

Zum Einfluß von marginalem Zinkmangel auf die humorale Immunität der Ratte

H. W. Kukral, M. Kirchgeßner und H.-P. Roth

Institut für Ernährungsphysiologie der Technischen Universität
München, Freising-Weihenstephan

Zusammenfassung: In einem Versuch mit 60 weiblichen entwöhnten Sprague-Dawley-Ratten wurde geprüft, ob marginaler Zinkmangel direkte Auswirkungen auf die Serumimmunglobulinspiegel IgM und IgG₁ zeigt. Die Ratten wurden in 6 Behandlungsgruppen zu je 10 Tieren eingeteilt. Zwei Kontrollgruppen (73,7 ppm Zn) und die beiden marginalen Zinkmangelgruppen (4,3 ppm Zn) wurden ad libitum mit einer halbsynthetischen Diät auf Caseinbasis versorgt. Die Tiere zweier weiterer Gruppen erhielten pair-fed zu den Mangeltieren eine Kontrolldiät mit ebenfalls 73,7 ppm Zn. 15 Tage nach Verfüttern dieser Diäten wurde jeweils eine Gruppe der unterschiedlich versorgten Tiere mit einem für Ratten apathogenen Rinderenterovirus (0,2 ml pro Ratte) i.m. infiziert. 3 Wochen später wurden alle Tiere mit Ether betäubt und dekapiert. Die Infektion der Ratten mit dem bovinen Rinderenterovirus blieb ohne Einfluß auf den Immunglobulin-(Ig-)Spiegel. Auch der marginale Zinkmangelzustand, wie er in der vorliegenden Untersuchung auftrat, führte bei den Versuchstieren zu keinen Veränderungen in der IgM- und IgG₁-Konzentration des Serums. Es bleibt zu untersuchen, ob andere Immunglobulinklassen eher auf marginalen Zinkmangel ansprechen oder welchen Einfluß ein extremer Zinkmangel bei der Ratte ausübt.

Summary: The purpose of this experiment was to examine the effects of a marginal zinc deficiency on serum immunoglobulin (Ig) IgM and IgG₁ levels. 60 weanling female Sprague-Dawley rats were divided into six groups of ten animals each. Two control groups (73.7 ppm Zn) and two zinc-deficient groups (4.3 ppm Zn) were fed a semisynthetic casein diet ad libitum. The animals of two further groups received the control diet (73.7 ppm Zn) pair-fed to the zinc-deficient animals. After 15 days the rats of one group of each treatment were infected i.m. with a single injection (0.2 ml) of a bovine enterovirus, apathogenous to rats. 3 weeks later, all rats were anesthetized with ether and decapitated. Infection of the rats with the bovine enterovirus had no effect on the serum immunoglobulin level. The marginal zinc deficiency did not alter the IgM and IgG₁ serum concentrations at all either. It remains to be examined whether other Ig-classes will react to marginal zinc deficiency. Also, the effect of severe zinc deficiency on the humoral immune system must be studied.

Schlüsselwörter: marginaler Zinkmangel; humorale Immunität; Immunglobuline der Ratte

Key words: marginal zinc deficiency; humoral immunity; rat immunoglobulins

Einleitung

Ungenügende alimentäre Zinkversorgung kann bei Mensch und Tier zu Entwicklungs- und Wachstumsstörungen sowie zu einer eingeschränkten Funktion des zellulären Immunsystems führen (Fraker et al. 1977; Golden et al. 1978). Ob auch die humorale Immunität bereits durch einen marginalen Zinkmangel beeinflußt wird, sollte in vorliegendem Rattenversuch getestet werden. Der Zinkstatus der Tiere wurde mit Hilfe der Messung von prozentualer Zinkbindungskapazität, Aktivität der alkalischen Phosphatase und der Zinkkonzentration im Serum und Femur ermittelt. Als Parameter zur Beurteilung der humoralen Immunität dienten die IgM- und IgG₁-Konzentrationen im Rattenserum. Durch eine Infektion der Tiere mit einem für Ratten apathogenen Virus sollten die Serumimmunglobulin-Spiegel künstlich erhöht und mögliche Interaktionen mit der differenzierten Zinkversorgung erfaßt werden. Inwieweit die Immunglobulin-(Ig-)Konzentrationen des Serums mit den im marginalen Zinkmangelzustand eventuell veränderten hämatologischen Werten korrelieren, wurde ebenfalls untersucht.

Material und Methoden

Versuchstiere

Der Versuch wurde mit 60 weiblichen entwöhnten Sprague-Dawley-Ratten durchgeführt, deren anfängliche mittlere Lebendmasse zwischen 40 und 50 g lag. Während einer Vorperiode von 28 Tagen wurden die Tiere mit einer Diät, die 14 ppm Zink enthielt (dieser Zinkgehalt entspricht etwa dem Bedarf einer wachsenden jungen Ratte) bis zu einem Gewicht von 159 g gefüttert. Aufgrund des fortgeschrittenen Alters der Tiere konnte mit einer weitgehend abgeschlossenen Ausreifung der Immunglobuline produzierenden B-Zellen gerechnet werden. Durch den niedrigen Zinkgehalt in der Diät sollte eine Anlage von zu großen Zinkspeichern vermieden werden. Am Tag 29 begann die Hauptperiode mit einer Einteilung der Tiere nach einem zweifaktoriellen Versuchsplan in 6 Behandlungsgruppen zu je 10 Tieren. Als Faktoren wurden die Zinkversorgung in 3 Stufen und eine Infektion der Tiere mit dem für Ratten apathogenen bovinen Enterovirus in 2 Stufen gewählt. Zwei Kontrollgruppen (73,7 ppm Zn) und die beiden marginalen Zinkmangelgruppen (4,3 ppm Zn) wurden ad libitum mit einer halbsynthetischen Diät auf Caseinbasis (Roth et al. 1975) versorgt. Die Tiere zweier weiterer Gruppen erhielten pair-fed zu den Mangeltieren die Kontrolldiät mit ebenfalls 73,7 ppm Zn. 15 Tage nach Beginn der Hauptperiode (Tag 44) wurde 30 Versuchstieren (jeweils einer Gruppe der unterschiedlich versorgten Tiere) ein Rinderenterovirus (Ecbo LCR-4, 10 BEL = 10. Passage) i.m. injiziert (Dosierung: 0,2 ml/Tier¹). Die hier verwendeten Rinderenteroviren (Ecbo = enteric cytopathogenic bovine orphan) wurden in Zellkulturen aus der Rinderlunge gezüchtet. Eine Infektion von Ratten mit dem bovinen Enterovirus verläuft apathogen, kann aber zu einem Anstieg der Serumimmunglobuline führen. 3 Wochen nach der Infizierung (Tag 65) wurden alle Tiere nach zwölfstündiger Nüchterung unter Ethernarkose dekapitiert.

¹) Die Bereitstellung des Virus erfolgte freundlicherweise durch den Lehrstuhl für Medizinische Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenmedizin des Fachbereichs Tiermedizin der Ludwig-Maximilians-Universität München.

Die Ratten wurden in metallfreien Kunststoffkäfigen auf Glasrosten bei 23 °C, 60 % relativer Luftfeuchte und zwölfständigem Licht-Dunkel-Zyklus gehalten. Die Käfige wurden täglich maschinell gereinigt und mit deionisiertem Wasser gespült, um eine Zinkeinschleppung über das Wasser zu vermeiden. Das ebenfalls jeden Tag erneuerte Trinkwasser (aqua bidest.) stand in 200-ml-Polyethylenflaschen, die mit einem Saugrohr aus Glas versehen waren, ad libitum zur Verfügung. Durch Zusatz von 0,014 % NaCl p.a. erfolgte eine Angleichung an die durchschnittliche Osmolarität von Leitungswasser.

Bestimmungsmethoden

An frischgewonnenem Blut, das in heparinisierten 1,5-ml-Eppendorf-Reaktionsgefäßen aufgefangen wurde, erfolgte sofort die Messung von Erythrozytenzahl, Hämatokrit und dem mittleren korpuskulären Zellvolumen (MCV) mit einem Coulter Counter (Fa. Coulter Electronics GmbH, Krefeld), ausgerüstet mit MCV/Hct-Zusatzgerät. Die Bestimmung der Hämoglobinkonzentration im Rattenblut wurde mit einem Hämoglobinometer (Fa. Coulter Electronics GmbH, Krefeld) durchgeführt. Nach dem Ausbluten der Tierkörper erfolgte die Entnahme der Femora, die luftdicht in Polyethylenbeutel verschweißt, tiefgefroren und bei -30 °C gelagert wurden.

Die Serum-Proteinkonzentration wurde in Anlehnung an die modifizierte Biuret-Methode von Inchiosa (1964) bestimmt. Die Messung der Aktivität der alkalischen Phosphatase (EC 3.1.3.1) erfolgte nach der „Optimierten Standardmethode“ der Deutschen Gesellschaft für klinische Chemie mit Hilfe einer Testkombination der Fa. Boehringer, Mannheim. Da nur eine begrenzte Menge an Rattenserum zur Verfügung stand, wurden 30 statt der in der Testvorschrift angegebenen 50 µl Probevolumen eingesetzt.

Die Bestimmung der Serumzinkkonzentration erfolgte nach Verdünnung des Serums mit bidest. Wasser im Verhältnis 1:5 an einem Atomabsorptions-Spektralphotometer Modell 300 der Fa. Perkin-Elmer, Überlingen, direkt in der Flamme. Die Femora wurden nach der Trockenmassebestimmung bei 105 °C in Platschalen bei 480 °C im Muffelofen trocken verascht. Es erfolgte die Aufnahme des Rückstandes in HCl-saure Lösung, um anschließend die Zinkkonzentration ebenfalls mittels AAS zu bestimmen. Die prozentuale Zinkbindungskapazität des Serums wurde im Mikromaßstab nach den Arbeitsvorschriften von Roth und Kirchgeßner (1980) bestimmt.

Modifizierte Immunelektrophorese nach Laurell (Raketenimmunelektrophorese)

Die quantitative Bestimmung der Immunglobuline IgM und IgG, im Rattenserum erfolgte mittels einer modifizierten quantitativen zweidimensionalen Immunelektrophorese nach Laurell (1966).

Da Immunglobuline (vor allem IgG und IgM) bei pH 8,6 nur eine geringe, und zwar sowohl kathodische als auch anodische Wanderungseigenschaft besitzen, wurde das Probeserum mit Kaliumcyanat (KOCN) carbamyliert.

1 g Agarose, Typ I: Low EEO (Firma Sigma, USA) wurde in 100 ml 1:4 verdünntem Immunelektrophoresepuffer (Firma Bio-Rad, USA), pH 8,6, Ionenstärke 0,02 µ bei 96 °C 20 Minuten im Wasserbad gelöst, auf 56 °C abgekühlt und mit 100 (IgM-Bestimmung) bzw. 200 µl (IgG₁-Bestimmung) monospezifischen Antiserums gut vermischt. Als monospezifische Antiseren wurden Anti-Rat IgM (Fc specific) und Anti-Rat IgG₁ (subsets specific) (Firma Nordic Immunological Laboratories, Niederlande) verwendet. Als Proteinreferenzserum kam gepooltes Rattenserum zur Anwendung (Firma Nordic Immunological Laboratories, Niederlande), das auch als Relativstandard eingesetzt wurde. Da die quantitative Bestimmung der Immunglobuline sehr von den jeweiligen Untersuchungsmethoden und den Bedingungen in den einzelnen Laboratorien abhängt, ist ein Bezug auf allgemeingültige

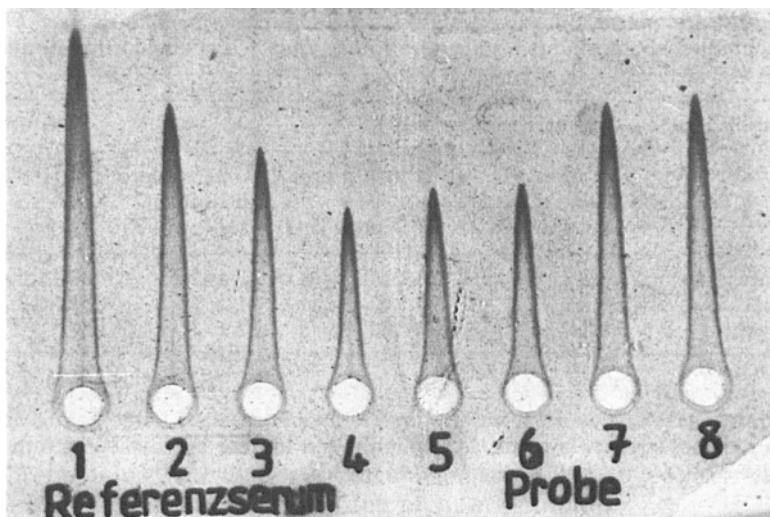


Abb. 1. Testplatte (GelBond®-Film) zur IgM-Bestimmung im Rattenserum (Raketenimmunoelktrophorese). 1-4 = Referenzserum (Standardverdünnungsreihe: 1:8, 1:9, 1:12 und 1:18); 5-6 = Probe A (Verdünnung: 1:8); 7-8 = Probe B (Verdünnung: 1:8)

Normwerte nicht möglich. Für die vorliegende Untersuchung wurde deshalb eine „Laborinterne Einheit“, kurz 1 LE, eingeführt. Dadurch wird ein Vergleich der ermittelten Werte innerhalb des Versuchs möglich. Ein Vergleich mit außerhalb des Labors ermittelten Absolutwerten ist jedoch nicht zulässig. Das gepoolte Referenzserum erhielt willkürlich den Titer 100 LE (100 Laborinterne Einheiten), d. h., in 10 µl Referenzserum sind 100 LE der zu untersuchenden Immunglobulinklasse enthalten. Der Immunglobulингehalt der gemessenen Serumproben wurde in relativen Einheiten (LE) bezogen auf das Referenzserum ausgedrückt. Jeweils 10 µl der antiserumhaltigen Agarosemischung wurden auf GelBond®-Filme (Firma LKB, Schweden) der Abmessungen 84 × 94 mm gleichmäßig verteilt. GelBond®-Filme besitzen gegenüber den sonst gebräuchlichen Glasplatten den Vorteil, daß sie bereits mit Agarose vorbeschichtet und für Dokumentationszwecke besser geeignet sind. Die Antigenkonzentrationen sowie die Verdünnungen des Serums wurden jeweils so gewählt, daß Präzipitate mit Längen um 50 mm entstanden. Die Elektrophorese wurde mit einem Gerät der Firma LKB, Schweden, durchgeführt, wobei die Feldstärke 2 V/cm und die Laufzeit 16 Stunden betrug. Nach Beendigung der Elektrophorese wurden die Platten vorsichtig mit H₂O dest. abgespült und gepreßt. Anschließend wurden die Platten mit physiologischer Kochsalzlösung gewaschen und zur besseren Sichtbarmachung der Präzipitate mit Coomassie Brilliant Blue R-250 (Fa. Serva) eingefärbt (siehe Abb. 1). Die Messung der Präzipitatlänge erfolgte von der Durchmessermitte der Auftragsstellen bis zur Mitte der Peaks. Die quantitative Auswertung wurde über eine Eichkurve durchgeführt. Die Höhe der Präzipitate der mitgeführten Standardverdünnungen wurde gegen ihre Konzentrationen in ein Koordinatensystem eingetragen. Aus dieser Bezugskurve konnten die Proteingehalte der Probenverdünnungen abgelesen werden. Da die Präzipitatthöhe von vielen Faktoren beeinflußt wird, war es notwendig, für jede Platte eine Eichkurve aufzustellen. Um die Fehler bei der Längenmessung gering zu halten, sollten die Präzipitatschleifen möglichst schmal und schlank sein.

Tab. 5. IgM- und IgG₁-Konzentrationen (LE) im Serum weiblicher nichtinfizierter und infizierter Ratten unterschiedlicher Zinkversorgung.

Virusinfektion	Zinkversorgung			Mittelwert
	Zn-Mangel-Tiere (4,3 ppm Zn)	Kontrolltiere pair-fed (73,7 ppm Zn)	Kontrolltiere ad libitum (73,7 ppm Zn)	
IgM-Konzentration:				
nichtinfiziert	51 ± 12	42 ± 12	48 ± 10	47 ± 11
infiziert	43 ± 13	37 ± 8	46 ± 15	42 ± 13
Mittelwert	47 ± 13	40 ± 10	47 ± 12	
IgG₁-Konzentration:				
nichtinfiziert	6,7 ± 3,0	8,4 ± 5,8	7,2 ± 6,2	7,4 ± 5,1
infiziert	6,9 ± 3,3	6,6 ± 4,9	5,7 ± 3,7	6,4 ± 3,9
Mittelwert	6,8 ± 3,1	7,5 ± 5,3	6,5 ± 5,0	

Die Immunglobulinkonzentrationen im Serum der Ratten sind in der Tabelle 5 in Relation zu einem Referenzserum angegeben, dessen IgG-Konzentration gleich 100 LE (Laborinterne Einheiten) gesetzt wurde. Ein Mittelwertvergleich zeigte keinen Einfluß der untersuchten Faktoren auf den IgM- und IgG₁-Gehalt im Serum der Tiere. Da die gemessenen Werte innerhalb der Gruppen sehr großen Schwankungen unterworfen waren, ergaben sich keine statistisch sicherbaren Unterschiede.

Diskussion

Schwerer Zinkmangel wird im besonderen mit Hypoplasie oder Unterentwicklung lymphatischen Gewebes (Miller et al. 1968; Quarterman 1974), Störung der Immunfunktion (Fraker et al. 1977; Fernandes et al. 1979), einer veränderten Tumorhäufigkeit (Duncan et al. 1974; Pories et al. 1978) und einer verlangsamten Wundheilung in Verbindung gebracht. Die Essentialität des Zinks ist aber wahrscheinlich zurückzuführen auf dessen funktionelle und strukturelle Rolle, die ihm bei einer Anzahl von sogenannten Metalloenzymen und Hormonen zukommt (Kirchgeßner et al. 1976; Chandra und Dayton 1982). Hierbei haben vor allem die für die DNA- und RNA-Synthese unentbehrlichen Enzyme DNA-Polymerase, RNA-Polymerase und Thymidinkinase für die zelluläre und humorale Immunität eine wichtige Funktion. Sie beeinflussen sowohl die rasche Prolifération immunkompetenter Lymphozyten als auch die Proteinbiosynthese.

Da ein extrem ausgeprägter Zinkmangel im Humanbereich nur selten auftritt, ist vor allem die Reaktion des Organismus auf eine marginale Zinkversorgung von Interesse. Es wird vermutet, daß ein marginaler Zinkmangel beim Menschen sogar weltweit verbreitet ist, wobei Industriestaaten wie z. B. die USA inbegriffen sind (Schlage und Wortberg 1972a, b; Hambidge et al. 1976; Sandstead und Vo-Kactu 1976; Klevay et al. 1979; Prasad 1979). Eine Ursache hierfür könnte der Verzehr hochgereinigter und industriell behandelter Lebensmittel sein, in denen der Spurenele-

mentgehalt signifikant erniedrigt ist (Zook et al. 1970). Die vorliegende Studie befaßte sich deshalb mit den Auswirkungen einer marginalen Zinkversorgung der Ratte auf deren IgM- und IgG-Konzentrationen im Serum. In früheren Arbeiten (Weigand und Kirchgeßner 1977a, b; Roth und Kirchgeßner 1980) konnte gezeigt werden, daß Ratten, die eine Diät mit 5 ppm Zink erhalten, als marginal versorgt zu betrachten sind, wie auch in der vorliegenden Arbeit der um 14 % geringere Massezuwachs ($p < 0,05$) der marginal mit Zink versorgten Tiere gegenüber den Ad libitum-Kontrolltieren belegt. Ein Einfluß der Virusinfektion auf den Masseansatz war dagegen nicht erkennbar.

Die humorale Immunität eines Organismus wird durch die von B-Lymphozyten produzierten Immunglobuline vermittelt. Dabei ist nach einer Infektion zuerst der IgM-Spiegel im Serum erhöht, und erst in einem späteren Stadium können auch veränderte Serum-IgG-Konzentrationen gemessen werden. In der vorliegenden Untersuchung blieb die Virusinfektion ohne Auswirkung auf die Immunglobulinspiegel im Serum. Weder die IgM- noch die IgG₁-Konzentration zeigte am Ende der Versuchsperiode Veränderungen zwischen nichtinfizierten und infizierten Tieren. Die verabreichte Dosis war entweder zu gering, um Unterschiede hervorzurufen, oder der Immunglobulinanstieg (z. B. IgM) war nur vorübergehend und nach Versuchsende nicht mehr meßbar. Eine Erhöhung der Antikörperreaktion hätte vielleicht noch erreicht werden können, wenn die Tiere nach einer bestimmten Zeitspanne (z. B. 3 Wochen) nochmals mit bovinen Enteroviren infiziert worden wären („Boosterreaktion“). Aber auch die Stufenmittelwerte des Faktors Zinkversorgung waren hinsichtlich der Parameter IgM- und IgG₁-Konzentration nicht signifikant voneinander verschieden. Hartoma et al. (1979) fanden bei männlichen freiwilligen Probanden mit erhöhten bzw. erniedrigten Serumzinkspiegeln ebenfalls keine veränderte IgM- und IgG-Serumkonzentration. Auch bei marginal zinkdepletierten Rhesusaffen war während einer zwölfmonatigen Versuchsphase kein Einfluß eines Zinkmangels auf die Serum-IgG-Konzentration festzustellen (Haynes et al. 1985). Ein wichtiger zu berücksichtigender Faktor ist vor allem das unterschiedliche zeitliche Auftreten der Immunglobulinklassen und der veränderliche Einfluß verschiedener lymphatischer Organe, besonders der des Thymus, auf die Produktion spezifischer Ig-Klassen. Ontogenetisch bedingt, treten die Immunglobuline in der Reihenfolge IgM, IgG und IgA auf.

Die unveränderte Ig-Konzentration in vorliegender Untersuchung korreliert mit anderen Serumwerten, die ebenfalls keine Reaktion auf die marginale Zinkversorgung zeigten. So waren die hämatologischen Werte, wie z. B. Erythrozytenzahl, Hämatokrit, Hämoglobin und MCV, ebenso unverändert wie die prozentuale Zinkbindungskapazität, die Zinkkonzentration und die Aktivität der alkalischen Phosphatase des Serums. Die marginale Zinkversorgung der Ratten über 35 Tage wirkte sich also nur auf die Zinkkonzentration der Femora und auf den Massezuwachs aus. Allerdings besteht die Möglichkeit, daß die bei leichter Zinkuntersorgung veränderte Stoffwechsellage dazu beigetragen hat, daß mit fortlaufender Versuchsdauer die Skelettspeicher entleert wurden. So wiesen die Femora, die hier repräsentativ für das Skelett anzusehen sind, zu Versuchsende nur noch 56 % vom Femurzinkgehalt der Pair-fed- bzw. Ad-

libitum-Kontrolltiere auf, was den Depletionseffekt unterstreicht. Der leichte Zinkmangelzustand wurde jedoch aufgrund einer erfolgreichen Zinkmobilisierung aus den Femora abgeschwächt. Auch Aziz et al. (1985), die zinkdeplatierte Mäuse mit Bilharziose-Erregern infizierten, konnten trotz unveränderter Serumzinkkonzentration einen erniedrigen Femurzinkgehalt feststellen. Die Fähigkeit des Skeletts, in Zeiten einer ungenügenden Nährstoffversorgung als Reservoir für verfügbares Zink zu dienen, war schon oft Gegenstand kontroverser Diskussionen. So sind Tao und Hurley (1975) der Ansicht, daß Zink sehr fest im mineralischen Teil des Knochens gebunden ist und in der Regel auch in Zeiten einer Unterversorgung dem Stoffwechsel nicht zur Verfügung steht. Andere Autoren behaupten hingegen, daß im Skelett gespeichertes Zink während eines Zinkmangels für den Organismus bereitgestellt werden kann; wenigstens bei wachsenden Tieren soll es zu einer aktiven Umbildung in den Knochen kommen (Kirchgeßner und Pallauf 1972; Roth und Kirchgeßner 1974, 1977; Calhoun et al. 1978; Wallwork et al. 1981; Kirchgeßner et al. 1982).

Zusammenfassend kann gesagt werden, daß ein marginaler Zinkmangelzustand, wie er in vorliegender Untersuchung auftrat, bei Ratten keinen direkten Einfluß auf deren IgM- und IgG₁-Konzentration im Serum ausübt. Inwieweit andere Immunglobulinklassen bei marginaler bzw. mangelnder Zinkversorgung betroffen sind, bleibt noch zu untersuchen.

Literatur

1. Aziz MTA, Fahmy K, Tharwat S, El Harrizi WM, Salama L, Ibrahim IA (1985) Relationship between zinc deficiency and immunity in bilharzial hepatic fibrosis. *Nutr Rep Intern* 32:1221-1227
2. Calhoun NR, McDaniel EG, Howard MP, Smith Jr JC (1978) Loss of zinc from bone during deficiency state. *Nutr Rep Intern* 17:299-306
3. Chandra RK, Dayton DH (1982) Trace element regulation of immunity and infection. *Nutr Res* 2:721-733
4. Duncan JR, Dreosti IE, Albrecht CF (1974) Zinc intake and growth of a transplanted hepatoma induced by 3'-Methyl-4-Dimethyl-aminoazobenzene in rats. *J Natl Cancer Inst (US)* 53:277-278
5. Fernandes G, Mair M, Onoe K, Tanaka T, Floyd R, Good RA (1979) Impairment of cell-mediated immunity functions by dietary zinc deficiency in mice. *Proc Natl Acad Sci, USA* 76:457-461
6. Fraker PJ, Haas S, Luecke RW (1977) Effect of zinc deficiency on the immune response of the young adult A/J mouse. *J Nutr* 107:1889-1895
7. Golden MHN, Golden BE, Harland PSEG, Jackson AA (1978) Zinc and immunocompetence in protein-energy malnutrition. *Lancet* 1:1226-1227
8. Hambidge KM, Walravens PA, Brown RM, Webster J, White S, Anthony M, Roth ML (1976) Zinc nutrition of preschool children in the Denver Head Start program. *Am J Clin Nutr* 29:734-738
9. Hartoma TR, Sotaniemi EA, Määttänen I (1979) Effect of zinc on some biochemical indices of metabolism. *Nutr Metab* 23:294-300
10. Haynes DC, Gershwin ME, Golub MS, Cheung ATW, Hurley LS, Hendrickx AG (1985) Studies of marginal zinc deprivation in rhesus monkeys: VI. Influence on the immunohematology of infants in the first year. *Am J Clin Nutr* 42:252-262
11. Inchiosa MA (1964) Direct biuret determination of total protein in tissue homogenates. *J Lab Clin Med* 63:319-324

12. Kirchgeßner M, Pallauf J (1972) Zinkdepletion wachsender Ratten – Leber, Knochen, Schwanz und Ganzkörper – 3. Mitteilung. Zum Stoffwechsel des Zinks im tierischen Organismus. *Z Tierphysiol Tierernährung u Futtermittelkde* 29:65–76
13. Kirchgeßner M, Roth H-P, Weigand E (1976) Biochemical changes in zinc deficiency. In: Prasad AS (ed) *Trace elements in health and disease*, Vol 1. Academic Press, New York, pp 189–225
14. Kirchgeßner M, Schwarz FJ, Weigand E, Roth H-P (1982) Zum Stoffwechsel des Zinks im menschlichen und tierischen Organismus. In: Staib I (Hrsg) *Spurenelemente: Bedeutung für Chirurgie, Anästhesiologie und Intensivmedizin*. FK Schattauer Verlag, Stuttgart New York, S. 12–61
15. Klevay LM, Reck SJ, Barcome DF (1979) Evidence of dietary copper and zinc deficiencies. *J Am Med Assoc* 241:1916–1918
16. Laurell CB (1966) Quantitative estimation of proteins by electrophoresis in agarose gel containing antibodies. *Analytical Biochemistry* 15:42–52
17. Miller ER, Luecke RW, Ullrey DE, Baltzer BV, Bradley BL, Hoefer JA (1968) Biochemical, skeletal and allometric changes due to zinc deficiency in the baby pig. *J Nutr* 95:273–286
18. Pallauf J, Kirchgeßner M (1971) Experimenteller Zinkmangel bei wachsenden Ratten. 2. Mitteilung. Zum Stoffwechsel des Zinks im tierischen Organismus. *Z Tierphysiol Tierernährung u Futtermittelkde* 28:128–139
19. Pries WJ, DeWys WD, Flynn A, Mansour EG, Strain WH (1978) Implications of the inhibition of animal tumors by dietary zinc deficiency. In: Schrauzer GN (ed), *Inorganic and Nutritional Aspects of Cancer; Adv Exp Med Biol* 91:243–257
20. Prasad AS (1979) Clinical, biochemical and pharmacological role of zinc. *Ann Rev Pharmacol Toxicol* 20:393–426
21. Quarterman J (1974) The effects of zinc deficiency or excess on the adrenals and thymus in the rat. In: Hoekstra WC, Suttie JW, Ganther HE, Mertz WE (eds) *Trace element metabolism in animals*, Vol. 2; University Park Press, Baltimore, pp 742–744
22. Roth H-P, Kirchgeßner M (1974) De- und Repletionsstudien an Zink in Knochen und Leber wachsender Ratten. *Arch Tierernährung* 24:283–298
23. Roth H-P, Kirchgeßner M (1975) Insulingehalte im Serum bzw. Plasma von Zinkmangelratten vor und nach Glukosestimulierung. *Intern Z Vit Ern Forsch* 45:201–208
24. Roth H-P, Kirchgeßner M (1977) zum Gehalt von Zink, Kupfer, Eisen, Mangan und Calcium in Knochen und Lebern von an Zink depletierten und repletierten Ratten. *Zbl Vet Med A* 24:177–188
25. Roth H-P, Kirchgeßner M (1980) Zn-Bindungskapazität des Serums. Ein Parameter zur Diagnose von marginalem Zn-Mangel. *Res Exp Med (Berl)* 177:213–219
26. Roth H-P, Schneider U, Kirchgeßner M (1975) Zur Wirkung von Zinkmangel auf die Glukosetoleranz. *Arch. Tierernährung* 25:545–549
27. Sandstead HH, Vo-Khactu KP (1976) Conditioned zinc deficiencies. In: Prasad AS (ed) *Trace Elements in human health and disease*; Academic Press, New York, pp 33–49
28. SAS Institute Inc (1985): *SAS User's Guide: Statistics, Version 5 Edition*. Cary, NC: SAS Institute Inc
29. Schlage C, Wortberg B (1972 a) Zinc in the diet of healthy preschool and school children. *Acta Paediatr Scand* 61:421–425
30. Schlage C, Wortberg B (1972 b) Manganese in the diet of healthy preschool and school children. *Acta Paediatr Scand* 61:648–652

31. Tao SH, Hurley LS (1975) Effect of dietary calcium deficiency during pregnancy on zinc mobilization in intact and parathyroidectomized rats. *J Nutr* 105:220-225
32. Underwood EJ (1977) Trace elements in human health and animal nutrition. Academic Press, London
33. Wallwork JC, Fosmire GJ, Sandsreal HH (1981) Effect of zinc deficiency on apatite and plasma amino acid concentration in the rat. *Br J Nutr* 45:127-136
34. Weigand E, Kirchgeßner M (1977 a) Dietray zinc supply and efficiency of food utilization for growth. *Z Tierphysiol Tierernährg u Futtermittelkde* 39:16-26
35. Weigand E, Kirchgeßner M (1977 b) Model study on the factorial derivation of the requirements of trace elements. - Zinc requirement of the growing rat. *Z Tierphysiol Tierernährg u Futtermittelkde* 39:84-95
36. Zook EG, Greene FE, Morris ER (1970) Nutrient composition of selected wheats and wheat products. 6. Distribution of manganese, copper, nickel, zinc, magnesium, lead, tin, cadmium, chromium and selenium as determined by atomic absorption spectroscopy and calorimetry. *Cereal Chem* 47:720-731

Eingegangen 16. März 1988

Für die Verfasser:

Prof. Dr. Dr. h. c. Dr. h. c. Manfred Kirchgeßner, Institut für Ernährungsphysiologie der Technischen Universität München, 8050 Freising-Weihenstephan