

Aus der Abteilung für experimentelle Pathologie (Prof. ELSE KNAKE) des Kaiser-Wilhelm-Instituts für Zellphysiologie, Berlin-Dahlem.

Über Transplantation von Lebergewebe.

Von
ELSE KNAKE.

Mit 5 Textabbildungen.

(Eingegangen am 26. Juni 1950.)

Ein frei verpflanztes Transplantat ist in gewisser Hinsicht mit den Gewebsschnitten zu vergleichen, die nach der von WARBURG ersonnenen Methode für Stoffwechselmessungen gebraucht werden. Hier wie dort erstrebt man, daß das Gewebe in allen seinen Teilen am Leben bleibt. Darum ist es richtig, die Überlegungen, die WARBURG über die wünschenswerte Beschaffenheit der Gewebsschnitte für Stoffwechselmessungen angestellt hat¹, auch auf die Beschaffenheit von Transplantaten anzuwenden.

„Wir betrachten einen Gewebsschnitt in einer Lösung, aus der er Stoffe verbraucht und an die er Stoffe abgibt. Ist der Stoffverbrauch groß und der Gewebsschnitt dick, so wird sich, wegen der Langsamkeit der Diffusion, nur eine mehr oder weniger tiefe Rindenschicht des Gewebes an dem Stoffwechsel beteiligen, der Kern des Schnittes dagegen untätig bleiben... Lassen wir die Dicke des Schnittes fortgesetzt abnehmen, so nimmt mit der Länge des Diffusionsweges auch der untätige Gewebsteil ab und verschwindet schließlich. Die Schnittdicke, bei der dieses eintritt, wollen wir als ‚Grenzschnittdicke‘ bezeichnen.“

... Es ist klar, daß die Grenzschnittdicke von Fall zu Fall verschieden ist, weil sie von der Größe des Stoffumsatzes, von der Diffusionskonstante der reagierenden Stoffe, von dem Einfluß der Konzentrationen auf den Stoffumsatz und anderen Faktoren abhängt.“

Wenn das Gewebe in Sauerstoff atmet, berechnet WARBURG die Grenzschnittdicke d' nach der Gleichung

$$d' = \sqrt{8c_0 \frac{D}{A}}.$$

Hier bedeutet A den Sauerstoffverbrauch des betreffenden Gewebes je Volum- und Zeiteinheit, D die Diffusionskonstante des Sauerstoffs in dem betreffenden Gewebe und c_0 die Sauerstoffkonzentration an der Grenze zwischen Schnitt und umgebender Lösung. Durch die für jede Gewebsart individuellen Werte von A und D wird diese Gleichung der biologischen Mannigfaltigkeit der Körperegewebe gerecht.

Die Grenzschnittdicke dürfte mit der Strecke zwischen Organzelle und nächstgelegener Capillare eng verwandt sein. Ebenso wie der Wert für die Grenzschnittdicke wird auch der Wert für die Entfernung Organzelle/Capillare zu dem Sauerstoffbedürfnis der betreffenden Zellen und dem Sauerstoffdruck in der dazugehörigen Capillare in naher Beziehung stehen. Der Histologe erkennt also in WARBURGS Gleichung

$$d' = \sqrt{8c_0 \frac{D}{A}}$$

die mathematische Formulierung des Kapillarmusters der Organe.

Für das Vorgehen bei freier Transplantation gibt dieser Wert d' einen guten Anhaltspunkt, sei es daß man ihn nach der Gleichung berechnet oder anschaulich aus der Capillarisierung des betreffenden Gewebes abliest. Auf beiden Wegen läßt sich ableiten, daß ein Transplantat verhältnismäßig dick sein darf, wenn es beispielsweise aus Knorpel besteht, daß man aber nur dünne Schnitte verpflanzen soll, wenn es sich etwa um Leber handelt.

Nach WARBURGS Berechnungen dürfen Leberschnitte bei Atmung in reinem Sauerstoff höchstens $470\ \mu$ dick sein, bei Atmung in Luft nicht mehr als $210\ \mu$. Sind die Schnitte dicker, so wird der Stoffwechsel in den inneren Schichten ungenügend, und diese Zellagen werden absterben. Werden nun Leberschnitte transplantiert, so ist der in der nächstgelegenen Capillare zur Verfügung stehende Sauerstoffpartialdruck auf jeden Fall niedriger als in Luft, er liegt zwischen $1/5$ Atm. und Null. Dementsprechend muß man sich bemühen, die Lebertransplantate noch dünner als $210\ \mu$ zu schneiden.

Auch im übrigen wird man bei der Transplantation alles zu vermeiden suchen, was die verpflanzten Gewebe schädigen kann. Um sie vor Cytotoxinen zu bewahren, ist die Autotransplantation der technisch etwas einfacheren Homotransplantation vorzuziehen. — Weil Sauerstoffmangel bei Körpertemperatur das Atmungsvermögen von vielen Geweben in kurzer Zeit schädigt oder vernichtet², sollen die Schnitte in eisgekühlter Ringerlösung aufgefangen werden, die mit Sauerstoff durchperlt wird. Außerdem wird der Ringerlösung 0,2% Traubenzucker als Energiequelle zugefügt. — Absolute Sterilität beim Arbeiten ist von fast ausschlaggebender Bedeutung, ebenso, daß schnell und leicht gearbeitet wird; die zarten Transplantate dürfen ebenso wenig geschädigt werden wie das Gewebe, das die Transplantate aufnimmt.

Das technische Vorgehen war daher in meinen Transplantationsversuchen folgendes: In Äthernarkose wird der bei einem Medianschnitt zunächst sichtbar werdende große Leberlappen an der Basis unterbunden, exstirpiert und trocken auf Eis aufbewahrt. Die Bauchhöhle wird wieder verschlossen. Der Leberlappen wird auf Filtrierpapier gelegt. Es werden davon Rasiermesserschnitte von etwa 0,5 qcm

Flächeninhalt gemacht und in der beschriebenen eisgekühlten Ringerlösung gesammelt. Die dünnsten, am stärksten durchscheinenden Schnitte* werden in eine 2. Schale mit der gleichen Flüssigkeit übertragen. In einer neuen Äthernarkose wird die Laparatomienaht wieder geöffnet und der Schnitt caudalwärts etwas verlängert oder durch einen 2. Medianschnitt caudalwärts ergänzt. Auf das kleine Netz zwischen Milz und Pankreas und auf die Mesotestes (das zarte Gewebe, was am Nebenhodenkopf hängt) werden einige Leberschnitte gelegt. Im letzten Fall wird die seröse Haut darüber locker so zusammen geschlagen, daß die Schnitte möglichst ausgebreitet bleiben. Darauf einschichtige Naht der Bauchwände. — Aus der Schale mit Schnitten wird nach erledigter Transplantation auf Bouillon abgeimpft.

In verschiedenen Abständen nach der Verpflanzung, und zwar von 2—3 Wochen an bis zu 5 Monaten, wurden die Tiere getötet, die Transplantate fixiert (gewöhnlich Carnoy, seltener Bouin) und in Stufen- oder Serienschnitten histologisch untersucht.

Die auf die Mesotestes gelegten Schnitte wurden dort fast regelmäßig wiedergefunden. Das kleine Netz ist offenbar ein nicht ganz so günstiges Transplantationsbett, oft gehen Transplantate spurlos verloren. Auf dem Mesenterium des Darms haften die Schnitte fast nie, sie verschwinden fast immer.

In den Mesotestes oder im kleinen Netz sitzen die Transplantate als gelbliche, meistens rundliche Einsprengungen von Hirsekorn- bis Hanfkorngröße. Seltener sind sie länglich. Ein solches längliches Transplantat hatte beispielsweise die Ausmaße 4×1 — 2×1 — 2 mm^3 .

Histologisch findet sich folgendes: Das Transplantat heilt in das Gewebe seines neuen Standortes glatt ein, ohne daß sich eine entzündliche Reaktionszone oder eine irgendwie beschaffene Demarkationsgrenze zwischen beiden bildet. Die Fettzellen der serösen Haut und die Leberepithelzellen oder Gallengänge des Transplantats liegen ohne die geringste Unterbrechung etwa durch Leukocyten, Rundzellen, Fibroblasten oder Granulationsgewebe unmittelbar nebeneinander (Abb. 1).

Zwischen Transplantaten von einigen Wochen und einigen Monaten findet man histologisch keinen grundsätzlichen Unterschied. Diese wie jene bestehen aus Leberepithelien und den daraus hervorgegangenen pigmentierten Zellen sowie vielkernigen Riesenzellen, weiter aus Gallengängen, Bindegewebe und Capillaren. Fast immer sind dazwischen kleine Bezirke chronisch entzündet oder zeigen hyalines narbiges Bindegewebe.

Die Leberzellen behalten in den ersten Wochen ihre bälkchenförmige Anordnung oft bei. Sie bilden dann ein- oder zweireihige

* An hochkant eingebetteten, geschnittenen und gefärbten Rasiermesser schnitten zählten wir durchschnittlich 5—15 Zellreihen.

Zellsäulen, die durch weit offene Capillaren stark auseinandergezogen sein können (Abb. 1). Diese Capillaren enthalten manchmal Blut, manchmal auch nur eine schwach eosinfärbbare Substanz ohne Blutzellen. Nur ein Teil der Capillarendothelien ist erhalten. Die DISSE-schen Räume können sehr weit sein.



Abb. 1. Leber-Autotransplantat 21 Tage alt. Reizlose Einheilung. Bälkchenanordnung mit weit offenen Capillaren.

Ausnahmsweise wühlt sich Blut direkt zwischen nackte Leberzellen, so daß diese in Blutseen schwimmen und dort wohl zugrunde gehen.

Die beschriebene Anordnung von Leberzellen und Capillaren in Bälkchenform, ähnlich der des intakten Organs, bleibt im allgemeinen nicht dauernd erhalten. Gewöhnlich veröden die intralobulären Capillaren, und die Leberzellen ziehen sich zu kleinen Gruppen von etwa 3—10 Zellen zusammen. Innerhalb solcher Gruppen, die auf dem Schmitt runde oder elliptische Form haben, finden sich nur wenige kollagene Fäserchen (Azan) und ebenso selten auch argyrophile Fasern

(BIELSCHOWSKI). Nur außen sind die Leberzellgruppen von kollagenen und argyrophilen Fasern mehr oder weniger vollständig umrahmt. — Diese Leberzellgruppen haben lange Zeit keine Capillaren. Das Transplantat wird zunächst von Gefäßen versorgt, die in zufälliger, nicht in der für Lebergewebe typischen Anordnung das Transplantat durchdringen. So erinnert in den meisten Lebertransplantaten lange Zeit nichts mehr an die ursprüngliche Läppchenstruktur, bei der alle Leberzellen von dem nächstgelegenen Capillarabschnitt etwa gleichweit entfernt sind, weil Leberbälkchen und Capillaren unmittelbar nebeneinander verlaufen. Erst in unseren ältesten Transplantaten von etwa 5 Monaten sieht man wieder unmittelbar neben Leberzellen Capillaren, und zwar sowohl parallel zu Leberzellreihen wie zentral in Leberzellgruppen (Abb. 2). Wir sahen dieses ziemlich häufig, so daß es sich dabei möglicherweise um eine gesetzmäßige Entwicklung handelt.

Es hat uns überrascht, daß die Leberepithelzellen cytologisch denen des intakten Organs gleichen. Auch in den 5 Monate alten Transplantaten sind sie hochdifferenziert geblieben (Abb. 3). Man identifiziert sie auf den ersten Blick und ohne jeden Zweifel an ihrer Zellform, der Konsistenz und Färbbarkeit des Cytoplasmas sowie an den charakteristischen Kernen. Der Zelleib ist stark eosinophil. Das Cytoplasma läßt in Kernnachbarschaft die gleiche feine fädchenförmige Zeichnung erkennen wie im Organschnitt. Vacuolen fehlen fast immer. Die Gallencapillaren sind auch in unseren ältesten Transplantaten mit großer Regelmäßigkeit darstellbar (nach EPPINGER) (Abb. 4). — Die Kerne sind sehr saftreich. In der Größe und in der Variation ihrer Größe verhalten sie sich sehr ähnlich wie die Zellen der regenerierenden Leber, von der das Transplantat stammt (Tabelle I). Sie enthalten 1 oder 2, manchmal sogar 3 runde Nucleolen, die durch ihre beträchtliche Größe und kräftige Eosinophilie in die Augen springen. Das Chromatin ist in den saftreichen Kernen ebenso verteilt wie bei den Leberzellen *in situ*. Die Kernmembran ist scharf gezeichnet und glatt, die Kerne sind prall.

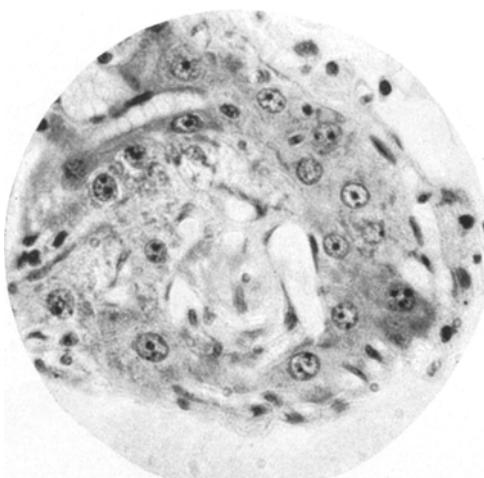


Abb. 2. Leber-Autotransplantat 146 Tage alt.
Neugebildete Capillaren neben Leberepithelzellen.

Fast in jedem Transplantat findet man große, stark eosinfärbbare Protoplasmakomplexe, die offenbar aus den zusammengeflossenen Zellleibern von untergegangenen Leberzellen bestehen. Sie sind ähnlich

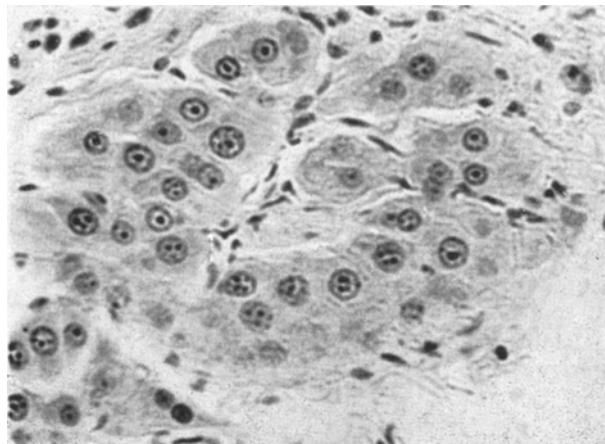


Abb. 3. Leber-Autotransplantat 155 Tage alt. Erhalten gebliebene Differenzierung der Leberepithelzellen.

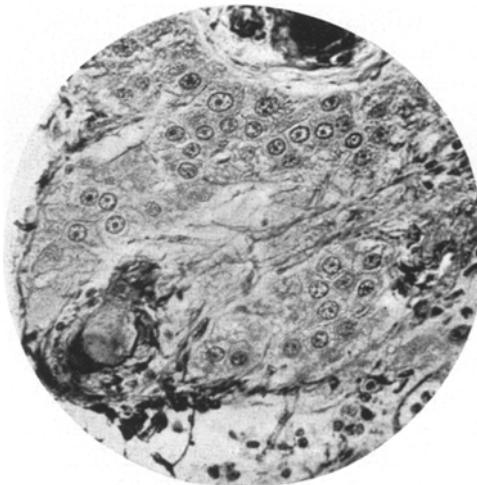


Abb. 4. Leber-Autotransplantat 149 Tage alt. Gallencapillaren (nach EPPINGER).

wie Fremdkörperriesenzellen von zahlreichen ovalen kleinen Kernen besiedelt, die sich durch Mitose vermehren können. Fast immer trifft der Schnitt in diesen Cytoplasmakomplexen einen Fremdkörper, der die homogene Beschaffenheit einer Gallerte hat und als nadelförmiger Spieß, als krummer Dorn oder wie ein breites steifes Band in dem Protoplasma steckt (Abb. 5). Diese Einschlüsse sind blaßbläulich

(Hämatoxylin-Eosin) oder farblos (Azan), ganz selten etwas bräunlich. Sie sind wahrscheinlich ein Ausscheidungs- oder Umwandlungsprodukt der Leberepithelien. In der ersten Stufe dieser Degeneration wird das Cytoplasma bei intaktem Kern arm an eosinfärbbarer Substanz, und es schließt sehr kleine und dabei zahlreiche stäbchen- und körnchenförmige silberweiß aufleuchtende (Hämatoxylin-Eosin) Körperchen ein. Später verdämmert in diesen Zellen der Kern, und die beschriebenen großen kräftig eosinfärbbaren fremdkörperriesenzellenartigen Cyto-

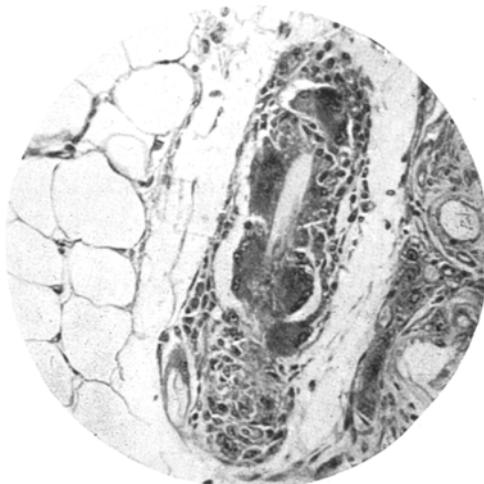


Abb. 5. Leber-Autotransplantat 76 Tage alt. Fremdkörperriesenzellartige Komplexe aus Leberepithelzellen entstanden.

plasmakomplexe scheinen den Endzustand dieses Degenerationsvorganges darzustellen. Möglicherweise ist dieses Schicksal für die Leberzellen im Transplantat unausweichlich, weil ihre Verbindung mit dem Gefäß- und Gallenabflußsystem für eine gesunde Funktion ungenügend ist, andererseits ihre erhalten gebliebene hohe Differenzierung ihre Tätigkeit nicht vollständig lahmt.

Die übrigen Bestandteile unserer Transplantate verhalten sich so, wie sie schon häufig von anderen Untersuchern beschrieben wurden³⁻¹². Jedes Transplantat enthält gewucherte Gallengänge; es liegen immer mehrere Querschnitte nebeneinander, und das auskleidende einschichtige Epithel hat häufig Mitosen. Es ist flach kubisch und oft mehr breit als hoch. Auch die Zellkerne sind in die Breite gezogen. Danach wäre anzunehmen, daß die Gallengangswände unter einem von innen wirkenden Druck stehen; doch konnten wir farberisch keinen Inhalt nachweisen (Hämatoxylin-Eosin, Mucicarmine, Azan). Die Gänge haben verschiedene weite Lumina. Zwei oder drei benachbarte Gänge vereinigen ihre Lumina nicht selten durch Zelleinschmelzungen, wie sich

aus den teilweise stehendenbleibenden Zwischenwänden ablesen läßt. Manches spricht dafür, daß die zuerst auftretenden Gänge durch partielle

Tabelle 1.

Objekt	Anzahl der Kerne mit dem Durchmesser x gemessen in Teilstrichen des Ocularmikrometers									
	$x = 3$	$x = 4$	$x = 5$	$x = 6$	$x = 7$	$x = 8$	$x = 9$	$x = 10$	Summe	
Transplantat Nr. 5059 21 Tage alt	4	247	437	98	19	8	2	—	815	
Leber Nr. 5059 seit 21 Tagen regenerierend	10	252	464	81	8	—	—	—	815	
Transplantat Nr. 5106 69 Tage alt	8	234	437	111	25	—	—	—	815	
Leber Nr. 5106 seit 69 Tagen regenerierend	7	212	446	137	12	1	—	—	815	
Transplantat Nr. 5104 76 Tage alt	9	189	404	175	31	7	—	—	815	
Leber Nr. 5104 seit 76 Tagen regenerierend	2	119	512	145	35	2	—	—	815	
Transplantat Nr. 5263 149 Tage alt	35	207	273	149	91	40	15	5	815	
Leber Nr. 5263 seit 149 Tagen regenerierend	32	198	480	93	12	—	—	—	815	
Transplantat Nr. 5264 155 Tage alt	13	305	324	132	33	6	2	—	815	
Leber Nr. 5264 seit 155 Tagen regenerierend	3	237	455	118	2	—	—	—	815	

Ta-

Objekt	Leber in situ		
	ausgezählte Leberepithelzellen	davon mehrkernig	Mitosen
Leber Nr. 5059 regenerierend seit 21 Tagen	5200	511 x zweikernig, 4 x dreikernig	13
Leber Nr. 5106 regenerierend seit 69 Tagen	5011	269 x zweikernig davon 1 x dreipolig, 1 x Chromosomen- absprengung	19
Leber Nr. 5104 regenerierend seit 76 Tagen	5000	277 x zweikernig, 1 x dreikernig davon 1 x Chromosomen- absprengung	22
Leber Nr. 5263 regenerierend seit 149 Tagen	5132	207 x zweikernig, 1 x dreikernig	5
Leber Nr. 5264 regenerierend seit 155 Tagen	6000	524 x zweikernig, 1 x dreikernig	1

Cytolyse aus soliden Epithelwucherungen entstehen. Das Gallengangsepithel ist von kollagenem und argyrophilen Bindegewebe zirkulär umgeben. Niemals liegen die Gallengänge in der ihnen gemäßen Umgebung, dem GLISSONSchen Feld. Nur verödete Gefäße mit hyalinisierten Wandungen erinnern in ihrer Umgebung zuweilen an diese Strukturen des intakten Organs.

Ein weiterer häufiger Bestandteil der Transplantate, junger wie alter, sind die pigmenttragenden Zellen, die andere Untersucher schon häufig beschrieben haben. Auch nach meinen Beobachtungen gehen sie aus Leberepithelzellen hervor. Das ockergelbe oder bräunliche Pigment ist staubförmig oder feinkörnig oder schollig. Nur ein Teil läßt sich durch die Berliner Blau-Reaktion färben und zwar blau oder schmutzig blaugrün.

Schließlich enthält fast jedes Transplantat chronisch entzündetes Bindegewebe. Da das umgebende Fettgewebe der serösen Haut, auf der das Transplantat aufsitzt, gleichzeitig ruhig und reizlos ist, muß man den Grund der Entzündung in den Transplantaten selbst suchen. Alles spricht dafür, daß sie eine Reaktion auf zugrunde gegangene Gewebsteile ist. Das eingepflanzte Lebergewebe bleibt ja nicht in allen Teilen erhalten. Leberzellen verdämmern, ganze Capillaren oder vereinzelte Endothelien, Arterien, Venen, Gallengänge und Blutzellen gehen zugrunde. Die Folge ist eine resorptive kleinzellige Entzündung, an der Plasmazellen sehr reichlich beteiligt sein können.

belle 2.

Objekt	Lebertransplantat		
	ausgezählte Leberepithelzellen	davon mehrkernig	Mitosen
Lebertransplantat Nr. 5059 21 Tage alt	5200	454 x zweikernig, 2 x dreikernig	9
Lebertransplantat Nr. 5106 69 Tage alt	4982	313 x zweikernig	6
Lebertransplantat Nr. 5104 76 Tage alt	5000	457 x zweikernig, 8 x dreikernig	4
Lebertransplantat Nr. 5262 146 Tage alt	4944	230 x zweikernig	2
Lebertransplantat Nr. 5263 149 Tage alt	4468	233 x zweikernig, 4 x dreikernig	2
Lebertransplantat Nr. 5264 155 Tage alt	5100	375 x zweikernig, 3 x dreikernig	1

Damit ist die Frage nach dem endgültigen Schicksal von autologen Lebertransplantaten aufgeworfen. Dem Untergang von Leberepithelien steht auch in unseren ältesten Transplantaten regelmäßig eine Zellvermehrung durch Mitosen gegenüber, wenn sie auch nicht so groß ist wie in der regenerierenden Leber desselben Tieres (Tabelle 2). Daneben sind direkte Kernteilungen häufig, ebenso häufig wie in der dazugehörigen regenerierenden Leber, wie die Zahl der mehrkernigen Zellen anzeigt (Tabelle 2). Ob sich beide Prozesse, Zelluntergang und Kernteilung, *auf die Dauer*, über 5 Monate hinaus, die Waage halten, sollen unsere weiteren Transplantationsversuche über noch längere Zeit beantworten.

Es soll noch erwähnt werden, daß sich bei Autotransplantation von etwa 1 mm dicken Leberscheibchen nach 6 Wochen Granulationsgewebe und einige am Rande vegetierende Leberepithelien fanden, wie es auch von anderen Untersuchern mitgeteilt worden ist. Die hier beschriebenen positiven Erfolge sind also tatsächlich auf die angewandte Methode zurückzuführen, von der folgende Faktoren unbedingt innergehalten werden müssen: Verpfanzung von dünnen Schnitten, Verpfanzung auf dasselbe Tier, von dem das Gewebe stammt, und streng aseptisches Arbeiten. Auch die Wahl eines zarten und gut vascularisierten Gewebes im Abdomen als Transplantationsort ist bedeutungsvoll.

Zusammenfassend erscheinen mir an meinen Befunden folgende Einzelheiten bemerkenswert: Die Transplantate heilen ohne jede Demarkation glatt in das Gewebe ihres neuen Standortes ein. Auch die empfindlichsten Elemente, die Leberepithelien, bleiben mindestens 5 Monate gesund und in voller Differenzierungshöhe erhalten, was besonders den mit Gewebekulturen Vertrauten überraschen muß. Auch nach 5 Monaten findet man in jedem Transplantat Mitosen von Leberepithelien und sehr häufig zweikernige Zellen.

Literatur.

- ¹ WARBURG, OTTO: Über den Stoffwechsel der Tumoren, S. 68. Berlin 1926. —
² MINAMI, SEIGO: In OTTO WARBURG, l. c., S. 85. — ³ RIBBERT, H.: Arch. Entw.-mechan. **6**, 131 (1898). — ⁴ LUBARSCH, O.: Verh. dtsch. path. Ges. **1899**, 97. — Beitr. path. Anat. **87**, 323 (1931). — ⁵ RÖSSLER, R.: Zbl. Path. **1923** (Festschr. M. B. SCHMIDT). — Sitzgsber. preuß. Akad. Wiss., Physik.-math. Kl. **1936**. — ⁶ MITSUDA, T.: Virchows Arch. **248**, 91 (1924). — ⁷ BENEKE, R.: Beitr. path. Anat. **74**, 2 (1925). — ⁸ HERXHEIMER u. JORNS: Beitr. path. Anat. **75**, 157 (1926). — ⁹ LETTERER, E.: Verh. dtsch. path. Ges. **1934**, 254. — ¹⁰ BÖCK, J., u. H. POPPER: Virchows Arch. **299**, 219 (1937). — ¹¹ CAMERON, G. R., and C. L. OAKLEY: J. of Path. **38**, 17 (1935). — ¹² SCHÄFER, TH.: Virchows Arch. **302**, 455 (1938).

Prof. ELSE KNAKE, Kaiser-Wilhelm-Institut für Zellphysiologie,
 Abteilung für experimentelle Pathologie, Berlin-Dahlem.