

Aus dem Institut für  
Physiologie, Physiologische Chemie und Tierernährung  
der Tierärztlichen Fakultät der Universität München

Geschäftsführender Vorstand:

Prof. Dr. H.-J. Gabius

Anfertigung unter der Leitung von

Priv.-Doz. Dr. Dr. R. G. Erben

**Langzeitversuch zur Knochenwirkung einer marginalen Zink-  
Versorgung an adulten Ratten**

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde  
der Tierärztlichen Fakultät  
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Von

Katja Lausmann  
aus Marbach

München 2004

Gedruckt mit der Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät  
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Dekan: Univ.-Prof. Dr. A. Stolle

Referent: Priv.-Doz. Dr. Dr. R.G. Erben

Koreferent: Priv.-Doz. Dr. A. Höflich

Tag der Promotion: 13. Februar 2004



## Inhaltsverzeichnis

	<b>Inhaltsverzeichnis</b> .....	I
	<b>Abbildungsverzeichnis</b> .....	IV
	<b>Tabellenverzeichnis</b> .....	IV
1	<b>Einleitung</b> .....	1
2	<b>Literaturübersicht</b> .....	3
2.1	Zink.....	3
2.1.1	Funktionen.....	3
2.1.2	Homöostase und Verteilung.....	5
2.1.3	Absorption und Transport.....	7
2.1.4	Sekretion und Ausscheidung.....	9
2.1.5	Zink und Knochen.....	11
2.2	Zinkbedarf.....	12
2.3	Zinkmangel.....	13
2.3.1	Bedeutung.....	13
2.3.2	Ursachen und Auswirkung.....	14
2.3.3	Zinkmangel und Osteoporose.....	16
2.4	Ratte als Versuchstier.....	18
2.5	Ziel des Versuches.....	18
3	<b>Material und Methoden</b> .....	20
3.1	Tiere und Haltung.....	20
3.2	Versuchsanordnung.....	22
3.3	Biochemische Parameter des Knochenstoffwechsels.....	24
3.3.1	Serumparameter.....	24
3.3.2	Urinparameter.....	25
3.4	Knochenzinkgehalt.....	26
3.5	Histologische Aufarbeitung des Knochengewebes.....	26

3.5.1	Präparation , Fixierung, Entwässerung des Knochens.....	26
3.5.2	Infiltration und Einbettung.....	26
3.5.3	Herstellung der Knochenschnitte.....	27
3.5.4	Färbung der Knochenschnitte.....	27
3.6	Knochenmineraldichte (pQCT).....	29
3.7	Histomorphometrische Messung.....	30
3.7.1	Strukturelle statistische Parameter .....	31
3.7.2	Zelluläre statistische Parameter .....	32
3.7.3	Dynamische Parameter.....	33
3.8	Statistik.....	33
4	<b>Resultate</b> .....	35
4.1	Allgemeinzustand der Ratten.....	35
4.2	Futteraufnahme.....	35
4.3	Gewichtsentwicklung.....	36
4.4	Serumwerte.....	38
4.5	Urinparameter.....	40
4.6	Knochenzinkgehalte.....	42
4.7	Knochenmineraldichte .....	43
4.8	Histomorphometrische Ergebnisse.....	46
4.8.1	Strukturelle statische Parameter .....	46
4.8.2	Zelluläre statische Parameter .....	48
4.8.3	Dynamische Knochenparameter.....	49
5	<b>Diskussion</b> .....	51
5.1	Die Zink-Depletionsmethode.....	51
5.2	Zinkmangel und Futteraufnahme.....	53
5.3	Monitoring des Zinkmangels im Serum.. ..	54
5.4	Zinkmangel und Knochenstoffwechsel.....	56
6	<b>Zusammenfassung</b> .....	63

7	<b>Summary</b> .....	65
8	<b>Literaturverzeichnis</b> .....	67
9	<b>Danksagung</b> .....	75

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 3.1 - Futterkomponenten.....	21
Tabelle 3.2 - Versuchsplan.....	22
Tabelle 4.3 - Gewichtsentwicklung.....	36
Tabelle 4.4 - Ergebnisse der Serumauswertung.....	38
Tabelle 4.5 - Ergebnisse der Urinauswertung.....	40
Tabelle 4.6 - Ergebnisse der Analyse des Zinkgehalts des Femurs.....	42
Tabelle 4.7-1 - Knochenmineraldichte im 4. Lendenwirbel.....	43
Tabelle 4.7-2 - Knochenmineraldichte in der proximalen Tibia.....	43
Tabelle 4.7-3 - Knochenmineraldichte in der distalen Tibia.....	44
Tabelle 4.7-4 - Knochenmineraldichte des Tibiaschaftes.....	44
Tabelle 4.8-1 - Strukturelle statische Parameter der Tibia.....	46
Tabelle 4.8-2 - Strukturelle statische Parameter des ersten Lendenwirbels.....	47
Tabelle 4.8-3 - Zelluläre statistische Parameter des ersten Lendenwirbels.....	48
Tabelle 4.8-4 - Ergebnisse der Auswertung der dynamischen Knochenparameter.....	49

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 2.1.2 - Zinkverteilung im Körper.....	6
Abbildung 4.3 - Gewichtsentwicklung.....	37
Abbildung 4.4-1 - Verlauf der Aktivität der alkalischen Phosphatase im Serum.....	39
Abbildung 4.4-2 - Verlauf der Zinkkonzentration im Serum.....	40
Abbildung 4.5 - Verlauf der DPD- Ausscheidung.....	41
Abbildung 4.7-1 - Verlauf der trabekulären BMD des 4. Lendenwirbels....	45
Abbildung 4.7-2 - Verlauf der trabekulären BMD der proximalen Tibia.....	45
Abbildung 4.8-1 - Verlauf der Bone area der proximalen Tibia.....	47
Abbildung 4.8-2 - Verlauf der Bone area des ersten Lendenwirbels.....	47





## 1 Einleitung

Zink ist ein essentielles Spurenelement und wird von jeder Körperzelle als unabdingbarer Bestandteil wichtiger Metalloenzyme und Enzymkomplexe zur Aufrechterhaltung des Zellstoffwechsels benötigt (Kirchgessner et al., 1983). Ein latenter, chronischer Zinkmangel ist bei älteren Menschen in westlichen Ländern häufig anzutreffen (Sandstead & Smith, 1996). Eine Untersuchung aus dem Jahre 2000 in den USA zum Beispiel zeigte, dass sowohl die Kupfer-, als auch die Zinkaufnahme bei Männern und Frauen zwischen dem 60. und 90. Lebensjahr als suboptimal zu bezeichnen sind (Ma & Betts, 2000). Erschwerend kommt hinzu, dass bei älteren Menschen die Fähigkeit der Zinkabsorption aus dem Darm im Vergleich zu jüngeren deutlich geringer ist (Turnlund et al., 1986; Ali et al., 1998).

Osteoporose ist eine sehr häufig vorkommende Knochenerkrankung bei älteren Menschen und auf Grund der Altersstruktur der Bevölkerung in den westlichen Industriestaaten wird diese Krankheit zu einem wachsenden volkswirtschaftlichen Problem. Untersuchungen von Heaney (1986) besagen, dass der Verlust an Knochenmasse im Alter von 35 Jahren beginnt und jährlich um 0,3 – 0,6 % fortschreitet. Bei Frauen in den Jahren um die Menopause steigt sich diese Zahl auf 2 - 5%. Eine Reihe von klinischen, tierexperimentellen und In vitro-Untersuchungen hat nun nahe gelegt, dass Zinkmangel auch ein Risikofaktor in der Pathogenese von Osteoporose sein könnte. So beschäftigte sich zum Beispiel eine Studie am Menschen mit der Frage, wie sich eine Zinksubstitution auf eine bereits bestehende Osteoporose auswirkt (Saltman & Strauss, 1993). Dort wurde die Knochenmineraldichte bei postmenopausalen Frauen untersucht, welche gruppenweise mit einem Placebo, mit Kalzium, mit einem Kupfer/Zink/Mangan-Gemisch bzw. mit einem Kupfer/Zink/Mangan/Kalzium-Gemisch supplementiert wurden. Die Knochenmineraldichteabnahme war bei der mit dem Placebo versorgten Gruppe am größten, gefolgt von der Kupfer/Zink/Mangan-Gruppe. Noch geringer war der Mineraldichteverlust in der mit Kalzium supplementierten Gruppe. Bei den Frauen, die das Kupfer/Zink/Mangan/Kalzium-Gemisch zu sich nahmen, konnte sogar eine Zunahme der Knochenmineraldichte erreicht werden.

Über die Bedeutung von Zink für den Knochenstoffwechsel sind bereits zahlreiche In vivo- und In vitro-Untersuchungen durchgeführt worden. Als gesichert gilt, dass Zink im wachsenden Organismus im Knochenstoffwechsel eine wichtige Rolle spielt. Tierversuche über Zinkmangel und dessen Auswirkungen wurden größtenteils an Ratten durchgeführt, die Absatztiere waren oder sich zumindest noch im raschen Wachstum befanden. In diesem Alter sind die Effekte der verminderten Zinkversorgung drastisch. Sie äußern sich v.a. in Appetitverlust (Chesters & Quaterman, 1970), Wachstumsretardierung (Williams & Mills, 1970),

Osteopenie (Eberle et al., 1999) und in einer Abnahme im Asche- und Zinkgehalt des Knochens (Roth & Kirchgessner, 1979). Außerdem kam es unter einer mangelhaften Zinkversorgung zu Veränderungen in der Morphologie der Chondrozyten, was sich negativ auf die Entwicklung der Wachstumsfuge auswirkt (Suwarnasarn et al., 1982; Follis et al., 1941). In weiteren Experimenten konnte durch Gabe von  $\beta$ -Alanin-Histidin-Zink der Knochenschwund in Östrogen-defizienten, ovariectomierten Ratten gänzlich verhindert (Yamaguchi, 1995) und die osteoblastäre Matrixsynthese *In vitro* stimuliert werden (Yamaguchi et al., 1987 und 1988).

Allerdings wurden nur wenige Zinkmangel-Studien an älteren Ratten durchgeführt, deren Wachstum bereits weitgehend abgeschlossen war. Ebenso liegen kaum Langzeit-Zinkmangel-Untersuchungen an Ratten vor. In einem dieser Zinkmangelversuche an ausgewachsenen Ratten konnte unter extremen Mangelbedingungen eine Verminderung des Zinkgehaltes des Skeletts, nicht jedoch der Skelettmasse festgestellt werden (Windisch & Kirchgessner, 1999b). In einem anderen Experiment an adulten Ratten, in dem die Entwicklung des Rattenknochens zwischen der ersten und der 52. Lebenswoche untersucht wurde, konnte eine Reduktion des Knochenstoffwechsels mit zunehmendem Alter festgestellt werden, nicht jedoch eine Abnahme im Zinkgehalt des Knochens (Yamaguchi et al., 1989a). Durch Gabe von Zink und 1,25-Dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> kam es zu einer Aktivierung der Knochenbildung.

Bezüglich der Rolle von Zink für den Knochenstoffwechsel und für die Pathogenese der Osteoporose und anderer Knochenkrankheiten besteht also noch erheblicher Forschungsbedarf. Dazu sollte die vorliegende Studie einen Beitrag leisten. Im Rahmen dieses Experiments sollten erstmals die Langzeitauswirkungen einer marginalen Zinkversorgung auf den Knochenstoffwechsel von ausgewachsenen, 9 Monate alten weiblichen Fischer 344-Ratten untersucht werden. Dabei kamen klinisch-chemische, histomorphometrische und knochen-densitometrische Auswert-Techniken zur Anwendung.

## 2 Literaturübersicht

### 2.1 Zink

#### 2.1.1 Funktionen

Zink in reiner Form ist ein bläulich glänzendes Schwermetall. Im Periodensystem der Elemente besitzt es die Ordnungszahl 30. Das Kation gehört zu den essentiellen Spurenelementen. Nach Eisen ist es das zweitwichtigste Spurenelement im tierischen und menschlichen Organismus nach Eisen. Zink ist unentbehrlich für den Stoffwechsel von Pflanze, Tier und Mensch. Der Körper eines Erwachsenen enthält 15-30 mmol (1-2 g) des Mineralstoffs (Brätter, 2002), allerdings liegt es nicht gleichmäßig verteilt vor. Augen, Hoden, Leber, Knochen, Pankreas und Haare weisen die höchsten Zinkkonzentrationen auf (Jackson, 1989). Beim Tier verhält es sich ähnlich. Hier befinden sich ebenfalls die höchsten Konzentrationen in Auge, Hoden, Leber, Pankreas, Knochen und den Haaren (Kirchgessner, Tierernährung, 1997).

Die Funktionen von Zink im Körper sind so komplex wie vielseitig. Von den anderen Spurenelementen unterscheidet es sich schon auf chemischer Basis. Auf Grund seiner Elektronenkonfiguration ist es zweiwertig, besitzt keine magnetischen oder optischen Eigenschaften, hat keine Ligandenfeldstabilisierungsenergie und keine Redoxaktivität. Aus diesen Gründen ist das Spurenelement ein sehr geeigneter und deshalb unabdingbarer Bestandteil von mehr als 200 Enzymen. Grosse Bedeutung hat Zink auf katalytischer, struktureller und/oder regulatorischer Basis. Zink ist in allen 6 Enzymklassen anzutreffen. Zink findet sich u.a. in der Carboanhydrase, der Carboxypeptidase, der Aspartattrans-Carbamylase, der Alkoholdehydrogenase, der Superoxiddismutase, der Glutamatdehydrogenase, DNS- und RNS-Polymerase, der Ribonuklease und der reverse Transkriptase (Stryer, 1996). Nicht zuletzt ist Zink ein wichtiger Bestandteil der alkalischen Phosphatase (ALP), wo es zum einen die Enzymstruktur selbst stabilisiert, zum anderen wichtig ist für deren katalytische Aktivität (Friedberg, 1974; Petering et al., 1971).

Die ALP ist im Körper weit verbreitet, Hauptvorkommen sind Leber, Gallenblase und -gänge, Dünndarm und Knochen (Knochenzellen). Eine hohe ALP-Konzentration haben auch die Geschmacksknospenmembranen (Lum & Henkin, 1976). Das Enzym stellt einen sensitiven Indikator für den Zinkstatus des Körpers dar, da es im Vergleich zum Serumzink schneller und einfacher messbar und in der Diagnose sicherer ist. Die Messbreite der ALP-Aktivität zwischen

nicht ausreichender Versorgung und ausreichender Versorgung ist höher als die von Zink und deshalb stellt die ALP eine exaktere Messgröße dar, welche eine Aussage über die tatsächliche im Stoffwechsel verfügbare Zinkkonzentration zulässt (Roth & Kirchgessner, 1979)

Zink übernimmt im Nucleinsäurestoffwechsel wichtige Funktionen. Es stabilisiert die Strukturen der DNS (Shin & Eichhorn, 1968), der RNS (Wacker & Valbee, 1959) und der Ribosomen (Prask & Plocke, 1971). Außerdem sind viele Metalloenzyme des Nucleinsäure-Stoffwechsels zinkabhängig (s.o.).

Zink hat aller Wahrscheinlichkeit nach kontrollierende Funktion bei der Zellapoptose (Hambidge, M. et al., 2000 ; Zalewski et al., 1994) und wirkt stabilisierend und protektiv auf Zellmembranen.

Außerdem ist das Spurenelement wichtig für die intakte zelluläre und humorale Immunabwehr. Die Auswirkungen einer suboptimalen Zinkversorgung sind für die Immunabwehr drastischer als für die verschiedenen Gewebe und Organe. Bei vielen Krankheiten ist ein reduzierter Zinkserumspiegel vorzufinden wie z.B. bei Pneumonien, Sepsis, Pilzinfektionen, AIDS und vielen anderen Infektionskrankheiten (Fraker et al., 2000). Darüber hinaus arbeitet das Immunsystem mit Enzymen, die überdurchschnittlich häufig zinkabhängig sind. Zink beeinflusst das Verhältnis von Helfer- und Suppressorzellen. Es trägt indirekt dazu bei, die Lymphokinproduktion zu erhöhen, indem es eine reduzierte Mitogenstimulierbarkeit der Lymphozyten erhöht. Es fördert die Lymphoblastendifferenzierung durch seine katalytische Funktion für die DNS-Transferase und stimuliert eine herabgesetzte Phagozytosefähigkeit der Makrophagen (Holtmeier & Kruse-Jarres, 1991). Unter Zinkmangel kommt es bei Mensch und Tier zu Thymusatrophie, Lymphopenie und zu einer Beeinträchtigung der zell- und antikörpermedierten Immunantwort. Außerdem wird vermutet, dass Zinkmangel zu einer chronisch gesteigerten Glukokorticoideausschüttung führt (Fraker et al., 2000).

Auch der Keratinisierungsprozess der Haut ist zinkabhängig. Die Epidermis weist einen relativ hohen Zinkgehalt auf, welcher sich im Filagin der Keratohyalin granula und in der hier reichlich vorkommenden alkalischen Phosphatase befindet. Deswegen ist Zinkmangel auch häufig mit Dermatosen assoziiert, wie z.B. mit Wundheilungsstörungen sowie erosiven, krustösen und pustulösen Veränderungen an Körperöffnungen, Akren und Beugefalten (Holtmeier, 1991). Das bekannteste Beispiel für die Zinkmangeldermatose ist die Acrodermatitis enteropathica.

Es ist auch gezeigt worden, dass Zink im Gehirn modulierende Funktion auf verschiedene Neurotransmitter hat, u.a. GABA und Glutamat (DeCastro, 2002 )

Eine ganze Reihe von Studien haben dar gelegt, dass Zink wichtige endokrine Funktionen beeinflusst, wie z.B. die Hormone Insulin (Roth et al., 1975) und das Wachstumshormon GH (Roth & Kirchgessner, 1982). Zink soll auch Einfluss auf männliche Sexualhormone haben (Mahajan et al., 1982). Auch der auf die Osteoblasten stimulierend wirkender Effekt von Östrogenen konnte bei In vivo- und bei In vitro-Untersuchungen durch Zinkzugabe gefördert werden (Yamaguchi & Yamaguchi, 1986; Yamaguchi & Kitajima, 1991).

Auch der Insulin-like growth Factor 1 (IGF-1) der Osteoblasten soll vom Zink stimulierend moduliert werden. IGF-1 hat starken Einfluss auf die Zunahme von Protein, DNA-Gehalt in Zellen und auf die Anzahl der Zellen selbst. Unter Anwesenheit von Zink werden diese stimulativen Effekte verstärkt (Matsui & Yamaguchi, 1995). GH und IGF-1 können durch Zinkmangel beeinflusst werden. Roth & Kirchgessner (1982) konnten unter Zinkmangel eine verminderte GH-Ausschüttung aus der Hypophyse feststellen. GH wiederum stimuliert bei Ratten die Sekretion von IGF-1 in der Leber (Ohlson et al, 1998) .

Die Bedeutung von Zink für den Knochenstoffwechsel wird in Abschnitt 2.1.5 besprochen.

### 2.1.2 Homöostase und Verteilung

Der Organismus ist in der Lage, über körpereigene Regulationsmechanismen die Zinkhomöostase in einer verblüffend flexiblen Weise zu verwalten. Für kein anderes Spurenelement existiert ein derartiger Regulationsmechanismus. Selbst bei einer 10-fachen Variation der Zinkzufuhr bei juvenilen Ratten konnte lange Zeit ein konstanter Gesamtzinkgehalt im Körper aufrecht erhalten werden (Kirchgessner, 1993); Studien am Menschen führten zu gleichen Ergebnissen (Johnson et al., 1993).

In Abschnitt 2.1.4 wird hierauf noch genauer eingegangen.

Zink verteilt sich im Organismus nicht gleichmäßig. Wie bereits oben erwähnt, weisen Augen, Hoden, Leber, Knochen, Pankreas und Haare die höchsten Zinkkonzentrationen auf, wobei sich insgesamt ca. 57 % in der Skelettmuskulatur und 29 % im Knochen befinden; 6 % sind in der Haut , 5 % in der Leber, die restlichen 2 % verteilen sich auf andere Gewebe (Jackson, 1989).

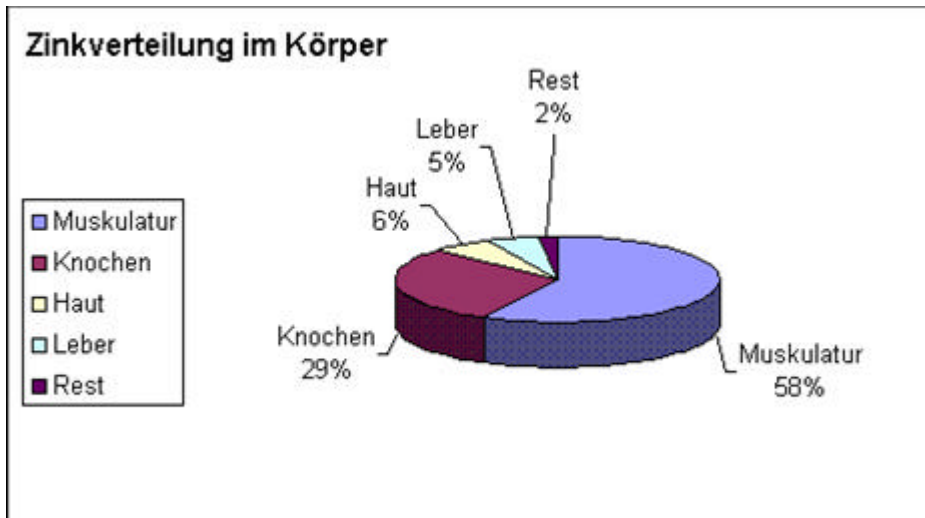


Abb. 2.1.2 –Zinkverteilung im Körper

Sowohl der tierische als auch der menschliche Körper legen sich im Vergleich zu anderen Mineralien wie Eisen, Kalzium und Jod nur verhältnismäßig geringe Zinkreserven an. Schon bei einem Verlust von 2,5 - 5 % des Gesamtzinkgehaltes des Körpers zeigen sich nach wenigen Tagen die für Zinkmangel typischen Symptome (King J, 1990).

Die verschiedenen zinkhaltigen Organe lassen sich einteilen in solche, die bei Zinkmangel sehr schnell diese Zinkreserven verlieren bzw. abgeben und solche, die über eine längere Zeit ihre, wenn auch nur geringen Zinkgehalte, trotz verminderter Versorgung kaum verändern. Die Zinkkonzentration im Muskel blieb in einem Zinkmangelexperiment bei zinkdefizienten wachsenden Ratten weitgehend konstant, während die Zinkgehalte von Knochen, Leber und Plasma fielen (Jackson MJ, 1982), (Giugliano & Millward, 1984).

So teilte Janet King 1990 auf einem Symposium des American Institute of Nutrition die Gewebe ein in „zinc high- „ und „low-priority tissues“. Zu ersteren zählt sie Muskulatur und Haut, welche bei verminderter Zinkzufuhr von den „low-priority-Geweben“ wie Knochen, Plasma und Leber mit Zink versorgt werden, was zu einer Abnahme des Zinkgehaltes der „low-priority-Gewebe“ führt. Eine Studie an Ratten belegte sogar, dass Zinkmangeltiere ihre Muskelmasse und deren Zinkgehalte, sowie die Zinkgehalte von Leber und Hoden im Vergleich zu einer Baselinegruppe erhöhen konnten, während v.a. der Knochen, aber auch Dünndarm, Thymus und Plasma die in etwa gleiche Menge an Zink verloren (Giugliano & Millward, 1984).

Das Plasma dient den verschiedenen Körpergeweben als Zink-Austausch-Medium, welches selber über große unterschiedliche Zinkversorgungslagen des Körpers einen relativ konstanten

Zinkgehalt aufrecht erhält. Das Plasma transportiert das Spurenelement von den „low-„ zu den „high-priority-Geweben“ und kann dadurch deren Gewebefunktion auch in Zeiten schlechter Zinkversorgung lange aufrecht erhalten. Nur eine chronisch marginale Zinkversorgung bzw. ein starker Einbruch oder verminderte Zinkzufuhr in Zeiten erhöhten Bedarfs (wie Laktation oder Wachstum) kann zu einem Abfall des Plasmazinkgehaltes führen. Zumindest beim Menschen sind alleinige physiologische Anzeichen, die für eine Zinkmangelsituation des Körpers sprechen oder alleinige Veränderungen im Zinkgehalt verschiedener Gewebe nicht ein Beweis für einen Zinkmangel, bis nicht auch das Plasma einen Abfall in der Zinkkonzentration vorweist (King et al., 2000).

Wichtigster Regulator des Zinkhaushaltes ist der Gastrointestinaltrakt. Durch seine schnelle Adaptionfähigkeit an eine schwankende Zinkzufuhr stellt er ein einzigartig flexibles Stellglied in der Zinkhomöostase des Organismus dar. Dies soll im Folgenden besprochen werden.

### 2.1.3 Absorption und Transport

Zink wird vorwiegend mit der Nahrung aufgenommen. Zinkreiche Nahrungsmittel sind Austern, Weizenkeime, Pinienkerne, Linsen, Haferflocken, Meeresfrüchte, Seefisch, Leber und Fleisch. Seine Absorption findet vorwiegend im mittleren Dünndarmabschnitt statt. Das Ileum hat die größte Zinkabsorptionskapazität (Antonson et al., 1979)

Für die Resorption aus dem Darm stehen sowohl passive, als auch aktive Transportmechanismen zur Verfügung. Ein erster wichtiger Schritt der erfolgreichen Resorption ist die Freisetzung von Zink aus der Matrix der Nahrung. Deshalb ist die Verdauung der Moleküle an die das Spurenelement gebunden ist, ganz entscheidend. Daneben spielt die Art bzw. die Löslichkeit der Salze, die vom pH-Gradienten im Darm abhängig ist, eine wichtige Rolle: Zink-Sulfat und -Acetat werden besser aufgenommen als Zink-Oxid oder -Carbonat, da diese schwer löslich sind.

Liganden mit geringem Molekulargewicht wie das EDTA, Aminosäuren (z.B. Histidin, Cystein) und organische Säuren (z.B. Citrat) sollen die Bioverfügbarkeit des Zink ebenfalls verbessern (Pabon & Lönnerdeal, 1992). Sie binden Zink, entziehen es dadurch einer Komplexbildung mit Phytat und können als Gesamtkomplex resorbiert werden.

Eine besondere Bedeutung kommt den sich in der Nahrung befindlichen Inhibitoren der Zinkresorption zu. Phytat, Cellulose und Hemizellulose können die Aufnahme des Zink aus dem Darm negativ beeinflussen. Auf die Wirkung des Phytat soll in Abschnitt 2.1.4 noch genauer eingegangen werden. Auch einige Ionen können die Zinkabsorption negativ beeinflussen, wie

Kalzium (in Kombination mit Phytat), Kadmium, Phosphor, Magnesium, Eisen in hoher Dosis und vermutlich auch Kupfer.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass der Menschen Zink aus tierischen Nahrungsmitteln besser verwertet als aus pflanzlichen (O`Dell et al, 1972).

Nachdem Zink aus der Nahrung in Lösung gegangen ist, bildet es Komplexe mit Phosphaten, Aminosäuren und anderen organischen Säuren. Es kommt zu einem Influx in die Enterozyten und durch die basolaterale Membran gelangt es schließlich in den Portalkreislauf. Da Zinkionen hydrophil sind, können sie Zellmembranen nicht durch passive Diffusion passieren. Für den zellulären In- und Efflux stehen verschiedene Transporter zu Verfügung. Ihre genaue Funktion im Zinktransport ist noch nicht gänzlich geklärt. Man kennt einige wenige dieser Zinktransporter und weiß, dass sie teilweise durch die Zinkversorgung selbst reguliert werden und dass sie mehr oder weniger spezifisch in den einzelnen Geweben vorzufinden sind. So befindet sich der Zinktransporter-2 z.B. nur in Dünndarm, Niere, Hoden und Plazenta und in einigen Fällen auch in der Leber, wohingegen der Zinktransporter-1 ubiquitär auch in den Villi des proximalen Dünndarms zu finden ist. (McMahon & Cousins, 1998). Der Zinktransporter-3 kommt in Hoden und Gehirn vor (Cousins & McMahon, 2000). In einer Untersuchung von Dufner-Beattie et al. (2003) wurde von einem weiteren Transporter, dem Zinktransporter-4 berichtet, der wahrscheinlich für den Zinktransport in die Milchdrüse zuständig ist. Dessen fehlende Expression wird mit Acrodermatitis enteropathica in Verbindung gebracht.

Außerdem wird vermutet, dass der Eisentransporter DCT-1, ein transmembranales Polypeptid, für eine Beteiligung am Zinktransport in Frage kommt (McMahon & Cousins, 1998).

Den Weg durch das Portalblut zur Leber legt Zink an Transferrin gebunden zurück. Danach übernehmen hauptsächlich Albumin und in geringerem Ausmaß auch  $\alpha_2$ -Makroglobulin den Transport. Diese Transportproteine geben den größeren Teil ihrer Last an das sich intrazellulär befindliche Speicherprotein Metallothionein ab, das wiederum Zink bei Bedarf schnell an die Transportproteine des Blutes abgeben kann.

Wie bereits oben erwähnt, stellt der Darm den zentralen Pfeiler der körpereigenen Zinkhomöostase dar. Schwankungen in der täglichen oralen Zinkzufuhr können dadurch weitgehend ausgeglichen werden.

So fiel in einer Studie an Ratten, welche eine völlig zinkfreie Diät erhalten hatten, die Absorptionsrate von 100 % auf ca. 55 % als man die Zinkzufuhr schrittweise auf 7  $\mu\text{mol/d}$  erhöhte. Gleichzeitig stieg die endogene Zinkexkretion um das 30-fache (Weigand &



Kirchgessner, 1978). Studien am Menschen zeigten ähnliche Adaptionsfähigkeiten des Darms: Taylor et al. (1991) stellten fest, dass bei einer Reduktion der oralen Zinkversorgung von 85 auf 12  $\mu\text{mol/d}$  die Zinkabsorption aus dem Darm um 93 % gesteigert werden konnte.

#### 2.1.4 Sekretion und Ausscheidung

Die Zinkausscheidung findet zu 90 % über den Darm statt. Wie bereits oben erwähnt, ist dieses Organ bezüglich der Adaptionsfähigkeit an die Zinkzufuhr sehr flexibel. Bei den Zinkverlusten über den Darm handelt es sich jedoch nicht ausschließlich um mit der Nahrung zugeführtes Zink, auch endogenes Zink kann über die Fäzes ausgeschieden werden; die Menge ist abhängig vom Zinkstatus des Körpers.

Grund hierfür ist die Existenz einer besonderen Zinkzirkulation in bzw. aus dem Darm. Im Rahmen dieses Zink-Zirkulationsmechanismus wird endogenes Zink in relativ großen Mengen in den Darm sezerniert. Quellen dieses körpereigenen Zinks sind Pankreas- und Gallensaft und gastroduodenale Sekrete. Es vermischt sich mit dem Zink der Nahrung. Ein Teil dieses Zinkgemisches wird schließlich wieder absorbiert, der andere Teil wird mit den Fäzes ausgeschieden (Windisch & Kirchgessner, 1999-a; Finley et al., 1994; Van Wouwe & Uilenbroek, 1994-b; Oberleas, 1996). Kommt es zu einer negativen Zinkbilanz im Körper, kann dieses endogene Zink wieder gänzlich absorbiert werden. Bei normaler Zinkversorgung werden bei der Ratte ca. 150  $\mu\text{g}$  Zink pro Tag in den Darm sezerniert (Windisch & Kirchgessner, 1995). In einem anderen In vivo-Versuch an adulten Ratten mit ausreichender Zinkversorgung waren 40 % des im Kot gefundenen Zinks endogenen Ursprungs (Windisch & Kirchgessner, 1999-a). Wahrscheinlich wird ca. ein Drittel dieses sezernierten Zinks wieder absorbiert. Dies war in einem In vitro-Experiment an Rattendärmen der Fall (Davies & Nightingale, 1975).

Genau dieses Zirkulationssystem macht sich die von Windisch & Kirchgessner etablierte Zink-Depletionsmethode zu Nutze, welche im vorliegenden Experiment angewandt wurde, und zwar mit einer zinkarmen Diät, der Phytat in hoher Menge zugesetzt wird. Dadurch kann auch das körpereigene Zink zur Ausscheidung gebracht werden (Windisch & Kirchgessner, 1999-a).

Bei Phytat (Inositolhexaphosphat) handelt es sich um ein Molekül, welches unter den pH-Bedingungen im Dünndarm in der Lage ist, eine schwerlösliche und von höheren Organismen kaum zu spaltende Verbindung zu bilden. Diese Fähigkeit des Phytats zur Komplexbildung wird durch Anwesenheit von Kalzium und vermutlich auch durch Magnesium noch verstärkt (Forbes et al., 1984). Die entstehenden Komplexe sind nicht aus dem Darm resorbierbar und verhindern auf diese Weise eine Zinkresorption je nach molarem Phytat/Zink- oder Phytat/Kalzium/Zink-

Verhältnis (Morris & Ellis, 1989) bzw. Phytat/Magnesium/Zink-Verhältnis. Die Zinkausscheidung wird dadurch stark gefördert (Davis & Nightingale, 1975).

Phytat kommt v.a. in getreidehaltigen Nahrungsmitteln, meist in Form von P-Phytat vor. Ebenso findet es sich in nennenswerten Mengen in Sojabohnen (Tucker & Salmon, 1955) und Reis (O'Dell et al., 1972). Ergänzend ist noch zu erwähnen, dass ein Phytatgehalt des Futters beim Wiederkäuer auf Grund des mikrobiellen Abbaus keinen Einfluss auf die Zinkabsorption hat (Miller, 1970). Bei Schwein und Geflügel ist dies jedoch der Fall (Tucker & Salmon, 1955; O'Dell & Savage, 1960; Likuski & Forbes, 1964).

Diese Eigenschaften des Phytat können somit experimentell genutzt werden, um körpereigenes Zink zur Ausscheidung zu bringen. Windisch & Kirchgessner (1999-a) konnten zeigen, dass ausgewachsene Ratten, welche mit einer Diät mit einem Futter mit hohem molaren Phytat/Zink-Verhältnis gefüttert wurden, innerhalb weniger Tage in eine Zinkmangel-Stoffwechselsituation versetzt werden konnten. In dem vorliegenden Experiment wurde diese auf Phytat beruhende Zink-Depletionsmethode angewendet. Die Ratten erhielten eine zinkarme Diät, der 8 g Natrium-Phytat pro kg Futter beigemischt war. Diese Menge bewirkt, dass nicht nur das der Mangeldiät beigemischte Zink (Gehalt 2.2 ppm) komplett zur Ausscheidung kommt, sondern auch, dass das körpereigene, in den Darm sezernierte endogene Zink über die Fäzes verloren geht (Windisch & Kirchgessner, 1999-a). Auf diese Weise kann man auch ausgewachsene Versuchsratten innerhalb weniger Tage in einen ausgeprägten Zustand des Zinkmangels versetzen, was sich bis vor wenigen Jahren noch als Problem darstellte.

Bei wachsenden Ratten ist es wesentlich leichter, einen Zinkmangel zu erzeugen. Hier reicht es bereits aus, die Tiere für wenige Tage mit einer zinkarmen Diät ohne Phytatzusatz zu füttern. Grund hierfür ist die anabole Stoffwechsellaage wachsender Tiere und der dadurch erhöhte Bedarf an Zink. Adulte Tiere sind durch eine alleinige zinkarme Fütterung nur sehr viel langsamer in eine Zinkmangelstoffwechsellaage zu versetzen. Ihr Zinkbedarf liegt deutlich unter dem von wachsenden Ratten (Roth & Kirchgessner, 1980; Windisch & Kirchgessner, 1994).

Die Exkretionskapazität der Niere für Zink ist begrenzt (Schwarz & Kirchgessner 1976). Auch sie ist jedoch in der Lage, in engen Grenzen die Zinkausscheidung abhängig von der Zinkzufuhr zu variieren, obwohl sie im Vergleich zum Darm wesentlich weniger sensitiv auf die Zinkzufuhr reagiert. Es konnte jedoch in einer Zinkmangelstudie an einem jungen Mann (King et al, 2000) schon 2-3 d nach Beginn der Depletion ein Absinken der renalen Zinkausscheidung festgestellt werden, noch bevor das Plasma Veränderungen zeigte. Allerdings scheint eine Reduktion der Zinkausscheidung über die Niere beim Menschen erst bei der geringen Zinkzufuhr von < 50

µmol pro Tag statt zu finden (Johnson et al., 1993). Eine Studie an Ratten zeigte keine adaptiven Reaktionen der Niere auf eine unterschiedliche Zinkversorgung. Hier war die Zinkausscheidung bei Zinkmangeltieren beinahe gleich wie bei den Tieren, die ausreichend mit Zink versorgt wurden (Weigand & Kirchgessner, 1978). Beim Hund wurde eine Abhängigkeit der renalen Zinkverluste von Glukagon und Insulin festgestellt: Glukagon-Infusionen steigerten die Zinkgehalte des Urin (Victery et al., 1981), wohingegen in einer anderen Studie Insulin diesen Anstieg verhindern konnte (Vander et al., 1983).

Die Niere reagiert in gewissem Maße auch auf eine überhöhte Zinkzufuhr. Bei Ratten mit einer Zinkübersorgung mit 200 ppm im Futter kam es zu einer verstärkten Zinkausscheidung über den Urin (Bonner et al., 1981).

Der Mensch verliert Zink auch über den Schweiß, Nagel- und Haarwachstum, Sperma und Monatsblutung. Auch in diesen Fällen ist eine gewisse Adaptionfähigkeit an die Zinkversorgung möglich. Über Haarwachstum und Hauterneuerung kann mit einem Verlust von 0.5 µmol Zink pro Tag gerechnet werden; seminale Verluste können bei häufigen Ejakulationen eine nicht außer Acht zu lassende Quelle für Zinkverluste darstellen (Baer & King, 1984): ein Ejakulat enthält etwa 9 µmol Zink.

#### 2.1.5 Zink und Knochen

In der vorliegenden Untersuchung steht die Bedeutung von Zink für den Knochenstoffwechsel im Mittelpunkt. Es gibt eine Vielzahl von Hinweisen darauf, dass Zink im Knochenstoffwechsel eine wichtige Rolle spielt. Hier einige wichtige In vitro und In vivo Beispiele:

- In einem In vitro-Experiment konnte die endogene Sekretion von Osteokalzin, IGF-1 und des Transforming-growth-factor  $\beta$  der Osteoblasten durch Zugabe von  $\beta$ -Alanyl-Histidin-Zink in Knochenzellkulturen deutlich erhöht werden (Yamaguchi & Hashizume, 1994).
- Zink wirkte in einem In vitro-Versuch stimulierend auf die IGF-1 Sekretion in den osteoblasten-ähnlichen Zellenformation (Matsui & Yamaguchi, 1995).
- Es wirkte in einem In vitro-Experiment inhibitorisch auf die Resorption von Knochenkalzium und ebenso auf die Formation von osteoklastenähnliche Zellen (Kishi & Yamaguchi, 1994).
- In Rattenschädelkulturen von entwöhnten Ratten konnte bei einer bestimmten Zinkzulage der Calciumgehalt des Knochengewebes verbessert werden (Yamaguchi et al., 1987).
- Der in Rattenschädelkultur beobachtete stimulierende Effekt von Vitamin D<sub>3</sub> auf DNS-, und Kalziumgehalt und die Aktivität der alkalischen Phosphatase konnte durch Zinkzulage ebenfalls gesteigert werden (Yamaguchi & Oishi, 1989-b).

- Zink soll indirekt als Co-Faktor der alkalischen Phosphatase (ALP) die Knochenmineralisation beeinflussen (Yamaguchi, 1998).
- Zinkzugabe zu Osteoblasten MC3T3-E1-Zellkulturen soll proliferativ auf diese Zellen gewirkt haben (Hashizume & Yamaguchi, 1993).
- Unter Zinkmangel kam es zu einem Absinken der ALP-Aktivität im Femur an jungen Ratten, allerdings im Vergleich zu ad libitum gefütterten Kontrolltieren (Roth & Kirchgessner, 1974-b). Die ALP spielt eine wichtige Rolle im normalen Knochenstoffwechsel.
- Zink befindet sich komplexiert mit Fluorid in den Hydroxyapatitkristallen, aus welchem das Knochenmineral besteht (Lowe et al., 2002).
- Einer der wichtigsten Wirkungsorte des Wachstumshormons (GH) ist der Knochen. GH besitzt eine strukturell und funktionell wichtige Stelle, welche Zink bindet (Cunningham et al., 1991). GH stimuliert die IGF-1 Sekretion und IGF-1 wiederum hat anabole Wirkungen am Knochen haben (Ohlson et al., 1998). Unter Zinkmangel kam es bei juvenilen und auch bei adulten männlichen Ratten zu einer verminderten GH Ausschüttung (Root et al., 1979) und in einem anderen Zinkmangelversuch an wachsenden Ratten konnte ebenfalls zu einer Verringerung der GH und IGF-1 Spiegel festgestellt werden (Roth & Kirchgessner, 1994.)
- Cha & Rojhani (1997) konnten aufzeigen, dass das Wachstumshormon GH in vivo bei wachsenden zinkadäquat gefütterten hypophysektomierten Ratten die Knorpelbreite an der Tibiaepiphyse positiv beeinflusste, was bei zinkdefizienten Ratten nicht der Fall war. Zusätzlich konnte durch Gabe von GH bei jungen Zinkmangeltieren keine Zunahme des zirkulierenden IGF-1 festgestellt werden (Dicks et al., 1993). Deshalb wird vermutet, dass es unter Zinkmangel zu einer Störung der GH/IGF-Achse kommt

Die meisten der In vivo-Versuche wurden an wachsenden Ratten durchgeführt. Deren Knochenstoffwechsel und Zinkbedarf unterscheiden sich jedoch erheblich von denen adulter Ratten. Es ist auch zu betonen, dass In vitro-Effekte nicht problemlos auf den Gesamtorganismus übertragbar sind. Trotz der vielfältigen Hinweise dafür, dass Zink eine wichtige Funktion im Knochenstoffwechsel spielen könnte, gilt diese Rolle jedoch nicht gesichert.

## 2.2 Zinkbedarf

Der tägliche Bedarf an Zink liegt für Jugendliche bei 7-10 mg, für erwachsene Männer bei 10 mg, für Frauen bei 7 mg; Schwangere Frauen sollten am Tag 10 mg Zink zu sich nehmen, stillenden Müttern wird sogar 11 mg pro Tag empfohlen. Säuglinge sollten 1-2 mg Zink pro Tag

erhalten, Kinder, je nach Alter, 3-10 mg bzw. 37 mg pro Tag bei den Mädchen (Deutsche Gesellschaft für Ernährung 3/2002). Zu einem erhöhten Bedarf kann es auch unter Einnahme bestimmter Pharmaka, bei veganer Ernährung und verschiedenen Krankheiten kommen (s. Abschnitt 2.3).

Der Zinkbedarf der Ratte ist stark abhängig vom Wachstum. Die verschiedenen Untersuchungen geben diesbezüglich unterschiedliche Mengen als bedarfsdeckend an. Weigand & Kirchgessner (1978) konnten ab einem Zinkgehalt von 39 ppm im Futter wachsender Ratten ein optimales Wachstum feststellen. In einem anderen Experiment an wachsenden Ratten schienen 12 ppm Zink im Futter ausreichend (Roth & Kirchgessner, 1979).

Bonner et al. (1981) hielten 40 ppm Zink im Futter für eine adäquate Zinkversorgung bei älteren, sich aber noch im Wachstum befindlichen Ratten für ausreichend.

Der Bedarf adulter Ratten an Zink ist im Allgemeinen wesentlich geringer, sofern die Tiere nicht trächtig sind oder lactieren. Windisch & Kirchgessner (1999-a und 1999-b) veranschlagten als ausreichende Zinkversorgung 21 ppm Zink im Futter. Massaro et al. (1982) gaben ihren jungen adulten Kontrollratten 24,4 ppm Zink.

Die „National Academie of Science“, Washington DC hat im National Research Council für Laborratten einen Zinkbedarf von 12 mg/kg Futter festgelegt.

## 2.3 Zinkmangel

### 2.3.1 Bedeutung

„Zinkmangel ist auch in Industrienationen wie Deutschland weiter verbreitet, als allgemein angenommen“, so Sven-David Müller von der Gesellschaft für Ernährungsmedizin und Diätetik, in Bad Aachen auf der 4. Internationalen Zinkkonferenz „Zinc Signals“ im Mai 2003. Ernährungsbedingter Zinkmangel mit seinen typischen klinischen Symptomen in schwerer Form tritt in Mitteleuropa nicht auf, außer bei Menschen mit angeborenem Zinkmangelsyndrom. Häufiger ist dagegen ein marginaler Versorgungsstatus, welcher den Betroffenen häufig nicht bewußt ist. Aus Ernährungsprotokollen der Deutschen Gesellschaft für Ernährung DGE konnte festgestellt werden, dass in Deutschland ca. 75 % der Männer und Frauen mit einer mangelhaften Zinkzufuhr leben (Risikogruppen s. Abschnitt 2.3.2).

Auch durch die BSE-Krise 2002 ging der Konsum an rotem Fleisch in den letzten Jahren stark zurück. Dieses ist jedoch eine wichtige Zinkquelle.

Eine regelmäßige Zinkzufuhr ist aber eine Voraussetzung für eine optimale Versorgung mit dem Spurenelement. Zinkmangel sei weit verbreitet, auch in finanziell besser situierten Bevölkerungsschichten laut H. Sandstead vom Department of Preventive Medicine and Community Health, Texas, USA bei der „Zinc Signals“ in Bad Aachen, 2003.

### 2.3.2 Ursache und Auswirkung

Ätiologisch lässt sich Zinkmangel einteilen in

- angeborenen Zinkmangel. Er zeigt die schwerste Form auf und entsteht bei Acrodermatitis enteropathica (eine genetisch bedingte Erkrankung, bei der es zur Zinkmalabsorption kommt) und bei der Sichelzellanämie (durch Hämolyse wird aus den Erythrozyten vermehrt Zink freigesetzt und abgebaut).
- induzierten Zinkmangel. Dieser entsteht durch Nieren-, Leber- und Darmerkrankungen und der Einnahme bestimmter Pharmaka (s.u.) und bei parenteraler Ernährung.

Nach zeitlicher Manifestation lässt sich Zinkmangel einteilen in

- akuten Zinkmangel

Dieser kommt nur selten vor. Ursache hierfür kann eine oral verabreichte Therapie mit Pharmaka sein, wie z.B. Antacida, Glukocorticoide, Ciclosporine, Diuretika, Eisen, Lipidsenker, Kontrazeptiva und ACE-Hemmer.

Auch postoperativ ist Zinkmangel sehr häufig anzutreffen. Akuter Zinkmangel äußert sich oft in Störungen der Geruchs- und Geschmacksempfindung, Appetitverlust und Hautschäden v.a. an Körperöffnungen und Akren.

- chronischen Zinkmangel.

Dieser ist häufiger anzutreffen und dies vor allem in Ländern der Dritten-Welt. In Ägypten und im Iran war v.a. Mitte der 60er Jahre Zinkmangel der Grund für besonders häufiges Auftreten von Zwergenwuchs mit verminderter sexueller Entwicklung (Halsted, 1972). Ursache hierfür waren die phytatreiche Ernährung, die dort häufig anzutreffenden Hakenwurminfektionen, bei denen es zu chronischen Blutverlusten kommt (Erythrozyten enthalten verhältnismäßig viel Zink) und schließlich auch die schlechte medizinische Versorgung in diesen Ländern.

In den Industrieländern kommt es aus anderen Gründen zu chronischem Zinkmangel. Eine inadäquate Aufnahme der Mineralstoffs durch fleischarme Ernährung, oft kombiniert mit der

Aufnahme von Zink-Absorptionshemmern in Form von Phytat (in Vollkorn- und Sojaprodukten) oder anderen Resorptionsinhibitoren, verursachen hier am häufigsten einen marginalen Zinkstatus im Körper.

Zur Malabsorption von Zink kann es auch bei bestimmten Erkrankungen kommen, wie z.B. Zöliakie, Morbus Crohn, Morbus Whipple, Akrodermatitis enteropathica, Nierenerkrankungen, Allergien und Diabetes mellitus und nach Darmresektion, Chemo- und Strahlentherapie. Chronischer Zinkmangel äußert sich in erhöhter Infektanfälligkeit, Wachstumsretardierung, gestörter sexueller Entwicklung, Wundheilungsstörungen, Schleimhautschädigungen, Haarausfall, weißfleckige Nägel, Depression, Konzentrationsstörungen, Nachtblindheit, Hypoguesie.

Auch in der Tiermedizin kann Zinkmangel bei einigen Tierarten eine klinisch relevante Rolle spielen. In der Schweinemast wird häufig Getreide und Sojaextraktionsschrot, also phytatreiches Futter, oft mit höheren Kalziumzusätzen verwendet. Dies führt zu einer schlechten Zinkresorption, welche beim Schwein Parakeratose (mangelhafte Verhornung der oberen Epidermisschichten) verursacht. Betroffen sind v.a. Läufer Schweine. Bevorzugte Stellen sind Gliedmaßeninnenseiten, sowie Bauch- und Brustunterseite. Begleitend kommt es häufig zu Durchfall und Wachstumsstillstand. Allerdings findet sich in den heutigen Futtergemischen ausreichend Zink und Phytasenzusatz, so dass ein solcher Zinkmangel höchstens noch in der alternativen Schweinehaltung auftritt (Waldmann & Wendt, 2001).

Gelegentlich kann es bei Weiderindern durch ausschließliche Aufnahme von zinkarmem Weidegras (Holland) oder bei synthetischer Fütterung zu einer inadäquaten Zinkversorgung kommen. Kälber und Junggrinder reagieren noch sensibler auf eine schlechte Zinkversorgung.

Bei Kälbern gibt es auch eine hereditäre Zinkresorptionsstörung. Unter Zinkmangel entwickelt sich dann das Symptom der Parakeratose. Die Hautveränderungen treten an mechanisch besonders beanspruchten Stellen wie Körperöffnungen, Ohrgrund, Schenkelinnenflächen, Gelenksbeugen und der Euterhaut auf. Hier entstehen Krusten, Schuppen und Verklebungen mit Juckreiz und seinen Folgen (Hofmann J, 1992)

In der Geflügelhaltung ist Zinkmangel auf Grund des Zusatzes von Phytasen in den Futtermischungen kaum anzutreffen (Kirchgessner, 1997).

Beim Pferd wird Zinkmangel mit Hufkrebs und Strahlfäule in Verbindung gebracht (Huskamp & Dietz, 1999). Die typischen Symptome werden allerdings nur unter experimentellen Bedingungen ausgelöst (Gerber, 1994).

Beim Hund gibt es bei Husky, Malamute und Bullterrier eine rassebedingte Prädisposition für Zinkresorptionsstörungen. In den meisten Fällen liegt beim Hund ein relativer Zinkmangel vor. Die Symptome sind hyperkeratotische Plaques um Körperöffnungen oder Hauterytheme und eitrige Dermatitis an Ellenbogen, Sohlen und Kopf (Kraft & Hirschberger, 2000).

Bei der Katze konnte Zinkmangel nur unter experimentellen Bedingungen an Welpen beobachtet werden. Er äußerte sich in Retinaatrophie, Anorexie und Haarkleidveränderungen (Kraft & Dürr, 1996).

Experimenteller Zinkmangel an Ratten äußert sich bei wachsenden Tieren vor allem in Wachstumsverzögerung, Anorexie und Hautläsionen (Williams & Mills, 1970; McDonnell & Henkin, 1974; Chesters & Quaterman, 1970), während bei adulten Tieren Gewichtsverluste und Appetitmangel weniger ausgeprägt waren, insofern kein Phytat im Futter enthalten war (Massaro et al., 1982; Windisch & Kirchgessner 1999-b).

### 2.3.3 Zinkmangel und Osteoporose

Die WHO definiert Osteoporose knochendensitometrisch: Eine Knochenmineraldichte  $> -2.5$  Standardabweichung eines jungen, geschlechtsbezogenen Normalkollektivs gilt als Osteoporose, eine Standardabweichung zwischen  $-1$  und  $-2.5$  gilt als Osteopenie. So kommt es durch diese Verminderung der Knochenmasse in Verbindung mit einer Qualitätsabnahme der Mikroarchitektur zu mechanischer Insuffizienz. Bereits ein leichtes Trauma kann damit einen Bruch zur Folge haben (Hoffmann, 1987).

Das Kuratorium für Knochengesundheit e.V. beschreibt die Osteoporose als schleichende und oft unterschätzte Krankheit. Jedes Jahr sterben ca. 30.000 Menschen nach einem Oberschenkelhalsbruch infolge Invalidisierung. In Deutschland leiden bereits 5 - 7 Mio. Menschen an Osteoporose. Ein Drittel aller Frauen, aber nur ein Sechstel aller Männer jenseits des 50. Lebensjahres haben das Risiko an Osteoporose zu erkranken (Kuratorium für Osteoporose e.V. 2002).

Schätzungen aus dem Jahre 1990 ergaben, dass bereits zur damaligen Zeit jedes Jahr eine halbe Milliarde Euro für die Behandlung der direkten Folgen dieser Krankheit ausgegeben wurden (Hörning, 1990). Es ist anzunehmen, dass diese Zahl bis heute deutlich gestiegen ist.



Die Osteoporose lässt sich in verschiedene Formen einteilen:

- Primäre Osteoporose Typ 1:

Hier kommt bei Frauen, die sich im Klimakterium befinden, zusätzlich zum altersbedingten Knochenschwund ein jährlicher Knochenverlust von 2-3 % hinzu. Nach 5-15 jähriger Östrogendefizienz kommt es dann zu klinischer Manifestation, meist in Form von Wirbelkörperbrüchen, da hier v.a. trabekulärer Knochen abgebaut wird. Dadurch entsteht der sogenannte „Witwenbuckel“.

- Primäre Osteoporose Typ 2:

Diese steht in keinem Zusammenhang mit den Wechseljahren. Sie kommt bei Frauen jedoch doppelt so häufig vor, wie bei Männern. Es erkranken dann beide Geschlechter jenseits des 70. Lebensjahres, weshalb sie auch als senile Osteoporose bezeichnet wird. Bei dieser Osteoporoseform unterliegt auch kortikaler Knochen dem Abbau.

- Sekundäre Osteoporose:

Sie entsteht aus einer Primärkrankheit oder anderen auslösenden Faktoren heraus, wie z.B. nach langandauernder Kortisontherapie, bei Laktoseintoleranz, Schilddrüsenüberfunktion, bei Diabetes mellitus, Hypogonadismus, Malabsorption, onkogenen Erkrankungen, nach Inaktivität (Bettruhe) oder bei hereditären Bindegewebserkrankungen. Diese Osteoporoseform ist altersunabhängig.

- Sonderformen:

Die idiopathische juvenile Osteoporose tritt v.a. bei präpubertären Kindern in Form von Minderwuchs und vermehrten Röhrenknochenbrüchen auf. Die idiopathische Osteoporose der jungen Männer und prämenstruellen Frauen, die zu Wirbelfrakturen und Körpergrößenverluste von bis zu 15 cm führen kann (Christenson, 1997).

Durch die vielfältigen direkten und indirekten Einflüsse von Zink auf den Knochenstoffwechsel könnte dieses Spurenelement eine pathogenetische Rolle im Krankheitsbild der Osteoporose spielen.

Bisher liegen dazu jedoch nur vereinzelt Daten vor:

Bei einigen Menschen mit seniler Osteoporose war der Zinkgehalt im Knochen reduziert (Atik, 1983). In einer Studie aus den Jahren 1994 - 96 wurde die Zink- (und Kupfer-) Aufnahme von 60

- 90jährigen Menschen in den USA untersucht: bei 75 % der Probanden war die Zinkaufnahme unter der Aufnahmeempfehlung von 12 bzw. 15 mg pro Tag (Ma & Betts, 2000).

Ältere Menschen haben im Vergleich zu jüngeren eine verminderte Zinkabsorption aus dem Darm (Turnlund et al., 1986).

Über den Zinkplasmastatus bei älteren Menschen gibt es widersprüchliche Aussagen. Wood (1990) berichtete von erniedrigtem Plasmazinkgehalt, während Relea et al. (1995) das Gegenteil behaupteten.

Bezüglich des Zusammenhangs zwischen Osteoporose und oraler Zinkzufuhr sei die Studie von Saltman & Strauss (1993) zu erwähnen. Sie zeigte, dass orale Zink- und Kupferzufuhr die Knochenverluste bei osteoporotischen Patienten vermindern konnte. Ähnlich verhielt es sich in einem Experiment an ovariektomierten Ratten (Yamaguchi, 1995).

#### 2.4 Die Ratte als Versuchstier

Um die Ergebnisse von Versuchen, die auf die Skelettwirkung Auswirkungen haben auf die Humanmedizin und größere Haustierarten übertragen zu können, eignet sich die Ratte als Versuchstier aus folgenden Gründen sehr gut:

- Die mikroanatomische Struktur des trabekulären Knochen bei Ratten ist die gleiche, wie bei höheren Säugern.
- Das Längenwachstum der Wirbelkörper ist ab dem 9. Lebensmonat nicht mehr messbar und das der proximalen Tibia ist mit 12 Monaten sehr gering (Erben, 1996). Remodeling ist bei einjährigen Fischer 344-Ratten die vorherrschende Turnoveraktivität (Erben, 1996). Anders als beim Menschen kommt es bei der Ratte jedoch zu keinem intrakortikalen Remodeling (Kalu, 1991).
- Außerdem sind Ratten in Haltung, Fütterung, Handling und tierärztlicher Versorgung unproblematisch.

#### 2.5 Ziel des Versuches

Die meisten der bisherigen Zinkmangelversuche wurden an wachsenden Ratten durchgeführt. Da diese im Vergleich zu ausgewachsenen Ratten einen wesentlich aktiveren Knochenturnover

und einen höheren Zinkbedarf haben, lassen sich die Versuchsergebnisse nur unter Einschränkungen auf adulte Tiere oder auf den Menschen übertragen.

Auch war es bisher nur schwer möglich, in ausgewachsenen Ratten einen Zinkmangel zu erzeugen. Durch die auf Phytatzusatz im Futter basierende Zink-Depletionsmethode von Windisch und Kirchgessner (1999-a) konnte diese Lücke geschlossen werden. Mit dieser Methode kann nun auch bei adulten Ratten innerhalb kurzer Zeit eine definierte Zinkmangelsituation erreicht werden.

Das vorliegende Experiment ist das erste seiner Art. In keiner Zinkmangelstudie waren adulte Tiere jemals über so viele Wochen einer defizitären bzw. marginalen Zinkversorgung ausgesetzt worden. Ziel unseres Versuches war es herauszufinden, ob eine defizitäre Zinkversorgung einen negativen Langzeiteinfluss auf den Knochen hat und Zink eine Rolle in der Pathogenese der Osteoporose spielt.

### 3 Material und Methoden

#### 3.1 Tiere und Haltung

Es wurden 64 weibliche, ausgewachsene Fischer 344-Ratten aus der Eigenzucht des Institutes für Physiologie der Universität München verwendet. Die Tiere waren zu Versuchsbeginn durchschnittlich 9 Monate alt und hatten ein durchschnittliches Lebendgewicht von ca. 206 g (175-239 g). Die Tiere wurden wöchentlich einer Gewichtskontrolle unterzogen, ebenso wurde der Gesundheitszustand 2 - 3 x wöchentlich kontrolliert.

Die Ratten wurden paarweise in Typ 3 Makrolonkäfigen auf Weichholzspänen in einem voll klimatisierten, fensterlosen Raum bei 24° C und 50 % rel. Luftfeuchtigkeit gehalten. Über die gesamte Versuchsdauer fand ein Lichtprogramm mit 12-stündigem Licht/ Dunkel-Wechsel statt.

Alle Tiere bekamen während des Versuchs Leitungswasser ad. lib.

Beim Futter handelte es sich um zwei verschiedene semisynthetische Diäten, welche sich lediglich in den Zinkgehalten unterschieden. Kontrolltiere erhielten das zinkadäquate Futter mit einer Zinkkonzentration von 64 ppm. Die Gruppen, welche zinkdefizitär, bzw. zinkmarginal gehalten wurden erhielten Zinkmangelfutter mit 2.2 ppm Zinkgehalt (genaue Zusammensetzung der Diät s. Tabelle 3.1).

Zur Adaption an das Futter wurden alle Ratten einen Monat lang vor Versuchsbeginn mit dem Futter der Kontrollgruppe gefüttert. Die Fütterung war restriktiv, was bei weiblichen Fischerratten bei paarweiser Haltung problemlos möglich ist, da diese kein Dominanzverhalten aufweisen.

Tabelle 3.1 Futterkomponenten

Casein	125.0 g/kg Futter
Maisstärke	411.6 g/kg
Zucker	280.0 g/kg
Öl	10.0 g/kg
Cellulose	30.0 g/kg
Palmin	75.0 g/kg
DL-Methionin	2.0 g/kg
Vitamine- Mischung*	12.5 g/kg
Mineralstoff-Mischung **	53.9 g/kg
ZinkSo4 x 7 H2O ***	0.264 g/kg
Natrium-Phytat	8.0 g/kg

\* pro kg Futter:

5000 IU All-Trans Retinol, 1000 IU Cholekalziferol, 150 mg alpha-Tocopherolacetat; 5 mg Mena-dion-Natrium-Bisulfit; 5 mg Thiaminmononitrat; 10 mg Riboflavin; 6 mg Pyridoxin-Hydrochlorid; 20 mg Kalzium-D-Pantothenat; 50 mg Nicotinsäure; 1000 mg Cholinchlorid; 1000 µg Folsäure; 200 µg Biotin; 25 µg Cyanobalamin.

\*\* pro kg Futter:

2,0 g	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 2H <sub>2</sub> O	0,117 g	CuSO <sub>4</sub> x 5H <sub>2</sub> O
0,308 g	MnSO <sub>4</sub> x H <sub>2</sub> O	17,6 g	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
1,73 g	KCL	0,504 mg	Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> x 2H <sub>2</sub> O
16,2 g	CaCO <sub>3</sub>	0,667 mg	NaSeO <sub>3</sub> x 6H <sub>2</sub> O
8,4 g	MgCl <sub>2</sub> x 2H <sub>2</sub> O	4,48 mg	NiSO <sub>4</sub> x 6H <sub>2</sub> O
5,513 mg	CrCl <sub>3</sub> x 6H <sub>2</sub> O	1.20 mg	NaF
0,496 g	FeSO <sub>4</sub> x 7H <sub>2</sub> O	2,62 mg	KJ
		5,513 mg	CrCl <sub>3</sub> x 6H <sub>2</sub> O

\*\*\* Zinksupplementierung des Zinkmangelfutters

→Ergebnisse der rechnerischen Zinkanalyse im Futter:

Kontrollgruppenfutter: 64 ppm Zink ; Zinkmangelfutter: 2.2 ppm Zink

Das Futter wurde vom Institut für Tierernährung der Technischen Universität München-Weihenstephan, Freising Deutschland bezogen.

### 3.2 Versuchsanordnung

Der Tierversuch wurde von der Regierung von Oberbayern genehmigt und unter dem Aktenzeichen 209.1/211-2531-60/02 geführt.

Die Ratten wurden bei Versuchsbeginn in 8 Gruppen zu je 8 Tieren so aufgeteilt, dass die Durchschnittsgewichte der Gruppen möglichst gleich waren. Alle Tiere erhielten eine semisynthetische Diät, die sich nur in den Zinkgehalten unterschied. Die Kontrollgruppen erhielten eine semisynthetische Diät mit einem adäquaten Zinkgehalt von 64 ppm Zink / kg Futter. Die Depletions-, zinkmarginal gehaltenen, und Repletionstiere erhielten ein zinkarmes Futter mit einem Zinkgehalt von 2,2 ppm Zink / kg Futter. In der Marginalphase wurde zusätzliches Zink als Zink-Sulfatlösung ( $\text{ZnSO}_4$ , Fa. Sigma, Deisenhofen, gelöst in Aqua bidest.) per Schlundsonde zugegeben.

Vor Versuchsbeginn gab es eine einmonatige Akklimatisationsphase an den neuen Käfigpartner und an das neue Futter. Die Tiere bekamen ausnahmslos die zinkadäquate Diätform und wurden auch an eine restriktive Fütterung mit 7,5 g dieses Futters pro Tag adaptiert. Mit dieser Futtermenge konnten die Ratten ihr Ausgangsgewicht halten. Danach begann der dreiphasige Fütterungsversuch.

**Tabelle 3.2 -Versuchsplan**

<b>Dauer:</b>	↓ Monat 0	↓ Monat 1	↓ Monat 3	↓ Monat 5
<b>Phase:</b>	↓→Depletion	↓→Margiale Zn-Versorg.	↓→Repletion	.

1	-----Baseline-----	→ †
2	-----Kontrollgruppe-----	→ †
3	-----Depletionsgruppe-----	→ †
4	-----Kontrollgruppe-----	→ †
5	-----Marginal-Zn-Gruppe-----	→ †
6	-----Kontrolgruppe-----	→ †
7	-----Marginal-Zn-Gruppe--	→ †
8	-----Repletionsgruppe-----	→ †

Zu Versuchsbeginn wurden die 8 Tiere der Baseline-Gruppe getötet. Die verbleibenden Tiere bekamen eine einmalige i.p.-Injektion von 30 mg/kg Alizarin complexone (Fa. Sigma, Deisenhofen) zur Markierung des Beginns des Experiments.

Dann begann die 4 Wochen andauernde Depletionsphase, in der die Tiere der drei Kontrollgruppen in einer Paarfütterung an die Verzehrsmenge der Zinkmangelgruppen angepasst wurden. Die Kontrolltiere erhielten die zinkadäquate Diät (64 ppm). Die Zinkmangeltiere wurden mit dem zinkarmen Futter (2,2 ppm Zinkgehalt) gefüttert.

Am Ende der Depletionsphase wurden die Gruppen 2 und 3 getötet.

Für die Tiere der Gruppen 5, 7 und 8 begann daraufhin die 2 Monate andauernde zinkmarginale Phase. In dieser wurde Zink zusätzlich zu dem geringen Zinkgehalt im Mangelfutter jeden zweiten Tag in mengenmäßig aufsteigender Form via Schlundsonde zugeführt, bis die Nahrungsaufnahme wieder 7,5 g Futter pro Tier und Tag betrug, was bei einer Zinkzufuhr von 75 µg pro Tier und Tag der Fall war (während der Depletionsphase war es zu einem dramatischen Verzehrseinbruch gekommen). Umgerechnet auf den Futtermittelverzehr bekamen die Zinkmarginaltiere 12,2 ppm Zink. Dieses über die Sonde zugeführte Zink wurde in Form von  $\text{ZnSO}_4$  in Aqua bidest. gelöst und über eine Schlundsonde appliziert. Um gleiche Bedingungen zu schaffen, bekamen die Kontrollgruppen (4 und 6), welche weiter mit dem zinkadäquaten Futter paargefüttert wurden, ebenso alle zwei Tage Aqua bidest. ohne Zinkzusatz mit der Schlundsonde in gleicher Menge appliziert.

Am Ende der zinkmarginalen Phase wurden die Tiere der Gruppen 4 und 5 getötet.

Im Anschluss an diese Phase setzte die zweimonatige Repletionsphase ein, wobei die Gruppe 7 weiter zinkmarginal gehalten wurde, die Gruppe 8 jedoch wieder auf adäquate Zinkzufuhr durch Verfüttern der zinkadäquaten Diät gesetzt wurde. Zu Beginn dieser Repletionsphase erhielten alle verbleibenden Ratten eine einmalige sc. Injektion von 25 mg/kg Oxytetracyclin (Fa. Sigma, Deisenhofen).

Nach der Repletionsphase wurden schließlich auch die Gruppen 6, 7 und 8 getötet.

Alle Ratten erhielten vor den jeweiligen Versuchsenden der einzelnen Phasen am 8. und 3.Tag vor ihrer Tötung eine Fluorochrom-Doppelmarkierung von 20 mg/kg Calcein gelöst in 2 %iger NaHCO<sub>3</sub> (Fa. Sigma, Deisenhofen) zur Kenntlichmachung der sich in Mineralisation befindenden Knochenfläche.

Am Abend vor den jeweiligen Versuchsenden wurden die Tiere einzeln unter Futterentzug für 12 Stunden in Stoffwechsellkäfige gesetzt und der Urin aufgefangen, um die verschiedenen Urinparameter und die Urinmenge zu bestimmen. Wasser stand ad libitum zur Verfügung.

Zur Tötung erhielten alle Ratten eine Ketamin/Xylazin-Injektionsanästhesie (50 mg/kg Ketamin Hostaket<sup>®</sup>, Fa. Hoechst, Wiesbaden, und 10 mg/kg Xylazin Rompun<sup>®</sup> 2 %ig, Fa. Bayer, Leverkusen, i.p.). Dann wurden sie durch Entbluten aus der Bauchorta getötet.

Serum und Urin wurden bis zur Beurteilung bei – 35 °C in Aliquots gelagert.

Anschließend wurden folgende Knochen entnommen :

Die Lendenwirbel L<sub>1</sub>, L<sub>3</sub>, L<sub>4</sub>, die rechte und linke Tibia und der rechte Femur.

Die Knochen die für die Histologie bestimmt waren, wurden in 40 %igem Ethanol bei -4°C auf einem Magnetrührer aufbewahrt (weiteres Vorgehen s.u.). Die Knochen, welche der Mineraldichtebestimmung zugeführt werden sollten, wurden in 70 %igem Ethanol bei Zimmertemperatur aufbewahrt.

Der Femur wurde bis zur Analyse des Zinkgehalts bei – 80°C gelagert.

Außerdem wurde von jedem Tier, außer denen der Baseline-Gruppe, ein Uterushorn entnommen und dieses für die kurze Zeit bis zum Wiegen in physiologische NaCl-Lösung gelegt.

### 3.3 Biochemische Parameter des Knochenstoffwechsels

#### 3.3.1 Blutparameter

Die Blutproben, welche von den Ratten bei Versuchsende durch Entbluten gewonnen wurden, wurden in Serummonovetten gesammelt und nach einer einstündigen Ruhephase für 10 min bei 1580 g zentrifugiert, das Serum



abpipettiert, in mehrere Fraktionen unterteilt und bis zur weiteren Verwertung bei  $-35\text{ }^{\circ}\text{C}$  gefroren.

Aus dem Serum wurden bestimmt: Natrium, Kalium, Kalzium, Zink, Phosphat, alkalische Phosphatase (ALP), Aspartat-Amino-Transferase (AST), Gesamt-Bilirubin, Kreatinkinase (CK), Albumin, Kreatinin und Harnstoff.

Natrium, Kalium und Kalzium wurden mit Flammenphotometrie bestimmt (Modell EFOX 50, Fa. Eppendorf, Hamburg).

Phosphat, Kreatinin, Harnstoff, Bilirubin, Albumin, AST und die ALP wurden mit einem Hitachi 717 Auto-Analyzer (Fa. Boehringer, Mannheim) bestimmt.

Der Serumzinkgehalt wurde nach Verdünnung mit Aqua bidest. mit der Atomabsorptometrie AAS (Modell 5100, Fa. Perkin-Elmer) am Institut für Tierernährung der Technischen Universität Weihenstephan, Freising-München bestimmt.

### 3.3.2 Urinparameter

Der in der Nacht vor der Tötung in den Stoffwechselläufigen aufgefangene Urin wurde nach Bestimmung der Menge/Tier mit 2-normaler HCL 1:1 verdünnt und danach noch einmal 1:26 mit Aqua dest. versetzt. Die Endverdünnung betrug so 1:52.

Im Urin wurden bestimmt: Natrium, Kalzium, Kalium, Kreatinin und Phosphor und Desoxypyridinolin (DPD), ein Knochenkollagen-Abbauprodukt.

Der 1:1 verdünnte Urin wurde zur Bestimmung der Natrium-, Kalium und Kalziumspiegel mit einem EFOX 50 Flammenphotometer (Fa. Eppendorf, Hamburg) herangezogen, während Kreatinin, Phosphor und Harnstoff aus den 1:52 verdünnten Proben mit dem Hitachi 717 Auto-Analyzer bestimmt wurden.

Gesamtdesoxypyridinolin (DPD) wurde mittels eines ELISA-Testkits (Metra Total DPD, Fa. Quidel, San Diego) gemäss den Herstellerangaben bestimmt.

### 3.4 Zinkgehalte des Knochens

Der rechte Femur wurde nach Entnahme und vorsichtigem Entfleischen bis zur Analyse bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert. Vor der Analyse wurde er gewogen, bei  $105^{\circ}\text{C}$  für 12 Stunden getrocknet, wieder gewogen, dann bei  $480^{\circ}\text{C}$  im Muffelofen 48 Stunden verascht. Die Rückstände wurden erneut gewogen. Danach wurden die einzelnen Ascheproben in 0,6 normaler HCL gelöst. Die Zinkanalyse wurde mittels Atomabsorptiomertie (Modell 5100, Fa. Perkin-Elmer) durchgeführt.

### 3.5 Histologische Aufarbeitung des Knochengewebes

#### 3.5.1 Präparation, Fixierung und Entwässerung der Knochen

Die dem Tier entnommenen Knochen wurden sofort nach Entnahme vorsichtig vom Muskelfleisch befreit, in beschriftete Histologiekörbchen gelegt und für 48 h bei  $4^{\circ}\text{C}$  in einem Glasgefäß unter ständiger sanfter Bewegung des Alkohols durch einen Magnetrührer in 40 %igem Ethanol fixiert. Die weitere Entwässerung erfolgte über eine aufsteigende Alkoholreihe, wobei die Knochen für jeweils 2-3 Tage in 70 %iges, dann 95 %iges Ethanol, dann 100 %iges Isopropanol und schließlich reines Xylol verbracht wurden (Schenk et al., 1984).

#### 3.5.2 Infiltration und Einbettung

Die Knochen wurden in drei Schritten nach der Methode von Schenk et al. (1984) in drei Schritten mit Methylmethacrylat (MMA) infiltriert. Die Zusammensetzung der Lösungen war folgende:

MMA-Lösung 1:	800 ml MMA 200 ml Dibutylphtalat
MMA-Lösung 2:	800 ml MMA 200 ml Dibutylphtalat 10 g Benzoylperoxid, getrocknet
MMA-Lösung 3:	800 ml MMA 200 ml Dibutylphtalat 30 g Benzoylperoxid, getrocknet

Die Knochen wurden für je 3-4 Tage in der jeweiligen MMA-Lösung belassen.

Die Einbettung fand in Rollrandgläsern mit vorgegossenen, ausgehärteten MMA-Böden statt, wobei die einzelnen Knochen mit MMA-Polymerisationslösung (frische MMA-Lösung 3) übergossen und in ein 26 °C warmes Wasserbad gestellt wurden. Die Temperatur wurde alle 12 h um 1 °C erhöht bis 31°C erreicht waren.

### 3.5.3 Herstellung der Knochenschnitte

Nach vollständiger Polymerisation wurden die Rollrandgläser mit einem leichten Gummihammerschlag gesprengt und die MMA-Blöcke mit Säge und Feile für den Schneidevorgang zurecht getrimmt.

Anschließend wurden aus der Medianebene des ersten Lendenwirbels bzw. aus der Sagitalebene der rechten, proximalen Tibia mit einem HM 360-Mikrotoms (Fa. Mikrom, Walldorf ) 5-µm-dicke Schnitte angefertigt. Diese wurden direkt vom Mikrotom auf mit Chromalaun-Gelatine beschichtete Objektträger überführt, mit 90%igem Ethanol beträufelt und nach vorsichtigem Strecken des Kunststoffs durch einen feinhaarigen Pinsel mit einer Kunststoffolie (Kisol-Folie, Fa. Kettenbach, Eschenburg) bedeckt. Anschließend trockneten die Schnitte in einer Objektträgerpresse 2 Tage lang bei 42°C im Wärmeschrank.

### 3.5.4 Färbung der Knochenschnitte

Nach Auswahl der qualitativ besten Schnitte hinsichtlich der Schnittebene und Artefakten wurden diese nach folgenden Färbeprotokollen gefärbt:

Mit der Von Kossa-Färbung (Schenk et al., 1984) kann kalzifizierter Knochen intensiv schwarz gefärbt werden. Diese Präparate wurden später für die vollautomatische Bildanalyse verwendet.

Zunächst mussten die Schnitte durch dreimaliges 20minütiges Inkubieren in Methoxyethylacetat entplastet und danach durch jeweils 5minütiges Verbringen in 70 %igen Ethanol, 40 %igen Ethanol und Aqua dest. für die anschließend

verwendeten hydrophilen Färbelösungen vorbereitet werden (nach BARON et al., 1983, modifiziert nach ERBEN et al., 1990).

Anschließend durchliefen die Schnitte folgende Färbeschritte:

5%iges Silbernitrat im Dunkeln	10 min
Abspülen mit Aqua dest.	3 mal
Natriumcarbonat/Formaldehydlösung (150 ml 6,7 %ige Natriumcarbonatlösung + 50 ml 38 %ige Formaldehydlösung)	2 min
Abspülen mit Leitungswasser	1 mal
Farmers Reducer (200 ml 10 %ige Natriumthiosulfatlösung +10 ml 10 %ige Formaldehydlösung)	30 sec
fließendes Leitungswasser	20 min
Abspülen mit Aqua dest.	1 mal

Zuletzt erfolgte das Eindecken mit Kaisers Glycerogelatine (Fa. Merck, Darmstadt)

Um die verschiedenen Knochenzellen differenzieren zu können und zur Abgrenzung von Osteoid vom mineralisierten Knochen wurden mit Toluidinblau (BARON et al., 1983) gefärbte Schnittpräparate verwendet. In den nach dieser Technik gefärbten Schnitten hebt sich das Osteoid als homogene, intensiv hellblau gefärbte Masse deutlich vom violetten Knochen ab.

Nach dem Entplasten (s. Abschnitt 3.5.4) wurden die Objektträger 10 min in Toluidinblau-Färbelösung (4g Toluidinblau in 200 ml Pufferlösung, pH 3,7) getaucht und anschließend zweimal für jeweils eine Minute in eine Pufferlösung verbracht (1,58 g Zitronensäure und 0,75 g di-Natriumhydrogenphosphat in 1000 ml Aqua dest., pH 3,7).

Nach ausreichendem Abtropfen gab man die Präparate dreimal nacheinander für je 90 Sekunden in frisches 1-Butanol, danach in 1-Butanol/Xylol und dann in Xylol.

Bis zum Eindecken mit DePeX (Fa. Boehringer, Ingelheim) wurden die Schnitte in frischem Xylol aufbewahrt.

Zur Darstellung der Calcein-, Alizarin- und Oxytetracyclinmarkierungen, welche die sich aktiv in Mineralisation befindlichen Knochenoberflächen anzeigen, wurden die Schnitte ohne Entplattung mit Fluoromount (Fa. Serva, Heidelberg) eingedeckt und bis zur Auswertung lichtgeschützt aufbewahrt. Gemessen wurden diese Linien schließlich mit Hilfe der Fluoreszenzmikroskopie.

### 3.6 Knochenmineraldichte

Die Knochenmineraldichte wurde mittels pQCT (periphere quantitative Computertomographie, Lees et al., 1998) gemessen. Der Vorteil dieser Messmethode z.B. gegenüber der bisherigen „Goldstandardmethode“ DEXA (Dual energy X-Ray absorptiometry, Lees et al., 1998) ist die Unterscheidung zwischen kortikalem und trabekulärem Knochen. Studien an ovariectomierten Ratten haben gezeigt, dass pQCT Veränderungen der Knochenmasse und -dichte früher erkennt als DEXA (Gasser, 1995).

Zur Knochenmineraldichteanalyse mittels pQCT dienten der vierte Lendenwirbel und die linke Tibia. Diese Knochen wurden bei den jeweiligen Versuchsenden aus dem frisch entbluteten Tier entfernt, vorsichtig vom Muskelfleisch und Bindegewebe befreit und für die pQCT-Bestimmung in 70 %igem Ethanol bei Zimmertemperatur aufbewahrt.

Die Messungen der Knochen fanden an drei transversalen Schnittebenen statt. Diese befanden sich beim Lendenwirbel in der Knochenmitte und je 0,2 mm cranial bzw. caudal der jeweiligen Epiphysenfuge. Bei der Tibia lagen die Messebenen 2 mm proximal der tibiofibularen Aufzweigung und je 2 mm distal bzw. proximal des jeweiligen Knochenendes.

Bei dem Gerät handelte es sich um ein XCT Research m+ (Fa. Norland Stratec Medizintechnik, Pforzheim). Die Voxelsize betrug 100  $\mu\text{m}$  und die Schichtdicke 0,2 mm. Als unterer Schwellenwert für kortikalen Knochen wurde 710  $\text{mg}/\text{cm}^3$  gewählt.

Es wurden folgende Parameter bestimmt:

#### Am 4. Lendenwirbel, der proximalen Tibia und der distalen Tibia.

- Gesamtknochenmineraldichte in  $\text{mg}/\text{cm}^3$
- Kortikale und Subkortikale Mineraldichte in  $\text{mg}/\text{cm}^3$
- Gesamtmineraldichte der Spongiosa in  $\text{mg}/\text{cm}^3$
- Gesamtquerschnittsfläche in  $\text{mm}^2$
- Querschnittsfläche der Kortikalis und Subkortikalis in  $\text{mm}^2$
- Querschnittsfläche der Spongiosa

#### Am Tibiaschaft

- Gesamtknochenmineraldichte in  $\text{mg}/\text{cm}^3$
- Kortikale Mineraldichte in  $\text{mg}/\text{cm}^3$
- Gesamtquerschnittsfläche in  $\text{mm}^2$
- Querschnittsfläche der Kortikalis
- Kortikale Dicke
- Periostaler Umfang in mm
- Endostaler Umfang in mm

### 3.7 Histomorphometrische Messungen

Für die Quantifizierung der Knochenmorphologie wurden zweidimensionale Parameter verwendet, da auf Grund der anisotropen Anordnung der Knochentrabekel im Wirbelkörper und in der proximalen Tibia der Ratte eine Umrechnung der Werte in die dritte Dimension nicht zulässig ist (PARFITT et al., 1983).

Im folgenden wurden die Standards der American Society of Bone and Mineral Research, eine vereinheitlichte und international gültige Terminologie für den Bereich der Knochenhistomorphometrie, verwendet (PARFITT et al., 1987).

### 3.7.1 Strukturelle statische Parameter (VIDAS)

Es wurden die statischen histomorphometrischen Parameter im trabekulären Knochen sowohl des ersten Lendenwirbels als auch der rechten proximalen Tibiametaphyse gemessen. Dazu wurde ein vollautomatisches Bildanalyse-System (VIDAS, Fa. Zeiss, Oberkochen) verwendet, welches mittels einer Bosch Messkamera (Fa. Bosch, Stuttgart) an ein Zeiss SV 11 Stereomikroskop (Fa. Zeiss, Oberkochen) angeschlossen war.

An den Von Kossa-gefärbten Knochenschnitten wurden jeweils ein 0,5 mm breiter, an die kraniale und kaudale Epiphysenfuge des Lendenwirbels bzw. an die proximale Epiphysenfuge der Tibia angrenzender Gewebebereich von der Messung ausgeschlossen, um das Messergebnis nicht durch das Miteinbeziehen primärer Spongiosa zu verfälschen.

Nach Einzeichnen des Messbereiches und manueller Überarbeitung der Präparatabbildungen (Löschen von Artefakten) bestimmte das Bildanalyse-System automatisch die Messfläche (Tissue area, T.Ar), die Summe der Knochenflächen (Bone area, B.Ar), die Anzahl der Knochen-trabekel (Number of Trabeculae, N.Tb) und die Summe der Knochenumfänge (Bone perimeter, B.Pm), woraus anschließend folgende Parameter errechnet wurden:

-Bone area (B.Ar/T.Ar) in % als Prozentsatz des kalzifizierten Knochens und Knorpels, bezogen auf die gesamte Messfläche,

-Bone perimeter (B.Pm/T.Ar in mm/mm<sup>2</sup>) als Gesamtlänge aller in einem mm<sup>2</sup> Gewebefläche vorhandenen Knochenumfänge,

-Trabecular number per tissue area (N.Tb /T.Ar in #/mm<sup>2</sup>) als Anzahl der Tabekelanschnitte pro mm<sup>2</sup> Gewebefläche und

-Trabecular number per bone area (N.Tb/B.Ar in #/mm<sup>2</sup>) als Anzahl Trabekelschnitte pro mm<sup>2</sup> Knochenfläche.

-Trabecular area (Tb.Ar= B.Ar/ N.Tb in mm<sup>2</sup>) stellt die durchschnittliche Fläche eines Trabekelprofilanschnittes,

-Trabecular width (Tb.Wi= B.Ar./B.Pm x 2000 in µm) die mittlere Trabekelbreite und

-Trabecular separation (Tb.Sp= 1/ Tb.N x 1000 – Tb.Th) den durchschnittlichen Abstand zweier benachbarter Trabekel dar.

### 3.7.2 Zelluläre statische Parameter (Videoplan)

Die mit Toluidinblau gefärbten Knochenschnitte wurden für die Bestimmung der zellulären histomorphometrischen Parameter mittels eines halbautomatischen Messsystems (Videoplan, Fa. Zeiss) und eines Zeiss-Axioskop-Mikroskopes mit Zeichentubus verwendet.

Die Messfläche umfasste den gesamten trabekulären Knochen des ersten Lendenwirbelkörpers, wobei zur kranialen und kaudalen Epiphysenfuge ein ca. 0,5 mm Abstand eingehalten wurde.

Bei 200facher Vergrößerung wurden gemessen

:

- der Knochenumfang (bone perimeter, B.Pm)
- der mit Osteoid bedeckte Knochenumfang (osteoid perimeter, O.Pm)
- der mit Osteoblasten bedeckte Knochenumfang (osteoblast perimeter, Ob.Pm)
- die Anzahl der Osteoklasten (number of osteoclasts, N.Oc)
- der mit Osteoklasten bedeckte Knochenumfang (osteoclast perimeter, Oc.Pm).
- die erodierte Knochenfläche (eroded perimeter, E.Pm).

Osteoklasten waren dabei als große, sich direkt dem Knochen anschmiegende ein- oder mehrkernige Zellen mit blassem, schaumig wirkenden Zytoplasma und in Howshipschen Lakunen lokalisiert definiert. Typische Zytoplasmaanschnitte, die keinen Kern mehr enthielten, wurden ebenso als Osteoklasten gewertet. Osteoblasten wurden definiert als einkernige, basophile kubische Zellen, welche sich in unmittelbarer Nähe von Osteoid befanden.

Aus diesen Primärdaten wurde daraufhin der prozentuale Anteil der von mit Osteoid bedecktem Knochenumfang ( $O.Pm/B.Pm \times 100$  in %), die Osteoklastenzahl pro mm mineralisiertem Knochenumfang ( $N. Oc / Md.Pm$  in #/mm mit  $Md.Pm = B.Pm - O.Pm$ ), der mit Osteoblasten bedeckte Knochenumfang ( $Ob.Pm/B.Pm \times 100$  in %), der mit Osteoklasten bedeckte Knochenumfang ( $Oc.Pm/B.Pm \times 100$  in %) und der erodierte Anteil des Knochenumfangs ( $E.Pm/B.Pm \times 100$  in %) berechnet.



### 3.7.3. Dynamische Parameter

Für die Messung der dynamischen, auf einer intravitalem Fluorochrommarkierung beruhenden Parameter, wurde dieselbe technische Ausrüstung wie für die zellulären Parameter benutzt. Für die Fluoreszenzanregung wurde eine Quecksilber-Höchstdrucklampe HBO 50 (Fa. Zeiss, Oberkochen) verwendet. Bei Anregungswellenlängen von 450 bis 490 nm zeigt Calcein, welches sich über Chelatbildungen an  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen der sich im Aufbau befindlichen Apatitkristalle an den Mineralisationsfronten in den Knochen einlagert, eine intensiv grüne Fluoreszenz (TONNA et al., 1984).

Alizarin complexone hingegen zeigt hier eine hellrote Färbung, während Oxytetracyclin sich als blassgelbe Linien darstellt, welche unter Blauviolettanregung deutlich von den Calceinmarkierungen zu unterscheiden sind.

Der Knochenumfang (Bone perimeter...B.Pm) und der mit einer Calcein-Doppelmarkierungen bedeckte Knochenumfang (Double-labeled perimeter, d.L.Pm), der durch Alizarin bedeckte Knochenumfang (Aliz.Pm) und der durch Oxytetracyclin fluoreszierende Knochenumfang (TC.Pm) wurden bei 200facher Vergrößerung bestimmt.

Der Abstand zwischen den beiden Calcein-Markierungen wurde alle 50  $\mu\text{m}$  bei 400-facher Vergrößerung gemessen. Daraus wurde dann durch Division des aus mindestens 40 Messungen pro Tier errechneten mittleren Abstandes durch den Zeitabstand der Fluoreszenzmarkierungen die mineral apposition rate (MAR in  $\mu\text{m}/\text{day}$ ) errechnet. Die pro Tag und Knochenumfang neu gebildete mineralisierte Knochenfläche (Bone formation rate, BFR = MAR x dl. Pm/B. Pm in  $\mu\text{m}^2$   $\mu\text{m}^2/\mu\text{m}/\text{day}$ ) wurde als Produkt aus der MAR und dem aktiv in mineralisation befindlichen Knochenumfang (Mineralizing perimeter, MPM = dL.Pm/B.Pm x 100 in %) berechnet.

### 3.8 Statistik

Zur objektiven Auswertung der Ergebnisse wurden verschiedene Varianz-Analysen, bzw. Tests wie folgt angewendet:

Zum Vergleich aller Gruppen (2 - 8) mit der Baseline-Gruppe (1) wurde zur Feststellung signifikanter Unterschiede eine einfache Varianzanalyse (one-way

ANOVA) und anschließend der T-Test nach Dunnett durchgeführt, wobei die Baseline-Gruppe als Kontrollgruppe diente.

Um die Gruppe 2 mit der Gruppe 3, bzw. die Gruppe 4 mit der Gruppe 5 zu vergleichen, wurde der T-Test angewendet .

Der Vergleich der Gruppen der Repletionsphase mit der Kontrollgruppe wurde zunächst eine einfache Varianzanalyse durchgeführt. Wenn hierbei die Gruppen mit  $p < 0,05$  keiner gemeinsamen Grundgesamtheit entstammten, wurde der least significant difference (LSD)-Test als post hoc-Test verwendet. Ein  $p < 0.05$  wurde dabei als statistisch signifikanter Unterschied bewertet.

## 4 Resultate

### 4.1 Allgemeinzustand der Ratten

Der Gesundheitszustand der Tiere wurde jeden zweiten Tag überprüft.

Die bei Zinkmangel typischen Symptome der zinkmangelbedingten Hautveränderung, Haarausfall, Diarrhöe (Mori. et al., 2000) oder erhöhte körperliche Aktivität (Van Wouwe et al., 1994-a) wurden nicht festgestellt. Eine Ratte musste wegen eines irreversiblen Uterusvorfalls euthanasiert werden, eine Ratte starb im ersten Monat des Experiments ohne ersichtlichen Grund (Sektion o.b.B), eine Ratte musste wegen starker Unterernährung durch die zinkdepletionsbedingte Anorexie getötet werden.

6 Ratten mussten nach einer Infektion mit *Microsporum canis* eingeschläfert werden. Dieser Hautpilz wurde während der Laufzeit des Experimentes durch das Pflegepersonal in die Tierhaltung eingeschleppt. Der gesamte Bestand wurde deswegen mit einer oralen Lufenurontherapie (Program®, orale Suspension, Fa. Novartis, Deutschland) in der Dosierung von 100 mg/ kg zweimalig im Abstand von 14 Tagen erfolgreich therapiert.

### 4.2 Futteraufnahme

Die Tiere wurden über die Versuchsdauer restriktiv mit 7,5 g der Diät pro Tier und Tag gefüttert. Bei dieser Ration konnten sie ihr Ausgangsgewicht halten. Im Versuchsverlauf kam es aber zu einer starken Abnahme des Appetites der Zinkmangeltiere, so dass die Ratten an Gewicht verloren. Da die Kontrolltiere nach den Vorgaben der Zinkmangeltiere paargefüttert wurden, hatte diese Reduktion der Futteraufnahme einen Gewichtsverlust bei den Kontrolltieren zur Folge.

Die Reduktion der Futteraufnahme stellte vor allem in der Depletionsphase, aber auch zu Beginn der Zinkmarginalphase ein ernsthaftes Problem dar. Wie schon in vielen Zinkmangelexperimenten zuvor (Massaro et al., 1981; Essatara et al., 1984; Cannon et al., 1988; Mori et al., 2001) wurden auch diese Ratten durch den Zinkmangel bereits am 5. Tag der Depletionsphase anorektisch. Der Futterverbrauch sank von anfänglich 7,5 g pro Tier und Tag nach einer Woche

auf durchschnittliche 4 g und nach einer weiteren Woche auf 2,5 g. Einige Ratten fraßen am Ende der Depletion nur noch 1,5 g am Tag.

Erst als Zinksulfat zu Beginn der zinkmarginalen Phase per Schlundsonde appliziert wurde, stellte sich schon einen Tag später der Appetit wieder ein (5,9 g pro Ratte und Tag). Nach einer über einige Tage andauernden langsamen Steigerung der Zinksulfatdosis auf 75 µg Zink pro Tier und Tag fraßen die Ratten wieder ca. 7-7,5 g. Diese Dosis von 75 µg wurde dann bei den Marginalgruppen über die Restlaufzeit des Experimentes beibehalten. Um zu überprüfen, ob die Zinkzufuhr auch tatsächlich im marginalen Bereich war, wurde gelegentlich die über die Sonde zugeführte Zinksulfatmenge für einen Tag auf 65 µg reduziert, worauf hin sich bereits am nächsten Tag eine verminderte Futteraufnahme feststellen ließ.

#### 4.3 Gewichtsentwicklung

**Tabelle 4.3 - Gewichtsentwicklung**

Gruppe	Name	Gewicht (g)
1	Baseline	208.8 (18.3)
2	Kontrollgruppe	204.5 (9.5)
3	Depletionsgruppe	193.4 (17.9)
4	Kontrollgruppe	202.6 (26.8)
5	Marginalgruppe	179.8 (16.9)
6	Kontrollgruppe	191.0 (19.2)
7	Marginalgruppe	181.7 (10.0)
8	Repletionsgruppe	189.0 (13.8)

*Die Werte stellen den Mittelwert ± Standardabweichung (in Klammern) dar.*

Zu Beginn des Experiments wogen die Gruppen durchschnittlich 213 g (s. Tab.4.3 und Abb. 4.3). Sie hatten vor Beginn der Depletionsphase eine einmonatige Adaptionsphase an die semisynthetische Diät. Die Baselines wogen danach durchschnittlich 204 g. Schon wenige Tage nach Depletionsbeginn nahmen die Tiere kontinuierlich ab, wobei bei den Zinkmangelgruppen ein stärkerer Gewichtsverlust verzeichnet wurde, als bei den Kontrollgruppen, obwohl die Tiere paargefüttert wurden.

Am Ende der Depletion hatten die Zinkmagnetiere im Vergleich zu den Baselines 7,3 % an Körpermasse verloren (die Zinknormaltiere 2 %), nach der marginalen Phase waren es bei den Marginaltieren bezogen auf die Baselinetiere bereits 13,8 % (3 %).

Allerdings war keine der Gewichtsveränderungen statistisch signifikant.

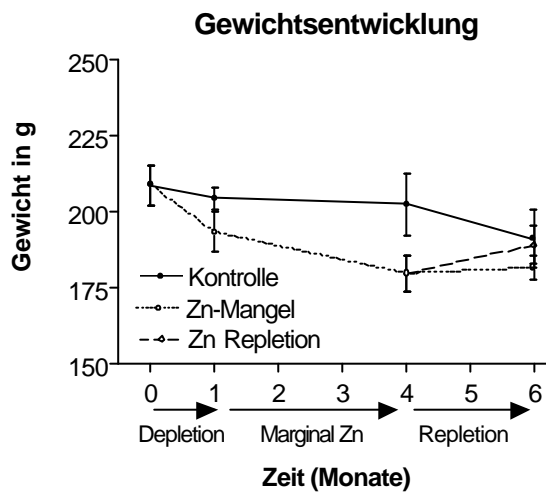


Abb. 4.3 - Gewichtsentwicklung

## 4.4 Serumparameter

Die Serumwerte der einzelnen Tiere lassen sich aus Tabelle 4.4 entnehmen.

**Tabelle 4.4**  
**Ergebnisse der Serumauswertung**

Gruppe	AST (U/l)	ALP (U/l)	T-Bili ( $\mu$ mol/l)	CK (U/l)	Alb (g/l)	Hst (mmol/l)	Crea ( $\mu$ mol/l)	P (mmol/l)	Na (mmol/l)	K (mmol/l)	Ca (mmol/l)	Zn $\mu$ g/ml
1	49.0	178.1	0.8	177.8	37.7	4.19	28.88	1.46	144.33	3.98	2.50	1.133
	(6.3)	(23.9)	(0.5)	(60.4)	(2.6)	(0.88)	(2.30)	(0.33)	(1.38)	(0.17)	(0.055)	(0.087)
2	39.8	215.0	0.6	119.5°	36.9	2.74°	28.63	1.54	149.55	4.38	2.52	0.911
	(3.4)	(47.1)	(0.5)	(17.0)	(2.2)	(0.68)	(1.92)	(0.21)	(4.00)	(0.46)	(0.092)	(0.052)
3	45.3	120.6*°	1.2*	110.1°	37.6	3.14	30.63	1.60	153.13	4.41	2.53	0.788°
	(6.5)	(22.3)	(0.5)	(22.9)	(1.0)	(0.61)	(2.26)	(0.17)	(1.21)	(0.35)	(0.07)	(0.142)
4	41.4	211.9	0.9	90.3°	39.9	4.31	26.57	1.69	152.35	5.31	2.68	1.133
	(2.5)	(42.9)	(0.5)	(18.1)	(2.5)	(0.78)	(1.99)	(0.17)	(1.26)	(0.60)	(0.08)	(0.145)
5	43.4	152.3⊖	1.1	83.8°	40.0	4.73	27.88	1.79	154.18	4.91	2.62	0.77⊖°
	(2.7)	(30.2)	(0.5)	(24.2)	(2.5)	(0.31)	(2.10)	(0.27)	(1.57)	(0.61)	(0.17)	(0.218)
6	46.0	141.5	1.0	80.0°	43.7°	4.21	25.25	1.61	153.42	4.44	2.53	1.206
	(7.6)	(54.3)	(0.4)	(13.8)	(1.9)	(0.60)	(4.57)	(0.43)	(2.08)	(0.29)	(0.06)	(0.145)
7	52.3	157.4	0.7	64.0°	40.8°	4.33	26.57	1.84	152.34	4.36	2.5	0.83°⊗
	(29.5)	(37.1)	(0.2)	(25.5)	(2.0)	(0.71)	(1.27)	(0.41)	(0.67)	(0.48)	(0.05)	(0.162)
8	49.0	147.8	0.6⊗	79.0°	43.6°	5.33	24.20	2.02	153.16	4.14	2.56	1.317?
	(15.1)	(37.3)	(0.4)	(15.0)	(3.0)	(1.64)	(4.16)	(0.20)	(0.61)	(0.13)	(0.07)	(0.046)

Die Werte stellen den Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung (in Klammern) dar.

° = signifikanter Unterschied zu Gruppe 1; \* = signifikanter Unterschied zu Gruppe 2;

⊖ = signifikanter Unterschied zu Gruppe 4; ⊗ = signifikanter Unterschied zu Gruppe 6.

? = signifikanter Unterschied zu Gruppe 7

AST = Aspartat-Aminotransferase; ALP = alkalische Phosphatase; T-Bili = Gesamtbilirubin;  
CK = Kreatinkinase; Alb = Albumin; Hst = Harnstoff; Crea = Kreatinin; P = Phosphor; Na =  
Natrium; K = Kalium; Ca = Kalzium; Zn = Zink

Wirklich dramatische Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen waren nicht festzustellen. Hier eine Zusammenfassung der signifikanten Unterschiede:

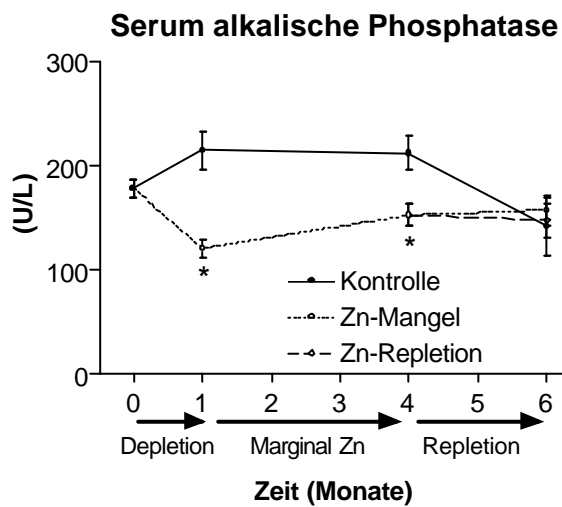
Das Serumzink reagierte auf die Zinkzufuhr deutlich: Die Baseline-, die Kontrollgruppen und die Repletionsgruppe hatten in Grossen und Ganzen alle gleich hohe Werte. Bei den Zinkdepletions bzw. -marginaltieren war der Zinkgehalt des Plasmas gleich niedrig, mit signifikanten Abnahmen im Vergleich zu ihren Kontrollgruppen von ca. 30 % (s. Abb 4.42).

Die Kreatinkinase (CK) fällt im Verlauf des Experiments um 55 - 64 % ab (Gruppe 1 gegen die Gruppen der Repletionsphase). D.h., je länger die Tiere im Versuch waren, desto geringer war der CK-Spiegel im Serum.

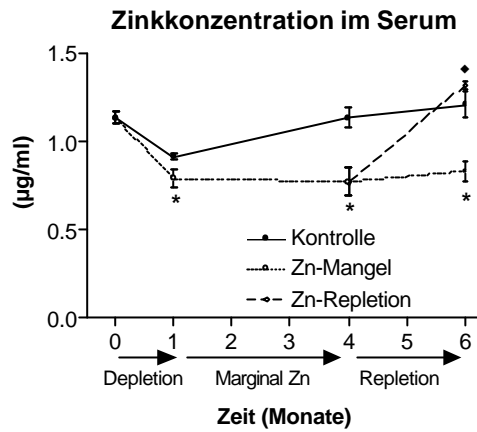
Uneinheitlich verhielt sich Bilirubin. Obwohl es keine großen Schwankungen gab, konnte der höchste Wert bei der Depletionsgruppe (3) mit 1,2  $\mu\text{mol/l}$  festgestellt werden, was gegenüber der Kontrollgruppe statistisch signifikant war.

Serum-Albumin war bei den der Gruppen der Repletionsphase gegenüber der Baseline-Gruppe signifikant erhöht.

Bei der alkalischen Phosphatase (ALP) sind ebenfalls nennenswerte Unterschiede aufgetreten. Die Kontrolltiere zeigten eine höhere ALP-Aktivität als Zinkmangeltiere (s. Abb.4.4-1). Am deutlichsten war die Differenz zwischen der Depletionsgruppe und der dazugehörigen Kontrollgruppe. Die Kontrollratten hatten eine um 44 % höhere ALP-Aktivität vorzuweisen als die Depletionsratten. Ähnlich, jedoch nicht ganz so stark, war der Unterschied zwischen den Gruppen 4 und 5 der Marginalphase (28 % Differenz). Bei den repletierten (Gruppe 8) und den weiter zinkmarginal gehaltenen Tieren (Gruppe 7) bzw. der dazugehörigen Kontrollgruppe werden die Differenzen deutlich kleiner.



**Abb. 4.4-1 - Verlauf der Aktivität der alkalischen Phosphatase im Serum .**  
 \*,  $p < 0.05$  gegen jeweilige zinkadäquate Kontrollgruppe.



**Abb. 4.4-2 - Verlauf der Zinkkonzentration im Serum**  
\*,  $p < 0.05$  gegen jeweilige zinkadäquate Kontrollgruppe.

#### 4.5 Urinparameter

**Tabelle 4.5**  
**Ergebnisse der Urinauswertung**

Gruppe	Name	UrCrea mM	UrP/Crea mM/mM	UrNa/Crea mM/mM	UrK/Crea mM/mM	UrCa/Crea mM/mM	DPD/Crea nM/Mm
1	Baseline	6.35 (2.26)	4.66 (0.98)	11.46 (5.82)	14.45 (4.5)	0.41 (0.15)	137.58 (40.48)
2	Kontrolle	12.48 (4.37)	6.22 (2.88)	13.66 (3.94)	18.42 (5.3)	0.28 (0.23)	124.24 (21.03)
3	Depletion	10.03 (6.17)	3.29*° (1.83)	8.97* (5.91)	9.35*° (4.38)	0.36 (0.19)	101.2° (29.81)
4	Kontrolle	12.57 (6.39)	7.27 (2.67)	15.93 (7.71)	20.35 (8.40)	0.48 (0.42)	104.89 (23.40)
5	Marginal	18.42 (6.15)	7.67 (1.69)	14.27 (6.53)	17.46 (6.63)	0.26 (0.12)	99.47° (20.04)
6	Kontrolle	21.03 (19.34)	2.68° (2.03)	5.88 (5.29)	8.18° (5.23)	0.38 (0.27)	70.10° (29.30)
7	Marginal	20.62 (21.27)	5.01 (3.40)	9.81 (11.71)	12.77 (9.78)	0.52 (0.32)	64.30° (11.66)
8	Repletion	24.66 (10.44)	5.81 (2.94)	7.98 (6.55)	15.36 (10.21)	0.20 (0.11)	87.76° (18.88)

Die Werte stellen den Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung (in Klammern) dar.

° = signifikanter Unterschied zu Gruppe 1; \* = signifikanter Unterschied zu Gruppe 2;

Die Tabelle gibt die Mittelwerte bezogen auf die Kreatininausscheidung wieder.

UrCrea = Kreatininausscheidung; UrP/Crea = Phosphorausscheidung im Verhältnis zur Kreatininausscheidung; UrNa/Crea = Natriumausscheidung im Verhältnis zur Kreatininausscheidung; UrCa/Crea = Kalziumausscheidung im Verhältnis zur Kreatininausscheidung; DPD/Crea = Desoxypyridinolinausscheidung im Verhältnis zur Kreatininausscheidung.



Im Versuchsverlauf waren die Unterschiede zwischen Kontroll- und Zinkmangeltieren bei der Depletionsgruppe und ihrer Kontrollgruppe am deutlichsten, vor allem in der Phosphor-Ausscheidung: die Kontrolltiere scheiden fast doppelt so viel Phosphor aus, wie die Depletionstiere. Ähnlich verhält es sich in diesen Gruppen bei der Kalium- und Natrium-Ausscheidung.

Die Ausscheidung von DPD verhielt sich uneinheitlich. Es war jedoch eine Abnahme über den Versuchsverlauf hinweg festzustellen. Die geringsten Werte zeigten die Tiere der letzten Versuchsphase, wo die größte Differenz zur Baseline-Gruppe die Marginalgruppe 7 hatte (über 50 % Unterschied).

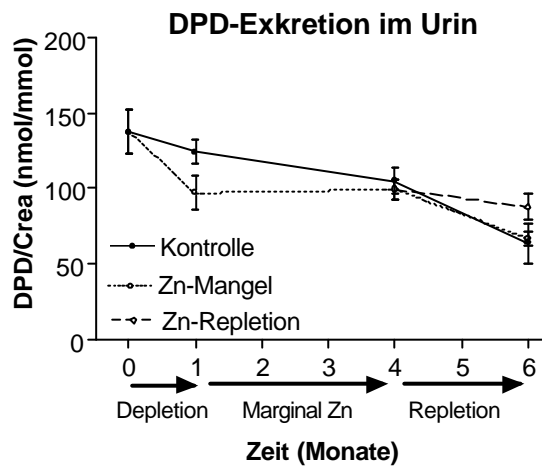


Abb. 4.5 - Verlauf der DPD-Ausscheidung

## 4.6 Zinkgehalte des Knochens

**Tabelle 4.6**  
**Ergebnisse der Analyse des Zinkgehalts des Femurs**

Gruppe	Name	Aschegewicht des Femur (g)	Trockengewicht des Femur (g)	Zinkgehalt der Femurs (g)
1	Baseline	/	/	/
		/	/	/
2	Kontrolle	0.255 (0.014)	0.472 (0.018)	228.4 (19.7)
3	Depletion	0.252 (0.038)	0.450 (0.048)	203.8* (15.2)
4	Kontrolle	0.248 (0.021)	0.521 (0.037)	212.6 (16.5)
5	Marginal	0.251 (0.02)	0.512 (0.043)	183.2 (14.4)
6	Kontrolle	0.254 (0.025)	0.503 (0.046)	218.9 (11.4)
7	Marginal	0.254 (0.024)	0.504 (0.037)	168.8⊗ (16.0)
8	Repletion	0.241 (0.023)	0.484 (0.034)	184.5⊗ (12.7)

Die Werte stellen den Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung (in Klammern) dar.

\* = signifikanter Unterschied zu Gruppe 2; ⊗ = signifikanter Unterschied zu Gruppe

Bei der Knochenzinkanalyse lässt sich deutlich eine Reaktion auf die niedrige Zinkzufuhr erkennen. Die Zinkmangel- bzw. -marginalgruppen hatten signifikant weniger Zink im Knochen, als ihre dazugehörigen Kontrollgruppen. Die Repletionstiere hatten jedoch fast den gleichen Zinkgehalt im Knochen wie die dazugehörige weiter zinkmarginal gefütterte Gruppe 7. Bei dieser Analyse kam es nicht zu einer sich über die Versuchsdauer hinweg entwickelnden Abnahme des Femurzinkgehaltes.

Trocken- und Aschegewichte blieben weitgehend konstant.

Außerdem zeigte sich bei Vergleich der Knochenzinkgehalte mit den Serumzinkgehalten, dass die beiden Kurven keinen parallelen Verlauf hatten, was deutlich machte, dass der Knochenzinkgehalt nicht unmittelbar vom Serumzink abhängt.

## 4.7 Knochenmineraldichte (pQCT)

**Tabelle 4.7-1**  
**Knochenmineraldichte im 4. Lendenwirbel**

Gruppe	Total-BMD (mg/cm <sup>3</sup> )	Cortical/Sub-cortical BMD (mg/cm <sup>3</sup> )	Trabecular-BMD (mg/cm <sup>3</sup> )	Total-Area (mm <sup>2</sup> )	Cortical/Sub-cortical Area (mm <sup>2</sup> )	Trabecular-Area (mm <sup>2</sup> )
1	659.8 (9.1)	901.0 (21.7)	499.2 (54.0)	5.14 (0.38)	2.05 (0.15)	3.08 (0.23)
2	631.2 (19.4)	901.5 (27.7)	451.4 (26.1)	5.06 (0.23)	2.02 (0.09)	3.04 (0.14)
3	627.9 (37.6)	895.3 (49.2)	450.5 (34.2)	4.99 (0.27)	1.99 (0.11)	2.62 (0.16)
4	600.6 (28.2)	879.2 (22.3)	415.6 (34.4)	5.02 (0.20)	2.00 (0.09)	2.43 (0.11)
5	606.3 (29.9)	879.9 (34.3)	424.9 (43.9)	5.05 (0.28)	2.01 (0.11)	3.03 (0.17)
6	615.5 (55.2)	876.6 (52.0)	441.2 (57.8)	5.32 (0.22)	2.13 (0.09)	3.19 (0.14)
7	619.4 (45.4)	893.5 (17.8)	436.9 (70.4)	5.02 (0.16)	2.01 (0.07)	3.01 (0.1)
8	616.5 (48.4)	885.8 (41.1)	437.6 (58.6)	4.91 (0.19)	1.96 (0.08)	2.95 (0.12)

**Tabelle 4.7-2**  
**Knochenmineraldichte in der proximalen Tibia**

Gruppe	Name	Total-BMD (mg/cm <sup>3</sup> )	Cortical/Sub-cortical BMD (mg/cm <sup>3</sup> )	Trabecular-BMD (mg/cm <sup>3</sup> )	Total-Area (mm <sup>2</sup> )	Cortical/Sub-cortical Area (mm <sup>2</sup> )	Trabecular-Area (mm <sup>2</sup> )
1	Baseline	707.7 (40.8)	1018.2 (37.2)	387.3 (66.7)	13.20 (2.27)	6.60 (1.13)	6.60 (1.14)
2	Kontrolle	614.9° (37.0)	955.1° (39.4)	274.1 (36.6)	13.79 (1.47)	6.90 (0.73)	6.89 (0.74)
3	Depletion	615.2° (37.7)	953.3° (29.7)	277.4 (54.2)	13.63 (1.70)	6.81 (0.84)	6.82 (0.85)
4	Kontrolle	554.6° (21.1)	914.6° (16.8)	195.3° (28.4)	13.44 (0.89)	6.71 (0.44)	6.73 (0.45)
5	Marginal	566.6° (35.4)	947.6°⊖ (25.4)	186.0° (57.1)	12.74 (1.15)	6.37 (0.58)	6.37 (0.57)
6	Kontrolle	637.5 (83.8)	989.3 (54.5)	285.7 (113.6)	13.32 (0.55)	6.66 (0.26)	6.66 (0.28)
7	Marginal	570.4° (59.1)	933.3°⊗ (30.0)	207.4° (108.2)	14.28 (1.23)	7.14 (0.61)	7.14 (0.62)
8	Repletion	576.1° (50.9)	945.0° (22.4)	200.2° (85.1)	13.05 (1.81)	6.52 (0.91)	6.53 (0.90)

Die Werte stellen den Mittelwert ± Standardabweichungen (in Klammern) dar.

° = signifikanter Unterschied zu Gruppe 1; ⊖ = signifikanter Unterschied zu Gruppe 4;

⊗ = signifikanter Unterschied zu Gruppe 6.

**Tabelle 4.7- 3**  
**Knochenmineraldichte in der distalen Tibia**

Gruppe	Name	Total-BMD (mg/cm <sup>3</sup> )	Cortical/Sub-	Trabecular-	Total- Area (mm <sup>2</sup> )	Cortical/Sub-	Trabecular-
			cortical BMD (mg/cm <sup>3</sup> )	BMD (mg/cm <sup>3</sup> )		cortical Area (mm <sup>2</sup> )	Area (mm <sup>2</sup> )
1	Baseline	765.3 (94.05)	1009.1 (105.18)	196.1 (88.99)	7.15 (1.25)	5.01 (0.88)	2.14 (0.37)
2	Kontrolle	729.1 (12.17)	982.4 (15.54)	139.1 (21.59)	7.33 (0.36)	5.13 (0.25)	2.20 (0.11)
3	Depletion	606.9 (18.49)	989.0 (25.41)	125.5 (19.18)	7.05 (0.47)	4.93 (0.33)	2.12 (0.14)
4	Kontrolle	716.3 (38.25)	973.6 (48.87)	116.5 (39.53)	7.17 (0.44)	5.01 (0.31)	2.15 (0.13)
5	Marginal	699.8° (19.00)	955.5 (27.49)	85.4° (23.85)	7.19 (0.39)	5.04 (0.20)	2.16 (0.12)
6	Kontrolle	752.3 (95.26)	1028.5 (25.89)	110.0 (37.04)	6.90 (0.54)	4.83 (0.37)	2.08 (0.17)
7	Marginal	724.7 (53.88)	972.6⊗ (36.01)	146.7 (144.20)	7.35 (0.90)	5.17 (0.63)	2.22 (0.27)
8	Repletion	700.5 (20.72)	955.7⊗ (31.73)	103.9 (4.61)	7.16 (0.51)	5.02 (0.37)	2.15 (0.14)

Die Werte stellen den Mittelwert ± Standardabweichung (in Klammern) dar.

° = signifikanter Unterschied zu Gruppe 1; ⊗ = signifikanter Unterschied zu Gruppe 4; ⊗ = signifikanter Unterschied zu Gruppe 6.

**Tabelle 4.7- 4**  
**Knochenmineraldichte des Tibiaschaftes**

Gruppe	Name	Total-BMD (mg/cm <sup>3</sup> )	Total- Area (mm <sup>2</sup> )	Cortical- Area mm <sup>2</sup>	Cortical - BMD (mg/cm <sup>3</sup> )	Cortical Thickness (mm)	Pericortical perimeter (mm)	Endocortical perimeter (mm)
1	Baseline	1069.3 (38.94)	3.97 (0.25)	2.87 (0.21)	1369.5 (11.42)	0.533 (0.04)	7.064 (0.22)	3.717 (0.25)
2	Kontrolle	1016.5° (20.56)	4.08 (0.13)	2.77 (0.14)	1373.2 (10.08)	0.495° (0.03)	7.159 (0.12)	4.051° (0.15)
3	Depletion	1022.7 (26.98)	4.04 (0.22)	2.74 (0.15)	1377.5 (13.13)	0.491° (0.02)	7.125 (0.19)	4.038° (0.20)
4	Kontrolle	924.8° (23.00)	4.13 (0.15)	2.55° (0.11)	1354.7 (5.83)	0.438° (0.02)	7.206 (0.13)	4.455° (0.12)
5	Marginal	936.4° (36.08)	4.19 (0.38)	2.62° (0.20)	1357.1 (14.38)	0.448° (0.02)	7.250 (0.33)	4.435° (0.32)
6	Kontrolle	961.8° (56.45)	4.18 (0.11)	2.68 (0.13)	1362.6 (4.79)	0.463° (0.03)	7.245 (0.09)	4.335° (0.28)
7	Marginal	938.3° (39.71)	4.20 (0.20)	2.64° (0.11)	1359.9 (9.32)	0.453° (0.03)	7.266 (0.17)	4.419° (0.30)
8	Repletion	959.4° (24.20)	4.00 (0.20)	2.56° (0.10)	1368.5 (9.85)	0.451° (0.01)	7.088 (0.17)	4.257° (0.17)

Die Werte stellen den Mittelwert ± Standardabweichung (in Klammern) dar.

° = signifikanter Unterschied zu Gruppe 1;

Veränderungen, welche auf die unterschiedliche Zinkversorgung zurückzuführen waren, also statistisch signifikante Differenzen zwischen den Kontrollgruppen und ihren Zinkmangelgruppen, traten nur bei der kortikalen/subkortikalen Mineraldichte der proximalen Tibia zwischen den Marginalgruppen 5 bzw. 7 und den jeweils dazugehörigen Kontrollgruppen auf. Dabei kam es in den Zinkmangelgruppen nach der Marginalphase zu einer Erhöhung des Wertes, nach der Repletion jedoch zu einem Absinken.

Vorwiegend handelte es sich bei den statistisch signifikanten Unterschieden jedoch um Veränderungen aller Versuchsgruppen gegen die Baselines, welche sich über den Versuchsverlauf hinweg verstärkten.

Insgesamt kam es dabei vor allem zu einem Knochenmineraldichteabfall über die Dauer des Versuches, wobei die trabekuläre Mineraldichte stärker betroffen war, als die kortikale. Die Gesamtmineraldichte sank über den Versuchsverlauf sowohl am Lendenwirbel, als auch an der Tibia (s. Abb. 4.7-1/2). Besonders stark war dabei die proximale Tibia betroffen. Bei ihr kam es bei der Gesamtknochenmineraldichte zu Abnahmen von 10 - 20 % im Vergleich der Baseline-Gruppe zu den Gruppen der letzten Phase des Experiments. Bei der trabekulären Mineraldichte waren es proximalen Tibia über die Versuchsdauer sogar 26 - 49 %.

Der endostale Umfang des Tibiaschaftes vergrößerte sich im Versuchverlauf ebenfalls signifikant.

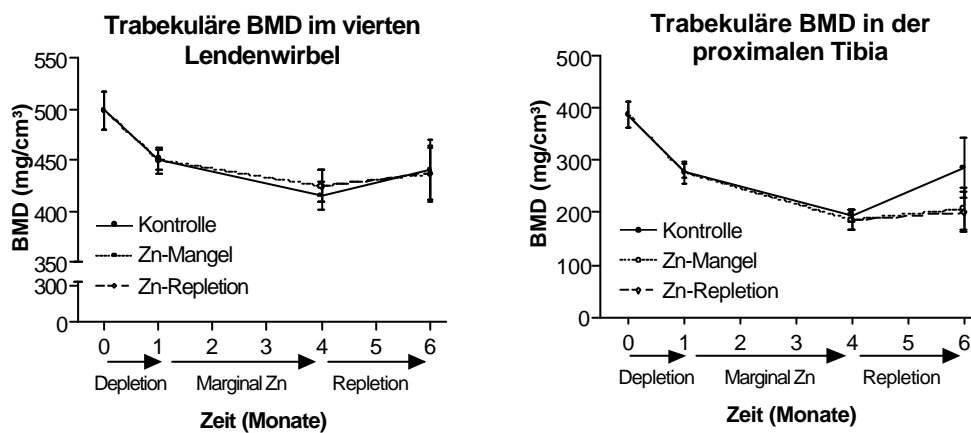


Abb. 4.7- 1/2 Verlauf der trabekulären BMD des 4. Lendenwirbels und der proximalen Tibia

## 4.8 Histomorphometrische Ergebnisse

### 4.8.1 Strukturelle statische Parameter

Für die bildanalytische Auswertung wurde sowohl der ersten Lendenwirbel (L<sub>1</sub>) als auch die rechte, proximale Tibiametaphyse gemessen.

Die Untersuchungsergebnisse lassen sich aus den folgenden Tabellen entnehmen.

**Tabelle 4.8-1**  
**Strukturelle statistische Parameter der Tibia**

Gruppe	Tissue area	Bone area	Trabecular number/ Tissue area	Trabecular area	Bone perimeter	Trabecular number/ bone area	Trabecular width	Trabecular number	Trabecular separation
	T.Ar (mm <sup>2</sup> )	B.Ar/T.Ar (%)	N.Tb/T.Ar (#/mm <sup>2</sup> )	Tb.Ar (mm <sup>2</sup> )	B.Pm/T.Ar (mm/mm <sup>2</sup> )	N.Tb/B.Ar (#/mm <sup>2</sup> )	Tb.Wi (µm)	Tb.N (#/mm)	Tb.Sp (µm)
<b>1</b>	12.48 (2.93)	26.89 (10.50)	2.87 (1.33)	0.14 (0.13)	5.13 (1.04)	13.20 (8.07)	102.18 (20.17)	3.27 (0.66)	237.67 (72.97)
<b>2</b>	14.75 (1.32)	18.42 (3.98)	3.69 (1.17)	0.05 (0.02)	4.34 (0.58)	22.24 (12.55)	84.33 (13.40)	2.76 (0.37)	302.06 (58.39)
<b>3</b>	13.41 (3.44)	19.17 (5.25)	3.67 (1.51)	0.06 (0.03)	4.41 (0.80)	21.23 (11.51)	86.46 (13.62)	2.81 (0.51)	299.58 (72.01)
<b>4</b>	13.79 (0.69)	15.74° (2.78)	3.22 (0.52)	0.05 (0.01)	3.51° (0.40)	21.39 (7.14)	89.26 (6.82)	2.23° (0.25)	382.56° (56.51)
<b>5</b>	14.48 (1.52)	13.27° (3.33)	2.95 (0.63)	0.04 (0.01)	3.30° (0.82)	24.54 (11.08)	80.05° (6.06)	2.10° (0.52)	438.06° (128.80)
<b>6</b>	13.58 (1.25)	20.80 (4.54)	2.81 (0.79)	0.07 (0.02)	4.26 (0.88)	13.76 (3.94)	97.72 (7.26)	2.71 (0.56)	304.37 (70.49)
<b>7</b>	13.76 (1.71)	15.60° (10.38)	2.92 (0.67)	0.06 (0.08)	3.09° (1.04)	25.23 (12.23)	94.57 (25.29)	1.97° (0.66)	472.11° (157.78)
<b>8</b>	13.47 (1.74)	14.10° (4.25)	2.88 (0.29)	0.05 (0.01)	3.07° (0.56)	22.93 (10.93)	89.89 (13.34)	1.95° (0.35)	456.91° (123.13)

Die Werte stellen den Mittelwert ± Standardabweichung (in Klammern) dar.

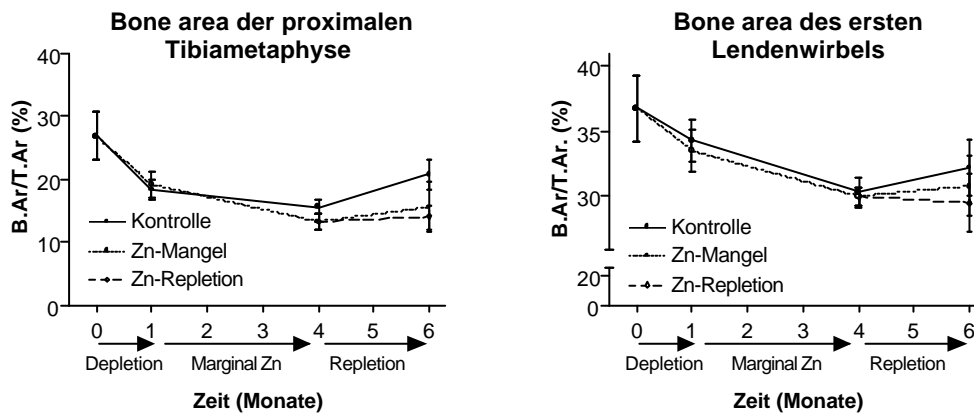
° = signifikanter Unterschied zu Gruppe 1;

**Tabelle 4.8-2**  
**Strukturelle s tatische Parameter des ersten Lendenwirbels**

Gruppe	Tissue area	Bone area	Trabecular number/ Tissue area	Trabecular area	Bone perimeter	Trabecular number/ bone area	Trabecular width	Trabecular number	Trabecular separation
	T.Ar (mm <sup>2</sup> )	B.Ar/T.Ar (%)	N.Tb/T.Ar (#/mm <sup>2</sup> )	Tb.Ar (mm <sup>2</sup> )	B.Pm/T.Ar (mm/mm <sup>2</sup> )	N.Tb/B.Ar (#/mm <sup>2</sup> )	Tb.Wi (µm)	Tb.N (#/mm)	Tb.Sp (µm)
1	4.77 (0.46)	36.80 (7.21)	2.58 (0.88)	0.18 (0.12)	7.20 (0.77)	7.60 (4.05)	101.75 (12.87)	4.58 (0.49)	140.88 (33.04)
2	4.59 (0.68)	34.27 (4.39)	2.24 (0.37)	0.15 (0.03)	6.75 (0.63)	6.70 (1.70)	101.40 (8.25)	4.30 (0.40)	154.72 (22.43)
3	4.57 (0.86)	33.54 (4.22)	2.44 (0.72)	0.16 (0.06)	6.85 (0.48)	7.74 (3.24)	97.57 (7.99)	4.36 (0.30)	153.60 (20.08)
4	5.00 (0.69)	30.27 (3.16)	2.01 (0.65)	0.16 (0.06)	6.74 (0.57)	6.91 (3.12)	90.16 (10.66)	4.29 (0.36)	163.54 (17.94)
5	5.39 (0.68)	29.96° (1.96)	1.92 (0.37)	0.16 (0.04)	6.51 (0.41)	6.49 (1.45)	92.21 (6.96)	4.14 (0.26)	169.60 (12.72)
6	5.14 (0.64)	32.21 (4.20)	1.70 (0.14)	0.19 (0.03)	6.82 (0.50)	5.39 (0.94)	94.23 (6.33)	4.34 (0.32)	157.26 (20.50)
7	5.34 (0.53)	30.79 (6.15)	1.90 (0.47)	0.17 (0.05)	6.51 (0.73)	6.47 (2.26)	94.02 (11.65)	4.15 (0.46)	169.83 (28.44)
8	5.46 (0.60)	29.47° (4.86)	2.08 (0.28)	0.15 (0.04)	6.42 (0.64)	7.43 (2.22)	91.20 (6.88)	4.09 (0.40)	174.85 (28.82)

Die Werte stellen den Mittelwert ± Standardabweichungen (in Klammern) dar.

° = signifikanter Unterschied zu Gruppe 1;



**Abb. 4.8-1/2 – Verlauf der Bone area der proximalen Tibia und des ersten Lendenwirbels**

Insgesamt zeigten die Daten zwischen den einzelnen Gruppen und Phasen nur wenige signifikante Unterschiede.

Beim Wirbel zeigten sich nur bei der Bone area zwei statistisch signifikante Unterschiede, welche sich in einer Tendenz zur Abnahme über die Versuchsdauer hinweg darstellten (s. Abb. 4.8-1/2)

An der Tibia zeigten sich mehr statistisch signifikante Veränderungen. Diese stellten sich ausschließlich als Abnahmen über die Versuchsdauer hinweg dar, mit einer geringen Tendenz der Verschlechterung der Werte zur marginalen Phase hin (Gruppe 4 und 5). Diese Veränderungen zeigten die Parameter Bone area, Bone perimeter und Trabekular separation.

Eine Reaktion auf die verschiedenen Zinkzulagen, also Unterschiede zwischen den Mangel- und ihren Kontrollgruppen, waren zu keinem Zeitpunkt statistisch signifikant. Lediglich bei der Bone area kam es in der Repletion zu einem geringgradigen, jedoch nicht statistisch signifikanten Anstieg (s. Abb. 4.8-1/-2)

#### 4.8.2 Zelluläre statische Parameter

**Tabelle 4.8-3**  
**Ergebnisse der zellulären statischen Parameter des ersten Lendenwirbels**

Gruppe	Name	Osteoid Perimeter % OPM	Osteoblast Perimeter % OBPM	Osteoklast Perimeter % OCPM	Eroded Perimeter % EPM	Number of Perimeter NOC
1	Baselines	14.84 (10.51)	13.76 (10.33)	2.90 (0.50)	10.52 (3.84)	1.49 (0.23)
2	Kontrolle	8.62 (3.20)	7.85 (3.05)	2.50 (0.63)	9.43 (3.05)	1.21 (0.46)
3	Depletion	10.88 (3.24)	10.13 (3.03)	2.33 (0.57)	9.13 (2.94)	0.98° (0.27)
4	Kontrolle	7.33° (2.71)	6.83° (2.54)	1.61° (0.47)	7.90 (1.62)	0.73° (0.22)
5	Marginal	7.19° (2.63)	6.93° (2.61)	1.83° (0.61)	8.54 (2.48)	0.86° (0.27)
6	Kontrolle	5.99° (4.26)	5.30° (3.22)	1.53° (0.57)	10.49 (2.07)	0.71° (0.26)
7	Marginal	4.53° (2.83)	4.23° (2.64)	1.55° (0.69)	7.88 (1.19)	0.74° (0.31)
8	Repletion	4.92° (1.70)	4.55° (1.51)	1.52° (0.63)	8.82 (3.52)	0.69° (0.17)

Die Werte stellen den Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung (in Klammern) dar.

° = signifikanter Unterschied zu Gruppe 1



Zusammenfassend ist hier zu sagen, dass die zellulären statistischen Parameter keine Reaktion auf die unterschiedliche Zinkzufuhr zeigten. D.h., es waren keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den Kontroll- und den Mangelgruppen festzustellen.

Auch bei dieser Analyse kam es über die Versuchsdauer hinweg zu einer Abnahme der Stoffwechselaktivität am Knochen. Sowohl der Osteoklastenparameter, als auch der Osteoblastenparameter nahmen fortlaufend ab. Im Vergleich der Baselines zu den drei Gruppen der letzten Versuchphase ging der Anteil des von Osteoblasten bedeckten Knochenumfangs (% OBPM) um 60 - 70 % zurück, der Anteil des von Osteoklasten bedeckten Knochenumfangs (% OCPM) ging im Vergleich der Baselines zu den Gruppen der letzten Versuchphase um 47 - 53 % zurück. Ähnlich verhielt es sich bei der Osteoklastenzahl (NOC) und des den Knochenumfang bedeckenden Anteils des Osteoids (% OPM).

#### 4.8.3 Dynamische Knochenparameter

**Tabelle 4.8-4**  
**Ergebnisse der Auswertung der dynamischen Knochenparameter**

Gruppe	Name	Mineralizing Perimeter MPM (%)	Mineral Aposition Rate MAR ( $\mu\text{m}/\text{Tag}$ )	Bone Formation Rate BFR ( $\mu\text{m}^3$ )
1	BL	22.58 (5.66)	1.43 (0.11)	0.32 (0.09)
2	Kontrolle	12.14° (3.53)	0.99° (0.15)	0.12° (0.04)
3	Depletion	18.56* (3.68)	1.21*° (0.06)	0.22*° (0.04)
4	Kontrolle	16.63 (3.12)	0.97° (0.15)	0.16° (0.05)
5	Marginal	14.72° (6.25)	1.01° (0.12)	0.15° (0.07)
6	Kontrolle	6.34° (4.55)	1.19° (0.05)	0.07° (0.05)
7	Marginal	6.85° (3.57)	0.94⊗° (0.12)	0.06° (0.03)
8	Repletion	7.62° (3.14)	1.13°? (0.17)	0.08° (0.04)

Die Werte stellen den Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung (in Klammern) dar.

° = signifikanter Unterschied zu Gruppe 1; \* = signifikanter Unterschied zu Gruppe 2  
⊗ = signifikanter Unterschied zu Gruppe 6. ? = signifikanter Unterschied zu Gruppe 7

Bei der Auswertung der dynamischen Knochenparameter waren vor allem im Vergleich der Depletionsgruppe 3 zu ihrer Kontrollgruppe statistisch signifikante Differenzen aufgetreten, welche sich aber gegen die Erwartung als Erhöhung der Knochenformation in allen drei Messparametern darstellte: der Mineralizing perimeter (MPM), die Mineral aposition rate (MAR) und die Bone formation rate (BFR) stiegen bei den Depletionstieren im Vergleich zu ihrer Kontrollgruppe 2 an. Nur bei der Marginalgruppe 7 kam es bei der MAR zu einem Absinken des Wertes im Vergleich mit der Kontrollgruppe und der Repletionsgruppe. Allerdings zeigten die Werte für MPM und BFR keine Unterschiede zwischen Zinkmangel- und Kontrolltieren nach Beendigung der Repletion.

Insgesamt kam es über den Versuchsverlauf zu einer Abnahme der dynamischen Knochenparameter; so sank beispielsweise die BFR über den Versuchsverlauf um 75-80 %.

## 5 Diskussion

In der vorliegenden Studie wurden erstmals die langfristigen Auswirkungen einer marginalen Zinkversorgung auf den Knochenstoffwechsel von ausgewachsenen Ratten untersucht.

### 5.1 Die Zink-Depletionsmethode

Um die Tiere in einer angemessenen Zeit überhaupt in die Stoffwechselsituation des Zinkmangels zu versetzen, wurde eine spezielle phytathaltige Depletionsdiät verfüttert, durch welche auch bei adulten Ratten innerhalb weniger Tage ein ausgeprägter Zinkmangel hervorgerufen werden kann.

Der Zinkbedarf adulter Ratten ist deutlich geringer als der von wachsenden. Eine alleinige zinklose Fütterung verursacht bei ausgewachsenen Ratten, wenn überhaupt, wahrscheinlich erst nach mehreren Monaten Zinkmangelsymptome (Windisch & Kirchgessner, 1999-a).

Durch eine bestimmte Phytatmenge im Futter ist es nun möglich, die Tiere innerhalb weniger Tage in eine definierte Zinkmangelsituation zu versetzen. Bei Phytat (Inositolhexaphosphat) handelt es sich um einen Komplexbildner, welcher im Darm in der Lage ist, mit Zink und anderen Ionen eine schwerlösliche Verbindung zu bilden, welche nicht resorbiert werden kann. Auf diese Weise kann zum einen das im Futter enthaltene Zink, zum anderen aber auch das körpereigene in den Darm sezernierte Zink mit den Fäzes zu Ausscheidung gebracht werden. Dieses körpereigene Zink gelangt physiologischer Weise im Rahmen eines besonderen Zink-Zirkulationsmechanismus vor allem mit den Verdauungssäften in den Darm, vermischt sich dort mit dem Speisebrei und wird wieder reabsorbiert. Je nach Kalzium- um Phytatmenge im Futter kann auf diese Weise ein negativer Zinkstatus im Körper hervorgerufen werden.

Die in unserem Experiment verfütterte Diät basiert auf den Untersuchungen von Windisch und Kirchgessner (1999-a). Diese fügten bei ihrem Zinkmangelfütterungsversuch an adulten Ratten der Diät, welche 1,5 µg/g Zink enthielt, Phytat in aufsteigender Menge zu. Ihre Tiere fraßen ihre Portionen bis zu einem Phytatzusatz von unter 2 mg/g Futter gänzlich auf. Dies entsprach einem molaren Phytat/Zink-Verhältnis von ca. 145. Ein höherer Phytatzusatz im Futter verursachte dann jedoch eine Abnahme des täglichen Futtermittelsverzehrs. Grund hierfür ist die verstärkte Komplexbildung des Phytats mit dem Zink, wodurch geringere Mengen des Spurenelementes aus dem Darm absorbiert werden konnten. Dadurch entstand ein Zinkmangel. Ab einem

Phytatgehalt von 6 mg/g kam im o.g. Experiment von Windisch und Kirchgessner das gesamte zugeführte Zink zur Ausscheidung.

In einem anderen Zinkdepletionsexperiment von Windisch und Kirchgessner (1999-b) konnten adulte Ratten ihr Gewicht unter einer Zinkmangeldiät mit einem Zinkgehalt von 1,5 µg/g über die Versuchsdauer von 28 Tagen halten. Die Tiere, die zusätzlich Phytat mit dem Futter erhielten, verloren mit aufsteigendem Phytatgehalt an Gewicht, was sich jedoch erst bei einem molaren Phytat/Zink-Verhältnis von ca. 260 deutlich zeigte. Dieses Experiment unterstreicht noch einmal, dass adulte Ratten bei alleiniger geringer Zinkzufuhr ohne Phytat im Futter über längere Zeit keine Zinkmangelsymptome entwickeln.

Dass jüngere Ratten bezüglich des Phytat/Zink-Verhältnisses sensibler reagieren, zeigt ein Versuch von Oberleas und Prasad (1976). Diese konnten bei wachsenden Ratten bei einem molaren Phytat/Zink-Verhältnis von 3 eine Gewichtszunahme von 48.5 g innerhalb 4 Wochen erreichen. Ein molares Phytat/Zink-Verhältnis von 66 brachte nur sehr geringe Gewichtszunahmen (12.5 g).

Der in unserem Experiment an die Zinkmangeltiere verfütterten Diät wurde bei einem Zinkgehalt von 2.2 µg/g 8 g Natrium-Phytat pro kg Futter zugesetzt. Dies entspricht einem molaren Phytat/Zink-Verhältnis von ca. 350. Wie die vorliegende Studie beweist, konnten mit dieser Zink-Depletionsmethode schnell die ersten Zinkmangelsymptome hervorgerufen werden. Bereits nach 5 Tagen des Verfütterns der Diät war ein deutlicher Appetitverlust aufgetreten. Dieser steigerte sich im Verlauf der Depletionsphase. Erst als in der Marginalphase zusätzlich Zink über die Schlundsonde appliziert wurde, konnte bei unseren Ratten ab einem molaren Phytat/Zink-Verhältnis von ca. 63 wieder die vor der Depletionsphase gefressene Futtermenge erreicht werden.

Auch der Kalziumgehalt eines phytathaltigen Futters hat Einfluss auf die Zinkausscheidung. In einem Zinkmangelfütterungsversuch von Morris und Ellis (1989) wurde bei einem molaren Phytat/Zink-Verhältnis von 12 bei einem Kalziumgehalt von 0,75 % noch keine Veränderung in der Gewichtszunahme bemerkt. Erst ab einem Verhältnis von 24 sanken die Gewichtszunahmen ihrer Ratten deutlich. Bei einem Kalziumgehalt von 1,75 % war dies schon bei einem Phytat/Zink-Verhältnis von 6 der Fall. Dieser Versuch wurde zwar nicht mit ausgewachsenen Ratten durchgeführt, er zeigt aber, dass der Kalziumgehalt die Zinkabsorption in Anwesenheit von Phytat beeinflusst.

Der Kalziumgehalt unserer Diät betrug 16,2 g  $\text{CaCO}_3$  / kg Futter. Dies entspricht ca. 0,65 % Kalzium.

Auch andere Mineralstoffe, wie Magnesium, Kupfer, Mangan und Eisen können mit Phytat interagieren (Davies & Nightingale, 1975; Forbes, 1984; Larson et al., 1996). Um nun diesbezüglich einen sekundären Mangel zu verhindern, wurden diese Mineralstoffe der im vorliegenden Experiment verwendeten Diät in ausreichender Menge beigemischt.

## 5.2 Zinkmangel und Futteraufnahme

Dass es unter Zinkmangel zu Appetitverlust kommt, ist aus vielen vorhergegangenen Untersuchungen an Mensch und Tier seit langem bekannt (Chesters & Quaterman, 1970; Cohen et al., 1973). Der Grund für eine verminderte Futteraufnahme unter Zinkmangel beruht wahrscheinlich auf einem Zusammenspiel zwischen peripheren Nerven, dem ZNS, Neurotransmittern, Neuropeptiden, den Geschmackspapillen und dem Gastrointestinaltrakt selbst (Shay & Mangian, 2000; McDonnell & Henkin, 1974).

Auf Grund dieser zinkmangelbedingten Anorexie stellt sich die Frage, ob die physiologischen, biochemischen, chemischen und histologischen Veränderungen in Stoffwechsel und Körper auch tatsächlich alleine der unzureichenden Zinkversorgung zugeschrieben werden können oder ob diese einfach die Folge eines allgemeinen Nährstoffmangels sind. Dies gilt vor allem für Experimente, in denen die Kontrolltiere nicht an die Verzehrsmenge der Zinkmangeltiere angepasst wurden, sondern ad libitum gefüttert wurden.

Durch Zwangsfütterung oder durch eine Paarfütterung an Kontrolltieren kann diesbezüglich Klarheit geschaffen werden. Letztere Methode wurde im vorliegenden Experiment angewendet.

Dass ein vermindertes Wachstum bzw. Gewichtsverlust bei Zinkmangel weniger auf die niedrigere Zinkzufuhr sondern vor allem auf die dadurch verursachte herabgesetzte Futteraufnahme zurückzuführen sind, zeigen die vorliegende und vorangegangene Studien. Auch die in anderen Zinkmangalexperimenten paargefütterten Kontrolltiere wiesen im Vergleich zu ad libitum und zinkadäquat gefütterten Tieren ein ähnlich vermindertes Wachstum wie die Zinkmangeltiere auf (McDonnell & Henkin, 1974; Cannon et al. 1988; Essatara et al., 1984). Die gleichen Ergebnisse brachte die Untersuchung von Faraji & Swendseid (1983), welche ihre Zinkmangelratten zwangsernährten.

Bei Kirchgessner & Roth (1975-a) hingegen konnten paargefütterte Kontrolltiere (96 ppm Zink) 75 % höhere Gewichtszunahmen erzielen, als die Zinkmangeltiere (1,2 ppm Zink). Es muss jedoch erwähnt werden, dass in keinem der hier aufgeführten Versuche die Depletionsphasen länger als einen Monat gedauert hatten.

Bezüglich des Gewichtsverlustes war in unserem Experiment hauptsächlich eine fortschreitende Abnahme der Durchschnittsgewichte über den Versuchverlauf hinweg zu verzeichnen. Die Unterschiede zwischen den Zinkmangel- bzw. Depletionstieren und ihren dazugehörenden paargefütterten Kontrollgruppen waren zu keinem Zeitpunkt signifikant. Am größten war die Differenz zwischen den Marginaltieren und den dazugehörigen Kontrolltieren am Ende der dreimonatigen Marginalphase mit einer Differenz von ca. 10 %. Dieser Unterschied verkleinerte sich aber nach der letzten Versuchsphase wieder (die Marginaltiere zeigten nur noch 4,8 % weniger Gewicht als die Kontrollgruppe). Die fortschreitende Gewichtsreduktion über die Dauer dieses 5monatigen Versuches lässt vermuten, dass es sich hierbei lediglich um Alterseffekte oder Langzeiteffekt der restriktiven Fütterung handelt und nicht auf die schlechte Zinkversorgung zurückzuführen ist.

Die vorliegende Studie hat bestätigt, dass Veränderungen am Knochen, die bei Zinkmangeltieren in einer Reihe von vorangegangenen Studien beobachtet wurden, nicht der unzureichenden Zinkversorgung zuzuschreiben sind (s. Abschnitt 5.4).

### 5.3 Monitoring des Zinkmangels im Serum

Das Serumzink zeigte eine klare Reaktion auf die Zinkzufuhr. So hatten die Kontroll-, die Baselinetiere und auch die Repletionstiere etwa gleich hohe Serumzinkwerte, die Depletions- und die beiden Marginalgruppen hatten alle etwa gleich niedrige Serumzinkwerte. Diese Daten zeigen, dass das Serumzink mit der Depletion sinkt, während der Marginalphase niedrig bleibt und nach der Repletion wieder zurück auf das Kontrollniveau steigt.

In der vorliegenden Untersuchung konnten bezüglich der ALP-Aktivität ebenfalls signifikante Differenzen zwischen den verschiedenen Gruppen festgestellt werden. Der größte Unterschied zeigte sich nach der einmonatigen Depletion: hier hatte die Kontrollgruppe 2 mit 215 U/l den höchsten Wert, den niedrigsten hatte ihre dazugehörige Depletionsgruppe mit 120 U/l, was einen signifikanten Aktivitätsabfall von 45 % bedeutet. Ebenfalls signifikant, wenn auch nicht

ganz so stark, ist die ALP-Differenz zwischen der Marginalgruppe 5 und ihrer Kontrollgruppe nach der zweimonatigen marginalen Phase mit 28 % Aktivitätsverlust bei Gruppe 5. Im weiteren Versuchsverlauf verbesserten sich diese Werte bei der Marginalgruppe 7 nach der Repletionsphase kaum.

Die alkalische Phosphatase (ALP) reagierte als zinkabhängiges Metalloenzym in verschiedenen Experimenten sowohl im Knochen als auch im Serum auf Zinkmangel mit einem Abfall ihrer Aktivität (Kirchgessner & Roth, 1975-a; Kirchgessner et al., 1975-b; Roth & Kirchgessner, 1974-a). Deshalb kann man sie sehr gut bei der Verdachtsdiagnose eines Zinkmangels miteinbeziehen, da sie einen sensitiveren und beständigeren Indikator als das Serumzink darstellt. Dabei muss jedoch berücksichtigt werden, dass dieses Enzym bei verschiedenen Erkrankungen, welche mit einem gesteigerten Knochenumbau einhergehen, in ihrer Aktivität erhöht ist. Das gleiche gilt auch für die Gravidität, Wachstum und für Lebererkrankungen (Roth & Kirchgessner, 1979).

Die hier aufgetretenen Veränderungen entsprechen im wesentlichen den Ergebnissen der Untersuchungen von Windisch und Kirchgessner (1994). Auch hier hatten adulte, mit 3 ppm Futterzink versorgte Ratten, eine um 50 % erniedrigte ALP-Aktivität gegenüber Ratten, die 24 ppm Zink bekamen (diese Diäten enthielten kein Phytat). Ähnlich verhielt es sich bei einer anderen Studie an adulten Ratten: Eine Zinkmangelgruppe bekam ein in etwa mit der Depletionsgruppe im vorliegenden Experiment vergleichbares Phytat/Zink-Verhältnis im Futter. Diese Tiere hatten im Vergleich zu einer mit 21 ppm Zink (ohne Phytat) versorgten Gruppe eine um 33 % erniedrigte ALP-Aktivität (Windisch & Kirchgessner, 1999-a).

Zu einem Absinken dieses Enzyms unter Zinkmangel kam es auch beim Küken (Britton, 1968) und beim Schwein (Norrdin, 1970). Auch beim Menschen führte eine mehrwöchige Zinkdepletion zu einem deutlichen Abfall der ALP-Aktivität (Prasad, 1982).

Interessant ist, dass eine Zinkrepletion im vorliegenden Versuch die ALP-Aktivität nicht steigern konnte. Die Werte der repletierten Tiere lagen sogar unter denen der weiter zinkmarginal gehaltenen. Dies widerspricht den Versuchsergebnissen eines Zinkdepletions/Zinkrepletionsversuches an Ratten, bei dem dieses Enzym auf eine Zinkrepletion nach 3 Tagen mit Aktivitätserhöhung reagierte. Hierbei handelte es sich jedoch um ein Experiment an wachsenden Ratten (Roth & Kirchgessner, 1974-a). Es ist möglich, dass unsere Tiere über die Dauer der Zinkmarginalphase ihre Zinkspeicher doch ausreichend auffüllten. Dadurch wäre das Zink, welches in der Repletion ausreichend zugeführt wurde, nicht mehr in der Lage gewesen

die ALP-Aktivität nicht mehr steigern. Hiergegen spricht allerdings die Tatsache, dass sich das Serumzink, dessen Konzentration sich bei den Marginalgruppen nicht steigerte, auf die Repletion jedoch deutlich reagierte.

Die Kontrolltiere der letzten Versuchsphase des vorliegenden Experimentes hatten eine ähnlich niedrige ALP-Aktivität, wie die dazugehörigen Marginal- und Repletionstiere; zwischen den drei Gruppen war kein deutlicher Unterschied in der ALP-Aktivität festzustellen. Aufgrund dieser Daten ließe sich die ausbleibende Reaktion auf die Repletion auch als Folge eines altersbedingten Effekts erklären.

Über die Versuchsdauer kam es insgesamt betrachtet auch zu einem Abfall der ALP-Aktivität.

Das vorliegende Experiment bestätigte weitgehend, dass die ALP auf einen niedrigen Zinkstatus des Körpers mit Aktivitätsverlust reagiert. Der Grad der Erniedrigung scheint auch hier von der Zinkzufuhr abhängig zu sein.

Bei wachsenden Ratten scheint die ALP jedoch stärker auf Zinkmangel zu reagieren.

#### 5.4 Zinkmangel und Knochenstoffwechsel

Als eindeutiges Resultat unserer Studie lässt sich festhalten, dass sich im Vergleich zu anderen Zinkmangelversuchen an wachsenden Ratten wesentlich weniger Veränderungen am Kochen gezeigt haben, als erwartet worden war. Das Experiment hat ergeben, dass ein Zinkmangel bei adulten Ratten keine nennenswerten Auswirkungen auf den Knochenstoffwechsel hat.

Eine Reaktion auf die unterschiedliche Zinkzufuhr zeigte sich lediglich bei der Analyse des Femurzinkgehaltes, bei der kortikalen/subkortikalen Mineraldichte der proximalen Tibia in der Marginal- und Repletionsphase und bei der Analyse der dynamischen Knochenparameter in der Depletionsphase.

Die Analyse des Zinkgehalts des rechten Femurs zeigte deutliche Resonanz auf die Zinkzufuhr. Zwischen allen Kontrollgruppen und ihren jeweils dazugehörigen Zinkmangelgruppen zeigten sich signifikante Unterschiede, welche sich im Versuchsverlauf leicht vergrößerten. Am größten war dieser Unterschied also nicht zwischen den Kontrolltieren und ihrer Depletionsgruppe (-13 %), sondern zwischen den Marginal- und den Kontrolltieren am Ende der Repletionsphase, wo die Marginalgruppe über 22 % weniger Zink im Knochen enthielt, als die Kontrollgruppe. Die drei Kontrollgruppen hatten alle etwa den gleichen Zinkgehalt im Knochen. Aus diesen Daten lässt sich zum einen ableiten, dass der Knochenzinkgehalt von der Zinkzufuhr abhängig ist, zum anderen zeigen sie auch, dass es bei einer marginalen Zinkzufuhr auf Dauer zu einer Abnahme



des Zinkgehaltes im Knochen kommt. Eine Zinkrepletion über die Dauer von 2 Monaten konnte die Zinkkonzentrationen im Knochen nicht verbessern. Diese Analyse zeigt auch, dass der Knochenstoffwechsel vom Zinkgehalt des Knochen weitgehend unabhängig ist. An dieser Stelle sei jedoch erwähnt, dass Windisch und Kirchgessner (1999-b) festgestellt hatten, dass Wirbel und flache Knochen unter Zinkmangelbedingungen mehr Zink verlieren, als die langen Knochen. Dies wird damit begründet, dass die langen Knochen ein kleineres Spongiosa/Kompakta-Verhältnis haben. Die Spongiosa soll eine bessere Quelle mobilisierbaren Zinks darstellen.

Vergleicht man weiter die Femurzinkgehalte dieses Knochens mit dem Serumzinkgehalt, so stellt sich heraus, dass die beiden Kurven nicht genau parallel zueinander verlaufen. Vor allem bei der Repletionsgruppe zeigt sich, dass der Serumzinkgehalt keinen Einfluss auf die Zinkkonzentration im Knochen hat, was das Resultat dieser Studie zusätzlich unterstreicht.

Die dynamischen Knochenparameter MPM, MAR und BFR zeigen eine gewisse Reaktion auf die geringe Zinkzufuhr in der Depletionsphase, allerdings in einer nicht erwarteten Weise: es zeigte sich eine statistisch signifikante Differenz zwischen der Depletionsgruppe und ihrer Kontrollgruppe: Die Depletionstiere lagen in ihren Werten bei allen 3 Messparametern über den Werten der Kontrollgruppe. Eine mögliche Erklärung hierfür wäre, dass es in den ersten Wochen des Experiments zu einer temporären Erhöhung der Knochenresorption und in der Folge zu einer verstärkten Knochenformation kam.

Insgesamt betrachtet kam es aber bei den dynamischen Knochenparametern zu einer Abnahme über den Versuchsverlauf hinweg. Der sich aktiv in Mineralisation befindliche Knochenumfang (MPM), die mineral apposition rate (MAR) und die pro Tag und Knochenumfang neu gebildete mineralisierte Knochenfläche (BFR) nahmen über den Versuchsverlauf signifikant ab. So fällt beispielsweise die BFR im Versuchsverlauf im Vergleich der Baselines zu den Gruppen der letzten Versuchsphase (Gruppe 6 - 8) um 75 - 80 %. Bei der MAR lassen sich signifikante Unterschiede in der Marginalphase und ein deutlicher Anstieg des Wertes durch die Repletion erkennen.

Bezüglich der Ergebnisse der Untersuchung des Zinkgehalts im Femur stimmen die Ergebnisse des vorliegenden Experimentes weitgehend mit den Ergebnissen der Untersuchungen von Windisch und Kirchgessner (1999-b) an adulten Ratten überein. Dort wurde bei einem molaren Phytat/Zink-Verhältnis im Futter, welches dem molaren Phytat/Zink-Verhältnis im Futter unserer Depletionsgruppe weitgehend entsprach, eine Abnahme der Femur-Zinkkonzentration von knapp 20 % festgestellt (in unserer Studie waren es ca. 13 % Abnahme). Die Zinkmangelphase dauerte auch dort ebenfalls einen Monat. Allerdings konnte bei den Ratten des Experiments von Windisch und Kirchgessner bei Tieren, die ein in etwa gleiches Phytat/Zink-Angebot im Futter

hatten wie unsere beiden Marginalgruppen, kein so starker Zinkverlust des Femurs festgestellt werden, wie dies bei unserer Studie der Fall war. Hier sei jedoch wieder darauf hingewiesen, dass die Marginalgruppen unseres Versuches zwei bzw. vier Monate der marginalen Zinkversorgung ausgesetzt waren, während der Versuch von Windisch und Kirchgessner (1999-b) nur einen Monat dauerte.

Bei der Untersuchung der Knochenmineraldichte kam es zu keiner Reaktion auf die Zinkzufuhr. Es entstanden hauptsächlich Veränderungen der Werte über die Versuchsdauer hinweg.

Die Ergebnisse der Knochenmineraldichte-Untersuchung (pQCT) in unserem Experiment zeigten am Lendenwirbel keine, an der Tibia jedoch ausgeprägte Veränderungen. Diese stellten sich fast ausschließlich als Mineraldichteabnahmen über die Dauer des Versuchs hinweg dar. Die trabekuläre Mineraldichte war von der Abnahme stärker betroffen, als die kortikale. Signifikante Unterschiede zwischen den Depletions- bzw. Marginalgruppen und ihren dazugehörigen paargefütterten Kontrollgruppen waren bei der pQCT-Untersuchung kaum vorhanden.

Vergleicht man bei beiden analysierten Knochen (Lendenwirbel und Tibia) die Gesamtmineraldichteverluste der drei Kontrollgruppen mit denen der Zinkmangeltieren (Gruppe 3, 5, 7), so zeigt sich, dass die Mangeltiere nur ca. 3 % mehr an Gesamtmineraldichte verloren hatten, als die Kontrollgruppen.

Eine Abnahme der Knochenmasse bestätigte sich auch in der Betrachtung der strukturellen statischen Parameter. Wie aus den Ergebnissen der oben besprochenen Mineraldichtemessung zu erwarten war, fanden sich auch bei den strukturellen statischen Parametern die signifikanten Unterschiede nicht zwischen den Zinkmangelgruppen und ihren Kontrollgruppen, sondern sie sanken mit dem Fortschreiten des Versuchs. Auch hier war fast ausschließlich die Tibia betroffen: die bone area (B.Ar/T.Ar), welche den prozentualen Knochenanteil pro Messfläche darstellt, sank im Vergleich der Baselines zur Kontrollgruppe der letzten Versuchsphase bei der Tibia um ca. 22 %. Weder die extrem niedrige Zinkzufuhr in der Depletionsphase, noch die Zinkrepletion brachten signifikante Unterschiede zu den paargefütterten Kontrollgruppen. Insgesamt sank die bone area über die Versuchsdauer deutlich. Ähnlich verhielt sich die Trabekelanzahl und auch deren Abstände zueinander vergrößerten sich.

Auch diese Analyse zeigt deutlich, dass die strukturellen statischen Parameter von einer Veränderung der Zinkzufuhr unberührt geblieben waren.

Die Einflüsse des Zinkmangels auf die Osteoklasten und Osteoblasten wurde mit der Analyse der zellulären statischen Parameter untersucht.

Weder der prozentuale Anteil der den Knochenumfang bedeckenden Osteoklasten noch der Osteoblasten (%OCPM und %OBPM) wurde durch die verminderte bzw. sich wieder erhöhende Zinkzufuhr verändert. Es konnte bei den Depletionstieren sogar eine Zunahme der Osteoblasten und des Osteoids im Vergleich zu ihrer Kontrollgruppe festgestellt werden.

Sehr deutlich zeichnet sich jedoch sowohl beim Osteoid- und Osteoblastenumfang als auch beim Osteoklastenumfang eine signifikante Abnahme über den Versuchsverlauf hinweg ab. Es ist anzunehmen, dass der Grund hierfür im steigenden Alter der Tiere zu finden ist, eventuell auch im Gewichtsverlust.

Die Analyse der ALP-Aktivität unterstreicht diese histologischen Ergebnisse: Durch die Abnahme der Knochenzellen und den dadurch verminderten Knochen turnover sinkt zwangsläufig auch die Aktivität dieses Enzyms. Wie bereits in 2.1.1 erwähnt, ist die ALP reichlich in osteoblastären Knochenzellen zu finden.

Die vorliegende Studie hat somit klar gezeigt, dass sich der Knochen turnover bei adulten Tieren von einer Änderung der Zinkzufuhr nicht beeinflussen lässt. Lediglich die Betrachtung der mineral aposition rate (MAR) lässt nicht mit Sicherheit ausschließen, dass ein Fortführen der marginalen Zinkversorgung über einen noch längeren Zeitraum doch noch negative Auswirkungen auf den Knochenstoffwechsel gehabt hätte.

Eberle et al. (1999) konnten in ihrem Zinkdepletionsversuch an wachsenden Ratten deutliche Unterschiede zwischen zinkdefizitär und –adäquat gefütterten Tieren bezüglich der strukturellen histomorphometrischen Parameter feststellen. Hier sank die bone area der Mangeltiere um 45 % im Vergleich zu den zinknormal gefütterten Tieren. Die Trabekelanzahl sank um 37 %. Ähnlich verhielten sich die anderen Werte seiner Untersuchungen, auch in der Histologie: Die Zinkmangeltiere hatten im Vergleich zu den zinkadäquaten einen signifikant geringeren Osteoblasten- und –klastenanteil an der Knochenoberfläche und weniger Osteoid. Die signifikanten Unterschiede, die sich in diesem Versuch im Vergleich zu unserer Studie ergeben hatten, beruhen aller Wahrscheinlichkeit darauf, dass im Experiment von Eberle et al. keine Paarfütterung stattgefunden hatte. Die Unterschiede im Knochenstoffwechsel beruhten deshalb wahrscheinlich auf der unterschiedlichen Futteraufnahme der Gruppen.

Eine In vitro-Studie an Mäuseknochenmarkskulturen konnte einen hemmenden Effekt von Zink auf die Proliferation von osteoklastenähnlichen Zellen aufzeigen, welche nach Vitamin D<sub>3</sub> bzw. nach Parathormonzugabe gesteigert war (Kishi et al., 1994). Dieses Ergebnis kann die vorliegende Studie nicht bestätigen. Ebenso können die Ergebnisse eine anderen In vitro-Studie nicht bestätigt werden, bei der die Proliferation von MC3T3-E1-Osteoblasten durch Zinkzugabe gefördert werden konnte (Hashizume et al., 1993).

Das in unserer Studie festgestellte o.g. Absinken des Knochenturnovers über die Versuchsdauer von 5 Monaten lässt darauf schließen, dass es sich hierbei um altersabhängige Veränderungen handelt. Diese Begründung wird zusätzlich von der Tatsache unterstrichen, dass die Tiere zu Versuchsbeginn durchschnittlich 9 Monate alt waren. Die Lebenserwartung von 344-Fischerratten liegt bei ca. 2 Jahren.

Dass sich der Knochenstoffwechsel von wachsenden von dem der adulten Ratten unterscheidet, zeigt ein Experiment von Sherman et al. (1989). So konnte dort unter mildem Zinkmangel in einem 4 Monate andauernden Experiment an adulten Ratten kein Effekt auf den Kalzium- oder Phosphorgehalt oder auf den Knochenturnover des Femurs festgestellt werden, was bei wachsenden Ratten, welche dieselbe Diät erhielten, durchaus der Fall war.

Yamaguchi (1989-a) konnte zeigen, dass der Zinkgehalt in der Matrix des Femurs unter zinknormaler Fütterung ab der 3. Lebenswoche zumindest bis zur 52. Lebenswoche auf einer konstanten Höhe bleibt, während die ALP, der DNS-Gehalt und v.a. der Kalziumgehalt ab der ca. 3. Lebenswoche absinken.

Eine neuere Studie untersuchte den Zusammenhang zwischen Alter und Knochenmineralgehalt und -dichte an 3-27 Monate alten männlichen Fischerratten mittels pQCT. Wie auch in der vorliegenden Studie konnten am Lendenwirbel keine signifikanten Veränderungen der beiden Parameter mit zunehmendem Alter festgestellt werden. An der proximalen Tibiametaphyse hingegen kam es ab dem 18. Lebensmonat zu Knochenmasseverlust. Nach 27 Monaten konnte ein 58 % Rückgang der trabekulären Knochenmineraldichte (BMD) festgestellt werden. Die kortikale BMD veränderte sich jedoch nicht. Ähnlich, jedoch nicht ganz so deutlich waren die Ergebnisse an der proximalen Tibia, während die Tibiadiaphyse kaum Veränderungen mit zunehmendem Alter zeigte (Banu et al., 2002).

Die Ergebnisse des Versuches von Banu et al., besonders die von ihm festgestellte Verteilung der Mineraldichteabnahmen, bestätigen die Ergebnisse unseres Versuchs.

Auch der Mensch verliert unter normalen Bedingungen ab der Lebensmitte bis zum Tode 20 - 30 % an Knochenmineraldichte (Aitken, 1975). Ab dem ca. 40 Lebensjahr beginnt beim Menschen physiologischer Weise die Abnahme der Knochenmasse mit einem jährlichen Verlust von 0.2 – 0.5 %. Dies steigert sich bei Frauen um die Menopause auf das 10fache ( Heaney, 1986)

Neuere Untersuchungen von Heaney (1989) besagen, dass dieser Verlust sogar schon ab einem Alter von ca. 35 beginnt und jährlich um 0.3 – 0.6 % fortschreitet. Diese Abnahme beruht vor allem auf unzureichender Nährstoffzufuhr (v.a. Kalzium) und einer irreversiblen Fenestration der Trabekel und schlecht gefüllten Haverschen Räumen.

Eine andere Begründung für die im vorliegenden Experiment über die Versuchsdauer sinkende Knochenmineraldichteabnahme, die sinkenden Zahlen der Knochenzellparameter und die der strukturellen statischen Parameter könnte mit der verminderten Futter- und dadurch auch verminderten Kalorien- und Kalziumaufnahme der Tiere in Zusammenhang stehen. Hierfür spricht die Tatsache, dass es über die Dauer des Versuches durch den Appetitverlust zu Gewichtsabnahmen von 9 -13 % gekommen war (Vergleich der Baselines mit den drei Gruppen der letzten Versuchsphase). Die niedrigsten Gewichte hatten die beiden Marginalgruppen nach der Zinkmarginal- bzw. Repletionsphase. Diese beiden Gruppen hatten auch die niedrigsten Zahlen bei einzelnen Werten der Knochenmineraldichteuntersuchung und bei der Analyse der strukturellen statischen Parameter.

Diese Theorie unterstreicht ein Experiment an ausgewachsenen Ratten, die zinkadäquat, aber kalorisch restriktiv gehalten wurden. Die Tiere wurde gruppenweise so gefüttert, dass die Kontrollgruppe kein, die futterrestriktiven Gruppen 20 % bzw. 40 % an Gewicht verloren. Zusätzlich musste die Hälfte jeder Gruppe tägliche Schwimmübungen absolvieren. Es zeigte sich, dass die Knochenmineraldichte der Tiere, die an Gewicht verloren hatten und keine Schwimmübungen absolvierten, im Vergleich zu allen anderen Gruppen, also auch nicht-schwimmenden, verringert war (Han et al., 1999).

Noch deutlicher zeigt sich der Zusammenhang zwischen Energiezufuhr und Knochenveränderungen in einer Studie von Talbott et al. (2001). Sie fütterten 20 und 48 Wochen alten Ratten Futter mit 40 % weniger Energie. Im Vergleich zu Kontrolltieren wurde nach 9 Wochen bei beiden kalorierestriktiv gefütterten Gruppen ein Gewichtsverlust von 15 % erreicht. Außerdem war die Knochenmineraldichte des Femurs um über 32 % gesunken. Die Mineraldichte der Tibia und des Humerus sanken nicht so deutlich. Außerdem war diese

Mineraldichteabnahme bei den 48 Wochen alten Ratten wesentlich stärker ausgeprägt, als bei den 20 Wochen alten. In diesem Experiment konnte also eine absolute Relation zwischen Körpergewicht und Knochenmineraldichte festgestellt werden.

Ndiaye et al. (1995) konnten in einem Fütterungsversuch an wachsenden Ratten, bei welchem durch Reduzierung der Kohlenhydratzufuhr eine negative Energiebilanz hervorgerufen wurde, eine verminderte Knochenformation feststellen. Diese war alleine auf die verminderte Kohlenhydrataufnahme zurückzuführen.

Ein anderes Experiment an wachsenden Ratten zeigt, dass bereits ein 12-stündiges Fasten eine reduzierte Osteoblastenaktivität zur Folge hatte (Wright & Mc Millan, 1994).

Viele andere Forscher stimmen ebenfalls der Hypothese zu, dass sich ein Gewichtsverlust bei älteren Ratten auch negativ auf die Knochenmasse auswirkt (La Mothe et al., 2003; Ferretti et al., 1988; Talbott et al., 1998).

Der Grund für diese Veränderungen liegt wahrscheinlich auf hormoneller Ebene. Bei fallender Energiezufuhr kommt es zu einem Absinken des Insulin- und IGF-1 Spiegels. Wie bereits erwähnt, haben beide anabole Effekte auf den Knochen (Talbott et al., 2001).

Aus den Ergebnissen des vorliegenden Experiments lässt sich zusammenfassend festhalten, dass ein Zinkmangel und eine marginale Zinkversorgung bei ausgewachsenen Fischerratten keinen direkten Einfluss auf den Knochenstoffwechsel, die Knochenmineraldichte oder die Struktur des Knochens haben.

Die in diesem Versuch festgestellten Veränderungen am Knochen sind sekundäre Effekte des Zinkmangels, die im Wesentlichen auf eine verminderte Futteraufnahme zurückzuführen sind. Weiter hat das fortschreitende Alter der Tiere auf den Knochenstoffwechsel ebenfalls entscheidenden Einfluss gehabt.

Ob die in anderen Zinkmanglexperimenten an wachsenden Ratten festgestellten Veränderungen tatsächlich ausschließlich auf der verminderten Zinkzufuhr beruhen, ist somit in Frage zu stellen. Auch dort könnte die verminderte Futteraufnahme erheblichen Einfluss auf die Versuchsergebnisse gehabt haben.

In wie weit sich diese Untersuchungsergebnisse auf den Menschen und das Krankheitsbild der Osteoporose übertragen lassen, ist nur durch weitere Untersuchungen zu klären. Diese Studie

legt jedoch nahe, dass Zinkmangel kein wesentlicher Risikofaktor für Osteoporose ist. Sie möge einen Anstoß für weitere intensive Untersuchungen auf diesem Gebiet der Knochenforschung geben.

## 6 Zusammenfassung

Die Beeinflussung des Knochenstoffwechsels durch eine mangelhafte Zinkversorgung wird beim Menschen im Zusammenhang mit der Knochenerkrankung Osteoporose diskutiert. Das Ziel des vorliegenden Experiments war es, den Langzeiteffekt einer marginalen Zinkzufuhr auf den Knochenstoffwechsel von ausgewachsenen Ratten zu untersuchen und die Rolle von Zink in der Pathogenese der Osteoporose weiter aufzuklären.

Zu Versuchsbeginn wurden die durchschnittlich 9 Monate alten Tiere in 8 Gruppen mit je 8 weiblichen Fischer 344-Ratten eingeteilt. Die Tiere erhielten eine phytathaltige, semisynthetische Diät, die Zink in zwei verschiedenen Konzentrationen enthielt. Die Kontrolltiere erhielten die zinkadäquate Diät (64 ppm Zink), die Zinkmangeltiere erhielten die gleiche Diät, jedoch mit dem inadäquaten Zinkgehalt (2.2 ppm Zink). Nach einmonatiger restriktiver Fütterung mit dem zinkadäquaten Futter zur Adaption an die Diät, wurden die ersten 8 Tiere (Baseline-Gruppe) getötet. Die anderen 7 Gruppen wurden in je 3 Kontrollgruppen und 4 Zinkmangelgruppen aufgeteilt. Die Kontrolltiere wurden bezüglich ihrer Futtermenge an die Verzehrsmenge der Zinkmangeltiere durch eine Paarfütterung angepasst. Nach einer einmonatigen Depletionsphase wurden die Depletionsgruppe und die dazugehörige Kontrollgruppe getötet. Anschließend begann die zweimonatige marginale Zinkfütterungsphase, in der die Kontrollgruppen weiter die zinkadäquate Diät erhielten. Die Marginalgruppen bekamen zu den 2.2 ppm Zink im Futter zusätzlich 75 µg Zink pro Tier und Tag mit der Schlundsonde appliziert. Am Ende der Marginalphase wurden eine Kontrollgruppe und eine zinkmarginale Gruppe getötet. Der Marginalphase schloss sich die zweimonatige Zinkrepletionsphase an, in der die Kontrollgruppe weiter das Futter mit 64 ppm Zink bekam und eine der beiden verbleibenden Marginalgruppen zur Zinkrepletion ebenfalls das zinkadäquate Futter erhielt. Die andere Marginalgruppe wurde weiter auf marginalem Zinkniveau gehalten. Nach der Repletionsphase wurden auch diese letzten 3 Gruppen getötet.

Die Knochenmineraldichte der linken Tibia und des vierten Lendenwirbels wurden mittels peripherer quantitativer Computertomographie (pQCT) analysiert. Knochenschnitte des ersten Lendenwirbels und der rechten proximalen Tibia wurden lichtmikroskopisch mittels quantitativer Knochenhistomorphometrie untersucht. Weiter wurden klinisch-chemische Parameter des Knochenstoffwechsels in Serum und Urin sowie der Zinkgehalt im Serum und im Femur bestimmt.

Die zinkdepletierten und auch alle zinkmarginal gehaltenen Ratten zeigten eine signifikante Reduktion im Serumzinkgehalt. Die Serumaktivität der alkalischen Phosphatase war gegen-



über den Kontrolltieren nach der Depletion um 44% und nach der zweimonatigen Marginalphase um 28% erniedrigt. Die Repletion führte zu einer Normalisierung der Zinkgehalte im Serum. Der Knochenzinkgehalt war erst zum Ende der Marginalphase, also 3 Monate nach Beginn der zinkdefizitären Stoffwechsellage, signifikant erniedrigt und ließ sich durch die zweimonatige Zinkrepletion nicht mehr auf Kontrollniveau zurückbringen. Im Verlauf des Versuchs kam es zu deutlichen altersbedingten Veränderungen des Knochenstoffwechsels und der Knochenmasse im appendikulären Skelett. Verglichen mit Kontrolltieren trat jedoch zu keinem Zeitpunkt eine Verringerung der trabekulären oder kortikalen Knochenmasse, eine Steigerung der Knochenresorption, eine Abnahme der Knochenformation oder strukturelle Veränderung der Knochenarchitektur bei den zinkdefizitären Tieren auf. Die vorliegende Studie hat somit klar gezeigt, dass Zink keine essentielle Rolle für den Knochenstoffwechsel bei alten Ratten spielt. Es erscheint damit fraglich, ob ein latenter Zinkmangel einen Risikofaktor für Osteoporose oder andere Knochenerkrankungen darstellt.

## **7 Summary    Skeletal effects of long-term marginal zinc supply in aged rats**

A deficient zinc supply has been implicated as a risk factor for osteoporosis in humans. The aim of the current experiment was to investigate the long-term effects of an insufficient zinc supply on bone metabolism in aged rats, and to explore further the role of zinc in the pathogenesis of osteoporosis.

Nine-month-old female Fischer-344 rats were divided into 8 weight-matched groups with 8 animals each. At the beginning of the experiment, all rats were adapted for one month to restrictive feeding (7.5 g/animal) of a semi-synthetic diet containing 8 g/kg sodium phytate and 64 ppm zinc. Thereafter, 8 animals were killed as baseline controls. For the whole duration of the experiment, control animals were pair fed to account for possible decreases in food intake in the zinc deficient rats. During the 1-month depletion phase, control animals received the zinc replete diet with 64 ppm zinc, whereas the zinc deficient rats were fed the same diet, but with a zinc content of 2.2 ppm. Eight rats in each group were killed after the depletion phase. Subsequently, the 2-month marginal phase began in which the rats on the diet with 2.2 ppm zinc received an additional daily zinc supplement of 75 µg zinc/rat by gavage. At the end of the marginal phase, 1 control and 1 zinc deficient group were killed. In the following repletion phase, 1 marginal group was switched to the zinc replete diet, while 1 group each was maintained on marginal zinc supply or on the zinc replete control diet. All remaining rats were killed after this phase.

Bone mineral density was measured in the left tibia and in the 4<sup>th</sup> lumbar vertebra by peripheral quantitative computed tomography (pQCT). The right proximal tibial metaphysis and the first lumbar vertebral body were analyzed by quantitative bone histomorphometry. Serum and urine were analyzed for clinical chemical parameters of bone metabolism. Zinc concentrations were measured in serum and femur by atomic absorption spectrometry.

The zinc-depleted and also the zinc marginal rats showed a significant reduction in the serum concentration of zinc. Serum alkaline phosphatase was decreased by 44% relative to control animals after the depletion phase, and by 28% after the marginal phase. Zinc repletion normalized the serum zinc concentrations. Bone zinc content showed a significant reduction in zinc deficient rats not before the end of the marginal phase, i.e., 3 months after the start of zinc deficiency, and did not reach control levels after the repletion phase. During the course of the study, we found distinct age-related changes in bone metabolism

and in bone mass of the appendicular skeleton. However, zinc deficient animals did not show decreased cancellous or cortical bone mass, increased bone resorption, reduced bone formation, or structural changes in bone architecture relative to control rats at any time point. Thus, the current study clearly showed that zinc does not play an essential role in bone metabolism in adult rats. Based on our findings, it appears to be questionable whether zinc deficiency is a risk factor for osteoporosis or other bone diseases.

## 8 Literaturangaben

**Aitken JM, 1975.** Factors affecting distribution of zinc in the human skeleton. *Calcif Tissue Res*; 20: 23-30

**Ali SA, Lowe NM, Jack CIA, Beattie JH, Reid MD, King JC, Jackson MJ, 1998.** Zinc absorption in the healthy elderly. *Proc Nutr Soc*; 57: 69A –72A

**Antonson DL, Barak AJ, Vanderhoof JA, 1979.** Determination of the site of zinc absorption in rat small intestine. *J Nutr*; 1: 142-47

**Atik OS, 1983.** Zinc in senile osteoporosis. *J Am Geriatrics Society*; 31: 790-91

**Baer MT, King JC, 1984.** Tissue zinc levels and zinc excretion during experimental zinc depletion in young men; *Am J Clin Nutr*; 39: 556-70

**Banu J, Wang L, Kalu DN, 2002.** Age related changes in bone mineral content and density in intact male F 344 rats. *Bone*; Vol 30(1) : 125-30

**Baron RA, Vignery A, Neff I, Silvergate L, Santa Maria A, 1983.** Processing of undecalcified bone specimens for bone histomorphometry. In: *Bone histomorphometry: Techniques and interpretation*. Recker RR, ed. CRC Press; Boca Raton, Florida: 13-35

**Bonner FW, King LJ, Parke DV, 1981.** The influence of high dietary zinc on tissue disposition and urinary excretion of cadmium, zinc, copper and iron after repeated parenteral administration of cadmium to rats. *Toxicology*; 19: 247-54

**Brätter P, 2002.** Mineralstoffe, Spurenelemente und Vitamine. Bertelsmann-Stiftung

**Britton WM, 1968.** Dissertation Abstracts Biochemistry; 29, 256B

**Cannon DS, Crawford IL, Carrell L, 1988.** Zinc deficiency conditions food aversion in rats. *Physiol Behav*; Vol 42: 245-47

**Canton MC, Cremin FM, 1990.** The effects of dietary zinc depletion and repletion on rats: Zinc concentration in various tissues and activity of pancreatic gamma-glutamyl hydrolase as indices for zinc status. *Br J Nutr*; 64: 201-09

**Cha MC, Rojhani A, 1997.** Zinc deficiency inhibits the direct growth effect of GH in the tibia of hypophysectomized rats. *Biol Trace Elem Res*; 59: 99-111

**Chesters JK, Quaterman J, 1970.** Effects of zinc deficiency on food intake and feeding patterns of rats. *Br J Nutr*; 24: 1061-69

**Christenson RH, 1997.** Biochemikal markers of bone metabolism: An overview. *Clin Biochem*; 30: 573-93

**Cohen IK, Schechter PJ, Henkin RI, 1973.** Hypoguesia, anorexia and altered zinc metabolism following thermal burn. *J Amer Med Ass*; 223: 914-16

**Cousins RJ, McMahon RJ, 2000.** Integrative Aspects of zinc transporters. *J Nutr*, 130-S: 1384 S-88 S

**Cunningham BC, Ulsch M, DeVos AM, Mulkerrin MG, Clauser KR, Wells JA, 1991.** Dimerization of human GH by zinc. *Science*, Washington DC; 253: 545-48

**Davies NT, Nightingale R, 1975.** The effects of phytate on intestinal absorption and secretion of zinc, and whole-body retention of zinc, copper, iron and manganese in rats. *Br J Nutr*; 43: 234-58

**De Castro E, Ferreira HS; Magrani J, Santamaria GF, Fregoneze JB; 2002:** Central administration of zinc reduces salt intake in rats. *Physiol Behav*; 75: 531-39

**Dicks D, Rojhani A, Cassack ZT, 1993.** The effects of growth hormone treatment on growth in zinc-deficient rats. *Nutr Res*, 13: 701-13

**Dufner-Beattie , Juni 2003;** *J Biol. Chem.* –in Press-

**Eberle J, Schmidmayer S, Erben RG, Stangassinger M, Roth HP, 1999.** Skeletal effects of zinc deficiency in growing rats. *J Trace Elem Med Biol*; Vol 13: 21-26

**Erben RG, Kohn B, Rambeck WA, Zucker H, 1990.** Histomorphometric analysis of the rat proximal metaphysis by „linear scanning“. *Scanning Microsc*; 4: 625-40

**Erben RG, 1996;** Trabecular and endocortical bone surfaces in the Rat: Modeling or remodeling?; *Anat Rec*; 264: 39-46

**Essatara M`B, Levine AS, Morley JE, McClain CJ, 1984.** Zinc deficiency and anorexia in rats: Normal feeding patterns and stress induced feeding. *Physiol and Behav*; 32(3): 469-74

**Faraji B, Swendseid ME, 1983.** Growth rate , Tissue zinc levels and activities of selected enzymes in rats fed a zinc deficient diet by gastric tube. *J Nutr*; 113 (1):447-455

**Ferretti JL, Tessaro RD, Delgado CJ, Bozzini CE, Alippi RM, 1988.** Biochem performance of diaphyseal shafts and bone tissue of femurs from protein restricted rats. *Bone Miner*; 4: 329-39

**Finley JW, Johnson PE, Reeves PG, Vanderpool RA, Briske-Anderson ME, 1994.** Effect of bile/ pancreatic excretions on absorption of radioactive or stable zinc: in vivo and in vitro studies. *Biol Trace Elem Res*; 42: 81-95

**Follis RH, Das HG, McCollum EV, 1941.** Histological studies of the tissues of rat fed a diet extremely low in zinc. *J Nutr*; 22: 223-33

**Forbes RM, Parker HM, Erdman JW, 1984.** Effects on dietary phytate, calcium and magnesium levels on zinc bioavailability to rats. *J Nutr*; 114(8): 1421-25

**Fraker PJ, King LE, Laakko T, Vollmer TL, 2000.** The dynamic links between the integrity of the immune system and zinc status. *J Nutr*; 130S: 1399 S-1405 S

**Friedberg F, 1974.** Effects of metal binding on protein structure; *Q Rev Biophys.*; 7: 1- 33

**Gasser JA, 1995.** Assessing bone quantity by pQCT. *Bone*; 17S: 145 S-54 S

**Gerber H, 1994.** *Pferdekrankheiten Band 1- Innere Erkrankungen und Dermatologie.* Verlag Eugen Ulmer

**Giugliano R, Millward DJ, 1984.** Growth and zinc-homeostasis in the severely zinc deficient rat. *Br J Nutr*; 52: 545-60

- Halsted JA, 1972.** The Shiraz Experiment. Am J Med; Vol. 53: 277-84
- Hambidge M, Cousins RJ, Costello RB, 2000.** Zinc and health: current status and future directions. J Nutr; 130: 1341S-43S
- Han S, Li W, Dargan K, Orefice M, Kemp FV, Bogden JD, 1999.** Effects of weight loss and exercise on distribution of lead an essential trace element in rats prior lead exposure. Environ health perspect; 107 (8): 657-62
- Hashizume M, Yamauchi M, 1993.** Stimulatory effect of  $\beta$ -alanyl-L-histidinato zinc on cell proliferation is dependent on protein synthesis in osteoblastic MC3T3-E1 cells. Mol Cell Biochem; 122: 59-64
- Heaney RP, 1986.** Calcium bone health and osteoporosis. In: Bone and mineral research. WA Peck, ed. Vol 4: 255-301. New York: Elsevier
- Heaney RP, 1989.** Nutritional factors in causation of osteoporosis. Am J Clin Nutr; 50 (5 S): 1182-89
- Hoffmann P, 1987.** Diagnostik, Prävention u. Therapie der Osteoporose; Therapiewoche; 37: 4427-30
- Hofmann J, 1992.** Rinderkrankheiten Band 1-Innere und chirurgische Erkrankungen. Verlag Eugen Ulmer
- Holtmeier HJ, Kruse-Jarres DJ, 1991.** Zink. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart
- Hörning M, 1990.** Osteoporose, Fischer Verlag
- Huskamp B, Dietz O, 1999.** Handbuch Pferdepraxis. Enkeverlag
- Jackson MJ, Jones DA, Edwards RHT, 1982.** Tissue Zinc levels as an index for body zinc status. Clin Physiol; 2: 333-43
- Jackson MJ, 1989;** Physiology of zinc: general aspects. Mills CF, eds. Zinc in human biology: 1-14, Springer Verlag: London
- Johanson PE, Hunt CD, Milne DB, Mullen LK, 1993.** Homeostatic of zinc metabolism in men: zinc excretion in men fed diets low in zinc. Am J Clin Nutr; 57: 557-65
- Kalu DN, 1991.** The ovariectomized rat model of postmenopausal bone loss. Bone Miner; 15: 175-92
- King J, 1990.** Assessment of zinc status. American Institute of Nutrition. J. Nutr; 120S-11: 1474-79
- King JC, Shames DM, Woodhouse LR, 2000.** Zinc homeostasis in Humans; J Nutr; 130: 1360S-66S
- Kirchgessner M, 1983.** Possibilities for the diagnostics of trace elements deficiency. In: Trace Element Analytical Chemistry in Medicine and Biology; Vol. II, Hrsg Brätter und Schramel. Walter de Gruyter: Berlin-New York
- Kirchgessner M, Roth HP, 1975-a.** Beziehungen zwischen klinischen Mangelsymptomen und Enzymaktivitäten bei Zinkmangel. Zentralbl Vet Med; A22: 14-26

**Kirchgessner M, Schwarz WA, Roth HP, 1975-b.** Zur Aktivität der ALP in Serum und Knochen von zinkdepletierten und –repletierten Kühen. *Z Tierphysiol*; 35: 191-200

**Kirchgessner, M. 1993.** Homeostasis und Homeorhesis in trace element metabolism. Meissner und Mills, eds. *Trace elements in men and animals-TEMA 8* : 4-21 Verlag media touristik: Dresden

**Kirchgessner M, 1997.** Tierernährung. Verlagsunion Agrar

**Kishi S, Yamaguchi M, 1994.** Inhibitory effect of zinc compounds on osteoclast-like-cell-formation in mouse marrow cultures. *Biochem Pharmacol*; 48: 1225-30

**Kraft W, Dürr U, 1996.** Katzenkrankheiten. Verlag H&M Scharper

**Kraft W, Hirschberger J, 2000.** Kleintierkrankheiten Band 1, Innere Medizin. Verlag Eugen Ulmer: Stuttgart

**La Mothe JM, Hepple RT, Zernicke RF, 2003.** Selected contribution: Bone adaption with ageing and long term caloric restriction in Fischer 344xBrown-Norway F1 hybrids. *J Appl Physiol*; 95 (4): 1739-45

**Larson M, Rossander-Hultenen L, Sandstorm B, Sandberg AS, 1996.** Improved zinc and iron absorption from breakfast meals containing malted oats with reduced phytate content. *Br J Nutr* ; 76 : 677-88

**Lees B, Banks LM, Stevenson JC, 1998.** Bone mass measurements. In: *Osteoporosis.*; 137-60. Stevenson JC, Lindsay R, eds. Capman and Hall: London

**Likuski HJ, Forbes RM, 1964.** Effect of phytic acid on the availability of zinc in amino acid and casein diets fed to chicks. *J Nutr*; 84: 145-50.

**Lowe NM, Fraser WD, Jackson JM, 2002.** Is there a therapeutic value of copper and zinc for osteoporosis ? *Proc Nutr Soc*; 61: 181-85

**Lum CK, Henkin RI, 1976.** Characterisation of fractions from taste bud and non-taste bud enriched filtrates from and around bovine circumvallate papille. *Biochim Biophys Acta*; 421: 362-79

**Ma J, Betts NM, 2000.** Zinc and copper intakes and their major food sources in the older adults in the 1994-96. Continuing Survey of Food Intakes by Individuals. *J Nutr*; 130: 2838-43

**Mahajan SK, Abbasi AA, Prasad AS, Rabbani P, Briggs WA, McDonald FD, 1982.** Effect of oral zinc therapy on gonadal funktion in haemodialysis patients. *Ann Intern Med*; 97: 357-61

**Marusik A, Kos K, Stavljenic A, Vukicevic S, 1990.** Acute zinc deficiency and trabecular bone loss in rats with talc granulomatosis. *Biol Trace Elem Res*; Vol 29: 165-73

**Massaro TF, 1982.** Effects of moderate zinc deficiency on cognitive performance in young adult rats. *Physiol Behav*; Vol 25: 117-21

**Matsui T, Yamagucchi M, 1995.** Zinc modulation of IGF effect in osteoblastic MC 373-E1 cells. *Peptides*; 16: 1063-68

**McDonnell SD, Henkin RI, 1974.** Altered preference for sodium chloride, anorexia, and changes in plasma and urinary zinc in rats feed a zinc deficient diet. *J Nutr*; 104: 1108-14

- McMahon RJ, Cousins RJ, 1998.** Mammalian zinc transporters. *J Nutr*; 128 (4): 667-70
- Miller WJ, 1970.** Zinc nutrition in cattle: a review. *J Dairy Sci*; 53: 1123-25
- Mori T, Tani T, Hanasawa K, Kodama M, 2001.** Effects of zinc deficiency and corticosterone elevation on bone marrow in rats. *Eur Surg Res*; 33: 92-98
- Morris ER, Ellis R, 1989.** Usefulness of the dietary phytic acid/ zinc molar ratio as an index of zinc bioavailability to rats and humans. *Biol Trace Elem Res*; 19: 107-17
- Ndiaye B, Cournot G, Pelissier MA, Debray OW, Lemmonier D, 1995.** Rat serum osteocalcin concentration is decreased by restriction of energy intake. *J Nutr*; 125: 1283-90
- Norrdin RW, 1970.** Dissertation Abstracts Biochemistry; 30: 5570B
- O`Dell BL, Burpo CE, Savage JE, 1972.** Evaluation of zinc availability in food stuffs of plant and animal origin. *J Nutr*; 102 (5): 653-60
- O`Dell BL, Savage JE, 1960.** Effect of phytic acid on zinc availability. *Proc Soc Exp Biol Med*; 103: 304-06
- Oberleas D, Prasad AS, 1976.** Trace elements in human health and disease. Vol 1: 155-62 Zinc and Copper. Prasad AS, ed. Academic: NewYork
- Oberleas D, 1996.** Mechanism of zinc homeostasis. *J Inorg Biochem* ; 62: 231-41
- Ohlson C, Bengtsson B, Isakson OG, Andreassen TT, Sootweg MC, 1998.** Growth hormone and bone. *Endocrinol Rev*; 19: 55-79
- Pabon M, Lönnerdal B, 1992.** Effect of citrate on zinc bioavailability from milk, milk fractions and infant formulas; *N Res*; 13: 103-11
- Parfitt AM, 1983.** Bone histomorphometry: Technics and interpretation. Recker RR, ed. CRC Press Boca Raton, Florida: 143-223
- Parfitt AM, Drezner MK, Glorieux FH, Kanis JA, Malluche H, Meunier PJ, Ott SM, Recker RR, 1987.** Bone histomorphometry: Standardisation of nomenclature, symbols and units. *J Bone Miner Res*; 2: 595-610
- Petering HG, Yeager DW, Withesup SO, 1971.** Trace Metal content of human hair in relation to age and sex. *Arch Environ Health*; 23: 202-07
- Prasad AS, 1982.** Clinical and biochemical spectrum of zinc deficiency in human subjects. In: clinical biochemical and nutritional aspects of trace elements: 3-62. Liss AR: New York
- Prask JA, Plocke DJ, 1971.** A role of Zinc in the structural integrity of cytoplasmic ribosomes of *Euglena gracilis*. *Plant Physiol*; 48: 150ff
- Relea P, Revilla M, Ripoll E, Arribas I, Villa LF, Rico H, 1995.** Zinc, biochemical markers of nutrition and type-1 osteoporosis. *Age and Ageing*; 24: 303-07
- Root AW, Duckett G, Sweetland M, Reiter EO, 1979.** Effects of zinc deficiency upon pituitary function in sexually mature and immature male rats. *J Nutr*; 109(6): 958-64



**Roth HP, Kirchgessner M, 1974-a.** Aktivitätsänderungen verschiedener Dehydrogenasen und der alkalischen Phosphatase im Serum bei Zinkdepletion und -repletion. *Z Tierphysiol, Tierernährung und Futtermittelkunde*; 32: 289-96

**Roth HP, Kirchgessner M, 1974-b.** Zum Einfluss unterschiedlicher Diätzinkgehalte auf die Aktivität der ALP im Knochen. *Z Tierphysiol, Tierernährung, und Futtermittelkunde*; 33: 57-61

**Roth HP, Schneider U, Kirchgessner M, 1975.** Zur Wirkung von Zinkmangel auf die Glucosetoleranz. *Arch Tierernähr*; 25: 545-49

**Roth HP, Kirchgessner M, 1979.** Experimentelle Untersuchungen zur Diagnose von marginalem Zinkmangel. *Res Exp Med*; 174: 283-300

**Roth HP, Kirchgessner M, 1980.** Diagnosis of zinc deficiency using alkaline phosphatase activity in serum before and after zinc injection. *Zbl Vet Med; A* 27: 290-97

**Roth HP, Kirchgessner M, 1982.** Gehalte von Wachstumshormon (GH) im Rattenserum bei Zinkmangel. *Z Tierphysiol, Tierernährung und Futtermittelkunde*; 47: 197-200

**Roth HP, Kirchgessner M, 1994.** Influence of alimentary zinc deficiency on the concentration of growth hormone GH, Insulin-like growth factor 1 and insulin in the serum of forced feed rats. *Horm Metab Res*; 26(9): 404-8

**Saltmann PD, Strauss LG, 1993.** The role of trace minerals in Osteoporosis. *JACN*; 12: 384-89

**Sandstead HH, Smith JC Jr., 1996.** Deliberations and evaluations of approaches, endpoints and paradigms for determining zinc dietary recommendations. *J Nutr*; 126: 2410S-18S

**Schenk RK, Olah AL, Herrmann W, 1984.** Preparation of calcified tissues for light microscopy. In: *Methods of calcified tissue preparation*: 1-56. Dickson GR, ed. Elsevier science publishers B.V.: Amsterdam-New York-Oxford

**Schwarz FJ, Kirchgessner M, 1976.** Distribution and excretion of intravenously administration in rat with different zinc intake. *Zbl Vet Med A*; 23: 836-48

**Seco C, Revilla M, Hernandez ER, Gervas J, Gonzalez-Riola J, Villa FL, Rico H. 1998.** Effects of zinc supplementation on vertebral and femoral bone mass in rats on strenuous treadmill training exercise. *J bone Miner Res*; 13: 508-12

**Shay NF, Mangian HF, 2000.** Neurobiology of zinc influenced eating behavior. *J Nutr*; 130: 1493S-99S

**Sherman SS, Smith JC, Tobin JD, Soares JH Jr., 1989.** Ovaryectomy, dietary zinc and bone metabolism in retired breeder rats. *Am J Clin Nutr*; 49: 1184-91

**Shin YA, Eichhorn GL, 1968.** Interactions of metal ions with polynucleotides and related compounds: 11. The reversible unwinding and rewinding of desoxyribonucleid acid by zinc<sup>2+</sup> ions through temperature manipulation. *Biochem*; 7: 1026-32

**Sinha R, Smith JC Jr, Soares JH Jr., 1988.** The effect of diet calcium on bone metabolism in young and aged female rats using a short term in vivo model. *J Nutr*; 118(10) 1217-22

**Stryer L, 1996.** Biochemie, Spektrum-Verlag

- Suwarnasarn A, Wallwork JC, Jykken GI, Low FN, Sandstead HH, 1982.** Epiphyseal plate development in the zinc deficient rat. *J Nutr*; 112: 1320-28
- Talbott SM, Cifuentes M, Dunn MG, Shapses SA, 2001.** Energy restriction reduces bone density and biochemical properties in aged female rats. *J Nutr*; 131: 2382-87
- Talbott SM, Rothkopf MM, Shapses SA, 1998.** Restriction of calcium and energy increases bone turnover and decreases bone mineral contents in rats. *J Nutr*; 128: 640-45
- Tao SH, Hurley LS, 1971.** Changes in plasma proteins in zinc deficient rats. *Proc Soc Exp Biol Med*; 136: 165-67
- Taylor CM, Bacon JR, Aggett PJ, Bremner I, 1991.** Homeostatic regulation of zinc absorption in endogenous losses in zinc-deprived men; *Am J Clin Nutr*; 53: 755-63
- Tonna EA, Singh IJ, Shandu HS, 1984.** None radioactive tracer techniques for calcified tissues. In : *Methods of calcified tissue preparation: 333-67.* Dickson GR, ed. Elsevier Science Publishers BV.: Amsterdam-New York-Oxford
- Tucker HF, Salmon WD, 1955.** Parakeratosis or zinc deficiency disease in the pig. *Proc Soc Exp Biol Med*; 88: 613-18.
- Turnlund JR, Durkin N, Costa F, Margen S, 1986.** Stable isotope studies of zinc absorption and retention in young and elderly men. *J.Nutr.*; 116: 1239-47
- Van Wouwe JP, Veldhuizen, 1994-a.** Dietary subacute zinc deficiency and potassium metabolism. *Biol Trace Elem Res*; Vol 46: 261-68
- Van Wouwe PJ, Uijenbroek JJM, 1994-b.** The role of the pancreas in the regulation of zinc status. *Biol Trace Elem Res*; 42: 143-49;
- Vander AC, Victery W, Germain C, Holloway D, 1983.** Insulin is a physiological inhibitor of urinary zinc excretion in anesthetized dogs. *Am J Physiol*; 244: E536-40
- Victery W, Levenson R, Vander AJ, 1981.** Effect of glucagon on zinc excretion in anesthetized dogs. *Am J Physiol* ; 240: F299-305
- Wacker WEC, Valbee BL, 1959.** Nucleid acid in metals: Chromium, manganese, nickel, iron and other metals in ribonucleid acid from diverse biological sources. *J Biol Chem*; 234: 3257-63.
- Waldmann KH, Wendt M, 2001.** *Lehrbuch der Schweinekrankheiten.* Verlag Parey
- Weigand E, Kirchgessner M, 1978.** Homeostatic adjustments in zinc digestion to widely varying dietary zinc intake; *Nutr Metab* ; 22: 101-12
- Williams RB, Mills CF, 1970.** The experimental production of zinc deficiency in the rat. *Br J Nutr.*; 24: 989-1003
- Windisch W, Kirchgessner M, 1994.** Zur Messung der homöostatischen Anpassung des Zinkstoffwechsels an eine defizitäre und hohe Zinkversorgung nach alimentärer <sup>65</sup>Zink-Markierung. 1. Mitteilung: Zum Effekt einer unterschiedlichen Zinkversorgung auf den quantitativen Zinkumsatz im Stoffwechsel adulter Ratten. *J Anim Physiol a Anim Nutr*; 71: 98-107
- Windisch W, Kirchgessner M, 1995.** Zur Anpassung des Zinkstoffwechsels und des

Zink austausch im Körper <sup>65</sup>Zinkmarkierter Ratten an eine variierende Zinkaufnahme. 1. Mitteilung: zum quantitativen Zinkumsatz im Stoffwechsel adulter Ratten bei physiologischer adäquater Zinkversorgung. *J Anim Physiol a Anim Nutr*; 74: 101-12

**Windisch W, Kirchgessner M, 1999-a.** Zinc absorption and excretion in adult rats at zinc deficiency induced by dietary phytate additions: 1. Quantitative zinc metabolism of <sup>65</sup>Zn-labelled adult rats at zinc deficiency. *J Anim Physiol a Anim Nutr*; 82: 106-15

**Windisch W, Kirchgessner M, 1999-b.** Tissue zinc distribution and exchange in adult rats at zinc deficiency induced by dietary phytate additions: 2. Quantitative zinc metabolism of <sup>65</sup>Zn-labelled adult rats at zinc deficiency. *J Anim Physiol a Anim Nutr*; 82: 116-24

**Wood R, 1990.** Zinc. In: Nutrition in the elderly. Boston Nutritional Status Survey: 177-82; Hartz SC, Russel RM, Rosenberg IH, eds. Smith-Gordon: London

**Wright KR, McMillan PJ, 1994.** Osteoclast recruitment and modulation by calcium deficiency, fasting and calcium supplementation. *Calcif Tissue Int*; 54: 62-66

**Yamaguchi M, 1995.**  $\beta$ -Alanyl-L-histidinato zinc and bone resorption. *General Pharmacology*; 26: 1179-83

**Yamaguchi M, 1998.** Role of zinc in bone formation and bone resorption. *J Trace Elem. In Exp Med*; 11: 119-35

**Yamaguchi M, Hashizume M, 1994.** Effects of  $\beta$ -alanyl-L-histidinato zinc on protein components in osteoblastic MC3T3-E1 cells; *Mol Cell Biochem*; 136: 163-69

**Yamaguchi M, Kitajima T, 1991.** Effects of östrogen on bone metabolism in tissue culture: enhancement of the steroid effect by zinc. *Res Exp Med*; 191: 145-54

**Yamaguchi M, Oishi H, Suketa Y, 1987.** Stimulatory effect of zinc on bone formation in tissue culture. *Biochem Pharmacol*; 36: 4007-12

**Yamaguchi M, Ozaki K, Suketa Y, 1989-a.** Alteration in bone metabolism with increasing age: Effects of zinc and vitamin D<sub>3</sub> in aged rats. *J Pharmacobiodyn* ; 12: 67-73

**Yamaguchi M, Oishi H; 1989-b.** Effect of 1,25 dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> on bone metabolism in tissue culture. Enhancement of this steroid effect by zinc. *Biochem Pharmacol*; 38: 3453-59

**Yamaguchi M, Ozaki K, 1990.** Effect of the new zinc compound  $\beta$ -alanyl-L-histidinato zinc on bone metabolism in elderly rats. *Pharmacologie*; 41: 345-49

**Yamaguchi M, Yamaguchi R, 1986.** Action of Zinc on bone metabolism in rats. Increases in alkaline phosphatase activity and DNA content. *Biochem Pharmacol*; 35: 773-77

**Zalewski PD, Forbes Ji, Seamark RF, Borlinghaus R, Beetts WH, Lincoln SF, Ward AD, 1994.** Flux of intracellular labile zinc during apoptosis revealed by a specific chemical probe, Zinquin. *Cem Biol* ; 1: 153-61



## 9 Danksagung

Ich danke Herrn Privatdozent Dr. Dr. Reinhold Erben für die Zuweisung des Themas und ganz besonders für die hervorragende und intensive Betreuung, welche auch über Weihnachtsfeiertage und in seinem Urlaub keine Pause machte.

Herrn Dr. Windisch möchte ich für seine Ideen für dieses Experiment und seine fachliche Unterstützung danken. Außerdem möchte ich mich beim Team des Institutes für Tierernährung der TU in Weihenstephan für die Herstellung des Futters und für die Analyse der Knochen und des Serums bedanken.

Weiter möchte ich mich bei der gesamten AG Erben bedanken, ohne welche die Durchführung des Experimentes unmöglich gewesen wäre. Ganz besonderen Dank sei an die unendliche Geduld und den Einsatz von Frau Claudia Bergoff, Frau Karin Begsteiger und Frau Siglinde Lutz gerichtet.

Ein Dank an alle Mitdoktoranden, die mir beim „Schlundeln“ geholfen haben.

Auch den Tierpflegern möchte ich diese Danksagung widmen, die mir das Öfteren ein Wochenende zu Hause ermöglichten.

Ganz liebevoll möchte ich mich bei meinem Freund Christian bedanken. Zum einen für die Anschaffung des Computers, zum anderen für die vielen Samstagmorgenfahrten nach München und natürlich für die Kompensation meiner Panikattacken.

Nicht zuletzt seien ganz herzlich meine Eltern erwähnt, die mich bis in dieses hohe Alter finanziell und moralisch unterstützt haben. Ohne deren Zuspruch und Durchhalteparolen wäre diese Doktorarbeit vielleicht nie zu Ende geführt worden.

Danke auch meiner Schwester für die vielen Korrekturen.

Und nochmals Danke an alle, die mir beim Umgang mit dem Computer geholfen haben, wie meinen Schwagern Johannes und Daniel und dem Martin H.