

Programm Lebensgrundlage Umwelt und ihre Sicherung (BWPLUS)
Forschungsbericht FZKA-BWPLUS

**Kupfer und frühkindliche Leberzirrhose: Molekulartoxikologische
Untersuchungen der chronischen Kupfertoizität**

Abschlussbericht

von

Karl H. Summer^{1,2}, Josef Lichtmanegger², Sandra Michaelen² und Dominik Klein¹

Institut für Toxikologie und Umwelthygiene, Technische Universität München, 80636
München und 2) Institut für Toxikologie, GSF-Forschungszentrum für Umwelt und
Gesundheit, 85758 Neuherberg

Förderkennzeichen PUG U 98003

Die Arbeiten des Projektes Umwelt und Gesundheit wurden mit Mitteln des Landes
Baden-Württemberg gefördert

April 2002

Inhaltsverzeichnis

	Seite
1. Einleitung	3
2. Material und Methoden	4
2.1 Tiere	4
2.1.1 LEC Ratten	4
2.1.2 Meerschweinchen	4
2.2 Aufarbeitung der Gewebe	5
2.3 Transmissionselektronenmikroskopie	5
2.4 Immunhistochemischer Nachweis der Kupffer'schen Sternzellen	6
2.5 Röntgenelementaranalyse	6
2.6 Analytik von Metallen und Metallothionein	6
2.7 GOT-Aktivität und Bilirubin	7
2.8 Proteinbestimmung	7
2.9 Statistische Verfahren	7
3. Ergebnisse und Diskussion	8
3.1 LEC Ratten	8
3.1.1 Histologische und labordiagnostische Befunde	8
3.1.2 Elektronenmikroskopische Befunde	9
3.1.3 Kupffer'sche Sternzellen bei der Entwicklung der fulminanten Hepatitis	13
3.1.4 Alters- und krankheitsabhängige Akkumulation von Kupfer	14
3.1.5 Lokalisation und Bindung von Kupfer in der Leber	16
3.1.5.1 Zytoplasma	16
3.1.5.2 Lysosomen und Mitochondrien	18
3.1.5.3 Zellkerne und Mikrosomen	21
3.1.6 Diskussion	22
3.2 Meerschweinchen	26
3.2.1 Nicht verstorbene bzw. nicht erkrankte Tiere	26
3.2.2 Verstorbene bzw. erkrankte Tiere	36
3.2.3 Zur Frage eines No Observed Adverse Effect Level (NOAEL) von Kupfer für Neugeborene	38
4. Zusammenfassung	39
4.1 Zum Mechanismus der Hepatotoxizität von Kupfer	39
4.2 Zur Kupfertoxizität beim Neugeborenen	40
5. Literatur	41

1. EINLEITUNG

Kupfer ist ein essentielles Spurenelement. Sein Bedarf wird nahezu ausschließlich über die Nahrung gedeckt (1). Der Beitrag über das Trinkwasser ist im allgemeinen vernachlässigbar. Nach Schätzungen der WHO liegt der akzeptable Bereich für die orale Aufnahme („Acceptable Range of Oral Intake“, AROI) bei 20-50 µg Kupfer/kg Körpergewicht/Tag für Kinder und Erwachsene (2). In den USA werden 1,5-3,0 bzw. 0,4-0,6 mg Kupfer/Tag als sicher und ausreichend für Erwachsene bzw. Kleinkinder im Alter von 0-5 Jahren erachtet („Estimated Safe and Adequate Daily Intake“) (3). Mit einer täglich aufgenommenen Menge von 0,6-1,6 mg Kupfer bei beruflich nicht exponierten Personen (4, 5) liegt damit die Versorgung der Durchschnittsbevölkerung mit Kupfer eher an der unteren Grenze der empfohlenen Menge. Aufgrund des effizient regulierten Gleichgewichts zwischen seiner Resorption und Ausscheidung ist Kupfer für den Säuger kaum toxisch. In Deutschland und in anderen Ländern sind jedoch in den letzten Jahrzehnten zahlreiche Fälle von frühkindlicher Leberzirrhose mit zumeist tödlichem Ausgang bekannt geworden, die auf eine erhöhte Exposition gegenüber Kupfer zurückzuführen sind (6-12). All diesen Fällen ist gemeinsam, dass die Kleinkinder nicht oder nur kurz gestillt wurden und mit Formulamilch ernährt wurden, die mit kupferhaltigem Wasser zumeist aus Eigenwasserversorgung zubereitet war.

Wegen der lückenhaften Datenlage bei den aufgetretenen Fällen von frühkindlicher Leberzirrhose ist eine Abschätzung der Gefährdung des Neugeborenen durch Kupfer im Trinkwasser auf der Grundlage der Humandaten alleine nicht möglich. Eine entsprechende Risikoabschätzung ist nur über Tierversuche, die unter kontrollierten Bedingungen durchgeführt werden möglich.

Im Vordergrund des geplanten Vorhabens standen Fragen bezüglich des molekularen Mechanismus der Hepatotoxizität von Kupfer und die Frage, ob und gegebenenfalls für wie lange der Säugling besonders empfindlich für eine erhöhte Kupferexposition ist. Ziel des Projektes war es, die Grundlagen zu schaffen für die Festlegung eines toxikologisch begründeten Grenzwertes für Kupfer im Trinkwasser, der die eventuell erhöhte Empfindlichkeit des Neugeborenen berücksichtigt. Die mechanistischen Fragestellungen wurden an genetisch veränderten Long-Evans Cinnamon (LEC) Ratten untersucht, die auf Grund eines Gendefekts Kupfer in der Leber akkumulieren (13, 14) und in der Folge Leberzellnekrosen und im Alter von 3-4 Monaten eine fulminante, zumeist tödlich verlaufende Hepatitis entwickeln. Die Untersuchungen zur Akkumulierbarkeit und Dosis-Wirkungs-Beziehung von Kupfer nach oraler Exposition wurden an neugeborenen Meerschweinchen durchgeführt. Meerschweinchen haben einen dem Menschen sehr ähnlichen Kupferstoffwechsel und können darüber hinaus als Nestflüchter bereits unmittelbar nach der Geburt oral gegenüber Kupfer exponiert werden (15, 16).

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1 Tiere

2.1.1 LEC Ratten

LEC Ratten beiderlei Geschlechts wurden von Charles River Wiga (Japan) bezogen. Die Tiere erhielten Leitungswasser und Standardfutter (Altromin, Lage; Kupfergehalt 11,0 mg/kg) ad libitum. Für die Untersuchungen wurden die Tiere in 6 Gruppen eingeteilt: Tiere ohne D-Penicillamin (DPA)-Behandlung im Alter von 62 ± 2 , 77 ± 1 bzw. 86 ± 1 Tagen, Tiere im Alter von 107 ± 1 Tagen, die ab Tag 64 DPA erhielten und Tiere im Alter von 84 ± 1 bzw. 93 ± 1 Tagen, die ab dem Alter von 77 Tagen mit DPA behandelt wurden.

Den ab dem Alter von 64 Tagen mit DPA behandelten LEC Ratten wurde anstelle des Leitungswassers eine Lösung von 538,8 mg DPA-Hydrochlorid (Heyl Pharma, Berlin) pro Liter entionisiertes Wasser, die mit 1 M NaOH auf einen pH von 3,5 eingestellt wurde, angeboten. Bei einem geschätzten Wasserverbrauch von 30 ml pro Tag und Tier entspricht dies einer täglichen Dosis von etwa 100 mg DPA/kg Körpergewicht. Diejenigen Tiere, die DPA ab dem Alter von 77 Tagen erhielten, wurden nach folgendem Schema behandelt: Jeweils eine Dosis von 500 mg DPA/kg Körpergewicht intragastral (i.g.) an den Tagen 77, 81 und 82 und jeweils zwei Dosen von 500 mg DPA/kg Körpergewicht i.g. an den Tagen 78-80. Die i.g. applizierte DPA-Lösung enthielt 311 mg DPA-Hydrochlorid/ml 1 M NaOH und wies einen pH von etwa 2,5 auf. Außerdem erhielten diese Tiere ab dem Tag 80 anstelle des Leitungswassers die gleiche mit DPA versetzte Lösung ad libitum, wie die ab dem Alter von 64 Tagen mit DPA behandelten Ratten.

2.1.2 Meerschweinchen

Männliche und weibliche Nachkommen von Dunkin Hartley Meerschweinchen erhielten zusätzlich zur Muttermilch vom 1. bzw. 2. Tag bis maximal zum 28. Tag 10 (n=34), 15 (n=34) bzw. 30 (n=40) mg Kupfer pro kg Körpergewicht und Tag als $\text{CuCl}_2 \times 2 \text{H}_2\text{O}$ in Formulamilch (Altromin, Lage). Die Dosierungen erfolgten in 3-4 Gaben an Werktagen und 2 Gaben täglich an Wochenenden. Vom Tag 28 an erhielten die Tiere das Metall über das Trinkwasser in Konzentrationen von 100, 150 bzw. 300 mg Kupfer pro Liter als $\text{CuCl}_2 \times 2 \text{H}_2\text{O}$, entsprechend einer geschätzten Tagesdosis von 10, 15 bzw. 30 mg pro kg Körpergewicht und Tag. Kontrolltiere (n=35) erhielten Formulamilch bzw. Trinkwasser ohne Kupferzusatz. Nach 3, 6, 10, 14, 21, 28 und 60 Tagen wurden jeweils 4-6

Tiere unter Äthernarkose getötet und Blut und Organe für klinisch-chemische, pathologische und biochemische Untersuchungen entnommen.

2.2 Aufarbeitung der Gewebe

Teile der Lebern wurden unter Eiskühlung in 4 Volumenteilen N₂-gesättigtem 10 mM Tris-HCl, 250 mM Sucrose, pH 7,4 (TS-Puffer) mit einem Potter-Elvehjem Homogenisator mit Teflonstempel bei 1.000 Upm homogenisiert. Zur Abtrennung der Zellkerne, Membranfragmente, Lysosomen und Mitochondrien wurde das Leberhomogenat für 20 Minuten bei 10.700 g_{max} (9.500 Upm, Sorvall SS-34 Rotor) zentrifugiert.

Zur Gewinnung der Zellkerne und Membranfragmente wurde das 10.700 g_{max}-Pellet je 3 mal in 20 ml TS-Puffer rehomogenisiert, anschließend für 10 Minuten bei 120 g_{max} zentrifugiert (1.000 Upm, Sorvall SS-34 Rotor) und schließlich in 10 ml TS-Puffer aufgenommen (Kern-Membran-Fraktion). Die Überstände aus den 3 Zentrifugationsschritten wurden vereint und bei 23.100 g_{max} (13.900 Upm, Sorvall SS-34 Rotor) für 10 Minuten zentrifugiert. Nach Abnahme des Überstandes wurde das Pellet 3 mal mit je 10 ml TS-Puffer durch Resuspendieren in TS-Puffer und Zentrifugieren (23.100 g_{max}) gewaschen und schließlich in 10 ml TS-Puffer aufgenommen (Lysosomen-Mitochondrien-Fraktion).

Für die Trennung von Lysosomen und Mitochondrien wurden 2 ml der Lysosomen-Mitochondrien-Fraktion auf einen Nycodenzgradienten folgender Zusammensetzung aufgetragen: 1 ml 40%, 1 ml 33%, 3 ml 28%, 2 ml 27%, und 2 ml 24% Nycodenz[®] in 10 mM Tris-HCl, pH 7,4. Nach 3-stündiger Zentrifugation bei 74.100 g_{max} (20.000 Upm, Sorvall AH-627 swing-out Rotor) wurde der Gradient in Anteilen zu je 1 ml fraktioniert, und die lysosomen- und mitochondrienspezifischen Fraktionen anhand der Markerenzyme, saure Phosphatase (AP) bzw. Succinatdehydrogenase (SDH), identifiziert.

2.3 Transmissionselektronenmikroskopie

Für die elektronenmikroskopischen Untersuchungen wurde die Proben in 1% Glutaraldehyd in PBS (50 mM Phosphate-Buffered Saline, pH 7,4) und anschließend in 2% Osmiumtetroxid in PBS fixiert. Nach Entwässerung mittels einer Alkoholreihe wurde die Proben in Epon eingebettet. Ultradünnschnitte (70-80 nm) wurden mit Bleicitrat und Uranacetat gefärbt und bei 60-80 kV im Elektronenmikroskop (EM-C10, Zeiss, Oberkochen) untersucht.

2.4 Immunhistochemischer Nachweis der Kupffer'schen Sternzellen

Der immunhistochemische Nachweis der Kupffer'schen Sternzellen erfolgt an Gefrierschnitten der Leber. Hierzu wurden Teile des Gewebes auf einen Messingblock aufgebracht und anschließend in $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ kaltem Isopentan tiefgefroren. Vor der Anfertigung der $8\text{ }\mu\text{m}$ dicken Schnitte wurden die Proben 2 Wochen lang bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ gehalten.

Der immunhistochemische Nachweis der Kupffer'schen Stenzellen erfolgte mittels einer modifizierten Methode von Hardonk et al. (17). Die Bestimmung der Zahl und Fläche der Kupffer'schen Sternzellen erfolgte mittels digitaler Bildanalyse (Optimas 6.2, Stemmer Imaging, Puchheim).

2.5 Röntgenelementaranalyse

Die kupferhaltigen Partikel aus der Fraktion 1 des Dichtegradienten wurden nach 3-maligem Waschen in TS-Puffer zuerst in 1% Glutaraldehyd in PBS und anschließend in 2% Osmiumtetroxid in PBS für jeweils 15 Minuten fixiert. Nach Entwässerung in einer aufsteigenden Alkoholreihe wurden die Proben über den kritischen Punkt getrocknet und $60\text{-}150\text{ nm}$ dicke Schnitte angefertigt. Die Schnitte wurden durch Kathodenzerstäubung (Emscope SC 500, Ashford, England) mit Platin beschichtet ($1\text{-}3\text{ nm}$) und in einem Feld-Rasterelektronenmikroskop (JSM-6300F, Jeol, Tokyo, Japan), ausgerüstet mit einem energiedispersiven Röntgenmikroanalysator (Link-Oxford eXI, Bucks, England) und einem lithiumgedrifteten Siliciumdetektor mit Berylliumfolie, untersucht. Die Beschleunigungsspannung der Primärelektronen betrug bis zu 20 kV .

2.6 Analytik von Metallen und Metallothionein

Die Bestimmung von Kupfer erfolgte entweder mit einem Graphitrohrfen-Atom-Absorptions-Spektrometer, ausgerüstet mit Zeeman Hintergrundkompensation (Modell 5000, Perkin-Elmer, Überlingen) oder einem Atom-Emissions-Spektrometer mit induktiv gekoppelter Plasmaanregung (Modell JY 38 P, Instruments SA, Neukeferloh). Die jeweiligen Proben ($0,3\text{ ml}$) wurden 24 Stunden mit $1,5\text{ ml}$ suprapurer, 65% -iger HNO_3 (Merck, Darmstadt) inkubiert und nach Zugabe von $1,2\text{ ml}$ entionisiertem Wasser analysiert.

Die Bestimmung der MT-Gehalte im Zytoplasma erfolgte mittels des Thiomolybdat- bzw. des Cd-Chelex-Tests (18, 19). In den Fraktionen des Dichtegradienten wurde der Gesamtgehalt an Metallothionein (MT) mit dem Thiomolybdat-Test (18) nach Solubilisierung quantifiziert. Hierzu wurden die Fraktionen des Dichtegradienten bei

Raumtemperatur für 18 Stunden mit 3,7 M Guanidiniumthiocyanat und 150 mM 2-Mercaptoethanol (2-ME) inkubiert.

2.7 GOT-Aktivität und Bilirubin

Die Aktivität der GOT und die Konzentration von Bilirubin im Serum wurden mit einem Reflotron-Reflexionsphotometer ermittelt (Boehringer Mannheim, Mannheim).

2.8 Proteinbestimmung

Die Proteingehalte wurden in Anlehnung an die Methode von Bradford (20) mit dem Bio-Rad Protein Test quantifiziert (Bio-Rad, München). Als Standard wurde Rinderserumalbumin eingesetzt.

2.9 Statistische Verfahren

Wenn nicht anders vermerkt, sind die dargestellten Messpunkte Mittelwerte und Standardabweichungen aus mindestens drei verschiedenen Proben. Für die Darstellung von 2 Messpunkten wurde in Graphiken der Mittelwert verwendet und in Tabellen der Bereich der Messwerte angegeben. Die Signifikanz des Vergleichs zweier Mittelwerte wurde mit dem Student t-Test berechnet, während die Signifikanz für den Vergleich der Eintrittswahrscheinlichkeit mit dem χ^2 -Test (Chiquadrat-Test) ermittelt wurde.

Die Ergebnisse der verstorbenen und moribunden Meerschweinchen wurden als Einzelwerte mit dem 2σ -Intervall der Kontrollwerte, in das 95% aller Beobachtungen fallen, verglichen. Als Kontrolltiere wurden 2 bis 3 Tage alte Meerschweinchen ($n = 5$) verwendet.

3. ERGEBNISSE UND DISKUSSION

3.1 LEC Ratten

3.1.1 Histologische und labordiagnostische Befunde

Bis zum Alter von 62 Tagen lagen bei den LEC Ratten die Serum-GOT-Aktivitäten und Serumbilirubinspiegel im Bereich der Kontrollwerte, und die Lebern waren durchwegs histologisch unauffällig (Tabelle 1). Erste Anzeichen einer Leberbeteiligung wurden bei den 77-Tage-alten Tieren beobachtet. Bei diesen Tieren war mit 867 ± 10 U/l die GOT-Aktivität im Serum im Mittel etwa 3,5-fach höher als bei den 62-Tage-alten Ratten. Teilweise wiesen diese Tiere auch erhöhte Serumbilirubinkonzentrationen auf (Tabelle 1). Das histologische Bild der Lebern war durch ein vermehrtes Auftreten von Einzelzellnekrosen und Anzeichen von Zelldegenerationen, wie hyaline Zytoplasmainschlüsse oder Vakuolen mit eosinophilem Inhalt gekennzeichnet. Unter den Regenerationsphänomenen dominierten große Leberzellkerne und die Proliferation von Gallengängen. Als Reaktion auf die Schädigungen zeigten sich Ansammlungen kleiner Gruppen von Mesenchymzellen, darunter auch Lymphozyten und gelegentlich Granulozyten (nicht gezeigt).

Die 86-Tage-alten LEC Ratten zeigten eine systemische Gelbsucht. Histologisch fielen vor allem Einzelzellnekrosen, vakuolisierte Zellen, Riesenkerne und hypertrophe Zellen, sowie eine deutliche Vermehrung von Mesenchymzellen auf. Insbesondere die Sinusoide waren angefüllt mit Makrophagen, die zum Teil gelblich pigmentiert und oftmals prall gefüllt waren mit Erythrozyten oder größeren kugeligen Restkörpern gleicher Färbung (nicht gezeigt).

Die ab dem Alter von 64 Tagen mit DPA behandelten Ratten blieben bis zum Beobachtungsende bei 107 Tagen ohne Symptome. Die Bilirubingehalte im Serum lagen bei diesen Tieren unterhalb der Meßgrenze von 0,5 mg/dl, und die Serum-GOT-Aktivitäten waren, wenngleich statistisch signifikant, im Mittel nur um den Faktor 1,7 höher als bei den 62-Tage-alten Tieren (Tabelle 1). Lichtmikroskopisch wurden zum Teil große Zellkerne und vereinzelt Einzelzellnekrosen, sowie bei etwa der Hälfte der Tiere geringe Mesenchymzellansammlungen beobachtet.

Bei den 84- und 93-Tage-alten und den ab dem Tag 77 mit DPA behandelten Ratten waren die Bilirubinspiegel im Serum normal, und auch die Serum-GOT-Aktivitäten erreichten wieder die Werte der Kontrolltiere (Tabelle 1). Das leberhistologische Bild dieser Tiere war ähnlich wie beim Behandlungsbeginn, jedoch mit deutlich weniger Einzelzellnekrosen und hyalinen Zytoplasmainschlüssen (nicht gezeigt).

Tabelle 1: Labordiagnostische Befunde und Leberpathologie von LEC Ratten

Tiergruppe	Alter (Tage) Bereich (Mittelwert \pm SD) ¹	GOT (U/l Serum) Bereich (Mittelwert \pm SD) ¹	Bilirubin (mg/dl Serum) Bereich (Mittelwert \pm SD) ²	Leber- pathologie
Wistar	55-62 (57 \pm 2)	190-311 (246 \pm 38)	<0.5-0.6	unauffällig
LEC, Alter 62 Tage	59-64 (62 \pm 2)	161-304 (244 \pm 48)	<0.5	unauffällig
LEC, Alter 77 Tage	77-79 (77 \pm 1)	510-1090 (867 \pm 210)	<0.5-3.6	auffällig
LEC, Alter 86 Tage	85-87 (86 \pm 1)	860-1605 (1409 \pm 283)	2.6-8.1 (6.1 \pm 2.6)	auffällig
LEC + DPA ab Tag 64, Alter 107 Tage	106-107 (107 \pm 1)	377-497 (430 \pm 60)	<0.5	auffällig
LEC + DPA ab Tag 77, Alter 84 Tage	84-85 (84 \pm 1)	261-281 (272 \pm 10)	<0.5	auffällig
LEC + DPA ab Tag 77, Alter 93 Tage	92-93 (93 \pm 1)	213-452 (305 \pm 104)	<0.5	auffällig

1) n = 3-11

2) n = 3-6

3.1.2 Elektronenmikroskopische Befunde

Bereits vor den lichtmikroskopischen Auffälligkeiten waren ultrastrukturelle Veränderungen in den Lebern erkennbar. So zeigten sich in den Leberzellen einer 73-Tage-alten, lichtmikroskopisch unauffälligen LEC Ratte mit normaler Serum-GOT-Aktivität und Serumbilirubinspiegel vermehrt lysosomale Profile. Zudem waren fokale Nekrosen erkennbar. Die Mitochondrien, der Kern und die Gallenkapillaren waren unauffällig (Abbildung 1). In einzelnen Zellen des retikuloendothelialen Systems fanden sich eine auffallend hohe phagozytotische Aktivität und zahlreiche elektronendichte Partikel (nicht gezeigt).

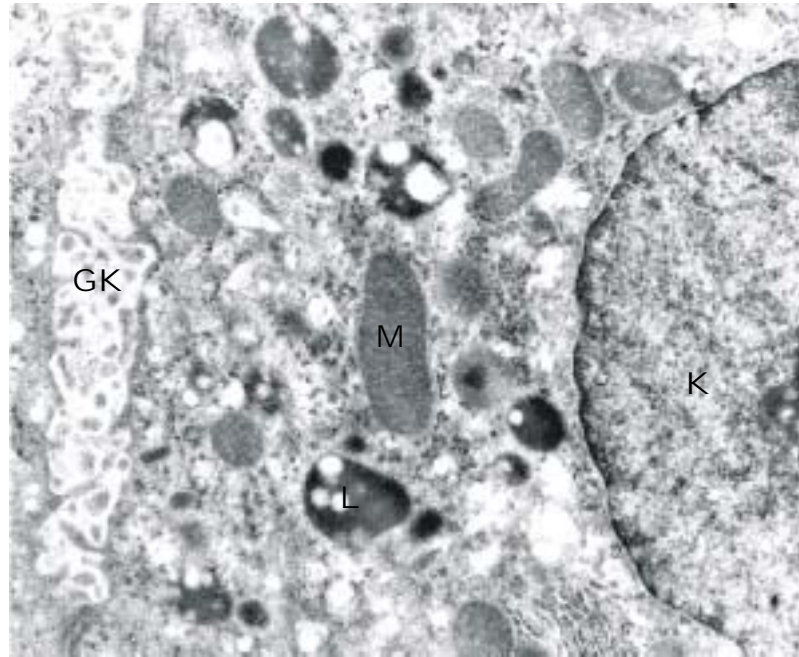


Abbildung 1: Feinstruktur eines Hepatozyten einer 73-Tage-alten LEC Ratte (27.000-fache Vergrößerung). GK=Gallekapillare; L=Lysosom; M=Mitochondrium; K=Kern.

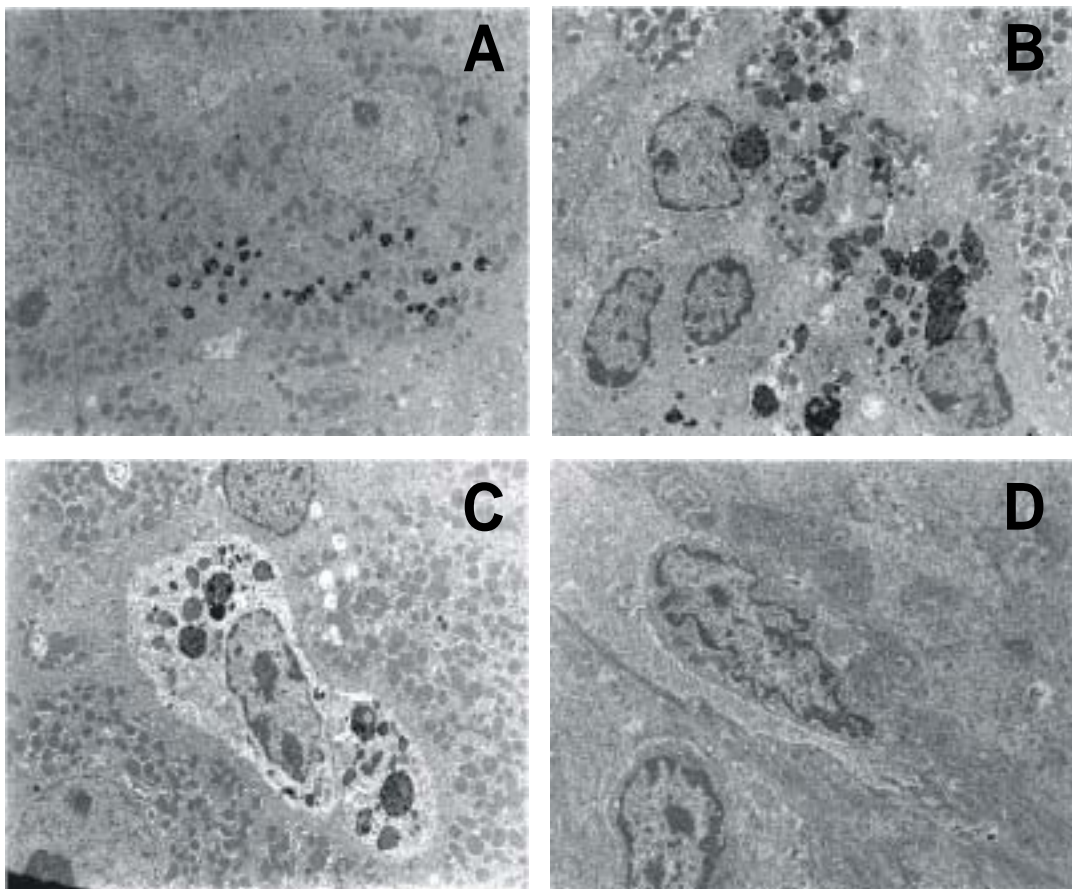


Abbildung 2: Feinstruktur der Leber einer 77-Tage-alten LEC Ratte mit beginnender Leberschädigung (Vergrößerungen: A, C: 2.650-fach; B: 7.420-fach; D: 5.000-fach).

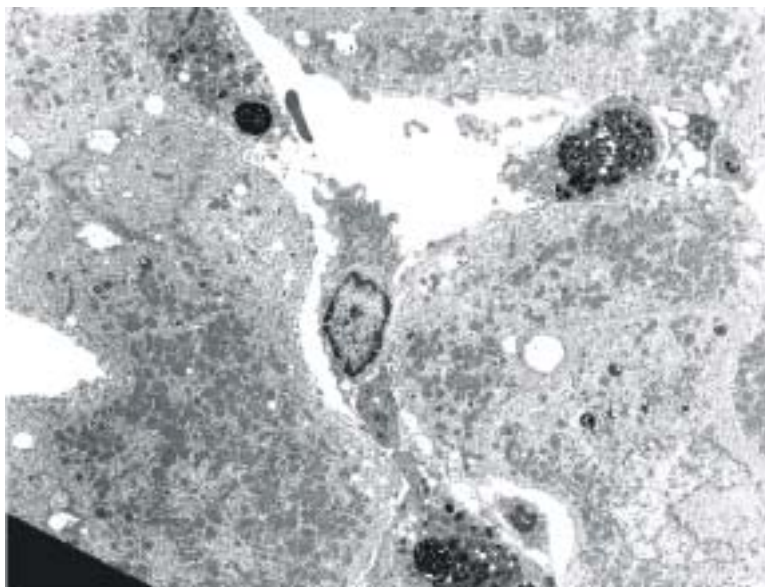


Abbildung 3: Feinstruktur der Leber einer 87-Tage-alten LEC Ratte mit Ikterus (1.670-fache Vergrößerung).

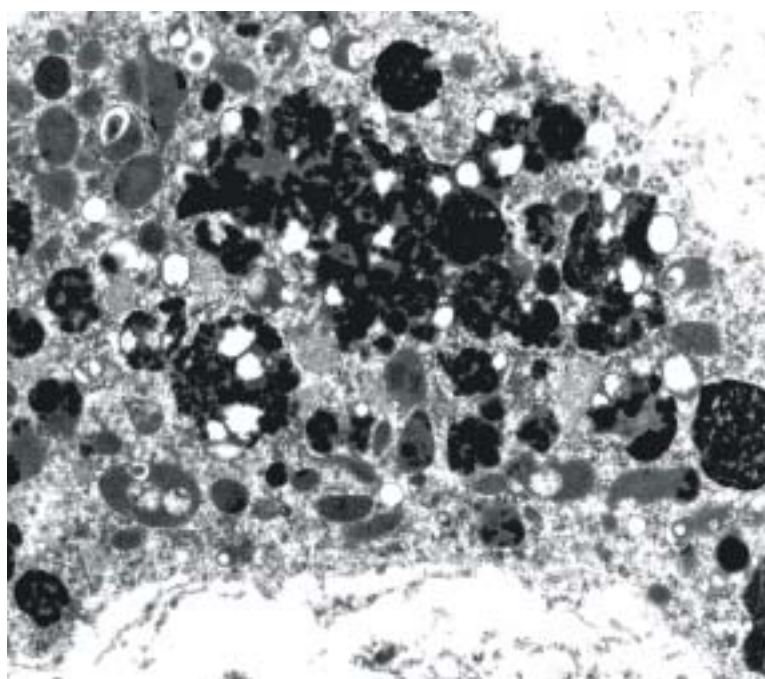


Abbildung 4: Feinstruktur einer Kupfer'schen Sternzelle aus der Leber einer LEC Ratte mit Ikterus (16.000-fache Vergrößerung).

Bei den 77-Tage-alten Tieren mit lichtmikroskopisch ersten Anzeichen einer Leberschädigung und bereits erhöhten Serum-GOT-Aktivitäten waren die ultrastrukturellen Veränderungen der Hepatozyten deutlicher. So waren die Cristae der Mitochondrien

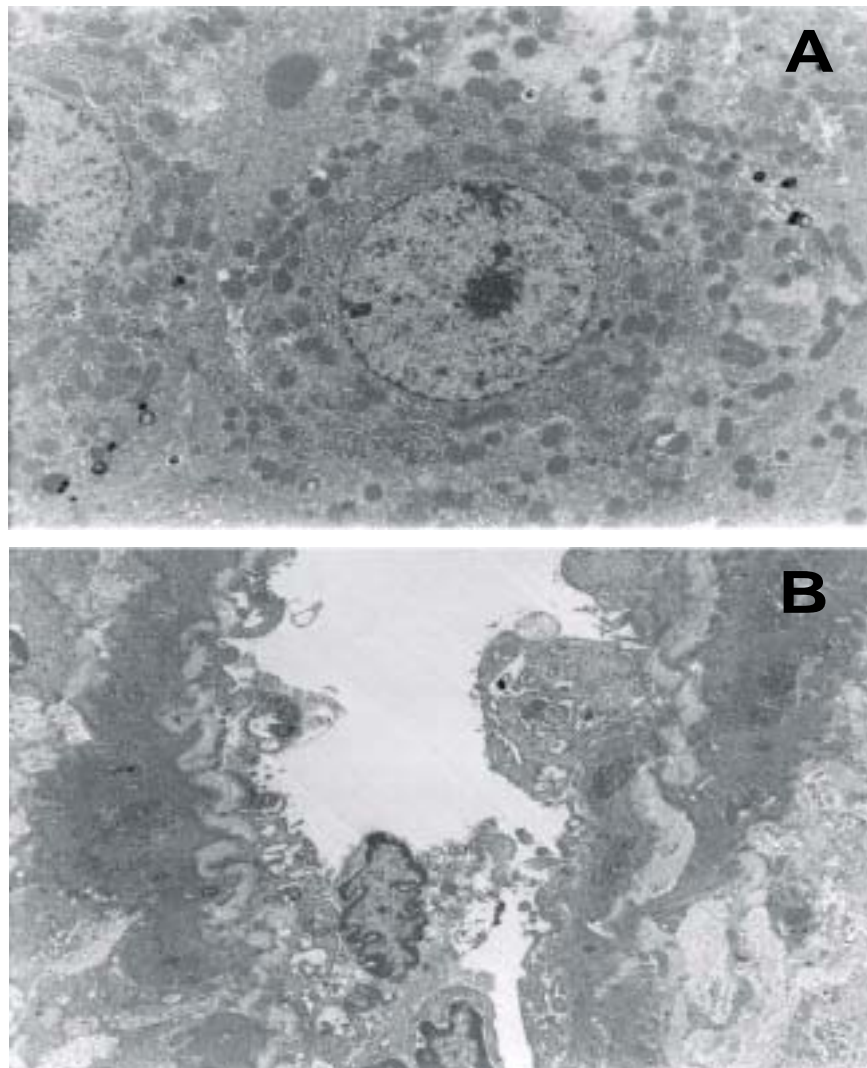


Abbildung 5: Feinstruktur der Leber einer ab dem Tag 77 mit D-Penicillamin behandelten LEC Ratte (Vergrößerung: A: 2.650-fach; B: 4.320-fach).

und das raue endoplasmatische Retikulum teilweise erweitert, und die Lysosomen enthielten dunkle, kontrastreiche Partikel (Abbildung 2 A, B). Elektronendichtes Material fand sich auch, wenngleich zu einem geringeren Anteil, in den Kupffer'schen Sternzellen (Abbildung 2 C, D).

Auch bei LEC Ratten mit systemischer Gelbsucht waren das raue endoplasmatische Retikulum und die mitochondrialen Christae der Hepatozyten auffallend dilatiert. Darüber hinaus war der perinukleäre Raum bei vielen Hepatozyten unregelmäßig erweitert, und insbesondere die Sinusuferezellen waren angefüllt mit lysosomalem, elektronendichten Material (Abbildung 3). Abbildung 4 zeigt den Anschnitt einer

Kupffer'schen Sternzelle mit massiver Speicherung von elektronendichten Partikeln in den Lysosomen.

Bei den ab Tag 77 mit DPA behandelten Ratten waren das rauhe endoplasmatische Retikulum sowie die Kerne und deren perinukleäre Membran normal. Auch die Mitochondrien waren gut erhalten und ohne auffällige Veränderungen an den Cristae. Die Lysosomen sowohl der Hepatozyten als auch der Kupffer'schen Sternzellen zeigten nur ganz vereinzelt elektronendichte Partikel (Abbildung 5).

3.1.3 Kupffer'sche Sternzellen bei der Entwicklung der fulminanten Hepatitis

Bei fortgeschrittener Hepatitis kam es in der Leber der LEC Ratten zu einer lichtmikroskopisch sichtbaren Ansammlung von Mesenchymzellen und einer in der Elektronenmikroskopie erkennbaren Speicherung elektronendichter Partikel in den Kupffer'schen Sternzellen. Mittels monoklonaler Antikörper gegen das ED2 Membranantigen wurden die Zahl und die Größe der Kupffer'schen Sternzellen bei den LEC Ratten bestimmt (Abbildung 6, Tabelle 2).

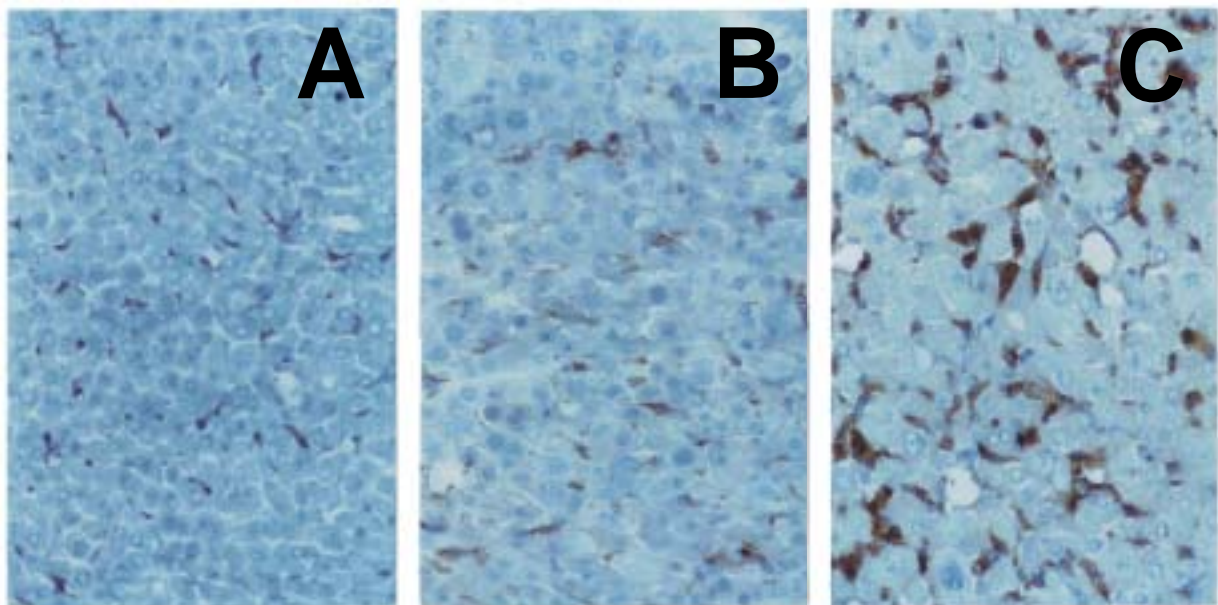


Abbildung 6: Kupffer'sche Sternzellen in der Leber von LEC Ratten (300-fache Vergrößerung).

- A: Fischer Kontrollratte
- B: LEC Ratte, beginnende Leberschädigung, Alter 74 Tage
- C: LEC Ratte, Ikterus, Alter 85 Tage

Tabelle 2: Zahl und Größe der Kupffer'schen Sternzellen von LEC Ratten

Tiergruppe	Zahl der ED2 positiven Zellen pro Meßfeld (0,165 mm ²) (Mittelwerte \pm S.D., n=10-20)	Durchschnittliche Fläche der ED2 positiven Zellen (μm^2) (Mittelwerte \pm S.D., n=10-20)
Fischer Kontrolle	169 \pm 39	21 \pm 4
LEC, Alter 74 Tage ^a	281 \pm 27 ^b	34 \pm 6 ^b
LEC, Ikterus	335 \pm 36 ^{b,c}	83 \pm 29 ^{b,c}

- a) Histologischer Leberbefund: Disseminiert hydropische Leberzelldegeneration; vereinzelt geringe mesenchymale Resorptionsherde; Leberzellmitosen.
- b) signifikant verschieden von der Fischer Kontrollratte ($p < 0,001$).
- c) signifikant verschieden von der 74-Tage-alten LEC Ratte ($p < 0,001$).

Bei der 74-Tage-alten LEC Ratte mit bereits histologischen Leberveränderungen aber normaler Serum-GOT-Aktivität und normalem Bilirubinwert war sowohl die Zahl als auch die Größe der ED2 positiven Zellen signifikant höher als in der Kontrolle (Tabelle 2). Tiere mit Ikterus zeigten im Mittel 70% bzw. 19% mehr Kupffer'sche Sternzellen pro Messfeld als die Kontrolle bzw. die 74-Tage-alte LEC Ratte. Mit 83 μm^2 war die durchschnittliche Fläche der ED2-positiven Zellen bei diesen Tieren im Mittel um den Faktor 4 größer als normal und mehr als doppelt so groß wie bei dem 74-Tage-alten Tier (Tabelle 2).

3.1.4 Alters- und krankheitsabhängige Akkumulation von Kupfer

Unmittelbar nach der Geburt war der Kupfergehalt in der Leber der LEC Ratten ähnlich dem der Wistar Kontrollratten, danach stieg er kontinuierlich an (Abbildung 7). Die normalerweise ab dem Alter von 5 Tagen stattfindende Abnahme der hepatischen Kupfergehalte aufgrund der Umstellung vom perinatalen zum adulten Kupferstoffwechsel wurde bei den LEC Ratten nicht beobachtet. Mit im Mittel 313 $\mu\text{g/g}$ FG wurden die höchsten Kupfergehalte in der Leber unmittelbar vor Auftreten der systemischen Gelbsucht beobachtet (Abbildung 7). Die Abnahme der Kupfergehalte danach dürfte auf die Freisetzung von Kupfer aus geschädigten Leberzellen zurückzuführen sein. Damit übereinstimmend, war die Kupferkonzentration im Plasma der Tiere mit Ikterus mit 2,02 \pm 0,64 $\mu\text{g/ml}$ (n=6) im Mittel um mehr als das 10-fache höher als bei den nicht erkrankten LEC Ratten (<0,20 μg Kupfer/ml Plasma, n=8) und um den Faktor 2,5 höher als bei den Kontrolltieren (nicht gezeigt).

In der Niere der LEC Ratten waren die Kupfergehalte bis zum Auftreten der Gelbsucht ähnlich denen der Kontrolltiere (Abbildung 7). Die hohen Kupfergehalte in der Niere bei den Tieren mit Ikterus müssen als Folge der Aufnahme von Kupfer aus dem Plasma interpretiert werden.

Wie aus der Abbildung 8 hervorgeht, ist die Zunahme des hepatischen Kupfergehaltes bei den Tieren mit beginnender Leberschädigung vor allem auf die Zunahme der Metallkonzentration in der partikulären Fraktion, welche die Zellorganellen und Membranfragmente enthält, zurückzuführen. Nach dem Auftreten der Gelbsucht blieb die Kupferkonzentration in der partikulären Fraktion unverändert und betrug $67 \pm 3\%$ des Gesamtkupfergehaltes. Die Behandlung mit DPA hatte durchwegs eine Abnahme der Organ-Kupferkonzentration zur Folge. Bei den ab Tag 64 mit DPA behandelten Ratten war jedoch die Mobilisierung von Kupfer, wenngleich signifikant, nur gering. Hingegen nahmen die hepatischen Kupfergehalte der ab Tag 77 mit DPA behandelten Tiere nach

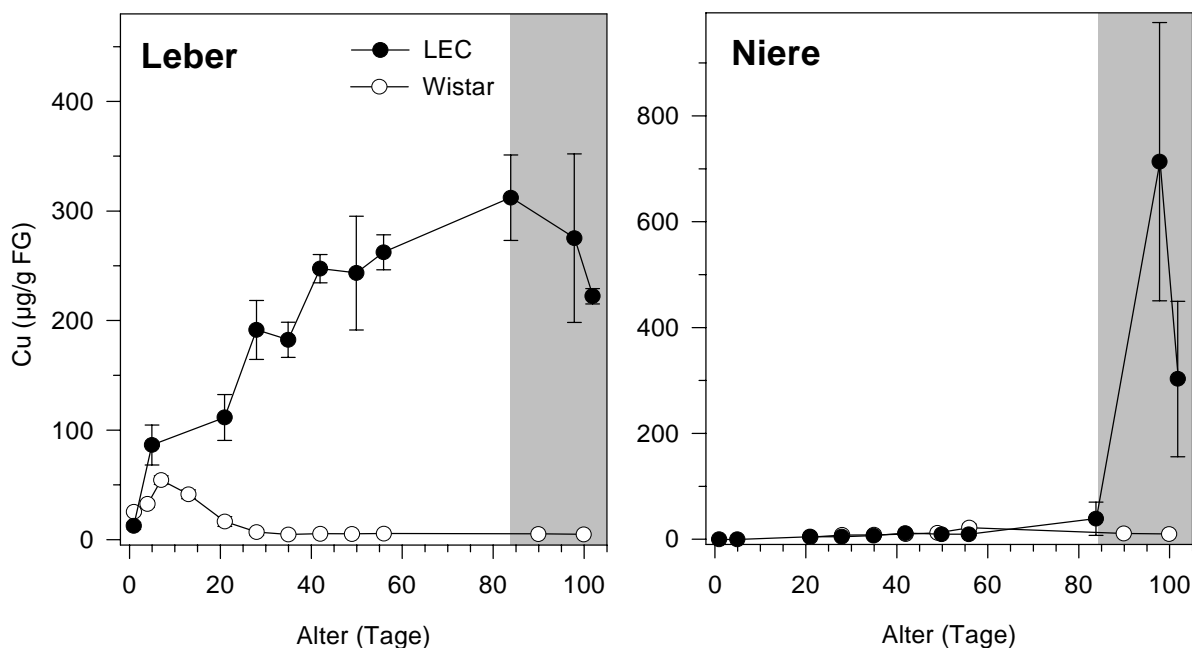


Abbildung 7: Altersabhängige Kupferakkumulation in Leber und Niere von LEC Ratten (Mittelwerte \pm SD, n=3-5). Der graue Bereich kennzeichnet das Alter der Tiere mit systemischer Gelbsucht.

nur einwöchiger Behandlung auf weniger als die Hälfte im Vergleich zum Zeitpunkt des Behandlungsbeginns ab und erreichten im Mittel sogar niedrigere Werte als die der LEC Ratten ohne Befund. Der Rückgang der Kupferkonzentrationen in der partikulären Frak-

tion während dieses Zeitraums war mit Faktor 3 noch deutlicher (Abbildung 8). Die Behandlung mit DPA über 9 zusätzliche Tage hatte keinen weiteren Effekt auf die Leberkupfergehalte der Tiere.

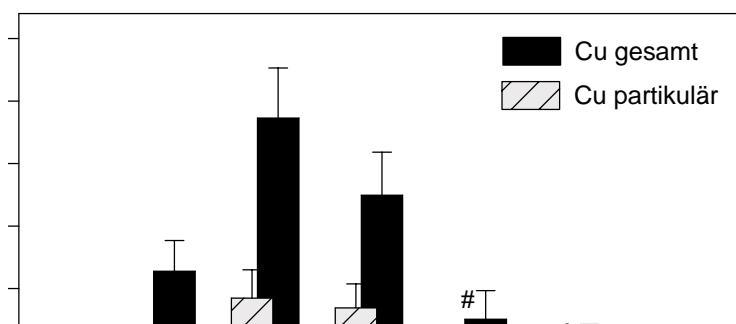


Abbildung 8: Kupfergehalte in der Leber von LEC Ratten mit und ohne Behandlung mit D-Penicillamin (DPA) (Mittelwerte \pm SD, n=3-11).

signifikant verschieden von den 62-Tage-alten LEC Ratten ($p < 0,05$).

* signifikant verschieden von den 77-Tage-alten LEC Ratten mit beginnender Leberschädigung ($p < 0,05$).

3.1.5 Lokalisation und Bindung von Kupfer in der Leber

Abhängig vom Schweregrad der Leberschädigung und der Behandlung mit DPA wurde die Lokalisation von Kupfer im Zytoplasma und den zellulären Organellen untersucht. Über die Charakterisierung der Kupferbindung wurde auf die Reaktivität des Metalls in den verschiedenen Kompartimenten geschlossen.

3.1.5.1 Zytoplasma

Das Zytoplasma scheint für eine Vielzahl der zu Akkumulation befähigten Metalle quantitativ ein wesentlicher Speicherort zu sein, und somit werden in vielen Geweben und

isolierten Zellen die Gehalte an diesen Metallen oftmals durch deren Konzentration im Zytoplasma bestimmt. Der Grund hierfür ist die Bindung der Metalle an spezifische Peptide und Proteine, die entweder basal in hoher Konzentration im Zytoplasma vorkommen oder, wie im Falle von MT, deren Synthese durch ein erhöhtes Angebot an Metallen stimuliert wird.

Mit etwa 145 µg/g Leberfeuchtgewicht wurden die höchsten zytoplasmatischen Kupfer-

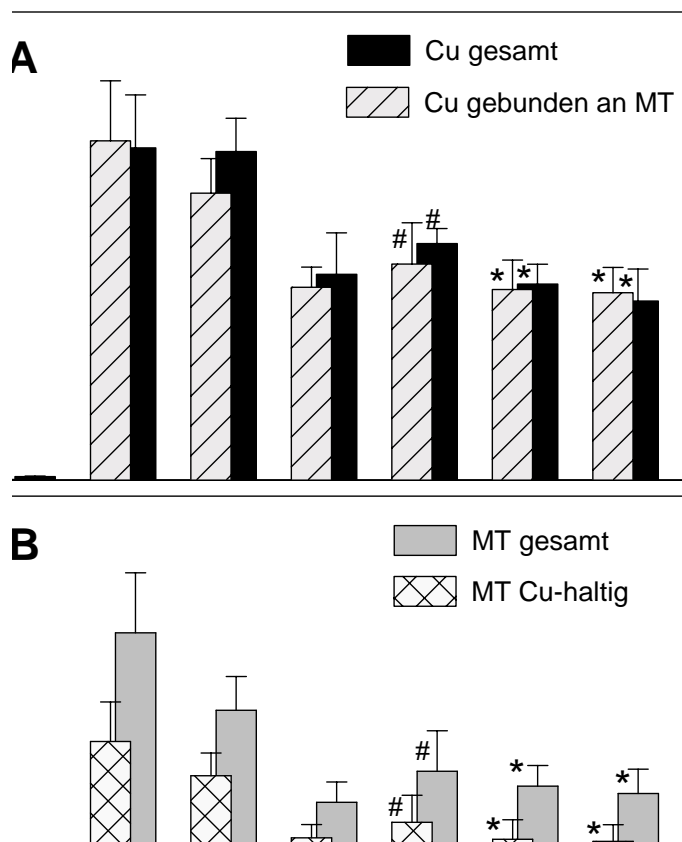


Abbildung 9: Kupfer (A) und Metallothionein (MT) (B) im Zytoplasma der Leber von LEC Ratten mit und ohne Behandlung mit D-Penicillamin (DPA) (Mittelwerte \pm SD, n=3-11).

signifikant verschieden von den 62-Tage-alten LEC Ratten ($p < 0,05$).

* signifikant verschieden von den 77-Tage-alten LEC Ratten mit beginnender Leberschädigung ($p < 0,05$).

gehalte vor dem Auftreten bzw. bei den ersten Anzeichen der Leberschädigung beobachtet (Abbildung 9 A). Der Anteil am Gesamtkupfergehalt der Leber (vgl. Abbildung 8) betrug damit im Mittel etwa 68% bei den 62-Tage-alten, gesunden LEC Ratten und lediglich 43% bei den 77-Tage-alten Tieren mit beginnender Leberschädigung.

Bei den Tieren mit Ikterus nahmen die zytosolischen Leber-Kupferkonzentrationen um etwa 40% gegenüber den Maximalwerten ab (Abbildung 9 A) und betrugen nur noch etwa 33% des Gesamtkupfergehaltes der Leber. Die Freisetzung von Kupfer aus geschädigten Leberzellen ist somit offensichtlich vor allem auf das Kupfer im Zytoplasma zurückzuführen. Die Behandlung mit DPA führte durchwegs zu einer Erniedrigung der zytoplasmatischen Kupfergehalte (Abbildung 9 A).

In Übereinstimmung mit unseren früheren Befunden, war MT der hauptsächliche Bindungspartner des zytosolischen Kupfer. Über die Konzentrationen von Kupfer und kupferhaltigem MT ergibt sich, dass das zytosolische Kupfer annähernd vollständig an MT gebunden ist, unabhängig von dem Schweregrad der Leberschädigung und der Behandlung mit DPA (Abbildung 9 A).

Mit $1.912 \pm 346 \mu\text{g/g}$ Leberfeuchtgewicht wurden die höchsten MT-Gehalte bei den 62-Tage-alten LEC Ratten ermittelt. LEC Ratten mit Ikterus wiesen mit $935 \pm 118 \mu\text{g/g}$ FG die niedrigsten MT-Gehalte auf (Abbildung 9 B). Die MT-Gehalte korrelierten gut mit den Kupfergehalten, unabhängig vom Grad der Leberschädigung oder der Behandlung mit DPA.

Der Anteil des kupferhaltigen MT war durchwegs höher als 60% und erreichte bei den Ratten mit Ikterus den Maximalwert von $78 \pm 6\%$ vom Gesamt-MT-Gehalt.

3.1.5.2 Lysosomen und Mitochondrien

Die Verteilung von Kupfer und MT in der Lysosomen-Mitochondrien-Fraktion der Leber von LEC Ratten nach der Trennung über den Dichtegradienten ist in Abbildung 10 dargestellt. Wie die Verteilungen der lysosomenspezifischen AP-Aktivitäten und der mitochondrienspezifischen SDH-Aktivitäten zeigen (Abbildung 10, eingeschobene Abbildung im oberen Teil), ist Kupfer und MT in den Fraktionen 7-9 nahezu ausschließlich lysosomalen Ursprungs, während die Fraktionen 3-5 überwiegend Kupfer und MT aus Mitochondrien beinhalten. Die Herkunft des Kupfer und MT in den Fraktionen 2 und 6 kann nicht eindeutig zugeordnet werden. Die Kupfer- und MT-Konzentrationen in Fraktion 10 sind auf zytosolische Verunreinigungen zurückzuführen.

Eine zunehmende Anreicherung von Kupfer in Mitochondrien wurde zwar mit dem Fortschreiten der Leberschädigung bis zum 10-fachen gegenüber der Kontrolle beobachtet, dennoch war die Konzentration an Kupfer in diesen Organellen vergleichsweise gering und erreichte bei den Tieren mit Ikterus Maximalwerte von $0,68 \pm 0,05 \mu\text{g}$ Kupfer/mg Protein (Abbildung 10).

Die höchsten Kupfer- und MT-Konzentrationen wurden in der Fraktion 1, die Fraktion mit der höchsten Dichte, gefunden. Bei den Tieren mit beginnender Leberschädigung betrug die Kupferkonzentration in dieser Fraktion im Mittel 6,72 $\mu\text{g}/\text{mg}$ Protein, bei den Tieren mit Ikterus sogar 24,9 $\mu\text{g}/\text{mg}$ Protein und lag damit etwa 600-fach über dem Wert der Wistar Ratten bzw. 250-fach über dem Wert der LEC Ratten ohne histopatho-

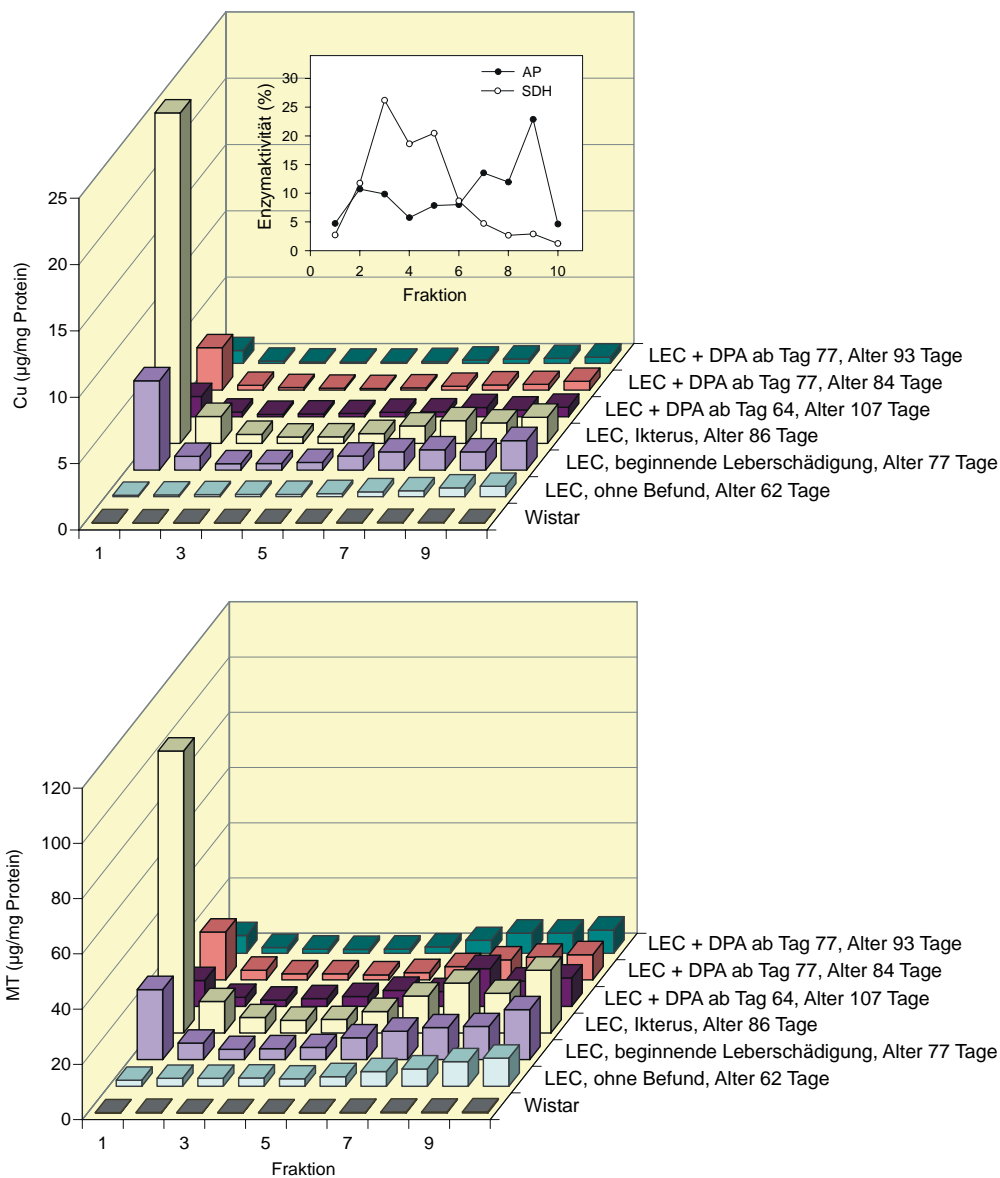


Abbildung 10: Kupfer (oberer Teil der Abbildung) und Metallothionein (MT) (unterer Teil der Abbildung) in den Dichtefractionen der über den Nycodenzgradienten getrennten Lysosomen-Mitochondrien-Fraktion (Mittelwerte, n=3-11). Die eingeschobene Abbildung im oberen Teil zeigt die typische Verteilung der Aktivitäten von saurer Phosphatase (AP) und Succinatdehydrogenase (SDH) in den Fraktionen (Mittelwerte, n=16).

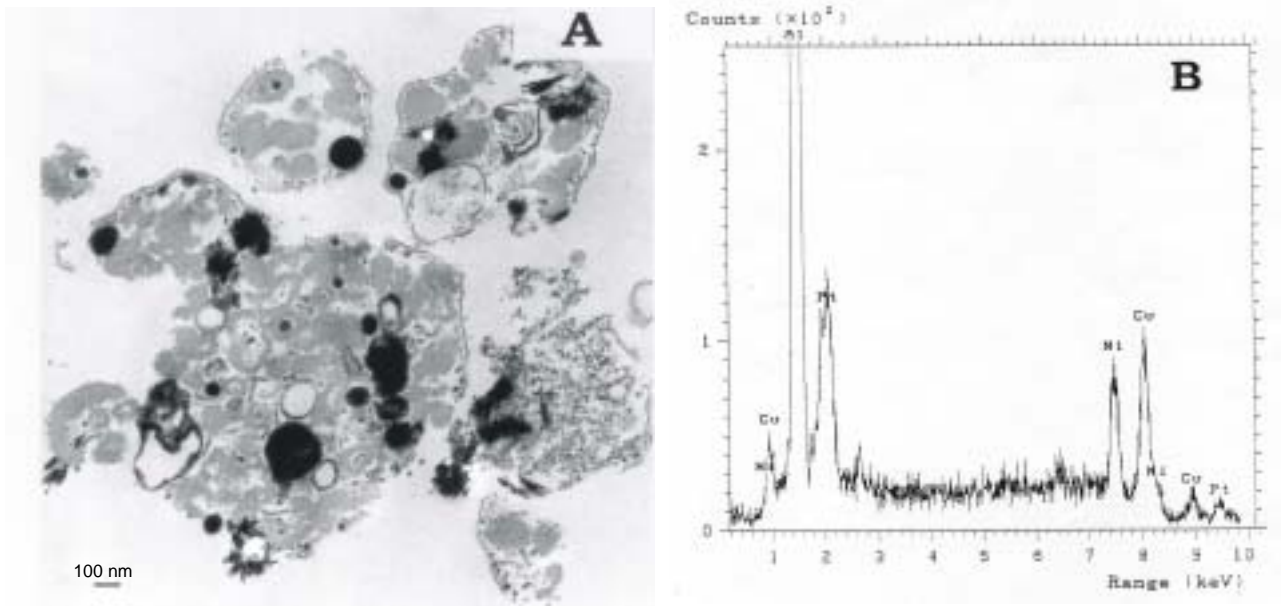


Abbildung 11: A) Transmissionselektronenmikroskopie der mittels Dichtegradientenzentrifugation isolierten Partikel hoher Dichte (Fraktion 1 des Nycodenzgradienten) aus der Leber einer LEC Ratte mit Ikterus (52.400-fache Vergrößerung). B) Energiedispersive Röntgenanalyse der elektronendichten Matrix der Partikel. Die Aluminium (Al)-, Nickel (Ni)- und Platin (Pt)-Peaks stammen vom Probenteller, dem Netzchen bzw. der Oberflächenbeschichtung.

logischen Befund (Abbildung 10). Diese Fraktion enthielt insbesondere bei den kranken Tieren große Anteile an bräunlich gefärbtem, partikulärem Material. Die Bestimmung des Metall-, Protein- und MT-Gehaltes in diesen Partikeln war nur nach vorheriger Solubilisierung des Materials mit Guanidiniumthiocyanat und 2-ME möglich. Die gute Korrelation zwischen den Kupfer- und MT-Gehalten in dieser Fraktion ist ein Hinweis dafür, dass MT an der Bindung des partikulären Kupfer beteiligt ist. Nach den elektronenmikroskopischen Aufnahmen ist das partikuläre Material der Fraktion 1 ebenfalls in Lysosomen lokalisiert, die Membran, welche die Organellen umgibt, ist deutlich erkennbar (Abbildung 11 A). Das elektronendichte Material in diesen Organellen wurde mit Hilfe der Röntgenelementaranalyse als kupferhaltig identifiziert (Abbildung 11 B). Unter Berücksichtigung unserer elektronenmikroskopischen Befunde (Kapitel 3.1.2) ist davon auszugehen, dass die kupferbeladenen Lysosomen in der Fraktion 1, insbesondere bei den Tieren mit Ikterus, zu einem ganz überwiegenden Anteil aus den Kupffer'schen Sternzellen stammen. Noch ist unklar, warum diese Fraktion keine lysosomenspezifische Enzymaktivität aufwies.

Die DPA-Behandlung der 62-Tage-alten LEC Ratten ohne Befund konnte die Bildung des partikulären Kupfer nicht vollständig verhindern, die Kupferkonzentration lag bei diesen Tieren mit durchschnittlich 1,52 µg/mg Protein nach 106 Tagen jedoch um den Faktor 4,5 unter derjenigen der Tiere mit beginnender Leberschädigung.

Bei Tieren mit beginnender Leberschädigung führte die Behandlung mit DPA bereits nach einer Woche zu einer Halbierung der Kupferkonzentration und einer 32%-igen Reduzierung der MT-Konzentration in der Fraktion 1. Nach 9 Tagen weiterer Behandlung mit DPA nahmen die Kupfer- und MT-Konzentrationen im Mittel bis auf 15% bzw. 25% der Werte bei Behandlungsbeginn ab (Abbildung 10).

Eine deutliche Anreicherung von Kupfer und MT wurde auch in den lysosomenspezifischen Fraktionen (Fraktion 9) des Dichtegradienten beobachtet (Abbildungen 10). Die MT-Konzentrationen korrelierten gut mit den Kupfergehalten, unabhängig von dem Grad der Leberschädigung und der Behandlung mit DPA. Kupfer und MT lagen zum Großteil in unlöslicher Form vor.

Bereits die 62-Tage-alten Ratten ohne Befund zeigten deutlich erhöhte Kupferkonzentrationen in den hepatischen Lysosomen. Tiere mit Ikterus wiesen mit 1.530 ± 364 ng/mg lysosomales Protein die höchsten Kupfergehalte auf (Abbildung 10). Der Anteil des löslichen Kupfer war bei diesen Tieren mit etwa 25% geringer als bei den 62-Tage-alten, gesunden Tieren (45% löslicher Kupferanteil) (nicht gezeigt).

Die Gesamt-MT-Gehalte in den Lysosomen zeigten keine Abhängigkeit vom Grad der Leberschädigung. So wurden bei den 62-Tage-alten Tieren mit im Mittel $14,3 \mu\text{g}/\text{mg}$ Protein nahezu identische MT-Gehalte beobachtet wie bei den Tieren mit Ikterus (Abbildung 10). Hingegen nahm der Anteil des löslichen MT von 35% bei den 62 Tage alten Tieren bis zu 19% bei den Tieren mit Gelbsucht kontinuierlich ab (nicht gezeigt). Die Behandlung der 62-Tage-alten Ratten mit DPA hatte keinen signifikanten Einfluss auf die Kupfer- und Gesamt-MT-Gehalte in den Lysosomen. Wurden hingegen Tiere mit beginnender Leberschädigung mit DPA behandelt, so nahmen der Gesamt-Kupfergehalt bereits nach einer Woche um zwei Drittel und der Gesamt-MT-Gehalt um ein Drittel ab (Abbildung 10).

3.1.5.3 Zellkerne und Mikrosomen

Die Kupfergehalte der Mikrosomen und der Kern-Membran-Fraktion aus der Leber der LEC Ratten sind in Tabelle 3 aufgeführt. Die mikrosomalen Kupferkonzentrationen waren, unabhängig von der Progression der Leberschädigung und der Behandlung mit DPA, durchwegs gering und betragen im Mittel maximal $3,3 \mu\text{g}/\text{g}$ FG, entsprechend einem Anteil von 1,7% des partikulären Kupfer. In der Kern-Membran-Fraktion waren die Kupfergehalte bei den leicht erkrankten Tieren und den Tieren mit Ikterus mit im Mittel $20,7$ bzw. $18,0 \mu\text{g}/\text{g}$ FG am höchsten. Während die DPA-Behandlung der 64-Tage-alten LEC Ratten keinen Einfluss auf die Kupferkonzentration hatte, war bei den ab Tag 77 mit DPA behandelten Tieren der Kupfergehalt nach einer Woche durchschnittlich um 59% und nach 16 Tagen um 76% gegenüber dem Ausgangswert signifikant verringert (Tabelle 3). Kupfer lag in der Kern-Membran-Fraktion ausschließlich in

unlöslicher Form vor. Nach Solubilisierung mit Guanidiniumthiocyanat und 2-ME war MT nachweisbar (nicht gezeigt).

Tabelle 3: Kupfer in Mikrosomen und der Kern-Membran-Fraktion der Leber von LEC Ratten

Tiere	Kupfer in Mikrosomen ¹ (prozentualer Anteil am partikulären Kupfer) ²	Kupfer in der Kern-Membran- Fraktion ¹ (prozentualer Anteil am partikulären Kupfer) ²
LEC, ohne Befund, Alter 62 Tage	0,3 ± 0,5 (0,4)	3,3 ± 0,1 (4,8)
LEC, beginnende Leberschädigung, Alter 77 Tage	3,3 ± 2,9 (1,7)	20,7 ± 5,6 (10,8)
LEC, Ikterus, Alter 86 Tage	1,0 ± 0,4 (0,5)	18,0 ± 2,9 (9,8)
LEC + DPA ab Tag 64, Alter 107 Tage	0,0 ± 0,0 (0)	3,3 ± 1,1 (4,5)
LEC + DPA ab Tag 77, Alter 84 Tage	0,3 ± 0,5 (0,4)	8,5 ± 0,8* (12,0)
LEC + DPA ab Tag 77, Alter 93 Tage	0,1 ± 0,2 (0,2)	5,0 ± 0,5* (8,9)

1 µg/g FG (Mittelwerte ± SD, n=3-6)

2 Mittelwerte

* signifikant verschieden von den 77 Tage alten LEC Ratten mit beginnender Leberschädigung (p<0,05)

3.1.6 Diskussion

Lokalisation von Kupfer in der Leber

Die bis zum Auftreten erster Anzeichen einer Leberschädigung kontinuierlich ansteigenden Kupferkonzentrationen in der Leber von LEC Ratten betraf die einzelnen zellulären Kompartimente in unterschiedlichem Ausmaß. In der präsymptomatischen Phase

nahmen die Kupfergehalte vor allem im Zytoplasma zu, während mit dem Fortschreiten der Hepatitis bis zur Entwicklung der systemischen Gelbsucht ein Anstieg der Kupfergehalte nur noch in den zellulären Organellen der Leber erfolgte.

Bindung von Kupfer in der Leber

Im Zytoplasma der Leber lag Kupfer überwiegend an MT gebunden vor. Die gute Korrelation der Kupfergehalte mit den MT-Gehalten weist auf eine MT-Induktion durch Kupfer hin, könnte aber auch bedeuten, dass infolge einer erhöhten kupferunabhängigen Expression des Proteins vermehrt Kupfer gebunden wird.

In Lysosomen ist die Bindung von Kupfer bislang nur unzureichend charakterisiert. Nach den vorliegenden Untersuchungen liegt nur ein geringer Anteil des lysosomalen MT als natives, ausschließlich kupferhaltiges Protein vor, der weitaus größte Teil ist ein unlösliches, kupferhaltiges Polymer. Unser Befund, wonach das Polymer nur nach vorhergehender Inkubation mit 2-ME solubilisiert werden konnte, ist ein indirekter Beweis dafür, dass die Bildung des Polymers oxidativ über die Bildung von MT Disulfidbrücken verläuft. Die besondere Oxidationsempfindlichkeit von kupferhaltigem MT wurde auch in vitro nachgewiesen, und die Bildung von Disulfidbrücken während der Oxidation mehrfach bestätigt (21, 22). Eine Folge der Oxidation der Thiolgruppen ist die im Vergleich zu nativem MT schwächere Bindung von Kupfer an das Protein und damit eine höhere Reaktivität des Metalls.

Polymere aus kupferhaltigem MT fanden sich auch in den Kupffer'schen Sternzellen erkrankter LEC Ratten. Wenngleich eine Synthese von MT in diesen Zellen prinzipiell möglich ist (23), spricht das Auftreten von MT erst während des fulminanten Verlaufs der Hepatitis, also in einer späten Phase der Kupfer-Akkumulation, gegen eine solche MT-Neusynthese. Die Akkumulation der MT-Polymere in den Kupffer'schen Sternzellen lässt sich vielmehr, und im Einklang mit der Funktion dieser Zellen, als die Folge der Phagozytose von kupferhaltigen lysosomalen Partikeln aus nekrotischen oder apoptotischen Parenchymzellen verstehen.

Zur Hepatotoxizität von Kupfer

Vor dem Hintergrund der ausgeprägten intra- und interzellulären Umverteilung von Kupfer im Verlauf der kupfervermittelten Leberschädigung und der unterschiedlichen Bindung des Metalls in den verschiedenen Kompartimenten besitzt die Frage, welche Bindungsform von Kupfer toxisch ist und auf welchem subzellulären Niveau der Schaden initial und irreversibel auftritt, eine besondere Bedeutung.

Einige Autoren vertreten die Auffassung, dass die Toxizität von Kupfer allein durch das überschüssige Metall im Zytoplasma hervorgerufen wird (24, 25), bzw., dass reaktives Kupfer aus kupferhaltigem MT im Zytoplasma freigesetzt wird, kupferhaltiges MT also prooxidativ wirkt (26, 27). Dies stützt sich vor allem auf Beobachtungen aus in vitro Ex-

perimenten, nach denen in Gegenwart von kupferhaltigem MT und hohen Konzentrationen von Wasserstoffperoxid zweiwertiges Kupfer entsteht und Hydroxylradikale gebildet werden (27). Wenngleich Wasserstoffperoxid intermediär auch in vivo entstehen kann, dürften die Konzentrationen jedoch nicht ausreichen, um die Thiolgruppen in MT in vivo zu oxidieren. Außerdem sind die Kupfer-Thiolat-Cluster vergleichsweise stabil gegenüber der Oxidation durch Superoxid und Hydroxylradikale (28, 29). Darüber hinaus wären bei einer prooxidativen Wirkung von kupferhaltigem MT oxidative Schäden immer dann zu erwarten, wenn die Synthese des Proteins aufgrund eines erhöhten Angebots an Kupfer induziert und das Metall vermehrt MT-gebunden vorliegt. Nach zahlreichen in vitro Befunden und tierexperimentellen Untersuchungen ist dies jedoch nicht zutreffend, im Gegenteil, die Bindung von Kupfer an MT erhöht die zelluläre Toleranz gegenüber dem Metall (30, 31). Kupfer im Zytoplasma kann demnach nur dann toxisch wirken, wenn sich seine Reaktivität entweder vor der MT-Induktion auswirkt oder seine Konzentration so hoch wird, dass die Synthesekapazität für MT nicht mehr ausreicht. Gegen erstere Annahme spricht die Beobachtung, dass die höchsten zytoplasmatischen Kupfer- und MT-Gehalte und damit die mutmaßlich höchste MT-Syntheserate bei den Tieren gefunden wurden, die noch keine Anzeichen einer Leberschädigung aufwiesen. Außerdem geht nach Befunden an Hepatoma Zelllinien eine erhöhte MT-Genexpression durch Kupfer mit einer Resistenz gegenüber dem Metall einher (32). Auch spricht die gute Korrelation zwischen den Kupfer- und MT-Gehalten, selbst bei den beobachteten Spitzenkonzentrationen an Kupfer, gegen eine Limitierung der Synthese von MT. Damit erscheint es naheliegend, dass die Hepatotoxizität bei der LEC Ratte nicht durch das Kupfer im Zytoplasma initiiert wird.

Aufgrund der beobachteten Akkumulation von Kupfer in Mitochondrien und Zellkernen der Lebern von Patienten mit verschiedenen Kupferspeicherkrankheiten, darunter auch Säuglingen mit frühkindlicher Leberzirrhose wurde vermutet, dass die Toxizität des Metalls von diesen Organellen ausgeht (33-35). Allerdings wurden in diesen Untersuchungen Zellfraktionen verwendet, deren Reinheit zumeist nicht geprüft wurde. Die wenigen Untersuchungen, in denen die Zellfraktionen auf spezifische Markerenzyme oder elektronenmikroskopisch charakterisiert wurden, haben ergeben, dass die Mitochondrien und Zellkerne enthaltenden Fraktionen durchwegs mit schweren, kupferbeladenen Lysosomen und elektronendichten Partikeln verunreinigt waren (36, 37). Auch nach unseren Untersuchungen wiesen Tiere mit lichtmikroskopisch auffälligem Leberbefund erhöhte Kupfergehalte in den, durch Dichtezentrifugation gewonnenen Mitochondrien und Kern-Membran-Fractionen auf, die auf Verunreinigungen durch lysosomales Kupfer zurückgeführt werden konnten. In der Kern-Membran-Fraktion lag das Metall ausschließlich in unlöslicher Form vor und zeigte die gleichen Eigenschaften wie das polymergebundene Kupfer, das mit Hilfe des Dichtegradienten aus den Kupffer'schen Sternzellen isoliert wurde. Offensichtlich ist die Sedimentation von

kupferhaltigen Partikeln hoher Dichte zusammen mit Zellkernen und Membranfragmenten die eigentliche Ursache für die beschriebenen erhöhten Kupfergehalte in den Kernen, gerade im fortgeschrittenen Stadium der Lebererkrankung.

Die Bedeutung der Lysosomen bei der Speicherung von Kupfer und für den Verlauf der chronischen Kupfertoxizität ist Gegenstand zahlreicher, zum Teil kontrovers geführter Diskussionen. Während vor allem in älteren Arbeiten die Sequestrierung von Kupfer in Lysosomen als ein Mechanismus zur Entgiftung des Metalls verstanden wurde (38-40), gibt es neuerdings immer mehr Anhaltspunkte dafür, dass dem in den Lysosomen akkumulierten Kupfer eine wesentliche Rolle bei der Toxizität des Metalls zukommt. Lysosomenschädigungen im Zusammenhang mit einer abnormaler Kupferakkumulation wurden in einigen in vivo Studien und in vitro Experimenten beschrieben. So wiesen die mit Kupfer angereicherten Lysosomen der Hepatozyten von LEC Ratten und normalen Ratten, die über die Nahrung oder das Trinkwasser mit Kupfer belastet wurden, neben einem vergrößerten Volumen auch erhebliche ultrastrukturelle Veränderungen und einen erhöhten pH-Wert auf (41-44). Die vorherrschenden Merkmale der gestörten strukturellen Integrität der Organellen waren oxidative Membranschäden, eine veränderte Membran-Lipid-Zusammensetzung, sowie verminderte Fluidität und erhöhte Fragilität der Membranen. Auch unsere Untersuchungen lassen vermuten dass die Kupferhepatotoxizität von den Lysosomen ausgeht. Einerseits liegt das Metall dort aufgrund seiner lockeren Assoziation an Polymere von MT in einer vergleichsweise reaktiven Form vor, andererseits ist die Gesundung der Tiere durch die DPA Behandlung vor allem von einer Mobilisierung des Kupfers in den Lysosomen begleitet.

Zur Rolle der Kupffer'schen Sternzellen

Noch gänzlich ungeklärt in seiner Bedeutung für die kupferinduzierte Leberschädigung ist die Akkumulation des Metalls in den Kupffer'schen Sternzellen. Zum einen kann angenommen werden, dass die kupferhaltigen Polymere aus MT auch in diesen Zellen ein beträchtliches toxisches Potential besitzen. Zum anderen kann die Phagozytose nekrotischer oder apoptotischer Parenchymzellen durch Kupffer'sche Sternzellen diese Zellen stimulieren, so dass vermehrt reaktive zytotoxische Sauerstoffspezies und Mediatoren, wie TNF- α und Interleukine freigesetzt werden. Solche Mediatoren fördern die Einwanderung und die Aktivierung von Neutrophilen, die ihrerseits Sauerstoffradikale und toxische Mediatoren freisetzen können, wodurch der oxidative Stress weiter erhöht, und Entzündungsreaktionen verstärkt werden.

3.2 Meerschweinchen

Insgesamt wurden 140 Tiere in die Studie einbezogen. Während der Versuchsdauer verstarben 17 Tiere, davon 3 Tiere der Kontrollgruppe. Außerdem erkrankten 2 Tiere der höchsten Dosisgruppe bereits innerhalb von 2 Tagen. Bei 11 der verstorbenen kupferdosierten Tieren bestand kein Zusammenhang zwischen der Todesursache und der Kupferexposition, die überwiegende Zahl dieser Tiere verstarb an einem akuten schockbedingten Lungenemphysem nach dem Tränken. Bei 3 verstorbenen Tieren, alle aus der höchsten Dosisgruppe, und den beiden erkrankten Tieren ist nach den pathologischen und biochemischen Befunden ein Zusammenhang zwischen Tod bzw. Erkrankung und der Kupferexposition als wahrscheinlich anzunehmen.

Im folgenden werden die Ergebnisse für die nicht-verstorbenen bzw. nicht erkrankten Tiere und die 5 verstorbenen bzw. erkrankten Tiere getrennt dargestellt und diskutiert.

3.2.1 Nicht verstorbene bzw. nicht erkrankte Tiere

Die Gewichtsentwicklung der Meerschweinchen in den verschiedenen Dosisgruppen ist in der Tabelle 4 zusammengefasst. Lediglich in der dritten Woche wurden in der 10 mg und der 30 mg Gruppe statistisch signifikante, verminderte Körpergewichtszunahmen festgestellt. Da der Effekt nur in diesem Zeitraum auftrat, somit reversibel zu sein scheint und außerdem nicht dosisabhängig war, ist er nicht als Parameter für systemische Toxizität anzusehen.

Die absoluten und relativen Organgewichte sind in den Tabellen 5-13 zusammengestellt. Die Gehirngewichte (Tabelle 5) der kupferexponierten Meerschweinchen entsprachen mit zwei Ausnahmen denen der Kontrolltiere und wurden deshalb zur Ermittlung der relativen Gewichte der anderen Organe herangezogen.

Die absoluten und relativen Lebergewichte waren in der höchsten Dosisgruppe am Tag 3, 10 und 28 und in der 15 mg Gruppe am Tag 10 erniedrigt (Tabelle 6 und 7). Höhere absolute und relative Lebergewichte wurden hingegen in der höchsten Dosisgruppe am Tag 14 festgestellt. Das Auftreten dieser Veränderungen vor allem in der höchsten, nie aber in der niedrigsten Dosisgruppe, legt den Schluss nahe, dass sie in Zusammenhang mit der Kupferexposition stehen. Da jedoch die Effekte zum einen gegenläufig waren, zum anderen nur zu den genannten Zeitpunkten beobachtet wurden, somit selbst bei kontinuierlicher Exposition reversibel zu sein scheinen, sind sie nicht als bewertungsrelevant anzusehen. Gleiches gilt für die Veränderungen der absoluten und relativen Gewichte der Nieren (Tabelle 8 und 9), der Milz (Tabelle 10 und 11) und des Thymus (Tabelle 12 und 13), die lediglich in einigen Versuchsgruppen beobachtet wurden.

Tabelle 4: Gewichtszunahme kupferexponierter Meerschweinchen (g)
(Mittelwerte \pm SD)

Woche	Dosis (mg Kupfer/kg Körpergewicht/Tag)			
	0	10	15	30
1 ^a	33,9 \pm 6,6 (n=22)	34,2 \pm 15,8 (n=19)	38,8 \pm 12,6 (n=22)	33,0 \pm 16,8 (n= 24)
2 ^a	67,1 \pm 12,8 (n=15)	66,2 \pm 9,8 (n=17)	73,2 \pm 8,4 (n=17)	65,4 \pm 13,7 (n=16)
3 ^a	80,8 \pm 11,4 (n=11)	65,8 \pm 6,9 (n=13)*	80,9 \pm 10,3 (n=13)	66,5 \pm 11,8 (n=12)*
4 ^a	69,7 \pm 12,6 (n=6)	59,2 \pm 14,3 (n=9)	75,1 \pm 16,5 (n=9)	72,3 \pm 17,7 (n=8)
9 ^b	212,5 \pm 84,1 (n=2)	201,2 \pm 68,9 (n=5)	242,3 \pm 16,9 (n=4)	136,3 \pm 47,9 (n=4)

^a Wöchentliche Gewichtszunahme

^b Gewichtszunahme zwischen Woche 4 und Woche 9

* signifikant verschieden von den Tieren gleichen Alters ohne Kupferexposition ($p < 0,01$)

Tabelle 5: Absolute Gehirngewichte kupferexponierter Meerschweinchen¹

Dosis ²	Alter (Tage)						
	3	6	10	14	21	28	60
0	2,70 \pm 0,02	2,68 \pm 0,14	3,05 \pm 0,10	3,22 \pm 0,25	3,44 \pm 0,08	3,31 \pm 0,19	4,06 \pm 0,07
10	2,95 \pm 0,05**	2,78 \pm 0,18	3,03 \pm 0,24	3,19 \pm 0,17	3,48 \pm 0,15	3,49 \pm 0,24	3,80 \pm 0,31
15	2,69 \pm 0,18	3,04 \pm 0,18*	3,00 \pm 0,14	3,10 \pm 0,14	3,55 \pm 0,07	3,58 \pm 0,25	3,98 \pm 0,29
30	2,77 \pm 0,14	2,88 \pm 0,19	2,86 \pm 0,21	3,37 \pm 0,33	3,27 \pm 0,33	3,60 \pm 0,10*	3,96 \pm 0,22

¹ Angaben in g, Mittelwerte \pm SD, n=4-6

² (mg Kupfer/kg Körpergewicht/Tag)

* signifikant verschieden von den Tieren gleichen Alters ohne Kupferexposition ($p < 0,05$)

** signifikant verschieden von den Tieren gleichen Alters ohne Kupferexposition ($p < 0,01$)

Tabelle 6: Absolute Lebergewichte kupferexponierter Meerschweinchen¹

Dosis ²	Alter (Tage)						
	3	6	10	14	21	28	60
0	5,61 ± 1,00	4,75 ± 0,77	6,73 ± 0,78	6,26 ± 2,12	11,64 ± 1,69	15,18 ± 3,28	24,87 ± 13,06
10	5,46 ± 0,86	5,38 ± 0,75	6,61 ± 0,49	7,26 ± 1,75	11,33 ± 1,71	13,72 ± 3,07	20,04 ± 3,26
15	4,39 ± 0,58	4,91 ± 0,28	3,94 ± 0,85**	8,59 ± 0,92	13,78 ± 1,62	13,72 ± 4,12	24,58 ± 3,23
30	3,78 ± 0,58**	4,31 ± 0,59	4,20 ± 0,65**	9,37 ± 0,91*	9,45 ± 2,67	10,84 ± 1,03*	16,81 ± 4,40

¹ Angaben in g, Mittelwerte ± SD, n=4-6

² (mg Kupfer/kg Körpergewicht/Tag)

* signifikant verschieden von den Tieren gleichen Alters ohne Kupferexposition (p < 0,05)

** signifikant verschieden von den Tieren gleichen Alters ohne Kupferexposition (p < 0,01)

Tabelle 7: Relative Lebergewichte kupferexponierter Meerschweinchen¹

Dosis ²	Alter (Tage)						
	3	6	10	14	21	28	60
0	2,08 ± 0,39	1,77 ± 0,19	2,20 ± 0,21	1,92 ± 0,54	3,38 ± 0,46	4,55 ± 0,76	6,10 ± 3,11
10	1,85 ± 0,28	1,95 ± 0,38	2,18 ± 0,15	2,28 ± 0,56	3,24 ± 0,37	3,92 ± 0,72	5,26 ± 0,61
15	1,63 ± 0,12	1,61 ± 0,07	1,31 ± 0,26**	2,78 ± 0,39*	3,88 ± 0,41	3,79 ± 0,87	6,23 ± 1,13
30	1,36 ± 0,21**	1,50 ± 0,24	1,46 ± 0,13**	2,78 ± 0,05*	2,85 ± 0,58	3,02 ± 0,32*	4,25 ± 1,14

¹ Angaben in g, Mittelwerte ± SD, n=4-6

² (mg Kupfer/kg Körpergewicht/Tag)

* signifikant verschieden von den Tieren gleichen Alters ohne Kupferexposition (p < 0,05)

** signifikant verschieden von den Tieren gleichen Alters ohne Kupferexposition (p < 0,01)

Tabelle 8: Absolute Nierengewichte kupferexponierter Meerschweinchen¹

Dosis ²	Alter (Tage)						
	3	6	10	14	21	28	60
0	1,20 ± 0,14	1,25 ± 0,14	1,77 ± 0,19	1,89 ± 0,45	2,89 ± 0,34	3,16 ± 0,17	4,00 ± 0,98
10	1,14 ± 0,06	1,41 ± 0,15	1,58 ± 0,19	1,70 ± 0,39	2,56 ± 0,21	3,08 ± 0,47	4,25 ± 0,45
15	1,10 ± 0,16	1,32 ± 0,13	1,56 ± 0,18	2,19 ± 0,24	3,17 ± 0,22	3,32 ± 0,54	4,87 ± 0,59
30	1,04 ± 0,07*	1,23 ± 0,08	1,26 ± 0,16**	2,25 ± 0,28	2,41 ± 0,49	3,25 ± 0,13	4,05 ± 0,62

¹ Angaben in g, Mittelwerte ± SD, n=4-6

² (mg Kupfer/kg Körpergewicht/Tag)

* signifikant verschieden von den Tieren gleichen Alters ohne Kupferexposition (p < 0,05)

** signifikant verschieden von den Tieren gleichen Alters ohne Kupferexposition (p < 0,01)

Tabelle 9: Relative Nierengewichte kupferexponierter Meerschweinchen¹

Dosis ²	Alter (Tage)						
	3	6	10	14	21	28	60
0	0,44 ± 0,05	0,47 ± 0,03	0,58 ± 0,05	0,58 ± 0,10	0,84 ± 0,09	0,95 ± 0,06	0,98 ± 0,22
10	0,39 ± 0,02	0,51 ± 0,06	0,52 ± 0,05	0,53 ± 0,12	0,73 ± 0,04	0,88 ± 0,13	1,12 ± 0,10
15	0,41 ± 0,03	0,43 ± 0,04	0,52 ± 0,05	0,71 ± 0,10	0,89 ± 0,05	0,92 ± 0,09	1,23 ± 0,21
30	0,38 ± 0,04*	0,43 ± 0,02*	0,44 ± 0,02**	0,67 ± 0,05	0,73 ± 0,09	0,91 ± 0,04	1,03 ± 0,18

¹ Angaben in g, Mittelwerte ± SD, n=4-6

² (mg Kupfer/kg Körpergewicht/Tag)

* signifikant verschieden von den Tieren gleichen Alters ohne Kupferexposition (p < 0,05)

** signifikant verschieden von den Tieren gleichen Alters ohne Kupferexposition (p < 0,01)

Tabelle 10: Absolute Milzgewichte kupferexponierter Meerschweinchen¹

Dosis ²	Alter (Tage)						
	3	6	10	14	21	28	60
0	0,21 ± 0,04	0,24 ± 0,01	0,36 ± 0,07	0,51 ± 0,23	0,73 ± 0,12	0,86 ± 0,18	0,73 ± 0,06
10	0,18 ± 0,06	0,22 ± 0,03	0,27 ± 0,07	0,54 ± 0,25	0,78 ± 0,22	0,61 ± 0,08*	0,70 ± 0,07
15	0,15 ± 0,02	0,21 ± 0,03	0,21 ± 0,03**	0,76 ± 0,10	0,78 ± 0,05	0,68 ± 0,12	0,84 ± 0,26
30	0,15 ± 0,02*	0,17 ± 0,03**	0,19 ± 0,02**	0,68 ± 0,12	0,36 ± 0,14**	0,65 ± 0,17	0,59 ± 0,07

¹ Angaben in g, Mittelwerte ± SD, n=4-6

² (mg Kupfer/kg Körpergewicht/Tag)

* signifikant verschieden von den Tieren gleichen Alters ohne Kupferexposition (p < 0,05)

** signifikant verschieden von den Tieren gleichen Alters ohne Kupferexposition (p < 0,01)

Tabelle 11: Relative Milzgewichte kupferexponierter Meerschweinchen¹

Dosis ²	Alter (Tage)						
	3	6	10	14	21	28	60
0	0,08 ± 0,02	0,09 ± 0,01	0,12 ± 0,02	0,16 ± 0,06	0,21 ± 0,03	0,26 ± 0,05	0,18 ± 0,02
10	0,06 ± 0,02	0,08 ± 0,02	0,09 ± 0,02	0,17 ± 0,08	0,22 ± 0,06	0,17 ± 0,02*	0,19 ± 0,02
15	0,06 ± 0,01	0,07 ± 0,01**	0,07 ± 0,01**	0,25 ± 0,04	0,22 ± 0,02	0,19 ± 0,02*	0,22 ± 0,08
30	0,06 ± 0,01*	0,06 ± 0,01**	0,07 ± 0,00**	0,21 ± 0,05	0,11 ± 0,03**	0,18 ± 0,05	0,15 ± 0,01

¹ Angaben in g, Mittelwerte ± SD, n=4-6

² (mg Kupfer/kg Körpergewicht/Tag)

* signifikant verschieden von den Tieren gleichen Alters ohne Kupferexposition (p < 0,05)

** signifikant verschieden von den Tieren gleichen Alters ohne Kupferexposition (p < 0,01)

Tabelle 12: Absolute Thymusgewichte kupferexponierter Meerschweinchen¹

Dosis ²	Alter (Tage)						
	3	6	10	14	21	28	60
0	0,05 ± 0,02	0,04 ± 0,02	0,08 ± 0,02	0,09 ± 0,03	0,12 ± 0,03	0,11 ± 0,03	0,21 ± 0,16
10	0,03 ± 0,02	0,04 ± 0,02	0,03 ± 0,02*	0,05 ± 0,01	0,05 ± 0,02*	0,13 ± 0,05	0,21 ± 0,15
15	0,01 ± 0,01**	0,03 ± 0,02	0,03 ± 0,03*	0,08 ± 0,03	0,07 ± 0,01*	0,12 ± 0,04	0,19 ± 0,06
30	0,04 ± 0,02	0,03 ± 0,01	0,02 ± 0,01**	0,06 ± 0,04	0,04 ± 0,02**	0,12 ± 0,03	0,21 ± 0,04

¹ Angaben in g, Mittelwerte ± SD, n=4-6

² (mg Kupfer/kg Körpergewicht/Tag)

* signifikant verschieden von den Tieren gleichen Alters ohne Kupferexposition (p < 0,05)

** signifikant verschieden von den Tieren gleichen Alters ohne Kupferexposition (p < 0,01)

Tabelle 13: Relative Thymusgewichte kupferexponierter Meerschweinchen¹

Dosis ²	Alter (Tage)						
	3	6	10	14	21	28	60
0	0,02 ± 0,01	0,02 ± 0,01	0,03 ± 0,01	0,03 ± 0,01	0,03 ± 0,01	0,03 ± 0,01	0,05 ± 0,04
10	0,01 ± 0,01	0,01 ± 0,01	0,01 ± 0,01*	0,02 ± 0,01*	0,02 ± 0,01**	0,04 ± 0,02	0,06 ± 0,04
15	0,00 ± 0,00**	0,01 ± 0,01	0,01 ± 0,01*	0,03 ± 0,01	0,02 ± 0,00*	0,03 ± 0,01	0,05 ± 0,02
30	0,02 ± 0,01	0,01 ± 0,00	0,01 ± 0,00**	0,02 ± 0,01	0,01 ± 0,01**	0,03 ± 0,01	0,05 ± 0,01

¹ Angaben in g, Mittelwerte ± SD, n=4-6

² (mg Kupfer/kg Körpergewicht/Tag)

* signifikant verschieden von den Tieren gleichen Alters ohne Kupferexposition (p < 0,05)

** signifikant verschieden von den Tieren gleichen Alters ohne Kupferexposition (p < 0,01)

Die Aktivitäten von GOT, GPT, GGT, alkalischer Phosphatase und die Gehalte von Bilirubin im Serum unterlagen großen Schwankungen auch innerhalb der Kontrollgruppen. Zum Teil waren die Werte in den Kontrollgruppen höher als die von kupferdosierten Tieren, so dass offensichtlich kein Zusammenhang mit der Kupferexposition besteht (nicht gezeigt).

Nach den histologischen Untersuchungen der Leber, dem Zielorgan der chronischen Kupfertoxizität traten Leberzellverfettungen bzw. fettige Leberzelldegenerationen in nahezu allen Tiergruppen auf. Diese Veränderungen stehen damit mit größter Wahrscheinlichkeit nicht in Zusammenhang mit einer Kupferexposition sondern sind die Folge mangelnder Bewegungsmöglichkeit der Tiere bei unbegrenztem Futterangebot.

Tabelle 14: Histologische Untersuchungsergebnisse der Leber kupferexponierter Meerschweinchen¹

Tiergruppe / Dosis	Alter (Tage)	Histologischer Befund			
		KU ²	TS ³	VD ⁴	MR ⁵
Kontrolle	1	2/3	0/3	0/3	0/3
	3	4/4	0/4	0/4	0/4
	6	2/4	0/4	0/4	0/4
	10	0/4	0/4	0/4	0/4
	14	0/4	0/4	0/4	0/4
	21	0/5	0/5	0/5	0/5
	28	0/4	0/4	0/4	0/4
	60	0/2	0/2	0/2	0/2
Nicht verstorben bzw. nicht erkrankt <i>10 mg Cu/kg Körpergewicht/Tag</i>	3	2/4	0/4	2/4	1/4
	6	4/4	0/4	4/4	4/4
	10	4/4	0/4	4/4	4/4
	14	3/4	1/4	2/4	3/4
	21	2/4	1/4	1/4	2/4
	28	3/4	1/4	2/4	3/4
	60	5/5	0/5	5/5	5/5
<i>15 mg Cu/kg Körpergewicht/Tag</i>	3	4/4	0/4	4/4	4/4
	6	1/4	0/4	1/4	1/4
	10	1/3	0/3	1/3	1/3
	14	2/4	0/4	2/4	2/4
	21	4/4	1/4	3/4	4/4
	28	3/5	3/5	0/5	3/5
	60	3/4	1/4	2/4	3/4
<i>30 mg Cu/kg Körpergewicht/Tag</i>	3	8/8	1/8	8/8	7/8
	6	2/4	0/4	2/4	2/4
	10	2/4	2/4	2/4	3/4
	14	0/3	0/3	2/3	2/3
	21	3/4	0/4	3/4	3/4
	28	2/4	2/4	0/4	2/4
	60	4/4	2/4	4/4	3/4
Verstorben bzw. erkrankt <i>(30 mg Cu/kg Körpergewicht/Tag)</i>	3	5/5	0/5	5/5	4/5

- ¹ Tiere pro Anzahl der Tiere in der Versuchsgruppe
- ² Kernuntergänge
- ³ Trübe Schwellung
- ⁴ Vakuoläre Degeneration
- ⁵ Mesenchymale Reaktion inkl. Sternzellhyperplasie

Histologische Veränderungen, die mit der Kupferexposition in Zusammenhang stehen dürften, sind in der Tabelle 14 aufgeführt. Im Vordergrund hierbei stehen die sog. trübe Schwellung, vakuoläre Degenerationen und mesenchymale Reaktionen, wobei die beiden letzteren in nahezu jeder Versuchsgruppe beobachtet wurden. Derartige pathologische Veränderungen sind als kupferspezifisch beschrieben und wurden auch bei unseren Untersuchungen an den LEC Ratten festgestellt. Die sog. trübe Schwellung kann von einer ödematösen Schwellung der Mitochondrien und Zerreißung der äußeren Mitochondrienmembran herrühren oder auf einem Zellödem beruhen. Sie ist meist reversibel, kann aber auch zum Zelltod berleiten. Auch die beobachteten vakuolären und eosinophilen Degenerationen können zu einer Leberzellnekrose führen. Die oftmals beobachteten Kernuntergnge könnten insbesondere bei den länger dosierten Tieren eine Folge dieser Degenerationen sein. Die mesenchymale Reaktion einschließlich der beobachteten Sternzellhyperplasie sind, ähnlich wie bei den LEC Ratten, als Reaktion auf eine Parenchymschädigung zu verstehen. Histologische Veränderungen traten bereits bei der niedrigsten Dosis von 10 mg Kupfer/kg Körpergewicht und nach kurzzeitiger Exposition auf und müssen für die vorliegenden Versuchsbedingungen als „Lowest Observed Adverse Effect Level“ (LOAEL) angesehen werden.

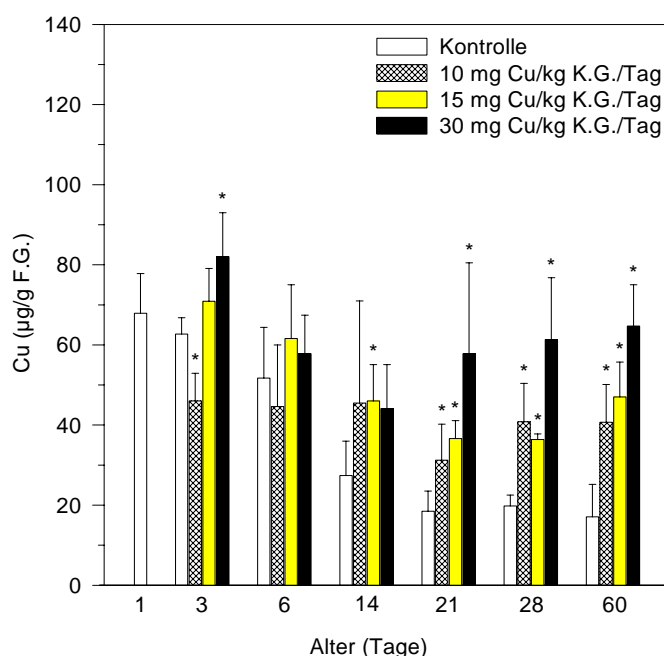


Abbildung 12: Kupfer (Cu) in der Leber kupferexponierter Meerschweinchen, Mittelwerte \pm SD, n=3-6

* Signifikant verschieden von den Tieren gleichen Alters ohne Kupferexposition ($p < 0,05$)

Die Exposition der Meerschweinchen mit Kupfer über Muttermilchersatznahrung bzw. Trinkwasser führte im Vergleich zu den Kontrolltieren zu fast allen Untersuchungszeitpunkten zu signifikant und meist dosisabhängig erhöhten Leber-Kupfergehalten (Abbildung 12). Dies untermauert den Zusammenhang zwischen der Kupferexposition und den beobachteten histologischen Veränderungen in der Leber.

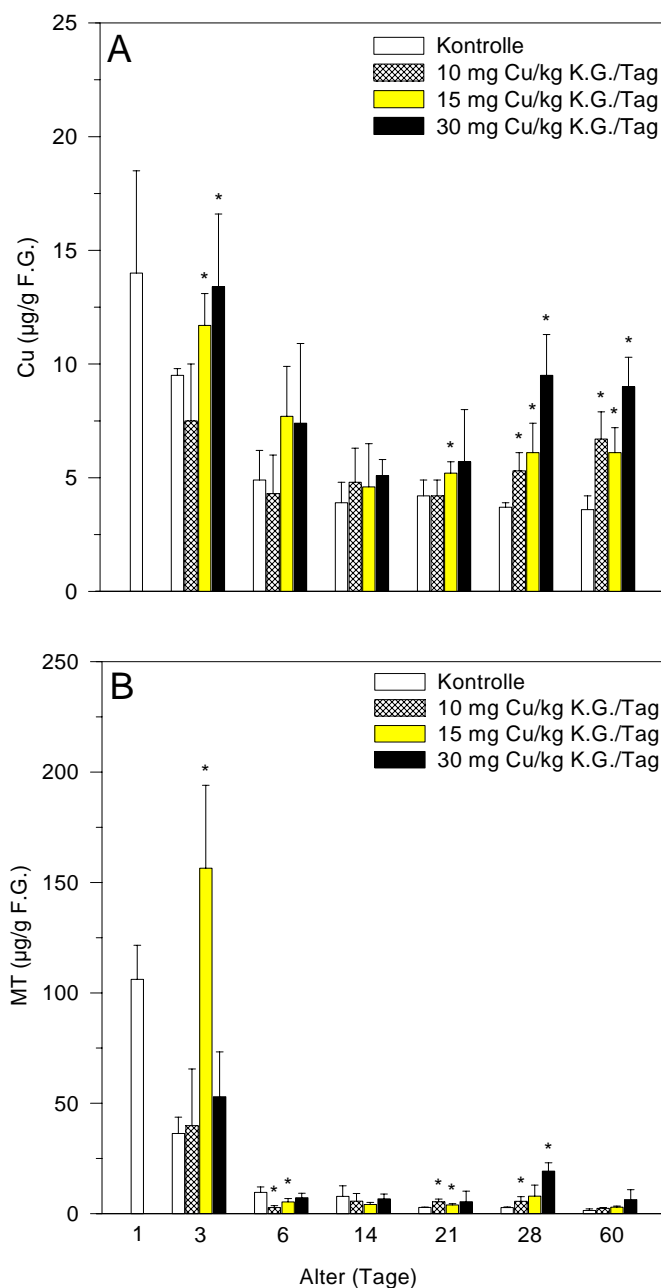


Abbildung 13: Kupfer (Cu) (A) und Metallothionein (MT)-Gehalte (B) im Leberzytosol kupferexponierter Meerschweinchen, Mittelwerte \pm SD, n=3-6

* Signifikant verschieden von den Tieren gleichen Alters ohne Kupferexposition ($p < 0,05$)

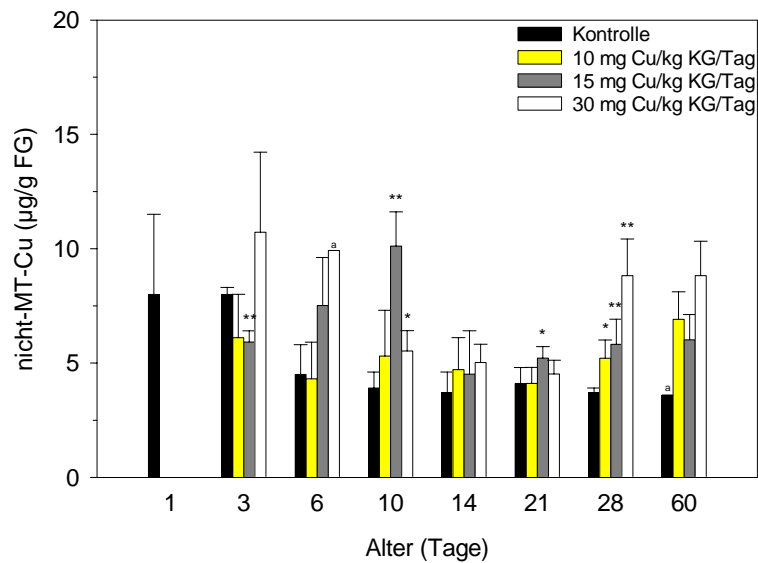


Abbildung 14: Gehalte an nicht an MT gebundenem Kupfer im Zytoplasma der Leber von kupferexponierten Meerschweinchen ohne Symptome (MW \pm SD, n=3-5)

- * signifikant verschieden von der Kontrolle (p<0,05)
- ** signifikant verschieden von der Kontrolle (p<0,01)
- a n=2, MW

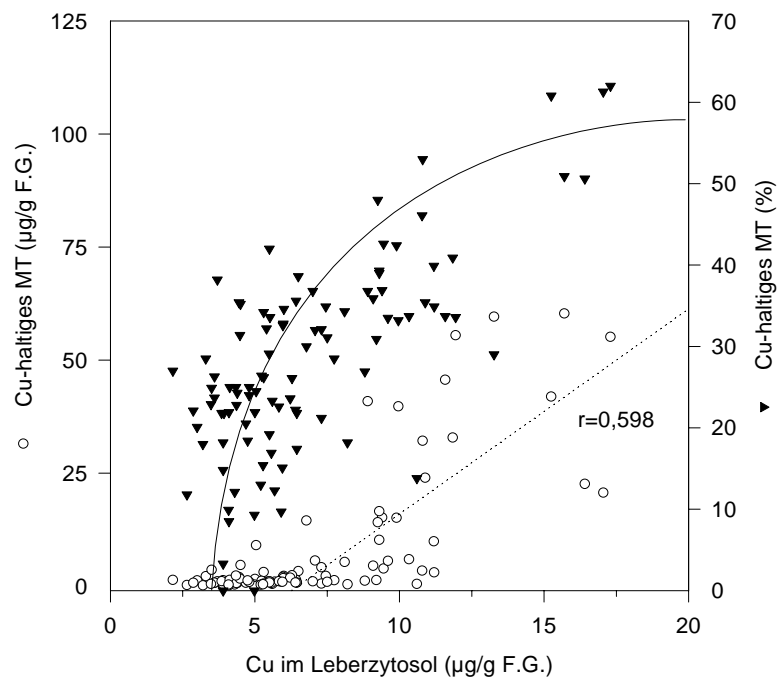


Abbildung 15: Beziehung zwischen Kupfer (Cu) und kupferhaltigem Metallothionein (MT) in der Leber kupferexponierter Meerschweinchen (Einzelwerte)

Parallel zum Kupfergehalt in der Leber veränderten sich die Konzentrationen von Kupfer und Metallothionein im Zytoplasma der Leber (Abbildung 13).

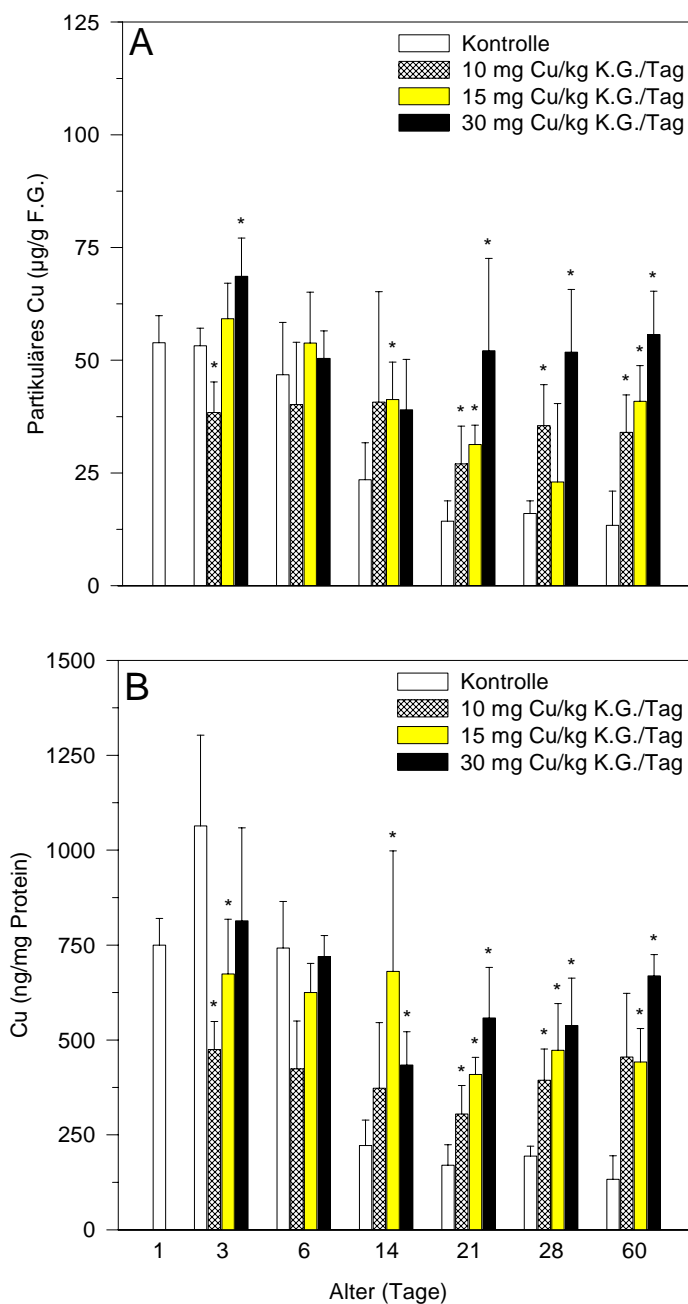


Abbildung 16: Partikuläres Kupfer (Cu) (A) und lysosomales Kupfer (B) in der Leber kupferexponierter Meerschweinchen, Mittelwerte \pm SD, $n=3-6$

* Signifikant verschieden von den Tieren gleichen Alters ohne Kupferexposition ($p < 0,05$)

Bei den kupferexponierten Tieren ist die Konzentration von nicht an Metallothionein gebundenem Kupfer, insbesondere nach längerer Expositionszeit, teilweise erhöht (Abbildung 14). Nicht an Metallothionein gebundenes Kupfer ist vermutlich reaktiv und wird in ursächlichem Zusammenhang mit der chronischen Toxizität des Metalls diskutiert (45).

Den Zusammenhang zwischen Kupfer und kupferhaltigem Metallothionein im Zytoplasma verdeutlicht die Abbildung 15. Zu erhöhten Gehalten an kupferhaltigem Metallothionein kommt es ab einem zytosolischen Kupfergehalt von etwa 7 µg/g Leberfrischgewicht. Die Beladung des Proteins mit Kupfer nimmt jedoch bereits bei niedrigeren Kupfergehalten stark zu und erreicht ab etwa 15 µg/g Leberfrischgewicht 100%. Ähnlich hohe Anteile des kupferhaltigen MT wiesen auch LEC Tiere auf (Kapitel 3.1.5.1) und sind auch bei Morbus Wilson und der frühkindlichen Leberzirrhose beschrieben (18, 46).

Es ist davon auszugehen, dass durch die hohe Beladung von Metallothionein mit Kupfer die Funktion des normalerweise überwiegend zinkhaltigen Proteins blockiert oder zumindest eingeschränkt sein dürfte. Darüber hinaus ist nach früheren Untersuchungen an LEC Ratten hoch mit Kupfer beladenes Metallothionein ursächlich an der Toxizität des Metalls beteiligt, weil es in den Lysosomen nur unvollständig abgebaut wird, und die Abbauprodukte offensichtlich reaktives Kupfer enthalten (47, 48). Damit übereinstimmend fanden sich auch bei den Meerschweinchen hohe Konzentrationen von Kupfer im partikulären Teil der Leber, insbesondere in den Lysosomen (Abbildung 16).

3.2.2 Verstorbene bzw. erkrankte Tiere

Fünf Tiere der höchsten Dosisgruppe starben bzw. erkrankten bereits im Alter von 1-3 Tagen an den Folgen der Kupferexposition. Die absoluten und relativen Organgewichte dieser Tiere sind in Tabelle 15 zusammengestellt. Statistisch signifikante Unterschiede zu den Kontrolltieren wurden bei den absoluten und relativen Gewichten von Milz und Thymus festgestellt. Zu den gleich alten, nicht verstorbenen bzw. erkrankten Tieren der gleichen Dosisgruppe (Tabellen 5-13) wurden jedoch keine Unterschiede beobachtet. Histologisch wiesen die Tiere Veränderungen auf, die auch bei den nicht verstorbenen bzw. nicht erkrankten Tieren gefunden wurden (Tabelle 14).

Die Leber-Kupfergehalte der Tiere variierten stark, wobei die beiden erkrankten Tiere die höchsten Werte aufwiesen (Tabelle 16). Die Leber-Kupfergehalte der verstorbenen Tiere waren sogar niedriger als der entsprechende Mittelwert bei gleich alten nicht erkrankten bzw. verstorbenen Tieren. Die Kupfergehalte in der Niere von 2 der 3 verstorbenen Tiere waren jedoch erhöht, ein Indiz für eine bereits fortgeschrittene Leberschädigung. Damit übereinstimmend kommt es auch bei erkrankten LEC Ratten infolge von Leberzelluntergängen zu einer Freisetzung des Metalls in das Blut, damit zur

Tabelle 15: Organgewichte verstorbener bzw. erkrankter kupferexponierter Meerschweinchen

Tiergruppe	Organgewichte							
	Leber		Niere		Milz		Thymus	
	absolut ¹	relativ ²	absolut ¹	relativ ²	absolut ¹	relativ ²	absolut ¹	relativ ²
Kontrolle ³	5,61 ± 1,00	2,08 ± 0,39	1,20 ± 0,14	0,44 ± 0,05	0,21 ± 0,04	0,08 ± 0,02	0,05 ± 0,02	0,02 ± 0,01
Nicht verstorben bzw. nicht erkrankt ⁴	3,78 ± 0,58**	1,36 ± 0,21**	1,04 ± 0,07*	0,38 ± 0,04*	0,15 ± 0,02*	0,06 ± 0,01*	0,04 ± 0,02	0,02 ± 0,01
Verstorben bzw. erkrankt ³	4,34 ± 1,10	1,57 ± 0,32	1,11 ± 0,10	0,41 ± 0,01	0,14 ± 0,03*	0,05 ± 0,01*	0,020 ± 0,01*	0,01 ± 0,01*

¹ Angaben in g, Mittelwerte ± SD, n=4-6

² Bezogen auf die Gehirngewichte, Mittelwerte ± SD, n=4-6

³ 30 mg Kupfer/kg Körpergewicht pro Tag

* Signifikant verschieden von der Kontrolle, p<0,05

** Signifikant verschieden von der Kontrolle, p<0,01

Tabelle 16: Kupfer und Metallothionein (MT) in Leber und Niere von verstorbenen bzw. erkrankten kupferexponierten Meerschweinchen

Tiergruppe	Leber			Niere Kupfer (µg/g FG)
	Kupfer (µg/g FG [#])	Kupferhaltiges MT (µg/g FG)	Kupferhaltiges MT (%)	
Kontrolle ¹	62,7 ± 4,1	14,3 ± 2,8	39 ± 2	3,6 ± 0,5
Cu-exponiert, ohne Symptome ^{1,2}	82,0 ± 11,0	27,4 ± 10,1	53 ± 8	3,7 ± 3,1
Cu-exponiert, verstorben bzw. erkrankt ^{2,3}				
<i>verstorben, Tier 1</i>	59,4	79,1	85	15,4
<i>verstorben, Tier 2</i>	67,6	130,5	73	17,7
<i>verstorben, Tier 3</i>	54,3	82,9	86	4,7
<i>erkrankt, Tier 1</i>	112,3	71,9	64	3,5
<i>erkrankt, Tier 2</i>	94,8	109,5	60	3,2

Feuchtgewicht

¹ Alter 2-3 Tage, Mittelwerte ± SD, n=5

² 30 mg Kupfer/kg Körpergewicht pro Tag

³ Einzelwerte

Abnahme des Kupfergehaltes in der Leber und daraufhin zu einem Anstieg der Kupferkonzentration in der Niere.

Auffällig waren bei den verstorbenen bzw. erkrankten Meerschweinchen der durchwegs hohe Gehalt an kupferhaltigem Metallothionein in der Leber und die teilweise hohe Beladung des Proteins mit Kupfer (Tabelle 16). Dieser Befund erlangt vor dem Hintergrund unserer Ergebnisse mit LEC Ratten besondere Bedeutung, weil kupferhaltigem Metallothionein eine Schlüsselrolle bei der Kupfertoxizität zukommt.

3.2.3 Zur Frage eines No Observed Adverse Effect Level (NOAEL) von Kupfer für Neugeborene

Auf der Grundlage der leberhistologischen Befunde bei kupferbelasteten neugeborenen Meerschweinchen lässt sich ein LOAEL von 10 mg Kupfer pro kg Körpergewicht und Tag angeben. Berücksichtigt man, dass es bei der höchsten Dosisgruppe bereits zu Todesfällen kam, scheint die Dosis-Wirkungs-Beziehung von Kupfer sehr steil zu verlaufen, d.h. der NOAEL dürfte relativ nahe am LOAEL liegen. Hilfsweise wird ein Faktor 3 zwischen LOAEL und NOAEL angenommen. Damit ergibt sich ein NOAEL für das neugeborene Meerschweinchen von 3,3 mg Kupfer pro kg Körpergewicht und Tag. Überträgt man diesen Wert auf die Situation des Säuglings, entspräche dies mit den Annahmen einer täglichen Aufnahme von 750 ml Flaschennahrung und einem Körpergewicht von 5 kg einer Kupferkonzentration von 22 mg/l Flaschennahrung. Berücksichtigt man ferner die üblicherweise mit dem Faktor 10 bezifferten Unsicherheiten bei der Extrapolation zwischen verschiedenen Spezies, ergibt sich ein NOAEL für Säuglinge von 2,2 mg Kupfer/l Leitungswasser. Diese Konzentration entspricht etwa dem Leitwert für Kupfer im Leitungswasser nach der bundesdeutschen Trinkwasserverordnung von 2 mg/l (49) und den jüngsten Empfehlungen der Weltgesundheitsorganisation (2).

4. ZUSAMMENFASSUNG

4.1 Zum Mechanismus der Hepatotoxizität von Kupfer

Bis zum Auftreten der systemischen Gelbsucht im Alter von etwa 85 Tagen, stiegen die Kupfergehalte in der Leber der LEC Ratten kontinuierlich an. In der präsymptomatischen Phase akkumulierte das Metall vor allem im Zytoplasma der Hepatozyten, während mit der Progression der Hepatitis die Kupferkonzentration nur noch in den zellulären Organellen zunahm. Bei den Tieren mit schwer geschädigter Leber war Kupfer überwiegend in den Lysosomen lokalisiert.

Entgegen bisherigen Vermutungen war das überschüssige Kupfer im Zytoplasma, unabhängig vom Schweregrad der Leberschädigung, annähernd quantitativ an Metallothionein (MT) gebunden. Der gleichsinnige Verlauf der Kupfergehalte und der MT-Gehalte weist darauf hin, dass die Synthese des Proteins durch Kupfer stimuliert wurde, und, dass die Neusynthese von MT unter diesen Bedingungen nicht limitiert ist. Die vermutete „prooxidative“ Wirkung von kupferhaltigem MT spielt nach unseren Ergebnissen für die Pathogenese der Leberschädigung bei der LEC Ratte keine Rolle. Somit ist davon auszugehen, dass die Hepatotoxizität von Kupfer bei diesen Tieren nicht durch das überschüssige Metall im Zytoplasma der Leber initiiert wird.

In den Lysosomen der Hepatozyten lag Kupfer überwiegend in Form unlöslicher Partikel vor, die als oxidierte, über Disulfidbrücken vernetzte Polymere aus MT identifiziert werden konnten. Eine Folge der Oxidation der Thiolgruppen ist zwangsläufig die im Vergleich zu nativem MT schwächere Bindung von Kupfer an das Protein. Eine vergleichsweise hohe Reaktivität dieses Kupfer ist anzunehmen, da polymerassoziiertes Metall, im Gegensatz zu MT-gebundenem Kupfer im Zytoplasma, durch DPA mobilisierbar war. Polymerassoziiertes, reaktives Kupfer kann über radikalvermittelte Reaktionen zu den beschriebenen oxidativen Schäden an der lysosomalen Membran führen und so den nekrotischen oder apoptotischen Zelluntergang initiieren. Als Folge der phagozytären Aufnahme aus geschädigten Parenchymzellen akkumulierten kupferhaltige MT-Polymere auch in den Kupffer'schen Sternzellen. Möglicherweise führt dies, ähnlich wie in den Hepatozyten, zum Untergang dieser Zellen und damit zu einer weiteren Freisetzung von reaktivem Kupfer. Doch nicht nur das Metall selbst, sondern auch die Stimulierung der Kupffer'schen Sternzellen könnte über die Freisetzung zytotoxischer oder chemotaktischer Mediatoren zur Pathogenese der Kupferhepatotoxizität beitragen.

4.2 Zur Kupfertoizität beim Neugeborenen

Von den insgesamt 40 oral mit der höchsten Dosis von 30 mg Kupfer/kg Körpergewicht und Tag exponierten Meerschweinchen starben bzw. erkrankten kupferbedingt 5 Tiere innerhalb der ersten 3 Lebensstage. Dies ist der erste experimentelle Beleg, dass Neugeborene im ersten Lebensabschnitt besonders empfindlich gegenüber Kupfer sind. Die Mehrheit aller kupferexponierten Tiere zeigten pathologische histologische Veränderungen der Leber wie trübe Schwellung, vakuoläre Degenerationen und Sternzellhyperplasien.

Die Kupferexposition führte zu einer zumeist dosisabhängigen Anreicherung des Metalls in der Leber, insbesondere, und ähnlich wie bei der LEC Ratte, im Zytoplasma und in den Lysosomen. Im Zytoplasma war Kupfer überwiegend an MT gebunden. Auffällig war, wie bei den LEC Ratten, die hohe Beladung des Proteins mit Kupfer. Dies könnte in Analogie zu den Befunden an LEC Ratten in ursächlichem Zusammenhang mit der Toxizität des Metalls stehen. Eine weitere kausale Bedeutung für die Kupfertoizität könnte dem nicht an MT gebundene Metall im Zytoplasma zukommen.

Auf der Basis der histologischen Befunde wurde für neugeborene Meerschweinchen ein Lowest Observed Adverse Effect Level (LOAEL) von 10 mg Kupfer/kg KG/Tag abgeleitet. Unter Zugrundelegung eines Faktors 3 zwischen LOAEL und dem No Observed Adverse Effect Level (NOAEL) ergibt sich ein NOAEL für das neugeborene Meerschweinchen von 3,3 mg Kupfer pro kg Körpergewicht und Tag. Übertragen auf die Situation des Säuglings, entspricht dies mit den Annahmen einer täglichen Aufnahme von 750 ml Flaschennahrung und einem Körpergewicht von 5 kg einer Kupferkonzentration von 22 mg Kupfer/l Flaschennahrung. Unter Berücksichtigung eines Sicherheitsfaktors von 10 auf Grund der Speziesunterschiede ergibt sich eine dem NOAEL analoge Kupferkonzentration von 2,2 mg/l Leitungswasser. Diese Konzentration entspricht dem Leitwert für Kupfer im Leitungswasser nach der bundesdeutschen Trinkwasserverordnung von 2 mg/l und den jüngsten Empfehlungen der Weltgesundheitsorganisation. Vor dem Hintergrund der vermutlich sehr steilen Dosis-Wirkungs-Beziehung von Kupfer und der relativ häufig anzunehmenden Überschreitung der Kupfergrenzwerte in Stagnationswässern und nach Neuinstallation von Versorgungsleitungen kann für überwiegend über Formulanahrung ernährte Säuglinge ein erhöhtes Gesundheitsrisiko nicht ausgeschlossen werden. Dies sollte bei einer künftigen Festlegung des Grenzwertes für Kupfer im Trinkwasser entsprechend berücksichtigt werden.

5. LITERATUR

- 1 Linder MC, Hazegh-Azam M (1996). Copper biochemistry and molecular biology. *Am J Clin Nutr* 63, 797-811
- 2 World Health Organization. International Programme On Chemical Safety, Environmental Health Criteria 200. Copper. Genf 1998
- 3 National Research Council (1989). Recommended dietary allowances, 10th edition. National Academy Press, Washington
- 4 Johnson PE, Milne DB, Lykken GI (1992). Effects of age and sex on copper absorption, biological half-life, and status in humans. *Am J Clin Nutr* 56, 917-925
- 5 Linder MC, Wooten L, Cerveza P, Cotton S, Shulze R, Lomeli N (1998). Copper transport. *Am J Clin Nutr* 67, 965-971
- 6 Adamson M, Reiner B, Olson J, Goodman Z, Plotnick L, Bernardini I, Gahl W (1992). Indian childhood cirrhosis in an American child. *Gastroenterology* 102, 1771-1777
- 7 Eife R, Müller-Höcker J (1988). Frühkindliche Leberzirrhose. *Deutsches Ärzteblatt* 85, 444-445
- 8 Lefkowitz JH, Honig CL, King ME, Hagstrom JWC (1982). Hepatic copper overload and features of Indian childhood cirrhosis on an American sibship. *N Engl J Med* 307, 271-277
- 9 Maggiore G, De Giacomo C, Sessa F, Burgio G (1987). Idiopathic copper toxicosis in a child. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 6, 980-983
- 10 Nayak NC, Ramalingaswami V (1975). Indian childhood cirrhosis. *Clin Gastroenterology* 4, 333-349
- 11 Schimmelpfennig W, Dieter HH (1995). Kupfer und frühkindliche Leberzirrhose. *Bundesgesundheitsblatt* 1, 2-10
- 12 Valencia MP, Gamboa MJ, Mediana J (1993). Copper overload and cirrhosis in four Mexican children. *Lab Invest* 68, 10-20
- 13 Li Y, Togashi Y, Sato S, Emoto T, Kang JH, Takeichi N, Kobayashi H, Kojima Y, Une Y, Uchino J (1991). Spontaneous hepatic copper accumulation in Long-Evans Cinnamon rats with hereditary hepatitis. A model of Wilson's disease. *J Clin Invest* 87, 1858-1861

- 14 Wu J, Forbes JR, Chen HS, Cox DW (1994). The LEC rat has a deletion in the copper transporting ATPase gene homologous to the Wilson disease gene. *Nat Genet* 7, 541-545
- 15 Chesta J, Srari SKS, Burroughs AK, Scheuer PJ, Epstein O (1989). Copper overload in the developing guinea pig liver: a histological, histochemical and biochemical study. *Liver* 9, 198-204
- 16 Srari SKS, Burroughs AK, Wood B, Epstein O (1986). The ontogeny of liver copper metabolism in the guinea pig: clues to the etiology of Wilson's disease. *Hepatology* 6, 427-432
- 17 Hardonk MJ, Dijkhuis FW, Hulstaert CE, Koudstaal J (1992). Heterogeneity of rat liver and spleen macrophages in gadolinium chloride-induced elimination and repopulation. *J Leukoc Biol* 52, 296-302
- 18 Klein D, Bartsch R, Summer KH (1990). Quantitation of Cu-containing metallothionein by a Cd-saturation method. *Anal Biochem* 189, 35-39
- 19 Bartsch R, Klein D, Summer KH (1990). The Cd-Chelex assay: A new sensitive method to determine metallothionein containing zinc and cadmium. *Arch Toxicol* 64, 177-180
- 20 Bradford MM (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72, 248-254
- 21 Hartmann HJ, Gartner A, Weser U (1984). Oxidation of Cu(I)-thionein by enzymically generated H₂O₂. *Hoppe Seylers Z Physiol Chem* 365, 1355-1359
- 22 Rupp H, Weser U (1974). Conversion of metallothionein into Cu-thionein, the possible low molecular weight form of neonatal hepatic mitochondriocuprein. *FEBS Lett* 44, 293-297
- 23 McKim Jr JM, Liu J, Liu YP, Klaassen CD (1992). Distribution of cadmium chloride and cadmium-metallothionein to liver parenchymal, Kupffer, and endothelial cells: Their relative ability to express metallothionein. *Toxicol Appl Pharmacol* 112, 324-330
- 24 Mori M, Hattori A, Sawaki M, Tsuzuki N, Sawada N, Oyamada M, Sugawara N, Enomoto K (1994). The LEC rat: A model for human hepatitis, liver cancer, and much more. *Am J Pathol* 144, 200-204
- 25 Sugawara N, Sugawara C, Sato M, Mori M (1993). Copper metabolism at two stages in the onset of spontaneous hepatitis in new mutant Long-Evans Cinn-

- mon (LEC) rats: Induction of hepatic copper metallothionein and its leakage from hepatocytes. *J Trace Elem Exp Med* 6, 15-21
- 26 Nakamura M, Nakayama K, Shishido N, Yumino K, Ohyama T (1997). Metal-induced hydroxyl radical generation by Cu⁽⁺⁾-metallothioneins from LEC rat liver. *Biochem Biophys Res Commun* 231, 549-552
 - 27 Sakurai H, Satoh H, Hatanaka A, Sawada T, Kawano K, Hagino T, Nakajima K (1994). Unusual generation of hydroxyl radicals in hepatic copper-metallothionein of LEC (Long-Evans Cinnamon) rats in the presence of hydrogen peroxide. *Biochem Biophys Res Commun* 199, 313-318
 - 28 Felix K, Lengfelder E, Hartmann HJ, Weser U (1993). A pulse radiolytic study on the reaction of hydroxyl and superoxide radicals with yeast Cu(I)-thionein. *Biochim Biophys Acta* 1203, 104-108
 - 29 Thornalley PJ, Vasak M (1985). Possible role for metallothionein in protection against radiation-induced oxidative stress. Kinetics and mechanism of its reaction with superoxide and hydroxyl radicals. *Biochim Biophys Acta* 827, 36-44
 - 30 Liu J, Kershaw WC, Klaassen CD (1991). The protective effect of metallothionein on the toxicity of various metals in rat primary hepatocyte culture. *Toxicol Appl Pharmacol* 107, 27-34
 - 31 Schilsky ML, Blank RR, Czaja MJ, Zern MA, Scheinberg IH, Stockert RJ, Sternlieb I (1989). Hepatocellular copper toxicity and its attenuation by zinc. *J Clin Invest* 84, 1562-1568
 - 32 Freedman JH, Peisach J (1989). Resistance of cultured hepatoma cells to copper toxicity. Purification and characterization of the hepatoma metallothionein. *Biochim Biophys Acta* 992, 145-154
 - 33 Owen CA Jr, Dickson ER, Goldstein NP, Baggenstoss AH, McCall JT (1977). Hepatic subcellular distribution of copper in primary biliary cirrhosis. Comparison with other hyperhepatocupric states and review of the literature. *Mayo Clin Proc* 52, 73-80
 - 34 Prasad R, Kaur G, Nath R, Walia BNS (1996). Molecular basis of pathophysiology of Indian childhood cirrhosis: Role of nuclear copper accumulation in liver. *Mol Cell Biochem* 156, 25-30
 - 35 Sokol RJ, Twedt D, McKim JM Jr, Devereaux MW, Karrer FM, Kam I, von Steigman G, Narkewicz MR, Bacon BR, Britton RS, Neuschwander-Tetri BA (1994). Oxidant injury to hepatic mitochondria in patients with Wilson's disease and Bedlington terriers with copper toxicosis. *Gastroenterology* 107, 1788-1798

- 36 Gooneratne SR, Howell JM, Gawthorne J (1979). Intracellular distribution of copper in the liver of normal and copper loaded sheep. *Res Vet Sci* 27, 30-37
- 37 Verity MA, Gambell JK, Reith AR, Brown WJ (1967). Subcellular distribution and enzyme changes following subacute copper intoxication. *Lab Invest* 16, 580-590
- 38 Goldfischer S, Popper H, Sternlieb I (1980). The significance of variations in the distribution of copper in liver disease. *Am J Pathol* 99, 715-730
- 39 Helman RG, Adams LG, Pierce KR, Bridges CH, Bailey EM (1983). The role of lysosomes in the pathogenesis of copper-induced hepatotoxicity. II. Intracellular distribution of copper in hepatocytes. *Toxicol Appl Pharmacol* 67, 238-245
- 40 Sternlieb I, Goldfischer S (1976). Heavy metals and lysosomes. *Front Biol* 45, 185-200
- 41 Abe S, Yamazaki K, Takikawa S, Suzuki K (1994). Impaired biliary excretion of copper and lysosomal enzymes in Long-Evans Cinnamon rat. *Tohoku J Exp Med* 172, 355-367
- 42 Gross JB Jr, Myers BM, Kost LJ, Kuntz SM, LaRusso NF (1998). Biliary copper excretion by hepatocyte lysosomes in the rat. Major excretory pathway in experimental copper overload. *J Clin Invest* 83, 30-39
- 43 Harada M, Sakisaka S, Yoshitake M, Shakadoh S, Gondoh K, Sata M, Tanikawa K (1993). Biliary copper excretion in acutely and chronically copper-loaded rats. *Hepatology* 17, 111-117
- 44 Myers BM, Prendergast FG, Holman R, Kuntz SM, LaRusso NF (1993). Alterations in hepatocyte lysosomes in experimental hepatic copper overload in rats. *Gastroenterology* 105, 1814-1823
- 45 Klein D, Lichtmannegger J, Heinzmann U, Müller-Höcker J, Michaelsen S, Summer KH (1998). Association of copper to metallothionein in hepatic lysosomes of Long-Evans cinnamon (LEC) rats during the development of hepatitis. *Eur J Clin Invest* 28, 302-310
- 46 Summer KH, Klein D, Sato S, Müller-Höcker J, Fischer R (1994). Metallothionein und die chronische Toxizität von Kupfer. In: Dokumentation des 2. Elsteraner Fachgesprächs. Kupfer und frühkindliche Leberzirrhose: Expositions- und Risikoabschätzung. (HH Dieter, W Seffner, Hrsg.). Bad Elster, 25.-26.10.1993, WaBoLu-Hefte 9, Berlin
- 47 Aljajeh IA, Mughal S, Al-Tahou B, Ajrawi T, Ismail EA, Nayak NC (1994). Indian childhood cirrhosis-like liver disease in an Arab child. A brief report. *Virchows Arch* 424, 225-227

- 48 Aston N, Morris P, Tanner S (1996). Retrorsine in breast milk influences copper handling in suckling rat pups. *J Hepatol* 25, 748-755
- 49 Verordnung über Trinkwasser und über Wasser für Lebensmittelbetriebe (Trinkwasserverordnung – TrinkwV) vom 12.12.1990. BGBl. I, S. 2613