



# GRUNDLAGEN DER EXPERIMENTELLEN ARZNEIMITTELFORSCHUNG

VON

DR. MED. LEOPOLD THER

apl. Professor der Pharmakologie und Toxikologie  
an der Johann-Wolfgang-Goethe-Universität  
in Frankfurt/Main



Mit 158 Abbildungen



WVVG

WISSENSCHAFTLICHE VERLAGSGESELLSCHAFT M.B.H.  
STUTT GART

1965

Die Wiedergabe von Gebrauchsnamen, Handelsnamen, Warenbezeichnungen usw. in diesem Buch berechtigt auch ohne besondere Kennzeichnung nicht zu der Annahme, daß solche Namen im Sinne der Warenzeichen- und Warenschutzgesetzgebung als frei zu betrachten wären und daher von jedermann benutzt werden dürfen.

702

DR. MED. LEOPOLD TIEMER

apl. Professor der Pharmakologie und Toxikologie  
an der Johann-Wolfgang-Friedrich-Universität  
in Halle/Saale



Mit 128 Abbildungen



Alle Rechte, auch die des auszugsweisen Nachdrucks, der photomechanischen Wiedergabe (durch Fotokopie, Mikrofilm oder irgendein anderes Verfahren) und der Übersetzung vorbehalten.

© 1965 Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft m.b.H., Stuttgart.

Printed in Germany

Satz und Druck: Graphische Betriebe W. Büxenstein GmbH., Berlin

## Vorwort

In den letzten Jahren habe ich wiederholt mit Pharmakologen des In- und Auslandes darüber diskutiert, in welcher Weise man beim heutigen Stand der Wissenschaft die in der experimentellen Pharmakologie gebräuchlichen und bewährten Methoden darstellen könnte. Die meisten meiner Kollegen vertraten entschieden die Meinung, daß dies nur in Form eines sog. Vielmännerbuches möglich sei, in welchem die einzelnen Kapitel von Spezialisten abgehandelt werden müßten. Auch mir schien diese Ansicht zunächst als durchaus richtig; denn die stürmische Expansion der medizinisch-naturwissenschaftlichen Forschung in den letzten Jahrzehnten brachte eine solche Fülle von Befunden, daß der einzelne kaum noch die Entwicklung eines einzigen Faches zu übersehen vermag. In der Pharmakologie ist dies um so mehr verständlich, weil ihre Arbeitsgebiete von der Botanik, der physikalischen Chemie und Biochemie über die Physiologie und Pathologie hinaus bis zu den klinischen Fächern reichen. Vor einer Generation konnte der angehende Pharmakologe sich als „Vorlesungsassistent“ das nötige Wissen und die dazugehörige experimentelle Technik erwerben. Da heute an Stelle des Vorlesungsexperimentes der Film getreten ist und das Praktikum in der Pharmakologie nicht überall so vielgestaltig durchgeführt wird, wie es notwendig wäre, fehlt vielen jungen Pharmakologen die Möglichkeit, sich auf breiter Basis auszubilden. Schon frühzeitig bearbeiten sie daher ein Spezialgebiet, meist auch mit Erfolg, weil die Anwendung der ganzen Kraft eines Forschers auf ein bestimmtes Problem zu einer Verfeinerung der experimentellen Methoden führt, die es ermöglicht, immer schärfere und eindeutige Fragestellungen zu beantworten. Es ist aber bekannt, daß gerade der „Spezialist“ meist nur seine eigene, von ihm entwickelte Methode kennt und durch die Einengung des Gesichtskreises auf ein hochspezialisiertes, aber nur kleines Arbeitsgebiet dieses zwar vorantreibt, durch die Absonderung von den übrigen Gebieten der Forschung den Fortschritt der Heilmittellehre kaum fördert.

Schon früh trennte sich die experimentelle Pharmakologie von der Klinik. Später folgte die Loslösung der experimentellen Chemotherapie und der Endokrinologie von der Pharmakologie. Darüber hinaus werden in unseren Tagen die Psychopharmakologie, die Arzneimitteltoxikologie und die therapeutische Biochemie als Sondergebiete herausgestellt. Von niemandem wird der Wert dieser Spezialisierung geleugnet, wenn nur der verbindende Gedanke stets dabei erhalten bliebe, daß es die alleinige Aufgabe der Pharmakologie ist, Heilmittel für kranke Menschen zu entwickeln und die Wirkungsweise der Pharmaka zu analysieren. Diese sich immer mehr anbahnende Spaltung der Pharmakologie in Sondergebiete muß aber schließlich dazu führen, die Be-

deutung unseres Faches herabzusetzen, und es ist die Pflicht der älteren und erfahreneren Generation, immer wieder das oft verkannte Gemeinsame der Teilgebiete herauszustellen und zu einem Ganzen zu verbinden. Das gilt vor allem für die Methodik. Die Pharmakologen wie alle anderen Wissenschaftler sind Individualisten und nach LEHMAN (Seite 374) meist nicht gewillt, eine bereits vorhandene Methode zu kopieren. Ich glaube aber, daß es weniger an dem fehlenden guten Willen liegt, sondern daran, daß vielen die Literatur nicht zugänglich und damit auch nicht bekannt ist, vor allem dann, wenn sie aus anderen Disziplinen kommen.

Als ich vor rund fünfundzwanzig Jahren mit der Bearbeitung meines Buches „Pharmakologische Methoden“ begann, habe ich versucht, eine Lücke in der deutschen Literatur der Arzneimittelwissenschaften zu schließen. Von zahlreichen Kollegen sind mir seither ermutigende Aufforderungen zugegangen, die mich veranlaßten, die zweite Auflage zu bearbeiten. Von der 1948 erschienenen Einführung in die pharmakologische Technik ist nur wenig übriggeblieben; es war sogar notwendig, den Titel der Neuauflage zu ändern sowie die „Grundlagen“ als ersten Band vorzuschicken, damit das Format eines handlichen Laborbuches beibehalten bleibt. Die erste Schwierigkeit trat bereits bei der Einteilung des vorhandenen Materials auf. Da sich zahlreiche Gebiete überschneiden, bleibt immer etwas Eigenwilligkeit dabei, das eine oder andere Verfahren diesem oder jenem Kapitel zuzuordnen. Auch war es mir nicht immer möglich, alle zu einer bestimmten Fragestellung gehörenden Arbeiten\*) aufzunehmen, sollte der Rahmen des Buches nicht wesentlich überschritten werden. Die wichtigste Aufgabe habe ich darin gesehen, die in der Literatur weit verbreiteten Publikationen kritisch zu ordnen und so darzustellen, daß jedem, der auf dem verzweigten Gebiet der Arzneimittelforschung arbeitet, gezeigt wird, was auf methodischem Gebiet bereits geleistet wurde; es soll vor allem verhindert werden, daß in mühevoller Arbeit „neue“ Methoden entwickelt (und auch publiziert) werden, die bereits bekannt sind.

Die Frage, ob überhaupt oder in welchem Ausmaße *mathematische Methoden* auch hier behandelt werden sollen, hat mich lange beschäftigt. Die große Zahl hervorragender Werke über medizinische Statistik sprach zuerst dagegen. Ich konnte mich aber bald davon überzeugen, daß es den meisten Anfängern schwerfällt, aus der mathematisch-statistischen Literatur die für die Pharmakologie geeigneten Methoden herauszufinden und diese sinnvoll anzuwenden. Wenn auch heute nicht mehr die Anschauung vertreten wird, daß eine statistische Bearbeitung der Versuchsergebnisse überflüssig ist, so glaubt doch ein Großteil, daß sich diese schwierige Arbeit nicht lohne, weil ja an Universitäten, vor allem aber in der Industrie, Institute für Statistik gegründet worden sind, die dem Forscher bei der Planung und Auswertung seiner Ver-

\*) Im Text wurde nur der erste Autor der Publikation genannt; die Mitarbeiter müssen sich mit der Bemerkung . . . et al. begnügen. Wenn außer dem zitierten Autor und seinen Mitarbeitern noch andere Forscher das gleiche Gebiet bearbeitet haben, dann wurde dies im Text mit der Abkürzung . . . u. and. vermerkt. Diese Abkürzung fordert den Leser auf, in der Bibliographie nach den anderen Arbeiten zu suchen.

suche helfen. Da außerdem die kompliziertesten Formeln heute programmiert sind und eine moderne Rechenmaschine alle Fragen in wenigen Sekunden beantwortet, die früher einige Mathematiker wochenlang beschäftigt hatten, scheinen einfache mathematische Verfahren, wie sie im Laboratorium bisher gebraucht wurden, als unzureichend.

Ich vertrete die Anschauung, daß es sich dennoch lohnt, die Kenntnis einfacher Verfahren zu erwerben und diese anzuwenden. Wenn auch die Computer das Programm in wenigen Sekunden bewältigen, so muß der Pharmakologe doch oft Tage und Wochen warten, bis er das Resultat erhält, weil Administrationsarbeiten eine raschere Information verhindern. Der Forscher, der häufig brennend an der Beurteilung eines Befundes interessiert ist, muß sich also gedulden, falls er sich nicht selbst ein Urteil bilden kann. Es lohnt sich auch deshalb, den mathematischen Teil nicht zu überschlagen, weil hier die Möglichkeit gegeben wird, das Grundwissen zu erwerben, um mit dem Mathematiker ein Gespräch zu führen. Bei aller Hilfsbereitschaft kann der Mathematiker nicht in jedem Falle dem Anfänger ein Privatkolleg über Biometrik halten. Außerdem wird der Pharmakologe, wenn er die Grundbegriffe nicht beherrscht, die Aussage der Statistik falsch verwerten. Es bedarf auch eines gewissen mathematischen Grundwissens, um an den Biometriker klare Fragen, die sich aus einer Versuchsanordnung ergeben, zu stellen.

Zu meiner Freude habe ich entdeckt, daß bereits Goethe (S. 18) auf Schwierigkeiten im Umgang mit mathematisch Kundigen gestoßen ist, und ich bin daher Herrn Dr. J. KÖRNLEIN für seine Mitarbeit besonders dankbar, denn er hat die Sprache gefunden, auch den mathematisch Unkundigen in die Grundbegriffe der Biometrik einzuführen. Die Nomenklatur wurde an die englischen Bezeichnungen angelehnt, was notwendig erschien, weil ein Großteil der pharmakologischen Fachliteratur heute in englischer Sprache erscheint und hier der Anschluß erleichtert werden soll. Da die Arbeiten verschiedener biometrischer Schulen aufgenommen wurden, war es nicht möglich, die Nomenklatur durch das ganze Kapitel einheitlich zu gestalten; im Endeffekt hätte das die Schaffung einer weiteren Nomenklatur bedeutet.

Die Bibliographie gibt dem Fortgeschrittenen eine Auswahl von Arbeiten aus dem Gebiet der quantitativen Pharmakologie. Man wird hier in der einen oder anderen Arbeit Wege und Hinweise finden, die im Text fehlen. Der Anfänger sollte aber mit den hier vorliegenden Beispielen beginnen. Es wurden einfache Beispiele mit Ergebnissen gewählt, wie sie täglich im pharmakologischen Laboratorium gefunden werden, um den Leser zu ermutigen, zu Bleistift und Papier zu greifen und die Formeln nachzurechnen. Dabei wird sich ihm immer wieder die Frage stellen, ob die hier abgehandelten Tests genügen. Schon beim Studium der Literatur über Planung von Versuchen ist mir aufgefallen, daß die Vorschläge zwar alle Möglichkeiten erschöpfen, aber dabei häufig der Satz zu finden ist: „Wie Vorversuche ergeben haben . . .“. Der Pharmakologe, der neue chemische Wirkstoffe untersucht oder sich über die Bedeutung einer Beobachtung informieren will, befindet sich aber gerade

im Stadium dieser Vorversuche. Für dieses Stadium reichen die hier beschriebenen Verfahren aus, und der mathematisch begabte Pharmakologe wird darüber hinaus weitere Wege zur Behandlung der Ergebnisse finden. Dem Spezialisten, dem Pharmakometriker, sei gesagt, daß Mathematik in der Pharmakologie nicht zum Selbstzweck werden soll.

Auch die *Versuchstierkunde* ist in letzter Zeit von verschiedenen Seiten grundsätzlich behandelt worden. Die Forderung an die Züchter, von spezifischen Krankheitserregern freie Tiere für die Versuche zu liefern, hat in der Pharmakologie und Toxikologie schon deshalb größte Beachtung gefunden, weil ja die Arzneimittelapplikation eine mehr oder weniger große Belastung bedeutet, und in einem Zustand der Resistenzverminderung auch solche Keime, die für das normale Tier nicht pathogen sind, zum Krankheitserreger werden können. Mit solchen Tieren hofft man, Zwischenfälle durch latente Infektionen und krankheitsbedingte Ausfälle bei Langzeitversuchen zu vermeiden. Über die Zucht von Versuchstieren wird hier nicht ausführlich berichtet. In der Bibliographie sind jedoch zahlreiche Hinweise auf Probleme der Aufzucht von Versuchstieren auch unter keimfreien Bedingungen gegeben.

Dem Versuchstier als dem Patienten des Pharmakologen gebührt im pharmakologischen Laboratorium der erste Platz. Leider findet man in vielen Instituten noch immer eine räumliche Trennung von Laboratorium und Stall, weil Geruchs- und Lärmbelästigung manche Pharmakologen stören. Es ist m. E. aber falsch, die Versuchstiere in abgelegenen, wenig besuchten Räumlichkeiten unterzubringen, denn Untersucher und Versuchstier sollen eine Gemeinschaft bilden. Man muß daran denken, daß auch kleine Warmblüter in vieler Hinsicht ähnlich wie der Mensch reagieren können und daß auch für das Arbeiten am kleinen Versuchstier Qualifikationen erforderlich sind, wie sie ganz allgemein für Untersuchungen an größeren Tieren und schließlich auch am Menschen benötigt werden. Das Experiment in der Pharmakologie verlangt Versuchstiere, bei denen nicht nur Alter, Geschlecht und Gewicht, sondern auch Abstammung, Erbanlagen, Zuchtart sowie Gesundheitszustand, aber auch Futter und Fütterung definiert sind. Auch hier hat die Spezialisierung Triumphe gefeiert, und man muß den Anfänger ebenso davor warnen, mit unqualifiziertem Tiermaterial zu arbeiten, wie davor, aus Ergebnissen mit speziellen Stämmen allzu weitreichende Schlußfolgerungen zu ziehen. Auf ein Paradoxon soll hier noch hingewiesen werden: In manchen Dingen wissen wir noch immer über die Lebensvorgänge bei Tieren mehr als über die des Menschen, so daß der Stagirit, der auf Seite 113 zitiert wurde, bis heute recht behalten hat.

Im dritten Abschnitt des Buches wurden die *Eingriffe am Versuchstier* behandelt, welche bei der Untersuchung von Arzneimitteln immer wieder durchgeführt werden und die die Grundlage für Applikationstechnik, Blutentnahme, künstliche Respiration und Narkose und schließlich für die Operationstechnik bilden. Bei allen Operationen gebührt dem Tier eine humane Behandlung. Ein Pharmakologe muß sich daher um seine operierten Tiere selbst kümmern

und darf die Pflege nicht ungeschultem Personal überlassen. Leider fehlt vielen Anfängern die notwendige Erfahrung im Umgang mit Tieren; diese läßt sich nicht aus einem Buch erlernen, sondern nur durch langjährige Praxis im Laboratorium erwerben. Die Tiere gleichen vielfach den Kindern. Sie leiden mehr unter der Angst vor dem Experimentator als unter Eingriffen, wie intravenöse Applikation oder Narkose, selbst. Die Intelligenz des Tieres soll dabei niemals unterschätzt werden. Den höheren Tieren fehlt auch nie ein feines Empfinden für Gutes und Schlechtes; Neid und Eifersucht können besonders bei Affen und Hunden beobachtet werden, wenn man das eine oder andere Tier bevorzugt.

Seit den Untersuchungen von R. MAGNUS stellt auch im pharmakologischen Laboratorium das *überlebende Organ* ein vielfach gebrauchtes Objekt dar, um seine Dynamik oder Stoffwechsel-Vorgänge zu analysieren. Die *Perfusions- und Suspensionstechnik* wurde deshalb als Sonderkapitel herausgehoben, weil sie bei unterschiedlichen Fragestellungen immer wieder vorkommt und die Verfahren dort nicht jedesmal von neuem abgehandelt werden können. Wenn hier und im Abschnitt der *Meß- und Registriertechnik* Apparate erwähnt werden, die vor mehr als einem Menschenalter konstruiert worden sind und heute z. T. durch moderne Verfahren ersetzt werden können, so geschah dies aus verschiedenen Gründen: Diese Apparate sind meist einfach und dabei auch schnell zu beschaffen. Viele Forscher verfügen auch nicht über Geldmittel, welche die Anschaffung von Hochleistungsgeräten erfordert, oder die Lieferung benötigt eine solche Zeitspanne, innerhalb welcher das Interesse für die Bearbeitung eines Problems erlischt. In den klassischen Arbeiten sind aber auch die Theorien des Meßvorganges häufig mit einer solchen mathematischen Gründlichkeit abgehandelt, wie sie die moderne Literatur kaum noch kennt. Und gerade hier besteht die Gefahr, daß junge Forscher „moderne“ Probleme aufgreifen und bearbeiten, die bereits mustergültig vor Jahrzehnten abgehandelt wurden. Man denke nur an die Arbeiten von O. FRANK über die Theorie des Manometers u. a. Aus Verehrung für diese Forschergeneration und ihre Leistung wurden auch einige Original-Abbildungen übernommen, und es steht jedem Forscher frei, „antiquierte Verfahren“ zu modifizieren. Auch hier besteht für den Anfänger die große Gefahr, daß er aus Liebhaberei sich dem elektronischen Apparatewesen in einem großen Maße verschreibt und andere Aufgaben darüber vergißt. Eine neue Methode oder ein neues Gerät ist für die Pharmakologie aber nur dann auch wertvoll, wenn die Güte der Messung oder wenigstens die Handhabung wesentlich verbessert und dadurch neue Informationen über ein pharmakologisches Phänomen erhalten werden.

An dieser Stelle danke ich Herrn H. RIESBECK und Herrn Dr. DAL RI für ihren Rat bei der Kurzfassung der elektronischen Registriertechnik und Herrn Dr. G. HÄRTFELDER für die Einführung in das Sondergebiet „Messung elektrischer Potentiale“.

Bei der Abfassung des Kapitels „*Stoffwechsel und Arzneimittel*“ gestaltete sich wiederum die Auswahl der Materie äußerst schwierig. Das Gewicht konnte hier auf das Tierexperiment gelegt werden, weil in den zahlreichen Hand-

büchern der biochemischen Methodik alle präparativen und analytischen Verfahren ausführlich beschrieben sind. Da die Erscheinungen des Lebens, auch die Arzneimittelwirkung, im Stoffwechsel wurzeln, stand die biochemische Betrachtungsweise des Wirkungsmechanismus der Arzneimittel seit jeher im Vordergrund des Interesses. Wenn heute auch wieder viele Pharmakologen — fasziniert von den neuesten Ergebnissen der präparativen und analytischen Methoden der Biochemie — die res ultima der Arzneimittelwirkung in einer Enzym- oder Membranwirkung suchen, so ist diese Forschungsrichtung durchaus zu fördern, da ja der Wirkungsmechanismus selbst von Digitalis und Insulin noch nicht geklärt ist und die von Klinik und Pharmakologie neu entwickelten Wirkstoffe zusätzlich Fragen der Stoffwechselwirkung aufwerfen.

Wenn sich heute ein neues Fach als „biochemische Pharmakologie“ abzugrenzen beginnt, dann mag dies nur vom Standpunkt der Biochemie berechtigt sein, um das Interessen- und Arbeitsgebiet eines geschulten Biochemikers, der sich mit Fragen der Arzneimittelwirkung beschäftigt, zu kennzeichnen. Von einem Pharmakologen verlangt man aber, daß er nicht nur auf biochemischen Spezialgebieten bewandert ist, sondern, daß er gelernt hat, zu allen Problemen der Arzneimittelwirkung und Nebenwirkung aus eigener Erfahrung heraus Stellung zu nehmen.

In letzter Zeit ist der Tierversuch als Mittel zur Beurteilung von Nebenwirkungen von Arzneimitteln kritisiert worden, weil noch nicht alle akuten und chronischen, vor allem nicht die allergisch bedingten Schäden damit erfaßt werden. Es gibt aber noch keine anderen Methoden, und nur der Tierversuch unter der Leitung des erfahrenen Pharmakologen erlaubt es dem Arzt überhaupt, ein unbekanntes Präparat in die klinische Pharmakologie einzuführen. Die Abhandlung über die *toxikologische Untersuchung neuer Arzneimittel* soll vor allem zeigen, welche umfangreichen Untersuchungen bereits vor der zur Zeit viel diskutierten Thalidomid-Affäre durchgeführt wurden, um die schädlichen Nebenwirkungen neuer Arzneimittel auszuschließen. Wenn heute zahlreiche Länder „Richtlinien“ empfehlen, dann lehnen sich diese im wesentlichen an die „Appraisals of the Safety of Chemicals in Foods, Drugs and Cosmetics“ an, die von der Food and Drug Administration ausgearbeitet wurden; auch in der vorliegenden Übersicht werden diese zur Diskussion gestellt. Daß bei der Beurteilung von Organschäden durch Arzneimittel die Pathologie ein entscheidendes Wort mitzusprechen hat, habe ich besonders hervorgehoben, weil nur ein experimentell erfahrener Humanpathologe viele der schwierig zu deutenden Befunde des Tierexperimentes auf menschliche Verhältnisse übertragen kann. Der Wert eines Arzneimittels wird häufig durch Effekte beeinflusst, die erst dann aufgedeckt werden, wenn das neue Mittel unter diversen pharmakologischen Gesichtspunkten, auch unter denen des Stoffwechsels und der Toxizität, studiert wird. Zum Vergleich muß immer das zur Zeit beste Präparat der Klinik dienen. Alle Einzelwirkungen müssen vom Pharmakologen herausgestellt, gegeneinander

abgegrenzt und abgewogen werden, bevor das Urteil über einen neuen Stoff gefällt wird. Der klinische Prüfer erhält alle Unterlagen der pharmakologischen Untersuchung, die Stellungnahme des Pharmakologen und eine daraus für den Menschen theoretisch errechnete Dosis des neuen Präparates, von welcher erwartet wird, daß sie eine therapeutische Wirkung ohne das Risiko einer schädigenden Nebenwirkung entfaltet. Nur der Pharmakologe kann die Verantwortung für den ersten Schritt tragen, mit welchem der klinische Prüfer seine Arbeit zur Untersuchung der Wirkung und Verträglichkeit des neuen Stoffes am Menschen aufnimmt.

Am Ende dieses Vorworts muß ich meinem Verleger, Herrn Professor Dr. R. SCHMIEDEL, und meinem langjährigen Mitarbeiter, Herrn Dr. G. VOGEL, meinen herzlichsten Dank aussprechen; Herrn Professor SCHMIEDEL, weil er mich durch ständige Ermahnungen und schließlich unter Drohung der Aufkündigung unserer alten Freundschaft dazu bewogen hat, daß ich die Neubearbeitung überhaupt in Angriff genommen habe, Herrn Dr. VOGEL, weil er mich mit Rat und Tat bei der Abfassung dieses Buches unterstützte und unermüdliche Hilfe beim Lesen des Manuskriptes sowie der Korrekturen leistete. Ebenso danke ich allen Kollegen, die mich bei einzelnen Fragestellungen beraten und einzelne Kapitel des Buches kritisch durchgesehen haben. Nur durch diese Zusammenarbeit wird es mir möglich sein, in einem folgenden Teil, den speziellen Methoden zur Auswertung der Pharmaka, ein abgerundetes Bild der experimentell bedingten Probleme der Pharmakologie zu geben. Die experimentelle Pharmakologie ist weder als angewandte Physiologie anzusehen, noch darf sie als angewandte Biochemie aufgefaßt werden. Auf Grund ihrer besonderen Fragestellung, die nur auf das Pharmakon zielt, ist sie eine in sich geschlossene Wissenschaft, zu der Elemente aus allen Gebieten der Medizin und Naturwissenschaft beigetragen werden müssen.

Kelkheim/Münster, im Juli 1964

LEOPOLD THER

# Inhaltsverzeichnis

A. Planen und Auswerten von pharmakologischen Versuchen . . . . .	1
I. Grundsätze für das Planen von Versuchen . . . . .	4
<i>Bibliographie</i> . . . . .	14
II. Die wichtigsten mathematischen Methoden zur Auswertung von pharmakologischen Versuchsergebnissen . . . . .	18
1. Stichprobe und Gesamtheit . . . . .	20
2. Kenngrößen der Statistik . . . . .	22
a) Arithmetischer Mittelwert . . . . .	22
b) Varianz und Standardabweichung . . . . .	23
c) Geometrischer Mittelwert . . . . .	25
3. Normalverteilung . . . . .	27
a) Zweiseitige Fragestellung . . . . .	32
b) Einseitige Fragestellung (F-Test) . . . . .	32
c) Grenzwerthypothese . . . . .	34
d) Normalverteilung als Summenkurve . . . . .	35
4. Lognormale Verteilung . . . . .	37
5. BERNOULLI-Verteilung (Binomialverteilung) . . . . .	37
6. t-Test nach STUDENT . . . . .	39
a) Mittelwertsvergleich im t-Test; einseitige Fragestellung . . . . .	40
b) Mittelwertsvergleich im t-Test; einseitige Fragestellung; Vergleich zweier Verfahren an ein und demselben Tier . . . . .	43
7. Chi-Quadrat-Methode . . . . .	44
8. Varianzanalyse . . . . .	46
a) Berechnung der Freiheitsgrade und des Gesamtmittels . . . . .	49
b) Berechnung der Quadratsummen und der Durchschnittsquadrate durch Differenzbildung . . . . .	50
c) Prüfung der Durchschnittsquadrate im F-Test . . . . .	52
d) Prüfung der Mittelwerte im t-Test . . . . .	52
e) Berechnung der Quadratsummen durch Differenzbildung mittels eines vorläufigen Durchschnittes . . . . .	53
f) Doppelte und mehrfache Varianzanalyse . . . . .	55
9. Regression und Korrelation . . . . .	55
a) Regressionsgerade und Regressionskoeffizient . . . . .	56
b) Gültigkeitskriterien der Regressionsgeraden . . . . .	59
c) Bestimmtheitsmaß und Korrelationskoeffizient . . . . .	64
10. Rangsummentest . . . . .	66
11. Sequenzanalyse . . . . .	68
<i>Bibliographie</i> . . . . .	70
III. Bestimmung pharmakologischer Kenngrößen . . . . .	74
1. Aktivitätsbestimmung ohne graphische Darstellung . . . . .	77
a) Methode von G. KÄRBER zur Bestimmung des $aM$ -Wertes . . . . .	77
b) Bestimmung des Zentralwertes nach B. BEHRENS . . . . .	77

2. Aktivitätsbestimmung mit Hilfe graphischer Darstellung nach I. W. TREVAN . . . . .	79
3. Bestimmung der LD <sub>50</sub> und ED <sub>50</sub> nach J. T. LITCHFIELD und F. WILCOXON . . . . .	82
a) Tabellierung der Ergebnisse . . . . .	82
b) Graphische Darstellung . . . . .	83
c) Prüfung der Linearität im Chi-Quadrat-Test . . . . .	84
d) Bestimmung der LD <sub>50</sub> bzw. der ED <sub>50</sub> . . . . .	86
e) Berechnung der Neigungsfunktion S . . . . .	86
f) Berechnung der Vertrauensgrenzen (Chi-Quadrat gehalten) . . . . .	87
g) Berechnung der Vertrauensgrenzen (Chi-Quadrat nicht gehalten) . . . . .	89
h) Tabellierung des Rechenganges . . . . .	90
4. Aktivitätsbestimmung durch Vergleich zweier Dosis-Wirkungsgeraden nach J. T. LITCHFIELD und F. WILCOXON . . . . .	91
5. Aktivitätsbestimmung im 4-Punkte-Test nach H. O. SCHILD . . . . .	95
6. Methode von J. H. GADDUM . . . . .	99
a) Bestimmung mit gezählter Wirkung (Vereinfachtes Probit-Verfahren) . . . . .	99
b) Bestimmung mit gemessener Wirkung . . . . .	106
<i>Bibliographie</i> . . . . .	110
<b>B. Versuchstiere im pharmakologischen Laboratorium</b> . . . . .	113
1. Tierschutzgesetz . . . . .	114
2. Auswahl der Versuchstiere . . . . .	116
3. Tier-Laboratorium . . . . .	119
4. Haltung der wichtigsten Versuchstiere . . . . .	121
a) Affen . . . . .	124
b) Hunde . . . . .	125
c) Katzen . . . . .	127
d) Kaninchen . . . . .	129
e) Meerschweinchen . . . . .	130
f) Ratten . . . . .	131
g) Baumwollratten . . . . .	134
h) Mäuse . . . . .	135
i) Goldhamster . . . . .	136
k) Frösche . . . . .	136
<i>Bibliographie</i> . . . . .	138
<b>C. Eingriffe am Versuchstier</b> . . . . .	153
<i>Bibliographie</i> . . . . .	158
<b>I. Applikationstechnik</b> . . . . .	161
1. Injektionstechnik . . . . .	164
a) Intravasale Injektionstechnik . . . . .	166
b) Subcutane, intramuskuläre und intraperitoneale Applikation u. a. . . . .	172
c) Intracerebrale (intraventrikuläre) und andere Injektionsformen . . . . .	174
2. Orale Applikationstechnik, Sondenfütterung . . . . .	178
3. Applikation von Gasen, Dämpfen und staubförmigen Stoffen . . . . .	183
4. Percutane und andere Applikationsformen . . . . .	187
<i>Bibliographie</i> . . . . .	188

II. Blutentnahme . . . . .	197
1. Venenpunktion . . . . .	197
a) Blutentnahme aus Schwanzvene . . . . .	197
b) Blutentnahme aus Zungenvene . . . . .	198
c) Blutentnahme aus retroorbitalem Venenplexus . . . . .	198
d) Blutentnahme aus Ohrvene . . . . .	200
e) Blutentnahme aus Vena jugularis . . . . .	202
f) Blutentnahme aus Extremitätenvenen (Flügelvene) . . . . .	203
g) Blutentnahme aus Vena portae . . . . .	203
h) Blutentnahme aus Nierenvene u. a. . . . .	204
2. Herzpunktion . . . . .	204
3. Entblutung . . . . .	206
<i>Bibliographie</i> . . . . .	206
III. Narkosetechnik . . . . .	209
1. Inhalationsnarkose . . . . .	209
a) Narkosemasken für Versuchstiere . . . . .	210
b) Intubationstechnik . . . . .	211
c) Tracheotomie . . . . .	212
d) Narkosesysteme . . . . .	214
2. Injektionsnarkose . . . . .	216
3. Narkose der Versuchstiere . . . . .	216
a) Hund . . . . .	217
b) Katze . . . . .	218
c) Kaninchen . . . . .	220
d) Meerschweinchen . . . . .	220
e) Ratten und Mäuse . . . . .	221
f) Vögel und Frösche . . . . .	222
<i>Bibliographie</i> . . . . .	222
IV. Künstliche Respiration . . . . .	227
<i>Bibliographie</i> . . . . .	233
D. Suspensions- und Perfusionstechnik überlebender Organe . . . . .	236
I. Nährlösungen für überlebende Organe; Oxygenatoren . . . . .	237
II. Suspensionstechnik . . . . .	240
III. Perfusionsmethoden . . . . .	249
<i>Bibliographie</i> . . . . .	257
E. Meß- und Registriertechnik im pharmakologischen Laboratorium . . . . .	262
I. Mechanische Registrierung . . . . .	265
1. Schreibhebel . . . . .	265
2. Plethysmographie und volumregistrierende Instrumente . . . . .	267
3. Druckregistrierende Apparate . . . . .	270
4. Stative . . . . .	277
5. Kymographion . . . . .	278
6. Reiz- und Zeitmarkierung am Rußkymographion . . . . .	281
7. Impulsfolge-Frequenzschreiber (Totalisatoren) und Zeitordinatenschreiber . . . . .	282
a) Totalisatoren . . . . .	282
b) Zeitordinatenschreiber . . . . .	284

II. Optische Registriertechnik . . . . .	284
III. Grundlagen der elektronischen Meß- und Registriertechnik . . . . .	286
1. Wandler . . . . .	287
a) Widerstandswandler . . . . .	289
b) Kristallwandler . . . . .	289
c) Kapazitive Wandler . . . . .	289
d) Induktive Wandler . . . . .	290
e) Thermoelemente . . . . .	290
f) Photoelektrische Wandler . . . . .	291
2. Verstärker . . . . .	291
3. Registriergeräte . . . . .	291
4. Elektronische Reizgeräte . . . . .	294
<i>Bibliographie</i> . . . . .	294
IV. Durchströmungsmessung . . . . .	303
1. Messung am geöffneten Gefäß . . . . .	304
2. Unblutige Messungen der Strömungsgeschwindigkeit . . . . .	312
<i>Bibliographie</i> . . . . .	316
V. Messung elektrischer Potentiale . . . . .	324
1. Mikroelektrodenteknik . . . . .	325
2. Makroelektrodenteknik . . . . .	330
<i>Bibliographie</i> . . . . .	333
F. Richtlinien zur Untersuchung der Stoffwechselwirkung von Arzneimitteln . . . . .	335
I. Methoden zur Harn- und Kotgewinnung (Stoffwechselkäfige) . . . . .	337
1. Harngewinnung . . . . .	339
2. Kotgewinnung . . . . .	341
II. Umsatzbestimmungen mit calorimetrischen und respirometrischen Methoden . . . . .	341
1. Calorimetrie . . . . .	341
2. Respirometrie . . . . .	343
III. Methoden zur Ausschaltung von Organfunktionen . . . . .	345
IV. Stoffwechselversuche an überlebenden Organen . . . . .	346
V. Untersuchungen an isolierten Zellen und Zellteilen . . . . .	347
VI. Fermentreaktionen (Enzyminhibitoren) . . . . .	349
VII. Membranwirkungen . . . . .	351
VIII. Arzneimetabolismus . . . . .	352
<i>Bibliographie</i> . . . . .	358
G. Toxizitätsprüfung neuer Arzneimittel . . . . .	374
I. Technik der akuten Toxizitätsprüfung . . . . .	380
1. Anzahl der Tiere . . . . .	381
a) Versuche an Nagetieren . . . . .	381
b) Versuche an Katzen und Hunden . . . . .	381
2. Alter, Gewicht, Futter und Geschlecht der Tiere . . . . .	381
3. Applikationsart und Applikationsort . . . . .	381
4. Beobachtungsdauer (Lebensdauer) . . . . .	385
5. Vergiftungssymptome . . . . .	385
6. Potenzierungseffekte . . . . .	385
II. Technik der chronischen Toxizitätsprüfung . . . . .	386

III. Prüfung von Reizstoffen (Irritantien) . . . . .	392
1. Hautreizstoffe (Läppchentest) . . . . .	393
2. Schleimhautreizstoffe (Augenreizstoffe) . . . . .	395
3. Reizwirkung am Injektionsort . . . . .	395
4. Prüfung am Menschen . . . . .	396
5. Substanzen mit sensibilisierender Wirkung . . . . .	397
IV. Prüfung auf embryotoxische Wirkung . . . . .	397
V. Prüfung auf cancerogene Wirkung . . . . .	405
VI. Prüfung auf Toleranz- und Abstinenzsyndrom . . . . .	408
VII. Pathologisch-anatomische Untersuchungstechnik im Pharmakologischen Laboratorium . . . . .	409
1. Spontanerkrankungen der Laboratoriumstiere . . . . .	409
2. Obduktionstechnik . . . . .	410
<i>Bibliographie</i> . . . . .	414
Sachverzeichnis . . . . .	425

## A. Planen und Auswerten von pharmakologischen Versuchen

Die Bedeutung der Statistik für die Arzneimittelforschung wurde von PAUL EHRLICH und WILHELM WIECHOWSKI bereits zu einer Zeit erkannt, als andere Forscher noch glaubten, ein pharmakologisches Versuchsergebnis sei absolut genau und eine statistische Behandlung der Versuchsergebnisse nicht notwendig. Experimente mit absolut genauen Resultaten sind aber meist erkenntnis-leer, wie folgende Aussage: „...*Das Nervmuskelpräparat eines Frosches, eine halbe Stunde in 70prozentigen Methyl- oder Äthylalkohol gelegt, zeigt, wenn seine Reizbarkeit geprüft wird, daß direkte und indirekte Erregbarkeit erloschen sind...*“ Die Bewertung eines derartigen Experimentes bedarf keiner Statistik, denn man glaubt dem Untersucher auch ohne mathematische Beweisführung, daß die nachfolgenden 30 oder 100 Froschmuskeln in gleicher Weise reagieren werden. Ein solches Experiment enthält aber kaum eine *praktisch verwertbare Information*, weil der zitierte Versuch ja nichts darüber aussagt, wann die Vergiftung des Muskels bzw. des Nerven eingetreten ist, welche Konzentration des Alkohols notwendig ist, um in einer bestimmten Zeit eine Lähmung (reversibel — nicht reversibel) herbeizuführen, schließlich welcher der beiden Alkohole der wirksamere ist usf. Um nur eine dieser Fragen zu beantworten, müssen Versuchsarrangierungen getroffen werden, bei denen *Informationen nicht verschenkt werden*. Die Ergebnisse derartiger Versuche liegen allerdings nur mehr mit einer *gewissen Wahrscheinlichkeit* in einem *bestimmten Bereich*. Diesen Bereich und auch die gewisse Wahrscheinlichkeit zu ermitteln, ist die Grundaufgabe der mathematischen Auswertung von Versuchsergebnissen mit Hilfe statistischer Methodik. In den folgenden Kapiteln sind einige Verfahren wiedergegeben, die es — ohne Einsatz höherer Mathematik — ermöglichen, Aussagen zu prüfen und mit einer Risikoangabe zahlenmäßig zu verbinden. Auf Beifügungen von der Art: „...*man ist versucht, anzunehmen*“, „...*es erscheint uns plausibel...*“ usf. kann dann verzichtet werden.

Planung und statistische Behandlung des Materials richten sich nach dem Experiment. Versuche, die jahreszeitlich gebunden sind, erfordern eine umfangreichere Planung als solche Versuche, bei denen das Material täglich in beliebig großer Menge anfällt (Qualitätskontrolle der pharmazeutischen Industrie). Eine Sonderstellung nehmen die Untersuchungen ein, bei denen das Objekt, an dem die Untersuchung vorgenommen werden soll, in *beschränkter Zahl und in nicht vorher bestimmbar Zeitabschnitten zur Verfügung steht*; der Versuch schreitet dann in dem Tempo fort, in dem Objekte verfügbar werden.

Die *Sequenzanalyse* (s. S. 68) bietet hier den Vorteil, die Ergebnisse allmählich zu sammeln und das Experiment zu beenden, sobald man eine klare Antwort auf die gestellte Frage erhalten hat. Bei der Planung und Durchführung müssen Vorkehrungen verschiedenster Art getroffen werden. Der experimentelle Aufwand kann dadurch vermindert, der wissenschaftliche Ertrag gesteigert werden. Eine mathematische Auswertung der Versuchsergebnisse kann jedoch nie mehr aussagen, als an Informationen in den Untersuchungsergebnissen schon enthalten ist. Häufig werden allerdings erst bei der mathematischen Auswertung Gesetzmäßigkeiten entdeckt, von denen auf kausale Zusammenhänge zu schließen verlockend ist. Schlußfolgerungen dieser Art können dem Untersucher jedoch kritische Entgegnungen eintragen (s. Korrelation S. 55 u. 66), weil ursächliche Zusammenhänge zwar nahegelegt, aber niemals mit Hilfe mathematischer Methoden bewiesen werden können.

Die Fragestellung in der Pharmakologie ist immer vergleichend. Aussagen ohne Angaben eines Bezugssystems sind erkenntnisleer, mitunter vollkommen wertlos und daraus gezogene Schlüsse falsch. Eine Aussage: „Von 200 Ratten, die in der Zeit vom 15. 1. 1939 bis 15. 1. 1941 den Lebensmittelfarbstoff *FX* in der Konzentration  $y\%$  dem Futter beigemischt erhielten, erkrankten 38 an Tumoren“, erlaubt erst dann auf cancerogene Wirkung des Farbstoffes zu schließen, wenn eine in gleicher Zeit unbehandelte gleiche Tieranzahl eine ähnliche Tumorate nicht aufweist; fehlt diese Angabe, dann ist die obige Aussage wertlos, wahrscheinlich sogar falsch, denn der Pathologe weiß, daß viele Rattenstämme zu Spontan-tumor-bildung neigen. Auch dann, wenn das Problem keinen Vergleich fordert, weil nur gefragt wird, ob die Substanz *FX* toxisch (cancerogen) ist, muß die Aussage auf einen Standard, in diesem Fall auf ein Placebo (Scheinapplikation), bezogen werden. Wenn gefragt wird, ob das unbekannte Arzneimittel (*U*) Vorteile gegenüber dem bekannten Arzneimittel (*S*) bietet, dann wird *S* zum Standard bestimmt und in die Untersuchung einbezogen.

Leider kann auch ein richtig geplanter Versuch zu einem falschen Ergebnis und damit zu einer falschen Aussage führen. Das *wahre Ergebnis* wird nämlich bei jedem Versuch durch mehrere Faktoren verfälscht, die der Experimentator als zunächst unbekannte Größen in seine Berechnung einbeziehen muß. Im pharmakologischen Versuch sind im allgemeinen drei Systeme gekoppelt:

- A. Das biologische Objekt (Tier, überlebendes Organ)
- B. Die Meßvorrichtung (Registriergerät, chemische Analyse)
- C. Der Experimentator.

Alle drei Systeme haben Fehlerquellen; prinzipiell hat man zwei Fehlerarten zu unterscheiden, den *systematischen Fehler* (bias) und den *Zufallsfehler*.

#### a) Systematischer Fehler

Der systematische Fehler (s. H. WEYEWER) ist ein Fehler in der Versuchsanordnung, der auf eine Versuchsreihe in *konstanter Richtung* (Vorzeichen des Fehlers: „zu groß“ — „zu klein“) und in annähernd *konstanter Größe* einwirkt.