

Aus dem Pathologischen Institut der Universität Tübingen
(Direktor: Prof. Dr. E. LETTERER).

**Morphologisches und humorales Stoffwechselgeschehen
in Leber, Milz und Blut
im Verlauf der experimentellen Amyloidose.**

Von

**WOLFGANG GOßNER, GERHARD SCHNEIDER, MANFRED SIESS
und HUBERT STEGMANN.**

Mit 11 Textabbildungen.

(Eingegangen am 1. September 1950.)

Inhalt.

	Seite
I. Einführung	326
II. Methodik	328
III. Ergebnisse	329
A. Quantitativ morphologische Veränderungen an der Leber	329
1. Körpergewicht und relatives Lebergewicht	329
2. Gewichtszunahme und Wassergehalt	332
3. Formalgenetische Analyse der Lebervergrößerung	334
4. Die Leberkernvariation	344
5. Die Kern-Plasmarelation	345
B. Histochemische Untersuchungen über das Verhalten der Pentose-Nucleotide in der Leber	346
C. Die mesenchymale Reaktion in Leber und Milz	357
D. Bluteiweißveränderungen und vergleichende Betrachtungen der morphologischen und humoralen Reaktion	361
IV. Zusammenfassende Schlußbetrachtung	369
Literatur	372

I. Einführung.

Neben dem eigentlichen Amyloidbefund fanden morphologisch faßbare Allgemeinreaktionen des Organismus bei der menschlichen und experimentellen Amyloidose bisher wenig Beachtung. Die meisten Amyloidstudien befassen sich mit der Ablagerungsart, dem Fundort und den strukturellen und färberischen Eigenschaften des Amyloids sowie seinen Entstehungsbedingungen. Auf Grund der Bluteiweißveränderungen im Laufe der Amyloiderkrankung und der Fütterungsabhängigkeit der experimentellen Amyloidose erscheint es jedoch angezeigt, auch einmal die morphologischen Allgemeinreaktionen des gefährdeten Organismus während der Phase der Amyloidentstehung näher zu analysieren.

In seiner ersten Arbeit über die Amyloidose (1925) fiel LETTERER bei der experimentellen Amyloidose der weißen Maus am Ende der amyloid erzeugenden Behandlung schon die nicht unerhebliche Milzvergrößerung

der Tiere auf. Die weitere Auswertung der Milz-, Leber- und Nieren gewichte der behandelten Mäuse war jedoch wegen der starken Inhomogenität des Tiermaterials nicht möglich. Im histologischen Befund der Leber war vor allem eine unterschiedlich starke Wucherung mesenchymaler Zellen bemerkenswert. Während KUCZYNSKI diese Zellvermehrungen in den GLISSONSchen Dreiecken wie auch die intracapilläre Zellproliferation als Folge einer abnormen Ernährungslage ansprach, mußte auf Grund der Untersuchungen von M. B. SCHMIDT vor allem an das sog. „Milzgewebe der Leber“ gedacht werden. Im Laufe der vielen Fütterungsstudien bei einer amyloidkrankmachenden Behandlung der Maus (diese wurden über mehrere Jahre mit den verschiedensten Futterarten und Mischungen von LETTERER ausgeführt, sind bisher aber nicht bzw. nur teilweise veröffentlicht) stellte sich heraus, daß die Zellherde in der Leber, seltener auch in der Niere auch ohne Amyloidbefall der Milz regelmäßig im Zuge der amyloiderzeugenden Behandlung auftreten. Sie stellen ein gewisses Kriterium der Amyloidosegefahr für das Tier dar; treten sie in einer Tierreihe in der Leber sehr reichlich auf, so ist auch sicher mit einem Milzamyloid mindestens bei einem Teil der Tiere zu rechnen. Eine weitere, vor allem auch dynamische Betrachtung des Auftretens dieser Zellvermehrungen erschien deshalb angebracht.

Neben dem Leberbindegewebe bleibt auch das *Parenchym* von dem kräckmachenden Einfluß der Injektionsbehandlung nicht unberührt. Das histologische Übersichtsbild zeigt stets einen erheblichen Unterschied der Zellen und Kerne in bezug auf Größe und Färbbarkeit bei den behandelten Tieren gegenüber den normalen. Das histologische Bild der meist vergrößerten Milz des behandelten Tieres ist durch ein mehr oder weniger starkes Verschwimmen der Follikelgrenzen und durch eine starke Rundzellenvermehrung in der Pulpa gekennzeichnet. Häufig tritt eine vermehrte Blutfüllung des Capillarnetzes an der Follikel-Pulpagrenze auf, ein Befund, den LETTERER schon 1925 als eine Vorstufe der Amyloidablagerung bezeichnet hat.

In seinen Untersuchungen hat LETTERER einen deutlichen Einfluß verschiedenartiger Ernährung auf die experimentelle Amyloidose gefunden und dabei bereits auf Verschiebungen des Körpergewichtes sowie der Leber- und Milzgrößen hingewiesen. Es erschien uns daher gerade für die Erfassung des dynamischen Stoffwechselgeschehens wichtig, eine eiweißreiche Kost (Casein- oder Plasmafütterung) mit einer überwiegenden Kohlenhydratfütterung (Hafer) zu vergleichen.

Nachdem so die statische Betrachtung für weitere Untersuchungen das Augenmerk vor allem auf Milzgröße, Leberparenchym und Leberbindegewebsveränderungen hinlenkte, galt es, diese Reaktionen in ihrem Ablauf mit exakten Methoden zu erfassen. Als Beobachtungsmodus erschien die schon bei den Bluteiweißuntersuchungen (SCHNEIDER)

eingeführte vierstufige amyloiderzeugende Standardmethode geeignet. Die Tiere wurden nach 5, 10, 15 und 20 Injektionen von Natrium-Caseinat getötet und untersucht, um ein Bild über den Ablauf der Reaktionen zu bekommen. Aus eigener Zucht stand ein einwandfreies homogenes Tiermaterial zur Verfügung, dessen Normalwerte für Leber- und Milzgewichte sowie Zell- und Kernbild stets innerhalb einer nur geringen physiologischen Schwankungsbreite gefunden wurden. Die in diesen Versuchen angewandte Caseinlösung in Natronlauge besitzt dieselbe Wirkung wie die in früheren Untersuchungen von LETTERER benutzte Nucleinlösung. Der Schwerpunkt der Injektionsbehandlung liegt in der Erzielung der Abscesse, wofür vor allem die Natronlauge verantwortlich ist. Die Eiweißlösungen sollen nur die Wirkung der Lauge auf Grund einer gewissen Pufferkapazität abschwächen.

Für *Milz- und Lebergewichtsbestimmungen* sowie *Zell- und Kernmessungen* wurden von SEISS und STEGMANN neue Methoden entwickelt, die eine Objektivierung der vorliegenden Befunde nach eingehenden Studien am Normaltier ermöglichen. Außerdem wurden laufend *Blut-eiweißbestimmungen* durchgeführt. Darüber hinaus erschien es wünschenswert, in den Zellstoffwechsel selbst mit Hilfe neuer cytochemischer Methoden einen Einblick zu gewinnen. Wegen der großen Bedeutung der *Nucleinsäuren*, vor allem auch der cytoplasmatischen Nucleotide für Zellvermehrung, Zellwachstum und Stoffwechselleistung wurde deren Verhalten mit Hilfe des Brachet-Testes in der Leber im Verlauf der Versuche untersucht. Die cytochemische Untersuchung sollte vor allem eine Ergänzung der quantitativ morphologisch erfaßten Zell- und Gewebsveränderungen darstellen. Außerdem wurde damit gerechnet, daß sie vielleicht eine Brücke zwischen dem morphologischen und humoralen Geschehen schlagen könnte.

II. Methodik.

133 männliche weiße Mäuse aus eigener Zucht mit über 18 g Körpergewicht wurden in verschiedenen Gruppen mit Eiweiß in Form von getrocknetem, pulverisiertem Pferdeblutplasma oder Casein (jeweils 3 g gemischt mit 1 g Hafer je Tag und Tier), sowie eine 3. Gruppe allein mit Hafer 1 Woche vorgefüttert. Unter Weiterführung der jeweiligen Fütterung wurde dann 3,5%iges Casein in 0,3%iger Natronlauge jedem Tier in Mengen von 0,5—0,7 cm³ unter die Rückenhaut an 5 aufeinanderfolgenden Tagen injiziert. Nach 2 Tagen Pause Tötung durch Dekapitation (Stufenversuch 5) oder Fortsetzung der Injektionen (Stufenversuch 10 = 2 Wochen Behandlung, Stufenversuch 15 und 20 mit 3 bzw. 4 Wochen Behandlungsdauer). Fortlaufende Gewichtskontrolle. Jeweils 2 Tage nach der letzten Injektion wurden die Tiere getötet und gleichmäßig ausgeblutet. Auffangen des Blutes und Endbestimmung der Bluteiweißwerte nach der nephelometrischen Mikromethode von SCHNEIDER. Bei 4 Wochen Versuchsdauer außerdem laufende Bestimmung der Bluteiweißwerte (Bestimmung am Anfang, nach 10 und 20 Injektionen).

Bestimmung von Leber- und Milzgewicht sowie Lebervolumen (10 mg bzw. 10 mm³ Genauigkeit). Fixierung der Organe in Susa, zeitlich gleiche Einbettung der Leber über Chloroform in Paraffin mit Schrumpfungsbestimmung. An Hämalaun-Eosin-gefärbten 7,5 μ dicken Schnitten Auszählung der mit Kern geschnittenen Leberzellen (X) und der Endothelzellen (B) in einem konstanten Flächenquadrat (a^2) bei gleicher Vergrößerung. Bestimmung der Kernfläche der Leberzellen in einer konstanten Fläche als Ausdruck der Kernplasmarelation und Anlegen einer Kernvariationskurve unter Beziehung auf die konstante Fläche. Die Grundlagen und Einzelheiten dieser Methodik sind in einer früheren Veröffentlichung einzusehen (SIESS und STEGMANN).

Zur Darstellung der Ribonucleinsäuren (RNS) kam die Methode von BRACHET zur Anwendung. Für ihre Grundlage wird auf die Arbeiten von BRACHET verwiesen. Eine Darstellung im deutschen Schrifttum findet sich unter anderem bei NOLTE und GÖSSNER. Die Leberstückchen wurden in CARNOYScher Lösung fixiert, in Paraffin eingebettet und die Schnitte mit Methylgrün-Pyronin gefärbt. Zur Fermentbehandlung stand ein krystallisiertes Ribonucleasepräparat¹ zur Verfügung. Es kam in einer Konzentration von 0,1 mg/cm³ bei pH 6,8 (Veronal-Acetatpuffer) zur Anwendung. Die Fermenteinwirkung erfolgte 1/2 Std bei 56° C. Nach der Fermentbehandlung sind in der Leber sämtliche mit Pyronin färbbaren Substanzen geschwunden, es ist nur noch das Chromatin der Kerne in blaugrüner Farbe (Methylgrün) dargestellt. Da dieses Verhalten bei zahlreichen Versuchen eine völlige Übereinstimmung ergab, wurde vor allem auch wegen der nur in beschränkter Menge zur Verfügung stehenden Ribonuclease auf eine Fermentbehandlung aller Schnitte verzichtet.

Die Untersuchungen umfassen somit bei allen 3 Fütterungsgruppen in vier Stufenversuchen von je 6—23 Tieren Vergleichswerte makroskopischer und mikroskopischer, quantitativer und cytologischer Beobachtungen an Leber und Milz sowie humoraler Veränderungen des Bluteiweißes bei denselben Tieren.

Für die statistische Auswertung verwandten wir den arithmetischen Mittelwert (M), die mittlere Abweichung vom Mittelwert (σ) und den mittleren Fehler des Mittelwertes (m) entsprechend den Angaben von GEBELEIN sowie RÖSSLER und ROULET.

III. Ergebnisse.

A. Quantitativ-morphologische Veränderungen an der Leber.

1. Körpergewicht und relatives Lebergewicht.

Um eine dynamische Vorstellung von den Gewichtsverschiebungen der Leber während eines Zeitraumes zu bekommen, ist es notwendig, Körpergewicht und Lebergewicht zueinander in Beziehung zu setzen und das relative *Lebergewicht* (Lebergewicht in Milligramm zu Körpergewicht in Gramm) zu bestimmen. Wir berechneten an 56 Normaltieren unserer Zucht unter Mischfütterung mit Milch, Brot und Hafer sowie auch bei reiner Haferfütterung den Mittelwert des relativen Lebergewichtes mit 45,8 mg/g bei einer mittleren Abweichung des Mittelwertes von $\sigma \pm 4,5$ mg/g und einen mittleren Fehler des Mittelwertes von $m \pm 0,6$ mg/g. Bei eiweißgefütterten Tieren (Plasma oder Casein) liegt dieser Mittelwert etwas höher, aber noch innerhalb der Streubreite

¹ Für die Überlassung dieses Präparates sind wir Herrn Doz. Dr. FRIEDRICH-FREKSA, Kaiser-Wilhelm-Institut für Biochemie, Tübingen, zu Dank verpflichtet.

der Differenz der Mittelwerte. Die verhältnismäßig große physiologische Streubreite dürfte zum Teil dadurch bedingt sein, daß nach Untersuchungen von HOLMGREN und FORSGREN das Lebergewicht im Verlauf der Sekretions- und Assimilationsphase gewisse Tagesschwankungen aufweist. Es sind daher für geringere Abweichungen des relativen Lebergewichtes vom Mittelwert innerhalb einer Versuchsreihe statistische Erhebungen nötig, um festzustellen, ob die Streubreite überschritten wird. Doch ergeben die Mittelwerte der verschiedenen Stufenversuche einen guten Einblick in die Verschiebungen des relativen Lebergewichtes, zumal auch die einzelnen Werte innerhalb eines Versuches sich meist sehr ähnlich verhalten.

Das *Körpergewicht* nimmt nach der Umstellung von der normalen Mischfütterung auf Eiweißfütterung in den ersten Tagen etwas ab, doch ist dieser Gewichtsabfall bald ausgeglichen oder sogar überholt, so daß zu Beginn der Injektionen das Ausgangsgewicht meist überschritten war.

Mit *Häfer* gefütterte Tiere zeigten nach 5 Injektionen eine Gewichtszunahme um 1—3 g, nach 10 Injektionen um 1—4 g, nach 15 Injektionen zeigt sich keine deutliche Gewichtsverschiebung, während nach 20 Injektionen die Gewichtszunahme mit 2 und 4 g wieder sehr deutlich ist. Dies drückt sich auch im Mittelwert der prozentualen Gewichtsunterschiede zwischen Anfangs- und Endgewicht in Tabelle 1 aus. Die Körpergewichtsverschiebungen bei den Häfertieren zeigen gleiches Verhalten, wie es schon früher LETTERER beobachtet hat.

Das *relative Lebergewicht* liegt bei den *Häfertieren* in den ersten 3 Wochen der Behandlung innerhalb des normalen Mittelwertes. Erst nach 4 Wochen Behandlungsdauer überschreitet der Mittelwert mit 58 mg/g die Streuung wesentlich. Da wir also bei gleichbleibendem relativem Lebergewicht in den ersten 3 Wochen eine deutliche Körpergewichtszunahme erkennen, wächst in dieser Zeit auch das absolute Lebergewicht in proportioniertem Verhältnis zum Körpergewicht. Nach 20 Injektionen dagegen ist die Zunahme des Lebergewichtes im Verhältnis zum Körpergewicht wesentlich stärker.

Mit *Plasma* und *Casein* gefütterte Tiere zeigen während der Behandlung unterschiedliche *Körpergewichtsbewegungen*. Oft wird das Anfangsgewicht etwas überschritten, doch finden wir auch ein Absinken unter den Ausgangswert, so daß die prozentuale Gewichtsverschiebung nicht sehr deutlich ist. Das Absinken des Körpergewichtes beträgt aber höchstens 1—2 g, so daß eine scheinbare Vergrößerung des relativen Lebergewichtes nicht vorgetäuscht werden kann.

Die Mittelwerte der *relativen Lebergewichte* innerhalb der verschiedenen Behandlungszeiten zeigen eine sehr deutliche Zunahme, die von der Zahl der Injektionen und der Stärke der örtlichen Absceßbildung an der Injektionsstelle abhängig ist. So sahen wir bei mit Casein gefütterten

Tieren, die infolge einer bakteriellen Mischinfektion mit hämolytischen Streptokokken eine stärkere Absceßbildung zeigen, schon sehr frühe abnorm hohe relative Lebergewichte (70—90 mg/g) auftreten, die weit außerhalb des Zufallsbereiches liegen. Auch hier ist das Körpergewicht nie wesentlich unter den Ausgangspunkt gesunken. Das absolute Lebergewicht überschreitet bei einem Teil der Tiere das kritische Lebergewicht normaler, unbehandelter Tiere (1400 mg) ganz beträchtlich und erreicht Werte bis zu 2300 mg (20 Injektionen). Schwächere örtliche Reaktionen, die meist aus derben, weißlichen Schwielenbildungen im Unterhautbindegewebe bestehen, waren von weniger hohen relativen Lebergewichten begleitet, die aber immer noch oberhalb der Streubreite der Normaltiere liegen. Man gewinnt den Eindruck, daß die mit Casein gefütterten Tiere zu stärkeren örtlichen Reaktionen neigen und dabei auch etwas höhere relative Lebergewichte besitzen als die mit Plasma gefütterten Tiere. In einer besonderen Versuchsreihe mit je 15 Mäusen hat sich dieser Befund nach 20 Injektionen nochmals bestätigt.

Wir können also bei *eiweißgefütterten Tieren* während der Spritzenbehandlung mit Na-Casein unter Berücksichtigung von Körpergewicht und relativem Lebergewicht eine sehr starke Zunahme des absoluten Lebergewichtes während der Injektionszeit feststellen. Diese Zunahme verläuft unproportioniert zum Körpergewicht und entspricht in extremen Fällen einer *Verdoppelung* des ursprünglichen Lebergewichtes vor der Injektionsbehandlung. Aus Tabelle 1 ist ersichtlich, daß die Zunahme nach 5 Injektionen noch verhältnismäßig gering ist, nach 10 Injektionen aber beträchtliche Werte erreicht. Die prozentuale Zunahme des relativen Lebergewichtes gibt im Mittelwert der Versuchsreihe jeweils auch die prozentuale absolute Gewichtszunahme der Leber an. Dabei ist der prozentuale Anteil der Körpergewichtszu- bzw. -abnahme noch mit einzubeziehen (Tabelle 1).

Zusammenfassend können wir also feststellen, daß es im Verlauf der Behandlung bei fast allen Tieren zu einer *absoluten Gewichtszunahme der Leber* kommt, die statistisch gesichert ist; dieselbe ist bei mit Hafer gefütterten Tieren zunächst gering und steht im proportionierten Verhalten zum Körpergewicht im Rahmen des Gesamtwachstums. Erst nach 20 Injektionen wird sie stärker und verhält sich zum Körpergewicht unproportioniert. Bei eiweißgefütterten Tieren dagegen tritt rasch, schon innerhalb der ersten 14 Tage, eine deutliche unproportionierte Lebervergrößerung ein, welche in Abhängigkeit zur örtlichen Absceßbildung steht. Nach Caseinfütterung werden meist stärkere örtliche Reaktionen und etwas schwerere Lebern als nach Plasmainweißfütterung beobachtet. Die Lebervergrößerung kann in extremen Fällen nach 20 Injektionen 100% des Anfangsgewichtes betragen.

Tabelle 1.
1. Körpergewicht.

Fütterung:	Verschiebung des Körpergewichtes in % des Anfangsgewichtes (Mittelwerte)			
	nach 5	10	15	20 Injektionen
Hafer	+ 7	+ 13	- 4	+ 13
Plasma	+ 5	- 3	+ 2	- 0,5
Casein	{ - 0,3	+ 1,5	± 0	± 0 schwache örtliche Reaktion
		- 0,7	-	- 7 starke örtliche Reaktion

2. Relatives Lebergewicht.

Fütterung:	Mittelwerte des relativen Lebergewichtes in mg/g (mittlere prozentuale Abweichung vom Mittelwert)			
	nach 5	10	15	20 Injektionen
Hafer	47 (+ 4)	46 (+ 2)	45 (- 2)	58 (+ 28)
Plasma	49 (+ 8)	61 (+ 35)	51 (+ 11)	55 (+ 22)
Casein	{ — 57 (+ 26)	55 (+ 22)	56 (+ 24)	63 (+ 40) schwache örtliche Reaktion 70 (+ 55) — 84 (+ 86) starke örtliche Reaktion

3. Zunahme des absoluten Lebergewichtes.

Fütterung:	Zunahme des absoluten Lebergewichtes in %			
	nach 5	10	15	20 Injektionen
Hafer	+ 11	+ 15	- 6	+ 41
Plasma	+ 13	+ 32	+ 13	+ 21,5
Casein	{ - + 25,7	+ 23,5	+ 24	+ 40 schwache örtliche Reaktion
		+ 54,3	-	+ 79 starke örtliche Reaktion

Die Größenordnung des mittleren Fehlers der Mittelwerte (errechnet aus Streubreite und Anzahl der Versuchstiere) schwankt naturgemäß innerhalb der einzelnen Versuchsgruppen. Der mittlere Fehler der Mittelwerte bei 1. beträgt etwa 1,5%, bei 2. 1-3%.

2. Gewichtszunahme und Wassergehalt von Leber und Gesamtkörper behandelter und unbehandelter Tiere unter Haferfütterung.

Die Frage, ob die Zunahme des Leber- wie die des Körpergewichtes auf einer einseitigen Vermehrung des Wassergehaltes oder auf einer echten Substanzvermehrung beruht, wurde in einer gesonderten Versuchsreihe geprüft.

Sechs männlichen Mäusen wurden unter Haferfütterung nach 1 Woche 2 Serien von je 5 Injektionen Na-Casein verabfolgt (Behandlungsdauer 14 Tage). Fünf Vergleichstiere von gleicher Größe unter denselben Fütterungsbedingungen blieben ohne Injektionen. Laufende Gewichtskontrolle, Tötung wie in den anderen Versuchen. Bestimmung des Frischgewichtes und des Trockengewichtes (3 Tage 100° C Trockenofen, Exsiccator bis zur Gewichtskonstanz) von Leber und Körper. Berechnung des Wassergehaltes der Leber nach der Formel:

$$\frac{(\text{Leberfrischgewicht} - \text{Lebertrockengewicht}) \cdot 100}{\text{Leberfrischgewicht}} \%$$

Der Wassergehalt des Körpers (ohne Magen-Darmtrakt) wurde analog berechnet. Die statistische Auswertung ergibt folgendes:

a) Zunahme des Körpergewichtes:

	Anfangsgewicht in g <i>M</i>	Endgewicht in g <i>m</i>	Zunahme <i>D_K</i> g %	mittl. Abw. σ_D g	$\frac{D_K}{\sigma_D}$
5 Kontrolltiere . . .	$18,9 \pm 0,18$	$19,4 \pm 0,37$	$0,5 + 2,6$	0,52	0,9
6 behandelte Tiere . . .	$18,9 \pm 0,18$	$20,25 \pm 0,14$	$1,35 + 7,1$	0,22	6,1

Während bei Kontrolltieren keine Zunahme des Körpergewichtes stattfindet, welche die normale Streubreite überschreitet, sehen wir bei behandelten Tieren eine statistisch gesicherte Zunahme von 7,1%.

b) Zunahme des Lebergewichtes.

Die absolute Zunahme des Lebergewichtes errechneten wir wieder aus der prozentualen Zunahme des Körpergewichtes und der prozentualen Erhöhung des relativen Lebergewichtes. Da diese Versuche 1 Jahr nach den übrigen Versuchen durchgeführt wurden, setzten wir als Normalwert das relative Lebergewicht unserer Kontrollreihe ein, das noch völlig im Streubereich des früheren Versuchsmittelwertes liegt. Für Kontrolltiere ergibt sich danach eine Zunahme des Lebergewichtes von 2,6%, die aber noch völlig im Streubereich des Anfangswertes liegt. Behandelte Tiere zeigen dagegen eine deutliche Lebergewichtszunahme von 19,1% während der Injektionen. Die Zunahme ist unter Einrechnung der kleinen Zahl der Versuchstiere statistisch knapp gesichert.

Wir errechneten die Lebergewichtszunahme noch nach einer zweiten einfacheren Methode. Das Anfangsgewicht der Leber ist im Mittelwert gleich dem normalen relativen Lebergewicht \times dem Mittelwert des Anfangskörpergewichtes. Die mittleren Fehler, umgerechnet in Prozent, ergeben addiert den neuen mittleren Fehler in Prozent und umgerechnet auch absolut. Die Lebergewichtszunahme ergibt danach:

	Leberendgewicht	Leberanfangsgewicht	Zunahme <i>D</i>
5 Kontrolltiere . . .	$M 845 \text{ mg } m \pm 40,03 \text{ mg}$	$(43,4 \cdot 18,9) \text{ mg} = 820 \text{ mg}$ $m \pm 31,6 \text{ mg}$	$+25 \text{ mg} = 3\%$ $\sigma_D = 51,2$ $D/\sigma_D = 0,48$
6 behandelte Tiere . . .	$M 986 \text{ mg } m \pm 40,04 \text{ mg}$	$= 820 \text{ mg}$ $m + 31,6 \text{ mg}$	$+166 \text{ mg} = 20\%$ $\sigma_D = 51,5 \text{ mg}$ $D/\sigma_D = 3,2$

Die Werte sind also praktisch identisch mit denen der anderen Methode und ebenfalls statistisch als signifikant anzusehen. Während also bei den Kontrollen keine wesentliche Vergrößerung der Leber stattfindet, beträgt diese bei behandelten Tieren rund 20%.

c) Verschiebung des Wassergehaltes.

	Wassergehalt	
	des Körpers	der Leber
Normaltiere	65,3 %, $\sigma^2 = 1,46\%$	69,7 %, $\sigma^2 = 0,98\%$
Behandelte Tiere . . .	66,6 %, $\sigma^2 = 4,6\%$	71,2 %, $\sigma^2 = 0,37\%$
Zunahme des Wassergehaltes <i>D</i>	1,3 %, $\sigma_D = 1\%$ $D/\sigma_D = 1,3$	1,5 %, $\sigma_D = 0,52\%$ $D/\sigma_D = 2,9$

Der Wassergehalt des *Körpers* zeigt bei behandelten Tieren keine wesentliche Erhöhung, die außerhalb der normalen Fehlerbreite fällt. Der Wassergehalt der

Leber behandelter Tiere ist um 1,5% höher als der der Kontrollen. Dieser Wert liegt an der oberen Grenze der Streubreite, ist aber noch nicht statistisch gesichert. Er kann auch nicht die Differenz von 17% zwischen der Gewichtszunahme der Lebern behandelter Tiere und der Kontrollen erklären. Es ergibt sich daraus, daß die *Zunahme des Leber- und Körpergewichtes behandelter Tiere* auf einer im wesentlichen *proportionierten Substanz- und Wasserzunahme* beruht. Eine einseitige Wassergehaltszunahme liegt sicher nicht vor.

3. Formalgenetische Analyse der Lebervergrößerung.

Es entsteht nun die Frage, auf welche formalgenetische Weise die zum Teil recht beträchtliche *Vergrößerung des Lebergewichtes* im Verlauf der Injektionsbehandlung zustande kommt. Theoretisch kann sie durch Vergrößerung der vorhandenen Leberzellen (Volumenwachstum), durch Zellvermehrung (Teilungswachstum) oder durch die Kombination beider Vorgänge bedingt sein. Eine gewisse Rolle könnte schließlich noch die Vermehrung des Mesenchyms im Verlauf der Injektionsbehandlung in Form von Proliferationsherden oder reiner Endothelvermehrung spielen. Diese ist jedoch nach unseren Berechnungen gewichtsmäßig ohne Einfluß. Erst bei hochgradigem Umbau, unter Umständen nach Amyloid-einlagerung, wie wir es bei wenigen Tieren sahen, ist auch dieser Faktor zu berücksichtigen.

In ausgedehnten Untersuchungen (SIESS und STEGMANN) an unbehandelten Mäusen derselben Zucht fanden wir, daß in der normalen Mäuseleber die Leberzellzahl während des größten Teiles der Wachstumszeit *konstant* (~ 66 Millionen) bleibt und das normale Leberwachstum innerhalb der Gewichtsklassen von 200—1400 mg Lebergewicht auf einer *Vergrößerung der vorhandenen Zellen* beruht. Der zugehörige Capillar- und Bindegewebsraum verbleibt in konstantem Verhältnis zum Leberparenchym. Der An- und Abbau von Leberparenchymzellen erfolgt in dieser Zeit sehr langsam, wie aus der geringen Anzahl der Mitosen in normalen Mäuselebern geschlossen werden kann. Mit 1400—1500 mg erreicht die Leber normaler erwachsener Mäuse ihr *kritisches Gewicht*; schwerere Lebern sahen wir bei *normalen* Mäusen selbst von 30 g Gewicht nicht.

Wie reagiert nun die Leber auf eine länger dauernde Stoffwechselbelastung, die, wie unsere Versuche zeigen, durch die Erzeugung steriler Abscesse eintritt? Offenbar besitzt die Leber eine ziemlich ausgedehnte Kompensationsbreite, bei der unter anderem auch Ernährungsfaktoren eine Rolle spielen. Daher ist erst nach wiederholten Injektionen während einer längeren Versuchsdauer und auch nicht bei allen Tieren mit einer Reaktion, die über die normale Fehlerbreite hinausgeht, zu rechnen.

Die Frage, ob eine Lebervergrößerung auf eine Vergrößerung der einzelnen Zellen (Volumenwachstum) oder auf eine Zellvermehrung (Teilungswachstum) zurückgeht, ist auf Grund der Beziehung *mittleres*

Zellvolumen zu absolutem Lebergewicht zu entscheiden. Ist das mittlere Zellvolumen, ausgedrückt durch die Zahl der mit Kern geschnittenen Leberzellen (X) in einer konstanten Flächeneinheit zu klein, oder mit anderen Worten, liegt die Leberzellzahl X (Kerndichte) über der normalen Kurve

$X = \frac{K}{\sqrt[3]{G^2}}$, so ist die Zunahme des Lebergewichtes nur durch eine Vermehrung der Leberzellen gegenüber der Norm zu erklären. Dabei ist Voraussetzung, daß die Kern-Plasmarelation, die Schrumpfungsbedingungen und damit auch das spezifische Gewicht sowie das Verhältnis von Capillarraum zu Leberparenchym keine einschneidende Verschiebung erfahren. Wir haben diese Faktoren in jeder Versuchsgruppe an einer Reihe von Tieren überprüft und keine Änderungen gefunden, welche die normale Fehlerbreite überschritten haben. Daß es sich nicht um zufällige, auch bei normalen Tieren vorkommende Abweichungen von X handelt, ist bei der großen Zahl der untersuchten Normaltiere, die nie solche Abweichungen ergaben, erwiesen. Der Capillarraum ändert sich bei der unter der Injektionsbehandlung einsetzenden Endothelproliferation zunächst in seinem Verhältnis zum Leberparenchym nicht, da auch bei verschieden großer Endothelzellzahl B der Wert X im Bereich der Norm bleibt. Zufälliges Zusammentreffen zweier gegensinniger Faktoren wie Zellvermehrung und relative Capillarraumvergrößerung, die theoretisch möglich wären, halten wir für unwahrscheinlich. Man dürfte bei behandelten Tieren für solche Fälle kein gesetzmäßiges Verhalten für X mehr erwarten, außerdem müßte eine Capillarraumerweiterung auch eine Änderung der Kernfläche je Flächeneinheit hervorrufen, was ebenfalls nie eintrat.

Wie aus den beiliegenden Skizzen (Abb. 1) hervorgeht, kann auf *absolute Gewichtszunahme* der Leber *nur* aus dem Verhalten des Körpergewichtes und des relativen Lebergewichtes zugleich geschlossen werden: Bleibt die Zunahme des Lebergewichtes im proportionalen Verhältnis zum Körpergewicht oder, mit anderen Worten, nimmt das Körpergewicht zu, ohne Verschiebung des relativen Lebergewichtes, so sprechen wir von proportionierter Zunahme des absoluten Lebergewichtes (physiologisches Wachstum). Wächst dagegen das relative Lebergewicht wesentlich an, so sprechen wir von unproportionierter Zunahme (gesteigertes Wachstum), welches ein Maß für die Zunahme des absoluten Lebergewichtes in dem gegebenen Zeitraum darstellt. So besagt bei gleichbleibendem Körpergewicht die Zunahme des relativen Lebergewichtes von 45 mg/g auf 90 mg/g, daß die Leber ihr Gewicht verdoppelt hat.

Entspricht nun bei einer Lebergewichtszunahme das *mittlere Zellvolumen* (ausgedrückt durch die Kerndichte) dem Normalwert für dieses Gewicht, so beruht die Vergrößerung bei konstant bleibender Zellzahl

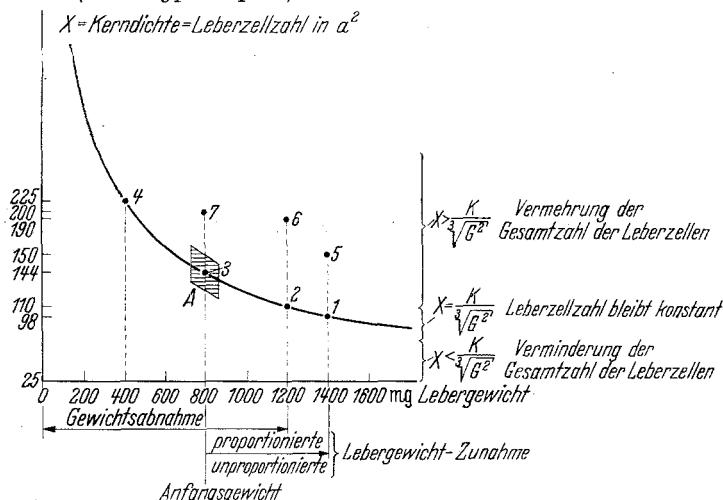
Makroskopisch ²			Mikroskopisch ²		
			Gesamtzahl der Leberzellen (Beziehungen zwischen absolutem Lebergewicht und mittlerem Zellvolumen)		
			Konstant	erhöht	erniedrigt
Körpergewicht während des Versuches	Relatives Lebergewicht (Körperendgewicht)	Absolutes Lebergewicht während des Versuches	$X = \frac{K}{\sqrt[3]{G^2}}$	$X > \frac{K}{\sqrt[3]{G^2}}$	$X < \frac{K}{\sqrt[3]{G^2}}$
Zunahme gleichbleibend	erhöht	unproportionierte Zunahme	(1) <i>Hypertrophie</i> = unproportioniertes Volumenwachstum	(5) <i>Hyperplasie</i> = unproportioniertes Teilungswachstum	(Zellverminderung ¹ bei Gewichtszunahme)
Abnahme	erhöht	proportionierte Zunahme	(2) <i>Eudystrophie</i> = proportioniertes Volumenwachstum = physiologisches Wachstum	(6) <i>Euplasie</i> = proportioniertes Teilungswachstum	(Zellverminderung ¹ bei Gewichtszunahme)
Zunahme gleichbleibend	gleichbleibend	gleichbleibend	(3) gleichbleibend	(7) <i>Isoplasie</i> Zellvermehrung bei gleichbleibendem Gewicht	(Zellverminderung ¹ bei gleichbleibendem Gewicht)
Abnahme gleichbleibend	gleichbleibend	gleichbleibend	(4) <i>proportionierte einfache Atrophie</i> = proportionierte Volumenabnahme	(Zellvermehrung ¹ bei Gewichtsabnahme)	(proportionierte ¹ numerische Atrophie)
Zunahme gleichbleibend	erniedrigt	unproportionierte Abnahme	<i>unproportionierte einfache Atrophie</i> = unproportionierte Volumenabnahme	(Zellvermehrung ¹ bei Gewichtsabnahme)	(unproportionierte ¹ numerische Atrophie)
Abnahme	erniedrigt				

¹ In bisherigen Versuchen nicht festgestellte Kombinationen. Die eingeklammerten Zahlen (1—7) beziehen sich auf die Abbildungen.

² Alle Definitionen (Hypertrophie, Hyperplasie usw.) beziehen sich auf das gesamte Organ, nicht auf die einzelne Zelle.

Abb. 1a. Formalgenetische Analyse des Leberumbauens.

auf einer Vergrößerung der vorhandenen Zellen. Dies kann proportioniert in Form des normalen Volumenwachstums (2 = *Eutrophie*) — wie die schon erwähnten Untersuchungen an Normaltieren erweisen — verlaufen oder unproportioniert als gesteigertes (pathologisches) Volumenwachstum (1 = *Hypertrophie*) wie bei einem Teil unserer Versuchstiere.

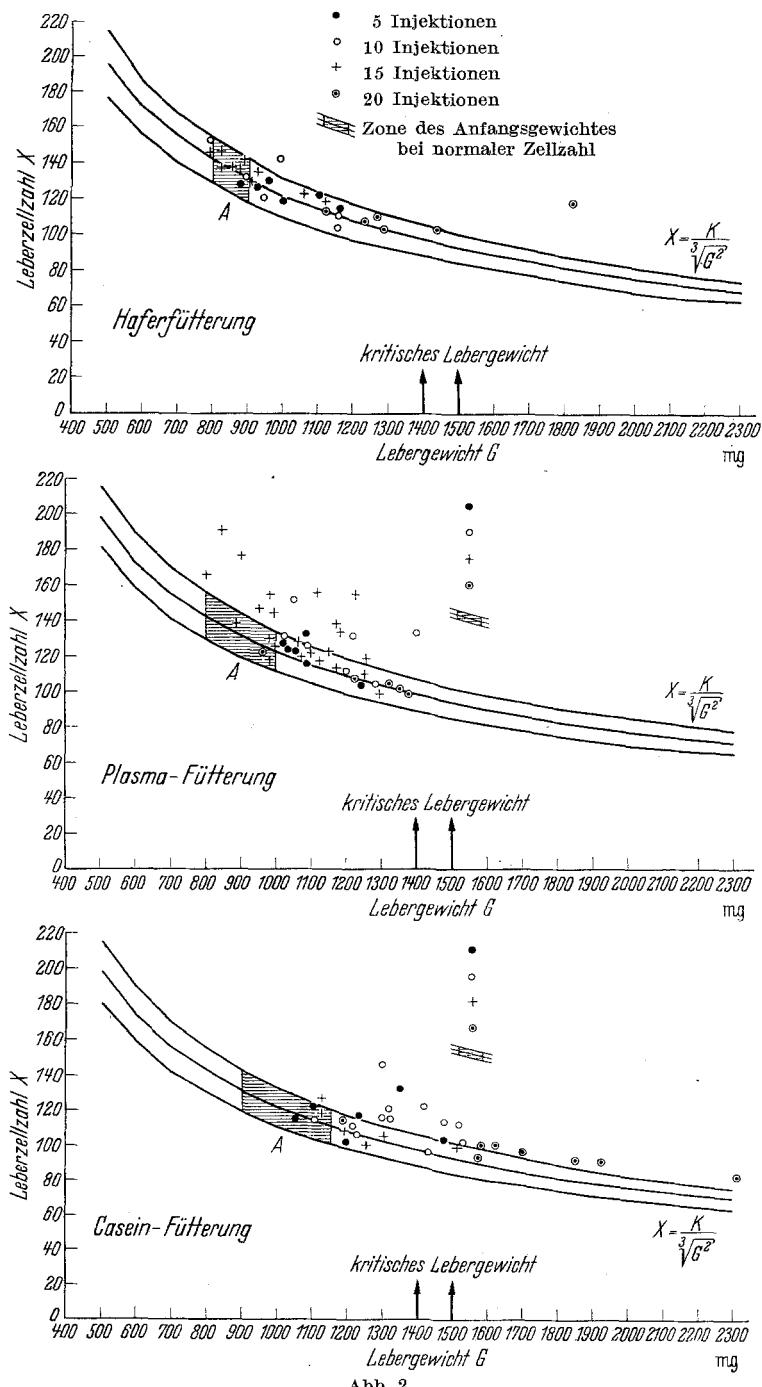


	Lebergewicht <i>G</i> (mg)	X-Kerndichte = Leberzell- zahl in a^2	Veränderung des Leber- gewichtes \pm mg	
A	800	147		Anfangsgewicht
I	1400	98	+600	Hypertrophie
2	1200	110	+400	Eutrophie
3	800	144	\pm 0	gleichbleibend
4	400	225	-400	Atrophie
5	1400	150	+600	Hyperplasie
6	1200	190	+400	Euplasie
7	800	200	\pm 0	Isoplasie

Die Veränderungen des Lebergewichtes sind durch das Verhalten von Körpergewicht und relativem Lebergewicht bestimmt.

Abb. 1 b. Zahlenbeispiel zur formalgenetischen Analyse des Leberumbauens.

Liegt dagegen die Zellzahl *X* über der Normalkurve der betreffenden Gewichtsklasse, so liegt eine *Zellvermehrung* vor. Eine solche Erhöhung der Zellzahl gegenüber der bei normalen unbehandelten Tieren braucht durchaus nicht immer mit einer Gewichtszunahme der Leber einherzugehen, sie könnte sogar theoretisch mit einer Gewichtsabnahme der Leber verbunden sein. Bei einer gleichzeitigen proportionierten Lebergewichtszunahme liegt also ein Teilungswachstum (6 = *Euplasie*) vor, das, wie schon ausgeführt, bei Normaltieren in dieser Form nicht beobachtet wird. Als *Hyperplasie* (5) wäre dann ein Teilungswachstum, das



mit einer unproportionierten, gesteigerten Gewichtszunahme der Leber verbunden ist, zu bezeichnen. Werte unterhalb der Normalkurve, die einer Zellzahlverminderung entsprechen würden, sahen wir in unseren Versuchen nicht, sie würden bei gleichzeitiger Organverkleinerung eine numerische Atrophie bedeuten.

Es ergibt sich somit die Tatsache, daß Organveränderungen nur unter gleichzeitiger Berücksichtigung *makroskopischer* und *mikroskopischer* Meßwerte formalgenetisch erfaßt werden können, wobei dann die Notwendigkeit entsteht, die bisher geläufigen Begriffsbestimmungen der allgemeinen Pathologie schärfer zu umreißen bzw. zu ergänzen. Nach der üblichen Terminologie versteht man unter *Hypertrophie* eine über das „Normale“ hinausgehende Organvergrößerung durch Vergrößerung der einzelnen Zellen, unter *Hyperplasie* eine solche durch Zellvermehrung. Auf Grund der obigen Ausführungen sollten diese beiden Begriffe aber nur für die *unproportionierten Organvergrößerungen*, bei der Hypertrophie also für *unproportioniertes Volumenwachstum*, bei der Hyperplasie für *unproportioniertes Teilungswachstum* angewandt werden. Handelt es sich dagegen um *proportionierte Organvergrößerung*, so sprechen wir von *Eutrophie* als dem normalen physiologischen Volumenwachstum, von *Euplasie* als proportioniertem Teilungswachstum. Außerdem besteht die Möglichkeit, daß Zellvermehrung in einem Organ *ohne* gleichzeitige Organvergrößerung stattfindet, wobei dann natürlich das Zellvolumen kleiner werden muß. Für diesen Vorgang wollen wir die Bezeichnung „*Isoplasie*“ (Nr. 7 der Abb. I) anwenden. In analoger Weise muß bei *Organverkleinerungen* zwischen proportionierter und unproportionierter Atrophie unterschieden werden. Liegt der Atrophie eine Volumenverminderung der Zellen zugrunde, handelt es sich um eine *einfache*, nimmt die Zellzahl ab, um eine *numerische Atrophie*.

Bei etwa 32% unserer Versuchstiere war nun das mittlere Zellvolumen für das Lebergewicht zu klein, die Zellzahl X lag oberhalb der Fehlergrenze der Normalkurve (Abb. 2). Es hatte also eine Zellvermehrung stattgefunden, die nicht erst bei Erreichung des kritischen Lebergewichtes auftrat, sondern auch schon bei kleinen Lebern von 900 mg beobachtet werden konnte. Meistens erfolgte die Zellvermehrung unter unproportionierter Vergrößerung des absoluten Lebergewichtes (Hyper-

Abb. 2. Die Leberzellzahl X (im konstanten Meßquadrat) in Beziehung zum absoluten Lebergewicht G . Die Kurve mit der beiderseitigen Begrenzung durch die Fehlerbreite entspricht dem Verhalten von X während des normalen Wachstums (konstante Gesamtzellzahl und Vergrößerung des mittleren Zellvolumens). Werte von X oberhalb der Fehlerbreite drücken eine Vermehrung der Gesamtzellzahl aus. Das mittlere Zellvolumen ist dabei für das entsprechende Lebergewicht zu klein. Beachte die Verschiebung des absoluten Lebergewichtes während der Behandlung und das Überschreiten des kritischen Lebergewichtes bei Caseinfütterung. Leberzellzahl X und zugehöriges Lebergewicht nach 5, 10, 15 und 20 Injektionen. A Zone der errechneten Anfangsgewichte bei normaler Gesamtleberzellzahl.

plasie), doch finden sich auch Fälle, in denen das Lebergewicht nur geringfügig zunimmt (Euplasie) oder sich nicht ändert (Isoplasie), während eine Abnahme des Lebergewichtes bei gleichzeitiger Zellvermehrung nicht nachgewiesen werden konnte. Am häufigsten trat die Zellvermehrung bei Tieren mit starker örtlicher Reaktion und starker Lebergewichtsvergrößerung auf. Wie aus Abb. 2 und Tabelle 2 ersichtlich ist, kommt es fast ausnahmslos bei plasma- und caseingefütterten Tieren zur Hyperplasie, während diese bei Haferfütterung nur zu einem geringen Prozentsatz zu finden ist. Man gewinnt dabei den Eindruck, daß nach 10 und 15 Injektionen der Gipfel der Hyperplasie überschritten ist und die Normalleberzellzahl wieder angestrebt wird. Die weitere Gewichtszunahme der Leber nach 20 Injektionen beruht in der Hauptsache wieder auf Zellvergrößerung. Nur die Tiere, welche das kritische Lebergewicht überschreiten, zeigen weiterhin eine gewisse Zellvermehrung, die jedoch bei großem mittlerem Zellvolumen (Abb. 2) meist nur gering bleibt.

Eine Beziehung zum Auftreten der Amyloidose zeigt sich bei beiden geschilderten Vorgängen *nicht*. Hypertrophie, Vermehrung der Leber-

Tabelle 2. Anzahl der Tiere mit Volumenwachstum und Teilungswachstum der Leber.

Fütterung	Zahl der Injektionen	Volumenwachstum		Teilungswachstum	
		Eutrophie	Hyper-trophie	Iso- bzw. Euplasie	Hyper-plasie
Hafer	5	5	1	—	—
	10	2	3	—	—
	15	9	1	1	—
	20	—	5	—	1
Plasma	5	3	2	1	—
	10	—	3	—	3
	15	3	10	7	3
	20	—	6	—	—
Casein bei schwacher örtlicher Reaktion	10	—	4	—	2
	15	—	5	—	1
	20	—	2	—	—
Casein bei starker örtlicher Reaktion	5	—	4	—	2
	10	—	1	—	5
	20	—	(6) (geringe Hyperplasie)	—	(6)
Insgesamt 101 Tiere, davon		22	47	9	32 23

Aufgliederung nach Fütterung.
Tierzahl

Hafer	28	16 (58 %)	10 (35 %)	2 (7 %)
Plasma	41	6 (16 %)	21 (51 %)	14 (33 %)
Casein	32	—	16 (50 %)	16 (50 %)

zellzahl mit oder ohne Vergrößerung der Leber treten völlig unabhängig von ihr auf.

Welche Rolle spielen nun Mitose und Amitose bei der beobachteten Leberzellvermehrung behandelter Tiere? Während bei Normaltieren nur sehr selten *Mitosen* der Leberzellen zu finden sind (etwa eine Mitose auf 20000—30000 Leberzellen), zeigt sich bei einer beträchtlichen Anzahl der behandelten Tiere ein gehäuftes Auftreten von Mitosen. Die Mitosenzahlen bewegen sich zwischen 0,1 und 0,7% und steigen in einem Fall sogar bis 1,5% an. Besonders häufig sind Mitosen nach 5 Injektionen bei hafer- und plasmagefütterten Tieren (60% der Tiere), während nach 10 Injektionen nur noch hafergefütterte Tiere Mitosen aufweisen.

Bei Caseinfütterung ist die Mitosevermehrung trotz starker Zellvermehrung selten. In einem Fall war sie allerdings auch nach 20 Injektionen noch deutlich. Es ist naheliegend, die Mitoservermehrung mit der Zellvermehrung in Zusammenhang zu bringen. Dazu muß aber gesagt werden, daß Tiere mit hoher Mitosezahl nicht unbedingt eine Zellvermehrung aufweisen müssen und umgekehrt, daß bei Tieren mit sehr starker Zellvermehrung nicht immer eine Vermehrung der Mitosen zu beobachten ist. Dies läßt zusammen mit dem unregelmäßigen Vorkommen von Mitosen überhaupt auf offenbar kurzdauernde Mitosewellen schließen, die wohl auf Stunden begrenzt sind, so daß es zum Teil vom Zufall abhängt, ob im Augenblick der Tötung solche gefunden werden oder nicht.

Mit zunehmender Zahl der Injektionen tritt gleichzeitig mit dem Rückgang der Zellvermehrung ein Rückgang der Mitosehäufung auf. Wahrscheinlich zeigt die verstärkte Mitosenzahl nur den verstärkten Umbau in der Leber an, der durchaus nicht sofort zu einer Überschüßbildung an Leberzellen führen muß. Offenbar tritt dieser gesteigerte Umbau unabhängig von der Fütterung bei allen Tieren ein. Eiweißgefütterte Tiere aber zeigen eine besondere Tendenz zur Zellvermehrung, während diese unter Haferfütterung nur gering ist.

Inwieweit *amitotische Zellteilungen* bei der Zellvermehrung eine Rolle spielen, läßt sich aus dem histologischen Bild kaum entscheiden, besonders auf Grund der Tatsache, daß die Amitosen ziemlich schnell ablaufen und daher in den histologischen Präparaten sicher nur in Ausnahmefällen erfaßt werden. Es ist also durchaus denkbar, daß auch amitotische Zellteilungen neben den Mitosen eine Rolle spielen. Wahrscheinlich kommt dabei den Mitosen die Bedeutung einer Regeneration nach gesteigertem Zellverschleiß zu, während die amitotische Zellteilung durch Oberflächenvergrößerung von Kern- und Zellgrenzflächen im Sinne von BENNINGHOFF und JACOBY eine mehr funktionelle Bedeutung im Sinne der akuten Leistungssteigerung haben werden. Die Schwierigkeiten bei der Beurteilung eines histologischen Präparates im Hinblick

auf die mitotischen und amitotischen Vorgänge liegen zum Teil auch in der bekannten Tatsache begründet, daß beide Vorgänge noch postmortal ablaufen können.

WILSON und LEDUC fanden eine Mitosenzunahme in Lebern weißer Mäuse sowohl nach plötzlicher Umstellung auf eiweißreiche Kost oder bei hungernden Tieren nach Wiedereinsetzen der Fütterung, desgleichen bei normal gefütterten Tieren nach Injektion von Organbrei (Leber und Niere oder Eigelb). Sie stellen außerdem zusammen mit der kurzdauernden Mitosenzunahme, die je nach den Versuchsbedingungen nach etwa 2—8 Tagen auftrat und eine beträchtliche Schwankungsbreite zeigte, auch eine Zunahme des Ribonucleinsäuregehaltes des Cytoplasmas der Leberzellen fest und glauben, daß die verstärkte Mitoseaktivität mit gesteigerter Eiweißsynthese in der Leber gekoppelt ist. Die Lebervergrößerung, die nach Eiweißfütterung auftritt, wird wegen der Mitosenzunahme als Folge der Zellvermehrung angesehen. Daneben kommt es aber auch zu deutlichen Zellvergrößerungen. Auch nach diesen Versuchen ist es jedoch nicht sicher zu entscheiden, ob die Mitosen nur einen gesteigerten Zellumbau darstellen, also Folge eines Regenerationsreizes sind, oder tatsächlich eine Hyperplasie zu Folge haben.

Für die Zahl der doppelkernigen Leberzellen lassen sich nach unseren Untersuchungen im Gegensatz zu MÜNZER u. a. keine besonderen Regeln aufstellen. Die Doppelkerne wechseln in ihrer Zahl oft innerhalb eines Schnittes, wobei aber das mittlere Zellvolumen gewahrt bleibt. Auch ist innerhalb der gleichen Versuchsreihe kein konstantes Verhalten nachweisbar. Bei hyperplastischen Lebern gewinnt man den Eindruck, daß die Zahl der doppelkernigen meist groß ist, während hypertrophe Formen oft weniger Doppelkerne aufweisen; doch gibt es dabei auch Übergänge.

Was die funktionelle Bedeutung dieser Vorgänge anbetrifft, so ist festzustellen, daß bei normalem Volumenwachstum und bei den hypertrophen Prozessen das Verhältnis der Zell- und Kerngrenzflächen zum Organvolumen zuungunsten der Grenzflächen verschoben ist, da diese prozentual geringer anwachsen als das Organvolumen. Bei der Zellvermehrung (Isoplasmie) bzw. bei der Hyperplasie findet aber eine relativ zum Organvolumen stärkere prozentuale *Grenzflächenvergrößerung* statt, also gerade umgekehrt wie bei dem Volumenwachstum. Je stärker die Zellvermehrung und je geringer die Gewichtszunahme der Leber ist, um so größer wird die prozentuale Grenzflächenvergrößerung gegenüber dem Organvolumen. Ist die Zellvermehrung dagegen gering, die Gewichtszunahme der Leber aber groß, so nähert sich das Verhältnis Grenzflächen zu Organvolumen demjenigen bei dem Volumenwachstum. Es handelt sich dann um die Kombination beider Vorgänge. Schlagwortartig drückt sich die Bedeutung des *Volumenwachstums* bzw. der *Hypertrophie in Substanzvermehrung*, die des *Teilungswachstums* bzw. der *Hyperplasie in Grenzflächenvergrößerung* aus. Das Verhältnis von Kern- zu Zellgrenzflächen innerhalb der Zelle bleibt bei beiden Vorgängen konstant, wenn man die Doppelkerne zunächst unberücksichtigt läßt. Eine

große Zahl von Doppelkernen bedeutet in jedem Fall lediglich eine Vergrößerung der Grenzfläche zwischen Kern und Plasma der Einzelzelle und damit günstigere Stoffaustauschbedingungen *innerhalb* der Zelle. Diese Erscheinung kann als ein Regulationsmechanismus im Sinne eines gesteigerten Betriebsstoffwechsels in der Zelle aufgefaßt werden, der seinerseits natürlich wieder aufs engste mit dem Leistungsstoffwechsel verknüpft ist. Oft fallen dunkle pyknotische Zellkerne in den Leberzellen auf, die fast ausnahmslos einen der Doppelkerne darstellen, während der andere Kern normale Strukturen besitzt. In seltenen Fällen findet man zwei dunkle Doppelkerne. Diese Erscheinung tritt unabhängig von der Fütterung auf und es erscheint durchaus möglich, daß auf diese Weise einer der Doppelkerne wieder verschwindet, ohne daß die ganze Zelle dem Untergang anheimfällt. Bei den mit Zellvermehrung einhergehenden Vorgängen kommt es sicher durch starke Vergrößerung sowohl der Kern- wie auch der Zellgrenzflächen zu einer raschen Anpassung an gesteigerte Stoffwechselbeanspruchungen, während den mit Zellvergrößerung einhergehenden Vorgängen analog der Vorstellung JACOBS eine mehr auf Dauerleistung gesteigerte Stoffwechselfunktion zukommt.

So können also in der Leber drei verschiedene, eng miteinander verknüpfte Regulationsmechanismen erkannt werden, die als Folge gesteigerter Stoffwechselbeanspruchung auftreten:

1. Die Begünstigung der Stoffaustauschbedingungen innerhalb der einzelnen Zelle durch Vergrößerung der Grenzflächen zwischen Kern und Cytoplasma (Doppelkerne).
2. Als Anpassung an eine gesteigerte Dauerleistung die Substanzvermehrung (Volumenwachstum — Hypertrophie).
3. Als Anpassung an akut gesteigerte Stoffwechselbeanspruchung im Leistungsstoffwechsel rasche Vergrößerung aller Grenzflächen durch Zellvermehrung (Isoplasie, Euplasie und Hyperplasie).

Nicht berücksichtigt sind dabei die in den Rahmen der Regeneration gehörenden Vorgänge, die durch vermehrten Zellverschleiß hervorgerufen werden. All diese Regulationen sind offenbar reversibel und lassen bei der Zellvermehrung, d. h. Isoplasie — Hyperplasie die eigenartige Tendenz zur *Rückkehr zur Zellzahlkonstanz* erkennen, die offenbar nur unter besonderen Bedingungen durchbrochen wird.

STOWELL fand bei hepatektomierten Ratten immer erst eine Volumenvergrößerung der Leberzellen und erst am 2. Tag traten Mitosen und Zellvermehrung auf. Nach 3 Tagen hat die Leber ihr ursprüngliches Volumen wieder erreicht. Wir könnten hier im Prinzip also ähnliche Regulationsvorgänge erkennen: Bei den hepatektomierten Tieren relativ verstärkte Belastung des restierenden Lebergewebes und Regenerationsreiz infolge Verlust von Lebergewebe, in unseren Versuchen absolute

Verstärkung der Stoffwechselbelastung und dadurch gesteigerter Zellverschleiß mit folgender Regeneration. In beiden Fällen versuchte Anpassung durch Volumenvergrößerung der Leberzellen und schließlich Zellvermehrung.

4. Die Leberkernvariation.

Der von JACOBJ geprägte Begriff des „Leistungswachstums“, der sich zunächst auf Kern und Zelle bezog, konnte durch meßtechnische

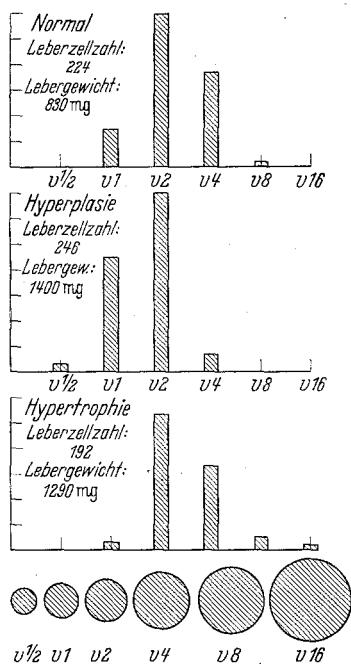


Abb. 3. Kerngrößenvariation bei normalen, hyperplastischen und hypertrofischen Lebern. Abszisse: Kerngrößenklassen V. Ordinate: Zahl der Kerne.

Untersuchungen an der Leber der weißen Maus (SIESS-STEGMANN) auch auf das Gesamtorgan erweitert werden. Es zeigte sich, daß Unterschiede bzw. Verschiebungen der Variationskurve innerhalb der verschiedenen Leberkernklassen *gewichtsabhängig sind*, d. h. daß schwereren Lebern das Auftreten größerer Leberkernklassen entspricht.

Es erschien daher angezeigt, unsere Stufenversuche auch mit dieser Methodik (nähere Angaben s. dort) zu verfolgen (Abb. 3).

Die Kernvariation, die in unseren Untersuchungen auf eine konstante Flächeneinheit bezogen ist, stellt in der gegebenen Darstellung eine Aufschlüsselung des mittleren Zellvolumens nach Kerngrößenklassen dar. Ihre Deutung in Beziehung auf Zellvergrößerung und Zellvermehrung ist, wie aus dem Vorhergehenden ersichtlich, nur in bezug auf relatives und absolutes Lebergewicht möglich.

Da wir bei dem Volumenwachstum, d. h. der Hypertrophie in den Lebern ausgewachsener Tiere immer eine Substanzvermehrung und meistens ein Lebergewicht von über 1200 mg finden, so sehen wir auch stets die Verschiebung zu größeren Kernklassen.

Noch im Wachstum begriffene Tiere können unter Umständen ein Volumenwachstum der Leber zeigen, das in der Kerngrößenvariation nicht zum Ausdruck kommt.

Bei der Isoplasie und Hyperplasie gelten dieselben Gesichtspunkte. Da das mittlere Zellvolumen im Verhältnis zum Lebergewicht klein ist, verschiebt sich die Verteilung mehr auf die kleineren Kernklassen. Bei sehr schweren Lebern oberhalb des kritischen Lebergewichtes, wie sie

z. B. bei Caseinfütterung nach 20 Injektionen auftreten, kommt aber deutlich zum Ausdruck, daß auch trotz der Zellvermehrung große Kernklassen vorkommen können. Das mittlere Zellvolumen (wie aus Abb. 2 hervorgeht) entspricht dem von Normallebern mit etwa 1400—1500 mg Gewicht.

Bei der Beurteilung der Kernvariationskurven fallen sehr deutlich die Lebern mit vermehrten Mitosen auf. Zwar liegen die Kulminationspunkte der Kurven noch bei den für die Mäuselebern typischen Kernklassenwerten, doch ist der Verlauf der Variationskurven mehr stumpfwinklig und flach. Während im Normalfall Kernvolumina, die zwischen den bekannten Klassenwerten gelegen sind, nur in geringerer Zahl auftreten, sind diese bei Mitosevermehrung häufiger und zeigen offenbar gesteigerte Umbauvorgänge an. Dieses Verhalten entspricht den Beobachtungen von STOWELL an der hepatektomierten Ratte: im restierenden Leberanteil kam es während der Regeneration ebenfalls zu einer Abflachung der typischen Kernklassengipfel.

Um für die Bewertung der bereits erwähnten dunklen Leberkerne, wie wir sie vor allem bei doppelkernigen Leberzellen beobachtet haben, karyometrische Anhaltspunkte zu gewinnen, führten wir eine selektive Messung solcher Kerne durch. Bei der variationsstatistischen Auswertung ließ sich eine Einordnung in die für die Mäuseleber typischen Klassen nicht ermöglichen. Außerdem war zu beobachten, daß bei Doppelkernen, die beide im optimalen Schnitt getroffen waren, der dunkle Kern in der Regel einen kleineren Durchmesser aufwies als der helle. Das spricht dafür, daß es sich bei diesen dunklen Kernen tatsächlich um Veränderungen im Sinne einer Pyknose handelt.

5. Die Kern-Plasmarelation.

Wie aus Abb. 4 ersichtlich, bleibt der Quotient Q als Ausdruck der Kern-Plasmarelation bei den 37 aus allen Stufenversuchen ausgewählten Tieren stets innerhalb der 3σ -Grenze unserer Normalwerte und entspricht der Kern-Plasmarelation der Normaltiere. Umgerechnet beträgt die tatsächliche Kern-Plasmarelation ungefähr 1 : 9. Das bedeutet, daß das Verhältnis von Kernfläche zu Plasmafläche innerhalb der angegebenen Fehlerbreite konstant ist. Die Messungen schließen aber nicht aus, daß für die einzelne Zelle eine gewisse Verschiebung des Kern-Plasmaverhältnisses trotzdem noch möglich ist. Man kann nur konstatieren, daß in der von uns angegebenen Flächeneinheit je Präparat die Konstanz der Kern-Plasmarelation innerhalb der angegebenen Fehlerbreite gewahrt bleibt.

Wie bereits erwähnt, kommt es bei einigen Tieren mit sehr hochgradiger Endothelvermehrung, unter Umständen auch bei Amyloid-

einlagerung in der Leber zu einer Vergrößerung des Capillarraumes und damit zu einer Ungenauigkeit der Kern-Plasmarelation am histologischen Schnitt, da unter diesen Umständen die Kernfläche je Flächeneinheit relativ zu klein wird. Andererseits entsteht bei Einhaltung einer konstanten Schnittdicke des Präparates eine Ungenauigkeit der Messung, wenn es zu einer Verschiebung zu größeren Kernklassen kommt, weil bei $7,5 \mu$ dicken Schnitten die Großkerne nicht immer im optimalen Durchmesser getroffen werden können.

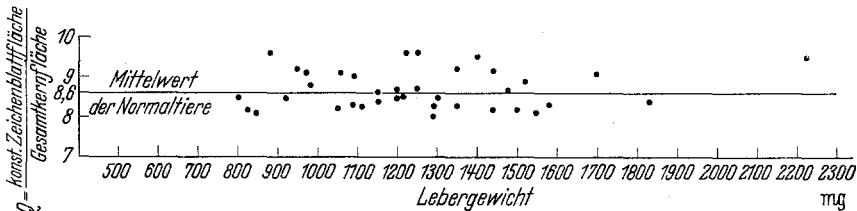


Abb. 4. Die Kern-Plasmarelation behandelter Tiere. Abszisse: Lebergewicht in Milligramm. Ordinate: Quotient Q ist Ausdruck der Kernplasmarelation. $Q = \text{konstante Zeichenblattfläche}/\text{Gesamtkernfläche je Zeichenblatt}$.

B. Histochemische Untersuchungen über das Verhalten der Pentose-Nucleotide in der Leber.

Auf die Bedeutung der Nucleinsäuren, insbesondere auch der Ribonucleinsäuren (RNS) für den Zellstoffwechsel und vor allem die Eiweißbildung soll hier nicht im einzelnen eingegangen werden. Dazu wird auf die zusammenfassenden Arbeiten von CASPERSSON und BRACHET verwiesen.

Wir wissen heute, daß jede biologische Eiweißsynthese an die Gegenwart von Nucleinsäuren gebunden ist, dabei fällt vor allem den RNS die wesentliche Rolle zu. Das Eiweißstoffwechselzentrum bildet offenbar der Zellkern und vor allem der an RNS reiche Nucleolus steht vermittelnd zwischen dem Kern und dem Cytoplasma.

Ein besonders reichliches Vorkommen an RNS findet man im Cytoplasma von Zellen, in denen eine starke Eiweißproduktion stattfindet, sei es zum Aufbau der Zellsubstanz selbst wie bei jugendlichen, wachsenden und blastomatösen Zellen, sei es bei der Bildung eiweißhaltiger Sekretionsprodukte (Drüsen, Plasmazellen usw.).

In seiner zusammenfassenden Arbeit über das Vorkommen von Pentosenucleotiden in tierischen Geweben erwähnt BRACHET auch die Leber und weist darauf hin, daß die schon von anderen in reicherlicher Menge im Cytoplasma beobachteten pyroninophilen Einschlüsse nach der Ribonucleasewirkung verschwinden; ihre Basophilie ist also durch das Vorhandensein von Pentosenucleotiden bedingt.

Bis dahin wurden diese basophilen Schollen im Cytoplasma der Leber besonders auf Grund der Arbeiten von BERG als gespeichertes Nahrungseiweiß angesehen. Die Vermehrung dieser Gebilde nach reichlicher Eiweißfütterung und ihr Verschwinden bei Hungertieren gab vor allem zu dieser Annahme Anlaß. BRACHET

betont bereits, daß auf Grund seiner histochemischen Untersuchungen, die den Nachweis der Identität dieser Zelleinschlüsse mit Pentosenucleotiden erbrachten, diese Deutung nicht mehr haltbar ist. Offenbar bestehen aber Beziehungen zwischen der Nahrungszufuhr und dem Nucleotidgehalt der Leber. Nach ROSSEEL und THONET (zit. nach BRACHET) tritt eine gewisse Verminderung der RNS nach einer längeren Hungerperiode ein. Weitere Untersuchungen über die RNS in der Leber liegen von OPIE und STOWELL vor.

STOWELL untersuchte das Verhalten der Nucleotide an der regenerierenden Rattenleber und bei der Bildung von Hepatomen nach Buttergelbfütterung. Mit Hilfe von UltraviolettabSORPTIONSMESsungen wurden die Verhältnisse quantitativ erfaßt. Eine Vermehrung der Nucleotide im Nucleolus beobachtete er während der Leberzellregenerationsphase, wobei auch gehäufte Mitosezahlen auftraten und ferner bei erhöhter Eiweißzufuhr. Die Cytoplasmanucleotide sind in den regenerierenden Epithelien eindeutig vermehrt, aber nicht in den hypertrophierten Leberzellen.

Quantitative chemische Untersuchungen über den Nucleinsäuregehalt bei der Leberregeneration führten NOVIKOFF und POTTER durch, wobei sie eine starke Zunahme der Pentosenucleotide bei der Regeneration feststellen konnten.

ALTMANN hat in einer kürzlich erschienenen Arbeit bei der menschlichen Leber auffällige Bilder, die unter Anwendung gewöhnlicher histologischer Färbungen den Übertritt von Nucleolarsubstanz in das Protoplasma zeigen, beschrieben. Ohne offenbar selbst histochemische Methoden, besonders den Brachet-Test, angewandt zu haben, bringt er seine Befunde mit den neueren cytochemischen Erkenntnissen über den Nucleinsäurestoffwechsel in Zusammenhang. Hierzu werden wir später noch einmal Stellung nehmen. Schließlich sieht ALTMANN in der durch die Nucleinsäuren bedingten Basophilie der Leberzelle einen Ausdruck für die Fähigkeit zur Bluteiweißkörperbildung.

In einer kürzlich erschienenen Monographie, die uns erst nach Abschluß der experimentellen Untersuchungen zugänglich wurde, hat LAGERSTEDT ausführliche cytologische und cytochemische Untersuchungen über den Eiweißstoffwechsel der Rattenleber veröffentlicht, wobei auch den cytoplasmatischen Nucleotiden besondere Beachtung geschenkt wurde. Die Darstellung der basophilen Cytoplasmaeinschlüsse erfolgte mit der Galloxyanin-Chromalaunfärbung und der Ultraviolettophotographie. Die mit den beiden Methoden erhaltenen Bilder zeigen eine große Übereinstimmung. Außerdem wurden Schnittveraschungen, Feulgenreaktion und Gesamtstickstoffbestimmungen an den Lebern durchgeführt. Die Größenverhältnisse besonders der Nucleolen wurden im Schnitt quantitativ bestimmt. Außer normalen Ratten wurden Tiere untersucht, die 5 Tage gehungert oder 18 Tage eine eiweißarme Kost erhalten hatten. Andere Tiere bekamen nach einer Hungerperiode eine Eiweißkost gefüttert. Die wesentlichsten Veränderungen zeigte der Nucleolus. Sowohl bei Hungertieren als auch nach eiweißreicher Kost vermindert sich der Nucleolarapparat schnell (bis zu 50% seiner Gesamtoberfläche in den Schnitten). Gleichzeitig schwinden die basophilen Schollen aus dem Cytoplasma. Nach Verabfolgung einer eiweißreichen Kost an Hungertiere kommt es zuerst zu einer Zunahme der Oberfläche des Nucleolarapparates um 100%, danach werden die cytoplasmatischen Nucleotide besonders in der Umgebung der Kernmembran in reichlicher Menge gebildet. Parallel damit geht ein Anstieg der Gesamtstickstoffwerte. Die Veränderungen am Nucleolarapparat und den cytoplasmatischen Nucleotiden werden als ein direkter Ausdruck für die Intensität des Eiweißumsatzes der Leberzellen angesehen.

Ein Vergleich des RNS-Gehaltes der Leber mit anderen Organen und Geweben, wie wir ihn mit Hilfe des Brachet-Testes durchgeführt

haben, zeigt in der Tat eine fast ähnliche Stärke wie in eiweißbildenden Systemen (z. B. Pankreas, Haut, Plasmazellen). Dies spricht durchaus dafür, daß sich in der Leber eine gegenüber den sonstigen Organen gesteigerte Eiweißsynthese abspielt, die das für die Vermehrung der Zellproteine zum Aufbau der Zellsubstanz notwendige Maß überschreitet. Auf Grund biochemischer Untersuchungen ist bekannt, daß die Leber die mit der Nahrung zugeführten Aminosäuren zu Eiweiß aufbaut und den übrigen Organismus mit Eiweiß versorgt, das dann am Verwendungs-ort seine spezifische Umbildung erfährt. Auch das Blutplasma erhält sein Eiweiß unter Vermittlung der Leber, wobei vor allem die Albuminsynthese in sie verlegt wird. Bei der Globulinbildung sind offenbar noch andere Zellsysteme zwischengestaltet (Plasmazellen, Lymphocyten, RES), in denen erst die spezifische Umwandlung erfolgt (s. Zusammenfassung bei KÜHNAU).

Die biochemischen Befunde stehen mit dem reichlichen RNS-Gehalt der Leber in Einklang und weisen ihr eine wesentliche Rolle bei der Eiweißsynthese im Organismus überhaupt und auch bei der Plasmaeiweißbildung zu.

Bei der engen Verkoppelung von Eiweißproduktion und Nucleinsäurevorkommen ist es durchaus denkbar, daß Änderungen der Eiweißbildung, sei es unter physiologischen wie auch pathologischen Bedingungen an den in der Zelle verankerten Ribosenucleotiden in irgend-einer Form zum Ausdruck kommen. Es kann sich dabei einmal um quantitative und qualitative Verschiebungen handeln, die natürlich nur mit entsprechenden, vor allem chemischen Methoden geklärt werden können. Andererseits bietet die Möglichkeit des morphologischen Nachweises dieser Stoffe mit histochemischen Methoden in der Zelle selbst eine weitere methodische Grundlage zur Erfassung solcher Veränderungen.

Unter diesen Gesichtspunkten nahmen wir die histochemische Untersuchung der Nucleotide in der Mäuseleber bei der experimentellen Amyloidose in Angriff und stellten uns die Frage, ob die bei dem Amyloid-experiment angewandten verschiedenen Ernährungsarten, die durch die Behandlung erfolgenden Einschmelzungsprozesse, die beobachteten Bluteiweißverschiebungen und das Entstehen des Amyloids zu einer faßbaren Veränderung an den Nucleotiden der Leber führen.

In Parallele zu dem schon in der normalen Mäuseleber außerordentlich bunten Zell- und Kernbild steht auch die Verteilung der Nucleotide, so daß sich häufig schon in den verschiedenen Abschnitten desselben Schnittes und sogar von Zelle zu Zelle ziemliche Unterschiede ergeben. Im folgenden sollen die verschiedenen morphologischen Bilder der Ablagerung der pyroninophilen Substanz in der Leberzelle, wie sie sowohl bei unbehandelten als auch im Experiment stehenden Tieren gefunden wurden, zusammenfassend dargestellt werden.

Die pyroninophilen Zelleinschlüsse verschwanden nach der Ribonucleasebehandlung immer vollständig, so daß wir wohl berechtigt sind, sie mit den Ribosenucleotiden zu identifizieren.

Es ist selbstverständlich, daß die Ablagerungsform in der Zelle durch die Fixierung nicht unerheblich beeinflußt wird. Die angewandte CARNOYSche Flüssigkeit ist zwar ein drastisches Fixierungsmittel, wird aber bei solchen Untersuchungen bevorzugt, da man vor allem danach eine optimale Methylgrün-Pyroninfärbung erhält. Die völlig gleichmäßige Bearbeitung des Materials ermöglicht die vergleichende Untersuchung im Sinne des Äquivalentbildes.

Im Cytoplasma finden wir die RNS teils in diffuser, feinkörniger, teils in scholliger und auch fädiger Form abgelagert. Häufig zeigt das Protoplasma eine vacuolare Struktur, besonders bei der scholligen Ablagerungsform. Letzteres sind wohl auch die Bilder, die BERG als gespeicherte Eiweißschollen angesprochen hat. Es ist nicht möglich, auf Grund der Intensität der Rotfärbung konkrete Aussagen über das mengenmäßige Vorkommen zu machen. Bei schwächeren Vergrößerungen erscheinen die Zellen mit der diffusen Ablagerung in einem deutlicheren Rot als die mit der vacuolär-scholligen Struktur. Wahrscheinlich ist aber in den Schollen nur eine Zusammenballungsform zu sehen, wobei der Gehalt in der Zelle im ganzen sicher nicht vermindert zu sein braucht. Es ist anzunehmen, daß die schollig-vacuolare Struktur zu einem großen Teil fixierungsbedingt ist und mit einer vielleicht stoffwechselbedingten quantitativen und qualitativen Änderung der chemischen Zusammensetzung und der physikalisch-chemischen Struktur des Protoplasmas zusammenhängt. Wesentlicher und einer näheren Deutung eher zugänglich scheint uns die fädige Ablagerung zu sein. Nebenbei bemerkt, haben diese fadenförmigen Bildungen ihrer Größe und Gestalt nach gewisse Ähnlichkeit mit den Mitochondrien. Über das Vorkommen von RNS in den Mitochondrien herrschen noch geteilte Ansichten.

LAGERSTEDT berichtet in der bereits zitierten Monographie über Untersuchungen an ultrazentrifugierten Leberzellen im ultravioletten Licht. Dabei verlieren die cytoplasmatischen Nucleotide ihre morphologischen Eigenheiten und bilden innerhalb der Zellen eine charakteristische Schicht, in der sich auch die Mitochondrien finden, die aber ihre morphologische Struktur behalten. Auch MONNÉ hält es für unwahrscheinlich, daß größere Mengen von RNS in den Mitochondrien enthalten sind und lokalisiert sie vor allem in die Chromidien. Im Gegensatz dazu konnte neuerdings ZOLLINGER mit dem Phasenkontrastverfahren und durch elektronenoptische Untersuchungen wahrscheinlich machen, daß der Mitochondrienkörper aus RNS besteht. Dies steht dann in Übereinstimmung mit früheren chemischen Untersuchungen an isolierten Mitochondrien.

Eine ähnliche fädige Ablagerung von RNS tritt im Pankreas auf und ist unter der Bezeichnung Ergastoplasma schon seit langer Zeit

bekannt, bevor dessen chemische Zusammensetzung näher analysiert war. RIES gelang es, bei der Behandlung von unfixiertem Pankreasgewebe mit Pufferlösungen bei einem p_{H} von etwa 1,9 eine deutliche Doppelbrechung zu erzeugen. NOLTE konnte diese Doppelbrechung durch Ribonucleasebehandlung zum Verschwinden bringen, was für einen orientierten Aufbau bzw. Einbau der Nucleinsäuremoleküle spricht. Es ist anzunehmen, daß auch die fädige Struktur der RNS im Cytoplasma der Leberzellen im gleichen Sinne zu deuten ist.

Bekanntlich kommt es im Cytoplasma der Pankreaszelle nach der Sekretausschüttung zu einem Ergastoplasma- (d. h. auch RNS-) Schwund und in der Phase der Sekretrestititution zum Neuaufbau der Ergastoplasmastruktur, also einer RNS-Vermehrung, welche die Grundlage für die forcierte Eiweißsynthese bei der Sekretbildung darstellt. Es ist dabei auf Grund strukturochemischer Überlegungen durchaus verständlich, daß während der autoreduplikativen Vermehrung der RNS und der davon abhängigen Eiweißbildung eine räumliche Orientierung der Moleküle erfolgt. Die Befunde an der Leberzelle lassen sich in ihrer Bedeutung wahrscheinlich auch in diesem Sinne erweitern. In ihr treten die fädigen RNS-Ablagerungen besonders häufig in unmittelbarer Ablagerung an die Kernmembran auf, einer Stelle also, wo auch an anderen Objekten eine besondere Aktivitätssteigerung der Cytoplasmamnucleotidreproduktion beobachtet wurde. Das Auftreten eines zwischen dem Kern und dem Nucleinsäurewall liegenden hellen Hofes, wie wir es häufig in unseren Präparaten beobachten, stellt sicher einen Fixierungsartefakt dar.

Das locker strukturierte Chromatin der Leberzellkerne zeigt bei der Methylgrün-Pyroninfärbung eine blaugrüne Farbe. Nach der Ribonucleasebehandlung erscheint das Chromatin in einem mehr grünlichen Farbton, was durch das Schwinden der im Heterochromatin enthaltenen RNS erklärt werden kann. Auffallend sind die sich kräftig mit Pyronin färbenden *Nucleolen*, die meist in der Mehrzahl (3—4) in einem Kern vorkommen. Sie liegen teils in der Mitte der Zellkerne, häufiger aber am Rand in der Nähe der Kernmembran. In kleinen Nucleolen findet sich gelegentlich im Zentrum ein mit Methylgrün färbbares Körnchen, den größeren liegen fast regelmäßig an einer Seite oder zwei gegenüberliegenden Seiten, manchmal auch die Zirkumferenz weitgehend umschließend, kappenförmige grün gefärbte Chromatinpartikel auf, die als Randkörperchen (*Nucleolus-associated-chromatin*) bekannt sind. Manchmal sieht man in vergrößerten Nucleolen auch kleine Vacuolen auftreten. Im allgemeinen sind die Nucleolen intensiver mit Pyronin gefärbt als das Cytoplasma. Auch nach kurzdauernder Fermentbehandlung, wonach das Cytoplasma gerade ungefärbt bleibt, zeigen die Nucleolen noch eine deutliche Anfärbbarkeit mit Pyronin. Sie enthalten

demnach wohl im allgemeinen die RNS in einer höheren Konzentration als das Cytoplasma. Im großen und ganzen gehen Nucleolengröße und ihr Gehalt an RNS mit dem des Cytoplasmas parallel; sie sind vor allem dann vergrößert und enthalten reichlich RNS, wenn die fädigen Kernmembrannucleotide auftreten (Abb. 5—8).

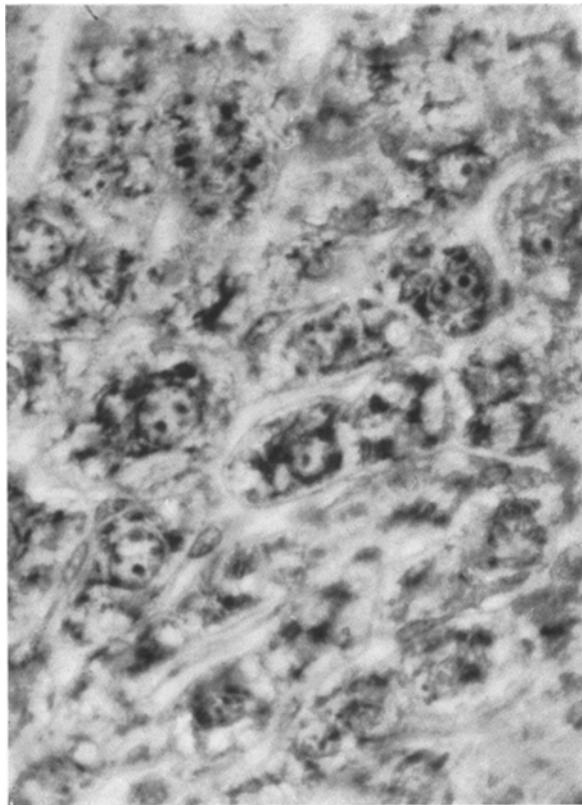


Abb. 5. Normale Mäuseleber (CARNOY, Methylgrün - Pyroninfärbung). Unregelmäßige, schollige RNS-Ablagerung, teilweise Anhäufung um die Kernmembran. Dabei Vergrößerung der Kerne mit großen Nucleolen, vacuolare Cytoplasmastruktur.

Auf den Übertritt von Nucleolarsubstanz in das Cytoplasma in einer Form, wie sie zuletzt ALTMANN für die Leber beobachtet hat, haben wir unser besonderes Augenmerk gerichtet. Sowohl bei den carnoyfixierten Präparaten und der Methylgrün-Pyroninfärbung, wie bei den mit Susa fixierten und HE- und Azan-gefärbten Schnitten für die übrigen morphologischen Untersuchungen konnten wir nirgends ähnliche Bilder finden. Dies ist besonders auffallend, da in unserem Material reichlich hypertrophierte Zellen mit Kernhypertrophien auftraten, die nach ALTMANN

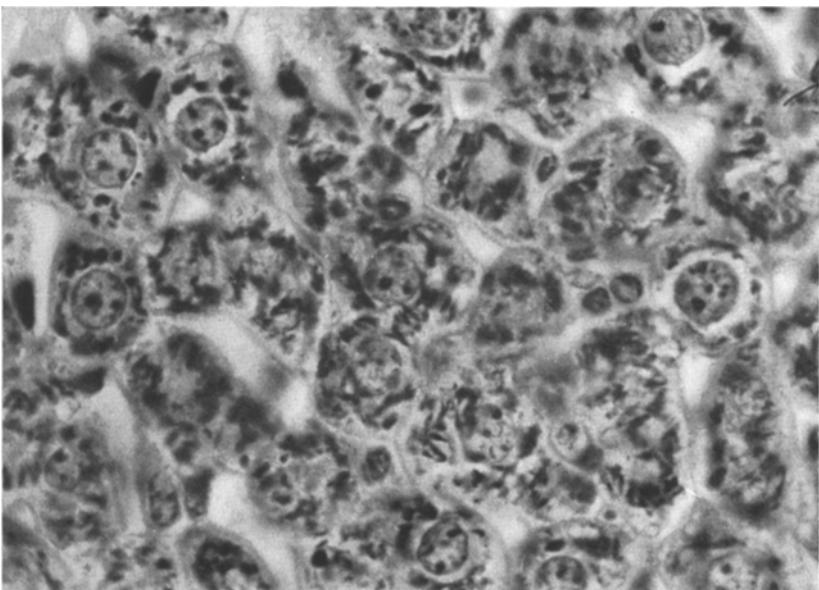


Abb. 6. Leber einer caseingefütterten Maus nach 5 Injektionen (CARNOY, Methylgrün-Pyronin). Reichlich RNS mit fädiger Ablagerung um Kernmembran. Vergrößerte Kerne mit großen häufig randständigen Nucleolen. (Heller Kernhof ist Fixierungsartefakt.)

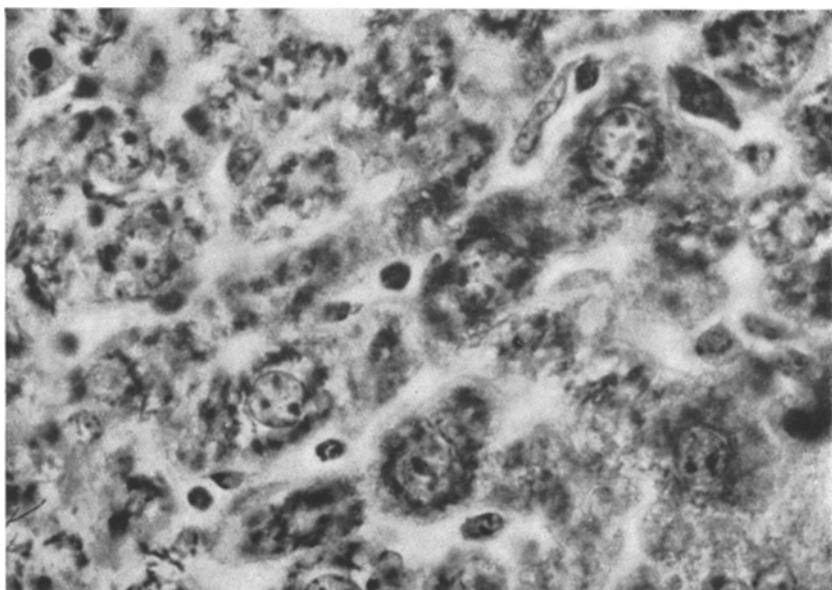


Abb. 7. Behandlung und Technik wie bei Abb. 6. Dichte Anlagerung der RNS an die Kernmembran in fädiger Form. Vergrößerte Kerne mit großen randständigen Nucleolen.

für solehe Vorgänge besonders disponiert erscheinen. Auf Grund seiner Beobachtungen, wobei es sich wohl doch um mehr oder weniger seltene Ausnahmefälle handelt, folgert ALTMANN verallgemeinernd, daß die cytoplasmatischen Nucleotide aus dem Kern stammen. Auf Grund

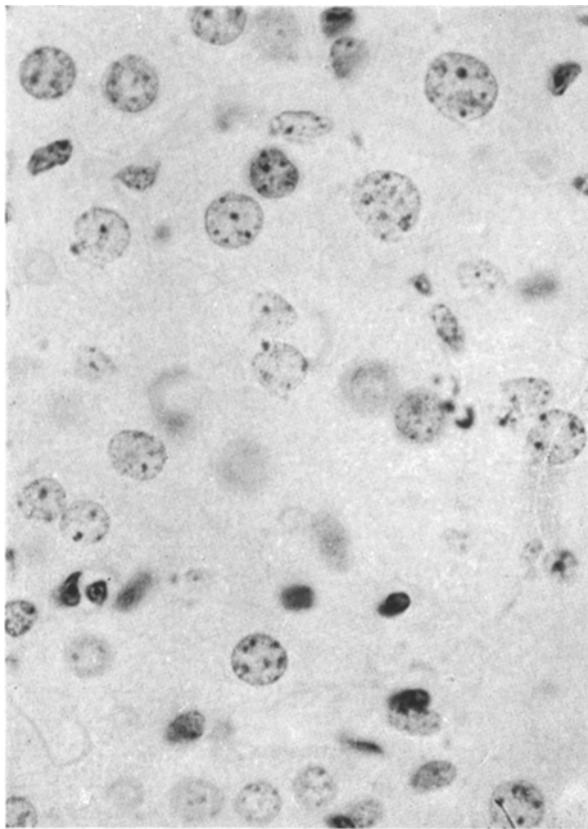


Abb. 8. Wie Abb. 7, jedoch nach Ribonucleasebehandlung. Völliger Schwund der RNS. Vergrößerte Kerne, im Kern Chromozentren bzw. Randkörperchen. Nucleolen nicht mehr färbar, noch als kleine hellere Flecke teilweise erkennbar.

unserer bisherigen Kenntnisse des cellulären Nucleinsäurestoffwechsels wie auch chemischer Überlegungen bestehen für eine solche Annahme eigentlich keine weiteren Beweise. Wir wissen, daß die Nucleinsäuren ganz allgemein zur Autoreproduktion befähigt sind. Sie können sich also durchaus auf diesem Wege im Cytoplasma vermehren und sind in keiner Weise auf einen Nachschub aus dem Kern angewiesen. Damit soll nicht geleugnet werden, daß zwischen dem Kern, vor allem dem Nucleolus und dem Cytoplasma, innige Beziehungen bestehen. Dies zeigt sich in der Anlagerung des Nucleolus an die Kernmembran und der

Anhäufung der cytoplasmatischen Nucleotide an deren Außenseite, meist sogar in verstärkter Weise in der Umgebung des Nucleolus. Es ist dabei durchaus möglich, daß von letzterem Stoffe in das Cytoplasma diffundieren, welche die Bildung der Cytoplasmanucleotide anregen. In dieser Art werden auch von CASPERSSON, HYDEN und VOGT die Verhältnisse interpretiert. BRACHET nimmt hierzu allerdings in kritischer Weise Stellung und hält auch den umgekehrten Weg für möglich. Auch wir haben in unseren Präparaten häufig randständige Nucleolen, die dicht der Innenseite der Kernmembran anliegen, feststellen können, an deren Außenseite dann vermehrt oft deutlich kappenförmig eine Anhäufung cytoplasmatischer Nucleotide in Erscheinung tritt. Bei genauer Beobachtung ließ sich dabei aber immer eine mit Methylgrün angefärbte Kernmembran dazwischen nachweisen. Es ist allerdings vorstellbar, daß bei anderen Färbungen, die nur einen basischen Farbstoff enthalten, Täuschungen auftreten können; dabei stellen sich nämlich die beiden Nucleinsäuretypen in demselben Farbton dar, so daß eine exakte Unterscheidung zwischen Nucleolus, Kernmembran und cytoplasmatischen Nucleotiden nicht mehr durchführbar ist und Bilder entstehen, die wie ein Ausfließen der Nucleolarsubstanz in das Cytoplasma erscheinen. Bei der Methylgrün-Pyroninfärbung dagegen kommen zwei basische Farbstoffe zur Anwendung, von denen der eine (Methylgrün) nur das Chromatin (Thymonucleinsäure), der andere (Pyronin) die RNS darstellt. Erst durch diese differente Färbbarkeit wird eine exakte Unterscheidung der beiden Stoffe und eine einwandfreie Analyse der geschilderten Verhältnisse ermöglicht. Auf Grund der oben angestellten Überlegung scheint uns auch gerade die häufig auftretende fädige Anordnung der Cytoplasmanucleotide an der Kernmembran für eine autoreproduktive Vermehrung im Cytoplasma zu sprechen.

Was die Verteilung der Nucleinsäuren im Leberläppchen anbetrifft, so fällt gelegentlich auf, daß ihre Menge in den peripheren Anteilen des selben etwas größer als in den zentralen erscheint.

Erwähnenswert sind noch einige Veränderungen der Chromatinstruktur der Kerne in Form von Verdichtungen und vermehrter Anfärbbarkeit mit Methylgrün (hyperchromatische Kerne) und blasiger Auflockerung (Blasenkerne). Hierbei scheint es sich um regressive Veränderungen zu handeln.

Es wurde bereits darauf hingewiesen, daß eine quantitative Abschätzung der RNS-Ablagerung kaum möglich ist und überdies schon normalerweise dabei ein wechselvolles Verhalten beobachtet wird. Auf Grund moderner Untersuchungen, besonders mit der Isotopenmethode ist erwiesen, daß die Ribosenucleotide einen sehr schnellen Umbau erfahren, der besonders im Gegensatz zu den in dieser Hinsicht ziemlich stabilen Desoxyribonucleotiden steht. Außerdem ist bekannt, daß die

Stoffwechselvorgänge in der Leber ein ausgesprochen rhythmisches Verhalten zeigen und es ist möglich, daß auch der Nucleoproteidumsatz solchen Gesetzen unterliegt. Wir werden deshalb je nach der Phase, in der die Untersuchung erfolgt, die ja gewissermaßen eine Momentaufnahme aus dem Gesamtablauf darstellt, ein anderes Bild zu erwarten haben. Diese Umstände wirken sich natürlich auf eine vergleichende Untersuchung erschwerend aus.

Es hat sich aber herausgestellt, daß bei bestimmten morphologisch gekennzeichneten Zustandsbildern der Zelle bestimmte Ablagerungstypen der RNS gehäuft sich finden. Es sind dies vor allem die vergrößerten Zellen mit den gleichfalls vergrößerten Kernen. Hier treten meist vergrößerte, der Kernwand naheliegende Nucleolen mit einer Vermehrung der cytoplasmatischen Kernwandnucleotide in fädiger Ablagerungsform auf. Das übrige Cytoplasma ist dabei im allgemeinen schollig und vacuolär. Die *nicht vergrößerten* Zellen besitzen dagegen meist eine mehr diffuse feinkörnige Ablagerung, die allerdings in Kernnähe oft deutlich intensiviert erscheint. Die im Laufe der Experimente nicht selten gehäuft *aufgetretenden Mitosen* zeigen eine starke Vergrößerung und deutliche Abrundung des Cytoplasmaleibes mit unscharfer Begrenzung. Cytoplasmatische Nucleotide sind dabei in Form einer diffusen staubförmigen, im ganzen gering erscheinenden Ablagerung zu erkennen. *Die doppelkernigen Leberzellen* enthalten meist reichlich RNS in diffuser feinkörniger Form. Nicht selten ist in ihnen der eine Kern kleiner und von dichterer Chromatinstruktur.

Da durch die gleichzeitig an demselben Material durchgeführten quantitativ-morphologischen Untersuchungen die oben beschriebenen Zustandsbilder (z. B. Vergrößerung der Zelle) im Ablauf des Versuches mengenmäßig erfaßt werden konnten, lassen sich durch eine Zuordnung des entsprechenden Ablagerungstyps der Nucleotide annäherungsweise Schlüsse auch auf den Ablauf ihrer Verteilung ziehen.

Nach diesem mehr allgemein gehaltenen Überblick über das Verhalten der RNS in den Leberzellen der Maus sollen die Verhältnisse im Laufe der Experimente betrachtet werden. Es sei gleich vorausgeschickt, daß im ganzen gesehen niemals irgendwelche von den bisher beschriebenen Verhältnissen auffallend abweichenden Befunde (z. B. völliges Schwinden der Nucleinsäure) erhoben werden konnten. Die Schwankungen bewegten sich in ziemlich engen Grenzen und ließen sich, wenn überhaupt, nur schwer fassen. Eigentlich war es nur möglich durch die vorhin erwähnte Verknüpfung mit den übrigen morphologischen Untersuchungen, gewisse Aussagen über die Dynamik des Nucleotidumsatzes zu machen. Es liegt dies ganz allgemein in der Methodik solcher histo-chemischen Untersuchungen begründet, die ja im wesentlichen nur zu einer näheren histotopochemischen Charakterisierung eines bestimmten

Substrates führen, aber keine sicheren Aussagen über quantitative Veränderungen zulassen. Dazu müßten chemisch-analytische Untersuchungen zur Anwendung kommen.

Die verschiedenen Ernährungsformen (Hafer, Plasma, Casein) bei sonst unbehandelten Tieren gaben keine eindeutigen Unterschiede in dem RNS-Bild. Bei den gespritzten Tieren fielen jedoch die mit Casein gefütterten Tiere (etwa ab 10 Spritzen) deutlich durch eine bei allen Tieren zu beobachtende Vermehrung der Nucleotide im Cytoplasma der Leberzellen auf.

Der Zelleib zeigt dabei eine diffuse dichte, feinkörnige Ablagerung mit deutlicher stärkerer Anhäufung um die Kerne und zudem einer auch gut erkennbaren fädigen Struktur. Die Vermehrung der RNS bei diesen Tieren äußerte sich auch bei der Ribonucleasewirkung, indem diese Schnitte im Vergleich mit anderen ein verzögertes Schwinden der Pyroninfärbbarkeit zeigten und erst nach längerer Einwirkung des Fermentes ein völlig ungefärbtes Cytoplasma aufwiesen. Gleichen Sinnes waren die Veränderungen, wenn ein Leberamyloid vorhanden war. Allerdings konnte dabei ein deutlicher Schwund der Cytoplasmanucleotide in den durch die Amyloidablagerung atrophierenden Leberzellen festgestellt werden.

Die Amyloidsubstanz selbst färbt sich mit Pyronin nicht an und erscheint in den Präparaten völlig ungefärbt. Es wird darauf besonders hingewiesen, weil diese Tatsache für das Fehlen von chemischen Substraten saurer Natur in der Amyloidsubstanz spricht. Außer den RNS färben sich nämlich auch gewisse Polyester-schwefelsäuren (Chondroitinschwefelsäure, Mucoitschwefelsäure, Heparin) mit Pyronin, allerdings in einem deutlich differenten Farbton. Durch die Behandlung der Gewebe mit Ribonuclease sind sie überdies von den RNS histochemisch sicher zu trennen. Die Feststellung einer fehlenden Anfärbarkeit des Amyloids mit Pyronin wird besonders im Hinblick auf das fragliche Vorkommen von Chondroitinschwefelsäure und auf die Beziehungen zum metachromatischen Verhalten getroffen.

Am Rande soll noch ein Zufallsbefund erwähnt werden. In einer Leber fanden sich vereinzelte Granulome, in deren Umgebung die Leberzellen einen vollständigen RNS-Schwund erkennen ließen. Dieser Befund soll vorläufig nur registriert werden; es ist aber wahrscheinlich, daß hier eine durch Abbauprodukte hervorgerufene Schädigung der Zellen vorliegt, die in diesem Verlust der Cytoplasmanucleotide zum Ausdruck kommt. An den Kernen dieser Zellen waren keinerlei Veränderungen faßbar.

Auf das Vorkommen von RNS in den Zellen der Proliferationsherde und der Endothelien wird an anderer Stelle eingegangen.

Faßt man die wesentlichen Befunde zusammen, so ist festzustellen, daß die histochemischen Nucleotiduntersuchungen an den Leberzellen

der Maus ein reichliches Vorkommen von RNS im Cytoplasma und Nucleolus zeigen. Dieser Befund steht sicher mit der Fähigkeit der Leberzelle zur Eiweißsynthese im Rahmen des Gesamtstoffwechsels und vor allem auch der Plasmaeiweißbildung im Zusammenhang. Dabei sind schon normalerweise, offenbar abhängig vom Funktionszustand der einzelnen Zelle und des Organs, gewisse Schwankungen in der Ab-lagerungsform und Menge der Nucleinsäuren zu beobachten. Unter dem Einfluß der verschiedenen von uns angewandten Ernährungsformen und der zusätzlichen amyloiderzeugenden Behandlung treten im allgemeinen keine Veränderungen auf, die in auffälliger Form von den auch normalerweise zu beobachtenden, je nach der Stoffwechsellage mehr oder weniger intensivierten Verhältnissen abweichen. Es kommt im Laufe des Amyloidexperimentes allerdings zu einem bevorzugten Auftreten der im Sinne einer Funktionssteigerung zu deutenden Bilder. Vor allem zeigten die längere Zeit gespritzten und mit Casein gefütterten Tiere eine deutliche Nucleotidvermehrung. Die hypertrophierten Leberzellen bieten im allgemeinen das Bild einer gesteigerten Proteinsynthese mit großen, randständigen Nucleolen und deutlichen Kernmembran-nucleotiden. Die Nucleinsäurevermehrung kann sowohl mit einer für die Vermehrung der Zellsubstanz benötigten Eiweißsynthese als auch darüber hinaus mit einer Steigerung der Eiweißsynthese in der Leberzelle im Rahmen des Gesamtstoffwechsels und vor allem der Bluteiweißkörperbildung in Zusammenhang stehen. Welcher dieser beiden Vorgänge hierbei im Vordergrund steht, läßt sich naturgemäß aus dem Verhalten der Nucleinsäuren allein nicht entscheiden, hierzu muß der Vergleich mit den quantitativ-morphologischen und den blutchemischen Werten herangezogen werden.

C. Die mesenchymale Reaktion in Leber und Milz.

Die mesenchymale Reaktion haben wir durch Zählung der Endothelzellen der Leber je Flächeneinheit, das Auftreten von mesenchymalen Proliferationsherden um kleine Pfortaderäste sowie Verschiebung des relativen Milzgewichtes festgestellt.

Während bei Normaltieren ohne Infekt die Endothelzellzahl in unserer Flächeneinheit 140 nie überschritt, sahen wir bei behandelten Tieren, gleich welcher Fütterung, mit zunehmender Zahl der Injektionen und Behandlungsdauer, aber auch in deutlicher Abhängigkeit von der örtlichen Absceßbildung eine Vermehrung der Endothelzellen bis auf Werte von 200—300. In ganz seltenen Fällen sahen wir bei starken Reaktionen nach 20 Injektionen die Endothelzellzahl bis auf 400 ansteigen. Das Auftreten der Proliferationsherde mesenchymaler Zellen, die von M. B. SCHMIDT das Milzgewebe der Leber genannt wurden, sahen wir beinahe parallel zur Stärke der Endothelvermehrung an

Ausdehnung zunehmen. Die Mittelwerte dieser Endothelzellzahl in den einzelnen Versuchen ergeben anschaulich die Reaktion einer Versuchsgruppe, wobei *keine Fütterungsunterschiede bestehen* (Abb. 9). Auffallend ist lediglich, daß die Tiere mit der Mischinfektion und der starken örtlichen Absceßbildung besonders hohe Endothelwerte aufwiesen, die nach

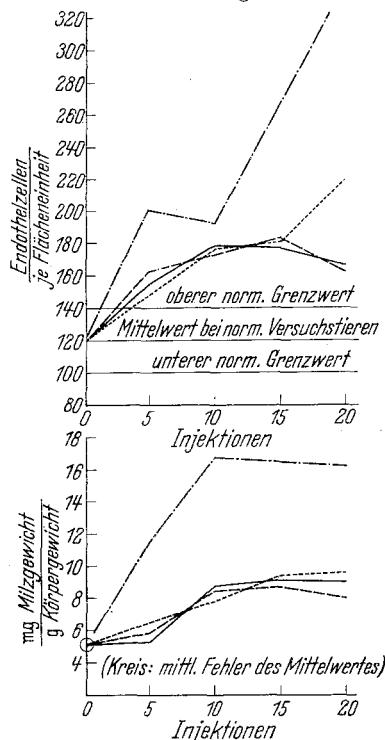


Abb. 9. Mesenchymbewegungen in Leber und Milz während der Injektionsbehandlung. — Haferfütterung; - - - Plasmafütterung; - · - Caseinfütterung (schwache Reaktion); - - - Caseinfütterung (starke Reaktion).

von Pfortaderästen auftreten und es daher auch auf die Schnitthöhe ankommt, in welchem Maße Proliferationsherde getroffen werden. Ge- wisse Dissoziationen in der Stärke der Endothelreaktion und Ausdehnung der Proliferationsherde können hierdurch bedingt sein.

Fast völlig parallel zu diesem Test verläuft das *relative Milzgewicht* (Milzgewicht mg/Körpergewicht g). An normalen Mäusen errechneten wir das Mittel mit 5,1 mg/g und einer Streubreite von $\sigma \pm 1,3$ mg/g und einen mittleren Fehler des Mittelwertes von $m \pm 0,4$. Ganz analog zur Endothelreaktion in der Leber steigt nun im Verlauf der Behandlung das relative Milzgewicht und damit auch das absolute Milzgewicht an.

20 Injektionen eine exakte Auswertung der Leberzellzahl X nicht mehr zuließen. Bei den übrigen Versuchsgruppen bewegte sich der Mittelwert meist um 200. Nach 5 und 10 Injektionen ist die Reaktion offenbar auf ihrem Höhepunkt zunächst angelangt, nach 15 Injektionen war bei mit Plasma und Hafer gefütterten Tieren die Reaktion verhältnismäßig gering. Besonders starke Reaktionen waren bei den mischinfizierten Tieren fast stets von einer sehr ausgeprägten Globulinvermehrung begleitet. Die *Proliferationsherde* in der Leber, die bereits von M. B. SCHMIDT, DIETRICH, WALBACH u. a. als Ausdruck des mesenchymalen Reizzustandes eingehend beschrieben wurden, nehmen an Ausdehnung im Verlauf der Behandlung zu, doch haben wir den Eindruck, daß die intracapilläre Endothelvermehrung in der Auszählung einen fast empfindlicheren Test darstellt, zumal diese in der ganzen Leber gleichmäßig auftritt, während die Proliferationsherde bevorzugt um Teilungsstellen

Auch hier besteht wieder die Abhängigkeit zur Stärke der örtlichen Absceßbildung (Abb. 9). Fütterungsunterschiede bestehen nicht. Nach 10 Injektionen ist bei mittleren örtlichen Reaktionen das relative Milzgewicht auf 8—10 mg/g angestiegen, diesen Wert zeigt es auch nach 15 oder 20 Injektionen. Die Mittelwerte überschreiten dabei deutlich den Zufallsbereich ihrer Streuung. Entsprechend der starken Reaktion bei einigen caseingefütterten Versuchsreihen sahen wir hier ganz abnorm hohe Milzgewichte (bis zu 16,7 mg/g).

Histologisch finden wir mit Zunahme des Milzgewichtes eine Zunahme der Riesenzellen. Während bei Normaltieren dunkelkernige lymphoide Zellelemente nur in den Randzonen vereinzelt in kleinen Nestern zu finden sind, breiten sich diese mit Zunahme der Injektionen in der roten Pulpa immer weiter aus, die Follikel werden dabei auseinandergedrängt, zeigen aber meist große Keimzentren. Oft findet sich dann auch eine perifolliculäre Hyperämie. Die Amyloidbildung in der Milz entsprach innerhalb der verschiedenen Fütterungsgruppen ganz den großen Reihenversuchen, die LETTERER früher durchführte. Während wir nach 5 Injektionen bei keinem Tier eine Amyloidbildung nachweisen konnten, sahen wir nach 10 Injektionen bei mit Casein gefütterten Tieren mit sehr starker örtlicher Absceßbildung (Mischinfektion) bei 86% der Tiere Milzamyloid, während mit Hafer und Plasma gefütterte Tiere mit schwächerer örtlicher Reaktion keine Amyloidose zeigten. Die Stärke der mesenchymalen Reaktion hängt mit der Ausdehnung der örtlichen Absceßbildung zusammen; diese ist abhängig 1. von unkontrollierbaren Einflüssen (Mischinfektion, individueller Reaktionslage u. a.), 2. von der Ernährung. Man gewinnt den Eindruck, daß Caseintiere zu stärkerer örtlicher Absceßbildung neigen als plasmagefütterte Tiere (s. S. 331), doch kann dies noch nicht als statistisch gesichert, sondern höchstens als signifikant (Versuch nur an je 15 Tieren, Mindestzahl sonst 30!) betrachtet werden. Nach 15 Injektionen war der Prozentsatz der amyloidpositiven Tiere bei den plasmagefütterten Tieren mit 8% am niedrigsten, während er bei Haferfütterung 38% und bei Caseinfütterung 66% betrug. Nach 20 Injektionen zeigten mit Hafer und Casein gefütterte Tiere unabhängig von der Stärke der örtlichen Reaktion zu 100% Amyloid, während plasmagefütterte Tiere nur einen Prozentsatz von 66% amyloidpositiver Milzen aufwiesen. Leberamyloid fanden wir nur bei wenigen Tieren nach 20 Injektionen. Es handelt sich dabei um caseingefütterte Tiere mit sehr starker relativer Lebervergrößerung und Überschreiten des kritischen Lebergewichtes.

Die Proliferationsherde in der Leber enthalten zahlreiche Zellen, die durch ein stark pyroninophiles Protoplasma auffallen (Abb. 10 und 11). Auch wenn es im Laufe der Versuche zu einer Proliferation der endothelialen Zellen kommt, lassen diese häufig einen mit Pyronin kräftig rot

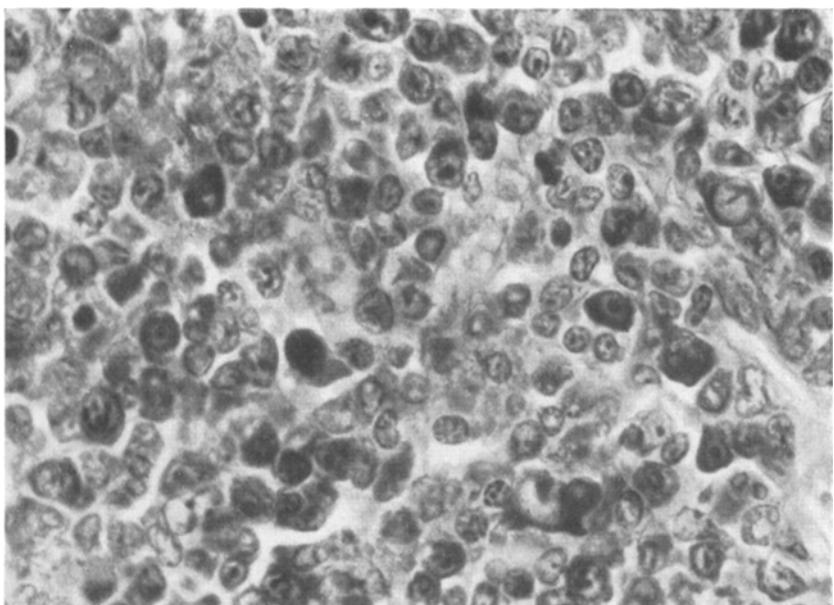


Abb. 10. Proliferationsherd in der Leber eines caseingefütterten Tieres mit Leberamyloid nach 20 Injektionen. Viele Zellen haben stark basophiles Protoplasma. Technik wie die anderen Präparate.

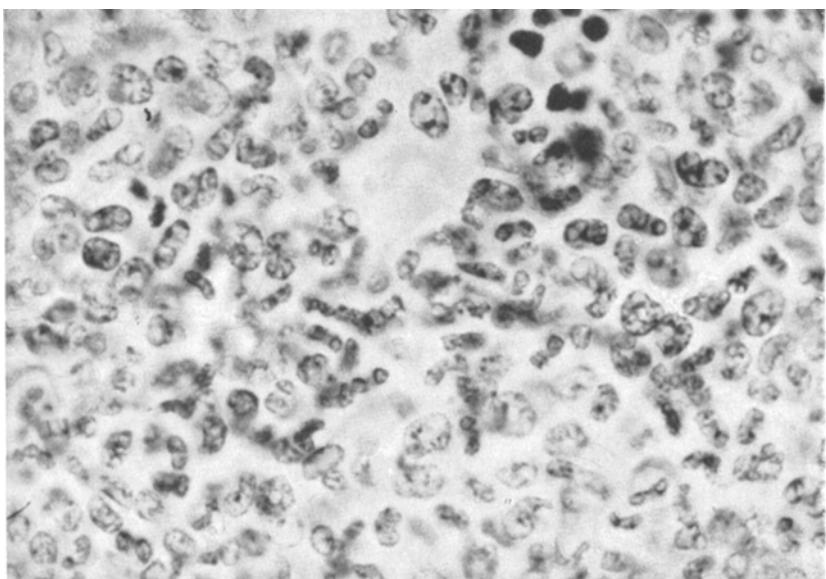


Abb. 11. Dasselbe Präparat nach Ribonucleasebehandlung. Die Basophilie des Cytoplasmas ist verschwunden.

gefärbten Protoplasmaleib erkennen. Die Endothelzellen (KÜPFERSCHE Sternzellen) normaler Mäuse lassen ein solches Verhalten im allgemeinen vermissen. Die beschriebene Basophilie der proliferierten Zellen geht nach der Ribonucleasewirkung verloren, so daß sie auch hier durch RNS bedingt ist. Die Intensität der Pyroninfärbbarkeit übersteigt dabei die sonst in jugendlichen Zellen zu beobachtende Menge und ist etwa der Basophilie der Plasmazellen gleichzusetzen. Dieser Befund erscheint uns deshalb wichtig, weil er auf die Möglichkeit einer Eiweißsynthese in diesen Zellen hinweist, wie es ja auch für die Plasmazellen bereits nachgewiesen ist (ZYLBERSZAC, VAN DEN BERGHE, THORELL, GÖSSNER).

In diesem Rahmen sei auf die Tatsache hingewiesen, daß immer wieder den Zellen des aktiven Mesenchyms, den Plasmazellen und Lymphocyten besonders für die Globulinbildung eine Bedeutung zugeschrieben wurde.

Dieser Nachweis des reichlichen RNS-Gehaltes, der auf Grund unserer heutigen Vorstellung mit einer Eiweißsynthese in Zusammenhang steht, spricht durchaus im Sinne anabiotischer Vorgänge in diesen Zellherden und widerlegt die Auffassung, daß sie sich nur reaktiv auf die Zerfallsprodukte entwickeln, um diese zu resorbieren. Es bleibt dabei dennoch wahrscheinlich, daß sie auch resorptive Leistungen vollbringen; darüber hinaus schalten sie sich aber vielleicht sogar mit diesen Stoffen als Bausteine in die Eiweißsynthese ein.

D. Bluteiweißveränderungen und vergleichende Betrachtungen der morphologischen und humoralen Reaktion.

Während der morphologische Teil dieser Arbeit neue Erkenntnisse über besondere Zustandsformen des Leberparenchyms und Mesenchymumwandlungsvorgänge in Leber und Milz erbrachte, sind ausgeprägte Bluteiweißveränderungen im Verlauf der klinischen und experimentellen Amyloidose schon länger bekannt.¹ Die meist erst im Stadium der Amyloidnephrose diagnostizierbare menschliche Amyloidose ist durch eine auffällig starke Albuminverminderung bei relativer Vermehrung der α - und β -Globuline und des Fibrinogens gekennzeichnet. Der Weg zum menschlichen Amyloid führt fast immer über einen chronischen Infekt (Tbc, Osteomyelitis), also wahrscheinlich über eine langandauernde Globulinvermehrung des Serums. In Anknüpfung an Bluteiweißuntersuchungen von LETTERER gelang es, mit der Entwicklung einer Hyperglobulinämie bei der weißen Maus im Laufe der amyloidkrankmachen- den Behandlung eine wesentliche Voraussetzung für das Auftreten des Amyloids nachzuweisen (SCHNEIDER). Zeigten die Tiere keine humorale Reaktion dieser Art, so trat keine Amyloidose auf. In laufenden Beobachtungen an Tieren mit 1, 5, 10, 15 und 20 Injektionen war die Stärke und Dauer der Globulinvermehrung von der Zahl der Injektionen

abhängig. Bei einer Injektion dauerte der Globulinanstieg etwa 2—5 Tage, bei 5 Injektionen erstreckte er sich schon über 14 Tage. Auffällig war bei dieser Globulinvermehrung, daß sie meist nach 10 Injektionen wieder etwas abfiel, und zwar bei erkrankenden Tieren häufiger als bei gesundbleibenden. In elektrophoretischen Untersuchungen (OTT-SCHNEIDER) zeigte es sich, daß die anfänglich beträchtliche Sofortreaktion der α - und β -Globuline ungefähr zu diesem Zeitpunkt sich dem Normalwert wieder nähert. Wird weitergespritzt, so geht sowohl das morphologische Bild der Injektionsstelle wie auch die humorale Reaktion des Blutes in das Gesamtbild einer chronischen Entzündung über. Dabei vermehrt sich das anfangs abgefallene γ -Globulin wieder, während das α - und β -Globulin noch etwas erhöht bleibt. Während des ganzen Versuchsverlaufes sinkt das Albumin laufend ab. Am Schluß ist nach 15—20 Injektionen meist das Bluteiweißbild einer Nephrose mit deutlicher Gesamteiweißverminderung erreicht, wobei die Albuminverminderung bei den erkrankten Tieren stärker war als bei den gesundbleibenden. Trotz dieser Auffälligkeiten, daß zur Amyloidentstehung stets eine Globulinvermehrung notwendig ist und andererseits verschont gebliebene Tiere mehr Gesamteiweiß, vor allem Albumin haben, konnte eine eindeutige, stets zum Amyloid führende Bluteiweißkonstellation nicht gefunden werden. Es liegt nahe, die Bluteiweißverschiebung als banale, auch bei anderen Krankheiten mögliche Dysproteinämie aufzufassen, in deren Verlauf vielleicht die Schädigung oder Erschöpfung des aktiven Mesenchyms eine wesentliche Rolle für die Amyloidentstehung spielt. Paraproteine konnten mit den angewandten Methoden nicht nachgewiesen werden.

Die vorliegenden Serum eiweißuntersuchungen wurden nephelometrisch (SCHNEIDER) an denselben Tieren angestellt, die auch zur morphologischen Beurteilung Verwendung fanden. Die Beurteilung der Serum eiweißverschiebung sollte ein weiteres Kriterium für den Reaktionsgrad der Tiere liefern. Vielleicht konnten sich hierbei gewisse Parallelen zwischen dem Auftreten morphologischer und humoraler Veränderungen im Laufe der Injektionsbehandlung aufzeigen lassen.

Die Globulinuntersuchungen an 91 Tieren, von denen 31 an Amyloid erkrankten, ergaben Globulinvermehrung in 68 Fällen (Endbestimmungswerte). Der Ablauf der Reaktion war entsprechend der Fütterung verschieden. In Tabelle 3 sind die Tiere jedes Fütterungsversuches entsprechend ihrer Injektionsbehandlung eingeordnet.

Alle Tiere vermehrten ihr Globulin schon nach 5 bzw. 10 Injektionen, dabei zeigten die casein- und hafergefütterten Tiere schon nach 15 Injektionen einen starken Amyloidbefall. Die plasmagefütterten Tiere erkrankten erst nach 20 Injektionen in höherem Grade an Amyloidose. Der Globulinspiegel war bei den 17 Caseintieren mit 5 und 10 Injektionen besonders hoch, einhergehend mit einer starken örtlichen Reaktion an

Tabelle 3.

Injektionszahl	Hafer			Casein			Plasma		
	I	II	III	I	II	III	I	II	III
5	6	5	0	6	6	0	4	3	0
10	6	4	0	11	11	4	6	2	0
15	10	8	4	6	2	4	16	12	1
20	6	6	6	8	4	8	6	6	4

Spalte I: Gesamtzahl der Tiere. Spalte II: Zahl der Tiere mit Globulinvermehrung (2,4—3,5 g-%). Spalte III: Zahl der Tiere mit Amyloidbefall. Der Normalwert für Globulin ($[NH_4]_2SO_4$ -Fällung) ist 1,8—2,2 g-% (M 2,1).

der Injektionsstelle, die Plasmatiere hatten dagegen nach 10 Injektionen nur zum kleineren Teil Globulinvermehrung. Die 8 Caseintiere mit 20 Injektionen hatten neben ausgedehntem Milzamyloid auch Leberamyloid, ihr Serumglobulin war dabei 4mal nicht erhöht und in 4 Fällen nur wenig erhöht (bis 2,6 g-%). Wird man vor die Aufgabe gestellt, Morphologie und humorale Ablauf einer Allgemeinreaktion vergleichend zu betrachten, so sind einige kritische Vorbemerkungen am Platze.

Die Bluteiweißuntersuchung liefert uns bei der starken Abhängigkeit der Bluteiweißzusammensetzung von Auf- und Abbauvorgängen *allerorts* im Organismus nur ein momentanes, rascher wandelbares Durchschnittsbild dieser Stoffwechselvorgänge im ganzen Organismus. An einer Stelle kann Körperfuge eingeschmolzen und mehr oder weniger weit abgebaut im Blutkreislauf erscheinen, während an anderer Stelle Stoffe aus der Blutbahn entnommen oder neu aufgebaute Stoffe in dieselbe abgegeben werden können. So sind durch nebeneinanderlaufenden, verschieden großen Zu- und Abfluß Stoffwechselvorgänge auf Grund von Blutanalysen recht schwer zu überschauen. Nach den Ergebnissen der WHIPPLESchen Schule bei Plasmapherese besteht ein dauerndes dynamisches Gleichgewicht zwischen Gewebsproteinen (Proteinpool) und den Proteinen des strömenden Blutes.

Gewebliche, örtlich begrenzte Stoffwechselstudien bieten dagegen geringere Schwierigkeiten. Die Zelle hypertrophiert, vergrößert oder verdoppelt dabei ihren Kern, teilt sich häufiger, das Organ wird zellreicher und zeigt damit, daß der Stoffwechsel anabiotisch intensiviert ist. Diese Anabiose kann dabei stoffwechselmäßig betrachtet einen vermehrten Anbau, Abbau mit Umbau oder reine Neusynthese mit Sekretion bedeuten. Die Katabiose als verminderte Zelleistung ist weitgehend durch Atrophie, Kernschrumpfung und Kernverlust gekennzeichnet. Für unsere Studien spielt auch das zeitliche Moment eine Rolle. Der Beginn einer humoralen und morphologischen Reaktion liegt sicher zeitlich sehr nahe beieinander, da eine aktive Zelleistung kenntlich an den obigen Zeichen der Anabiose Voraussetzung für das Auftreten

vermehrter Blutproteine ist. Man muß ja auch für den Spezialfall der Plasmaproteine an der These einer cellulären Genese festhalten, da Anzeichen für eine rein humorale intravasale Bluteiweißsynthese (z. B. Zwischenprodukte) nicht bekannt sind. Anders wird es am Ende einer Reaktion mit humoralen und morphologischen Äußerungen eines Organismus sein. Das humorale Bild kann schon wieder normalisiert oder eine Reaktionsstufe weiter sein als sein morphologisches Äquivalent. Mit anderen Worten, die proliferierte Zelle kann weiterexistieren, ohne durch besondere Leistung in Erscheinung zu treten. Während so morphologische Kriterien einerseits sehr lange auffällig bleiben können, wie Zellproliferate und Hypertrophien, sind andererseits gewisse Zellstoffwechselphasen wie Mitosen oder Veränderungen des Plasmas (Auftreten von RNS) schnell wieder schwindende Zustandsformen, die schon in Tagesrhythmen ablaufen können. So ist ihre Verwertung in größeren Beobachtungsabständen als Stunden und Tagen nur bedingt möglich. Trotz dieser beträchtlichen Bedenken erscheint es jedoch lohnenswert, beide hier beobachteten Reaktionsarten wie Hyperglobulinämie und Morphologie der Leber und Milz einmal kritisch einander gegenüberzustellen.

Tabelle 4. Gegenüberstellung von Globulinvermehrung und Mesenchymreaktion.

Injektionszahl	Zahl der Tiere	Globulin		Globulin und Mesenchym, beide		Nur ein Teil vermehrt	
		vermehrt	normal	vermehrt	normal	Globulin	Mesenchym
5	16	14	2	12	2	2	—
10	23 (4 ¹)	17 (4 ¹)	6	11 (4 ¹)	1	—	5
15	32 (9 ¹)	22 (6 ¹)	10 (3 ¹)	21 (6 ¹)	—	1	10 (3 ¹)
20	20 (18 ¹)	15 (18 ¹)	5 (5 ¹)	15 (13 ¹)	—	—	5 (5 ¹)

¹ davon Amyloidtiere.

Wie die morphologischen Studien zeigen, ist mit der Zunahme der Injektionszahl eine Mesenchymvermehrung in Leber und Milz zu beobachten. Vergleichende Untersuchungen des Knochenmarks ergaben bei der weißen Maus keine Anhaltspunkte für eine faßbare Reaktion. Stellt man nun das Auftreten einer mesenchymalen Reaktion der Tiere, gemessen in Mesenchymzellen der Leber (Werte über 140 je Flächeneinheit), und an Hand des Milzfaktors (Werte über 5,5) den Bluteiweißwerten gegenüber, so besteht ein auffälliger zeitlicher Gleichlauf beider Reaktionen. Während das Globulin der Tiere in den ersten zwei Spritzenraten im Ansteigen begriffen ist, entwickeln sich vorwiegend erst in den Lebercapillaren, dann auch in der Milz vermehrt mesenchymale Zellen von der Art der Endothelzellen mit Übergängen zu großen Mononukleären mit rundem Kern oder vereinzelt auch polymorphkernige Leuko-

cyten. Die Milz vergrößert sich laufend. Nach 5 und 10 Injektionen waren bei 39 untersuchten Tieren (Tabelle 4) nur 2 mit einer geringen Globulinvermehrung auf 2,45 g-% ohne mesenchymale Reaktion. Drei Tiere zeigten während des ganzen Versuchs weder morphologische noch humorale Reaktion. Während so am Anfang der Spritzenbehandlung eine gleichlaufende Reaktion Globulinvermehrung-Mesenchymvermehrung aufgezeichnet werden kann, kommt bei der weiteren Behandlung eine gewisse Dissoziation beider Befunde zustande. Wie frühere Serum-eiweißuntersuchungen gezeigt haben, ist nach 10 Injektionen ein gewisser Stillstand oder sogar Abfall der Globulinbewegung bei amyloid-erkrankenden Tieren häufig. Dies prägt sich in unserer Reihe so aus, daß nunmehr wohl noch 37 unter 52 Tieren vermehrtes Globulin mit Mesenchymvermehrung haben, aber auch 15 Tiere Mesenchymvermehrung ohne erhöhten Globulinspiegel aufweisen. Hierunter fällt auch der Hauptteil der stark amyloidkranken Tiere (5 von 7 Tieren mit Leber- und Milzamyloid). 20 Tiere mit 20 Injektionen wurden neben den Endwertbestimmungen auch laufend auf ihr Bluteiweiß untersucht. Die Werte der Anfangsbestimmung und Untersuchungen nach 10 Injektionen und am Ende der Behandlung zeigten wie üblich, daß auch diese Tiere eine erhebliche Globulinreaktion mitgemacht hatten. Somit ist ihre vergrößerte Milz und mesenchymreiche Leber wohl als morphologisches Überbleibsel dieser Reaktion aufzufassen.

Im ganzen liegt es wohl klar, daß mit der humoralen Reaktion einer Globulinvermehrung auch stets eine deutliche mesenchymale Reaktion verknüpft ist. Zeitlich kann diese Globulinvermehrung kürzer nachweisbar sein als ihr morphologischer Begleiter. Ein besonderer mesenchymal-humoraler Reaktionstyp aber, der zum Amyloid führt, konnte nicht beobachtet werden.

An Hand der ausgedehnten Untersuchungen am Leberparenchym, die eine deutliche Lebergewichtszunahme mit Hypertrophie oder Vermehrung der Leberzellen zeigte, wurde nun auch die Frage Leberparenchym und Verhalten des Bluteiweißes geprüft (Tabelle 5). Verwendet wurden für den Vergleich nur Tiere, die durch eine unproportionierte Lebergewichtszunahme oder Hyperplasie besonders deutliche Reaktionen zeigten. Ein eindeutiger Gleichlauf zwischen diesen Leberparenchym-veränderungen und der Globulinreaktion wurde nicht gefunden (Tabelle 5a). Doch scheint eine sehr starke Globulinvermehrung (über 2,8 g-%), die stets von einer starken Mesenchymproliferation begleitet ist, ohne eine wesentliche Mitbeteiligung des Leberparenchyms nicht möglich zu sein, denn unter 32 humoral sehr stark reagierenden Tieren hatten 27 eine sehr große, meist hyperplastische Leber (Tabelle 5b). Untersucht man die Tiere mit hohem Gesamteiweißspiegel (über 6,8 g-%) auf ihr Leberparenchym, so haben von insgesamt 35 Tieren 28 eine

unproportionierte Lebervergrößerung und 2 weitere Tiere sehr viel Mitosen (Tabelle 5c). Dieser Anteil ist immerhin auffällig; aber die Hälfte dieser Tiere (14) ist mit den obigen Fällen einer starken Globulinvermehrung bei Parenchym- und Mesenchymreaktion nicht identisch. Ihr hohes Gesamtweiß ist vorwiegend durch relativ hohen Albumin gehalt bedingt. Ein direkter Zusammenhang zwischen hohem Gesamt eiweißspiegel und Amyloidbefall, wie es BOHLE, HARTMANN und POLA neuerdings annehmen, konnte bei diesen Tieren nicht bestätigt werden. Von den 35 Tieren mit hohem Gesamteiweißgehalt hatten nur 7 Amyloid bekommen. Im Gegenteil war es auffällig, daß vorwiegend die nur wenig zur Amyloidose neigenden plasmagefütterten Tiere häufig hohes Gesamteiweiß hatten. Bei 15 Injektionen hatten 9 von 16 Plasmatisierten Serumgesamteiweiß über 6,8 g-% ohne eine Amyloidose bekommen zu haben.

Tabelle 5. Gegenüberstellung von Globulinvermehrung, hohem Gesamteiweißgehalt und Verhalten des Leberparenchyms.

a) Globulinvermehrung und Leberparenchymreaktion.

Injektionszahl	Tiere mit Globulinvermehrung	Dabei Leberparenchym		Leberparenchym vermehrt ohne Globulinvermehrung
		vermehrt	normal	
5	14	9	5	0
10	17	16	1	5
15	22	11	11	8
20	20	20	0	1

b) Starke Globulinvermehrung und Parenchym- mit Mesenchymreaktion.

Injektionszahl	Tiere mit Globulinwerten über 2,8 g-%	Dabei Parenchymvermehrung und Mesenchymreaktion	
5	10	9	5
10	7	7	10
15	8	5	15
20	7	6	20

c) Hohe Gesamteiweißwerte bei gleichzeitiger unproportionierter Lebervergrößerung.

Injektionszahl	Tiere mit Gesamteiweißwerten über 6,8 g-%	Dabei unproportionierte Lebervergrößerung	
5	7	5	6
10	6	10	6
15	9	15	9
20	7	20	7

Im Blick auf unsere Beobachtungen an Leber und Milz sind Befunde von DOMAGK beachtenswert. Er fand bei Phagocytoseversuchen am RES der Leber und Milz nach Einverleibung lebender und abgetöteter Kulturen von Infektionserregern eine wesentliche Vermehrung der mesenchymalen Zellen in Leber und Milz. Auffälligerweise trat diese Zellvermehrung auch nach intravenöser Gabe *abgetöteter* Erreger auf. Die Leber vergrößerte sich im gleichen Sinne wie bei unserer Behandlung. In einzelnen Fällen trat dabei Milzamyloid auf.

Durch vergleichende Stickstoffuntersuchungen an den Milzen und Lebern der behandelten Tiere und menschlichen Organen bei eitrigen Einschmelzungen, Sepsis und zerfallenden Tumoren (HOPPE-SEYLER) findet DOMAGK einen engen Zusammenhang zwischen Leber und Milz und dem intermediären Eiweißstoffwechsel. Es wurde der lösliche N- und Eiweiß-N-Gehalt dieser Organe am Gesunden und Kranken bestimmt. Bei der behandelten Maus ist dabei der lösliche N (Rest-N) in der Milz und der Eiweiß-N in der Leber wesentlich gegenüber dem Normalen vermehrt. Gleichlaufend sind auch die Befunde bei infektiösen und spodogenen Milztumoren beim Menschen. Bei eitrigen Einschmelzungen, Infektionen wie auch zerfallenden Tumoren sind der Rest-N der Milz auf das Doppelte, der Rest-N der Leber bis auf das $1\frac{1}{2}$ fache angestiegen. Der koagulable N-Gehalt der Leber kann in Fällen hochgradiger Leberschwellung bis auf das $1\frac{1}{2}$ fache des Normalwertes ansteigen. Die absolute Gesamteiweißzunahme der Leber ist dabei meist noch deutlicher. DOMAGK deutet seine Befunde dahingehend, daß Milz und Leber sehr wichtige Funktionen im intermediären Eiweißstoffwechsel zu erfüllen haben. Die Milz baut anfallende Eiweißschlacken bis zum Rest-N ab. Dieser wird in der Leber wieder zum Eiweiß um- und aufgebaut. Stets besteht ein Gefälle des Rest-N-Gehaltes von der Milz zur Leber. In der Gesamtbilanz betrachtet, ist es auffällig, daß die Gesamt-N-Zunahme in Leber und Milz bei seinen Experimenten weit größer ist als der N-Gehalt der verabreichten Kulturen. Das vermehrte Lebereiweiß entsteht also nicht nur aus den anfallenden Eiweißschlacken durch einen Umbau in der Leber, sondern auch eine Neusynthese aus anderen N-Quellen läuft daneben her.

Während DOMAGK mehr die eiweißabbauende Tätigkeit der Milz und Leber hervorhebt, sprechen unsere Versuche eher für einen Umbau und Neubau von Eiweißkörpern vorwiegend in der Leber.

Eine kleine Stütze liefert uns dazu das vermehrte Vorkommen der RNS in der Leber bei unseren Versuchen. Erfahrungsgemäß ist das Vorkommen der RNS nur im Verlauf einer Eiweißsynthese zu beobachten, während die RNS keine nähere Beziehung zum Eiweißabbau hat (siehe Gössner). Normalerweise ist die Leberzelle recht reich an RNS. Ein Zeichen dafür, daß physiologischerweise in der Leber Eiweiß neu aufgebaut wird. Hohe Werte an RNS der Leberzelle waren bei vergleichenden Betrachtungen häufig mit hohen Globulin- oder vermehrten Gesamteiweißwerten im Blut vergesellschaftet. Selbst in den Mesenchymzellproliferaten trat dabei RNS auf. Sichten wir unser gesamtes Untersuchungsmaterial kritisch für einen Vergleich zwischen erhöhten Globulin- und Gesamteiweißwerten im Blut und vermehrten Vorkommen der RNS im Parenchym und Mesenchym der Leber, so fallen vor allem die caseingefütterten Tiere auf. Unter 59 Tieren (davon 27 mit Caseinfütterung) mit erheblichem RNS-Gehalt der Leberzellen ist in 51 Fällen auch eine erhebliche Globulin- bzw. Gesamteiweißvermehrung im Blut vorhanden (Tabelle 6). Während sämtliche Caseintiere schon nach 5 Injektionen humorale sehr stark reagieren, ist auch ihr Gehalt an RNS der Leber außerordentlich hoch.

Obwohl der RNS-Gehalt der Leber innerhalb des Normalen vielleicht schon tageszeitlich rhythmisch kleineren Schwankungen unterworfen ist (der Stärkegrad I unserer Tabelle 6 kann unter Umständen auch im

Tabelle 6. Gegenüberstellung von starker humoraler Reaktion und erhöhtem RNS-Gehalt der Leberzellen.

Injektionszahl	Ribonucleinsäuregehalt		Davon haben humoral stark reagiert
	vermehrt I	stark II	
5	7 (5 Caseintiere)	—	6
10	8	8 (Caseintiere)	15
15	11	5 (Caseintiere)	11
20	13	7 (Caseintiere)	19
Insgesamt	Vermehrter RNS-Gehalt 59		51

Normalen erreicht werden), glauben wir doch diesen stärkeren Befall bei 59 Tieren mit der gleichzeitig stärkeren humoralen Reaktion bei 51 dieser Tiere in engeren Zusammenhang bringen zu dürfen. Wäre der starke Befall eine reine Zufallserscheinung, so wäre der Wahrscheinlichkeit entsprechend ein geringerer Grad des Zusammentreffens beider Befunde zu erwarten.

Werden nun in der Leber und Milz unter unseren Versuchsbedingungen vermehrt Eiweißkörper intermediär und durch Neusynthese aus Nahrungseiweiß gebildet, so bleibt es immer noch unerwiesen, ob diese Eiweißkörper auch tatsächlich als Plasmaproteine ins Blut gelangen. Die zeitliche und zum Teil auch quantitative Übereinstimmung zwischen den morphologischen Zeichen einer erhöhten Aktivität des Eiweißstoffwechsels von Leber und Milz und den Verschiebungen im Bluteiweiß lassen einen weitgehenden Vermutungsschluß zu. Im übrigen bestärken Beobachtungen anglo-amerikanischer Untersucher die Annahme, daß Mesenchymzellen eine direkte Synthese von Bluteiweißkörpern vollziehen können (s. auch HEINLEIN). Auf dem Gebiet der Antikörperbildung halten HADFIELD und GARROD es für naheliegend, daß das RES weitgehend die Antikörper des Blutes aufbaut. So haben McMMASTER und KIDD die Produktion von neutralisierenden Antikörpern in Lymphknoten aufgezeigt, in deren Lymphbahnenbereich Kuhpockenvirus injiziert worden war. SABIN will diesen Prozeß des Freiwerdens von Antikörpern aus phagocytierenden Zellen sogar direkt sichtbar gemacht haben. Sie sieht dabei, wie sich aus der Zelleinheit von Makrophagen nach Phagocytose oberflächliche Cytoplasmateile loslösen. SABIN schließt daraus, daß dies ein Prozeß ist, bei dem Makrophagen Globuline in Freiheit setzen. Der Vorgang der Globulinbildung wird nach ihrer Ansicht durch Antigenphagocytose intensiviert. Obwohl die morphologischen Betrachtungen von SABIN noch sehr umstritten bleiben können, erscheint der enge Zusammenhang zwischen Phagocytose und Globulinbildung in Makrophagen doch zum mindesten theoretisch beachtenswert. HARRIS gelang es in Fortführung der

Arbeiten von McMMASTER und KIDD nachzuweisen, daß die Lymphocyten immunisierter Tiere wesentlich mehr Antikörper als deren Blut enthalten, so daß auch hier an eine Produktion von Bluteiweißkörpern ins Blut gedacht werden muß. APITZ unter den deutschen Autoren hält zum mindesten für das Plasmocytom die Annahme für gesichert, daß bestimmte Mesenchymzellen definierte Eiweißkörper ins Blut abgeben.

IV. Zusammenfassende Schlußbetrachtung.

Im Verlauf der amyloiderzeugenden Behandlung durch Injektionen mit Na-Casein zeigen sich bei der weißen Maus in *morphologischen Untersuchungen an Milz und Leber* Veränderungen quantitativer und qualitativer Art, die auf gesteigerte Stoffwechselvorgänge in diesen Organen schließen lassen.

1. Das *Lebergewicht* zeigt im Verlauf der Behandlung eine deutliche Zunahme durch *Hypertrophie oder Hyperplasie*, in extremen Fällen bis zu 100% des Anfangsgewichtes. Bei hafergefütterten Tieren bewegt sich die Substanzvermehrung mehr im Rahmen des proportionierten Volumenwachstums, während bei casein- und plasmagefütterten Tieren die Hypertrophie oder Hyperplasie zugrunde lag. Vor allem zeigten die caseingefütterten Tiere ein Überschreiten des kritischen Lebergewichtes und eine Kombination beider Vorgänge.

2. Dem Vorgang des *Teilungswachstums* liegt eine Vergrößerung der Zell- und Kerngrenzflächen durch Vermehrung der Leberzellen bei konstanter Kern-Plasmarelation zugrunde. Bei dem *Volumenwachstum* kommt es durch die Vergrößerung der einzelnen Zelle zu einer prozentual zur Volumenvergrößerung nur geringen Zunahme der Kern- und Zellgrenzflächen, wobei auch hier die Konstanz der Kern-Plasmarelation gewahrt bleibt. Dies wird durch die Aufschlüsselung des mittleren Zellvolumens veranschaulicht. Die *Kernvariationskurve* zeigt eine deutliche Verschiebung zu den größeren *Kernklassen* bei der *Hypertrophie*, während bei der *Hyperplasie* entsprechend dem kleineren mittleren Zellvolumen die *kleineren Kernklassen* gewöhnlich vorherrschen.

Die Bedeutung des *Volumenwachstums* und speziell der *Hypertrophie* liegt in der *Substanzvermehrung*, die des *Teilungswachstums* und speziell der *Hyperplasie* in der *Grenzflächenvermehrung*. Den *Grundvorgang der Leistungssteigerung* der Zelle erkennen wir in der Hypertrophie (47% der Tiere), die am Ende der Behandlung überwiegt. Die Zellvermehrung bzw. Hyperplasie traten nur bei 32% der Tiere mit einem Gipfel nach 10—15 Injektionen ein. Nach 4 Wochen zeigt sich eine deutliche Tendenz zur Normalisierung der Leberzellzahl und Übergang zu Hypertrophie. Nur bei Überschreiten des kritischen Lebergewichtes besteht auch weiterhin eine geringe Zellvermehrung.

3. Ob die Zellvermehrung über *Mitose* und *Amitose* entsteht, ist nicht eindeutig zu entscheiden. Wahrscheinlich laufen beide Vorgänge nebeneinander ab, wobei der Mitosesteigerung, wie wir sie in unseren Versuchen häufig fanden, mehr eine regenerative Bedeutung als Folge eines gesteigerten Zellumsatzes und der amitotischen Zellteilung eine rasche Anpassungsmöglichkeit an einen akut gesteigerten Stoffwechsel durch Vergrößerung von Kern- und Zellgrenzflächen zukommt. Der Hypertrophie dagegen obliegt mehr die stetig gleichmäßig erhöhte Dauerleistung.

4. Im Unterschied zu diesen Vorgängen sehen wir in dem vermehrten Auftreten von *doppelkernigen* Zellen, das bei völlig normalen Lebern wie bei Hyperplasie und Hypertrophie ohne Gesetzmäßigkeit variieren kann, eine Steigerung des intracellulären Stoffwechselgeschehens durch Vergrößerung der Grenzflächen zwischen Kern und Plasma der einzelnen Zelle.

5. Das *Mesenchym* (Proliferationsherde und Endothelzellen in der Leber, relatives Milzgewicht) zeigt im Verlauf der Injektionen eine deutliche von der Fütterung unabhängige zunehmende Zellproliferation, die in ihrem Ausmaß zum Teil von der Stärke der örtlichen Absceßbildung abhängt.

Während so die morphologisch quantitativen Untersuchungen eindeutige Zeichen einer verstärkten allgemeinen Stoffwechselleistung geben, führen *histochemische Untersuchungen* der Pentosenucleotide auf das spezielle Problem der Eiweißsynthese. Das Vorkommen der RNS ist mit der Eiweißbildung eng verknüpft. Während schon normalerweise der Gehalt der Leber an RNS ziemlich groß ist und mit dem normalen Eiweißumsatz im Zusammenhang steht, werden im Laufe der Eiweißfütterung und Injektionsbehandlung Zeichen einer Intensivierung des Nucleotidumsatzes beobachtet. Sie weisen auf eine gesteigerte Eiweißbildung hin. Ebenso findet man RNS in den proliferierten Mesenchym- und Endothelzellen der Leber, ein Befund, der auch diese Zellsysteme in die Eiweißbildung einbezieht.

Die *Bluteiweißuntersuchungen* an den Tieren ergaben im Einklang mit älteren Befunden im Endwert bei 75% und bei gleichzeitiger Mitverwertung der laufenden Bestimmungen in 80% aller Tiere eine *Globulinvermehrung* im Laufe der Injektionsbehandlung. Der Gesamteiweißwert lag in 38% aller Fälle etwas über der Norm. Bei Einordnung der einzelnen Gruppen, welche wir untersucht haben, zu einem dynamischen Gesamtbild ergab sich, daß der Globulinanstieg sehr rasch (schon nach 5 Injektionen) zustande kommt und mit weiteren Injektionen nicht mehr wesentlich höher steigen muß. Im Gegenteil, nach 10—15 Injektionen kann bereits ein Stillstand oder Abfall der Globulinvermehrung auftreten. Letztere ist bei erkrankenden Tieren etwas häufiger. Bei den

Caseintieren war eine starke humorale Reaktion mit einem sehr frühen Auftreten von Amyloid in Milz und später auch Leber vergesellschaftet. Plasmafütterung wirkt, wie schon frühere große Reihenversuche (LETTERER) gezeigt haben, amyloidverzögern.

6. Fassen wir die *Ergebnisse vergleichender humoral-morphologischer Studien* zusammen:

a) Gleichlaufend mit der Globulinvermehrung des Serums der behandelten Tiere vermehrt sich deren Mesenchym und nimmt die Milz an Gewicht zu.

b) In extremen Fällen der Globulinvermehrung und bei Gesamteiweißvermehrung des Blutes schaltet sich das Leberparenchym durch starke unproportionierte Gewichtszunahme mit in diesen Vorgang ein.

c) Höherer Gehalt an RNS in der Leberzelle, der sicher nicht in der physiologischen Breite eines normalen Rhythmus liegt, findet sich besonders häufig bei Tieren mit hohem Globulin- und Gesamteiweißwert.

d) Diese Befunde sprechen dafür, daß Milz- und Lebermesenchym zusammen mit dem Leberparenchym nicht nur Eiweißkörper abbauen, sondern aus den anfallenden Eiweißschlacken und aus anderen Stickstoffquellen schöpfend auch neue Eiweißkörper synthetisieren. Aus der Bluteiweißveränderung während dieses Eiweißstoffwechselgeschehens in der Leber und Milz kann auf die Möglichkeit geschlossen werden, daß die neu aufgebauten Eiweißkörper als mehr oder weniger definierte Bluteiweißkörper ins Blut gelangen.

e) Inwieweit diese Betrachtungen zu einer weiteren Klärung der Frage der Amyloidgenese beitragen können, ist noch nicht zu sagen. Während die Amyloidose sicherer Ausdruck einer Eiweißstoffwechselstörung ist, erscheint die Entscheidung, an welchem Punkt des Eiweißstoffwechsels diese Störung einsetzt, noch recht diskutabel. DOMAGK und KUCZYNSKI glauben noch an eine Abbaustörung. Unsere Befunde beweisen eindeutig, daß im Zuge der amyloidkrankmachenden Behandlung der weißen Maus Leber und Milz vermehrt Eiweiß aufbauen und gleichzeitig eine Globulinvermehrung im Blut auftritt.

7. Abgesehen von den auf unser Problem im besonderen zugeschnittenen Fragen und Ergebnissen hat uns experimentelle Erfahrung und theoretische Auswertung noch zu einer für die Auslegung der Begriffe Hypertrophie und Hyperplasie notwendig gewordenen Unterscheidung gebracht. Es hat sich gezeigt, daß bei einem Organ mit normalerweise konstanter Zellzahl — wie hier die Leber der weißen Maus — einerseits das Verhalten des Organgewichtes zum Körpergewicht (relatives Lebergewicht) und andererseits die Feststellung der Leberzellzahl am Untersuchungszeitpunkt im Vergleich zur normalen Wachstumskurve für die

nähere Begriffsbestimmungen ausschlaggebend sind. Wir können damit eine proportionierte Organvergrößerung bzw. -verkleinerung von einer unproportionierten unterscheiden. Die Bestimmung der Leberzellzahl gestattet dann im einzelnen die Unterscheidung, ob es sich bei einer Organvergrößerung um ein Volumen- oder Teilungswachstum handelt, bzw. bei einer Organverkleinerung eine einfache oder numerische Atrophie vorliegt. Dementsprechend kommen wir unter Einführung einiger Unterbegriffe zu der folgenden in Abb. 1 schon erläuterten Terminologie:

- a) *Hypertrophie* ist unproportionierte Organvergrößerung durch Zellvergrößerung.
- b) *Hyperplasie* ist unproportionierte Organvergrößerung durch Zellvermehrung.
- c) *Eutrophie* ist proportionierte Organvergrößerung durch Volumenwachstum der Zellen, wobei die Zellzahl konstant bleibt. Dieser Vorgang liegt in der Leber der weißen Maus dem physiologischen Wachstum zugrunde.
- d) *Euplasie* ist proportionierte Organvergrößerung durch Teilungswachstum.
- e) *Isoplasie* stellt den Sonderfall dar, daß in einem Organ eine Zellvermehrung ohne Gewichtsänderung des Organs stattfindet, wobei die Zellen naturgemäß kleiner werden müssen.
- f) Liegt der *Organverkleinerung*, die proportioniert oder unproportioniert verlaufen kann, eine Volumenverminderung der Zellen zugrunde, so handelt es sich um eine *einfache*, nimmt die Zellzahl ab, um eine *numerische Atrophie*.

Literatur.

- ALTMANN: Z. Naturforschg **4b**, 138 (1949). — APITZ: Virchows Arch. **306**, 631 (1940). — BENNINGHOFF: Handwörterbuch der Naturwissenschaften, Bd. 4. 1934. BERGHE, VAN DEN: Acta biol. Belg. **2**, 390 (1942). — BERG, W.: Biochem. Z. **61**, 428 (1914). — Münch. med. Wschr. **1913/14**. — Pflügers Arch. **194**, 102 (1922); **214**, 243 (1926). — Z. mikrosk.-anat. Forschg **28**, 565 (1932); **35**, 146 (1934); **38**, 644 (1935). — BOHLE, HARTMANN u. POLA: Klin. Wschr. **1950**, 106. — BRACHET, J.: C. r. Soc. Biol. Paris **133**, 88 (1940). — Embryologie chimique. Paris: Masson & Co. Archives de Biol. **53**, 207 (1942). — CASPERSSON, T.: Naturwiss. **29**, 33 (1941). — DIETRICH: Mitt. Grenzgeb. Med. u. Chir. **40**, 183. — DOMAGK: Virchows Arch. **253**, 594 (1924). — GEBELEN, H.: Zahl und Wirklichkeit. Leipzig 1943. — GöSSNER, W.: Zbl. Path. **85**, 443 (1949). — HADFIELD and GARROD: Rec. Advanc. Path., 5. Aufl., S. 36—38. London 1947. — HARRIS: Zit. nach HADFIELD und GARROD. — HEINLEIN: Z. exper. Med. **112**, 535 (1942). — HOLMGREN u. FORSGREN: Zit. nach PFUHL. In MöLLENDORF, Handbuch der mikroskopischen Anatomie des Menschen, Bd. V/2. — HOPPE-SEYLER: Z. phys. Chem. **116** u. **130**. — HYDÉN, H.: Acta physiol. scand. (Stockh.) **6** (1943). — Z. mikrosk.-anat. Forschg **54** (1943). — JAKOBY, W.: Arch. f. Entw.mechan. **141**, 584 (1942). (Siehe dort weitere Literaturangaben.) — KUCZYNSKI: Virchows Arch. **239**, 300 (1922). — KÜHNAU: Z. angew. Chem. **1949**. — LAGERSTEDT, ST.: Acta anat. (Lund) **1949**, Suppl. 9. —

LEDUC, E. H.: Amer. J. Anat. **84**, 397 (1949). — LETTERER, E.: Beitr. path. Anat. **75**, 486 (1925). — Virchows Arch. **317** (1949). — Dtsch. med. Wschr. **1950**, H. 1. — MASTER u. KIDD: Zit. nach HADFIELD und GARROD. — MONNÉ: Experientia **2**, 153 (1946). — MÜNZER: Arch. mikrosk. Anat. u. Entw.gesch. **104**, 138. — NOLTE, A.: Z. Naturforschg **2b**, 295 (1947). — NOVIKOFF u. POTTER: J. of biol. Chem. **173**, 223 (1948). — OPIE, E. L.: J. of exper. Med. **84**, 91 (1947); **85**, 339 (1949). — OTT u. SCHNEIDER: Ärztl. Forschg **4**, 345 (1950). — RIES, E.: Z. Zellforschg **1940**, 456. — RÖSSLE u. ROULET: Maß und Zahl in der Pathologie. Berlin: Springer 1932. — SABIN: J. of exper. Med. **70**, 67 (1939). — SCHMIDT, M. B.: Beitr. path. Anat. **11**, 199 (1892). — SCHNEIDER, G.: Z. physiol. Chem. **283**, 113 (1948). — Virchows Arch. **317**, 26 (1949). — SIESS u. STEGMANN: Virchows Arch. **318** (1950). — STOWELL: Arch. Path. **46**, 164 (1948). — Cancer **2**, 121 (1949). — THORELL, B.: Acta med. scand. (Stockh.) **117**, 334 (1939); Suppl. 200 (1947). — THORELL, B., u. WISING: Nord. Med. **24**, 1842 (1944). — VOGT, C. u. O.: Ärztl. Forschg **1**, 8, 43 (1947). — WALLBACH: Z. exper. Med. **68**, H. 5/6 (1929). — WILSON and LEDUC: Anat. Rec. **97**, 470 (1947). — ZOLLINGER: Experientia **6**, 14 (1950). — ZYLBERSZAC: Acta biol. Belg. **1**, 429 (1941).

Dr. WOLFGANG GöSSNER, Tübingen, Patholog. Institut d. Universität.