

## **Zur Essentialität von Blei für das tierische Wachstum**

VON ANNA M. REICHLMAYR-LAIS UND M. KIRCHGESSNER

*Eingang des Ms. 22. 12. 1980*

### **1 Einleitung**

Erste Veränderungen infolge mangelnder Pb-Versorgung konnten an wachsenden Ratten in Depletionsversuchen mit einer Pb-Konzentration von 45 ppb in der Diät in Form einer mikrozytären hypochromen Anämie festgestellt werden. Dies setzte jedoch voraus, daß bereits deren Mütter depletiert waren (REICHLMAYR-LAIS und KIRCHGESSNER 1981). Inwieweit durch eine stärkere Depletion der Versuchstiere auch Wachstumsdepressionen induziert werden können, sollte durch einen weiteren Generationenversuch mit einer Depletionsdiät, die eine noch niedrigere Pb-Konzentration aufwies, untersucht werden. Verringertes Wachstum gilt nämlich allgemein als wesentlichstes Kriterium, um die Essentialität eines Spurenelements zu beweisen. In einem weiteren Versuchsansatz sollte untersucht werden, ob Pb-Mangel entscheidend durch die Depletion in der Fötal- oder in der Säugetzeit ausgeprägt wird.

### **2 Material und Methodik**

#### **Versuchsaufbau**

Sechs weibliche SPF-Sprague-Dawley-Ratten (Stamm Mus Rattus, München) mit einem Anfangsgewicht von  $30 \pm 1$  g wurden in eine Depletions- und in eine Kontrollgruppe eingeteilt. Mit ca. 200 g Lebendmasse wurden diese Weibchen ( $P_0$ ) gedeckt. Die jungen Ratten der  $F_1$ -Generation wurden am 21. Lebenstag abgesetzt. Drei Tage nach dem Absetzen wurden die männlichen Tiere geschlachtet, während die weiblichen bis zum 38. Lebenstag weitergefüttert und bis auf drei Tiere pro Gruppe getötet wurden. Diese drei weiblichen Ratten pro Gruppe ( $P_1$ ) sollten eine  $F_2$ -Generation produzieren und wurden daher mit einem Gewicht von 200 g gedeckt. Die Ratten der  $F_2$ -Generation wurden auf zwei Versuche verteilt und zwar auf einen Depletion-Repletion-Versuch und auf einen Überkreuzversuch.

Für den Depletion-Repletion-Versuch wurden die Würfe zweier Mütter aus der Depletionsgruppe am 18. Lebenstag abgesetzt. Die Hälfte eines jeden Wurfs wurde nach dem Absetzen weiterhin depletiert, während die andere Hälfte durch Pb-Zulage von 1 ppm Blei zur Diät repletiert wurde. Die Ratten beider Gruppen (Depletion und Repletion) wurden am 29. Lebenstag nach Äthernarkose dekapitiert.

Für den Überkreuzversuch wurden jeweils die Würfe einer Mutter aus der Depletionsgruppe bzw. aus der Kontrollgruppe halbiert und jeweils eine Hälfte des Wurfs untereinander am Wurfstag ausgetauscht, so daß 4 Gruppen resultierten (siehe hierzu Tabelle 1 bzw. Abb. 4), Voraussetzung für diesen Versuch waren gleiche Wurftermine der beiden Muttertiere. Die Ratten der F<sub>2</sub>-Generation aus diesem Versuch wurden am 21. Lebenstag abgesetzt. Am Absetztag wurden die Mütter geschlachtet. Bis zum 30. Lebenstag wurden die Ratten, die von der Depletionsmutter aufgezogen wurden (Gruppen DD und DK), nach dem Absetzen weiterhin depletiert, während die Ratten, die von der Kontrollmutter gesetzt wurden (Gruppen KD und KK), die Kontrolldiät erhielten.

### Zucht und Haltung der Tiere

Die Ratten wurden in Makrolonkäfigen in einem klimatisierten Raum bei einer relativen Luftfeuchte von 55% und einer Temperatur von  $23 \pm 1^\circ \text{C}$  gehalten. Zur Zeit der Würfe wurde die Temperatur auf  $25 \pm 1^\circ \text{C}$  erhöht. Der Raum wurde 12 Stunden am Tag im Dämmerlicht gehalten. Die Makrolonkäfige waren mit Plexiglaslaufrosten und -deckeln ausgestattet. Die Tiere wurden täglich gewogen und in einen frischen Käfig umgesetzt. Zum Decken wurde jedes Weibchen 7 Tage mit einem Bock zusammengesetzt.

### Reinigung und Zusammensetzung der Diät

Die Diät setzte sich aus Casein (20%), Stärke (30%), Saccharose (32.1%), Fett (8.7%), Cellulose (3%), Vitaminmischung (2%), Mineralstoffmischung (4%) und DL-Methionin (0.2%) zusammen. Zur Mineralstoff- und Vitaminmischung siehe REICHLMAYR-LAIS und KIRCHGESSNER (1981). Das Casein wurde in Anlehnung an eine Methode von PALLAUF und KIRCHGESSNER (1971) aus Magerquark hergestellt. Nach Zugabe von EDTA zur wässrigen Quarkmasse fällte man das Casein bei einem pH von 4.3 bis 4.1. Anschließend wurde das Casein mit dest. Wasser sowie Aceton und Methanol wiederholt gewaschen. Das Reinigen von Stärke und Cellulose erfolgte nach einer Methode von SCHNEGG (1975). Die Depletionsdiät wies eine Pb-Konzentration von  $18 \pm 5$  ppb auf, während die Kontrolldiät 1 ppm Blei als  $(\text{CH}_3\text{COO})_2 \text{Pb} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$  enthielt. Für die Muttertiere P<sub>1</sub> ab ca. 80 g Lebendmasse sowie für die F<sub>2</sub>-Generation betrug die Pb-Konzentration der Depletionsdiät  $30 \pm 5$  ppb.

### Statistische Auswertung

Die Auswertung der Daten erfolgte varianzanalytisch. Die Signifikanzen wurden mit Hilfe des multiplen t-Testes bestimmt. Die  $\pm$ -Werte stellen die jeweiligen Standardabweichungen der Einzelwerte dar.

## 3 Ergebnisse

Die Muttertiere P<sub>0</sub> aus der Depletions- und der Kontrollgruppe zeigten bis zu dem Tag, an dem ihre Jungen (F<sub>1</sub>-Generation) abgesetzt wurden, keine unterschiedliche Lebendmas-

scentwicklung. Auch das Geburtsgewicht der jungen Ratten der  $F_1$ -Generation war zwischen den beiden Gruppen nicht verschieden. Es betrug in der Depletionsgruppe  $6.3 \pm 0.4$  g ( $n = 22$ ) und in der Kontrollgruppe  $6.4 \pm 0.4$  g ( $n = 22$ ). Während der Säuzeit jedoch war die Entwicklung der Lebendmasse der jungen Ratten von den Depletionsmüttern im Vergleich zu denen der Kontrollmütter stets verlangsamt, so daß am Ende der Säuzeit (Absetztag) eine Gewichtsdepression von 11% resultierte ( $p < 0.025$ ). Dabei betrug am Absetztag die durchschnittliche Lebendmasse der Ratten aus der Depletionsgruppe  $37.7 \pm 6.1$  g und die der Ratten aus der Kontrollgruppe  $42.7 \pm 6.8$  g. Die Entwicklung der Lebendmasse dieser Ratten der  $F_1$ -Generation vom Wurfstag bis zum Absetztag ist in Abbildung 1 dargestellt. Durch weitere Depletion der abgesetzten Ratten bis zum 38. Lebenstag

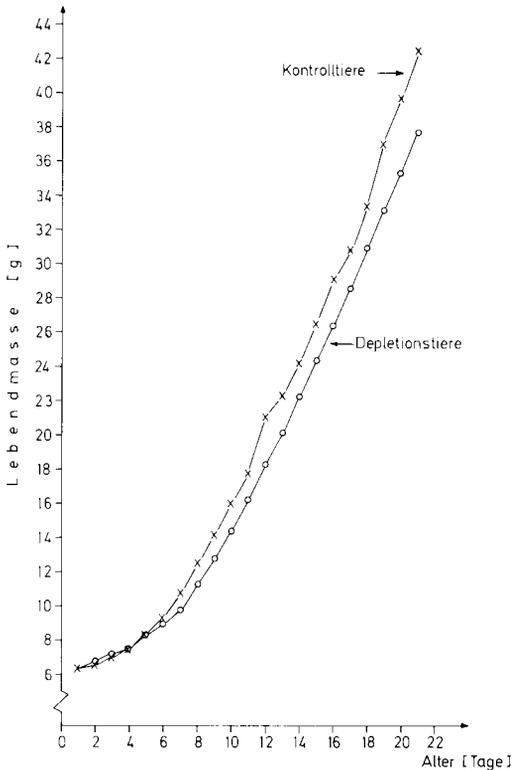


Abb. 1. Lebendmasseentwicklung junger Ratten der  $F_1$ -Generation vom Wurfstag bis Absetztag

verbessertes Wachstum erzielt werden (Abbildung 3). Im Alter von 29 Tagen lag die durchschnittliche Lebendmasse der Depletionstiere bei  $62.3 \pm 4.3$  g und die der Repletionstiere um 12% höher bei  $70.6 \pm 5.7$  g ( $p < 0.001$ ).

Im Überkreuzversuch verlief die Entwicklung der Lebendmasse bei den Ratten der vier Gruppen vom Wurfstag bis zum 16. Lebenstag ähnlich. Am 16. Lebenstag war dann eine Abnahme in der Lebendmasse bei den Tieren, die von der Depletionsmutter gesäugt wurden (Gruppen DD und DK), zu beobachten. Ab diesem Wachstumseinbruch verlief dann die Entwicklung der Lebendmasse der Ratten, die von der Depletionsmutter stammten und auch von ihr aufgezogen wurden (Gruppe DD), stets langsamer als bei den Ratten der an-

konnte die Gewichtsdepression erweitert werden. Die Entwicklung der Lebendmasse der Ratten vom Absetztag bis zum 38. Lebenstag ist in Abbildung 2 dargestellt. Am 38. Lebenstag betrug die durchschnittliche Lebendmasse der Ratten aus der Depletionsgruppe  $101.5 \pm 9.5$  g ( $n = 8$ ) und in der Kontrollgruppe  $126 \pm 11.8$  g ( $n = 10$ ). Der durchschnittliche tägliche Zuwachs in der Versuchsperiode Absetztag bis Schlachtung lag hier in der Depletionsgruppe bei 3.9 g und in der Kontrollgruppe bei 5.0 g. Demnach war das Wachstum Pb-depletierter Ratten um 22% reduziert ( $p < 0.001$ ).

Die Neugeborenen der  $F_2$ -Generation aus Depletions- und Kontrollgruppe zeigten ebenfalls kein unterschiedliches Geburtsgewicht. Es betrug in der Depletionsgruppe  $5.9 \pm 0.5$  g ( $n = 34$ ) und in der Kontrollgruppe  $5.9 \pm 0.4$  g ( $n = 44$ ).

Im Depletion-Repletion-Versuch konnte bei Ratten, die nach dem Absetzen repletiert wurden, im Vergleich zu den Depletionstieren ein

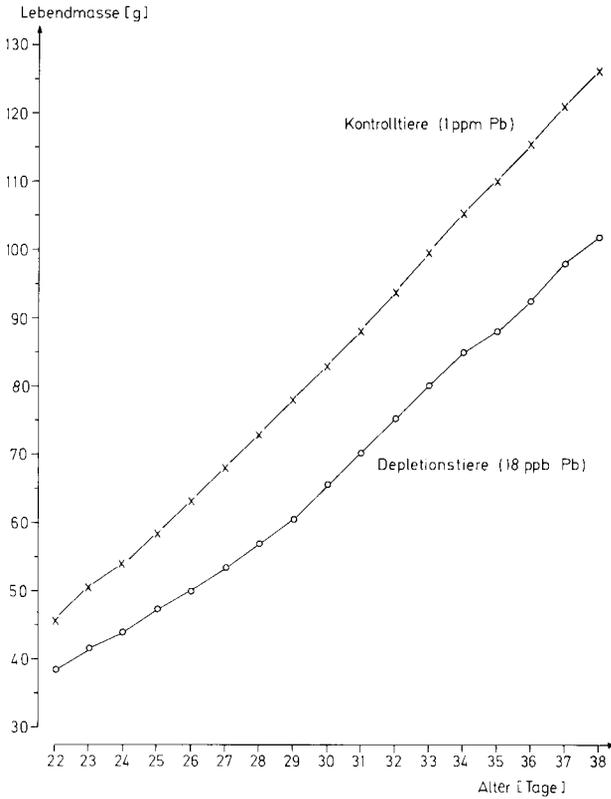


Abb. 2. Lebendmassentwicklung weiblicher Ratten der F<sub>1</sub>-Generation vom Absetztag bis zum Schlachttag

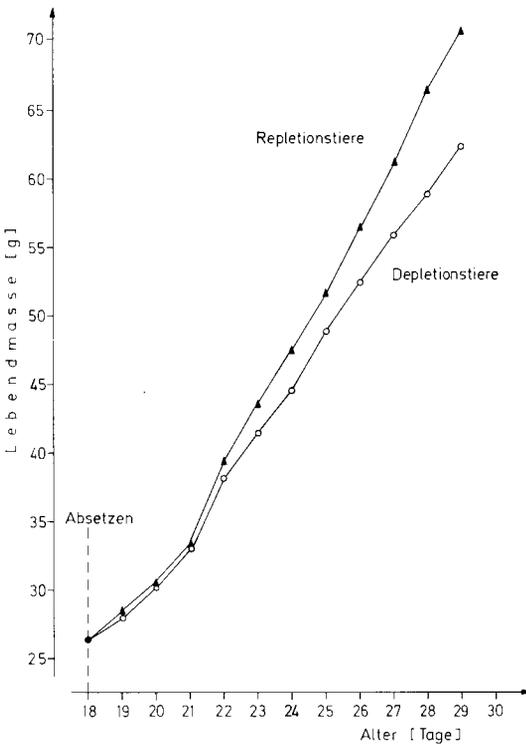
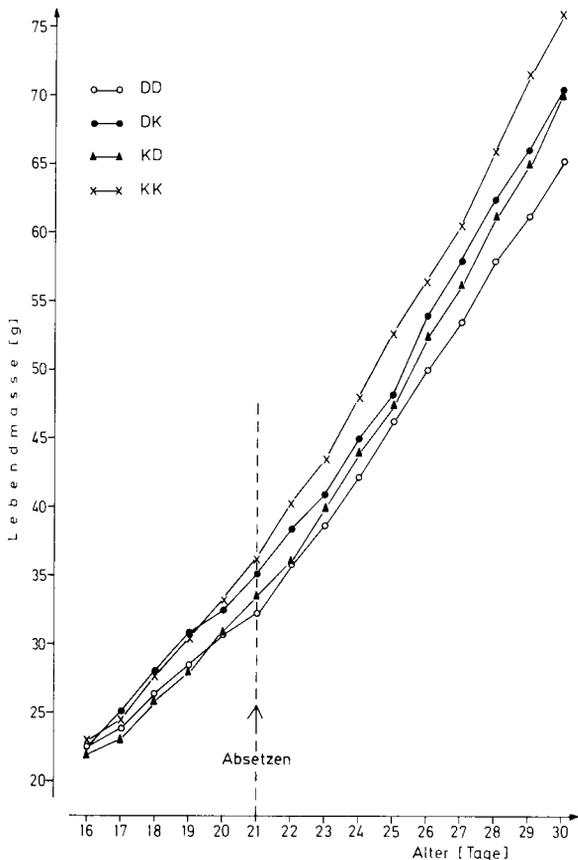


Abb. 3. Entwicklung der Lebendmasse der Ratten aus dem Depletion-Repletion-Versuch vom Absetztag bis Versuchsende



deren Gruppen (DK, KK, KD), während sich die Ratten, die von der Kontrollmutter stammten, jedoch von der Depletionsmutter gesäugt wurden (Gruppe DK), rasch erholten. Die Entwicklung der Lebendmasse dieser Tiere vom 16. Lebenstag bis zum Versuchsende ist in Abbildung 4 dargestellt. Am Versuchsende lag dann die durchschnittliche Lebendmasse der Tiere der Gruppe DD um ca. 15% unter der der Gruppe KK ( $p < 0.025$ ) und ca. 8% unter der der Gruppen KD und DK ( $p < 0.05$ ). Die durchschnittliche Lebendmasse der einzelnen Gruppen am Versuchsende gehen aus Tabelle 1 hervor.

Abb. 4. Entwicklung der Lebendmasse der Ratten aus dem Überkreuzversuch vom 16. Lebenstag bis Versuchsende

Tabelle 1

Lebendmasse 30tägiger Ratten aus dem Überkreuzversuch (F<sub>2</sub>-Generation)

Versorgung in der Fötalzeit → Säugezeit ↓	Depletion	Kontrolle
Depletion	-DD-	-DK-
	65.2	70.5
	± 7.1 (n = 5)	± 6.7 (n = 6)
Kontrolle	-KD-	-KK-
	69.8	76.0
	± 7.6 (n = 5)	± 6.8 (n = 6)

## 4 Diskussion

In früheren Depletionsversuchen konnten mit einer Depletionsdiät, deren Pb-Konzentration 45 ppb betrug, hämatologische Veränderungen an Ratten der  $F_1$ -Generation, deren Mütter zusätzlich depletiert wurden, induziert werden (REICHLMAYR-LAIS u. KIRCHGESSNER 1981). Gleichzeitig konnten Anhaltspunkte für eine homöostatische Regulation für Blei aufgezeigt werden. Diese Beeinträchtigungen der Funktionen des Stoffwechsels bei suboptimaler Pb-Versorgung sowie das Bestreben des Organismus nach Homöostase sprechen für die Essentialität von Blei. Der endgültige Beweis der Essentialität eines Elements ist jedoch erst dann erbracht, wenn bei mangelnder Zufuhr dieses Elements die Stoffwechselfvorgänge soweit gestört werden, daß auch ein vermindertes Wachstum als primäres Mangelsymptom resultiert.

Mit den vorliegenden Untersuchungen konnten erstmals experimentell Wachstumsdepressionen infolge unzureichender Pb-Versorgung mit einer Depletionsdiät, die 18 ppb Pb enthielt, an Ratten ausgelöst werden. Ein verzögertes Wachstum trat aber erst dann bei den Versuchstieren auf, wenn bereits die Mütter eine Pb-arme Diät erhielten. In der  $F_1$ -Generation war das Wachstum der jungen Ratten von Depletionsmüttern im Vergleich zu denen der Kontrollmütter während der gesamten Säugetzeit stets verlangsamt. Dies weist darauf hin, daß die Pb-depletierten Mütter bereits Veränderungen im Stoffwechsel aufweisen, die zu einer unvollständigen Versorgung der saugenden Ratten führen.

Die in der  $F_1$ -Generation beobachteten Wachstumsdepressionen bei Pb-depletierten Ratten konnten in der  $F_2$ -Generation reproduziert werden, sie traten jedoch in abgeschwächter Form auf. Der Grund dafür wäre bei der Depletionsdiät zu suchen, die für die Muttertiere  $P_1$  ab ca. 80 g Lebendmasse eine etwas höhere Pb-Konzentration in der Depletionsdiät aufwies. Möglicherweise stellten sich die Versuchstiere auch auf die niedrige Pb-Versorgung durch erhöhte Verwertung und verminderte Ausscheidung ein. Dies konnte beispielsweise für das Element Zink in Depletionsversuchen an Kühen aufgezeigt werden. Nach anfänglicher negativer Bilanz zeigten die Kühe im fortgeschrittenen Depletionsstadium sogar eine leicht positive Zn-Retention (KIRCHGESSNER und SCHWARZ 1976).

In einem Überkreuzversuch, für den jeweils die Hälfte der Würfe einer Depletions- und einer Kontrollmutter am Wurftag untereinander ausgetauscht wurden, zeigten diejenigen Ratten am Versuchsende die geringste Lebendmasse, die sowohl ante partum als auch post partum depletiert wurden (Gruppe DD). Mangelnde Pb-Versorgung erst ab der Geburt reichte dagegen nicht aus, um ähnliche Wachstumseinbrüche zu erzielen. Junge Ratten einer ausreichend mit Blei versorgten Mutter, die jedoch ab der Geburt von einer Pb-depletierten Mutter aufgezogen wurden (Gruppe DK), wiesen nämlich am Versuchsende eine höhere Lebendmasse auf als Ratten, die auch bereits in der fötalen Phase depletiert wurden (Gruppe DD). Dies dürfte ein Beweis dafür sein, daß bei den Nachkommen depletierter Mütter insgesamt weniger Blei gespeichert wird.

Durch Repletion von Ratten einer mangelnd mit Blei versorgten Mutter infolge Aufzucht über eine ausreichend mit Blei versorgten Mutter (Gruppe KD) erhöhten sich im Vergleich zu Ratten, die nach der Geburt weiterhin depletiert wurden (Gruppe DD), die Wachstumsraten, sie waren allerdings nicht so hoch wie bei Ratten, die bereits pränatal mehr Blei speichern konnten (Gruppe KK). Auch im Depletion-Repletion-Versuch konnte bei Tieren, die nach dem Absetzen repletiert wurden, im Vergleich zu ihren Geschwistertieren, die weiterhin depletiert wurden, ein verbessertes Wachstum beobachtet werden.

Aus dem Überkreuzversuch läßt sich ableiten, daß die Depletion während der fötalen Entwicklung der Ratten von entscheidender Bedeutung für das Auftreten von Pb-Mangelsymptomen ist, während die Versorgung mit der Milch Pb-depletierter Mütter in der Säugezeit eine geringere Rolle spielen dürfte. Der Depletionseffekt bei Foeten von unzureichend mit Blei versorgten Muttertieren bestätigt auch die Vermutung, daß bei diesen Muttertieren bereits Schäden im Stoffwechsel durch mangelnde Pb-Versorgung auftraten.

Insgesamt konnten in drei verschiedenen Versuchsansätzen durch mangelnde Pb-Versorgung bei Ratten Wachstumsdepressionen mehrfach reproduziert werden. Somit ist das Element Blei für ein optimales Wachstum unentbehrlich. Zulagen von Blei zur Depletionsdiät bewirken normale Wachstumsraten. Auch eine Repletion nach vorausgehendem Mangel führt zu einer Normalisierung des Wachstums. Verzögerungen des Wachstums infolge einer Depletion an Blei sowie Normalisierung des Wachstums nach Zulagen von Blei dürften als Beweis ausreichen, daß Blei für Wachstum und Stoffwechsel essentiell ist.

### Zusammenfassung

In einem Generationenversuch wurde untersucht, ob bei ausreichender Pb-Depletion Wachstumsdepressionen an Ratten induziert werden können. Zu diesem Zweck wurde durch Auswahl und Reinigung von verschiedenen Diätkomponenten eine Depletionsdiät von  $18 \pm 5$  ppb Blei hergestellt. Der Kontrolldiät wurde 1 ppm Blei zugelegt.

Wachstumsdepressionen infolge einer Pb-Depletion traten bei wachsenden Ratten der F<sub>1</sub>-Generation, deren Muttertiere bereits mangelnd mit Blei versorgt wurden, auf. Am Ende der Säugezeit lag die durchschnittliche Lebendmasse der Ratten Pb-depletierter Mütter um 11% niedriger als die der Ratten von Kontrollmüttern. Durch weitere Depletion nach dem Absetzen reduzierten sich die Wachstumsraten Pb-depletierter Ratten im Vergleich zu Kontrolltieren um 22%.

In der F<sub>2</sub>-Generation konnten die Wachstumsverzögerungen infolge unzureichender Pb-Zufuhr reproduziert werden. Außerdem konnte gezeigt werden, daß durch Repletion sich das Wachstum normalisierte. In einem Überkreuzversuch, für den jeweils eine Hälfte der Würfe einer Depletions- und einer Kontrollmutter am Wurfstag untereinander ausgetauscht wurden, konnte nachgewiesen werden, daß für die Ausprägung von Pb-Mangel bei Ratten von Depletionsmüttern die Fötalzeit entscheidend ist.

Insgesamt konnte somit durch diese Untersuchung die Essentialität von Blei für Wachstum und Stoffwechsel bewiesen werden.

### Summary

#### Essentiality of lead for growth and metabolism

In an experiment over generations it was tested whether growth depression could be induced in rats by severe Pb-depletion. For this purpose, a depletion diet was composed of selected and purified ingredients. The concentration of lead in this diet was  $18 \pm 5$  ppb. The control diet was supplemented with one ppm lead.

Growth depressions were ascertained in rats of the f<sub>1</sub>-generation whose mothers had already been supplied with suboptimal lead quantities. At the day of weaning the weight of rats from lead-depleted mothers averaged about 11% less than the weight of control rats.

Continued depletion after weaning led to growth rates which were about 22% reduced in comparison with control rats.

Growth depression as result of lead depletion could be reproduced in the  $f_2$ -generation. Moreover, a normalization of growth by repletion could be shown in a cross over experiment, in which one half of the litters of a lead-depleted mother and of a control mother were changed among one another at the day of birth, the fetal stage was shown to be decisive for the manifestation of lead deficiency in rats from a lead-depleted mother.

Altogether, the experiments demonstrate the essentiality of lead for growth and metabolism.

### Literatur

1. KIRCHGESSNER, M.; SCHWARZ, W. A., 1976: Arch. Tierernährg. **26**, 3 – 16.
2. PALLAUF, J.; KIRCHGESSNER, M., 1971: Tierphysiol., Tierernährg. u. Futtermittelkde. **28**, 128 – 139.
3. REICHLMAYR-LAIS, ANNA M.; KIRCHGESSNER, M., 1981: Arch. Tierernährg. im Druck.
4. SCHNEGG, A., 1975: Dissertation, TU München.

*Anschrift d. Autoren:* Institut für Ernährungsphysiologie d. TU München,  
D-8050 Freising-Weihenstephan