

## ÜBER DAS VERHALTEN DER NUCLEOLEN VON LEBERZELLEN BEI THIOAZETAMID-VERGIFTUNG\*

(Vorläufige Mitteilung)

G. KENDREY\*\*

(Eingegangen am 3. April, 1963)

Eine bedeutende Vergrößerung des Zellkerns und des Nucleolus in den Leberzellen weißer Ratten wurde von verschiedenen Verfassern im Frühstadium der chronischen Thioazetamid-Vergiftung beschrieben [13, 8, 10, 15, 5, 4, 17]. Diese Erscheinung zeigt sich am deutlichsten im Perizentralvenenraum und weniger entwickelt im Bereich des periportalen Feldes. Die Kern- und Nucleolus-Vergrößerung geht mit zytoplasmatischen Veränderungen (Verlust der scholligen zytoplasmatischen Basophilie, Verschwinden des Glykogens usw.) einher. Erwähnenswert ist, daß diese Prozesse durch ein- bis zweiwöchige tägliche Verabreichung des Stoffes in kleineren Dosen (20–30 mg/kg) hervorgerufen werden können. Höhere einmalige Dosen (z. B. 200 mg/kg) erzeugen azinozentrale Leberzellnekrosen [13, 7].

In der vorliegenden Arbeit soll über solche Kern- und Nucleolus-Veränderungen berichtet werden, die bisher unseres Wissens im Frühstadium der chronischen Thioazetamid-Zufuhr noch nicht beschrieben worden sind.

### Material und Methodik

Zum Studium von Leberzellveränderungen dienten 50 durchschnittlich 280 g schwere Wistar-Ratten männlichen Geschlechts aus der Rattenzucht des Institutes für Ernährung, Potsdam Rehbrücke. 25 Tiere erhielten innerhalb von 16 Tagen 14mal 25 mg/kg Thioazetamid in physiologischer Kochsalzlösung intraperitoneal. 25 Ratten dienten als unbehandelte Kontrolltiere. Thioazetamid ( $\text{CH}_3\text{—CS—NH}_2$ , Mol. Gew. 75,14) wurde vom VEB Berlin-Chemie, Berlin Adlershof geliefert. Während der Behandlung haben wir keine toxischen Schädigungen beobachtet, und nach dem Abschluß der Behandlung konnte eine Körpergewichtsabnahme der Versuchstiere nicht festgestellt werden. Nach der Tötung aller Tiere erfolgte die Fixierung des lebensfrischen Materials in 10%iger Formalin- und in Carnoy'scher Lösung. An den durchschnittlich 5  $\mu$  dicken Paraffin- und 10  $\mu$  dicken Gefrierschnitten wurden folgende Färbungen und histochemische Reaktionen durchgeführt: Hämalaun-Eosin, Methylgrün-Pyronin, Kresylechtviolett, Feulgen-Reaktion nach McManus—Hotchkiss, Glykogennachweis nach Best, Sudan III., Fettrot.

\* Herrn Professor Dr. med. habil. G. Holle — für die Unterstützung dieser Arbeit — gewidmet.

\*\* Zur Zeit der Untersuchungen Gastassistent am Pathologischen Institut der Karl Marx Universität, Leipzig.

## Ergebnisse

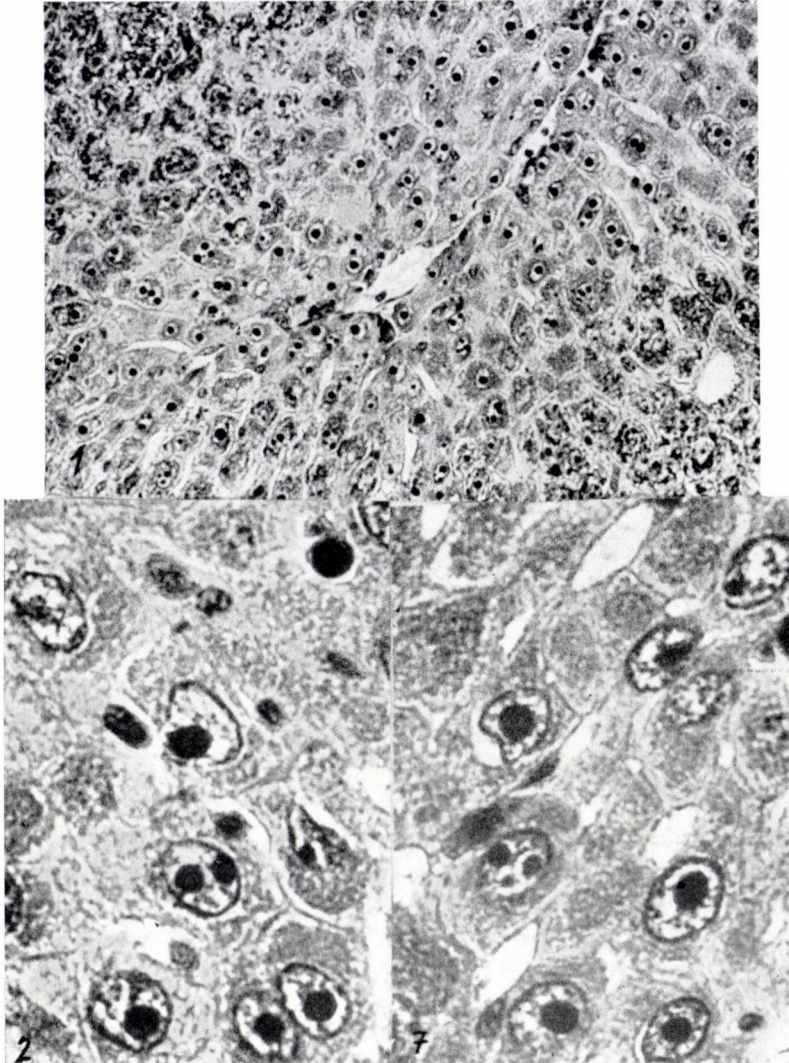
Das charakteristische Bild der Kern- und Nucleolus-Vergrößerung der um die Zentralvenen gelagerten Leberzellen ist schon bei geringerer Vergrößerung gut erkennbar. Die Kerne enthalten ein bis vier, verschieden große, intensiv gefärbte, stark pyroninophile Nucleoli (Abb. 1). Am häufigsten findet sich ein zentral gelegener Nucleolus, aber es gibt mehrere Leberzellkerne, die exzentrisch gelegene Nucleoli aufweisen. In einigen Zellen liegt der Nucleolus in unmittelbarer Nähe der Kernmembran, manchmal liegt er der Kernmembran völlig an. Anderswo hat man den Eindruck, das Kernkörperchen trete durch die Kernmembran hindurch (Abb. 2, 3). Es scheint wichtig zu erwähnen, daß im Verlauf dieser Prozesse die Kontinuität der Kernmembran nur selten unterbrochen ist (Abb. 4). Nach dem Durchtritt des Nucleolus durch die Kernmembran liegt dieser neben dem leeren Zellkern im Zytoplasma (Abb. 5). Die Nucleolusextrusion kann am deutlichsten in Methylgrün-Pyronin Präparaten verfolgt werden, in denen die starke Pyroninophilie des ausgetretenen Nucleolus gut erhalten geblieben ist. Ein seltener, aber gut erfaßbarer Befund ist das Vorhandensein ausgetretener Nucleolen außerhalb der Zelle, in unmittelbarer Nähe der Zelle, aus der die Extrusion erfolgte (Abb. 6).

Während dieser Verlagerung des Nucleolus weist die Kernmembran bestimmte Veränderungen auf. Als eine oft vorkommende Erscheinung vor dem Austritt des Nucleolus kann die Invagination der Kernmembran in Richtung auf den Nucleolus betrachtet werden (Abb. 2 und 7). Weiterhin zeigt die Kernmembran an den veränderten Leberzellen unregelmäßige Konturen und manchmal mehrfache Einziehungen.

Zusammengefaßt ist festzustellen, daß es sich an den perizentral gelagerten Leberzellen weißer Ratten im Frühstadium der chronischen Thioacetamid-Vergiftung um eigenartige Nucleus- und Nucleolusveränderungen handelt. Außer der bedeutenden Vergrößerung derselben konnte die totale Extrusion des Nucleolus aus dem Kernraum in das Zytoplasma und aus diesem in den interzellulären Raum beobachtet werden. Diese Erscheinungen gehen mit gewissen Kernmembran-Alterationen, mit »Kernknospungen« im Sinne von RONDEZ, RÜTTNER und VOGEL [14] (unregelmäßige Konturen, Invaginationen) einher.

## Besprechung der Befunde

Im Jahre 1962 berichteten RONDEZ, RÜTTNER und VOGEL [14] über ihre zytologischen Untersuchungsergebnisse an den Leberzellen solcher Wistar-Ratten, die über 30 bis 40 Tage Thioacetamid erhielten. Sie hatten zum Zweck — als Ergänzung einer früheren Arbeit von RÜTTNER und RONDEZ [16] — die



- Abb. 1.* Bedeutende Kern- und Nucleolusvergrößerung in den im Läppchenzentrum gelegenen Leberzellen. An den veränderten Leberzellen ist der Verlust der scholligen zytoplasmatischen Pyroninophilie gut erkennbar. Methylgrün-Pyronin-Färbung
- Abb. 2.* Zwei vergrößerte Nucleoli in einem großen Zellkern bei Einziehung der Kernmembran. Nucleolus im Austritt aus dem Kernraum in das Zytoplasma der benachbarten Leberzelle. Methylgrün-Pyronin-Färbung
- Abb. 7.* Invagination der Kernmembran in Richtung auf den vergrößerten Nucleolus. Methylgrün-Pyronin-Färbung

zytologischen Veränderungen der Leberparenchymzellen »in der Zeitspanne bis zum Beginn des Parenchymbaues zu verfolgen«. Während dieses Studiums konnten sie als erste Beobachter die Totalextrusion des vergrößerten Nucleolus aus dem Kernraum ins Zytoplasma feststellen.

Die Ergebnisse unserer, zeitlich wesentlich kürzer bemessenen Versuche stimmen mit denjenigen von RONDEZ, RÜTTNER und VOGEL [14] völlig überein und ergänzen diese noch mit Angaben über den Austritt des kompakten Nucleolus aus dem Zytoplasma in den interzellulären Raum. Sie sind gleichzeitig ein Beweis dafür, daß die Totalextrusion des Nucleolus nicht nur im späteren, sondern auch im früheren Stadium der chronischen Thioacetamid-Vergiftung auftritt und sich nicht nur auf den Übertritt vom Nucleolus aus dem Kern ins Zytoplasma beschränkt.

Was die Bedeutung der Nucleolusextrusion betrifft, scheint es notwendig zu sein, die heutige Auffassung über die chemisch-funktionellen Zusammenhänge des Nucleoprotein- und Eiweißstoffwechsels zwischen dem Nucleus und Zytoplasma unter normalen Umständen kurz zu überblicken. Die Abgabe von Kernstoffen (»Kernsekretion«) an das Zytoplasma verläuft — nach den an den Kernen des exokrinen Pankreas unternommenen experimentellen Untersuchungen von ALTMANN [1] — normalerweise zyklisch. Nach der sogenannten »Ruhephase«, in der der runde Nucleolus im Kernzentrum liegt, beginnt die Extrusion der Nucleolarsubstanzen, in deren Verlauf sich eine Verbindung der Chromozentren mit der Kernmembran bildet und der Nucleolus sich länglich ausbreitet. Wenn ein entsprechender Anspruch seitens der Zellen vorliegt, erfolgt eine Abgabe von Nucleolarsubstanz. In dieser »Extrusionsphase« liegt der Nucleolus der Kernmembran an, durch die der Nucleolusinhalt an das Zytoplasma abgegeben wird. Die Abgabe der im Nucleolus angesammelten Stoffe geht manchmal mit völligem Verlust von Nucleolarsubstanzen einher. In der »Restitutionsphase« erscheinen neue Nucleolarsubstanzen, deren Ansammlung schließlich zur Bildung neuer Nucleolen führen kann. Im Laufe des Studiums der Kernsekretion hat ALTMANN [1] den ganzen Prozeß als »Funktionsformwechsel« des Kernes bezeichnet. Vorher wurde die Abgabe von Kernsubstanzen an das Zytoplasma von BERG [3] »Ausschleusungsmechanismus« genannt.

Unter normalen Umständen bewerkstelligt dieser Mechanismus die Abgabe von Stoffen (u. a. Ribonucleinsäure) aus dem Kernraum bzw. aus dem Nucleolus an das Zytoplasma. Im Laufe der Thioacetamid-Vergiftung scheint diese Funktion irgendwie gehemmt zu sein. Hierfür spricht außer der enormen Vergrößerung der Kerne und der Nucleolen — die nach der Meinung mehrerer Verfasser [12, 11, 9, 10, 15] auf eine synthetische Aktivität und eine Anreicherung von Ribonucleotiden und Eiweißstoffen zurückzuführen sei — der Verlust der scholligen zytoplasmatischen Pyroninophilie. Diese letztere Eigenschaft des Zytoplasmas ist mit dem Vorhandensein von Ribonucleinsäuren verbunden. Nach den Untersuchungen von GOLDSTEIN, MICOU und CROCKER [6] ist bekannt, daß enukleierte Zellen in Gewebekultur neben Erhaltung ihrer Fähigkeit zur Eiweißsynthese ihr Vermögen zur Bildung von Ribonucleinsäure verlieren. Auf Grund dieses Befundes sind sie der Meinung, daß die zytoplasmatische Ribonucleinsäure nuclearen Ursprungs sei.



Abb. 3. Exzentrisch gelegener Nucleolus in einer Leberzelle; Nucleolusextrusion aus der anderen Zelle. Methylgrün-Pyronin-Färbung

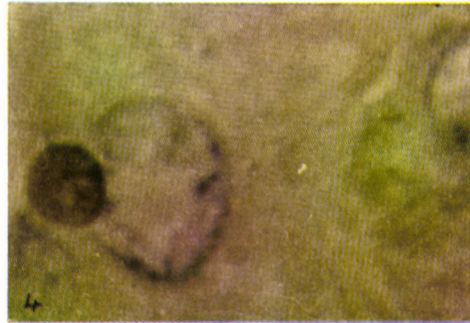


Abb. 4. Stark pyroninophiler Nucleolus, der nach dem Austritt im Zytoplasma liegt. Die Kernmembran ist unterbrochen. Methylgrün-Pyronin-Färbung



Abb. 5. Totale Extrusion des vergrößerten Nucleolus. Die Kontinuität der Kernmembran deutlich erkennbar, der Nucleolus liegt frei im Zytoplasma. Methylgrün-Pyronin Färbung

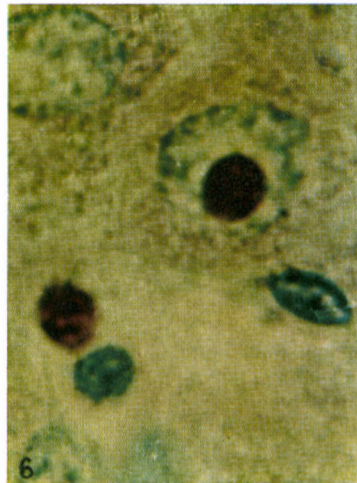
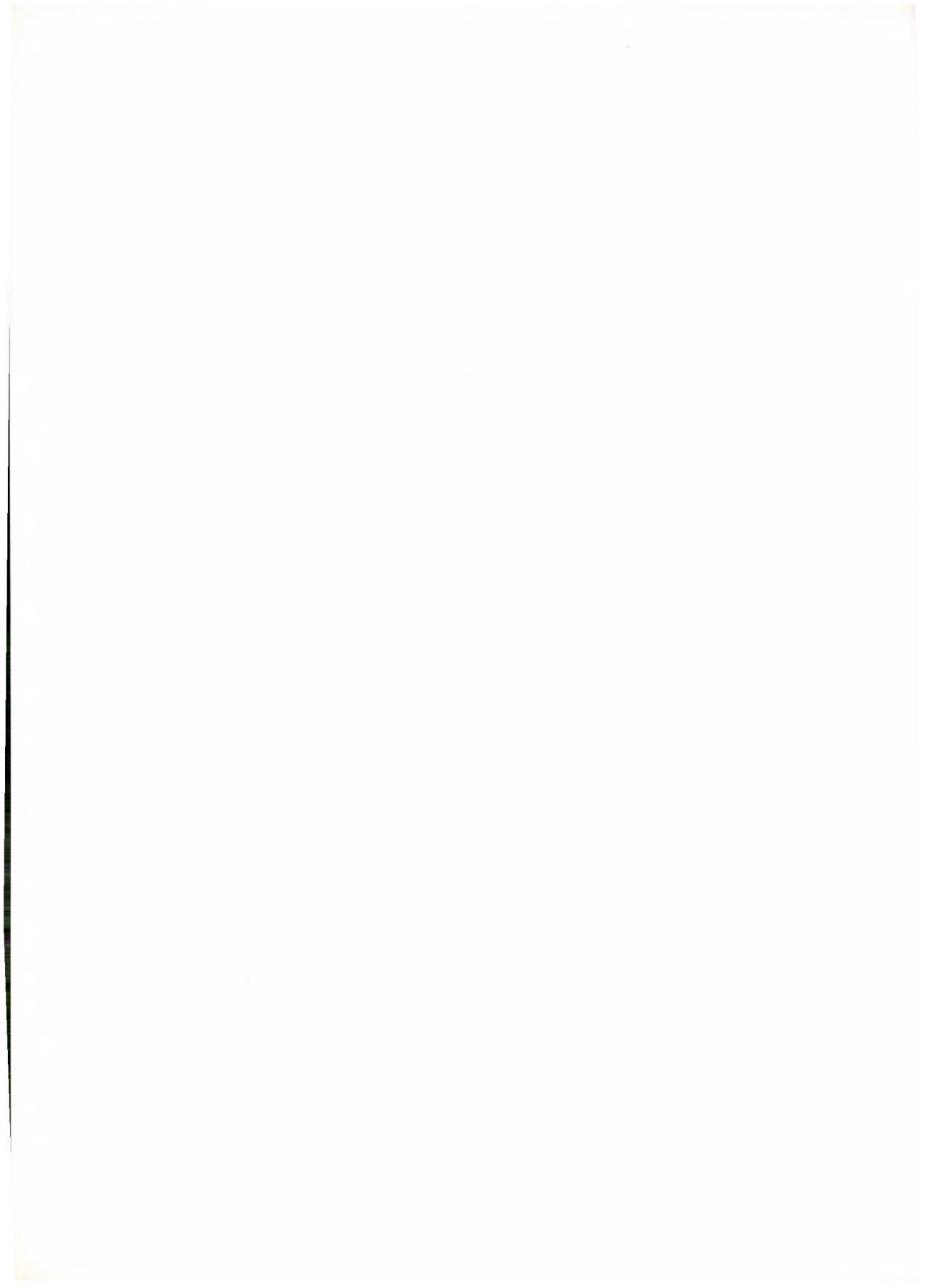


Abb. 6. Ausgetretener Nucleolus außerhalb der Leberzellen. Methylgrün-Pyronin Färbung



Totale und partielle Nucleolusextrusionen — besonders unter hochgesteigerten Funktionsbelastungen (ALTMANN [1]) — ergeben sich aus physiologischen Prozessen, während der Nucleolusaustritt aus dem Kernraum in der von Thioazetamid geschädigten Rattenleber ein pathologisches Phänomen darstellt. Diese Art der Nucleolusextrusion wurde nach der Meinung von RONDEZ, RÜTTNER und VOGEL [14] unter pathologischen Umständen noch nicht beschrieben. Wir möchten auch annehmen, daß diese Erscheinungen irgendwie mit der merkwürdigen Wirkung des Stoffes in Zusammenhang stehen.

Das weitere Schicksal ausgetretener Nucleolen bleibt ungeklärt. Es wäre möglich, daß ihr Nucleoproteidgehalt im proliferativen Umbauprozess des Leberparenchyms eine Rolle spielt [14]. Unsere Beobachtungen bezüglich Verlagerung ausgetretener Nucleolen in den interzellulären Raum lassen uns annehmen, daß der abgegebene Inhalt des Nucleolus nicht immer zu einer reparativen Zellneubildung verwendet wird. Diese Annahme scheint jener Umstand zu unterstützen, daß die Auflösung des kompakten Nucleolus im Zytoplasma von uns nicht beobachtet werden konnte.

Zu der viel diskutierten Frage, ob die charakteristische Vergrößerung der Zellkerne und der Nucleolen nur einen rein regressiven Prozeß darstellt, können wir auf Grund unserer Untersuchungen folgendes beitragen: Nekrobiotische Phänomene unter den von Thioazetamid geschädigten Leberzellen gehören zu den äußerst seltenen Befunden. Sind solche vorhanden, so treten sie in Form von Einzelzellnekrosen auf. Die gut erhaltene Struktur fast sämtlicher veränderten Leberzellen bietet keinen Anhaltspunkt für eine Nekrobiose.

Experimentelle Angaben weisen darauf hin, daß das Thioazetamid irgendwie in den Nucleoproteidstoffwechsel der Leberzellen eingreifen kann. Die charakteristischen Leberzellveränderungen im Frühstadium der chronischen Thioazetamidzufuhr scheinen diese Annahme zu stützen. BECKER [2] ist der Meinung, bei der Entstehung der Thioazetamid-Zirrhose sei der mutmaßlichen Schädigung des Ribonucleinsäurestoffwechsels eine Bedeutung beizumessen. Es stellt sich damit die weitere und bisher noch unbeantwortete Frage nach der Rolle des durch Thioazetamid gestörten Nucleoproteidstoffwechsels in der Leberkarzinogenese, deren Beantwortung von großer Bedeutung ist.

### Zusammenfassung

Im Laufe des Studiums an durch Thioazetamid geschädigten Leberzellen weißer Ratten im Frühstadium der chronischen Thioazetamidzufuhr konnte eine totale Extrusion der vergrößerten Nucleolen aus dem Kernraum in das Zytoplasma und aus diesem in den interzellulären Raum beobachtet werden. Histologische und histochemische Untersuchungen weisen darauf hin, daß diese Erscheinung nicht einen nekrobiotischen, sondern einen eigenartigen pathologischen Prozeß darstellt, der mit der Thioazetamidvergiftung in engem Zusammenhang steht. Diese Beobachtungen geben gewisse Hinweise auf die Bedeutung des durch Thioazetamid

gestörten Nucleoproteinstoffwechsels in der Entstehung der Thioacetamid-Zirrhose und ermöglichen einen Einblick in jene histologischen und histochemischen Veränderungen, die sich bei der Verabreichung eines hepatokarzinogenen Stoffes im Frühstadium der Karzinogenese in den Leberzellen abspielen.

#### LITERATUR

1. ALTMANN, H. W.: (1952) Über den Funktionsformwechsel des Kernes im exokrinen Gewebe des Pankreas. *Z. Krebsforsch.* **58**, 632. — 2. BECKER, V.: (1959—1960) Experimentelle Leberzirrhose durch mutmassliche Schädigung des Ribonucleinsäurestoffwechsels. *Zbl. Path.* **100**, 362. — 3. BERG, W.: cit. Altmann — 4. BRODEHL, J.: (1961) Thioacetamid in der experimentellen Leberforschung. *Klin. Wschr.* **39**, 956. — 5. GEORGII, A., MEHNERT, H.: (1961) Über Leberveränderungen durch Thioacetamid bei gleichzeitiger Belastung mit blutzuckersenkenden Substanzen der Biguanidreihe. *Beitr. path. Anat.* **124**, 278. — 6. GOLDSTEIN, L., MICOU, J., CROCKER, T. T.: (1960) Nuclear-Cytoplasmic Relationship in Human Cells in Tissue Culture. IV. A Study of Some Aspects of Nucleic Acid and Protein Metabolism in Enucleate Cells. *Biochim. biophys. Acta (Amst.)* **45**, 82. — 7. GUPTA, D. N.: (1956) Acute Changes in the Liver after Administration of Thioacetamid. *J. Path. Bact.* **72**, 183. — 8. GUPTA, D. N.: (1956) Nodular Cirrhosis and Metastasizing Tumours Produced in the Liver of Rats by Prolonged Feeding with Thioacetamide. *J. Path. Bact.* **72**, 415. — 9. HEIZER, P.: (1955) Desoxyribose Nucleic Acid (DNA) Content and Size of Rat Liver Nuclei during Thioacetamide Intoxication and Recovery. *Chromosoma* **7**, 281. — 10. KLEINFELD, R. G.: (1957) Early Changes in Rat Liver and Kidney Cells Induced by Thioacetamide. *Cancer Res.* **17**, 954. — 11. LAIRD, A. K.: (1953) Nuclear Changes Produced in Rat Liver Cells by Thioacetamide. *Arch. Biochem. Biophys.* **46**, 119. — 12. OEHLERT, W., SCHULTZE, B.: (1960) Die Kerngröße als Ausdruck der synthetischen Aktivität des Kernes. *Beitr. path. Anat.* **123**, 101. — 13. RATHER, L. J.: (1951) Experimental Alteration of Nuclear and Cytoplasmic Components of the Liver Cell with Thioacetamide. *Bull. John Hopkins Hosp.* **88**, 38. — 14. RONDEZ, R., RÜTTNER, J., VOGEL, A.: (1962) Zytologische Untersuchungen an der Thioacetamidgeschädigten Rattenleber. *Path. et Microbiol. (Basel)* **25**, 13. — 15. RÜTTNER, J. R., RONDEZ, R., GASSMANN, R.: (1959) Histochemische Untersuchungen an der toxisch geschädigten Rattenleber. *Schweiz. Z. Path. Bakt.* **22**, 294. — 16. RÜTTNER, J. R., RONDEZ, R.: (1960). Zur formalen Genese der Thioacetamid Zirrhose der Ratte. *Path. et Microbiol. (Basel)* **23**, 113. — 17. THOENES, W., BANNASCH, P.: (1962) Elektronen- und lichtmikroskopische Untersuchungen am Cytoplasma der Leberzellen nach akuter und chronischer Thioacetamid-Vergiftung. *Virchows Arch. path. Anat.* **335**, 556.

#### BEHAVIOUR OF THE NUCLEOLI OF LIVER CELLS IN THIOACETAMIDE POISONING

G. KENDREY

White rats have been chronically treated with thioacetamide. In the initial phase of the treatment some of the enlarged nucleoli of the hepatic cells emigrated from the nuclei into the cytoplasm and from the latter into the intercellular spaces especially in the center of the liver lobules. Histological and histochemical examinations allow the conclusion that this phenomenon represents a peculiar and not necrobiotic process induced by the poison. These observations point to the important role of disturbances in the metabolism of nucleoproteins due to treatment with thioacetamide in the development of thioacetamide cirrhosis. The observed phenomena shed, moreover, a light on those histological and histochemical changes which occur in the liver cells at an early stage of carcinogenesis after the administration of a carcinogenic substance.



ПОВЕДЕНИЕ ЯДРЫШЕК ПЕЧЕНОЧНЫХ КЛЕТОК У ОТРАВЛЕННЫХ  
ТИОАЦЕТАМИДОМ КРЫС

Г. КЕНДРЕИ

Автор подвергал белых крыс хроническому воздействию тиацетамида и наблюдал, что уже в ранней стадии отравления увеличенные ядрышки выступили из ядра пораженных печеночных клеток в цитоплазму и оттуда в межклеточное пространство. Гистологические и гистохимические исследования показали, что это явление не некробиотический, а патологический процесс, тесно связанный с отравлением тиацетамидом. Современные наблюдения указывают на то, что нарушенный тиацетамидом нуклеопротеидный обмен играет роль в возникновении тиацетамидной атрофии, далее позволяет делать выводы относительно тех тканевых и гистохимических изменений, которые протекают в печеночных клетках в ранней стадии канцерогенеза, вызванного применением канцерогенного вещества.

DR. G. KENDREY: Budapest VIII. Üllői út 26., Ungarn