Übertragbarkeit von Tierversuchen

Zur Übertragbarkeit der Versuchsergebnisse muss zwischen der Forschung für das Tier und der Forschung für den Menschen unterschieden werden. In der tiermedizinischen Forschung findet die Durchführung direkt in der Tierart statt, in der beispielsweise die neue Therapie Anwendung finden soll. So ist eine vollständige Übertragbarkeit gegeben und es konnten bereits zahlreiche Therapien für Klein- und Nutztiere entwickelt werden (Abendschön et al. 2020; Amirtahmaseb 2015; Nolff et al. 2018; Thein et al. 2018). Auch Studien zur Verbesserung der Haltungsbedingungen von Tieren, erfolgen direkt mit der betreffenden Tierart (Bernhart 2017; Hollandt et al. 2021). Bei der Betrachtung der Übertragbarkeit von Tieren auf den Menschen muss bedacht werden, dass die Funktionen von Zellen und Organen von beispielsweise der Ratte und dem Menschen zwar eine Ähnlichkeit aufweisen, gleichwohl durch die Evolution nicht unbedingt vollständig übereinstimmen (Graw 2015). So haben alle lebenden Organismen den gleichen Ursprung, wie man mittels der Molekulargenetik beweisen kann. Biosynthesewege oder Strukturelemente der Zelle sind von *Escherichia coli* bis zum Menschen vergleichbar bis sehr ähnlich. Aber bei höher entwickelten Wesen

nimmt die Komplexität von spezialisierten Zelltypen und Organen fortschreitend zu (Storch et al. 2013). Folglich ist nicht davon auszugehen, dass beispielsweise im Rahmen der Wirkstoffentwicklung ein Wirkungserfolg in der Ratte zwangsläufig auf den Menschen übertragbar ist. Jedoch sind die evolutionären Entwicklungen auf Zellebene, die zur Entstehung und einem Therapieerfolg einer Krankheit führen, stabil geblieben. Das heißt, dass zelluläre Prozesse, die einen Effekt in einer bestimmten Tierart zeigen, dies auch mit hoher Wahrscheinlichkeit in anderen Spezies, wie zum Beispiel dem Menschen, tun (Thein et al. 2018). Laut der DFG lassen sich durch Tierversuche den Menschen betreffende erwünschte sowie etwa 70 % der unerwünschten Wirkungen vorhersagen. Die Acetylsalicylsäure wirkt beispielsweise bei Ratte und Mensch schmerzlindernd, jedoch kann es bei beiden zu einer gesteigerten Blutungsneigung nach Einnahme kommen (DFG-Senatskommission 2016). Jedoch können Tiere nicht alle Krankheiten des Menschen abbilden (DFG-Senatskommission 2016; Hendriksen 2006).

Generell ist zu beachten, dass die Ergebnisse immer in Abhängigkeit von der Tierart, Tierstamm, Geschlecht und Alter zu sehen sind.

II.5 Anästhesie

In der vorliegenden Studie wurde sowohl eine Inhalationsnarkose mit Isofluran, als auch eine Injektionsnarkose mit Medetomidin-Midazolam-Fentanyl-(MMF) durchgeführt. Nachfolgend soll eine Übersicht über die verschiedenen Anästhesiemethoden und deren Auswirkungen unter spezieller Berücksichtigung der Versuchstierart Ratte gegeben werden. Dies ist von Relevanz, da die gewählte Anästhesiemethode einen Einfluss auf den Tierversuch hat.

II.5.1 Definition

Die Anästhesie bzw. Narkose lässt sich in die Allgemein- oder Vollanästhesie sowie die Lokal- oder Regionalanästhesie untergliedern. Unter Allgemeinanästhesie wird der reversible Zustand der Bewusstlosigkeit (Hypnose), Schmerzlinderung (Analgesie) und Skelettmuskelentspannung (Relaxation, Immobilisation) induziert durch Anästhetika, verstanden. Sie unterteilt sich wiederum in die Injektions- und Inhalationsanästhesie und wird durch die systemische Applikation von Injektions- und Inhalationsanästhetika hervorgerufen. Die Lokal- und Regionalanästhesie hingegen umfasst die Ausschaltung des Schmerzempfindens bestimmter Körperregionen, indem

nach Applikation oder Injektion von Lokalanästhetika Nervenleitungen reversibel blockiert werden. Zusätzlich zum Ausschalten der sensiblen Fasern werden auch motorische Fasern blockiert und es kommt zur Relaxation der Muskulatur. Bei dieser Form der Anästhesie können sich die Patienten auch im Wachzustand befinden (Erhardt 2012).

Die Aufgaben der Anästhesie in der Tiermedizin umfassen neben der Narkose, die Intensiv- und Notfallmedizin sowie die perioperative und chronische Schmerztherapie. Außerdem werden aus Sichtweise der Anästhesie tierschutzgerechte Schlacht- und Euthanasiemethoden entwickelt und durchgeführt (Erhardt 2012; Shibutani 2000).

II.5.2 Anästhesiestadien und Überprüfung der Anästhesietiefe bei der Ratte

Gemäß der Definition Allgemeinanästhesie müssen die Kriterien Hypnose, Analgesie und Relaxation sowie die Verhinderung autonomer Reflexe erfüllt werden, um eine ausreichende Anästhesietiefe zu erreichen. Die Reaktion auf einen Schmerzreiz stellt ein wichtiges Kriterium für die Erfassung der Narkosetiefe dar, da das Verhindern

von Schmerzen ein bedeutendes Ziel der Anästhesie ist (Erhardt et al. 2012; Erhardt und Haberstroh 2012).

In der Anästhesie von Menschen und größeren Tieren werden klinische Parameter, wie die Herzfrequenz, Atemfrequenz, der arterielle Blutdruck, Abwehrreaktion oder Tränenfluss herangezogen (Arras et al. 2001; Erhardt und Haberstroh 2012). Steigen Herzfrequenz, Atemfrequenz oder der arterielle Blutdruck plötzlich, besteht eine unzureichende Narkosetiefe (Tranquilli et al. 2007). Die korrekte Überprüfung der physiologischen Parameter gestaltet sich bei Nagern schwierig, da sie hohe physiologische Werte aufweisen. Um diese erfassen zu können, sind geeignete Gerätschaften notwendig, die zeitliche und personelle Ressourcen erfordern. Der hierdurch entstehende Aufwand ist bei Routineeingriffen häufig nicht gerechtfertigt. Im Gegensatz dazu sind eine Überprüfung der Reflexe und andere klinische Beobachtungen in der Praxis leichter umsetzbar (Arras et al. 2001).

Die Bewertung der Tiefe der Anästhesie erfolgt daher anhand der Dämpfung bzw. Erregbarkeit der Reflexe. Das von Guedel erstellte Anästhesieschema bietet einen allgemeinen Überblick über Stadien und Stufen des Re-

flexstatus mit unterschiedlichen klinischen Anzeichen (Muskeltonus, Pupillengröße, Atemmuster, ...) (Guedel 1951). Dieses wurde ursprünglich für die Ethernarkose beim Menschen entwickelt und anschließend für verschiedene Anästhesiemethoden und Spezies weiterentwickelt, da sich die Reflexantwort jeweils unterscheidet. In der Regel werden folgende Reflexe evaluiert: Stellreflex, Lidreflex, Zwischenzehen- bzw. Fußrückziehreflex, Pupillarreflex und Bulbusrotation. Insgesamt werden 4 Anästhesiestadien, in der Regel der Reihe nach, abhängig vom Erregungs- und Dämpfungszustand des ZNS durchlaufen, beginnend mit Stadium I (Analgesie- und Einleitungsstadium oder Stadium der psychischen Dämpfung), gefolgt von Stadium II (Exzitationsstadium), Stadium III (Toleranzstadium) sowie Stadium IV (Asphyxiestadium) (Erhardt und Haberstroh 2012; Guedel 1951). Stadium III wird wiederum in mehrere Stufen untergliedert: Stufe 1 Stadium III₁ (Hypnosestadium), Stufe 2 Stadium III₂ (chirurgisches Toleranzstadium) und Stufe 3 Stadium III₃ (Stadium der physischen Depression) (Erhardt und Haberstroh 2012).

Je nach Methode der Anästhesie und Applikationsform, Spezies, Stamm, Geschlecht, Alter und Allgemeinbefinden werden die Stadien in unterschiedlicher Ausprägung und Schnelligkeit durchlaufen. Bei einer Reduktion der Anästhesietiefe erfolgt das Durchlaufen wieder in retrograder Weise, es sei denn, alle Komponenten der Anästhesie werden kompetitiv antagonisiert. Dies ist bei der vollständig antagonisierbaren Anästhesie der Fall. Ziel der Narkosetiefe ist das Stadium III₂ mit chirurgischer Toleranz, da hierbei eine ausreichende Analgesie bei beibehaltenen Vitalfunktionen herrscht (Erhardt und Haberstroh 2012; Green 1982).

Bei der Ratte werden vor allem der fehlende Stellreflex sowie der Zwischenzehen- bzw. Fußrückziehreflex und der Lidreflex als Kennzeichen für die Überprüfung der Anästhesiestadien herangezogen (Henke und Reinert 2006; Henke und Erhardt 2012). Der Zwischenzehenreflex stellt dabei die am meisten empfohlene, zuverlässigste und sensibelste Methode bei Nagern dar und zeigt die angemessene Narkosetiefe der chirurgischen Toleranz an (Arras et al. 2001; Henke und Erhardt 2012). Bei Vibration der Barthaare und einem positiven Fußrückziehreflex ist die Narkose zu flach, bei extremem Exoph-

thalmus und pressender Atmung zu tief (Henke und Erhardt 2002, 2012). Zur Überprüfung des Zwischenzehenreflexes wird mittels eines Hilfsmittels die Zwischenzehenhaut der sanft gestreckten Hintergliedmaße gekniffen, um ein Zurückziehen zu provozieren. Ein geringes Zurückziehen ist angemessen und gilt als Maß für den Anfang und das Ende der chirurgischen Toleranz (Henke und Erhardt 2012). Bei Ratten eignet sich unter MMF-Narkose die Überprüfung des Zwischenzehenreflexes der Hintergliedmaße besser als die der Vordergliedmaße, da er erst bei tieferen Narkosestadien ausfällt und somit besser zur Überwachung der adäquaten Narkosetiefe geeignet ist. Des Weiteren tritt er in der Aufwachphase früher wieder auf (Mantel 1999). Der Ausfall von Schmerzreflexen im Körper findet zeitlich versetzt statt (Erhardt und Haberstroh 2012). Der Verlust des Stellreflexes (*Loss of Righting Reflex* = LORR; leichtes Ankippen des Käfigs; positiver Reflex: selbständiges Drehen von Brust- in Bauchlage/Rückkehr in physiologische Körperhaltung) stellt noch keine ausreichende Tiefe der Anästhesie dar, wird jedoch zeitlich mit dem Beginn der Narkose und Bewusstlosigkeit in Verbindung gebracht (Franks 2008). Die Überprüfung von Lidreflex (Berührung des Lids am medialen Augenwinkel; positiver Re-

flex: Zucken oder Blinzeln der Augenlider), sowie Kornealreflex (leichtes Antippen der Cornea; positiver Reflex: Augenzwinkern) und Bulbusrotation werden im Gegensatz zu Hund und Katze nur selten bei Nagern eingesetzt (Flecknell 2015; Henke und Erhardt 2012; Smith 1993). Sie können das Auge schädigen (Arras et al. 2001).

Der Kutaneusreflex (Manipulation der Haut; positiver Reflex: Zucken) ist nicht aussagekräftig, da auch Tiere, die lauffähig sind, nicht auf diesen reagieren (Arras et al. 2001; Smith 1993), ebenso der Schwanzreflex (vorsichtiges Kneifen des Schwanzes; positiver Reflex: Zucken des Schwanzes), da er bei Mäusen und Ratten in weniger tiefen Narkosestadien ausfällt als der Zwischenzehenreflex (Arras et al. 2001; Field et al. 1993).

Zusammenfassend muss sich in der Anästhesie zur Beurteilung der geeigneten Anästhesietiefe auf klinische Parameter, die Reflexüberprüfung und den Erfahrungswert verlassen werden, jedoch auf die Gefahr hin, dass dies nicht ausreichend sein kann (Erhardt und Haberstroh 2012; Haskins 1992a).

II.5.3 Anästhesiemöglichkeiten bei der Ratte

Ratten sind nicht nur Patienten in der kurativen Praxis, sondern gehören auch zu den häufigsten Versuchstieren, sodass insbesondere im Bereich der Versuchstierkunde häufig Narkosen durchgeführt werden (Bundesinstitut für Risikobewertung 2021; Hedrich 2000).

Bei der Anästhesie der Ratten kommen als Möglichkeit, bevorzugt die Injektionsanästhesie und die Inhalationsanästhesie sowie die Kombination aus beiden in Frage. Die Auswahl der am besten geeigneten Methode ist dabei von den Gegebenheiten vor Ort sowie dem Anlass der Anästhesie abhängig (Henke und Erhardt 2012; Waynforth und Flecknell 1992). Alter und Geschlecht zeigen auch einen Einfluss auf die Anästhesiemethode (Sharp und La Regina M. C. 2013; Shibutani 2000; Waynforth und Flecknell 1992). Selbst verschiedene Rattenstämme reagieren unterschiedlich auf das gleiche Anästhetikum (Avsaroglu et al. 2007; Sharp und La Regina M. C. 2013; Waynforth und Flecknell 1992).

II.5.3.1 Inhalationsanästhesie

Inhalationsanästhetika sind inhalierbare volatile (flüchtige) Hypnotika, die bei Raumtemperatur in flüssigem (Is-

ofluran, Sevofluran, Desfluran,) oder gasförmigem (Kohlendioxid, Lachgas) Zustand vorliegen. Allen Substanzen ist die Applikation per inhalationem über die Lunge in gasförmiger Phase oder nach Passage des Verdampfers per Dampf gemein (Erhardt et al. 2012). Aufgrund der untergeordneten Relevanz von Lachgas und Kohlendioxid liegt der Fokus dieses Abschnitts auf den volatilen Anästhetika.

Grundsätzlich sollte ein Inhalationsanästhetikum bestimmte Kriterien erfüllen. Hierzu zählen unter anderem neben nicht schleimhautreizender Eigenschaften, eine zügige Aufnahme ins Blut und Abgabe in das ZNS, eine gute Steuerbarkeit mittels Änderung der Konzentration, eine gute Hypnose, Dämpfung der Schmerzwahrnehmung und Muskelrelaxation, eine geringe negative Auswirkung auf Organe mit geringer Verstoffwechslung im Organismus, sowie eine rasche Abflutung bei Abstellung des Zuflusses über den Verdampfer mit geringen Nachwirkungen im Anschluss an die Anästhesie (Erhardt et al. 2012).

Die Aufnahme und Abgabe der Inhalationsanästhetika erfolgen ausschließlich über die Lunge. Die Wirkung ist sedierend und je nach Dosis hypnotisch. Klinisch wirken

sie vergleichbar wie ein Injektionshypnotikum. Bei Verabreichung hoher Dosen können Reaktionen, die die Motorik und das Herz-Kreislaufsystem betreffen, als Folge der Unterdrückung von Schmerzreizen auftreten. In der Theorie sind sie als Monoanästhesie einsetzbar, jedoch werden höhere Dosen benötigt, die nahe des toxischen Bereichs sind (Erhardt 2012). Wichtig ist zudem, dass bei einer Inhalationsanästhesie keine ausreichende Analgesie vorhanden ist (Erhardt 2012). Bei einer tiefen Anästhesie, wie sie bei länger andauernden und mittelgradig bis schweren chirurgischen Eingriffen notwendig ist, sollte eine Kombination aus einem Inhalations- und Injektionsanästhetikum gewählt werden (Erhardt und Baumgartner 2012). Gemäß dieser sogenannten balancierten Anästhesie können einerseits Potenzierungseffekte bestmöglich ausgeschöpft und andererseits Narkotika reduziert werden (Erhardt und Baumgartner 2012).

Die Einleitung der Anästhesie mittels Inhalation in einer Ganzkörperkammer stellt die womöglich stressfreiste Anästhesiemethode für die Ratte dar (Flecknell 2015). Zudem ist sie einfach und zuverlässig durchzuführen. Eine Kopf- oder Nasenkammer ist hingegen nur für die

Erhaltung der Anästhesie geeignet. Von einer Einleitung hierüber ist aufgrund einer hohen Stressbelastung für das Tier abzusehen (Henke und Erhardt 2012).

Zur Dosierung ist es ratsam dem Kreislaufsystem einen geregelten Verdampfer, einen sogenannten Präzisionsverdampfer, vorzuschalten. So erfolgt eine bessere Steuerung der Dosierung, da das flüchtige Anästhetikum in prozentualer Konzentration abgegeben werden kann. Dadurch ist eine zügige Veränderung der Narkosetiefe möglich und eine Überdosierung kann verhindert werden (Brunson 2008; Erhardt et al. 2012; Hedenqvist und Hellebrekers 2003). Als Trägergas findet in der Regel reiner Sauerstoff Verwendung (Henke und Erhardt 2012). Zudem werden der Frischgasdurchfluss, die Umgebungstemperatur sowie der Wirkstoffdampfdruck automatisch berücksichtigt (Alef 2003; Erhardt et al. 2012; Gaertner et al. 2008).

In der Regel werden offene und halboffene Systeme in der Inhalationsanästhesie bei der Ratte angewandt. Hierbei werden üblicherweise Isofluran und Sevofluran verwendet (Gaertner et al. 2008; Henke und Erhardt 2002, 2012; Mason 1997).

Neben einer angemessenen Anästhesie für den Patienten, muss auch auf ein vertretbares gesundheitliches Risiko für das Personal geachtet werden (Mason 1997). Mit Inhalationsanästhetika getränkte Wattetupfer finden daher aufgrund der unzureichenden Arbeitssicherheit und Steuerbarkeit keine Verwendung mehr (Flecknell 2015; Waynforth und Flecknell 1992). Hinsichtlich des Arbeitssicherheitsrisikos gibt es weitere Nachteile der Inhalationsanästhesie. Volatile Anästhetika, die fast alle chlorierte Kohlenwasserstoffe sind, bergen als Treibhausgase ein erhebliches Umweltrisiko. Ferner ist im Vergleich zur Injektionsanästhesie teures Equipment notwendig (Haberstroh 2012; Henke und Haberstroh 2012). Auch bedarf es beim Nager und insbesondere der Ratte einer genauen Untersuchung des Respirationstraktes, da sich Erkrankungen der Atemwege negativ auf die Aufnahme und Abgabe des Anästhetikums auswirken können (Sharp und La Regina 1998).

II.5.3.2 Injektionsanästhesie

Als Vorteil der Injektionsanästhesie gilt, dass sie eine relativ einfach durchzuführende und kostengünstige Methode darstellt mit einer geringen Belastung für Personal

und Umwelt sowie nur minimalen materiellen Ausstattung (Haberstroh 2012).

Grundsätzlich erfolgt die Applikation von Injektionsanästhetika parenteral. Sie werden in die drei Klassen Sedativa, Hypnotika und Analgetika unterteilt. Da kein Injektionsanästhetikum für sich in der Lage ist alle Kriterien der Allgemeinanästhesie (Hypnose, Relaxation, Analgesie) in einem nicht toxischen Bereich abzudecken, ist eine Kombinationsanästhesie mit mindestens zwei der drei Gruppen erforderlich, um eine chirurgische Toleranz zu erreichen (Erhardt und Baumgartner 2012).

Für Kleinsäuger sind Injektionsanästhesien jedoch nur bei einer guten Steuerbarkeit empfehlenswert. Diese ist von der Applikationsart (subkutan (s. c.), intramuskulär (i. m.), intraperitoneal (i. p.) oder intravenös (i. v.)) und der Wirkdauer der Anästhetika abhängig (Paddleford und Erhardt 1992). Zur besseren Steuerbarkeit kann auch eine vollständig antagonisierbare Anästhesie (VAA) durchgeführt werden, bei der für jedes Anästhetikum ein Antagonist eingesetzt werden kann, um die Wirkung aufzuheben. Hierfür müssen allerdings verschiedene Anästhetika und deren Antagonisten bevorratet werden,

was mit erhöhten Kosten einhergeht (Henke und Erhardt 2012).

Kurzwirksame Anästhetika sollten nur i. v. appliziert werden, was bei den meisten Kleinsäugetern in einem wachen Zustand nicht möglich ist (Sedgwick et al. 1992). Die i. v. Applikation in den Venenwinkel, die nur während der Narkose oder unter tiefer Sedation möglich ist, setzt Erfahrung und Kenntnisse voraus. Sie dient insbesondere bei einem Narkosezwischenfall als Notfallstelle für eine Injektion (Henke und Erhardt 2012; Waynforth und Flecknell 1992).

Es empfiehlt sich daher eine i. p. oder i. m. Verabreichung, wobei die i. p. Applikation üblich ist (Henke und Erhardt 2012). Bei der i. p. Applikation besteht die Möglichkeit pro Injektion größere Volumina zu verwenden als bei der i. m. Applikation (Waynforth und Flecknell 1992). Wird bei der i. m. Applikationen das pro Einstichstelle empfohlene Injektionsvolumen überschritten, muss dieses auf mehrere Gaben verteilt werden (Henke und Erhardt 2012). Hierbei ist jedoch die zuverlässige Absorption vorteilhaft (Henke und Erhardt 2012; Waynforth und Flecknell 1992). Gegenüber der i. v. Applikation werden für diese Methode aufgrund der langsameren

Aufnahme und Distribution höhere Dosismengen erfordert. Damit geht eine schlechtere Steuerbarkeit und folglich lange Schlaf- und Aufwachphasen einher (Flecknell et al. 1991; Hu et al. 1992). Auch wenn dem mit einer VAA entgegengewirkt werden kann, sind gute anästhesiologische Grundkenntnisse von Nöten (Henke und Erhardt 2012). Zudem besteht bei i. p. Injektionen die Gefahr von Fehlapplikationen in Leber, Milz, das subkutane Fettgewebe oder Hohlorgane, wie die Harnblase oder den Gastrointestinaltrakt (Coria-Avila et al. 2007; Henke und Erhardt 2012). Bei Verwendung reizender Substanzen sind bei i. m. Injektion auch Muskelschäden möglich (Henke und Erhardt 2012; Waynforth und Flecknell 1992). Als Applikationsform der Injektionsanästhesie wird für Ratten die i. m. Injektion empfohlen (Henke und Erhardt 2012).

Anästhesiemethoden, die teilweise oder vollständig antagonisierbar sind, ermöglichen eine bessere Steuerbarkeit und erlauben ein Eingreifen in Notfallsituationen und folglich eine Reduktion der Mortalitätsrate (Sedgwick et al. 1992). Eine vollständig antagonisierbare Anästhesie (VAA) ermöglicht es jederzeit, die Wirkung der Anästhetika durch die entsprechenden Antagonisten wieder auf-

zuheben. Eine sogenannte VAA mit einer guten chirurgischen Toleranz besteht aus drei Wirkstoffgruppen, die antagonisiert werden sollen: α_2 -Adrenorezeptoragonisten, Opioide und Benzodiazepine. Diese wurden hauptsächlich für kurze chirurgische Eingriffe und Kleinsäuger entwickelt (Erhardt und Lendl 2002; Erhardt und Baumgartner 2012). Als Allgemeinanästhesie wird die VAA bei sehr jungen und kleinen Heimtieren von unter 1 kg KGW angewendet (Henke 2010; Henke und Erhardt 2012; Preißel). Hier ist die i. v. Applikation in der Regel nur schwer möglich, sodass eine Verabreichung i. m., i. p. oder s. c. erfolgt, was mit einer hohen Dosierung und dementsprechend schlechter Steuerung einhergeht (Erhardt und Baumgartner 2012).

Bei Ratten wird neben Ketamin-Kombinationen mit einem α_2 -Adrenorezeptoragonisten wie Xylazin oder Medetomidin, insbesondere die vollständig antagonisierbare Kombinationsanästhesie aus Medetomidin, Midazolam und Fentanyl empfohlen. Sie ist mittels der Antagonisten Atipamezol, Flumazenil und Naloxon, die s. c. appliziert werden, vollständig aufhebbar (Flecknell 2015; Green et al. 1981; Henke und Erhardt 2012).

II.5.4 Inhalationsanästhetikum Isofluran

Das Inhalationsanästhetikum Isofluran wurde 1965 synthetisiert (Eger 1981; Larsen 2006a). Es weist aktuell das beste Verhältnis von Risiko zu Nutzen auf, sodass es eine breite Anwendung sowohl in der Humanmedizin, als auch in der Veterinärmedizin findet (Erhardt et al. 2012; Larsen 2006a).

Die Wirkung von Isofluran beruht auf der Reduktion der myoneuronalen Transmission (Eger 1998). Der Mechanismus dahinter ist jedoch bisher nicht genauer verstanden. Effekte an den muskarinergen AChE- und GABA_A-Rezeptoren sowie Modulationen an der Membran durch die Lipophilie der Substanz stehen in der Diskussion (Alkire und Haier 2001; Quinlan et al. 1995).

Isofluran weist eine gute muskelrelaxierende und hypnotische, jedoch nur schwache analgetische Wirkung auf (Ebert et al. 2002; Eger 1984; Hildebrandt et al. 2008; Larsen 2006a; Schulte am Esch et al. 2000a). Nach dem Erwachen aus der Anästhesie ist keine postoperative Analgesie vorhanden (Henke und Erhardt 2012).

Die Aufnahme und Verteilung von Isofluran sind von unterschiedlichen Faktoren abhängig. Hierzu zählen die

Menge der Einatemkonzentration, die Lungenbelüftung, die Herzleistung und die Löslichkeit im Gewebe und Blut (Dale und Brown 1987). Der Blut-Gas-Löslichkeitskoeffizient liegt bei 1,4 (Erhardt et al. 2012). Die An- und Abflutung des Isofluran erfolgt sehr rasch aufgrund der geringen Löslichkeit im Blut (Ebert et al. 2002; Haskins 1992b), was eine unmittelbare Steuerung der Narkosetiefe ermöglicht (Alef 2003; Erhardt et al. 2012).

Die Einleitungs- und Aufwachzeit beträgt speziesabhängig zwischen 3–5 min. Für 10 min nach dem postoperativen Aufwachen zeigen die Tiere Desorientierung (Henke und Erhardt 2012).

Die lipophile Eigenschaft der Substanz ermöglicht ein rasches Passieren der Alveolarwand und somit einen zügigen Übertritt in das Blut (Hildebrandt et al. 2008). Von dort gelangt es rasch in das ZNS (Eger 1984), von wo es auch schnell wieder abflutet (Lu et al. 2008). Das Inhalationsanästhetikum wird fast komplett wieder abgeatmet und nahezu nicht metabolisiert (Dale und Brown 1987; Hedenqvist und Hellebrekers 2003).

Die Induktions- und Erhaltungsdosis von Isofluran orientieren sich am MAC-Wert (minimale alveoläre Konzentration), also dem empirisch ermittelten Wert, bei dem 50 % der Patienten einen Schmerzreiz, wie z. B. eine Hautinzision, nicht mehr spüren. Er wird als prozentualer Anteil der zugeführten Atemluft in Volumen % angegeben. Er ist jedoch nur ein Richtwert und unterliegt starken interindividuellen und speziesabhängigen Schwankungen (Alef 2003; Eger 1984; Hedenqvist und Hellebrekers 2003). Bei Heimtieren liegt er etwa in dem Bereich 1,15–3,0 % (Henke und Erhardt 2012). Zudem ist darauf zu achten, dass es zu einer Abweichung zwischen der eingestellten Konzentration am Verdampfer und der beim Tier ankommenden Menge aufgrund des vorhandenen Totraums im Narkosesystem kommen kann (Henke und Erhardt 2012). Die Induktion bei Heimtieren erfolgt bei etwa 2,0–6,0 Vol %, die Erhaltung zwischen 1–4,2 Vol % (Henke und Erhardt 2012).

Aufgrund der geringen Metabolisierungsrate von nur 0,2 % wirkt es nicht nieren- oder lebertoxisch (Alef 2003; Eger 1984; Gaertner et al. 2008; Hedenqvist und Hellebrekers 2003). Es ist daher auch bei Patienten mit Nieren- oder Leberschaden geeignet (Erhardt et al.

2012; Plumb 2015). Zudem werden ihm keine toxische Wirkung auf Organsysteme sowie kanzerogene oder mutagene Eigenschaften zugesprochen. Hierdurch erweist es sich in der Versuchstierkunde als praktikabel (Dale und Brown 1987; Eger 1981; Eger et al. 1987; Hedenqvist und Hellebrekers 2003; Larsen 2006a) und bietet sich beispielsweise für toxikologische Studien besonders an (Eger 1981; Flecknell 2015).

Während eine direkte arrhythmogene oder kardiodepressive Wirkung als gering angesehen wird (Alef 2003; Brunson 2008; Eger 1984; Hildebrandt et al. 2008; Larsen 2006a; Schulte am Esch et al. 2000a), führt Isofluran über seine vasodilatatorische Wirkung zu einer Reduktion des peripheren Widerstandes und somit zu einem Blutdruckabfall (Alef 2003; Ebert et al. 2002; Erhardt et al. 2012; Hedenqvist und Hellebrekers 2003; Schulte am Esch et al. 2000a). Dies führt zu einer kompensatorischen Tachykardie (Eger 1984; Erhardt et al. 2012; Schulte am Esch et al. 2000a) und kann unter Umständen zu einer verminderten Durchblutung der Koronararterien und einem gesteigerten Hirndruck führen (Brunson 2008; Ebert et al. 2002; Erhardt et al. 2012; Hedenqvist und Hellebrekers 2003; Schulte am Esch et

al. 2000a) sowie eine Minderung des renalen Blutflusses mit einer Senkung der glomerulären Filtrationsrate und des Harnflusses (Eger 1981; Erhardt et al. 2012; Larsen 2006a).

Ein Durchdringen der Plazentaschranke ist ungehindert möglich, wodurch nicht nur bei Patienten, sondern auch im Sinne des Arbeitsschutzes bei Schwangeren große Vorsicht geboten ist (Erhardt et al. 2012; Gaertner et al. 2008).

Isofluran ist ein bei vielen Tierarten in Deutschland zugelassenes Inhalationsanästhetikum. Es wird auch bei Ratten eingesetzt (Erhardt et al. 2012). Wichtig ist, dass in Abhängigkeit des gefahrenen Anästhesiesystems (offen, halboffen, geschlossen) auf geeignete Abzugseinrichtungen zu achten ist, um die Arbeits- und Umweltsicherheit zu gewährleisten (Haberstroh 2012). Zudem sollte sparsam gearbeitet werden, was teils einigen Modifikationen bedarf, wenn Gerätschaften aus der Kleintiermedizin Anwendung finden (Henke und Erhardt 2012). Bei einigen Heimtierarten wie Chinchilla und Meerschweinchen ist darauf zu achten, dass sie sehr empfindlich mit starker Schleimhautreizung bis Bronchosekretion und Lakrimation reagieren, weshalb eine Prämedikation mit

Atropin zu empfehlen ist (Erhardt et al. 2012; Heide et al.).

Zusammenfassend gilt Isofluran durch sein schnelles An- und Abfluten als gut steuerbar (Flecknell 2015; Henke und Erhardt 2012; Wixson und Smiler K. L. 1997; Wolfensohn und Lloyd 2015). Durch die geringe Metabolisierungsrate ist es in der Praxis vor allem bei Tieren mit eingeschränkter Leber- oder Nierenfunktion gut einsetzbar und weist ein beherrschbares Nebenwirkungsspektrum auf. Da es in seiner hypnotischen und analgetischen Fähigkeit als Monoanästhetikum eingeschränkt ist, sollte, sofern eine tiefere Anästhesie vonnöten ist, mit Injektionsanästhetika kombiniert werden. Bei der sogenannten balancierten Anästhesie werden die zweckdienlichen Wirkeigenschaften der Anästhetika idealerweise synergetisch ausgenutzt und bei geringerer Einzeldosen verschiedener Anästhetika gleiche oder bessere Wirkung erzielt während unerwünschte Wirkungen der einzelnen Wirkstoffe reduziert werden (Erhardt und Baumgartner 2012; Paddleford und Erhardt 1992; Paddleford 1999).

II.5.5 Kombinationsanästhesie mit Medetomidin, Midazolam und Fentanyl

Die Kombinationsanästhesie ist notwendig, um bei der Allgemeinanästhesie durch Injektionsanästhetika alle Kriterien zu erfüllen. Fast keine Substanz kann bei einer angemessenen therapeutischen Anwendung sowohl eine adäquate Hypnose, als auch Analgesie und Muskelrelaxation erreichen. Durch die Kombination von mindestens zwei der drei Klassen von Injektionsanästhetika, kann durch Ergänzung und Potenzierung der Wirkeigenschaften eine Optimierung erzielt werden. Indem sich die negativen Nebenwirkungen wechselseitig kompensieren, können die verabreichten Dosierungen der einzelnen Anästhetika und folglich toxische Wirkungen durch eine Reduktion der Nebenwirkungen minimiert werden (Erhardt und Baumgartner 2012). Dies hat eine Vergrößerung der therapeutischen Breite und Erhöhung des therapeutischen Index zur Folge.

Die Kombination der MMF-Narkose wurde bei Ratten erfolgreich etabliert. Sie bietet bei mittelgradig bis hochschmerzhaften Eingriffen eine gute Analgesie. Im Heimtierbereich und bei Jungtieren wird sie vor allem aufgrund der guten Antagonisierbarkeit empfohlen mit dem-

entsprechend guter Steuerbarkeit sowie kurzer Aufwachzeit. Zu Sauerstoffsubstitution und Atemmonitoring wird geraten (Henke und Erhardt 2012; Mantel 1999).

II.5.5.1 Medetomidin

Das Imidazolderivat Medetomidin ist ein hoch selektiver, spezifischer und potenter α_2 -Adrenorezeptoragonist (Erhardt et al. 2012). Es bindet sowohl an prä- als auch postsynaptische α_2 -adrenergen Rezeptoren (Virtanen 1989). Der Effekt von Medetomidin ist vornehmlich sedativ, muskelrelaxierend und nur geringgradig analgetisch (Erhardt et al. 2012; Vainio 1989). Die Wirkung ist dosis- und erheblich speziesabhängig, wobei eine höhere Menge zwar die Wirkdauer, jedoch nicht die Sedation verstärkt (Erhardt et al. 2012; Stenberg 1989; Vainio 1989). Die dosisabhängige Sedation hält ungefähr 3 h an, die dosisabhängige analgetische Wirkung jedoch nur 30–45 min mit einem Wirkeintritt nach 1–5 min, sodass die sedative Wirkung die analgetische überdauert (Erhardt et al. 2012; Henke et al. 2014). Die muskelrelaxierende Wirkung beruht auf der gehemmten neuronalen Reizübertragung im Rückenmark (Erhardt et al. 2012). Die Applikation kann i. v., i. m., i. p. oder s. c. erfolgen (Erhardt et al. 2012; Salonen 1989). Zudem hat

die Substanz die Eigenschaft, den Effekt anderer Anästhetika zu verstärken, wie beispielsweise die analgetische und antinozizeptive Wirkung bei einer Kombination mit Opioiden (Ossipov et al. 1990). Jedoch kommt es hier auch zu einer Verstärkung der atemdepressiven Wirkung (Erhardt et al. 2012).

Eingesetzt wird Medetomidin in Kombination mit anderen Substanzen im Rahmen einer Sedation, Analgesie, Anästhesie oder Narkoseprämedikation (Henke et al. 2014).

Zu den unerwünschten Wirkungen von Medetomidin gehört eine reversible Kreislaufzentralisation durch selektive Aktivierung sympathischer und parasymphathischer Effekte, die sich auf das Überleben des Patienten jedoch nicht nachteilig auswirkt (Erhardt et al. 2012). Dieser Zustand gleicht einem Phase I-Schock. Er ist gekennzeichnet durch eine schwerwiegende bradykarde anstelle tachykarder Herzfrequenz sowie peripherer Vasokonstriktion durch die aktivierten α_2 -Adrenorezeptoren der glatten Muskulatur peripherer Gefäße mit verstärkt perfundierten parenchymatösen Organen und reduzierter Durchblutung der peripheren Gewebe (Clarke 1993;

Erhardt et al. 2012; Vainio 1989). Es werden massive Herzrhythmusstörungen ausgelöst (Erhardt et al. 2012). Der Blutdruck kann durch Erhöhung des peripheren Gefäßwiderstandes stark ansteigen, wobei er langanhaltend abfällt (Scabell et al.; Vainio 1989). Des Weiteren besteht bei Anwendung die Gefahr der Hypothermie (Hall und Clarke 1991; Vainio 1989) und der ausgeprägten Depression der Atmung, insbesondere in Kombination mit anderen atemdepressiven Substanzen (Erhardt et al. 2012).

Zusätzlich hemmt es die Insulinfreisetzung und kann eine Hyperglykämie zur Folge haben (Burton et al. 1997; Clarke 1993; Erhardt et al. 2012; Henke et al. 2014; Hu et al. 1992). Die Hemmung der ADH-Ausschüttung (Antidiuretisches Hormon) und Hyperglykämie führen zu Polyurie (Burton et al. 1997; Clarke 1993; Henke et al. 2014; Hu et al. 1992).

Die Metabolisierung der Substanz läuft über die Leber und die Ausscheidung der Metaboliten über die Niere, wobei die Ratte auch eine signifikante fäkale Ausscheidungsmenge zeigte (Erhardt et al. 2012).

Von einer Anwendung von Medetomidin bei Patienten mit Diabetes, Herz- und Nierenerkrankungen wird daher abgeraten. Ebenso ist keine Empfehlung für trüchtige Patienten auszusprechen, da eine Wirkung auf den Uterus gegeben ist (Erhardt et al. 2012).

Eine Antagonisierung von Medetomidin ist mittels Atipamezol, einem kompetitiven Antagonisten an α_2 -Adrenorezeptoren, zu erreichen (Erhardt et al. 2012).

II.5.5.2 Midazolam

Das Benzodiazepin Midazolam ist ein Imidazolbenzodiazepin. Es wird genau genommen nicht zu den Anästhetika gezählt und stattdessen den Sedativa, Tranquilizern bzw. Ataraktika zugeordnet (Erhardt et al. 2012; Göthert et al. 1996; Larsen 2006b). Der Wirkmechanismus von Midazolam basiert auf der Verstärkung des wichtigsten inhibitorischen Neurotransmitters γ -Aminobuttersäure (GABA) (Connolly und Wafford 2004; Erhardt et al. 2012; Göthert et al. 1996; Krasowski und Harrison 2000; Soudijn und van Wijngaarden 2000). Hierbei werden Dopamin, Serotonin und Noradrenalin ausgeschüttet (Hedenqvist und Hellebrekers 2003). GABA-Rezeptoren werden im Allgemeinen in zwei Haupttypen unterteilt, die GABA_A- und GABA_B-Rezeptoren sind. Der Benzodiaze-

pin-Rezeptor befindet sich an einer Untereinheit des GABA-Rezeptors, der γ -Untereinheit des GABA_A-Rezeptors (Ebert et al. 2002; Hedenqvist und Hellebrekers 2003; Larsen 2006b; Schulte am Esch et al. 2000b).

Es besitzt eine anxiolytische, antikonvulsive sowie leicht muskelrelaxierende und geringe sedative Wirkung, die dosisabhängig und speziesspezifisch ist (Erhardt et al. 2012; Göthert et al. 1996). Im Allgemeinen haben Benzodiazepine keine analgetische Wirkung (Ebert et al. 2002; Erhardt et al. 2012; Hedenqvist und Hellebrekers 2003).

Die Anwendung umfasst die Sedation (Thurmon et al. 1996) sowie die Prämedikation vor einer Anästhesie zur Senkung Anästhetikadosis (Erhardt und Baumgartner 2012) und des MAC-Wertes bei Inhalationsanästhesie (Hall et al. 1988). In Kombination mit anderen Substanzen wird es auch zur Anästhesie eingesetzt, da es allein zu keinem anästhetischen Zustand führt (Erhardt und Baumgartner 2012; Gross 2001). Zudem wird es auch für die Einleitung und zur Beruhigung des Patienten verwendet (Erhardt et al. 2012; Göthert et al. 1996).

Die Verabreichung des Anästhetikums erfolgt i. m., s. c., i. v. oder i. p. (Erhardt et al. 2012). Sie kann aber auch oral erfolgen (Hall und Clarke 1991). Bei einem pH < 4 ist Midazolam gut wasserlöslich, wohingegen es bei einem höheren pH-Wert lipidlöslich wird aufgrund der Schließung der Imidazol-Ringstruktur der Substanz (Meyer und Fish 2008). Durch die starke Lipophilie kommt bei parenteraler Applikation zu einer raschen Aufnahme und schnellem Anfluten im ZNS mit einem Wirkeintritt nach etwa 90 s bei intravenöser Gabe (Larsen 2006b; Paddleford und Erhardt 1992; Schwartz et al. 2013; Töpfer et al. 2016). Nach der hepatischen Metabolisierung zu hydrophilen Metaboliten werden diese renal eliminiert (Erhardt et al. 2012).

Bei Tieren, die aufgeregt und ängstlich sind, kann die Gabe zu Konvulsionen und Exzitationen führen (Erhardt et al. 2012). Die Wirkung auf das Herz-Kreislauf-System ist im therapeutischen Anwendungsbereich als sehr gering einzuordnen, wohingegen sehr hohe Dosen eine hypotensive Wirkung zeigen und zu Ataxien sowie Muskelzittern und auch einer zentralen Atemdepression führen können (Ebert et al. 2002; Erhardt et al. 2012; Göthert et al. 1996). Die Plazentaschranke kann passiert

werden (Erhardt et al. 2012). Da die Anwendung von Benzodiazepinen zu einem erhöhten Augeninnendruck führen kann, stellt ein Engwinkelglaukom eine Kontraindikation der Gabe dar. Vorsicht ist auch bei Lebererkrankungen, insbesondere der hepatischen Enzephalopathie oder einem Portosystemischen Shunt geboten, da es hier zu verzögerter Metabolisierung und somit längerer Wirkdauer führen kann (Maddison et al. 2002; Plumb 2015).

Als kompetitiver Antagonist am GABA_A-Rezeptor wird Flumazenil verabreicht (Erhardt et al. 2012; Meyer und Fish 2008; Schulte am Esch et al. 2000b).

II.5.5.3 Fentanyl

Fentanyl ist ein synthetisches Opioid mit hoher Affinität zum μ -Rezeptor und starker analgetischer Potenz. Es wird mit einer um das 80–100 fache potenteren Wirkung als Morphin zu den starken Opioiden gezählt und fällt folglich unter das Betäubungsmittelgesetz (Erhardt et al. 2012). Die Applikation erfolgt auf unterschiedlichen parenteralen Wegen, wie i. v., i. m., s. c. oder auch perkutan (Erhardt et al. 2012; Paddleford und Erhardt 1992). Die Wirkung tritt vor allem bei i. v. oder i. m. Applikation bereits nach 5 min ein, ist aber nur von einer

kurzen 20–30 minütigen Dauer (Erhardt et al. 2012; Henke et al. 2014; Paddleford und Erhardt 1992). Dies beruht großteils auf der Lipophilität, sodass es direkt nach Verabreichung zu hohen Wirkstoffspiegeln in stark durchbluteten Organen, wie Herz, Gehirn und Lunge kommt mit anschließender Umverteilung in Fett- und Muskelgewebe und gleichzeitiger Reduktion des Plasmaspiegels (Erhardt et al. 2012).

Das Einsatzgebiet von Fentanyl umfasst die intraoperative Analgesie bei mittel- bis hochgradigen Schmerzen (Henke et al. 2014). In der Humanmedizin findet es auch in transdermaler Applikation häufig Verwendung (Böhm 2020; Töpfer et al. 2016).

Die Verstoffwechslung erfolgt über die Leber, was zu einer erheblichen Verzögerung bei älteren oder lebergeschädigten Patienten führt (Erhardt et al. 2012). Anschließend wird der Metabolit über Niere und Darm ausgeschieden (Erhardt et al. 2012).

Fentanyl hat, wie alle Opioide, eine starke atemdepressive Wirkung (Erhardt et al. 2012). Eine geringe Ausschüttung von Histamin wird beobachtet (Erhardt et al. 2012), die beim Hund zu einer Vasodilatation mit gerin-

gem Abfall des Blutdrucks führt (Paddleford und Erhardt 1992). Jedoch sind Nebenwirkungen auf das Herz-Kreislauf-System durch Fentanyl, wie auch andere Opioide, grundsätzlich als gering einzuschätzen. Die Herzfrequenz wird lediglich geringgradig erniedrigt (Ebert et al. 2002; Frey 1999) wogegen aber durch Minimierung der Fentanyl-Dosis schnell gegengesteuert werden kann (Erhardt et al. 2012; Hall und Clarke 1991; Paddleford und Erhardt 1992). Bestmöglich wird Fentanyl daher in repetitiven Gaben angewendet. Eine Dauerinfusion oder Gabe mittels Perfusor eignet sich aufgrund der kontextsensitiven Halbwertszeit von Fentanyl nicht. Hierbei kommt es zur Verlängerung der Wirkdauer in Abhängigkeit von der Infusionsdauer. Es kann Stunden nach Verabreichung zu Nebenwirkungen als Spätkomplikationen kommen. Ursache hierfür ist das in der Eliminierungsphase abgegebene Fentanyl aus dem Depot in den Blutkreislauf (Erhardt et al. 2012).

Eine Antagonisierung von Fentanyl ist durch Naloxon, einen kompetitiven Antagonisten an allen Opioid-Rezeptoren, möglich (Erhardt et al. 2012). Buprenorphin, ein partieller μ -Agonist, wird teilweise auch zur Aufhebung der atemdepressiven Wirkung von Fentanyl emp-

fohlen (Arras et al. 2020). Zu beachten ist, dass die analgetische Wirkung im Gegensatz zur Naloxongabe zwar weiter besteht, aber diese geringer als bei einem reinem μ -Agonisten ausfällt. Der partielle μ -Agonist kann aufgrund der starken Rezeptorbindung durch einen reinen μ -Agonisten nicht vom Rezeptor verdrängt werden. Eine Steigerung der Analgesie im Nachhinein ist somit nicht mehr möglich (ITIS 2012).

II.5.6 Risiken bei der Anästhesie der Ratte

Allen Nagetieren ist ein geringes KGW mit einer hohen Aktivität des Stoffwechsels gemein. Ratten haben unter anderem durch die Gefahr von Hypothermie, Atem- und Kreislaufdepressionen und Stoffwechsellentgleisung ein hohes Narkoserisiko von Komplikationen bis hin zu einem letalen Ausgang (Brodbelt 2008; Henke und Reinert 2006).

Die Hypothermie, entstanden durch den Verlust von Körperwärme, stellt insbesondere beim Kleinsäuger die häufigste Todesursache während der Anästhesie und anschließend in der Aufwachphase dar (Henke und Erhardt 2012). Kritisch ist das Absinken der Körperkern-temperatur unter 33 °C anzusehen, da die Tiere die Anästhesie hierbei in der Regel nicht überleben (Henke und

Erhardt 2002). Gründe sind Kreislaufdepression und das Ausschalten der Thermoregulationsmechanismen durch die Anästhesie (Flecknell 2015; Henke und Erhardt 2012). Es entsteht eine Hypothermie durch die vasodilatative Wirkung von Anästhetika und die Muskelrelaxierung (Kurz 2001). Eine um das 20–30 fache reduzierte Metabolisierungsrate steuert diesem bei, ebenso wie Wärmeverluste durch eröffnete Körperhöhlen bei Operationen, Evaporation von Desinfektionsmitteln und Konvektion der rasierten Hautareale (Henke et al. 2012). Zudem haben Ratten eine verhältnismäßig große Körperoberfläche im Vergleich zu Ihrer Körpermasse. Das wirkt sich zusätzlich negativ auf die Thermoregulation aus, indem sie rasch Körperwärme verlieren, insbesondere über Ohren, Pfoten und Schwanz. Vor allem der Schwanz ist für die Thermoregulation der Ratte von großer Bedeutung (Flecknell 2015; Henke und Erhardt 2012; Sharp und La Regina 1998). Eine lange Nachschlafzeit wirkt sich aufgrund der Dämpfung des ZNS auch negativ auf die Atmung und den Kreislauf aus. Insbesondere für Tiere mit einem geringen Körpergewicht ist das sehr gefährlich (Henke et al. 2004).

Eine weitere Gefahr der Anästhesie der Ratte stellt die hypoglykämische Stoffwechsellentgleisung dar, bedingt durch die geringen Glykogen- und Fettreserven und die hohe Stoffwechselrate der Tiere sowie Flüssigkeitsimbilanzen. Das Nüchtern halten von Nagern ist unnötig und bisweilen gefährlich, da sie leicht in die Hypoglykämie abrutschen können (Erhardt und Baumgartner 2012; Henke und Erhardt 2012). Nach der Anästhesie ist angeraten, die Wärmezufuhr fortzuführen, bis eine Futteraufnahme erfolgt. Bei Inappetenz ist eine orale Zwangsernährung und s. c. Flüssigkeitsaufnahme durchzuführen. Die Tiere sollten so rasch wie möglich in die gewohnte Umgebung gebracht werden (Henke und Erhardt 2012).

Zusätzlich ist zu beachten, dass Ratten oftmals Träger latenter, chronischer Atemwegsinfektionen sind, weshalb eine präanästhesiologische Untersuchung des Allgemeinbefindens unbedingt durchgeführt werden sollte (Henke und Erhardt 2002, 2012; Longley 2008). Bemerk werden diese erst während der Anästhesie oder der postoperativen Phase (Flecknell 2015; Henke und Erhardt 2012). Durch ein regelmäßiges Hygienemonitoring entsprechend der FELASA-Empfehlungen (*Federation of European Laboratory Animal Science Associa-*

tions) ist dies in Versuchstierhaltungen jedoch vermeidbar (Mähler Convenor et al. 2014). Auch ist Vorsicht bei der Anästhesie geboten, wenn Ratten sogenannte „Brillenaugen“ aufweisen, also porphyrinhaltiges Sekret von der Harderschen Drüse im medialen Augenwinkel vorhanden ist. Dies weist auf einen schlechten Allgemeinzustand des Tieres und ein verändertes Putzverhalten hin (Henke und Erhardt 2002; Hollmann 2000; Hollmann und Skogstadt 2004).

Die Anästhesie sollte grundsätzlich in der Ruhe- und Lichtphase stattfinden, da die Tiere stärker auf die Narkosemittel ansprechen, als in der Aktivitäts- und Dunkelphase (Rebuelto et al. 2004). Andererseits gehen Störungen der Ruhephase, aufgrund der hochgradigen hormonellen Stressantwort, oftmals mit einer negativen Reaktion auf die Anästhesie einher (Gabriel 2010). Selbst die Fixation des Tieres löst eine massive Stressreaktion aus, wenn sie dies nicht gewohnt sind (Brodgelt 2008).

Zusammenfassend ist eine erfolgreiche Anästhesie abhängig von einer gelungenen Verhinderung von Zwischenfällen im Vorfeld, indem die Methoden optimiert werden (Henke und Erhardt 2012). Die Tiere sind immer

auf ihren Gesundheitszustand zu überprüfen. Für einen Anästhesieplatz von Nagern sollten in Abhängigkeit des Vorhabens bzw. Versuches die Möglichkeit zur Sauerstoffapplikation, Beatmung und Wärmeregulation, kleine Kanülen zur i. v. Applikation bzw. Blutentnahme, eine präzise Waage, sowie zur Überwachung der Vitalparameter ein spezielles *High-Speed* Pulsoxymeter und beispielsweise eine Rektalsonde zur Messung der Körpertemperatur vorhanden sein. Die Augen selbst sind zum Schutz während der Narkose mit Augensalbe zu versorgen, da sie geöffnet bleiben (Ewringmann und Glöckner 2014; Henke und Erhardt 2002, 2012; Wolfensohn und Lloyd 2015).

III. ZIELSETZUNG

Es ist essenziell effektive Behandlungsmöglichkeiten für Menschen und Tiere bei Vergiftungen durch Organophosphate bereit zu halten. Aktuell besteht jedoch trotz intensiver, jahrzehntelanger Forschung hinsichtlich eines effektiven (Breitspektrum-) Therapeutikums gegen phosphororganische Nervenkampfstoffe und Pestizide eine Therapielücke. Dies ist vor allem bei einer Vergiftung durch V-Stoffe wie VX, die sich durch eine hohe biologische Stabilität und lange Persistenz In-vivo auszeichnet, der Fall (Goldsmith et al. 2017; Reiter et al. 2011; Reiter et al. 2015; van der Schans et al. 2003). Die standardtherapeutischen Maßnahmen greifen erst, nachdem die AChE bereits durch das Organophosphat gehemmt wurde. Sie umfassen neben Benzodiazepinen als Antikonvulsivum, Atropin als kompetitiven muskarinergen Rezeptorantagonisten. Ebenso finden Oxime, in der Regel Obidoxim, als Reaktivator der Organophosphat gehemmten AChE Verwendung in der therapeutischen Behandlung (Cannard 2006; Eyer 2003; Eyer et al. 2009; Jett 2007; Marrs et al. 2007; Thiermann et al. 2013).

Bioscavenger haben die Eigenschaft als Therapeutikum bereits früher zu wirken, indem sie das Organophosphat

noch in der Blutbahn inaktivieren, bevor das Zielgewebe erreicht und die dortige AChE durch Phosphorylierung gehemmt wird. Hierdurch werden die Verteilung des Organophosphates reduziert und folglich toxische Effekte abgeschwächt oder sogar verhindert werden (Elsinghorst et al. 2013; Masson und Rochu 2009; Mumford et al. 2013). Dies verdeutlicht den dringenden Bedarf an der Entwicklung neuer wirksamer Therapieansätze im Bereich der *Bioscavenger* (Thiermann et al. 2013; Worek und Thiermann 2013).

Das Hauptziel dieser Arbeit ist es die Wildtyp-PTE (PTE-1) sowie die vielversprechend genetisch modifizierten In-vitro getesteten katalytische *Bioscavenger*-Mutanten PTE-2 (PTE-C23(R152E)-PAS(100)-10-2-C3(I106A/C59V/C227V/E71K)- PAS(200)) (Escher et al. 2020; Köhler et al. 2021) und PTE-3 (10-2-C3(C59V/C227V)-PAS(200)) (Job et al. 2020; Köhler et al. 2021) als Therapeutikum bei Vergiftung durch VX im Tierversuchsmodell Ratte zu untersuchen. Die Hauptzielgröße ist, ob schwerwiegende Vergiftungssymptome auftreten (ja/nein). Dies soll für jedes Tier anhand von Beobachtung geklärt werden. Die Hauptfragestellung lautet, ob die therapeutische Behandlung mit den PTE-

Mutanten das Auftreten klinischer Vergiftungssymptome nach Vergiftung durch VX reduziert.

Im Rahmen der vorliegenden Studie wurden die Daten jeder PTE-Therapiegruppe mit der VX-Kontrollgruppe verglichen. Auf diese Weise sollen wirksame PTE als mögliche Therapeutika identifiziert werden.

Folgende Nebenfragestellungen sollen beantwortet werden:

- Reduziert die Therapie mit den jeweiligen PTE-Mutanten die Sterblichkeit nach Vergiftung durch VX?
- Verlängert die therapeutische Behandlung mit den jeweiligen PTE-Mutanten die Überlebenszeit?
- Senkt die therapeutische Behandlung mit den PTE-Mutanten die VX-Konzentration im Vollblut?
Wie lange ist die VX-Hydrolyse-Halbwertszeit?
- Reduziert die therapeutische Behandlung mit den PTE-Mutanten die Hemmung der AChE-Aktivität der Erythrozyten durch VX im Blut?

- Reduziert die therapeutische Behandlung mit den PTE-Mutanten die Hemmung der AChE-Aktivität durch VX in verschiedenen Geweben?
- Wie lange ist die Halbwertszeit der PTE im Plasma?

IV. PUBLIKATION

Archives of Toxicology (2022) 96:571–583
<https://doi.org/10.1007/s00204-021-03199-6>

MOLECULAR TOXICOLOGY



Post-VX exposure treatment of rats with engineered phosphotriesterases

Lisa Stigler¹ · Anja Köhler^{1,2} · Marianne Koller¹ · Laura Job² · Benjamin Escher² · Heidrun Potschka³ · Horst Thiermann¹ · Arne Skerra² · Franz Worek¹ · Timo Wille¹

Received: 25 October 2021 / Accepted: 9 December 2021 / Published online: 28 December 2021
 © The Author(s) 2021

Abstract

The biologically stable and highly toxic organophosphorus nerve agent (OP) VX poses a major health threat. Standard medical therapy, consisting of reactivators and competitive muscarinic receptor antagonists, is insufficient. Recently, two engineered mutants of the *Brevundimonas diminuta* phosphotriesterase (PTE) with enhanced catalytic efficiency ($k_{cat}/K_M = 21$ to $38 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ min}^{-1}$) towards VX and a preferential hydrolysis of the more toxic P(-) enantiomer were described: PTE-C23(R152E)-PAS(100)-10-2-C3(1106A/C59V/C227V/E71K)-PAS(200) (PTE-2), a single-chain bispecific enzyme with a PAS linker and tag having enlarged substrate spectrum, and 10-2-C3(C59V/C227V)-PAS(200) (PTE-3), a stabilized homodimeric enzyme with a double PASylation tag (PAS-tag) to reduce plasma clearance. To assess in vivo efficacy, these engineered enzymes were tested in an anesthetized rat model post-VX exposure ($\sim 2\text{LD}_{50}$) in comparison with the recombinant wild-type PTE (PTE-1), dosed at 1.0 mg kg^{-1} i.v.; PTE-2 dosed at 1.3 mg kg^{-1} i.v. (PTE-2.1) and 2.6 mg kg^{-1} i.v. (PTE-2.2) and PTE-3 at 1.4 mg kg^{-1} i.v. Injection of the mutants PTE-2.2 and PTE-3, 5 min after s.c. VX exposure, ensured survival and prevented severe signs of a cholinergic crisis. Inhibition of erythrocyte acetylcholinesterase (AChE) could not be prevented. However, medulla oblongata and diaphragm AChE activity was partially preserved. All animals treated with the wild-type enzyme, PTE-1, showed severe cholinergic signs and died during the observation period of 180 min. PTE-2.1 resulted in the survival of all animals, yet accompanied by severe signs of OP poisoning. This study demonstrates for the first time efficient detoxification in vivo achieved with low doses of heterodimeric PTE-2 as well as PTE-3 and indicates the suitability of these engineered enzymes for the development of highly effective catalytic scavengers directed against VX.

Keywords Acetylcholinesterase · Catalytic bioscavenger · Detoxification · Enzyme engineering · In vivo · Organophosphate · PASylation · Phosphotriesterase · Therapy · VX

Introduction

Despite ban by the Chemical Weapons Convention, highly toxic organophosphorus nerve agents (OP) were repeatedly used in military conflicts, terrorist attacks or assassination

attempts. The use of sarin in the Syrian civil war, the supposed VX poisoning of Kim Jong Nam 2017 as well as the homicidal attacks of Sergei Skripal 2018 and of Alexei Navalny 2020 with novichok underline the persistent threat of these vicious compounds (Berlinger 2017; Dewan and Alkashli 2017; Halasz et al. 2020; John et al. 2018; Steindl et al. 2021; Vale et al. 2018).

The high toxicity of OP results from covalent binding to and subsequent inhibition of the pivotal enzyme acetylcholinesterase (AChE). This leads to a synaptic overflow of acetylcholine (ACh), followed by overstimulation and desensitization of muscarinic and nicotinic cholinergic receptors causing a broad spectrum of clinical signs including miosis, salivation and cardiac arrhythmia (Aldridge and Davison 1953; Aldridge and Reiner 1972; Holmstedt 1959). Ultimately, central and peripheral

Timo Wille
 timowille@bundeswehr.org

¹ Bundeswehr Institute of Pharmacology and Toxicology, Neuherbergstraße 11, 80937 Munich, Germany

² Chair of Biological Chemistry, Technical University of Munich, Emil-Erlenmeyer-Forum 5, 85354 Freising, Germany

³ Institute of Pharmacology, Toxicology and Pharmacy, Ludwig-Maximilians-University Munich, Königinstraße 16, 80539 Munich, Germany

respiratory depression may lead to death by asphyxia (Thiermann et al. 2013; Yanagisawa et al. 2006).

For the past 60 years the standard therapy of OP poisoning has been a combination of the competitive muscarinic receptor antagonist atropine and an oxime as AChE reactivator (Cannard 2006; Thiermann et al. 2013). However, multiple in vitro and in vivo studies have shown that this treatment has limited effectiveness against different OP and cannot prevent cholinergic signs (Thiermann et al. 2013; Worek and Thiermann 2013). This triggered extensive research on enzyme-based scavengers to detoxify OP via hydrolysis to less toxic products in the blood compartment, thus preventing the distribution into target tissues and reducing toxicity (Masson and Nachon 2017; Worek et al. 2016a).

Phosphotriesterase (PTE) from *Brevundimonas diminuta* has emerged as a promising candidate for a catalytic bioscavenger (Masson and Rochu 2009; Worek et al. 2016a). Several research groups described PTE variants with improved catalytic activity, broadened substrate spectrum and stereopreference towards the more toxic P(-) nerve agent enantiomer (Bigley et al. 2013, 2015; Cherny et al. 2013; Goldsmith et al. 2017; Worek et al. 2016a). Hereby, a main focus was to improve the detoxification of highly toxic and biologically stable V-agents such as VX (Benschop and de Jong 1988; Masson and Nachon 2017; Reiter et al. 2015).

In fact, post-exposure therapy of VX poisoned guinea pigs with the engineered PTE mutant C23 ($k_{cat}/K_M = 5 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ min}^{-1}$) ensured survival and prevented systemic cholinergic toxicity (Worek et al. 2014), indicating that PTE variants may have the potential for use as pre- and post-exposure prophylaxis as well as post-exposure treatment (Worek et al. 2016b). Another improved mutant, the PTE variant C23AL detoxified VX with $k_{cat}/K_M = 12 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ min}^{-1}$, but in vivo data showed slower kinetics than the expected breakdown of VX extrapolated from in vitro data (Wille et al. 2016).

Theoretical calculations by Ashani et al. (2016) and Worek et al. (2016a) suggest a catalytic enzyme activity of $> 50 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ min}^{-1}$ as a prerequisite for a practically applicable enzyme dose of $\leq 1 \text{ mg kg}^{-1}$ body weight to achieve a VX degradation half-life $< 5 \text{ s}$ for sufficient detoxification. Therefore, new mutants were recently engineered based on previously published variants C23 (Cherny et al. 2013), 10-2-C3 and 10-2-C3-1106A (Goldsmith et al. 2017).

Novel variants were generated to improve catalytic efficacy and stability, e.g. by replacing two unpaired Cys residues by the more inert amino acid Val (Job et al. 2020) or by creating a highly effective PTE heterodimer with broadened substrate spectrum (Escher et al. 2020). These two promising mutants were optimized with regard to extended plasma half-life with an additional C-terminal PAS-tag (Schlapachy et al. 2013) and showed efficient detoxification in vitro

towards a broad substrate spectrum of structurally diverse nerve agents (Köhler et al. 2021).

Consequently, we have now set out to test the efficacy of the two novel PTE mutants, PTE-2 and PTE-3 (Table 1), in comparison with wild-type PTE (PTE-1) in a post-exposure therapy model of VX exposed rats.

Materials and methods

Chemicals

The OP VX (*O*-ethyl *S*-(diisopropylaminoethyl)phosphonothioate; $> 98\%$ by ^1H and ^{31}P NMR) and VR (*O*-isobutyl *S*-(diethylaminoethyl)phosphonothioate; $> 98\%$ by ^1H and ^{31}P NMR) were made available by the German Ministry of Defence. VX and VR stock solutions (1% v/v in acetonitrile) were stored at room temperature. For each in vivo test, a fresh VX working solution ($36 \mu\text{g mL}^{-1}$) was prepared in saline and put on ice until use. For the stereoselective analytics of VX in rat blood samples a VR working solution (20 ng mL^{-1}) was prepared in acetonitrile as internal standard.

Tris[hydroxymethyl]-aminomethane (TRIS), Triton X-100, 5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoic acid) (DTNB), acetylthiocholine iodide (ATCh), and ethopropazine were purchased from Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Germany). Human erythrocyte acetylcholinesterase (AChE) was prepared from heparinized whole blood according to Bierwisch et al. (2014), Dodge et al. (1963), Worek et al. (2002). All other chemicals were purchased from Merck (Darmstadt, Germany).

Protein expression and purification

PTE-1, PTE-2, and PTE-3 (Table 1) were expressed in *Escherichia coli* using previously described plasmids according to published procedures by Escher et al. (2020),

Table 1 Overview of PTE variants tested in vivo

Variant	Molecular mass (Da)
PTE-1 Wild-type PTE ^{a,b}	37,617.9 ^c
PTE-2 PTE-C23(R152E)-PAS(100)-10-2-C3(1106A/C59V/C227V/E71K)-PAS(200) ^{c,d}	98,502.3
PTE-3 10-2-C3(C59V/C227V)-PAS(200) ^{b,c}	54,075.9 ^c

^aCaldwell and Raushel (1991)

^bJob et al. (2020)

^cKöhler et al. (2021)

^dEscher et al. (2020)

^eThese enzymes are non-covalent hetero-dimers, only the mass of one subunit is shown

Job et al. (2020) and Köhler et al. (2021). For production of PTE-1, *E. coli* BL21 was transformed with the expression plasmid encoding wild-type-PTE, whose synthetic gene was inserted between the *KasI* and *HindIII* restriction sites on pASK-IBA5(+) (IBA, Göttingen, Germany), including an N-terminal *Strep*-tag II (Schmidt and Skerra 2007). The bacteria were cultivated at 22 °C in shake flasks with 2 L TB medium (0.017 mol L⁻¹ KH₂PO₄, 0.072 mol L⁻¹ K₂HPO₄, 12 g L⁻¹ Bacto tryptone, 24 g L⁻¹ Bacto yeast extract, 4 mL L⁻¹ glycerol) containing ampicillin (100 mg L⁻¹) and ZnSO₄ (0.2 mmol L⁻¹). Recombinant gene expression was induced at OD₅₅₀ ≈ 1.8–2.2 by adding anhydrotetracycline (200 µg L⁻¹) for up to 15 h. Bacteria were harvested by centrifugation (40 min, 5016 × g, 4 °C), resuspended in 3 mL affinity chromatography buffer (100 mmol L⁻¹ TRIS/HCl, 150 mmol L⁻¹ NaCl, 10 mmol L⁻¹ NaHCO₃, 0.1 mmol L⁻¹ ZnSO₄, pH 8.0) per 1 g wet weight and mechanically disrupted using a high-pressure homogenizer (PandaPLUS 2000; GEA Niro Soavi, Lübeck, Germany). The soluble extract was loaded onto a *Strep*-Tactin column for affinity purification as described (Schmidt and Skerra 2007), followed by dialysis overnight against 20 mmol L⁻¹ Hepes/NaOH, 20 mmol L⁻¹ NaCl, 10 µmol L⁻¹ ZnSO₄ pH 7.2 for PTE-1 and against 20 mmol L⁻¹ Bis-Tris/HCl, 20 mmol L⁻¹ NaCl, 10 µmol L⁻¹ ZnSO₄ pH 6.0 for PTE-3. To remove endotoxin, the homodimeric PTE variants were loaded onto a 6 mL Resource Q anion exchange column (ResQ; Cytiva, Freiburg, Germany) equilibrated with the dialysis buffer. The protein was collected from the flow through and wash fractions. To remove the oligomers of the PTE-2, an anion-exchange chromatography (AEX) was applied using a 6 mL ResQ column (Cytiva, Freiburg, Germany) equilibrated with 20 mmol L⁻¹ Hepes/NaOH, 20 mmol L⁻¹ NaCl, 10 µmol L⁻¹ ZnSO₄ at pH 7. The different species were separated by a linear concentration gradient from 20 to 250 mmol L⁻¹ NaCl in running buffer over 20 column volumes. All PTEs were subjected to size-exclusion chromatography (SEC) on a 120 mL HiLoad Superdex 200 16/60 prep grade column or 320 mL HiLoad Superdex 200 26/60 prep grade column (GE Healthcare, Freiburg, Germany) for final purification and buffer exchange using 50 mmol L⁻¹ TRIS/HCl, 100 mmol L⁻¹ NaCl, 10 µmol L⁻¹ ZnSO₄ pH 8.0 as running buffer. Endotoxin contents were determined using an EndosafePTS system (Charles River Laboratories, Wilmington, MA, USA) and were below 15 EU mg⁻¹ for all proteins. Protein concentrations were quantified using an Ultrospec 2100 pro UV-Vis spectrophotometer (Cytiva, Freiburg, Germany) with a molar absorption coefficient at 280 nm calculated according to Wilkins et al. (1998). Protein purity was determined using SDS/PAGE (Coomassie-stained sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis) using the buffer system of Fling and Gregerson (1986) to be > 99% for all enzyme variants.

Activity measurement of PTE enzymes

The organophosphorus hydrolysis (OPH) rate of VX by the PTE mutant 1 was quantified *in vitro* as described by Goldsmith et al. (2016), Job et al. (2020), and Köhler et al. (2021). PTE-1 was incubated at 37 °C with VX in 50 mmol L⁻¹ TRIS/HCl, 50 mmol L⁻¹ NaCl, pH 8.0 (final concentrations in a total volume of 600 µL: PTE-1 9.8 × 10⁻⁶ mol L⁻¹ and VX 3.3 × 10⁻⁶ mol L⁻¹). At defined time points (1, 7, 14, 20, 30, 45, 60, 90, and 120 min), 50 µL aliquots of this solution were added to an assay mixture (total volume; 3.15 mL) containing acetylthiocholine (ATCh; 0.45 mmol L⁻¹) and Ellman's reagent DTNB (0.3 mmol L⁻¹) in 0.1 mol L⁻¹ phosphate buffer (pH 7.4). To initiate the chromogenic reaction, 10 µL AChE (200 mE/min in phosphate buffer) was added and inhibition curves were recorded at 412 nm at 37 °C for 5 min using a UV-2600 photometer (Shimadzu, Kyoto, Japan). Pseudo-first order rate constants for AChE activity $k_{\text{AChE}}(t_{\text{OPH}})$ and the OPH constant k_{OPH} were obtained and calculated as described by Job et al. (2020) and Köhler et al. (2021). $k_{\text{cat}}/K_{\text{M}}$ of PTE-2 and PTE-3 were taken from Köhler et al. (2021).

Animals

Male Wistar rats (approximately 250–370 g; corresponding to an age range of 7–9 weeks) were purchased from Charles River (Sulzfeld, Germany). In total, $n = 65$ animals were used, five died during preparation. Prior to experiments, the animals were housed at least 7 days for acclimatization under controlled conditions (12 h light/dark cycle [light from 7:00 a.m. to 7:00 p.m.], 20–24 °C, 45–65% humidity) with standard diet (Ssniff Spezialdiäten, Soest, Germany) and tap water *ad libitum* in eurostandard Makrolon cages type IV with heightened lids (Tecniplast, Hohenpeißenberg, Germany). For enrichment a house (Zoonlab, Castrop-Rauxel, Germany), embedding (Rettenmeier&Söhne, Rosenberg, Germany), nestlets and wood wool (both from Zoonlab) were provided and replaced once a week. Every attempt was made to minimize discomfort and pain and to reduce the number of animals used in the study.

All experiments were in conformity with the German Animal Welfare Act of 18th May 2006 (BGBl. I S. 1206, 1313), the European Parliament and Council Directive of 22nd September 2010 (2010/63/EU) and carried out according to the Basel declaration as well as the 3R concept (replace, reduce, refine). The study was ethically approved by the institutional animal protection committee (Ref.-No. 42-34-30-40/G03-19).

Experimental procedure for PTE plasma concentration profile determination

For PTE administration and blood sampling as shown in the time line (Fig. 1a), rats were repetitively anesthetized with short-time isoflurane inhalation (IsoFlo 100% w/w, Abbott Laboratories, Burgdorf, Germany; oxygen as carrier gas), 5% for induction of anesthesia and 2% for maintenance. In advance to vascular cannulation, local anesthetic creme (25 mg g⁻¹ + 25 mg g⁻¹ Prilocaine–Lidocaine; Pierre Fabre, Freiburg, Germany) was applied. To ensure an adequate depth of anesthesia, reflexes were checked regularly. Defined PTE doses were injected into the respective lateral tail vein using a peripheral intravenous inserted catheter (24 Gauge i.v. indwelling cannula, 0.7 × 19 mm; B. Braun, Melsungen, Germany) and flushed with saline before removal. Subsequently, blood samples were taken at various time points from the lateral tail vein over a period of 48 h (10 min, 20 min, 30 min, 60 min, 120 min, 240 min, 480 min, 960 min, 1440 min and 2880 min) with a maximum of five samples per animal. Sterile hypodermic needles were used to prick the vein and the blood samples were collected in heparinized Minivettes (POCT, Sarstedt, Nümbrecht, Germany).

Experimental groups for PTE plasma concentration profiles

The animals ($n = 24$) were divided into three groups by simple randomization. PTE-1 was administered at a dose of 1.0 mg kg⁻¹, the doses of PTE-2 and PTE-3 were adjusted according to the molecular weight to achieve equal

stoichiometries (note that PTE-2 is a single-chain heterodimer with two distinct active sites) (Table 1).

- PTE-1 (1.0 mg kg⁻¹ i.v.; $n=8$).
- PTE-2 (1.3 mg kg⁻¹ i.v.; $n=8$).
- PTE-3 (1.4 mg kg⁻¹ i.v.; $n=8$).

Experimental procedure for the therapeutic efficacy study

Rats were anesthetized by i.m. injection of a mixture of medetomidine (0.15 mg kg⁻¹; Zoetis, Berlin, Germany), midazolam (0.4 mg kg⁻¹; Ratiopharm, Ulm, Germany) and fentanyl (0.1 mg kg⁻¹; Albrecht, Aulendorf, Germany) to reduce suffering from VX challenge. Reflexes were checked for depth of anesthesia throughout the whole experiment and anesthesia re-dosing was applied as required with 1/4–1/3 of the initial dose. Next, the animals were placed on a heatable operating table in supine position, a rectal thermistor was inserted and an electrocardiogram and a pulse oximeter were attached.

Eyes were covered with panthenol eye cream (Jenapharm Mibe, Brehna, Germany) to protect from dehydration. After preparation of the left a. carotis (for blood sampling) and the right v. jugularis (for PTE injection), catheters (24 G × ¼ [0.7 × 19 mm] Introcan; B. Braun) were inserted and fixed. The animals were monitored (blood pressure, heart rate, oxygenation, body temperature) throughout the whole experiment. Clinical signs were observed and heparinized blood samples (250 µL replaced by Ringer's solution) were collected. The first blood sample was taken before and 11 further blood collections were scheduled between 3 and 180 min after subcutaneous injection of 25 µg kg⁻¹ (~2LD₅₀) VX prepared in saline (Misik et al. 2015; Myhrer et al. 2015).

For AChE activity determination, 50 µL whole blood was diluted (1:20) in distilled water, whereas 100 µL whole blood was used for VX analysis. The remaining blood sample was centrifuged and plasma was used for PTE analysis. All samples were snap-frozen in liquid nitrogen and stored at -80 °C until use. Directly after the end of the experiment tissue samples of diaphragm and medulla oblongata were taken and their wet weight determined. For the time line see Fig. 1b.

Experimental groups for the therapeutic efficacy study

The animals ($n = 36$) were divided into six groups by simple randomization:

- Solvent control group (saline i.v. 5 min after saline s.c.; $n=6$).

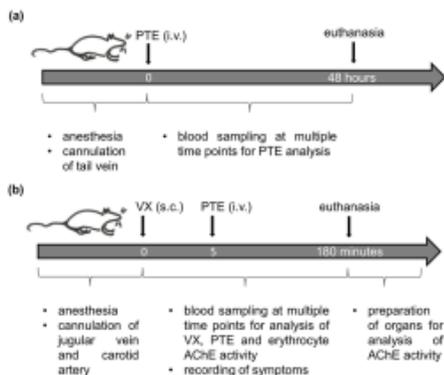


Fig. 1 Time lines for the determination of the PTE plasma profile (a) and the therapeutic efficacy study (b)

- VX control group (saline i.v. 5 min after 25 $\mu\text{g kg}^{-1}$ VX s.c.; $n=6$).
- PTE-1 treatment group (1.0 mg kg^{-1} PTE-1 i.v. 5 min after 25 $\mu\text{g kg}^{-1}$ VX s.c.; $n=8$).
- PTE-2.1 treatment group (1.3 mg kg^{-1} PTE-2 i.v. 5 min after 25 $\mu\text{g kg}^{-1}$ VX s.c.; $n=4$).
- PTE-2.2 treatment group (2.6 mg kg^{-1} PTE-2 i.v. 5 min after 25 $\mu\text{g kg}^{-1}$ VX s.c.; $n=4$).
- PTE-3 treatment group (1.4 mg kg^{-1} PTE-3 i.v. 5 min after 25 $\mu\text{g kg}^{-1}$ VX s.c.; $n=8$).

PTE analysis

PTE concentrations in plasma samples were determined by means of the enzymatic activity via hydrolysis of paraoxon-ethyl (PXE) as a chromogenic substrate. For calibration curves of each PTE mutant, 2 μL of the purified recombinant enzyme solution was diluted in TZN buffer (50 mmol L^{-1} TRIS/HCl, 10 $\mu\text{mol L}^{-1}$ ZnSO_4 , 50 mmol L^{-1} NaCl, pH 8.0) and added to 48 μL heparinized plasma from untreated rats up to final PTE concentrations between 1 and 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Plasma samples from the in vivo study were diluted in TZN buffer (PTE-1 and PTE-3, 1:5; PTE-2, 1:10). After incubation on ice for 2 h, all samples were further diluted (PTE-1, 1:80; PTE-2, 1:20; PTE-3, 1:40) in TZN buffer. Then, 150 μL PXE substrate solution (1 mmol L^{-1} in TZN buffer) was mixed each with 50 μL sample solution in a 96-well plate (cell culture plate, 96-well, PS, flat bottom; Greiner Bio-One, Frickenhausen, Germany). The change in absorbance at 400 nm was immediately recorded using an infinite M200 PRO plate reader (Tecan, Wien, Austria) at 25 °C for 2 min. The time-dependent absorbance of samples from the calibration curve and plasma were calculated in mA min^{-1} . Pre-determined calibration curves were used for the calculation of the enzyme level in plasma samples. The corresponding circulation half-life (PTE $t_{1/2}$) was obtained using a one-compartment model with a mono-exponential decay of the calculated plasma enzyme levels versus the blood collection time points, and the maximal (initial) plasma concentration of PTE variants (C_{max}) was estimated by retrograde extrapolation of the mono-exponential curve fit using Prism Version 4.03 (GraphPad, San Diego, CA, USA).

AChE activity assay

Diaphragm and medulla oblongata were removed after the end of the experiment or death of the animal, snap-frozen in liquid nitrogen and stored at -80 °C until the determination of the AChE activity.

Diaphragm was mixed with a tenfold volume of TRIS/HCl buffer (50 mmol L^{-1} , pH 7.4), supplemented with EDTA (5 mmol L^{-1}) and 1% v/v Triton X-100 followed by homogenization of the mixture with a T 25

digital ULTRA-TURRAX (IKA, Staufen, Germany). Medulla oblongata was mixed with a tenfold volume of phosphate buffer (0.1 mol L^{-1} , pH 7.4) containing 1% v/v Triton X-100. This mixture was subsequently homogenized with a glass-Teflon Potter (B. Braun). Afterwards, the homogenate was centrifuged (Microfuge 22; Hettich, Tuttlingen, Germany) at maximum speed for 5 min. The supernatant was used to measure the AChE activity according to a modified Ellman assay (Worek et al. 1999). The total protein concentration was determined with a bicinchoninic acid assay (Protein Quantification Kit; Interchim Uptima, Montlucon, France) using bovine serum albumin as standard (Smith et al. 1985).

For analysis of all in vivo AChE activities polystyrol cuvettes were filled with phosphate buffer (0.1 mol L^{-1} , pH 7.4), 0.3 mmol L^{-1} DTNB and 0.02 mmol L^{-1} ethopropazine. After adding the sample the assay was started by adding 0.45 mmol L^{-1} ATCh and the absorbance change was recorded at 436 nm at 37 °C (Cary 50; Varian, Darmstadt, Germany). Erythrocyte AChE activity was referenced to the hemoglobin concentration of the respective blood dilution (Worek et al. 1999) and was calculated as $\text{mU } \mu\text{mol}^{-1}$ Hb. Diaphragm and brain AChE activity were referenced to the total protein concentration determined by the bicinchoninic acid method (Smith et al. 1985) and presented as mU mg^{-1} .

Analysis of VX in blood samples

VX enantiomers in blood samples were quantified by LC–MS/MS as described before (Reiter et al. 2008, 2011) with slight modifications. 100 μL thawed, heparinized rat whole blood was diluted with 300 μL water and mixed with 37.5 μL 1 mol L^{-1} perchloric acid, followed by addition of 7.5 μL 1 mol L^{-1} potassium acetate, and vortexed. The precipitated proteins were separated by centrifugation for 10 min at 21,290 $\times g$ at 4 °C. The supernatant was mixed with 50 μL of 0.5% w/v ammonium hydroxide and 5 μL of internal standard solution (20 ng mL^{-1} VR working solution prepared in acetonitrile) and centrifuged again for 3 min at 21,290 $\times g$ at 4 °C. The sample was applied to a pre-conditioned (1 mL methanol, 1 mL purified water; Milli-Q, Merck Millipore, Schwalbach, Germany) SPE cartridge (Strata-X PRP, 30 mg, 1 mL; Phenomenex, Aschaffenburg, Germany) on a vacuum manifold. The column bed was rinsed with 1 mL water and carefully dried under maximum vacuum. The sample was eluted with 500 μL acetonitrile and collected in a cup filled with 50 μL purified water as keeper. The organic phase was evaporated in a vacuum rotation concentrator (50 min at room temperature) with 11,360 $\times g$ and the residue was reconstituted with 100 μL purified water.

The analytical LC–MS/MS system for the quantification of VX enantiomers consisted of a Prominence HPLC system

(Shimadzu Deutschland, Duisburg, Germany) and a QTRAP 6500 mass spectrometer (Sciex, Darmstadt, Germany).

Peak separation was achieved with a Chiralpak AGP column (150 × 2.1 mm, 5 μm, VWR, Darmstadt, Germany) at a flow rate of 175 μL min⁻¹ using 25 mmol L⁻¹ ammonium formate (pH 8.5) in water (eluent A) and 25 mmol L⁻¹ ammonium formate (pH 8.5) in 1:1 methanol–water (eluent B) with the following gradients: 90% A (0–3 min), 90–50% A (3–23 min), 50% A (23–26 min), 50–90% A (26–27 min), 90% A (27–30 min). The injection volume was 10 μL, applied at a column temperature of 30 °C.

Two MRM (multiple reaction monitoring) transitions each for VX and VR (internal standard) were selected for detection after positive electrospray ionization at 5.5 kV with a source temperature of 400 °C and by applying the following declustering potentials and collision energies, respectively: *m/z* 268.1 → 128.1 (120, 25), *m/z* 268.1 → 86.0 (146, 32) for VX and *m/z* 268.1 → 100.1 (120, 25), *m/z* 268.1 → 72.2 (121, 42) for VR.

Gas 1, gas 2, and curtain gas were set at 35, 40, 45 arbitrary units. The entrance potential was set to 5.0 V, cell exit potential was set to 12 V. Dwell time was 750 ms and resolution was “unit” for both quadrupoles.

Calculation of VX half-life

The theoretical half-life of VX hydrolysis (VX $t_{1/2}$) was calculated by Eq. (1) according to Worek et al. (2016a) using in vitro k_{cat}/K_M and the maximal plasma concentration of PTE variants (C_{max}):

$$VX\ t_{1/2} = \frac{\ln(2)}{\frac{k_{cat}}{K_M} \times C_{max}} \quad (1)$$

Data analysis

Data are shown as mean ± standard deviation (SD). Data analysis and statistical comparisons were performed using Prism Version 5.04.

For the analysis of the diaphragm and medulla oblongata AChE activity differences between groups, a one-way repeated measure analysis of variance (ANOVA) with Bonferroni post-hoc test multiple comparison test was used. A $p < 0.05$ value was considered to be statistically significant.

Results

PTE plasma concentration profile in vivo

As a prerequisite to study the protective effect of the newly engineered PTE enzymes, PTE-2 and PTE-3 in comparison

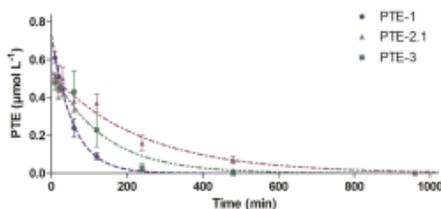


Fig. 2 PTE plasma concentration profile in rats over 48 h after injection of PTE-1 (1.0 mg kg⁻¹ i.v.), PTE-2 (1.3 mg kg⁻¹ i.v.) or PTE-3 (1.4 mg kg⁻¹ i.v.)

Table 2 Calculated VX degradation by PTE variants

Group	k_{cat}/K_M (M ⁻¹ min ⁻¹)	C_{max} (mol L ⁻¹)	$t_{1/2}$ (s)	Time to 96% VX degradation (s)
PTE-1	0.02×10^6	5.7×10^{-7}	3632	18,200
PTE-2.1	21×10^6	2.4×10^{-7}	8.2	41.1
PTE-2.2	21×10^6	6.3×10^{-7}	3.1	15.7
PTE-3	38×10^6	4.6×10^{-7}	2.4	11.8

C_{max} was taken from the PTE plasma profile of the therapeutic efficacy study. Degradation half-life was calculated with Eq. (1) and time to 96% VX degradation was estimated as $5 \times t_{1/2}$

to wild-type PTE-1, against VX exposure in rats their pharmacokinetics (PK) after i.v. injection was studied in the same species (Fig. 1a). PTE concentrations were analyzed according to the one compartment model, resulting in plasma half-life values (PTE $t_{1/2}$) of 39 min, 165 min and 94 min for PTE-1, PTE-2, and PTE-3, respectively (Fig. 2). As expected, the application of PASylation technology (Schlapschy et al. 2013) led to a considerable extension of the PK for PTE-2 and PTE-3. This effect was most pronounced for the single-chain heterodimeric enzyme PTE-2 which has its both subunits linked by a 100 residue PAS linker (Escher et al. 2020).

Calculated VX hydrolysis

From our previous studies, it was known that PTE-2 and PTE-3 show high catalytic efficiencies (k_{cat}/K_M) towards VX hydrolysis in vitro (Table 2), which are by three orders higher than the one of wild-type PTE (PTE-1), whose k_{cat}/K_M value of 0.02×10^6 M⁻¹ min⁻¹ for VX was determined in the present study. The maximum PTE plasma concentrations (C_{max}), which were obtained from the PK analysis, allowed us to estimate half-lives of VX hydrolysis

in vivo ($VX t_{1/2}$) which were below 10 s for the engineered enzymes but above 1 h for wild-type PTE (Table 2).

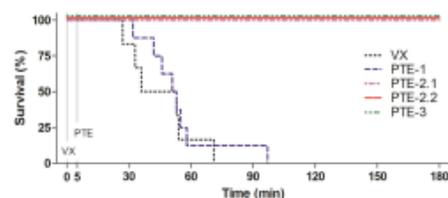


Fig. 3 Survival plot showing the survival of rats after VX exposure ($25 \mu\text{g kg}^{-1}$ s.c.) without treatment, for the VX control group, and with PTE treatment (i.v., 5 min after intoxication), for the groups PTE-1 (1.0 mg kg^{-1} i.v.), PTE-2.1 (1.3 mg kg^{-1} i.v.), PTE-2.2 (2.6 mg kg^{-1} i.v.) and PTE-3 (1.4 mg kg^{-1} i.v.)

Therapeutic efficacy study

Clinical signs and survival

Subcutaneous injection of $25 \mu\text{g kg}^{-1}$ ($\sim 2\text{LD}_{50}$) VX (Misik et al. 2015; Myhrer et al. 2015) resulted in signs of chewing and an early onset of local muscle fasciculations directly at the injection site in all animals of the VX control, PTE-1 and PTE-2.1 groups. Chewing was observed in one single animal each of the PTE-2.2 and PTE-3 groups and local fasciculations were seen directly at the VX injection site in two animals of the PTE-2.2 group and in five animals of the PTE-3 group (data not shown).

All degrees of convulsions, from uncontrolled muscle movements of head to forelimbs, hind legs and the entire body, were noted. Furthermore, respiratory distress was observed including the whole spectrum from labored breathing to respiratory depression. Over time, all animals of the VX control group and of the PTE-1 therapy group developed increasingly severe signs of a cholinergic crisis which persisted until death (Fig. 4). All animals of the VX

Signs/Time (min)		0 – 20	21 – 40	41 – 60	90	120	150	180
VX	Convulsions							
	Respiratory distress							
PTE-1	Convulsions							
	Respiratory distress							
PTE-2.1	Convulsions							
	Respiratory distress							
PTE-2.2	Convulsions							
	Respiratory distress							
PTE-3	Convulsions							
	Respiratory distress							

Fig. 4 Clinical signs and survival of VX exposed rats without treatment and with post-exposure treatment of PTE-1, PTE-2 and PTE-3. Time of survival is given in minutes and each line represents an individual animal. Time of death is shown by grey, hatched lines. The signs are subdivided into convulsions (local, generalized) and respiratory distress (labored breathing, respiratory depression).

$25 \mu\text{g kg}^{-1}$ VX s.c. (VX); $25 \mu\text{g kg}^{-1}$ VX s.c. followed after 5 min by 1.0 mg kg^{-1} PTE-1 i.v. (PTE-1); $25 \mu\text{g kg}^{-1}$ VX s.c. followed after 5 min by 1.3 mg kg^{-1} PTE-2 i.v. (PTE-2.1); $25 \mu\text{g kg}^{-1}$ VX s.c. followed after 5 min by 2.6 mg kg^{-1} PTE-2 i.v. (PTE-2.2); $25 \mu\text{g kg}^{-1}$ VX s.c. followed after 5 min by 1.4 mg kg^{-1} PTE-3 i.v. (PTE-3)

control group died between 27 and 71 min after subcutaneous VX injection (mean: 46 ± 17 min). The animals of the PTE-1 therapy group survived only slightly longer, between 32 and 97 min (mean: 54 ± 19 min) after s.c. VX injection (Fig. 3). In contrast, all rats treated with PTE-2.1, PTE-2.2 and PTE-3 survived until the end of the observation period of 180 min (Fig. 3). Only one of four VX poisoned rats treated with PTE-2.1 showed a longer-lasting dyspnea until the end of the observation period, whereas convulsions persisted in three of four rats (Fig. 4). Notably, none of the animals treated with PTE-2.2 and PTE-3 showed convulsions or respiratory distress as severe clinical signs throughout the experiment (Fig. 4).

Erythrocyte AChE activity

Erythrocyte AChE activities of animals prior to VX exposure and PTE treatment were 147 ± 14 mU μmol^{-1} Hb (PTE-1 treatment group), 141 ± 15 mU μmol^{-1} Hb (PTE-2.1 treatment group), 148 ± 21 mU μmol^{-1} Hb (PTE-2.2 treatment group), and 148 ± 16 mU μmol^{-1} Hb (PTE-3 treatment group). VX poisoning resulted in a rapid decrease of erythrocyte AChE activity in all groups and could not be prevented by administration of either PTE mutant (Fig. 5).

Tissue AChE activity

VX poisoning resulted in an almost complete inhibition of medulla oblongata and diaphragm AChE activity (Figs. 6, 7). Therapy with PTE-1 had no protective effect whereas administration of PTE-2 and PTE-3 resulted in a partial preservation of AChE activity in these tissues. This effect was statistically significant in the PTE-2.2 and PTE-3 groups compared to VX and PTE-1 (Figs. 6, 7).

VX blood concentration

The quantification of VX enantiomers in whole blood samples revealed a rapid increase of (+)-VX and a delayed increase of the more toxic (–)-VX enantiomer (Fig. 8). In the VX control and PTE-1 treatment groups the concentration of both enantiomers increased during the further course of the experiment (Fig. 8). The analysis of (+)-VX in the VX control group showed a sharp increase in concentration up to 4.4 nmol L^{-1} within the first 6 min after VX administration and a maximum concentration of 5.4 nmol L^{-1} . The (–)-VX concentration showed a delayed increase with 1.5 nmol L^{-1} at the sampling time (6 min) and a lower maximal concentration of 3.4 nmol L^{-1} (Fig. 8). In contrast, administration of PTE-2 and PTE-3 5 min after VX challenge resulted in an ongoing hydrolysis, resulting in lower concentrations of

(–)-VX (and (+)-VX) (Fig. 8). PTE-2.2 and PTE-3 treatment groups showed (+)-VX peak concentrations of 2.0 nmol L^{-1} and 1.9 nmol L^{-1} , respectively, at 3 min with a subsequent decrease in concentration. The (–)-VX concentration exhibited only a very slight increase up to a maximum of 0.3 nmol L^{-1} for the PTE-2.2 treatment group and 0.2 nmol L^{-1} for the PTE-3 treatment group at 3 min, with subsequent concentration below the quantification limit (Fig. 8).

Discussion

This study demonstrates the efficacy of post-exposure therapy of VX poisoned animals with the new PTE mutants PTE-2 and PTE-3. PTE-3 is a hyperactive stabilized homodimeric enzyme (Job et al. 2020) carrying two PAS(200) tags (Schlapschy et al. 2013) whereas PTE-2 is a single-chain version with two distinct engineered active sites (Escher et al. 2020) whose two subunits are linked by a PAS(100) spacer and which is equipped with one PAS(200) tag (Table 1).

Efficient OP detoxification requires a sufficiently high catalytic activity, which can be determined in vitro (k_{cat}/K_m). Previous studies have postulated that a k_{cat}/K_m of at least $50 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ min}^{-1}$ is needed for successful therapy of VX poisoning at a reasonable enzyme dose of 1 mg kg^{-1} (Ashani et al. 2016; Worek et al. 2016a). Lower degradation rates or lower enzyme doses may still ensure survival but not prevent severe toxic effects.

Knowledge of the k_{cat}/K_m values and the PTE plasma concentration enables the calculation of VX degradation half-lives (Table 2) (Worek et al. 2014). Our results demonstrate that the recombinant wild-type PTE from *Brevundimonas diminuta* (PTE-1), with an in vitro k_{cat}/K_m value of $0.02 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ min}^{-1}$, was ineffective in vivo to treat VX poisoning. Throughout the experiment the PTE-1 treatment group revealed increasingly severe toxic signs and circulatory depression (data not shown) similar to the VX control group (Fig. 4). Our findings for PTE-1 are in line with prior data from Masson and Rochu (2009) and Kolakowski et al. (1997), who determined a negligible protective effect of wild-type PTE against V-type nerve agents.

In contrast, the novel engineered enzyme PTE-3, with an in vitro k_{cat}/K_m of $38.1 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ min}^{-1}$, was able to prevent both mortality and severe toxicity in vivo. In comparison, the bispecific variant PTE-2, with an in vitro k_{cat}/K_m of $20.7 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ min}^{-1}$, was able to prevent mortality but not severe toxicity (convulsions, respiratory distress) at the initial dose of 1 mg kg^{-1} (Fig. 4). However, administration of a doubled PTE-2 dose was successful with regard to preventing severe toxic signs and ensuring survival.

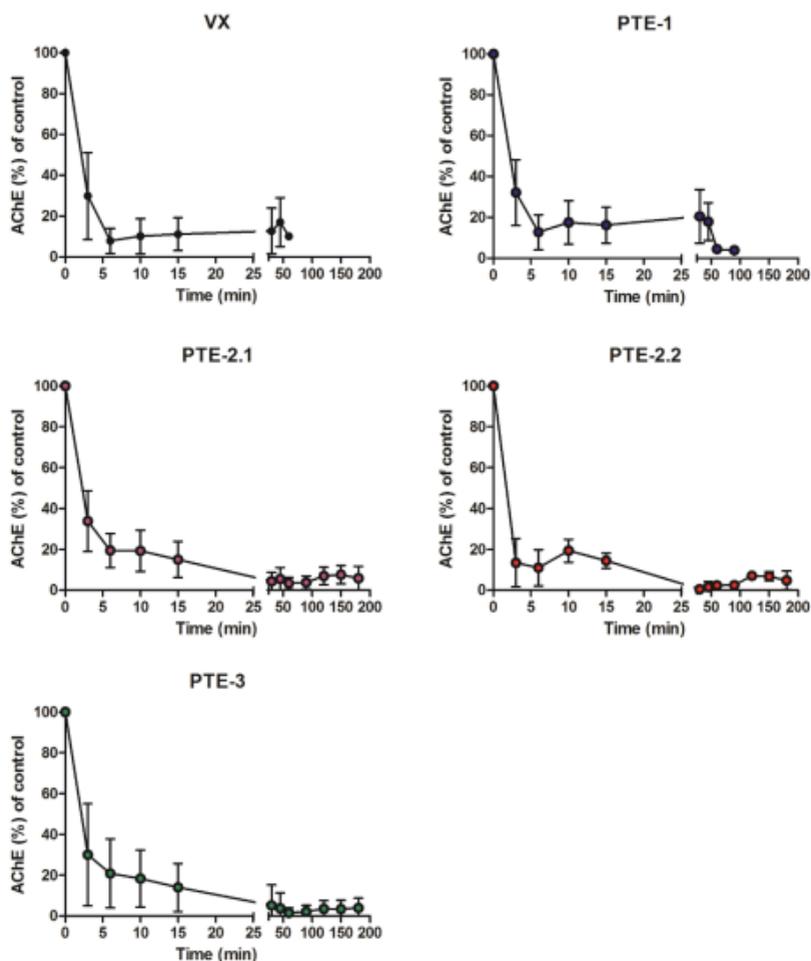


Fig. 5 Time-dependent changes of erythrocyte AChE activity. 25 $\mu\text{g kg}^{-1}$ VX s.c. (VX); 25 $\mu\text{g kg}^{-1}$ VX s.c. followed after 5 min by 1.0 mg kg^{-1} PTE-1 i.v. (PTE-1); 25 $\mu\text{g kg}^{-1}$ VX s.c. followed after 5 min by 1.3 mg kg^{-1} PTE-2 i.v. (PTE-2.1); 25 $\mu\text{g kg}^{-1}$ VX s.c. fol-

lowed after 5 min by 2.6 mg kg^{-1} PTE-2 i.v. (PTE-2.2); 25 $\mu\text{g kg}^{-1}$ VX s.c. followed after 5 min by 1.4 mg kg^{-1} PTE-3 i.v. (PTE-3). Data are shown as % of solvent control activity (mean \pm SD)

The therapeutic success of the PTE-2 and PTE-3 enzymes is mainly based on their high catalytic activities. Available k_{cat}/K_m values and PTE plasma concentrations allow a first approximation of the degradation half-time (Table 2). These data indicate a negligible VX degradation in a relevant time window by PTE-1, whereas PTE-2 (PTE-2.2) and PTE-3

show extremely short $t_{1/2}$ values of 3.1 and 2.4 s, respectively. For a more detailed analysis, the extended circulation of the PASylated enzymes has to be taken into account, which further boosts the OP degradation as will be discussed below.

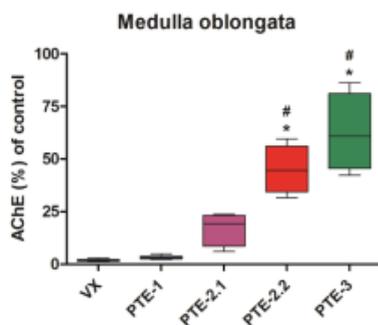


Fig. 6 Medulla oblongata AChE activity of the VX control group and the PTE-1, PTE-2, PTE-2.2 and PTE-3 treated rat groups. Data are presented as % of pre-exposure control AChE activity as mean values \pm SD using box plots with min to max whiskers. ($^{\#}p < 0.05$ versus VX control group; $^*p < 0.05$ versus PTE-1 group)

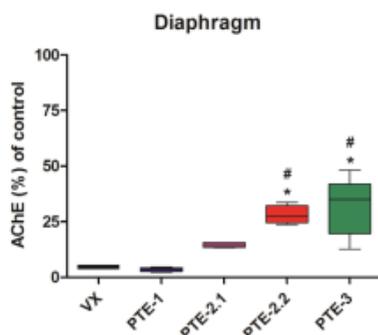


Fig. 7 Diaphragm AChE activity of the VX control group and the PTE-1, PTE-2, PTE-2.2 and PTE-3 treated rat groups. Data are presented as % of pre-exposure control AChE activity as mean values \pm SD using box plots with min to max whiskers. ($^{\#}p < 0.05$ versus VX control group; $^*p < 0.05$ versus PTE-1 group)

These theoretical considerations are supported by analyses of the VX enantiomer concentrations in vivo (Fig. 8). There was a gradual increase and persistence of both (–) and (+)-VX in the VX control and PTE-1 groups, whereas in the PTE-2 and PTE-3 treatment groups (–)-VX levels were at or below the limit of quantification shortly after administration of PTE (Fig. 8). Notably, the (+)-VX level also decreased after PTE administration in these groups, which corresponds to previous in vitro data on the stereoselective

degradation of VX by PTE-2 (BdPTE-7) and PTE-3 (BdPTE-4), showing a preferential but not exclusive hydrolysis of (–)-VX (Köhler et al. 2021).

The s.c. VX injection resulted in a delayed appearance of (–)-VX in the blood, relevant (–)-VX concentrations were first observed in the 6 min samples of the VX control and PTE-1 groups. This is in accordance with the slightly delayed inhibition of erythrocyte AChE activity and the emerging first signs of VX poisoning in the VX control group between 11 to 26 min (Fig. 4).

The difference in catalytic efficiency and therapeutic efficacy between the PTE variants is also reflected by AChE activities in the diaphragm and medulla oblongata (Figs. 6, 7). While a virtually complete AChE inhibition was observed in the VX control and PTE-1 groups, enzyme activity was partially preserved in the PTE-2 and PTE-3 groups. This indicates that distribution of VX from the central blood compartment into target tissues could not be fully prevented but was reduced substantially depending on the catalytic activity of the different PTE variants and/or concentrations, i.e. PTE-3 > PTE-2.2 > PTE-2.1 >> PTE-1.

Efficient detoxification requires not only a high catalytic activity of PTE but also a long biological half-life. This is of special importance in the case of VX and related agents since V-agents exhibit a high biological stability and long persistence in vivo (Goldsmith et al. 2017; Reiter et al. 2011, 2015; van der Schans et al. 2003). In fact, in the case of VX poisoning current standard therapy with atropine and oxime must be administered over a prolonged period of time to preserve a sufficient level of active AChE and to ensure survival (Joosen et al. 2010). Hence, extension of the residence time of PTE in blood is the second key for a successful treatment. The PTE variants PTE-2 and PTE-3 were modified using PASylation technology (Binder and Skerra, 2017) in different ways, as explained above (Table 1). Plasma half-life of the unmodified wild-type PTE-1 was only 39 min whereas PTE-2 and PTE-3 showed a half-life of 165 min and 94 min (Fig. 2), respectively, which demonstrates that the PAS-tag has the ability to extend plasma half-life considerably. In fact, even more prolonged circulation can be expected when using longer PAS polypeptides, e.g. with 600 residues (Schlappschy et al. 2013; Binder and Skerra 2017; Gebauer and Skerra 2018).

The present study was based on anesthetized rats and s.c. administration of VX, which was due to animal welfare considerations and refinement at this stage of in vivo investigation. Further studies in conscious animals with percutaneous VX exposure are needed to verify the results and to more precisely evaluate required PTE doses and, potentially, the need for repeated PTE administration. Such studies are also needed to define the window of opportunity, i.e. the maximum time between agent exposure

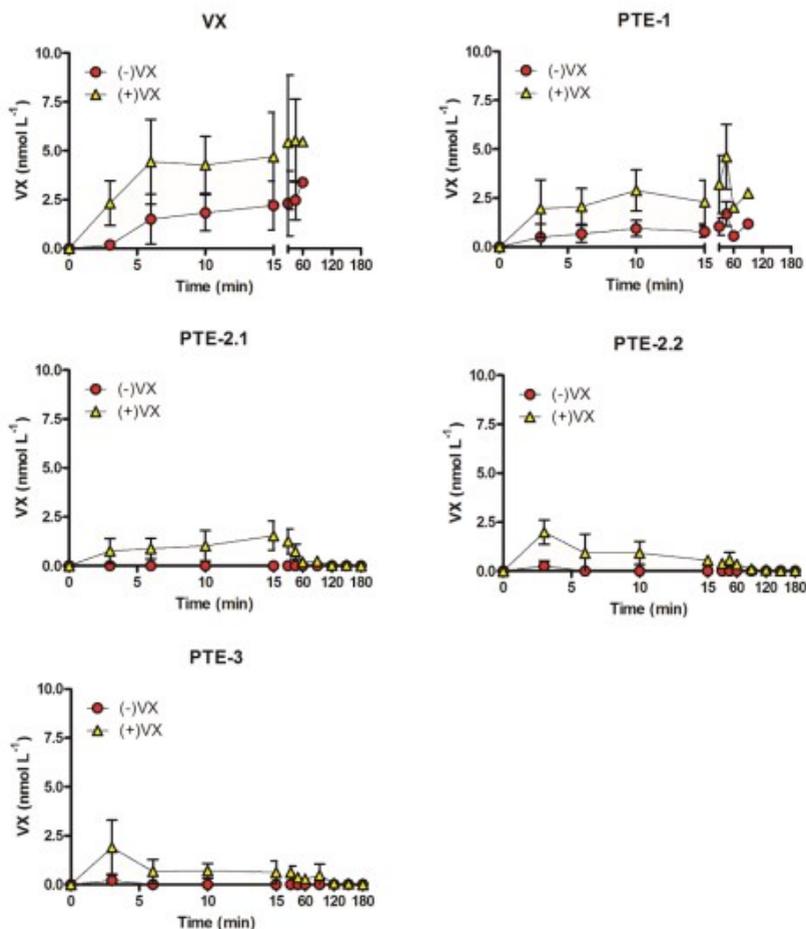


Fig. 8 Concentration of VX enantiomers in whole blood samples. 25 $\mu\text{g kg}^{-1}$ VX s.c. (VX); 25 $\mu\text{g kg}^{-1}$ VX s.c. followed after 5 min by 1.0 mg kg^{-1} PTE-1 i.v. (PTE-1); 25 $\mu\text{g kg}^{-1}$ VX s.c. followed after 5 min by 1.3 mg kg^{-1} PTE-2 i.v. (PTE-2.1); 25 $\mu\text{g kg}^{-1}$ VX s.c. fol-

lowed after 5 min by 2.6 mg kg^{-1} PTE-2 i.v. (PTE-2.2); 25 $\mu\text{g kg}^{-1}$ VX s.c. followed after 5 min by 1.4 mg kg^{-1} PTE-3 i.v. (PTE-3). Data are given in nmol L^{-1} per VX enantiomer as mean values \pm SD

and PTE administration without risking severe signs of toxicity.

In conclusion, this study has demonstrated the potential of the engineered phosphotriesterases PTE-2 and PTE-3 as post-VX exposure treatment in order to prevent systemic

toxicity and mortality. PASylation of PTE variants led to extended plasma half-life of these enzymes which is of special importance in the case of persistent nerve agents. Hence, the engineered PTE mutants PTE-2 and PTE-3 offer promising candidates as catalytic bioscavengers and deserve further investigation *in vivo*.

Acknowledgements The excellent technical assistance of N. Boos, N. Fiedler, S. Hänel, K. Kettner, L. Seck, A. Schröder, J. Schürger, M. Urban and A. Wosar is gratefully acknowledged.

Funding Open Access funding enabled and organized by Projekt DEAL.

Declarations

Conflict of interest A.S. is cofounder and shareholder of XL-protein GmbH. All other authors declare that there are no conflicts of interest.

Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

References

- Aldridge WN, Davison AN (1953) The mechanism of inhibition of cholinesterases by organophosphorus compounds. *Biochem J* 55(5):763–766. <https://doi.org/10.1042/bj0550763>
- Aldridge WN, Reiner E (1972) Enzyme inhibitors as substrates: interactions of esterases with esters of organophosphorus and carbamic acids (*Frontiers of Biology*, 26). North-Holland Publ. Co, Amsterdam
- Ashani Y, Leader H, Aggarwal N, Silman I, Worek F, Sussman JL, Goldsmith M (2016) *In vitro* evaluation of the catalytic activity of paraoxonases and phosphotriesterases predicts the enzyme circulatory levels required for *in vivo* protection against organophosphate intoxications. *Chem Biol Interact* 259(B):252–256. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2016.04.039>
- Benschop HP, de Jong LPA (1988) Nerve agent stereoisomers: analysis, isolation and toxicology. *Acc Chem Res* 21(10):368–374. <https://doi.org/10.1021/ar00154a003>
- Berflinger J (2017) VX nerve agent used to kill Kim Jong Nam, police say. CNN. <https://edition.cnn.com/2017/02/23/asia/kim-jong-nam-vx-nerve-agent/index.html>. Accessed 28 Sep 2020
- Bierwisch A, Zengerle M, Thiermann H, Kubik S, Worek F (2014) Detoxification of alkyl methylphosphonofluoridates by an oxime-substituted β -cyclodextrin—an *in vitro* structure-activity study. *Toxicol Lett* 224(2):209–214. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2013.10.024>
- Bigley AN, Xu C, Henderson TJ, Harvey SP, Raushel FM (2013) Enzymatic neutralization of the chemical warfare agent VX: evolution of phosphotriesterase for phosphorothioate hydrolysis. *J Am Chem Soc* 135(28):10426–10432. <https://doi.org/10.1021/ja402832z>
- Bigley AN, Mabanglo MF, Harvey SP, Raushel FM (2015) Variants of phosphotriesterase for the enhanced detoxification of the chemical warfare agent VR. *Biochemistry* 54(35):5502–5512. <https://doi.org/10.1021/acs.biochem.5b00629>
- Binder U, Skerra A (2017) PASylation®: a versatile technology to extend drug delivery. *Curr Opin Colloid Interface Sci* 31:10–17. <https://doi.org/10.1016/j.cocis.2017.06.004>
- Caldwell SR, Raushel FM (1991) Detoxification of organophosphate pesticides using a nylon based immobilized phosphotriesterase from *Pseudomonas diminuta*. *Appl Biochem Biotechnol* 31(1):59–73. <https://doi.org/10.1007/BF02922126>
- Cannard K (2006) The acute treatment of nerve agent exposure. *J Neurol Sci* 249(1):86–94. <https://doi.org/10.1016/j.jns.2006.06.008>
- Cherny I, Greisen P Jr, Ashani Y, Khare SD, Oberdorfer G, Leader H, Baker D, Tawfik DS (2013) Engineering V-type nerve agents detoxifying enzymes using computationally focused libraries. *ACS Chem Biol* 8(11):2394–2403. <https://doi.org/10.1021/cb4004892>
- Dewan A, Alkashli H (2017) Syria chemical attack: authority finds “incontrollable” evidence of Sarin. CNN. <https://edition.cnn.com/2017/04/20/middleeast/syria-chemical-attack-sarin-opcw/index.html>. Accessed 8 Jul 2021
- Dodge JT, Mitchell C, Hanahan DJ (1963) The preparation and chemical characteristics of hemoglobin-free ghosts of human erythrocytes. *Arch Biochem Biophys* 100:119–130. [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(63\)90042-0](https://doi.org/10.1016/0003-9861(63)90042-0)
- Escher B, Köhler A, Job L, Worek F, Skerra A (2020) Translating the concept of bispecific antibodies to engineering heterodimeric phosphotriesterases with broad organophosphate substrate recognition. *Biochemistry* 59(45):4395–4406. <https://doi.org/10.1021/acs.biochem.0c00751>
- Fling SP, Gregerson DS (1986) Peptide and protein molecular weight determination by electrophoresis using a high-molarity tris buffer system without urea. *Anal Biochem* 155(1):83–88. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(86\)90228-9](https://doi.org/10.1016/0003-2697(86)90228-9)
- Gebauer M, Skerra A (2018) Prospects of PASylation® for the design of protein and peptide therapeutics with extended half-life and enhanced activity. *Bioorg Med Chem* 26:2882–2887. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2017.09.016>
- Goldsmith M, Eckstein S, Ashani Y, Greisen P Jr, Leader H, Sussman J, Aggarwal N, Ovchinnikov S, Tawfik D, Baker D, Thiermann H, Worek F (2016) Catalytic efficiencies of directly evolved phosphotriesterase variants with structurally different organophosphorus compounds *in vitro*. *Arch Toxicol* 90:2711–2724. <https://doi.org/10.1007/s00204-015-1626-2>
- Goldsmith M, Aggarwal N, Ashani Y, Jubran H, Greisen PJR, Ovchinnikov S, Leader H, Baker D, Sussman JL, Goldenzweig A, Fleishman SJ, Tawfik DS (2017) Overcoming an optimization plateau in the directed evolution of highly efficient nerve agent bioscavengers. *Protein Eng Des Sel* 30(4):333–345. <https://doi.org/10.1093/protein/gzx003>
- Halasz S, Bryony Jones, Gianluca Mezzofiore (2020) Novichok nerve agent used in Alexey Navalny poisoning, says German government. CNN. <https://edition.cnn.com/2020/09/02/europe/alexey-navalny-novichok-intl/index.html>. Accessed 28 Sep 2020
- Holmstedt B (1959) Pharmacology of organophosphorus cholinesterase inhibitors. *Pharmacol Rev* 11:567–688
- Job L, Köhler A, Escher B, Worek F, Skerra A (2020) A catalytic bioscavenger with improved stability and reduced susceptibility to oxidation for treatment of acute poisoning with neurotoxic organophosphorus compounds. *Toxicol Lett* 321:138–145. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2019.12.030>
- John H, van der Schans MJ, Koller M, Spruit HET, Worek F, Thiermann H, Noort D (2018) Fatal sarin poisoning in Syria 2013:

- Forensic verification within an international laboratory network. *Forensic Toxicol* 36(1):61–71. <https://doi.org/10.1007/s11419-017-0376-7>
- Joosen MJA, van der Schans MJ, van Helden HPM (2010) Percutaneous exposure to the nerve agent VX: efficacy of combined atropine, obidoxime and diazepam treatment. *Chem Biol Interact* 188(1):255–263. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2010.06.010>
- Köhler A, Escher B, Job L, Köller M, Thiermann H, Skerra A, Worek F (2021) Catalytic activity and stereoselectivity of engineered phosphotriesterases towards structurally different nerve agents in vitro. *Arch Toxicol* 95:2815–2823. <https://doi.org/10.1007/s00204-021-03094-0>
- Kolakowski JE, Defrank JJ, Harvey SP, Szafraniec LL, Beaudry WT, Lai K, Wild JR (1997) Enzymatic hydrolysis of the chemical warfare agent VX and its neurotoxic analogues by organophosphorus hydrolase. *Biocatal Biotransf* 15(4):297–312. <https://doi.org/10.3109/10242429709003196>
- Masson P, Nachon F (2017) Cholinesterase reactivators and bioscavengers for pre- and post-exposure treatments of organophosphorus poisoning. *J Neurochem* 142(Suppl. 2):26–40. <https://doi.org/10.1111/jnc.14026>
- Masson P, Rochu D (2009) Catalytic bioscavengers: the next generation of bioscavenger-based medical countermeasures. In: Gupta R (ed) *Handbook of toxicology of chemical warfare agents*. Academic Press, London, pp 1053–1065
- Misik J, Pavlikova R, Cabal J, Kuca K (2015) Acute toxicity of some nerve agents and pesticides in rats. *Drug Chem Toxicol* 38(1):32–36. <https://doi.org/10.3109/01480545.2014.900070>
- Myhrer T, Mariussen E, Enger S, Aas P (2015) Supralethal poisoning by any of the classical nerve agents is effectively counteracted by procyclidine regimens in rats. *Neurotoxicology* 50:142–148. <https://doi.org/10.1016/j.neuro.2015.08.012>
- Reiter G, Mikler J, Hill I, Weatherby K, Thiermann H, Worek F (2008) Chromatographic resolution, characterisation and quantification of VX enantiomers in hemolyzed swine blood samples. *J Chromatogr B* 873(1):86–94. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2008.08.001>
- Reiter G, Mikler J, Hill I, Weatherby K, Thiermann H, Worek F (2011) Simultaneous quantification of VX and its toxic metabolite in blood and plasma samples and its application for in vivo and in vitro toxicological studies. *J Chromatogr B* 879(26):2704–2713. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2011.07.031>
- Reiter G, Müller S, Hill I, Weatherby K, Thiermann H, Worek F, Mikler J (2015) In vitro and in vivo toxicological studies of V nerve agents: molecular and stereoselective aspects. *Toxicol Lett* 232(2):438–448. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2014.11.010>
- Schlapsky M, Binder U, Börger C, Theobald I, Wachinger K, Kisting S, Haller D, Skerra A (2013) PASylation: a biological alternative to PEGylation for extending the plasma half-life of pharmaceutically active proteins. *Protein Eng Des Sel* 26(8):489–501. <https://doi.org/10.1093/protein/gzt023>
- Schmidt TGM, Skerra A (2007) The Strip-tag system for one-step purification and high-affinity detection or capturing of proteins. *Nat Protoc* 2(6):1528–1535. <https://doi.org/10.1038/nprot.2007.209>
- Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD, Fujimoto EK, Goetzke NM, Olson BJ, Klenk DC (1985) Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem* 150:76–85. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(85\)90044-7](https://doi.org/10.1016/0003-2697(85)90044-7)
- Steindl D, Boehmerle W, Köhrner R, Praeger D, Haug M, Nee J, Schreiber A, Scheibe F, Demin K, Jacoby P, Tauber R, Hartwig S, Endres M, Eckardt KU (2021) Novichok nerve agent poisoning. *Lancet* 397(10270):249–252. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)32644-1](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)32644-1)
- Thiermann H, Worek F, Kehe K (2013) Limitations and challenges in treatment of acute chemical warfare agent poisoning. *Chem Biol Interact* 206(3):435–443. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2013.09.015>
- Vale JA, Marrs TC, Maynard RL (2018) Novichok: a murderous nerve agent attack in the UK. *J Toxicol Clin Toxicol* 56(11):1093–1097. <https://doi.org/10.1080/15563650.2018.1469759>
- van der Schans MJ, Lander BJ, van der Wiel H, Langenberg JP, Benschop HP (2003) Toxicokinetics of the nerve agent (±)-VX in anesthetized and atropinized hairless guinea pigs and marmosets after intravenous and percutaneous administration. *Toxicol Appl Pharmacol* 191(1):48–62. [https://doi.org/10.1016/S0041-008X\(03\)00216-3](https://doi.org/10.1016/S0041-008X(03)00216-3)
- Wilkins MR, Gasteiger E, Tonella L, Ou K, Tyler M, Sanchez JC, Gooley AA, Walsh BJ, Bairoch A, Appel RD, Williams KL, Hochstrasser DF (1998) Protein identification with N and C-terminal sequence tags in proteome projects. *J Mol Biol* 278(3):599–608. <https://doi.org/10.1006/jmbi.1998.1726>
- Wille T, Neumaier K, Köller M, Ehinger C, Aggarwal N, Ashani Y, Goldsmith M, Sussman JL, Tawfik DS, Thiermann H, Worek F (2016) Single treatment of VX poisoned guinea pigs with the phosphotriesterase mutant C23AL: intraosseous versus intravenous injection. *Toxicol Lett* 258:198–206. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2016.07.004>
- Worek F, Thiermann H (2013) The value of novel oximes for treatment of poisoning by organophosphorus compounds. *Pharmacol Ther* 139(2):249–259. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2013.04.009>
- Worek F, Mast U, Kiderlen D, Diepold C, Eyer P (1999) Improved determination of acetylcholinesterase activity in human whole blood. *Clin Chim Acta* 288(1–2):73–90. [https://doi.org/10.1016/S0009-8981\(99\)00144-8](https://doi.org/10.1016/S0009-8981(99)00144-8)
- Worek F, Reiter G, Eyer P, Sznycz L (2002) Reactivation kinetics of acetylcholinesterase from different species inhibited by highly toxic organophosphates. *Arch Toxicol* 76(9):523–529. <https://doi.org/10.1007/s00204-002-0375-1>
- Worek F, Seeger T, Reiter G, Goldsmith M, Ashani Y, Leader H, Sussman JL, Aggarwal N, Thiermann H, Tawfik DS (2014) Post-exposure treatment of VX poisoned guinea pigs with the engineered phosphotriesterase mutant C23: a proof-of-concept study. *Toxicol Lett* 231(1):45–54. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2014.09.003>
- Worek F, Thiermann H, Wille T (2016a) Catalytic bioscavengers in nerve agent poisoning: a promising approach? *Toxicol Lett* 244:143–148. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2015.07.012>
- Worek F, Thiermann H, Wille T (2016b) Oximes in organophosphate poisoning: 60 years of hope and despair. *Chem Biol Interact* 259(Pt B):93–98. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2016.04.032>
- Yanagisawa N, Morita H, Nakajima T (2006) Sarin experiences in Japan: acute toxicity and long-term effects. *J Neurol Sci* 249(1):76–85. <https://doi.org/10.1016/j.jns.2006.06.007>

Publisher's Note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

V. ÜBERGREIFENDE DISKUSSION

V.1 Identifizierung

Mit dem Ziel der Abrüstung von Massenvernichtungswaffen wurde 1993 nach Ende des Kalten Krieges die Chemiewaffenkonvention (CWC) nach langwierigen und schwierigen Verhandlungen angenommen und am 27.04.1997 in Kraft gesetzt. Sie regelt das Verbot der Entwicklung, Produktion, Lagerung, sowie des Transfers, Gebrauchs und der Zerstörung chemischer Waffen und wird von der OPCW umgesetzt (Gupta und Robin 2022; OPCW 2023a, 2023b, 2023c). Aktuell haben sich 193 Mitgliedsstaaten der CWC verpflichtet und nur 2 % der globalen Bevölkerung leben nicht unter ihrem Schutz. Trotzdem kommt es noch immer zu Vorfällen, die auf den Einsatz von Nervenkampfstoffen zurückzuführen sind. Auch der Gebrauch von phosphororganischen Pestiziden durch suizidale Einnahme vor allem in Entwicklungs- und Schwellenländern fordert schätzungsweise hunderttausende Todesopfer pro Jahr (Eddleston 2019; Gunnell et al. 2007; Mew et al. 2017). Ebenso führen Vergiftungen durch Organophosphate auch bei Tieren zu stetigen Berichten über Todesfälle (Berny und Gaillet 2008; Berny et al. 2010; Guitart et al. 2010a; Guitart et

al. 2010b; Gupta et al. 2018). Die durch die Vergiftung ausgelöste Hemmung der AChE führt zu einer Störung von Organfunktionen und kann in einer cholinergen Krise enden (Aldridge und Reiner 1975; Eyer et al. 2004; Kwong 2002; Lee 2003; Namba 1971; Sidell 1994; Taylor et al. 1995; Thiermann et al. 2016; Zilker 2008).

In-vitro-Studien haben vielversprechende Ergebnisse zu genetisch modifizierten PTE erbracht. Auch wenn die katalytischen Aktivitäten mit $21 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ min}^{-1}$ und $38 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ min}^{-1}$ gegenüber VX unter dem postulierten Wert von $5 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ min}^{-1}$ liegen (Ashani et al. 2016; Gupta et al. 2011; Worek et al. 2016a), ist von aussichtsreichen Kandidaten zur Behandlung von phosphororganischen Vergiftungen auszugehen. Hierfür sprechen die zu erwartende lange biologische Halbwertszeit durch die PASylierung (Escher et al. 2020; Escher 2021; Schlapschy et al. 2013), die präferierte (-)-VX-Hydrolyse (Köhler et al. 2021), die unter theoretischer Berechnung ermittelte Einhaltung der VX-Hydrolyse-Halbwertszeit von $< 5 \text{ s}$ bei PTE-3 (2,2 s) und nahezu bei PTE-2 (7,7 s) sowie ein verbreitertes Substratspektrum von G- und V-Stoffen (Escher et al. 2020; Job et al. 2020; Köhler et al. 2021).

Um pharmakologisch wirksame Therapeutika für die Humantherapie zu entwickeln, ist es aktuell notwendig, als nächsten Schritt die gewonnenen Ergebnisse in einem komplexen In-vivo-Organismus zu bestätigen. Derzeit gibt es keine zuverlässigen alternativen Methoden zur Bestimmung dieser Parameter.

In der vorliegenden Studie wurden daher *Bioscavenger*-Wirkstoffkandidaten (PTE) für die Therapie nach Organophosphatvergiftungen bei Ratten getestet.

V.1.1 Versuchsabschnitt Pharmakokinetik

Zur Erfassung der Pharmakokinetik wurden die PTE-Konzentrationen zu den jeweiligen Zeitpunkten bestimmt und gemäß des Ein-Kompartiment-Modells analysiert. Die Plasma-Halbwertszeiten (PTE $t_{1/2}$) betragen für PTE-1, PTE-2 und PTE-3 39 min, 165 min und 94 min. Insbesondere das bispezifische Heterodimer PTE-2, aber auch PTE-3 zeigte eine eindeutige Verlängerung der Plasma-Halbwertszeit. Dies verdeutlicht, dass die Technologie der PASylierung von PTE-2 und PTE-3 die Fähigkeit besitzt, die Ausscheidungszeit zu verlängern. Eine weitere Verlängerung des PAS-Anhängsels mit zusätzlichen PAS-Polypeptiden lässt eine noch längere Zirkulationszeit im Blutkreislauf erwarten (Binder und

Skerra 2017; Gebauer und Skerra 2018; Schlapschy et al. 2013). Neben der Methode der PASylierung sind in Studien bereits unterschiedliche andere Ansätze getestet worden, um die Zirkulationsdauer der Enzyme zu verlängern. Hierzu zählt beispielsweise die kovalente Bindung einer synthetischen Polymerkette aus Polyethylenglycol (PEG) an die PTE. Die Methode der PEGylierung basiert ebenso, wie die PASylierung, auf dem Wirkmechanismus einer verzögerten glomerulären Filtration durch die Niere indem das hydrodynamische Volumen vergrößert wird (Fishburn 2008; Schlapschy et al. 2013; Strohl 2015). In einem In-vivo-Versuch konnte bereits eine 50-fache Verlängerung der PTE $t_{1/2}$ erzielt werden (Novikov et al. 2010). Jedoch weist die PASylierung gegenüber der PEGylierung einige Vorteile auf. Hierzu zählt die einfachere und kostengünstigere Herstellung der PASylierten Verbindung im Vergleich zu PEG-Enzymen. Zudem entfällt die notwendige chemische Kopplung und ein intrazellulärer Abbau des PAS-Polypeptids ist möglich, sodass eine Akkumulation im Gewebe vermieden wird, die mit einer Immunreaktion einhergehen kann (Gebauer und Skerra 2018; Schilz et al. 2021; Schlapschy et al. 2013). Des Weiteren wurden PTE mit Blockcopolymeren modifiziert (Efremenko et al.

2017) oder deren Oberfläche mit einem Poly(carboxybetain)-Polymerfilm ummantelt (Zhang et al. 2019). Obwohl hierdurch eine eindeutige Verlängerung der PTE $t_{1/2}$ im Tierversuch mit bis zu einer Woche erreicht werden konnte (Zhang et al. 2019), sind sie aktuell noch in der Experimentalphase und stellen sich hinsichtlich der Entwicklung von biopharmazeutischen Wirkstoffkandidaten als extrem aufwendig dar.

Des Weiteren bietet die PASylierung die Möglichkeit, wie bei der Mutante PTE-2 geschehen, neben einem PAS-Anhängsel, einen PAS-*Linker* anzubringen, der zwei Untereinheiten miteinander verbindet. Die Anbringung eines *Linkers* ermöglicht die Verbindung unterschiedlicher PTE, ohne deren Wirksamkeit negativ zu beeinflussen. Das eröffnet viele Möglichkeiten, um wirkungsvolle PTE miteinander zu verknüpfen (Escher et al. 2020; Escher 2021). Hierdurch offenbart sich ein vielversprechender Ansatz, da es sich angesichts der vielfältigen strukturellen Variationen der Organophosphate als sehr unwahrscheinlich darstellt, dass ein einzelnes Enzym das gesamte Breitspektrum an Substraten abdecken kann (Despotović et al. 2019; Worek et al. 2016a). Eine mögliche Mischung einzelner optimierter Enzymvarian-

ten zu einem sogenannten Enzym-*Cocktail*, um dieses Dilemma zu umgehen, würde hierbei, gemäß der GMP (*Good Manufacturing Practice*)-Richtlinien mit beachtlich hohen Produktionskosten einhergehen, da jedes Enzym einzeln hergestellt und in einer klinischen Studie separat getestet werden müsste (Escher et al. 2020; Lagassé et al. 2017).

V.1.2 Versuchsabschnitt therapeutische Wirksamkeit

Das Auftreten klinischer Vergiftungssymptome nach Vergiftung durch VX konnte durch die therapeutische Behandlung reduziert werden. Die Gruppen, die mit PTE-2.2 und PTE-3 behandelt wurden, wiesen keine schwerwiegenden Vergiftungssymptome wie Krämpfe (lokal, generalisiert) und Atemnot (erschwerterte Atmung, Atemdepression) auf. Bei der mit PTE-2.1-behandelten Gruppe, zeigte eins von vier Tieren schwerwiegende Vergiftungssymptome einer Atemnot bis zum Ende der Versuchszeit von 180 min, wohingegen Krämpfe bei drei Tieren bis Versuchszeitende beobachtet wurden. In der PTE-1 behandelten Gruppe sowie der VX-Kontrollgruppe wurden bei allen Tieren schwerwiegende Vergiftungssymptome beobachtet. Die Sterblichkeit der mit den

PTE-Varianten PTE-2.1-, -2.2- und -3-behandelten Tiere nach VX-Vergiftung konnte reduziert werden, indem bei allen Tieren dieser Gruppen die Überlebenszeit über die gesamte Versuchsdauer von 180 min gesichert wurde. Die PTE-2.1-Variante schaffte es demzufolge, wie die mit PTE-2.2- und -3-behandelten Gruppen, zwar die Sterblichkeit zu verhindern, aber nicht schwerwiegende Vergiftungssymptome zu unterbinden. Da die postulierte erforderliche minimale katalytische Aktivität bei PTE-2.1 unterschritten wurde und die maximale VX-Hydrolyse-Halbwertszeit, wie nachfolgend beschrieben, überschritten wurde, erweisen sich die Ergebnisse als plausibel (Ashani et al. 2016; Gupta et al. 2011; Worek et al. 2016a). Alle Tiere behandelt mit Wildtyp-PTE (PTE-1) verstarben hingegen zwischen 32–97 min nach s. c. VX-Injektion, wie auch alle Tiere der unbehandelten VX-Kontrollgruppe in einem Zeitraum von 27–71 min. Der vernachlässigbare protektive Effekt von PTE-1 gegen eine VX-Vergiftung mit einer katalytischen In-vitro-Aktivität von $0,02 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ min}^{-1}$ deckt sich mit früheren Studien der Wildtyp-PTE, die bereits eine unzureichende Wirkung gegenüber V-Stoffe zeigten (Kolakowski et al. 1997; Masson und Rochu 2009).

Die Quantifizierung der VX-Enantiomere im Vollblut zeigte bei den mit PTE-2.1-, -2.2- und -3-behandelten Gruppen, dass der Konzentrationsanstieg der (-)-VX und (+)-VX-Enantiomere im Vergleich zur VX-Kontrollgruppe und der PTE-1 Gruppe gesenkt werden konnte, was die Ergebnisse der In-vitro Studie bestätigt (Köhler et al. 2021). Die mit PTE-2- und PTE-3-behandelten Gruppen zeigten eine fortwährende Hydrolyse von VX und dementsprechend niedrigere VX-Konzentrationen. Die (-)-VX-Konzentration bewegte sich dabei an der minimalen Bestimmungsgrenze. Auffallend ist, dass auch der (+)-VX-Wert abnimmt. Dies deckt sich aber mit vorherigen In-vitro-Messungen, in denen festgestellt wurde, dass die stereoselektive Präferenz von PTE-2 (BdPTE-7) and PTE-3 (BdPTE-4) hauptsächlich auf (-)-VX ausgerichtet ist, jedoch nicht ausschließlich (Köhler et al. 2021). Relevante VX-Konzentrationen der VX-Kontrollgruppe konnten erst ab dem Blutentnahmezeitpunkt 6 min detektiert werden, was sich jedoch mit der gering verzögerten Hemmung der Erythrozyten ACHE-Aktivität deckt, sowie dem Erscheinen erster Vergiftungssymptome zwischen 11 bis 26 min nach VX-Applikation. Die geringe Verzögerung zwischen der Resorption und Verteilung von VX aus dem subkutanen Depot gegenüber der Ent-

wicklung von Vergiftungsanzeichen könnte auf eine verlangsamte Verteilung im Gewebe hinweisen. Eine mögliche Erklärung stellt das Vorliegen von VX als protoniertes Amin ($pK_a \sim 8,5$) dar (Epstein et al. 1974; Shih et al. 2005). Zahlreiche Studien dokumentierten vergleichbare Ergebnisse eines verlangsamten VX-Konzentrationsanstieges im Blut, sowie einer Verzögerung von Vergiftungssymptomen (Mumford et al. 2011; Mumford et al. 2013; van der Schans et al. 2003; Worek et al. 2014b).

Die Ergebnisse der VX-Quantifizierung unterstützen die theoretischen Berechnungen der VX-Hydrolyse-Halbwertszeit (VX $t_{1/2}$ in s). Die VX $t_{1/2}$ von PTE-1 lag bei 3632 s, was über 1 h entspricht. Die VX-Hydrolyse-Halbwertszeiten der anderen PTE hingegen lagen unter 10 s: 8,2 s bei PTE-2.1, 3,1 s bei PTE-2.2 und 2,4 s bei PTE-3. Die Detoxifikation von PTE-2.2 und PTE-3 erfolgte somit in dem postulierten Zeitfenster von < 5 s (Ashani et al. 2016; Worek et al. 2016a) und deckt sich mit den Ergebnissen der Überlebenszeit und der Aufzeichnung schwerwiegender Vergiftungssymptome.

Die Hemmung der AChE-Aktivität der Erythrozyten konnte durch die Behandlung mit den PTE-Mutanten nicht verhindert werden. In den Gewebeproben (Medulla oblongata, Diaphragma) war die Reduktion der gehemmten AChE-Aktivität der Gruppen PTE-2.2 und PTE-3 statistisch signifikant gegenüber der VX-Kontrollgruppe und der PTE-1-behandelten Gruppe. Die Gabe von PTE-1 hatte keinen protektiven Effekt auf die AChE-Aktivität der untersuchten Gewebe, wohingegen PTE-2 und PTE-3 diese teilweise aufrechterhalten konnten. Die Ergebnisse der Hemmung der AChE-Aktivität der Erythrozyten und der Gewebeproben decken sich mit Ergebnissen früherer In-vivo-Studien von PTE-Behandlungen nach VX-Vergiftung. Auch hier konnte zwar das Überleben der Tiere nach Vergiftung gesichert werden, aber eine Hemmung der AChE-Aktivitäten nicht verhindert werden (Wille et al. 2016; Worek et al. 2014b).

V.2 Schlussfolgerung

Die erfolgversprechenden In-vitro-Ergebnisse der Mutanten PTE-2 und PTE-3 hinsichtlich der PTE-Halbwertszeit und VX-Hydrolyse-Halbwertszeit haben sich in der vorliegenden Studie bestätigt (Escher et al. 2020; Job et al. 2020; Köhler et al. 2021). Dies unterstützt die Vorhersagbarkeit der In-vivo-Effektivität von Bioscavengern aus In-vitro-Daten (Ashani und Pistinner 2004; Worek et al. 2014a; Worek et al. 2014b).

Es konnte erstmals In-vivo gezeigt werden, dass die modifizierten Phosphotriesterasen PTE-2 und PTE-3 als therapeutische Behandlung nach VX-Vergiftung die Fähigkeit haben, eine schwerwiegende systemische Vergiftungssymptomatik und Sterblichkeit zu verhindern. Die Applikationsmenge der katalytischen *Bioscavenger* mit umgerechnet 1 mg kg⁻¹ bei PTE-3 und 2 mg kg⁻¹ bei PTE-2.2, welche entsprechend ihrem Molekulargewicht angepasst wurden, um eine vergleichbare Stöchiometrie zu erreichen, erlaubten hierbei weit niedrigere Dosierungen im Vergleich zu stöchiometrischen *Bioscavengern*. In einer Studie nach perkutaner VX-Vergiftung bei Meer-schweinchen mussten beispielsweise 72 mg kg⁻¹ huma-

nes BChE für eine erfolgreiche Behandlung eingesetzt (Mumford et al. 2011).

Die PASylierung bei PTE-2 und PTE-3 zeigte eine Verlängerung der PTE-Plasma-Halbwertszeiten im Gegensatz zur nicht PASylierten PTE-1 Variante, da die Modifikationen durch zusätzliche PAS-Polypeptide zu einer verzögerten Ausscheidung oder biologischen Abbau der PTE geführt haben. Sie ist essenziell, um sowohl einen prophylaktischen Schutz in Organophosphat-Vergiftungsszenarien zu ermöglichen als auch bei Vergiftungen durch persistente phosphororganische Verbindungen als Therapeutikum Einsatz zu finden (Goldsmith et al. 2017; Reiter et al. 2011; Reiter et al. 2015; van der Schans et al. 2003). Die modifizierten PTE stellen somit vielversprechende Kandidaten als katalytische *Bioscavenger* dar.

Weitere In-vivo-Forschung ist notwendig, um das verfügbare Therapiefenster zu klären, in welchem die jeweilige PTE nach Exposition mit Organophosphaten verabreicht werden muss, um schwere Vergiftungssymptome zu verhindern. Eventuell sind auch mehrere Dosen der PTE notwendig, sodass es auch der Ermittlung von Menge und Anzahl dieser bedarf. Hierbei müssen immu-

nogene Reaktionen auf eine mehrmalige Gabe ausgeschlossen werden, da die Entwicklung und Produktion der PTE von bakteriellem Ursprung ist (Escher et al. 2020; Job et al. 2020). Auch ist die Wirksamkeit der PTE bei anderen Organophosphaten In-vivo zu untersuchen und eine Behandlung ergänzend mit Oximen und Atropin zu testen. Da der experimentelle Aufbau dieser hier durchgeführten *Proof-of-Concept*-Studie darauf ausgelegt war, die Wirkung der PTE als alleiniges Therapeutikum gegenüber des Organophosphat VX zu testen, sollten als Hauptzielgröße schwerwiegende Symptome einer phosphororganischen Vergiftung erfasst werden, um festzustellen, inwieweit die jeweilige PTE diese reduziert oder nicht. Bei weiterführenden Studien, die über eine *Proof-of-Concept*-Studie hinausgehen wäre ein Versuch an wachen Tieren anzuraten unter zusätzlichem Einsatz von Analgetika und Antiepileptika, um zentrale Symptome beizubehalten, aber generalisierte Krämpfe sowie unnötige Schmerzen, Leiden und Schäden zu verhindern.

V.3 Limitationen und Ausblick

V.3.1 Limitationen

Die genetisch modifizierten PTE-Mutanten PTE-2 und PTE-3 stellen aussichtsreiche Kandidaten für die weitere Entwicklung von effektiven katalytischen Bioscavengern zur Behandlung von phosphororganischen Vergiftungen dar. Jedoch bedarf es bei der Interpretation der in der vorliegenden Studie gewonnenen Ergebnisse der Beachtung unterschiedlicher Limitationen.

V.3.1.1 Phosphotriesterase

Eine erfolgreiche PTE-Behandlung, sofern die PTE nicht bereits als Prophylaktikum verabreicht wurde, setzt eine rasche Diagnostik voraus, um die Therapie rechtzeitig vor Inhibition der AChE beginnen zu können.

Des Weiteren ist zu beachten, dass PTE aufgrund ihrer Größe (PTE-1: 38 Kilodalton (kDa), PTE-2: 99 kDa, PTE-3: 54 kDa) die Blut-Hirn-Schranke ab ca. 400–500 g mol⁻¹ nicht überwinden (Fischer et al. 1998; Kaliszan 1996). Daher können sie ihre Wirkung im Gehirn nicht entfalten und ihr Effektkompartiment beschränkt sich auf den Blutkreislauf. VX hingegen schafft es durch seine Größe und lipophile Eigenschaft die Blut-Hirn-Schranke

zu passieren und die AChE im Gehirn zu hemmen. Folglich ist das Kompartiment, indem die PTE wirken kann, beschränkt, wie es auch bei Oximen der Fall ist.

Für die Applikation von Antidoten bei Organophosphatvergiftungen im militärischen Bereich werden Autoinjektoren verwendet. So muss für eine Anwendung dieser PTE überprüft werden, ob je nach Therapiezeitfenster eine ausreichend rasche Resorption über die i. m. Injektion erfolgt. In einer Studie bei VX-vergifteten Meeresschweinchen konnten durch die i. m. Applikation im Vergleich zur i. v. und i. o. Applikation der PTE Variante C23AL jedoch kein nachweisbares Plasmalevel erreicht werden (Wille et al. 2016). Die i. v. oder i. o. Verabreichung erfordert dementsprechend eine gewisse medizinische Expertise und geeignetes Equipment.

Zudem ist eine hohe Stabilität der Enzyme notwendig, um eine ausreichende katalytische Aktivität zu garantieren. Dies ist insbesondere hinsichtlich der Praktikabilität zur Lagerung bei Raumtemperatur von Bedeutung. Eine Lyophilisierung (Gefriertrocknung) der PTE könnte eine Möglichkeit der Lagerung darstellen und müsste weiter untersucht werden.

V.3.1.2 Organophosphatvergiftung durch s. c. VX-Applikation

Die vorliegende Studie wurde in anästhesierten Ratten nach s. c. Vergiftung durch VX durchgeführt. Realistischere Eintrittspforten von Organophosphaten sind die orale, transmuköse, inhalative oder auch perkutane Aufnahme (Masson 2016). Bei der Betrachtung aktueller Szenare phosphororganischer Vergiftungen mit Nervenkampfstoffen in Salisbury, Omsk oder Kuala Lumpur zeigen sich insbesondere perkutane Resorptionen (Berlinger 2017; Chai et al. 2017; Chai et al. 2018; Simon et al. 2013; Steindl et al. 2021; Vale et al. 2018). Da es jedoch in dieser Studie wichtig war, die exakte Vergiftungsmenge zu kennen, um die Wirkung der PTE miteinander vergleichen zu können, war die Durchführung einer s. c. Intoxikation notwendig. In weiterführenden In-vivo-Studien sollte die Wirksamkeit optimierter PTE gegenüber unterschiedlichen Aufnahmewegen sowie einem breiteren Spektrum von Organophosphaten getestet werden.

V.3.1.3 Einfluss der Versuchstiere

Wie in jedem Tierversuchsmodell, gibt es viele verschiedene Faktoren, die die Versuchsergebnisse statistisch

beeinflussen können. Hierzu zählen beispielsweise die Wahl der Tierspezies, des Tierstammes, Alters, Gewichts und Geschlechtes (Bouwknicht und Paylor 2002; Clayton und Collins 2014; Shapira et al. 2002; Simon et al. 2013; Vital et al. 2015).

In der vorliegenden Studie wurden männliche Wistar-Ratten (Stammcode: 619) verwendet mit einem Gewicht zwischen 250–370 g, was einem Alter von ungefähr 7–9 Wochen (49–63 Tage) entspricht. Es handelt sich um einen Auszuchtstamm. Bei einem Auszuchtstamm werden Tiere mit dem geringstmöglichen Verwandtschaftsgrad miteinander verpaart. Dadurch erhält man eine definierte möglichst hohe genetische Heterogenität. Jedoch ist anzumerken, dass sie nicht die Variabilität des menschlichen Genoms repräsentieren (Kluge und Wedekind 2016).

Die Einflüsse durch Alter, Geschlecht und Gewicht der Tiere auf die Versuchsergebnisse bei Vergiftungen durch Nervenkampfstoffe stellen sich wie folgt dar. Eine Studie zeigte, dass bei erwachsenen Ratten keine geschlechtsspezifischen Unterschiede hinsichtlich der Letalität bei Ganzkörper-Exposition gegenüber VX gefunden wurden

(Benton et al. 2006). Dasselbe Ergebnis zeigte sich auch bei s. c. VX-Intoxikation, wobei das Gewicht und Alter die LD₅₀ beeinflussten (Callaway et al. 1958). Demgegenüber steht ein Versuch mit perkutaner VX-Vergiftung, bei welchem weibliche Tiere während der Pubertät (42 Tage alt) und als junge Erwachsene (70 Tage alt), im Gegensatz zu männlichen Tieren, weniger anfällig für letale Effekte waren. Als mögliche Erklärung wurden hormonelle Veränderungen genannt (Wright et al. 2016a). Bei einem Versuch mit Soman vergifteten Ratten wurde festgestellt, dass der Schweregrad des Status epilepticus in weiblichen Tieren im Vergleich zu männlichen Tieren signifikant höher war, wohingegen der Östrogenzyklus keinen Einfluss hatte (Gage et al. 2021). Weibliche Ratten unter Sarin-Exposition reagierten auch sensibler auf die Vergiftung im Vergleich zu männlichen Ratten (Mioduszewski et al. 2002). Eine weitere gemischtgeschlechtliche Studie zeigte, dass perinatale Ratten mit einem Alter von 7, 14 und 21 Tagen, sowie junge Erwachsene Tiere (70 Tage alt) im Vergleich zu pubertären Tieren (28 und 42 Tage alt) anfälliger für letale Effekte unter Exposition mit Tabun, Sarin, Soman and Cyclosarin waren. Bei VX-vergifteten Ratten wurden

hingegen keine altersabhängigen Unterschiede festgestellt (Wright et al. 2016b).

Um einen alters-, geschlechts-, und gewichtsspezifischen Einfluss auf die Erfassung der Vergiftungssymptome und die Letalität bei zukünftigen Versuchen, insbesondere im Hinblick auf die Testung weiterer Therapeutika bei verschiedenen Organophosphatvergiftung, zu minimieren und einen hohen Grad an Varianz der Tiere mit dementsprechender Verbesserung der Übertragbarkeit auf den Menschen zu erzielen, ist eine gemischtgeschlechtliche Kohorte von Wistar-Ratten unterschiedlichen Alters zu wählen.

V.3.1.4 Einfluss von Medetomidin, Midazolam und Fentanyl

Im Versuchsabschnitt der therapeutischen Wirksamkeit wurde für jedes einzelne Tier das Auftreten schwerwiegender Vergiftungssymptome, wie Krämpfe (lokal, generalisiert) und Atemnot (erschwerte Atmung, Atemdepression) anhand von Beobachtung (ja/nein) beurteilt. Es stellt sich die Frage, inwiefern die MMF-Narkose die erfassten klinischen Symptome bzw. die Ausprägung der mit einer cholinergen Krise assoziierten Symptome hierbei beeinflusst haben kann. Die bei einer MMF-Narkose

empfohlene Sauerstoffsubstitution und Atemüberwachung konnten hinsichtlich des Versuchsaufbaus nicht umgesetzt werden, da der Einfluss auf den Respirationstrakt zur Erfassung der Vergiftungssymptomatik Atemnot so gering wie möglich gehalten werden sollte. Eine Intubation oder andere Sicherung der Atemwege waren folglich nicht durchführbar.

Midazolam führt zu einer geringen Atemdepression, indem es das zentralnervöse Atemzentrum dämpft. Medetomidin hat eine atemdepressive Wirkung, die sich bei Gabe von Opioiden, wie Fentanyl, die ebenfalls eine atemdepressive Wirkung haben, verstärkt. Die Wirkung wird aber nicht als einheitlich beschrieben, sodass sowohl eine Hyperventilation als auch ein kompletter Atemstillstand möglich ist. Weiterhin kann Blutentzug, wie Blutprobenentnahmen, zu einer geringen Änderung der Atmung hinsichtlich Hyperventilation führen, wenn ein Sauerstoffmangel und Kohlendioxidüberschuss entstehen (Erhardt et al. 2012). Dies könnte zu einer Verzerrung der Interpretation der erhobenen Vergiftungssymptome führen, indem der Parameter Atemnot nicht auf die Intoxikation, sondern auf die Wirkung der Injektionsanästhetika zurückzuführen ist. Jedoch wurden in der

Vehikel-Kontrollgruppe keine respiratorischen Symptome einer schwerwiegenden cholinergen Krise festgestellt, wie es bei der VX-Kontrollgruppe und den PTE-behandelten Gruppen der Fall war. Dementsprechend wird der Einfluss der Medikamente auf die Atmung als gering eingestuft. Zudem decken sich die Ergebnisse der Erfassung der Symptome einer schwerwiegenden cholinergen Krise mit den Ergebnissen der AChE-Aktivität der Organe, sowie der VX-Hydrolyse.

Organophosphate sind Hemmer der AChE und wirken stark prokonvulsiv (Jett 2012). Sie führen zu zentral vermittelten Anfällen und Krämpfen (Jett 2012). Halten diese 30 min oder länger an, werden sie als Status epilepticus bezeichnet (Sloviter 1999). Benzodiazepine, wie Diazepam oder Midazolam, werden aufgrund ihrer antikonvulsiven und neuroprotektiven Wirkung nicht nur als Therapeutikum bei Vergiftungen mit Organophosphaten eingesetzt, sondern auch zur Behandlung von epileptischen Erkrankungen (Fröscher 2008; Thiermann et al. 2016). Es ist somit davon auszugehen, dass Midazolam als Bestandteil der MMF-Narkose durch seine antikonvulsive Wirkung einen Einfluss auf die Anfallsstärke der Krämpfe in diesem Versuchsmodell hatte. Grundsätzlich

ist auch darauf hinzuweisen, dass eine Opiatintoxikation zu einer vergleichbaren Symptomatik, wie eine Organophosphatintoxikation führt (Cislo und Fer 2009; Sadock und Sadock 2012; Thiermann et al. 2016). Dementsprechend kann auch ein Einfluss durch Fentanyl im Rahmen der MMF-Narkose auf die Vergiftungserscheinungen nicht ausgeschlossen werden. Da alle Versuchsgruppen aber eine den Vorgaben entsprechende Menge der MMF-Narkose erhalten haben, ist der Effekt auf alle Gruppen als gleichwertig anzusehen. Zudem wurde bei der Vehikel-Kontrollgruppe kein klinisches Bild einer Opiatintoxikation festgestellt.

Zu beachten ist, dass Midazolam bei Kindern zu einer paradoxen Reaktion führen kann. Die typischen Symptome umfassen Halluzinationen, Erregung und Unruhe. Sie können sogar eine Ruhigstellung erfordern (Massanari et al. 1997; Weinbroum et al. 2001). In einer Studie zeigten Ratten am 3. Tag und am 10. Tag nach Geburt bei Midazolam-Behandlung hinsichtlich Sedierung und Nozizeption paradoxe Effekte (Koch et al. 2008). Dies war jedoch bei Ratten ab dem 40. Lebens- tag nicht mehr zu beobachten (Koch et al. 2008; Tobin 2008). Da die Ratten in dem hier durchgeführten Ver-

such einem Alter von etwa 56 Tagen entsprachen, kann eine Fehlinterpretation von Krämpfen aufgrund des paradoxen Effekts als sehr unwahrscheinlich angesehen werden (Koch et al. 2008).

V.3.1.5 Datenerhebung

Da akute Organophosphatintoxikationen zu einer Bandbreite von Symptomen bis hin zu einer cholinergen Krise und zum Status epilepticus führen können, ist für Folgeversuche eine telemetrische Überwachung empfehlenswert, um die Datenerhebung zu optimieren. Sie ermöglicht EEG-Ableitungen, also die elektrographischen Änderungen im Gehirn in Echtzeit, aufzuzeichnen und mit einer speziellen Software auszuwerten. Zudem können weitere Parameter erhoben werden: EKG, Aktivitätsprofil, Blutdruck und Körpertemperatur.

Bei telemetrisch überwachten Tieren gibt es einen direkten Zusammenhang zwischen Veränderungen im Elektroenzephalogramm (EEG) und Krampfanfällen in Echtzeit (Gage et al. 2021). Die Quantifizierung verhaltensbedingter Anfälle alleine ermöglicht keine Aussage darüber, ob die Anfälle vom Gehirn ausgelöst werden oder durch periphere Wirkungen des Organophosphates (Gage et al. 2021). Daher ist die Verwendung eines im-

plantierten kabellosen Telemetriesystems für Versuche im Wachmodell anzuraten.

Neben der Messung der AChE-Aktivität des Diaphragmas als wichtiges respiratorisches Organ und der Medulla oblongata, in der das Atemzentrum lokalisiert ist, sollten weitere Organe und Gewebe nach dem Tod des Tieres untersucht werden.

Interessant ist aus neurologisch wissenschaftlicher Sicht der piriforme, entorhinale und perirhinale Cortex sowie der Hippocampus, da die initiale cholinerge Hyperaktivierung im piriformen Cortex und medialen septalen Gebiet ausgelöst durch phosphororganische Vergiftungen in diesen Arealen zu einer gesteigerten glutamatergen Aktivität und folglich Krampfanfällen führt (Engel 1993; Gage et al. 2021; Myhrer 2007). Die massive Aktivierung des glutamatergen Systems kann sich neurotoxisch auswirken und zu strukturellen Schädigungen führen (Wasterlain und Shirasaka 1994). Der Schweregrad und die Dauer bestimmen das Risiko für das Auftreten spontan wiederkehrender Anfälle sowie das Ausmaß der Hirnschädigung bei Überlebenden nach einer therapeutischen Behandlung mit Atropin, Oximen und einem Antikonvulsivum (Gage et al. 2021; Klitgaard et al. 2002;

Nairismägi et al. 2004; Puttachary et al. 2015; Puttachary et al. 2016). Immunhistochemische Untersuchungen der Gehirnnareale zeigen neuroinflammatorische und neurodegenerative Geschehen, welche für den Struktur- oder Funktionsverlust von Neuronen stehen, als auch Gliose, die einen reaktiven Prozess einer Ansammlung von Gliazellen aufgrund ZNS-Verletzungen und -Krankheiten beschreibt (Araujo Furtado et al. 2010; Burda und Sofroniew 2014; Gage et al. 2021; Przedborski et al. 2003; Rojas et al. 2020). Hierfür gibt es spezielle Test-Kits und Anfärbungsmethoden. Zusätzlich könnten proinflammatorische Zytokine wie Interleukin-1 β (IL-1 β) oder Tumornekrosefaktor (TNF- α) im Plasma untersucht werden.

Des Weiteren wäre eine Überprüfung der AChE-Aktivität weiterer Organe- und Gewebe interessant. Ergebnisse würden Rückschlüsse auf das Zeitfenster zwischen der kompletten Hemmung in der Blutbahn und der Verteilung in andere Systeme zulassen.

Um die Transparenz und Nachvollziehbarkeit der Tierversuche zu verbessern und die Aussagekraft und Qualität der gewonnenen Ergebnisse zu erhöhen, sind die Vor-

gaben gemäß der *ARRIVE Guidelines* grundsätzlich bestmöglich umzusetzen (Kilkenny et al. 2010). Die Einhaltung der Richtlinien bei In-vivo-Experimenten anhand der frei zugänglichen Checkliste, die detaillierte Informationen über die Anzahl der verwendeten Tiere, das Studiendesign oder den Versuchsablauf vorsieht, ermöglicht eine angemessene Überprüfung der Qualität und Zuverlässigkeit der veröffentlichten Forschung, Bewertung der Methodik sowie Reproduktion der Methoden und Ergebnisse (Du Percie Sert et al. 2020a; Du Percie Sert et al. 2020b).

V.3.2 Ausblick

Die OPCW hat bisher mehr als 4200 komplette Industriinspektionen durchgeführt, die Vernichtung von 99 % der gemeldeten Lagerbestände an Chemiewaffen überwacht und wurde 2013 mit dem Friedensnobelpreis geehrt. Nach wie vor verfolgt sie das Ziel einer Welt frei von Bedrohungen durch Chemiewaffen. Aufgrund des fortwährenden Fortschritts in der Technik und Wissenschaft begegnet die OPCW aktuell zahlreichen Herausforderungen. Hierzu zählen die leichte Zugänglichkeit von Ausgangsmaterialien im Rahmen der Chemie-Produktionsanlagen sowie frei öffentlich verfügbare Lite-

ratur über Synthesebeschreibungen zur Herstellung von Nervenkampfstoffen (Elsinghorst et al. 2013; Gupta 2020; Ledgard 2006; Nguyen 2022). Gegenwärtig wird eine in Deutschland ansässige Firma verdächtigt, sogenannte *Dual-Use-Substanzen*, die nicht nur für den zivilen Gebrauch, sondern auch für die Herstellung chemischer Kampfstoffe geeignet sind, unerlaubt nach Russland exportiert zu haben (Schmitt 2022). Dies verdeutlicht, dass Organophosphate im Bereich der Nervenampfstoffe nach wie vor eine große Bedrohung darstellen. Doch auch phosphororganische Pestizide bedeuten eine fortwährende Gefahr für Menschen und Tiere, wie zahlreiche Berichte belegen (Eddleston 2019; Gupta 2005; Mew et al. 2017).

Umso wichtiger erweist sich die Entwicklung und Etablierung effektiver Behandlungsmethoden. Hierbei spielen insbesondere katalytische *Bioscavenger* eine zukunfts-trächtige Rolle als Therapeutikum (Masson 2016).

Die durchgeführte In-vivo-Studie über neu modifizierte scavengerbasierte katalytische Bioscavenger für die Behandlung von Organophosphatvergiftungen liefert hierzu wichtige Erkenntnisse, weil die Therapie mit den jeweiligen Wirkstoffkandidaten hinsichtlich des Auftre-

tens einer schwerwiegenden systemischen Vergiftungssymptomatik, der Reduktion klinischer Vergiftungssymptome und der Sterblichkeit untersucht wurden. Sowohl die Hemmung der AChE-Aktivität der Erythrozyten im Blut sowie verschiedener Gewebe als auch die Halbwertszeit der PTE im Plasma wurden ebenfalls eingehend überprüft. Zudem wurden die Verlängerung der Überlebenszeit, die VX-Hydrolyse-Halbwertszeit und die Senkung der VX-Konzentration im Vollblut betrachtet.

Mit diesen Ergebnissen sollen die Stabilität, katalytische Aktivität und die Erweiterung des Wirkungsspektrums durch die effektive Methode der PASylierung der PTE weiter optimiert werden, um in mittelbarer Zukunft eine Anwendung bei Organophosphatvergiftungen in der Humanmedizin realistisch werden zu lassen. Sofern sich hieraus ein gut etablierter, breit verfügbarer und kostengünstiger Behandlungsansatz entwickeln lässt, könnte dies auch relevant für die Tiermedizin werden.

VI. ZUSAMMENFASSUNG

Vergiftungen mit phosphororganischen Verbindungen stellen nach wie vor eine ernst zu nehmende gesundheitliche Bedrohung dar. Insbesondere, wenn es sich um V-Stoffe, wie VX handelt, die durch eine hohe Toxizität und Stabilität gekennzeichnet sind. Der Hauptpathomechanismus beruht auf der Hemmung der AChE. Da die Standardtherapie bei Vergiftungen mit phosphororganischen Verbindungen mittels Benzodiazepinen als Antikonvulsiva, dem kompetitiven Muskarinrezeptorantagonisten Atropin und Oximen als Reaktivator Organophosphat gehemmter AChE, gewisse Einschränkungen mit sich bringt, präsentiert die scavengerbasierte Therapie eine Verbesserung der Behandlungsstrategie. Die Strategie beruht auf der Detoxifikation des jeweiligen Organophosphates in der Blutbahn, bevor es in das Zielgewebe gelangt und die AChE inhibiert. Dies setzt jedoch eine frühzeitige Diagnostik voraus, um die Bioscavenger vor Hemmung der AChE verabreichen zu können.

Die getesteten katalytischen *Bioscavenger* stammen von dem Bakterium *Brevundimonas diminuta* und haben gegenüber stöchiometrischen Scavengern den Vorteil, dass sie sich nicht verbrauchen (vgl. Abbildung 8).

Die beiden neuartigen, genetisch modifizierten PTE-Mutanten PTE-2 (PTE-C23(R152E)-PAS(100)-10-2-C3(I106A/C59V/C227V/E71K)- PAS(200)) (Escher et al. 2020; Köhler et al. 2021) und PTE-3 (10-2-C3(C59V/C227V)-PAS(200)) (Job et al. 2020; Köhler et al. 2021) wurden in einem In-vivo-Rattenmodell gegenüber der Wildtyp-PTE PTE-1 getestet. Beide PTE weisen eine PASylierung auf, also eine Aminosäurekette bestehend aus Prolin, Alanin und Serin (PAS), wodurch sich die Halbwertszeit im Blut verlängert (siehe V.1.1). Der Mechanismus beruht darauf, dass sich der Aminosäurefaden zu einem knäuelartigen Gebilde formt, welcher durch die hydrophilen Eigenschaften der Aminosäuren Wasser anlagert und folglich so voluminös wird, dass eine Ausscheidung über die Glomerula der Niere nicht möglich ist. Aufgrund dessen kommt es zu einer längeren Verweildauer im Blutkreislauf, bis der biologische Abbau eintritt. Bei PTE-2 handelt es sich um ein einkettiges, heterodimeres und bispezifisches Enzym mit einem PAS(100)-*Linker*, das zwei PTE-Mutanten miteinander verbindet ohne deren katalytische Aktivität negativ zu beeinflussen, als auch einem PAS(200)-Anhängsel. Zudem zeigt es eine angemessenen bis hohe katalytische Aktivität gegenüber einem breiten Spektrum an G- und

V-Stoffen. PTE-3 ist ein oxidativ stabilisiertes homodimeres Enzym mit einem PAS(200)-Anhängsel, um die Plasma-Clearance zu verringern. PTE-2 und PTE-3 verfügen gegenüber VX über eine Verbesserung der katalytischen Aktivität In-vitro (PTE-2: $k_{cat}/K_M = 20,7 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ min}^{-1}$; PTE-3: $k_{cat}/K_M = 38 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ min}^{-1}$) sowie eine stärkere Hydrolyse des toxischeren (-)-VX-Enantiomers gegenüber des geringer toxischen (+)-VX-Enantiomers.

Um die Effektivität dieser beiden PTE-Mutanten (Phosphotriesterase) als potenzielles Therapeutikum bei Vergiftungen durch VX zu überprüfen, wurde ein In-vivo-Versuch in Ratten durchgeführt. PTE-2 mit PTE-2.1 (1,3 mg kg⁻¹ i. v.), PTE-2.2 (2,6 mg kg⁻¹ i. v.) und PTE-3 (1,4 mg kg⁻¹ i. v.) wurden gegenüber der rekombinanten Wildtyp-PTE (PTE-1) mit 1,0 mg kg⁻¹ i. v. 5 min nach s. c. VX-Intoxikation ($\sim 2 \times \text{LD}_{50}$) getestet. Die Anwendung von PTE-2.2 und PTE-3 sicherte das Überleben der Tiere und konnte akute schwerwiegende Vergiftungssymptome einer cholinergen Krise verhindern. Die Hemmung der Erythrozyten-AChE konnte jedoch nicht verhindert werden, wohingegen die AChE-Aktivität des Diaphragmas und der Medulla oblongata teilweise erhalten werden konnte. VX wurde mit einer Hydrolyse-Halbwertszeit

(VX $t_{1/2}$) von 3,1 s durch PTE-2.2 und 2,4 s durch PTE-3 schnell abgebaut. Die theoretischen Berechnungen der Plasma-Halbwertszeiten (PTE $t_{1/2}$) betragen 165 min für PTE-2 und 94 min für PTE-3. Zudem zeigten sich nach PTE-2- und PTE-3-Applikation nahezu kein Anstieg des (-)-VX-Levels und eine Reduktion des (+)-VX-Levels im Gegensatz zur VX-Kontrollgruppe ohne Behandlung sowie der PTE-1-(Wildtyp-PTE)-behandelten Gruppe. Dies stimmt mit vorangegangenen In-vitro-Ergebnissen überein, indem vorrangig (-)-VX, jedoch auch (+)-VX abgebaut wird.

Ratten, die mit PTE-2.1 behandelt wurden, überlebten alle, jedoch mit schweren phosphororganischen Vergiftungserscheinungen (Krämpfe, Atemnot). Alle Tiere der PTE-1-behandelten Gruppe, wiesen schwere Symptome einer cholinergen Krise auf und verstarben während der 180-minütigen Versuchsdauer. Die ermittelte Plasma-Halbwertszeit (PTE $t_{1/2}$) lag bei 39 min und die VX-Hydrolyse-Halbwertszeit (VX $t_{1/2}$) zeigte mit 60,5 min keine ausreichende Detoxifikation in dem postulierten Zeitfenster von < 5 s.

Zusammenfassend konnte erstmals mittels einer Behandlung von PTE-2 und PTE-3 im niedrigen Dosisbereich In-vivo eine effiziente Detoxifikation In-vivo bei Ratten nachgewiesen werden. Die Anwendung konnte die Sterblichkeit und systemische Toxizität verhindern. Die PASylierung verlängert die Plasma-Halbwertszeit dieser Enzyme, was insbesondere bei stabilen Organophosphaten, wie dem Nervenkampfstoff VX, von großer Bedeutung ist.

Dies verdeutlicht das Potential der modifizierten Phosphotriesterasen PTE-2 und PTE-3, um hochwirksame katalytische *Bioscavenger* gegen VX zu entwickeln.

VII. SUMMARY

Poisoning with organophosphorus compounds continues to pose a serious health threat. Especially when it comes to V-substances, such as VX, which are characterized by high toxicity and stability. The main pathomechanism is based on inhibition of AChE. The standard therapy for poisoning with organophosphorus compounds consists of benzodiazepines as anticonvulsants, the competitive muscarinic receptor antagonist atropine, and oximes as a reactivator of organophosphate inhibited AChE. Since it has certain limitations, the scavenger-based therapy presents an improvement in the treatment strategy. The strategy is based on detoxification of the respective organophosphate in the bloodstream before it enters the target tissue and inhibits AChE. However, this requires early diagnosis in order to administer the bioscavenger before inhibition of AChE.

The catalytic bioscavengers tested are derived from the bacterium *Brevundimonas diminuta* and have the advantage over stoichiometric scavengers that they do not consume themselves (see figure 8).

The two novel genetically modified PTE (phosphotriesterase) mutants PTE-2 (PTE-C23(R152E)-PAS(100)-10-2-C3(I106A/C59V/C227V/E71K)-PAS(200)) (Escher et al. 2020; Köhler et al. 2021) and PTE-3 (10-2-C3(C59V/C227V)-PAS(200)) (Job et al. 2020; Köhler et al. 2021) were tested in an in vivo rat model in comparison with wild-type PTE-1. Both PTEs are modified through PASylation, an amino acid chain consisting of proline, alanine, and serine (PAS), which extended the half-life in blood (see V.1.1). The mechanism is based on the fact that the amino acid thread forms a ball-like structure which, due to the hydrophilic properties of the amino acids, accumulates water. Consequently, it becomes too voluminous for excretion via glomeruli of the kidney to be possible. This results in a longer retention time in the bloodstream until biodegradation occurs. PTE-2 is a single-chain, heterodimeric and bispecific enzyme linked with a PAS(100) spacer, which connects two molecules of PTE mutants as well as a PAS(200) tag without negatively affecting their catalytic activity. In addition, it shows adequate to high catalytic activity towards a wide range of G- and V-substances. PTE-3 is an oxidatively stabilized homodimeric enzyme with a PAS(200) tag to reduce plasma

clearance. Compared to VX, PTE-2 and PTE-3 have an improvement in catalytic activity In-vitro (PTE-2: $k_{\text{cat}}/K_M = 20.7 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ min}^{-1}$; PTE-3: $k_{\text{cat}}/K_M = 38 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ min}^{-1}$) as well as a stronger hydrolysis of the more toxic (-)-VX enantiomer versus the less toxic (+)-VX enantiomer.

To test the efficacy of these two PTE mutants as potential therapeutic agents for poisoning by VX, an in vivo experiment was conducted in rats. Two PTE-2 dosages (PTE-2.1: $1.3 \text{ mg kg}^{-1} \text{ i. v.}$, PTE-2.2: $2.6 \text{ mg kg}^{-1} \text{ i. v.}$), and one dosage of PTE-3 ($1.4 \text{ mg kg}^{-1} \text{ i. v.}$) were compared with the recombinant wild-type PTE (PTE-1) containing $1.0 \text{ mg kg}^{-1} \text{ i. v.}$. The PTEs were applied 5 min after s. c. VX intoxication ($\sim 2 \times \text{LD}_{50}$). The use of PTE-2.2 and PTE-3 ensured animal survival and was able to prevent acute severe poisoning symptoms of cholinergic crisis. However, inhibition of erythrocyte AChE could not be prevented, whereas AChE activity of the diaphragm and medulla oblongata was partially preserved. VX was rapidly degraded with a hydrolysis half-life of VX ($\text{VX } t_{1/2}$) of 3.1 s by PTE-2.2 and 2.4 s by PTE-3. The theoretical calculations of plasma half-lives (PTE $t_{1/2}$) are 165 min for PTE-2 and 94 min for PTE-3. In addition, after PTE-2 and PTE-3 application, there was almost no increase in

the (-)-VX level and a reduction in the (+)-VX level in contrast to the VX control group without treatment and the PTE-1 (wild-type PTE) treated group. This is consistent with previous *in vitro* results wherein primarily degrading of (-)-VX but to a lesser extent also (+)-VX was found.

All rats treated with PTE-2.1 survived, but nonetheless showed severe symptoms of organophosphorus poisoning (convulsions, respiratory distress). Animals in the PTE-1 (wild-type PTE) group exhibited severe symptoms of cholinergic crisis and died during the 180-minute experimental period. The plasma half-life (PTE $t_{1/2}$) amounted to 39 min and the VX hydrolysis half-life (VX $t_{1/2}$) with 60.5 min did not show sufficient detoxification in the postulated time window from < 5 s.

In summary, an efficient detoxification *in vivo* in rats could be demonstrated for the first time by treatment with PTE-2 and PTE-3 in the low dose range *in vivo*. The application was able to prevent mortality and systemic toxicity. PASylation extended the plasma half-life of these enzymes, which is particularly important for stable organophosphates, such as the nerve agent VX.

This highlights the potential of the modified phosphotriesterases PTE-2 and PTE-3 to develop highly effective catalytic bioscavengers against VX.

VIII. LITERATURVERZEICHNIS

Abendschön, N.; Senf, S.; Deffner, P.; Miller, R.; Grott, A.; Werner, J. et al. (2020): Local Anesthesia in Piglets Undergoing Castration-A Comparative Study to Investigate the Analgesic Effects of Four Local Anesthetics Based on Defensive Behavior and Side Effects. In: *Animals : an open access journal from MDPI* 10 (10). DOI: 10.3390/ani10101752.

Aktories, K.; Hofmann, F.; Föstermann, U.; Starke, K. (2005): 1. Allgemeine Pharmakologie und Toxikologie. 1.1 Grundbegriffe. In: K. Aktories (Hg.): Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie. Für Studenten der Medizin, Veterinärmedizin, Pharmazie, Chemie und Biologie sowie für Ärzte, Tierärzte und Apotheker. 9., völlig überarb. Aufl. München, Jena: Elsevier Urban & Fischer, S. 1–4.

Aldridge, W. N.; Reiner, E. (1975): Enzyme inhibitors as substrates: interactions of esterases with ethers of organophosphorous and carbonic acids. Amsterdam, Oxford, New York: Elsevier.

Alef, M. (2003): Praxis der Inhalationsanästhesie. In: M. Alef und G. Oechtering (Hg.): Praxis der Inhalationsanästhesie. Stuttgart: Enke Verlag, S. 1–17.

Ali-Shtayeh, M. S.; Jamous, R. M.; Abu Zaitoun, S. Y.; Qasem, I. B. (2014): In-vitro screening of acetylcholinesterase inhibitory activity of extracts from Palestinian indigenous flora in relation to the treatment of Alzheimer's disease. In: *Functional Foods in Health and Disease* 4 (9), S. 381. DOI: 10.31989/ffhd.v4i9.149.

Alkire, M. T.; Haier, R. J. (2001): Correlating in vivo anaesthetic effects with ex vivo receptor density data supports a GABAergic mechanism of action for propofol, but not for isoflurane. In: *British journal of anaesthesia* 86 (5), S. 618–626. DOI: 10.1093/bja/86.5.618.

AVV: Allgemeine Verwaltungsvorschrift zur Durchführung des Tierschutzgesetzes. Online verfügbar unter https://www.verwaltungsvorschriften-im-internet.de/bsvwvbund_09022000_32135220006.htm, zuletzt geprüft am 10.02.2023.

Amirtahmaseb, C. Z. (2015): Untersuchung über den Einsatz von Butorphanol zur Reduktion kastrationsbe-

dingter Schmerzen beim Saugferkel. Dissertation. Ludwig-Maximilians-Universität München, München. Lehrstuhl für Krankheiten des Schweines. Online verfügbar unter https://edoc.ub.uni-muenchen.de/18872/1/Amirtahmaseb_Caroline.pdf, zuletzt geprüft am 14.02.2023.

Animal Research Tomorrow: Purpose of the Animal Research Tomorrow. Online verfügbar unter <https://animalresearchtomorrow.org/en/purpose>, zuletzt geprüft am 02.02.2023.

Antonijevic, B.; Stojiljkovic, M. P. (2007): Unequal efficacy of pyridinium oximes in acute organophosphate poisoning. In: *Clinical medicine & research* 5 (1), S. 71–82. DOI: 10.3121/cmr.2007.701.

Araujo Furtado, M. d.; Lumley, L.; Robison, C.; Tong, L. C.; Lichtenstein, S.; Yourick, D. L. (2010): Spontaneous recurrent seizures after status epilepticus induced by soman in Sprague-Dawley rats. In: *Epilepsia* 51 (8), S. 1503–1510. DOI: 10.1111/j.1528-1167.2009.02478.x.

Arnot, L. F.; Veale, D. J. H.; Steyl, J. C. A.; Myburgh, J. G. (2011): Treatment rationale for dogs poisoned with

aldicarb (carbamate pesticide). In: *Journal of the South African Veterinary Association* 82 (4), S. 232–238. DOI: 10.4102/jsava.v82i4.80.

Arras, M.; Autenried, P.; Rettich, A.; Spaeni, D.; Rüllicke, T. (2001): Optimization of intraperitoneal injection anesthesia in mice: drugs, dosages, adverse effects, and anesthesia depth. In: *Comparative medicine*, S. 443–456.

Arras, M.; Becker, K.; Bergadano, A.; Durst, M.; Eberspächer-Schweda, E.; Fleischmann, T. et al. (2020): Schmerztherapie bei Versuchstieren. Fachinformation aus dem Ausschuss für Anästhesie und Analgesie der GV-SOLAS in Zusammenarbeit mit dem Arbeitskreis 4 in der TVT. Hg. v. GV-SOLAS.

ARRIVE: The ARRIVE guidelines 2.0. Online verfügbar unter <https://arriveguidelines.org/arrive-guidelines>, zuletzt geprüft am 02.02.2023.

Ashani, Y.; Bhattacharjee, A. K.; Leader, H.; Saxena, A.; Doctor, B. P. (2003): Inhibition of cholinesterases with cationic phosphonyl oximes highlights distinctive properties of the charged pyridine groups of quaternary oxime

reactivators. In: *Biochemical pharmacology* 66 (2), S. 191–202. DOI: 10.1016/s0006-2952(03)00204-1.

Ashani, Y.; Leader, H.; Aggarwal, N.; Silman, I.; Worek, F.; Sussman, J. L.; Goldsmith, M. (2016): In vitro evaluation of the catalytic activity of paraoxonases and phosphotriesterases predicts the enzyme circulatory levels required for in vivo protection against organophosphate intoxications. In: *Chemico-biological interactions* 259 (Pt B), S. 252–256. DOI: 10.1016/j.cbi.2016.04.039.

Ashani, Y.; Pistinner, S. (2004): Estimation of the upper limit of human butyrylcholinesterase dose required for protection against organophosphates toxicity: a mathematically based toxicokinetic model. In: *Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology* 77 (2), S. 358–367. DOI: 10.1093/toxsci/kfh012.

Augustsson, H.; van de Weerd, H. A.; Kruitwagen, C. L. J. J.; Baumans, V. (2003): Effect of enrichment on variation and results in the light/dark test. In: *Laboratory animals* 37 (4), S. 328–340. DOI: 10.1258/002367703322389898.

Aumüller, G.; Aust, G.; Conrad, A.; Engele, J.; Kirsch, J.; Maio, G. et al. (2007): Anatomie. Stuttgart: Thieme (Dua-le Reihe).

Aurbek, N.; Worek, F.; Thiermann, H. (2009): Aktuelle Aspekte in der Behandlung der phosphororganischen Vergiftung. In: *Wehrmedizinische Monatszeitschrift* (53), S. 340–349.

Avsaroglu, H.; van der Sar, A. S.; van Lith, H. A.; van Zutphen, L. F. M.; Hellebrekers, L. J. (2007): Differences in response to anaesthetics and analgesics between inbred rat strains. In: *Laboratory animals* 41 (3), S. 337–344. DOI: 10.1258/002367707781282811.

Bajgar, J.; Fusek, J.; Kassa, J.; Kuca, K.; Jun, D. (2015): Global Impact of Chemical Warfare Agents Used Before and After 1945. In: *Handbook of Toxicology of Chemical Warfare Agents*: Elsevier, S. 17–25.

Bajgar, J.; Fusek, J.; Kuca, K.; Bartosova, L.; Jun, D. (2007): Treatment of organophosphate intoxication using cholinesterase reactivators: facts and fiction. In: *Mini reviews in medicinal chemistry* 7 (5), S. 461–466. DOI: 10.2174/138955707780619581.

Banerjee, I.; Tripathi, S. K.; Roy, A. S. (2014): Efficacy of pralidoxime in organophosphorus poisoning: revisiting the controversy in Indian setting. In: *Journal of postgraduate medicine* 60 (1), S. 27–30. DOI: 10.4103/0022-3859.128803.

Banting, F. G.; Best, C. H.; Collip, J. B.; Macleod, J. J. R.; Noble, E. C. (1922): THE EFFECT OF PANCREATIC EXTRACT (INSULIN) ON NORMAL RABBITS. In: *American Journal of Physiology-Legacy Content* 62 (1), S. 162–176. DOI: 10.1152/ajplegacy.1922.62.1.162.

Barr, J. R.; Driskell, W. J.; Aston, L. S.; Martinez, R. A. (2004): Quantitation of Metabolites of the Nerve Agents Sarin, Soman, Cyclohexylsarin, VX, and Russian VX in Human Urine Using Isotope-Dilution Gas Chromatography-Tandem Mass Spectrometry. In: *Journal of Analytical Toxicology* 28 (5), S. 372–378. DOI: 10.1093/jat/28.5.372.

Barré-Sinoussi, F.; Montagutelli, X. (2015): Animal models are essential to biological research: issues and perspectives. In: *Future science OA* 1 (4), FSO63. DOI: 10.4155/fso.15.63.

Basel Declaration Society: Become a member of the "Basel Declaration Society". Online verfügbar unter <https://www.basel-declaration.org/basel-declaration-en/assets/File/Brosch%C3%BCre.pdf>, zuletzt geprüft am 02.02.2023.

Baumans, V. (2004): Use of animals in experimental research: an ethical dilemma? In: *Gene therapy* 11 Suppl 1, S64-6. DOI: 10.1038/sj.gt.3302371.

Behring, E. v. (1890): Ueber das Zustandekommen der Diphtherie-Immunität und der Tetanus-Immunität bei Thieren. DOI: 10.17192/eb2013.0164.

Benschop, H. P.; Jong, L. P. d. (1988): Nerve agent stereoisomers: analysis, isolation and toxicology. In: *Accounts of Chemical Research* 21 (10), S. 368–374. DOI: 10.1021/ar00154a003.

Benschop, H. P.; Jong, L. P. d. (1991): Toxicokinetics of soman: species variation and stereospecificity in elimination pathways. In: *Neuroscience and biobehavioral reviews* 15 (1), S. 73–77. DOI: 10.1016/S0149-7634(05)80094-6.

Benton, B. J.; McGuire, J. M.; Sommerville, D.; Dabisch, P. A.; Jakubowski, E. M.; Matson, K. L. et al. (2006): Effects of whole-body VX vapor exposure on lethality in rats. In: *Inhalation toxicology* 18 (14), S. 1091–1099. DOI: 10.1080/08958370600945598.

Berkaloff, A.; Bourguet, J.; Favard, P.; Favard, N.; Lacroix, J.-C. (1990): *Die Zelle*. Wiesbaden: Vieweg+Teubner Verlag.

Berlinger, J. (2017): VX nerve agent used to kill Kim Jong Nam, police say. CNN. Online verfügbar unter <https://edition.cnn.com/2017/02/23/asia/kim-jong-nam-vx-nerve-agent/index.html>, zuletzt aktualisiert am 27.02.2017, zuletzt geprüft am 23.01.2023.

Bernhart, K. I. (2017): Einfluss einer ad libitum Vollmilchtränke auf Futteraufnahme, Gewichtsentwicklung, Gesundheit und ausgewählte Blutparameter von Fleckviehkälbern. Ludwig-Maximilians-Universität München. Lehrstuhl für Tierschutz, Verhaltenskunde, Tierhygiene und Tierhaltung.

Berny, P.; Caloni, F.; Croubels, S.; Sachana, M.; Vandembroucke, V.; Davanzo, F.; Guitart, R. (2010): Animal

poisoning in Europe. Part 2: Companion animals. In: *Veterinary journal (London, England : 1997)* 183 (3), S. 255–259. DOI: 10.1016/j.tvjl.2009.03.034.

Berny, P.; Gaillet, J.-R. (2008): Acute poisoning of Red Kites (*Milvus milvus*) in France: data from the Sagir network. In: *Journal of wildlife diseases* 44 (2), S. 417–426. DOI: 10.7589/0090-3558-44.2.417.

BfR: ZEBET. Online verfügbar unter https://www.bfr.bund.de/de/a-z_index/zebet-202160.html, zuletzt geprüft am 11.02.2023.

BfR (2015a): Beurteilung der Belastung genetisch veränderter Fische (Knochenfische, Teleostei). Online verfügbar unter <https://www.bfr.bund.de/cm/343/beurteilung-der-belastung-genetisch-veraenderter-knochenfische-teleostei.pdf>, zuletzt geprüft am 11.02.2023.

BfR (2015b): Beurteilung der Belastung genetisch veränderter Mäuse und Ratten. Online verfügbar unter <https://www.bfr.bund.de/cm/343/beurteilung-der-belastung-genetisch-veraenderter-maeuse-und-ratten-version-2.pdf>, zuletzt geprüft am 11.02.2023.

Bigley, A. N.; Mabanglo, M. F.; Harvey, S. P.; Raushel, F. M. (2015): Variants of Phosphotriesterase for the Enhanced Detoxification of the Chemical Warfare Agent VR. In: *Biochemistry* 54 (35), S. 5502–5512. DOI: 10.1021/acs.biochem.5b00629.

Bigley, A. N.; Raushel, F. M. (2019): The evolution of phosphotriesterase for decontamination and detoxification of organophosphorus chemical warfare agents. In: *Chemico-biological interactions* 308, S. 80–88. DOI: 10.1016/j.cbi.2019.05.023.

Bigley, A. N.; Xu, C.; Henderson, T. J.; Harvey, S. P.; Raushel, F. M. (2013): Enzymatic neutralization of the chemical warfare agent VX: evolution of phosphotriesterase for phosphorothiolate hydrolysis. In: *Journal of the American Chemical Society* 135 (28), S. 10426–10432. DOI: 10.1021/ja402832z.

Binder, U.; Skerra, A. (2017): PASylation®: A versatile technology to extend drug delivery. In: *Current Opinion in Colloid & Interface Science* 31, S. 10–17. DOI: 10.1016/j.cocis.2017.06.004.

Birtley, R. D.; Roberts, J. B.; Thomas, B. H.; Wilson, A. (1966): Excretion and metabolism of ¹⁴C-pyridostigmine in the rat. In: *British journal of pharmacology and chemotherapy* 26 (2), S. 393–402. DOI: 10.1111/j.1476-5381.1966.tb01919.x.

Black, R. (2016): Volume 1: Fundamental Aspect. Chapter 1: Development, Historical Use and Properties of Chemical Warfare Agents. In: F. Worek, J. Jenner und H. Thiermann (Hg.): *Chemical Warfare Toxicology*. Cambridge: Royal Society of Chemistry (Issues in Toxicology), S. 9–28.

Black, R.; Harrison, J. (1996): The chemistry of organophosphorus chemical warfare agents. In: F. Hartley (Hg.): *The Chemistry of Organophosphorus Compounds*. Chichester, West Sussex, UK, New York: John Wiley & Sons Ltd., S. 781–840.

Black, R. M.; Read, R. W. (2013): Biological markers of exposure to organophosphorus nerve agents. In: *Archives of toxicology* 87 (3), S. 421–437. DOI: 10.1007/s00204-012-1005-1.

Blakemore, C.; MaCarthur Clark, J.; Nevalainen, T.; Oberdorfer, M.; Sussman, A. (2012): Implementing the 3Rs in neuroscience research: a reasoned approach. In: *Neuron* 75 (6), S. 948–950. DOI: 10.1016/j.neuron.2012.09.001.

Bleecker, J. d.; Lison, D.; van den Abeele, K.; Willems, J.; Reuck, J. de (1994): Acute and subacute organophosphate poisoning in the rat. In: *Neurotoxicology* 15 (2), S. 341–348.

Bloom, F. E. (2001): Neurotransmission an the central nervous system. In: J. G. Hardman und L. E. Limbird (Hg.): Goodman & Gilman's the pharmacological basis of therapeutics. 10. ed., international ed. New York, NY: McGraw-Hill Med. Publ, S. 293–320.

Böhm, S. (2020): Nozizeptives System. In: M. Freissmuth, S. Offermanns und S. Böhm (Hg.): Pharmakologie und Toxikologie. Berlin, Heidelberg: Springer, S. 273–291.

Bouwknrecht, J. A.; Paylor, R. (2002): Behavioral and physiological mouse assays for anxiety: a survey in nine

mouse strains. In: *Behavioural brain research* 136 (2), S. 489–501. DOI: 10.1016/s0166-4328(02)00200-0.

Breitburd, F.; Kirnbauer, R.; Hubbert, N. L.; Nonnenmacher, B.; Trin-Dinh-Desmarquet, C.; Orth, G. et al. (1995): Immunization with viruslike particles from cottontail rabbit papillomavirus (CRPV) can protect against experimental CRPV infection. In: *Journal of virology* 69 (6), S. 3959–3963. DOI: 10.1128/JVI.69.6.3959-3963.1995.

Brodbelt, D. (2008): Perioperative mortality in small animal anaesthesia. In: *Veterinary journal* 182 (2), S. 152–161. DOI: 10.1016/j.tvjl.2008.06.011.

Brunson, D. B. (2008): Pharmacology of inhalation anesthetics. In: R. E. Fish, M. J. Brown, P. J. Danneman und A. Z. Karas (Hg.): *Anesthesia and analgesia in laboratory animals*. London: Academic Press, S. 83–95.

Bruun, D. A.; Guignet, M.; Harvey, D. J.; Lein, P. J. (2019): Pretreatment with pyridostigmine bromide has no effect on seizure behavior or 24 hour survival in the rat model of acute diisopropylfluorophosphate intoxication.

In: *Neurotoxicology* 73, S. 81–84. DOI:

10.1016/j.neuro.2019.03.001.

Buckley, N. A.; Eddleston, M.; Li, Y.; Bevan, M.; Robertson, J. (2011): Oximes for acute organophosphate pesticide poisoning. In: *The Cochrane database of systematic reviews* (2), CD005085. DOI:

10.1002/14651858.CD005085.pub2.

Bundesinformationszentrum Landwirtschaft; Statistisches Bundesamt: Infografiken. Online verfügbar unter <https://www.landwirtschaft.de/landwirtschaft-verstehen/haetten-sies-gewusst/infografiken/>, zuletzt geprüft am 02.02.2023.

Bundesinstitut für Risikobewertung: Über das Bf3R. Online verfügbar unter

https://www.bf3r.de/de/ueber_das_bf3r-276226.html,
zuletzt geprüft am 02.02.2023.

Bundesinstitut für Risikobewertung: Verwendung von Versuchstieren im Jahr 2020. Online verfügbar unter https://www.bf3r.de/de/verwendung_von_versuchstieren_im_jahr_2020-288932.html, zuletzt geprüft am 02.02.2023.

Bundesinstitut für Risikobewertung (2021): Zahlen zu den im Jahr 2020 verwendeten Versuchstieren. Unter Mitarbeit von Deutsches Zentrum zum Schutz von Versuchstieren. Hg. v. Bundesinstitut für Risikobewertung. Online verfügbar unter <https://www.bf3r.de/cm/343/zahlen-zu-den-im-jahr-2020-verwendeten-versuchstieren.pdf>, zuletzt geprüft am 28.01.2023.

Burda, J. E.; Sofroniew, M. V. (2014): Reactive gliosis and the multicellular response to CNS damage and disease. In: *Neuron* 81 (2), S. 229–248. DOI: 10.1016/j.neuron.2013.12.034.

Burden, N.; Chapman, K.; Sewell, F.; Robinson, V. (2015): Pioneering Better Science through the 3Rs: An Introduction to the National Centre for the Replacement, Refinement, and Reduction of Animals in Research (NC3Rs). In: *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science* 54 (2), S. 198–208.

Burton, S. A.; Lemke, K. A.; Ihle, S. L.; Mackenzie, A. L. (1997): Effects of medetomidine on serum insulin and plasma glucose concentrations in clinically normal dogs.

In: *American journal of veterinary research* 58 (12), S. 1440–1442.

Busch, M.; Chourbaji, S.; Dammann, P.; Finger-Baier, K.; Gerold, S.; Hemisch, A. et al. (2017): Tiergerechte Haltung von Laborratten. Fachinformation aus dem Ausschuss für Tiergerechte Labortierhaltung. Hg. v. GV-SOLAS. Online verfügbar unter <https://www.gv-solas.de/wp-content/uploads/2021/08/2017Rattenhaltung.pdf>, zuletzt geprüft am 02.02.2023.

Butler, V. P. (1982): Antibodies as specific antagonists of toxins, drugs, and hormones. In: *Pharmacological reviews* 34 (1), S. 109–114.

Caldwell, S. R.; Raushel, F. M. (1991): Detoxification of organophosphate pesticides using a nylon based immobilized phosphotriesterase from *Pseudomonas diminuta*. In: *Applied biochemistry and biotechnology* 31 (1), S. 59–73. DOI: 10.1007/BF02922126.

Callaway, S.; Brimblecombe, R. W.; Blackburn, J. W.; Parkes, D. C. (1958): The effect of body weight and age on the susceptibility of rats to VX poisoning by the

subcutaneous route. In: *PTP 652, UK Archive Number WO 189/970*.

Caloni, F.; Breny, P.; Corubels, S.; Sachana, M.; Guitart, R. (2018): Epidemiology of Animal Poisonings in Europe. In: R. C. Gupta (Hg.): *Veterinary toxicology. Basic and clinical principles*. London, United Kingdom: Elsevier/Academic Press, S. 45–54.

Cannard, K. (2006): The acute treatment of nerve agent exposure. In: *Journal of the neurological sciences* 249 (1), S. 86–94. DOI: 10.1016/j.jns.2006.06.008.

Casida, J. E.; Quistad, G. B. (2004): Organophosphate toxicology: safety aspects of nonacetylcholinesterase secondary targets. In: *Chemical research in toxicology* 17 (8), S. 983–998. DOI: 10.1021/tx0499259.

Cegielski, J. P.; McMurray, D. N. (2004): The relationship between malnutrition and tuberculosis: evidence from studies in humans and experimental animals. In: *The international journal of tuberculosis and lung disease : the official journal of the International Union against Tuberculosis and Lung Disease* 8 (3), S. 286–298.

Chai, P. R.; Boyer, E. W.; Al-Nahhas, H.; Erickson, T. B. (2017): Toxic chemical weapons of assassination and warfare: nerve agents VX and sarin. In: *Toxicology communications* 1 (1), S. 21–23. DOI:

10.1080/24734306.2017.1373503.

Chai, P. R.; Hayes, B. D.; Erickson, T. B.; Boyer, E. W. (2018): Novichok agents: a historical, current, and toxicological perspective. In: *Toxicology communications* 2 (1), S. 45–48. DOI: 10.1080/24734306.2018.1475151.

Chan, J. F.-W.; Zhang, A. J.; Yuan, S.; Poon, V.; Chan, C.; Lee, A. et al. (2020): Simulation of the Clinical and Pathological Manifestations of Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) in a Golden Syrian Hamster Model: Implications for Disease Pathogenesis and Transmissibility. In: *Clinical infectious diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America* 71 (9), S. 2428–2446. DOI: 10.1093/cid/ciaa325.

Cherny, I.; Greisen, P.; Ashani, Y.; Khare, S. D.; Oberdorfer, G.; Leader, H. et al. (2013): Engineering V-type nerve agents detoxifying enzymes using computationally focused libraries. In: *ACS chemical biology* 8 (11), S. 2394–2403. DOI: 10.1021/cb4004892.

-
- Childs, A. F.; Davies, D. R.; Green, A. L.; Rutland, J. P. (1955): The reactivation by oximes and hydroxamic acids of cholinesterase inhibited by organo-phosphorus compounds. In: *British journal of pharmacology and chemotherapy* 10 (4), S. 462–465. DOI: 10.1111/j.1476-5381.1955.tb00106.x.
- Cislo, G. S.; Fer, T. M. de (2009): The Washington manual general internal medicine consult. 2nd ed. Philadelphia: Wolters Kluwer/Lippincott Williams & Wilkins (Washington manual subspecialty consult series).
- Clarke, K. W. (1993): Premedikation. In: G. U. Schmidt-Oechtering und M. Alef (Hg.): *Neue Aspekte der Veterinärnarkose und Intensivtherapie*. Berlin, Hamburg: Paul Parey Verlag, S. 19–24.
- Clayton, J. A.; Collins, F. S. (2014): Policy: NIH to balance sex in cell and animal studies. In: *Nature* 509 (7500), S. 282–283. DOI: 10.1038/509282a.
- Clement, J. G. (1992): Efficacy of various oximes against GF (cyclohexyl methylphosphonofluoridate) poisoning in mice. In: *Archives of toxicology* 66 (2), S. 143–144. DOI: 10.1007/BF02342509.

CliniTox: Carbamate / Organophosphate - Kleintier. Onlinedatenbank über Arzneimittel und Giftstoffe. Hg. v. Institut für Veterinärmedizinische Pharmakologie und Toxikologie der Universität Zürich. Online verfügbar unter

https://www.vetpharm.uzh.ch/clinitox/toxdb/klt_004.htm.

CliniTox: Coumarinderivate - Kleintier. Onlinedatenbank über Arzneimittel und Giftstoffe. Hg. v. Institut für Veterinärmedizinische Pharmakologie und Toxikologie der Universität Zürich. Online verfügbar unter

[https://www.vetpharm.uzh.ch/clinitox/toxdb/klt_003.htm?](https://www.vetpharm.uzh.ch/clinitox/toxdb/klt_003.htm?Submit=Hier+KLICKEN+zum+Weiterlesen+-+sponsored+by+Laboklin)

[Submit=Hier+KLICKEN+zum+Weiterlesen+-+sponsored+by+Laboklin](https://www.vetpharm.uzh.ch/clinitox/toxdb/klt_003.htm?Submit=Hier+KLICKEN+zum+Weiterlesen+-+sponsored+by+Laboklin).

Cohen, J. (2020): From mice to monkeys, animals studied for coronavirus answers. In: *Science* 368 (6488), S. 221–222. DOI: 10.1126/science.368.6488.221.

Connolly, C. N.; Wafford, K. A. (2004): The Cys-loop superfamily of ligand-gated ion channels: the impact of receptor structure on function. In: *Biochemical Society transactions* 32 (Pt3), S. 529–534. DOI:

10.1042/BST0320529.

Coria-Avila, G. A.; Gavrilu, A. M.; Ménard, S.; Ismail, N.; Pfaus, J. G. (2007): Cecum location in rats and the implications for intraperitoneal injections. In: *Lab animal* 36 (7), S. 25–30. DOI: 10.1038/labam0707-25.

Costa, L. G. (2006): Current issues in organophosphate toxicology. In: *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry* 366 (1-2), S. 1–13. DOI: 10.1016/j.cca.2005.10.008.

Costa, L. G.; Giordano, G.; Cole, T. B.; Marsillach, J.; Furlong, C. E. (2013): Paraoxonase 1 (PON1) as a genetic determinant of susceptibility to organophosphate toxicity. In: *Toxicology* 307, S. 115–122. DOI: 10.1016/j.tox.2012.07.011.

Dale, O.; Brown, B. R. (1987): Clinical pharmacokinetics of the inhalational anaesthetics. In: *Clinical pharmacokinetics* 12 (3), S. 145–167. DOI: 10.2165/00003088-198712030-00001.

Dancy, J. (2004): Ethics without principles. Oxford: Clarendon Press. Online verfügbar unter <http://www.loc.gov/catdir/enhancements/fy0620/2004303051-d.html>.

DeClementi, C. (2018): Prevention and Treatment of Poisoning. In: *Veterinary Toxicology*: Elsevier, S. 1141–1159.

DeClementi, C.; Sobczak, B. R. (2018): Common Rodenticide Toxicoses in Small Animals. In: *The Veterinary clinics of North America. Small animal practice* 48 (6), S. 1027–1038. DOI: 10.1016/j.cvsm.2018.06.006.

Désiré, B.; Saint-André, S. (1987): Inactivation of sarin and soman by cyclodextrins in vitro. In: *Experientia* 43 (4), S. 395–397. DOI: 10.1007/BF01940424.

Despotović, D.; Aharon, E.; Dubovetskyi, A.; Leader, H.; Ashani, Y.; Tawfik, D. (2019): A mixture of three engineered phosphotriesterases enables rapid detoxification of the entire spectrum of known threat nerve agents. In: *Protein engineering, design & selection* 32 (4), S. 169–174. DOI: 10.1093/protein/gzz039.

Deutsches Zentrum zum Schutz von Versuchstieren - Bf3R: Zentralstelle zur Erfassung und Bewertung von Ersatz- und Ergänzungsmethoden zum Tierversuch (ZEBET). Online verfügbar unter https://www.bf3r.de/de/zentralstelle_zur_erfassung_und_

bewer-
tung_von_ersatz__und_ergaenzungsmethoden_zum_tie
rversuch__zebet_-276672.html, zuletzt geprüft am
02.02.2023.

DFG (2021): „Initiative Transparente Tierversuche“ star-
tet. Pressemitteilung Nr. 24. Online verfügbar unter
https://www.dfg.de/service/presse/pressemitteilungen/2021/pressemitteilung_nr_24/index.html, zuletzt geprüft am
02.02.2023.

DFG-Magazin (2019): "Mit allem Für und Wider". Online
verfügbar unter
[https://www.dfg.de/dfg_magazin/aus_gremien_politikber
atung/dossier_tierexperimentelle_forschung/02_forschun
g_interview_vollmar/index.html](https://www.dfg.de/dfg_magazin/aus_gremien_politikberatung/dossier_tierexperimentelle_forschung/02_forschung_interview_vollmar/index.html), zuletzt geprüft am
02.02.2023.

DFG-Senatskommission (2016): Tierversuche in der
Forschung. Stand: 01.02.2016. Hg. v. DFG. Bonn: DFG.

Doke, S. K.; Dhawale, S. C. (2015): Alternatives to ani-
mal testing: A review. In: *Saudi pharmaceutical journal* :
*the official publication of the Saudi Pharmaceutical Soci-
ety* 23 (3), S. 223–229. DOI: 10.1016/j.jsps.2013.11.002.

Drenckhahn, D. (Hg.) (2008): Zellen- und Gewebelehre, Entwicklungslehre, Skelett- und Muskelsystem, Atemsystem, Verdauungssystem, Harn- und Genitalsystem. Unter Mitarbeit von B. Christ. Elsevier Urban & Fischer. 17., durchgesehene Auflage. München: Elsevier (Anatomie, Bd. 1).

Du Percie Sert, N.; Ahluwalia, A.; Alam, S.; Avey, M. T.; Baker, M.; Browne, W. J. et al. (2020a): Reporting animal research: Explanation and elaboration for the ARRIVE guidelines 2.0. In: *PLoS biology* 18 (7), e3000411. DOI: 10.1371/journal.pbio.3000411.

Du Percie Sert, N.; Hurst, V.; Ahluwalia, A.; Alam, S.; Avey, M. T.; Baker, M. et al. (2020b): The ARRIVE guidelines 2.0: Updated guidelines for reporting animal research. In: *PLoS biology* 18 (7), e3000410. DOI: 10.1371/journal.pbio.3000410.

Düwell, M.; Steigleder, K. (Hg.) (2003): Bioethik. Eine Einführung. Erste Auflage, Originalausgabe. Frankfurt am Main: Suhrkamp (Suhrkamp-Taschenbuch Wissenschaft, 1597).

Ebert, U.; Frey, H. H.; Schulz, R. (2002): Pharmakologie des zentralen Nervensystems (ZNS). In: H. H. Frey und U. Ebert (Hg.): Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie für die Veterinärmedizin, Bd. 3. Stuttgart: Enke Verlag, S. 87–138.

Eddleston, M. (2019): Novel Clinical Toxicology and Pharmacology of Organophosphorus Insecticide Self-Poisoning. In: *Annual review of pharmacology and toxicology* 59, S. 341–360. DOI: 10.1146/annurev-pharmtox-010818-021842.

Eddleston, M.; Buckley, N. A.; Checketts, H.; Senarathna, L.; Mohamed, F.; Sheriff, M. H. R.; Dawson, A. (2004): Speed of initial atropinisation in significant organophosphorus pesticide poisoning--a systematic comparison of recommended regimens. In: *Journal of toxicology. Clinical toxicology* 42 (6), S. 865–875. DOI: 10.1081/clt-200035223.

Eddleston, M.; Eyer, P.; Worek, F.; Juszczak, E.; Alder, N.; Mohamed, F. et al. (2009): Pralidoxime in acute organophosphorus insecticide poisoning--a randomised controlled trial. In: *PLoS medicine* 6 (6), e1000104. DOI: 10.1371/journal.pmed.1000104.

Eddleston, M.; Eyer, P.; Worek, F.; Mohamed, F.; Senarathna, L.; Meyer, L. von et al. (2005): Differences between organophosphorus insecticides in human self-poisoning: a prospective cohort study. In: *Lancet (London, England)* 366 (9495), S. 1452–1459. DOI: 10.1016/S0140-6736(05)67598-8.

Eddleston, M.; Szinicz, L.; Eyer, P.; Buckley, N. (2002): Oximes in acute organophosphorus pesticide poisoning: a systematic review of clinical trials. In: *QJM : monthly journal of the Association of Physicians* 95 (5), S. 275–283. DOI: 10.1093/qjmed/95.5.275.

Edens, C.; Dybdahl-Sissoko, N. C.; Weldon, W. C.; Oberste, M. S.; Prausnitz, M. R. (2015): Inactivated polio vaccination using a microneedle patch is immunogenic in the rhesus macaque. In: *Vaccine* 33 (37), S. 4683–4690. DOI: 10.1016/j.vaccine.2015.01.089.

Efremenko, E. N.; Lyagin, I. V.; Klyachko, N. L.; Bronich, T.; Zavyalova, N. V.; Jiang, Y.; Kabanov, A. V. (2017): A simple and highly effective catalytic nanozyme scavenger for organophosphorus neurotoxins. In: *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Re-*

lease Society 247, S. 175–181. DOI:

10.1016/j.jconrel.2016.12.037.

Eger, E. I. (1981): Isoflurane: a review. In: *Anesthesiology* 55 (5), S. 559–576. DOI: 10.1097/00000542-

198111000-00014.

Eger, E. I. (1984): The pharmacology of isoflurane. In:

British journal of anaesthesia 56 Suppl 1, 71S-99S.

Eger, E. I. (1998): Current and future perspectives on inhaled anesthetics. In: *Pharmacotherapy* 18 (5), S.

895–910.

Eger, E. I.; Johnson, B. H.; Ferrell, L. D. (1987): Comparison of the toxicity of I-653 and isoflurane in rats: a test of the effect of repeated anesthesia and use of dry soda lime. In: *Anesthesia and analgesia* 66 (12), S. 1230–1233.

Ekser, B.; Rigotti, P.; Gridelli, B.; Cooper, D. K. C.

(2009): Xenotransplantation of solid organs in the pig-to-primate model. In: *Transplant immunology* 21 (2), S. 87–

92. DOI: 10.1016/j.trim.2008.10.005.

Ellman, G. L.; Courtney, K. D.; Andres, V.; Feather-Stone, R. M. (1961): A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. In: *Biochemical pharmacology* 7, S. 88–95. DOI: 10.1016/0006-2952(61)90145-9.

Elsinghorst, P. W.; Worek, F.; Thiermann, H.; Wille, T. (2013): Drug development for the management of organophosphorus poisoning. In: *Expert opinion on drug discovery* 8 (12), S. 1467–1477. DOI: 10.1517/17460441.2013.847920.

Engel, J. (Hg.) (1993): Surgical treatment of the epilepsies. Palm Desert International Conference on the Surgical Treatment of Epilepsies. 2. ed. New York, NY: Raven Press.

Epstein, J.; Callahan J. J.; Bauer, V. E. (1974): The Kinetics and Mechanisms of Hydrolysis of Phosphonothioates in Dilute Aqueous Solution. In: *Phosphorus* (4), S. 157–163.

Erhardt, W. (2012): Definition, Aufgaben und Bedeutung der tierärztlichen Anästhesiologie. In: W. Erhardt, J. Henke, J. Haberstroh, C. Baumgartner und S. Tacke

(Hg.): Anästhesie und Analgesie. beim Klein- und Heimtier mit Exoten, Labortieren, Vögeln, Reptilien, Amphibien und Fischen. Unter Mitarbeit von P. Kölle, R. Korbelt, C. Lendl und M. Lierz. 2., vollständig überarb. und erw. Aufl. Stuttgart: Schattauer, S. 5–11.

Erhardt, W.; Baumgartner, C. (2012): Praktische Grundlagen zur Narkoseführung. Anästhesieregime. In: W. Erhardt, J. Henke, J. Haberstroh, C. Baumgartner und S. Tacke (Hg.): Anästhesie und Analgesie. beim Klein- und Heimtier mit Exoten, Labortieren, Vögeln, Reptilien, Amphibien und Fischen. Unter Mitarbeit von P. Kölle, R. Korbelt, C. Lendl und M. Lierz. 2., vollständig überarb. und erw. Aufl. Stuttgart: Schattauer, S. 327–340.

Erhardt, W.; Haberstroh, J. (2012): Mechanismen der Anästhesie. Anästhesietiefe und Anästhesiezeichen. In: W. Erhardt, J. Henke, J. Haberstroh, C. Baumgartner und S. Tacke (Hg.): Anästhesie und Analgesie. beim Klein- und Heimtier mit Exoten, Labortieren, Vögeln, Reptilien, Amphibien und Fischen. Unter Mitarbeit von P. Kölle, R. Korbelt, C. Lendl und M. Lierz. 2., vollständig überarb. und erw. Aufl. Stuttgart: Schattauer, S. 317–326.

Erhardt, W.; Henke, J.; Tacke, S.; Baumgartner, C.; Kroker, R. (2012): Allgemeinanästhetika. In: W. Erhardt, J. Henke, J. Haberstroh, C. Baumgartner und S. Tacke (Hg.): Anästhesie und Analgesie. beim Klein- und Heimtier mit Exoten, Labortieren, Vögeln, Reptilien, Amphibien und Fischen. Unter Mitarbeit von P. Kölle, R. Korbel, C. Lendl und M. Lierz. 2., vollständig überarb. und erw. Aufl. Stuttgart: Schattauer, S. 17–110.

Erhardt, W.; Lendl, C. (2002): Präanästhetische Notfälle und präformierte Risikopatienten. In: W. Erhardt, J. Henke und C. Lendl (Hg.): Narkosenotfälle. Stuttgart: Enke Verlag, S. 71–112.

Escher, B. (2021): Protein-Engineering katalytischer Bioscavenger zur Detoxifizierung phosphororganischer Verbindungen. Technischen Universität München. Lehrstuhl für biologische Chemie.

Escher, B.; Köhler, A.; Job, L.; Worek, F.; Skerra, A. (2020): Translating the Concept of Bispecific Antibodies to Engineering Heterodimeric Phosphotriesterases with Broad Organophosphate Substrate Recognition. In: *Biochemistry* 59 (45), S. 4395–4406. DOI: 10.1021/acs.biochem.0c00751.

ESF–EMRC (2011): Position on the Directive on the Protection of Animals Position on the Directive on the Protection of Animals used for Scientific Purposes (2010/63/EU). Online verfügbar unter http://archives.esf.org/fileadmin/Public_documents/Publications/protectionAnimals_pp3.pdf, zuletzt geprüft am 02.02.2023.

Estour, F.; Letort, S.; Müller, S.; Kalakuntla, R. K.; Le Provost, R.; Wille, T. et al. (2013): Functionalized cyclodextrins bearing an alpha nucleophile--a promising way to degrade nerve agents. In: *Chemico-biological interactions* 203 (1), S. 202–207. DOI: 10.1016/j.cbi.2012.10.020.

Europäische Kommission: EURL ECVAM dataset on alternative methods to animal experimentation (DB-ALM). Online verfügbar unter <https://data.jrc.ec.europa.eu/dataset/b7597ada-148d-4560-9079-ab0a5539cad3>, zuletzt geprüft am 11.02.2023.

Europäisches Übereinkommen zum Schutz der für Versuche und andere wissenschaftliche Zwecke verwendeten Wirbeltiere: Europäisches Übereinkommen zum

Schutz der für Versuche und andere wissenschaftliche Zwecke verwendeten Wirbeltiere. Online verfügbar unter [https://www.tierhyg.vetmed.uni-muen-chen.de/tierschutz/tierschutzlinks/ts_downloads/eutiervers.pdf](https://www.tierhyg.vetmed.uni-muenchen.de/tierschutz/tierschutzlinks/ts_downloads/eutiervers.pdf), zuletzt geprüft am 09.02.2023.

Ewringmann, A.; Glöckner, B. (2014): Leitsymptome bei Hamster, Ratte, Maus und Rennmaus. Stuttgart: Enke Verlag.

Eyer, F.; Felgenhauer, N.; Thiermann, H.; Meischner, V.; Kiderlen, D.; Eyer, P.; Zilker, T. (2004): Aktuelle Empfehlungen zur Diagnostik und Therapie von Vergiftungen mit insektiziden Organophosphaten. In: *Intensivmed* 41 (5). DOI: 10.1007/s00390-004-0467-7.

Eyer, F.; Worek, F.; Eyer, P.; Felgenhauer, N.; Haberkorn, M.; Zilker, T.; Thiermann, H. (2009): Obidoxime in acute organophosphate poisoning: 1 - clinical effectiveness. In: *Clinical toxicology (Philadelphia, Pa.)* 47 (8), S. 798–806. DOI: 10.1080/15563650903206828.

Eyer, P. (2003): The role of oximes in the management of organophosphorus pesticide poisoning. In: *Toxicologi-*

cal reviews 22 (3), S. 165–190. DOI: 10.2165/00139709-200322030-00004.

Eyer, P.; Szinicz, L.; Thiermann, H.; Worek, F.; Zilker, T. (2007): Testing of antidotes for organophosphorus compounds: experimental procedures and clinical reality. In: *Toxicology* 233 (1-3), S. 108–119. DOI: 10.1016/j.tox.2006.08.033.

Ferdowsian, H. R.; Gluck, J. P. (2015): The ethical challenges of animal research. In: *Cambridge quarterly of healthcare ethic: CQ: the international journal of healthcare ethics committees* 24 (4), S. 391–406. DOI: 10.1017/S0963180115000067.

Field, K. J.; White, W.; Lang, C. M. (1993): Anaesthetic effects of chloral hydrate, pentobarbitone and urethane in adult male rats. In: *Laboratory animals* 27 (3), S. 258–269. DOI: 10.1258/002367793780745471.

Fikes, J. D. (1990): Toxicology of selected pesticides, drugs, and chemicals. Organophosphorus and carbamate insecticides. In: *The Veterinary clinics of North America. Small animal practice* 20 (2), S. 353–367. DOI: 10.1016/S0195-5616(90)50029-7.

Fischer, H.; Gottschlich, R.; Seelig, A. (1998): Blood-brain barrier permeation: molecular parameters governing passive diffusion. In: *The Journal of membrane biology* 165 (3), S. 201–211. DOI: 10.1007/s002329900434.

Fishburn, C. S. (2008): The pharmacology of PEGylation: balancing PD with PK to generate novel therapeutics. In: *Journal of pharmaceutical sciences* 97 (10), S. 4167–4183. DOI: 10.1002/jps.21278.

Fisher, I. J.; Pain, D. J.; Thomas, V. G. (2006): A review of lead poisoning from ammunition sources in terrestrial birds. In: *Biological Conservation* 131 (3), S. 421–432. DOI: 10.1016/j.biocon.2006.02.018.

Fisher, P.; Campbell, K. J.; Howald, G. R.; Warburton, B. (2019): Anticoagulant Rodenticides, Islands and Animal Welfare Accountancy. In: *Animals : an open access journal from MDPI* 9 (11). DOI: 10.3390/ani9110919.

Flecknell, P. A. (2015): Laboratory animal anaesthesia. Fourth edition. Amsterdam [u.a.]: Elsevier AP.

Flecknell, P. A.; Hu, C.; Liles, J. H. (1991): Journal Article Fentanyl and medetomidine anaesthesia in the rat. In: *Journal of Veterinary Anaesthesia* (18), S. 53.

Francis, J. (1958): Tuberculosis in Animals and Man. A Study in Comparative Pathology: London: Cassell & Co. Ltd.

Franks, N. P. (2008): General anaesthesia: from molecular targets to neuronal pathways of sleep and arousal. In: *Nature reviews. Neuroscience* 9 (5), S. 370–386. DOI: 10.1038/nrn2372.

Frederiksson, T. (1957): Pharmacological properties of methyl-fluoro-phosphorylcholines; two synthetic cholinergic drugs. In: *Archives internationales de pharmacodynamie et de therapie* 113 (1-2), S. 101–113.

Freissmuth, M. (2020): Pharmakokinetik. In: M. Freissmuth, S. Offermanns und S. Böhm (Hg.): Pharmakologie und Toxikologie. Berlin, Heidelberg: Springer, S. 9–40.

Frey, H. H. (1999): Opioide in der Medizin. Berlin, Barcelona: Springer.

Fröscher, W. (2008): Pharmakotherapie der Epilepsien. Tabellarische Darstellung unter besonderer Berücksichtigung der Pharmakokinetik ; mit 25 Tabellen. 4., vollst. überarb. und erw. Aufl. Stuttgart, New York: Schattauer.

FSVO (2022): Technical information Animal experimentation. Severity degrees 1.04, 2022. Online verfügbar unter

https://www.blv.admin.ch/dam/blv/en/dokumente/tiere/publikationen-und-forschung/tierversuche/klassifikation-schweregrad-tv.pdf.download.pdf/116104_EN.pdf, zuletzt geprüft am 11.02.2023.

Fujii, T.; Mashimo, M.; Moriwaki, Y.; Misawa, H.; Ono, S.; Horiguchi, K.; K., Koichiro (2017): Expression and Function of the Cholinergic System in Immune Cells. In: *Frontiers in immunology* 8, S. 1085. DOI: 10.3389/fimmu.2017.01085.

Gabriel, S. (2010): Schmerztherapie beim Heimtier. In: *Kompendium Kleintiere* (1), S. 37–41.

Gaertner, D.; Hallman, T.; Hankenson, F.; Batchelder, M. (2008): Anesthesia and analgesia for laboratory rodents. In: R. E. Fish, M. J. Brown, P. J. Danneman und A. Z. Karas (Hg.): *Anesthesia and analgesia in laboratory animals*. London: Academic Press, S. 239–397.

Gage, M.; Rao, N. S.; Samidurai, M.; Putra, M.; Vasanthi, S. S.; Meyer, C. et al. (2021): Soman (GD) Rat Mod-

el to Mimic Civilian Exposure to Nerve Agent: Mortality, Video-EEG Based Status Epilepticus Severity, Sex Differences, Spontaneously Recurring Seizures, and Brain Pathology. In: *Frontiers in cellular neuroscience* 15, S. 798247. DOI: 10.3389/fncel.2021.798247.

Gebauer, M.; Skerra, A. (2018): Prospects of PASylation® for the design of protein and peptide therapeutics with extended half-life and enhanced action. In: *Bioorganic & medicinal chemistry* 26 (10), S. 2882–2887. DOI: 10.1016/j.bmc.2017.09.016.

Genzel, L.; Adan, R.; Berns, A.; van den Beucken, J. J. J. P.; Blokland, A.; Boddeke, E. H. W. G. M. et al. (2020): How the COVID-19 pandemic highlights the necessity of animal research. In: *Current biology: CB* 30 (18), R1014-R1018. DOI: 10.1016/j.cub.2020.08.030.

Ginsburg, S.; Wilson, I. B. (1957): Oximes of the Pyridine Series 1. In: *J. Am. Chem. Soc.* 79 (2), S. 481–485. DOI: 10.1021/ja01559a067.

Goedde, H. W.; Altland, K. (1971): Suxamethonium sensitivity. In: *Annals of the New York Academy of Sciences*

179, S. 695–703. DOI: 10.1111/j.1749-6632.1971.tb46945.x.

Goldsmith, M.; Aggarwal, N.; Ashani, Y.; Jubran, H.; Greisen, P., JR; Ovchinnikov, S. et al. (2017): Overcoming an optimization plateau in the directed evolution of highly efficient nerve agent bioscavengers. In: *Protein engineering, design & selection* 30 (4), S. 333–345. DOI: 10.1093/protein/gzx003.

Goldsmith, M.; Ashani, Y. (2018): Catalytic bioscavengers as countermeasures against organophosphate nerve agents. In: *Chemico-biological interactions* 292, S. 50–64. DOI: 10.1016/j.cbi.2018.07.006.

Goldsmith, M.; Ashani, Y.; Simo, Y.; Ben-David, M.; Leader, H.; Silman, I. et al. (2012): Evolved stereoselective hydrolases for broad-spectrum G-type nerve agent detoxification. In: *Chemistry & biology* 19 (4), S. 456–466. DOI: 10.1016/j.chembiol.2012.01.017.

Goldsmith, M.; Eckstein, S.; Ashani, Y.; Greisen, P.; Leader, H.; Sussman, J. L. et al. (2016): Catalytic efficiencies of directly evolved phosphotriesterase variants with structurally different organophosphorus compounds

in vitro. In: *Archives of toxicology* 90 (11), S. 2711–2724.
DOI: 10.1007/s00204-015-1626-2.

Golfinopoulos, S. K.; Nikolaou, A. D.; Kostopoulou, M. N.; Xilourgidis, N. K.; Vagi, M. C.; Lekkas, D. T. (2003): Organochlorine pesticides in the surface waters of Northern Greece. In: *Chemosphere* 50 (4), S. 507–516.
DOI: 10.1016/S0045-6535(02)00480-0.

Golledge, H.; Jirkof, P. (2016): Score sheets and analgesia. In: *Laboratory animals* 50 (6), S. 411–413. DOI: 10.1177/0023677216675387.

Goncharov, N. V.; Terpilowski, M. A.; Shmurak, V. I.; Belinskaya, D. A.; Avdonin, P. V. (2019): The Rat (*Rattus norvegicus*) as a Model Object for Acute Organophosphate Poisoning. 1. Biochemical Aspects. In: *J Evol Biochem Phys* 55 (2), S. 112–123. DOI: 10.1134/S0022093019020042.

Gosh, R.; Newman, J. F. (1955): A new group of organophosphorous pesticides. In: *Chemistry & Industry* (11).

Göthert, M.; Bönisch, H.; Schlicker, E.; Helmchen, H. (1996): Psychopharmaka. In: W. Forth, D. Henschler, W. Rummel und K. Starke (Hg.): Allgemeine und spezielle

Pharmakologie und Toxikologie. Heidelberg, Oxford: Spektrum, S. 285–317.

Grando, S. A.; Kawashima, K.; Wessler, I. (2003): Introduction: the non-neuronal cholinergic system in humans. In: *Life sciences* 72 (18-19), S. 2009–2012. DOI: 10.1016/s0024-3205(03)00063-8.

Graw, J. (2015): Genetik. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.

Green, C. J. (1982): Animal anaesthesia. 2nd print. with amendments 1982. London: Laboratory Animals (Laboratory animals handbooks, 8).

Green, C. J.; Knight, J.; Precious, S.; Simpkin, S. (1981): Ketamine alone and combined with diazepam or xylazine in laboratory animals: a 10 year experience. In: *Laboratory animals* 15 (2), S. 163–170. DOI: 10.1258/002367781780959107.

Grimm, H. (2012): Bentham's Erben und ihre Probleme - Zur Selbstreflexion einer Ethik der Mensch-Tier-Beziehung. In: M. Zichy, J. Ostheimer und H. Grimm (Hg.): Was ist ein moralisches Problem? Zur Frage des

Gegenstandes angewandter Ethik. Orig.-Ausg. Freiburg, München: Alber, S. 436–475.

Grimm, H. (2015): Turning apples into oranges? The harm-benefit analysis and how to take ethical considerations into account. In: *Alternatives to laboratory animals* 43 (2), P22-4. DOI: 10.1177/026119291504300211.

Grob, D. (1956): The manifestations and treatment of poisoning due to nerve gas and other organic phosphate anticholinesterase compounds. In: *A.M.A. archives of internal medicine* 98 (2), S. 221–239. DOI: 10.1001/archinte.1956.00250260095010.

Gross, D.; Tolba, R. H. (2015): Ethics in Animal-Based Research. In: *European surgical research. Europäische chirurgische Forschung. Recherches chirurgicales européennes* 55 (1-2), S. 43–57. DOI: 10.1159/000377721.

Gross, M. E. (2001): Veterinary Pharmacology and Therapeutics. In: H. R. Adams (Hg.): *Veterinary pharmacology and therapeutics*. 8. ed. Ames, Iowa: Iowa State Press, S. 299–342.

GG: Grundgesetz für die Bundesrepublik Deutschland. Online verfügbar unter <https://www.gesetze-im->

internet.de/gg/BJNR000010949.html, zuletzt geprüft am 02.02.1996.

Guedel, A. E. (1951): Inhalation Anästhesie. New York: Macmillan.

Guignet, M.; Dhakal, K.; Flannery, B. M.; Hobson, B. A.; Zolkowska, D.; Dhir, A. et al. (2020): Persistent behavior deficits, neuroinflammation, and oxidative stress in a rat model of acute organophosphate intoxication. In: *Neurobiology of disease* 133, S. 104431. DOI: 10.1016/j.nbd.2019.03.019.

Guillemain, M.; Devineau, O.; Lebreton, J.-D.; Mondain-Monval, J.-Y.; Johnson, A. R.; Simon, G. (2007): Lead shot and teal (*Anas crecca*) in the Camargue, Southern France: Effects of embedded and ingested pellets on survival. In: *Biological Conservation* 137 (4), S. 567–576. DOI: 10.1016/j.biocon.2007.03.016.

Guitart, R.; Croubels, S.; Caloni, F.; Sachana, M.; Davanzo, F.; Vandenbroucke, V.; Berny, P. (2010a): Animal poisoning in Europe. Part 1: Farm livestock and poultry. In: *Veterinary journal (London, England : 1997)* 183 (3), S. 249–254. DOI: 10.1016/j.tvjl.2009.03.002.

Guitart, R.; Sachana, M.; Caloni, F.; Croubels, S.; Vandenbroucke, V.; Berny, P. (2010b): Animal poisoning in Europe. Part 3: Wildlife. In: *Veterinary journal (London, England : 1997)* 183 (3), S. 260–265. DOI:

10.1016/j.tvj.2009.03.033.

Gunderson, C. H.; Lehmann, C. R.; Sidell, F. R.; Jabbari, B. (1992): Nerve agents: a review. In: *Neurology* 42 (5), S. 946–950. DOI: 10.1212/wnl.42.5.946.

Gunnell, D.; Eddleston, M.; Phillips, M. R.; Konradsen, F. (2007): The global distribution of fatal pesticide self-poisoning: systematic review. In: *BMC public health* 7, S. 357. DOI: 10.1186/1471-2458-7-357.

Gupta, PK. (2019): Concepts and Applications in Veterinary Toxicology. An Interactive Guide. 1st ed. 2019. Cham: Springer (Springer eBook Collection).

Gupta, R. C. (2005): Toxicology of Organophosphate & Carbamate Compounds. 1. Aufl. s.l.: Elsevier professional. Online verfügbar unter <https://ebookcentral.proquest.com/lib/kxp/detail.action?doid=299439>.

Gupta, R. C. (Hg.) (2020): Handbook of toxicology of chemical warfare agents. Third edition. San Diego: Elsevier Academic Press. Online verfügbar unter <https://ebookcentral.proquest.com/lib/kxp/detail.action?dclid=6201147>.

Gupta, R. C.; Miatovic, D.: Toxicity of organophosphates carbamates. In: *Mammalian toxicology of insecticides* 2012, S. 104–136.

Gupta, R. C.; Robin, D. B. (2022): Overview of Insecticide and Acaricide (Organic) Toxicosis in Animals. Hg. v. MSD Veterinary Manual. Online verfügbar unter <https://www.msdrvetermanual.com/toxicology/insecticide-and-acaricide-organic-toxicity/overview-of-insecticide-and-acaricide-organic-toxicosis-in-animals>, zuletzt aktualisiert am Last review/revision Aug 2022; Modified Nov 2022.

Gupta, R. C.; Sachana, M.; Mukherjee; I. M.; Doss, R. B.; Malik, J. K.; Miatovic, D. (2018): Organophosphates and Carbamates. In: R. C. Gupta (Hg.): *Veterinary toxicology. Basic and clinical principles*. London, United Kingdom: Elsevier/Academic Press, S. 495–508.

Gupta, R. D.; Goldsmith, M.; Ashani, Y.; Simo, Y.; Mullo-
kandov, G.; Bar, H. et al. (2011): Directed evolution of
hydrolases for prevention of G-type nerve agent intoxica-
tion. In: *Nature chemical biology* 7 (2), S. 120–125. DOI:
10.1038/nchembio.510.

Haberstroh, J. (2012): Gesetzliche Vorschriften rund um
die Anästhesie. Arbeitssicherheits- und umweltrechtliche
Aspekte der Inhalationsanästhetika. In: W. Erhardt, J.
Henke, J. Haberstroh, C. Baumgartner und S. Tacke
(Hg.): Anästhesie und Analgesie. beim Klein- und Heim-
tier mit Exoten, Labortieren, Vögeln, Reptilien, Amphi-
bien und Fischen. Unter Mitarbeit von P. Kölle, R. Kor-
bel, C. Lendl und M. Lierz. 2., vollständig überarb. und
erw. Aufl. Stuttgart: Schattauer, S. 154–160.

Haines, D. D.; Fox, S. C. (2014): Acute and Long-Term
Impact of Chemical Weapons: Lessons from the Iran-
Iraq War. In: *Forensic science review* 26 (2), S. 97–114.

Hall, L. W.; Clarke, K. W. (1991): Anaesthesia of the
species rodents. In: L. W. Hall und K. W. Clarke (Hg.):
Veterinary Anaesthesia. London, Tokyo: Bailliere Tindall,
S. 342–343.

Hall, R. I.; Schwieger, I. M.; Hug, C. C. (1988): The anesthetic efficacy of midazolam in the enflurane-anesthetized dog. In: *Anesthesiology* 68 (6), S. 862–866. DOI: 10.1097/00000542-198806000-00005.

Hallermann, S.; Schmidt, R. F. (2019): Erregungsübertragung von Zelle zu Zelle. Arbeitsweise von Synapsen, Neurotransmitter und ihre Rezeptoren. In: R. Brandes, F. Lang und R. F. Schmidt (Hg.): *Physiologie des Menschen*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg (Springer-Lehrbuch), S. 95–115.

Hamilton, M. G.; Lundy, P. M. (1989): HI-6 therapy of soman and tabun poisoning in primates and rodents. In: *Archives of toxicology* 63 (2), S. 144–149. DOI: 10.1007/BF00316437.

Hansson, N.; Enke, U. (2015): Emil von Behring: erster Nobelpreisträger für Medizin. In: *Deutsche medizinische Wochenschrift (1946)* 140 (25), S. 1898–1902. DOI: 10.1055/s-0041-110248.

Haskins, S. C. (1992a): General guidelines for judging anesthetic depth. In: *The Veterinary clinics of North*

America. Small animal practice 22 (2), S. 432–434. DOI: 10.1016/s0195-5616(92)50659-3.

Haskins, S. C. (1992b): Inhalational anesthetics. In: *The Veterinary clinics of North America. Small animal practice* 22 (2), S. 297–307. DOI: 10.1016/s0195-5616(92)50614-3.

Hawkins, P.; Morton, D. B.; Burman, O.; Dennison, N.; Honess, P.; Jennings, M. et al. (2011): A guide to defining and implementing protocols for the welfare assessment of laboratory animals: eleventh report of the BVA/AFW/FRAME/RSPCA/UFAW Joint Working Group on Refinement. In: *Laboratory animals* 45 (1), S. 1–13. DOI: 10.1258/la.2010.010031.

Hedenqvist, P.; Hellebrekers, L. J. (2003): Laboratory animal analgesia, anesthesia, and euthanasia. In: J. Hau und G. L. van Hoosier (Hg.): *Handbook of laboratory animal science*, Bd. 17. Boca Raton, Fla.: CRC Press, S. 413–457.

Hedrich, H. J. (2000): History, Strains and Models. In: G. J. Krinke (Hg.): *The laboratory rat*. Unter Mitarbeit von M. Shibutani: Academic Press, S. 3–16.

Hegele, R. A.; Maltman, G. M. (2020): Insulin's centenary: the birth of an idea. In: *The lancet. Diabetes & endocrinology* 8 (12), S. 971–977. DOI: 10.1016/S2213-8587(20)30337-5.

Heide, C.; Henke, J.; Eissner, B.; Erhardt, W.: Clinical evaluation of isoflurane and sevoflurane with and without atropine pre-medication in guinea pigs (*Cavia Porcellus*) (30), S. 51–52.

Hendriksen, C. F. M. (2006): Developments in the area of animal experiments in biomedical research. In: *Nederlands tijdschrift voor geneeskunde* 150 (52), S. 2857–2862.

Henke, J. (2010): Analgesie und Anästhesie beim Kleinsäuger (91), Artikel 4, S. 294–304.

Henke, J.; Baumgartner, C.; Röltgen, I.; Eberspächer, E.; Erhardt, W. (2004): Anaesthesia with midazolam/medetomidine/fentanyl in chinchillas (*Chinchilla lanigera*) compared to anaesthesia with xylazine/ketamine and medetomidine/ketamine. In: *Journal of veterinary medicine. A, Physiology, pathology, clinical*

medicine 51 (5), S. 259–264. DOI: 10.1111/j.1439-0442.2004.00632.x.

Henke, J.; Erhardt, W. (2002): Notfälle unter Anästhesie bei Kleinsäugetern. In: W. Erhardt, J. Henke und C. Lendl (Hg.): Narkosenotfälle. Stuttgart: Enke Verlag, S. 195–218.

Henke, J.; Erhardt, W. (2012): Speziesspezifische Anästhesie. Nager. In: W. Erhardt, J. Henke, J. Haberstroh, C. Baumgartner und S. Tacke (Hg.): Anästhesie und Analgesie. beim Klein- und Heimtier mit Exoten, Labortieren, Vögeln, Reptilien, Amphibien und Fischen. Unter Mitarbeit von P. Kölle, R. Korbel, C. Lendl und M. Lierz. 2., vollständig überarb. und erw. Aufl. Stuttgart: Schattauer, S. 703–725.

Henke, J.; Haberstroh, J. (2012): Narkoseversorgungseinheit. Anästhesieausrüstung und Anästhesiearbeitsplatz. In: W. Erhardt, J. Henke, J. Haberstroh, C. Baumgartner und S. Tacke (Hg.): Anästhesie und Analgesie. beim Klein- und Heimtier mit Exoten, Labortieren, Vögeln, Reptilien, Amphibien und Fischen. Unter Mitarbeit von P. Kölle, R. Korbel, C. Lendl und M. Lierz. 2., voll-

ständig überarb. und erw. Aufl. Stuttgart: Schattauer, S. 169–198.

Henke, J.; Reinert, J. (2006): Anwendung von Medetomidin in der Heimtierpraxis. In: *Fachpraxis*, 2006 (50), S. 12–19. Online verfügbar unter <https://www.kleintierpraxis-markdorf.de/downloads/fp50anaesthesie.pdf>.

Henke, J.; Schönagel, B.; Niedermeier, K. (2014): Entscheidungshilfen zur prä-, intra- und postoperativen Analgesie beim Heimtier. Übersicht der analgetisch wirksamen Substanzen zur Anwendung beim Heimtier. Initiative tiermedizinische Schmerztherapie (ITIS). Hg. v. *Kleintierpraxis* 59 (5) (264-280).

Henke, J.; Tacke, S.; Erhardt, W. (2012): Notfälle im Rahmen der Anästhesie. In: W. Erhardt, J. Henke, J. Haberstroh, C. Baumgartner und S. Tacke (Hg.): *Anästhesie und Analgesie. beim Klein- und Heimtier mit Exoten, Labortieren, Vögeln, Reptilien, Amphibien und Fischen*. Unter Mitarbeit von P. Kölle, R. Korbel, C. Lendl und M. Lierz. 2., vollständig überarb. und erw. Aufl. Stuttgart: Schattauer, S. 601–948.

Herbert, J.; Thiermann, H.; Worek, F.; Wille, T. (2017): Precision cut lung slices as test system for candidate therapeutics in organophosphate poisoning. In: *Toxicology* 389, S. 94–100. DOI: 10.1016/j.tox.2017.07.011.

Higgins, A.; Klaucke, C.; Stephens, P.; Barima, A.; Patel, V.; Neavyn, M. et al. (2018): 391 Paralysis Following Acute Organophosphate Poisoning Improves Survival and Decreases Pulmonary Secretion Production in a Rat Model. In: *Annals of Emergency Medicine* 72 (4), S153. DOI: 10.1016/j.annemergmed.2018.08.396.

Hildebrandt, I. J.; Su, H.; Weber, W. A. (2008): Anesthesia and other considerations for in vivo imaging of small animals. In: *ILAR journal* 49 (1), S. 17–26. DOI: 10.1093/ilar.49.1.17.

Höffe, O. (2013): Einführung in die utilitaristische Ethik. Klassische und zeitgenössische Texte. 5., überarbeitete und erweiterte Auflage. Tübingen, Basel: A. Francke Verlag (UTB Philosophie, 1683).

Hoffman, B. B. (2001): Neurotransmission: The autonomic and somatic nervous systems. In: J. G. Hardman und L. E. Limbird (Hg.): Goodman & Gilman's the phar-

macological basis of therapeutics. 10. ed., international ed. New York, NY: McGraw-Hill Med. Publ, S. 115–154.

Hollandt, T.; Baur, M.; Wöhr, A.-C. (2021): Animal-appropriate housing of ball pythons (*Python regius*)-Behavior-based evaluation of two types of housing systems. In: *PloS one* 16 (5), e0247082. DOI: 10.1371/journal.pone.0247082.

Hollmann, P. (2000): Das Geheimnis der "roten Träne" bei Nagern. In: *Kleintier Konkret* (3), Artikel 25-27.

Hollmann, P.; Skogstadt, K. (2004): Der Hamster. Artgerecht halten, gesund ernähren, richtig verstehen. 5. Aufl. München: Gräfe und Unzer (Mein Heimtier).

Holmstedt, B. (1959): Pharmacology of organophosphorus cholinesterase inhibitors. In: *Pharmacological reviews* 11, S. 567–688.

Hong, S. B.; Raushel, F. M. (1999): Stereochemical constraints on the substrate specificity of phosphotriesterase. In: *Biochemistry* 38 (4), S. 1159–1165. DOI: 10.1021/bi982204m.

Horn, G.; Wille, T.; Musilek, K.; Kuca, K.; Thiermann, H.; Worek, F. (2015): Reactivation kinetics of 31 structurally different bispyridinium oximes with organophosphate-inhibited human butyrylcholinesterase. In: *Archives of toxicology* 89 (3), S. 405–414. DOI: 10.1007/s00204-014-1288-5.

Horne, I.; Sutherland, T. D.; Harcourt, R. L.; Russell, R. J.; Oakeshott, J. G. (2002): Identification of an opd (organophosphate degradation) gene in an Agrobacterium isolate. In: *Applied and environmental microbiology* 68 (7), S. 3371–3376. DOI: 10.1128/AEM.68.7.3371-3376.2002.

Hu, C.; Flecknell, P. A.; Liles, J. H. (1992): Fentanyl and medetomidine anaesthesia in the rat and its reversal using atipamazole and either nalbuphine or butorphanol. In: *Laboratory animals* 26 (1), S. 15–22. DOI: 10.1258/002367792780809075.

ITIS (2012): Empfehlungen Empfehlungen für die Schmerztherapie bei Kleintieren. Hg. v. Initiative tiermedizinische Schmerztherapie (ITIS). Online verfügbar unter <https://www.bundestieraerztekammer.de/tieraerzte/leitlini>

en/downloads/EmpfehlungenFebruar2012ITIS.pdf, zuletzt geprüft am 09.02.2023.

Jackson, C. J.; Carr, P. D.; Kim, H.-K.; Liu, J.-W.; Herald, P.; Mitić, N. et al. (2006): Anomalous scattering analysis of *Agrobacterium radiobacter* phosphotriesterase: the prominent role of iron in the heterobinuclear active site. In: *The Biochemical journal* 397 (3), S. 501–508. DOI: 10.1042/BJ20060276.

Jänig, W.; Baron, R. (2019): Peripheres vegetatives Nervensystem. In: R. Brandes, F. Lang und R. F. Schmidt (Hg.): *Physiologie des Menschen*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg (Springer-Lehrbuch), S. 879–891.

Jendryn, P.; Twele, F.; Meller, S.; Osterhaus, A. D. D. M. E.; Schalke, E.; Volk, H. (2021): Canine olfactory detection and its relevance to medical detection. In: *BMC Infectious Diseases* (21), Artikel 1.

Jespersen, B.; Tykocki, N. R.; Watts, S. W.; Cobbett, P. J. (2015): Measurement of smooth muscle function in the isolated tissue bath-applications to pharmacology re-

search. In: *Journal of visualized experiments* (95), S. 52324. DOI: 10.3791/52324.

Jett, D. A. (2007): Neurological aspects of chemical terrorism. In: *Annals of neurology* 61 (1), S. 9–13. DOI: 10.1002/ana.21072.

Jett, D. A. (2012): Chemical toxins that cause seizures. In: *Neurotoxicology* 33 (6), S. 1473–1475. DOI: 10.1016/j.neuro.2012.10.005.

Jett, D. A. (2016): The NIH Countermeasures Against Chemical Threats Program: overview and special challenges. In: *Annals of the New York Academy of Sciences* 1374 (1), S. 5–9. DOI: 10.1111/nyas.13179.

Job, L.; Köhler, A.; Escher, B.; Worek, F.; Skerra, A. (2020): A catalytic bioscavenger with improved stability and reduced susceptibility to oxidation for treatment of acute poisoning with neurotoxic organophosphorus compounds. In: *Toxicology letters* 321, S. 138–145. DOI: 10.1016/j.toxlet.2019.12.030.

John, H.; Breyer, F.; Thumfart, J. O.; Höchstetter, H.; Thiermann, H. (2010): Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-

TOF MS) for detection and identification of albumin phosphorylation by organophosphorus pesticides and G- and V-type nerve agents. In: *Analytical and bioanalytical chemistry* 398 (6), S. 2677–2691. DOI: 10.1007/s00216-010-4076-y.

John, H.; van der Schans, M. J.; Koller, M.; Spruit, H. E. T.; Worek, F.; Thiermann, H.; Noort, D. (2018): Fatal sarin poisoning in Syria 2013: forensic verification within an international laboratory network. In: *Forensic toxicology* 36 (1), S. 61–71. DOI: 10.1007/s11419-017-0376-7.

Jokanović, M. (2009): Medical treatment of acute poisoning with organophosphorus and carbamate pesticides. In: *Toxicology letters* 190 (2), S. 107–115. DOI: 10.1016/j.toxlet.2009.07.025.

Jokanović, M. (2018): Neurotoxic effects of organophosphorus pesticides and possible association with neurodegenerative diseases in man: A review. In: *Toxicology* 410, S. 125–131. DOI: 10.1016/j.tox.2018.09.009.

Kaliszan, R. (1996): Brain/blood distribution described by a combination of partition coefficient and molecular

mass. In: *International Journal of Pharmaceutics* 145 (1-2), S. 9–16. DOI: 10.1016/S0378-5173(96)04712-6.

Kammermann-Lüscher, B. (1978): Cumarinvergiftung bei Hund und Katze. DOI: 10.5169/seals-591695.

Kant, I. (2014): Die Metaphysik der Sitten. 17. Auflage. Frankfurt am Main: Suhrkamp (Suhrkamp-Taschenbuch Wissenschaft, 190).

Karalliedde, L.; Baker, D.; Marrs, T. C. (2006): Organophosphate-induced intermediate syndrome: aetiology and relationships with myopathy. In: *Toxicological reviews* 25 (1), S. 1–14. DOI: 10.2165/00139709-200625010-00001.

Kása, P.; Rakonczay, Z.; Gulya, K. (1997): The cholinergic system in Alzheimer's disease. In: *Progress in neurobiology* 52 (6), S. 511–535. DOI: 10.1016/s0301-0082(97)00028-2.

Khersonsky, O.; Tawfik, D. (2010): Enzyme promiscuity: a mechanistic and evolutionary perspective. In: *Annual review of biochemistry* 79, S. 471–505. DOI: 10.1146/annurev-biochem-030409-143718.

Kilkenny, C.; Browne, W. J.; Cuthill, I. C.; Emerson, M.; Altman, D. G. (2010): Improving bioscience research reporting: the ARRIVE guidelines for reporting animal research. In: *PLoS biology* 8 (6), e1000412. DOI: 10.1371/journal.pbio.1000412.

Kim, J.; Koo, B.-K.; Knoblich, J. A. (2020): Human organoids: model systems for human biology and medicine. In: *Nature reviews. Molecular cell biology* 21 (10), S. 571–584. DOI: 10.1038/s41580-020-0259-3.

Klitgaard, H.; Matagne, A.; Vanneste-Goemaere, J.; Margineanu, D.-G. (2002): Pilocarpine-induced epileptogenesis in the rat: impact of initial duration of status epilepticus on electrophysiological and neuropathological alterations. In: *Epilepsy research* 51 (1-2), S. 93–107. DOI: 10.1016/s0920-1211(02)00099-2.

Kluge, R.; Wedekind, D. (2016): Auszuchtstämme - Zuchtmethoden und genetische Eigenschaften. Fachinformation aus dem Ausschuss für Genetik und Labortierzucht. Hg. v. GV-SOLAS. Online verfügbar unter https://www.gv-solas.de/wp-content/uploads/2016/02/Auszuchtstaemme_02-2016.pdf, zuletzt geprüft am 11.02.2023.

Koch, S. C.; Fitzgerald, M.; Hathway, G. J. (2008): Midazolam potentiates nociceptive behavior, sensitizes cutaneous reflexes, and is devoid of sedative action in neonatal rats. In: *Anesthesiology* 108 (1), S. 122–129. DOI: 10.1097/01.anes.0000296079.45446.15.

Köhler, A.; Escher, B.; Job, L.; Koller, M.; Thiermann, H.; Skerra, A.; Worek, F. (2021): Catalytic activity and stereoselectivity of engineered phosphotriesterases towards structurally different nerve agents in vitro. In: *Archives of toxicology* 95 (8), S. 2815–2823. DOI: 10.1007/s00204-021-03094-0.

Kolakowski, J. E.; Defrank, J. J.; Harvey, S. P.; Szafraniec, L. L.; Beaudry, W. T.; Lai, K.; Wild, J. R. (1997): Enzymatic Hydrolysis of the Chemical Warfare Agent VX and its Neurotoxic Analogues by Organophosphorus Hydrolase. In: *Biocatalysis and Biotransformation* 15 (4), S. 297–312. DOI: 10.3109/10242429709003196.

Krasowski, M. D.; Harrison, N. L. (2000): The actions of ether, alcohol and alkane general anaesthetics on GABAA and glycine receptors and the effects of TM2 and TM3 mutations. In: *British Journal of Pharmacology* 129 (4), S. 731–743. DOI: 10.1038/sj.bjp.0703087.

Kretzmer, E. A.; Meltzer, N. E.; Haenggeli, C.-A.; Ryugo, D. K. (2004): An animal model for cochlear implants. In: *Archives of otolaryngology--head & neck surgery* 130 (5), S. 499–508. DOI: 10.1001/archotol.130.5.499.

Kühnel, W. (2003): Color atlas of cytology, histology and microscopic anatomy. 4. ed., rev. and enl. Stuttgart, New York: Thieme; Thieme Med. Publ (Thieme flexibook Basic sciences). Online verfügbar unter http://www.e-streams.com/es0703/es0703_3057.html.

Kullak-Ublick, G. A.; Siepmann, T.; Kirch, W. (Hg.) (2012): Arzneimitteltherapie. Wirksamkeit – Sicherheit – Praktische Anwendung. I Allgemeiner Teil: 1 Definitionen, Kinetik, Dynamik, Genetik, Interaktionen. Stuttgart: Georg Thieme Verlag.

Kumar, S.; Kaushik, G.; Dar, M. A.; Nimesh, S.; Lopez-Chuken, U. J.; Villarreal-Chiu, J. F. (2018): Microbial Degradation of Organophosphate Pesticides: A Review. In: *Pedosphere* 28 (2), S. 190–208. DOI: 10.1016/S1002-0160(18)60017-7.

Kummer, W.; Lips, K. S.; Pfeil, U. (2008): The epithelial cholinergic system of the airways. In: *Histochemistry and*

cell biology 130 (2), S. 219–234. DOI: 10.1007/s00418-008-0455-2.

Kurz, A. (2001): Effects of anaesthesia on thermoregulation. In: *Current Anaesthesia & Critical Care* 12 (2), S. 72–78. DOI: 10.1054/cacc.2001.0328.

Kwong, T. C. (2002): Organophosphate pesticides: biochemistry and clinical toxicology. In: *Therapeutic drug monitoring* 24 (1), S. 144–149. DOI: 10.1097/00007691-200202000-00022.

Lagassé, H. A. D.; Alexaki, A.; Simhadri, V. L.; Katagiri, N. H.; Jankowski, W.; Sauna, Z. E.; Kimchi-Sarfaty, C. (2017): Recent advances in (therapeutic protein) drug development. In: *F1000Research* 6, S. 113. DOI: 10.12688/f1000research.9970.1.

Larsen, R. (2006a): Inhalationsanästhetika. In: R. Larsen (Hg.): *Anästhesie*. München: Urban & Fischer, S. 19–56.

Larsen, R. (2006b): Intravenöse Anästhetika, benzodiazepine und Neuroleptika. In: R. Larsen (Hg.): *Anästhesie*. München: Urban & Fischer, S. 57–83.

Larsen, R. (Hg.) (2016): Anästhesie und Intensivmedizin für die Fachpflege. Berlin, Heidelberg: Springer.

Ledgard, J. B. (2006): A laboratory history of chemical warfare agents. A book. 2nd ed. Raleigh, N.C.: Selbstveröffentlichung, Vertrieb durch Lulu.com.

Lee, E. C. (2003): Clinical manifestations of sarin nerve gas exposure. In: *JAMA* 290 (5), S. 659–662. DOI: 10.1001/jama.290.5.659.

LL 2007/526/EG: Leitlinien für die Unterbringung und Pflege von Tieren, die für Versuche und andere wissenschaftliche Zwecke verwendet werden. Online verfügbar unter <https://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2007:197:0001:0089:DE:PDF>, zuletzt geprüft am 09.02.2023.

Lenz, D. E.; Yeung, D.; Smith, J. R.; Sweeney, R. E.; Lumley, L.; Cerasoli, D. M. (2007): Stoichiometric and catalytic scavengers as protection against nerve agent toxicity: a mini review. In: *Toxicology* 233 (1-3), S. 31–39. DOI: 10.1016/j.tox.2006.11.066.

Leven, M.; Knaab, T. C.; Held, J.; Duffy, S.; Meister, S.; Fischli, C. et al. (2017): 3-Hydroxy-N'-

arylidenepropanehydrazonamides with Halo-Substituted Phenanthrene Scaffolds Cure P. berghei Infected Mice When Administered Perorally. In: *Journal of medicinal chemistry* 60 (14), S. 6036–6044. DOI:

10.1021/acs.jmedchem.7b00140.

Lewejohann, L.; Reinhard, C.; Schrewe, A.; Brandewiede, J.; Haemisch, A.; Görtz, N. et al. (2006): Environmental bias? Effects of housing conditions, laboratory environment and experimenter on behavioral tests. In: *Genes, brain, and behavior* 5 (1), S. 64–72. DOI:

10.1111/j.1601-183X.2005.00140.x.

Li, D.; Qiu, Z.; Shao, Y.; Chen, Y.; Guan, Y.; Liu, M. et al. (2013): Heritable gene targeting in the mouse and rat using a CRISPR-Cas system. In: *Nature biotechnology* 31 (8), S. 681–683. DOI: 10.1038/nbt.2661.

Lidster, K.; Jefferys, J. G.; Blümcke, I.; Crunelli, V.; Flecknell, P.; Frenguelli, B. G. et al. (2016): Opportunities for improving animal welfare in rodent models of epilepsy and seizures. In: *Journal of neuroscience methods* 260, S. 2–25. DOI: 10.1016/j.jneumeth.2015.09.007.

Liebsch, M.; Grune, B.; Seiler, A.; Butzke, D.; Oelgeschläger, M.; Pirow, R. et al. (2011): Alternatives to animal testing: current status and future perspectives. In: *Archives of toxicology* 85 (8), S. 841–858. DOI: 10.1007/s00204-011-0718-x.

Lilley, E.; Andrews, M. R.; Bradbury, E. J.; Elliott, H.; Hawkins, P.; Ichiyama, R. M. et al. (2020): Refining rodent models of spinal cord injury. In: *Experimental neurology* 328, S. 113273. DOI: 10.1016/j.expneurol.2020.113273.

Lin, C.-C.; Hung, D.-Z.; Chen, H.-Y.; Hsu, K.-H. (2016): The effectiveness of patient-tailored treatment for acute organophosphate poisoning. In: *Biomedical journal* 39 (6), S. 391–399. DOI: 10.1016/j.bj.2016.11.001.

Lockridge, O. (2015): Review of human butyrylcholinesterase structure, function, genetic variants, history of use in the clinic, and potential therapeutic uses. In: *Pharmacology & therapeutics* 148, S. 34–46. DOI: 10.1016/j.pharmthera.2014.11.011.

Lockridge, O.; Norgren, R. B.; Johnson, R. C.; Blake, T. A. (2016): Naturally Occurring Genetic Variants of Hu-

man Acetylcholinesterase and Butyrylcholinesterase and Their Potential Impact on the Risk of Toxicity from Cholinesterase Inhibitors. In: *Chemical research in toxicology* 29 (9), S. 1381–1392. DOI:

10.1021/acs.chemrestox.6b00228.

Longley, L. (2008): *Anaesthesia of exotic pets*. Edinburgh, New York: Elsevier Saunders.

Löscher, W. (Hg.) (2014): *Pharmakotherapie bei Haus- und Nutztieren*. 9., aktualisierte und erw. Aufl. Stuttgart: Enke.

Lotti, M. (1991): The pathogenesis of organophosphate polyneuropathy. In: *Critical reviews in toxicology* 21 (6), S. 465–487. DOI: 10.3109/10408449209089884.

Lotti, M. (2001): *Handbook of Pesticide Toxicology*. Clinical toxicology of anticholinesterase agents, S. 1040–1085.

Lotti, M.; Moretto, A. (2005): Organophosphate-induced delayed polyneuropathy. In: *Toxicological reviews* 24 (1), S. 37–49. DOI: 10.2165/00139709-200524010-00003.

Lu, C.-C.; Tsai, C.-S.; Hu, o. Y.-P.; Chen, R.-M.; Chen, T.-L.; Ho, S.-T. (2008): Pharmacokinetics of isoflurane in human blood. In: *Pharmacology* 81 (4), S. 344–349. DOI: 10.1159/000122960.

Lundy, P. M.; Hamilton, M. G.; Sawyer, T. W.; Mikler, J. (2011): Comparative protective effects of HI-6 and MMB-4 against organophosphorous nerve agent poisoning. In: *Toxicology* 285 (3), S. 90–96. DOI: 10.1016/j.tox.2011.04.006.

Lundy, P. M.; Hansen, A. S.; Hand, B. T.; Boulet, C. A. (1992): Comparison of several oximes against poisoning by soman, tabun and GF. In: *Toxicology* 72 (1), S. 99–105. DOI: 10.1016/0300-483x(92)90089-w.

Lundy, P. M.; Raveh, L.; Amitai, G. (2006): Development of the bisquaternary oxime HI-6 toward clinical use in the treatment of organophosphate nerve agent poisoning. In: *Toxicological reviews* 25 (4), S. 231–243. DOI: 10.2165/00139709-200625040-00004.

Lüttringhaus, A.; Hagedorn, I. (1964): Quartäre Hydroxyiminomethylpyridiniumsalze. In: *Arzneimittel Forschung - Drug Research* (14), Artikel 1-5.

Mackintosh, C. G.; Laas, F. J.; Godfrey, M. E.; Turner, K. (1988): Vitamin K1 treatment of brodifacoum poisoning in dogs. Proceedings of the Vertebrate Pest Conference.

Online verfügbar unter

<https://escholarship.org/uc/item/9gd965d7>, zuletzt geprüft am 03.03.2023.

Mackworth, J. F.; Webb, E. C. (1948): The inhibition of serum cholinesterase by alkyl fluorophosphonates. In: *The Biochemical journal* 42 (1), S. 91–95. DOI: 10.1042/bj0420091.

Maddison, J. E.; Page, S. W.; Church, D. B. (2002): Small animal clinical pharmacology. Unter Mitarbeit von P. Pawson. London: Saunders (101-114).

Mähler Convenor, M.; Berard, M.; Feinstein, R.; Gallagher, A.; Illgen-Wilcke, B.; Pritchett-Corning, K.; Raspa, M. (2014): FELASA recommendations for the health monitoring of mouse, rat, hamster, guinea pig and rabbit colonies in breeding and experimental units. In: *Laboratory animals* 48 (3), S. 178–192. DOI: 10.1177/0023677213516312.

Mali, H.; Shah, C.; Raghunandan, B. H.; Prajapati, A. S.; Patel, D. H.; Trivedi, U.; Subramanian, R. B. (2023): Organophosphate pesticides an emerging environmental contaminant: Pollution, toxicity, bioremediation progress, and remaining challenges. In: *Journal of environmental sciences (China)* 127, S. 234–250. DOI: 10.1016/j.jes.2022.04.023.

Mantel, R. (1999): Zur Anästhesie bei der Ratte mit der vollständig antagonisierbaren Anästhetika Medetomidin, Midazolam und Fentanyl. Ludwig Maximilians Universität, München.

Marican, A.; Durán-Lara, E. F. (2018): A review on pesticide removal through different processes. In: *Environmental science and pollution research international* 25 (3), S. 2051–2064. DOI: 10.1007/s11356-017-0796-2.

Marrs, T. C. (1993): Organophosphate poisoning. In: *Pharmacology & therapeutics* 58 (1), S. 51–66. DOI: 10.1016/0163-7258(93)90066-m.

Marrs, T. C.; Maynard, R. L.; Sidell, F. R. (Hg.) (2007): Chemical warfare agents: Toxicology and treatment. Unter Mitarbeit von P. Eyer. 2nd ed. S. 305–329.

Chichester: Wiley. Online verfügbar unter <http://www.loc.gov/catdir/enhancements/fy0826/2006022729-b.html>.

Martínez-Haro, M.; Mateo, R.; Guitart, R.; Soler-Rodríguez, F.; Pérez-López, M.; María-Mojica, P.; García-Fernández, A. J. (2008): Relationship of the toxicity of pesticide formulations and their commercial restrictions with the frequency of animal poisonings. In: *Ecotoxicology and environmental safety* 69 (3), S. 396–402. DOI: 10.1016/j.ecoenv.2007.05.006.

Marx, E. (1914): Die Experimentelle Diagnostik, Serumtherapie und Prophylaxe der Infektionskrankheiten. 3rd ed. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin / Heidelberg (Bibliothek Von Coler-Von Schjerning Ser). Online verfügbar unter <https://ebookcentral.proquest.com/lib/kxp/detail.action?doid=6599971>.

Mason, D. E. (1997): Anesthesia, analgesia, and sedation for small mammals. In: E. V. Hillyer und K. E. Quisenberry (Hg.): *Ferrets, rabbits, and rodents - clinical medicine and surgery*. Philadelphia: Saunders, S. 378–391.

Massanari, M.; Novitsky, J.; Reinstein, L. J. (1997): Paradoxical reactions in children associated with midazolam use during endoscopy. In: *Clinical pediatrics* 36 (12), S. 681–684. DOI: 10.1177/000992289703601202.

Masson, P. (2016): Volume 2: Management of poisoning. Chapter 2: Nerve Agents: Catalytic Scavengers as an Alternative. In: F. Worek, J. Jenner und H. Thiermann (Hg.): *Chemical Warfare Toxicology*. Cambridge: Royal Society of Chemistry (Issues in Toxicology), S. 43–81.

Masson, P.; Lockridge, O. (2010): Butyrylcholinesterase for protection from organophosphorus poisons: catalytic complexities and hysteretic behavior. In: *Archives of biochemistry and biophysics* 494 (2), S. 107–120. DOI: 10.1016/j.abb.2009.12.005.

Masson, P.; Nachon, F. (2017): Cholinesterase reactivators and bioscavengers for pre- and post-exposure treatments of organophosphorus poisoning. In: *Journal of neurochemistry* 142 Suppl 2, S. 26–40. DOI: 10.1111/jnc.14026.

Masson, P.; Nachon, F.; Broomfield, C. A.; Lenz, D. E.; Verdier, L.; Schopfer, L. M.; Lockridge, O. (2008): A col-

laborative endeavor to design cholinesterase-based catalytic scavengers against toxic organophosphorus esters. In: *Chemico-biological interactions* 175 (1-3), S. 273–280. DOI: 10.1016/j.cbi.2008.04.005.

Masson, P.; Rochu, D. (2009): Catalytic Bioscavengers Against Toxic Esters, an Alternative Approach for Prophylaxis and Treatments of Poisonings. In: *Acta Naturae* 1 (1), S. 68–79. DOI: 10.32607/20758251-2009-1-1-68-79.

Massoulié, J.; Pezzementi, L.; Bon, S.; Krejci, E.; Vallette, F. M. (1993): Molecular and cellular biology of cholinesterases. In: *Progress in neurobiology* 41 (1), S. 31–91. DOI: 10.1016/0301-0082(93)90040-y.

Max-Planck-Gesellschaft: Vermindern, Verbessern, Vermeiden – Verantwortung. Online verfügbar unter <https://www.mpg.de/10885134/3rs>.

Mazzaferro, E. M. (2017): Blackwell's Five-Minute Veterinary Consult Clinical Companion. Small Animal Emergency and Critical Care. Newark: John Wiley & Sons Incorporated (Blackwell's Five-Minute Veterinary Consult Ser). Online verfügbar unter

<https://ebookcentral.proquest.com/lib/kxp/detail.action?dclid=4883067>.

Mdeni, N. L.; Adeniji, A. O.; Okoh, A. I.; Okoh, O. O. (2022): Analytical Evaluation of Carbamate and Organophosphate Pesticides in Human and Environmental Matrices: A Review. In: *Molecules (Basel, Switzerland)* 27 (3). DOI: 10.3390/molecules27030618.

Means, C.; Wismer, T. (2018): An Overview of Trends in Animal Poisoning Cases in the United States: 2011 to 2017. In: *The Veterinary clinics of North America. Small animal practice* 48 (6), S. 899–907. DOI: 10.1016/j.cvsm.2018.07.010.

Meerdink, G. L. (1989): Organophosphorus and carbamate insecticide poisoning in large animals. In: *The Veterinary clinics of North America. Food animal practice* 5 (2), S. 375–389. DOI: 10.1016/s0749-0720(15)30982-8.

Merola, V. (2002): Anticoagulant rodenticides: Deadly for pests, dangerous for pets. In: *Veterinary Medicine* 97.

Mew, E. J.; Padmanathan, P.; Konradsen, F.; Eddleston, M.; Chang, S.-S.; Phillips, M. R.; Gunnell, D. (2017): The global burden of fatal self-poisoning with pesticides

2006-15: Systematic review. In: *Journal of affective disorders* 219, S. 93–104. DOI: 10.1016/j.jad.2017.05.002.

Meyer, R. E.; Fish, R. E. (2008): Pharmacology of injectable anesthetics, sedatives, and tranquilizers. In: R. E. Fish, B. R. Brown, P. J. Danneman und A. Z. Karas (Hg.): *Anesthesia and analgesia in laboratory animals*. London: Academic Press, S. 27–82.

Millard, C. B.; Kryger, G.; Ordentlich, A.; Greenblatt, H. M.; Harel, M.; Raves, M. L. et al. (1999): Crystal structures of aged phosphonylated acetylcholinesterase: nerve agent reaction products at the atomic level. In: *Biochemistry* 38 (22), S. 7032–7039. DOI: 10.1021/bi982678l.

Mioduszewski, R.; Manthei, J.; Way, R.; Burnett, D.; Gaviola, B.; Muse, W. et al. (2002): Interaction of exposure concentration and duration in determining acute toxic effects of sarin vapor in rats. In: *Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology* 66 (2), S. 176–184. DOI: 10.1093/toxsci/66.2.176.

Miyaki, K.; Nishiwaki, Y.; Maekawa, K.; Ogawa, Y.; Asukai, N.; Yoshimura, K. et al. (2005): Effects of sarin

on the nervous system of subway workers seven years after the Tokyo subway sarin attack. In: *Journal of occupational health* 47 (4), S. 299–304. DOI: 10.1539/joh.47.299.

Monath, T. P. (2008): Treatment of yellow fever. In: *Antiviral research* 78 (1), S. 116–124. DOI: 10.1016/j.antiviral.2007.10.009.

Morita, H.; Yanagisawa, N.; Nakajima, T.; Shimizu, M.; Hirabayashi, H.; Okudera, H. et al. (1995): Sarin poisoning in Matsumoto, Japan. In: *Lancet (London, England)* 346 (8970), S. 290–293. DOI: 10.1016/s0140-6736(95)92170-2.

Mount, M. E. (1988): Diagnosis and therapy of anticoagulant rodenticide intoxications. In: *The Veterinary clinics of North America. Small animal practice* 18 (1), S. 115–130. DOI: 10.1016/s0195-5616(88)50012-8.

Mumenthaler, M.; Mattle, H. (2006): Kurzlehrbuch Neurologie. 135 Tabellen. 1. Aufl. Stuttgart: Thieme. Online verfügbar unter <https://swbplus.bsz-bw.de/bsz253392985idx.htm>.

Mumford, H.; Docx, C. J.; Price, M. E.; Green, A. C.; Tattersall, J. E. H.; Armstrong, S. J. (2013): Human plasma-derived BuChE as a stoichiometric bioscavenger for treatment of nerve agent poisoning. In: *Chemico-biological interactions* 203 (1), S. 160–166. DOI: 10.1016/j.cbi.2012.08.018.

Mumford, H.; E Price, M.; Lenz, D. E.; Cerasoli, D. M. (2011): Post-exposure therapy with human butyrylcholinesterase following percutaneous VX challenge in guinea pigs. In: *Clinical toxicology (Philadelphia, Pa.)* 49 (4), S. 287–297. DOI: 10.3109/15563650.2011.568944.

Myhrer, T. (2007): Neuronal structures involved in the induction and propagation of seizures caused by nerve agents: implications for medical treatment. In: *Toxicology* 239 (1-2), S. 1–14. DOI: 10.1016/j.tox.2007.06.099.

Nachmansohn, D.; Machado, A. L. (1943): The formation of acetylcholine. A new enzyme: "Choline Acetylase". In: *Journal of Neurophysiology* 6 (5), S. 397–403. DOI: 10.1152/jn.1943.6.5.397.

Nachon, F.; Brazzolotto, X.; Trovaslet, M.; Masson, P. (2013): Progress in the development of enzyme-based

nerve agent bioscavengers. In: *Chemico-biological interactions* 206 (3), S. 536–544. DOI: 10.1016/j.cbi.2013.06.012.

Nägeli, H.; Wegemann Ehrensperger, D. (2017): Vergiftungen. In: B. Kohn und G. Schwarz (Hg.): *Praktikum der Hundeklinik*. Begründet von Hans G. Niemand. 12., aktualisierte Auflage. Stuttgart: Enke, S. 215–232.

Naguib, M. (2007): Sugammadex: another milestone in clinical neuromuscular pharmacology. In: *Anesthesia and analgesia* 104 (3), S. 575–581. DOI: 10.1213/01.ane.0000244594.63318.fc.

Nairismägi, J.; Gröhn, O. H. J.; Kettunen, M. I.; Nissinen, J.; Kauppinen, R. A.; Pitkänen, A. (2004): Progression of brain damage after status epilepticus and its association with epileptogenesis: a quantitative MRI study in a rat model of temporal lobe epilepsy. In: *Epilepsia* 45 (9), S. 1024–1034. DOI: 10.1111/j.0013-9580.2004.08904.x.

Nakayama, S. M. M.; Morita, A.; Ikenaka, Y.; Mizukawa, H.; Ishizuka, M. (2019): A review: poisoning by anticoagulant rodenticides in non-target animals globally. In: *The*

Journal of veterinary medical science 81 (2), S. 298–313. DOI: 10.1292/jvms.17-0717.

Namba, T. (1971): Cholinesterase inhibition by organo-phosphorus compounds and its clinical effects. In: *Bulletin of the World Health Organization* 44 (1-2-3), S. 289–307.

National Academies Press (US) (1997): Review of Acute Human-Toxicity Estimates for Selected Chemical-Warfare Agents. Washington (DC).

National Centre for the Replacement, Refinement, and Reduction of Animals in Research: Our mission. Online verfügbar unter <https://nc3rs.org.uk/who-we-are/our-mission>, zuletzt geprüft am 02.02.2023.

Nationale Behörden für die Durchführung der Richtlinie 2010/63/EU: Framework for the Genetically Altered Animals under Framework for the Genetically Altered Animals under Directive 2010/63/EU on the protection of animals used for scientific purposes. A working document on Genetically Altered Animals to fulfil the requirements under the Directive.

Nationale Behörden für die Durchführung der Richtlinie 2010/63/EU: Arbeitspapier über einen Rahmen für die Bewertung des Schweregrads (Belastungsbeurteilung). Arbeitspapier Belastungsbeurteilung. Online verfügbar unter https://ec.europa.eu/environment/chemicals/lab_animals/pdf/guidance/severity/de.pdf, zuletzt geprüft am 02.02.2023.

Natoff, I. L.; Reiff, B. (1973): Effect of oximes on the acute toxicity of anticholinesterase carbamates. In: *Toxicology and applied pharmacology* 25 (4), S. 569–575. DOI: 10.1016/0041-008x(73)90026-4.

Nelson, R. W.; Couto, C. G.; Steffen, T. (Hg.) (2023): Innere Medizin der Kleintiere. Elsevier Urban & Fischer. 6. Auflage. München: Elsevier.

Nestler, E. J.; Hyman, S. E. (2010): Animal models of neuropsychiatric disorders. In: *Nature neuroscience* 13 (10), S. 1161–1169. DOI: 10.1038/nn.2647.

Nguyen, T. H. (2022): Countering the future chemical weapons threat. In: *Science* 376 (6591), S. 355–357. DOI: 10.1126/science.abo6380.

-
- Nicholson, W. T.; Sprung, J.; Jankowski, C. J. (2007): Sugammadex: a novel agent for the reversal of neuromuscular blockade. In: *Pharmacotherapy* 27 (8), S. 1181–1188. DOI: 10.1592/phco.27.8.1181.
- Nolff, M. C.; Albert, R.; Reese, S.; Meyer-Lindenberg, A. (2018): Comparison of Negative Pressure Wound Therapy and Silver-Coated Foam Dressings in Open Wound Treatment in Dogs: A Prospective Controlled Clinical Trial. In: *Veterinary and comparative orthopaedics and traumatology : V.C.O.T* 31 (4), S. 229–238. DOI: 10.1055/s-0038-1639579.
- Norecopa: Compilation of severity classifications across Europe. Online verfügbar unter <https://norecopa.no/more-resources/severity-classification/compilation-of-severity-classifications-across-europe/>, zuletzt geprüft am 11.02.2023.
- Novikov, B. N.; Grimsley, J. K.; Kern, R. J.; Wild, J. R.; Wales, M. E. (2010): Improved pharmacokinetics and immunogenicity profile of organophosphorus hydrolase by chemical modification with polyethylene glycol. In: *Journal of controlled release : official journal of the Con-*

trolled Release Society 146 (3), S. 318–325. DOI:
10.1016/j.jconrel.2010.06.003.

Nuffield Council on Bioethics (2005): The ethics of research involving animals. Hg. v. Nuffield Council on Bioethics. Online verfügbar unter <https://www.nuffieldbioethics.org/wp-content/uploads/The-ethics-of-research-involving-animals-full-report.pdf>, zuletzt geprüft am 09.02.2023.

Okumura, T.; Takasu, N.; Ishimatsu, S.; Miyanoki, S.; Mitsuhashi, A.; Kumada, K. et al. (1996): Report on 640 victims of the Tokyo subway sarin attack. In: *Annals of Emergency Medicine* 28 (2), S. 129–135. DOI:
10.1016/s0196-0644(96)70052-5.

Omburo, G. A.; Kuo, J. M.; Mullins, L. S.; Raushel, F. M. (1992): Characterization of the zinc binding site of bacterial phosphotriesterase. In: *The Journal of biological chemistry* 267 (19), S. 13278–13283.

OPCW (2023a): Chemical Weapons Convention. Hg. v. Organisation for the Prohibition of Chemical Weapons. Organisation for the Prohibition of Chemical Weapons.

Online verfügbar unter <https://www.opcw.org/chemical-weapons-convention>, zuletzt geprüft am 23.01.2023.

OPCW (2023b): OPCW by the Numbers. Hg. v. Organisation for the Prohibition of Chemical Weapons. Organisation for the Prohibition of Chemical Weapons. Online verfügbar unter <https://www.opcw.org/media-centre/opcw-numbers>, zuletzt geprüft am 23.01.2023.

OPCW (2023c): Our Work. Hg. v. Organisation for the Prohibition of Chemical Weapons. Organisation for the Prohibition of Chemical Weapons. Online verfügbar unter <https://www.opcw.org/our-work>, zuletzt geprüft am 23.01.2023.

Ossipov, M. H.; Harris, S.; Lloyd, P.; Messineo, E.; Lin, B. S.; Bagley, J. (1990): Antinociceptive interaction between opioids and medetomidine: systemic additivity and spinal synergy. In: *Anesthesiology* 73 (6), S. 1227–1235. DOI: 10.1097/00000542-199012000-00022.

Osweller, G. D.; Hovda, L.; Brutlag, A.; Lee, J. A. (Hg.) (2011): Small animal toxicology. Unter Mitarbeit von J. Gualtieri. Ames, Iowa: Wiley-Blackwell (Blackwell's five-minute veterinary consult clinical companion).

Paddleford, R. R. (1999): Manual of small animal anesthesia. 2nd ed. Philadelphia: W.B. Saunders Co.

Paddleford, R. R.; Erhardt, W. (1992): Reptilien, Vögel, Primaten, Kaninchen und kleine Nager. In: R. R. Paddleford und W. Erhardt (Hg.): Anästhesie bei Kleintieren. Stuttgart, New York: Schattauer, S. 374–383.

Pain, D. J.; Meharg, A. A.; Ferrer, M.; Taggart, M.; Penneriani, V. (2005): Lead concentrations in bones and feathers of the globally threatened Spanish imperial eagle. In: *Biological Conservation* 121 (4), S. 603–610. DOI: 10.1016/j.biocon.2004.06.012.

Papke, R. L. (2014): Merging old and new perspectives on nicotinic acetylcholine receptors. In: *Biochemical pharmacology* 89 (1), S. 1–11. DOI: 10.1016/j.bcp.2014.01.029.

Peter, J. V.; Moran, J. L.; Graham, P. (2006): Oxime therapy and outcomes in human organophosphate poisoning: an evaluation using meta-analytic techniques. In: *Critical care medicine* 34 (2), S. 502–510. DOI: 10.1097/01.ccm.0000198325.46538.ad.

Peter, J. V.; Sudarsan, T. I.; Moran, J. L. (2014): Clinical features of organophosphate poisoning: A review of different classification systems and approaches. In: *Indian Journal of Critical Care Medicine* 18 (11), S. 735–745.

DOI: 10.4103/0972-5229.144017.

Plumb, D. C. (2015): Plumb's veterinary drug handbook. 8. ed. Ames, Iowa: Wiley-Blackwell.

Poziomek, E. J.; Hackley, B. E.; Steinberg, G. M. (1958): Pyridinium Aldoximes 1. In: *J. Org. Chem.* 23 (5), S.

714–717. DOI: 10.1021/jo01099a019.

Prado, V. F.; Janickova, H.; Al-Onaizi, M. A.; Prado, M. A. M. (2017): Cholinergic circuits in cognitive flexibility.

In: *Neuroscience* 345, S. 130–141. DOI:

10.1016/j.neuroscience.2016.09.013.

Preißel, A. K.: Zur vollständig antagonistisierbaren Anästhesie von neugeborenen Mäusen mit Midazolam, Medetomidin und Fentanyl - eine experimentelle Dosierstudie. veterinärmedizinische Dissertation, München.

Przedborski, S.; Vila, M.; Jackson-Lewis, V. (2003): Neurodegeneration: what is it and where are we? In: *The*

Journal of clinical investigation 111 (1), S. 3–10. DOI: 10.1172/JCI17522.

Punta, M.; Coggill, P. C.; Eberhardt, R. Y.; Mistry, J.; Tate, J.; Bournsnel, C. et al. (2012): The Pfam protein families database. In: *Nucleic acids research* 40 (Database issue), D290-301. DOI: 10.1093/nar/gkr1065.

Purves, D.; Augustine, G. J.; Fitzpatrick, D.; Hall, W. C.; LaMantia, A.-S.; McNamara, J. O.; Williams, S. M. (Hg.) (2004): *Neuroscience. Neurotransmitters and Their Receptors*. Unter Mitarbeit von G. J. Augustine. 3. ed. Sunderland, Mass.: Sinauer. Online verfügbar unter <https://www.hse.ru/data/2011/06/22/1215686482/Neuroscience.pdf>.

Puttachary, S.; Sharma, S.; Tse, K.; Beamer, E.; Sexton, A.; Crutison, J.; Thippeswamy, T. (2015): Immediate Epileptogenesis after Kainate-Induced Status Epilepticus in C57BL/6J Mice: Evidence from Long Term Continuous Video-EEG Telemetry. In: *PloS one* 10 (7), e0131705. DOI: 10.1371/journal.pone.0131705.

Puttachary, S.; Sharma, S.; Verma, S.; Yang, Y.; Putra, M.; Thippeswamy, A. et al. (2016): 1400W, a highly se-

lective inducible nitric oxide synthase inhibitor is a potential disease modifier in the rat kainate model of temporal lobe epilepsy. In: *Neurobiology of disease* 93, S. 184–200. DOI: 10.1016/j.nbd.2016.05.013.

Quinlan, J. J.; Firestone, S.; Firestone, L. L. (1995): Isoflurane's enhancement of chloride flux through rat brain gamma-aminobutyric acid type A receptors is stereoselective. In: *Anesthesiology* 83 (3), S. 611–615. DOI: 10.1097/00000542-199509000-00021.

Quitschau, M.; Schuhmann, T.; Piel, J.; Zezschwitz, P. v.; Grond, S. (2008): The New Metabolite (S)-Cinnamoylphosphoramidate from *Streptomyces* sp. and Its Total Synthesis. In: *Eur. J. Org. Chem.* 2008 (30), S. 5117–5124. DOI: 10.1002/ejoc.200800654.

Rauschel, F. M. (2002): Bacterial detoxification of organophosphate nerve agents. In: *Current opinion in microbiology* 5 (3), S. 288–295. DOI: 10.1016/s1369-5274(02)00314-4.

Ravenelle, R.; Santolucito, H. B.; Byrnes, E. M.; Byrnes, J. J.; Donaldson, S. T. (2014): Housing environment modulates physiological and behavioral responses to

anxiogenic stimuli in trait anxiety male rats. In: *Neuroscience* 270, S. 76–87. DOI:
10.1016/j.neuroscience.2014.03.060.

Rebuelto, M.; Ambros, L.; Waxman, S.; Montoya, L. (2004): Chronobiological study of the pharmacological response of rats to combination ketamine-midazolam. In: *Chronobiology international* 21 (4-5), S. 591–600. DOI:
10.1081/cbi-200026466.

Reeves, T. E.; Wales, M. E.; Grimsley, J. K.; Li, P.; Cerasoli, D. M.; Wild, J. R. (2008): Balancing the stability and the catalytic specificities of OP hydrolases with enhanced V-agent activities. In: *Protein engineering, design & selection* 21 (6), S. 405–412. DOI:
10.1093/protein/gzn019.

Regan, T. (2004): *The case for animal rights*. 2. ed., updated with a new preface. Berkeley, Calif.: University of California Press. Online verfügbar unter
<http://www.loc.gov/catdir/bios/ucal052/2004003833.html>.

Regan, T. (2011): *The Radical Egalitarian Case for Animal Rights*. Online verfügbar unter
<http://tomregan.free.fr/Tom-Regan-Radical-Egalitarian->

Case-for-Animal-Rights.pdf, zuletzt geprüft am
02.02.2023.

Regan, T.; Singer, P. (1989): Animal rights and human obligations. 2. ed. Englewood Cliffs, NJ: Prentice Hall.

Reiter, G.; Mikler, J.; Hill, I.; Weatherby, K.; Thiermann, H.; Worek, F. (2008): Chromatographic resolution, characterisation and quantification of VX enantiomers in hemolysed swine blood samples. In: *Journal of chromatography. B, Analytical technologies in the biomedical and life sciences* 873 (1), S. 86–94. DOI:
10.1016/j.jchromb.2008.08.001.

Reiter, G.; Mikler, J.; Hill, I.; Weatherby, K.; Thiermann, H.; Worek, F. (2011): Simultaneous quantification of VX and its toxic metabolite in blood and plasma samples and its application for in vivo and in vitro toxicological studies. In: *Journal of chromatography. B, Analytical technologies in the biomedical and life sciences* 879 (26), S. 2704–2713. DOI:
10.1016/j.jchromb.2011.07.031.

Reiter, G.; Müller, S.; Hill, I.; Weatherby, K.; Thiermann, H.; Worek, F.; Mikler, J. (2015): In vitro and in vivo toxi-

cological studies of V nerve agents: molecular and stereoselective aspects. In: *Toxicology letters* 232 (2), S. 438–448. DOI: 10.1016/j.toxlet.2014.11.010.

Rice, D.; Barone, S. (2000): Critical periods of vulnerability for the developing nervous system: evidence from humans and animal models. In: *Environmental health perspectives* 108 Suppl 3 (Suppl 3), S. 511–533. DOI: 10.1289/ehp.00108s3511.

Rice, H. (2016): Volume 1: Fundamental Aspect. Chapter 3: Toxicology of Organophosphorus Nerve Agents. In: F. Worek, J. Jenner und H. Thiermann (Hg.): *Chemical Warfare Toxicology*. Cambridge: Royal Society of Chemistry (Issues in Toxicology), S. 81–116.

RL 2010/63/EU (22.09.2010): Richtlinie 2010/63/EU des europäischen Parlaments und des Rates zum Schutz der für wissenschaftliche Zwecke verwendeten Tiere. Online verfügbar unter <https://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2010:276:0033:0079:de:PDF>, zuletzt geprüft am 02.02.2023.

Rochu, D.; Chabrière, E.; Masson, P. (2007): Human paraoxonase: a promising approach for pre-treatment

and therapy of organophosphorus poisoning. In: *Toxicology* 233 (1-3), S. 47–59. DOI: 10.1016/j.tox.2006.08.037.

Rojas, A.; Ganesh, T.; Wang, W.; Wang, J.; Dingledine, R. (2020): A rat model of organophosphate-induced status epilepticus and the beneficial effects of EP2 receptor inhibition. In: *Neurobiology of disease* (133: 104399). DOI: 10.1016/j.nbd.2019.02.010.

Rosman, Y.; Eisenkraft, A.; Milk, N.; Shiyovich, A.; Ophir, N.; Shrot, S. et al. (2014): Lessons learned from the Syrian sarin attack: evaluation of a clinical syndrome through social media. In: *Annals of internal medicine* 160 (9), S. 644–648. DOI: 10.7326/M13-2799.

Russell, W. M. S.; Burch, L. (1959): *The Principles of Humane Experimental Technique*: Methuen (1).

Sadock, B. J.; Sadock, V. A. (2012): *Kaplan & Sadock's Concise Textbook of Clinical Psychiatry*. 3rd ed. Philadelphia: Wolters Kluwer Health. Online verfügbar unter <https://ebookcentral.proquest.com/lib/kxp/detail.action?docID=2032153>.

Salonen, J. S. (1989): Pharmacokinetics of medetomidine. In: *Acta veterinaria Scandinavica. Supplementum* 85, S. 49–54.

Sánchez-Barbudo, I. S.; Camarero, P. R.; Mateo, R. (2012): Primary and secondary poisoning by anticoagulant rodenticides of non-target animals in Spain. In: *The Science of the total environment* 420, S. 280–288. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2012.01.028.

Sanderson, G. C.: A review of the problem of lead poisoning in waterfowl. In: *Illinois Natural History Survey* 1986 (4), S. 34–45.

Sandkühler, H. J. (2010): Enzyklopädie Philosophie: Felix Meiner Verlag.

Santos, R. L.; Zhang, S.; Tsohis, R. M.; Kingsley, R. A.; Adams, L. G.; Bäumlner, A. J. (2001): Animal models of Salmonella infections: enteritis versus typhoid fever. In: *Microbes and infection* 3 (14-15), S. 1335–1344. DOI: 10.1016/S1286-4579(01)01495-2.

Satar, S.; Satar, D.; Mete, U. O.; Suchard, J. R.; Topal, M.; Kaya, M. (2005): Ultrastructural effects of acute or-

ganophosphate poisoning on rat kidney. In: *Renal failure* 27 (5), S. 623–627. DOI: 10.1080/08860220500200536.

Saxena, A.; Sun, W.; Fedorko, J. M.; Koplovitz, I.; Doctor, B. P. (2011): Prophylaxis with human serum butyrylcholinesterase protects guinea pigs exposed to multiple lethal doses of soman or VX. In: *Biochemical pharmacology* 81 (1), S. 164–169. DOI: 10.1016/j.bcp.2010.09.007.

Scabell, P.; Henke, J.; Deppe, H.; Ulrich, M.; Erhardt, W.: Vergleichsuntersuchungen zur Medetomidin-Kombinationsanästhesie beim Hund. In: *Tierärztliche Praxis* 1999 (27(K)), S. 231–238.

Schilz, J.; Binder, U.; Friedrich, L.; Gebauer, M.; Lutz, C.; Schlapschy, M. et al. (2021): Molecular recognition of structurally disordered Pro/Ala-rich sequences (PAS) by antibodies involves an Ala residue at the hot spot of the epitope. In: *Journal of molecular biology* 433 (18), S. 167113. DOI: 10.1016/j.jmb.2021.167113.

Schlapschy, M.; Binder, U.; Börger, C.; Theobald, I.; Wachinger, K.; Kisling, S. et al. (2013): PASylation: a biological alternative to PEGylation for extending the

plasma half-life of pharmaceutically active proteins. In: *Protein engineering, design & selection* 26 (8), S. 489–501. DOI: 10.1093/protein/gzt023.

Schmidt, R. F.; Lang, F.; Heckmann, M. (Hg.) (2010): *Physiologie des Menschen. Mit Pathophysiologie*. 31., überarbeitete und aktualisierte Auflage. Heidelberg: Springer (SpringerLink Bücher).

Schmitt, J. (2022): Bekommt Putin Kampfstoffe aus der deutschen Provinz? Russland-Sanktionen. Hg. v. Süddeutsche Zeitung. Online verfügbar unter <https://www.sueddeutsche.de/politik/razzia-putin-chemikalien-riol-sanktionen-1.5647585?reduced=true>, zuletzt aktualisiert am 30.08.2022, zuletzt geprüft am 23.01.2023.

Schrader, G. (1950): Organische Phosphorverbindungen als neuartige Insektizide. In: *Angewandte Chemie* (62), S. 471–473.

Schrader, G. (1951): Die Entwicklung neuer Insektizide auf Grundlage organischer Fluor- und Phosphor-Verbindungen. In: *Monographie Angewandte Chemie und Chemie-Ingenieur-Technik* (62), S. 1–62.

Schrader, G. (1963): Die Entwicklung neuer insektizider Phosphorsäure-Ester. Weinheim: Verlag Chemie.

Schulte am Esch, J.; Kochs, E.; Bause, H. (2000a): All-gemeinanästhesie - Inhalationsanästhetika. In: J. Schulte am Esch, E. Kochs und H. Bause (Hg.): Anästhesiologie und Intensivmedizin. Stuttgart: Georg Thieme Verlag (Duale Reihe), S. 147–161.

Schulte am Esch, J.; Kochs, E.; Bause, H. (2000b): All-gemeinanästhesie - Intravenöse Pharmaka. In: J. Schulte am Esch, E. Kochs und H. Bause (Hg.): Anästhesiologie und Intensivmedizin. Stuttgart: Georg Thieme Verlag (Duale Reihe), S. 123–146.

Schünke, M.; Schulte am Esch, J.; Schumacher, U. (2015): Kopf, Hals und Neuroanatomie. Unter Mitarbeit von M. Voll und K. Wesker. 4., überarbeitete und erweiterte Auflage. Stuttgart, New York: Georg Thieme Verlag (Prometheus).

Schwartz, M.; Muñana, K. R.; Nettifee-Osborne, J. A.; Messenger, K. M.; Papich, M. G. (2013): The pharmacokinetics of midazolam after intravenous, intramuscular, and rectal administration in healthy dogs. In: *Journal of*

veterinary pharmacology and therapeutics 36 (5), S. 471–477. DOI: 10.1111/jvp.12032.

Sedgwick, C. J.; Erhardt, W.; Korbel, R.; Lendl, C. (1992): Anästhesie bei Reptilien, Vögeln, Primaten, Kaninchen und kleinen Nagern. In: R. R. Paddleford und W. Erhardt (Hg.): Anästhesie bei Kleintieren. Stuttgart, New York: Schattauer, S. 374–384.

Seeger, T.; Eichhorn, M.; Lindner, M.; Niessen, K. V.; Tattersall, J. E. H.; Timperley, C. M. et al. (2012): Restoration of soman-blocked neuromuscular transmission in human and rat muscle by the bispyridinium non-oxime MB327 in vitro. In: *Toxicology* 294 (2-3), S. 80–84. DOI: 10.1016/j.tox.2012.02.002.

Segovia, G.; Del Arco, A.; Mora, F. (2009): Environmental enrichment, prefrontal cortex, stress, and aging of the brain. In: *Journal of neural transmission (Vienna, Austria : 1996)* 116 (8), S. 1007–1016. DOI: 10.1007/s00702-009-0214-0.

Sellström, A. (2013): United Nations Mission to investigate allegations of the use of chemical weapons in the Syrian Arab Republic. In: *Final Report*.

Senanayake, N.; Karalliedde, L. (1987): Neurotoxic effects of organophosphorus insecticides. An intermediate syndrome. In: *The New England journal of medicine* 316 (13), S. 761–763. DOI:

10.1056/NEJM198703263161301.

Sengupta, P. (2013): The Laboratory Rat: Relating Its Age With Human's. In: *International Journal of Preventive Medicine* 4 (6), S. 624–630.

Serdar, C. M.; Gibson, D. T.; Munnecke, D. M.; Lancaster, J. H. (1982): Plasmid Involvement in Parathion Hydrolysis by *Pseudomonas diminuta*. In: *Applied and environmental microbiology* 44 (1), S. 246–249. DOI:

10.1128/aem.44.1.246-249.1982.

Shampo, M. A.; Kyle, R. A. (1996): Godfrey Hounsfield--developer of computed tomographic scanning. In: *Mayo Clinic proceedings* 71 (10), S. 990. DOI: 10.1016/S0025-6196(11)63774-9.

Shapira, S.; Sapir, M.; Wengier, A.; Grauer, E.; Kadar, T. (2002): Aging has a complex effect on a rat model of ischemic stroke. In: *Brain research* 925 (2), S. 148–158. DOI: 10.1016/s0006-8993(01)03270-x.

Sharp, P. E.; La Regina, M. C. (1998): Anesthesia and Analgesia. In: P. E. Sharp und M. C. La Regina (Hg.): A Volume in The Laboratory Animal pocket Reference Series, The Laboratory Rat.: CRC Press, S. 101–113.

Sharp, P. E.; La Regina M. C. (2013): Veterinary care. In: P. E. Sharp und J. Villano (Hg.): The laboratory rat. 2nd ed. Boca Raton, Fla.: CRC Press (Laboratory animal pocket reference series), S. 65–128.

Shibutani, M. (2000): Anesthesia, artificial ventilation and perfusion fixation. In: G. J. Krinke (Hg.): The laboratory rat. Unter Mitarbeit von M. Shibutani: Academic Press, S. 511–521.

Shih, T. M.; Kan, R. K.; McDonough, J. H. (2005): In vivo cholinesterase inhibitory specificity of organophosphorus nerve agents. In: *Chemico-biological interactions* 157-158, S. 293–303. DOI: 10.1016/j.cbi.2005.10.042.

Sidell, F. R. (1994): Clinical effects of organophosphorus cholinesterase inhibitors. In: *Journal of applied toxicology* 14 (2), S. 111–113. DOI: 10.1002/jat.2550140212.

Sidell, F. R.; Borak, J. (1992): Chemical warfare agents: II. Nerve agents. In: *Annals of Emergency Medicine* 21 (7), S. 865–871. DOI: 10.1016/s0196-0644(05)81036-4.

Simon, M. M.; Greenaway, S.; White, J. K.; Fuchs, H.; Gailus-Durner, V.; Wells, S. et al. (2013): A comparative phenotypic and genomic analysis of C57BL/6J and C57BL/6N mouse strains. In: *Genome biology* 14 (7), R82. DOI: 10.1186/gb-2013-14-7-r82.

Singer, P. (1993): Practical ethics. 2. ed. Cambridge: Cambridge University Press.

Singer, P. (2009): Animal liberation. The definitive classic of the animal movement. 1st Harper Perennial ed. New York, NY: Ecco Book/Harper Perennial.

Singh, B. K. (2009): Organophosphorus-degrading bacteria: ecology and industrial applications. In: *Nature reviews. Microbiology* 7 (2), S. 156–164. DOI: 10.1038/nrmicro2050.

Singh, B. K.; Walker, A. (2006): Microbial degradation of organophosphorus compounds. In: *FEMS microbiology reviews* 30 (3), S. 428–471. DOI: 10.1111/j.1574-6976.2006.00018.x.

Sloviter, R. S. (1999): Status epilepticus-induced neuronal injury and network reorganization. In: *Epilepsia* 40 Suppl 1, S34-9; discussion S40-1. DOI: 10.1111/j.1528-1157.1999.tb00876.x.

Smith, D.; Anderson, D.; Degryse, A.-D.; Bol, C.; Criado, A.; Ferrara, A. et al. (2018): Classification and reporting of severity experienced by animals used in scientific procedures: FELASA/ECLAM/ESLAV Working Group report. In: *Laboratory animals* 52 (1_suppl), S. 5–57. DOI: 10.1177/0023677217744587.

Smith, W. (1993): Responses of laboratory animals to some injectable anaesthetics. In: *Laboratory animals* 27 (1), S. 30–39. DOI: 10.1258/002367793781082377.

Soreq, H.; Seidman, S. (2001): Acetylcholinesterase--new roles for an old actor. In: *Nature reviews. Neuroscience* 2 (4), S. 294–302. DOI: 10.1038/35067589.

Soudijn, W.; van Wijngaarden, I. (2000): The GABA transporter and its inhibitors. In: *Current medicinal chemistry* 7 (10), S. 1063–1079. DOI: 10.2174/0929867003374363.

Steindl, D.; Boehmerle, W.; Körner, R.; Praeger, D.; Haug, M.; Nee, J. et al. (2021): Novichok nerve agent poisoning. In: *Lancet (London, England)* 397 (10270), S. 249–252. DOI: 10.1016/S0140-6736(20)32644-1.

Stenberg, D. (1989): Physiological role of alpha 2-adrenoceptors in the regulation of vigilance and pain: effect of medetomidine. In: *Acta veterinaria Scandinavica. Supplementum* 85, S. 21–28.

Stojiljkovic, M. P.; Jokanović, M. (2007): Pyridinium oximes: Rationale for their selection as causal antidotes against organophosphate poisonings and current solutions for auto-injectors. In: *Archives of Industrial Hygiene and Toxicology* (57(4)), S. 435–443.

Storch, V.; Welsch, U.; Wink, M. (2013): *Evolutionsbiologie*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.

Strohl, W. R. (2015): Fusion Proteins for Half-Life Extension of Biologics as a Strategy to Make Biobetters. In: *BioDrugs : clinical immunotherapeutics, biopharmaceuticals and gene therapy* 29 (4), S. 215–239. DOI: 10.1007/s40259-015-0133-6.

Sturma, D.; Heinrichs, B. (Hg.) (2015): Handbuch Bioethik. Unter Mitarbeit von A. Spaeth und R. Wagner. Deutsches Referenzzentrum für Ethik in den Biowissenschaften. Stuttgart, Weimar: Verlag J.B. Metzler.

Suzich, J. A.; Ghim, S. J.; Palmer-Hill, F. J.; White, W. I.; Tamura, J. K.; Bell, J. A. et al. (1995): Systemic immunization with papillomavirus L1 protein completely prevents the development of viral mucosal papillomas. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92 (25), S. 11553–11557. DOI: 10.1073/pnas.92.25.11553.

Suzuki, T.; Morita, H.; Ono, K.; Maekawa, K.; Nagai, R.; Yazaki, Y. (1995): Sarin poisoning in Tokyo subway. In: *Lancet (London, England)* 345 (8955), S. 980.

Szinicz, L. (2005): History of chemical and biological warfare agents. In: *Toxicology* 214 (3), S. 167–181. DOI: 10.1016/j.tox.2005.06.011.

Szu, S. C.; Stone, A. L.; Robbins, J. D.; Schneerson, R.; Robbins, J. B. (1987): Vi capsular polysaccharide-protein conjugates for prevention of typhoid fever. Preparation, characterization, and immunogenicity in laboratory ani-

mals. In: *The Journal of experimental medicine* 166 (5), S. 1510–1524. DOI: 10.1084/jem.166.5.1510.

Tammelin, L. E. (1957): Dialkoxyphosphorylthiocholines, alkoxy-methylphosphorylthiocholines and analogous choline esters-syntheses, pka of tertiary homologues and cholinesterase inhibition. In: *Acta Chemica Scandinavica* (11.8), S. 1340–1349.

Tattersall, J. E. H.; Smith, A. P.; Waters, K.; Mistry, R.; Weeden, C. B. D. (1998): Therapeutic action of HI-6 against Soman poisoning in vitro: An interspecies comparison. In: *British Journal of Pharmacology* (125 (Suppl)), Artikel 7P.

Taylor, P. (2001): Anticholinesterase agents. In: J. G. Hardman und L. E. Limbird (Hg.): *Goodman & Gilman's the pharmacological basis of therapeutics*. 10. ed., international ed. New York, NY: McGraw-Hill Med. Publ, S. 175–191.

Taylor, P.; Radic, Z.; Hosea, N. A.; Camp, S.; Marchot, P.; Berman, H. A. (1995): Structural bases for the specificity of cholinesterase catalysis and inhibition. In: *Toxi-*

cology letters, S. 453–458. DOI: 10.1016/0378-4274(95)03575-3.

Tenberken, O.; Mikler, J.; Hill, I.; Weatherby, K.; Thiermann, H.; Worek, F.; Reiter, G. (2010): Toxicokinetics of tabun enantiomers in anaesthetized swine after intravenous tabun administration. In: *Toxicology letters* 198 (2), S. 177–181. DOI: 10.1016/j.toxlet.2010.06.012.

The Wistar Institute: Our Story. Online verfügbar unter <http://www.wistar.org/the-institute/our-history>, zuletzt geprüft am 02.02.2023.

Thein, E.; Aigner, B.; Brandstetter, H.; Brielmeier, M.; Lengling, A.; Linklater, N.; Thaden, A. K. v. (2018): Fragen und Antworten zum Thema Tierversuche. für das Organisationskomitee der 56. Wissenschaftlichen Tagung der Gesellschaft für Versuchstierkunde. Online verfügbar unter https://www.sicherheitswesen.verwaltung.uni-muenchen.de/downloadbereich/tierschutz/hand_out.pdf, zuletzt geprüft am 02.02.2023.

Thiermann, H.; Gonder, S.; John, H.; Kehe, K.; Koller, M.; Steinritz, D.; Worek, F. (2010): Chemische Kampf-

stoffe. In: Toxikologie Band 2: Toxikologie der Stoffe. Weinheim: WILEY-VCH (Master, Bd. 2), S. 206–208.

Thiermann, H.; Szinicz, L.; Eyer, P.; Zilker, T.; Worek, F. (2005): Correlation between red blood cell acetylcholinesterase activity and neuromuscular transmission in organophosphate poisoning. In: *Chemico-biological interactions* 157-158, S. 345–347. DOI: 10.1016/j.cbi.2005.10.102.

Thiermann, H.; Worek, F.; Aurbek, N. (2016): Volume 2: Management of poisoning. Chapter 1: Treatment of Nerve Agent Poisoning. In: F. Worek, J. Jenner und H. Thiermann (Hg.): *Chemical Warfare Toxicology*. Cambridge: Royal Society of Chemistry (Issues in Toxicology), S. 1–42.

Thiermann, H.; Worek, F.; Kehe, K. (2013): Limitations and challenges in treatment of acute chemical warfare agent poisoning. In: *Chemico-biological interactions* 206 (3), S. 435–443. DOI: 10.1016/j.cbi.2013.09.015.

Thurmon, J. C.; Tranquilli, W. J.; Benson GJ (Hg.) (1996): *Lumb & Jones' veterinary anesthesia*. Unter Mitarbeit von M. R. Bednarski. 3. ed. Baltimore: Williams &

Wilkins (A Lea & Febiger book). Online verfügbar unter <http://www.loc.gov/catdir/enhancements/fy0802/95046509-b.html>.

TierSchG: Tierschutzgesetz. Online verfügbar unter <https://www.gesetze-im-internet.de/tierschg/BJNR012770972.html>, zuletzt geprüft am 02.02.2023.

Tierversuche verstehen: Tierarten und ihr Einsatz in der Forschung. Online verfügbar unter <https://www.tierversuche-verstehen.de/tierarten-und-ihr-einsatz-in-der-forschung/>, zuletzt geprüft am 02.02.2023.

Tierversuche verstehen: Tierversuche und Ethik. Online verfügbar unter <https://www.tierversuche-verstehen.de/tierversuche-und-ethik/>, zuletzt geprüft am 02.02.2023.

Timperley, C. M. (Hg.) (2015): Toxicology and medical treatment of organophosphate compounds. In Best Synthetic Methods: Organophosphorus (V) Chemistry. Unter Mitarbeit von C. M. Timperley und J. E. H. Tatterstall. Oxford: Elsevier.

Tinson, E.; Boller, E.; Davis, M. (2017): A suspected case of intermediate syndrome in a dog with carbamate toxicosis. In: *Australian veterinary journal* 95 (6), S. 201–206. DOI: 10.1111/avj.12589.

Tobin, J. R. (2008): Paradoxical effects of midazolam in the very young. In: *Anesthesiology* 108 (1), S. 6–7. DOI: 10.1097/01.anes.0000296717.85521.b5.

Tobler, K.; Ackermann, M.; Fraefel, C. (2021): Allgemeine Virologie. Unter Mitarbeit von D. Ribeiro Almeida Guerra. 2., aktualisierte Auflage. Bern: Haupt Verlag (utb basics, 4516).

Töpfer, L.; Vater, J.; Boldte, M.; Keppeler, P. (2016): BASICS Anästhesie, Intensivmedizin und Schmerztherapie. 4. Auflage. München: Elsevier Urban & Fischer (Basics). Online verfügbar unter <http://www.elsevier.de/978-3-437-42349-9>.

Tranquilli, W. J.; Thurmon, J. C.; Grimm, K. A. (Hg.) (2007): Lumb & Jones' veterinary anesthesia and analgesia. Haskins, Steve C. Unter Mitarbeit von S. C. Haskins. 4. ed. Oxford: Blackwell. Online verfügbar unter <https://books-library.net/files/books->

library.online_noob5781bfd0cd351b04a09bb-58889.pdf,
zuletzt geprüft am 17.12.2022.

Tsai, P.-C.; Bigley, A. N.; Li, Y.; Ghanem, E.; Cadieux, C. L.; Kasten, S. A. et al. (2010): Stereoselective hydrolysis of organophosphate nerve agents by the bacterial phosphotriesterase. In: *Biochemistry* 49 (37), S. 7978–7987. DOI: 10.1021/bi101056m.

Vainio, O. (1989): Introduction to the clinical pharmacology of medetomidine. In: *Acta veterinaria Scandinavica Supplementum* 85, S. 85–88.

Valchev, I.; Binev, R.; Yordanova, V.; Nikolov, Y. (2008): Anticoagulant rodenticide intoxication in animals - A review. In: *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences* 32, S. 237–243.

Vale, A. (2005): What lessons can we learn from the Japanese sarin attacks? In: *Przegląd lekarski* 62 (6), S. 528–532.

Vale, J. A. (1998): Toxicokinetic and toxicodynamic aspects of organophosphorus (OP) insecticide poisoning. In: *Toxicology letters* 102-103, S. 649–652. DOI: 10.1016/s0378-4274(98)00277-x.

Vale, J. A.; Marrs, T. C.; Maynard, R. L. (2018): Novichok: a murderous nerve agent attack in the UK. In: *Clinical toxicology (Philadelphia, Pa.)* 56 (11), S. 1093–1097. DOI: 10.1080/15563650.2018.1469759.

van de Weerd, H. A.; Aarsen, E. L.; Mulder, A.; Kruitwagen, C. L. J. J.; Hendriksen, C. F. M.; Baumans, V. (2002): Effects of environmental enrichment for mice: variation in experimental results. In: *Journal of applied animal welfare science* 5 (2), S. 87–109. DOI: 10.1207/S15327604JAWS0502_01.

van der Schans, M. J.; Lander, B. J.; van der Wiel, H.; Langenberg, J. P.; Benschop, H. P. (2003): Toxicokinetics of the nerve agent (+/-)-VX in anesthetized and atropinized hairless guinea pigs and marmosets after intravenous and percutaneous administration. In: *Toxicology and applied pharmacology* 191 (1), S. 48–62. DOI: 10.1016/S0041-008X(03)00216-3.

van Helden, H. P.; Lange, J. de; Busker, R. W.; Melchers, B. P. (1991): Therapy of organophosphate poisoning in the rat by direct effects of oximes unrelated to ChE reactivation. In: *Archives of toxicology* 65 (7), S. 586–593. DOI: 10.1007/BF01973721.

Vanhooke, J. L.; Benning, M. M.; Raushel, F. M.; Holden, H. M. (1996): Three-dimensional structure of the zinc-containing phosphotriesterase with the bound substrate analog diethyl 4-methylbenzylphosphonate. In: *Biochemistry* 35 (19), S. 6020–6025. DOI: 10.1021/bi960325l.

Veazey, R. S. (2013): Animal models for microbicide safety and efficacy testing. In: *Current opinion in HIV and AIDS* 8 (4), S. 295–303. DOI: 10.1097/COH.0b013e328361d096.

Ventura, C.; Denton, E.; van Court, E. (2021): *The Emergency Medical Responder. Training and Succeeding as an EMT/EMR.* 1st ed. 2021. Cham: Springer International Publishing; Imprint Springer.

Versuchstiermeldeverordnung: Verordnung über die Meldung zu Versuchszwecken verwendeter Wirbeltiere oder Kopffüßer oder zu bestimmten anderen Zwecken verwendeter Wirbeltiere. Online verfügbar unter https://www.gesetze-im-internet.de/verstiermeldv_2013/BJNR414510013.html, zuletzt geprüft am 10.02.2023.

TierSchVersV (Tierschutz-Versuchstierverordnung vom 01.08.2013 (BGBl. I S. 3125, 3126), die zuletzt durch Artikel 1 der Verordnung vom 11.08.2021 (BGBl. I S. 3570) geändert worden ist): Verordnung zum Schutz von zu Versuchszwecken oder zu anderen wissenschaftlichen Zwecken verwendeten Tieren (Tierschutz-Versuchstierverordnung - TierSchVersV). Online verfügbar unter <https://www.gesetze-im-internet.de/tierschversv/BJNR312600013.html>, zuletzt geprüft am 02.02.2023.

Virtanen, R. (1989): Pharmacological profiles of medetomidine and its antagonist, atipamezole. In: *Acta veterinaria Scandinavica. Supplementum* 85, S. 29–37.

Vital, M.; Harkema, J. R.; Rizzo, M.; Tiedje, J.; Brandenberger, C. (2015): Alterations of the Murine Gut Microbiome with Age and Allergic Airway Disease. In: *Journal of immunology research* 2015, S. 892568. DOI: 10.1155/2015/892568.

Waddell, L. S.; Poppenga, R. H.; Drobatz, K. J. (2013): Anticoagulant rodenticide screening in dogs: 123 cases (1996-2003). In: *Journal of the American Veterinary*

Medical Association 242 (4), S. 516–521. DOI: 10.2460/javma.242.4.516.

Wagner, H.; Kluge, R. (2013): Fütterungskonzepte und –methoden in der Versuchstierhaltung und im Fütterungskonzepte und –methoden in der Versuchstierhaltung und im Tierversuch - RATTE -. Fachinformation aus dem Ausschuss für Ernährung der Versuchstiere. GV-SOLAS. Online verfügbar unter https://www.gv-solas.de/wp-content/uploads/2021/08/2016_10Ernaehrung_Ratte.pdf, zuletzt geprüft am 04.02.2023.

Warnock, M. (2008): *Utilitarianism and On Liberty*. Including 'Essay on Bentham' and Selections from the Writings of Jeremy Bentham and John Austin. 2nd ed. Hoboken: John Wiley & Sons Ltd. Online verfügbar unter <http://gbv.ebib.com/patron/FullRecord.aspx?p=351643>.

Wasterlain, C. G.; Shirasaka, Y. (1994): Seizures, brain damage and brain development. In: *Brain & development* 16 (4), S. 279–295. DOI: 10.1016/0387-7604(94)90025-6.

Waynforth, H. B.; Flecknell, P. A. (1992): Anaesthesia and postoperative care. In: H. B. Waynforth und P. A. Flecknell (Hg.): *Experimental and surgical technique in the rat*. London: Academic Press, S. 100–152.

Weinbroum, A. A.; Szold, O.; Ogorek, D.; Flaishon, R. (2001): The midazolam-induced paradox phenomenon is reversible by flumazenil. Epidemiology, patient characteristics and review of the literature. In: *European journal of anaesthesiology* 18 (12), S. 789–797. DOI: 10.1046/j.1365-2346.2001.00922.x.

Weiß, J.; Maeß, J.; Nebendahl, K.; Rossbach, W. (1996): *Haus- und Versuchstierpflege*. 1. Aufl. Jena, Stuttgart, New York: Gustav Fischer Verlag.

Westheide, W.; Rieger, G. (2013): *Spezielle Zoologie*. Teil 1: Einzeller und Wirbellose Tiere. 3. Aufl. Berlin, Heidelberg: Springer Spektrum.

Widemann, B. C.; Schwartz, S.; Jayaprakash, N.; Christensen, R.; Pui, C.-H.; Chauhan, N. et al. (2014): Efficacy of glucarpidase (carboxypeptidase g2) in patients with acute kidney injury after high-dose methotrexate therapy.

In: *Pharmacotherapy* 34 (5), S. 427–439. DOI:
10.1002/phar.1360.

Wille, T.; Neumaier, K.; Koller, M.; Ehinger, C.; Aggarwal, N.; Ashani, Y. et al. (2016): Single treatment of VX poisoned guinea pigs with the phosphotriesterase mutant C23AL: Intraosseous versus intravenous injection. In: *Toxicology letters* 258, S. 198–206. DOI:
10.1016/j.toxlet.2016.07.004.

Wille, T.; Tenberken, O.; Reiter, G.; Müller, S.; Le Provost, R.; Lafont, O. et al. (2009): Detoxification of nerve agents by a substituted beta-cyclodextrin: application of a modified biological assay. In: *Toxicology* 265 (3), S. 96–100. DOI: 10.1016/j.tox.2009.09.018.

Winter, M.; Wille, T.; Musilek, K.; Kuca, K.; Thiermann, H.; Worek, F. (2016): Investigation of the reactivation kinetics of a large series of bispyridinium oximes with organophosphate-inhibited human acetylcholinesterase. In: *Toxicology letters* 244, S. 136–142. DOI:
10.1016/j.toxlet.2015.07.007.

Wismer, T.; Means, C. (2012): Toxicology of newer insecticides in small animals. In: *The Veterinary clinics of*

North America. Small animal practice 42 (2), 335-47, vii-viii. DOI: 10.1016/j.cvsm.2011.12.004.

Wixson, S. K.; Smiler K. L. (Hg.) (1997): *Anesthesia and analgesia in laboratory animals*. Unter Mitarbeit von D. Kohn, S. K. Wixson, W. White und G. Benson. San Diego: Academic Press (American College of Laboratory Animal Medicine series).

Wolf, U. (2012): *Ethik der Mensch-Tier-Beziehung*. Frankfurt am Main: Vittorio Klostermann GmbH (Klostermann rote Reihe, 49). Online verfügbar unter <http://www.perlentaucher.de/buch/ursula-wolf/ethik-der-mensch-tier-beziehung.html>.

Wolfensohn, S.; Lloyd, M. (2015): *Handbook of laboratory animal management and welfare*. Fourth edition. Chichester, West Sussex, UK, Boston, Massachusetts: Wiley-Blackwell; Credo Reference.

Wolfer, D. P.; Litvin, O.; Morf, S.; Nitsch, R. M.; Lipp, H.-P.; Würbel, H. (2004): *Laboratory animal welfare: cage enrichment and mouse behaviour*. In: *Nature* 432 (7019), S. 821–822. DOI: 10.1038/432821a.

Woody, B. J.; Murphy, M. J.; Ray, A. C.; Green, R. A. (1992): Coagulopathic effects and therapy of brodifacoum toxicosis in dogs. In: *Journal of veterinary internal medicine* 6 (1), S. 23–28. DOI: 10.1111/j.1939-1676.1992.tb00981.x.

Worek, F.; Aurbek, N.; Thiermann, H. (2007): Reactivation of organophosphate-inhibited human AChE by combinations of obidoxime and HI 6 in vitro. In: *Journal of applied toxicology* 27 (6), S. 582–588. DOI: 10.1002/jat.1241.

Worek, F.; Eyer, P.; Szinicz, L. (1998a): Inhibition, reactivation and aging kinetics of cyclohexylmethylphosphonofluoridate-inhibited human cholinesterases. In: *Archives of toxicology* 72 (9), S. 580–587. DOI: 10.1007/s002040050546.

Worek, F.; Eyer, P.; Thiermann, H. (2012): Determination of acetylcholinesterase activity by the Ellman assay: a versatile tool for in vitro research on medical countermeasures against organophosphate poisoning. In: *Drug testing and analysis* 4 (3-4), S. 282–291. DOI: 10.1002/dta.337.

Worek, F.; Koller, M.; Thiermann, H.; Szinicz, L. (2005): Diagnostic aspects of organophosphate poisoning. In: *Toxicology* 214 (3), S. 182–189. DOI: 10.1016/j.tox.2005.06.012.

Worek, F.; Seeger, T.; Goldsmith, M.; Ashani, Y.; Leader, H.; Sussman, J. S. et al. (2014a): Efficacy of the re-PON1 mutant IIG1 to prevent cyclosarin toxicity in vivo and to detoxify structurally different nerve agents in vitro. In: *Archives of toxicology* 88 (6), S. 1257–1266. DOI: 10.1007/s00204-014-1204-z.

Worek, F.; Seeger, T.; Reiter, G.; Goldsmith, M.; Ashani, Y.; Leader, H. et al. (2014b): Post-exposure treatment of VX poisoned guinea pigs with the engineered phosphotriesterase mutant C23: A proof-of-concept study. In: *Toxicology letters* 231 (1), S. 45–54. DOI: 10.1016/j.toxlet.2014.09.003.

Worek, F.; Seeger, T.; Zengerle, M.; Kubik, S.; Thiermann, H.; Wille, T. (2014c): Effectiveness of a substituted β -cyclodextrin to prevent cyclosarin toxicity in vivo. In: *Toxicology letters* 226 (2), S. 222–227. DOI: 10.1016/j.toxlet.2014.02.010.

Worek, F.; Thiermann, H. (2013): The value of novel oximes for treatment of poisoning by organophosphorus compounds. In: *Pharmacology & therapeutics* 139 (2), S. 249–259. DOI: 10.1016/j.pharmthera.2013.04.009.

Worek, F.; Thiermann, H.; Szinicz, L.; Eyer, P. (2004): Kinetic analysis of interactions between human acetylcholinesterase, structurally different organophosphorus compounds and oximes. In: *Biochemical pharmacology* 68 (11), S. 2237–2248. DOI: 10.1016/j.bcp.2004.07.038.

Worek, F.; Thiermann, H.; Wille, T. (2016a): Catalytic bioscavengers in nerve agent poisoning: A promising approach? In: *Toxicology letters* 244, S. 143–148. DOI: 10.1016/j.toxlet.2015.07.012.

Worek, F.; Thiermann, H.; Wille, T. (2016b): Oximes in organophosphate poisoning: 60 years of hope and despair. In: *Chemico-biological interactions* 259 (Pt B), S. 93–98. DOI: 10.1016/j.cbi.2016.04.032.

Worek, F.; Thiermann, H.; Wille, T. (2020): Organophosphorus compounds and oximes: a critical review. In: *Archives of toxicology* 94 (7), S. 2275–2292. DOI: 10.1007/s00204-020-02797-0.

Worek, F.; Widmann, R.; Knopff, O.; Szinicz, L. (1998b): Reactivating potency of obidoxime, pralidoxime, HI 6 and HLö 7 in human erythrocyte acetylcholinesterase inhibited by highly toxic organophosphorus compounds. In: *Archives of toxicology* 72 (4), S. 237–243. DOI: 10.1007/s002040050495.

Worek, F.; Wille, T.; Aurbek, N.; Eyer, P.; Thiermann, H. (2010): Reactivation of organophosphate-inhibited human, Cynomolgus monkey, swine and guinea pig acetylcholinesterase by MMB-4: a modified kinetic approach. In: *Toxicology and applied pharmacology* 249 (3), S. 231–237. DOI: 10.1016/j.taap.2010.09.021.

Wright, L. K. M.; Lee, R. B.; Clarkson, E. D.; Lumley, L. (2016a): Female rats are less susceptible during puberty to the lethal effects of percutaneous exposure to VX. In: *Toxicology reports* 3, S. 895–899. DOI: 10.1016/j.toxrep.2015.12.003.

Wright, L. K. M.; Lee, R. B.; Vincelli, N. M.; Whalley, C. E.; Lumley, L. (2016b): Comparison of the lethal effects of chemical warfare nerve agents across multiple ages. In: *Toxicology letters* 241, S. 167–174. DOI: 10.1016/j.toxlet.2015.11.023.

Yamanaka, S.; Ohta, K.; Tomita, Y.; Takayanagi, A.; Nomura, T.; Takaesu, Y. (1996): Effects on acute organophosphorus poisoning in rats in aging and solubility of organophosphates. In: *Environmental health and preventive medicine* 1 (3), S. 119–127. DOI: 10.1007/BF02931202.

Yanagisawa, N.; Morita, H.; Nakajima, T. (2006): Sarin experiences in Japan: acute toxicity and long-term effects. In: *Journal of the neurological sciences* 249 (1), S. 76–85. DOI: 10.1016/j.jns.2006.06.007.

Yang, H.; Carr, P. D.; McLoughlin, S. Yu; Liu, J. W.; Horne, I.; Qiu, X. et al. (2003): Evolution of an organophosphate-degrading enzyme: a comparison of natural and directed evolution. In: *Protein engineering* 16 (2), S. 135–145. DOI: 10.1093/proeng/gzg013.

Yang, Y.-G.; Sykes, M. (2007): Xenotransplantation: current status and a perspective on the future. In: *Nature reviews. Immunology* 7 (7), S. 519–531. DOI: 10.1038/nri2099.

Zarocostas, J. (2017): Syria chemical attacks: preparing for the unconscionable. In: *Lancet (London, England)*

389 (10078), S. 1501. DOI: 10.1016/S0140-6736(17)30997-2.

Zhang, P.; Liu, E. J.; Tsao, C.; Kasten, S. A.; Boeri, M. V.; Dao, T. L. et al. (2019): Nanoscavenger provides long-term prophylactic protection against nerve agents in rodents. In: *Science translational medicine* 11 (473). DOI: 10.1126/scitranslmed.aau7091.

Zilker, T. (2008): Klinische Toxikologie für die Notfall- und Intensivmedizin. 1st ed. Bremen: UNI-MED Verlag (UNI-MED Science). Online verfügbar unter <https://ebookcentral.proquest.com/lib/kxp/detail.action?dclid=6677626>.

Zintzsch, A.; Noe, E.; Reißmann, M.; Ullmann, K.; Krämer, S.; Jerchow, B. et al. (2017): Guidelines on severity assessment and classification of genetically altered mouse and rat lines. In: *Laboratory animals* 51 (6), S. 573–582. DOI: 10.1177/0023677217718863.

zur Hausen, H. (2002): Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application. In: *Nature reviews. Cancer* 2 (5), S. 342–350. DOI: 10.1038/nrc798.

IX. DANKSAGUNG

Das Verfassen dieser Dissertation wäre ohne die Unterstützung und Beratung mehrerer Personen nicht möglich gewesen.

Zunächst möchte ich mich bei meiner Doktormutter Frau Prof. Dr. med. vet. Heidrun Potschka von der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München, Inhaberin des Lehrstuhls für Pharmakologie, Toxikologie und Pharmazie für ihre hervorragende Betreuung, professionelle Beratung, die sehr wertvolle Unterstützung und Motivation sowie die gute und produktive Kooperation bedanken.

Weiterhin danke ich meinem Betreuer Prof. Dr. med. Timo Wille für die hervorragende Betreuung, die sehr wertvolle Unterstützung, die professionelle Beratung sowie die Ermutigung, die er mir gab.

Außerdem danke ich Herrn Prof. Dr. med. Franz Worek, Leiter des Instituts für Pharmakologie und Toxikologie der Bundeswehr, für die hervorragende Führung, für die sehr wertvolle Unterstützung und für die Möglichkeit, meine Dissertation unter diesen hervorragenden Arbeitsbedingungen durchführen zu können.

Danke an meine Kollegen und Freunde aus dem Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Bundeswehr für die guten wissenschaftlichen Diskussionen, anregende Beratung und Unterstützung.

Abschließend möchte ich insbesondere Kathi, Jo, Sepp und Elisabeth sowie meinem Mann Jakob für die Motivation und konstante Unterstützung in den letzten Jahren danken. Ihr seid mein Anker und meine Stütze. Ihr habt maßgeblich zum Gelingen meines Studiums, als auch der Promotion beigetragen.