

Amt der Steiermärkischen Landesregierung
Fachabteilung 10 A
Mag. Beate de Roja
Krottendorferstr. 94
8052 Graz

Graz, am 11.03.2011

Betrifft: Bericht über die Durchführung einer Forschungsarbeit mit Rana temporaria Larven 2010:

Antragstellende Einrichtung war das Interuniversitäre Kolleg für Gesundheit und Entwicklung (www.inter-uni.net, insbesondere > Forschung) auf Anregung der Kollegialen Instanz für Komplementärmedizin der Universität Bern.

Im Nachgang zum positiven Tierversuchsbescheid der Fachabteilung 10A vom 11.05.2010, verbunden mit der Sammelgenehmigung der FA13C, legen wir folgenden Abschlussbericht vor.

Pilotversuch zur unabhängigen Wiederholung einer Studie zur Beeinflussung der Metamorphosegeschwindigkeit von Amphibienlarven durch homöopathisch verdünntes Thyroxin (10e-30) durch eine von der Kollegialen Instanz für Komplementärmedizin der Universität Bern vorgeschlagene Forscherin

Einleitung

Das Amphibienmodell bietet die Möglichkeit, die Wirkung von extrem hohen Verdünnungen, die nach Vorschrift der Homöopathie, d.h. durch schrittweises Verdünnen und Verschütteln hergestellt wurden, zu untersuchen. Falls durch den Herstellungsprozess spezifische Information im Trägermedium (Wasser) gespeichert wird, kann diese, wie bisherige Untersuchungen zeigen, eine Wirkung auf die hochsensiblen Larven von Amphibien haben.

In den frühen 1990er Jahren wurde – damals noch im Rahmen des Ludwig Boltzmann Institutes für Homöopathie in Graz (Doz. M. Haidvogel) und in Zusammenarbeit mit dem Institut für Zoologie der Universität Graz (Doz. G. Kastberger) – ein entsprechendes nicht invasives Tiermodell standardisiert, das in der Grundlagenforschung zur Homöopathie eingesetzt wurde [1 - 5]. In den Folgejahren wurden analoge bzw. vertiefende Studien in Tübingen [6] und Wien [7], jeweils an den dortigen Universitäten, durchgeführt. Die Publikationen des Teams sind in internationalen Verzeichnissen wie MEDLINE präsent.

Das Amphibienmodell kann dazu beigetragen, den Wissensstand in der Forschung zur Homöopathie, einschließlich Anliegen des Konsumentenschutzes, zu verbessern.

Konkreter Zweck der Studie 2010 war, dass eine von der Kollegialen Instanz für Komplementärmedizin der Universität Bern vorgeschlagene Forscherin die Gelegenheit haben sollte, die standardisierte Durchführung des Versuches im Labor des Interuniversitären Kollegs, Steiermark, zu beobachten und zu erlernen, sowie in einem abgesonderten, dem Team des Kollegs nicht zugänglichen Raum eine eigene Versuchswiederholung (Pilotstudie) durchzuführen. Dies sollte auch der Möglichkeit dienen, in bisherigen Veröffentlichungen eventuell nicht explizit genannte Details der Versuchsdurchführung zu thematisieren und explizit zu protokollieren. Eine Veränderung methodischer Details war nicht vorgesehen, allerdings sollten Vorschläge für eine allfällige Optimierung der Methodik erarbeitet werden.

Method

Die Untersuchung wurde im September 2010 durchgeführt. Die Tiere wurden unmittelbar zu Versuchsbeginn in einem weststeirischen Teich gesammelt.

Das Stadium des Versuchsbeginns war durch den Grad der Spreizung der Hinterbeine in der Weise definiert, dass man gerade eben durch das von Schwanz, Ober- und Unterschenkel gebildete Dreieck hindurchblicken kann, und entspricht dem Bereich des Stadiums 31 nach Gosner. Die Larven wurden beobachtet, bis die Vorderbeine, die unter der Haut ausgebildet werden, durchbrechen und die Tiere so das Vierbeinstadium erreichten. Nach einer Entwicklungszeit von 1 - 2 Wochen brechen die präformierten Vorderbeine jeweils innerhalb weniger Minuten aus ihren Hauttaschen hervor. Wegen seiner zeitlichen Diskretheit erscheint das Erreichen des Vierbeinstadiums als Parameter sehr gut geeignet. In einer Zufallsprozedur wurden jeweils 10 Tiere mittels Netz (Einzelfang) in weiße Plastikbecken eingesetzt. Um Standortphänomene zu vermeiden, wurden diese in alternierender Reihenfolge plaziert. Es herrschte indirektes natürliches Licht.

Die Tiere wurden mit Tetrajodthyronin (T_4) (Sigma) in einer wäßrigen Verdünnung von 10^{-30} Gewichtsteilen (Endkonzentration im Beckenwasser nach der ersten Zugabe nominell 10^{-35}) behandelt. Die wässrige Ausgangslösung, die zunächst bei einer Temperatur von 35°C hergestellt wird, hat dabei eine (nominelle und im Assay bestimmte) Konzentration von 10^{-4} Gewichtsteilen. Diese wird in Schritten von 1:10 weiter verdünnt, wobei in standardisierter Weise jeder Verdünnungsschritt von einer Phase des Verschüttelns gefolgt ist. Mittels Einwegpipetten wird 1 ml der vorangegangenen Verdünnung in einer sterilen 20 ml fassenden Glasflasche zu 9 ml Aqua bidest. zugegeben. Dann wird die Glasflasche verschlossen und händisch 30mal in Intervallen von ca. 0.5 sec auf einen Gummiblock aufgeschlagen, um eine mechanische Schockwirkung zu erzeugen (Thyroxin D30). Als Kontrolle wird analog in Glasflaschen verschütteltes und jeweils mit Aqua bidest. weiterverdünntes Wasser verwendet (Wasser D30). Derart zubereitete Kontrolllösung wird verwendet, um allfällige Einflüsse des Sauerstoffgehaltes oder gelöster Bestandteile der Glasgefäße in der Testlösung zu balancieren.

Es wurden jeweils 3 µl der Proben (Thyroxin D30 oder Wasser D30) pro Tier und 300 ml chlorfreiem Leitungswasser in Intervallen von 48 h zugegeben. Alle Experimente wurden verblindet.

Die Demonstrationsstudie wurde von Dr. Waltraud Scherer-Pongratz mit einigen wenigen Tieren durchgeführt; die räumlich abgesonderte Pilotstudie der Gastforscherin wurde mit insgesamt 2 x 70 Tieren durchgeführt. Jeweils 70 Tiere (d.h. 7 Becken) wurden mit Thyroxin D30 bzw. mit Wasser D30 behandelt. Die Anzahl von 70 Tieren pro Gruppe ergab sich aus der beschränkten natürlichen Verfügbarkeit. Wie im ursprünglichen Ansuchen um Tierversuchsgenehmigung festgehalten, gehen wir davon aus, dass etwa 300 Tiere pro Gruppe notwendig wären, um den zu erwartenden Effekt (erfahrungsgemäß 5-10% Unterschied zwischen den Gruppen) statistisch absichern zu können.

Die Tiere verblieben für die Untersuchung ca. eine Woche in den Becken (weiße lebensmittelechte Hartplastikbecken mit nominell 10 L Volumen, gefüllt mit jeweils 6 L) und wurden mit blanchierten Salatblättern gefüttert. In Abständen von 8 h wurde für jedes Becken die Zahl jener Tiere bestimmt, die das Vierbeinstadium erreicht hatten. Diese Tiere werden mittels Netz einzeln schonend aus dem Becken genommen und in ein Aquaterrarium gesetzt. Nach Abschluss der Untersuchung wurden die Tiere schonend wieder in die Natur zurückgebracht.

Analyse: Verglichen wurde die Zahl der vierbeinig gewordenen Tiere in jeder der beiden Gruppen zu jedem der Messpunkte. Das statistische Signifikanzniveau wurde mittels Chi-Quadrat-Test (Yates-korrigiert) ermittelt. Zudem wurde die statistische Effektstärke (Cohen's d = Differenz der Mittelwerte geteilt durch die Standardabweichung) ermittelt: $d > 0,2$ gilt als gering, $> 0,5$ als mittel und $> 0,8$ als groß. Da wir, wie bereits im Ansuchen um die Tierversuchsgenehmigung festgehalten, davon ausgingen, dass etwa 300 Tiere pro Gruppe notwendig wären, um den zu erwartenden Effekt (erfahrungsgemäß 5-10% geringere Werte in den TD30- als in den W30-Gruppen) statistisch absichern zu können, wurden explorative Berechnungen auch mit einer auf jeweils 300 Elemente normierten Gruppengröße durchgeführt.

Ergebnis

Die Rohdaten des Versuches sind in Tabelle 1 wiedergegeben.

Gruppe	Becken	MP0	MP1	MP2	MP3	MP4	MP5	MP6	MP7	MP8	MP9	MP10	MP11	MP12	MP13	MP14	MP15	MP16	MP17
WD30	1	0	0	0	2	3	4	5	5	5	6	8	10	10	10	10	10	10	10
WD30	2	0	0	2	2	3	4	5	5	5	5	8	8	8	9	10	10	10	10
WD30	3	0	0	1	2	4	6	6	6	6	6	7	8	8	9	9	9	9	9
WD30	4	0	0	0	0	1	1	2	4	4	6	7	9	9	9	9	9	10	10
WD30	5	0	0	1	2	2	2	2	3	3	3	4	5	6	7	7	7	9	9
WD30	6	0	1	1	1	1	2	3	3	5	7	7	7	8	8	8	9	9	9
WD30	7	0	0	0	0	1	1	4	5	6	7	8	9	9	9	9	9	9	9
	Summe	0	1	5	9	15	20	27	31	34	40	49	56	58	61	62	63	66	66

TD30	1	0	0	0	0	1	1	2	2	3	4	5	6	9	9	9	9	9	9
TD30	2	0	0	1	2	2	2	2	4	5	7	7	8	8	8	8	8	8	8
TD30	3	0	0	0	0	3	5	5	5	6	6	7	8	9	9	9	9	9	9
TD30	4	0	0	1	1	2	5	5	5	6	6	6	8	9	9	9	9	9	10
TD30	5	0	0	2	2	4	5	5	5	6	6	6	6	8	8	8	9	9	9
TD30	6	0	0	0	1	2	3	4	4	4	4	4	5	6	8	10	10	10	10
TD30	7	0	0	0	0	1	2	2	2	3	4	6	8	9	10	10	10	10	10
Summe	0	0	0	4	6	15	23	25	27	33	37	41	49	58	61	63	64	64	65

Tab. 1: Rohdaten des Pilotversuches der von der Kollegialen Instanz für Komplementärmedizin der Universität Bern vorgeschlagenen Forscherin zur unabhängigen Wiederholung einer Amphibienstudie. MP = Messpunkt, Intervalle von 4 Stunden. Weitere Erklärungen im Text.

Wie aus Tabelle 1 und Abbildung 1 ersichtlich, lagen die Werte der TD30-Gruppe zu einigen Zeitpunkten deutlich unter jenen der WD30-Gruppe. In jenem Bereich, in dem 70% der WD30-Tiere das Vierbeinstadium erreicht hatten, hatten in der TD30-Gruppe nur 59%, also 11% weniger, dieses Stadium erreicht. Die Entwicklungsverzögerung in der TD30-Gruppe betrug hier etwa 8 Stunden. An diesem Messpunkt (Messpunkt 11, d.h. an Tag 4) hatten je WD30-Becken $7,00 \pm 2,01$ (Mittelwert \pm Standardabweichung in %) und je TD30-Becken $5,86 \pm 1,53$ Prozent der Tiere das Vierbeinstadium erreicht. Die Effektstärke d ist mit 0,92 groß (!).

Die Unterschiede sind zwar zu keinem der Messpunkte statistisch signifikant ($p > 0.05$); wurde jedoch die Gruppengröße auf $N=300$ normiert, so zeigten sich durchaus Signifikanzwerte von $p < 0.05$ (z.B. $p = 0.02$ an Messpunkt 11).

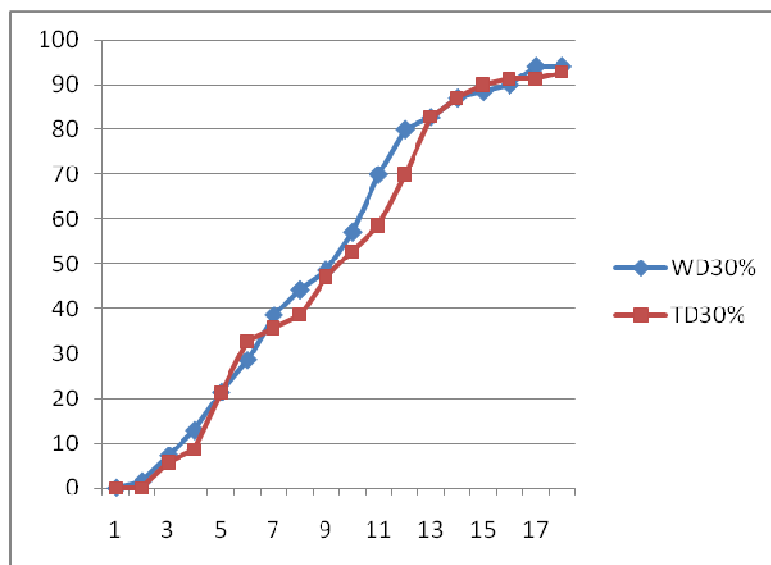


Abbildung 1: Pilotversuch der von der Kollegialen Instanz für Komplementärmedizin der Universität Bern vorgeschlagenen Forscherin zur unabhängigen Wiederholung einer Amphibienstudie. Erklärungen unter Tabelle 1 und im Text.

Schlussfolgerung

Der Versuch 2010 hat seinen Zweck insofern erfüllt, als die Gastforscherin die standardisierte Durchführung des Versuches im Labor des Interuniversitären Kollegs beobachten und erlernen konnte, sowie in einem abgesonderten, dem Team des Kollegs nicht zugänglichen Raum eine eigene Versuchswiederholung (Pilotstudie) durchführen konnte. Es konnten anlässlich des Aufenthaltes der Gastforscherin in Graz einige in bisherigen Veröffentlichungen nicht explizit genannte Details der Versuchsdurchführung thematisiert und explizit protokolliert werden.

Literatur

- 1 Endler P.C., Pongratz W., Van Wik R., Kastberger G., Haidvogel M. Effects of highly diluted succussed thyroxine on metamorphosis of highland frogs. Berlin J Res Hom 1991;1:151-160.
- 2 Endler P.C., Schulte J. (eds.). Ultra High Dilution: Physiology and Physics. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht 1994.
- 3 Endler P.C., Pongratz W., Kastberger G., Wiegant F.A.C., Schulte J. The effect of highly diluted agitated thyroxine on the climbing activity of frogs. Vet. Hum. Tox. 1994;36:56-59.
- 4 Endler P.C., Pongratz W., Smith C.W., Schulte J. Non-molecular information transfer from thyroxine to frogs with regard to 'homoeopathic' toxicology. Vet. Hum. Tox. 1995;37(3):259-260.
- 5 Endler P.C., Pongratz W., van Wijk R., Waltl K., Hilgers H., Brandmaier R. Transmission of hormone information by nonmolecular means. FASEB J. 1994;8,4:A400 (Abs.).
- 6 Endler P.C., Heckmann C., Lauppert E., Pongratz W., Alex J., Dieterle D., Lukitsch C., Vinattieri C., Smith C.W., Senekowitsch F., Möller H., Schulte J. The metamorphosis of amphibians and information of thyroxine. In: Schulte J, Endler P.C. (Ed.). Fundamental Research in Ultra High Dilution and Homoeopathy. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 1998.
- 7 Zausner C., Lassnig H., Endler P.C., Scherer W., Haidvogel M., Frass M., Kastberger G., Lüdtker R.: Die Wirkung von "homöopathisch" zubereitetem Thyroxin auf die Metamorphose von Hochlandamphibien - Ergebnisse einer multizentrischen Kontrollstudie. Perfusion 2002;17:268-276.