

3. Material und Methode

3.1 Die Versuchstiere

Unser heutiges Hausschwein - *Sus scrofa domestica*- stammt vom Europäischen Wildschwein - *Sus scrofa*- ab. Das Schwein kann bei der Geburt im Durchschnitt 8 bis 12 Ferkel zur Welt bringen.

Kein anderes Nutztier unterlag züchterisch so großen Veränderungen wie das Schwein. So soll laut Sambraus das Schlachtalter von Schweinen in Deutschland um 1800 bei ein- einhalb Jahren und das Schlachtgewicht bei ca. 50 kg gelegen haben (Sambraus, 1989). Zu dieser Zeit sah das Hausschwein dem Wildschwein noch sehr ähnlich, das ein lang- beiniges, schlankes Tier mit langem gestreckten Kopf war.

Mitte des 19. Jahrhunderts änderte sich das Aussehen des Hausschweines. Insbesondere die Erfolge in der Landwirtschaft führten zum Anbau von Futtermitteln (Kartoffel), was zur Intensivierung der Schweinemast führte. In jener Zeit bevorzugte man großrahmige, tiefrumpfige Schweine vom Typ des Fettschweines. Mit dem Wohlstand nach dem 2. Weltkrieg änderte sich das Erscheinungsbild des Schweines abermals. Nun wurde zartes fettarmes Fleisch gewünscht und das Schwein bekam hervorquellende Schultern, ausgeprägte Schinken und einen langen schlanken Rumpf sowie ein Rippenpaar mehr. Des weiteren wurde der Fettanteil des Schlachtkörpers enorm gesenkt.

Dämmrich (1989) stellt fest, dass beim Schwein durch die Selektion auf Muskelbildung in der Rücken- und Oberschenkelmuskulatur durch die Faserkaliberzunahme ein latentes Sauerstoffdefizit, das verstärkt durch die Vermehrung weißer Muskelfaser, bei Belastung unter anderem auch PSE - Fleisch entstehen läßt.

Heute werden Schweine ca. 4 bis 6 Monate gemästet und je nach Rasse und Vermarktung des Fleisches mit ca. 85 bis 110 kg zur Schlachtung gegeben.

3.1.1 Probanden

Für die praktische Durchführung der Versuchsreihe stellte eine Agrargenossenschaft aus Sachsen-Anhalt ein Teil ihrer Ferkel zur Verfügung. Die Probanden sind Hybriden. Die Sauen gehören der Rasse Landschwein an und die Eber der Rasse Pietrain. Die Schweine werden auf Stroh gehalten. Die Sauen befinden sich in Einzelboxen und sind zusätzlich mit einer Vorrichtung fixiert. Den Tieren stehen Selbsttränken zur Verfügung. Gefüttert werden die Sauen und die Ferkel getrennt in Trögen mit unterschiedlichen Schrotmischungen.

Die Ferkel, welche die Probanden für den Hauptversuch darstellen, sind zwischen dem 05.10. und 10.10.1995 geboren. Die Muttertiere sind alle Altsauen. Die Körpermasse der Ferkel beträgt bei Versuchsbeginn zwischen 3700 und 4700g. Nach Beendigung der Versuchsreihe liegen die Körpermassen zwischen 5200 und 6100g. Die praktische Durchführung fand vom 22. bis 28. Oktober 1995 statt. Das Alter der Ferkel betrug zu Beginn der Versuchsreihe 12-17 Tage.

Für den Vorversuch wurde ein durchschnittlich entwickeltes Ferkel, welches routinemäßig zur Kastration anstand, ausgesucht.

Da zum Zeitpunkt des Versuches die Tiere noch nicht individuell gekennzeichnet waren, läßt sich eine Verwandtschaft nicht eindeutig klären. Eine verwandtschaftliche Beziehung der Ferkel in der väterlichen Linie ist möglich, konnte aber nicht mehr geklärt werden.

Bei den Probanden sind folgende Ferkel Geschwister:

A und B

C, D und E

F, G und H

I und J.

Ferkel A und B stammen aus einem Wurf mit 8 Ferkeln, von denen eines bei der Geburt verendet ist. In diesem Wurf waren 4 weibliche und 3 männliche Ferkel.

Die Probanden C, D und E sind aus einem Wurf mit 9 Ferkeln, wovon 4 weiblich und 5 männlich waren.

Aus einem Wurf von 12 Jungen sind die Geschwister F, G und H. Hier konnten 10 Ferkel aufgezogen werden, von denen 4 weiblich und 6 männlich waren.

Die Muttersau der beiden Probanden I und J zog 11 Ferkel auf. Die Sau brachte 8 Jungtiere zur Welt. 3 weibliche Ferkel wurden dazu verbracht. Das Geschlechterverhältnis betrug hier 6 Sauen und 5 Eber.

Die 10 Ferkel für den Hauptversuch wurden also von 4 Altsauen ausgesucht, um damit auch möglichst eine repräsentative Auswahl zu erreichen.

Für diesen Versuch wurde eine Genehmigung im Regierungspräsidium Dessau beantragt. Dieser Antrag (53a-42502/2-008/5 FU B) wurde positiv beschieden.

3.2 Methodik

3.2.1 Vorbereitung und Vorüberlegungen der Versuchsreihe

Ziel dieser Versuchsreihe war die Ermittlung von Catecholaminkonzentrationen im Blut männlicher Ferkel vor, während und nach der Kastration, um aus den ermittelten Werten, Rückschlüsse auf die physische und psychische Belastung durch diesen Eingriff ziehen zu können.

Um festzustellen, in welchen Größenordnungen Catecholamine im Blut vorkommen, wurde ein Vorversuch durchgeführt. Dieser diente auch dazu, die Fragestellung nach der grundsätzlichen Meßbarkeit der Catecholamine und der Ermittlung eines „Ruhewertes“ ansatzweise zu klären. Laut Döcke (1994) gibt es eine Sekretionsrate von Catecholaminen im unbelasteten Zustand des Organismus.

Somit sollte zunächst ermittelt werden, ob dieser „Ruhewert“ bei solch jungen Tieren überhaupt nachgewiesen werden kann? Dieser gewonnene Wert müßte mit einem anderen, z.B. mit einem Ruhewert, verglichen werden, um überhaupt weitere Aussagen und Auswertungen treffen zu können.

Nach den Ergebnissen der Vorversuche wurde über die Fortsetzung der Hauptversuchsreihe entschieden. Hier sei bereits vorweggenommen, dass meßbare Ergebnisse festgestellt wurden. Somit sollten im Hauptversuch 10 verschiedenen Ferkeln über eine Woche täglich je eine Blutprobe entnommen werden, um zu ermitteln, ob es zum einen, einen „Ruhewert“ der Catecholaminkonzentrationen gibt und zum anderen, welche Auswirkung die Kastration auf die Konzentration der Catecholamine besitzt. Anhand dieser Ergebnisse sollte bewertet werden, wie die Belastung durch diesen Eingriff aus der Sicht des Tier-schutzes zu beurteilen sei.

Nach diesen Vorüberlegungen folgte im weiteren die praktische Umsetzung der Versuchsreihe.

Mittels Randomisierung wurde ein männliches Ferkel ausgewählt und anschließend in Narkose gelegt. Da es nach Döcke (1994) einen Basiswert geben soll, sollte untersucht werden, ob unter Anästhesie eine solche Konzentration meßbar ist. Die Punktion fand in der Fossa jugularis statt, als der Proband bei Berührung keine Abwehrbewegung mehr durchführte. Im Weiteren (Gliederungspunkt 4) wird es als Ferkel α bezeichnet.

Für den 2. Vorversuch wurde ein weiteres Ferkel durch Randomisierung ausgewählt. Dieser Proband trägt im weiteren die Bezeichnung Ferkel β .

Das ausgesuchte Ferkel β wurde rücklings auf einen Tisch gelegt und wie im Hauptversuch vor der Kastration, direkt im Anschluß an diese und fünf bzw. zehn Minuten danach zur Probengewinnung punktiert. Der Proband war dabei bei Bewußtsein.

Bei der weiteren Durchführung der Versuchsreihe wurden die Ferkel möglichst schonend gefangen und auf den Tisch verbracht werden. Anschließend wurden sie langsam und mit

so wenig Erregung wie möglich auf den Rücken gedreht. Im weiteren wurden sie für eine Dauer von ca. 7 Minuten Manipulationen im Hals- und Hodenbereich durchgeführt, möglichst ohne Schmerzauslösung. Danach wurde eine Blutprobe entnommen. Nachfolgend blieben die Ferkel für 5 Minuten auf dem Tisch, um sie an das Liegen zu gewöhnen. Nun fanden für ca. 2 Minuten weitere Manipulationen im Hals- und Hodenbereich statt, wobei schmerzverursachende Handlungen unterblieben. Nach dieser Zeit ließ man die Ferkel für ca. 3 Minuten ausruhen. Abschließend wurde die Manipulation beendet und die Tiere zur Bucht zurückgebracht und eingesetzt.

Die Vorüberlegungen für den Hauptversuch sahen wie folgt aus:

Es sollten Saugferkel in eine Injektionsnarkose gelegt werden, um ihnen einen Verweilkatheter in die Vena jugularis einzusetzen und somit eine möglichst komplikationslose und störungsfreie Blutentnahme in regelmäßigen Abständen durchzuführen. Die Verweilkatheter sollten über den Zeitraum der Versuchsreihe, 7 Tage, in der Vene verbleiben und auf diese Weise möglichst gleiche Versuchsbedingungen für die Ferkel gewährleisten. Nach Versuchsende sollen die Katheter entfernt werden.

Das theoretische Ausgangsmodell sah vor, an sieben aufeinander folgenden Tagen jeweils eine Blutprobe zu entnehmen, wenn die Ferkel sich in Ruhelage befinden. Nach der ersten Blutentnahme des 7. Versuchstages sollte die Kastration der Ferkel erfolgen. Sofort nach der Kastration sowie nach weiteren 5 und 10 Minuten sollten erneut Punktionen durchgeführt werden.

Die Tabellen 2 und 3 geben einen entsprechenden Überblick über die geplante Umsetzung der Probenentnahmen während der Versuchsreihe.

In Abweichung von der Planung konnten bei der praktischen Umsetzung der Versuchsreihe am 2. Tag keine Blutproben entnommen werden. Siehe diesbezüglich auch die Abbildung 2 auf Seite 40 aus der die geplante und die realisierte Durchführung hervorgeht.

Übersicht der Blutprobengewinnung während der gesamten Versuchsdurchführung

Probanden	Anzahl der Blutproben						
	Tag 1	Tag 2	Tag 3	Tag 4	Tag 5	Tag 6	Tag 7
Ferkel A	1	1	1	1	1	1	4
Ferkel B	1	1	1	1	1	1	4
Ferkel C	1	1	1	1	1	1	4
Ferkel D	1	1	1	1	1	1	4
Ferkel E	1	1	1	1	1	1	4
Ferkel F	1	1	1	1	1	1	4
Ferkel G	1	1	1	1	1	1	4
Ferkel H	1	1	1	1	1	1	4
Ferkel I	1	1	1	1	1	1	4
Ferkel J	1	1	1	1	1	1	4

Tab. 2: Anzahl der geplanten Blutproben insgesamt
Quelle: Eigene Darstellung

Übersicht der Blutprobengewinnung am 7. Versuchstag

Probanden	Anzahl der Blutproben			
	Tag 7			
	vor der Kastration	Kastration	5 min n. d. Kast- ration	10 min n. d. Kastration
Ferkel A	1	1	1	1
Ferkel B	1	1	1	1
Ferkel C	1	1	1	1
Ferkel D	1	1	1	1
Ferkel E	1	1	1	1
Ferkel F	1	1	1	1
Ferkel G	1	1	1	1
Ferkel H	1	1	1	1
Ferkel I	1	1	1	1
Ferkel J	1	1	1	1

Tab. 3 Anzahl der zu entnehmenden Blutproben am 7. Versuchstag
Quelle: Eigene Darstellung

3.2.2 Praktische Versuchsdurchführung

Am **1. Versuchstag** wurden von 4 Sauen jeweils 2 bis 3 Ferkel, insgesamt 10 Ferkel, für den Versuch ausgesucht und mit einem Spray markiert. Von Sau Nummer I wurden 2 Ferkel, von Sau Nummer II 3 Ferkel, von Sau Nummer III 3 Ferkel und von Sau Nummer IV wiederum 2 Ferkel ausgesucht. Dabei wurden durchschnittliche Ferkel in bezug auf die Größe und Gewicht bevorzugt. Besonders große Ferkel und Kümmerer fanden keine Berücksichtigung. Alle Probanden befanden sich in einem Alter zwischen 11 und 16 Tagen und die Körpermassen der Ferkel betragen bei Versuchsbeginn zwischen 3700 und 4700g. Die Muttertiere waren alle Altsauen.

Nun wurde jedes Ferkel mit Hypnodil® (Fa. Janssen) und Streßnil® (Fa. Janssen) mittels i. p. Injektion in Narkose gelegt. Die Medikamente wurden in einer Mischspritze in folgender Dosierung injiziert Hypnodil® 0,9 ml und Stresnil® 0,1 ml. Als nach ca. 4-5 Minuten die Ferkel keine Abwehrreaktion bei Berührungen mehr zeigten, wurde eine Punktion mittels Kanüle und Kabevette in der Fossa jugularis durchgeführt. Anschließend wurden die Ferkel schlafend in die Bucht zurückgelegt. Nach ca. 1 Stunde erwachten die Ferkel wieder.

Am **2. Versuchstag** wurden alle Ferkel in Rückenlage auf einem mit Stroh belegten Tisch in der Fossa jugularis punktiert. Die Punktion wurde nach 10 Minuten durchgeführt, als die Probanden sich beruhigt hatten. Bei der Punktion zeigten die Ferkel A und C jedoch Zeichen eines Kreislaufkollapses. Die Ferkel A und C hatten Atembeschwerden und wiesen am ganzen Körper zyanotische Verfärbungen auf. Daraufhin wurde die Punktion bei diesen beiden Probanden abgebrochen und an diesem Tag auch bei keinem anderem Probanden mehr durchgeführt. Somit fehlten für den zweiten Tag die Untersuchungsergebnisse. Siehe Abb. 2 auf Seite 40 zur Planung und Umsetzung der Versuchsreihe. Damit die Ferkel sich an die Manipulation gewöhnten, wurden sie an diesem Tag 3 mal jeweils für ca. 5 min in Rückenlage auf den Tisch verbracht und ohne weitere Manipulationen oder Punktionen durchzuführen, fixiert.

Der **3. Versuchstag**. Jedes Ferkel wurde wieder einzeln in Rückenlage auf den Tisch verbracht und verweilte dort ca. 10 Minuten. Nachdem sie sich beruhigt hatten, wurde eine Blutprobe mittels Punktion mit Kabevette und Kanüle entnommen. Danach wurden die Ferkel noch für ca. 1 bis 2 Minuten so auf dem Tisch in Rückenlage fixiert, bis sie sich beruhigt hatten und kamen dann erst zu ihren Geschwistern zurück.

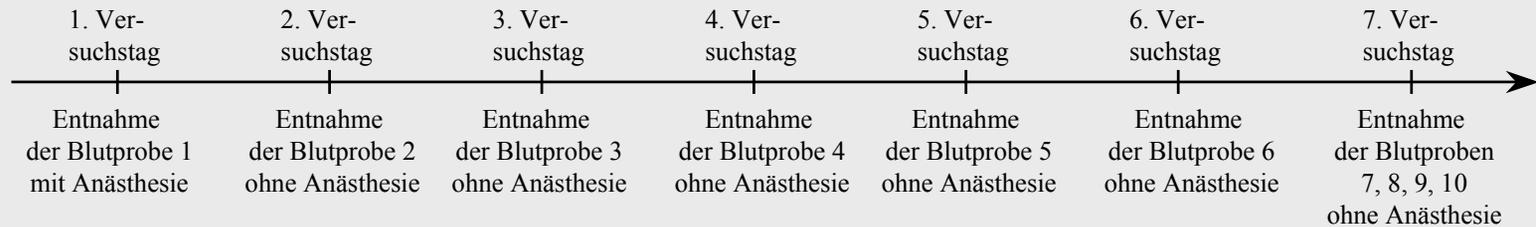
In der gleichen Art und Weise verliefen die **Versuchstage 4, 5 und 6**.

Der **7. Versuchstag** begann wie die vorangegangenen. Die Ferkel wurden einzeln aus der Bucht genommen, auf den Tisch verbracht und punktiert. Anschließend wurde die Kastration durchgeführt. Dazu hielt eine Hilfsperson die Ferkel kopfüber an den Hintergliedmaßen fest. Dann wurde nach vorheriger Reinigung und Desinfektion mit einem Skalpell das Scrotum und die Tunica vaginalis eröffnet und die Hoden einzeln mit einem kleinen E-maskulator nach Hausmann, Aesculap abgesetzt. Die Kastration wurde ohne Betäubung durchgeführt. Nach der Kastration wurden die Ferkel sofort wieder in Rückenlage auf dem Tisch fixiert und punktiert. In dieser Lage wurde nach weiteren 5 und 10 Minuten wiederum eine Blutprobe entnommen.

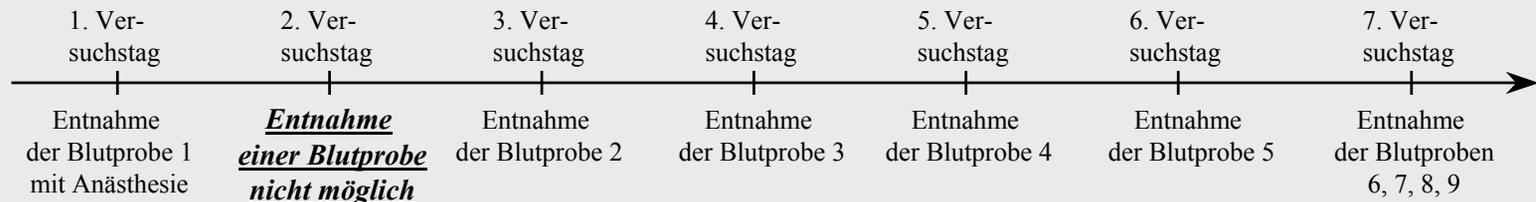
Nach Abschluß des Versuchsreihe waren 90 Blutproben zur Messung gewonnen worden.

Zur Probengewinnung erfolgte eine Punktion der Vena jugularis in der Fossa jugularis. Die Kanüle wurde nach Desinfektion der Haut mit angesetzter Spritze im Bereich der Drosselrinne, je nach Größe des Tieres 2-4 cm kranial und lateral des Manubrium sterni, in kaudodorsaler und leicht medialer Richtung eingestochen. Die Kanüle wurde unter Erzeugung eines Unterdruckes durch Zurückziehen des Kolbens langsam durch das Gewebe geführt, bis Blut aus dem Endteil der V. brachiocephalica oder dem Anfangsteil der V. jugularis externa in die Spritze einschöß (zur Methode vgl. Dietz / Henschel, 1988). Da keine Aussagen über die Verträglichkeit einer täglichen Punktion in der Vossa jugularis über einen Zeitraum von einer Woche vorlagen, erfolgte die Probenentnahme zunächst immer auf der rechten Seite.

Planung der Versuchsreihe



Praktische Umsetzung der Versuchsreihe



Planung und Umsetzung der Versuchsreihe am 7. Tag

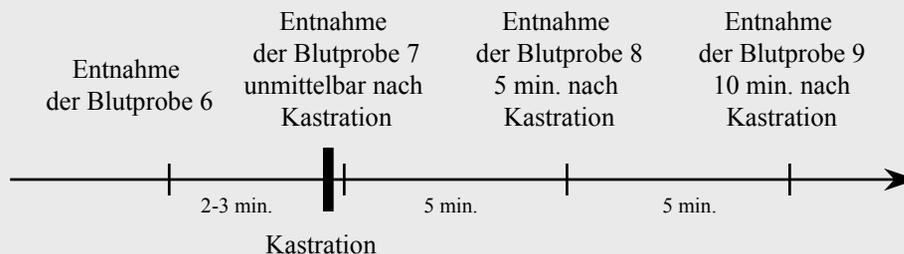


Abb. 2: Übersicht zur Planung und praktischen Umsetzung der Versuchsreihe
Quelle: Eigene Darstellung

Für die Probengewinnung wurden Einmalkanülen der Größe 0,9 x 40 mm (Fa. Braun Sterican) benutzt. Die Blutprobe wurde in einer direkt auf der Kanüle aufgesetzten Kabevette® (Fa. Kabe, Nümbrecht-Elsenroth) aufgefangen. Diese speziellen Kabevetten enthielten zur Stabilisierung der Blutprobe die Stabilisierungslösung EGTA und Glutathion.

Jede Blutprobe wurde sofort nach ihrer Gewinnung in eine Zentrifuge verbracht und dort 10 Minuten lang bei 4000 U/min zentrifugiert. Dies erfolgte noch in den bereits erwähnten Kabevetten. Jetzt wurde aus jeder zentrifugierten Blutprobe mittels Pipette 2 mal 1 ml Plasma entnommen und je in ein Reaktionsgefäß (Fa. Eppendorf, Hamburg) pipettiert. In jedes Eppendorfgefäß kamen noch 50 Mikroliter einer internen Standardlösung. Diese interne Standardlösung (3,4-Dihydroxybenzylamin, 12 pg/µl, d.h. die Konzentration des internen Standards in der Plasmaprobe betrug 600pg/ml) besitzt die gleichen Verfallseigenschaften wie die Catecholamine. Sie diente zu Vergleichsuntersuchungen der Catecholamine. Die Menge des internen Standards ist definiert. Bei der Probenmessung wurde auch der interne Standard gemessen und so läßt sich der prozentuale Verlust dieser Standardlösung ermitteln. Die gleichen prozentualen Verluste gibt es bei den Catecholaminen. So ist die Originalkonzentration der Catecholamine in der Probe ausrechenbar. Anschließend wurde jede Plasmaprobe sofort in einem Tiefkühlschrank eingefroren, bis sie nach Abschluß der Versuchsreihe in einer Kühltasche zur weiteren Bearbeitung ins Institut für Physiologie der Freien Universität zu Berlin gebracht wurden.

3.2.3 Probenaufarbeitung

Die Probenaufbereitung wurde in Berlin im Institut für Physiologie durchgeführt. Mittels Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC - High performance liquid chromatography) mit elektrochemischer Detektion wurde der Catecholamingehalt in den EGTA-Plasmaproben bestimmt.

Bei der weiteren Probenaufarbeitung sind die Catecholamine durch eine selektive Adsorption an Aluminiumoxid (Probenvorbereitungskartusche; Fa. Chromsystems, Martensried) isoliert worden. Bis zur Messung mittels HPLC's wurden die Proben bei

- 20 °C tiefgefroren. Mit der Hochdruckflüssigkeitschromatographie erfolgte die Auftrennung in Dopamin, Adrenalin und Noradrenalin. Durch die elektrochemische Detektion wurde die Quantität der Catecholamine bestimmt. Folgende Geräte wurden für die Hochdruckflüssigkeitschromatographie benötigt: eine Hochdruckpumpe (HPLC- Pumpe 64; Fa. Knauer, Berlin), ein elektrisches Injektionsventil (Schleifeninjektor; Fa. Knauer, Berlin), ein elektrochemischer Detektor (Fa. Metrohm, Schweiz) und ein Integrator (HP 3396 A; Fa. Hewlett Packard, Waldbronn).

Die stationäre und die mobile Phase für die Hochdruckflüssigkeitschromatographie stammen aus einem „Kit zur HPLC-Analyse der Catecholamine im Plasma“ (Fa. Chromsystems, Martinsried). Die Fließgeschwindigkeit beträgt bei Messung 1 ml/min. Für die elektrochemische Detektion wurde eine Glassy-Carbon-Arbeits Elektrode verwendet, die mit einer Polarisierungsspannung von +460 mV und einem Strommeßbereich von 0,5 nA arbeitete.

Bei der Bestimmung wurden jeweils 20 µl über die Probenschleife in die Meßapparatur injiziert. Die Messung der Catecholamine erfolgte bei Raumtemperatur. Für die Eichung und zur Kontrolle wurden Standard-Catecholaminlösungen (Fa. Sigma, Deisenhofen) gemessen.

Durch verschiedene Retentionszeiten war es möglich die einzelnen Catecholamine zu identifizieren und damit die im Chromatogramm sichtbaren Peaks zuzuordnen. Die Nachweisgrenze der einzelnen Catecholamine lag zwischen 10 und 1000 pg/ml. Wenn die Catecholaminkonzentration den Meßbereich überschritt, wurden Verdünnungen angefertigt und erneut gemessen.

Bei der Messung mittels HPLC fiel auf, dass der in die Eppendorfgläser hinzugefügte interne Standard zu unregelmäßigen Meßergebnissen führte. Das bedeutete, der gewählte interne Standard war für die Ergebnisgewinnung unbrauchbar. Um die Proben dennoch auswerten zu können, wurde für die Messung ein anderer interner Standard benutzt.