

# Der Einfluß von D-Penicillamin auf den Gehalt einiger Organe an Spurenelementen sowie auf die mechanischen Eigenschaften von Kollagen

Trace Elements in Several Organs and Mechanical Properties of Collagen under the Influence of D-Penicillamin

H. Wesch

Institut für Nuklearmedizin am Deutschen Krebsforschungszentrum Heidelberg

R. Jonak, H. Nemetschek-Gansler, H. Riedl und Th. Nemetschek

Pathologisches Institut der Universität Heidelberg, Abteilung für Ultrastrukturforschung

Z. Naturforsch. 33 c, 346–358 (1978); eingegangen am 17. März 1978

D-Penicillamin, Trace Elements, Electron Microscopy, Biosynthesis, Cross-Links, Mechanical Properties of Collagen

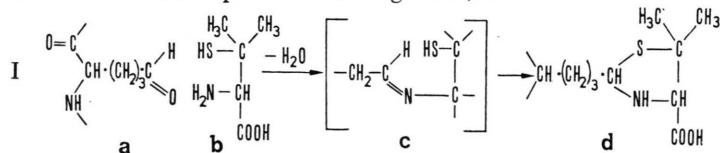
The content of trace elements in several organs of rats under the influence of D-penicillamine (D-PA) was investigated by the neutronactivation-analysis. It could be shown an diminution of Cu, and Co under D-PA-treatment, the content of Fe, Mn, Rb and Zn was not influenced. The investigated organs didn't show any submicroscopic alterations under D-PA. On isolated collagen fibrils of tail tendon was seen a significantly diminution of E-moduls. In accordance with Siegel the principal effect of D-PA is thought to block the synthesis of functional groups from Schiff-base crosslink precursors but not to inhibit lysyloxidase by loss of Cu-ions of connective tissue. The thermostability of D-PA influenced fibrils is changed in stretched state only and will be due to the lack of crosslink Schiff-bases; where as the shrinking point of not stretched fibrils shows only aging dependent changes.

## Einleitung

D-(–)- $\beta,\beta$ -Dimethylcystein (**Ib**) mit der gebräuchlichen Bezeichnung D-Penicillamin (D-PA) war ursprünglich nur im Zusammenhang mit der Strukturaufklärung und als zentraler Baustein bei der Totalsynthese der Penicilline von Bedeutung [1]. Medizinisches Interesse erlangte D-PA u. a. durch den Einsatz zur Elimination physiologischer Schwermetallionen aus unphysiologischen Depotkonzentrationen, z. B. beim Morbus Wilson [2]. Es hatte sich nämlich gezeigt, daß D-PA eine hohe Affinität zu Schwermetallionen unter Bildung auch *in vivo* stabiler Komplexe besitzt. In der Folgezeit wurde ferner tierexperimentell festgestellt, daß D-PA

einen hemmenden Einfluß auf den Übergang von löslichem in unlösliches fibrilläres Kollagen ausübt [3–7]. Daraus wurde geschlossen, daß D-PA die Biosynthesen intermolekularer Quervernetzungen beeinflußt, die erforderlich sind, damit lösliches in unlösliches Kollagen übergehen kann. Für diesen Einfluß werden im wesentlichen zwei Mechanismen verantwortlich gemacht:

1. Hemmung der Lysyloxidase-Aktivität durch Kupferentzug aus dem Bindegewebe; damit verbunden Ausfall der über eine oxidative Desamierung der  $\epsilon$ -Aminogruppen führende Umwandlung von Lysin- und Hydroxylysin in die entsprechenden Aldehydderivate (**Ia**).



2. Blockierung bereits vorhandener  $\alpha$ -Amino-Adipinsäure- $\delta$ -Semialdehydreste (Allysin) (**Ia**) über Thiazolidinderivate (**Id**) verbunden mit dem Ausfall einer Verknüpfung mit benachbarten

Sonderdruckanforderungen an Prof. Dr. Th. Nemetschek, Abt. Ultrastrukturforschung, Pathologisches Institut der Universität, Postfach 10 43 40, D-6900 Heidelberg 1.



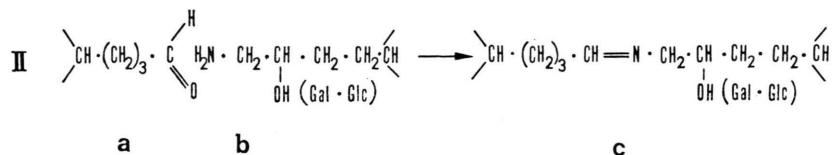
Dieses Werk wurde im Jahr 2013 vom Verlag Zeitschrift für Naturforschung in Zusammenarbeit mit der Max-Planck-Gesellschaft zur Förderung der Wissenschaften e.V. digitalisiert und unter folgender Lizenz veröffentlicht: Creative Commons Namensnennung-Keine Bearbeitung 3.0 Deutschland Lizenz.

Zum 01.01.2015 ist eine Anpassung der Lizenzbedingungen (Entfall der Creative Commons Lizenzbedingung „Keine Bearbeitung“) beabsichtigt, um eine Nachnutzung auch im Rahmen zukünftiger wissenschaftlicher Nutzungsformen zu ermöglichen.

This work has been digitized and published in 2013 by Verlag Zeitschrift für Naturforschung in cooperation with the Max Planck Society for the Advancement of Science under a Creative Commons Attribution-NoDerivs 3.0 Germany License.

On 01.01.2015 it is planned to change the License Conditions (the removal of the Creative Commons License condition "no derivative works"). This is to allow reuse in the area of future scientific usage.

Hydroxylsirenen unter Bildung der Schiff'schen Base Dehydro-Lysinohydroxynorleucin (**II**).



Die sich hieraus ergebenden Störungen im Vernetzungsablauf werden ein fibrillär geordnetes Kollagen zur Folge haben, das hinsichtlich seines Vernetzungsgrades nicht mit dem eines gleichalten Kontrolltieres übereinstimmt, verbunden mit einem erhöhten Gehalt an löslichem Kollagen. Da bekanntlich die mechanischen Eigenschaften der Kollagenfasern wesentlich von ihrem Vernetzungsgrad mitbestimmt werden, bieten entsprechende Messungen eine Möglichkeit, Störungen in der Biosynthese von Vernetzungen zu erfassen [8 – 10]. Im Rahmen dieser Untersuchungen sollte zudem auch noch geprüft werden, ob das an Einzelfasern zu registrierende biphasische Spannungs-Dehnungsverhalten [11, 12] eine Differenzierung der beteiligten Querverbindungen ermöglicht. Da weiterhin zu erwarten war, daß D-PA als Komplexbildner nicht nur den Kupfergehalt des Bindegewebes, sondern auch den anderer Organe ebenso wie den Gehalt weiterer Spurenelemente beeinflussen würde, wurde die Aktivierungsanalyse auch bei der Bestimmung von Eisen, Mangan, Kobalt, Rubidium und Zink eingesetzt. Parallel hierzu wurde licht- und elektronenmikroskopisch auf etwaige Gewebsveränderungen geprüft.

### **Material und Methoden**

Es wurden 80 männliche Sprague-Dawly-Ratten – durchschnittliches Körpergewicht bei Versuchsbeginn 100 g – eingesetzt. Mittels Zufallszahlen wurden die Versuchstiere in zwei Hauptgruppen (Versuch, Kontrolle) mit jeweils 10 Untergruppen zu vier Tieren aufgeteilt. Von jeder Hauptgruppe wurden 20 Tiere in Einzelkäfigen, zur Ermittlung des Futterverbrauchs, gehalten. Die restlichen Tiere waren in Vierergruppen in Standardkäfigen (vollklimatisierter Raum 21 °C) untergebracht. Als Futter wurde Altromin®-Standarddiät, dem für die Versuchsgruppe 4 g D-PA/kg (Homburg) und 100 mg Vitamin B<sub>6</sub>/kg für die Kontrollgruppe nur 100 mg Vitamin B<sub>6</sub>/kg maschinell beigemischt war, gegeben. Futter und Wasser standen den Tiere ad libitum zur Verfügung. Die durchschnittliche Futterauf-

nahme steigerte sich von 18 g zu Beginn auf 30 g gegen Ende des Versuchs, entsprechend einer Dosis von 72 – 120 mg D-PA/die.

36 Stunden, 4 Tage, 1, 2, 4, 8, 12, 17 und 40 Wochen nach Versuchsbeginn wurden die Tiere der entsprechenden Untergruppe getötet und neben den Schwanzsehnen Proben aus Gefäßen, Herz, Gehirn, Leber, Milz, Niere und (Nebenniere) entnommen, und der Spurenelement-Analyse sowie der licht- und elektronenmikroskopischen Untersuchung zugeführt. Den 40 Wochen nach Versuchsbeginn noch verbliebenen vier Tieren der Versuchsgruppe wurde für weitere 8 Wochen das gleiche Futter wie den Kontrolltieren gegeben.

**Spurenelementbestimmung.** Als Nachweismethode zur Bestimmung von Eisen, Kobalt, Kupfer, Mangan, Rubidium und Zink sowie von Natrium und Kalium wurde die Neutronenaktivierungsanalyse gewählt. Diese Methode bietet neben einer hohen Empfindlichkeit die Möglichkeit der simultanen Multi-elementbestimmung. Ferner ist sie hinsichtlich der Kontaminationsgefahr den herkömmlichen Verfahren überlegen, da Chemikalien zur Abtrennung von Störelementen, sofern überhaupt erforderlich, erst nach der Bestrahlung zugeführt werden und somit die Radioaktivitätsmessung der Spurenelementkonzentrationen nicht stören können.

Nach Tötung und Entbluten (Aorta-Punktion) der Tiere wurden die Organe Herz, Leber, Milz und Niere metallfrei und das Gehirn nach Eröffnung des Schädels (Knochenschere) mittels Plastikinstrumenten entnommen, in hochgereinigte Nitrocelluloseröhrchen abgepackt und sofort gewogen. Nach Gefriertrocknung und Bestimmung des Trockengewichts wurden die Gewebsproben in einem Teflon-Mörser homogenisiert. Jeweils 200 mg wurden in Quarzampullen und weitere 100 mg in Polystyrolröhrchen eingewogen. Die Quarzampullen wurden 14 Stunden im FRII-Reaktor des Kernforschungszentrums Karlsruhe ( $4 \times 10^{13} \text{ n cm}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ) bestrahlt. Nach einer Abklingzeit von 14 Tagen konnte die Konzentration der Elemente Co, Fe, Rb, Zn nebeneinander mittels eines hochauflösenden Ge-Li-Bohrlochdetektors

durch Vergleich mit unter identischen Bedingungen bestrahlten und gemessenen Standardlösungen bestimmt werden.

Zur Bestimmung der Elemente Cu, K, Mn und Na wurde die zweite Probe im Triga Mark I-Reaktor des Deutschen Krebsforschungszentrums eine Stunde ( $2 \times 10^{12} \text{ n cm}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ) bestrahlt. Nach direkter Bestimmung von K und Na wurde die Probe mit  $\text{H}_2\text{SO}_4$  und  $\text{H}_2\text{O}_2$  aufgeschlossen und die Elemente Kupfer und Mangan mittels Ammoniumpyridindithiocarbamat/Methylisobutylketon extrahiert und nebeneinander bestimmt [13]. Der Fehler für die direkte Elementbestimmung ist geringer als 3%, während der maximale Fehler für die Bestimmung von Kupfer und Mangan 5% beträgt.

**Statistische Methoden.** Das Verhalten der Spurenelementkonzentration in den untersuchten Organen nach Umstellung auf das Versuchsfutter war als zweifaktorieller Versuchsplan (Behandlung, Zeit) mit 2 bzw. 9 Stufen angelegt. Mittels der zweifachen Varianzanalyse konnte somit auf Unterschiede zwischen den Gruppen, auf einen zeitlichen Trend während des Versuchs sowie auf ein unterschiedliches zeitliches Verhalten in den beiden Gruppen (Wechselwirkung) geprüft werden. Weiterhin konnte durch Logarithmieren der Originaldaten die bei der Analyse geforderte Normalverteilung und Varianzstabilität annähernd erreicht werden. Die Ergebnisse der Varianzanalyse sind in den Legenden der Abbildungen durch Angabe der Irrtumswahrscheinlichkeit „p“ wiedergegeben. Zusätzlich wurde in der Versuchsgruppe mittels der Korrelationsanalyse der Zusammenhang der von der Kontrollgruppe abweichenden Elementkonzentrationen in den Organen überprüft.

**Mechanische Messungen.** Die E-Moduln der frei präparierten Fasern wurden mit Hilfe der von Bowitz [14] beschriebenen Meßanordnung bei  $20^\circ\text{C}$  bestimmt; Messungen bei höheren Temperaturen siehe dort; Dehnungsgeschwindigkeit 8%/min. Zur Querschnittsbestimmung dienten lichtoptische Vergrößerungen von Gefrierschnitten. Die Flächenbestimmung der Gefrierschnitte geschah durch Wägen und in jüngster Zeit mit dem elektronischen Flächenmeßgerät DIGIPLAN der Firma Kontron.

Zur Röntgenbeugung wurden luppenpräparierte Fasern feucht in dünnwandige Glaskapillaren (Markröhren) von 0,5 mm Durchmesser eingezo gen oder im gespannten Zustand in Küvetten vor den Röntgenstrahl gebracht. Von den Proben wur-

den unter Verwendung von Kiessig- und Kratky-Kammern und unter Einsatz der Cu-K $\alpha$ -Strahlung sowohl Weitwinkel- als auch Kleinwinkelröntendiagramme angefertigt.

Die Schrumpfungstemperatur- ( $T_s$ ) Bestimmung erfolgte bei gleichzeitiger Beobachtung der Faserstückchen mit Hilfe des elektronischen Temperaturmeßgerätes Tastotherm P 1 von Braun in Verbindung mit einer Steuereinheit, die es erlaubt, die Probe definiert aufzuheizen. Der Ausgang des Temperaturmeßgerätes ist dabei über einen Meßverstärker mit einem x/t-Schreiber verbunden.

Zur licht- und elektronenmikroskopischen Untersuchung der Gewebsproben erfolgte die Probenaufbereitung, wie bereits beschrieben [15]. Betrachtung der Objekte mit dem Elmiskop Ia von Siemens.

## Ergebnisse

### Bestimmung der Spurenelemente

In Abb. 1 findet man die Gewichtszunahme der Versuchs- und Kontrolltiere. Mittels der ZVA läßt sich kein Unterschied zwischen den beiden Gruppen feststellen. Lediglich nach 40 Wochen ist eine Abnahme des Gewichtes der Versuchstiere von ca. 8%

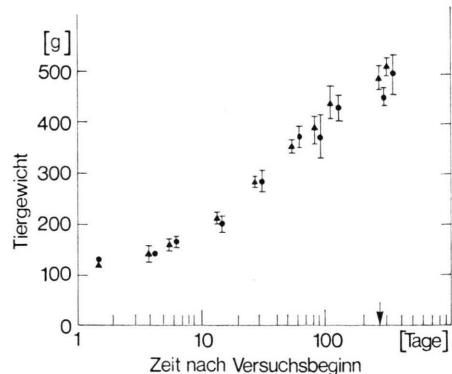


Abb. 1. Abhängigkeit der Tiergewichte vom Alter. Ergebnisse der Varianzanalyse:

Gruppe	Zeit	Wechselwirkung (Gruppe Zeit)
Gewicht	ns	0,001
		ns
ns = nicht signifikant		
SD = Standardabweichung		$\sqrt{\frac{\sum(x-\bar{x})^2}{n-1}}$
● Versuchstiere (Mittel aus 4 Tieren $\pm$ SD);		
□ Kontrolltiere (Mittel aus 4 Tieren $\pm$ SD);		
↓ Wechsel von Versuchs- auf Kontrollfutter.		

zu beobachten; nach Absetzen des Versuchsfutters jedoch wieder ausgeglichen. Ein Unterschied im Gewicht der entnommenen Organe sowie im Wassergehalt (Verhältnis feucht/trocken) lag nicht vor. Alle weiteren Angaben beziehen sich auf 1 g gefriergetrocknetes Gewebe. Man findet, wie erwartet, in allen untersuchten Organen eine deutliche Änderung in der Kupferkonzentration. Weiterhin findet man eine auffällige, mit dem Kupfergehalt nahezu synchron verlaufende Abnahme der Kobaltkonzentration. Dagegen konnten im Gehalt der Elemente Mangan, Eisen, Zink, Natrium, Kalium und Rubidium keine wesentlichen Abweichungen gegenüber den Kontrollgeweben festgestellt werden. Die Meßdaten der Elemente Mangan, Eisen und Zink sind jeweils in Klammern als Mittelwert aus 36 Tieren angegeben. Wobei der erste Wert die Elementkonzentration des entsprechenden Organs in der Versuchsgruppe bedeutet.

Von allen untersuchten Organen zeigt das *Gehirn* (Abb. 2) der Versuchstiere die geringste Konzentrationsabnahme an Kupfer und Kobalt. Diese beträgt

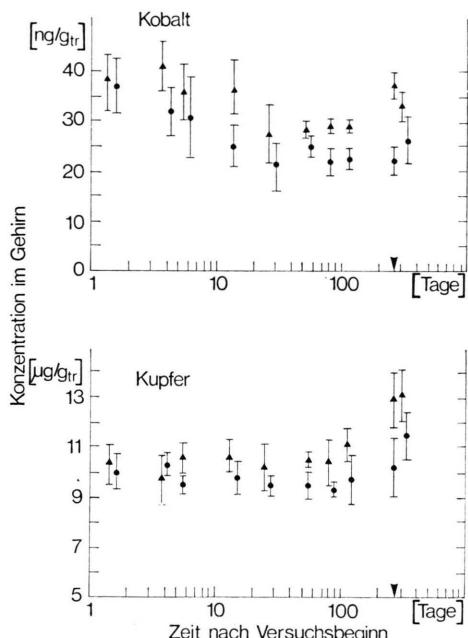


Abb. 2. Zeitliche Abhängigkeit der Kobalt- und Kupferkonzentration im Gehirn. Korrelation Co-Cu in der Versuchsgruppe:  $r=0,17$  ns. Ergebnisse der Varianzanalyse:

	Gruppen	Zeit	Wechselwirkung
Co	$p<0,001$	$p<0,001$	ns
Cu	$p<0,001$	$p<0,001$	$0,005 < p < 0,001$

nach 40 Wochen für Kobalt 40% und für Kupfer 20%.

Der Gehalt an Zink (51,6/52,3  $\mu\text{g/g}$ ), Eisen (60,4/61,4  $\mu\text{g/g}$ ) und Mangan (1,72/1,75  $\mu\text{g/g}$ ) wird innerhalb 40 Wochen nach Gabe von D-PA nicht beeinflußt. Weiterhin war in beiden Gruppen eine Zunahme der Eisenkonzentration von 50,5  $\mu\text{g/g}$  auf 85,4  $\mu\text{g/g}$  ( $P<0,001$ ) und eine geringfügige Abnahme der Zinkkonzentration von 56,6  $\mu\text{g/g}$  auf 50,3  $\mu\text{g/g}$  ( $P<0,001$ ) zu beobachten, während die Mangankonzentration sich zeitlich nicht änderte.

Nach Absetzen von D-PA wird im Gegensatz zu den anderen Organen die Konzentration der Kontrollgruppe nicht annähernd erreicht.

Das *Herzgewebe* zeigt (Abb. 3), bei einer sehr stabilen mittleren Konzentration an Kupfer (21,3  $\mu\text{g/g}$ ) in der Kontrollgruppe, unter D-PA eine kontinuierliche Abnahme bis zur 8. Versuchswoche von 60%, gefolgt von einem kontinuierlichen Anstieg, der nach 40 Wochen mit 17,8  $\mu\text{g/g}$  fast den Spiegel der Kontrolltiere (20,5  $\mu\text{g/g}$ ) erreicht.

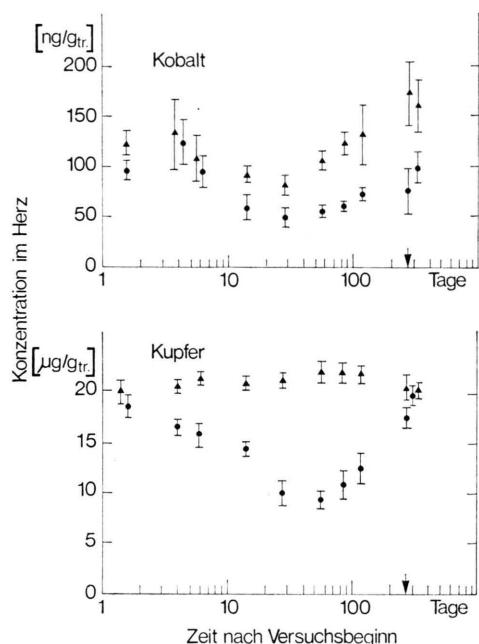


Abb. 3. Zeitliche Abhängigkeit der Kobalt- und Kupferkonzentration im Herz. Korrelation Co-Cu in der Versuchsgruppe:  $r=0,61$   $p<0,001$ . Ergebnisse der Varianzanalyse:

	Gruppen	Zeit	Wechselwirkung
Co	$p<0,001$	$p<0,001$	$p<0,001$
Cu	$p<0,001$	$p<0,001$	$p<0,001$

Die Kobaltkonzentration erreicht bereits nach zwei Wochen ein Minimum von 50 ng/g und steigt dann parallel zur Kontrollgruppe bis auf 75 ng/g an. Der Unterschied zur Kontrollgruppe beträgt dabei nahezu konstant 50%.

Zink (65,7/68,5 µg/g) ist geringfügig erniedrigt, während der Mangan- (1,57/1,54 µg/g) und Eisengehalt (266/261 µg/g) durch D-PA nicht beeinflußt wird. Dagegen erkennt man für diese Elemente in beiden Gruppen einen deutlichen zeitlichen Trend.

Die Kupferkonzentration im Herz der Versuchstiere erreicht 8 Wochen nach Absetzen von D-PA den Kontrollwert, während für Kobalt noch ein Defizit von 37% besteht.

In der Leber (Abb. 4) der Versuchstiere erreicht die Kupferkonzentration nach 12 Wochen ein bis zum 200. Versuchstag beibehaltenes Plateau von 7,4 µg/g, entsprechend einer Abnahme um 36%.

Die Kobaltkonzentration ist dagegen bereits nach vier Wochen um 78% abgefallen.

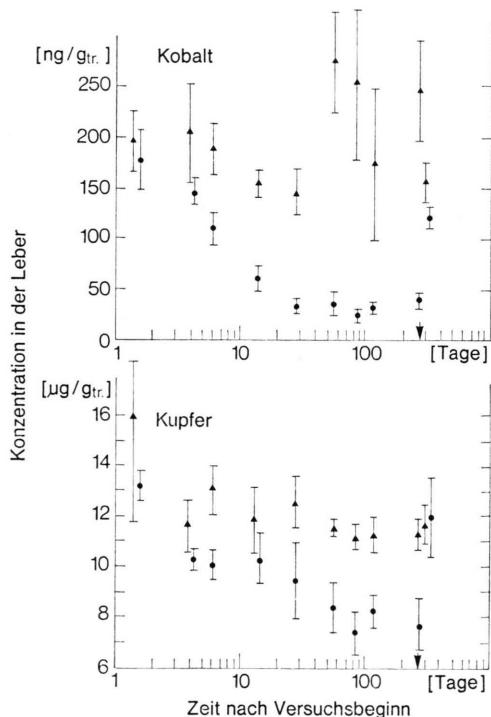


Abb. 4. Zeitliche Abhängigkeit der Kobalt- und Kupferkonzentration in der Leber. Korrelation Co-Cu in der Versuchsgruppe:  $r=0,84$   $p < 0,001$ . Ergebnisse der Varianzanalyse:

	Gruppen	Zeit	Wechselwirkung
Co	$p < 0,001$	$p < 0,001$	$p < 0,001$
Cu	$p < 0,001$	$p < 0,001$	ns

Zink (82,8/82,9 µg/g), Eisen (360/320 µg/g) und Mangan (6,7/6,6 µg/g) werden nicht beeinflußt, dagegen findet man auch in der Leber in beiden Gruppen eine Anreicherung an Eisen von 187 µg/g auf 600 µg/g. Mangan zeigt ebenso eine Zunahme von 6,0 µg/g auf 7,2 µg/g. Dagegen bleibt die Zinkkonzentration über 40 Wochen konstant.

8 Wochen nach Umstellen auf das Kontrollfutter findet man für die Kupferkonzentration (11,7 µg/g zu 12,0 µg/g) keinen Unterschied gegenüber den Kontrolltieren. Die Kobaltkonzentration ist dagegen mit 123 ng/g noch um 20% erniedrigt.

In der Milz findet man auffälligerweise bereits 36 Stunden nach Versuchsbeginn einen Abfall des Kupfergehaltes auf 75% (Abb. 5) und nach 12 Wochen nur noch ~40% des Kontrollwertes.

Die Kobaltkonzentration erreicht nach 8 Wochen ein Plateau von 20 ng/g. Bei annähernd konstanten Werten in der Kontrollgruppe von ca. 60 ng/g bedeutet dies eine Erniedrigung um 66%.

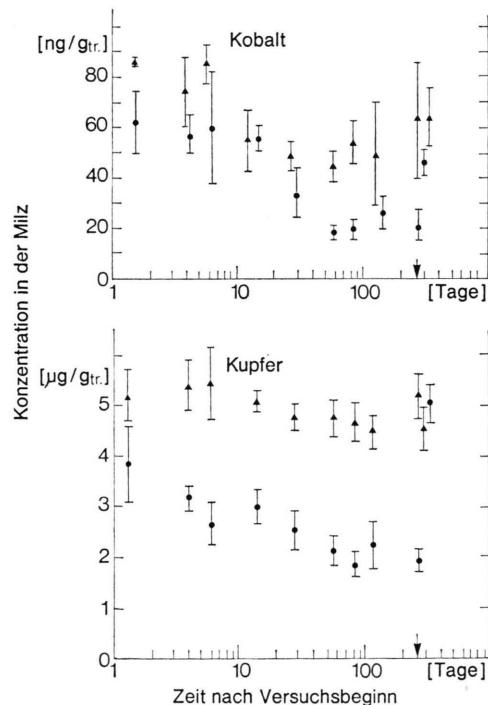


Abb. 5. Zeitliche Abhängigkeit der Kobalt- und Kupferkonzentration in der Milz. Korrelation Co-Cu in der Versuchsgruppe:  $r=0,60$   $p < 0,001$ . Ergebnisse der Varianzanalyse:

	Gruppen	Zeit	Wechselwirkung
Co	$p < 0,001$	$p < 0,001$	ns
Cu	$p < 0,001$	$p < 0,001$	$0,001 < p > 0,005$

Der Gehalt an Zink (74/73 µg/g), Eisen (2600/2560 µg/g) und Mangan (0,69/0,65 µg/g) bleibt von D-PA unbeeinflußt. Allerdings steigt die Eisenkonzentration in beiden Gruppen mit dem Alter der Tiere von 725 µg/g auf 7600 µg/g an, während der Gehalt an Mangan von 0,7 µg/g auf 0,6 µg/g und Zink von 80 µg/g auf 63 µg/g abfällt.

Nach Absetzen des Versuchsfutters erreicht die Kupferkonzentration den Wert der Kontrollgruppe, während die Kobaltkonzentration etwas unterhalb des Kontrollwertes bleibt.

Bereits 36 Stunden nach Versuchsbeginn ist die Kupferkonzentration in der Niere (Abb. 6) auf 17,6 µg/g gesunken und bleibt während des gesamten Versuches nahezu konstant. In der Kontrollgruppe findet in der gleichen Zeit ein Anstieg von 23,4 µg/g auf 57 µg/g statt.

Die Kobaltkonzentration erreicht bereits zwei Wochen nach Versuchsbeginn ein Plateau von 480 µg/g, das ziemlich konstant beibehalten wird.

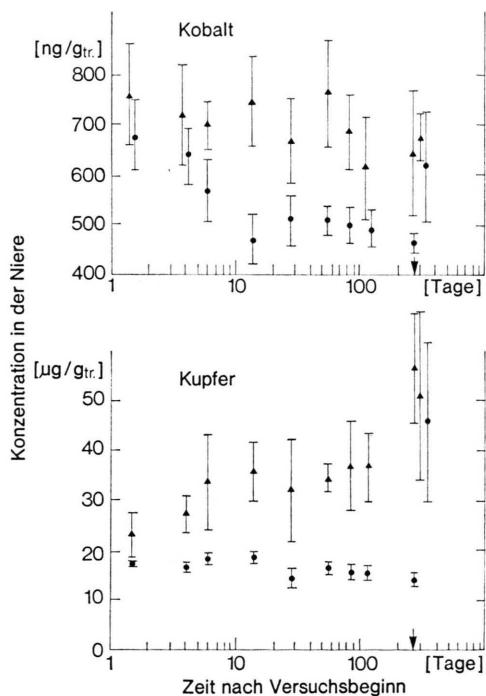


Abb. 6. Zeitliche Abhängigkeit der Kobalt- und Kupferkonzentration in der Niere. Korrelation Co-Cu in der Versuchsgruppe:  $r=0,29$  ns. Ergebnisse der Varianzanalyse:

	Gruppen	Zeit	Wechselwirkung
Co	$p<0,001$	$p<0,001$	ns
Cu	$p<0,001$	$p<0,001$	$p<0,001$

Die Zinkkonzentration (82/86 µg/g) ist leicht erhöht, während der Gehalt an Eisen (220/228 µg/g) und Mangan (3,3/3,3 µg/g) unverändert ist.

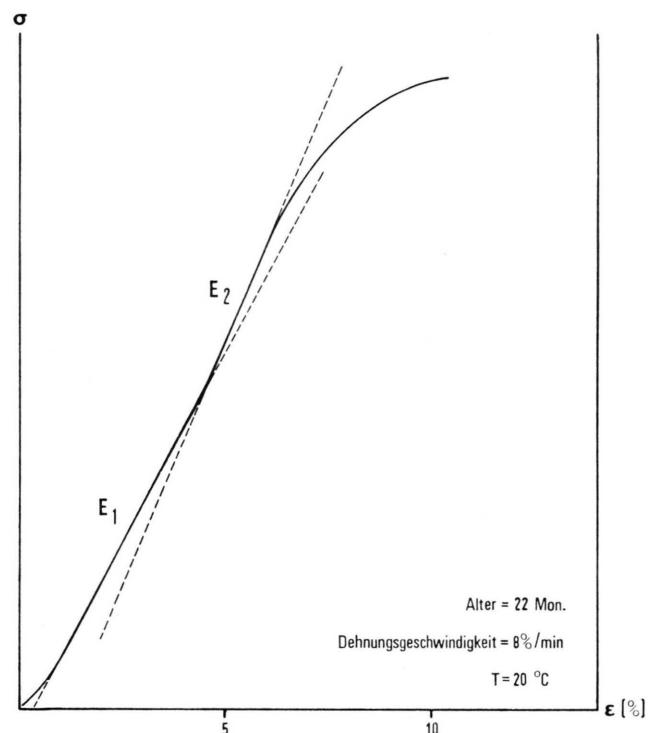
Nach Absetzen des D-PA-haltigen Futters erreicht die Konzentration von Kupfer, Kobalt und Zink den Wert der Kontrolltiere.

**E-Modul-Bestimmungen.** Abb. 7 veranschaulicht den biphasischen Funktionsverlauf im Spannungs-Dehnungs-Diagramm einer nativen Kollagenfaser. Unter  $E_1$  wird der untere und unter  $E_2$  der obere zu einer höheren Steigung abgeknickte lineare Bereich verstanden. Zu Versuchsbeginn lag der  $E_1$ -Modul der Schwanzsehnenfasern bei  $4 \times 10^8$  N/m<sup>2</sup> und der  $E_2$ -Modul bei  $5 \times 10^8$  N/m<sup>2</sup>.

Im Verlauf der ersten Versuchswoche schwankten sowohl die Ausgangs- als auch die Versuchswerte, da junge und somit z. T. noch sehr dünne Fasern aus präparationstechnischen Gründen nur schwer zu vermessen sind. Dennoch erkennt man in Abb. 8, daß offenbar innerhalb eines Abschnittes von 20 – 30 Tagen kein signifikanter Unterschied in den mechanischen Eigenschaften der Kontroll- und Versuchsfasern besteht. Ab der 15. Versuchswoche entnommene Fasern führen zu E-Moduln, die nunmehr deutlich von denen der Kontrollfasern abweichen (Abb. 8). Die absolute Differenz ist dabei zwar im  $E_1$ -Modul geringer als im  $E_2$ -Modul, und zwar z. B. nach einer Versuchsdauer von ~330 Tagen etwa  $7,5 \times 10^7$  N/m<sup>2</sup> zu  $10^8$  N/m<sup>2</sup>, relativ beläßt sich aber der Unterschied in beiden Fällen zwischen 13 und 24%. Auffälligerweise bleiben die E-Moduln auch nach dem 270. Versuchstag, also nach Absetzen von D-PA, annähernd gleich. Bemerkenswert ist fernerhin das stetige Ansteigen der E-Moduln mit dem Alter auch der Versuchstiere.

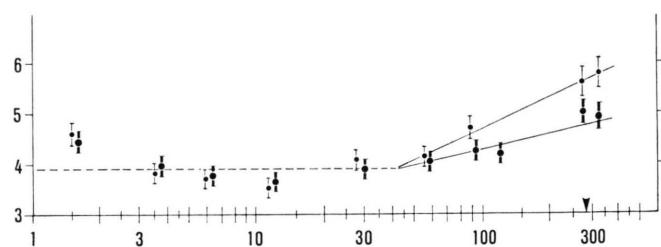
**E-Modul-Messungen bei höheren Temperaturen.** Als Ausgangstemperatur wurde 20 °C gewählt und anschließend auf 50 °C erhöht. Messungen bei 50 °C ergaben direkt nach dem Aufheizen einen Abfall im E-Modul gegenüber dem Ausgangswert bei 20 °C. Nach etwa 10 Dehnungen bei 50 °C wurde jedoch der Ausgangsmodul wieder erreicht. Bei 55 °C war der E-Modul kaum meßbar, da die Fasern schon bei kleinen Dehnungen rissen. Bei 53 °C konnte ein starker Abfall des Moduls gegenüber dem Ausgangswert beobachtet werden; bei weiteren Dehnungen wurde dieser Effekt noch verstärkt. Zudem wurde die Probe zunehmend unelastischer, d. h. die Hysteresisschleifen waren nicht mehr geschlossen. Die

Abb. 7. Biphasisches Spannungs-Dehnungs-Diagramm einer nativ feuchten Kollagenfaser aus Rattenschwanzsehne, aufgenommen in horizontal angeordneter Meßküvette. Im Proportionalbereich weist die Kurve zwei Steigungen auf, durch die zwei E-Moduln definiert sind [11].



E<sub>1</sub>-Modul

$$\left[ \frac{N}{m^2} \cdot 10^{-8} \right]$$



E<sub>2</sub>-Modul

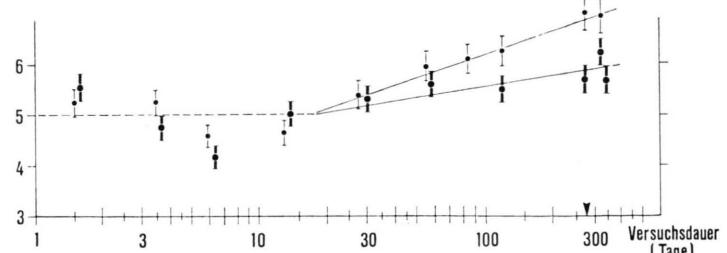


Abb. 8. E-Moduln von nativen Fasern aus Schwanzsehnen unter D-PA-Einfluß stehender Ratten (■) im Vergleich zu Kontrollfasern (□); nach 270 Tagen wurde D-PA abgesetzt und auf Normalfutter umgestellt (▼).

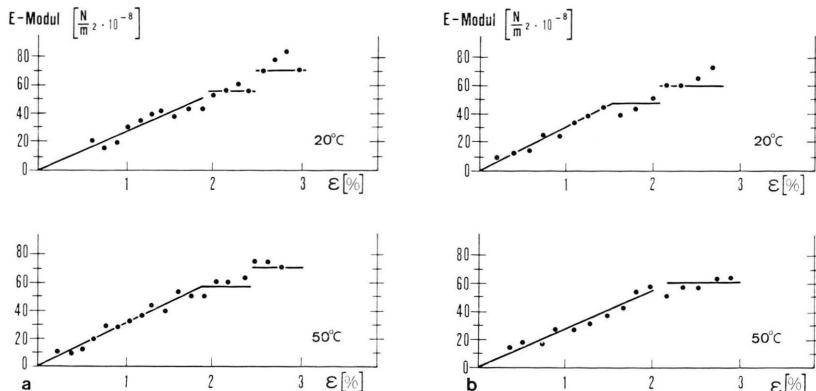


Abb. 9. Differentieller  $E$ -Modul von 51 Wochen alten Sehnenfasern in Abhängigkeit der Dehnung und Temperatur. a) Kontrollfasern; b) nach 40 Wochen D-PA Applikation. Dehnungsgeschwindigkeit: 8%/min. Es wurden  $\sigma$ - $\epsilon$ -Kurven ausgewertet, die dem Gleichgewichtszustand der Fasern bei der jeweiligen Temperatur entsprachen; d. h. die Faser wurde so lange be- und entlastet, bis der Konditionierungsvorgang abgeschlossen war.

ursprünglichen mechanischen Eigenschaften der Kollagenfasern kehrten beim Abkühlen nicht zurück.

In Abb. 9 sind die Ergebnisse der Messungen bei 20 °C und 50 °C wiedergegeben, und zwar wurden  $\sigma$ - $\epsilon$ -Kurven ausgewertet, die dem Gleichgewichtszustand der Fasern bei der jeweiligen Temperatur entsprachen. Zu diesem Zweck wurden die Fasern so lange be- und entlastet, bis der Konditionierungsvorgang abgeschlossen war. Weiterhin wurden die  $\sigma$ - $\epsilon$ -Kurven durch Sekanten in Polygonzüge zerlegt. Die Steigungen dieser Sekanten wurden in  $E$ -Moduln umgerechnet und gegen  $\epsilon$  aufgetragen. Die  $E$ -Moduln im herkömmlichen Sinn, denen im Spannungs-Dehnungs-Diagramm ein geradliniger Kurvenverlauf entspricht, werden im  $E$ - $\epsilon$ -Diagramm durch horizontale Kurvenabschnitte angezeigt. Da die Sekantensteigungen in diesen Bereichen um einen Mittelwert schwanken, wurden mit Hilfe der vorstehend beschriebenen Methode lediglich die  $\epsilon$ -Bereiche festgelegt, die den Moduln  $E_1$  und  $E_2$  entsprechen. Die als horizontale Geraden in die Diagramme eingetragenen Moduln wurden dann aus den Originalkurven direkt bestimmt. Während nun bei den Kontrollfasern zwischen der 20°- und 50°-Kurve kein signifikanter Unterschied besteht, fehlt bei den 50°-Diagrammen der Versuchsprobe der den  $E_1$ -Modul anzeigenende horizontale Kurvenabschnitt.

Parallel zu den mechanischen Messungen wurde auch die Thermostabilität frei beweglicher Fasern bestimmt; die Schrumpfungstemperaturen ( $T_s$ ) ergaben keine signifikanten Unterschiede zwischen Kontroll- und Versuchsfasern. Es konnte lediglich ein altersbedingter Anstieg von ~58 auf ~61 °C bei beiden Tiergruppen registriert werden.

Auch die Methode der Röntgenbeugung ergab für beide Gruppen keine strukturellen Unterschiede.

*Licht- und elektronenmikroskopisch* wurden von allen Versuchsgruppen Gewebsproben folgender Organe untersucht: Leber, Milz, Niere, Herz, Aorta und Nebenniere. Im Rahmen dieser Mitteilung wird von einer ausführlichen Besprechung der Befunde abgesehen. Hervorzuheben bleibt:

1. An Lebergewebe einiger Tiere der 3., 4. und 6. Versuchsgruppe war ein venöser Stau zu beobachten. Bei zwei dieser Versuchstiere fand man vereinzelt hyalintropfige Hepatocyten, in denen elektronenmikroskopisch Fibrin nachzuweisen war. Hinsichtlich des Lipid- und Glykogengehaltes beobachtet man bei den Kurzzeitversuchen eine deutliche Lipidspeicherung in den Hepatocyten, teils in Form von Tropfen, teils als Myelinfiguren; der Glykogengehalt ist reichlich, jedoch bis auf eine Vergesellschaftung mit Lipiden unauffällig. Mit fortschreitender Versuchsdauer gleichen sich die Befunde zwischen Kontrollen und Versuchstieren immer mehr an. Quantitative Unterschiede im Gehalt an Peroxisomen und Mitochondrien wurden nicht erhoben. Gelegentlich konnte man aber vermehrt Lipoproteinvesikel beobachten. Die Kollagenfibrillen aus der Leberkapsel (Abb. 10) zeigen gegenüber den Kontrollen ein aufgelockertes Gefüge in der Art von Aufspaltungen und Aufsplitterungen in dünne Subfibrillenbündel.
2. Das untersuchte Nierengewebe aus Versuchs- und Kontrolltieren zeigt lichtmikroskopisch keine Unterschiede. Elektronenmikroskopisch ist bei den Versuchstieren gelegentlich eine Vermehrung an Myelinfiguren, vor allem in den proximalen Tubuli festzustellen. Veränderungen der Basalmembran sowohl der Glomerula als auch der



Abb. 10. Subkapsulär gelegene Kollagenfibrillen mit aufgelockertem Gefüge aus dem Lebergewebe einer 48 Wochen unter D-PA-Einfluß gehaltenen Ratte. Die Pfeile markieren besonders auffällige Fibrillenbereiche.  $\text{UO}_2\text{-Ac}$ . und Pb-Hydroxo-Nachkontrastierung. 1821/76; el. opt.: 18 000 : 1.

Tubuli waren nicht nachzuweisen. Gelegentlich konnte eine Schwellung der Podocyten beobachtet werden, verbunden mit Endothelllücken, jedoch betrafen diese Veränderungen jeweils nur einen Teil der Glomerula.

3. Auch die untersuchten Myocardproben ergaben keine signifikanten Unterschiede zwischen Versuchs- und Kontrolltieren. In beiden Fällen waren große Phagolysosomen in Muskelzellen auffällig.
4. Die Gewebsproben aus den Nebennieren waren bei beiden Tierkollektiven unauffällig.
5. An den kleineren Arterien und Arteriolen der Organe fand man gelegentlich im adventitiellen Raum einzelne aufgelockerte Kollagenfibrillen, wie sie auch in der Leberkapsel zu beobachten waren. An größeren Gefäßen erschien jedoch das Kollagen unauffällig. Die Gefäßendothelen und vor allem die Sinusendothelen der Leber lassen eine geringgradig erhöhte Pinocytose erkennen.

## Diskussion

Die Ergebnisse der Spurenelementanalyse haben gezeigt, daß die Wirkung von D-PA auf die Elementkonzentration in den einzelnen Organen recht unterschiedlich ist. So konnte eine Erniedrigung bei

ausreichender diätischer Zufuhr nur für den Gehalt an Kupfer und Kobalt festgestellt werden. Ein Zinkmangel, wie er unter Berücksichtigung der Metall-D-PA-Affinitäts-Reihe ( $\text{Cu} \gg \text{Zn} > \text{Co} > \text{Fe} > \text{Mn}$ ) zu erwarten gewesen wäre und von Klingberg *et al.* [16] bei einem Patienten unter D-PA-Therapie beobachtet wurde, war nicht zu registrieren. Vielmehr bestätigen die in der Niere gefundene erhöhte Zinkkonzentration und die konstanten Zinkwerte in den übrigen Organen die Untersuchungen von McCall *et al.* [17]. Diese Autoren fanden eine erhöhte Resorption von Zink bei gleichzeitig vermehrter Ausscheidung des Elements nach Gabe von D-PA bei Wilson- und Cystinurie-Patienten, während für Kupfer eine negative Bilanz bestand.

Auffälligerweise zeigten die untersuchten Organe hinsichtlich ihrer Spurenelementspeicher ein unterschiedliches Verhalten gegenüber D-PA. Ferner konnte für alle Organe unter dem Einfluß von D-PA ein Grenzwert der Elementkonzentration ermittelt werden, der dann bis zum Versuchsende nicht mehr unterschritten wurde. Für den maximalen Kupfermangel gilt die Reihenfolge Niere (30%), Milz (40%), Herz (40%), Leber (64%) und Gehirn (80%), während die Kobaltnahme den Trend über Leber (10%), Milz (35%), Herz (50%), Gehirn (60%) und Niere (75%) zeigt.

Die Ergebnisse führen weiter zu dem Schluß, daß kein einfacher Zusammenhang zwischen Ausgangskonzentration und maximaler Erniedrigung besteht. So fällt Kobalt in der Niere von einem Ausgangswert von 800 ng/g nur um 75% ab, während in der Leber bei einer mittleren Konzentration von 210 ng/g in der Kontrollgruppe eine Abnahme um eine Zehnerpotenz zu beobachten ist. Ähnliches gilt für Kupfer in der Leber und Milz. Dies dürfte damit zusammenhängen, daß in den einzelnen Organen für beide Elemente mehrere Depots unterschiedlicher Bindungsstärke vorliegen. So fordert Walshe [18] für Kupfer mindestens zwei Pools, Haselring [19] hingegen z.B. in der Leber mindestens drei Kompartimente. In Anlehnung an diese Auffassung wäre somit gemäß eigener Daten das erste Depot mit sehr schwacher Elementbindung bereits nach 36 h durch D-PA geleert. Das zweite wäre nach 8–12 Wochen verarmt, während das dritte Depot schließlich innerhalb der Versuchsdauer von 12–40 Wochen keine wesentliche Beeinflussung durch D-PA erkennen läßt, trotz eines Überschusses von 530 µmol gegenüber 117 µmol an komplexierungsfähigen Metallionen. So ist die Kupferkonzentration in Leber, Milz und Niere bereits 36 h nach Versuchsbeginn stark abgefallen, danach bleibt diese in der Niere nahezu konstant, während sie in Leber und Milz bis 12 Wochen nach Versuchsbeginn weiter abnimmt. Der zeitliche Verlauf im Herzen deutet nur auf Kompartiment 2 und 3 hin. Bemerkenswerterweise tritt bei diesem Organ nach Erreichen des Minimums am 56. Tage ein Regulationsmechanismus in Kraft, der bis Versuchsende den Kupferverlust nahezu ausgleicht. Auch in der Leber und in der Milz ist nach 105 Tagen eine, wenn auch geringe, Kompensation der Kupferwerte zu beobachten. Ähnliche Grenzwerte fanden Owen [20] bei Ratten, die 200 Tage eine Kupfermangeldiät erhielten und Wesch et al. [21] während des Wachstums experimenteller Tumoren in der Niere.

Betrachtet man weiter den Gehalt der Organe an Kobalt, so ist die gute Korrelation mit den Kupferwerten überall dort auffällig, wo ein deutlicher Kupferverlust im Kompartiment 2 auftritt (Leber, Milz, Herz). Dagegen besteht keine Korrelation in der Niere, wo ein unmittelbarer Abfall des Kupfergehaltes erfolgt, während der Kobaltwert erst nach 14 Tagen ein Minimum erreicht.

Die Besprechung dieser Befunde muß zunächst rein deskriptiv bleiben, da, wie gezeigt werden

konnte, unter diesen Versuchsbedingungen der Kupferentzug selbst für die Biosynthese von Kollagen eine von früheren Ergebnissen abweichende Bedeutung [22] erlangt hat. So ist mit dem relativ raschen Abfall des Kupfergehaltes auch der Sehnenfasern\* nicht sofort, sondern erst nach 20–30 Tagen ein Abfall der *E*-Moduln von Einzelfasern korreliert. Es muß auch offen bleiben, ob der auffällige Abfall des Kobaltgehaltes nicht nur mit einem Eingriff in den Stoffwechsel von Vitamin B<sub>12</sub>, sondern evtl. auch gekoppelt mit dem Kupfermangel mit einem Einfluß auf die Blutbildung [23] verbunden ist.

Schließlich bleibt hervorzuheben, daß die gefundenen Schwankungen der Spurenelementkonzentrationen der Kontrollorgane auf ein Spurenelement-Reservoir hindeuten, das bei Bedarf (Schwangerschaft oder Erkrankungen) schnell mobilisiert werden kann. Bei chronischer Behandlung mit D-PA dürfte aber dieses Reservoir nicht mehr zur Verfügung stehen, weshalb es angezeigt erscheint, in solchen Fällen neben dem Kupfergehalt auch den an Kobalt im Serum zu bestimmen.

Die mechanischen Messungen haben gezeigt, daß im Gegensatz zum raschen Abfall des Kupfergehaltes einiger Organe (s. z.B. Abb. 5 und 6) die mechanischen Eigenschaften von Kollagenfasern aus den Schwanzsehnen innerhalb der Meßgenauigkeit bis zum 30. Versuchstag noch unbeeinflußt bleiben. Demgegenüber beschreibt Vogel [9] bereits nach zwei Tagen Applikation von 12–120 mg D-PA/die mit der Schlundsonde eine deutliche Abnahme des *E*-Moduls und der Reißfestigkeit der Rattenhaut. Nach 10 Tagen Versuchsdauer soll dabei die Reißfestigkeit der Haut bis auf 60% und die der Sehnenfasern bis auf 25–50% abgenommen haben. Allerdings lag die Fehlerbreite dieser Messungen bei ± 30%, was damit zu erklären sein dürfte, daß Haut- und Sehnenquerschnitte nur grob berücksichtigt wurden. Bei exakter Einbeziehung der Faserquerschnitte findet man, wie aus Abb. 8 ersichtlich, nach 50 Wochen-Applikation von ~75 mg D-PA/die, den *E*<sub>1</sub>-Modul um ~25% niedriger als den von Kontrollfasern. Es ist dabei auffällig, daß der Abfall des *E*<sub>2</sub>-Moduls höher liegt als der des *E*<sub>1</sub>-Moduls. Da nun der *E*<sub>1</sub>-Modul vorwiegend vom Grad der Beteiligung nicht-helikaler Schwanzpeptide an der Stabilisierung der Faser bestimmt sein dürfte [24], wäre ein stärkerer Abfall des *E*<sub>1</sub>-Moduls zu erwarten ge-

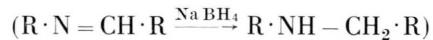
\* Die an den Fasern ermittelten Werte streuten jedoch sehr stark, weshalb von einer Wiedergabe abgesehen wurde.

wesen. D-PA sollte nämlich gerade Vernetzungsreaktionen zwischen diesen nicht-helikalen Peptiden und benachbarten Dreierschrauben hemmen bzw. blockieren. Offenbar kommt aber bei der Bestimmung des  $E_2$ -Moduls hinzu, daß infolge einer gestörten intermolekularen Vernetzung nicht nur  $E_1$ , sondern auch der  $E$ -Modul der Hauptketten, also  $E_2$ , erniedrigt erscheint, und zwar wegen eines  $E_1$ -abhängigen, nunmehr reduzierten Kraftflusses. Anders verhält es sich bei der Ermittlung der  $E$ -Moduln unterschiedlich alter Fasern. Hier zeigt der  $E_1$ -Modul (Abb. 8), wie zu erwarten, relativ zu  $E_2$  einen stärkeren Anstieg in Abhängigkeit vom Alter, konform der Zunahme intermolekularer Vernetzungen [24].

Bei einer Dosis von 30 mg D-PA/die ermittelten Nimni und Bavetta [4] an Rattenhautkollagen eine Abnahme der Zugfestigkeit um etwa 80%; bei einer Dosis von 90 mg D-PA/die [8] einen Festigkeitsabfall der vermessenen Hautstreifen um 90% unter Berücksichtigung des Gesamtkollagengehaltes; bezogen auf den Anteil an unlöslichem Kollagen verblieb eine Abnahme um ~44% des Kontrollwertes. Da auch bei diesen Messungen keine Querschnittsbestimmungen einbezogen wurden, ist ein Vergleich mit den hier besprochenen Ergebnissen nur qualitativ möglich. Auffällig bleibt jedoch in jedem Fall, daß offenbar der Einfluß von D-PA auf Hautkollagen größer ist als auf Sehnenkollagen, d.h. also, daß unter Annahme eines einheitlichen Wirkungsmechanismus die Anfälligkeit der Biosynthese stabilisierender Vernetzungen je nach dem Ursprung der Kollagenfasern verschieden sein müßte. So findet Siegel [22] in Sehnenkollagen einen höheren Anteil an Dihydroxylysinonorleucin (**IIIc**) als in Hautkollagen und führt dies auf eine evtl. durch D-PA veränderte Lysyloxidase-Substrat-Affinität oder auf eine Aktivierung einer spezifischen Hydroxylysyl-oxidase zurück. Begünstigend kommt hinzu, daß das bei der Verknüpfung eines Hydroxyallysins mit einem Hydroxylysinrest gebildete Dehydro-Hydro-

xylysinohydroxynorleucin (**IIIA**) stabiler wird als **IIc**, und zwar infolge einer nachfolgenden Amadori-Umlagerung [25] zum Hydroxylysin-5-keto-norleucin (**IIIB**).

Offenbar deshalb gelingt es diesen Querbindungs-typ analytisch zu erfassen, während z.B. die Schiff'sche Base aus **II** erst nach vorausgegangener Überführung in die stabilere Form durch Reduktion mit  $\text{Na} \cdot \text{BH}_4$

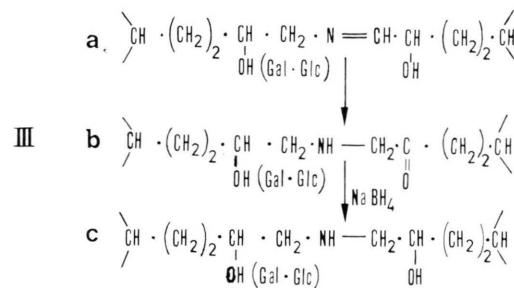


zugänglich wird [26].

Da nun weiterhin die Initialreaktion der Thiazolidin-Ringbildung (**I**), ähnlich wie bei **II** über eine Schiff'sche Base (**Ie**), mit anschließender nukleophiler Addition der SH-Gruppe, abläuft, sollte die Priorität von **Id** oder **II** allein von der Stabilität der jeweiligen Schiff'schen Base abhängen. Nun wird die Schiff'sche Base nach **I** durch den Thiazolidinring stabilisiert, weshalb mit Siegel [22] angenommen werden kann, daß eine Blockierung der Allysinreste gemäß **I** Priorität hat. Somit ist zu erwarten, daß der Einfluß von D-PA dort am größten sein dürfte, wo der Gehalt des Kollagens an Hydroxylysin und somit die Voraussetzungen für Vernetzungen gemäß **III** am geringsten sind. Darüber hinaus dürfte die Anwesenheit von Thiazolidinderivaten auch nach Absetzen von D-PA eine dichte Packung der Kollagenhauptketten innerhalb dieser Bereiche erschweren und hierdurch evtl. auch die Biosynthese allerdings noch umstrittener polyfunktioneller Querbrücken [27] stören. Eine Hemmung der Lysyloxidase soll hingegen erst nach Verabreichung höherer Dosen (>100 mg D-PA/die) [28] resultieren. So gesehen erscheint es verständlich, daß Hautkollagen wegen seines höheren Anteils an Typ-III-Kollagen verbunden mit einem niedrigen Hydroxylysingehalt (Tab. I) von D-PA stärker

Tab. I. Gegenüberstellung der Hydroxylysin/Lysingehalte einzelner Kollagentypen. S: Sehnen; K: Knochen.

Reste/1000	Typ IS	Typ IK	Typ II	Typ III
Hylys/Lys	9/26	19/18	14/22	6/30



beeinflußt wird als Sehnenkollagen. In guter Übereinstimmung hiermit steht auch die Beobachtung, daß Knochen- und Knorpelkollagene von vergleichbaren D-PA-Dosen nicht beeinflußt werden, im

Unterschied zu dem auf einer durch  $\beta$ -Aminopropionitril irreversiblen Inhibierung der Lysyloxidase [29, 30] beruhenden Osteolathyrismus.

Während nun das mechanische Verhalten der Kollagenfasern durch D-PA beeinflußt wird, blieb die Thermostabilität isolierter Sehnenfasern innerhalb der Meßgenauigkeit unverändert. Die Schrumpfungstemperatur ( $T_s$ ) der Fasern änderte sich allerdings sowohl bei den Versuchs- als auch den Kontrolltieren in Abhängigkeit vom Alter. Daraus geht hervor, daß der die Thermostabilität mitbestimmende altersbedingte Vernetzungsanstieg offenbar von durch D-PA nicht beeinflußbaren Querbrücken getragen wird. Es ist naheliegend für diesen Vernetzungsanstieg, Querbrücken zwischen Hydroxyalysin und Hydroxylsinsresten gemäß III verantwortlich zu machen, da sie durch D-PA nicht inhibiert werden und zudem relativ thermostabil sind. An Hautkollagen fand Nimni [8] nach 45-stündiger D-PA-Applikation (90 mg/die) auffälligerweise keine Hitzeschrumpfung, und zwar auch nicht bei Erwärmung auf 15 °C oberhalb der Kontroll- $T_s$ . Allerdings wurden diese Befunde nicht durch Messen der  $T_s$ , sondern der Kontraktionsspannung vorbelasteter Hautstreifen erzielt. Nimni deutet das Ausbleiben einer thermischen Kontraktion als Folge des Fehlens bzw. Verlustes sämtlicher intermolekulare Querverbindungen. Entsprechend soll nach Vernetzung der Hautstreifen mit  $10^{-1} - 10^{-3}$  M Glutaraldehydlösung das Schrumpfungsverhalten wiederhergestellt sein. Theoretischen Überlegungen zur Folge könnten intermolekular unvernetzte Polypeptidketten wegen ihrer freien Beweglichkeit bei Erwärmung eine Entdrillung durchaus auch ohne Beeinflussung der Quartärstruktur, d. h. Faserlänge erfahren. Somit sollte die von Nimni an Hautstreifen D-PA-behandelter Tiere gemessene Zugfestigkeit allein durch zwischenmolekulare Nebenvalenzkräfte getragen worden sein.

Die bei der Registrierung der Kontraktionsspannung auftretende Erschlaffung der längere Zeit auf eine bestimmte Temperatur gebrachten Kollagenfasern führte Verzár [31] ebenfalls auf eine Zerstörung intermolekularer Bindungen zurück. Allerdings wurden damals für die Stabilisierung der Fasern noch Esterbrücken angenommen.

Anders als bei der Schrumpfungstemperatur-Bestimmung läßt der der Abb. 9 zugrunde liegende neuartige Versuch, den gesamten  $\sigma$ - $\epsilon$ -Kurvenverlauf thermisch belasteter Fasern einer Auswertung zu-

gänglich zu machen, einen Unterschied zwischen Fasern von Kontroll- und D-PA-Tieren erkennen. Und zwar dürfte der Ausfall des dem  $E_1$ -Modul zugeschreibenden Kurvenabschnittes darauf hinweisen, daß, wie vermutet, innerhalb dieses Bereiches die Blockierung quervernetzender Schiff'scher Basen durch D-PA stattgefunden hat. Interessanterweise hatte aber ihr Fehlen keinen meßbaren Einfluß auf die  $T_s$ . Somit müssen verborgene zwischenmolekulare Nebenvalenzkräfte diesen Ausfall an mechanisch unbelasteten Fasern kompensiert haben. So konnte auch an dermatosparaktischem Kollagen gezeigt werden, daß mit Ansteigen stabilisierender Nebenvalenzkräfte die Thermostabilität mechanisch unbelasteter Fasern zunimmt [32].

Die durchgeführten licht- und elektronenmikroskopischen Untersuchungen an Gewebsproben aus Leber, Niere, Milz, Herz, Aorta und Nebenniere haben keinen Hinweis dafür erbracht, daß sich unter der D-PA-Einwirkung innerhalb der angegebenen Versuchszeiten morphologisch faßbare Veränderungen abspielen. Einschränkend muß allerdings geltend gemacht werden, daß keine morphometrischen Parameter an Mitochondrien und Peroxisomen, wie z. B. von Riede *et al.* [33] ermittelt wurden. Auch konnten in keinem Fall in den Hepatocyten Riesenmitochondrien beobachtet werden, wie sie von Tandler und Hoppel [34] nach tierexperimenteller Verabreichung des Kupferhelatbildners Cuprizon (bis-Cyclohexanon-oxaldehydrazon) beschrieben wurden. Allerdings traten diese Mitochondrien auch nach gleichzeitiger Verabreichung von Kupfersulfat auf, weshalb vermutet wurde, daß die Auswirkungen von Cuprizon auf subzellulärer Ebene nicht allein durch eine Kupferverarmung ausgelöst sein dürften.

Die bis zur 6. Versuchwoche vorübergehend auftretenden Veränderungen, vor allem in der Leber, scheinen dafür zu sprechen, daß mit Beginn des Kupferentzugs Stoffwechselstörungen einhergehen, die jedoch mit der Zeit ausgeglichen werden. Lediglich die Kollagenfibrillen einzelner Organe erscheinen auch noch nach einem Jahr Versuchsdauer häufiger aufgelockert als in den entsprechenden Kontrollgeweben im Sinne einer lang anhaltenden Blockierung funktioneller Gruppen gemäß I. Die Vermutung, daß u. U. morphologisch faßbare Abweichungen in den Gefäßwänden vorliegen könnten, hat sich nicht bestätigt. Andererseits ist aber bekannt, daß als Folge einer Kupfermangeldiät z. B.

an Schweinen eine Prädisposition zu Gefäßrupturen beobachtet wurde [35, 36].

Abschließend bleibt hervorzuheben, daß auch die vorliegenden Befunde eine hohe Spezifität von D-PA für Kupferionen unterstreichen, gleichzeitig aber auch eine vergleichbar hohe Affinität zu Kobaltionen erkennen lassen. Es erscheint daher wichtig, auf mögliche Konsequenzen, insbesondere im Zu-

sammenhang mit dem Vitamin B<sub>12</sub>-Stoffwechsel, zu verweisen.

Für ihre Mitarbeit danken wir Frau B. Lassen und U. Wald sowie Herrn A. Bindl und Herrn H. Eskerski.

Mit Unterstützung der Deutschen Forschungsgemeinschaft. Schwerpunktprogramm: Biopolymere und Biomechanik von Bindegewebs-Systemen.

- [1] H. T. Clarke, J. R. Johnson u. R. Robinson: The Chemistry of Penicillin. Princeton 1949, 455.
- [2] J. M. Walshe, Lancet I, 25–26 (1956).
- [3] M. E. Nimni, Biochim. Biophys. Acta **111**, 576–579 (1965).
- [4] M. E. Nimni u. L. A. Bavetta, Science **150**, 905–907 (1965).
- [5] M. Chvapil, J. Hurich u. E. Ehrlichová, Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. **349**, 218–222 (1968).
- [6] K. Deshmukh u. M. E. Nimni, J. Biol. Chem. **244**, 1787–1795 (1969).
- [7] P. Bornstein, Amer. J. Med. **49**, 429–435 (1970).
- [8] M. E. Nimni, J. Biol. Chem. **243**, 1457–1466 (1968).
- [9] H. G. Vogel, Arzneim. Forsch. (Drug Res.) **24**, 157–163 (1974).
- [10] R. Fricke, H. Hesse, A. Prange u. V. Prange (in Vorbereitung).
- [11] R. Bowitz, H. Nemetschek-Gansler, Th. Nemetschek u. O. Schiller, Naturwissenschaften **62**, 493 (1975).
- [12] H. Riedl u. Th. Nemetschek, Sitzungsber. Heidelberg. Akad. Wiss. Math.-Naturw. Klasse, 5. Abhandl. 209–248 (1977).
- [13] H. Wesch, J. Zimmerer u. J. Schuhmacher, Int. J. Appl. Radiat. **21**, 431–439 (1970).
- [14] R. Bowitz, G-I-T Fachz. Lab. **19**, 1085–1087 (1975).
- [15] Th. Nemetschek, A. Meinel, H. Nemetschek-Gansler, P. Reill u. H. Riedl, Virchows Arch. A. Path. Anat. Histol. **372**, 57–74 (1976).
- [16] W. G. Klingberg, A. S. Prasad u. D. Oberleas: Zinc deficiency following penicillamin therapy. Trace elements in human health and disease. Vol. I (ed. A. S. Prasad). Academic Press, New York 1976.
- [17] J. T. McCall, N. P. Goldstein, R. V. Randall u. J. B. Gross, Amer. J. Med. Sci. **254**, 35–45 (1967).
- [18] J. M. Walshe, Quart. J. of Medicine, New Series **XLI**, 411–452 (1973).
- [19] J. B. Haselring, C. A. Owen jr. u. E. Ackermann, Amer. J. Physiol. **211**, 1075–1081 (1966).
- [20] C. A. Owen jr., Amer. J. Physiol. **221**, 1722–1727 (1971).
- [21] H. Wesch, J. Zimmerer, K. Wayss u. M. Volm, Z. Krebsforsch. **79**, 19–30 (1973).
- [22] R. C. Siegel, J. Biol. Chem. **252**, 254–259 (1977).
- [23] E. J. Underwood, Trace Elements in Human and Animal Nutrition, Academic Press, New York 1971.
- [24] Th. Nemetschek, R. Bowitz u. H. Nemetschek-Gansler, Verh. dtsch. Ges. Path. **59**, 34–43 (1975).
- [25] E. J. Miller u. P. B. Robertson, Biochem. Biophys. Res. Commun. **54**, 432–439 (1973).
- [26] A. J. Bailey, S. P. Robins u. G. Balian, Nature **251**, 105–109 (1974).
- [27] S. P. Robins u. A. J. Bailey, Biochem. J. **163**, 339–346 (1977).
- [28] M. E. Nimni, K. Deshmukh u. N. Gerth, Nature **240**, 220 (1972).
- [29] C. Levene u. J. Gross, J. Exp. Med. **110**, 771–789 (1959).
- [30] R. C. Siegel, S. R. Pinnell u. G. R. Martin, Biochemistry **9**, 4486–4491 (1970).
- [31] F. Verzár, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. **335**, 38–52 (1963).
- [32] R. Jonak, Ch. M. Lapière, A. Meinel, H. Nemetschek-Gansler, Th. Nemetschek u. H. Riedl, Z. Naturforsch. **32c**, 743–747 (1977).
- [33] U. N. Riede, M. Roth, J. J. Molnar, L. Bianchi u. H. P. Rohr, Experientia **27**, 794–797 (1971).
- [34] B. Tandler u. C. L. Hoppel, Beitr. Path. **156**, 56–64 (1975).
- [35] W. H. Carnes, G. S. Shields, G. E. Cartwright u. M. Wintrobe, Fed. Proc. **20**, 118–130 (1961).
- [36] G. S. Shields, W. H. Carnes, G. E. Cartwright u. M. M. Wintrobe, Clin. Res. **9**, 62 (1961).