

Elektronenmikroskopische und morphometrische Untersuchungen an Kaninchen-Lebern nach intravenöser Injektion organisch gebundenen Kupfers

W. WESSEL, P. GEDIGK und O. GIERBERG

Pathologische Institute der Universitäten Bonn (Direktor: Prof. Dr. H. HAMPERL)
und Marburg (Direktor: Prof. Dr. P. GEDIGK)

Eingegangen am 2. August 1965

Seit langem ist es bekannt, daß Kupferablagerungen in der Leber, ähnlich wie andere Schwermetallspeicherungen, Schädigungen verursachen können, die u. U. zu Leberzellnekrosen und zum cirrhotischen Umbau führen (HERKEL; LANGE; SCHAFFNER, STERNLIEB, BARKA and POPPER). Trotzdem besitzen wir über die Form der Ablagerung des Kupfers im Cytoplasma, über die Entstehung der regressiven Veränderungen in den reticuloendothelialen Elementen und der Parenchymzellen sowie über den Ablauf der Nekrobiose in den speichernden Zellen nur bruchstückhafte Kenntnisse. Auch der Mechanismus der Aufnahme und Abgabe der Schwermetalle durch die Zellen ist in vielen Punkten noch umstritten.

Um zur weiteren Klärung dieser Probleme beizutragen, injizierten wir eine organische Kupferverbindung von relativ geringer Toxizität (Kupfer-ADTE) intravenös bei Kaninchen. Dabei interessierte uns zunächst die Frage, in welcher Form das Kupfer in reticuloendotheliale Elemente und Parenchymzellen gelangt, und an welchen Stellen es dort gebunden wird. Weiterhin sollten die Veränderungen und gegebenenfalls Schädigungen untersucht werden, welche diese Zellen bzw. deren Organellen bei der Speicherung und Verarbeitung des Kupfers erleiden. Schließlich wollten wir im Laufe der Schwermetallablagerung das Gesamtvolumen der speichernden Granula und der Mitochondrien im Verhältnis zum Cytoplasmavolumen verfolgen, weil sich hierbei u. U. Rückschlüsse auf die Stoffwechselsituation der Zellen ergeben könnten.

Versuchsanordnung und Methoden

Sechs Kaninchen von 3—4 kg Gewicht, welche die übliche Standardkost erhielten, injizierten wir ein- bis zweimal wöchentlich 2,5 mg/kg Kupfer-ADTE intravenös in die Ohrvene. Die Versuchsdauer betrug insgesamt 49 Wochen. Für die elektronenmikroskopische Untersuchung wurden von allen Tieren nach 2, 8, 14, 20, 26, 34, 42, 52 und 69 Injektionen durch Laparotomie gewonnene Leberstückchen 15 Minuten in gepuffelter 2%iger Osmiumsäure fixiert und dann teils in Methacrylat, teils in Vestopal eingebettet. Die Blöcke schnitten wir mit einem Porter-Blum-Ultramikrotom und untersuchten die Schnitte mit einem Siemens Elmiskop I. Von jedem Block wurden unkontrastierte und mit Bleihydroxyd (Methode nach KARNOFSKY) nachkontrastierte Schnitte untersucht und verglichen, um die Metallablagerungen von den mit Blei „färbbaren“ organischen Strukturen unterscheiden zu können. Zur Bestimmung des Volumenanteils der kupferspeichernden Granula am Gesamtvolumen benutzten wir die von HENNING und MEYER-ARENDT sowie WEIBEL angegebenen morphometrischen Methoden.

Außerdem wurde von allen Tieren Material zur lichtmikroskopischen Untersuchung in der üblichen Weise nach der Fixierung in Formalin in Paraffin eingebettet. Die Darstellung des Kupfers erfolgte mit Benzylidenrhodanin und mit Rubeanwasserstoffsäure. Dabei erwies sich die Rubeanwasserstoffsäuremethode wegen der schwarzen Farbe und der guten Lokalisation ihres Reaktionsproduktes als empfindlicher und zuverlässiger als das Benzylidenrhodanin. — Nähere methodische Angaben finden sich bei GEDIGK und TOTOVIC.

Untersuchungsergebnisse

A. Lichtmikroskopische Befunde

Bereits nach 2 Injektionen (1 Woche) zeigte sich eine leichte Vermehrung und Schwellung der Kupfferschen Sternzellen und einiger Leberzellen. Die Disséschen Räume erschienen verschmälert. — Mit der Rubeanwasserstoffmethode ließen sich in Sternzellen und Leberzellen sowie in Bindegewebszellen der Glissonschen Felder vereinzelte kupferhaltige Granula nachweisen.

Nach 8 Injektionen (6 Wochen) trat eine geringe Verbreiterung und Verlängerung der periportaln Felder zutage, die mit lymphocytären und histiocytären Infiltraten sowie mit einer beginnenden Vermehrung der kollagenen Fasern einherging. Die Begrenzung der Acinusperipherie war stellenweise etwas unscharf. Die Vermehrung und Schwellung der Sternzellen hatte weiter zugenommen. — Das Cytoplasma der etwas vergrößerten Leberzellen war mitunter leicht vacuolisiert und enthielt vereinzelte kleine Fetttropfchen. — Mit der Rubeanwasserstoffmethode stellten sich in den acinusperipheren Leberzellen, in den Sternzellen sowie in einigen mesenchymalen Elementen der portalen Felder bräunliche bis grauschwarze, kupferhaltige Granula und kleinere Schollen dar. Die Berliner-Blau-Reaktion zeigte hier gelegentlich geringe Eisenablagerungen. Im Bereich der Kupferablagerungen ließ sich eine Diastase-resistente PAS-Reaktion erzielen.

Nach 34 Injektionen (25 Wochen) waren die Verbreiterung und Verlängerung der periportaln Felder fortgeschritten, die inzwischen verhältnismäßig viele kollagene Fasern und auch vereinzelte Pseudogallengangswucherungen enthielten. An der Acinusperipherie fielen Abbauvorgänge auf. Die lymphocytären und histiocytären Infiltrate, welche mitunter auch in der Umgebung der kleinen Gallengänge recht dicht gelagert waren, hatten stellenweise auf die peripheren Acinusabschnitte übergegriffen. — Bemerkenswert waren herdförmige Ansammlungen von Reticulumzellen in den Acini, die mitunter bis zur Bildung kleiner Knötchen führten. In den vergrößerten Sternzellen und vor allem in den Parenchymzellen bestanden eine hydropische Quellung und Vacuolisierung des Cytoplasmas. Auch Einzelzell- und kleinere Gruppennekrosen waren nachweisbar. Die Zahl der kupferhaltigen Granula und Schollen war in den mesenchymalen Elementen und in den Parenchymzellen erheblich vermehrt, wobei ihre Größe von der Läppchenperipherie zum Zentrum etwas abnahm. — Die PAS-Reaktion fiel im Bereich der kupferhaltigen Schollen unverändert positiv aus. Auch schwache feinkörnige und diffuse Eisenablagerungen ließen sich hier in geringem Maße demonstrieren.

Nach 69 Injektionen (49 Wochen) hatte die Verbreiterung und Verlängerung der periportaln Felder erheblich zugenommen. Ihre lymphocytäre und histiocytäre Infiltration war etwas zurückgegangen, die Faserbildung dagegen deutlich vermehrt. Auch Pseudogallengangswucherungen waren gelegentlich vorhanden. An der Acinusperipherie waren an zahlreichen Stellen Abbauvorgänge erkennbar. Hier bestanden ferner lymphocytäre und histiocytäre Infiltrate, denen gelegentlich polymorphkernige Leukocyten beigemischt waren. Die regressiven Veränderungen, und zwar besonders die hydropische Schwellung, hatten an den sich vielfach ablösenden Sternzellen, ebenso wie an den Leberzellen, zugenommen. Gelegentlich traf man in den Acini auf kleinere nekrobiotische Parenchymherde sowie auf knötchenförmige Ansammlungen von Reticulumzellen. — Die kupferhaltigen Granula erstreckten sich über das ganze Acinusgebiet; in den peripheren Anteilen lagen sie jedoch am dichtesten. Besonders reichliche und große Ansammlungen kupferspeichernder Körnchen fanden sich in Mesenchymzellen am Rande der periportaln Felder. Die PAS-Reaktion war innerhalb und in der Umgebung der Kupferablagerungen unverändert stark positiv. Nach wie vor ließ sich hier gelegentlich eine leicht positive Berliner-Blau-Reaktion erzielen.

Hervorzuheben ist die Tatsache, daß die beschriebenen Retothelknötchen in den Acini sich an der Speicherung des Kupfers nicht beteiligten.

B. Elektronenmikroskopische Befunde

Bei der elektronenmikroskopischen Betrachtung zeigten die reticuloendothelialen Elemente (von Kupfferschen Sternzellen) und die Parenchymzellen entsprechend ihrer verschiedenen Funktion auch ein unterschiedliches Verhalten bei der Aufnahme und Speicherung der Kupferpartikel, so daß die an ihnen ablaufenden Veränderungen im folgenden jeweils getrennt beschrieben werden.

I. Aufnahme und Speicherung des Kupfers:

1. *Von Kupffersche Sternzellen.* Schon nach den ersten beiden intravenösen Injektionen des organisch gebundenen Kupfers, also nach einer Woche, fand sich im reticuloendothelialen System der Leber reichlich Kupfer. Die Sternzellen reagierten zunächst mit einer starken Cytoplasmaschwellung, wodurch die Sinusoide eingengt und die Disséschen Räume verkleinert wurden.

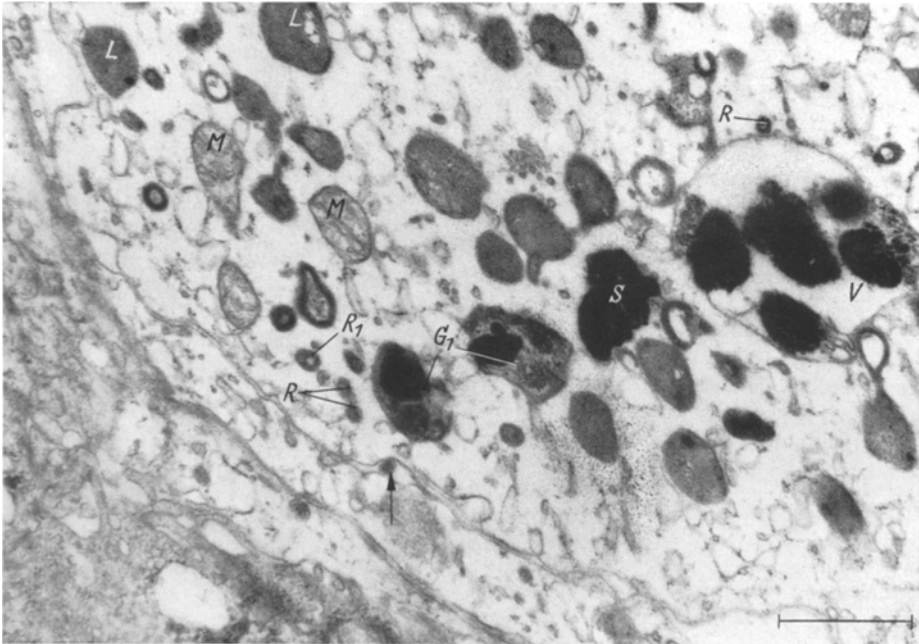


Abb. 1. Geschwollene Sternzelle nach 8 Kupferinjektionen. Große Kupferschollen neben feingranulären Kupferansammlungen in einer großen intracytoplasmatischen Vacuole (V; Phagosom). Daneben an zwei Stellen sehr dichte, offenbar nur aus Anteilen der injizierten Substanz bestehende, unregelmäßig begrenzte Schollen (S) ohne deutliche Membran. Weiter findet man Granula (G_1), die neben Kupfereinlagerungen an der Peripherie organische, offenbar von der Zelle gebildete Substanzen enthalten (Phagolysosomen). Schließlich enthält das Cytoplasma von einer Membran begrenzte, feingranulär strukturierte Körper (L), die nur gelegentlich kleine Ansammlungen von Kupfer enthalten und Lysosomen entsprechen dürften. Außen an der Zellmembran rundliche, ca. 0,1 μ große Kupferansammlungen (\rightarrow). Ähnliche Ansammlungen (R) erkennt man auch im Cytoplasma, wo sie mitunter ringförmig erscheinen (R_1). Mitochondrien (M) frei von Kupfer. OsO_4 -fixiert, nicht nachkontrastiert.

Vergrößerung: 22000fach

Im Cytoplasma der Sternzellen zeigten sich nach den ersten Kupferinjektionen meist zahlreiche osmiophile Granula, die nach Form und Struktur Lysosomen entsprachen und vielfach zunächst noch wenig Kupferteilchen einschlossen (Abb. 1 u. 2). Daneben sah man besonders in diesen Anfangsstadien im Cytoplasma große Vacuolen, die metallreiche Schollen enthielten (Abb. 1). Bei diesen auf dem Blutweg an die Sternzellen herangeführten metallhaltigen Substanzen handelte es sich offenbar um größere Verklumpungen des injizierten Stoffes oder vielleicht um Coacervate des Kupfers mit Plasmaproteinen. Wie die elektronenoptischen Befunde zeigten, gelangten diese groben kupferhaltigen Schollen durch *Phagocytose* in die Zellen, wo sie zunächst in den beschriebenen großen, offenbar durch Membranvacuolisierung entstandenen Vacuolen lagen. Nach der Auflösung der primären Vacuolen-Membran waren sie später als unregelmäßig begrenzte dichte Granula

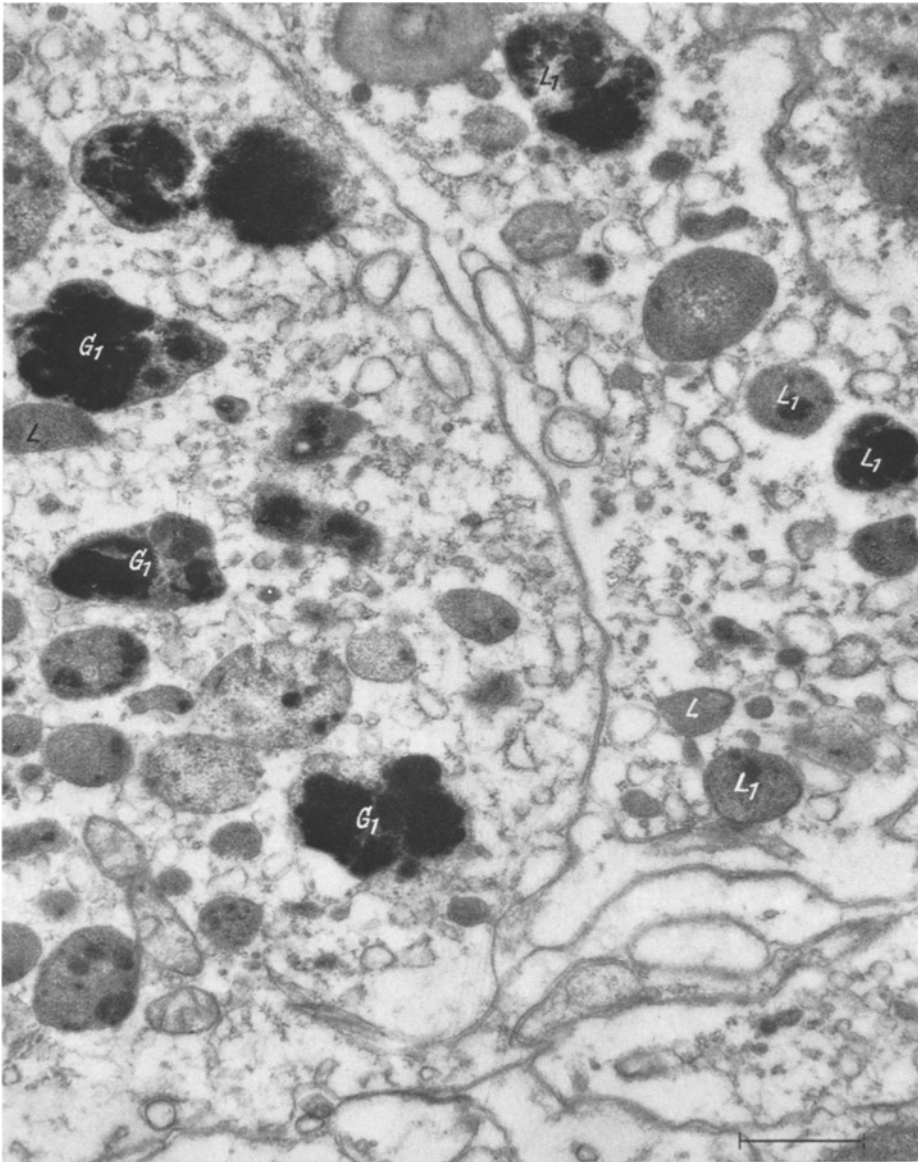


Abb. 2. Cytoplasmaausschnitt zweier Sternzellen nach 14 Injektionen. Zahlreiche Lysosomen (L), von denen einige Kupfer enthalten (L_1). Daneben unregelmäßig begrenzte, zum größten Teil aus Kupferschollen bestehende Granula (G_1 ; Phagolysosomen). Vergrößerung :16 000fach

im Cytoplasma erkennbar. Aus der Abb. 1 läßt sich weiter ersehen, daß die eingeschleusten Kupferschollen sehr bald von organischem, offenbar von der Zelle gebildetem Material durchsetzt und schließlich von einer neuen einfachen Membran begrenzt wurden.

Unter einer bestimmten Größe (etwa $0,3 \mu$) vollzog sich bei den Sternzellen die Aufnahme des Kupfers nicht auf dem oben beschriebenen Weg durch Phagocytose, sondern durch *Pinocytose*. So sah man an der Zelloberfläche stellenweise rund-

liche, metalledichte, kleine Bezirke, welche Anteilen der injizierten Substanz entsprachen. Hier wies die Zelloberfläche mitunter kleine Buchten auf, von deren Grund kleine Partikel in das Cytoplasma aufgenommen wurden. Die weitere Speicherung und Verarbeitung erfolgte auf zwei Wegen: Einerseits lagerten sich diese Kupferteilchen zu Gruppen zusammen und umgaben sich allmählich mit einer begrenzenden Membran. Die so entstandenen Granula unterschieden sich von den

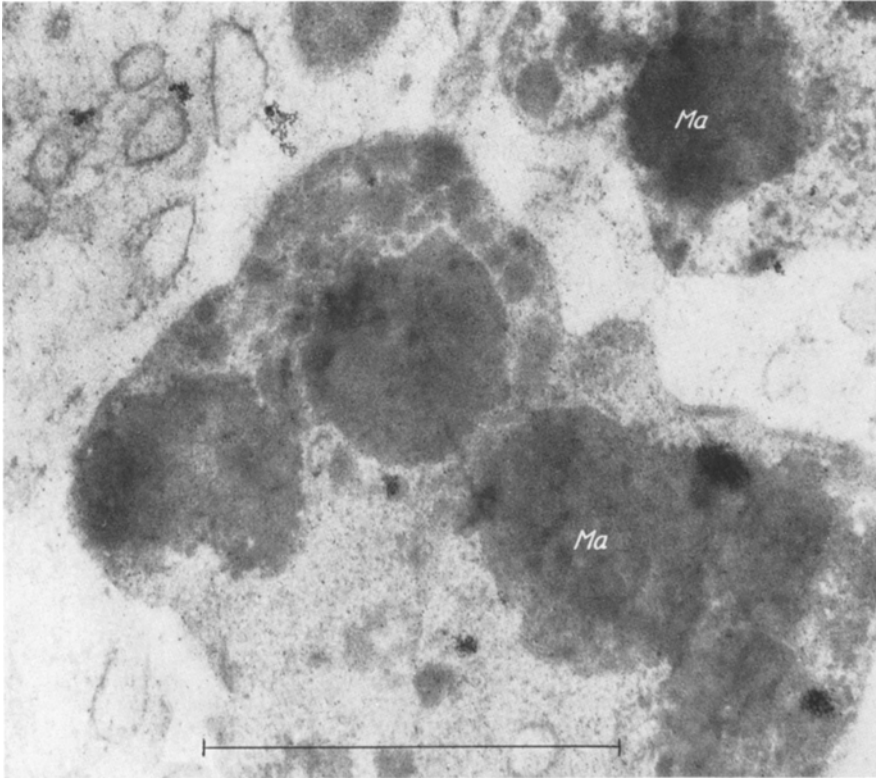


Abb. 3. Sternzelle nach 67 Kupferinjektionen. Drei große, unregelmäßig begrenzte Lysosomen mit herdförmig verdichteter Matrix (*Ma*) und diffus eingelagerten Metallpartikeln, welche größtenteils Ferritinstrukturen entsprechen. Das inkorporierte Kupfer ist in den Lysosomen teilweise bereits abgebaut, während neue Kupferteilchen von den in Auflösung befindlichen Zellen nicht mehr aufgenommen werden. Nicht kontrastiert.

Vergrößerung: 55 000fach

Speichergranula, die sich aus den oben beschriebenen großen Kupferschollen bildeten, vor allem durch den inhomogenen, grob-granulären Bau (Abb. 1 u. 2). Neben dieser Kupferspeicherung in nicht präformierten Strukturen sah man andererseits auch eine Aufnahme der pinocytotisch eingeschleusten Partikel in präformierte Lysosomen (Abb. 2). In ihrem Inneren bildete sich im Laufe der folgenden Zeit eine allmählich an Kontrast zunehmende Grundsubstanz. In seltenen Fällen ordneten sich die kupferhaltigen Teilchen in diesen speichernden Granula zu kristallartigen Einschlüssen mit einem Abstand von etwa 40 Å an, die meist von einer einfachen Membran begrenzt waren. — In diesen ersten Versuchsstadien blieben die Parenchymzellen zunächst noch weitgehend frei von kupferspeichernden Granula.

Die verschiedenen kupferhaltigen Granula erfuhren im Laufe der weiteren Speicherung (nach etwa 21 Wochen) eine Umwandlung, die sich besonders bei

einem Vergleich nur kurz in OsO_4 fixierter, nicht nachkontrastierter mit den lange fixierten, bleikontrastierten Präparaten darstellen ließ. Während im ersten Fall nur die Metallteilchen hervortraten und die übrigen Strukturen der Zellen schwach angedeutet waren, „färbte“ sich bei der Bleikontrastierung in zunehmendem Maße das die Kupferpartikel einhüllende organische Material, so daß die Granula dann homogen schwarz erschienen.

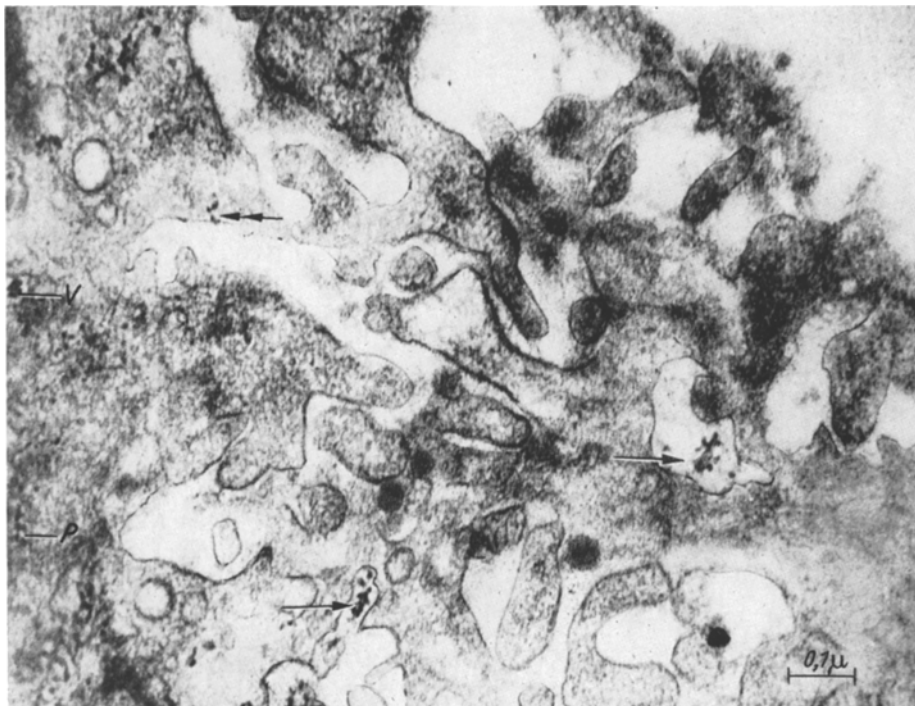


Abb. 4. Anteile des sog. Disséschen Raumes mit Mikrovilli der Parenchymzellen. In den Ausbuchtungen des Disséschen Raumes kleinste Kupferpartikel von etwa 100 Å Durchmesser (\rightarrow). Auch intracellulär sieht man an mehreren Stellen einzelne Partikel (P), die mitunter zu kleinen Gruppen in Vacuolen (V) eingeschlossen sind. An einer Stelle liegen drei offenbar gerade in das Cytoplasma eingeschleuste Partikel unmittelbar an der Zellmembran ($\rightarrow\rightarrow$). Bleikontrastierung. Vergrößerung 85 000fach

In späteren Versuchsstadien (*nach 40 Wochen bzw. 52 Injektionen*) hatten sich beide Typen der Speichergranula zu größeren, unregelmäßig gestalteten Schollen zusammengefügt und lagen in einem stark geschwollenen Cytoplasma. Diese großen Schollen enthielten elektronenoptisch relativ wenig Kupfer. Dabei ließen die Sternzellen mitunter deutlich Auflösungserscheinungen erkennen, die auf den bevorstehenden Untergang der Zellen hinwiesen. Bei nur kurz in OsO_4 fixierten und nicht nachkontrastierten Schnitten trat noch deutlicher hervor, daß die durch Zusammenlagerung entstandenen großen Schollen kaum noch die harten Metallkontraste gespeicherter Kupferteilchen, sondern große Bezirke einer mit Osmium oder anderen Schwermetallen stark „färbbaren“ organischen Grundsubstanz enthielten (Abb. 3), welche dann meistens nicht mehr von einer scharf konturierten Membran begrenzt wurde. In diesem Endstadium war eine Unterscheidung der auf verschiedenen Wegen entstandenen Granula nicht mehr möglich.

2. *Parenchymzellen.* In den Leberzellen traten die Kupferablagerungen im allgemeinen etwas später zutage als in den Sternzellen. Außerdem erfolgte die Aufnahme der Kupferteilchen in den Parenchymzellen offenbar nur dann, wenn diese in feinverteilter Form in den Disséschen Räumen vorlagen (Abb. 4). Größere Partikel gelangten im allgemeinen nicht in die Zelle. Zweifellos überwog hier als Ein-

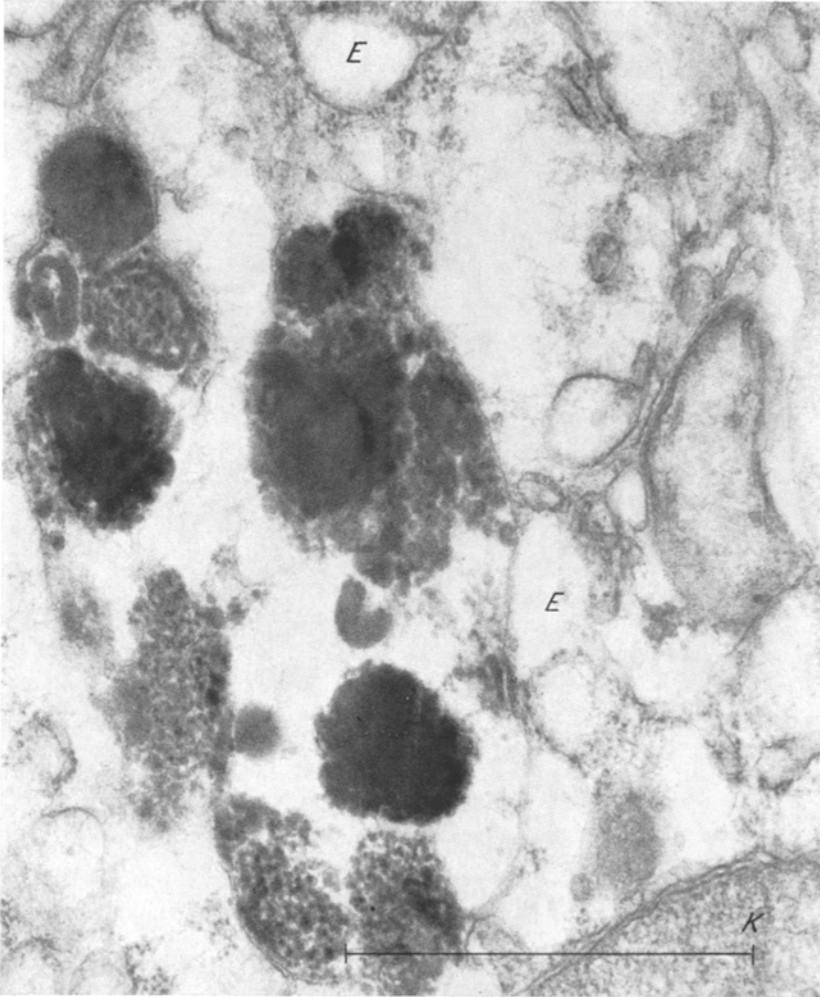


Abb. 5. Große Kupferansammlungen, die von einer Membran umschlossen werden, in einer Leberparenchymzelle. Das Kupfer liegt hier in homogenen oder granulär aufgebauten Schollen vor. Ergastoplasmaräume (E) leicht cystisch erweitert. Vergrößerung: 55 000fach

schleusungsmechanismus die *Pinocytose*. Vom Grunde tiefer Einbuchtungen der Zellmembran wurden die Kupferpartikel teils einzeln, teils auch in kleinen Gruppen aufgenommen (Abb. 4). Während um die einzeln im Cytoplasma liegenden Partikel manchmal keine Membran erkennbar war, waren die in Gruppen aufgenommenen stets von einer Außenmembran umschlossen. Diese Membran war offenbar ein Rest der bei der Kupfereinschleusung in das Cytoplasma gelangten Zellmembran (Membranvesikulation).

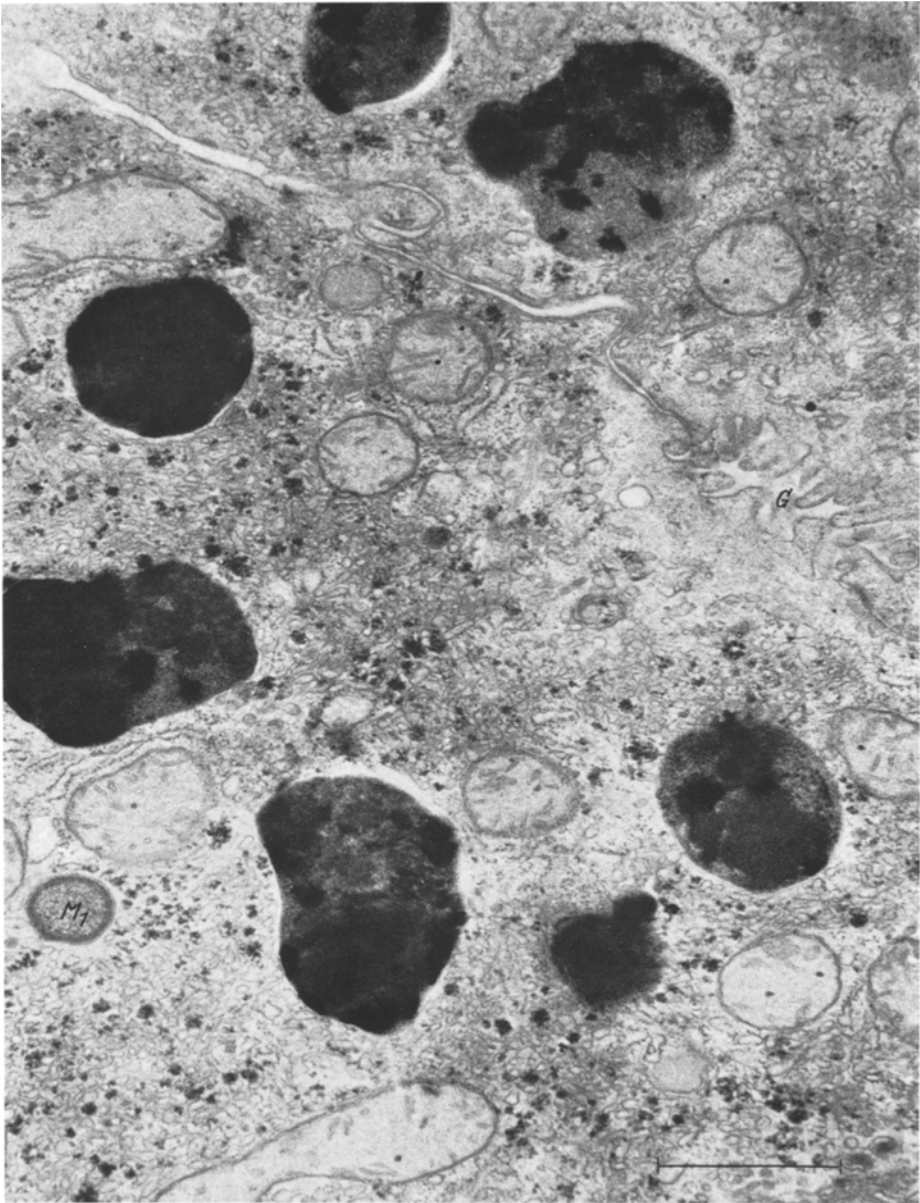


Abb. 6. Cytoplasmaanteile von zwei Leberzellen mit Gallekapillare (G) und kupferhaltigen Speichergranula (Lysosomen), die durch eine Bleikontrastierung im Gegensatz zu einem „Microbody“ (M) sehr kontrastreich und fast homogen erscheinen. Bleikontrastierung. Vergrößerung: 28 000fach

Wie in den Sternzellen waren auch hier zwei Wege der Speicherung möglich. Einmal konnten die Kupferpartikel sich zu großen Konglomeraten zusammenlagern, die später von einer Membran umgeben wurden (Abb. 5). Zum anderen fanden wir häufig einen Einbau der Kupferpartikel in präformierte Lysosomen. Im Gegensatz zu den Sternzellen wurde hier der erste der beiden genannten Wege nur selten beschritten. Wahrscheinlich hing es von der Menge des anflutenden

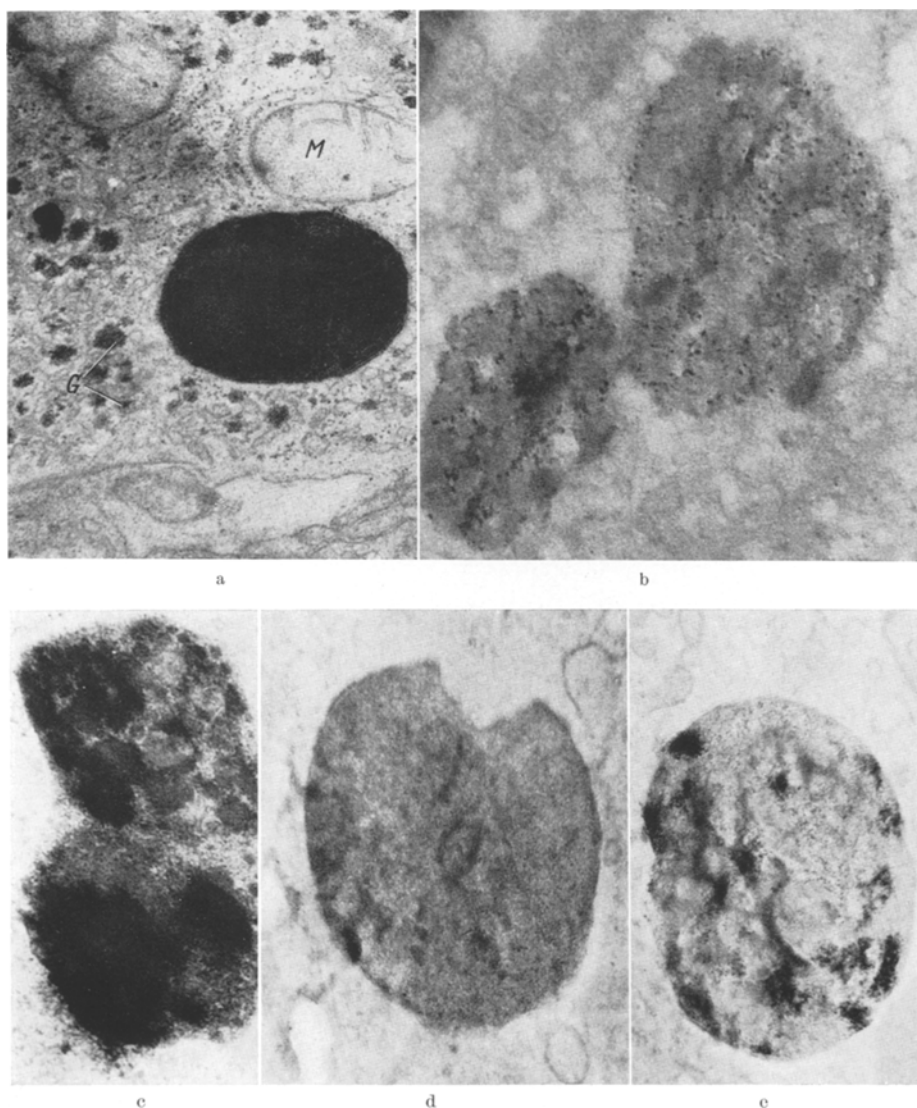


Abb. 7a—e. a Teil einer Parenchymzelle mit einem älteren Speichergranulum (Lysosom), in dessen stark bleibender, homogen schwarz erscheinender Matrix die gespeicherten Kupferpartikel verschwinden. Das daneben liegende Mitochondrium (*M*) ist frei von Kupfer. Das Glykogen (*G*) stellt sich gut dar. Bleikontrastierung. Vergrößerung: 40000fach. b Unkontrastiertes Speichergranulum (Lysosom) einer Parenchymzelle. An der Peripherie der in kleinen Kugeln angeordneten Matrix erkennt man abgelagerte Kupferteilchen. Vergrößerung: 61000fach. c Ein der Abb. 7b entsprechendes Speichergranulum, mit Blei nachkontrastiert. Die in kleinen Kugeln angeordnete Matrix besitzt eine starke Bleibindung. In der stark kontrastierten Matrix erkennt man hin und wieder Kupferpartikel. Vergrößerung: 53000fach. d Junges Speichergranulum (Lysosom) mit diffuser Einlagerung von Kupferpartikeln in einer relativ dichten Matrix. Normale OsO_4 -Fixierung ohne Nachkontrastierung. Vergrößerung: 68000fach. e Älteres Speichergranulum (Lysosom) mit herdförmigen Kupferablagerungen. Kurze OsO_4 -Fixierung ohne Nachkontrastierung. Vergrößerung: 68000fach

Kupfers ab, ob zunächst die eine oder die andere Form der Speicherung bevorzugt wurde. Meist wurden die mit Kupfer reichlich beladenen Granula in die Nähe der Gallenkapillaren verlagert (Abb. 6), ähnlich wie man es vom Hämosiderin kennt.

Durch ihren metallharten Kontrast unterschieden sich die Granula deutlich von den peribiliären Körpern der normalen Leberzellen. Die Speichergranula, die auf diese Weise teils aus einer Zusammenlagerung von Kupferpartikeln und teils durch Einlagerung von Kupferpartikeln in präexistente Lysosomen entstanden waren, entwickelten in den späteren Stadien im Laufe ihrer Alterung eine Grundsubstanz (Matrix), die sich bei unkontrastierten Schnitten durch einen relativ hohen Eigenkontrast und bei kontrastierten Schnitten durch eine auffallend starke Bleibindung auszeichnete. Mit der Zunahme der Dichte ging bei unseren parallel durchgeführten histochemischen Untersuchungen eine stärker werdende PAS-Reaktion einher.

Ferner zeigte es sich, daß gleichzeitig mit der diffusen Zunahme der elektronenoptisch dichten Grundsubstanz die kontrastreichen Kupferpartikel allmählich verschwanden. Dieser Umbau der Granula ließ sich in nachkontrastierten Schnitten nicht verfolgen, da die Kupferanteile in der stark mit Blei behandelten Matrix verschwanden, wie es z. B. die Abb. 6 und 7a demonstrieren.

Zur Darstellung der Umbauvorgänge mußten wir daher Material verwenden, das nur wenige Minuten in OsO_4 fixiert und nicht nachkontrastiert worden war. Die kurze Osmiumfixierung reichte für einen schattenhaft angedeuteten Kontrast der Mitochondrien und des Ergastoplasmas aus. Auf diese Weise traten die Kupferablagerungen in den Speichergranula (Lysosomen) deutlich hervor.

In den Speichergranula kamen verschiedene Verteilungsmuster des Kupfers vor, wie sie in Abb. 7b—e wiedergegeben werden. Hier hatten sich die Kupferpartikel an der Peripherie einer in Form zahlreicher Kugeln angeordneten Matrix niedergeschlagen (Abb. 7b). Kontrastierte man derartige Speichergranula mit Blei, so entstanden Bilder, die der Abb. 7c entsprechen. Mitunter wies das Kupfer unregelmäßige, herdförmige Anordnungen auf, wobei die Herdbildungen meist peripher lagen (Abb. 7e). Derartige Bilder kennzeichneten jedoch vor allem die älteren Speicherstadien. Das Zentrum einiger Granula wurde von einer leicht verwaschen erscheinenden Matrix gebildet (Abb. 8a). Die Kupferpartikel ordneten sich dabei an der Peripherie büschelartig, beinahe kristallin an.

Nach 42 Injektionen (31 Wochen) fand man in den speichernden Granula weitere Veränderungen: Bei den nicht kontrastierten Schnitten lagen die weniger dichten Grundsubstanzen nicht mehr in Form kleiner Schollen, sondern in größeren, zusammenfließenden Bezirken vor, die von Lamellensystemen umschlossen wurden und dichte Kupferansammlungen enthielten (Abb. 8b). Bei den konzentrischen Lamellen handelte es sich anscheinend um Lipidanteile der Grundsubstanz, wobei sich die Lipid- bzw. Proteidmoleküle schichtweise und kettenförmig angeordnet hatten. Stellenweise war die Grundsubstanz mit fein verteiltem Kupfer imbibiert.

Nach 52—69 Injektionen (40—49 Wochen), wenn bereits schwere regressive Veränderungen an den Organellen bestanden, hatten sich in der Regel mehrere speichernde Granula zu großen Konglomeraten mit einem grobscholligen Aufbau vereinigt (Abb. 8c). Bei einem Vergleich kontrastierter und nicht kontrastierter Speichergranula zeigte es sich, daß die Granula eine relativ helle Matrix besaßen, während sich in den dichteren Schollen keine metallharten Kupferteilchen mehr nachweisen ließen. Dagegen fielen zahlreiche Ferritineinheiten auf.

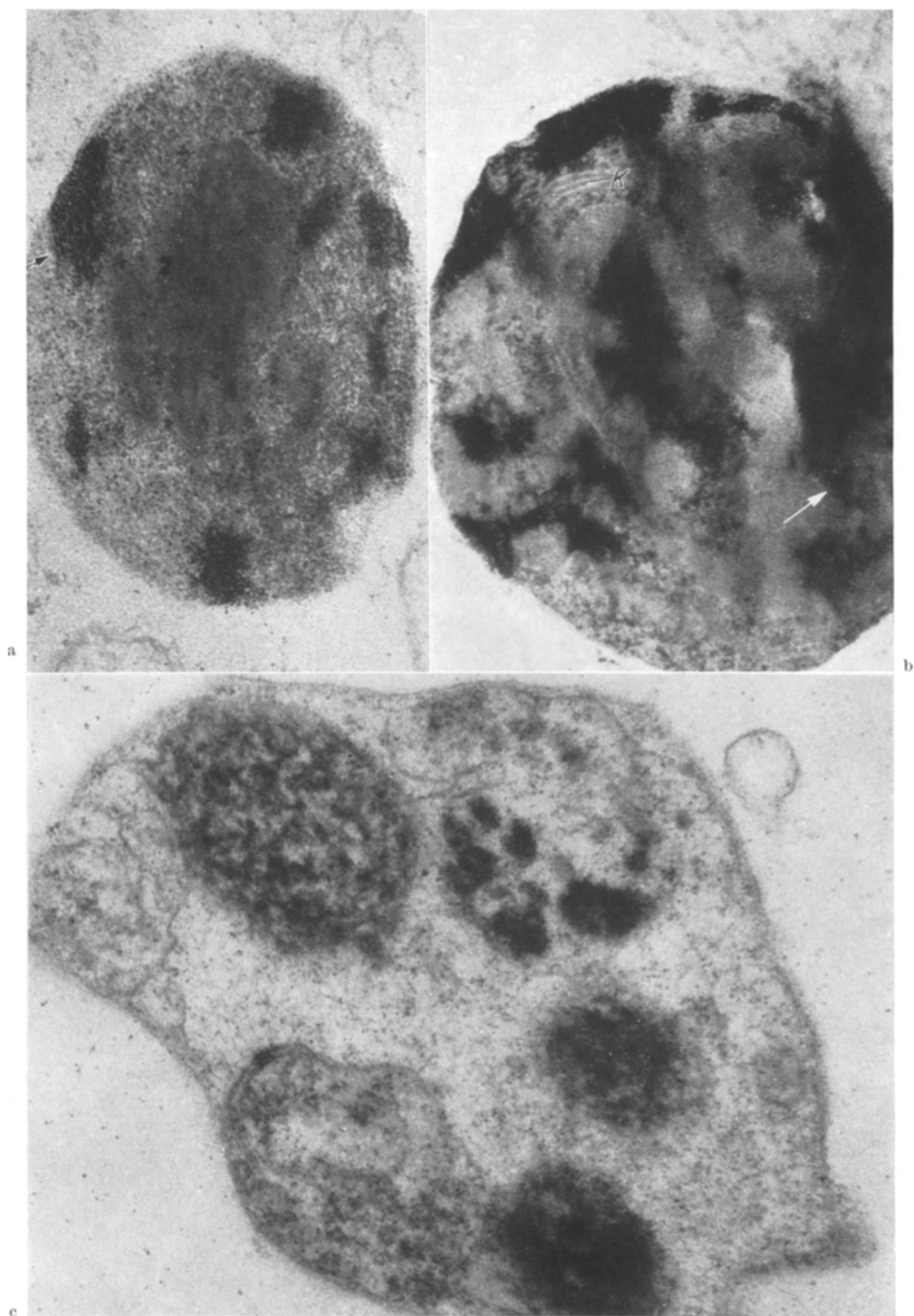


Abb. 8a—c. a Älteres Speichergranulum (Lysosom) mit homogener, zentraler Matrix, deren Dichte evtl. auf einer molekularen Verteilung des Kupfers beruhen könnte. An der Peripherie feingranuläre Kupferablagerungen mit kristallähnlichem Bau (→). Kurze OsO_4 -Fixierung ohne Nachkontrastierung. Vergrößerung: 70000fach. b Älteres Speichergranulum (Lysosom) mit homogener, relativ dichter Matrix im Zentrum und teils feingranulären, teils wolkigen homogenen Kupferablagerungen, die manchmal fließend in die umgebende Matrix übergehen (→). (Fortsetzung der Legende s. Seite 217)

II. Cytoplasmaveränderungen durch die Kupferspeicherung

Die kupferspeichernden Zellen der Leber erlitten unter dem Einfluß des in relativ großen Mengen anflutenden Kupfers deutliche regressive Veränderungen:

1. *Sternzellen*. Bei den Sternzellen stand — wie weiter oben beschrieben — vor allem eine Cytoplasmaschwellung im Vordergrund, der später der Untergang der Zellen und ihre Ablösung von der Wand der Sinusoide folgte. Dabei wurde das Bild von der hydropischen Schwellung des Cytoplasmas, der Schwellung der Mitochondrien sowie einer Verminderung bzw. einem Verlust des Ergastoplasmas beherrscht. Auch der Zellkern ging nach einer hydropischen Schwellung zugrunde.

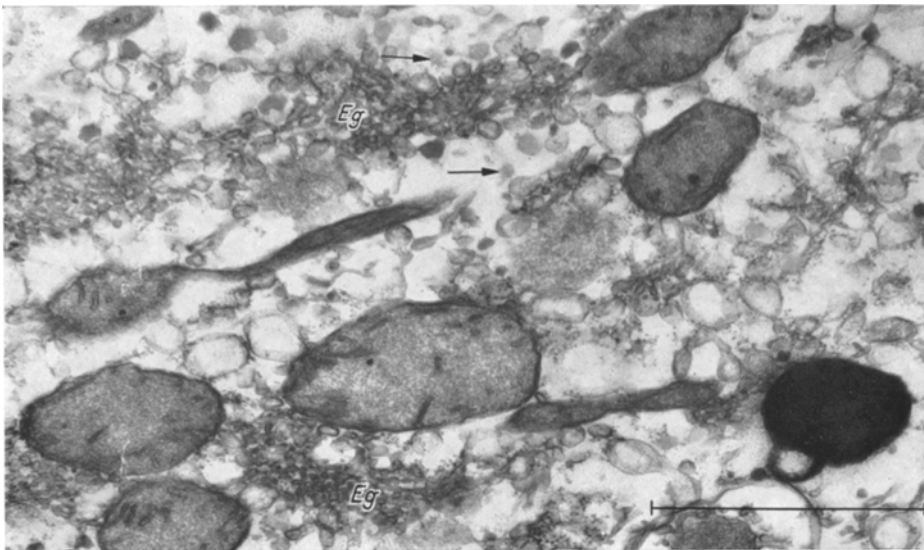


Abb. 9. Leberparenchymzelle. Beginnende Auflösung der Glykogeneinheiten (→). Ribonucleoprotein-Granula stark vermindert. Zunahme des glatten endoplasmatischen Reticulums (Eg). Bleikontrastierung. Vergrößerung: 48 000fach

2. *Parenchymzellen*. Durch den größeren Strukturreichtum war die Skala der Veränderungen bei den *Parenchymzellen* wesentlich größer. Wenige Wochen nach Versuchsbeginn fanden wir eine deutliche Vermehrung der Mitochondrien, deren Gesamtvolumen von 5,5% auf einen Anteil von ca. 15% am Cytoplasmavolumen anstieg, wie unsere morphometrischen Messungen zeigten. Gleichzeitig traten vermehrt Lysosomen auf. Nach 10 Wochen (14 Injektionen) ließen die Parenchymzellen eine geringe Auflockerung ihres Cytoplasmas mit leichter Verminderung des Ergastoplasmas bei gleichzeitiger Vermehrung glatter endoplasmatischer Membranstrukturen erkennen (Abb. 9). Ab und an fand man Riesenmitochondrien mit zahlreichen unregelmäßig verlaufenden Cristae. Das Glykogen, das sich mit der Bleikontrastierung sehr gut darstellte, nahm ebenfalls ab.

Stellenweise ordnen sich die Lipide und Proteide der Matrix zu parallel verlaufenden Ketten an (K). Kurze OsO_4 -Fixierung ohne Nachkontrastierung. Vergrößerung: 70 000fach. c Speichergranulum (Lysosom) einer in Auflösung befindlichen Parenchymzelle nach 40 Versuchswochen. In dem Speichergranulum erkennt man mehrere kleinere Schollen, welche die metallharten Kontraste des Kupfers vermissen lassen. Bei den in der hellen Matrix verteilten feinen Granula handelt es sich größtenteils um Ferritineinheiten. Kurze OsO_4 -Fixierung ohne Nachkontrastierung. Vergrößerung: 72 000fach

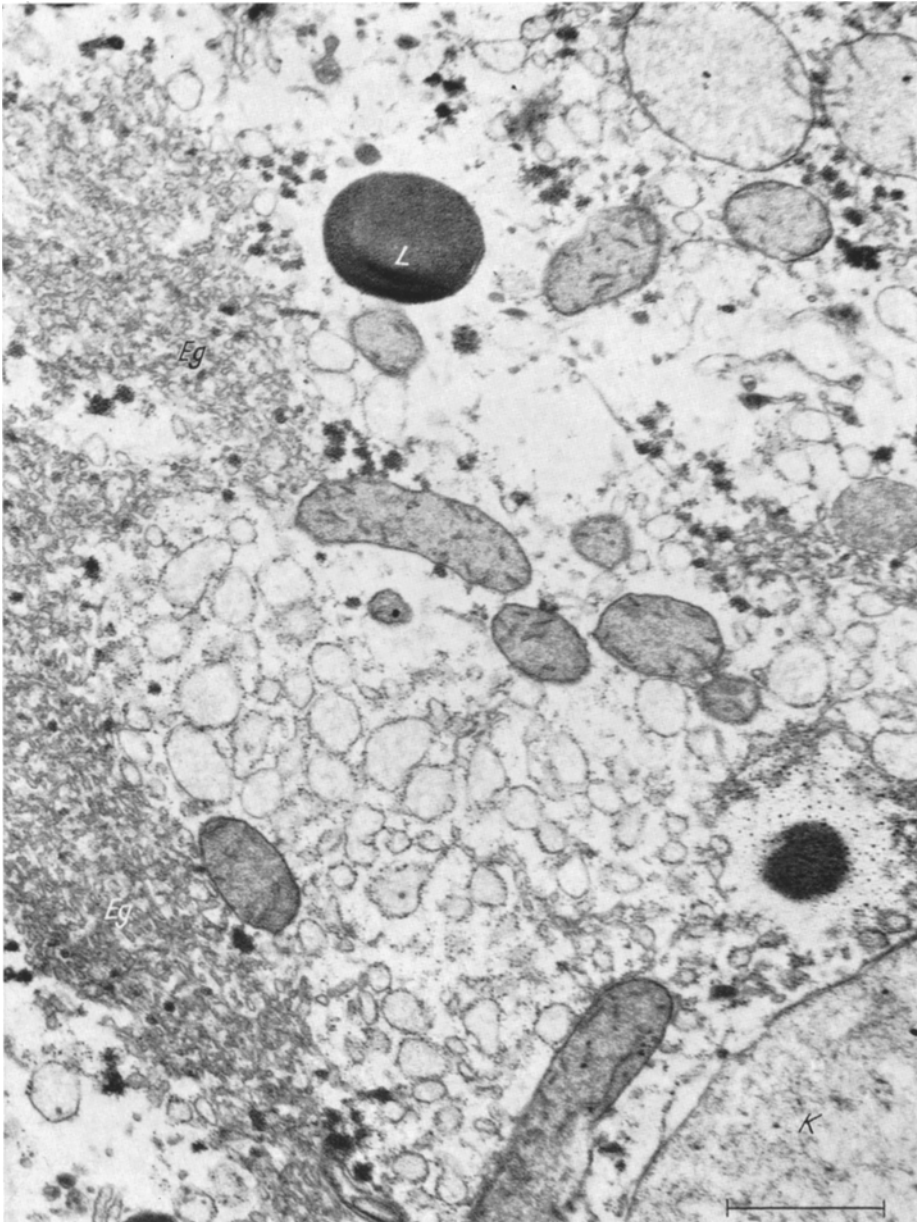


Abb. 10. Leberzelle nach 52 Kupferinjektionen. Weitgehender Schwund des Glykogens. Vakuolige Umwandlung und Verminderung des Ergastoplasmas bei gleichzeitiger starker Vermehrung des glatten endoplasmatischen Reticulums (*Eg*). Kupferhaltiges Lysosom (*L*). Zellkern (*K*). Bleikontrastierung. Vergrößerung: 20 000fach

Nach 42 Kupferinjektionen (31 Wochen) zeigten sich weitere regressive Veränderungen ab, die nach 52 Injektionen (40 Wochen) noch stärker ausgeprägt waren. Im Vordergrund stand dabei eine hydropische Schwellung der Zellen, und zwar des Kernes und des Cytoplasmas. Im Cytoplasma war die Schwellung an drei Stellen besonders ausgeprägt: um den Kern als sog. „perinucleäres Ödem“, um die

Gallencapillaren als sog. „peribiliäres Ödem“ und als „intracytoplasmatisches Ödem“ entlang der Sinusoide. Die „Ödemzonen“ fielen durch ihren elektronenoptisch geringen Kontrast und durch den Mangel an Cytoplasmaorganellen auf. Um die Gallencapillaren unterschied sich die Ödemzone deutlich von dem üblichen, schmalen, an Organellen armen „peribiliären“ Streifen, der normalerweise einer Verdichtungszone des Grundplasmas entsprach. Das intracytoplasmatische „Ödem“ entlang der Sinusoide könnte auf den ersten Blick vielleicht lichtmikroskopisch zur Annahme eines erweiterten Disséschen Raumes führen, der hier jedoch in Wirklichkeit eingeengt war.

Das Ergastoplasma war stellenweise vakuolig umgewandelt. Die Mitochondrien erschienen bei gleichzeitigem weitgehendem Schwund der Cristae vermindert. Bei fast völligem Verlust der Ribosomen und des rauhen endoplasmatischen Reticulums war das glatte endoplasmatische Reticulum stark vermehrt (Abb. 10), ähnlich wie REMMER und MERKER es nach Gaben einiger Pharmaka, wie z. B. Tolbutamid und Barbitursäurederivaten, fanden. Schließlich ließen die Leberzellen oft eine Dissoziation mit Sprengung der Schlußleisten und Erweiterung der Gallencapillaren erkennen.

Diskussion

A. Aufnahme und Schicksal des Kupfers in den Zellen

In der Abb. 11 haben wir die Möglichkeit der Kupferaufnahme in die Zelle und die an den Speichergranula ablaufenden Veränderungen schematisch dargestellt. Nach unseren Befunden hing die Art der Aufnahme von der Teilchengröße der anflutenden Substanz ab. Im Blutstrom, d. h. in den Capillaren, lag die injizierte Substanz in größeren Coacervaten (Ia), in grob disperser Form (IIa) oder in molekularer Form (IIIa) vor.

Der mit „I“ bezeichnete Weg, nämlich die *Phagocytose* von größeren Kupfercoacervaten, kam bei unseren Experimenten vor allem bei den *Sternzellen* vor. Er entsprach ähnlichen früheren Beobachtungen bei anderen Organen, wie z. B. bei der Fremdstoffaufnahme in Alveolarzellen (SCHULZ; GIESEKING; KARRER, u. a.) oder bei der Verarbeitung von Eisenhydroxyd in Makrophagen (WESSEL u. GEDIGK). Bei der Phagocytose gelangten die größeren Kupferpartikel durch Membranvakuolisierung (I) in die Zelle und lagen zunächst in großen Vacuolen. In Anlehnung an die Terminologie von STRAUS möchten wir diese Cytoplasmavacuolen mit noch unveränderten Fremdstoffen als „Phagosomen“ bezeichnen (Ic). Im weiteren Verlauf wurden meist die in Phagosomen enthaltenen großen Schollen von einer Membran umgeben. Die Schollen selbst wurden in kleinere Einheiten zerteilt und bildeten kleinere selbständige Granula, deren Grundsubstanz langsam an elektronenmikroskopischem Eigenkontrast, aber auch an Bindungsfähigkeit der Schwermetalle bei der Nachkontrastierung elektronenmikroskopischer Schnitte zunahm. Die Speichergranula dieses Stadiums (Id) möchten wir in Anlehnung an STRAUS als „Phagolysosomen“ bezeichnen, da sie einerseits noch unveränderte Kupferteilchen, andererseits aber bereits eine von der Zelle gebildete Grundsubstanz enthielten.

Bei vollständiger Umwandlung oder weitgehendem Abbau des ursprünglich eingeschleusten Kupfers war dann die Umbildung der Speichergranula zu Lysosomen vollzogen (Ie). Diese enthielten mitunter noch Reste von Kupfer in Form

kleiner Büschel und können sich zu der mit „I“ bezeichneten Form weiter entwickeln. Die unregelmäßige Begrenzung dieser Lysosomen ließ meist erkennen, daß sie aus Phagosomen durch Umwandlung und Verarbeitung der Fremdstoffe entstanden waren.

Bei den *Parenchymzellen* der Leber überwog dagegen der mit „II“ bezeichnete Weg der Stoffaufnahme, die *Pinocytose*. Hier gelangten etwa 200–300 Å große Kupferanteile durch Membranvesikulation in das Cytoplasma. Die Tatsache, daß

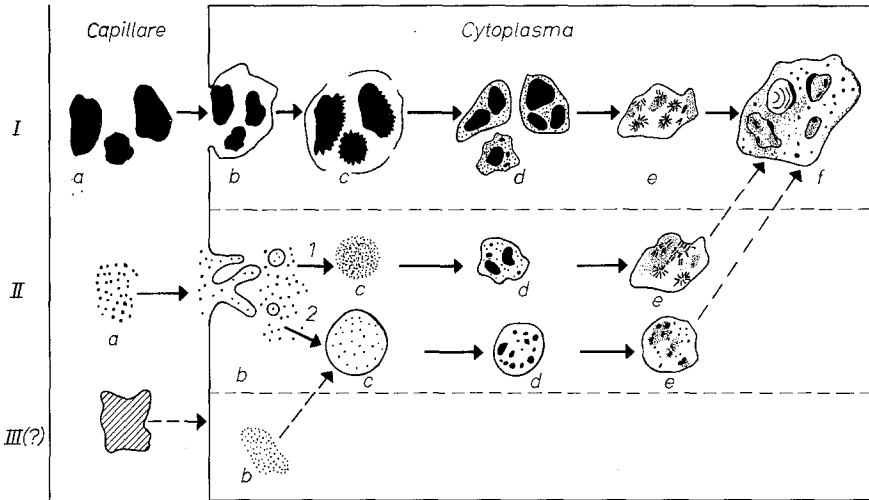


Abb. 11. Schema der Einschleusung und Speicherung von Kupfer in Stern- und Parenchymzellen der Leber. Die Art der Aufnahme hängt offenbar von der Teilchengröße des anflutenden Kupfers ab. Auf der linken Seite sind die im strömenden Blut (Capillaren) auftretenden Größenordnungen des injizierten Kupfers dargestellt: *Ia* große Coacervate; *IIa* grob-disperse Form; *IIIa* molekulare Verteilung. Der mit *I* bezeichnete Weg betrifft nur die Sternzellen: Durch Phagozytose der Kupfercoacervate bilden sich Speichervacuolen *Ic* (Phagosom). Daraus entstehen nach Auflösung der Vacuolenmembran Phagolysosomen *Id*, welche neben noch nicht abgebautem Kupfer bereits organische, von der Zelle gebildete Substanzen enthalten. Nach weitgehendem Umbau des Kupfers bilden sich Lysosomen *Ie*, die sich wieder zu größeren Einheiten *If* zusammenlagern können.

Der zweite Weg (*II*) trifft für Stern- und Parenchymzellen zu: Die grob-dispersen Kupferteilchen *IIa* gelangen meist durch Membranvesikulation ins Cytoplasma und lagern sich entweder zu größeren Gruppen zusammen (*II, 1*), die später von einer Membran umschlossen werden und über Phagolysosomen zu Lysosomen werden. Die grob-dispersen Kupferteilchen können aber auch direkt in bereits bestehende Lysosomen (*II, 2c*) ohne Zwischenschaltung von Phagolysosomen eingelagert und abgebaut werden. Gelegentlich fließen mehrere Lysosomen (*II, 2e*) zu größeren Schollen (*If*) zusammen. Der Weg *II, 1* wird von den Sternzellen häufig, von den Parenchymzellen aber nur selten beschritten. Bei den Parenchymzellen überwiegt der Weg *II, 2*.

Die Einschleusung molekular verteilter Kupfers (*III*) ist hypothetisch und läßt sich elektronenmikroskopisch nicht nachweisen. Wir haben deshalb diese Möglichkeit mit einem Fragezeichen versehen.

die Leberzellen im allgemeinen nur kleinste Partikel aufnehmen, mag seinen Grund darin haben, daß in die Disséschen Räume, aus denen die Zellen Fremdstoffe aufnehmen, in der Regel nur kleine Partikel gelangen. Nach unseren Erfahrungen können sich die eingeschleusten Teilchen im Cytoplasma zu größeren Bezirken zusammenlagern (*II, 1c*), um dann nach Abgrenzung durch eine Membran und Einlagerung einer Grundsubstanz in ein Phagolysosom umgewandelt zu werden (*Id*) und später in ein Lysosom überzugehen (*Ie*).

Auf dem häufiger beschrittenen Weg (*II, 2*) erfolgte die Einlagerung der eingeschleusten Teilchen in bereits in der Zelle vorhandenen Lysosomen, d.h. im Gegensatz zu „I“ und „II, 1“, in präformierten Strukturen. In den Lysosomen lagerten sich die Kupferteilchen oft zu unterschiedlich großen Klumpen zusammen (*2d*), die dann allmählich, unter Zunahme der elektronenoptischen Dichte der Grund-

substanz, abgebaut werden. Dieser Weg (II, 2) unterscheidet sich von „II, 1“ durch den Fortfall des Stadiums der Phagolysosomen und von „I“ zusätzlich noch durch das Fehlen des „Phagosom“-Stadiums. — Mitunter lagerten sich die kupferspeichernden Lysosomen, und zwar sowohl die primär vorhandenen (II, 2) als auch die sekundär gebildeten (II, 1), bei längerer Versuchsdauer und bei dem Auftreten regressiver Cytoplasmaveränderungen schließlich zu größeren Konglomeraten zusammen, die weitgehend den in den Endstadien der Phagocytose beobachteten großen Speichergranula (I, f) entsprachen.

Als dritter Weg der Inkorporation wäre die im Schema mit „III“ bezeichnete *Diffusion* von fein verteiltem, etwa in molekularer Form vorliegendem Kupfer durch die Zellmembran möglich, wie es von GIESEKING für Alveolarmakrophagen angenommen wurde. Dabei würden die Teilchen wahrscheinlich in Lysosomen eingelagert. Während die im Schema der Abb. 1 unter „I“ und „II“ aufgezeichneten Wege der Phagocytose und Membranvesikulation elektronenoptisch darstellbar sind, bleibt die Inkorporation durch Diffusion z. Z. noch hypothetisch.

Die Einlagerung des Kupfers in präformierte Strukturen (Lysosomen) vollzog sich also vor allem in Parenchymzellen; doch konnten wir den gleichen Vorgang auch in den Sternzellen beobachten, bei denen an sich die geschilderte Ablagerung des Kupfers in nicht präformierten Strukturen überwog.

Eine Speicherung von Kupferpartikeln in Mitochondrien, Golgi-Strukturen oder Ergastoplasmateilen beobachteten wir nicht. Einige Speichergranula erinnerten zwar durch die sekundäre Ausbildung Cristae-ähnlicher Membranstrukturen manchmal an Mitochondrien. Bei starker Vergrößerung und genauerer Untersuchung erwiesen sich diese „Membranstrukturen“ aber als kettenartig aufgereihete Verdichtungen der Grundsubstanz, die wahrscheinlich Lipoproteide enthielten.

Die hier aufgezeichneten Wege der Aufnahme und weiteren Verarbeitung des Kupfers in Stern- und Leberparenchymzellen unterschieden sich vor allem in ihrem ersten Abschnitt. Später konvergierten sie mehr und mehr, so daß man die Endprodukte des Speichervorganges, und zwar vor allem die speichernden Granula, immer weniger und schließlich kaum noch unterscheiden konnte. Bei einem Vergleich unserer Ergebnisse mit der Literatur möchten wir annehmen, daß dieses Verhalten der Stern- und Parenchymzellen nicht für die Speicherung von Kupfer spezifisch ist, sondern auch für andere Fremdstoffe gilt.

Entsprechende Beobachtungen machte HAGER an Ganglienzellen nach Injektion von Tellur. Auch hier wurde das fein verteilte Tellur in Lysosomen gespeichert, die nach der Injektion in großer Zahl entstanden waren und anfangs noch kein elektronenmikroskopisch sichtbares Tellur enthielten. — In den Tubulusepithelien der Niere erfolgte im Gegensatz zu den Parenchymzellen der Leber die Speicherung und Verarbeitung der Farbstoffe meist nicht in präformierten Strukturen (MILLER u. PALADE). Hier wurden von der Zelle vielmehr organische Substanzen, an denen hydrolytische Fermente beteiligt waren, in die eingeschleusten Fremdstoff-Granula eingelagert, ähnlich wie wir es bei den Phagolysosomen fanden. Nur selten nahmen in der Niere ältere, präexistente Lysosomen frisch eingeschleustes Fremdmaterial auf. In ihrem wichtigen Beitrag zu dem Problem der Fremdstoffspeicherung in der Niere konnten MILLER u. PALADE elektronenmikroskopisch zeigen, daß in den einzelnen Zelltypen bei der Injektion verschiedener Substanzen stets der gleiche Vorgang der Enzyymbildung an den in das Cytoplasma aufgenommenen Fremdstoffen ablief.

Für die Ansicht, daß die speichernden Granula neu entstehen und nicht präformierte Strukturen darstellen, sprachen sich vor allem GIESEKING sowie KARRER bei Untersuchungen an speichernden Alveolarmakrophagen aus. Am gleichen Objekt kamen aber SCHULZ sowie

LINDNER zu der Überzeugung, daß die Speicherung in präformierten Cytosomen erfolgte. RICHTER trat für eine Ablagerung von Eisen in Mitochondrien von Leberparenchymzellen, Reticulumzellen der Milz und Tubulusepithelien der Nieren ein.

Eine besondere Art der Stoffaufnahme in Leberzellen wurde von HÜBNER sowie HÜBNER und BERNHARD beschrieben, die nach temporärer Durchblutungssperre, intralialer Allyl-Alkohol-Injektion und Tetrachlorkohlenstoff große Cytoplasmavacuolen in der Nähe der Disséschen Räume fanden. Unter unseren Versuchsbedingungen ergaben sich keine Hinweise dafür, daß auch das Kupfer auf diesem Weg in das Cytoplasma eingeschleust wurde.

Die Versuche zeigten, daß die Kupfer-Partikel, entsprechend ihrer verschiedenen Form und Größe im extracellulären Raum, auch in den Zellen verschieden umgeformt wurden: Die größeren homogenen Tröpfchen lösten sich im Laufe der Speicherung in immer kleinere aber auch dichtere Teilchen verschiedener Größe auf. Die Zunahme der Dichte könnte darauf hinweisen, daß der ursprüngliche Kupfer-Komplex mit dem ADTE aufgebrochen und das Metall in den Partikeln stärker konzentriert wurde.

Bei dem in feinsten Tröpfchen von den Parenchymzellen aufgenommenen Kupfer kam es mitunter zur Zusammenlagerung und Bildung größerer (ca. 800 Å) homogener Konglomerate in den Speichergranula. Später wurden die Konglomerate dann wieder zu kleineren Einheiten (ca. 400 Å) abgebaut.

In den Endstadien besaßen die Kupfer-Partikel oft eine längliche Struktur mit einer Länge von 200 Å. Daneben sah man auch büschelartige, kristallähnliche Formationen. Im Gegensatz zum Eisen bildete das Kupfer allerdings keine charakteristischen Einheiten wie etwa die im Ferritin vorliegenden Oktaeder.

Zur Frage, in welcher Form das Kupfer von den Leberzellen in die Galle ausgeschieden wird, können wir nur Vermutungen anstellen. Würde die Ausscheidung des Kupfers in größeren Partikeln erfolgen, so hätten diese häufiger in Gallencapillaren sichtbar sein müssen. Das Fehlen größerer Partikel weist also darauf hin, daß auch unter unseren Versuchsbedingungen das Kupfer in den Lysosomen bis etwa zur molekularen Größenordnung abgebaut und in feinsten Verteilung, evtl. gekuppelt an Coeruloplasmin, an die Galle abgegeben wird.

B. Die organischen Strukturen (Matrix) der Speichergranula

STRAUS konnte bereits lichtmikroskopisch bei seinen Versuchen zeigen, daß sich innerhalb weniger Stunden bis zu etwa 2 Tagen die Umwandlung der Phagosomen zu Lysosomen vollzieht. Es ist allerdings anzunehmen, daß der Umbau der kupferhaltigen Phagosomen in etwas größeren Zeiträumen abläuft als der Abbau der leichter „verdaulichen“ Proteine der von STRAUS injizierten Peroxydase. Immerhin dürfte die auch bei unseren Experimenten festgestellte doch relativ schnelle Verarbeitung dafür verantwortlich sein, daß wir frisch phagocytierte, noch nicht von Zellprodukten durchsetzte Kupferteilchen nur selten fanden.

Elektronenoptisch ließ sich an der in die Speichergranula eingelagerten organischen Grundsubstanz (Matrix) eine Reihe von Veränderungen nachweisen, und zwar eine allmähliche Zunahme des Eigenkontrastes, eine zunehmende Affinität für Schwermetalle und eine Anordnung von Molekülgruppen der organischen Substanz zu konzentrischen, membranartigen Figuren.

Anfangs besaß die Matrix nur einen geringen *Eigenkontrast*. Im weiteren Verlauf nahm die Matrix dann an elektronenoptischer Dichte zu. Entsprechend den Versuchen von STRAUS dürfte dies den Übergang von Phagolysosomen zu Lyso-

somen kennzeichnen. Durch lichtmikroskopische und histochemische Untersuchungen ist es bekannt, daß in intracytoplasmatischen speichernden Granula eine organische Trägersubstanz auftritt, die neben Proteinen stark PAS-positive Mucopolysaccharide (oder Glykoproteide) sowie in geringem Umfang Lipide enthält (GEDIGK; GÖSSNER). Ihrer Bildung liegt offenbar eine unspezifische Reaktion der Zelle auf die intracytoplasmatische Ablagerung von Fremdmaterial zugrunde.

Da bei unseren Versuchen das Auftreten und die Verstärkung der PAS-Reaktion im Bereich der Kupferablagerungen synchron mit der Zunahme des elektronenmikroskopischen Eigenkontrastes der Grundsubstanz der speichernden Granula erfolgte, dürften diese weitgehend oder sogar ganz aus der Trägersubstanz bestehen.

Mit zunehmender Versuchsdauer trat bei der Nachkontrastierung der *Präparate eine steigende Affinität der Grundsubstanz der speichernden Granula für Schwermetalle* auf und führte bei den Spätstadien zu einer homogenen „schwarzen Anfärbung“ mit Blei- und Uranylsalzen. Damit wurde nunmehr auch im submikroskopischen Bereich der Befund bestätigt, daß die Trägersubstanzen der speichernden Granula eine Affinität für Schwermetalle besitzen und Kationen im histologischen Präparat adsorbieren und binden können (GEDIGK und STRAUSS sowie GEDIGK und PROCH).

Bemerkenswert war in Anbetracht dieser in vitro stets reproduzierbaren Schwermetallaffinität der Trägersubstanz, daß das frisch injizierte Kupfer in vivo nicht immer sofort von der bereits vorhandenen Grundsubstanz der speichernden Granula gebunden wurde. Entweder kam das frisch in die Zelle aufgenommene Kupfer nicht gleich mit der reaktionsfähigen organischen Substanz in Berührung oder aber die vorhandene Trägersubstanz war an diesen Stellen doch schon mit einer molekularen Schicht des vorher verabfolgten Kupfers durchsetzt. Daneben ist in Rechnung zu stellen, daß unter unseren Versuchsbedingungen eine relativ große Bleimenge an die Schnitte herangebracht wurde, so daß die schon intravital nachweisbare Bindefähigkeit für Schwermetalle in diesen Präparaten besonders deutlich zutage trat.

Daß die Affinität der Trägersubstanzen für Schwermetalle erst durch die Denaturierungsvorgänge bei der Fixierung gesteigert oder gar hervorgerufen wurde, kann nicht angenommen werden, weil in ihrem Bereich auch intravital Eisenablagerungen stattfanden, die sich sowohl lichtmikroskopisch wie elektronenmikroskopisch leicht demonstrieren ließen. Ihre Eisenbindefähigkeit bestand also bereits im lebenden Gewebe. Außerdem war die Bindefähigkeit der Trägersubstanz für anorganische Substanzen von der Art der vorausgegangenen Fixierung weitgehend unabhängig.

Die mitunter zu beobachtenden *lamellenartigen Formationen* der Trägersubstanz waren bei oberflächlicher Betrachtung mit Myelinfiguren zu verwechseln. Bei stärkerer Vergrößerung sah man jedoch oft, daß hier nicht wie beim Myelin scharfe Membranen vorlagen, sondern kugelige, kettenförmig aneinandergereihte Strukturen von etwa 100 Å Durchmesser, wie wir sie auch im Vitamin-E-Mangelpigment beobachten konnten (GEDIGK und WESSEL). Daß diese membranartigen Gebilde nichts mit Cristae mitochondriales zu tun hatten, wurde bereits erwähnt. Die konzentrischen Formationen waren allerdings nur in den schwach kontrastierten Präparationen erkennbar, während sie bei der üblichen Nachkontrastierung oft in der dichten Blei-„Anfärbung“ untergingen. Außerdem sah man als

besondere Anordnung die Trägersubstanz mitunter in Form kleiner Kugeln, deren Peripherie mit Kupferteilchen besetzt war.

Bei den Endstadien der Versuche fiel gelegentlich in den Speichergranula ein großer, relativ dichter Bezirk auf, ohne den harten Kontrast von Metallpartikeln. Es wäre möglich, daß diese relativ hohe Dichte auf einer molekularen Ablagerung kleinerer Kupfermengen an diesen Stellen der Matrix beruhte.

Von BARKA u. Mitarb. wurde nach Injektion von Kupfersulfat eine Vermehrung von Pigmentgranula in den Leberzellen beschrieben, deren histochemische Eigenschaften (positive PAS-Reaktion, Säurefestigkeit und Sudanophilie) mit Ausnahme der fehlenden Eigenfluoreszenz dem Lipofuscin entsprachen. In wechselnder Menge enthielten diese Granula auch Kupfer. Die Autoren halten es für möglich, daß Kupfer vielleicht zu den Substanzen gehört, welche die Entstehung von Lipofuscin verursachen.

Dem Lipofuscin und den kupferhaltigen Granula ist nun — ebenso wie dem Hämosiderin — gemeinsam, daß die Speicherung und Verarbeitung der abgelagerten Stoffe, also der ungesättigten Lipide bzw. der Schwermetalle, in präformierten und nicht präformierten Lysosomen oder in lysosomartigen Granula erfolgt. Somit ist auch zu erwarten, daß Parallelen in der formalen Genese und u. U. auch gewisse histochemische und morphologische Ähnlichkeiten zwischen diesen Speichergranula bestehen. Das äußert sich u. a. darin, daß in den schwermetallhaltigen Granula bzw. in ihrer organischen Trägersubstanz mitunter in geringem Umfang histochemisch (GEDIGK und STRAUSS (1); GEDIGK und PROCH) und elektronenmikroskopisch (WESSEL und GEDIGK) nachweisbare unlösliche, offenbar oxydierte Lipide vorkommen, welche als wesentliche Bausteine quantitativ und qualitativ das Lipofuscin charakterisieren. Trotzdem sollten diese Organellen, d. h. das Lipofuscin, die kupferspeichernden Granula und das Hämosiderin, im Sinne klarer morphologischer Definitionen und Begriffe voneinander unterschieden werden. Nach unseren Beobachtungen ist die Abgrenzung der kupferspeichernden und eisenspeichernden Lysosomen von den Lipofuscinen nicht zuletzt durch die Art der abgelagerten Stoffe auch ohne weiteres möglich, selbst wenn in älteren Speichergranula mit fortschreitender Abgabe der Schwermetalle ein deutlicheres Zutagetreten bzw. eine gewisse Zunahme der dort mengenmäßig an sich stets im Hintergrund bleibenden Lipide erfolgt.

Allerdings wäre es interessant zu prüfen, ob es bei einer längeren Versuchsdauer oder bei der Verwendung anderer kupferhaltiger Substanzen zu einer derartigen Schädigung der speichernden Lysosomen durch die abgelagerten Schwermetalle kommt, daß sie — auch nach der teilweisen oder gänzlichen Abgabe der Metalle — nicht mehr zu einer regelrechten Verarbeitung von Fettstoffen imstande sind, welche sich dann in ihnen anhäufen und schließlich durch Oxydation und Polymerisation zu Lipopigmenten umgeformt werden. Des weiteren wäre es denkbar, daß auch andere Cytoplasmabezirke oder Organellen durch das Kupfer so geschädigt werden, daß in ihrem Bereich Lipopigmentgranula entstehen. Unter unseren Versuchsbedingungen haben wir die Bildung von Lipofuscinen aus Speichergranula oder an anderen Stellen des Cytoplasmas selbst bei älteren Tieren nicht beobachtet und können daher anhand der vorliegenden Experimente zur Klärung dieser Fragen nicht beitragen.

C. Regressive Veränderungen der Zellen bei Kupferspeicherung

Durch Kupferintoxikationen ausgelöste Zellschädigungen an der Leber sind seit langem bekannt und lichtmikroskopisch wiederholt untersucht worden (HALL u. BUTT; WOLFF). Vergleicht man unsere lichtmikroskopischen Beobachtungen

mit älteren Arbeiten und vor allem mit den von BARKA u. Mitarb. durchgeführten Experimenten, so ergeben sich in dem Ausmaß der regressiven und nekrobiotischen Veränderungen, der cirrhotischen Umbauvorgänge und der Kupferablagerungen zwar Abweichungen; die Art dieser Veränderungen blieb jedoch im wesentlichen gleich. Die Unterschiede zwischen früheren Arbeiten und neueren Beobachtungen dürften wohl Folge der verschiedenen Versuchsbedingungen sein, wie der Art und Menge sowie der Applikationsweise der verwendeten Kupferverbindungen und der Versuchsdauer. So möchten wir die bei unseren Versuchstieren vor allem in späteren Stadien recht ausgeprägten regressiven Veränderungen und beginnenden cirrhotischen Umbauvorgänge in der Leber hauptsächlich als Folgen der verhältnismäßig umfangreichen Kupferinjektionen und der relativ langen Versuchsdauer ansehen.

Entsprechend diesen lichtmikroskopischen Befunden war es zu erwarten, daß auch im submikroskopischen Bereich neben eigentlichen Speichervorgängen regressive Veränderungen in der Zelle zutage traten. Tatsächlich fanden wir in Übereinstimmung mit BARKA u. Mitarb., daß die Kupfferschen Sternzellen und die Parenchymzellen auch elektronenmikroskopische Veränderungen erleiden, wie sie von Zellschädigungen aus anderen Ursachen bekannt sind:

Die *Sternzellen* reagierten hauptsächlich mit einer Cytoplasmaschwellung und einer Vermehrung der Lysosomen. Nennenswerte Veränderungen in der Gestalt, Größe und Zahl der Mitochondrien traten zunächst nicht in Erscheinung. Mit zunehmender Versuchsdauer sah man dann auch Sternzellen, die zugrunde gingen und sich von der Wand der Sinusoide ablösten. Dabei kam es zu einer Schwellung der Mitochondrien und einem Verlust des Ergastoplasmas. Die Kerne wiesen eine starke Schwellung und stellenweise bereits Zeichen der Chromatolyse auf.

Bei den *Parenchymzellen* stand zunächst die *Zunahme des Gesamtvolumens der Mitochondrien* im Vordergrund. Dabei ist zu betonen, daß diese Volumenzunahme anfangs nicht auf eine Schwellung zurückging, wie sich durch Querschnittsmessungen der Mitochondrien beweisen ließ. Es fand sich vielmehr bereits bei den Übersichtsvergrößerungen etwa vier Wochen nach Versuchsbeginn in den elektronenmikroskopischen Bildern eine Vermehrung der Mitochondrien. Da das Mitochondrienvolumen als ungefähres Maß für die Größe des oxydativen Stoffwechsels angesehen wird (KLINGENBERG), ist die Annahme naheliegend, daß der oxydative Stoffwechsel der Leberzellen nach der Injektion von Kupfer zumindest vorübergehend gesteigert wird. Dem entspricht unter ähnlichen Versuchsbedingungen eine Zunahme der oxydativen Fermente (POPPER).

Demgegenüber zeigten die von uns untersuchten *Endstadien* an den Mitochondrien eine *Schwellung bei gleichzeitiger Abnahme des Gesamtvolumens*. Da trotz der Schwellung der einzelnen Mitochondrien eine Abnahme des Gesamtvolumens zu beobachten war, mußte mit einem Verlust an Mitochondrien gerechnet werden.

Wegen der besonderen Bedeutung der Mitochondrien für das Stoffwechselgeschehen der Zelle versuchten wir für diese Veränderungen objektive Werte zu erhalten und bestimmten den prozentualen Anteil des Mitochondrienvolumens am Cytoplasmavolumen mit morphometrischen Methoden. Auf diese Weise ließ sich der nach wenigen Wochen erfolgte Anstieg und Abfall des Mitochondrienvolumens quantitativ sichern. Das Resultat dieser Messungen ist in der Abb. 12 wiedergegeben. Sie zeigt drei Kurven, von denen eine die intravenöse Kupferzufuhr in mg,

die zweite den Volumenanteil der Mitochondrien am Gesamtvolumen des Cytoplasmas und die dritte den Volumenanteil der speichernden Organellen (Lysosomen) angibt. Die in dem Diagramm für Mitochondrien bzw. Speichergranula eingetragenen Meßwerte entsprechen dem Quotienten V_m/V_c bzw. V_s/V_c , wobei V_m das Gesamtvolumen der Mitochondrien, V_s das Volumen der Speichergranula und V_c das Gesamtvolumen des Cytoplasmas darstellt.

Das Diagramm zeigt, daß nach 8 Injektionen (6—7 Wochen) ein Anstieg des Mitochondrienvolumens im Verhältnis zum Cytoplasmavolumen um mehr als das Doppelte erfolgte. Da es sich bei dem Meßwert um einen Quotienten, d.h. um einen relativen Wert handelt, sind mehrere Deutungen möglich. Der Anstieg der Kurve kann bedeuten:

1. das absolute Mitochondrienvolumen hat zugenommen
 - a) durch echte Vermehrung der Mitochondrien,
 - b) durch Schwellung,
2. das Cytoplasmavolumen ist geschrumpft.

Um den Aussagewert der Kurve zu erhöhen, haben wir zwei Unbekannte in unserer „Gleichung“ bestimmt, nämlich den durchschnittlichen Mitochondriendurchmesser als Kriterium für eine etwaige Schwellung und lichtmikroskopisch

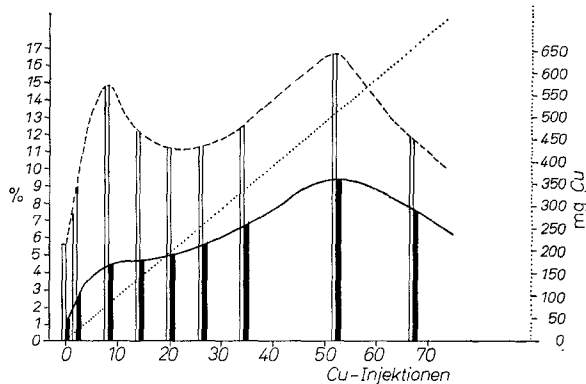


Abb. 12. Verhalten der Gesamtvolumina von Mitochondrien und Speichergranula mit fortschreitender Kupferzufuhr. Kupfermenge rechts auf der Ordinate. Links auf der Ordinate der Volumenanteil der Mitochondrien (V_m/V_c) bzw. der Speichergranula (V_s/V_c) am Cytoplasmavolumen. Auf der Abszisse ist die Zahl der Kupfer-Injektionen aufgetragen. □ Mitochondrien, ■ Cu-Granula, mg Cu

das durchschnittliche Volumen der einzelnen Leberzelle. Unsere Messungen ergaben, daß der durchschnittliche Mitochondriendurchmesser z.Z. des ersten Gipfels (8 Injektionen, 6—7 Wochen) nicht signifikant von dem Ausgangswert abwich. Eine Mitochondrienschwellung ließ sich somit als Ursache der Volumenzunahme ausschließen. Ebenso ergab die lichtmikroskopische Kontrolle der durchschnittlichen Cytoplasmavolumina pro Zelle keine signifikante Verkleinerung gegenüber dem Ausgangswert. Der Anstieg der Kurve beruhte somit auf einer echten Vermehrung der Mitochondrien, die als Antwort auf die Kupferspeicherung anzusehen ist.

Etwa 2—4 Wochen hielt die Vermehrung der Mitochondrien an, um bei fortgesetzter Kupferbelastung wieder abzufallen. Dabei wurde der Abfall der Kurve verstärkt durch eine leichte Cytoplasmасhwel lung, die sich auch in der Kurve der Speichergranula ausdrückte. Das zweite, nach 52 Injektionen (40 Wochen)

erreichte Maximum hingegen war auf eine allmählich zunehmende Schwellung der Mitochondrien zurückzuführen. Gegen Ende der Versuche bestand die Schwellung zwar weiter, aber die Zahl der Mitochondrienanschnitte verringerte sich in den Zellen erheblich, so daß die Kurve nach 52 Injektionen (40 Wochen) steil abfiel. Trotz dieser Schwellung, die ja die Volumenrelation Mitochondrien—Cytoplasma zugunsten der Mitochondrien verschob, kam es nach etwa 25 Injektionen (20 Wochen) morphometrisch zu einer relativen Verminderung des Mitochondrienvolumens. Es ist somit anzunehmen, daß die Abnahme der Zahl der Mitochondrien noch stärker ist, als es aus der Kurve der Abb. 12 hervorgeht. Mit diesem Abfall, der also einen Verlust der Mitochondrien wiedergibt, vollzog sich nach den elektronenmikroskopischen Bildern ein Untergang zahlreicher Leberzellen.

Betrachtet man die Kurve der *Speichergranula*, so findet man bereits normalerweise derartige Granula (Lysosomen) mit einer Beteiligung von 1% am Cytoplasma-volumen. Ihr Anteil stieg bereits nach den ersten Kupferinjektionen auf 4,2%. Ihr relativer Anstieg ist also noch steiler als bei den Mitochondrien, wenn sie auch nicht das gleiche Gesamtvolumen am Cytoplasma erreichen.

Das weitere morphometrische Verhalten der Speichergranula zur Geraden der Kupferzufuhr läßt in Verbindung mit den lichtmikroskopischen Befunden interessante Schlüsse zu. Obwohl im elektronenmikroskopischen Bild bereits nach 8 Injektionen das Gesamtvolumen der Granula auf das 4fache in den Leberzellen angestiegen war, ließen sich lichtmikroskopisch mit der Rubeanwasserstoff-Kern-echtröt-Färbung nur verhältnismäßig wenig kupferpositive Granula nachweisen. Während das Gesamtvolumen der Granula von der 8. bis zur 20. Injektion nicht wesentlich anstieg, nahmen die kupferpositiven Granula im gleichen Zeitraum lichtmikroskopisch stark zu. Daraus ist zu schließen, daß durch den Reiz des mit den ersten Injektionen anflutenden Kupfers von den Zellen nicht nur vermehrt Mitochondrien, sondern auch überschießend zur Speicherung fähige Granula gebildet werden, die zunächst nur wenig Kupfer enthielten, so daß sie im Lichtmikroskop mit der Rubeanwasserstoff-Methode nur zu einem kleinen Teil dargestellt werden konnten. Während anschließend das Gesamtvolumen der Granula nicht mehr wesentlich anstieg, erfolgte eine Konzentration des weiter zugeführten Kupfers zum größten Teil in den bereits gebildeten Granula, wodurch diese sich dann mit Rubeanwasserstoff gut anfärben ließen.

Die weiter einsetzende Cytoplasmaschwellung ging mit einer verlangsamten Vermehrung der Speichergranula der Leberzellen einher. Der Effekt der Cytoplasmaschwellung trat bei der Volumenbestimmung der Lysosomen demnach nicht so deutlich hervor wie bei den Mitochondrienvolumina, da das Kupfer weiterhin kontinuierlich zugeführt wurde und die Ausgangswerte niedriger waren (Wildersches Ausgangslagen-Gesetz). Bis zur 52. Injektion (40 Wochen) wurde ständig Kupfer von den Leberzellen aufgenommen. Das dann folgende Endstadium entsprach elektronenoptisch den stark geschädigten, an Organellen verarmten Parenchymzellen, die offenbar kein Kupfer mehr aufnahmen, sondern nur noch in fein verteilter Form abgaben.

Hinsichtlich des Gesamtvolumens der Kupfer-speichernden Organellen läßt sich in den intakten Zellen morphometrisch bei unseren Versuchen also eine schnelle Zunahme erkennen, die nach etwa 8 Wochen ein erstes Maximum erreicht und anschließend absinkt. Die starken regressiven Zellveränderungen gehen dann

mit einer relativen Verminderung der Kupfer-Aufnahme einher. Daraus ist zu schließen, daß die Kupferspeicherung der Leber bei experimentell zugeführtem Kupfer intakte oder zumindest nur gering geschädigte Zellen voraussetzt.

Als wichtiges Ergebnis dieser Messungen ist hervorzuheben, daß der synchrone Anstieg der Mitochondrienzahl und der Speichergranula am Versuchsbeginn und der fast gleichzeitige Abfall beider Organellen am Versuchsende als Hinweis dafür angesehen werden kann, daß zwischen dem Mitochondriengehalt und der Speicherfähigkeit für Kupfer Zusammenhänge bestehen.

An weiteren regressiven Veränderungen ist vor allem ein Abbau des Glykogens bei gleichzeitiger Vermehrung des glatten endoplasmatischen Reticulums zu nennen. Das ribosomentragende endoplasmatische Reticulum reagiert mit einer Schwellung und Abbauvorgängen, etwa entsprechend den Beobachtungen von MÖLBERT u. Mitarb. sowie von EMMELOT u. Mitarb. Als weitere Schädigungsfolge wiesen die Parenchymzellen eigentümliche, von Organellen freie „Ödemzonen“ auf, die perinucleär, peribiliär und entlang der Sinusoide lokalisiert waren. Die Golgi-Zonen wurden im Laufe der Schädigung deutlich kleiner. Die Zellkerne wiesen eine Schwellung mit Abnahme der elektronenoptischen Dichte auf. Als Zeichen der irreversiblen, später zum Zelltod führenden Schädigung möchten wir vor allem das Aufbrechen der Zell- und Kernmembranen ansehen.

Zusammenfassung

Bei sechs Kaninchen wurde 11 Monate lang wöchentlich ein- bis zweimal Kupfer-ADTE intravenös injiziert und die Lebern elektronenmikroskopisch untersucht. Die *reticulär-endothelialen Elemente* (Sternzellen) nahmen das Kupfer meist in Form großer Schollen durch Phagocytose auf und lagerten es in Phagolysosomen ein, die sich zu Lysosomen umwandelten. Die *Parenchymzellen* hingegen schleusten das Kupfer in fein verteilter Form ein. Speicherung und Abbau erfolgten vorwiegend in präformierten Lysosomen, die bei den ersten Kupferinjektionen in großer Zahl entstanden waren. Stern- und Parenchymzellen gaben an die speichernden Granula eine organische Substanz ab, die sich durch eine im Laufe der Speicherung zunehmende Affinität für Schwermetalle *in vitro* auszeichnete.

Morphometrische Messungen an elektronenmikroskopischen Dünnschnitten ergaben bei Versuchsbeginn eine Zunahme des Gesamtvolumens der Mitochondrien. Am Ende der Versuche wiesen die stark geschädigten Zellen eine deutliche Schwellung und Abnahme des Mitochondrienvolumens auf. Es wird angenommen, daß zwischen Mitochondriengehalt und Speicherfähigkeit der Leberzellen Zusammenhänge bestehen.

Elektron Microscopic and Morphometric Studies of the Rabbit Liver after Injecting Organic Copper Intravenously

Summary

Six rabbits were injected intravenously with copper-EDTA (total dose 650 mg) once or twice a week for 11 months; biopsies of their livers were studied electron-microscopically every four weeks. *The von Kupffer cells* phagocytized the copper particles mostly in large aggregates and stored them in phago-lysosomes which later became lysosomes. In contrast, the *parenchymal cells* took up the copper in a finely dispersed form. Storage and digestion took place in preformed lysosomes which were produced in large numbers after the first injections of copper.

The von Kupffer cells and parenchymal cells released an organic substance to the accumulated copper particles; during their storage this substance showed an increasing affinity for heavy metals in vitro.

Morphometric measurements in electron microscopic sections revealed an increased total volume of the mitochondria at the onset of the experiment. At the end, the severely damaged cells disclosed a distinct swelling and a decrease in mitochondrial volume.

Literatur

- BARKA, T., P. J. SCHEUER, F. SCHAFFNER, and H. POPPER: Structural changes of liver cells in copper intoxication. *Arch. Path.* **78**, 331—349 (1964).
- EMMELOT, P., I. I. MIZRAHI, R. NACCARATO, and E. I. BENEDETTI: Changes in function and structure of the endoplasmic reticulum of rat liver cells after administration of cystein. *J. Cell Biol.* **12**, 177—180 (1962).
- GEDIGK, P.: Zur Histochemie der Fremdkörperreaktionen. *Verh. dtsch. Ges. Path.* **39**, 206—211 (1955).
- Die funktionelle Bedeutung des Eisenpigmentes. *Ergebn. allg. Path. path. Anat.* **38**, 1—45 (1958).
- , u. W. PROCH: Über die Speicherung von Schwermetallverbindungen in mesenchymalen Geweben. *Beitr. path. Anat.* **116**, 124—148 (1956).
- , u. G. STRAUSS: (1) Zur Histochemie des Hämosiderins. *Virchows Arch. path. Anat.* **324**, 373—390 (1953).
- (2) Zur formalen Genese des Eisenpigments. *Virchows Arch. path. Anat.* **326**, 172—190 (1954).
- , u. V. TOTÓVIĆ: Histochemische Methoden. In: *Biochemisches Taschenbuch*, Teil 2, S. 437—497. Berlin-Göttingen-Heidelberg: Springer 1964.
- , u. W. WESSEL: Elektronenmikroskopische Untersuchung des Vitamin-E-Mangel-Pigmentes im Myometrium der Ratte. *Virchows Arch. path. Anat.* **337**, 367—382 (1964).
- GIESEKING, R.: Aufnahme und Ablagerung von Fremdstoffen in der Lunge nach elektronenoptischen Untersuchungen. *Ergebn. allg. Path. path. Anat.* **38**, 92 (1958).
- GÖSSNER, W.: Histochemischer Nachweis einer organischen Trägersubstanz im Hämosiderin-pigment. *Virchows Arch. path. Anat.* **323**, 685 (1953).
- HAGER, H.: Die feinere Cytologie und Cytopathologie des Nervensystems. *Veröff. morph. Path. H.* **67** (1964).
- HALL, E. M., and E. M. BUTT: Experimental pigment cirrhosis due to copper poisoning: Its relation to hemochromatosis. *Arch. Path.* **6**, 1—25 (1928).
- HENNIG, A., and J. R. MEYER-ARENDT: Microscopic volume determination and probability. *Lab. Invest.* **12**, 460—464 (1963).
- HERKEL, W.: Über die Bedeutung des Kupfers (Zinks und Mangans) in der Biologie und Pathologie. *Beitr. path. Anat.* **85**, 513—554 (1930).
- HÜBNER, G.: Zur Genese der großen cytoplasmatischen Einschuß-Vakuolen. *Naturwissenschaften* **52**, 136—137 (1965).
- , u. W. BERNHARD: Das submikroskopische Bild der Leberzelle nach temporärer Durchblutungssperre. *Beitr. path. Anat.* **125**, 1—30 (1961).
- KARRER, H. E.: Electron microscopic study of the phagocytosis process in the lung. *J. biophys. biochem. Cytol.* **7**, 367—372 (1960).
- KLINGENBERG, M.: Die funktionelle Biochemie der Mitochondrien. In: *Funktionelle und morphologische Organisation der Zelle*, S. 69—81. Berlin-Göttingen-Heidelberg: Springer 1963.
- LANGE, J.: Eisen, Kupfer und Eiweiß am Beispiel der Leberkrankheiten. Stuttgart: Thieme 1958.
- Die Therapie der Schwermetallspeicherungen und -vergiftungen mit Komplexbildnern. *Berl. Med.* **15**, 109—115 (1964).
- LINDNER, E.: Der elektronenmikroskopische Nachweis von Eisen im Gewebe. *Ergebn. allg. Path. path. Anat.* **38**, 46 (1958).

- MILLER, F., and G. E. PALADE: Lytic activities in renal protein absorption droplets. *J. Cell Biol.* **23**, 519—552 (1964).
- MÖLBERT, E., K. HILL u. F. BÜCHNER: Die Kanzerisierung der Leberparenchymzelle durch Diaethylnitrosamin im elektronenmikroskopischen Bild. *Beitr. path. Anat.* **126**, 218—242 (1962).
- POPPER, H.: Persönliche Mitteilung.
- REMMER, H., u. H. J. MERKER: Vermehrung von „smooth“-Membranen und arzneimittelabbauenden Enzymen des endoplasmatischen Reticulums der Leberzellen bei der Behandlung mit verschiedenen Pharmaka. *Naturwissenschaften* **50**, 670 (1963).
- RICHTER, G. W.: A study of hemosiderosis with the aid of electron microscopy. With observations on the relationship between hemosiderin and ferritin. *J. exp. Med.* **106**, 203 (1957).
- SCHAFFNER, F., I. STERNLIEB, T. BARKA, and H. POPPER: Hepatocellular changes in Wilson's disease: histochemical and electron microscopic studies. *Amer. J. Path.* **41**, 315—328 (1962).
- SCHULZ, H.: Die submikroskopische Pathologie der Cytosomen in den Alveolarmakrophagen der Lunge. *Beitr. path. Anat.* **119**, 71 (1958).
- STRAUS, W.: Cytochemical observations on the relationship between lysosomes and phagosomes in kidney and liver by combined staining for acid phosphatase and intravenously injected horseradish peroxidase. *J. Cell Biol.* **20**, 497—508 (1964).
- Occurrence of phagosomes and phago-lysosomes in different segments of the nephron in relation to the reabsorption, transport, digestion and extrusion of intravenously injected horseradish peroxidase. *J. Cell Biol.* **21**, 295—308 (1964).
- WEIBEL, E. R.: Principles and methods for the morphometric study of the lung and other organs. *Lab. Invest.* **12**, 131—155 (1963).
- WESSEL, W., u. P. GEDIGK: Die Verarbeitung und Speicherung von phagocytiertem Eisen im elektronenmikroskopischen Bild. *Virchows Arch. path. Anat.* **332**, 508—532 (1959).
- WOLFF, S. M.: Copper deposition in rat. *Arch. Path.* **69**, 217—223 (1960).

Privatdozent Dr. W. WESSEL
Pathologisches Institut der Universität
53 Bonn 1, Postfach

Prof. Dr. P. GEDIGK
Pathologisches Institut der Universität
3550 Marburg a. d. Lahn, Robert-Koch-Str. 5

Dr. O. GIERBERG
Chirurgische Klinik der Universität
5 Köln-Lindenthal