

J. Eberle
J. Diebold
A.M. Reichlmayr-Lais
M. Kirchgeßner

Untersuchungen zur Knochenmarks- morphologie und zu verschiedenen Hämolysemarkern bei wachsenden Ratten im alimentären Bleimangel

Studies of the bone marrow morphology and of several laboratory parameters of hemolysis in growing rats with alimentary Pb-deficiency

Zusammenfassung Der Einfluß eines alimentären Bleimangels auf die Knochenmarksmorphologie und verschiedene Hämolysemarker im Serum wurde in zwei Wachstumsversuchen und einem Generationenversuch mit weiblichen Sprague Dawley Ratten untersucht. Die Tiere erhielten eine halbsynthetische Diät auf Caseinbasis, die sich nur in der Konzentration an zugelegtem Blei in Form von Pb-II-acetat-3-

hydrat unterschied (0 ppb Pb bis 800 ppb Pb). Die Knochenmarksuntersuchungen ergaben einen völlig unauffälligen Befund und zeigten keine Unterschiede zwischen den unterschiedlichen Blei-Zulagestufen. Bei den Hämolysemarkern deutete sich im Bleimangel eine Erhöhung des freien Hämoglobins im Plasma sowie der Aktivität der Laktatdehydrogenase im Serum und eine Erniedrigung der Konzentration des Haptoglobins im Serum an. Weiterhin war die Aktivität der Glutathionperoxidase und die Konzentration des Glutathions in den Erythrozyten in den bleiarm versorgten Gruppen erhöht. Insgesamt zeigt die Untersuchung, daß die in einer früheren Untersuchung bei Bleimangelratten aufgetretene Pancytopenie nicht auf eine Störung der Blutzellbildung zurückzuführen sein dürfte, während sich aufgrund der gemessenen Hämolysemarker ansatzweise Anhaltspunkte für eine vermehrte periphere Hämolyse ergaben.

Pb-II-acetat-3-hydrate. The evaluation of the bone marrow did not show differences among the groups with different lead supply in the diet. Concerning the laboratory parameters of hemolysis it has been shown that the hemoglobin concentration of plasma and the lactate-dehydrogenase activity of serum were increased and the haptoglobin concentration of serum was decreased in the groups fed the diets poor in lead relative to lead-adequate animals. The activity of glutathione peroxidase and the glutathione concentration in red blood cells were increased in the groups fed the lead-deficient diet compared to lead-adequate groups. In conclusion, the study shows that the pancytopenia observed recently in lead-deficient rats is not caused by disturbed hematopoiesis, whereas some parameters measured suggest that there exists increased hemolysis in lead-deficient rats.

Eingegangen: 18. Dezember 1995
Akzeptiert: 23. Februar 1996

Prof. Dr. Dr. h. c. mult. M. Kirchgeßner (✉)
Dr. A.M. Reichlmayr-Lais · Dr. J. Eberle
Institut für Ernährungsphysiologie
der Technischen Universität München-
Weihenstephan
85350 Freising

Dr. J. Diebold
Pathologisches Institut
der Ludwig Maximilians-Universität
München
80337 München

Summary The effects of an alimentary lead deficiency on bone marrow morphology and several laboratory parameters of hemolysis were examined in two growth- and one generation-experiments with female Sprague Dawley rats. The animals were fed a semisynthetic casein-based diet supplemented with 0 ppb up to 800 ppb lead as

Schlüsselwörter Alimentärer Pb-Mangel – Ratte – temporäre Pancytopenie – Knochenmarksuntersuchung – Hämolysemarker

Key words Lead deficiency – rat – temporary pancytopenia – evaluation of bone marrow morphology – laboratory parameters of hemolysis

Abkürzungen ALT = Alanin-Aminotransferase · AST = Asparaginsäure-Aminotransferase
DTNB = 5,5-Dithio-bis-(2-Nitrobenzoesäure) · FEP = freies

Erythrozytenporphyrin · G-6-PDH = Glucose-6- Phosphatdehydrogenase · GSH = Glutathion
GSH-Px = Glutathionperoxidase
Hp = Haptoglobin · LDH =

Lactatdehydrogenase · RBC = Erythrozyten · TNB = 2-Nitro-5-Thiobenzoessäure

Einleitung

Die Essentialität des Spurenelements Blei gilt am Modelltier Ratte aufgrund von Befunden in verschiedenen Generationsversuchen als gesichert (18, 25–30). Im alimentären Bleimangel waren bei Tieren der Nachfolgenerationen insbesondere hämatologische Kenngrößen reproduzierbar verändert (28). In einer neuen Bleimangel-Studie konnten bereits bei wachsenden Ratten der ersten Generation klinische Mangelsymptome wie Wachstumsverzögerungen und Fellveränderungen bei sehr bleiarm versorgten Tieren im Vergleich zu Kontrolltieren induziert werden (31). Mit drei darauffolgenden Bleimangelversuchen mit ähnlichem Versuchsdesign sollten hierzu biochemische Veränderungen im Stoffwechsel wachsender Ratten im Bleimangel näher aufgeklärt werden. In zwei dieser Versuche zeigten sich bei den Bleimangeltieren temporäre Störungen im Blutbild in Form einer normochromen, normozytären Panzytopenie (8). In der Bleimangelgruppe wurde beispielsweise eine starke Verminderung der Leukozyten-, Erythrozyten- und Thrombozytenzahl sowie stark verminderte Hämoglobinkonzentrationen und Hämatokritwerte beobachtet.

Die vorliegende Untersuchung, für die das gleiche Versuchsmaterial verwendet wurde, hatte zum Ziel, die Ursachen dieser vorübergehenden hämatologischen Veränderungen bei Bleimangeltieren näher aufzuklären und dabei möglicherweise weitere Hinweise zur physiologischen Bedeutung des Element Bleis im Stoffwechsel zu erhalten.

Material und Methoden

Versuchstiere und Diäten

In drei Versuchen erhielten weibliche Sprague-Dawley Ratten (Charles River Wiga GmbH, Sulzfeld) eine gereinigte halbsynthetische Diät auf Casein-Basis ohne Bleizulage bzw. mit Zulage von Blei in Form von Blei(II)-acetat-3-hydrat in unterschiedlichen Konzentrationen. Die Analyse der Bleigehalte in den Diäten erfolgte invers-voltametrisch (464 VA Processor, Metrohm, Herisau, Switzerland). Die analysierten Bleikonzentrationen der Diäten der 3 Versuche sind in Tabelle 1 zusammengefaßt. Die Zusammensetzung und Reinigung der Diät sowie die Haltung der Ratten wurde bereits in einer vorangegangenen Arbeit ausführlich beschrieben (8).

In Versuch 1 wurden 54 weibliche Ratten in 6 Behandlungsgruppen mit je 9 Tieren mit gleicher mittlerer

Tab. 1 Bleigehalte der Diäten (Mittelwerte und Standardabweichungen aus Dreifachbestimmungen)

Zulagenstufe	Bleigehalt (ng/g)
Versuch 1 und 3	
0 ppb Pb	63 ± 12
100 ppb Pb	97 ± 12
200 ppb Pb	229 ± 54
400 ppb Pb	371 ± 58
600 ppb Pb	652 ± 52
800 ppb Pb	1 025 ± 139
Versuch 2	
0 ppb Pb	26 ± 4
200 ppb Pb	234 ± 13
800 ppb Pb	799 ± 55

Lebendmasse (35 ± 5 g) eingeteilt. Die Tiere wurden einzeln gehalten und erhielten die beschriebene, lediglich im Bleigehalt unterschiedliche Versuchsdiät (Tab. 1). Nach 19 Versuchstagen wurde dieser Versuch beendet.

In Versuch 2 wurden 72 weibliche Ratten in 3 Behandlungsgruppen von jeweils 24 Tieren mit gleicher mittlerer Lebendmasse (39 ± 2 g) eingeteilt. Die Tiere wurden ebenfalls einzeln gehalten und erhielten die beschriebene Versuchsdiät mit unterschiedlichen Bleizulagen (Tab. 1). Am Versuchstag 28 und am Versuchstag 41 wurden jeweils 8 Tiere jeder Behandlungsstufe zur Analyse aus dem Versuch entnommen. Die jeweils 8 Tiere pro Gruppe wurden an den beiden Versuchstagen nach ihrer mittleren Lebendmasse ausgewählt, so daß die mittlere Lebendmasse der entnommenen und der im Versuch verbleibenden Tiere der jeweiligen Gruppe übereinstimmte. Die restlichen 8 Rattenweibchen jeder Gruppe wurden zur Erzeugung einer zweiten (F₁)-Generation ab dem 42. Versuchstag über Nacht mit männlichen Ratten gepaart. Nach der Gravidität und einer 13tägigen Laktationsperiode wurden die Muttertiere getötet und das Probenmaterial entnommen. Das Probenmaterial der Nachkommen wurden wurfweise gepoolt.

In Versuch 3 wurden insgesamt 108 weibliche Ratten in 6 Behandlungsgruppen mit je 18 Tieren mit gleicher mittlerer Lebendmasse (38 ± 4 g) eingeteilt. Die Tiere wurden paarweise gehalten und innerhalb einer Behandlungsgruppe so verteilt, daß zu Versuchsbeginn die mittlere Lebendmasse von 10 ausgewählten Tieren mit der mittleren Lebendmasse der gesamten Gruppe identisch

war. Nach 21 Versuchstagen wurden die anfänglich ausgewählten 10 Tiere pro Gruppe getötet. Als zweiter Untersuchungszeitpunkt wurde Versuchstag 28 festgelegt.

Gewinnung, Aufbereitung und Analytik des Probenmaterials und statistische Auswertung

Die Tiere wurden am Ende der jeweiligen Versuchsperiode 10 h genüchert und nach einer Ethernarkose dekapitiert und entblutet. Ein Teil des Blutes wurde in mit EDTA-beschichteten Gefäßen zur Bestimmung der hämatologischen Parameter gesammelt. Aus weiteren Aliquoten wurden Plasma- und Serumproben gewonnen, die bis zur weiteren Analyse bei -20 °C gelagert wurden. Zur Gewinnung von Hämolyt wurden die Erythrozyten einer Vollblutprobe dreifach mit physiologischer Kochsalzlösung gewaschen und die gewaschenen, gepackten Erythrozyten anschließend durch Zugabe von Reinstwasser und kräftigem Schütteln hämolytisiert (9). Die Hämolytate wurden bis zur weiteren Analyse ebenfalls bei -20 °C gelagert.

Bei den Tieren aus Versuch 2 wurde das Knochenmark des Femurs und die extramedullären Organe der Blutbildung für histologische Untersuchungen aufbereitet. Dazu wurden die Milz, ein Teilstück der Leber (ca. 1 g) und ein präparierter Femur unmittelbar nach der Sektion in verschiedene Fixierlösungen eingelegt. Die Femora wurden mit einer Schere längs geöffnet und in einer Methanol/Formol neutr.-Lösung (3:7, v:v) fixiert. Die entwässerten Proben wurden ohne Decalcifizierung in Methylmethacrylat eingebettet und anschließend 2 µm starke Schnitte angefertigt. Die geschnittenen Knochenmarkproben wurden mit Giemsa, PAS, Gomori reticulín, Laddewig trichrome und Prussian blue angefärbt. Die Leber- und Milzproben wurden in einer Aldehyd-Lösung (2 ml 25 %ige Glutardialdehyd-, 3 ml 37 %ige Formaldehyd-Lösung, 1,58 g Ca-Azetat und 100 ml dest. H₂O) fixiert, in Paraffin-Wachs eingebettet und ebenfalls geschnitten (3 µm). Die Leber- und Milzschnitte wurden mit Haematoxylin-Eosin, Giemsa, Berliner Blau und unter Verwendung der Naphthol AS-D-Chlorazetat-Esterase-Reaktion angefärbt. Zusätzlich wurde Knochenmark auf Objektträger ausgestrichen, luftgetrocknet und mit May-Grünwald-Giemsa angefärbt.

Die Bestimmung der Hämoglobinkonzentration im Hämolyt erfolgte mittels Testkombinationen der Firma Boehringer (Mannheim, Deutschland). Die Hämoglobinkonzentration des Plasmas der Versuche 1 und 2 wurde mit Hilfe eines Testkits der Fa. Sigma (Taufkirchen, Deutschland) kolorimetrisch bestimmt.

Die Porphyrinkonzentration in den Erythrozyten wurde in den Versuchen 2 und 3 als Globalbestimmung von Koproporphyrin und Protoporphyrin ermittelt. Dazu wurde eine fluoreszenzphotometrische Methode in Anlehnung an Kammholz et al. (16) und Piomelli et al. (24) zur Bestimmung der freien Erythrozytenporphyrine (FEP) ange-

wendet. Diese Bestimmungsmethode, die auch den zunächst gebundenen Metaboliten Zink-Protoporphyrin mit-erfaßt (22), ist die praktikabelste Methode zur Bestimmung der Erythrozytenporphyrine (6). Die Messung der FEP erfolgte an einem Fluoreszenzphotometer (Shimadzu RF 5001-PC, Egling, Deutschland) bei einer Anregungswellenlänge von 405 nm und einer Emissionswellenlänge von 610 nm (Bandbreite der Anregung und der Emission 20 nm) gegen einen Reagenzienleerwert.

Die Haptoglobin (Hp)-Konzentration im Serum wurde Hochdruck-flüssigkeitschromatographisch in Anlehnung an eine Methode von Schröder et al. (33) bestimmt, wobei allerdings gerätebedingte Modifikationen notwendig waren. Als Trennsäule wurde eine Fertigsäule (Zorbax, GF-250, 25 cm x 9,4 mm Innendurchmesser) verwendet; die Elution erfolgte isokratisch mit 0,2 molarem Di-Natriumhydrogenphosphat-Puffer (pH 8,0) bei einer Säulentemperatur von 40 °C, die Detektion mit UV-Detektion bei einer Wellenlänge von 254 nm. Diese Methode ergab an einem Referenzserum Wiederfindungsraten von 99 bis 106 %. Die Gesamthaptoglobin-Konzentration wurde aus der Summe der Konzentration an Hp1 und Hp2 im Serum errechnet.

Zur Bestimmung der Aktivität der Glucose-6-Phosphatdehydrogenase (G-6-PDH) wurde eine Testkombination der Fa. Sigma verwendet. Die Bestimmung basierte auf der Reduktion von NADP zu NADPH, deren Verlauf bei einer Wellenlänge von 340 nm verfolgt wurde. Aktivitätsbestimmungen der Enzyme AST (Aspartat-Aminotransferase, optimierte Standardmethode, UV-Test, Boehringer), ALT (Alanin-Aminotransferase, optimierte Standardmethode, UV-Test, Boehringer) und LDH (Lactatdehydrogenase, opt. Standardmethode, UV-Test, Boehringer) wurden an einem Autoanalyzer Typ 704 (Fa. Boehringer-Hitachi, Mannheim) durchgeführt. Die Eichung der Meßgrößen erfolgte mit Hilfe von Kalibrationsseren (Boehringer) und die Richtigkeit der Messungen wurde mit Kontrollseren (Boehringer) überprüft.

Die Bestimmung der Glutathionkonzentration im Hämolyt erfolgte nach der Methode von Bergmeyer (2). Dabei wird Glutathion (GSH) zunächst durch 5,5'-Dithio-bis-(2-Nitrobenzoesäure) (DTNB) unter Bildung von 2-Nitro-5-Thiobenzoessäure (TNB) oxidiert. In einem zweiten Schritt wird oxidiertes Glutathion durch die Glutathionreduktase unter NADPH-Verbrauch wieder zu GSH reduziert. Die Konzentrationen von DTNB, NADPH und Glutathionreduktase wurden so gewählt, daß die pro Zeiteinheit freigesetzte Menge an TNB der Konzentration an GSH im Ansatz proportional war. Die Konzentration des gebildeten TNB wird als Maß für die Konzentration des GSH photometrisch bei einer Wellenlänge von 412 nm bestimmt. Zur Bestimmung der Aktivität der Glutathion-Peroxidase (GSH-PX) wurde in Versuch 3 am Tag 21 eine von Levander et al. (23) beschriebene Methode angewendet. Dabei wird in einem gekoppelten Testsystem indirekt über den Verbrauch an NADPH die Bildung von

Tab. 2 Konzentrationen an freiem Hämoglobin im Plasma (HGB), an Haptoglobin (Hp_{ges}, Hp1, Hp2) sowie Aktivitäten der Enzyme G-6-PDH im Blut und AST, ALT und LDH im Serum der Versuchstiere in Versuch 1 am Tag 19 bei unterschiedlichen Bleizulagen in der Diät

Parameter	Bleizulage in der Diät (ng/g)					
	0 (n = 9)	100 (n = 9)	200 (n = 9)	400 (n = 9)	600 (n = 9)	800 (n = 9)
Freies HGB (mg/dL)	31,0 ± 9,4 ^{bc}	34,3 ± 7,0 ^c	27,6 ± 6,6 ^{abc}	25,5 ± 10,3 ^{ab}	21,8 ± 7,7 ^a	24,7 ± 6,0 ^{ab}
Hp _{ges} (mg/mL)	8,9 ± 1,1	7,7 ± 0,7	8,5 ± 1,4	8,1 ± 0,9	8,7 ± 1,1	8,4 ± 0,9
Hp1 (mg/mL)	2,3 ± 0,3	2,0 ± 0,2	2,3 ± 0,3	2,1 ± 0,3	2,2 ± 0,3	2,2 ± 0,3
Hp2 (mg/mL)	6,5 ± 0,8	5,7 ± 0,5	6,2 ± 1,2	6,0 ± 0,6	6,5 ± 0,8	6,2 ± 0,6
G-6-PDH (U/10 ¹² RBC)	376 ± 16	351 ± 18	365 ± 22	360 ± 30	359 ± 9	384 ± 28
AST (U/L)	309 ± 67	320 ± 67	271 ± 33	266 ± 22	262 ± 54	278 ± 72
ALT (U/L)	54 ± 11	60 ± 10	52 ± 7	50 ± 7	53 ± 7	50 ± 10
LDH (10 ³ U/L)	3,21 ± 0,97 ^c	3,10 ± 0,61 ^{bc}	2,75 ± 0,45 ^{abc}	2,53 ± 0,47 ^{ab}	2,19 ± 0,64 ^a	2,19 ± 0,79 ^a

Tab. 3 Konzentrationen an freiem Hämoglobin im Plasma (HGB) und freiem Erythrozytenporphyrin (FEP) im Blut der Versuchstiere in Versuch 2 zu unterschiedlichen Zeitpunkten (G₀ = erste Generation, F₁ = Folgegeneration)

Parameter	0 ppb	Blei-Zulage 200 ppb	800 ppb
Freies HGB (mg/dL)			
G ₀ , Tag 28	49,9 ± 17,6	61,5 ± 9,7	44,6 ± 13,0
G ₀ , Tag 41	55,2 ± 18,5	49,2 ± 12,3	49,4 ± 10,4
FEP (µg/L)			
G ₀ , Tag 28	176 ± 68 ^a	249 ± 73 ^b	276 ± 73 ^b
G ₀ , Tag 41	296 ± 49	244 ± 57	277 ± 40
G ₀ , Tag 13 (Laktation)	243 ± 78	276 ± 53	248 ± 95
F ₁ , Tag 13 (Laktation)	218 ± 101	321 ± 122	216 ± 59

Glutathion gemessen. Als Maß für die Aktivität der GSH-PX diente die Extinktionsabnahme im Ansatz durch die begleitende Oxidation von NADPH, die an einem Spektralphotometer bei 340 nm gegen den Reagenzienleerwert aufgezeichnet wurde.

Die Ergebnisse der jeweils einfaktoriellen Versuche wurden mit dem Statistik-Programm Minitab (Version 7.1, 1989) varianzanalytisch ausgewertet. Bei signifikantem F-Wert ($p < 0,05$) wurde mit dem Fisher-Test ein multipler Mittelwertsvergleich durchgeführt. Die im Ergebnisteil zu den Mittelwerten angegebenen \pm -Werte sind die Standardabweichungen der Einzelwerte. Signifikant voneinander verschiedene Mittelwerte ($p < 0,05$) wurden durch unterschiedliche Hochbuchstaben gekennzeichnet.

Ergebnisse

Zur Beurteilung einer möglicherweise gestörten Blutbildung im Bleimangel wurden in Versuch 2 am Versuchstag 28 das Femur-Knochenmark bzw. Knochenmarksaus-

striche von jeweils 8 Tieren pro Gruppe histologisch aufbereitet und bewertet. Ebenso wurden die extramedulären Blutbildungsstätten Leber und Milz von jeweils 3 ausgewählten Tieren der Blei-Depletionsgruppe und der 800 ppb Pb-Gruppe untersucht. Im Knochenmark lag das Verhältnis der myeloischen Zellreihe zur erythropoetischen Zellreihe im Bereich von 1:1 bis 2:1. Es fielen dabei keine Unterschiede zwischen den drei Pb-Behandlungsstufen auf. Für Ratten wird als Referenzwert dieses Indexes der Knochenmarksaktivität der Bereich von 0,5:1 bis 2,5:1 angegeben (32). Weiterhin war die Megakaryopoese in allen drei Gruppen qualitativ und quantitativ unauffällig. Insgesamt war die Hämatopoese über alle Gruppen hinweg weder vermindert noch konnten Ausreifungsdefekte festgestellt werden. Es gab keine Hinweise auf ein aplastisches oder myelodysplastisches Syndrom oder auf eine durch chemische Noxen gestörte Hämatopoese. Desweiteren wurden keine sideroplastische Zellformen im Probematerial festgestellt. Eiseneinlagerungen im Knochenmark der unterschiedlich mit Blei versorgten Tiere waren nicht oder nur minimal vorhanden. Die Un-

Tab. 4 Konzentrationen an freiem Hämoglobin im Plasma (HGB), freiem Erythrozytenporphyrin (FEP), Haptoglobin (Hp_{ges}, Hp1, Hp2) sowie Aktivitäten der Enzyme G-6-PDH im Blut und AST, ALT und LDH im Serum der Versuchstiere in Versuch 3 am Tag 21 bei unterschiedlichen Bleizulagen in der Diät

Parameter	Blei-Zulage in der Diät (ng/g)					
	0 (n = 9)	100 (n = 9)	200 (n = 9)	400 (n = 9)	600 (n = 9)	800 (n = 9)
Freies HGB (mg/dL)	35,6 ± 7,8	33,2 ± 10,4	35,6 ± 10,0	40,1 ± 10,0	34,5 ± 9,0	27,5 ± 6,9
FEP (µg/L)	325 ± 172	385 ± 127	436 ± 67	388 ± 80	453 ± 142	416 ± 82
Hp _{ges} (mg/mL)	7,5 ± 0,6 ^a	7,4 ± 1,0 ^a	8,8 ± 0,6 ^b	8,9 ± 0,7 ^b	8,5 ± 0,9 ^b	7,2 ± 0,5 ^a
Hp1 (mg/mL)	2,3 ± 0,3 ^a	2,4 ± 0,4 ^a	2,9 ± 0,4 ^b	3,0 ± 0,4 ^b	3,2 ± 0,4 ^b	2,2 ± 0,2 ^a
Hp2 (mg/mL)	5,2 ± 0,5 ^a	4,9 ± 0,6 ^a	5,8 ± 0,4 ^b	5,8 ± 0,5 ^b	5,3 ± 0,8 ^a	5,0 ± 0,5 ^a
G-6-PDH (U/10 ¹² RBC)	375 ± 36	379 ± 39	407 ± 36	408 ± 23	376 ± 25	384 ± 26
AST (U/L)	240 ± 77	227 ± 83	281 ± 94	198 ± 63	196 ± 47	213 ± 73
ALT (U/L)	49 ± 8	47 ± 12	52 ± 13	39 ± 9	46 ± 11	43 ± 8
LDH (10 ³ U/L)	2,06 ± 0,74 ^{ab}	1,91 ± 0,77 ^{ab}	2,53 ± 0,81 ^a	1,79 ± 0,64 ^b	1,52 ± 0,35 ^b	1,65 ± 0,63 ^b

Tab. 5 Konzentrationen an freiem Erythrozytenporphyrin (FEP), Haptoglobin (Hp_{ges}, Hp1, Hp2) sowie Aktivitäten der Enzyme G-6-PDH im Blut und AST, ALT und LDH im Serum der Versuchstiere in Versuch 3 am Tag 28 bei unterschiedlichen Bleizulagen in der Diät

Parameter	Blei-Zulagen zur Diät (ng/g)					
	0 (n = 9)	100 (n = 9)	200 (n = 9)	400 (n = 9)	600 (n = 9)	800 (n = 9)
FEP (µg/L)	400 ± 118	293 ± 146	449 ± 188	290 ± 152	295 ± 116	339 ± 126
Hp _{ges} (mg/mL)	9,6 ± 0,7	9,5 ± 0,7	9,2 ± 1,3	10,4 ± 1,3	10,0 ± 1,1	9,4 ± 0,6
Hp1 (mg/mL)	3,5 ± 0,3	3,3 ± 0,6	3,5 ± 0,5	3,5 ± 0,5	3,8 ± 0,4	3,1 ± 0,4
Hp2 (mg/mL)	6,1 ± 0,7	6,2 ± 0,5	5,7 ± 1,1	6,8 ± 1,0	6,2 ± 0,8	6,3 ± 0,5
G-6-PDH (U/10 ¹² RBC)	386 ± 32	362 ± 24	361 ± 16	369 ± 25	377 ± 61	375 ± 31
AST (U/L)	187 ± 46	174 ± 39	205 ± 81	206 ± 90	181 ± 35	190 ± 59
ALT (U/L)	37 ± 9	35 ± 5	40 ± 11	40 ± 10	34 ± 14	42 ± 7
LDH (10 ³ U/L)	1,81 ± 0,56	1,69 ± 0,81	1,77 ± 0,77	1,66 ± 0,87	1,47 ± 0,30	1,23 ± 0,47

Tab. 6 Konzentrationen von Glutathion (GSH) und Aktivitäten der Glutathionperoxidase (GSH-Px) im Hämolysat der Versuchstiere in Versuch 3 am Tag 21 bei unterschiedlichen Bleizulagen in der Diät

Parameter	Blei-Zulagen zur Diät (ng/g)					
	0 (n = 9)	100 (n = 9)	200 (n = 9)	400 (n = 9)	600 (n = 9)	800 (n = 9)
GSH (µmol/g HGB)	11,7 ± 3,3 ^{bc}	12,9 ± 3,3 ^c	10,3 ± 2,5 ^{ab}	8,4 ± 2,1 ^a	9,7 ± 1,3 ^{ab}	10,5 ± 1,8 ^{ab}
GSH-Px (U/g HGB)	1 045 ± 346 ^b	1 085 ± 272 ^b	812 ± 178 ^a	659 ± 213 ^a	740 ± 69 ^a	765 ± 114 ^a

tersuchung der Knochenmarksausstriche ergab keine anderweitigen Informationen. Die histologische Aufbereitung von Leber und Milz zeigte, daß am Versuchstag 28 die extramedulläre Hämatopoese aller untersuchten Tiere noch größtenteils in der Milz stattfand. Für eine Störung der Blutbildung ergab sich in der Leber und der Milz kein Anhalt. Als auffälligster Befund zeigte sich in den Lebern der Versuchstiere unabhängig von der Bleiversorgung eine 25–60 %ige Vakuolisierung der Hepatozyten aufgrund von Lipideinlagerungen. Vor allem die periportalen Hepatozyten waren verfettet. Auch die Bestimmung der Organmassen der bei -20 °C gelagerten Milzproben

am Tag 28 ergab keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den drei Behandlungsgruppen (0 ppb Pb (n = 8), 0,52 ± 0,1 g; 200 ppb Pb (n = 7), 0,53 ± 0,1 g; 800 ppb Pb (n = 8), 0,58 ± 0,1 g).

In Tabelle 2 sind die Ergebnisse der Bestimmung verschiedener Hämolyse-Marker (Konzentrationen des freien Hämoglobins (HGB) im Plasma und des Haptoglobins im Serum) sowie die Aktivitäten der Enzyme G-6-PDH, AST, ALT und LDH in Versuch 1 am Tag 19 zusammengefaßt. Die Plasmakonzentration an freiem HGB nahm mit steigendem Bleigehalt in der Diät signifikant ab. Dagegen war die Konzentration des Gesamthaptoglo-

bins im Serum und deren Fraktionen, Hp1 und Hp2, zu diesem Untersuchungszeitpunkt ebenso wie die Aktivitäten der Enzyme G-6-PDH, AST und ALT unabhängig von den Bleigehalten in der Diät. Im Gegensatz dazu nahm die Aktivität der LDH mit steigenden Bleigehalten der Diät kontinuierlich ab.

Tabelle 3 zeigt die ermittelten Konzentrationen an freiem HGB im Plasma und an FEP zu den verschiedenen Untersuchungszeitpunkten in Versuch 2. Am Versuchstag 28 hatten die unterschiedlichen Bleigehalte der Diät keinen statistisch signifikanten Einfluß auf die Konzentration an freiem HGB im Plasma, während die Konzentration an FEP in der 0 ppb Pb-Gruppe gegenüber den anderen beiden Gruppen statistisch signifikant vermindert war. Nach 41 Versuchstagen war hingegen bei keinem dieser Parameter ein statistisch signifikanter Einfluß der Bleiversorgung auf die ausgewählten Hämolysemarker festzustellen. Auch am Versuchsende (13. Tag der Laktation) lag weder in der G₀-Generation noch in der F₁-Generation ein signifikanter Einfluß der unterschiedlichen Bleigehalte der Diät auf die FEP-Konzentration vor.

Tabelle 4 faßt die Konzentrationen an freiem HGB im Plasma, an FEP und an Hp im Serum und die Aktivitäten der Enzyme G-6-PDH, AST, ALT und LDH in Versuch 3 am Tag 21 zusammen. Weder in der Konzentration an freiem HGB noch in der an FEP zeigten sich am 21. Versuchstag statistisch signifikante Unterschiede zwischen den verschiedenen mit Blei versorgten Gruppen. Ebenso waren die Aktivität der G-6-PDH im Vollblut und die Aktivitäten der Enzyme AST und ALT von den Bleigehalten der Versuchsdiet zu diesem Zeitpunkt unbeeinflusst.

Dagegen war die Gesamt-Hp-Konzentration der 0 ppb Pb- und der 100 ppb Pb-Gruppe im Vergleich zur 200 ppb Pb- und 400 ppb Pb-Gruppe um 16 %, im Vergleich zur 600 ppb Pb-Gruppe um 12 % erniedrigt. Auffallenderweise waren in der 800 ppb Pb-Gruppe die Meßwerte beider Haptoglobinformen (Hp1, Hp2) wie bei der 0 ppb Pb- und der 100 ppb Pb-Gruppe erniedrigt. Demnach setzte sich der tendenzielle Anstieg dieser Meßgrößen bei zunehmenden Bleizulagen in der Diät nicht bis zur 800 ppb Pb-Gruppe fort. Auch auf die Aktivität der LDH im Serum hatte der Bleigehalt der Diät einen signifikanten Effekt. In den Zulagestufen 0 ppb Pb, 100 ppb Pb und 200 ppb Pb in der Diät wurde am Tag 21 nominell eine erhöhte LDH-Aktivität im Vergleich zu den Behandlungsgruppen mit höheren Bleizulagen in der Diät gemessen. Allerdings war lediglich der Meßwert der 200 ppb Pb-Gruppe im Vergleich mit den Gruppen mit 400 ppb Pb, 600 ppb Pb und 800 ppb Pb in der Diät signifikant unterschiedlich.

Am Versuchstag 28 (Tab. 5) war im Unterschied zum Versuchstag 21 hingegen keinerlei Einfluß der unterschiedlichen Blei-Versorgung auf die gemessenen Parameter festzustellen.

In Tabelle 6 sind die Aktivitäten der GSH-PX und die Konzentration des GSH im Hämolsat der Tiere am Versuchstag 21 dargestellt. Beide Parameter waren in den Gruppen mit 0 und 100 ppb Pb im Vergleich zu den restlichen Gruppen erhöht.

Diskussion

Im Rahmen der vorliegenden Untersuchung zeigte sich, daß Bleimangel zu einer deutlichen Verringerung aller Blutzellfraktionen führt (8). Mit der vorliegenden Studie sollten mögliche Ursachen für diese Panzytopenie bei Bleimangelratten aufgeklärt werden. Dazu wäre zunächst abzuklären, ob als Ursachen für die hämatologischen Störungen eine ungenügende Blutzellproduktion im Knochenmark – bei jüngeren Tieren auch in der Leber und der Milz (12, 36) – oder ein vermehrter Abbau in der Peripherie in Frage kommen. In früheren Bleimangelstudien wurde eine Störung der Hämatopoese als eine mögliche Ursache der im Bleimangel auftretenden mikrozytären, hypochromen Anämie im Bleimangel diskutiert (17). Die morphologische Beurteilung der 3 Hauptzelllinien im Knochenmark ergab in den vorliegenden Studien unter Berücksichtigung der tierartspezifischen Besonderheiten der Hämatopoese im Hinblick auf Produktion und Ausschwemmung der Zellen einen völlig unauffälligen Befund. Ebenso ergaben auch die histologischen Untersuchungen von Leber und Milz bei den Bleimangelratten keinerlei Auffälligkeiten, die auf eine gestörte Hämatopoese hindeuten würden. Daher kann davon ausgegangen werden, daß die in diesem Versuch bei den Bleimangelratten beobachteten hämatologischen Veränderungen nicht auf eine gestörte Blutzellbildung zurückzuführen sein dürften. Bei der histologischen Beurteilung der Lebern fielen in allen Gruppen lediglich vermehrte Lipideinlagerungen auf. Diese vermehrten Lipideinlagerungen dürften darauf zurückzuführen sein, daß als Folge der hohen Energiedichte der Diät und der ad-libitum Futteraufnahme sehr viel Energie aufgenommen wurde. Hohe Energieaufnahme, speziell hohe Kohlenhydrataufnahme führt nämlich zu einer vermehrten Lipogenese in der Leber (13).

Eine weitere mögliche Ursache einer Panzytopenie könnte in einer vermehrten peripheren Hämolyse begründet sein. Deshalb wurden in der vorliegenden Untersuchung eine Reihe von Parametern gemessen, die im Zusammenhang mit einer vermehrten Hämolyse stehen. Unter dem FEP wird allgemein das Ergebnis von Globalbestimmungen des Koproporphyrins und des Protoporphyrins verstanden. Die genannten Metaboliten stellen die beiden letzten Vorstufen auf dem Weg zur Häm-Synthese dar. Primär sind erhöhte FEP-Konzentrationen das entscheidende diagnostische Kriterium bei der erythropoetischen Protoporphyrinurie und bei Blei-Intoxikationen, da Blei in toxischen Mengen nahezu alle Enzyme des Häm-Syn-

theseweges blockiert. Weiterhin ist die FEP-Konzentration nach Granick et al. (11) und Doss (7) nicht nur ein sensibler und früher Indikator des Eisenmangels, sondern auch ein Indikator für weitere Anämieformen, wie auch die hämolytische Anämie. Grundsätzlich kommt es in diesen Fällen nach Granick et al. (11) zu einem deutlichen Anstieg der FEP-Konzentrationen auf Werte von 1 bis zu 20 mg FEP/l. Die in Versuch 2 und Versuch 3 ermittelten FEP-Konzentrationen ergaben im Durchschnitt aller Untersuchungszeitpunkte und Behandlungsgruppen einen Wert von $318 \pm 80 \mu\text{g/l}$. Da das FEP im Bleimangel im Vergleich zu den höheren Blei-Zulagestufen nicht erhöht war, sondern teilweise sogar vermindert war, läßt sich mit diesem Parameter eine Hämolyse als Ursache der in den vorausgegangenen Untersuchungen beschriebenen Blutbildveränderungen (8) nicht belegen.

Die Eignung von freiem HGB und Hp als biochemische Hämolysemarker leitet sich aus dem Katabolismus des Hämoglobins ab, welches aus den defekten Erythrozyten herausdiffundiert (5, 19). Gelangt freies HGB in die Zirkulation, so tritt eine sofortige Bindung an Hp ein. Der Hp-HGB-Komplex wird durch Aufnahme in die Leber umgehend aus dem Plasma eliminiert. Bei hämolytischen Prozessen ist die Hp-Konzentration deswegen erniedrigt. Nach Erschöpfung der Hp-Bindungskapazität wird HGB teilweise noch von Hämopectin gebunden. Nach Absättigung dieses Proteins tritt HGB frei im Plasma auf und wird in diesem Stadium von den Zellen des retikuloendothelialen Systems phagozytiert. Die Bestimmung an freiem HGB zeigte in Versuch 1 einen Einfluß der unterschiedlichen Bleizulagen in der Diät auf diesen Parameter auf. Wie vermutet, waren zu diesem Untersuchungszeitpunkt die HGB-Konzentration in den bleiarm versorgten Gruppen in der Tendenz erhöht. Mit der HGB-Messung am Versuchstag 21 in Versuch 3 konnte dieses Ergebnis jedoch nicht reproduziert werden.

Die Hp-Konzentration war in Versuch 3 am Tag 21, an dem deutliche Störungen in den bleiarm versorgten Gruppen im Blutbild vorlagen (8), erwartungsgemäß in diesen Gruppen vermindert. Daß auch in der 800 ppb Pb-Gruppe ein ebenso niedriger Hp-Wert resultierte, ist mit dem beschriebenen Pathomechanismus und der postulierten Hämolyse bei Bleimangel schwer nachzuvollziehen. Allerdings fiel zu diesem Untersuchungszeitpunkt schon bei der Ermittlung des Blutbildes auf, daß sich ein kontinuierlicher Anstieg der Meßwerte bei zunehmendem Bleigehalt in der Diät bei den Parametern Erythrozytenzahl, Hämoglobin und Hämatokrit nicht bis in die 800 ppb Pb-Gruppe fortsetzte (8). Der Einfluß der Bleiversorgung auf die Konzentration des Haptoglobins war allerdings nicht reproduzierbar. In Versuch 1, in dem das Blutbild nicht verändert war (8), konnten im Unterschied zu Versuch 3 keine Effekte auf die Hp-Konzentration abgesichert werden. Dabei sollte aber berücksichtigt werden, daß entzündliche, resorptive oder destruiierende Gewebsprozesse dazu führen können, daß bei Verdacht auf

hämolytische Anämie keine Verminderung, sondern häufig sogar eine Erhöhung der Haptoglobinkonzentration auftritt. Die Haptoglobinkonzentration kann auch durch weitere Faktoren beeinflußt werden, wie etwa Leberparenchymschäden (5, 35).

Das Enzym G-6-PDH (EC 1.1.1.49) spielt in den Erythrozyten eine Schlüsselrolle für die Bildung von NADPH, das für die Aufrechterhaltung der intrazellulären Konzentration an reduziertem GSH benötigt wird. GSH wiederum kommt zentrale Bedeutung innerhalb der antioxidativen Abwehrmechanismen der Erythrozyten (RBC) zu. In diesem Zusammenhang wird ein G-6-PDH-Mangel als eine mögliche Ursache intravasaler Hämolyse diskutiert. Im Humanbereich ist der G-6-PDH-Mangel der häufigste angeborene Enzymdefekt, der zu einer kombiniert zellulär und extrazellulär bedingten hämolytischen Anämie führen kann (3). In der vorliegenden Studie war die Aktivität der G-6-PDH in Versuch 1 und Versuch 3 unabhängig von der Bleizulage in der Diät. Demnach lassen sich die Aktivitätsmessungen dieses Enzyms nicht als Beleg und als möglicher Pathomechanismus der panzytopenischen Erscheinungen im Blutbild wachsender Ratten im Bleimangel heranziehen. Ähnlich wie in der vorliegenden Untersuchung zeigte sich auch in einer weiteren Bleimangelstudie mit Ratten kein Einfluß der Bleiversorgung auf die Aktivität der G-6-PDH in der Leber (27).

Veränderte Aktivitäten bestimmter Serumenzyme können Hinweise zur Diagnostik und Verlaufbeurteilung hämolytischer Anämien liefern. In diesem Zusammenhang wurden die Enzyme LDH, AST und ALT als typische Größen des Intrazellulärraumes untersucht. Akute, erworbene, intravasale hämolytische Anämien gehen in Abhängigkeit vom Erythrozytenabbau häufig mit einer LDH-Erhöhung und seltener auch mit Erhöhungen der AST und ALT einher (34). In der vorliegenden Untersuchung wurde zu keinem Untersuchungszeitpunkt ein signifikanter Einfluß des Bleigehaltes in der Diät auf die Aktivitäten der AST und ALT und damit ein Zusammenhang mit den panzytopenischen Erscheinungen festgestellt. Im Gegensatz dazu deuteten die Ergebnisse der LDH-Bestimmung im Serum eher auf eine hämolytische Anämie in den Bleimangel-Gruppen. Zu allen 3 Untersuchungszeitpunkten ist ein eindeutiger, teils statistisch signifikanter Zusammenhang dahingehend zu erkennen, daß in den bleiarm versorgten Gruppen erhöhte LDH-Werte im Serum auftreten. Damit korrespondierte die LDH-Aktivität am besten mit den in den vorangegangenen Studien festgestellten Störungen im Blutbild (8) und scheint für die vorliegende Form des Zelluntergangs der sensitivste der besprochenen Hämolysemarker zu sein. Diese bevorzugte Eigenschaft der LDH gegenüber der AST und der ALT bestätigte auch Kleeberg (19) mit Ergebnissen aus Humanstudien. Ebenso beschrieb Gmür (10) eine leichte Erhöhung der Serum-LDH-Aktivität bei Patienten mit einer ausgeprägten Panzytopenie.

Die Bedeutung des Tripeptids GSH in den Erythrozyten resultiert aufgrund seiner Zellschutzfunktionen als Substrat der für antioxidative Vorgänge wichtigen Enzyme GSH-PX und Glutathion-S-Transferase und als Bestandteil nichtenzymatischer Entgiftungsvorgänge (4). Ebenso ist das Enzym GSH-PX ein wichtiger Bestandteil der intrazellulären Kontrollmechanismen bei der Eliminierung reaktiver Sauerstoffspezies (21). Erythrozyten sind aufgrund der hohen Sauerstoffspannung, des hohen Anteils mehrfach ungesättigter Fettsäuren in der Zellmembran und der hohen Eisenbeladung besonders für radikalinduzierte, oxidative Prozesse anfällig (37). Von verschiedenen Autoren sind Hämolyseformen beschrieben, die durch oxidativen Streß in den roten Blutzellen ausgelöst werden (1, 14, 15, 20). In der vorliegenden Untersuchung zeigten sich bei den bleiarm versorgten Tieren keine verminderten, sondern sogar erhöhte Konzentrationen an GSH und erhöhte Aktivitäten der GSH-PX. Obgleich für das Auftreten oxidativer Prozesse auch andere antioxidativ wirksame Verbindungen eine Rolle spielen, sind aus diesen Befunden vermehrte radikalinduzierte Oxidationsprozesse, die zu einer vermehrten Hämolyse führen würden, eher unwahrscheinlich. Andererseits könnten die erhöhten Konzentrationen von GSH und die erhöhte Aktivität der GSH-PX im Sinne einer Kompensation Folge vermehrt auftretenden oxidativen Stresses sein.

Insgesamt läßt sich zusammenfassen, daß die in einer früheren Untersuchung von Eberle et al. (8) festgestellte temporäre Verminderung aller Blutzellzahlen bei wachsenden Ratten aufgrund der vorliegenden Ergebnisse und unter Berücksichtigung der vorliegenden Bleigehalte der Mangeldiäten vermutlich nicht auf eine Störung der Blutbildung im Knochenmark, in der Leber und der Milz zurückzuführen sind. Ursachen für die pathologischen Blutbildbefunde sind daher wahrscheinlich in sogenannten „peripheren Phänomenen“, einem vermehrten Blutzellabbau in der Peripherie, zu suchen. Definitionsgemäß sind demnach die verschiedenen Formen hämolytischer Anämien als Grund der Störungen im Blutbild denkbar. Die hierzu ermittelten Hämolysemarker ergaben jedoch mit Ausnahme der im Bleimangel erhöhten LDH-Werte im Serum keinen eindeutigen Beleg für die Verdachtsdiagnose Hämolyse ab. Möglicherweise werden die Effekte, die aufgrund des vermutlich erhöhten HGB-Katabolismus zu erwarten gewesen wären, durch die komplexen Prozesse im Zusammenwirken mit anderen Serumproteinen (Hämopexin, Albumin) und dem retikuloendotheliale System überdeckt. Bereits die Blutbildbefunde (8) zeigten den kurzlebigen und damit schwer nachweisbaren Charakter der hämatologischen Störungen auf, was auch die Messung der Hämolysemarker verdeutlicht.

Literatur

1. Allen DW, Jandl JH (1961) Oxidative hemolysis and precipitation of hemoglobin. II. Role of thiols in oxidant drug action. *J Clin Invest* 40:454–475
2. Bergmeyer HU (1985) *Methods of Enzymatic Analysis*. II. Edition, Volume VIII, VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim
3. Beutler E (1979) Red cell enzymes defects as nondiseases and diseases. *Blood* 54:1–7
4. Beutler E, Dale GL (1989) Erythrocyte glutathione: function and metabolism. In: Coenzymes and cofactors, glutathione. Dolphin D, Poulson R, Avramovic O (eds) Wile Interscience, Volume III, pp 291–317
5. Braun HJ (1971) Eigenschaften und Funktionen menschlicher Serumproteine bei intravasaler Hämolyse. *Dtsch med Wschr* 96:595–600
6. Chilsom JJ, Brown DH (1975) Microscale photofluorometric determination of "free erythrocyte porphyrin" (protoporphyrin IX). *Clin Chem* 21:1669–1682
7. Doss M (1981) Protoporphyrinämie zur Diagnostik des Eisenmangels. *Dtsch med Wschr* 106:1308–1310
8. Eberle J, Reichlmayr-Lais AM, Kirchgeßner M (1996) Hämatologische Veränderungen bei alimentärem Pb-Mangel wachsender Ratten. *Z Ernährungswiss* (eingereicht)
9. Eder K, Reichlmayr-Lais AM, Kirchgeßner M (1989) Studies on the determination of Na-K-ATPase in red blood cell membranes. *J Trace Elem Electrolytes Health Dis* 3:151–159
10. Gmür J (1980) Die aplastische Anämie (Panzytopenie). *Erg inn Medd* 45:145–213
11. Granick S, Sassa S, Granick JL, Levere RD, Kappas A (1972) Assays for porphyrins, aminolevulinic-acid dehydratase, and porphyrinogen synthetase in microliter samples of whole blood: applications to metabolic defects involving the heme pathway. *Proc Natl Acad Sci USA* 69:2381–2385
12. Greengard O, Federman M, Knox WE (1972) Cytomorphometry of developing rat liver and its application to enzymic differentiation. *J Cell Biol* 52:261–272
13. Herzberg GR, Rogerson M (1989) Hepatic fatty acid synthesis and triglyceride secretion in rats fed fructose- or glucose-based diets containing corn oil, tallow or marine oil. *J Nutr* 118:1061–1067
14. Jaffe ER (1972) Oxidative hemolysis, or "what made the red cell break"? *N Engl J Med* 186:156–157
15. Johnson GJ, Allen DW, Cadman S, Fairbanks VF, White JG, Lampkin BC, Kaplan ME (1979) Red-cell membrane polypeptide aggregates in glucose-6-phosphate dehydrogenase mutants with chronic hemolytic disease. *N Engl J Med* 301:522–527
16. Kammholz LP, Thachter LG, Blodgett FM, Good TA (1972) Rapid protoporphyrin quantitation for detection of lead poisoning. *Pediatrics* 50:625–631
17. Kirchgeßner M, Reichlmayr-Lais AM (1981) Changes of iron concentration and iron-binding capacity in serum resulting from alimentary lead deficiency. *Biol Trace Elem Res* 3:279–285
18. Kirchgeßner M, Reichlmayr-Lais AM (1982) Konzentration verschiedener Stoffwechselmetaboliten im experimentellen Bleimangel. *Ann Nutr Metab* 26:50–55
19. Kleeberg UR (1975) Pathophysiologie und Diagnostik hämolytischer Anämien. *Dtsch med Wschr* 100:1400–1402
20. Kosower NS, Kosower EM (1989) Influence of glutathione on membranes. In: Coenzymes and cofactors, glutathione. Dolphin D, Poulson R, Avramovic O (eds), Wile Interscience, pp 319–356

21. Kurata M, Suzuki M, Agar NS (1993) Antioxidant systems and erythrocyte life-span in mammals. *Comp Biochem Physiol* 106B:477-487
22. Lamola A, Joselow M, Yamane T (1975) Zinc protoporphyrin (ZPP): A simple sensitive fluorometric screening test for lead poisoning. *Clin Chem* 21:93-97
23. Levander OA, DeLoach DP, Morris VC, Moser PB (1983) Platelet glutathione peroxidase activity as an index of selenium status in rats. *J Nutr* 113:55-63
24. Piomelli S, Davidow B, Guinee VF, Young P, Gay G (1973) The FEP (free erythrocyte porphyrins) test: A screening micromethod for lead poisoning. *Pediatrics* 51:254-259
25. Reichlmayr-Lais AM, Kirchgeßner M (1981) Zur Essentialität von Blei für das tierische Wachstum. *Z Tierphysiol Tierernährg u Futtermittelkde* 46:1-8
26. Reichlmayr-Lais AM, Kirchgeßner M (1981) Depletionsstudien zur Essentialität von Blei an wachsenden Ratten. *Arch Tierernährg* 31:731-737
27. Reichlmayr-Lais AM, Kirchgeßner M (1981) Aktivitätsveränderungen verschiedener Enzyme im alimentären Blei-Mangel. *Z Tierphysiol Tierernährg u Futtermittelkde* 46:145-150
28. Reichlmayr-Lais AM, Kirchgeßner M (1981) Hämatologische Veränderungen bei alimentärem Bleimangel. *Ann Nutr Metab* 25:281-288
29. Reichlmayr-Lais AM, Kirchgeßner M (1981) Katalase- und Coeruloplasmin-Aktivität im Blut bzw. Serum von Ratten im Blei-Mangel. *Zbl Vet Med A* 28:410-414
30. Reichlmayr-Lais AM, Kirchgeßner M (1981) Eisen-, Kupfer- und Zinkgehalte in Neugeborenen sowie in Leber und Milz wachsender Ratten bei alimentärem Blei-Mangel. *Z Tierphysiol Tierernährg u Futtermittelkde* 46: 8-14
31. Reichlmayr-Lais AM, Kirchgeßner M (1993) Bleimangel bei an Blei deplierten Ratten und deren Nachkommen. *J Anim Physiol a Anim Nutr* 70:246-252
32. Sanderson JH, Phillips CE (1981) An atlas of laboratory animal hematology. Clarendon Press, Oxford, pp 38-41
33. Schröder W, Dumas ML, Klein U (1990) Rapid high-performance liquid chromatographic protein quantitation of purified recombinant Factor VIII containing interfering substances. *J Chromatogr* 512:213-218
34. Thomas L (1984) Enzyme. In: Labor und Diagnose. 2. Aufl., Thomas L (Hrsg), Med Verlagsgesellschaft Marburg/Lahn, 33-109
35. Thomas L, Opferkuch W (1984) Plasmaproteine. In: Labor und Diagnose. 2. Aufl., Thomas L (Hrsg), Med Verlagsgesellschaft Marburg/Lahn, S 505-546
36. Van Zwieten MJ, Hollander CF (1985) Extramedullary hematopoiesis, liver, rat. In: Monographs on Pathology of Laboratory Animals - digestive system. Jones, Mohr, Hunt (eds) Springer Verlag, Berlin, pp 97-100
37. Wagner GM, Lubin BH, Chiu DT (1988) Oxidative damage to red blood cells. In: Cellular Antioxidant Defence Mechanism. Chow CK (ed) CRC Press Inc, Boca Raton, Volume I, pp 185-195