

Institut für Ernährungsphysiologie der Technischen Universität München,  
Freising-Weihenstephan

ANNA M. REICHLMAYR-LAIS und M. KIRCHGESSNER

## Depletionsstudien zur Essentialität von Blei an wachsenden Ratten

### 1. Einleitung

Blei wurde bislang im Zusammenhang mit Ernährungsfragen nur unter toxikologischen Aspekten untersucht. Toxische Wirkungen eines Elements, die in erster Linie von der Dosis abhängig sind, schließen aber eine essentielle Funktion dieses Elements in kleineren Mengen nicht aus. Um eine mögliche Essentialität von Blei nachzuweisen, soll daher mit den vorliegenden Untersuchungen überprüft werden, ob es in Tierversuchen am Beispiel Ratte gelingt, einen Pb-Mangel zu induzieren, wenn Blei weitestgehend in der Diät reduziert wird.

### 2. Material und Methodik

#### 2.1. Versuchsaufbau

Insgesamt wurden zur vorliegenden Fragestellung ein einfacher Wachstumsversuch und ein Generationenversuch durchgeführt. Für den Wachstumsversuch wurden 18 männliche Ratten mit einer durchschnittlichen Lebendmasse von  $30 \pm 1$  g in eine Depletionsgruppe und in eine Kontrollgruppe aufgeteilt. Nach 30 Versuchstagen wurden die Ratten nach Äthernarkose dekapitiert.

Für den Generationenversuch wurden 12 zugekaufte weibliche Ratten ( $P_0$ -Generation) mit einer durchschnittlichen Lebendmasse von  $30 \pm 1$  g in eine Depletions- und in eine Kontrollgruppe eingeteilt. Im geschlechtsreifen Alter wurden diese weiblichen Ratten mit ca. 200 g Lebendmasse gedeckt, um die  $F_1$ -Generation zu erzeugen. Die jungen Ratten dieser  $F_1$ -Generation wurden am 21. Lebenstag abgesetzt. Am Tage des Absetzens wurden die Muttertiere und aus beiden Versuchsgruppen pro Wurf zwei männliche Tiere geschlachtet. Die restlichen männlichen Jungtiere aus der Depletionsgruppe wurden mit einem mittleren Alter von 34 Tagen gleichmäßig auf zwei Gruppen verteilt. Eine Gruppe wurde weiterhin depletiert (Depletion), während die zweite Gruppe mit der Kontrolldiät repliziert (Repletion) wurde. Die weiblichen Ratten der  $F_1$ -Generation aus der Depletionsgruppe wurden ebenso mit einem mittleren Alter von 34 Tagen entsprechend ihres Alters gleichmäßig auf drei Gruppen verteilt. Die erste Gruppe wurde weiterhin depletiert (Depletion), die zweite Gruppe erhielt die Kontrolldiät (Repletion) und die dritte Gruppe die Depletionsdiät, jedoch mit doppelter Fe-Zulage (Depletion + Fe). Nach 12 Behandlungstagen wurden sowohl die männlichen als auch die weiblichen Ratten geschlachtet. Zusätzlich wurden aus der Kontrollgruppe männliche und weibliche Ratten der  $F_1$ -Generation zeitlich so geschlachtet, daß sie in ihrem Alter mit den Tieren der anderen Gruppe übereinstimmen.

## 2.2. Haltung und Zucht der Ratten

Für die Versuche wurden SPF-Sprague-Dawley-Ratten (Stamm Mus-Rattus, München) verwendet. Als Stall diente ein klimatisierter Raum mit einer relativen Luftfeuchte von 55% und einer Temperatur von  $23 \pm 1$  °C. Zur Zeit der Würfe betrug die Temperatur  $25 \pm 1$  °C. Der Raum wurde 12 Stunden am Tag mit Dämmerlicht versorgt. Die Ratten wurden in Makrolonkäfigen gehalten, die mit Plexiglasrosten und -deckeln ausgerüstet waren. Unter die Plexiglasroste wurden wenige spurenelementarme Zelluloseschnitzel gestreut, um die Tiere sauber zu halten. Die Käfige wurden täglich gewechselt. Für die Zucht wurden die weiblichen Ratten mit einer Körpermasse von 200 g gedeckt, wobei je zwei Weibchen mit einem Bock 7 bis 10 Tage zusammengesetzt wurden. In beiden Versuchen wurden die Diäten ad libitum gefüttert. Als Trinkwasser wurde zur freien Aufnahme destilliertes Wasser, das mit 0.014% NaCl p. a. versetzt war, gereicht.

## 2.3. Zusammensetzung der Diät

Durch Auswahl und Reinigen geeigneter Diätkomponenten wurde eine Depletionsdiät mit  $45 \pm 5$  µg Blei/kg hergestellt. Der Kontrolldiät wurde 1 mg Pb/kg zugelegt. Die Diäten setzten sich zusammen aus Kasein (20%), Stärke (30%), Saccharose (32.1%), Fett (8.7%), Zellulose (3%), Vitaminmischung (2%), Mineralstoffmischung (4%) und DL-Methionin (0.2%). Die Mineralstoffmischung enthielt pro kg Diät NaCl (suprapur 1,148 g),  $\text{NaHCO}_3$  (p. a. 1,224 g), Ca ( $\text{C}_3\text{H}_5\text{O}_3$ )<sub>2</sub> · 5H<sub>2</sub>O (löslich, reinst 8,7 g),  $\text{CaCO}_3$  (suprapur 4,4 g),  $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3 \cdot (\text{OH})$  (trocken, rein 6,0 g),  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  (p. a. 0,257 g),  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (p. a. 4,04 g),  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (suprapur 10,247 g),  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  (p. a. 3,84 g),  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (p. a. 219,93 mg), KJ (suprapur 36,00 mg),  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  (p. a. 38,4 mg),  $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  (p. a. 144,1 mg), NaF (p. a. 1,2 mg),  $\text{NiSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  (p. a. 4,48 mg). Die Vitaminmischung bestand pro kg Diät aus Vitamin A 5000 I. E., Vitamin D<sub>3</sub> 300 I. E., α-Tokopherolacetat 100 mg, Menadion-Natriumbisulfid 5 mg, Thiaminiumdichlorid 5 mg, Riboflavin 10 mg, Pyridoxinhydrochlorid 6 mg, Ca-D-Panthotenat 50 mg, Nikotinsäure 20 mg, Cholinchlorid 1,0 g, Folsäure 0,2 mg, Vitamin B<sub>12</sub> 25 µg, Saccharose ad 20 g. Stärke und Zellulose wurden in Anlehnung an eine Vorschrift von SCHNEGG (1975) gereinigt.

## 2.4. Bestimmung der Blutwerte

Unmittelbar nach dem Dekapitieren eines Tieres wurde aus dem heparinisiertem Blut der Hämatokrit (Hct), die Erythrozytenzahl (RBC) und das mittlere korpuskuläre Zellvolumen (MCV) mit einem Coulter Counter (Firma Coulter Electronics GmbH, Krefeld), ausgerüstet mit MCV/Hct-Zusatzgerät, gemessen. Die Bestimmung des Hämoglobingehaltes im Rattenblut (Hb) erfolgte mit einem Hämoglobinometer (Firma Coulter Electronics GmbH, Krefeld).

## 2.5. Statistische Auswertung

Das Datenmaterial wurde varianzanalytisch ausgewertet. Die ±-Werte stellen die jeweiligen Standardabweichungen der Einzelwerte dar.

## 3. Ergebnisse

Im ersten Wachstumsversuch traten bei den Depletionstieren im Vergleich zu den Kontrolltieren zu keinem Zeitpunkt des Versuches gesicherte Unterschiede in der Lebendmasseentwicklung auf. Nach 30 Versuchstagen zeigten die Ratten der Depletionsgruppe eine durchschnittliche Lebendmasse von  $185 \pm 14$  g und die der Kontrollgruppe  $190 \pm 8$  g. Auch bei den Blutwerten konnten zwischen Depletions- und Kontrolltieren am Versuchsende keine gesicherten Unterschiede festgestellt werden (Tab. 1).

Tabelle 1

Blutwerte männlicher Ratten nach 30 Versuchstagen  
(Wachstumsversuch)

Gruppe	RBC (10 <sup>6</sup> /μl)	Hct (%)	Hb (g/100 ml)	MCV (μ <sup>3</sup> )
Depletion (n=9)	6.9 ±0.5	47.4 ± 3.0	14.1 ± 0.5	78 ± 2
Kontrolle (n=9)	6.7 ±0.4	46.2 ± 2.6	13.7 ± 0.5	78 ± 2

Nachdem sich in diesem einfachen Wachstumsversuch weder in der Lebendmasseentwicklung noch bei den hämatologischen Parametern zwischen Depletions- und Kontrollratten Unterschiede zeigten, sollte in einem zweiten Versuch über Generationen geprüft werden, ob mit der gleichen Depletionsdiät (45 μg Pb/kg) an jungen Ratten, deren Mütter bereits an Blei depletiert wurden, Mangelsymptome hervorgerufen werden können. In diesem Generationsversuch wiesen die Muttertiere P<sub>0</sub> aus der Depletionsgruppe im Vergleich zu den Kontrollmüttern keine Unterschiede in der Lebendmasseentwicklung auf. Am Absetztag betrug die durchschnittliche Lebendmasse der Depletionsmütter 242 ± 17 g und die der Kontrollmütter 247 ± 8 g. Auch bei den jungen Depletionsratten der F<sub>1</sub>-Generation war im Vergleich zu den Kontrolltieren die Lebendmasse sowohl am Wurftag als auch die weitere Entwicklung nicht verschieden. Die durchschnittliche Geburtmasse der Neugeborenen betrug nämlich sowohl in der Depletions- als auch in der Kontrollgruppe 6,0 ± 0,5 g (n<sub>D</sub> = 64; n<sub>K</sub> = 50). Am Absetztag (21. Lebenstag) zeigten die Jungtiere der Depletionsgruppe eine durchschnittliche Lebendmasse von 38,7 ± 3,9 g und die der Kontrollgruppe 38,4 ± 3,7 g (n = 44). Auch am Versuchsende konnten weder bei den männlichen noch bei den weiblichen Ratten der F<sub>1</sub>-Generation zwischen den Gruppen eine unterschiedliche Lebendmasse beobachtet werden (Tab. 2).

Tabelle 2

Durchschnittliche Lebendmasse der Ratten  
nach unterschiedlicher Diät-Behandlung  
(F<sub>1</sub>-Tiere aus dem Generationenversuch)

Behandlung	Lebendmasse $\bar{x}$ (g)
männliche Ratten	
Depletion (n=8)	192 ± 22
Repletion (n=7)	182 ± 28
Kontrolle (n=8)	183 ± 37
weibliche Ratten	
Depletion (n=8)	146 ± 17
Depletion + Fe (n=7)	150 ± 20
Repletion (n=8)	150 ± 16
Kontrolle (n=8)	147 ± 21

Die Muttertiere P<sub>0</sub> aus der Depletionsgruppe zeigten im Vergleich zu den Kontrollmüttern am Absetztag auch keine veränderten Blutwerte (Tab. 3). Jedoch wurden

Tabelle 3

Durchschnittliche Blutwerte der Muttertiere P<sub>0</sub> am Absetztag (Generationenversuch)

Gruppe	RBC (10 <sup>6</sup> /μl)	Hct (%)	Hb (g/100 ml)	MCV (μ <sup>3</sup> )	MCH (pg)	MCHC (%)
Depletion (n=5)	7.3 ± 0.5	48.2 ± 3.5	14.0 ± 0.8	66 ± 2	19 ± 1	29 ± 1
Kontrolle (n=5)	7.3 ± 0.4	48.2 ± 1.7	13.5 ± 0.5	65 ± 3	19 ± 1	28 ± 1

Tabelle 4

Durchschnittliche Blutwerte 21tägiger Ratten aus der F<sub>1</sub>-Generation

Gruppe	RBC (10 <sup>6</sup> /μl)	Hct (%)	Hb (g/100 ml)	MCV (μ <sup>3</sup> )	MCH (pg)	MCHC (%)
Depletion (n=10)	4.6 ± 0.6	30.7 ± 3.6	7.8 ± 0.7	65 ± 4	17 ± 3	25 ± 3
Kontrolle (n=8)	4.8 ± 0.5	34.4 ± 3.4	9.2 ± 0.5	71 ± 2	18 ± 5	27 ± 2
p <	—	0.05	0.001	0.001	—	—

Tabelle 5

Durchschnittliche Blutwerte der Ratten nach unterschiedlicher Diätbehandlung (F<sub>1</sub>-Tiere aus dem Generationenversuch)

Behandlung	RBC (10 <sup>6</sup> /μl)	Hct (%)	Hb (g/100 ml)	MCV (μ <sup>3</sup> )	MCH (pg)	MCHC (%)
männliche Ratten						
Depletion (n=8)	6.4 ± 0.4	44.2 ± 2.3	13.1 ± 0.3	73 ± 3	21 ± 2	30 ± 2
Repletion (n=7)	6.4 ± 0.5	45.6 ± 3.6	13.1 ± 0.9	75 ± 2	20 ± 2	29 ± 3
Kontrolle (n=8)	6.2 ± 0.7	44.2 ± 5.2	12.9 ± 1.1	74 ± 1	21 ± 1	29 ± 2
weibliche Ratten						
Depletion (n=8)	6.5 ± 0.3	43.9 ± 0.7	13.5 ± 0.5	71 ± 3	21 ± 1	31 ± 1
Depletion + Fe (n=7)	6.3 ± 0.7	42.0 ± 3.7	12.9 ± 1.4	70 ± 3	20 ± 1	31 ± 1
Repletion (n=8)	6.6 ± 0.2	44.2 ± 0.6	13.5 ± 0.3	70 ± 2	20 ± 1	31 ± 1
Kontrolle (n=8)	6.6 ± 0.5	46.1 ± 4.0	13.3 ± 0.7	72 ± 2	20 ± 1	29 ± 2

hämatologische Veränderungen bei den jungen Ratten der F<sub>1</sub>-Generation am Absetztag festgestellt. Die durchschnittlichen Blutwerte dieser Ratten sind in Tab. 4 zusammengestellt. Im Vergleich zu den Kontrolltieren waren bei den Ratten aus der Depletionsgruppe der Hämatokrit um 11%, der Hämoglobingehalt um 15% und das mittlere korpuskuläre Zellvolumen um 9% reduziert. Bei älteren Tieren der F<sub>1</sub>-Generation traten diese hämatologischen Veränderungen nicht mehr auf (Tab. 5).

#### 4. Diskussion

Erste Hinweise für eine mögliche Essentialität von Blei stammen von SCHWARZ (1974), der die potentielle Essentialität dieses Elements von den Feststellungen ableitete, daß Blei normalerweise im Organismus und in Zellen vorkommt und auch in Eiern, Milch und Neugeborenen nachgewiesen werden kann und daß ein Mechanismus existiert, der den Pb-Level im Blut konstant hält. Für einen exakten Beweis der Essentialität von Blei ist es jedoch erforderlich, am Tiermodell meßbare Mangelerscheinungen zu induzieren, da nur von einem Mangel aus ein Bedarf des Organismus an einem Spurenelement nachgewiesen werden kann. In den vorliegenden Untersuchungen sollte daher überprüft werden, ob physiologische Abnormalitäten an den Versuchstieren gemessen werden können, wenn nur Blei aus einer optimal zusammengesetzten Diät entfernt wird. Ausgehend von einem höheren Bedarf wachsender Tiere, der bei suboptimaler Versorgung des zu prüfenden Elements eine Mobilisierung der Reserven bedingt, wurde für diese Fragestellung zunächst ein einfacher Wachstumsversuch durchgeführt. In einem weiteren Versuch über Generationen sollte der Depletionseffekt durch die Generationenfolge verstärkt werden.

Mit dem ersten Wachstumsversuch konnten mit einer Depletionsdiät, deren Pb-Konzentration 45 µg/kg betrug, noch keine physiologischen Veränderungen bei den Depletionstieren im Vergleich zur Kontrollgruppe beobachtet werden. Dies läßt vermuten, daß die Pb-Depots dieser Ratten zu Versuchsbeginn so hoch waren, daß die Depletion nicht ausreichte, um Mangelsymptome hervorzurufen. Außerdem läßt sich daraus ableiten, daß, sofern ein Bedarf für mögliche essentielle Funktionen besteht, dieser sehr niedrig sein wird.

Erste physiologische Veränderungen als Folge mangelnder Pb-Versorgung traten bei wachsenden Ratten auf, wenn bereits ihre Mütter depletiert wurden. Die Ratten der F<sub>1</sub>-Generation von Depletionsmüttern zeigten nämlich am Absetztag eine mikrozytäre hypochrome Anämie. Anscheinend konnte durch eine Pb-Depletion bereits der Muttertiere die Pb-Depotbildung bei den jungen Ratten reduziert werden. Aufgrund homöostatischer Regulationsmechanismen wäre es nämlich verständlich, daß Muttertiere, die suboptimal mit Blei versorgt werden, ihre Foeten intrauterin nicht mehr ausreichend mit Blei versorgen können und ihre Pb-Ausscheidung über die Milch vermindern.

Ältere Tiere der F<sub>1</sub>-Generation zeigten die hämatologischen Veränderungen, die bei den Ratten am Absetztag festgestellt wurden, nicht mehr. Dies dürfte möglicherweise damit zu erklären sein, daß die Pb-Versorgung über die Depletionsdiät, mit der die Ratten nach dem Absetzen versorgt wurden, höher war als mit der Milch Pb-depletierter Mütter während der Säugetzeit. Eine weitere Erklärung wäre, daß sich die Ratten mit zunehmender Versuchsdauer an die niedrige Versorgungslage anpaßten. Aus Zn-Depletions-Versuchen ist beispielsweise bekannt, daß sich bei Kühen

im Zn-Mangel nach zunächst stark negativer Zn-Bilanz im fortgeschrittenen Depletionsstadium sogar eine geringe Zn-Retention einstellte (KIRCHGESSNER und SCHWARZ, 1976).

Insgesamt konnten in den vorliegenden Untersuchungen erste physiologische Veränderungen infolge einer Pb-Depletion induziert werden. Gleichzeitig wurden deutliche Anzeichen einer homöostatischen Regulation für Blei im Organismus erkennbar. Die physiologischen Veränderungen im Blei-Mangel sowie das Bestreben nach Homöostase sind wesentliche Indizien für die Essentialität von Blei. Der Bedarf des Stoffwechsels an Blei wird sehr niedrig sein, da Mangelercheinungen erst bei einer extrem niedrigen Blei-Konzentration in der Diät und zusätzlicher Depletion der Versuchstiere über Generationen auftraten.

### Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit sollte geprüft werden, ob in Tierversuchen Mangelercheinungen auftreten, wenn nur Blei aus einer optimal zusammengesetzten Diät entfernt wird. Für diese Fragestellung wurden ein Wachstumsversuch und ein Generationenversuch durchgeführt. In beiden Versuchen wurde eine Depletionsdiät mit einer Pb-Konzentration von  $45 \pm 5 \mu\text{g/kg}$  verfüttert, während der Kontrolldiät 1 mg Blei/kg zugelegt wurde.

Im Wachstumsversuch traten zwischen Depletions- und Kontrollgruppe nach 30 Versuchstagen weder Unterschiede bei der Lebendmasse noch bei den Blutwerten auf. Auch im Generationenversuch zeigten weder die Muttertiere  $P_0$  noch die jungen Ratten der  $F_1$ -Generation eine unterschiedliche Lebendmasseentwicklung. Bei den Ratten der  $F_1$ -Generation konnten jedoch am Absetztag gesicherte hämatologische Veränderungen gemessen werden. Im Vergleich zu den Kontrolltieren waren die Werte für Hämatokrit um 11%, Hämoglobin um 15% und MCV um 9% bei den Pb-depletierten Ratten reduziert. Damit konnten erste physiologische Abnormalitäten infolge einer Pb-Depletion nachgewiesen werden, die einen wesentlichen Anhaltspunkt für die Essentialität von Blei darstellen.

### Резюме

АННА М. РАЙХЛМАЙР-ЛАИС И М. КИРХГЕССНЕР

Исследование по независимости свинца у растущих крыс

Изучалась, появляется ли недостаток у животных, если свинец удаляется из сбалансированного рациона. Для этого проводились опыты, где определились рост и поколение. В обоих опытах были скормлены диеты с  $45 \pm 5 \text{ мг Pb/kg}$ , а к контрольной диете добавили 1 мг Pb/kg.

В опыте для изучения роста после 30 дней нет различия между контрольной и опытной группами относительно живой массы и параметров крови. В опыте о поколении не крысы-матки ( $P_0$ ), не молодые крысы ( $F_1$ ) отличались относительно

прибавления живой массы. Но у крыс  $F_1$  определились при отъеме гематологические изменения; различия были достоверными. По сравнению с контролем гематокрит сокращался на 11%, гемоглобина — на 15% и MCV на 9%. Таким образом получены первые данные, которые указывают на незаменимость свинца для животных.

### Summary

ANNA M. REICHLMAYR-LAIS and M. KIRCHGESSNER

### Lead-depletion studies with rats to the essentiality of lead

In model studies with rats it was tested whether symptoms of deficiency could be induced if only lead was removed from an optimal composed diet. For this purpose, one growth experiment and one experiment over generations were conducted. In both experiments depletion diets were fed with a lead concentration of  $45 \pm 5$  ppb, whereas the control diet was supplemented with 1 ppm lead.

In the growth experiment there were no differences in weight and hematological criteria between lead-depleted rats and control rats after 30 days. Similarly in the experiment over generations neither the mother  $p_0$  nor the young rats of the  $f_1$ -generation showed changes in growth rate. However, hematological abnormalities could be measured in these rats of the  $f_1$ -generation at the day of weaning. In comparison with the control rats the lead-depleted rats showed reduced values of Hct by about 11%, Hb by about 15% and MCV by about 9%. Therefore, these experiments demonstrated first physiological abnormalities as the result of lead-depletion, findings which indicate the essentiality of lead.

### Literaturverzeichnis

- [1] KIRCHGESSNER, M. U., W. A. SCHWARZ: Arch. Tierernährung 26, 3 (1976)
- [2] SCHNEGG, A.: TU München (1975)
- [3] SCHWARZ, K.: In Trace Element Metabolism in Animals -2, Seite 371, (Hrsg. HOEKSTRA W. G.; J. W. SUTTIE; H. E. GANTHER; W. MERTZ), University Park Press, Baltimore (1974)

Eingegangen: 16. Februar 1981

### Anschrift der Autoren:

ANNA M. REICHLMAYR-LAIS und Prof. Dr. sc. M. KIRCHGESSNER  
 Institut für Ernährungsphysiologie der TU München  
 D - 8050 Freising-Weihenstephan