

BEITRÄGE ZUR ENTSTEHUNG VON EIWEISSTROPFEN ENTHALTENDEN VAKUOLEN DER LEBERZELLEN

A. HARASZTI und B. DOLHAY

(Eingegangen am 21. Dezember 1961)

Die bei den Zirkulationsstörungen entstehenden Veränderungen der Leber sind lange bekannt. Die Wirkung der Hypoxie hat BÜCHNER [4] und seine Schule in der Niederdruckkammer eingehend untersucht. BÜCHNER [4], ALTMANN [1] und PICHOTKA [16] sind der Ansicht, daß die Eiweißtropfen enthaltenden Vakuolen die am meisten charakteristischen hypoxischen Veränderungen der Leber sind. Da der Ursprung der Eiweißtropfen bestritten ist, untersuchten wir die Entstehung der Vakuolen mit Eiweißtropfen bei Stagnationshypoxie.

Material und Methode

In den Untersuchungen wurden 94 weiße Ratten von 120–180 g Gewicht verwendet. Die Tiere wurden in vier Gruppen geteilt.

In der ersten Gruppe wurde bei 40 Tieren ein Zweig der Vena hepatica vor ihrer Einmündung in die Vena cava inferior abgeklemmt und je vier Tiere 10, 20 und 30 Minuten bzw. 1, 2, 3, 4, 8, 12 und 24 Stunden nachher getötet.

In der zweiten Gruppe wurde 28 Tieren, unmittelbar nach dem Abklemmen der Vena hepatica, in die Vena femoralis 2 ml 1,25%ige Evansblaulösung injiziert. Die Tiere wurden nach 10, 20, 30, 40, 50 und 60 Minuten getötet.

In der dritten Gruppe erhielten 10 Tiere Evansblau in die Vena femoralis, dann wurde die eine Vena hepatica abgeklemmt und 10, 20, 30, 40 und 60 Minuten nachher wurden je zwei Ratten getötet.

In der vierten Gruppe wurde bei 16 Tieren die Vena hepatica abgeklemmt und sofort danach Evansblau in die Vena femoralis gespritzt. Nach einer Stunde wurde die Klemme abgenommen und 10, 20, 30, 40, 50 und 60 Minuten, bzw. 2 und 4 Stunden später wurden je 2 Tiere getötet.

Das Abklemmen der Vena hepatica ist eine ziemlich schwerfällige Methode und bei den Vorversuchen kam es öfters vor, daß die Wand der Vene verletzt wurde und das Tier verblutete, in anderen Fällen dagegen fiel die Klemme ab. Nach entsprechender Übung hat sich aber die Methode als brauchbar erwiesen.

Die Lebern wurden in 10%igem neutralen Formol fixiert, mit Hämatoxylin-Eosin, Endesschem Trichrom, Safranin und PAS gefärbt.

Ergebnisse

I. Gruppe. In der Leber der Tiere die 10 Minuten nach dem Abklemmen getötet wurden, sind in dem Zytoplasma der Parenchymzellen herdförmig winzige Fettvakuolen zu sehen. In einem Tier sind auch großtröpfige Fett-

vakuolen zu finden. Nur in einer Ratte zeigen sich einige Vakuolen mit Eiweißtropfen. Die Sinusoide enthalten rote Blutkörperchen, die Venae centrales stellenweise sich mit Trichrom blaßblau anfärbendes Serum.

Nach 30 Minuten erscheinen neben den kleinen Fettvakuolen, hauptsächlich in der intermediären Zone, in kleinerem Maße zentral, Vakuolen mit Eiweißtropfen in größerer Anzahl. Stellenweise sind in den mit Erythrozyten gefüllten Sinusoiden Fibrinfäden zu sehen.

Nach 1—4 Stunden sind bereits Einzelzellnekrosen zu finden. Der Kern dieser Zellen ist geschrumpft, färbt sich hyperchrom, das Zytoplasma ist homogen, eosinophil. Hauptsächlich an dem intermediären Teil des Lappchens sind Vakuolen mit Eiweißtropfen in großer Anzahl zu finden (Abb. 1). Die Tropfen färben sich mit Trichrom im allgemeinen blaßblau an, es kommen aber darunter immer mehr Tropfen vor, die sich lila, fibrinartig färben. Der Rand der lila Tropfen ist oft blaßblau und der ganze Tropfen ist von einem hellen Hof umgeben. In dem Inneren einzelner blaßblauer Tropfen, zentral oder exzentrisch, sind immer mehr kleine lila Kügelchen zu sehen (Abb. 2). An einigen Stellen bildet sich zwischen dem lilafarbenen Tropfen und dem blaßblauen Rand gewissermaßen eine Übergangsfarbe. Gegenüber der PAS-Negativität der blaßblauen Tropfen färben sich die lila Tropfen PASpositiv (Abb. 3). Es sind auch groß- und kleintröpfige Fettvakuolen zu finden. Die Sinusoide sind hauptsächlich in der intermediären Zone mit Erythrozyten gefüllt, enthalten stellenweise auch Fibrinfäden.

Nach 8 Stunden sind die Nekrosen intermediär, zentral oder sektorförmig verbreitet und fließen stellenweise zusammen. Im allgemeinen beginnen sie in einer Entfernung von einigen Zellen von der Vena centralis. Die nekrotischen Zellen sind nicht mehr polygonal, sondern abgerundet, ihr Kern löst sich auf, ihr Zytoplasma ist homogen, eosinophil, ihre Grenzen sind verwaschen. In einzelnen zentralen nekrotischen Herden sind auch Erythrozytenanhäufungen, sog. Blutseen, wahrzunehmen. Am ausgeprägtesten sind die Vakuolen mit Eiweißtropfen in der Nachbarschaft der abgestorbenen Zellen (Abb. 4), und die lila Tropfen befinden sich hauptsächlich in den geschädigten Teilen. In den erweiterten Sinusoiden sind hie und da Fibrinfäden nachzuweisen. Zeitweise färbt sich auch der Inhalt der Vena centralis lilafarben an. In einigen nekrotischen Herden sind Leukozytenanhäufungen zu sehen.

Nach 12 Stunden sind die Veränderungen mehr ausgedehnt, die nekrotischen Herde fließen zusammen.

II. Gruppe. Das Bild gleicht dem der I. Gruppe. Nach 10 Minuten erscheinen an dem intermediären Teil des Leberlappchens, oft in dem Zytoplasma der Leberzellen, die entlang der mit Erythrozyten gefüllten Sinusoide liegen, einige Vakuolen mit kleinen Fett- bzw. Eiweißtropfen.

In den mit Safranin gefärbten Schnitten sind die Eiweißtropfen blaßblau, als Zeichen dafür, daß ihr Inhalt aus dem mit Evansblau gefärbten Blutplasma

herstammt. Die Kupfferschen Zellen sind gequollen und enthalten hie und da eine sich blaßblau färbende Substanz. Auch die Zentralvene ist mit blaßblauem Plasma ausgefüllt. Das Zytoplasma einiger nekrobiotischer Zellen ist homogen blaßblau imbibiert, der lebhaft rote Zellkern ist geschrumpft.

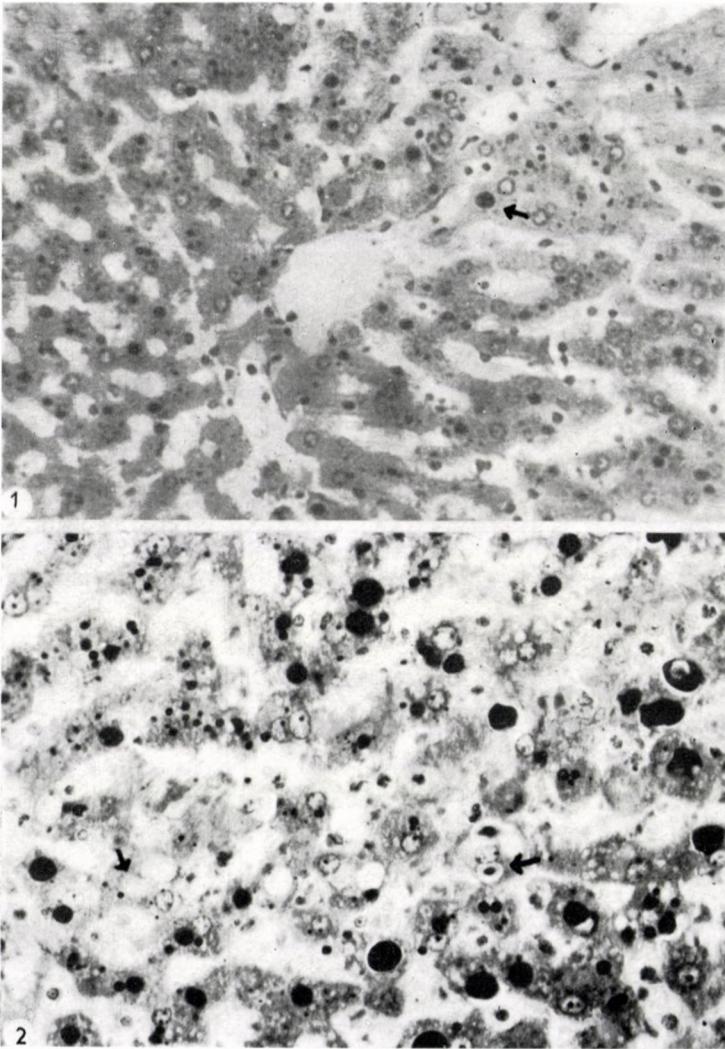


Abb. 1. 2 Stunden nach Abklemmen der Vena hepatica getötetes Tier. In der zentral-intermediären Zone der Leberläppchen im Zytoplasma der Leberzellen Vakuolen mit PASpositiven Eiweißtropfen (→) PAS, 280 ×

Abb. 2. 1 Stunde nach Abklemmen der Vena hepatica getötetes Tier. Im Zytoplasma der Leberzellen sich lila (im Bilde schwarz) und blaßblau färbende Eiweißtropfen verschiedener Größe (→). Im Inneren einzelner blaßblauer Tropfen sind auch sich dunkellila färbende Kügelchen wahrzunehmen (→). Endessches-Trichrom, 400 ×

Nach 30 Minuten sind die Vakuolen mit Eiweißtropfen viel zahlreicher, und es sind schon sich mit Trichrom lila färbende, PASpositive Tropfen zu finden. In den späteren Zeitpunkten sind die Veränderungen ausgedehnter.

III. Gruppe. Hier sind die Vakuolen mit Eiweißtropfen hauptsächlich am intermediären Teil des Leberläppchens zu beobachten. In den mit Safranin

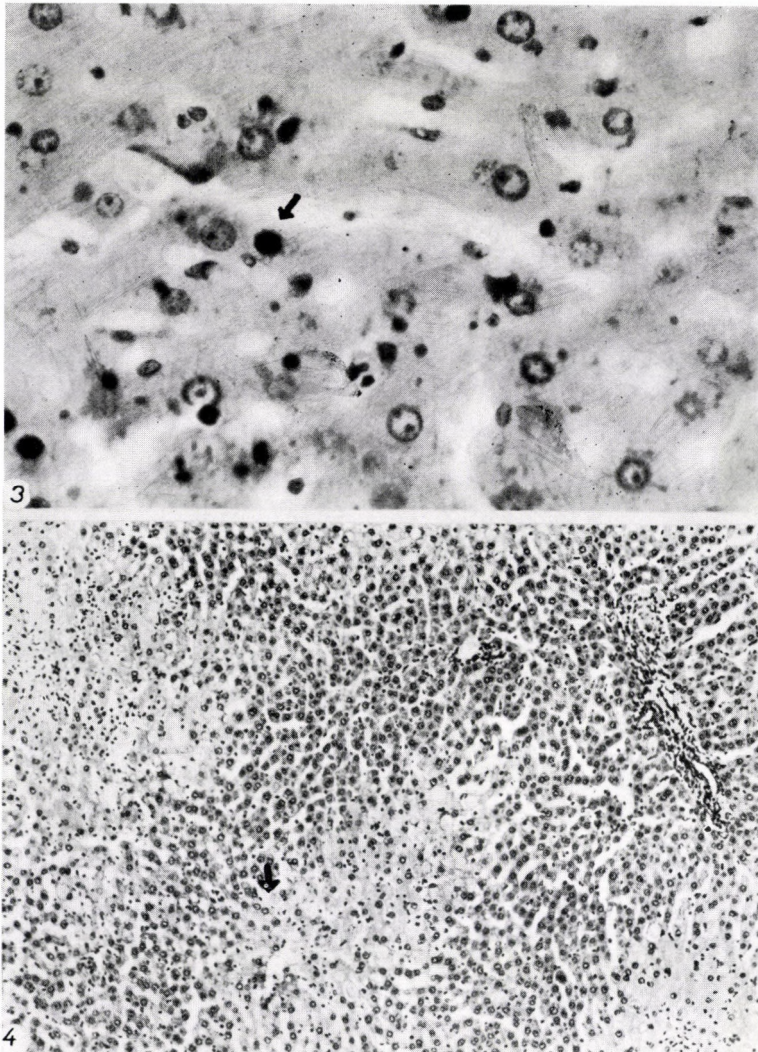


Abb. 3. 1 Stunde nach Abklemmen der Vena hepatica getötetes Tier. Im Zytoplasma der Leberzellen PASpositive Vakuolen mit Eiweißtropfen. PAS, 400 \times

Abb. 4. Vakuolen mit Eiweißtropfen entlang nekrotischer Herden. 8 Stunden nach Abklemmen der Vena hepatica getötete Ratte. H. E., 120 \times

gefärbten Schnitten ist der Inhalt der Tropfen genau so blaßblau, wie das Blutplasma.

IV. Gruppe. Die Veränderungen sind die gleichen wie nach einstündigem Abklemmen.

Diskussion

In Zusammenhang mit den Eiweißtropfen enthaltenden Vakuolen warten zahlreiche Fragen auf eine Klärung: Woher stammt der Eiweißgehalt der Vakuolen, welche Faktoren bringen die Veränderung zustande, was ist das Schicksal der Eiweißtropfen usw.?

Nach BÜCHNER [4] stammen die Eiweißtropfen aus dem Zytoplasma der Leberzellen. Laut TÖRÖ [23] sollen die von ihm beschriebenen »Wasservakuolen« auch aus dem Zytoplasma der Leberzellen herkommen. Nach ALTMANN [1] und anderen Verfassern dagegen stammen die Eiweißtropfen aus dem zirkulierenden Blutplasma. Die in den Vakuolen vorkommenden Einschlusskörperchen hält MALLORY [13] für Fibrin, APITZ [2] für Koazervate. Die Koazervation käme so zustande, daß das lebende Zytoplasma aus den Vakuolen Wasser entzieht. RÖSSLE [19] faßt die Vakuolisierung als eine vitale Reaktion auf; seiner Meinung nach werden von der Zelle die hineingelangten schädlichen Substanzen auf diese Weise entfernt. LEPESCHKIN [12] betrachtet die Vakuolisierung als Begleiterscheinung des Zelltodes; nach ALTMANN [1] hingegen deutet sie auf keine irreversible Zellschädigung.

Über das Entstehen und das Schicksal der Vakuolen geben die mit dem Fluoreszenzmikroskop durchgeführten Untersuchungen wertvolle Aufklärung. HANZON [8] hat mit dieser Methode nicht nur das Erscheinen der Vakuolen, sondern auch ihr Verschwinden beobachtet. Der Inhalt der Vakuolen wird später durch die Galle ausgeschieden; diese sogenannte Albuminoholie wurde von FRANKE und SYLLA [6] fluoreszenzmikroskopisch beobachtet. REESE [18] bewies mittels Natriumfluorescein, daß eine geringfügige Hypoxie die sekretorische Funktion der lobulozentralen Zellen vermindert, während eine schwere Hypoxie sie ganz aufhebt. Diese Zellen sind mit fluoreszierenden Tropfen enthaltenden Zellen umgeben.

Die vakuolige Umwandlung der Leberzellen betrachten MARTIN und Mitarbeiter [14] als eine Folge der Hypoxie. BÜCHNER [4] stellte das pathogenetische Prinzip der Hypoxydose auf, demzufolge die Hemmung der oxydativen Prozesse zu der Entwicklung der Schädigungen führt. Bei dem Entstehen der Vakuolen können auch andere Faktoren eine Rolle spielen. KETTLER [10] betont die Bedeutung der Erhöhung der Kapillarpermeabilität, TROWELL [24] mutet der Erhöhung des kapillaren Druckes, SHERLOCK [21] dem sog. VDM eine wichtige Rolle zu. Nach SIEGMUND [22] lassen sich die Veränderungen der

Parenchymzellen auf eine »neurozirkulatorische Dystrophie« zurückführen. Nach CAMERON und KARUNARATNE [5] und KETTLER [11] wird die Bedeutung der häufig beobachteten intermediären kapillären Erweiterungen auch durch die Vakuolen mit Eiweißtropfen und den sektorartigen Nekrosen unterstützt. SENEVIRATNE [20] konnte die infolge sympathischer Erregung zustandekommende Vasokonstriktion durch Ergotamintartarat hemmen. Auch die gequollenen Leberzellen können eine Zirkulationsstörung verursachen, indem sie die zwischen ihnen verlaufenden Kapillaren zusammendrücken. Nach BOLCK [3] sollen die Veränderungen angesichts der engen Verbindung der Hepatonelemente mit der gemeinsamen Rolle des Parenchyms und der Sinusoide erklärt werden.

Auf die Wichtigkeit der Eiweißtropfen enthaltenden Vakuolen deutet ihr häufiges Vorkommen im Sektionsmaterial hin. Nach KETTLER [11] kommt die Veränderung in 30% im menschlichen Sektionsmaterial vor. HAMBACH und Mitarbeiter [7] beobachteten Lebervakuolen im Sektionsmaterial bei verschiedenen Formen der Hypoxie. Nach HARASZTI und ENDES [9] sind für die Leber der an sekundärem Schock und akuter Herzinsuffizienz Gestorbenen nicht die Vakuolen das bezeichnendste, was sie damit erklären, daß ihre Fälle nach protrahierter Hypoxie zur Sektion kamen. KETTLER [11] konnte auch beobachten, daß die Vakuolen im Laufe der experimentellen Hypoxie schon nach 10 Minuten erscheinen. Nach POST und Mitarbeiter [17] erfolgt eine Rückbildung von diesen Leberschädigungen am schnellsten bei sich im Wachstum befindenden Tieren.

Wir haben durch Abklemmen der Vena hepatica stagnierende Hypoxie in der Leber hervorgerufen. Die Eiweißtropfen erschienen bereits nach 10 Minuten, vorwiegend in der intermediären Zone der Leberläppchen der mit Blutkörperchen gefüllten Sinusoide entlang, was neben der Hypoxie und der erhöhten Belastung der Leberzellen auf die Rolle des Zirkulationsfaktors hinweist.

Die blaue Färbung der Eiweißtropfen in mit Safranin gefärbten Schnitten von Tieren, die Evansblau bekommen haben, spricht dafür, daß die Substanz der Eiweißtropfen aus dem Blutplasma herkommt. Dieses bläulich gefärbte Blutplasma gelangt in die Leberzellen, unabhängig davon, ob das Evansblau vor oder erst nach dem Abklemmen der Vena hepatica verabreicht wurde. In den Inneren der blaßblauen, Evansblau enthaltenden, also sich mit dem Blutplasma gleich anfärbenden Eiweißtropfen, sondern sich hie und da Kügelchen ab, die sich mit Endesschem Trichrom lila, fibrinartig anfärben. (Durch Trichrom färben sich Fibrin und die fibrinoiden Substanzen dunkellila an.) Diese Kügelchen, die auch PAPPENHEIMER und HAWTHORNE [15] beobachtet hatten, können auf zweierlei Arten entstehen: 1. entweder verdickt sich der Inhalt der Eiweißtropfen, oder 2. es treten durch die Wände der Sinusoide, im Falle einer starken Erhöhung der Kapillarpermeabilität, Eiweißkörper

hinüber. Für die erste Möglichkeit spricht der Umstand, daß das Absondern der Kügelchen nicht am Rande der Tröpfchen, also in der Nähe der Sinusoidwand, sondern im Inneren der Tropfen zustandekommt. Es ist möglich, daß diese Kügelchen das Anfangsstadium der Fibrin enthaltenden Vakuolen sind. Die Bedeutung der kapillären Permeabilitätserhöhung wird dadurch unterstützt, daß in der Nachbarschaft der schwer geschädigten nekrotischen Zonen häufig sich ganz lila, also fibrinartig färbende Eiweißtropfen gefunden werden. Die lila Tropfen oder Kügelchen entsprechen also Fibrin, oder einem eingedickten Eiweiß, das eine fibrinartige Färbung ergibt.

Obwohl die Vakuolisierung als ein reversibler Vorgang angesehen wird, genügt zu ihrer Rückbildung in unseren Versuchen 4 Stunden nicht. Dieser Umstand deutet auf die Schwere der Schädigung hin.

Zusammenfassung

1. Vakuolen mit Eiweißtropfen kommen bei Stagnationshypoxie schon nach 10 Minuten zustande; für ihr Verschwinden genügen 4 Stunden nicht.

2. Nach Verabreichung von Evansblau erscheinen in den Leberzellen blaßblau gefärbte Eiweißtropfen, als Zeichen dafür, daß sie aus dem Blutplasma stammen. Diese Erscheinung ist unabhängig davon, ob das Evansblau vor oder nach dem Abklemmen der Vena hepatica verabreicht wurde.

3. Im Falle einer schweren Schädigung erscheinen in den Leberzellen häufig sich fibrinartig färbende und eine PASpositive Reaktion ergebende Tropfen.

4. Die Eiweißtropfen enthaltenden Vakuolen entstehen hauptsächlich in dem intermediären Teil der Leberläppchen, in den Leberzellen, die neben mit Blutkörperchen gefüllten Sinusoiden liegen, was neben der Hypoxie und der erhöhten Belastung der Leberzellen auf die Bedeutung des Zirkulationsfaktors hinweist.

LITERATUR

1. ALTMANN, H. W. (1949): Über Leberveränderungen bei allgemeinem Sauerstoffmangel nach Unterdruckexperimenten an Katzen. *Frankfurt. Z. Path.* **60**, 376. — 2. APITZ, K.: zit. bei Altmann. — 3. BOLCK, F. (1955): Leber. In Büchner, F., Letterer, E., Roulet, F.: *Handbuch der allgemeinen Pathologie*. Springer, Berlin. Bd. III/2, S. 219. — 4. BÜCHNER, F. (1957): Die Pathologie der zellulären und geweblichen Oxydationen. Die Hypoxydosen. In Büchner, F., Letterer, E., Roulet, F.: *Handbuch der allgemeinen Pathologie*. Springer, Berlin. Bd. IV/2, S. 569. — 5. CAMERON, G. R., KARUNARATNE, W. A. E. (1936): Carbon Tetrachloride Cirrhosis in Relation to Liver Regeneration. *J. Path. Bact.* **42**, 1. — 6. FRANKE, K., SYLLA, A. (1933): Mikroskopische Lebendbeobachtungen innerer Organe. *Z. ges. exp. Med.* **39**, 141. — 7. HAMBACH, R., STUDENY, J., KHUN, K. (1960): Über das Vorkommen der hydropischen Leberzellendystrophie im auswahllosen Sektionsgut. *Zbl. allg. Path. path. Anat.* **101**, 355. — 8. HANZON, V. (1952): Liver Cell Secretion under Normal and Pathologic Conditions Studied by Fluorescence Microscopy on Living Rats. *Acta physiol. scand.* **28**, Suppl. 101. — 9. HARASZTI A., ENDES, P. (1960): Hepatic Lesions in Secondary Shock and Acute Cardiac Failure. *Acta morph. Acad. Sci. hung.* **9**, 343. — 10. KETTLER, L. H. (1957): In E. Kaufmann—M. Staemmler: *Lehrbuch der speziellen pathologischen Anatomie*. de Gruyter, Berlin. — 11. KETTLER, L. H. (1948): Über die vakuolige Degeneration der Leberzellen. *Virchows Arch. path. Anat.* **315**, 587. — 12. LEPESCHKIN, W. W.: zit. bei Altmann. — 13. MALLORY, F. B. (1901): Necroses of the Liver. *J. med. Res.* **6**, 264. — 14. MARTIN, H. G., LOEVENHART, A. S., BUNTING, C. H.: (1918): The Morphological Changes in the Tissues of the Rabbit as a Result of Reduced Oxidation. *J. exp. Med.* **27**, 399. — 15. PAPPENHEIMER, A. M., HAWTHORNE, J. J. (1936): Certain Cytoplasmic Inclusions of Liver Cells. *Amer. J. Path.* **12**, 625. — 16. PICHOTKA, J. (1942): Tierexperimentelle Untersuchungen zur pathologischen Histologie des akuten Höhentodes.

Beitr. path. Anat. **107**, 117. — 17. Post, J., Klein, A., Hoffmann, J. (1960): Responses of the Liver to Injury. Arch. Path. **70**, 314. — 18. Reese, A. J. M. (1960): The Effect of Hypoxia on Liver Secretion Studied by Intravital Fluorescence Microscopy. Brit. J. exp. Path. **41**, 527. — 19. Rössle, R. (1930): In Henke, F., Lubarsch, O.: Handbuch der speziellen pathologischen Anatomie und Histologie. Springer, Berlin. Bd. V/1, S. 243. — 20. SENEVIRATNE, R. D. (1949): Physiological and Pathological Responses in the Blood-vessels of the Liver. Quart. J. exp. Physiol. **35**, 77. — 21. SHERLOCK, S. (1951): The Liver in Heart Failure, Relation of Anatomical, Functional and Circulatory Changes. Brit. Heart J. **13**, 273. — 22. SIEGMUND, H. (1952): Allgemeine Pathologie der Leberparenchymveränderungen unter besonderer Berücksichtigung zirkulatorischer und nutritiver Faktoren. Dtsch. Z. Verdau. u. Stoffwechselkr., Sonderbd. **31**. — 23. TÖRÖ, I. (1951): Die Entstehung von Wasservakuolen in Leberzellen. Acta morph. Acad. Sci. hung. **1**, 313. — 24. TROWELL, O. A. (1943): Liver Vacuoles and Anoxaemia. Nature (London) **151**, 730.

ON THE GENESIS OF PROTEIN-FILLED VACUOLES IN LIVER CELLS

A. HARASZTI and B. DOLHAY

(1) In stagnation hypoxia vacuoles filled with droplets of protein appear as early as 10 minutes; their disappearance takes more than 4 hours.

(2) Parenteral administration of Evans blue is followed by the appearance of pale blue droplets of protein in the liver cells, a phenomenon indicative of the protein's plasmatic origin. The blue droplets appear whether the stain is introduced before or after the ligation of the hepatic vein.

(3) Droplets which stain like fibrin and give a positive periodic acid Schiff reaction occur frequently in the liver cells in cases of grave hepatic damage.

(4) It is chiefly in the intermediary part of the lobules, in the hepatic cells next to the congested sinusoids, that protein vacuoles arise, a phenomenon pointing to the significance of the circulation, another factor beside hypoxia and the increased strain of the hepatic cells.

ДААННЫЕ К ВОЗНИКНОВЕНИЮ В ПЕЧЕНОЧНЫХ КЛЕТКАХ ВАКУОЛЕЙ С БЕЛКОВЫМИ КАПЕЛЬКАМИ

A. ХАРАСТИ и Б. ДОЛХАИ

1. Вакуоли с белковыми капельками возникают при застойной гипоксии уже в течение 10 мин, и для их исчезновения недостаточной 4 часа.

2. После введения красителя «ивенсблау» в организм животных, в печеночных клетках появляются окрашенные в ультрамариновый цвет белковые капли, в знак того, что они происходят из плазмы крови. Эти ультрамариновые капли равным образом появляются при даче «ивенсблау» до или после перевязки печеночной вены.

3. В случае тяжелого расстройства, в печеночных клетках часто наблюдаются фибриноподобноокрашенные капли, дающие ПАШ-положительную (PAS-) реакцию.

4. Вакуоли с белковыми капельками образуются главным образом в промежуточной части печеночных долек, в печеночных клетках, расположенных вдоль застойных синусоидов. Это, — наряду с гипоксией и повышенной нагрузкой печеночных клеток — указывает на значение фактора кровообращения.

Dr. Antal HARASZTI, Eger, Megyei Tanács Kórháza. Ungarn

Dr. Balázs DOLHAY, Debrecen, 12. Kórbonctan. Ungarn