

GSF-Forschungszentrum für Umwelt und Gesundheit GmbH, Neuherberg,
Institut für Toxikologie

**Zur Toxizität von Kupfer beim Neugeborenen:
Untersuchungen an neonatal exponierten
Meerschweinchen**

Sandra Lilian Michaelsen

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Naturwissenschaften

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender:

Univ.-Prof. Dr. K.-H. Schleifer

Prüfer der Dissertation:

1. Univ.-Prof. Dr. H. Greim, i. R.

2. Univ.-Prof. Dr. W. Höll

Die Dissertation wurde am 21.2.2002 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt am 21.5.2002 angenommen.

INHALT

1	Einleitung	1
2	Material und Methoden	5
2.1	Chemikalien	5
2.2	Geräte	6
2.3	Herkunft und Haltung der Tiere	7
2.4	Exposition der Meerschweinchen.....	8
2.5	Probenvorbereitung.....	10
	2.5.1 Isolierung subzellulärer Fraktionen der Leber	11
2.6	Analytische Verfahren	12
	2.6.1 Gelchromatographie mittels HPLC.....	12
	2.6.2 Bestimmung von Metallothionein.....	13
	2.6.3 Kupferanalytik	15
	2.6.4 Proteinbestimmung	15
	2.6.5 Bestimmung von Enzymaktivitäten und Bilirubin	15
2.7	Statistische Verfahren	16
3	Ergebnisse	18
3.1	Methodische Vorarbeiten zur subzellulären Lokalisation und Bindung von Cu in der Leber	18
3.2	Zur Toxizität von Cu bei juvenilen Meerschweinchen.....	24
	3.2.1 Leberenzyme und Bilirubin im Serum.....	24
	3.2.2 Histologische Untersuchung der Leber	27
	3.2.3 Körpergewichte	29
	3.2.4 Organgewichte	32
	3.2.5 Cu- und MT-Gehalte in der Leber	36
	3.2.6 Cu-Gehalte in der Niere	50
4	Diskussion	54

5	Zusammenfassung	61
6	Literaturverzeichnis	64
7	Verzeichnis der Abkürzungen	78

1 EINLEITUNG

Stoffwechsel von Kupfer

Als essentielles Metall ist Kupfer (Cu) in vielfacher Hinsicht unentbehrlich für Differenzierung, Wachstum und Funktion der Zelle. Cu-haltige Enzyme wie Tyrosinase, Ascorbinsäure-Oxidase, Monoamin-Oxidase, Superoxiddismutase, Cytochrom-Oxidase und Ceruloplasmin sind unter anderem an der Entgiftung reaktiver Sauerstoffspezies und am zellulären Energiestoffwechsel beteiligt (Peisach et al. 1966). Der Cu-Bedarf wird im Wesentlichen über die Nahrung gedeckt und beträgt nach Angaben der WHO beim Erwachsenen etwa 0,03 und bei Kindern bis zu 0,08 mg/kg Körpergewicht/Tag. Mit der Nahrung werden täglich etwa 0,5 - 2 mg Cu aufgenommen, von denen im Gastrointestinaltrakt 30 bis 50% resorbiert werden. Der größte Teil des resorbierten Cu wird über die Galle ausgeschieden. Das resorbierte Cu wird, gebunden an Albumin und Transcuprein, mit dem Pfortaderblut zur Leber transportiert. Dort wird Cu über ein spezielles Transportsystem in das Zytosol von Hepatozyten aufgenommen und bindet zuerst an Glutathion (Freedman et al. 1989). In dieser Form kann Cu auf verschiedene Makromoleküle sowie auf Metallothionein (MT), das eine wesentliche Rolle bei der Entgiftung von Metallen spielt, übertragen werden (Ciriolo et al. 1990, Ferreira et al. 1993, Musci et al. 1996).

Toxizität von Kupfer

Beim Säuger ist die Leber nicht nur das wichtigste Organ des Cu-Stoffwechsels, sondern auch das Zielorgan der Toxizität des Metalls. Zum molekularen Mechanismus der Toxizität von Cu wurden verschiedene Theorien vorgeschlagen: Neben der Hemmung von Enzymen durch Cu-Ionen (Boulard et al. 1972, Nakamura und Yamazaki 1972) kommt es zu Schädigungen von Membranen durch Cu(II), die mit der Oxidation membranständiger Thiolatgruppen zu Disulfiden bei gleichzeitiger Reduktion des Cu(II) zu Cu(I) erklärt werden. Cu(I) wird in Gegenwart von Sauerstoff nach einer Fenton-Reaktion oxidiert, wobei reaktive Sauerstoffspezies

entstehen, die letzten Endes zu Membranschäden und Lipidperoxidation führen können (Forman et al. 1980, Freedman et al. 1989, Halliwell und Gutteridge 1984, Kumar et al. 1978, Samuni et al. 1981, Stacey und Klaassen 1981).

Für die Toxizität von Cu spielen die Lokalisation und Art der Bindung des Metalls in der Leber eine entscheidende Rolle. Diesbezügliche Kenntnisse liegen jedoch kaum vor. Ein wesentlicher Grund hierfür ist, dass die bisher eingesetzten Methoden wie histochemische Verfahren zum Teil unspezifisch sind und nur qualitative Aussagen liefern.

Die häufigste Ursache für eine Cu-assoziierte Leberschädigung ist die Akkumulation des Metalls auf Grund einer vererbten Störung des Cu-Stoffwechsels (Scheinberg 1981, Tanzi et al. 1993) oder in Folge cholestatischer Erkrankungen (Dickson et al. 1981, Fleming et al. 1974, Sternlieb 1980). Eine chronische Toxizität von Cu beim Erwachsenen nach oraler Aufnahme des Metalls wurde bislang nur in zwei Fallberichten (O'Donohue et al. 1993, Yelin et al. 1987) beschrieben. Bei Säuglingen und Kleinkindern hingegen wurden wiederholt Erkrankungen in Folge erhöhter Exposition gegenüber Cu beobachtet. Die sogenannte Cu-assoziierte frühkindliche Leberzirrhose (Idiopathic Copper Toxicosis, ICT) wurde auf die enorme Anreicherung von Cu in der Leber zurückgeführt. In Indien wurden in den letzten Jahrzehnten mehrere hundert Fälle der sogenannten Indian Childhood Cirrhosis (ICC) beschrieben (Nayak 1979, Nayak und Ramalingaswami 1975, Pradhan et al. 1983, Tanner 1986, Tanner und Portmann 1981). Charakteristisch für diese Fälle war die erhöhte Exposition gegenüber Cu auf Grund der Zubereitung von tierischer Milch als Säuglingsnahrung in Kupfer- und Messinggefäßen. In Deutschland sind bislang 26 derartige Fälle, davon 15 mit tödlichem Ausgang, bekannt geworden (Bent und Böhm 1995, Eife et al. 1987, Eife et al. 1991, Eife und Müller-Höcker 1988, Fischer 1993, Müller-Höcker et al. 1987, Müller-Höcker et al. 1988, Schimmelpfennig und Dieter 1995, Schramel et al. 1988, Trollmann und Behrens 1998, Weiß et al. 1989). Auch in anderen Ländern wurden Fälle von ICT beschrieben (Adamson et al. 1992, Aljajeh et al. 1994, Baker et al. 1995, Horslen et al. 1994, Lefkowitz et al. 1982, Lim und Choo 1979, Maggiore et al. 1987, Price et al. 1996, Sternlieb 1985, Valencia et al. 1993, Walker-Smith und Blomfield 1973). All diesen Fällen ist gemeinsam, dass die Kinder nicht oder nur kurz gestillt wurden und mit Formulamilch ernährt wurden,

die mit Cu-haltigem Wasser aus Eigenwasserversorgung zubereitet war. Über eine endemische Häufung von ICT am Anfang dieses Jahrhunderts in Tirol berichteten Müller et al. (1996). In diesen Fällen wurde als Ursache der Cu-Exposition die Verwendung von Kupfergeschirr zur Zubereitung der Säuglingsnahrung diskutiert. Bereits Cu-Konzentrationen von mehr als 1,13 mg/l im Trinkwasser wurden mit dem Auftreten von ICT in Zusammenhang gebracht (Adamson et al. 1992). Die Frage, warum nur Säuglinge unter diesen Bedingungen erkranken, ist nicht geklärt. Eine genetische Ursache (Müller et al. 1996, Scheinberg und Sternlieb 1984) oder ein zweiter synergistisch wirkender Faktor in der Nahrung (Aston et al. 1996, Morris et al. 1994, Seffner et al. 1997, Tanner und Mattocks 1987) konnten bislang nicht bestätigt werden. Möglicherweise ist der in den ersten Lebensmonaten noch nicht ausgereifte Cu-Stoffwechsel ursächlich an der ICT beteiligt (Summer et al. 1994).

Eine experimentelle Überprüfung einer möglicherweise besonderen Empfindlichkeit Neugeborener gegenüber Cu im Tiermodell ist bislang nicht erfolgt. In den vorliegenden tierexperimentellen Untersuchungen wurden nur erwachsene Tiere oral gegenüber Cu exponiert (Barka et al. 1964, Chesta et al. 1989, Fuentealba et al. 1989, Fuentealba und Haywood 1988, Funk und Baker 1991, Gooneratne et al. 1989, Haywood et al. 1985, Haywood und Loughran 1985, Hébert et al. 1993, Jenkins 1989, Jenkins und Hidiroglou 1989, Kumaratilake und Howell 1989a, Kumaratilake und Howell 1989b, Morris et al. 1994, Sokol et al. 1990, Srai et al. 1986, St. Laurent et al. 1972, Sugawara et al. 1995, Weiss und Baur 1968). Vor dem Hintergrund dieser Problematik wurden in der vorliegenden Dissertation folgende Fragen bearbeitet:

Fragestellung

- Wie äußert sich die Toxizität von Cu bei juvenilen Säugern?
- Welche Bedeutung haben die Lokalisation und Bindung von Cu in der Leber von Cu-exponierten Neugeborenen für die Toxizität des Metalls?
- Lassen sich die Hinweise für die besondere Empfindlichkeit von Neugeborenen gegenüber Cu tierexperimentell belegen?

Ausgehend von diesen Ergebnissen sollte ein NOAEL als Grundlage zur Erstellung eines Grenzwertes für Cu im Trinkwasser abgeschätzt werden, der die möglicherweise besondere Empfindlichkeit des Neugeborenen gegenüber Cu berücksichtigt.

Die methodischen Voraussetzungen, die Lokalisation und Bindung von Cu in der Leber zu charakterisieren, wurden an der Long-Evans Cinnamon (LEC)-Ratte erarbeitet. Diese Tiere eignen sich hierfür besonders, da sie auf Grund eines genetischen Defekts Cu in der Leber akkumulieren und in der Folge eine Hepatitis bis hin zum fulminanten Leberversagen entwickeln (Li et al. 1991, Li, Togashi und Takeichi 1991, Sasaki et al. 1985, Suzuki et al. 1993).

Für die Untersuchungen zur besonderen Empfindlichkeit von Neugeborenen gegenüber Cu und für die Abschätzung des NOAEL wurden neugeborene Meerschweinchen oral gegenüber Cu exponiert. Der wesentliche Vorteil dieser Tiere ist die relativ einfache Durchführbarkeit der Exposition unmittelbar nach der Geburt und vor allem der dem Menschen ähnliche Stoffwechsel von Cu (Chesta et al. 1989, Srail et al. 1986).

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 Chemikalien

- Cadmiumchlorid „Standard Solution for AAS“, Kupfer(II)chloriddihydrat (A.C.S. Reagenz) (Aldrich, Steinheim)
- ^{109}Cd (37 MBq/mg Cd) in 0,1 M HCl, 'carrier free' (Amersham Buchler, Braunschweig)
- Chelex 100 (100-200 mesh) (Bio-Rad, München)
- Succinat Dinatriumsalz wasserfrei, p-Iodotetrazolium Violett (Fluka-Chemie, Neu-Ulm)
- Nycodenz (Life Technologies, Eggenstein)
- Stickstoff 5,0 (Linde, München)
- Citronensäuremonohydrat, Formaldehyd, mind. 37% säurefrei, Natriumchlorid, Natriumhydroxid, Saccharose, Suprapure 65% HNO_3 , Ethylacetat, Ethanol absolut, Trichloressigsäure (Merck, Darmstadt)
- Acetonitril (Riedel de Haen, Seelze)
- CM-Sephadex (40-200 μm), DEAE-Sephacel (40-150 μm), 2-Mercaptoethanol, p-Nitrophenol, p-Nitrophenolphosphat, Rinderserumalbumin (RIA Grade), Tris-(hydroxymethyl)aminomethan (Tris), Zink(II)sulfatheptahydrat (Sigma Chemie, Deisenhofen)
- Ammoniumtetrathiomolybdat (Ventron-Alfa, Karlsruhe)

Alle Lösungen wurden unter Verwendung von entionisiertem Wasser (Milli-Q UF System, Millipore, Eschborn) hergestellt. Zur Stickstoffsättigung wurden die Lösungen im Ultraschallbad entgast und anschließend bei 4°C mit Stickstoff begast.

2.2 Geräte

- Fraktionssammler Gilson Microcol TDC80 (Abimed Analysetechnik GmbH, Langenfeld)
- Analysenautomat Synchron CX 5, Microfuge E, Ultrazentrifuge Modell Spinco L-2 65 b, Rotor 50 Ti (Beckman Instruments, München)
- Branson-Sonifier B-12 (Branson Sonic Power Company, Danbury, USA)
- Potter-Elvehjem Homogenisator mit Teflonstempel (Braun, Melsungen)
- Gamma-Zähler Modell Minaxi Autogamma 5000 mit 2-Zoll NaI-Detektor (Canberra Packard, Frankfurt a. M.)
- Eppendorf-Schüttler Modell 5432 (Eppendorf, Hamburg)
- Atom-Emissions-Spektrometer Modell JY 70 (Instruments SA, Neukeferloh)
- pH-Meter (Knick, Berlin)
- UV/VIS Spektrophotometer Uvikon 941 Plus (Kontron, Neufahrn)
- Schlittenmikrotom (Leitz, Wetzlar)
- Peristaltische Pumpe 2232 Micro Perpex S (LKB, Bromma)
- Einbettstation Tissue-Tek (Miles Scientific, München)
- Zentrifuge RC-5C, Zentrifuge RC2-B, Rotor SS34, Rotor SA600, Rotor AH-627 (Sorvall, Bad Homburg)
- Metallblock-Thermostat Dri-Block DB-1 (Thermo-Dux, Wertheim)
- TSK G 2000 SW Säulen (7,5 mm x 30 cm, 10 µm), Vorsäule (7,5 mm x 7,5 cm, 10 µm) (Tosohaas, Stuttgart)

2.3 Herkunft und Haltung der Tiere

Ratten

Männliche und weibliche Long Evans Cinnamon (LEC)-Ratten (n=17) wurden von Charles River (Yokohama, Japan) bezogen. Als Kontrollen wurden Wistar-Ratten (n=9) beiderlei Geschlechts (Inzuchtstamm GSF Neuherberg, Deutschland) verwendet. Die Tiere wurden im GSF-Forschungszentrum für Umwelt und Gesundheit, Neuherberg unter Quarantäne in einem 12-stündigen Tag- und Nachtrhythmus bei einer Temperatur von 23-24°C und 50% Luftfeuchtigkeit gehalten. Sie erhielten Standardfutter (Altromin, Lage, Deutschland) (11,0 mg Cu/kg) und Trinkwasser *ad libitum*.

Tabelle 1: Labordiagnostische und histologische Befunde der LEC-Ratten

Gruppe	Alter (Tage) ²	Serum ASAT (U/l) ^{1,2}	Serum Bilirubin (mg/dl) ²	Histologische Befunde der Leber
Wistar (n=9)	55-62 (57 ± 2)	190-311 (246 ± 38)	< 0,5-0,6	negativ
LEC, nicht erkrankt, 56-64 Tage (n=9)	56-64 (59 ± 3)	161-322 (238 ± 42)	< 0,5	negativ
LEC, nicht erkrankt, 70-78 Tage (n=4)	70-78 (75 ± 3)	194-232 (213 ± 15)	< 0,5	negativ
LEC, leicht geschädigte Leber (n=1)	84	520	< 0,5	positiv
LEC, Gelbsucht (n=3)	87-91 (88 ± 2)	990-1065 (1037 ± 33)	11,8-27,7 (17,1 ± 0,5)	positiv

¹ Aspartataminotransferase (Units/l, 37°C)

² Angaben: Bereich (MW ± SD)

Die LEC-Ratten wurden nach Alter bzw. Stadium der Lebererkrankung in 4 Gruppen eingeteilt: Tiere ohne Befund, Alter 56-64 Tage (LEC, nicht erkrankt, 56-64 Tage) bzw. Alter 70-78 Tage (LEC, nicht erkrankt, 70-78 Tage), ein Tier mit beginnender Leberschädigung (LEC, leicht geschädigte Leber) und Tiere mit systemischer Gelbsucht (LEC, Gelbsucht) (Tabelle 1).

Meerschweinchen

Männliche und weibliche Dunkin-Hartley Meerschweinchen (CrI: (HA)BR) wurden von Charles River Wiga, Sulzfeld bezogen. Die Tiere wurden im Umweltbundesamt, Institut für Wasser-, Boden- und Lufthygiene, Außenstelle Bad Elster (n=140) oder im GSF-Forschungszentrum für Umwelt und Gesundheit, Neuherberg (n=10) unter Quarantäne in einem 12-stündigen Tag- und Nachtrhythmus bei einer Temperatur von 23-24°C und 50% Luftfeuchtigkeit gehalten. Die Meerschweinchen erhielten Trinkwasser und Standardfutter (Altromin, Lage) *ad libitum*. Der Cu-Gehalt des Trinkwassers betrug 4,2 µg Cu/l (Bad Elster) bzw. 24,7 µg Cu/l (Neuherberg), der des Standardfutters 18 mg/kg.

2.4 Exposition der Meerschweinchen

Die Exposition der Meerschweinchen gegenüber Cu erfolgte mit Cu-haltiger Formulamilch. Diese wurde aus Kupfer(II)chloriddihydrat ($\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)-haltigen Stammlösungen in destilliertem Wasser und Muttermilchersatznahrung (Altromin, Lage) hergestellt. Die Stammlösungen enthielten 151,5; 227,3 bzw. 454,6 mg Cu/100 ml. Die Endkonzentrationen an Cu in der Formulamilch betrugen 0,303; 0,455 bzw. 0,909 mg/ml. Die Meerschweinchen erhielten von der Cu-haltigen Formulamilch täglich 1 ml pro 30 g Körpergewicht entsprechend einer täglichen Dosis von 10, 15 bzw. 30 mg Cu/kg Körpergewicht (KG).

Vom 1. bzw. 2. Lebenstag an wurde den neugeborenen Meerschweinchen die Cu-haltige Formulamilch werktags in drei- bis viermaliger Gabe und am Wochenende in ein- bis zweimaliger Gabe oral verabreicht. Die Kontrolltiere erhielten entsprechende Volumina Muttermilchersatznahrung ohne Cu-Zusatz. Die Tiere wurden zusätzlich von ihren Müttern gesäugt. Im Alter von 28 Tagen wurden die Tiere abgesetzt und erhielten Trinkwasser mit 100, 150 bzw. 300 mg Cu/l *ad libitum*. Mit der Annahme eines Wasserkonsums von 50 ml pro Tag und Tier entsprechen diese Cu-Konzentrationen einer täglich aufgenommenen Dosis von 10, 15 bzw. 30 mg Cu/kg KG/Tag. Die Kontrolltiere bekamen Trinkwasser ohne Cu-Zusatz *ad libitum*. Während der gesamten Versuchsdauer wurde das Allgemeinbefinden der

Tiere mehrmals täglich kontrolliert. Das Körpergewicht wurde während der ersten vier Wochen täglich und am jeweiligen Versuchsende bestimmt.

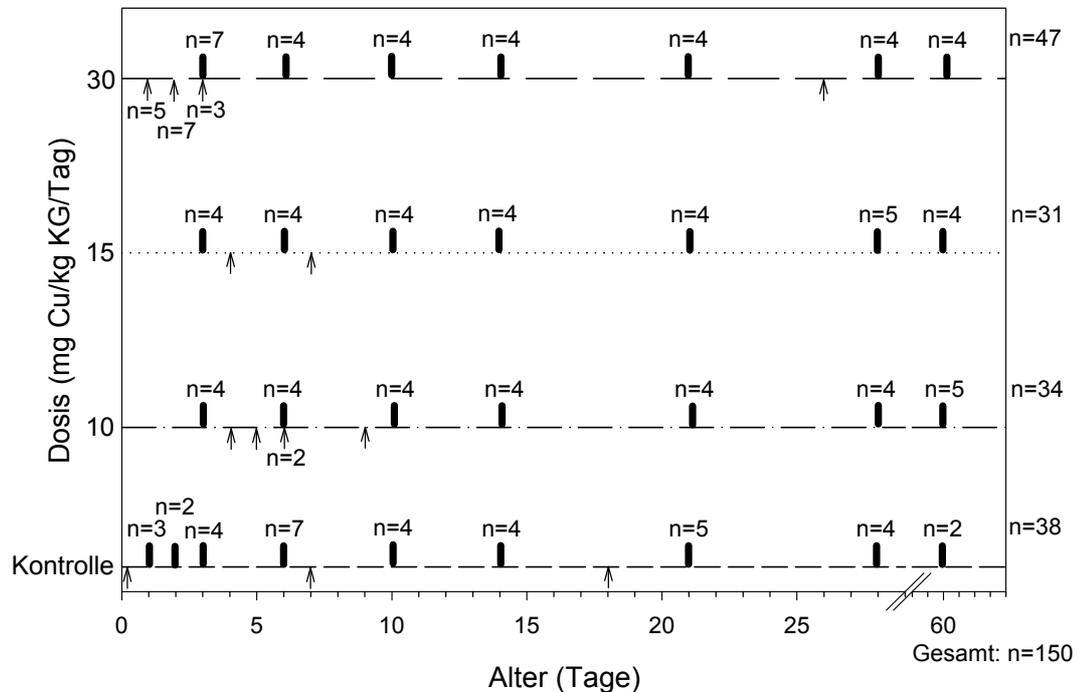


Abbildung 1: Schematische Darstellung des Versuchsablaufs. Die Balken kennzeichnen das Alter und die Anzahl der Meerschweinchen am jeweiligen Versuchsende. Die Pfeile kennzeichnen die Zeitpunkte der schwer erkrankten oder verstorbenen Tiere (n=1 falls nicht anders gekennzeichnet)

Im Alter von 3, 6, 10, 14, 21, 28 und 60 Tagen wurden je 2-7 Cu-exponierte bzw. Kontrolltiere getötet (Abbildung 1). Während des Versuchs verstarben 3 Kontrolltiere, 5 Tiere der Dosisgruppe 10 mg Cu/kg KG/Tag, 2 Tiere der Dosisgruppe 15 mg Cu/kg KG/Tag und 11 Tiere der Dosisgruppe 30 mg Cu/kg KG/Tag. Außerdem erkrankten 5 Tiere der Dosisgruppe 30 mg Cu/kg KG/Tag schwer und wurden aus ethischen Gründen getötet.

Tabelle 2: Täglich verabreichte Cu-Dosis über die Formulamilch (1-27 Tage)

Theoretische Dosis (mg Cu/kg KG/Tag)	Verabreichte Dosis (mg Cu/kg KG/Tag) ¹
10	9,0 ± 1,8 (n=442)
15	14,3 ± 1,6 (n=441)
30	27,3 ± 4,9 (n=437)

¹ MW ± SD (n)

2.5 Probenvorbereitung

Die Tiere wurden unter Äther- bzw. Nembutalanästhesie entblutet, Serum für die Bestimmung von Leberenzymen und Bilirubin gewonnen und die Gewichte von Leber, Niere, Milz, Thymus und Gehirn bestimmt. Leber und Nieren wurden in kaliumphosphatgepuffertem, 4-prozentigen Formalin bzw. in neutralem 10-prozentigen Formalin in Trispuffer (10 mM Tris-HCl, 250 mM Saccharose, pH 7,4) fixiert und für die Histologie zurückgestellt.

Die in Formalin fixierten Organe wurden in Paraffin eingebettet und 2 µm dicke Schnitte angefertigt. Nach der Färbung mit Hämatoxylin und Eosin wurden die Schnitte lichtmikroskopisch untersucht.

Teile von Lebern und Nieren wurden unter Eiskühlung mit 4 bzw. 9 Volumenteilen 10 mM Tris-HCl, 250 mM Saccharose, pH 7,4 (TS-Puffer) im Potter-Elvehjem-Homogenisator homogenisiert. Jeweils 0,5 ml der Homogenate wurden zur Bestimmung der Gewebe-Cu-Gehalte zurückgestellt. Ein Aliquot des Homogenats (2 ml) wurde eine Stunde bei 100.000 x g (50 Ti Rotor) zentrifugiert. Nach dem Entfernen der Fettschicht wurde der jeweilige Überstand (Zytosol, S100) in Eppendorf Reaktionsgefäße portioniert und bis zur Analyse von Metallothionein, Cu und des Proteingehaltes bei -70°C aufbewahrt.

2.5.1 Isolierung subzellulärer Fraktionen der Leber

Die Isolierung der subzellulären Fraktionen der Leber erfolgte zunächst über differentielle Zentrifugation des Leberhomogenates (Abbildung 2).

Hierzu wurden 10-15 ml des Homogenats bei 10.700 x g (Rotor Sorvall SA600 bzw. SS34) für 20 min zentrifugiert. Das Pellet wurde in 20 ml TS-Puffer suspendiert und bei 120 x g (Rotor Sorvall SA600 bzw. SS34) für 10 min zentrifugiert. Dieser Vorgang wurde zweimal wiederholt und das resultierende Pellet (Kerne, Membranbruchstücke) wurde in 10 ml TS-Puffer resuspendiert. Diese Suspension wird im Folgenden als Kernfraktion bezeichnet. Die Fraktion der vereinigten Überstände, vorwiegend bestehend aus Lysosomen und Mitochondrien wurde bei 23.000 x g (Rotor Sorvall SA600 bzw. SS34) für 10 min zentrifugiert. Um zytosolische Verunreinigungen abzutrennen wurde das resultierende Pellet zweimal mit 30 ml TS-Puffer resuspendiert und zentrifugiert. Das resultierende Pellet wurde in 8 ml TS-Puffer resuspendiert (lysosomal-mitochondriale Fraktion). Die Kernfraktion und die lysosomal-mitochondriale Fraktion wurden bis zur Bestimmung von Metallothionein, Cu und Protein bei -70°C aufbewahrt.

Zur Isolierung von Lysosomen und Mitochondrien wurde ein nichtionischer Dichtegradient von 5-(N-2,3-dihydroxypropylacetamido)-2,4,6-triiodo-N,N'-bis(2,3-dihydroxypropyl)-isophthalamid (Nycodenz) verwendet. Auf Grund der geringen Osmolarität und Viskosität des Materials (Graham et al. 1990, Rickwood et al. 1982) konnten niedrigere Zentrifugationsgeschwindigkeiten erreicht werden, die es ermöglichten die Membranintegrität weitgehend zu erhalten und höhere Ausbeuten zu erzielen.

Die Trennung der Lysosomen und Mitochondrien erfolgte über einen Dichtegradienten folgender Zusammensetzung: 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. Je 2 ml der lysosomal-mitochondrialen Fraktion wurde über dem Dichtegradienten in einem Swing-Out-Rotor (AH-627, Sorvall) bei 52.000 x g für 3 Stunden zentrifugiert. Anschließend wurden Fraktionen von 1 ml Volumen gesammelt und bis zur Analyse von Cu und Protein bei -70°C aufbewahrt. Die mit Lysosomen bzw. Mitochondrien angereicherten Fraktionen wurden anhand der Leitenzymaktivitäten

Saure Phosphatase (Lysosomen) und Succinatdehydrogenase (Mitochondrien) identifiziert.

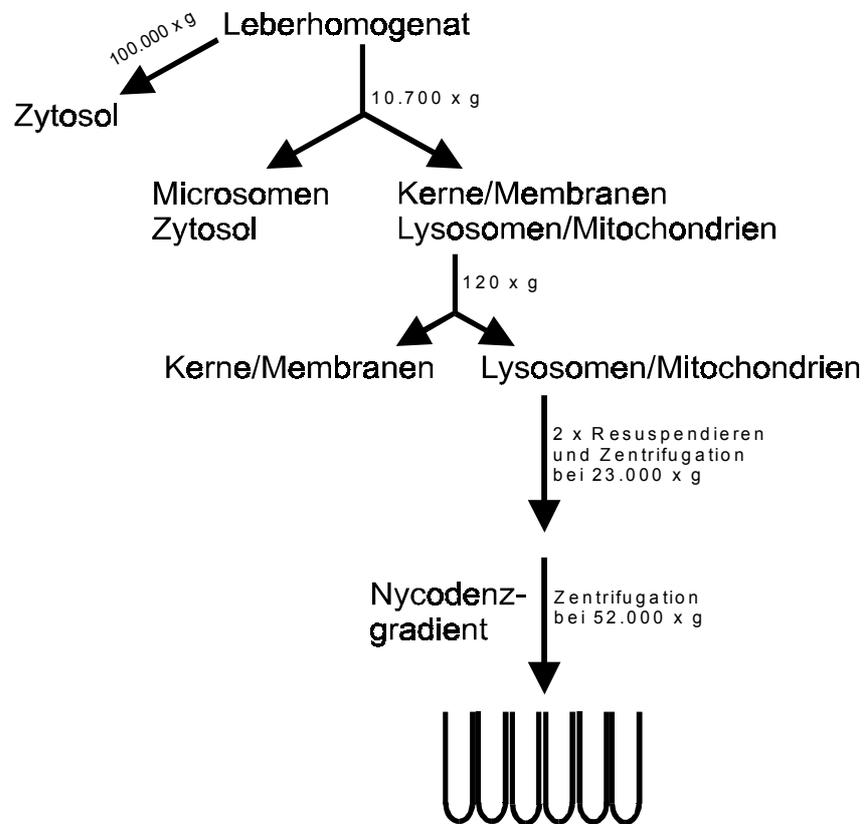


Abbildung 2: Schematische Darstellung zur Isolierung von Zytosol und zellulären Organellen durch differenzielle Zentrifugation

2.6 Analytische Verfahren

2.6.1 Gelchromatographie mittels HPLC

Mit der Gelpermeationschromatographie wurden die metallbindenden Proteine im Zytosol der Leber von LEC-Ratten getrennt.

Die stationäre Phase bestand aus zwei TSK G 2000 SW Säulen (7,5 mm x 30 cm, 10 µm und 7,5 mm x 7,5 cm, 10 µm als Vorsäule, Tosohaas, Stuttgart). Als mobile Phase wurde 50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, pH 7,4 verwendet. Im Eluat wurde die optische Dichte bei 254 nm aufgezeichnet. Bei einer Flussrate von 1 ml/min

wurden Fraktionen von 1 ml gesammelt und der Cu-Gehalt in den Fraktionen bestimmt.

2.6.2 Bestimmung von Metallothionein

Die Bestimmung von Metallothionein (MT) beruht auf der Sättigung des Proteins mit Cd und der konstanten Cd/MT-Stöchiometrie. Dabei wird an MT gebundenes Zn gegen Cd ausgetauscht (Cd-Chelex-Test, Bartsch et al. 1990). Aus dem konstanten molaren Verhältnis $Cd/MT = 7$ (Kägi et al. 1974, Nordberg und Nordberg 1975) lässt sich über die Quantifizierung des Cd-Gehaltes der MT-Gehalt bestimmen.

Wegen der im Vergleich zu Cd höheren Affinität von Cu zu MT wird zur Bestimmung von Cu-haltigem MT (Cu-MT) das Metall zuvor mit Ammoniumtetrathiomolybdat (TM) aus dem Protein entfernt. Anschließend kann das Apoprotein mit Cd gesättigt werden (Thiomolybdat-Test, Klein et al. 1990). Oxidierte Formen von MT können durch Cd-Sättigung nicht direkt erfasst werden, da die Oxidation der Thiolgruppen zum Verlust der Metallbindungskapazität führt. Werden jedoch die oxidierten Thiolgruppen durch Inkubation mit 2-Mercaptoethanol (2-ME) reduziert und wird gleichzeitig Zn zur Stabilisierung der Thiolgruppen angeboten, so kann in dem dann gebildeten Zn-MT das Metall gegen Cd ausgetauscht werden (ME-Test, Klein et al. 1994). Aus der Differenz der Ergebnisse von ME- und Thiomolybdat-Test wird die Menge an oxidiertem MT erhalten. Der prozentuale Anteil von oxidiertem MT ergibt sich aus dem Verhältnis der Menge an oxidiertem MT zur Menge an Gesamt-MT, die mit dem ME-Test bestimmt wird. Analog berechnet sich die Menge an Cu-haltigem MT aus der Differenz der Ergebnisse von Thiomolybdat- und Cd-Chelex-Test (Abbildung 3).

Die Ionenaustauscher CM-Sephadex, DEAE-Sephacel und Chelex 100 wurden vor Gebrauch in zehn Volumenteilen 10 mM Tris-HCl, 1 M NaCl, pH 7,4 gewaschen, anschließend mit zehn Volumenteilen Testpuffer (10 mM Tris-HCl, 85 mM NaCl, pH 7,4) äquilibriert und als 66-prozentige Suspension im Test eingesetzt. 2-ME und TM wurden vor dem Test jeweils frisch in Testpuffer angesetzt.

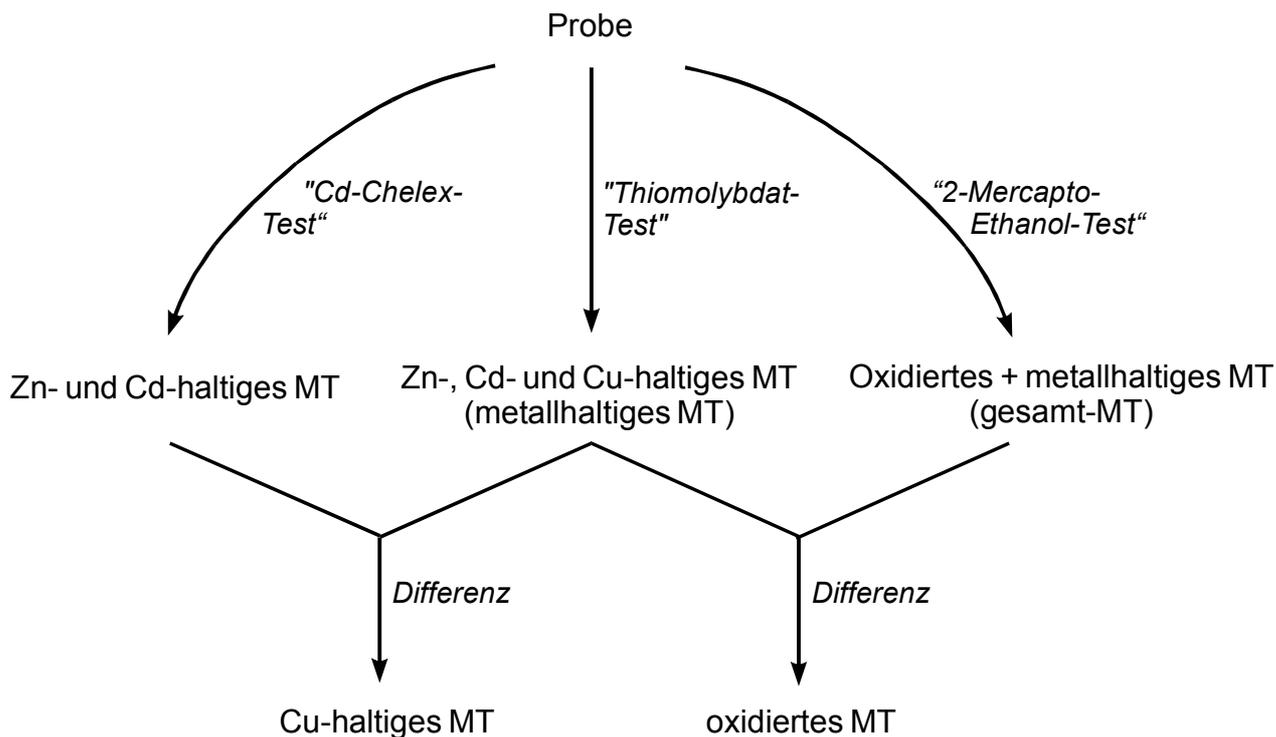


Abbildung 3: Schematische Darstellung der Analytik von Metallothionein (MT)

Im einzelnen wurden 100 µl Probe mit 10 µl einer 300 mM $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ -Lösung versetzt und anschließend für 30 min mit 10 µl 140 mM 2-ME-Lösung bzw. Testpuffer inkubiert. Das Gemisch wurde mit 120 µl Acetonitril versetzt und geschüttelt. Nach 3 min wurden 500 µl Testpuffer und 100 µl CM-Sephadex-Suspension zugegeben und 3 min geschüttelt. Anschließend wurde mit 50 µl Rinderserumalbuminlösung (30 mg/ml in Testpuffer) für 2 min inkubiert, die Proben mit 20 µl 500 µM TM-Lösung bzw. Testpuffer versetzt und weitere 2 min inkubiert. Nach Zusatz von 100 µl DEAE-Sephacel-Suspension wurden die Proben erneut 3 min geschüttelt und danach 3 min bei 8.000 x g zentrifugiert. 600 µl Überstand wurden mit 10 µl einer mit ^{109}Cd markierten CdCl_2 -Lösung (ca. 40 µg Cd/ml, 0,45 µCi/µg Cd) 5 min inkubiert und anschließend mit 100 µl Chelex-100 Suspension versetzt. Die Mischung wurde 20 min geschüttelt und 1 min bei 8.000 x g zentrifugiert. 500 µl des Überstands wurden 3 min mit 500 µl Acetonitril inkubiert und nach dreiminütiger Zentrifugation bei 8.000 x g wurden 900 µl des Überstands im Gamma-Zähler auf ihren Cd-Gehalt analysiert.

Die Berechnung der MT-Menge, bezogen auf ml Lösung bzw. mg Protein, erfolgte nach folgender Formel:

$$MT (\mu\text{g/ml}) = (c_{\text{Cd}} - c_{\text{L}}) \times F_{\text{V}} \times F_{\text{K}} \text{ bzw. } MT (\mu\text{g/mg Protein}) = (c_{\text{Cd}} - c_{\text{L}}) \times F_{\text{V}} \times F_{\text{K}} / c_{\text{Prot}}$$

c_{Cd} : Cd-Konzentration im Überstand ($\mu\text{g/ml}$)

c_{L} : Leerwert; statt der Probe wurden 100 μl Testpuffer eingesetzt

c_{Prot} : Proteinkonzentration (mg/ml)

F_{V} : Verdünnungsfaktor des Tests: 2,39

F_{K} : Konversionsfaktor (8,39) auf Grund der Molmasse von MT = 6.600, der Atommasse von Cd = 112,4 und des molaren Verhältnisses Cd/MT = 7

2.6.3 Kupferanalytik

Für die Analytik von Cu wurde ein Atom-Emissions-Spektrometer mit Plasmaanregung (ICP-AES, Instruments SA, Neukeferloh) (Schramel et al. 1982) eingesetzt. Die Richtigkeit der verwendeten Methode wurde durch Messung von Referenzproben (Aldrich, Steinheim) sichergestellt. Vor der Messung wurde 0,3 ml Probe mit 1,5 ml suprapurer 65% HNO_3 inkubiert und nach 24 Stunden mit 1,2 ml suprapurem H_2O versetzt.

2.6.4 Proteinbestimmung

Die Proteinbestimmung in den Zytosolen, in den Kernfraktionen und den lysosomal-mitochondrialen Fraktionen erfolgte nach der Biuret-Methode (Dumas et al. 1981). Der Proteingehalt in den Fraktionen des Dichtegradienten wurde nach der Methode von Bradford (Bradford 1976) bestimmt. Als Standard wurde jeweils Rinderserumalbumin eingesetzt.

2.6.5 Bestimmung von Enzymaktivitäten und Bilirubin

Die Aktivität der Sauren Phosphatase wurde über die kolorimetrische Quantifizierung von p-Nitrophenol bestimmt, das durch die Saure Phosphatase aus p-Nitrophenolphosphat freigesetzt wird (Andersch und Szczypinski 1947). 100 μl p-Nitro-

phenolphosphat-Lösung (15,2 mM in bidestilliertem H₂O), 100 µl Citrat-Puffer (90 mM Citrat, 10 mM NaCl, pH 4,8) und 40 µl Probe wurden 30 min bei 37°C inkubiert. Nach Zugabe von 1 ml 0,1 N NaOH wurde die Absorption bei 410 nm gemessen. Die Messwerte wurden um die Absorption der Proben (40 µl) in 1,2 ml 0,1 N NaOH korrigiert. Der p-Nitrophenol-Gehalt der Proben wurde über eine Eichgerade aus Verdünnungen von p-Nitrophenol in 0,02 N NaOH bestimmt. Eine Einheit an Enzymaktivität der Phosphatase setzt pro Stunde 60 nmol p-Nitrophenol aus p-Nitrophenolphosphat frei (Bessey et al. 1946). Die Bestimmung der Enzymaktivität der Succinatdehydrogenase erfolgte über die Reduktion von p-Iodonitrotetrazolium Violett (Graham et al. 1990). 280 µl Succinat (10 mM in 0,05 M Phosphatpuffer pH 7,4) und 20 µl Probe wurden 10 min bei 37°C inkubiert. Nach der Zugabe von 1 ml Ethylacetat/Ethanol/Trichloressigsäure (5:5:1) wurde die Absorption des entstandenen Reaktionsproduktes bei 490 nm gemessen. Der Gehalt an direktem Bilirubin im Serum und die Serumaktivitäten von Aspartataminotransferase (ASAT), Alaninaminotransferase (ALAT), γ -Glutamyltransferase (γ GT) wurden mit Hilfe eines Analysenautomaten (Synchron CX 5, Beckman Instruments, München) nach Standardmethoden (Henry 1991, Jendrassik und Grof 1983, Szasz 1969) ermittelt.

2.7 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

3.1 Methodische Vorarbeiten zur subzellulären Lokalisation und Bindung von Cu in der Leber

Die Methoden zur Charakterisierung der Lokalisation und Bindung von Cu in der Leber der Cu-exponierten Meerschweinchen wurden an der Long-Evans-Cinnamon (LEC)-Ratte erarbeitet.

Die Abbildungen 4, 5 und 7 zeigen die Gehalte von Cu in verschiedenen Fraktionen der Leber von LEC-Ratten in Abhängigkeit des Alters der Tiere bzw. des Grades der Leberschädigung.

Bis zum Alter von 78 Tagen nahmen die Cu-Gehalte in der Leber der Tiere zu und blieben bei Fortschreiten der Leberschädigung in etwa auf dem gleichem Niveau (Abbildung 4). Im partikulären Teil der Leber stiegen die Cu-Gehalte mit dem Alter und dem Leberschaden kontinuierlich an und betragen bei Tieren mit Gelbsucht im Mittel 240 µg/g FG etwa 6-mal mehr als bei 56-64 Tage alten, gesunden LEC-Ratten.

Im Gegensatz dazu nahm der Cu-Gehalt im Zytosol mit fortschreitender Leberschädigung ab (Abbildung 5). Unter Berücksichtigung der entsprechenden Konzentrationen an Cu-haltigem MT (nicht gezeigt) ergibt sich, dass das zytosolische Cu unabhängig vom Alter bzw. Grad der Leberschädigung nahezu ausschließlich an MT gebunden ist (Abbildung 5, Abbildung 6).

In der geschädigten Leber von LEC-Ratten fanden sich hohe Gehalte von Cu in der partikulären Fraktion. Während die Fraktionen, die vor allem Mikrosomen bzw. Kerne und Membranfragmente enthielten, nur geringe Cu-Mengen aufwiesen (nicht gezeigt), fand sich der überwiegende Teil des Metalls in der lysosomal-

mitochondrialen Fraktion. Der parallele Verlauf der Cu- und MT-Gehalte in dieser Fraktion (Abbildung 7) lässt den Schluss zu, dass MT bei der Bindung dieses Cu eine zentrale Bedeutung zukommt. Eine genauere Bestimmung der Lokalisation des Cu in der lysosomal-mitochondrialen Fraktion erfolgte durch Trennung der Lysosomen von den Mitochondrien mit Hilfe der Dichtegradientenzentrifugation. Wie aus dem Verlauf der lysosomen- bzw. mitochondrienspezifischen Enzyme hervorgeht (Abbildung 8), konnte ein gutes Trennergebnis durch die Verwendung von Nycodenz als Matrix in einem diskontinuierlichen Gradienten folgender Zusammensetzung erzielt werden: 1 ml 40%, 1 ml 33%, 3 ml 28%, 2 ml 27% und 2 ml 24% Nycodenz.

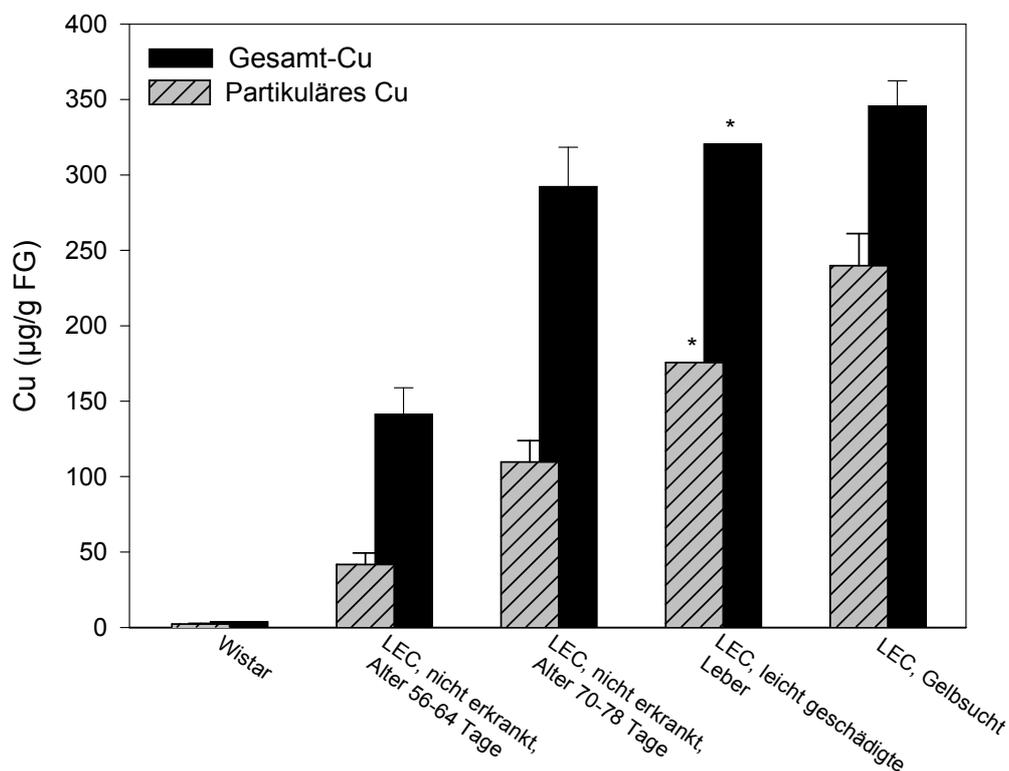


Abbildung 4: Gesamt-Cu und partikuläres Cu in der Leber von LEC-Ratten. MW ± SD (n=3-9), * Einzelwert. Der Cu-Gehalt im partikulären Teil der Leber, welcher Kerne, Zellorganellen und Membranfragmente enthält, wurde aus der Differenz des Gesamt-Cu-Gehaltes und dem Cu-Gehalt im Zytosol berechnet

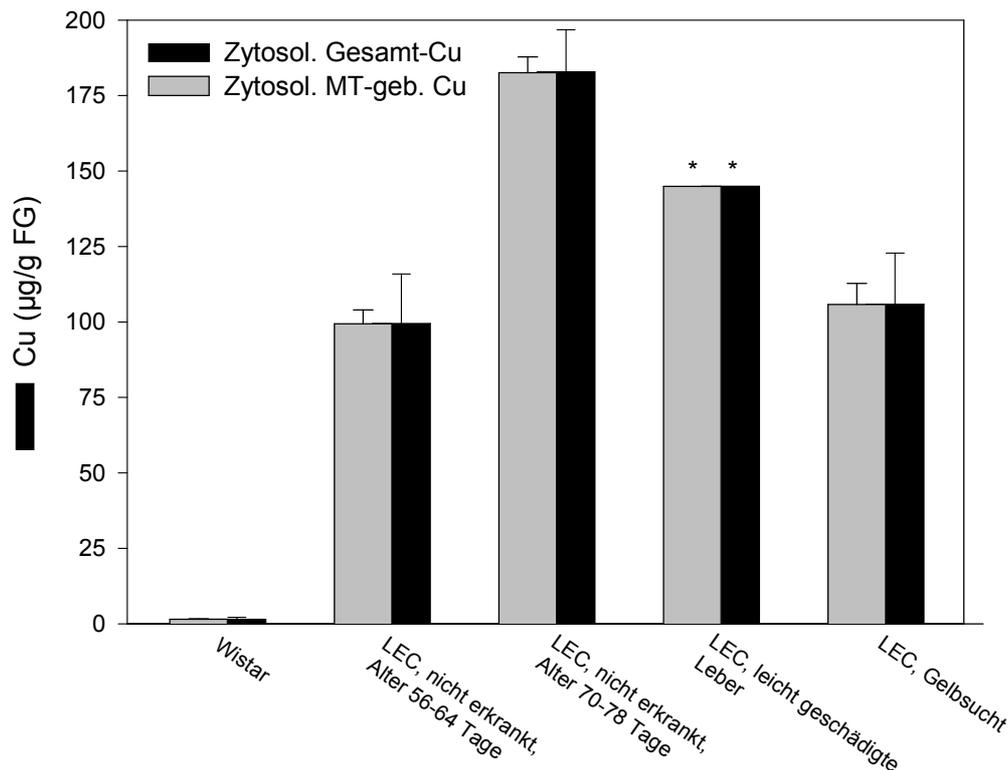


Abbildung 5: Cu im Zytosol der Leber von LEC-Ratten. MW ± SD (n=3-9), * Einzelwert. MT-geb. Cu: an MT gebundenes Cu

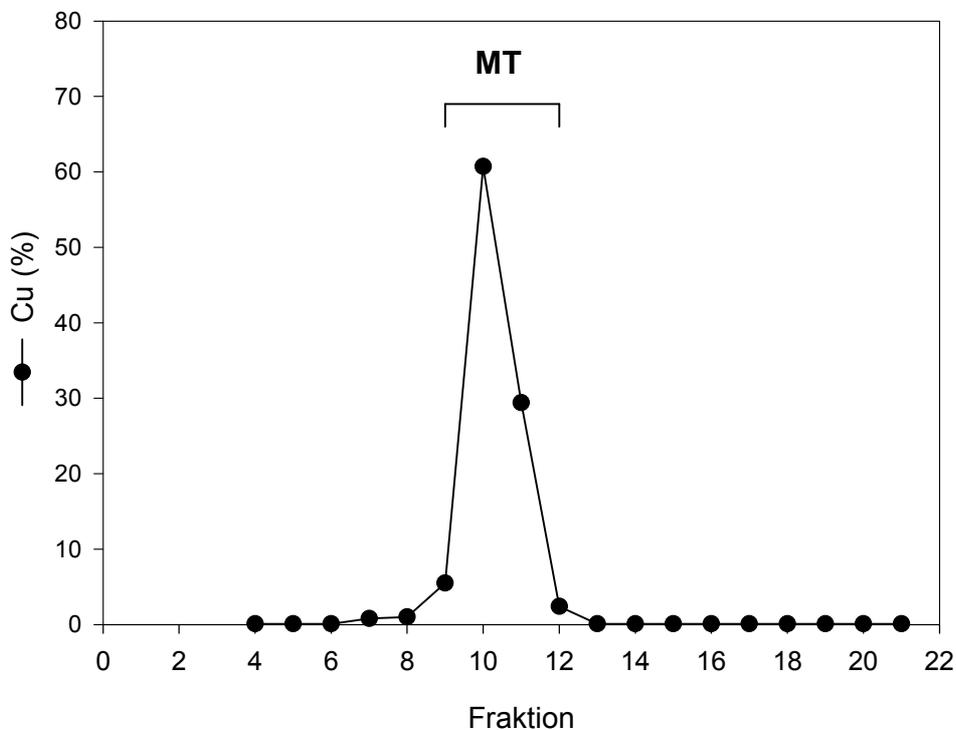


Abbildung 6: Elutionsprofil von Cu nach gelchromatographischer Trennung (HPLC) des Leberzytosols einer LEC-Ratte mit Gelbsucht. Die Klammer kennzeichnet die Fraktionen, bei denen gereinigtes Standard-MT eluiert

Abgesehen von den Fraktionen 1 und 11 fand sich Cu vor allem in den lysosomenspezifischen Fraktionen (Abbildung 9). In Mitochondrien wurde hingegen nur eine geringe Erhöhung der Cu-Konzentrationen festgestellt. Cu in der Fraktion 11 ist auf Restanteile von Zytosol zurückzuführen. Die bei geschädigten Lebern außergewöhnlich hohen Cu-Konzentrationen in der Fraktion 1 sind nach ultrastrukturellen Untersuchungen lysosomalen Ursprungs, stammen jedoch aus den residenten Makrophagen der Leber, den Kupfferschen Sternzellen (nicht gezeigt).

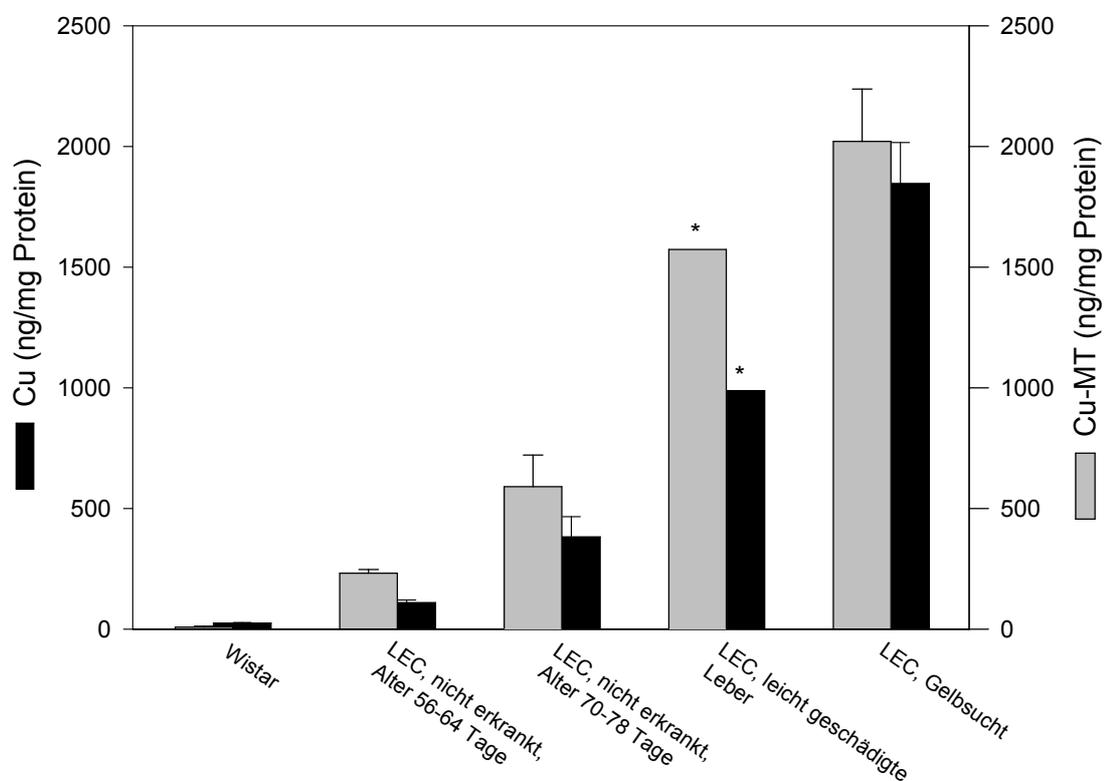


Abbildung 7: Cu und Cu-haltiges MT (Cu-MT) in der lysosomal-mitochondrialen Fraktion der Leber von LEC-Ratten. MW ± SD (n=3-9), * Einzelwert

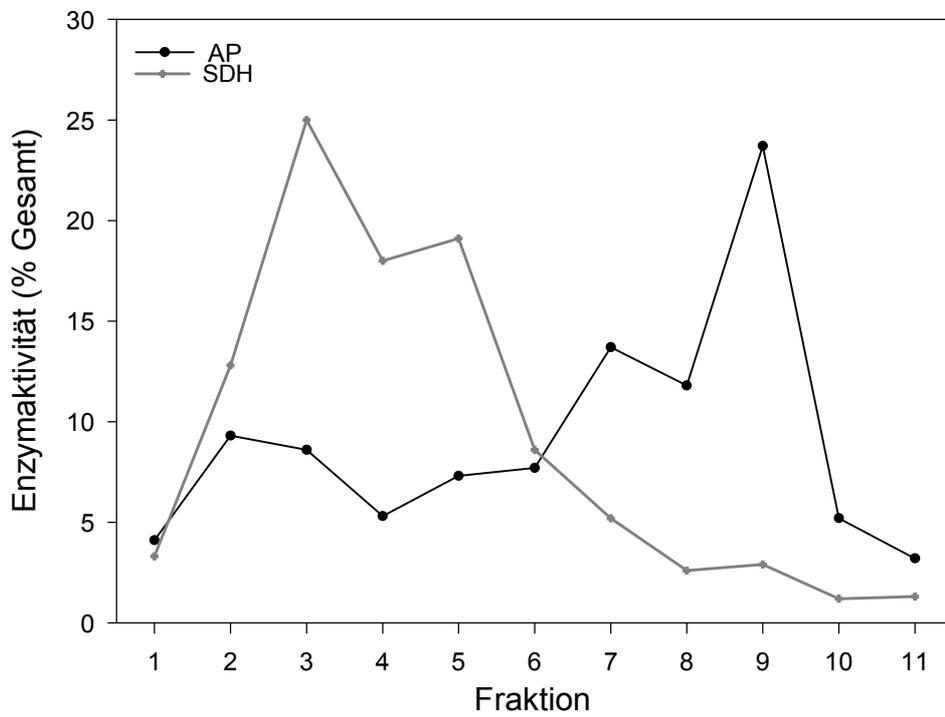


Abbildung 8: Typische Verteilung der Aktivitäten der lysosomen-spezifischen Sauren Phosphatase (AP) und der mitochondrien-spezifischen Succinatdehydrogenase (SDH) der über einen Dichtegradienten getrennten lysosomal-mitochondrialen Fraktion der Leber von LEC-Ratten. Diskontinuierlicher Gradient: 1 ml 40%, 1 ml 33%, 3 ml 8%, 2 ml 27% und 2 ml 24% Nycodenz, MW (n=26)

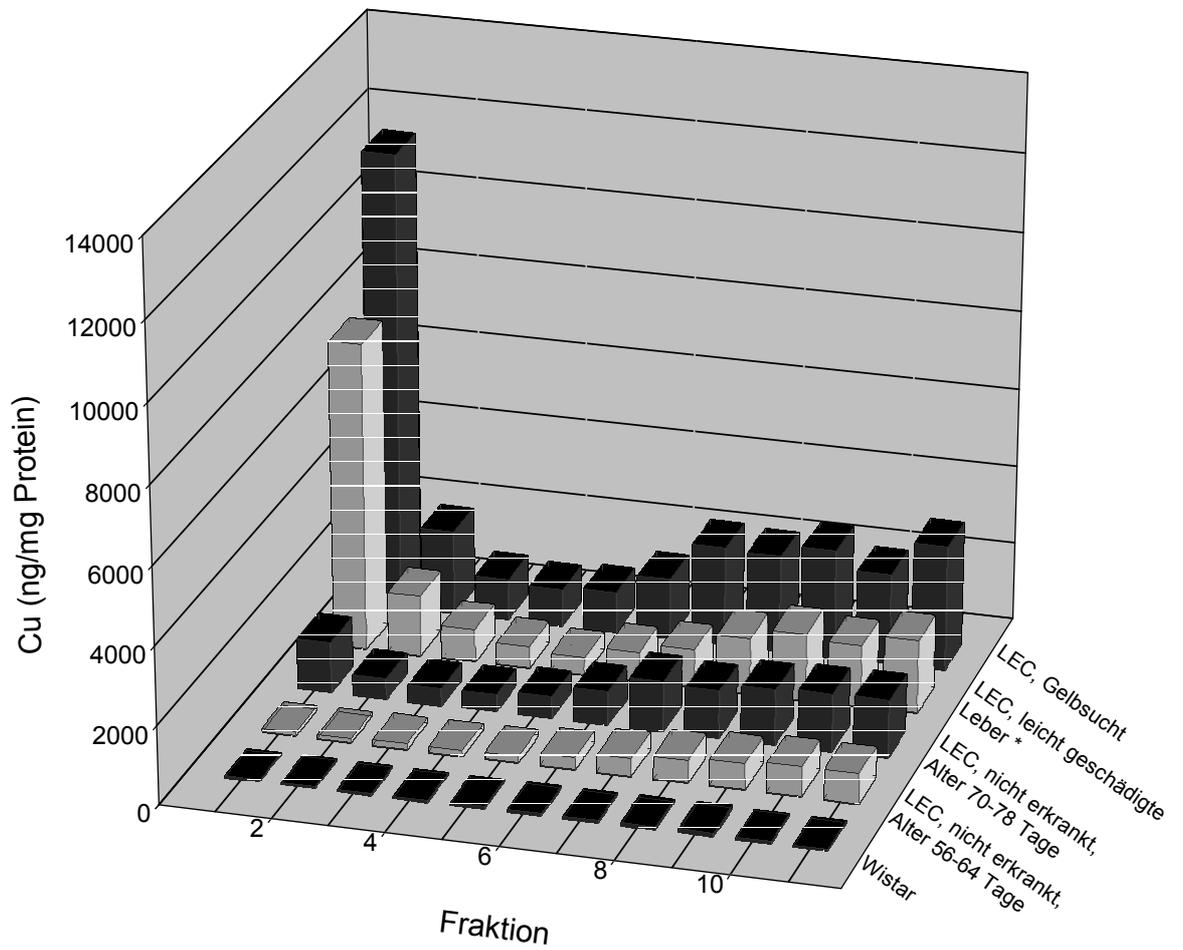


Abbildung 9: Cu in den Fraktionen der über einen Dichtegradienten getrennten lysosomal-mitochondrialen Fraktion der Leber von LEC-Ratten, MW ± SD (n=3-9), * Einzelwert

3.2 Zur Toxizität von Cu bei juvenilen Meerschweinchen

Von den insgesamt 150 Meerschweinchen zeigten 124 Tiere während der gesamten Versuchsdauer keine Krankheitssymptome. Es verstarben 21 Tiere, davon 18 Cu-exponierte und 3 Kontrolltiere (Tabelle 3). Bei den 3 Kontrolltieren sowie 9 von 18 der Cu-exponierten verstorbenen Meerschweinchen war die Todesursache ein akutes schockbedingtes Lungenemphysem. Zwei Tiere verstarben an inneren Blutungen bzw. an Nephrose (Tabelle 3). Bei diesen 14 Tieren bestand offensichtlich kein Zusammenhang zwischen der Cu-Exposition und der Todesursache, so dass sie im Ergebnisteil nicht berücksichtigt wurden. Sieben verstorbene Tiere der höchsten Dosisgruppe zeigten neben den Leberauffälligkeiten (Tabelle 5) eine Enteritis (Tabelle 3). Darüberhinaus erkrankten 5 Cu-exponierte Tiere der höchsten Dosisgruppe nach 1-3 Tagen schwer und wurden aus humanitären Gründen getötet. Bei diesen Tieren wurde ebenfalls eine Enteritis sowie eine auffällige Leber beobachtet.

Im Folgenden werden die Untersuchungsergebnisse der Cu-exponierten Meerschweinchen ohne Symptome getrennt von denen der verstorbenen bzw. moribunden Tiere dargestellt.

3.2.1 Leberenzyme und Bilirubin im Serum

Meerschweinchen ohne Symptome

Die Aktivitäten von Leberenzymen im Serum der Cu-exponierten Tiere lagen zum größten Teil im Bereich der Kontrollwerte (Tabelle 4). Vereinzelt waren die Enzymaktivitäten statistisch signifikant erhöht bzw. erniedrigt. Die Gehalte von direktem Bilirubin im Serum der Cu-exponierten Meerschweinchen waren bis auf eine Ausnahme gleich denen der Kontrolltiere (Tabelle 4).

Tabelle 4: Aktivitäten von Leberenzymen und Gehalte an direktem Bilirubin im Serum von Cu-exponierten Meerschweinchen ohne Symptome

Parameter	Alter (Tage)	Dosis (mg Cu/kg KG/Tag)			
		Kontrolle	10	15	30
ASAT ¹	1	92 ± 47	-	-	-
	3	118 ³	140 ± 60	87 ± 2	164 ± 68
	6	216 ± 30	196 ± 62	170 ± 70	n. b.
	10	112 - 119 ⁴	151 ± 64	94 ± 35	213 ± 43*
	14	100 ± 16	113 ± 7	90 ± 20	169 ± 76
	21	118 ± 28	85 ± 18	74 ± 11*	151 ± 5
	28	93 ± 21	84 ± 22	122 ± 98	75 ± 18
	60	50 - 79 ⁴	79 ± 14	115 ± 56	191 ± 71
ALAT ¹	1	45 ± 1	-	-	-
	3	42 ³	39 ± 17	17 ± 10	42 ± 11
	6	52 ± 30	56 ± 27	38 ± 7	n. b.
	10	38 - 38 ⁴	46 ± 22	36 ± 5	49 ± 3*
	14	32 ± 6	36 ± 3	36 ± 3	52 ± 13*
	21	41 ± 5	36 ± 3	37 ± 5	52 ± 2*
	28	47 ± 9	42 ± 9	51 ± 18	46 ± 6
	60	41 - 46 ⁴	52 ± 21	59 ± 12	92 ± 41
γGT ¹	1	11 ± 2	-	-	-
	3	3 ³	7 ± 4	4 ± 2	5 ± 1
	6	12 ± 5	7 ± 2	8 ± 1	n. b.
	10	9 - 20 ⁴	9 ± 2	11 ± 3	8 ± 3
	14	13 ± 3	13 ± 3	9 ± 2	12 ± 2
	21	12 ± 3	21 ± 10	12 ± 2	17 ± 4
	28	11 ± 3	14 ± 2	10 ± 5	19 ± 8
	60	23 - 23 ⁴	14 ± 4*	21 ± 3	12 ± 3*
D-Bili ²	1	0,12 ± 0,04	-	-	-
	3	0,30 ³	0,10 ± 0,05	0,19 ± 0,12	0,20 ± 0,08
	6	0,15 ± 0,17	0,27 ± 0,10	0,23 ± 0,03	n. b.
	10	0,09 - 0,23 ⁴	0,34 ± 0,19	0,06 ± 0,04	0,24 ± 0,06
	14	0,10 ± 0,05	0,17 ± 0,06	0,07 ± 0,06	0,10 ± 0,07
	21	0,11 ± 0,10	0,10 ± 0,04	0,01 ± 0,01	0,13 ± 0,04
	28	0,04 ± 0,03	0,03 ± 0,03	0,01 ± 0,02	0,10 ± 0,05
	60	0,01 - 0,10 ⁴	0,18 ± 0,05*	0,05 ± 0,04	0,05 ± 0,04

¹ Angaben in U/l (37°C), MW ± SD, n=3-5

² Angaben in mg/dl, MW ± SD, n=3-5

³ Einzelwert

⁴ n=2, Bereich

* signifikant verschieden von der Kontrolle (p<0,05)

ASAT: Aspartataminotransferase, ALAT: Alaninaminotransferase, γGT: γ-Glutamyltransferase, D-Bili: Direktes Bilirubin

n. b.: nicht bestimmt

Verstorbene und moribunde Meerschweinchen

Bei den verstorbenen sowie 3 der 5 moribunden Cu-exponierten Meerschweinchen konnte kein Serum gewonnen werden. Bei den beiden anderen moribunden Tieren waren die Aktivitäten der ASAT und ALAT im Vergleich zu den Kontrolltieren um das 5- bzw. 2-fache erhöht (nicht gezeigt). Die Aktivitäten der γ GT lagen bei beiden Tieren im Bereich der Kontrollen, und der Gehalt an direktem Bilirubin war bei einem der beiden Meerschweinchen auf 0,68 mg/dl erhöht (Kontrolle 0,30 mg/dl).

3.2.2 Histologische Untersuchung der Leber

Meerschweinchen ohne Symptome

Bis zu einem Alter von 6 Tagen wurden Verfettungen sowie fettige Degenerationen der Leberzellen sowohl bei den Cu-exponierten Meerschweinchen als auch bei den Kontrolltieren beobachtet.

Degenerative Veränderungen der Leberzellen wie die trübe Schwellung und vakuoläre Degenerationen wurden ausschließlich bei Cu-exponierten Tieren festgestellt (Tabelle 5). In der niedrigsten Dosisgruppe wurde die trübe Schwellung der Leberzellen erstmals nach einer Expositionszeit von 14 Tagen bei einem von 4 Tieren beobachtet. Diese Veränderungen traten in der mittleren Dosisgruppe bei jeweils einem von 4 Tieren nach 21 bzw. 60 Tagen und bei 3 von 5 Tieren nach 28 Tagen Exposition auf. In der höchsten Dosisgruppe wurde die trübe Schwellung bereits nach dreitägiger Exposition bei einem von 5 Tieren gefunden.

Vakuoläre Degenerationen wurden unabhängig von der Dosis und Expositionszeit bei etwa 50% der Cu-exponierten Meerschweinchen beobachtet (Tabelle 5).

Kernuntergänge wurden bis zu einem Alter von 6 Tagen sowohl bei den exponierten als auch bei den Kontrolltieren festgestellt (Tabelle 5). Ab einem Alter von 10 Tagen traten Kernuntergänge nur in der Leber der exponierten Meerschweinchen auf. Mesenchymale Reaktionen wurden unabhängig von Alter und Dosis bei über

Tabelle 5: Histologische Befunde der Leber von Cu-exponierten Meerschweinchen¹

Tiergruppe/Dosis	Alter (Tage)	Histologische Befunde			
		KU ²	TS ³	VD ⁴	MR ⁵
Kontrolle	1	2/3	0/3	0/3	0/3
	2	2/2	0/2	0/2	2/2
	3	3/3	0/3	0/3	0/3
	6	2/4	0/4	0/4	0/4
	10	0/3	0/3	0/3	0/3
	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
Meerschweinchen ohne Symptome 10 mg Cu/kg KG/Tag	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	4/4	0/4	4/4	4/4
15 mg Cu/kg KG/Tag	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
30 mg Cu/kg KG/Tag	3	5/5	1/5	5/5	4/5
	6	0/2	0/2	0/2	0/2
	10	2/4	2/4	2/4	3/4
	14	0/3	0/3	2/3	2/3
	21	3/3	0/3	3/3	3/3
	28	2/4	2/4	0/4	2/4
	60	4/4	2/4	4/4	3/4
Verstorbene und moribunde Meerschweinchen (30 mg Cu/kg KG/Tag)	1-3	12/12	0/12	5/12	11/12

1 Betroffene Tiere pro Anzahl der untersuchten Tiere
 2 Kernuntergänge
 3 Trübe Schwellung
 4 Vakuoläre Degenerationen
 5 Mesenchymale Reaktionen inkl. Sternzellhyperplasie

zwei Drittel der Cu-exponierten Tiere und bei den 2 Tage alten Kontrolltieren gefunden (Tabelle 5). In den meisten Fällen traten mesenchymale Reaktionen, die meist von einer Sternzellhyperplasie begleitet wurden, gleichzeitig mit Kernuntergängen auf. Eine Sternzellhyperplasie wurde jedoch ausschließlich bei Cu-exponierten Tieren beobachtet. Die in Tabelle 5 aufgeführten histologischen Veränderungen waren bis auf die trübe Schwellung in der 10 mg/kg KG/Tag-Gruppe in allen Dosisgruppen im Vergleich zur Kontrollgruppe statistisch signifikant erhöht (Chiquadrat-Test, $p < 0,05$).

Verstorbene und moribunde Meerschweinchen

Die histologischen Befunde der Leber der verstorbenen und moribunden Tiere unterschieden sich kaum von denen der Cu-exponierten Meerschweinchen ohne Symptome (Tabelle 5). So traten auch bei diesen Tieren Kernuntergänge auf und bis auf jeweils eine Ausnahme wurden vakuoläre Degenerationen und mesenchymale Reaktionen, die meist von einer Sternzellhyperplasie begleitet wurden, beobachtet.

3.2.3 Körpergewichte

Meerschweinchen ohne Symptome

Statistisch signifikant erhöhte Körpergewichte im Vergleich zu den gleich alten Kontrolltieren wurden bei den 4 - 6, 12 - 15, 18 - 23 und 25 Tage alten Cu-exponierten Tieren der mittleren Dosisgruppe und bei den 11 - 14 Tage alten Tieren der höchsten Dosisgruppe beobachtet (Abbildung 10).

Die wöchentlichen Körpergewichtszunahmen betragen von der ersten zur zweiten Woche in allen Dosisgruppen und der Kontrollgruppe etwa 90% (Tabelle 6). Anschließend blieben sie bis zur vierten Woche in allen Gruppen konstant. Von der vierten zur neunten Woche nahmen die Meerschweinchen der Gruppen 10 und 15 mg Cu/kg KG/Tag wie die Kontrolltiere um fast das Dreifache ihrer Körpergewichtszunahme zu. In der höchsten Dosisgruppe nahmen die Tiere im gleichen Zeitraum um etwa das Zweifache zu (nicht signifikanter Unterschied).

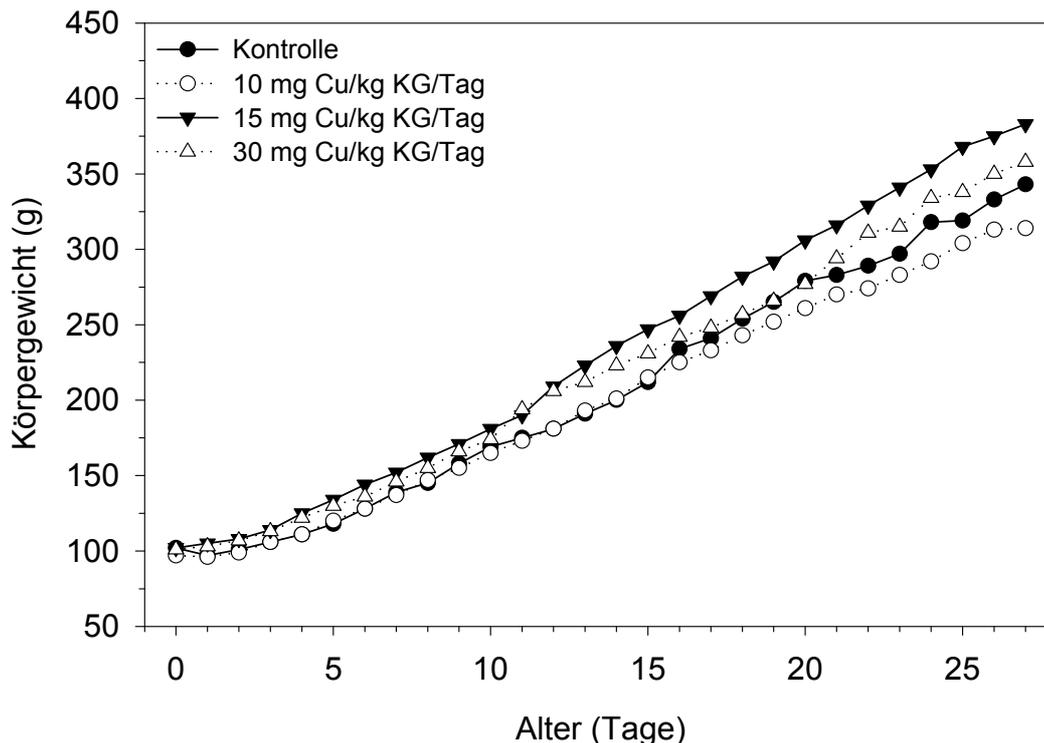


Abbildung 10: Entwicklung des Körpergewichts von Cu-exponierten Meerschweinchen ohne Symptome (MW, n = 6 - 29)

Tabelle 6: Wöchentliche Körpergewichtszunahme von Cu-exponierten Meerschweinchen ohne Symptome¹

Woche	Dosis (mg Cu/kg KG/Tag)			
	Kontrolle	10	15	30
1	33,8 ± 7,1 (n=18)	34,3 ± 16,2 (n=18)	38,8 ± 12,6 (n=22)	34,3 ± 17,3 (n=21)
2	67,1 ± 12,8 (n=15)	65,9 ± 10,0 (n=16)	73,2 ± 8,4 (n=17)	67,3 ± 11,7 (n=15)
3	80,8 ± 11,4 (n=11)	66,3 ± 7,0* (n=12)	80,9 ± 10,3 (n=13)	68,5 ± 10,1* (n=11)
4	69,7 ± 12,6 (n=6)	56,8 ± 13,0 (n=8)	75,1 ± 16,5 (n=9)	72,3 ± 17,7 (n=8)
9 ³	153 - 272 (n=2) ²	187,0 ± 70,6 (n=4)	242,3 ± 16,9 (n=4)	136,3 ± 47,9 (n=4)

¹ Angaben in g, MW ± SD, (n)

² Bereich der Messwerte

³ Körpergewichtszunahme zwischen Woche 4 und Woche 9

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

Statistisch signifikant erniedrigte wöchentliche Körpergewichtszunahmen im

Vergleich zu den Kontrolltieren wurden lediglich in der dritten Woche bei den Tieren der niedrigsten und höchsten Dosisgruppe beobachtet.

Verstorbene und moribunde Meerschweinchen

Die Körpergewichte der verstorbenen und moribunden Tiere betragen am Todestag zwischen 51 und 89 g (Tabelle 7). Die Geburtsgewichte eines verstorbenen und eines moribunden Meerschweinchens und das Körpergewicht eines Tieres am Todestag waren im Vergleich zu den Kontrollen statistisch signifikant erniedrigt.

Tabelle 7: Entwicklung des Körpergewichts von Cu-exponierten verstorbenen und moribunden Meerschweinchen^a

Tier	Alter (Tage)		
	0	1	2
verstorben, Tier 1	87	84	84
verstorben, Tier 2	86	85	84
verstorben, Tier 3	91	85	84
verstorben, Tier 4	75	74	74
verstorben, Tier 5	80	73	
verstorben, Tier 6	75		
verstorben, Tier 7	63*	58	51*
moribund, Tier 1	92	90	89
moribund, Tier 2	88	86	87
moribund, Tier 3	84	79	77
moribund, Tier 4	64*	62	
moribund, Tier 5	70	63	
Kontrolle ^b	102 ± 19 (65 - 140)	97 ± 20 (52 - 135)	101 ± 20 (58 - 140)
2σ-Bereich ^c	64,9 - 138,9	58,0 - 136,9	61,6 - 139,7

a Angaben in g, Einzelwerte

b MW ± SD, (Bereich), n=23-26

c Intervall [MW-2*SD; MW+2*SD], in dem 95% aller Beobachtungen liegen

* signifikant verschieden von der Kontrolle (p<0,05)

3.2.4 Organgewichte

3.2.4.1 Absolut

Meerschweinchen ohne Symptome

Die absoluten Gewichte von Gehirn, Leber, Nieren, Milz und Thymus der Cu-exponierten Meerschweinchen ohne Symptome sind in Tabelle 9 zusammengefasst.

Die Exposition mit Cu führte im Vergleich zu den Kontrolltieren zu verschiedenen Zeitpunkten zu teilweise statistisch signifikant erniedrigten aber auch erhöhten absoluten Organgewichten. Die absoluten Gehirngewichte der Cu-exponierten Meerschweinchen waren im Vergleich zu den Kontrolltieren zumeist unverändert. Die Lebergewichte waren im Vergleich zu den Kontrolltieren in 4 Fällen unabhängig von der Expositionszeit statistisch signifikant erniedrigt und in einem Fall statistisch signifikant erhöht. Die absoluten Nierengewichte der Cu-exponierten Meerschweinchen lagen bis auf 2 Ausnahmen im Bereich der Kontrolltiere. Die absoluten Milz- und Thymusgewichte waren im Vergleich zu den Kontrollen unabhängig von Dosis und Expositionszeit in jeweils 6 Fällen statistisch signifikant erniedrigt.

Verstorbene und moribunde Meerschweinchen

Die absoluten Leber- und Nierengewichte der verstorbenen und moribunden Meerschweinchen waren im Vergleich zu den Mittelwerten der Kontrolltiere teilweise erhöht und auch erniedrigt (Tabelle 8).

Die Gewichte der anderen Organe wurden bei diesen Tieren nicht ermittelt.

Tabelle 8: Absolute Leber- und Nierengewichte von Cu-exponierten verstorbenen und moribunden Meerschweinchen^a

Tier	Leber	Niere
verstorben, Tier 1	64,5*	92,4
verstorben, Tier 2	72,3	87,5
verstorben, Tier 3	106,5	103,8
verstorben, Tier 4	167,7*	130,9*
verstorben, Tier 5	157,5*	110,3
verstorben, Tier 6	165,2*	126,5*
verstorben, Tier 7	73,1	120,6*
moribund, Tier 1	60,5*	81,7*
moribund, Tier 2	65,6*	89,9
moribund, Tier 3	141,4*	150,0*
moribund, Tier 4	132,3*	95,6
moribund, Tier 5	115,9	113,2
Kontrolle ^b	100,0 ± 14,1 (80,1 - 112,2)	100,0 ± 8,8 (86,6 - 111,2)
2σ-Bereich ^c	71,9 - 128,1	82,3 - 117,7

- ^a alle Angaben in % bezogen auf die MW gleich alter Kontrolltiere, Einzelwerte
- ^b 2 bis 3 Tage alte Tiere, MW ± SD, (Bereich), n=5
- ^c Intervall [MW-2*SD; MW+2*SD], in dem 95% aller Beobachtungen liegen
- * signifikant verschieden von der Kontrolle (p<0,05)

3.2.4.2 Relativ

Meerschweinchen ohne Symptome

Wie die absoluten Organgewichte waren auch die relativen, auf die Gehirngewichte bezogenen Organgewichte bei den Cu-exponierten Meerschweinchen im Vergleich zu den Kontrolltieren vereinzelt statistisch signifikant erhöht bzw. erniedrigt (Tabelle 10).

Tabelle 9: Absolute Organgewichte von Cu-exponierten Meerschweinchen ohne Symptome¹

Parameter	Alter (Tage)	Dosis (mg Cu/kg KG/Tag)			
		Kontrolle	10	15	30
Gehirn	1	2,84 ± 0,06	-	-	-
	3	2,70 ± 0,03	2,95 ± 0,05**	2,69 ± 0,18	2,81 ± 0,11
	6	2,68 ± 0,14	2,78 ± 0,18	3,04 ± 0,18*	3,01 - 3,032
	10	3,05 ± 0,12	3,03 ± 0,24	3,00 ± 0,14	2,86 ± 0,21
	14	3,22 ± 0,25	3,19 ± 0,17	3,10 ± 0,14	3,37 ± 0,33
	21	3,44 ± 0,08	3,48 ± 0,15	3,55 ± 0,07	3,43 ± 0,06
	28	3,31 ± 0,19	3,49 ± 0,24	3,58 ± 0,25	3,60 ± 0,10*
	60	3,10 - 4,112	3,69 ± 0,22	3,98 ± 0,29	3,96 ± 0,22
Leber	1	5,07 ± 0,44	-	-	-
	3	5,88 ± 1,02	5,46 ± 0,86	4,39 ± 0,58	3,67 ± 0,58**
	6	4,75 ± 0,77	5,38 ± 0,75	4,91 ± 0,28	3,66 - 4,292
	10	6,91 ± 0,85	6,61 ± 0,49	3,94 ± 0,85**	4,20 ± 0,65**
	14	6,26 ± 2,12	7,26 ± 1,75	8,59 ± 0,92	9,37 ± 0,91*
	21	11,64 ± 1,69	11,33 ± 1,71	13,78 ± 1,62	10,73 ± 0,94
	28	15,18 ± 3,28	13,72 ± 3,07	13,72 ± 4,12	10,84 ± 1,03*
	60	15,63 - 34,102	18,91 ± 2,38	24,58 ± 3,23	16,81 ± 4,40
Niere	1	1,00 ± 0,20	-	-	-
	3	1,22 ± 0,15	1,14 ± 0,06	1,10 ± 0,16	1,02 ± 0,05*
	6	1,25 ± 0,14	1,41 ± 0,15	1,32 ± 0,13	1,19 - 1,342
	10	1,82 ± 0,19	1,58 ± 0,19	1,56 ± 0,18	1,26 ± 0,16**
	14	1,89 ± 0,45	1,70 ± 0,39	2,19 ± 0,24	2,25 ± 0,28
	21	2,89 ± 0,34	2,56 ± 0,21	3,17 ± 0,22	2,63 ± 0,28
	28	3,16 ± 0,17	3,08 ± 0,47	3,32 ± 0,54	3,25 ± 0,13
	60	3,31 - 4,692	4,09 ± 0,32	4,87 ± 0,59	4,05 ± 0,62
Milz	1	0,15 ± 0,03	-	-	-
	3	0,22 ± 0,03	0,18 ± 0,06	0,15 ± 0,02*	0,15 ± 0,02**
	6	0,24 ± 0,01	0,22 ± 0,03	0,21 ± 0,03	0,16 - 0,212
	10	0,35 ± 0,08	0,27 ± 0,07	0,21 ± 0,03*	0,19 ± 0,02*
	14	0,51 ± 0,23	0,54 ± 0,25	0,76 ± 0,10	0,68 ± 0,12
	21	0,73 ± 0,12	0,78 ± 0,22	0,78 ± 0,05	0,41 ± 0,12*
	28	0,86 ± 0,18	0,61 ± 0,08*	0,68 ± 0,12	0,65 ± 0,17
	60	0,68 - 0,772	0,70 ± 0,08	0,84 ± 0,26	0,59 ± 0,07
Thymus	1	0,033 ± 0,023	-	-	-
	3	0,053 ± 0,023	0,033 ± 0,024	0,005 ± 0,010*	0,036 ± 0,018
	6	0,040 ± 0,022	0,037 ± 0,018	0,028 ± 0,015	0,020 - 0,0302
	10	0,073 ± 0,023	0,030 ± 0,020*	0,033 ± 0,026	0,023 ± 0,010**
	14	0,085 ± 0,029	0,046 ± 0,013	0,083 ± 0,034	0,055 ± 0,038
	21	0,118 ± 0,032	0,053 ± 0,022*	0,070 ± 0,014*	0,053 ± 0,012*
	28	0,110 ± 0,027	0,128 ± 0,046	0,118 ± 0,043	0,118 ± 0,029
	60	0,100 - 0,3202	0,245 ± 0,152	0,198 ± 0,058	0,210 ± 0,039

¹ Angaben in g, MW ± SD, n=3-5

² n=2, Bereich

* signifikant verschieden von der Kontrolle (p<0,05)

** signifikant verschieden von der Kontrolle (p<0,01)

Tabelle 10: Relative Organgewichte von Cu-exponierten Meerschweinchen ohne Symptome¹

Parameter	Alter (Tage)	Dosis (mg Cu/kg KG/Tag)			
		Kontrolle	10	15	30
Leber	1	1,79 ± 0,18	-	-	-
	3	2,18 ± 0,40	1,85 ± 0,28	1,63 ± 0,12*	1,30 ± 0,17**
	6	1,77 ± 0,19	1,95 ± 0,38	1,61 ± 0,07	1,21 - 1,432
	10	2,26 ± 0,20	2,18 ± 0,15	1,31 ± 0,26**	1,46 ± 0,13**
	14	1,92 ± 0,54	2,28 ± 0,56	2,78 ± 0,39*	2,78 ± 0,05*
	21	3,38 ± 0,46	3,24 ± 0,37	3,88 ± 0,41	3,12 ± 0,23
	28	4,55 ± 0,76	3,92 ± 0,72	3,79 ± 0,87	3,02 ± 0,32*
	60	3,90 - 8,302	5,13 ± 0,62	6,23 ± 1,13	4,25 ± 1,14
Niere	1	0,35 ± 0,06	-	-	-
	3	0,45 ± 0,06	0,39 ± 0,02	0,41 ± 0,03	0,36 ± 0,02*
	6	0,47 ± 0,03	0,51 ± 0,06	0,43 ± 0,04	0,39 - 0,452
	10	0,60 ± 0,04	0,52 ± 0,05	0,52 ± 0,05	0,44 ± 0,02**
	14	0,58 ± 0,10	0,53 ± 0,12	0,71 ± 0,10	0,67 ± 0,05
	21	0,84 ± 0,09	0,73 ± 0,04	0,89 ± 0,05	0,77 ± 0,07
	28	0,95 ± 0,06	0,88 ± 0,13	0,92 ± 0,09	0,91 ± 0,04
	60	0,83 - 1,142	1,11 ± 0,11	1,23 ± 0,21	1,03 ± 0,18
Milz	1	0,05 ± 0,01	-	-	-
	3	0,08 ± 0,01	0,06 ± 0,02	0,06 ± 0,01*	0,05 ± 0,01**
	6	0,09 ± 0,01	0,08 ± 0,02	0,07 ± 0,01**	0,05 - 0,072
	10	0,12 ± 0,02	0,09 ± 0,02	0,07 ± 0,01*	0,07 ± 0,00**
	14	0,16 ± 0,06	0,17 ± 0,08	0,25 ± 0,04	0,21 ± 0,05
	21	0,21 ± 0,03	0,22 ± 0,06	0,22 ± 0,02	0,12 ± 0,03**
	28	0,26 ± 0,05	0,17 ± 0,02*	0,19 ± 0,02*	0,18 ± 0,05
	60	0,17 - 0,192	0,19 ± 0,02	0,22 ± 0,08	0,15 ± 0,01
Thymus	1	0,012 ± 0,008	-	-	-
	3	0,020 ± 0,009	0,011 ± 0,008	0,002 ± 0,004*	0,013 ± 0,007
	6	0,015 ± 0,007	0,013 ± 0,006	0,009 ± 0,005	0,007 - 0,0102
	10	0,024 ± 0,007	0,010 ± 0,006*	0,011 ± 0,008	0,008 ± 0,003**
	14	0,026 ± 0,008	0,015 ± 0,005*	0,027 ± 0,012	0,016 ± 0,010
	21	0,034 ± 0,009	0,015 ± 0,007**	0,020 ± 0,004*	0,016 ± 0,003*
	28	0,034 ± 0,010	0,037 ± 0,015	0,032 ± 0,009	0,033 ± 0,007
	60	0,025 - 0,0782	0,065 ± 0,039	0,050 ± 0,015	0,054 ± 0,012

¹ Organgewicht/Gehirngewicht, MW ± SD, n=3-5

² n=2, Bereich

* signifikant verschieden von der Kontrolle (p<0,05)

** signifikant verschieden von der Kontrolle (p<0,01)

3.2.5 Cu- und MT-Gehalte in der Leber

Meerschweinchen ohne Symptome

Die Cu-Gehalte in der Leber der Kontrolltiere nahmen mit dem Alter ab und erreichten nach 21 Tagen mit $18,5 \pm 5,0 \mu\text{g Cu/kg FG}$ die Gehalte 60 Tage alter Tiere (Abbildung 11). Die Exposition gegenüber Cu führte zu fast allen Zeitpunkten zu einer meist dosisabhängigen und statistisch signifikanten Erhöhung der hepatischen Cu-Gehalte. Nach 60 Tagen erreichten die Cu-Gehalte in der Leber der niedrigsten, mittleren bzw. höchsten Dosisgruppe das 2,5-fache, 2,8-fache bzw. 3,8-fache der Kontrollwerte.

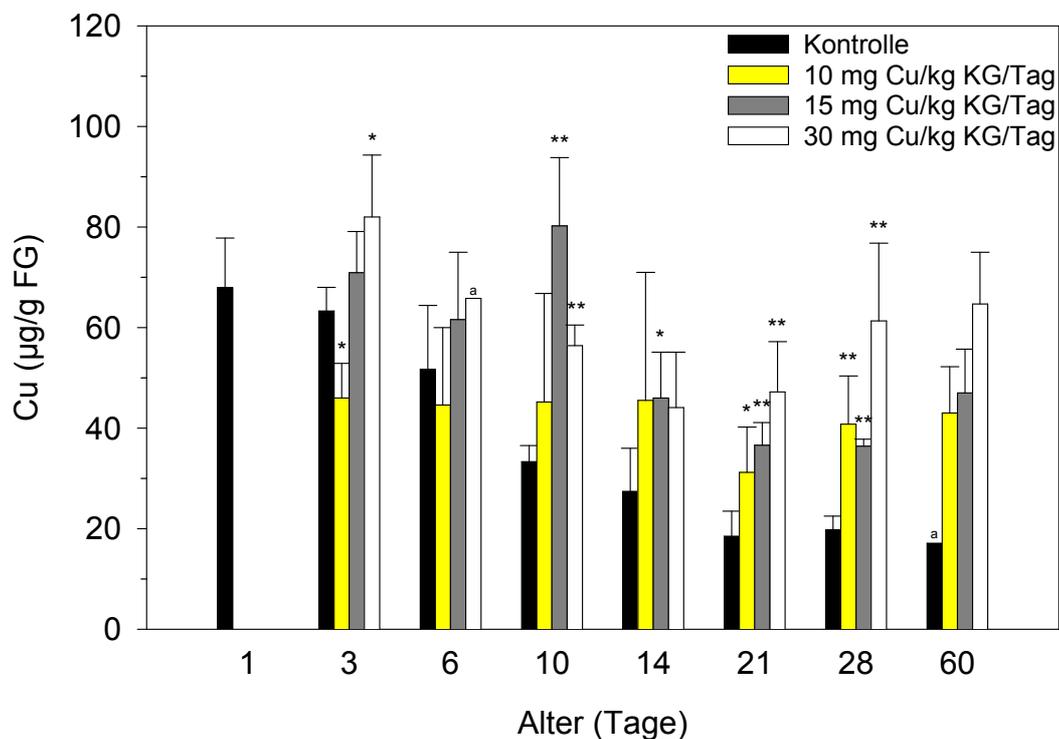


Abbildung 11: Cu-Gehalte in der Leber von Cu-exponierten Meerschweinchen ohne Symptome (MW \pm SD, n=3-5)

* signifikant verschieden von der Kontrolle ($p < 0,05$)

** signifikant verschieden von der Kontrolle ($p < 0,01$)

^a n=2, MW

Verstorbene und moribunde Meerschweinchen

Die Cu-Gehalte in der Leber der verstorbenen bzw. moribunden Meerschweinchen waren in keinem Fall statistisch signifikant erniedrigt, jedoch in 50% der Fälle bis zum 2,3-fachen statistisch signifikant erhöht (Tabelle 11).

Tabelle 11: Cu-Gehalte in der Leber von Cu-exponierten verstorbenen und moribunden Meerschweinchen^a

Tier	Cu
verstorben, Tier 1	93,7
verstorben, Tier 2	106,7
verstorben, Tier 3	85,7
verstorben, Tier 4	91,6
verstorben, Tier 5	111,3
verstorben, Tier 6	133,7*
verstorben, Tier 7	234,4*
moribund, Tier 1	177,3*
moribund, Tier 2	149,7*
moribund, Tier 3	174,3*
moribund, Tier 4	104,3
moribund, Tier 5	118,4*
Kontrolle ^b	100,0 ± 5,7 (91,4 - 105,0)
2σ-Bereich ^c	88,6 - 111,4

^a alle Angaben in % bezogen auf die MW gleich alter Kontrolltiere, Einzelwerte

^b 2 bis 3 Tage alte Tiere, MW ± SD, (Bereich), n=5

^c Intervall [MW-2*SD; MW+2*SD], in dem 95% aller Beobachtungen liegen

* signifikant verschieden von der Kontrolle (p<0,05)

3.2.5.1 Zytosol

Meerschweinchen ohne Symptome

In der Leber der Kontrolltiere nahmen die zytosolischen Cu-Gehalte in den ersten 6 Lebenstagen stark ab und blieben ab einem Alter von 10 Tagen konstant bei 4 µg Cu/g FG (Abbildung 12). Die Cu-Exposition führte überwiegend und zumeist dosisabhängig zu einer Zunahme der Cu-Gehalte im Zytosol auf bis zu 20% des hepatischen Cu-Gehalts.

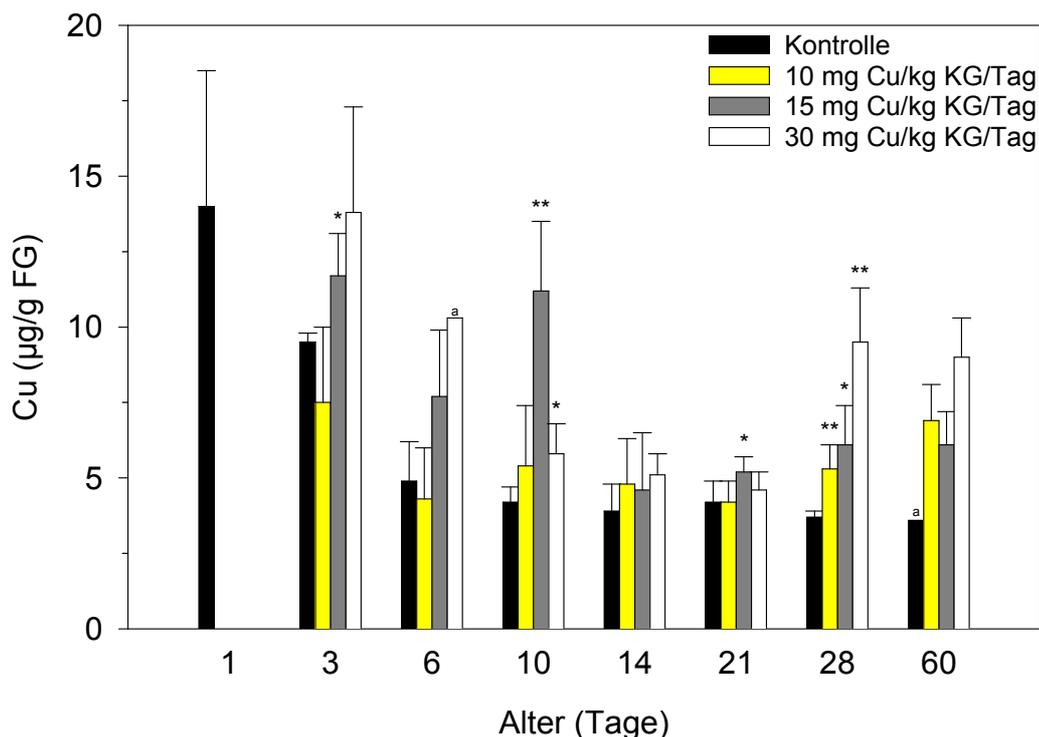


Abbildung 12: Cu-Gehalte im Zytosol der Leber von Cu-exponierten Meerschweinchen ohne Symptome (MW ± SD, n=3-5)

* signifikant verschieden von der Kontrolle (p<0,05)

** signifikant verschieden von der Kontrolle (p<0,01)

^a n=2, MW

Die Gehalte an metallhaltigem MT nahmen von $106,1 \pm 15,4 \mu\text{g MT/g FG}$ am Tag 1 während der folgenden 5 Tage rasch ab und erreichten im Alter von 21 Tagen mit etwa $10,0 \mu\text{g/g FG}$ die Werte 60 Tage alter Tiere (Abbildung 13). Bei den exponierten Meerschweinchen wurden vereinzelt statistisch signifikant erhöhte als auch erniedrigte Gehalte an metallhaltigem MT beobachtet.

Die Spiegel an Cu-MT im Zytosol verliefen nahezu durchwegs parallel zu den Gehalten an metallhaltigem MT und betragen zwischen 9,5 und 23,7% dieses Gehaltes (Abbildung 13). Die Exposition gegenüber Cu führte bei 3, 21 und 28 Tage alten Tieren vereinzelt zu statistisch signifikant erhöhten Cu-MT-Gehalten.

In Folge der unterschiedlichen Verläufe der Gehalte an Cu und Cu-MT im Zytosol (Abbildung 12, Abbildung 13) waren bei den Cu-exponierten Tieren die Gehalte an nicht an MT gebundenem Cu zumeist dosisabhängig erhöht (Abbildung 14).

Die Abhängigkeit der Cu-MT-Gehalte von den Cu-Gehalten im Zytosol zeigt Abbildung 15. Bis zu einem Cu-Gehalt von etwa $120 \text{ ng Cu/mg Protein}$ blieben die zytosolischen Gehalte von Cu-MT unverändert und stiegen anschließend linear mit den Cu-Gehalten an ($r=0,8130$). Der Anteil von Cu-MT am metallhaltigen MT

nahm bereits bei der geringsten Zunahme der zytosolischen Cu-Gehalt stark zu und erreichte bei einem zytosolischen Cu-Gehalt von 216 ng Cu/mg Protein den Maximalwert von 62%.

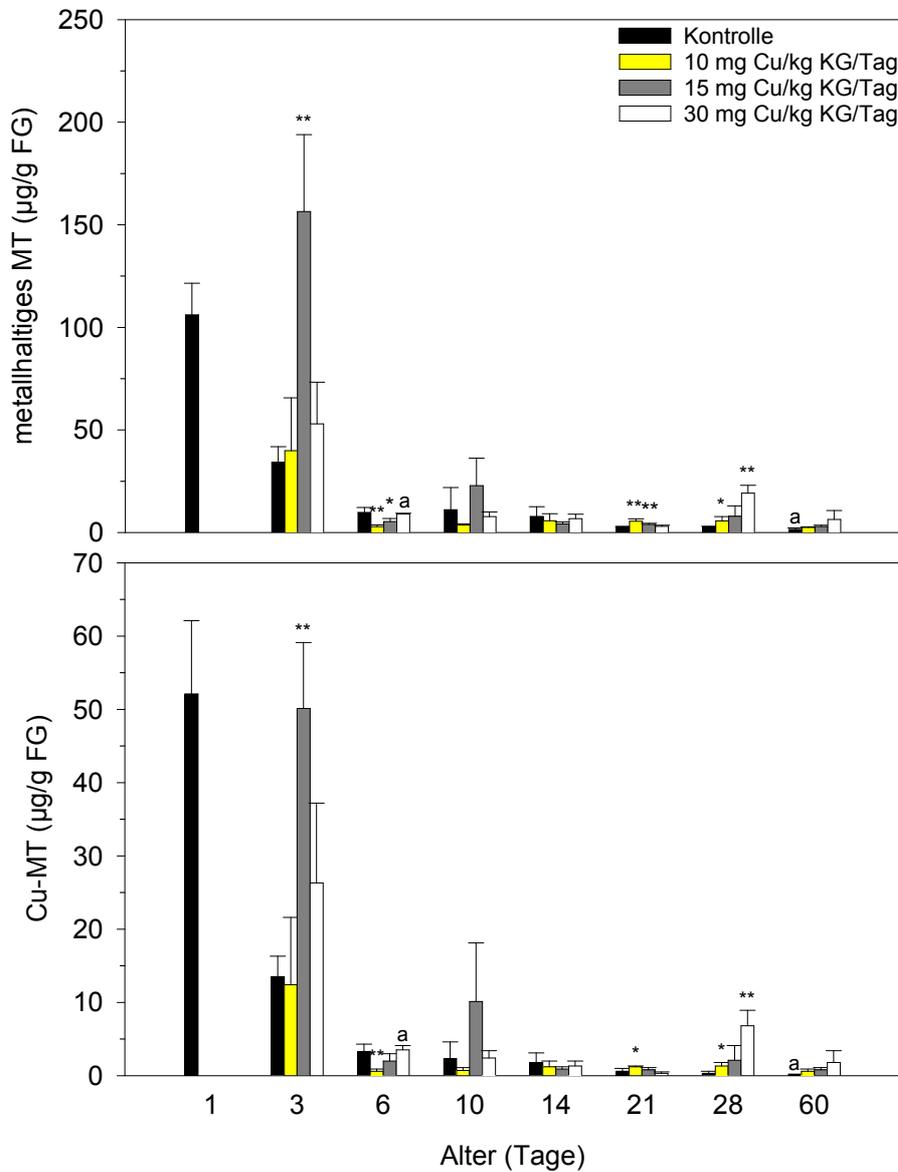


Abbildung 13: Gehalte an Metall- und Cu-haltigem Metallothionein (Cu-MT) im Zytosol der Leber von Cu-exponierten Meerschweinchen ohne Symptome (MW ± SD, n=3-5)

* signifikant verschieden von der Kontrolle (p<0,05)

** signifikant verschieden von der Kontrolle (p<0,01)

^a n=2, MW

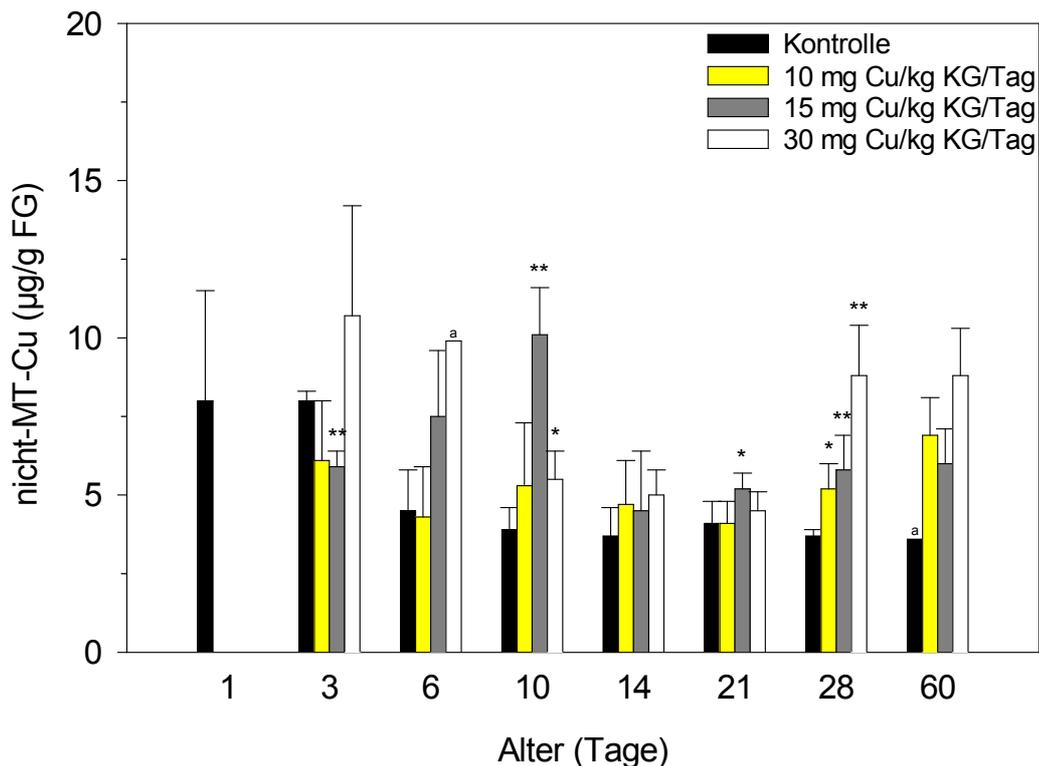


Abbildung 14: Gehalte an nicht an MT gebundenem Cu im Zytosol der Leber von Cu-exponierten Meerschweinchen ohne Symptome (MW ± SD, n=3-5)

* signifikant verschieden von der Kontrolle (p<0,05)

** signifikant verschieden von der Kontrolle (p<0,01)

^a n=2, MW

Verstorbene und moribunde Meerschweinchen

Die Gehalte an Cu und Cu-MT im Zytosol der Leber der verstorbenen und moribunden Meerschweinchen waren im Vergleich zu den gleich alten Kontrollen durchwegs statistisch signifikant erhöht (Tabelle 12) und die prozentualen Anteile von Cu-haltigem MT erreichten Maximalwerte von bis zu 85% (nicht gezeigt). Außerdem waren die Gehalte an nicht an MT gebundenem Cu im Zytosol der Leber im Vergleich zu den Kontrolltieren bei 7 Meerschweinchen statistisch signifikant erhöht, bei 4 erniedrigt und bei einem Tier unverändert (Tabelle 12).

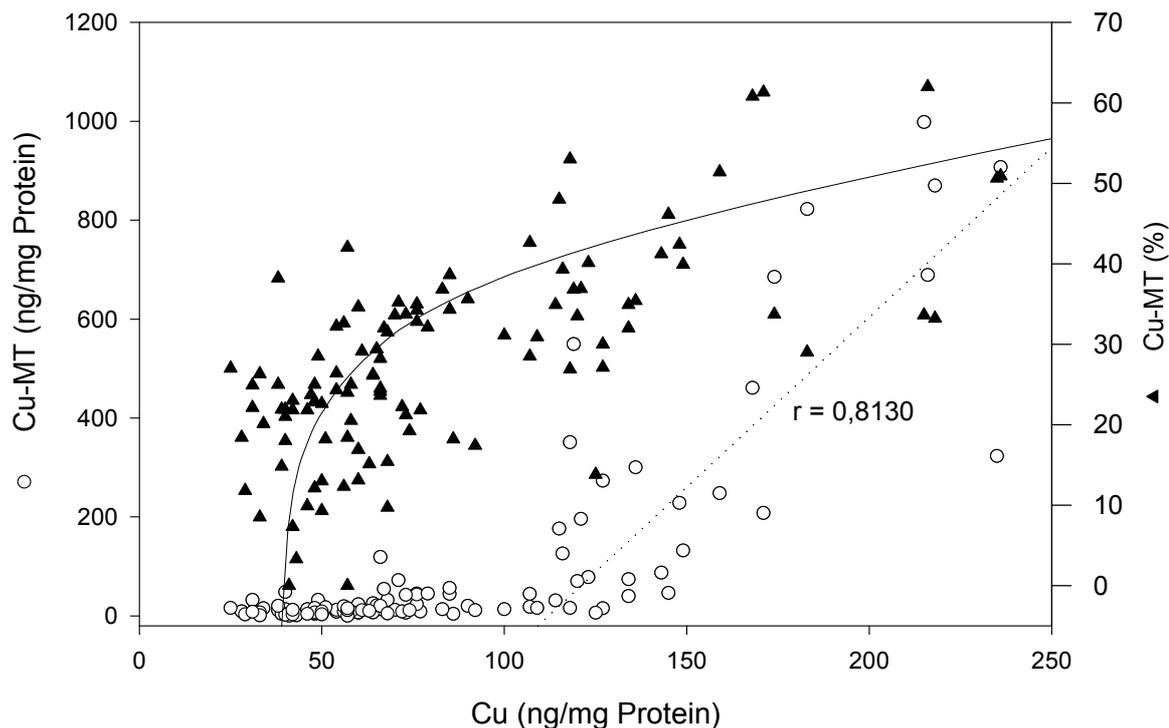


Abbildung 15: Cu und Cu-haltiges Metallothionein (Cu-MT) im Zytosol der Leber von Cu-exponierten Meerschweinchen ohne Symptome

Tabelle 12: Gehalte an Cu, Cu-haltigem Metallothionein (Cu-MT) und nicht an MT gebundenem Cu (nicht-MT-Cu) im Zytosol der Leber von Cu-exponierten verstorbenen und moribunden Meerschweinchen^a

Tier	Cu	Cu-MT	nicht-MT-Cu
verstorben, Tier 1	209,4*	591,0*	132,9*
verstorben, Tier 2	327,0*	1156,5*	135,4*
verstorben, Tier 3	313,7*	813,9*	161,4*
verstorben, Tier 4	197,2*	341,2*	70,2*
verstorben, Tier 5	247,8*	557,7*	74,8*
verstorben, Tier 6	253,1*	300,6*	99,4
verstorben, Tier 7	764,0*	2357,4*	147,1*
moribund, Tier 1	159,6*	410,8*	142,0*
moribund, Tier 2	193,1*	638,7*	133,0*
moribund, Tier 3	456,4*	1148,1*	169,0*
moribund, Tier 4	177,4*	556,1*	51,3*
moribund, Tier 5	188,5*	770,5*	30,9*
Kontrolle ^b	100,0 ± 11,4 (90,0 - 115,5)	100,0 ± 22,5 (69,0 - 124,1)	100 ± 8,7 (88,2 - 111,8)
2σ-Bereich ^c	77,1 - 122,9	55,0 - 145,0	82,6 - 117,4

^a alle Angaben in % bezogen auf die MW gleich alter Kontrolltiere, Einzelwerte

^b 2 bis 3 Tage alte Tiere, MW ± SD, (Bereich), n=5

^c Intervall [MW-2*SD; MW+2*SD], in dem 95% aller Beobachtungen liegen

* signifikant verschieden von der Kontrolle (p<0,05)

3.2.5.2 Partikulärer Teil

Meerschweinchen ohne Symptome

Die Cu-Gehalte im partikulären Teil der Leber (Abbildung 16) lagen stets höher als die der entsprechenden Cu-Gehalte im Zytosol und betrug 80-95% des Gesamtgehaltes (vgl. Abbildung 11). Bei den Kontrolltieren blieben die Cu-Gehalte bis zu einem Alter von 6 Tagen bei etwa 50 µg Cu/g FG und nahmen danach auf die Gehalte 60 Tage alter Tiere ab. Ab einer Exposition von 10 Tagen waren die Cu-Gehalte vor allem bei der höchsten Dosisgruppe im Vergleich zu den Kontrolltieren statistisch signifikant erhöht.

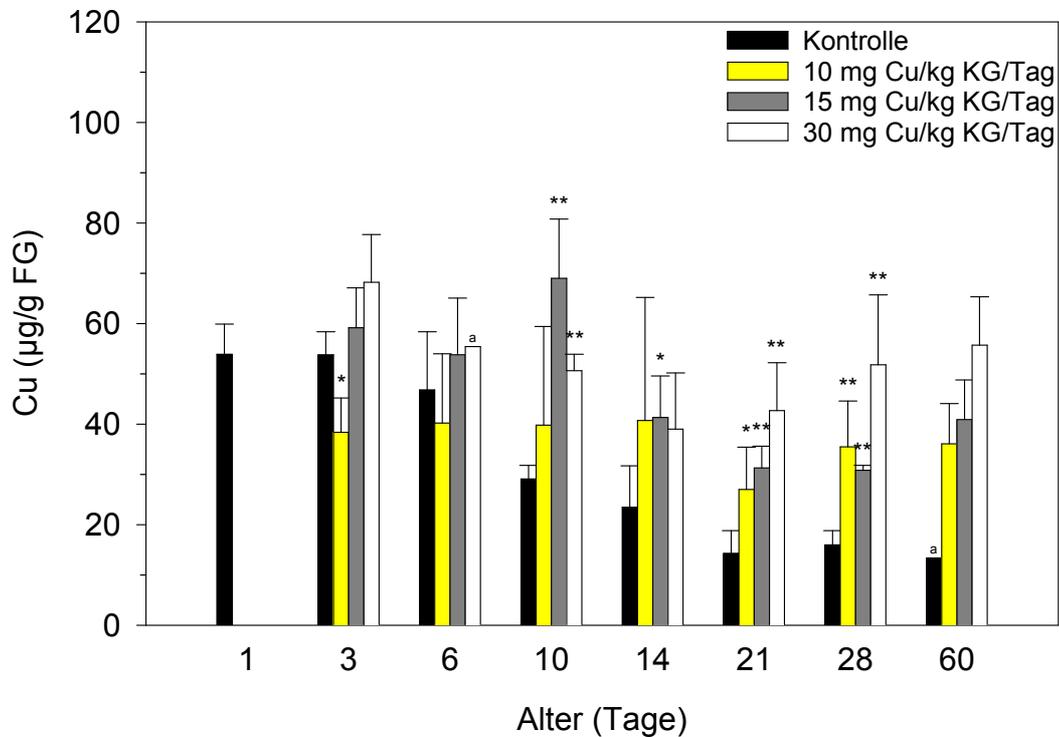


Abbildung 16: Cu-Gehalte im partikulären Teil der Leber von Cu-exponierten Meerschweinchen ohne Symptome (MW ± SD, n=3-5)

* signifikant verschieden von der Kontrolle (p<0,05)

** signifikant verschieden von der Kontrolle (p<0,01)

^a n=2, MW

Verstorbene und moribunde Meerschweinchen

Bei 9 der 12 verstorbenen und moribunden Tieren waren die Cu-Konzentrationen im partikulären Teil der Leber im Vergleich zu den Kontrolltieren verändert. So zeigten 4 Tiere statistisch signifikant erhöhte und 5 Tiere erniedrigte Cu-Gehalte (Tabelle 13).

Tabelle 13: Cu-Gehalte im partikulären Teil der Leber von Cu-exponierten verstorbenen und moribunden Meerschweinchen^a

Tier	Cu
verstorben, Tier 1	73,8*
verstorben, Tier 2	77,6*
verstorben, Tier 3	59,3*
verstorben, Tier 4	75,9*
verstorben, Tier 5	91,3
verstorben, Tier 6	118,3*
verstorben, Tier 7	168,5*
moribund, Tier 1	172,2*
moribund, Tier 2	133,2*
moribund, Tier 3	101,0
moribund, Tier 4	85,5*
moribund, Tier 5	104,1
Kontrolle ^b	100,0 ± 6,3 (90,2 - 105,2)
2σ-Bereich ^c	87,5 - 112,5

- ^a alle Angaben in % bezogen auf die MW gleich alter Kontrolltiere, Einzelwerte
- ^b 2 bis 3 Tage alte Tiere, MW ± SD, (Bereich), n=5
- ^c Intervall [MW-2*SD; MW+2*SD], in dem 95% aller Beobachtungen liegen
- * signifikant verschieden von der Kontrolle (p<0,05)

Lysosomen und Mitochondrien

Meerschweinchen ohne Symptome

Die Cu-Gehalte in der lysosomal-mitochondrialen Fraktion der Leber der Kontrolltiere nahmen von 750 ± 70 ng Cu/mg Protein am Tag 1 auf 977 ± 201 ng Cu/mg Protein am Tag 3 zu. Danach nahmen sie kontinuierlich ab und erreichten im Alter von 14 Tagen mit etwa 200 ng Cu/mg Protein die Gehalte 60 Tage alter Tiere (Abbildung 17). Die Cu-Exposition von 10 und mehr Tagen führte zumeist dosisabhängig zu statistisch signifikant erhöhten Cu-Gehalten in der lysosomal-mitochondrialen Fraktion.

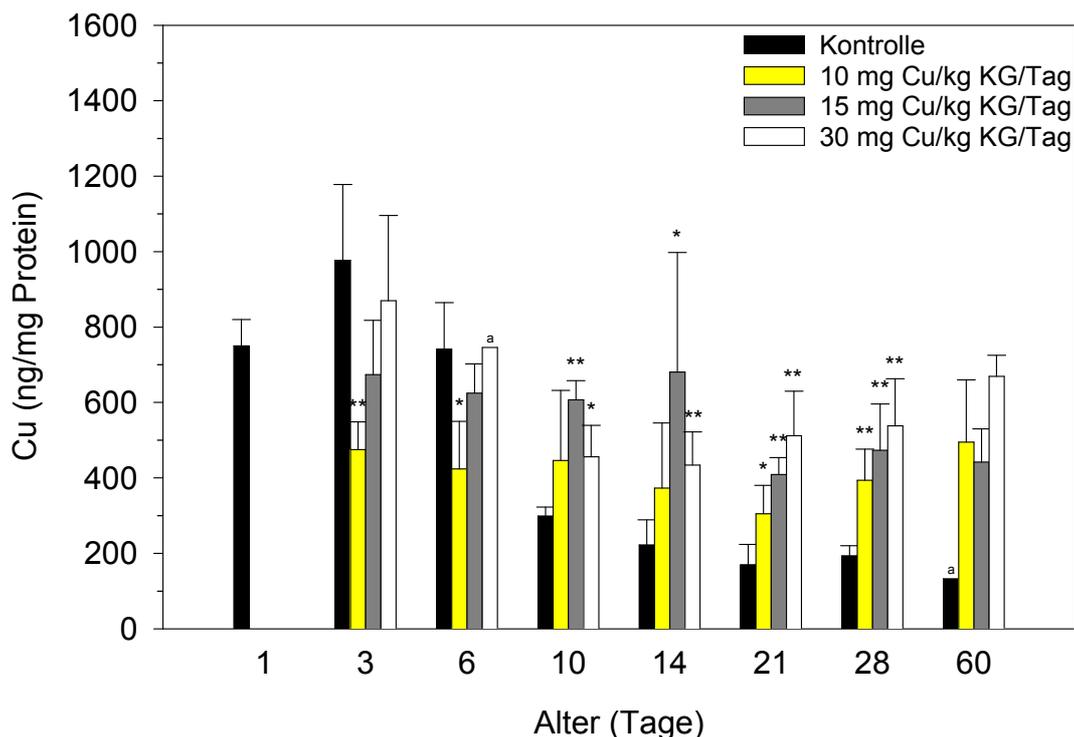


Abbildung 17: Cu-Gehalte in der lysosomal-mitochondrialen Fraktion der Leber von Cu-exponierten Meerschweinchen ohne Symptome (MW \pm SD, n=3-5)

* signifikant verschieden von der Kontrolle ($p < 0,05$)

** signifikant verschieden von der Kontrolle ($p < 0,01$)

^a n=2, MW

Die Gehalte an Cu-MT in dieser Fraktion (Abbildung 18) verliefen im Wesentlichen parallel zu den Cu-Gehalten ($r=0,8329$, nicht gezeigt).

Die Anteile von Cu-MT an metallhaltigem MT lagen bis auf wenige Ausnahmen zwischen 81 und 97% (nicht gezeigt). Die Gehalte an oxidiertem MT betragen bei den Kontrolltieren am ersten Lebenstag 327 ± 82 ng MT/mg Protein. Unabhängig von der Cu-Exposition bewegten sich die Gehalte an oxidiertem MT meist parallel zu den Cu- bzw. Cu-MT-Gehalten (nicht gezeigt).

Die prozentualen Anteile von oxidiertem MT am Gesamt-MT wiesen bei allen Tieren eine erhebliche Schwankung auf und betragen zwischen 11 und 60% des Gesamt-MT-Gehaltes (nicht gezeigt).

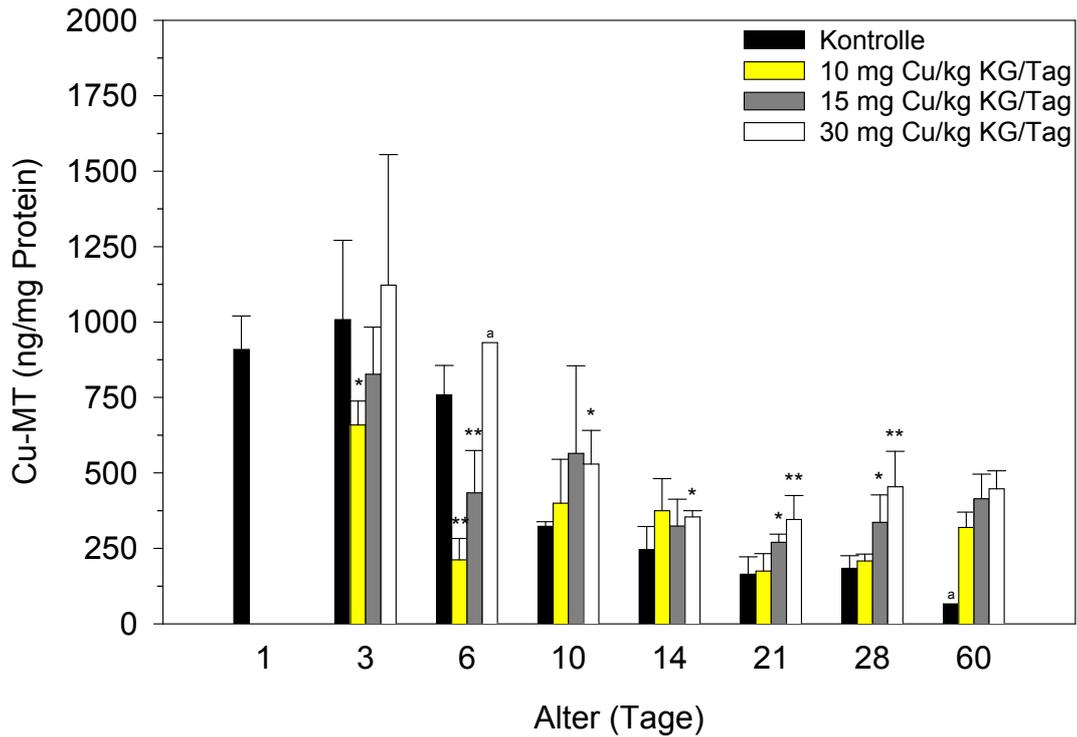


Abbildung 18: Gehalte an Cu-haltigem Metallothionein (Cu-MT) in der lysosomal-mitochondrialen Fraktion der Leber von Cu-exponierten Meerschweinchen ohne Symptome (MW ± SD, n=3-5)

* signifikant verschieden von der Kontrolle (p<0,05)

** signifikant verschieden von der Kontrolle (p<0,01)

^a n=2, MW

Verstorbene und moribunde Meerschweinchen

Sowohl die Cu-Gehalte als auch die Cu-MT-Gehalte in der lysosomal-mitochondrialen Fraktion der Leber der verstorbenen und moribunden Tiere wiesen mit 41-163 bzw. 13-739% des Mittelwerts der Kontrolltiere erhebliche Schwankungen auf (Tabelle 14).

Die prozentualen Anteile an oxidiertem MT lagen bei den verstorbenen und moribunden Tieren bis auf 2 Ausnahmen höher als die der Meerschweinchen ohne Symptome (nicht gezeigt).

Tabelle 14: Cu-Gehalte und Gehalte an Cu-haltigem Metallothionein (Cu-MT) in der lysosomal-mitochondrialen Fraktion der Leber von Cu-exponierten verstorbenen und moribunden Meerschweinchen^a

Tier	Cu	Cu-MT
verstorben, Tier 1	62,3*	23,3*
verstorben, Tier 2	97,2	46,9*
verstorben, Tier 3	41,4*	12,5*
verstorben, Tier 4	90,2	56,2*
verstorben, Tier 5	112,8	80,2
verstorben, Tier 6	n. b.	n. b.
verstorben, Tier 7	162,8*	739,4*
moribund, Tier 1	123,6	160,2*
moribund, Tier 2	51,2*	73,2
moribund, Tier 3	97,5	33,0*
moribund, Tier 4	131,5*	119,9
moribund, Tier 5	n. b.	n. b.
Kontrolle ^b	100,0 ± 15,7 (80,6 - 121,6)	100,0 ± 18,6 (84,2 - 130,1)
2σ-Bereich ^c	68,7 - 131,3	62,8 - 137,2

- ^a alle Angaben in % bezogen auf die MW gleich alter Kontrolltiere, Einzelwerte
- ^b 2 bis 3 Tage alte Tiere, MW ± SD, (Bereich), n=5
- ^c Intervall [MW-2*SD; MW+2*SD], in dem 95% aller Beobachtungen liegen
- * signifikant verschieden von der Kontrolle (p<0,05)
- n. b.: nicht bestimmt

Abbildung 19 zeigt die Cu-Gehalte in den über einen Dichtegradienten getrennten lysosomal-mitochondrialen Fraktionen aus der Leber von Tieren der höchsten Dosisgruppe.

Bei den Kontrolltieren nahmen in Übereinstimmung mit der Abnahme von Cu im partikulären Teil der Leber die Cu-Gehalte in den lysosomenspezifischen Fraktionen und den Fraktionen hoher Dichte mit dem Alter kontinuierlich ab. Bei den Cu-exponierten Tieren waren die Cu-Konzentrationen insbesondere in den Fraktionen hoher Dichte erhöht bzw. unverändert hoch ().

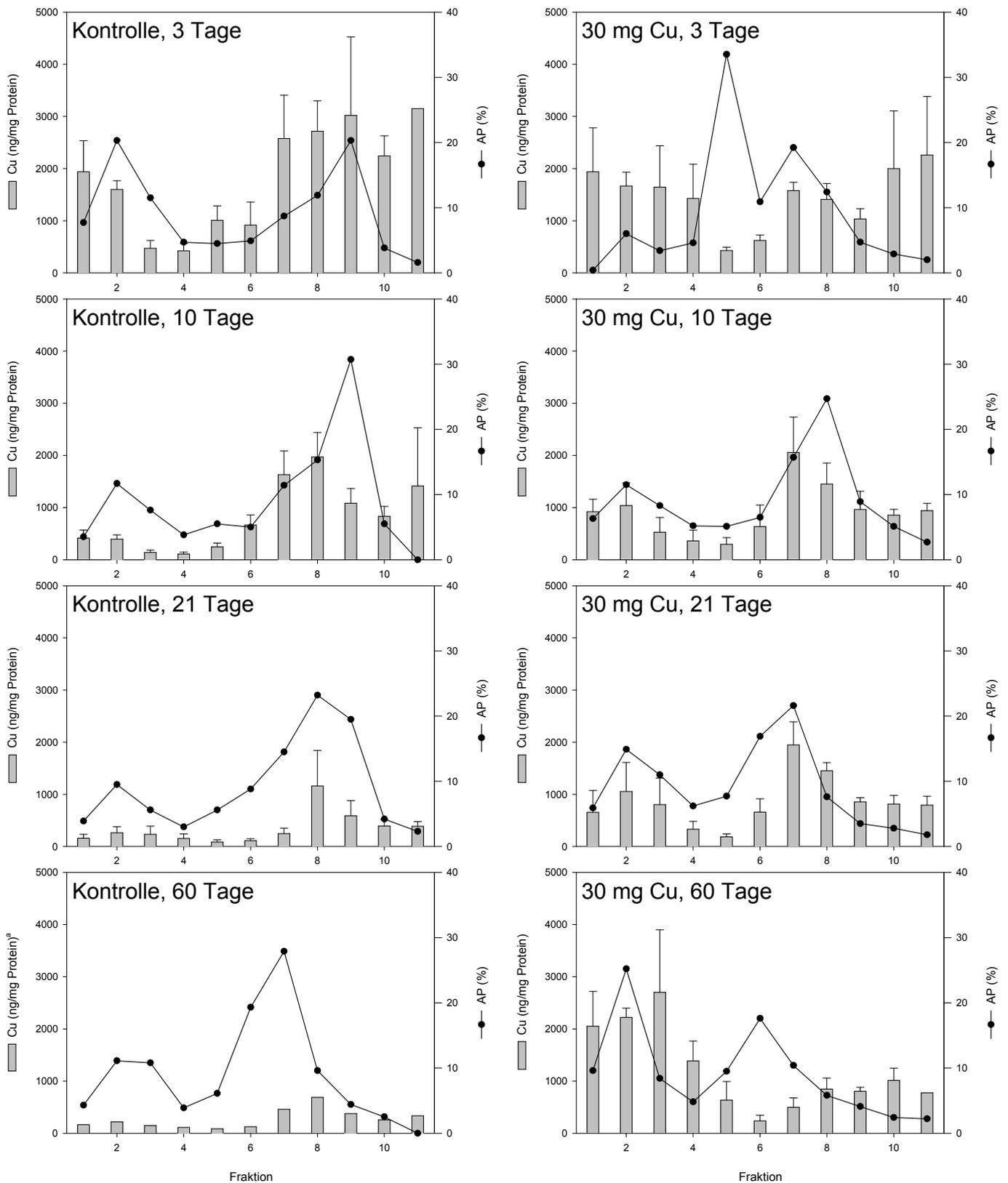


Abbildung 19: Cu (MW \pm SD, n=3-5) und Saure Phosphatase (AP, Aktivität in % der Gesamtaktivität, Einzelwerte) in den Fraktionen des Dichtegradienten der Leber von exponierten Meerschweinchen ohne Symptome

^a n=2, MW

Zellkerne

Meerschweinchen ohne Symptome

In der Kernfraktion der Leber von Kontrolltieren nahmen die Cu-Gehalte vom Tag 1 bis zum Alter von 10 Tagen auf 13% ab und blieben danach in etwa konstant (Abbildung 20). Nach 14-tägiger Exposition und danach waren die Cu-Gehalte in den Kernen überwiegend dosisabhängig statistisch signifikant erhöht.

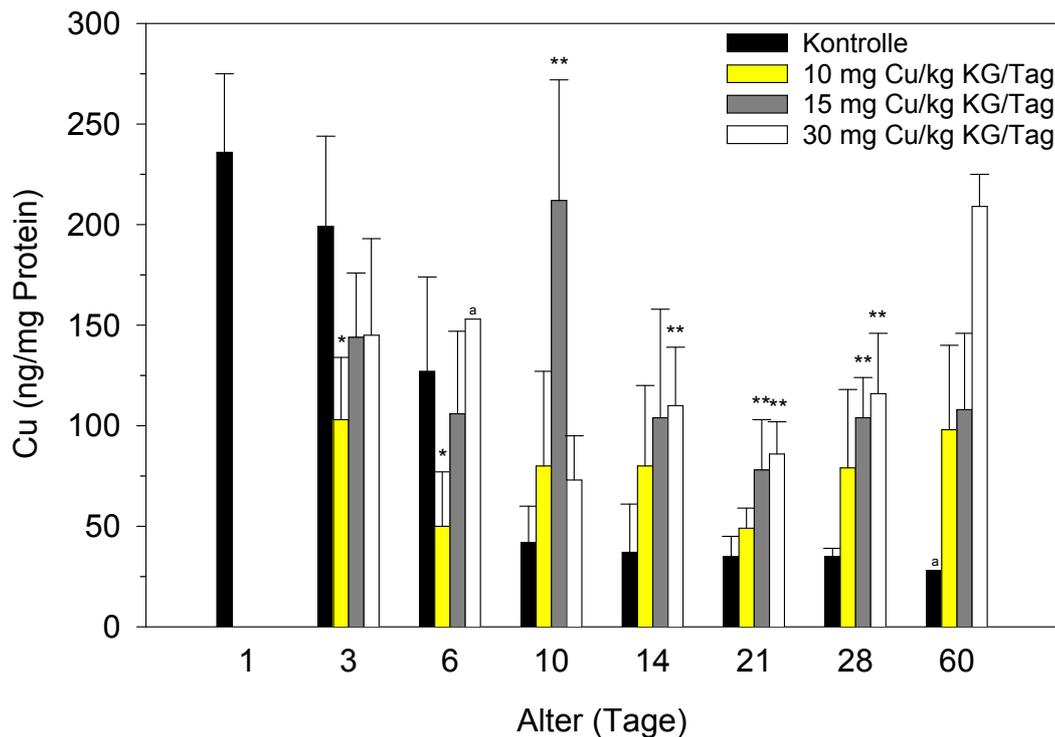


Abbildung 20: Cu-Gehalte in der Kernfraktion der Leber von Cu-exponierten Meerschweinchen ohne Symptome (MW ± SD, n=3-5)

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

Die Cu-MT-Spiegel in der Kernfraktion (Abbildung 21) verliefen weitgehend parallel zu denen der Cu-Gehalte (r=0,8231, nicht gezeigt).

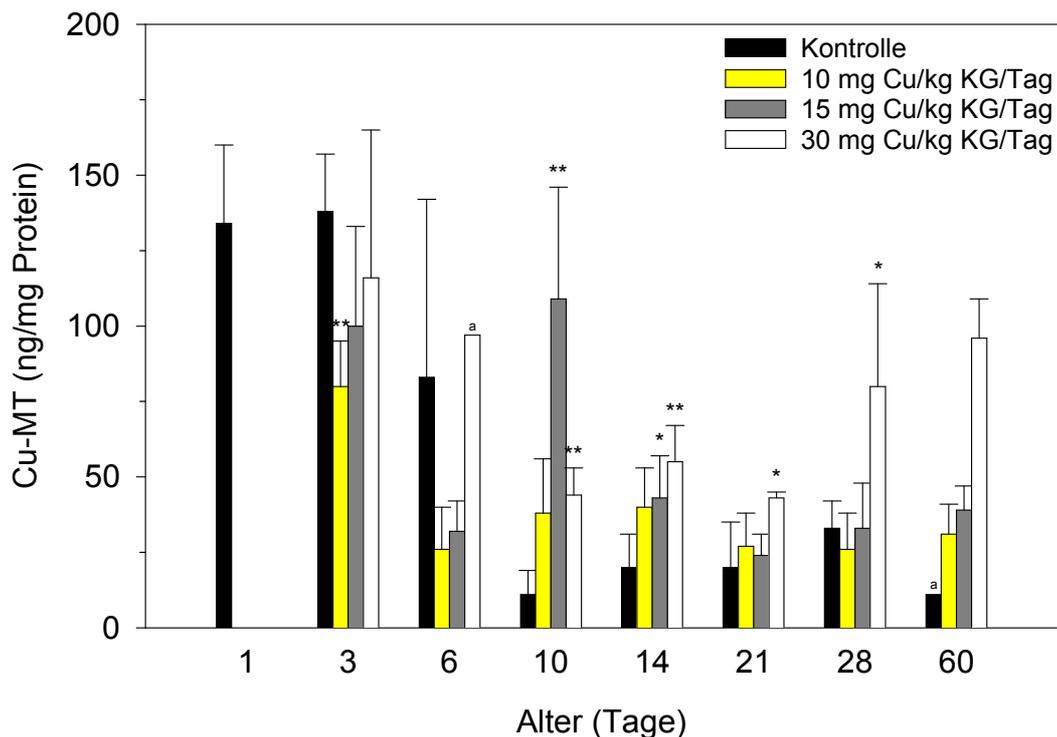


Abbildung 21: Gehalte an Cu-haltigem Metallothionein (Cu-MT) in der Kernfraktion der Leber von Cu-exponierten Meerschweinchen ohne Symptome (MW \pm SD, n=3-5)

* signifikant verschieden von der Kontrolle (p<0,05)

** signifikant verschieden von der Kontrolle (p<0,01)

^a n=2, MW

Verstorbene und moribunde Meerschweinchen

Die Cu- sowie die Cu-MT-Gehalte in der Kernfraktion der Leber verstorbener und moribunder Meerschweinchen wiesen erhebliche Schwankungen auf und betragen das 0,5- bis 5,2- bzw. 0,2- bis 11,2-fache des Mittelwerts der Kontrolltiere (Tabelle 15).

Tabelle 15: Cu-Gehalte und Gehalte an Cu-haltigem Metallothionein (Cu-MT) in der Kernfraktion der Leber von Cu-exponierten verstorbenen und moribunden Meerschweinchen^a

Tier	Cu	Cu-MT
verstorben, Tier 1	57,8*	23,2*
verstorben, Tier 2	81,4	47,4*
verstorben, Tier 3	185,0*	140,2*
verstorben, Tier 4	178,9*	145,0*
verstorben, Tier 5	275,9*	151,0*
verstorben, Tier 6	n. b.	n. b.
verstorben, Tier 7	185,7*	1114,7*
moribund, Tier 1	94,5	92,7
moribund, Tier 2	45,2*	56,7*
moribund, Tier 3	522,1*	731,4*
moribund, Tier 4	168,6*	146,2*
moribund, Tier 5	n. b.	n. b.
Kontrolle ^b	100,0 ± 16,2 (78,6 - 124,1)	100,0 ± 14,2 (85,1 - 114,7)
2σ-Bereich ^c	67,7 - 132,4	71,6 - 128,4

- ^a alle Angaben in % bezogen auf die MW gleich alter Kontrolltiere, Einzelwerte
- ^b 2 bis 3 Tage alte Tiere, MW ± SD, (Bereich), n=5
- ^c Intervall [MW-2*SD; MW+2*SD], in dem 95% aller Beobachtungen liegen
- * signifikant verschieden von der Kontrolle (p<0,05)
- n. b.: nicht bestimmt

3.2.6 Cu-Gehalte in der Niere

Meerschweinchen ohne Symptome

Die Cu-Gehalte in der Niere blieben sowohl bei den Kontrolltieren als auch bei den exponierten Tieren bis zu einem Alter von 21 Tagen mit etwa 4 µg Cu/g FG nahezu unverändert und stiegen danach auf etwa 7 µg Cu/g FG im Alter von 60 Tagen an (Abbildung 22). Die Cu-Gehalte in der Niere der exponierten Tiere unterschieden sich bis auf wenige Ausnahmen nicht von denen der Kontrolltiere.

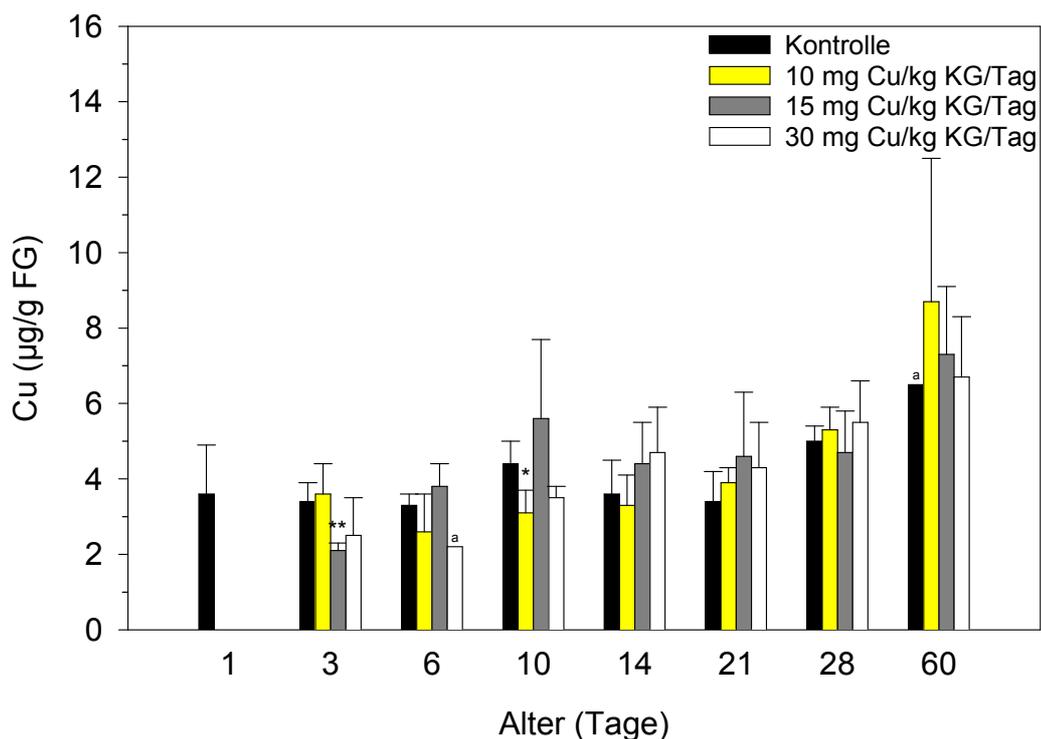


Abbildung 22: Cu-Gehalte in der Niere von Cu-exponierten Meerschweinchen ohne Symptome (MW ± SD, n=3-5)

* signifikant verschieden von der Kontrolle (p<0,05)

** signifikant verschieden von der Kontrolle (p<0,01)

^a n=2, MW

Verstorbene und moribunde Meerschweinchen

Die Cu-Gehalte in der Niere der verstorbenen Meerschweinchen waren bis um das 20-fache des Mittelwertes der Kontrolltiere erhöht. Bei den moribunden Tieren lagen die renalen Cu-Gehalte bis auf 2 Ausnahmen um das 7- bis 10-fache über dem Mittelwert der Kontrolltiere (Tabelle 16).

Zytosol

Meerschweinchen ohne Symptome

Die Cu-Gehalte im Zytosol der Niere (Abbildung 23) betragen etwa die Hälfte des Gesamt-Cu-Gehaltes, unabhängig von der Dosis und Expositionsdauer.

Tabelle 16: Cu-Gehalte in der Niere von Cu-exponierten verstorbenen und moribunden Meerschweinchen^a

Tier	Cu
verstorben, Tier 1	455,7*
verstorben, Tier 2	523,3*
verstorben, Tier 3	138,0*
verstorben, Tier 4	1970,6*
verstorben, Tier 5	724,3*
verstorben, Tier 6	257,3*
verstorben, Tier 7	397,8*
moribund, Tier 1	103,7
moribund, Tier 2	94,9
moribund, Tier 3	873,8*
moribund, Tier 4	1000,2*
moribund, Tier 5	718,7*
Kontrolle ^b	100,0 ± 12,7 (89,3 - 116,6)
2σ-Bereich ^c	74,6 - 125,4

- ^a alle Angaben in % bezogen auf die MW gleich alter Kontrolltiere, Einzelwerte
- ^b 2 bis 3 Tage alte Tiere, MW ± SD, (Bereich), n=5
- ^c Intervall [MW-2*SD; MW+2*SD], in dem 95% aller Beobachtungen liegen
- * signifikant verschieden von der Kontrolle (p<0,05)

Verstorbene und moribunde Meerschweinchen

Bei fast allen der verstorbenen und moribunden Meerschweinchen waren die Cu-Gehalte auch im Zytosol der Niere bis zum 15-fachen erhöht (Tabelle 17).

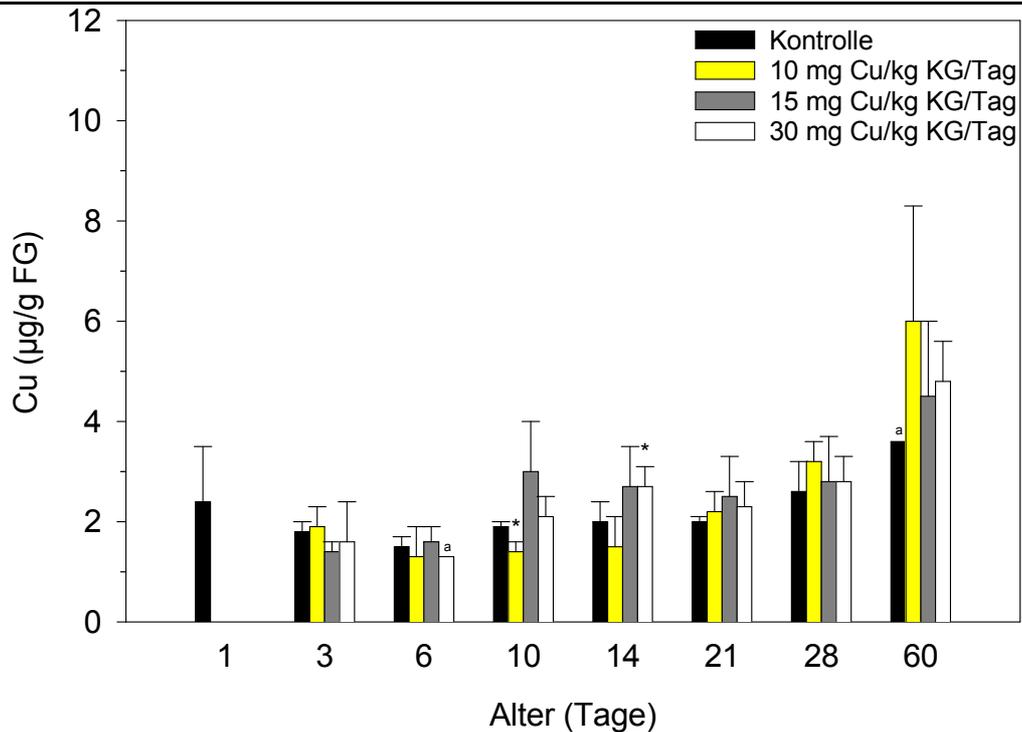


Abbildung 23: Cu-Gehalte im Zytosol der Niere von Cu-exponierten Meerschweinchen ohne Symptome (MW ± SD, n=3-5)

* signifikant verschieden von der Kontrolle (p<0,05)

** signifikant verschieden von der Kontrolle (p<0,01)

^a n=2, MW

Tabelle 17: Cu-Gehalte im Zytosol der Niere von Cu-exponierten verstorbenen und moribunden Meerschweinchen^a

Tier	Cu
verstorben, Tier 1	464,6*
verstorben, Tier 2	n. b.
verstorben, Tier 3	167,5*
verstorben, Tier 4	817,7*
verstorben, Tier 5	673,6*
verstorben, Tier 6	330,3*
verstorben, Tier 7	571,8*
moribund, Tier 1	118,9
moribund, Tier 2	91,8
moribund, Tier 3	833,2*
moribund, Tier 4	1472,8*
moribund, Tier 5	652,4*
Kontrolle ^b	100,0 ± 16,9 (73,7 - 120,2)
2σ-Bereich ^c	66,3 - 133,7

^a alle Angaben in % bezogen auf die MW gleich alter Kontrolltiere, Einzelwerte

^b 2 bis 3 Tage alte Tiere, MW ± SD, (Bereich), n=5

^c Intervall [MW-2*SD; MW+2*SD], in dem 95% aller Beobachtungen liegen

* signifikant verschieden von der Kontrolle (p<0,05)

n. b.: nicht bestimmt

4 DISKUSSION

Untersuchungen an der LEC-Ratte

Zahlreiche Untersuchungen haben überzeugende Hinweise dafür erbracht, dass für die Hepatotoxizität von Cu dessen Konzentration im Gewebe allein nicht ausschlaggebend ist. Vielmehr scheint die Lokalisation des Metalls innerhalb der Zellen und die Bindung von Cu letztlich dessen Reaktivität zu bestimmen.

Diesbezügliche Informationen insbesondere im Verlauf der Cu-induzierten Leberschädigung fehlen weitestgehend. Gründe hierfür sind vor allem in den bislang verwendeten Methoden zu sehen, die wie im Fall der histochemischen Untersuchungen in der Regel unspezifisch sind und nur qualitative Ergebnisse liefern.

In der vorliegenden Arbeit wurde deshalb am Modell der LEC-Ratte eine Methode erarbeitet, die es erlaubt schonend, in hoher Reinheit und in guter Ausbeute, subzelluläre Fraktionen der Leber zu isolieren. Als ein besonderer Vorteil gelang es, mit diesem Verfahren Zellorganellen auch dann noch verlässlich zu isolieren, wenn sie wie die Lysosomen durch die Akkumulation von Cu eine erhöhte Dichte aufweisen.

Die Ergebnisse belegen die ausgeprägte intra- und interzelluläre Umverteilung von Cu im Verlauf der Cu-bedingten Leberschädigung. Insbesondere die mit zunehmender Schädigung ansteigenden Cu-Gehalte in Lysosomen legen die Vermutung nahe, dass das Metall in diesen Organellen kausal mit der Hepatotoxizität von Cu in Beziehung steht.

Die ausgearbeiteten präparativen Verfahren wurden eingesetzt, um die Lokalisation und Bindung des Metalls bei unmittelbar nach der Geburt gegenüber Cu exponierten Meerschweinchen zu untersuchen.

Toxizität von Kupfer beim Meerschweinchen

Die 60-tägige Exposition gegenüber Cu führte beim Meerschweinchen vereinzelt zu Veränderungen der Körper- und Organgewichte sowie der Aktivitäten der Serumenzyme Aspartataminotransferase, Alaninaminotransferase und γ -Glutamyltransferase. Da diese Effekte keine Dosisabhängigkeit zeigten und offensichtlich reversibel waren, sind sie für die Bewertung als wenig relevant anzusehen. Dies stimmt mit anderen Untersuchungen überein, nach denen die orale Gabe von Cu im Trinkwasser (Srai et al. 1986) bzw. in Formulamilch (Seffner et al. 1997) bei Meerschweinchen ebenfalls keinen Einfluss auf die Körper- und Lebergewichte hatte. In der vorliegenden Untersuchung wurde bei den Cu-exponierten Tieren eine zumeist dosisabhängige Akkumulation von Cu in der Leber beobachtet, die auch für andere Cu-exponierte Spezies beschrieben ist (Chesta et al. 1989, Fuentealba et al. 1989, Fuentealba und Haywood 1988, Gooneratne et al. 1989, Haywood et al. 1985, Haywood und Loughran 1985, Hébert et al. 1993, Kumaratilake und Howell 1989a, Kumaratilake und Howell 1989b, Morris et al. 1994, Sokol et al. 1990, Srai et al. 1986, Sugawara et al. 1995).

In der Leber sowohl der verstorbenen und moribunden Meerschweinchen als auch der Tiere ohne Symptome wurden histopathologische Veränderungen beobachtet, die allerdings unabhängig von der Expositionszeit und zumeist unabhängig von der Dosis waren. Die Verfettungen und fettigen Degenerationen traten sowohl bei Kontrolltieren als auch bei Cu-exponierten Tieren auf und sind somit offensichtlich nicht Cu-spezifisch. Diese Veränderungen sind vermutlich die Folge mangelnder Bewegungsmöglichkeit der Tiere bei unbegrenztem Futterangebot. Einige degenerative Veränderungen wie die trübe Schwellung und hydropische Degenerationen wurden hingegen nur in der Leber von Cu-exponierten Tieren beobachtet. Derartige Veränderungen sind auch von anderen Cu-exponierten Spezies (Fuentealba und Haywood 1988, Hädrich 1996) und von Patienten mit ICC bekannt (Popper et al. 1979). Sie dürften Folge einer Störung des zellulären Wasserhaushalts sein. Vermutlich sind hierfür Cu-induzierte Sauerstoffradikale (Forman et al. 1980, Freedman et al. 1989, Halliwell et al. 1984) mit der Folge von Membranschäden und gestörten Ionengleichgewichten verantwortlich. Kernuntergänge wurden bis zum Alter von 6 Tagen sowohl bei Cu-exponierten als auch bei den Kontrolltieren beobachtet. Ab dem Alter von 10 Tagen traten diese Veränderungen nur noch bei exponierten Tieren auf. Kernuntergänge sind als Zeichen für einen

Zelluntergang zu sehen (Gedigk und Totovic 1986) und könnten die Folge von Cu-induzierten DNA-Schäden sein (Drouin et al. 1996, Prasad et al. 1996, Spear und Aust 1995). Derartige irreversible Kernschäden in Leberparenchymzellen sind auch von Cu-exponierten Ratten bekannt (Fuentealba et al. 1989, Fuentealba und Haywood 1988, Haywood und Loughran 1985). Die Kernuntergänge bei den exponierten Meerschweinchen waren zumeist von Sternzellhyperplasien begleitet. Ein vermehrtes Auftreten von Kupfferschen Sternzellen ist auch bei LEC-Ratten beschrieben (Kawano et al. 1991, Namieno et al. 1991) und kann als Hinweis auf eine verstärkte Phagozytoseaktivität auf Grund geschädigter Parenchymzellen verstanden werden. Darüber hinaus wird vermutet, dass diese Zellen auch eine aktive Rolle bei der Cu-induzierten Leberschädigung mit der Freisetzung von toxischen Mediatoren wie TNF-alpha und Interleukine spielen (Yamate et al. 1999). Möglicherweise sind diese Mediatoren auch an der Entstehung der histologischen Veränderungen in der Leber von früh gegenüber Cu exponierten Meerschweinchen beteiligt.

In der vorliegenden Studie traten Todes- bzw. Krankheitsfälle bereits nach ein- bis dreitägiger Exposition und nur in der höchsten Dosisgruppe auf. Die betroffenen Tiere wiesen die gleichen charakteristischen histologischen Veränderungen in der Leber auf wie die Cu-exponierten nicht erkrankten Meerschweinchen. Bei den verstorbenen bzw. moribunden Tieren fanden sich hohe Cu-Konzentrationen in Leber oder Niere. Auch bei LEC-Ratten (Rui und Suzuki 1997, Sugawara et al. 1993, Suzuki et al. 1993), bei Schafen mit chronischer Cu-Vergiftung (Gooneratne et al. 1989) und bei Patienten mit der Wilson-Krankheit (Scheinberg und Sternlieb 1984, Sternlieb 1972) kommt es neben der exzessiven Anreicherung von Cu in der Leber zu einer Anreicherung von Cu in der Niere. Die erhöhten Cu-Gehalte in der Niere werden als direkte Folge einer massiven Leberschädigung mit der Freisetzung des Metalls in das Blut aus nekrotischen oder apoptotischen Hepatozyten diskutiert (Sugawara et al. 1993, Suzuki et al. 1993).

Zur Bedeutung der Lokalisation und Bindung von Kupfer für die Hepatotoxizität des Metalls

Der Mechanismus der Hepatotoxizität von Cu ist bislang nicht ausreichend geklärt. Es kann jedoch als gesichert gelten, dass für die toxischen Effekte die subzelluläre Verteilung von Cu in der Leber und die Assoziation mit spezifischen Bindungspartnern von herausragender Bedeutung sind. Bei den exponierten neugeborenen Meerschweinchen war Cu vor allem in Zellkernen, Lysosomen und Mitochondrien angereichert. Dies steht in Einklang mit früheren Befunden an Cu-exponierten Ratten (Fuentealba et al. 1989, Fuentealba und Haywood 1988, Haywood et al. 1985), Schafen (Gooneratne et al. 1989, Kumaratilake und Howell 1989a) und Kälbern (Jenkins 1989). Es ist jedoch ungeklärt, in welchem Kompartiment der Zelle sich die Cu-Toxizität initial manifestiert.

Die beobachteten Kernuntergänge sind vermutlich die Folge von Cu-induzierten DNA-Schäden und DNA-Fragmentierungen (Drouin et al. 1996, Prasad et al. 1996, Spear und Aust 1995). Damit übereinstimmend wurden auch in der Leber von LEC-Ratten und Wilson-Patienten vermehrt Oxidationsprodukte der DNA und von Lipiden gefunden (Jong-Hon et al. 1993, Nair et al. 1996, Nair et al. 1998, Yamamoto et al. 1993).

Parallel zur Anreicherung von Cu waren auch die Gehalte an Cu-MT in den Zellkernen der Leber der Meerschweinchen erhöht. Auch bei Wilson-Patienten (Elmes et al. 1989, Fuller et al. 1990, Nartey et al. 1987) und bei Ratten, die gegenüber hohen Dosen von Cu exponiert waren (Evering et al. 1990), wurde MT vermehrt im Zellkern von Hepatozyten nachgewiesen. Cu-MT könnte durch die Produktion von Hydroxylradikalen (Nakamura et al. 1997, Oikawa et al. 1995, Suzuki et al. 1996) zur Entstehung von DNA-Schäden beitragen. Für eine solche prooxidative Wirkung von MT sprechen Befunde, dass Meerschweinchen mit erhöhten Cu-MT-Gehalten in der Leber empfindlicher gegenüber sauerstoffradikalbildendem Eisennitrilotriacetat sind (Goddard et al. 1986, Suntres und Lui 1991). Die bei Cu-exponierten Meerschweinchen beobachteten Schädigungen der Zellkerne könnten auch mit den erhöhten Gehalten an nicht an MT gebundenem Cu im Zytosol in Zusammenhang stehen. Die Ursachen für die Entstehung der erhöhten Spiegel dieser Cu-Spezies könnten eine eingeschränkte Induktion der MT-Synthese oder eine unvollständige Beladung des Proteins mit Cu bei neugeborenen Meerschweinchen sein. Nicht an MT gebundenes Cu ist vermutlich

in der Lage, über radikalische Prozesse (Yamamoto und Kawanishi 1989) Lipidperoxidationen bzw. DNA-Schäden auszulösen (Forman et al. 1980, Freedman et al. 1989).

Die vorgelegten Ergebnisse verdeutlichen, dass die Lysosomen bei Cu-exponierten Meerschweinchen wesentlich an der Speicherung von Cu beteiligt sind. Wie der parallele Verlauf der Cu- und Cu-MT-Gehalte nahelegt, ist MT ein wesentlicher Bindungspartner des lysosomalen Cu.

Eine Akkumulation des Metalls in Lysosomen wurde auch bei Bedlington-Terriern mit erblich bedingter hepatischer Cu-Akkumulation und Wilson-Patienten beschrieben (Hanaichi et al. 1984, Lerch et al. 1985, Sternlieb 1987). Die Bedeutung der Lysosomen bei der Speicherung von Cu und für den Verlauf der chronischen Cu-Toxizität ist Gegenstand zahlreicher, zum Teil kontrovers geführter Diskussionen. Während vor allem in älteren Arbeiten die Sequestrierung von Cu in Lysosomen als ein Mechanismus zur Entgiftung des Metalls verstanden wurde (Epstein et al. 1981, Goldfischer et al. 1980, Goldfischer und Sternlieb 1968, Helman et al. 1983, Sternlieb und Goldfischer 1976), gibt es neuerdings immer mehr Anhaltspunkte dafür, dass das in den Lysosomen akkumulierte Cu direkt toxisch ist. So wiesen Cu-reiche Lysosomen der Leber von Cu-belasteten Ratten und von LEC-Ratten erhebliche ultrastrukturelle Veränderungen und einen erhöhten pH-Wert auf (Abe et al. 1994, Gross et al. 1998, Harada et al. 1993, Myers et al. 1993, Myers et al. 1995). Ultrastrukturell zeigten sich eine veränderte Membran-Lipid-Zusammensetzung und eine verminderte Fluidität und erhöhte Fragilität der Membran (Abe et al. 1994, Haywood et al. 1985, Myers et al. 1993). Daneben kam es als Folge der durch Cu initiierten Lipidperoxidation zu einer erhöhten Konzentration von Oxidationsprodukten in der lysosomalen Membran (Myers et al. 1993). Der Mechanismus wie es letztlich zu dieser Lysosomenschädigung kommt ist noch ungeklärt. Nach neueren eigenen Befunden dürfte Cu in den Lysosomen reaktiv sein, da es an oxidiertes MT nur locker assoziiert ist (Klein et al. 1998). Auch bei den Cu-exponierten Meerschweinchen dürfte die Hepatotoxizität des Metalls ähnliche Ursachen haben. Damit übereinstimmend zeigten die Cu-exponierten Tiere neben erhöhten MT-Gehalten auch erhöhte Konzentrationen an oxidiertem MT.

Zur Frage der besonderen Empfindlichkeit neugeborener Meerschweinchen gegenüber Kupfer

Die Beobachtung, dass Cu-exponierte Meerschweinchen nur in den ersten Lebenstagen erkrankten oder verstarben ist der bislang erste experimentelle Hinweis für eine besondere Empfindlichkeit des Neugeborenen gegenüber Cu. Dies könnte mit den Besonderheiten des Cu-Stoffwechsels in den ersten Lebenstagen zusammenhängen. So kommt es während der ersten Lebensstage zu einer Abnahme der Konzentration von Cu-MT im Zytosol und das Protein ist weitgehend mit Cu gesättigt. Dies weist auf eine eingeschränkte Induktion der MT-Synthese und eine limitierte Bindungskapazität für Cu hin. Damit wäre die Entgiftungskapazität des Proteins für Cu in diesem Zeitraum vermindert. Ein weiterer Grund für die erhöhte Empfindlichkeit neugeborener Meerschweinchen gegenüber Cu dürfte die noch nicht ausgereifte Resorption und Ausscheidung des Metalls in den ersten Lebenstagen sein. So ist bei neugeborenen Ratten die Resorption von Cu höher als bei erwachsenen Tieren (Lønnerdal et al. 1985, Varada et al. 1993) und sowohl neugeborene Ratten als auch neugeborene Meerschweinchen scheiden vergleichsweise wenig Cu über die Galle aus (Mearrick und Mistilis 1969, Mohan et al. 1995, Srail et al. 1986).

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

Auf der Grundlage der histologischen Befunde lässt sich für neugeborene Meerschweinchen ein Lowest Observed Adverse Effect Level (LOAEL) von 10 mg Cu pro kg KG und Tag ableiten. Ein No Observed Adverse Effect Level (NOAEL) konnte nicht abgeleitet werden. Berücksichtigt man jedoch, dass es bei der höchsten Dosisgruppe bereits zu teilweise letalen Erkrankungen kam, scheint die Dosis-Wirkungs-Beziehung von Cu sehr steil zu verlaufen, d.h. der NOAEL dürfte relativ nahe am LOAEL liegen. Unter Zugrundelegung eines Faktors 3 zwischen LOAEL und NOAEL ergibt sich ein NOAEL für das neugeborene Meerschweinchen von 3,3 mg Cu pro kg KG 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 Cu-Konzentration von 22 mg Cu/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 Cu/l Leitungswasser.

Fazit

Die vorgelegte Arbeit liefert den ersten experimentellen Hinweis auf eine erhöhte Empfindlichkeit des Neugeborenen gegenüber Cu. Die Ursache hierfür dürfte vor allem in einer verminderten Entgiftungskapazität und dem noch nicht ausgereiften Cu-Stoffwechsel zu sehen sein. Berücksichtigt man den Zeitraum der verminderten Entgiftungskapazität der Leber und den Zeitraum der Reifung der biliären Cu-Ausscheidung beim Menschen (Bloomer und Lee 1978, Emery und Hilton 1961, Epstein 1983, Evans 1973, Klein et al. 1991, Linder 1991, Reed et al. 1972) ist mit einer besonderen Empfindlichkeit des Neugeborenen während der ersten 6-8 Lebensmonate zu rechnen. Mit den Annahmen zur Abschätzung des NOAEL und zur Übertragbarkeit der an Meerschweinchen erhobenen Befunde auf den Menschen, ergibt sich ein NOAEL für Cu im Bereich der Grenzwerte nach der Trinkwasserverordnung (1991) und den Empfehlungen der WHO (WHO 1998).

Vor dem Hintergrund der vermutlich sehr steilen Dosis-Wirkungsbeziehung von Cu und der relativ häufig anzunehmenden Überschreitung der Cu-Grenzwerte in Stagnationswässern und nach Neuinstallation der Versorgungsleitungen ist für überwiegend über Formulanahrung ernährte Säuglinge ein erhöhtes Gesundheitsrisiko nicht auszuschließen. Diese Problematik sollte bei einer künftigen Festlegung des Grenzwertes für Cu im Trinkwasser entsprechend berücksichtigt werden.

5 ZUSAMMENFASSUNG

Vor dem Hintergrund der in Deutschland und anderen Ländern aufgetretenen Fälle von frühkindlicher Leberzirrhose in Folge erhöhter Kupfer(Cu)-Aufnahme aus Leitungswasser wurde in der vorliegenden Arbeit die Empfindlichkeit von Neugeborenen gegenüber Cu experimentell an Meerschweinchen überprüft. Darüber hinaus sollte ein NOAEL als Grundlage zur Erstellung eines Grenzwertes für Cu im Trinkwasser abgeschätzt werden, der die möglicherweise besondere Empfindlichkeit des Neugeborenen gegenüber Cu berücksichtigt.

Für die Hepatotoxizität von Cu sind neben dessen Konzentration im Gewebe insbesondere die subzelluläre Lokalisation und Bindung des Metalls von ausschlaggebender Bedeutung. Die methodischen Voraussetzungen die Lokalisation und Bindung von Cu in der Leber zu charakterisieren, wurden an der Long-Evans Cinnamon (LEC)-Ratte mit genetisch bedingter Cu-Akkumulation in der Leber erarbeitet.

Meerschweinchen wurden vom ersten bzw. zweiten Lebenstag an mit Cu-haltiger Formulamilch in Dosen von 10, 15 bzw. 30 mg Cu/kg Körpergewicht (KG)/Tag bis zu einem Alter von 28 Tagen gefüttert. Danach erhielten die Tiere Cu-haltiges Trinkwasser in Konzentrationen von 100, 150 bzw. 300 mg Cu/l entsprechend einer abgeschätzten Dosis von 10, 15 bzw. 30 mg Cu/kg KG/Tag.

Von den insgesamt 150 Meerschweinchen zeigten 124 während des Versuchs keine Symptome, 21 Tiere verstarben, davon 18 Cu-exponierte und 3 Kontrolltiere. Bei den 3 Kontrolltieren sowie 11 von 18 der Cu-exponierten verstorbenen Meerschweinchen konnte ein Zusammenhang mit der Cu-Exposition ausgeschlossen werden. Diese 14 Tiere wurden im Ergebnisteil nicht berücksichtigt. Darüber hinaus erkrankten 5 Cu-exponierte Tiere der höchsten Dosisgruppe nach 1-3 Tagen schwer.

Nach den pathologischen und pathobiochemischen Befunden ist ein kausaler Zusammenhang zwischen der Cu-Exposition dieser Tiere und deren Erkrankung

bzw. Tod als wahrscheinlich anzunehmen. So zeigte die Mehrheit der Cu-exponierten Tiere histologische Veränderungen der Leber wie trübe Schwellung, vakuoläre Degenerationen und Sternzellhyperplasien. Die Cu-Exposition führte bereits nach kurzer Expositionszeit zu einer zumeist dosisabhängigen Anreicherung des Metalls in der Leber insbesondere im Zytosol, in den Lysosomen und den Zellkernen. In Lysosomen und Zellkernen war im Gegensatz zum Zytosol ein großer Teil des akkumulierten Cu an Metallothionein (MT) gebunden. Auffällig war die erhöhte Konzentration von nicht an MT gebundenem Cu im Zytosol, die hohe Sättigung des Proteins mit Cu im Zytosol und der hohe Oxidationsgrad des Proteins in den Lysosomen der erkrankten und verstorbenen Meerschweinchen. Die hierdurch verminderte Entgiftungskapazität für Cu und die erhöhte Konzentration an reaktivem Cu sowie möglicherweise auch die prooxidative Wirkung von Cu-MT dürften auslösende Faktoren für die Hepatotoxizität von Cu sein.

Die vorliegenden Untersuchungsergebnisse sind der erste experimentelle Beleg, dass Neugeborene im ersten Lebensabschnitt besonders empfindlich gegenüber einer erhöhten Cu-Exposition sind.

Auf der Basis der histologischen Befunde wurde für neugeborene Meerschweinchen ein Lowest Observed Adverse Effect Level (LOAEL) von 10 mg Cu/kg KG/Tag abgeleitet. Unter Zugrundelegung eines Faktors 3 zwischen LOAEL und NOAEL ergibt sich ein NOAEL für das neugeborene Meerschweinchen von 3,3 mg Cu pro kg KG und Tag. Übertragen auf die Situation des Säuglings, entspricht dies mit den Annahmen einer täglichen Aufnahme von 750 ml Flaschnahrung und einem Körpergewicht von 5 kg einer Cu-Konzentration von 22 mg Cu/l Flaschnahrung. Unter Berücksichtigung eines Sicherheitsfaktors von 10 auf Grund der Speziesunterschiede ergibt sich eine dem NOAEL analoge Cu-Konzentration von 2,2 mg/l Leitungswasser. Dies entspricht dem Leitwert für Cu im Leitungswasser nach der bundesdeutschen Trinkwasserverordnung von 3 mg/l und den jüngsten Empfehlungen der Weltgesundheitsorganisation.

Vor dem Hintergrund der vermutlich sehr steilen Dosis-Wirkungs-Beziehung von Cu und der relativ häufig anzunehmenden Überschreitung der Cu-Grenzwerte in Stagnationswässern und nach Neuinstallation von Versorgungsleitungen ist für überwiegend über Formulanahrung ernährte Säuglinge ein erhöhtes Gesundheits-

risiko nicht auszuschließen. Diese Problematik sollte bei einer künftigen Festlegung des Grenzwertes für Cu im Trinkwasser entsprechend berücksichtigt werden.

6 LITERATURVERZEICHNIS

- 1 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
- 2 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
- 3 Aljajeh, I.A., Mughal, S., Al-Tahou, B., Ajrawi, T., Ismail, E.A., Nayak, N.C. (1994). Indian childhood cirrhosis-like liver disease in an Arab child. A brief report. *Virchows Arch.* 424, 225-227
- 4 Andersch, M.A., Szczypinski, A.J. (1947). Use of p-nitrophenyl phosphate substrate in determination of serum acid phosphatase. *Am. J. Clin. Pathol.* 17, 571
- 5 Aston, N., Morris, P., Tanner, S. (1996). Retrorsine in breast milk influences copper handling in suckling rat pups. *J. Hepatol.* 25, 748-755
- 6 Baker, A., Gormally, S., Saxena, R., Baldwin, D., Drumm, B., Bonham, J., Portmann, B., Mowat, A.P. (1995). Copper-associated liver disease in childhood. *J. Hepatol.* 23, 538-543
- 7 Barka, T., Scheuer, P.J., Schaffner, F., Popper, H. (1964). Structural changes of liver cells in copper intoxication. *Arch. Pathol.* 78, 331-349
- 8 Bartsch, R., Klein, D., Summer, K.H. (1990). The Cd-Chelex-assay: a new sensitive method to determine metallothionein containing zinc and cadmium. *Arch. Toxicol.* 64, 177-180
- 9 Bent, S., Böhm, K. (1995). Kupferinduzierte Leberzirrhose bei einem 13 Monate alten Jungen. *Gesundheitswesen* 57, 667-669

-
- 10 Bessey, O.A., Lowry, O.H., Brock, M.J. (1946). A method for the rapid determination of alkaline phosphatase with five cubic millimeters of serum. *J. Biol. Chem.* 164, 321
 - 11 Bloomer, L.C., Lee, G.R. Normal hepatic copper metabolism. In: *Metals and the liver* (L.W. Powell, Hrsg.). S. 179-239, Marcel Dekker, New York 1978
 - 12 Boulard, M., Blume, K.G., Beutler, E. (1972). The effect of copper on red cell enzyme activities. *J. Clin. Invest.* 52, 459-461
 - 13 Bradford, M. (1976). *Anal. Biochem.* 72, 248
 - 14 Chesta, J., Srai, S.K.S., Burroughs, A.K., Scheuer, P.J., Epstein, O. (1989). Copper overload in the developing guinea pig liver: a histological, histochemical and biochemical study. *Liver* 9, 198-204
 - 15 Ciriolo, M.R., Desideri, A., Paci, M., Rotilio, G. (1990). Reconstitution of Cu,Zn-superoxide dismutase by the Cu(I)-glutathione complex. *J. Biol. Chem.* 265, 11030-11034
 - 16 Dickson, E.R., Fleming, C.R., Baldus, W.P. Primary biliary cirrhosis: past, present, and speculations on the future. In: *Frontiers in liver disease* (D. Berk, T.C. Chalmers, Hrsg.). S. 242-254, Thieme, Stuttgart 1981
 - 17 Doumas, B.T., Bayse, D.D., Carter, R.J. (1981). A candidate reference method for determination of total protein in serum. *Clin. Chem.* 27, 1642
 - 18 Drouin, R., Rodriguez, H., Gao, S.W., Gebreyes, Z., O'Connor, T.R., Holmquist, G.P., Akman, S.A. (1996). Cupric ion/ascorbate/hydrogen peroxide-induced DNA damage: DNA-bound copper ion primarily induces base modifications. *Free Rad. Biol. Med.* 21, 261-273
 - 19 Eife, R., Müller-Höcker, J. (1988). Frühkindliche Leberzirrhose. *Deutsches Ärzteblatt* 85, 444-445
 - 20 Eife, R., Müller-Höcker, J., Kellner, M., Arleth, S., Schmölz, A., Weiß, M., Bendes-Götze, C.H., Schramel, P., Holtmann, H., (1987). Kupferwasserleitungen als Ursache für Immundefizienz und frühkindliche letale Leberzirrhose. *Pädiat. Prax.* 36, 69-76

-
- 21 Eife, R., Reiter, K., Sigmund, B., Schramel, P., Dieter, H.H., Müller-Höcker, J. (1991). Die frühkindliche Leberzirrhose als Folge der Kupferintoxikation. Bundesgesundheitsblatt 32, 327-329
 - 22 Elmes, M.E., Clarkson, J.P., Mahy, N.J., Jasani, B. (1989). Metallothionein and copper in liver disease with copper retention - a histopathological study. J. Pathol. 158, 131-137
 - 23 Emery, J.L., Hilton, D.J. (1961). The iron and copper concentrations of the liver in intrauterine life and in haemolytic disease. Acta Paediatr. Scand. 50, 233-239
 - 24 Epstein, O. (1983). Liver copper in health and disease. Postgrad. Med. J. 59, 88-94
 - 25 Epstein, O., Arborgh, B., Sagiv, M., Wroblewski, R., Scheuer, P.J., Sherlock, S. (1981). Is copper hepatotoxic in primary biliary cirrhosis? J. Clin. Pathol. 34, 1071-1075
 - 26 Evans, G.W. (1973). Copper homeostasis in the mammalian system. Physiol. Rev. 53, 535-570
 - 27 Evering, W.E., Haywood, S., Elmes, M.E., Jasani, B., Trafford, J. (1990). Histochemical and immunocytochemical evaluation of copper and metallothionein in the liver and kidney of copper-loaded rats. J. Pathol. 160, 305-312
 - 28 Ferreira, A.M., Ciriolo, M.R., Marcocci, L., Rotilio, G. (1993). Copper(I) transfer into metallothionein mediated by glutathione. Biochem. J. 292, 673-676
 - 29 Fischer, R. Probleme der morphologischen Diagnostik frühkindlicher Lebererkrankungen. In: Dokumentation des 2. Elsteraner Fachgesprächs. Kupfer und frühkindliche Leberzirrhose: Expositions- und Risikoabschätzung. (H.H. Dieter, W. Seffner, Hrsg.). Bad Elster, 25.-26.10.1993, WaBoLu-Hefte 9, Berlin 1994
 - 30 Fleming, C.R., Dickson, E.R., Baggenstoss, A.H., McCall, J.T. (1974). Copper and primary biliary cirrhosis. Gastroenterology 67, 1182-1187

- 31 Forman, S.J., Kumar, K.S., Redeker, A.G., Hochstein, P. (1980). Hemolytic anemia in Wilson's disease: clinical findings and biochemical mechanisms. *Am. J. Hematol.* 9, 269-276
- 32 Freedman, J.H., Ciriolo, M.R., Peisach, J. (1989) The role of glutathione in copper metabolism and toxicity. *J. Biol. Chem.* 264, 5598-5605
- 33 Fuentealba, I., Haywood, S. (1988). Cellular mechanisms of toxicity and tolerance in the copper-loaded rat. I. Ultrastructural changes in the liver. *Liver* 8, 372-380
- 34 Fuentealba, I., Haywood, S., Foster, J. (1989). Cellular mechanisms of toxicity and tolerance in the copper-loaded rat. II. Pathogenesis of copper toxicity in the liver. *Exp. Mol. Pathol.* 50, 26-37
- 35 Fuller, C.E., Elmes, M.E., Jasani, B. (1990). Age-related changes in metallothionein, copper, copper-associated protein, and lipofuscin in human liver: a histochemical and immunohistochemical study. *J. Pathol.* 161, 167-172
- 36 Funk, M.A., Baker, D.H. (1991). Toxicity and tissue accumulation of copper in chicks fed casein and soy-based diets. *J. Anim. Sci.* 69, 4505-4511
- 37 Gedigk, P., Totovic, V. Zell- und Gewebsschäden. In: *Lehrbuch der allgemeinen Pathologie und der pathologischen Anatomie.* (M. Eder, P. Gedigk, Hrsg.). S. 6-75, Springer, Berlin 1986
- 38 Goddard, J.G., Basford, D., Sweeney, C.D. (1986). Lipid peroxidation stimulated by iron nitrilotriacetate in rat liver. *Biochem. Pharmacol.* 35, 2381-2387
- 39 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
- 40 Goldfischer, S., Sternlieb, I. (1968). Changes in the distribution of hepatic copper in relation to the progression of Wilson's disease (hepatolenticular degeneration). *Am. J. Pathol.* 53, 883-901
- 41 Gooneratne, S.R., Howell, J.McC., Gawthorne, J.M., Kumaratilake, J.S. (1989). Subcellular distribution of copper in the kidneys of normal, copper-poisoned, and thiomolybdate-treated sheep. *J. Inorg. Biochem.* 35, 23-36

-
- 42 Graham, J.M., Ford, T., Rickwood, D. (1990). Isolation of the major subcellular organelles from mouse liver using nycodenz gradients without the use of an ultrazentrifuge. *Anal. Biochem.* 187, 318-323
 - 43 Gross, J.B. Jr., Myers, B.M., Kost, L.J., Kuntz, S.M., LaRusso, N.F. (1998). Biliary copper excretion by hepatocyte lysosomes in the rat. Major excretory pathway in experimental copper overload. *J. Clin. Invest.* 83, 30-39
 - 44 Hädrich, J. (1996). Auffallend hohe Kupferkonzentrationen in Lebern von Mastkälbern. Aktuelle Meßergebnisse und Versuch einer Bewertung. *Deutsche Lebensmittel-Rundschau* 4, 103-113
 - 45 Halliwell, B., Gutteridge, M.C. (1984). Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. *Biochem. J.* 219, 1-14
 - 46 Hanaichi, T., Kidokoro, R., Hayashi, H., Sakamoto, N. (1984). Electron probe X-ray analysis on human hepatocellular lysosomes with copper deposits: copper binding to a thiol-protein in lysosomes. *Lab. Invest.* 51, 592-597
 - 47 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
 - 48 Haywood, S., Loughran, M. (1985). Copper toxicosis and tolerance in the rat. II. Tolerance - a liver protective adaptation. *Liver* 5, 267-275
 - 49 Haywood, S., Loughran, M., Batt, R.M. (1985). Copper toxicosis and tolerance in the rat. III. Intracellular localization of copper in the liver and kidney. *Exp. Mol. Pathol.* 43, 209-219
 - 50 Hébert, C.D., Elwell, M.R., Travlos, G.S., Fitz, C.J., Bucher, J.R. (1993). Sub-chronic toxicity of cupric sulfate administered in drinking water and feed to rats and mice. *Fund. Appl. Toxicol.* 21, 461-475
 - 51 Helman, R.G., Adams, L.G., Pierce, K.R., Bridges, C.H., Bailey, E.M. (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
 - 52 Henry, J. Clinical diagnosis and management by laboratory methods. S. 250-284. W.B. Saunders, Philadelphia, USA 1991

-
- 53 Horslen, S.P., Tanner, S.P., Lyson, T.D.B., Fell, G.S. Lowry, M.F. (1994). Copper-associated childhood cirrhosis. *Gut*. 35, 1497-1500
- 54 Jendrassik G., Grof J. Clinical guide to laboratory tests. W.B. Saunders, Philadelphia, USA 1983
- 55 Jenkins, K.J. (1989). Effect of copper loading of preruminant calves on intracellular distribution of hepatic copper, zinc, iron, and molybdenum. *J. Dairy Sci.* 72, 2346-2350
- 56 Jenkins, K.J., Hidioglou, M. (1989). Tolerance of the calf for excess copper in milk replacer. *J. Dairy Sci.* 72, 150-156
- 57 Jong-Hon, K., Togashi, Y., Kasai, H., Hosokawa, M., Takeichi, N. (1993). Prevention of spontaneous hepatocellular carcinoma in Long-Evans cinnamon rats with hereditary hepatitis by the administration of D-penicillamine. *Hepatology* 18, 614-620
- 58 Kägi, J.H.R., Himmelhoch, S.R., Whanger, P.D., Bethune, J.L., Vallee, B.L. (1974). Equine hepatic and renal metallothioneins. Purification, molecular weight, amino acid composition, and metal content. *J. Biol. Chem.* 249, 3537-3542
- 59 Kawano, K., Hirashima, T., Mori, S., Bando, S., Yonemoto, K., Abe, F., Goto, H., Natori, T. Pathological and laboratory findings of "LEC/Otk" rats maintained under SPF conditions. In: *The LEC rat. A new model for hepatitis and liver cancer.* (M. Mori, M.C. Yoshida, N. Takeichi, N. Taniguchi, Hrsg.). S. 30-40, Springer, Tokyo 1991
- 60 Klein, D. (1991). Die Analytik von kupferhaltigem Metallothionein: Untersuchungen zur Beteiligung von Metallothionein bei der chronischen Kupfertoxizität. Dissertation, Fachbereich Chemie, Technische Universität München
- 61 Klein, D., Bartsch, R., Summer, K.H. (1990). Quantitation of Cu-containing metallothionein by a Cd-saturation method. *Anal. Biochem.* 189, 35-39

-
- 62 Klein, D., Lichtmanegger, J., Heinzmann, U., Müller-Höcker, J., Michaelsen, S., Summer, K.H. (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
- 63 Klein, D., Sato, S., Summer, K.H. (1994). Quantification of oxidized metallothionein in biological material by a Cd saturation method. *Anal. Biochem.* 221, 405-409
- 64 Klein, D., Scholz, P., Drasch, G.A., Müller-Höcker, J., Summer, K.H. (1991). Metallothionein, copper and zinc in fetal and neonatal human liver: changes during development. *Toxicol. Lett.* 56, 61-67
- 65 Kumar, K.S., Rowse, C., Hochstein, P. (1978). Copper induced generation of superoxide in human red cell membrane. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 83, 587-592
- 66 Kumaratilake, J.S., Howell, J.McC. (1989a). Intracellular distribution of copper in the liver of copper-loaded sheep - a subcellular fractionation study. *J. Comp. Path.* 101, 161-176
- 67 Kumaratilake, J.S., Howell, J.McC. (1989b). Lysosomes in the pathogenesis of liver injury in chronic copper poisoned sheep: an ultrastructural and morphometric study. *J. Comp. Path.* 100, 381-390
- 68 Lefkowitz, J.H., Honig, C.L., King, M.E., Hagstrom, J.W.C. (1982). Hepatic copper overload and features of Indian childhood cirrhosis on an American sibship. *N. Engl. J. Med.* 307, 271-277
- 69 Lerch, K., Johnson, G.F., Grushoff, P.S., Sternlieb, I. (1985). Canine hepatic lysosomal copper protein: identification as metallothionein. *Arch. Biochem. Biophys.* 243, 108-114
- 70 Li, Y., Togashi, Y., Sato, S., Emoto, T., Kang, J.H., 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 for Wilson's disease. *J. Clin. Invest.* 87, 1858-1861

-
- 71 Li, Y., Togashi, Y., Takeichi, N. Abnormal copper accumulation in the liver of LEC rats: a rat form of Wilson's disease. In: The LEC rat (M. Mori, M.C. Yoshida, N. Takeichi, N. Taniguchi), S. 122-132, Springer-Verlag, Tokio 1991
- 72 Lim, C.T., Choo, K.T. (1979). Wilson's disease in a 2-year-old child. *J. Singapore Pediatr. Soc.* 21, 99-102
- 73 Linder, M.C. The biochemistry of copper. Plenum, New York 1991
- 74 Lönnerdal, B., Bell, J.G., Keen, C.L. (1985). Copper absorption from human milk, cow's milk, and infant formulas using a suckling rat model. *Am. J. Clin. Nutr.* 42, 836-844
- 75 Maggiore, G., De Giacomo, C., Sessa, F., Burgio, G. (1987). Idiopathic copper toxicosis in a child. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* 6, 980-983
- 76 Mearrick, P.T., Mistilis, S.P. (1969). Excretion of radiocopper by the neonatal rat. *J. Lab. Clin. Med.* 74, 421-426
- 77 Mohan, P., Failla, M., Bremner, I., Arthur-Smith, A., Kerzner, B. (1995). Biliary copper excretion in the neonatal rat: role of glutathione and metallothionein. *Hepatology* 21, 1051-1057
- 78 Morris, P., O'Neill, D., Tanner, S. (1994). Synergistic liver toxicity of copper and retrorsine in the rat. *J. Hepatol.* 21, 735-742
- 79 Müller, T., Feichtinger, H., Berger, H., Müller, W. (1996). Endemic Tyrolean infantile cirrhosis: an ecogenetic disorder. *Lancet* 346, 877-880
- 80 Müller-Höcker, J., Meyer, U., Wiebecke, B., Hübner, G., Eife, R., Kellner, M., Schramel, P. (1988). Copper storage disease of the liver and chronic dietary copper intoxication in two further German infants mimicking Indian childhood cirrhosis. *Path. Res. Pract.* 183, 39-45
- 81 Müller-Höcker, J., Weiß, M., Meyer, U., Schramel, P., Wiebecke, B., Belohradsky, B.H., Hübner, G. (1987). Fatal copper storage disease of the liver in a German infant resembling Indian childhood cirrhosis. *Virch. Arch. A.* 411, 379-385

-
- 82 Musci, G., Di Marco, S., Bellenchi, G.C., Calabrese, L. (1996). Reconstitution of ceruloplasmin by the Cu(I)-glutathione complex. Evidence for a role of Mg^{2+} and ATP. *J. Biol. Chem.* 271, 1972-1978
- 83 Myers, B.M., Hamilton, B.A., Schilsky, M.L. (1995). Proliferation of hepatic lysosomes and autophagic vacuoles in the Long-Evans Cinnamon (LEC) rat. *Hepatology* 22, A373
- 84 Myers, B.M., Prendergast, F.G., Holman, R., Kuntz, S.M., LaRusso, N.F. (1993). Alterations in hepatocyte lysosomes in experimental hepatic copper overload in rats. *Gastroenterology* 105, 1814-1823
- 85 Nair, J., Carmichael, P.L., Fernando, R.C., Phillips, D.H., Strain, A.J., Bartsch, H. (1998). Lipid peroxidation-induced etheno-DNA adducts in the liver with the genetic metal storage disorders Wilson's disease and primary hemochromatosis. *Cancer Epidem. Biomarker Prev.* 7, 435-440
- 86 Nair, J., Sone, H., Nagao, M., Barbin, A., Bartsch, H. (1996). Copper-dependent formation of miscoding etheno-DNA adducts in the liver of Long-Evans cinnamon (LEC) rats developing hereditary hepatitis and hepatocellular carcinoma. *Cancer Res.* 56, 1267-1271
- 87 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. Comm.* 231, 549-552
- 88 Nakamura, M., Yamazaki, I. (1972). One-electron transfer reactions in biochemical systems. VI. Changes in electron transfer mechanism of lipoamide dehydrogenase by modification of sulfhydryl groups. *Biochim. Biophys. Acta* 267, 249-257
- 89 Namieno, T., Takeichi, N., Sasaki, M., Dempo, K., Mori, M., Uchino, J., Kobayashi, H. Clinical and pathological characteristics of LEC rats with spontaneous hepatitis. In: *The LEC rat. A new model for hepatitis and liver cancer.* (M. Mori, M.C. Yoshida, N. Takeichi, N. Taniguchi, Hrsg.). S. 41-53, Springer, Tokyo 1991

-
- 90 Nartey, N.O., Frei, J.V., Cherian, M.G. (1987). Hepatic copper and metallothionein distribution in Wilson's disease (hepatolenticular degeneration). *Lab. Invest.* 57, 397-401
- 91 Nayak, N.C. Indian childhood cirrhosis. In: *Pathology of the liver.* (R.N.M. MacSween, P.P. Anthony, P.J. Scheuer, Hrsg.). S. 268-269, Churchill Livingstone, New York 1979
- 92 Nayak, N.C., Ramalingaswami, V. (1975). Indian childhood cirrhosis. *Clin. Gastroenterology* 4, 333-349
- 93 Nordberg, M., Nordberg, G.F. (1975). Distribution of metallothioneinbound cadmium and cadmium chloride in mice: preliminary studies. *Environ. Health Perspect.* 12, 103-108
- 94 O'Donohue, J.W., Reid, M.A., Varghese, A., Portmann, B., Williams, R. (1993). Micronodular cirrhosis and acute liver failure due to chronic copper self-intoxication. *Eur. J. Gastroenterol. Hepatol.* 5, 561-562
- 95 Oikawa, S., Kurasaki, M., Kojima, Y., Kawanishi, S. (1995). Oxidative and nonoxidative mechanisms of site-specific DNA cleavage induced by copper-containing metallothioneins. *Biochemistry* 34, 8763-8770
- 96 Peisach, J., Aisen, P., Blumberg W.E. (Hrsg.). *The biochemistry of copper.* Academic Press, New York 1966
- 97 Popper, H., Goldfischer, S., Sternlieb, I., Nayak, N.C., Madhavan, T.V. (1979). Cytoplasmic copper and its toxic effects. *Studies in Indian childhood cirrhosis. Lancet*, June 9, 1205-1208
- 98 Pradhan, A.M., Talbot, I.C., Tanner, M.S. (1983). Indian childhood cirrhosis and other cirrhosis of Indian children. *Pediatr. Res.* 17, 435-438
- 99 Prasad, R., Kaur, G., Nath, R., Walia, B.N.S. (1996). Molecular basis of pathophysiology of Indian childhood cirrhosis: role of nuclear copper accumulation in liver. *Mol. Cell. Biochem.* 156, 25-30
- 100 Price, L.A., Walker, N.I., Clague, A.E., Pullen, I.D., Smits, S.J., Ong, T.H., Patrick, M. (1996). Chronic copper toxicosis presenting as liver failure in an Australian child. *Pathology* 28, 316-320

-
- 101 Reed, G.B., Butt, E.M., Landing, B.H. (1972). Copper in childhood liver disease. A histologic, histochemical and chemical survey. *Arch. Pathol.* 93, 249-255
- 102 Rickwood, D., Ford, T., Graham, J. (1982). Nycodenz: a new nonionic iodinated gradient medium. *Anal. Biochem.* 123, 23-31
- 103 Rui, M., Suzuki, K.T. (1997). Copper in plasma reflects its status and subsequent toxicity in the liver of LEC rats. *Res. Comm. Mol. Pathol. Pharmacol.* 98, 335-346
- 104 Samuni, A., Chevion, M., Czapski, G. (1981). Unusual copper-induced sensitization of the biological damage due to superoxide radicals. *J. Biol. Chem.* 256, 12632-12635
- 105 Sasaki, M., Yoshida, M.C., Kagami, K., Takeichi, N., Kobayashi, H., Dempo, K., Mori, M. (1985). Spontaneous hepatitis in an inbred strain of Long-Evans rats. *Rat News Lett.* 14, 4-6
- 106 Scheinberg, I.H. (1981). Wilson's disease. *J. Rheumatol. Suppl.* 7, 90-93
- 107 Scheinberg, I.H., Sternlieb, I. Wilson's disease. WB Saunders, Philadelphia, 1984
- 108 Schimmelpfennig, W., Dieter, H.H. (1995). Kupfer und frühkindliche Leberzirrhose. *Bundesgesundheitsblatt* 1, 2-10
- 109 Schramel, P., Klose, B.J., Hasse, S. (1982). Die Leistungsfähigkeit der ICP-Emissionsspektroskopie zum Nachweis von Spurenelementen in biologisch-medizinischen und in Umweltproben. *Fresenius, Z. Anal. Chem.* 310, 209-216
- 110 Schramel, P., Müller-Höcker, J., Meyer, U., Weiß, M., Eife, R. (1988). Nutritional copper intoxication in three German infants with severe liver cell damage (features of Indian childhood cirrhosis). *J. Trace Elem. Electrol. Health. Dis.* 2, 85-89
- 111 Seffner, W., Schiller, F., Lippold, U., Dieter, H.H., Hoffmann, A. (1997). Experimental induction of liver fibrosis in young guinea pigs by combined application of copper sulphate and aflatoxin B₁. *Toxicol. Lett.* 92, 161-172

-
- 112 Sokol, R.J., Devereaux, M., Mierau, G.W., Hambidge, K.M., Shikes, R.H. (1990). Oxidant injury to hepatic mitochondrial lipids in rats with dietary copper overload. *Gastroenterology* 99, 1061-1071
- 113 Spear, N., Aust, S.D. (1995). Hydroxylation of deoxyguanosin in DNA by copper and thiols. *Arch. Biochem. Biophys.* 317, 142-148
- 114 Srai, S.K.S., Burroughs, A.K., 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
- 115 St. Laurent, G.J., Amer, M.A., Barrette, D.C., Brisson, G.J. (1972). Supplementary Cu and Se in the diet of young calves. *J. Anim. Sci.* 35, 1135
- 116 Stacey, N.H., Klaassen, C.D. (1981). Comparison of the effects of metals on cellular injury and lipid peroxidation in isolated rat hepatocytes. *J. Toxicol. Environ. Health* 7, 139-147
- 117 Sternlieb, I. (1980). Copper and the liver. *Gastroenterology* 78, 1615-1628
- 118 Sternlieb, I. (1987). Hepatic lysosomal copper-thionein. *EXS* 52, 647-653
- 119 Sternlieb, I. Copper and liver injury. In.: *Hepatology: a festschrift for Hans Popper.* (H. Brunner, H. Thaler, Hrsg.). S. 243-250 Raven Press, New York 1985
- 120 Sternlieb, I. Evolution of the hepatic lesions in Wilson's disease (hepatolenticular degeneration). In: *Progress in liver disease IV* (H. Popper, F. Schaffner, Hrsg.). S. 511-525, Grune and Stratton, New York 1972
- 121 Sternlieb, I., Goldfischer, S. (1976). Heavy metals and lysosomes. *Front. Biol.* 45, 185-200
- 122 Sugawara, N., Li, D., Sugawara, C., Miyake, H. (1995). Response of hepatic function to hepatic copper deposition in rats fed a diet containing copper. *Biol. Trace Elem. Res.* 49, 161-168
- 123 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 Cinnamon (LEC) rats: induction of hepatic copper-metallothionein and its leakage from hepatocytes. *J. Trace Elem. Exp. Med.* 6, 15-21

-
- 124 Summer, K.H., Klein, D., Sato, S., Müller-Höcker, J., Fischer, R. Metallothionein und die chronische Toxizität von Kupfer. In: Dokumentation des 2. Elsteraner Fachgesprächs. Kupfer und frühkindliche Leberzirrhose: Expositions- und Risikoabschätzung. (H.H. Dieter, W. Seffner, Hrsg.). Bad Elster, 25.-26.10.1993, WaBoLu-Hefte 9, Berlin 1994
- 125 Suntres, Z.E., Lui, E.M.K. (1991). Age-related differences in iron-nitriilotriacetate hepatotoxicity in the guinea pig: role of copper-metallothionein. *J. Pharmacol. Exp. Toxicol.* 258, 797-806
- 126 Suzuki, K.T., Kanno, S., Misawa, S., Sumi, Y. (1993). Changes in hepatic copper distribution leading to hepatitis in LEC rats. *Res. Comm. Chem. Pathol. Pharmacol.* 82, 217-224
- 127 Suzuki, K.T., Rui, R., Ueda, J.I., Ozawa, T. (1996). Production of hydroxyl radicals by copper-containing metallothionein: roles as prooxidant. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 141, 231-237
- 128 Szasz, G. (1969). A kinetic photometric method for serum gamma-glutamyl transpeptidase. *Clin. Chem.* 15, 124-136
- 129 Tanner, M.S. Indian childhood cirrhosis. In: Recent advances in paediatrics. (S.R. Meadow, Hrsg.). Churchill Livingstone, Edinburgh 1986
- 130 Tanner, M.S., Mattocks, A.R. (1987). Hypothesis: plant and fungal biocides, copper and Indian childhood liver cirrhosis. *Ann. Trop. Paediatr.* 7, 264-269
- 131 Tanner, M.S., Portmann, B. (1981). Indian childhood cirrhosis. *Arch. Dis. Child* 56, 4-6
- 132 Tanzi, R.E., Petrukhin, K., Chernov, I., Pellequer, J.L., Wasco, W., Ross, B., Romano, D.M., Parano, E., Pavone, L., Brzustowicz, L.M., Devoto, M., Peppercorn, J., Bush, A.J., Sternlieb, I., Pirastu, M., Gusella, J.F., Evgrafov, O., Penchasqadeh, G.K., Honig, B., Edelman, I.S., Soares, M.B., Scheinberg, I.H., Gilliam, T.C. (1993). The Wilson disease gene is a copper transporting ATPase with homology to the Menkes disease gene. *Nat. Genet.* 5, 344-350
- 133 Trollmann, R., Behrens, R. (1998). Späte Manifestation einer Indian Childhood Cirrhosis aufgrund einer chronischen Kupferintoxikation über Saures Leitungswasser. *Gesundheitswesen* 60, 376-377

-
- 134 Valencia, M.P., Gamboa, M.J., Mediana, J. (1993). Copper overload and cirrhosis in four Mexican children. *Lab. Invest.* 68, 10-20
- 135 Varada, K.R., Harper, R.G., Wapnir, R.A. (1993). Development of copper intestinal absorption in the rat. *Biochem. Med. Metab. Biol.* 50, 277-283
- 136 Walker-Smith, J.A., Blomfield, J. (1973). Wilson's disease or chronic copper poisoning. *Arch. Dis. Child* 48, 476-479
- 137 Weiss, E., Baur, P. (1968). Experimentelle Untersuchungen zur chronischen Kupfervergiftung des Kalbes. *Zbl. Vet. Med. A.* 15, 156-184
- 138 Weiß, M., Müller-Höcker, J., Wiebecke, B., Belohradsky, B.H. (1989). First description of "Indian childhood cirrhosis" in a non-Indian infant in Europe. *Acta Paediatr. Scand.* 78, 152-156
- 139 World Health Organization. International Programme On Chemical Safety. Copper. WHO, Genf 1998
- 140 Yamamoto, F., Kasai, H., Togashi, Y., Takeichi, N., Hori, T., Nishimura, S. (1993). Elevated level of 8-hydroxydeoxyguanosine in DNA of liver, kidneys, and brain of Long-Evans cinnamon rats. *Jpn. J. Cancer Res.* 84, 508-511
- 141 Yamamoto, K., Kawanishi, S. (1989). Hydroxyl free radical is not the main active species in site-specific DNA damage induced by copper (II) ion and hydrogen peroxide. *J. Biol. Chem.* 264, 15435-15440
- 142 Yamate, J., Kumagai, D., Tsujino, K., Nakatsuji, S., Kuwamura, M., Kotani, T., Sakuma, S., LaMarre, J. (1999). Macrophage populations and apoptotic cells in the liver before spontaneous hepatitis in Long-Evans Cinnamon (LEC) rats. *J. Comp. Pathol.* 120(4):333-346
- 143 Yelin, G., Taff, M.L., Sadowski, G.E. (1987). Copper toxicity following massive ingestion of coins. *Am. J. For. Med. Pathol.* 8, 78-85

7 VERZEICHNIS DER ABKÜRZUNGEN

AAS	= Atomabsorptionsspektroskopie
ALAT	= Alaninaminotransferase
AP	= Saure Phosphatase
ASAT	= Aspartataminotransferase
Cd	= Cadmium
CM	= Carboxymethyl
Cu	= Kupfer
Cu-MT	= Kupferhaltiges Metallothionein
D-Bili	= Direktes Bilirubin
DEAE	= Diethylaminoethyl
DNA	= Desoxyribonucleinsäure
FG	= Feuchtgewicht
γ GT	= γ -Glutamyltransferase
HPLC	= Hochdruck-Flüssigkeitschromatographie
ICC	= Indian Childhood Cirrhosis
ICP-AES	= Atom-Emissions-Spektrometer mit Plasmaanregung
ICT	= Idiopathic Copper Toxicosis
KU	= Kernuntergänge
KG	= Körpergewicht
LEC	= Long-Evans Cinnamon
LOAEL	= Low Observed Adverse Effect Level Niedrigste Dosis eines Stoffes, bei der noch schädliche Wirkungen nachgewiesen werden können.
2-ME	= 2-Mercaptoethanol
min	= Minuten
MR	= Mesenchymale Reaktion
MT	= Metallothionein

MW	= Mittelwert
NOAEL	= No Observed Adverse Effect Level Die höchste Dosis eines Stoffes, bei der gerade noch kein schädlicher Effekt feststellbar ist.
SD	= Standardabweichung
SDH	= Succinatdehydrogenase
TM	= Ammoniumtetrathiomolybdat
TNF	= Tumornekrosefaktor
Tris	= Tris-(hydroxymethyl)aminomethan
TS	= Trübe Schwellung
VD	= Vakuoläre Degeneration
WHO	= World Health Organization
Zn	= Zink

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Januar 1995 bis Dezember 1998 am Institut für Toxikologie des GSF-Forschungszentrums für Umwelt und Gesundheit GmbH, Neuherberg, unter Leitung von Herrn Prof. Dr. H. Greim durchgeführt, bei dem ich mich herzlich für die Überlassung des Themas bedanken möchte.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. K.-H. Summer für seine ständige Diskussionsbereitschaft und die zahlreichen Anregungen sowie allen jetzigen und ehemaligen Mitgliedern seines Arbeitskreises, die für das hervorragende Arbeitsklima mitverantwortlich waren. Insbesondere möchte ich mich bei Herrn Dr. D. Klein und Herrn J. Lichtmannegger bedanken, die mir stets gerne mit Rat und Tat zur Seite standen.

Der experimentelle Teil dieser Arbeit wurde im Umweltbundesamt, Institut für Wasser-, Boden- und Lufthygiene, Außenstelle Bad Elster, im Fachbereich V 2.1 unter Leitung von Herrn Prof. Dr. W. Seffner durchgeführt, bei dem ich mich herzlich für die gelungene Zusammenarbeit bedanken möchte. Mein Dank gilt auch allen am Projekt beteiligten Elsteraner Kollegen für die ständige Hilfsbereitschaft und freundliche Zusammenarbeit. Vor allem möchte ich mich bei Frau Sylvia Renz und Frau Ute Kramer bedanken.

Ein letztes Dankeschön noch an meine Familie, die zunächst erst mal durch zweifachen Familienzuwachs die Fertigstellung der Arbeit verzögert hat, dann jedoch den Ernst der Lage erkennend, dazu beigetragen hat die Arbeit zu einem gelungenen und glücklichen Ende zu führen.