

Aus der Inneren Abteilung des Städtischen Krankenhauses Berlin-Wilmersdorf  
(Chefarzt: Dr. H. HÖTZL) und dem Pathologischen Institut des Städtischen  
Wenckebach-Krankenhauses Berlin-Tempelhof (Chefarzt: Dr. C.-J. LÜDERS)

## Die Wirkung isolierter Leberzellmitochondrien auf den akuten Tetrachlorkohlenstoffschaden der Rattenleber\*

### I. Mitteilung

Histologische, enzymatisch-histochemische und blutchemische Unter-  
suchungen nach parenteraler Zufuhr homologer Leberzellmitochondrien

Von

GERHARD LAUDAHN und CLAUS-JÜRGEN LÜDERS

Mit 15 Textabbildungen

(Eingegangen am 24. Juli 1956)

Das Verfahren der Zellfraktionierung ermöglicht es, differenzierte Bauelemente von Organzellen, wie Zellkerne, Mitochondrien und Mikrosomen zu isolieren und anzureichern. Erfolgt die Aufarbeitung des Gewebes unter Einhaltung aller erforderlichen Bedingungen, so bleiben die isolierten Zellfraktionen morphologisch und biologisch intakt und erlauben eine einwandfreie biochemische Untersuchung ihrer speziellen Eigenschaften. Auf diese Weise wurde die chemische Zusammensetzung der einzelnen Bauelemente der Zelle ermittelt, die sich zugleich als Träger ganz unterschiedlicher Fermentsysteme erwiesen. Zellstoffwechsel und Zellatmung werden durch das Zusammenwirken der Fermentsysteme aller Zellkomponenten aufrechterhalten.

Von allen Zellbestandteilen ist bisher über Aufbau und Funktion der *Mitochondrien* am meisten bekannt (Übersicht s. 23–25). Diese in das Cytoplasma der Zelle eingebetteten Partikel haben im Rahmen des Zellstoffwechsels wahrscheinlich die bedeutungsvollste Aufgabe: sie besorgen die Endoxydation der Nährstoffe, wobei die Oxydation mit einer Phosphorylierung verknüpft ist. Der komplexe Vorgang der oxydativen Phosphorylierung dient der Energielieferung und ist nach heutigen Erkenntnissen eine ausschließliche Funktion der Mitochondrien<sup>31, 44</sup>. Dieser für die Aufrechterhaltung der Zellatmung lebensnotwendige Phosphorylierungsprozeß kann durch Schädigung der Mitochondrien infolge infektiöser, toxischer, alimentärer oder mit Hypoxämie einhergehender Vorgänge sehr schnell und teilweise selektiv gestört werden. Die daraus sich ergebende Zellstoffwechselstörung führt

\* Unserem hochverehrten Lehrer Herrn Prof. Dr. RÖSSLE zum 80. Geburtstag  
in Dankbarkeit gewidmet.

je nach Art, Schwere und Dauer der angreifenden Schädigung von der „trüben Schwellung“ der Zelle bis zum Zelltod und wirkt sich naturgemäß bei Organen mit lebhaftem Stoffwechsel besonders ungünstig aus.

Ein Organ, bei dem diese Zusammenhänge besonders deutlich werden, ist die *Leber*. In unseren bisherigen Veröffentlichungen<sup>27, 28, 29</sup> haben wir die Beziehungen zwischen Mitochondrienfunktion und Leberparenchym-schaden bereits ausführlich dargestellt. Gerade bei der Leber, die durch die Konzentration lebensnotwendiger Enzymsysteme im Mittelpunkt des Stoffwechsels steht, bedeutet ein Angriff der genannten schädigenden Faktoren in erster Linie eine Fermentschädigung mit allen Folgen für den Zell- und Gesamtstoffwechsel. Trotz der unleugbaren Fortschritte der modernen Lebertherapie sind die bisherigen Maßnahmen zur Förderung der Ferment- und damit der Zellregeneration noch unbefriedigend. Zwar sind Bestrebungen im Gange, das primär geschädigte Multienzymsystem der Mitochondrien beim Leberparenchym-schaden spezifisch zu unterstützen<sup>41, 42, 43</sup>, doch können alle bisher einzeln oder gemeinsam zugeführten „hepatotropen“ Substanzen (Aminosäuren, Vitamine, Purinkörper, Kreatin, Orotsäure usw.) bei der Kompliziertheit der Stoffwechselstörungen nicht als gezielte Therapie betrachtet werden.

Die entscheidende Rolle eines intakten Mitochondriensystems in der Leber war bekannt, die Möglichkeit zur Isolierung reiner vitaler Mitochondrien gegeben; der Gedanke lag daher nahe, eine *ideale Therapiemöglichkeit in der Substitution der geschädigten Mitochondrien durch Zufuhr reiner Mitochondrien aus gesunder Leber* zu suchen und zunächst tierexperimentell zu überprüfen<sup>27, 28</sup>. Diese Überlegung wurde — zu unserer Überraschung — in der einschlägigen Literatur bisher noch niemals ausgesprochen.

Diese Tatsache war um so überraschender, als Mitochondriensuspensionen bereits schon verschiedentlich Versuchstieren injiziert worden waren. Allerdings dienten diese Versuche hauptsächlich der Untersuchung der Antikörperbildung<sup>1, 8, 15, 18, 36</sup>. Von anderen Untersuchern, besonders von LETTRÉ und Mitarbeitern, wurde außerdem auch der Einfluß injizierter und radioaktiv markierter Tumorzellmitochondrien auf das Wachstum des gleichartigen Tumors im Tierversuch geprüft<sup>32-35</sup>. Aus diesen Experimenten ging u. a. hervor, daß die injizierten Mitochondrien im Körper nicht abgebaut wurden, sondern nach Wanderung zu den korrespondierenden Tumorzellen von diesen nach Art der Phagocytose offenbar als ganze Strukturelemente aufgenommen wurden! Auf dieses Problem soll im Rahmen der vorliegenden Untersuchungen weiter unten näher eingegangen werden. Eine rein therapeutische Anwendung isolierter vitaler Mitochondriensuspensionen wurde bisher jedoch noch nicht beschrieben.

Wir haben deshalb in Vorversuchen zunächst die Verträglichkeit homologer und heterologer Mitochondriensuspensionen bei unterschiedlicher Applikation im Tierversuch (Ratte, Maus, Meerschweinchen) geklärt<sup>28</sup>. Dabei ergab sich, daß selbst durch höchste Dosen bei intraperitonealer, subcutaner, intramuskulärer und intravenöser Injektion keine toxischen oder anaphylaktischen Erscheinungen und keine geweblichen Veränderungen in den untersuchten Organen (Leber, Pankreas, oberer Dünndarm und Speicheldrüsen) bei Ratten auftraten.

Daraufhin konnte der erste Therapieversuch vorgenommen werden: Geprüft wurde die *therapeutische Wirkung parenteral zugeführter, isolierter, vitaler Lebermitochondrien aus gesunder Rattenleber auf den akuten Tetrachlorkohlenstoffschaden der Rattenleber*. Die Ergebnisse dieses Versuches sollen hier ausführlich dargestellt werden.

### Material und Methoden

**Mitochondrien.** Für die Mitochondriengewinnung wurden die Lebern von weißen Ratten beiderlei Geschlechts verwendet. Zu diesem Zweck hielten wir 250 Ratten von 200—250 g Gewicht einer einheitlichen Züchtung gesondert. Die Aufarbeitung erfolgte in Anlehnung an die Methode von SCHNEIDER-HOGEBOOM<sup>26,41</sup>.

An jedem Injektionstag wurden jeweils 20 Ratten, die 24 Std gehungert hatten, durch Nackenschlag getötet. Nach sorgfältiger Entblutung der Tiere wurden sofort die Lebern entnommen und bei Eiskühlung innerhalb einer Minute homogenisiert (Waring-Blendor-Prinzip). Das gewogene Homogenat wurde 1:10 in eiskalter 0,25 m-Saccharoselösung aufgenommen (Saccharose p. A. in schwermetallfreiem Aqua bidest.) und der fraktionierten Zentrifugierung in einer schnellaufenden kühlbaren Zentrifuge („Eispirouette“) bei 0° C unterworfen. Zunächst wurde zur Entfernung von Zelltrümmern, Kernen und Erythrocyten 10 min bei 700 × g zentrifugiert, der Überstand aufbewahrt und das Sediment nochmals nach Aufnahme in frischer 0,26 m-Saccharoselösung 10 min bei 700 × g gewaschen. (Trennung von Sediment und Überstand erfolgte jeweils durch vorsichtiges Absaugen mit einer Rekordspritze mit langer, stumpfer Nadel. Zentrifugeneinsätze aus Kunststoff). Erster Überstand und Waschlösung wurden vereinigt und 2mal je 17 min bei 5000 × g zentrifugiert. Das jetzt erhaltene Sediment besteht aus der „unreinen“ Mitochondrienfraktion und enthält noch vereinzelte Erythrocyten und Kerntrümmer; diese können durch 2—3maliges Waschen für 5 min bei 2000 × g entfernt werden. Die vereinigten Sedimente wurden dann wiederum neu aufgenommen und 10 min bei 24000 × g zentrifugiert. Über dem festen Mitochondrionsediment liegt jetzt eine lockere Schicht submikroskopischer Partikel („fluffy layer“), die zur Mikrosomenfraktion gerechnet werden muß. Diese Schicht wurde vorsichtig abgesaugt und das Mitochondriensediment jeweils nach Aufnahme in frischer Suspensionslösung noch 2mal 10 min bei 24000 × g zentrifugiert. Das Endsediment enthält die reine Mitochondrienfraktion. Diese Sediment wurde in 25,0 cm<sup>3</sup> frischer 0,25 m-Saccharoselösung aufgenommen und bildete die „Stamm-suspension“.

### Vitalitäts- und Reinheitskriterien der Mitochondrienfraktion:

Bei licht- und phasenkontrastmikroskopischer Untersuchung zeigte sich ein homogenes Sediment aus 0,5—2 μ großen sphärischen Partikeln, das sich in typischer Weise vital mit Janusgrün B 1:20000 anfärbte und mit Neutralrot keine

Farbreaktion gab. Bei Vergrößerung 1:1000 fand sich auf 30—50 Blickfeldern 1 Zellkern. Der Gehalt an Zellkernen war damit insgesamt gesehen so gering, daß sich im Sediment chemisch keine Desoxyribonucleinsäure (= typischer und ausschließlicher Bestandteil der Zellkerne) mehr nachweisen ließ und konnte demgemäß außer acht gelassen werden. Durch Ultrazentrifugierung konnte weiterhin mittels Philpot-Svensson-Optik nachgewiesen werden, daß in dem Sediment keine Mikrosomen mehr vorhanden waren. Im Thunberg-Versuch und bei Messung im Warburg-Gerät zeigten die Mitochondrien an zahlreichen geprüften Substraten erhaltene Atmung und Phosphorylierung. Mit der Gesamtheit der Untersuchungsverfahren (Einzelheiten s.<sup>28</sup>) wurde bestätigt, daß das Sediment aus reinen, vitalen Mitochondrien bestand und diese für die relativ kurze Zeitspanne zwischen beendeter Gewinnung und Injektion bei Aufbewahrung auf Eis ihre vitalen Eigenschaften bewahrten.

### *Standardisierung der Mitochondriensuspensionen*

Da es sich bei dem vorliegenden Versuch noch um frisch suspendierte Mitochondrien handelte, die nicht wie in späteren Versuchen nach Spezifophilisation in mg dosierbar waren, wurde als Standardisierung der Suspensionen die Aktivität der Bernsteinsäure-Dehydrogenase der Mitochondrien gewählt. Dazu wurde sofort nach Beendigung des Herstellungsprozesses die Fermentaktivität in 1,0 cm<sup>3</sup> der Stammsuspension in einem leicht modifizierten Thunberg-Verfahren an der Entfärbungsgeschwindigkeit einer definierten Methylenblaulösung bei 37° C im Vakuum gemessen (Vierfachkontrolle jeder Einzelmessung). Die Entfärbungszeit in Sekunden wurde auf mg Mitochondrienstickstoff (KJELDAHL) bezogen und ergab einen Quotienten, der der Einfachheit halber als „Aktivitäts-Einheit“ (AE) bezeichnet wurde (genaue Einzelheiten der Methodik s.<sup>28</sup>). Durch Verdünnung mit 0,25 m-Saccharose unter Kontrolle der Aktivität wurde jede im weiteren Verlauf frisch hergestellte Stammsuspension so eingestellt, daß 1,0 cm<sup>3</sup> der Suspension eine durchschnittliche Aktivität der Bernsteinsäure-Dehydrogenase von 25 AE ( $\pm$  2 AE) hatte. Damit war in gewissen Grenzen die Möglichkeit einer gleichbleibenden Dosierung für die Injektionen geschaffen. An jedem Injektionstag erfolgte eine frische Herstellung der Mitochondrien-Stammsuspension. Während der sofort angeschlossenen Aktivitätsprüfung stand die Stammsuspension im Eisschrank und nach der erfolgten Einstellung (Zeitdauer etwa 1 Std) wurde sofort mit den Injektionen begonnen. Auf eine sterile Herstellung konnte verzichtet werden, da die laufende bakteriologische Kontrolle stets nur einen sehr geringen Keimgehalt von für Ratten nicht pathogenen Erregern in den Suspensionen ergab. (Eine sterile Herstellung ist jedoch möglich, wie sich später bei der Gewinnung von Rinder- und Kalbslebermitochondrien für klinische Zwecke gezeigt hat.)

### *Tiergruppen*

Der therapeutische Versuch erfolgte an 105 erwachsenen weißen Inzuchtratten beiderlei Geschlechts vom Stamm SPRAGUE-DAWLEY, deren mittleres Gewicht bei 220 g lag. Die Tiere erhielten eine Vollkost, bestehend aus Gerste, Leinsamen, getrockneten Garneelen und 2mal wöchentlich Gemüse, rohes Fleisch und Weißbrot in Milch; Wasser ad libitum. Die Einteilung erfolgte in 5 Gruppen zu je 21 Tieren:

Gruppe I: Kontrolltiere; Gruppe II: Nur mit Mitochondrien behandelte Tiere; Gruppe III: Nur mit Tetrachlorkohlenstoff vergiftete Tiere (einmalige Gabe von 0,25 cm<sup>3</sup>/100 g subcutan); Gruppe IV: Mit Mitochondrien 3 Tage lang täglich vorbehandelte, dann in gleicher Art vergiftete und weiter mit Mitochondrien behandelte

Tiere (= prophylaktische Wirkung); Gruppe V: Mit Mitochondrien nach erfolgter gleichartiger Vergiftung behandelte Tiere (= therapeutische Wirkung).

Sämtliche Injektionen erfolgten subcutan. Eine Übersicht der Versuchsanordnung gibt Tabelle I. In den dort angegebenen Abständen wurden jeweils 3 Tiere jeder Gruppe getötet und die Lebern nach Wägung histologisch untersucht.

Die Vergiftung erfolgte in den Abendstunden des 4. Versuchstages (vgl. Tabelle I); die erste Mitochondrieneinjektion der Gruppe V am 5. Versuchstag lag zeitlich 12 Std nach erfolgter Vergiftung. Die ersten 3 Tiere aller Versuchsgruppen wurden am 6. Versuchstage getötet; das entsprach für die Gruppen III—V einem Zeitpunkt von 36 Std nach erfolgter Vergiftung.

**Histologie.** Außer einer Hämatoxylin-Eosin- und einer Sudanfärbung wurden folgende spezielle histologische Untersuchungen durchgeführt.

*Mitochondrien im Gewebe* Formolfixierung, Paraffineinbettung und Entparaffinieren von 4  $\mu$  dicken Schnitten wie üblich. Einstellen der Schnitte über Nacht in eine Färbelösung von Chromotrope 2 R-Anilinblau. (Färbelösung: 1,0 g Phosphorwolframsäure unter Erwärmung in 100,0 cm<sup>3</sup> 0,02 n-Salzsäure lösen und 0,5 g Anilinblau zusetzen. Nach dem Akbühlen Zusatz von 2,0 g Chromotrope 2 R\*. Einstellen der Lösung auf pH 2,2. Vor Gebrauch filtrieren.) Anschließend Abspülen der Schnitte mit Aqua dest., trocknen zwischen Fließpapier und 3mal für die Dauer von je 5 min in eine Lösung von 3 Teilen tertiärem Butylalkohol + 1 Teil absolutem Alkohol einstellen. Danach je 5 min dehydrieren mit 2maligem Wechsel in einer Mischung von 3 Teilen Terpentinöl + 1 Teil Xylool. Abschließend werden die Schnitte 2mal in Xylool gewaschen und in Canadabalsam eingeschlossen. — Färbung: Mitochondrien rot, Kerne und Bindegewebe tiefblau, Nucleoli rot, Cytoplasma grau-blau.

#### *Histochemischer Nachweis der Bernsteinsäure-Dehydrogenase*

Substratlösung: 3 Teile einer 1%igen Lösung von 2,3,5-Triphenyltetrazoliumchlorid werden mit 1 Teil physiologischer Kochsalzlösung versetzt und mit einer 0,1 m-Phosphatpufferlösung (9 Vol. Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> + 1 Vol. KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) auf pH 7,64 eingestellt. Drei Teile dieser Lösung werden mit 1 Teil 0,2 m-Natriumsuccinatlösung versetzt.

Arbeitsgang: Sofort nach Herausnahme der Lebern werden daraus kleine Gewebsproben entnommen und in eiskalte physiologische Kochsalzlösung gebracht. Die Gewebsproben werden mit einer Rasierklinge in 2—3 mm starke Scheiben zerschnitten und in ein Kölbchen mit 5,0 cm<sup>3</sup> der Substratlösung überführt. Fester Verschluß der Kölbchen durch Zellophan und Inkubation für 1 Std im Brutschrank bei 37,5° C, wobei alle 10 min geschüttelt werden muß. Danach Abgießen der Substratlösung, Aufgießen von 10%igem neutralem Formalin und 24 Std im Dunkeln fixieren lassen. Anschließend Anfertigung 15—20  $\mu$  starker Gefrierschnitte, Einbettung in Glycergelatine und Überziehen des Deckglasrandes mit farblosem Nagellack. — Reaktion: an den Dehydrogenaseorten Ablagerung rötlich-purpurner Formazankristalle. Lokalisation intracellulär, hauptsächlich um die Gefäße, Kerne negativ.

#### *Histochemischer Nachweis der alkalischen Phosphatase*

Die Substratlösung setzt sich zusammen aus 25,0 cm<sup>3</sup> 2%iger Natrium- $\beta$ -glycerophosphat-Lösung, 25,0 cm<sup>3</sup> 2%iger Veronal-Natrium-Lösung, 50,0 cm<sup>3</sup> Aqua dest.,

\* Pharmaceutical Laboratories National Anilin Division. Allied Chemical & Dye Corporation. 40 Rector Street, New York 6, N. Y. Catalog Nr. 616.

5,0 cm<sup>3</sup> 2%iger Calciumchloridlösung, 2,0 cm<sup>3</sup> 2%iger Magnesiumchloridlösung; der Lösung werden einige Tropfen Chloroform zugesetzt und ihr p<sub>H</sub> wird auf 9,4 eingestellt.

Arbeitsgang: 2—3 mm starke Leberstückchen werden zunächst 24 Std in eiskaltem Aceton (Eisschrank!) fixiert und dann weitere 6 Std in frischem Aceton bei Zimmertemperatur. Schnelles Einbetten über weiches Paraffin zu hartem Paraffin und Anfertigung von 4—8 μ dicken Schnitten. Die Schnitte werden auf handwarmem Wasser gestreckt und 4 Std bei 37° C in der Substratlösung inkubiert (Thermostat). Nach Abspülen in Aqua dest. Einstellen der Schnitte 5 min in eine 1%ige Lösung von Kobalthlorid, darauf Abspülen in Aqua dest. und Überführung in eine stark verdünnte Lösung von gelbem Ammoniumsulfid für 1—2 min (Lösung muß ganz schwach gelblich sein). Nach erneutem Abspülen Entwässerung über die Alkoholreihe und Einschluß in Canadabalsam. Reaktion: Phosphataseorte braun-schwarz, Kerne negativ.

**Elektrophorese.** Das Blutserum der getöteten Tiere wurde mittels Papierelektrophorese (Veronal-Natrium-Puffer p<sub>H</sub> 8,4, Laufzeit 10 Std, Amidoschwarz) untersucht und über den ganzen Verlauf zu Vergleichszwecken stets kontrolliert. Bei einem Teil der Tiere wurde nebenher außerdem das Antweiler-Verfahren angewendet (Mikroelektrophorese; Dole-Puffer p<sub>H</sub> 8,6, Ionenstärke 0,12, 25 min bei 15° C und 1,8 mA).

### Ergebnisse

#### *Histologisch und enzymatisch-histochemisch*

##### **Gruppe I.** (Normaltiere; Tier 1—21.)

**H.-E.-Färbung:** Protoplasma der Leberzellen grobschollig mit Lückenbildungen. Kerne in sämtlichen Läppchenanteilen gleichmäßig groß. In den periportalen Feldern und um größere Venen mehr oder minder dichte Zellinfiltrate aus leukocytären und monocytären Elementen, darunter Eosinophile sowie Plasmazellen.

**Sudan III:** Der Fettgehalt der Normallebern schwankt zwischen ganz vereinzelten, disseminiert verteilten intracellulären Fetttröpfchen und erheblichen Fetteinlagerungen in der intramedиären und peripheren Läppchenzone. Größe der Fetttröpfen unterschiedlich, die größten entsprechen Leberzellkernen. Gelegentlich Fettspeicherung in den KUPFFER-schen Sternzellen.

**Alkalische Phosphatase:** In den periportalen Feldern sind Gefäßwände und Gallengangswandungen positiv. Eine Schwärzung zeigen weiter vereinzelte KUPFFERSche Sternzellen sowie Blutzellen innerhalb der Lebercapillaren.

**Bernsteinsäure-Dehydrogenase:** Die größte Aktivität findet sich in der periportalen Region und in der Umgebung größerer Lebervenen und Pfortaderäste. Hier liegen intracellulär massenhaft vielgestaltige Formazankristalle in Form von Reisern, Tafeln und Nadeln. Die Kerne sind frei. Fetttröpfchen sind blaß-orange gefärbt. Die perizentrale Region der Läppchen ist praktisch frei.

**Mitochondrien:** Im Protoplasma der Leberzellen zahlreiche, teils kugelige, teils mehr länglich ovale, feinste rote Gebilde. Kerne tiefblau,

Nucleoli der Kerne gleichfalls rot, Cytoplasma farblos oder leicht bläulich tingiert.

**Gruppe II.** (Nur mit Mitochondrien behandelte Tiere; Tier 22—42.) Makroskopisch weisen die Lebern keine Veränderungen gegenüber der normalen Rattenleber auf.

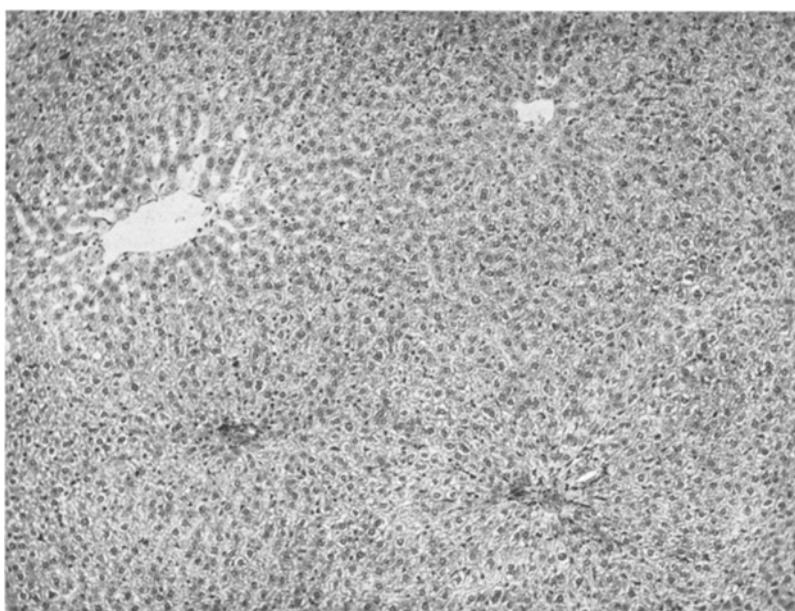


Abb. 1. Gruppe II, Tier 23. Nur mit Mitochondrien behandelt. Keine Parenchymveränderungen. H.-E. 100:1

*H.-E.-Färbung:* Das Übersichtsbild entspricht der normalen Rattenleber. Die periportalen Infiltrate sind bei einzelnen Tieren schwächer ausgeprägt (Abb. 1).

*Sudan III:* Die Fetteinlagerung in den Leberzellen ist in ihrem Ausmaß gegenüber den Normaltieren weniger schwankend; man findet durchschnittlich nur wenige, ganz unregelmäßig verteilte Fetttropfchen. Auffällig ist dagegen bei der Mehrzahl der Tiere eine tropfige Fetspeicherung in den KUPFFERSCHEN Sternzellen.

*Alkalische Phosphatase:* Die Reaktion entspricht der des Normaltieres, nur bei Tier 26 zeigen einige Capillarwände in der Umgebung der Zentralvenen eine Schwärzung, im Cytoplasma benachbarter Leberzellen positive Granula.

*Bernsteinsäure-Dehydrogenase:* Gleicher Befund wie bei der normalen Rattenleber.

*Mitochondrien:* Keine Veränderungen gegenüber den unbehandelten Tieren.

Die Tiere 33, 35—37 sind nicht zu verwerten, da bei ihnen eine granulomatöse Infektion mit Auftreten zahlreicher miliarer epitheloidzelliger Granulome gefunden wurde, offenbar eine sog. Pseudotuberkulose. Entsprechend weichen die Fermentreaktionen vom Normalbild ab.

Bei den Tieren 39, 41, 42 wurden vereinzelte gleichartige Granulome gefunden, ohne daß jedoch bei den angestellten Färbungen und histochemicalen Reaktionen

Unterschiede zu den übrigen Tieren der Gruppe festgestellt werden konnten.

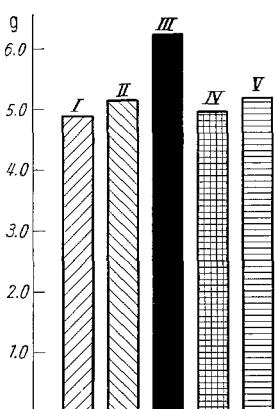
**Gruppe III.** (Nur mit Tetrachlorkohlenstoff vergiftete Tiere; Tier 43—63.)

*Nach 36 Std:* Makroskopisch sind die Lebern stark vergrößert und grau-gelblich gefleckt. Oberfläche fein granuliert mit verstärkter Gefäßzeichnung. Deutliche Gewichtszunahme der Lebern dieser Gruppe (vgl. Abb. 2).

*H.-E.-Färbung:* Die zentralen Läppchenteile sind durch nekrobiotische Kolaps herde (Abb. 3) gekennzeichnet mit zusammengesinterten Leberzellen und Kerndegenerationen in Form variabler Kerngröße, Schwankungen des Chromatingehaltes und Kerndeformierungen bis zu ausgeprägten Pyknosen. Protoplasma verdichtet, homogen stark eosino-

Abb. 2. Durchschnittliche Lebergewichte der einzelnen Gruppen 36 Std nach Beginn der Vergiftung in den Gruppen III—V (Kontrolle Gruppe I und II)

phil. Zwischen den kollabierten Zellen schüttete Zellfiltrate, meist Eosinophile und Plasmazellen. Nach außen anschließend eine mehr oder minder deutlich ringförmig angeordnete Zone stark vergrößerter, blasig degenerierter Leberzellen (Abb. 4) mit pyknotischem, teils zentral, teils exzentrisch gelegenen Kern. An Stelle des Cytoplasmas optisch leere Lückenbildung; in einigen Zellen sind jedoch noch fadenförmig oder spinnengewebsartig vom Kern gegen die Zellmembran ausgebretete Protoplasmareste erhalten. Gelegentlich findet sich auch eine ausgesprochen wabige Struktur des Cytoplasmas (Abb. 5). Weiter nach außen anschließend, intermediär im Läppchen gelegen, eine stark verfettete Leberzone mit mittelgroßen bis großen Fettropfen. Hier zugleich die Zeichen einer starken Zellregeneration mit massenhaft Mitosen aller Stadien (Abb. 6), daneben auch Kernzerfall im Sinne der Karyorrhexis. Cytoplasma der Leberzellen hier in der Farbintensität schwankend, teils stark eosinophil und verdichtet, teils blaß, durchsichtig und mehr basophil. Kernnucleolen bis zu 6 in einem Kern vermehrt. In der Läppchenperipherie relativ gut erhaltene Leberzellen, hier nur eine schwache



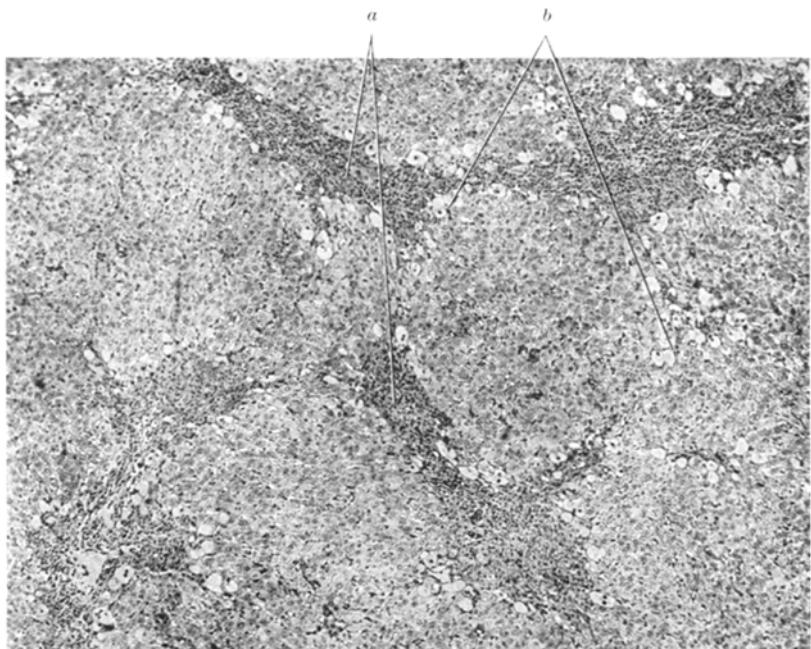


Abb. 3. Akute  $\text{CCl}_4$ -Vergiftung der Rattenleber, 36 Std nach subcutaner Gabe von  $0,25 \text{ cm}^3 / 100 \text{ g}$ . Zentroacinäre Kollapsatrophie (a), randständige Zone blasiger Zellentartung (b). Tier 43. H.-E. 70:1

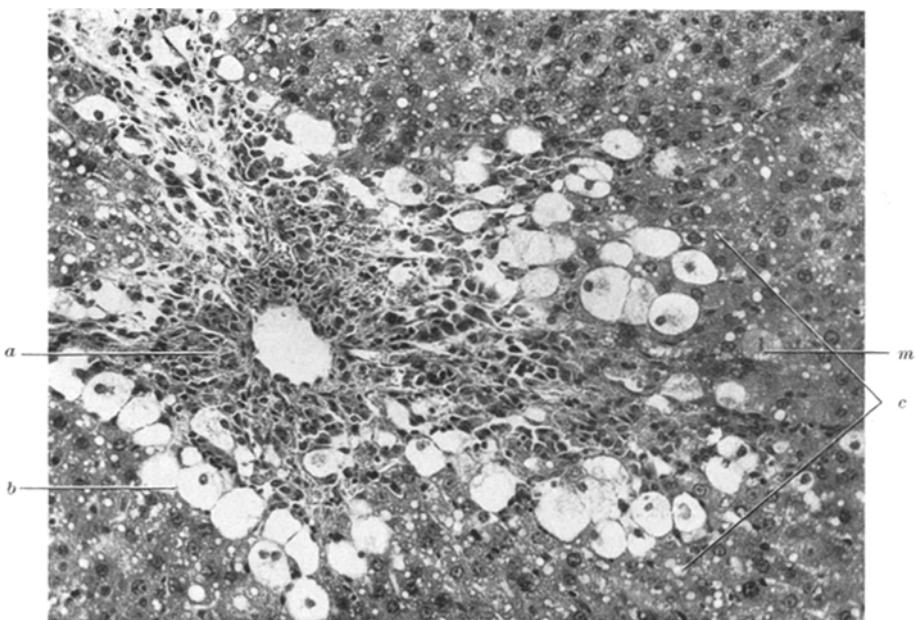


Abb. 4. Akute  $\text{CCl}_4$ -Vergiftung der Rattenleber, 36 Std nach Gabe von  $0,25 \text{ cm}^3 / 100 \text{ g}$ . Zentroacinäre Kollapsatrophie (a), Zone blasiger Zelldegeneration (b), Verfettung (c), Mitose (m). Tier 43. 180:1

Fettspeicherung und nur vereinzelte Mitosen. Die Lebercapillaren sind besonders intermediär und peripher als Folge der Zellschwellung enggestellt.

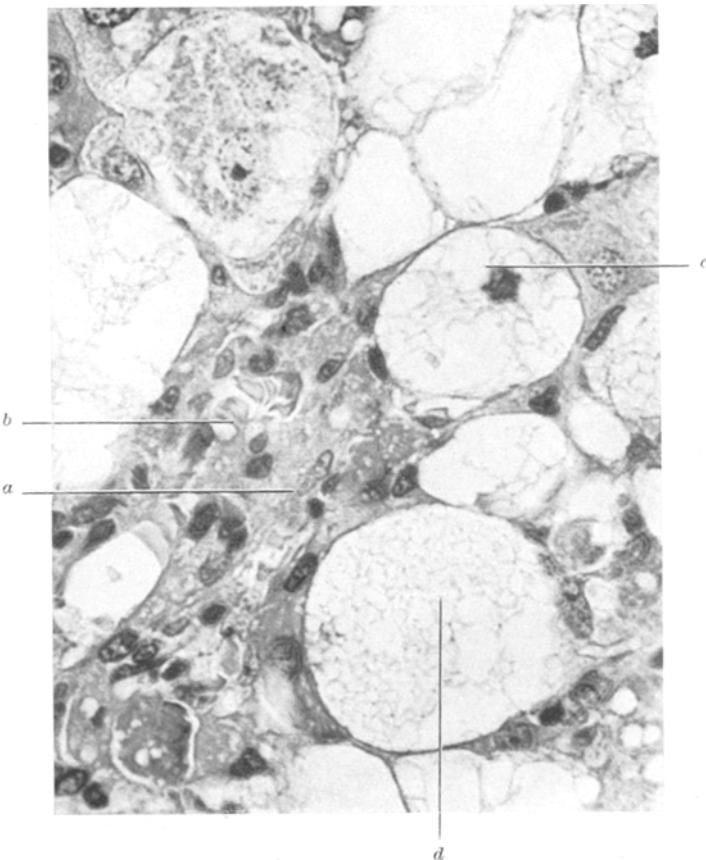


Abb. 5. Akute  $\text{CCl}_4$ -Vergiftung der Rattenleber, 36 Std nach Gabe von  $0,25 \text{ cm}^3/100 \text{ g}$ . Zentroacinäre Kollapsatrophie mit Nekrosen und Kernpyknosen (a), Zentralvene (b), blasige Zelldegeneration mit Kernpyknosen (c) und wabigen Cytoplasmaresten (d). Tier 44. H.-E. 600:1

*Sudan III:* Größe der Fetttropfen schwankend. Die größten Tropfen finden sich im unmittelbaren Anschluß an die blasig degenerierte Zone. Die zentrale Kollapszone ist frei von Fettsubstanzen.

*Alkalische Phosphatase:* Starke Aktivitätszunahme. Zentrale Kollapszone negativ (Abb. 7), hier nur Blutzellen und vereinzelte Sternzellen positiv. Die blasig degenerierte Zone zeigt ebenfalls keine Aktivität. Dagegen ist die intermediäre und periphere Läppchenzone stark positiv, besonders die Capillarwände (Abb. 8); die Leberzellen selbst

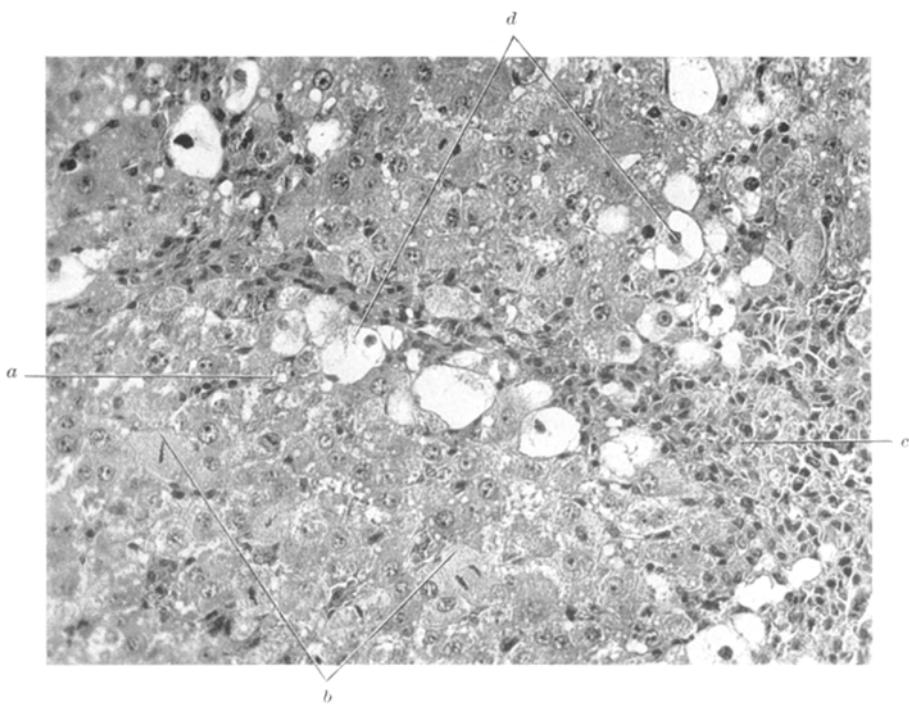


Abb. 6. Akute  $\text{CCl}_4$ -Vergiftung der Rattenleber, 36 Std nach Gabe von  $0,25 \text{ cm}^3/110 \text{ g}$ . Zentrale Kollapsatrophie (a), blasige Zelldegeneration (b), Verfettung (c), intermediär und peripher multiple Mitosen (d). Tier 45. H.-E. 250:1

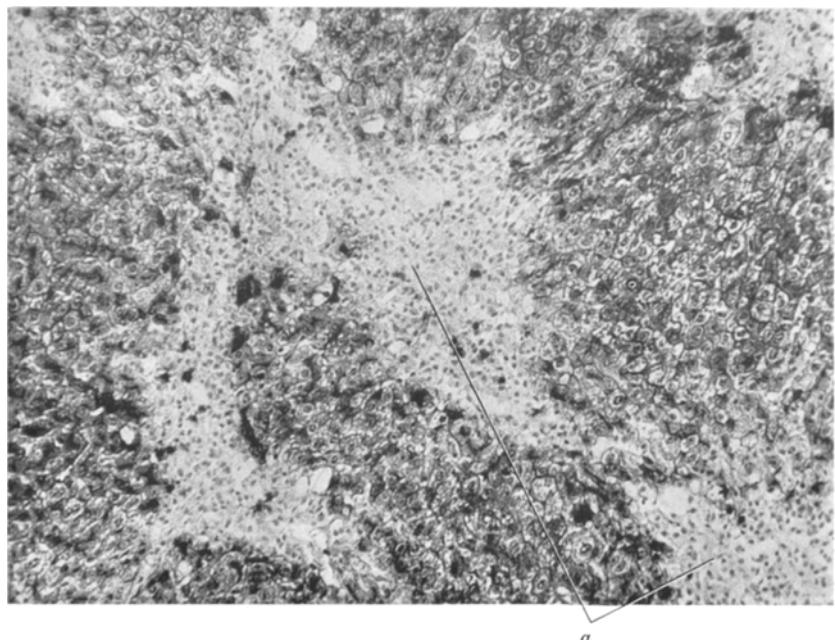


Abb. 7. Akute  $\text{CCl}_4$ -Schädigung der Rattenleber, 36 Std nach Vergiftung. Starke Aktivitätszunahme der alkalischen Phosphatase. Zentrale Kollapsatrophie (a) negativ. Tier 45. 100:1. Vgl. dagegen Abb. 9!

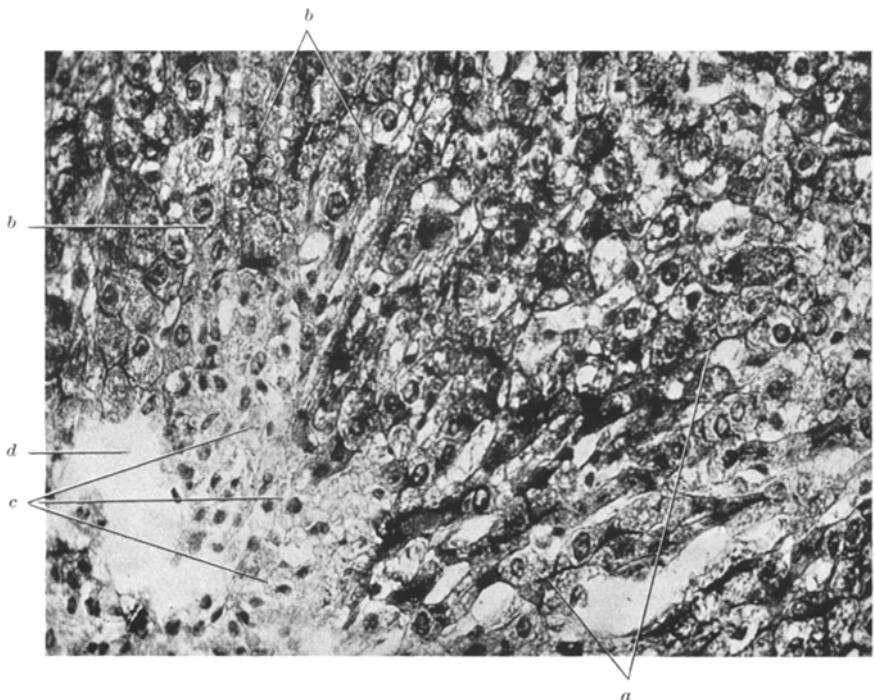


Abb. 8. Akute  $\text{CCl}_4$ -Schädigung der Rattenleber, 36 Std nach Vergiftung. Stark erhöhte Aktivität der alkalischen Phosphatase in den Capillarmembranen (a), granulär im Cytoplasma (b), zentrale Kollapsatrophie negativ (c), Zentralvene (d). Tier 45. 250:1

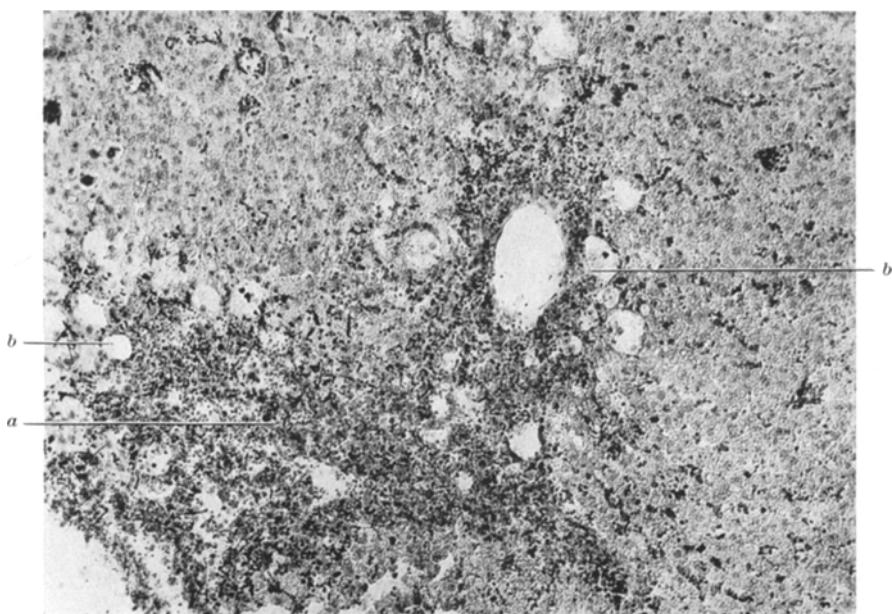


Abb. 9. Akute  $\text{CCl}_4$ -Schädigung der Rattenleber, 36 Std nach Vergiftung. Stark erhöhte Aktivität der Bernsteinsäure-Dehydrogenase in der zentroacinären Kollapsatrophie (a). Blasige Zelldegeneration (b). Tier 45. 100:1. Vgl. dagegen Abb. 7!

sind schwächer positiv in Form feiner granulärer Cytoplasmaschwärzung. Leberzellkerne nur wenig intensiver gefärbt. Die periportalen Felder verhalten sich prinzipiell gleichartig wie im Normalbild, sind jedoch stärker geschwärzt.

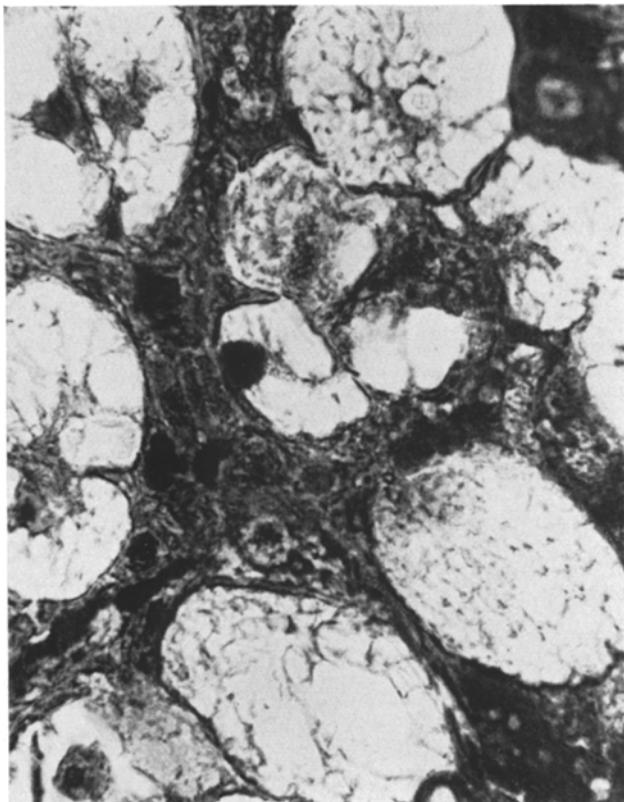


Abb. 10. Akute  $\text{CCl}_4$ -Schädigung der Rattenleber, 36 Std nach Vergiftung. Blasig degenerierte Zellen mit wabig-fädigen Cytoplasmaresten. Mitochondrien als verquollene und z. T. verklumpte Granula erkennbar. Tier 43. Chromotrope 2 R. 1080:1

*Bernsteinsäure-Dehydrogenase:* Allgemein gesteigerte Aktivität, besonders in der Umgebung der größeren Venen. Die stärkste Aktivität findet sich im Gegensatz zum Verhalten der alkalischen Phosphatase in den zentralen Kollapsberden (Abb. 9).

*Mitochondrien:* In der nekrobiotischen Kollapszone sind Mitochondrien kaum nachweisbar. Dagegen findet man in der blasig degenerierten Zone intracytoplasmatisch z. T. noch gut erhaltene, in Form und Größe schwankende, mitunter verklumpte Mitochondrien (Abb. 10). Auch intermediär stark verwischte Mitochondrien mit Neigung zur

Verklumpung. Peripher sind die Mitochondrien scharf getrennt, weisen jedoch starke Größenschwankungen auf.

Bemerkungen: Bei Tier 44 zeigen die zentral gelegenen Leberzellen nur selten das Bild des Zellkollapses mit Nekrobiose; sie sind nur wenig verkleinert, das Cytoplasma ist stark eosinophil und homogen. Die hydropische Zone ist dagegen besonders stark ausgebildet, deutlich ringförmig, z. T. direkt den Zentralvenen anliegend. Ansonsten sind die Veränderungen bei Tier 43—45 prinzipiell gleichartig.

Bei der Mitochondrienfärbung ist ein Befund beachtenswert: *in Teilung befindliche Zellkerne färben sich regelmäßig rot statt blau an!* Über die Ursache dieser veränderten Anfärbung können wir noch nichts aussagen.

*Nach 4 Tagen.* Makroskopisch zeigen sich die Lebern noch leicht vergrößert. Die Farbe ist grau-gelblich, deutliche oberflächliche Gefäßzeichnung.

*H.-E. und Sudan III:* Zentralvenen hyperämisch, erweitert. Benachbart nur noch wenige kollapsatrophische Leberzellen mit pyknotischen Kernen, daneben vereinzelte blasige Zellen. Die Masse der zentralen Leberzellen zeigt ein homogenes oder feinstkörnig eosinophiles Cytoplasma mit leicht deformierten und im Chromatingehalt schwankenden Kernen. Intermediär eine breite verfettete Zone, Zellen der Innenzone fettfrei. Peripher reguläre Leberzellen, keine Mitosen.

*Alkalische Phosphatase:* Aktivität insgesamt erhöht, aber schwächer als 36 Std nach der Vergiftung.

*Bernsteinsäure-Dehydrogenase:* Aktivität gesteigert, zentrale Läppchenzone noch positiv.

*Mitochondrien:* Die Mitochondrien sind zentral verringert und z. T. verbacken. Intermediär erscheinen sie vergrößert.

*6 Tage* nach der Vergiftung hat sich das Gewebsbild bei der H.-E.- und Sudanfärbung kaum verändert. Die Verfettung ist etwas geringer ausgeprägt. Die alkalische Phosphatase dagegen ist in ihrer Aktivität gegenüber dem Normalbild deutlich *herabgesetzt* oder völlig *negativ!* Die Aktivität der Bernsteinsäure-Dehydrogenase entspricht dem Befund in der normalen Rattenleber.

*Nach 8 Tagen* ist nur noch in der Umgebung vereinzelter Zentralvenen eine schmale Zone atrophischer Leberzellen mit pyknotischen Kernen nachweisbar, untermischt mit Plasmazellen und Eosinophilen. Die Verfettung ist weiter zurückgegangen. Bei den Fermentreaktionen zeigt die alkalische Phosphatase *keine* Aktivität; die Gewebsschnitte sind völlig negativ. Die Bernsteinsäure-Dehydrogenase entspricht der Norm.

*Nach 14 Tagen* sind in Nachbarschaft der Zentralvenen nur noch ganz vereinzelte atrophische Zellen aufzufinden. Das Cytoplasma der in der zentralen und intermediären Läppchenzone gelegenen Zellen ist verdichtet und zeigt gegenüber der normalen Rattenleber weniger Lücken-

bildungen. Eine Verfettung fehlt. Die alkalische Phosphatase ist noch negativ. Mitochondrien gestaltlich und färberisch wie in der normalen Rattenleber.

*Nach 3 Wochen* ist das Gewebsbild weitgehend normalisiert, auch die alkalische Phosphatase entspricht wieder der Norm.

**Gruppe IV.** (Mit Mitochondrien vorbehandelte, dann vergiftete und mit Mitochondrien weiterbehandelte Tiere; Tier 64—84.)

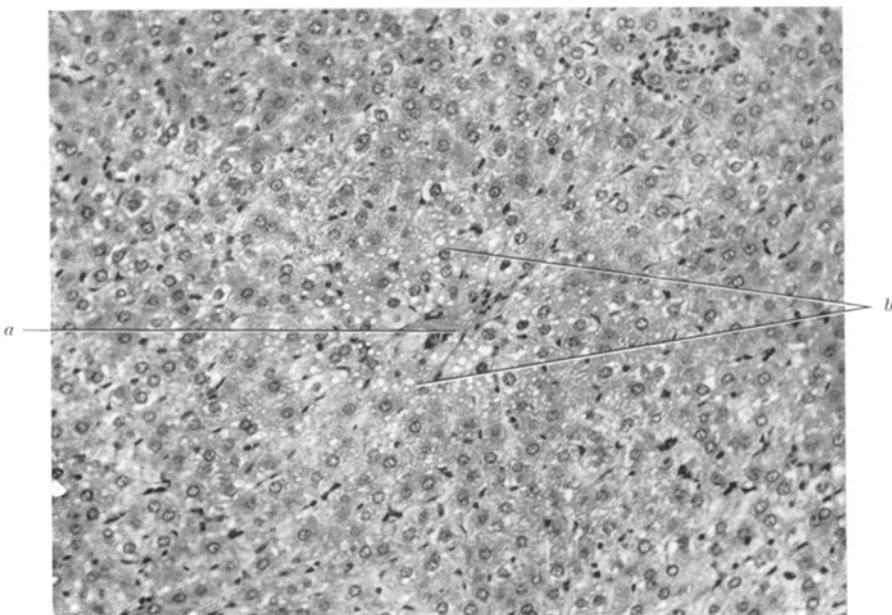


Abb. 11. Akute  $\text{CCl}_4$ -Schädigung der Rattenleber, 36 Std nach Vergiftung. Tier 65 mit Mitochondrien vor- und nachbehandelt. Zentroacinar vereinzelte Zellen mit Kollapsatrophie (a), randständige Verfettung (b), keine blasige Degeneration, peripher keine Mitosen. H.-E. 180:1. Vgl. Abb. 4, gleicher Maßstab

*Nach 36 Std.* Makroskopisch ließen sich in der Größe, Form und Farbe der Lebern keine Unterschiede gegenüber der normalen Rattenleber feststellen.

**H.-E. und Sudan III:** Bei der Mehrzahl der Leberläppchen sind zentroacinar blasig degenerierte Leberzellen nicht aufzufinden (Abb. 11). Ein Teil der Zentralvenen ist von wenigen kollapsatrophischen Leberzellen mit deformierten Kernen umgeben, daneben ganz vereinzelte blasig umgewandelte Zellen, die dann den Zentralvenen unmittelbar anliegen (Abb. 12). Intermediär ist eine Verfettungszone deutlich ausgebildet, Cytoplasma der Leberzellen hier eosinophil, Fetttröpfchen mittelgroß, peripher ein normales Leberzellbild. Keine oder nur vereinzelte

Mitosen (Tier 66), keine Kerngrößenschwankungen, keine oder nur geringe Vermehrung der Kernnucleolen.

*Alkalische Phosphatase*: Deutlich gesteigerte Aktivität, aber geringer als in Gruppe III. Periportal Gallengänge und Gefäßwände positiv. Zentral sind nur die Sternzellen geschwärzt. In den übrigen Läppchen teilen positive Capillarwände und selten, feingranular, das Cytoplasma (Abb. 13).

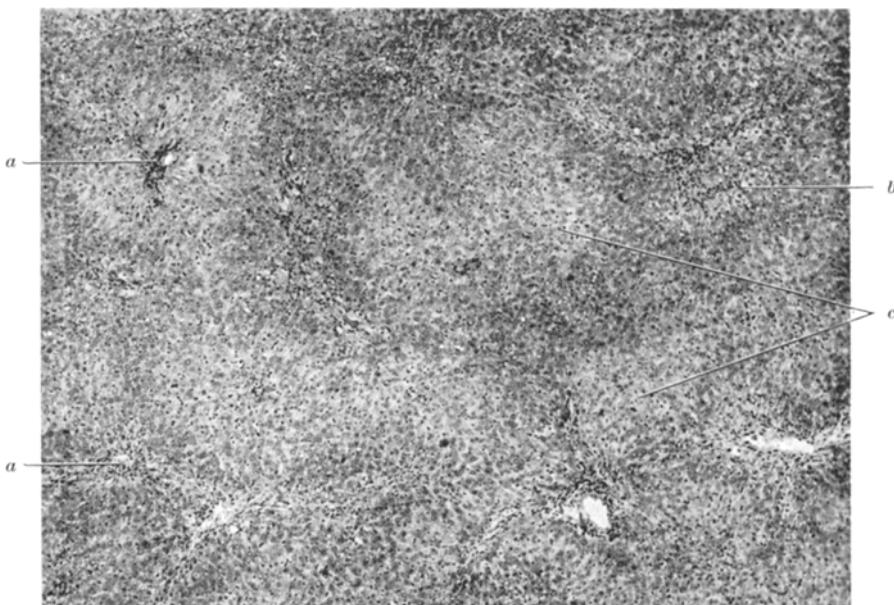


Abb. 12. Akute  $\text{CCl}_4$ -Schädigung der Rattenleber, 36 Std nach Vergiftung. Tier 66 mit Mitochondrien vor- und nachbehandelt. Zentroacinar spärliche Kollapsatrophie der Leberzellen (a), vereinzelte blasige Zellen (b), Verfettung (helle Bezirke) (c). H.-E. 70:1.  
Vergleiche Abb. 3, gleicher Maßstab!

*Bernsteinsäure-Dehydrogenase*: zentral gesteigerte Aktivität, aber schwächer als in Gruppe III.

*Mitochondrien*: In der verfetteten Zone vergrößerte und z. T. verbackene Mitochondrien.

*Nach 4 Tagen*. Die Zentralvenen sind erweitert. Kollapsatrophische Zellen nur neben einigen Zentralvenen nachweisbar, zugleich dort auch Infiltrate aus Leukocyten, Lymphocyten und Plasmazellen. Blasige Zellen fehlen. Verfettungszone schmal und unregelmäßig ausgebildet, Fettropfen mittelgroß. Die Fermentreaktionen zeigen keine Unterschiede zum Ausfall in der normalen Rattenleber. Mitochondrien gestaltlich und färberisch wie in der normalen Rattenleber.

*Nach 6 Tagen* sind zentroacinar nur ganz vereinzelte atrophische Leberzellen und lockere, vorwiegend eosinophile Zellinfiltrate nachweisbar. Peripher und intermediär bei Tier 70 vereinzelte Mitosen. Verfettung intermediär nur schwach und mehr disseminiert ausgeprägt. Die

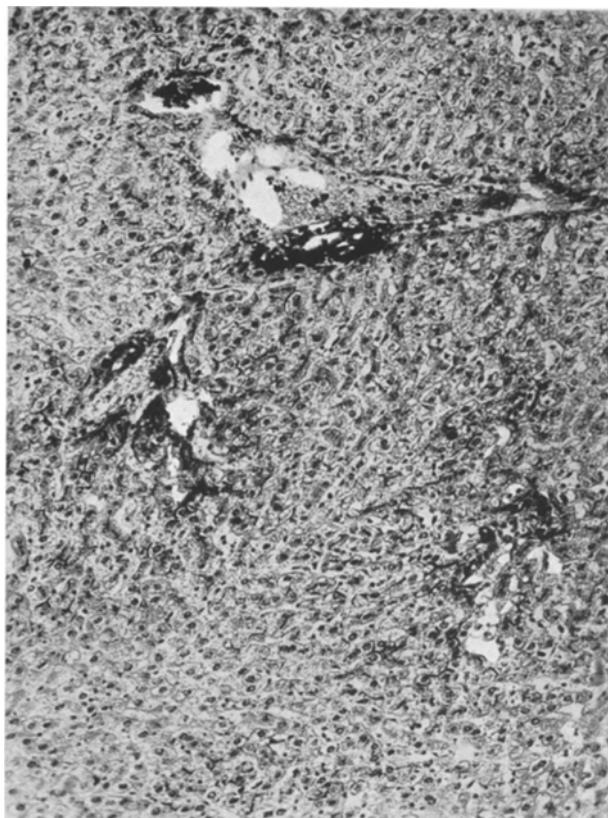


Abb. 13. Akute  $\text{CCl}_4$ -Schädigung der Rattenleber, 36 Std nach Vergiftung. Tier 65 mit Mitochondrien vor- und nachbehandelt. Erhöhte Aktivität der alkalischen Phosphatase. 100:1

alkalische Phosphatase zeigt ebenso wie in der Gruppe II einen negativen Ausfall.

*Nach 8 Tagen* entspricht das Gewebsbild vollständig der normalen Rattenleber!

Bemerkungen: Die Tiere 69 und 73 konnten wegen einer starken granulomatösen Infektion nicht beurteilt werden.

**Gruppe V.** (Vergiftete und mit Mitochondrien 12 Std später nach behandelte Tiere; Tier 83—105.)

*Nach 36 Std.* Makroskopisch Lebern nur wenig vergrößert.

*H.-E.- und Sudan III:* Das Tier 86 zeigt geweblich gleiche Veränderungen wie die Tiere der Gruppe IV zum gleichen Zeitpunkt. Es fehlen die Kollapszone und die blasig degenerierte Zone. Zentral und intermediär eine fein- bis grobtropfige Verfettung. Zentral nur wenige nekrobiotische, leicht kollabierte, stark eosinophile Zellen (Abb. 14). Peripher normale Leberzellen mit vereinzelten Mitosen.

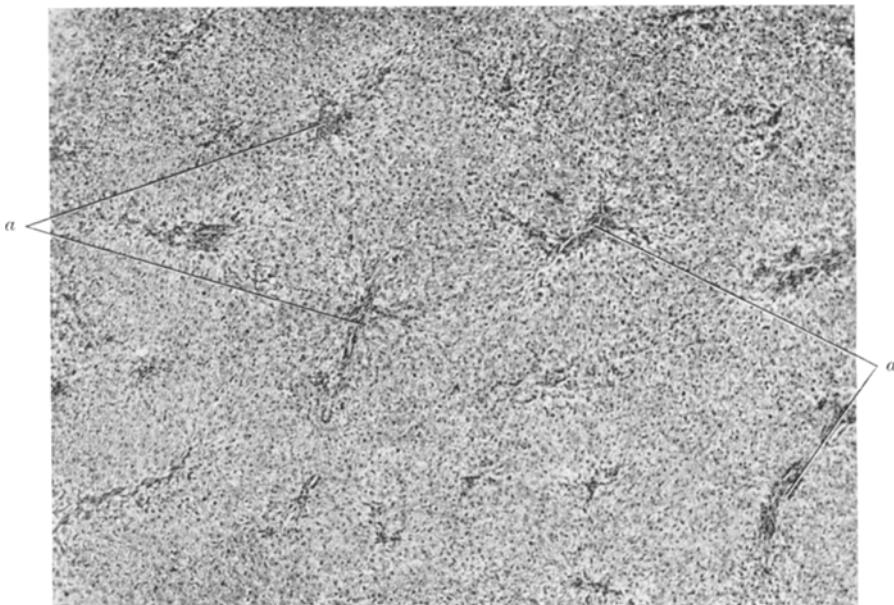


Abb. 14. Akute  $\text{CCl}_4$ -Schädigung der Rattenleber, 36 Std. nach Vergiftung. Tier 86. 12 Std. nach Vergiftung einmalig mit Mitochondrien behandelt. Zentroacinar geringe Kollapsatrophie der Leberzellen (a), benachbart Verfettung, keine blasige Degeneration. H.-E. 70:1. Vgl. Abb. 3 und 11, gleicher Maßstab!

Die Tiere 85 und 87 zeigen dagegen zentral eine schmale, aber deutliche Kollapszone (Abb. 15). auch eine schmale Zone blasig degenerierter Zellen ist vorhanden. Diese ist jedoch weit weniger ausgeprägt als bei den nur vergifteten Tieren der Gruppe III. Verfettung in der intermediären Zone stark ausgeprägt, peripher Mitosen aller Stadien, jedoch auch weniger reichlich als bei Gruppe III.

*Alkalische Phosphatase:* Kollapszone und hydropische Zellen negativ. Intermediär positive Capillarwände und Sternzellen; Leberzellcytoplasma schwächer granulär positiv.

*Bernsteinsäure-Dehydrogenase:* Zentroacinäre Zone wie bei Gruppe III und IV positiv.

*Mitochondrien:* Die Befunde entsprechen denen der Gruppe III und IV.

*4 Tage nach Vergiftung und nach erneuter Mitochondriengabe am 3. Tage.* Die zentrale Kollapszone und die blasig degenerierten Zellen fehlen bei allen 3 Tieren der Gruppe. Der Verfettungsgrad ist abgeschwächt. Mitosen sind nicht mehr nachweisbar. Die histologischen Veränderungen mit nur wenigen zentroacinären atrophischen Leberzellen entsprechen dem Befund bei den im gleichen Zeitabstand getöteten Tieren der Gruppe IV.

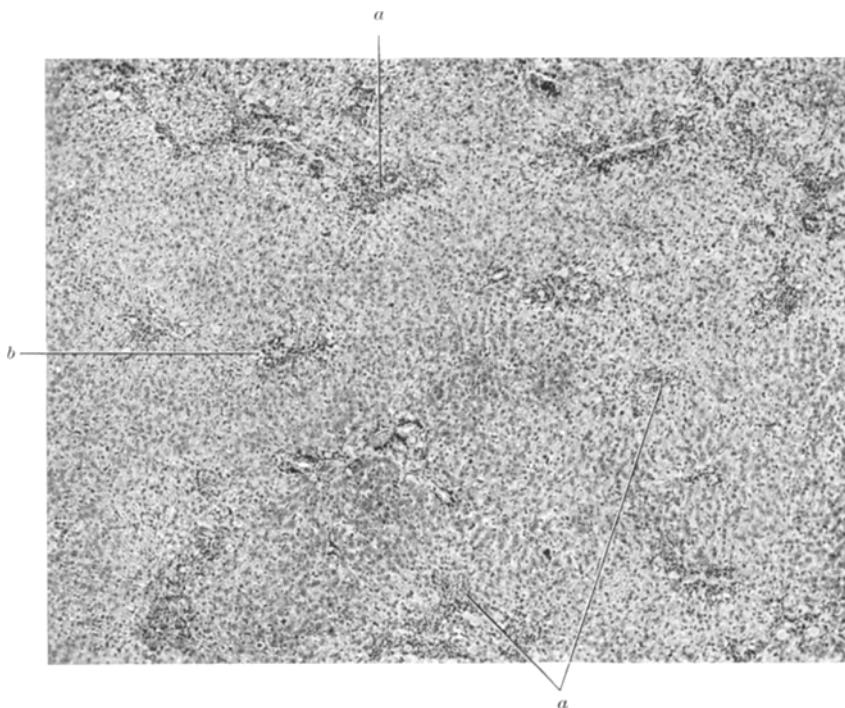


Abb. 15. Akute CCl<sub>4</sub>-Schädigung der Rattenleber, 36 Std nach Vergiftung. Tier 85. 12 Std nach Vergiftung einmalig mit Mitochondrien behandelt. Zentrale Kollapsatrophie der Leberzellen (a), vereinzelte blasige Zellen (b). Siehe Text. Vgl. Abb. 3, 11, 14.  
H.-E. Sp. 70:1

*6 Tage nach der Vergiftung* sind die geweblichen Veränderungen die gleichen wie bei den Tieren der Gruppe IV.

*Nach 8 Tagen* ist auch in dieser Gruppe eine Leberzellsschädigung nicht mehr nachweisbar.

Tabelle 2 gibt die Veränderungen der *Serumeiweißfraktionen* in den einzelnen Gruppen im Vergleich zur normalen Kontrollgruppe I wieder. Auf eine unnötige Darstellung in vielen graphischen Tabellen wurde bewußt verzichtet und stattdessen das Ergebnis als Produkt der zahlenmäßigen Auswertung (7 Elektrophoresen in jeder Gruppe über 3 Wochen) in Worten ausgedrückt.

Tabelle 1

Ver-suchstag	Gruppe I Tier 1—21	Gruppe II Tier 22—42	Gruppe III Tier 43—63	Gruppe IV Tier 64—84	Gruppe V Tier 85—105
1	—	—	—	10 AE	—
2	—	—	—	10 AE	—
3	—	—	—	14 AE	—
4	—	—	TCK	TCK	TCK
5	—	15 AE	—	15 AE	15 AE
6	1—3	22—24	43—45	64—66	85—87
7	—	15 AE	—	15 AE	15 AE
8	4—6	25—27	46—48	67—69	88—90
9	—	10 AE	—	10 AE	10 AE
10	7—9	28—30	49—51	70—72	91—93
11	—	10 AE	—	10 AE	10 AE
12	—	—	—	—	—
13	10—12	31—33	52—54	73—75	94—96
14	—	12 AE	—	12 AE	12 AE
15	—	—	—	—	—
16	—	12 AE	—	12 AE	12 AE
17	—	—	—	—	—
18	13—15	34—36	55—57	76—78	97—99
19	—	12 AE	—	12 AE	12 AE
20	—	—	—	—	—
21	—	—	—	—	—
22	—	12 AE	—	12 AE	12 AE
23	—	—	—	—	—
24	16—18	37—39	58—60	79—81	100—102
25	—	12 AE	—	12 AE	12 AE
26	—	—	—	—	—
27	—	—	—	—	—
28	—	—	—	—	—
29	—	—	—	—	—
30	19—21	40—42	61—63	82—84	103—105

Zeichenerklärung: Die Zahlen entsprechen den Nummern der Tiere, die an jedem Versuchstag getötet wurden. AE = Aktivitäts-Einheiten der Bernstein-säure-Dehydrogenase in den injizierten Gesamtdosis Mitochondriensuspension, im Mittel in 0,5 cm<sup>3</sup> Suspension. Injektionsart subcutan. TCK = Tetrachlorkohlenstoff. Suspension: Mittlerer N-Gehalt 1,52 mg/cm<sup>3</sup>; mittlere AE 26/cm<sup>3</sup>.

Tabelle 2. Ergebnisse der Elektrophorese

Gruppe	Gesamteiweiß	Albumine	$\alpha$ -Globuline	$\beta$ -Globuline	$\gamma$ -Globuline
II	unverändert	leicht vermindert	leicht vermehrt	leicht vermehrt	unverändert
III	stark vermindert	stark vermindert	stark vermehrt	stark vermehrt	erst vermehrt, ab 2. Woche vermindert
IV	leicht vermindert	leicht vermindert	leicht vermehrt	stark vermehrt	unverändert bis leicht vermindert
V	leicht vermindert	leicht vermindert	unverändert	leicht vermehrt	unverändert bis leicht vermindert

### Besprechung der Ergebnisse

#### *A. Histologie und enzymatische Histochemie*

Die in unseren Versuchen durch einmalige nicht letale Gabe von Tetrachlorkohlenstoff erzeugte Leberschädigung entspricht nach 36 Std dem klassischen Bild, wie es CAMERON und Mitarbeiter (1936) und seitdem zahlreiche andere Untersucher erzeugt haben<sup>2, 4, 5, 6, 16, 17, 22, 37, 39, 40, 47, 50, 51</sup>. Der Versuch bestätigt zugleich die gute Regenerationsfähigkeit der Leberzellen, die in einer hochgradigen Steigerung der Mitosenzahl zum Ausdruck kommt und bei der gewählten Dosis nach 3—4 Wochen zu einer weitgehenden Normalisierung des Leberzellbildes führt. Die Wirkung des Tetrachlorkohlenstoffs wird im Läppchenzentrum zuerst sichtbar. Der Ausfall der histochemischen Reaktionen weist in Übereinstimmung mit bekannten Untersuchungen<sup>2, 3, 9, 10, 11, 14, 48</sup> darauf hin, daß eine Fermentschädigung vorliegt. Entsprechend sind auch in den zentral liegenden kollabierten und nekrotischen Leberzellen Mitochondrien als Hauptträger des Fermentstoffwechsels praktisch nicht mehr nachweisbar.

Die Anordnung unserer Versuchsreihen — erste Kontrolle nach 36 Std — gestattet keine Aussage über die Morphologie der primären zentralen Zellveränderungen; es ist jedoch nach den Experimenten von EGER<sup>9–11</sup> eine primäre Zellschwellung anzunehmen, auf die der — nach 24 Std bereits voll ausgeprägte<sup>4, 16</sup> — Zellkollaps folgt. Die zentralgelegenen Zellen sind neben den Zeichen der akuten Entquellung aus dem Verband herausgelöst, die Zellgrenzen aufgehoben, das Capillargerüst ist aufgesprengt, so daß die Voraussetzungen für die Einwirkung proteolytischer Fermente gegeben sind. Die Resorption des toten Zellmaterials geht unter Mitwirkung eingewandter Zellen, teils leuko- teils histiocytärer Natur, sehr schnell vonstatten. Bemerkenswert ist in diesem Zusammenhang auch die Schwellung der KUPFFERSCHEN Sternzellen in den erhaltenen intermediären und peripheren Läppchenanteilen, auf die schon CAMERON und Mitarbeiter<sup>4</sup> hingewiesen haben. Nach 14 Tagen ist der fermentative Verdauungsprozeß praktisch abgeschlossen. Eine wesentliche mesenchymale Zellreaktion oder gar eine bindegewebige Proliferation wird vollständig vermißt.

Bereitet die Einordnung der zentralen Kollapszone histomorphologisch bezüglich Zelltod oder noch vorhandener Vitalität keine Schwierigkeiten, so ist bei der unmittelbar anschließenden und innig mit der zentralen Nekrose verzahnten Zone *blasig* degenerierter Leberzellen eine solche Entscheidung schwierig. Der weitgehende Verlust des Cytoplasmas, die hochgradig pyknotische Deformierung der Kerne legen es nahe, auch hier bei der *Masse* der Zellen bereits einen Zelltod anzunehmen. Die Veränderung ist am besten als *celluläre Kollokulationsnekrose* zu kennzeichnen. In einigen „Ballon-Zellen“ konnten wir noch erhaltene,

in der Form und Größe stark variable Mitochondrien nachweisen. Da die Zahl der Mitochondrien bekanntlich für die Vitalität der Zelle von entscheidender Bedeutung ist, dürfte die Annahme einer Reversibilität dieser degenerativen Metamorphose für *einen Teil* der Zellen im Bereich der Möglichkeit liegen. Unsere Beobachtung von innerhalb des noch erhaltenen Cytoplasmas blasig entarteter Zellen nachweisbaren Mitochondrien unterstreicht auch den Hinweis KETTLERS<sup>21</sup>, daß im Gegensatz zur sog. „trüben Schwellung“ der Zellen die hydropische und blasige Degeneration *nicht* durch eine Mitochondrienschwellung bedingt ist.

Die Pathogenese der blasigen Zellentartung ist nicht völlig geklärt (vgl. hierzu KETTLER<sup>21</sup>). Sicher ist, daß es sich um eine glykogen- und fettfreie Zellveränderung handelt, die wahrscheinlich auf eine erhöhte Wasserbindung im Zusammenhang mit Ionenverschiebungen zurückzuführen ist. Entsprechend fanden STOWELL-LEE<sup>47</sup> bei der Tetrachlorkohlenstoffvergiftung der Maus eine Zunahme des Lebergewichtes durch Wasser- und Lipoidaufnahme innerhalb von 3 Tagen bis zu 50%. Inwieweit neben der Wasserverschiebung gleichzeitig eine Einschwemmung von Eiweißstoffen stattfindet, besonders bei toxisch bedingten Permeabilitätsstörungen der Membranen, ist nicht sicher beurteilbar.

Bei der Tetrachlorkohlenstoffvergiftung der Ratte scheint ein Teil der Zellen das aufgenommene Wasser (?) in einem akuten Entquellungsvorgang (EGER<sup>11</sup>) wieder abzugeben, der andere Teil es aber festzuhalten, so daß einmal zentral die akute Kollapsatrophie mit Koagulationsnekrose des Cytoplasmas, zum anderen die blasige Entartung als celluläre Kollusionsnekrose entsteht.

Die peripherwärts anschließende Zone der *Verfettung* ist bei vergleichender Betrachtung im Ablauf der Vergiftung mit Sicherheit reversibel; sie ist Ausdruck der in dieser Zone weniger eingreifenden Fermenstörung.

Bei den angestellten *histochemischen* Reaktionen decken sich unsere Ergebnisse im wesentlichen mit den bisher bekannten Befunden. Wir konnten in Übereinstimmung mit anderen Untersuchern<sup>2,10,11,14</sup> auf dem Höhepunkt der Vergiftung eine starke Aktivitätszunahme der *alkalischen Phosphatase* beobachten. Das Auftreten der typischen Schwärzung ist an die intermediäre und periphere, regenerativ höchst aktive Lappchenzone gebunden und in der Wand der Capillaren, in den KUPFFERSchen Sternzellen, weniger stark und feingranular im Cytoplasma der Leberzellen lokalisiert. Die Kerne bleiben in der Regel frei. EGER fand dagegen die Aktivität auch in den Kernen vermehrt<sup>9,11,14</sup>, eine Tatsache, die u. E. und nach neueren Erkenntnissen gegen die von EGER verwandte Methode spricht. Die zentrale nekrotische Kollapszone verhielt sich ebenso wie die blasig degenerierte Zellzone negativ. In den periportalen Feldern war die im Normalbild in den Gefäß- und Gallengangswandungen vorhandene Aktivität gleichfalls gesteigert. Nicht geklärt ist der eigenartige, auch von BEJDL und Mitarbeitern<sup>2</sup> beobachtete

Aktivitätsabfall etwa am 6. Tage nach der Vergiftung bis zum völligen Aktivitätsverlust in dem Zeitraum von 8 — 14 Tagen nach der Tetrachlorkohlenstoff-Applikation.

Die während des Höhepunktes der Vergiftung gerade in der zentralen nekrotischen Kollapszone nachgewiesene Steigerung der Dehydrogenaseaktivität ist auf die Anwesenheit des aus den zerstörten Mitochondrien freigesetzten Fermentes zurückzuführen. Das aus seiner strukturellen Bindung gelöste Ferment hat — frei im Gewebe liegend — seine Aktivität behalten; die fermentative Leistung ist jedoch nicht mehr gesteuert. Wir konnten entsprechend die Lagerung der Formazankristalle überwiegend extracellulär ermitteln. Eine gute Übereinstimmung mit dem enzymatisch-histochemischen Verhalten zeigt sich in vitro bei *biochemischer* Überprüfung der Stoffwechselleistungen von Mitochondrien, die während der akuten Tetrachlorkohlenstoffvergiftung in regelmäßigen Abständen aus der Leber isoliert worden. Hierauf soll in einer weiteren Veröffentlichung näher eingegangen werden<sup>39</sup>.

Wir kommen nun zur Besprechung der durch die Zuführung des homologen Mitochondrienhomogenates erzielten geweblichen Wirkung. Die vorliegenden Untersuchungen haben gezeigt, daß es durch mehrmalige parenterale Gaben von jeweils durchschnittlich 0,5 cm<sup>3</sup> des vitalen Homogenates gelingt, das für die akute Tetrachlorkohlenstoffvergiftung der Rattenleber typische Gewebsbild weitgehend zu verhindern oder abzuschwächen. Der durch die angewandte Versuchsanordnung erzielte prophylaktische und therapeutische Erfolg übersteigt deutlich den Wirkungsgrad, der in bekannten Experimenten mit Leberhydrolysaten, -autolysaten und Kernsubstanzen erzielt wurde<sup>10, 14, 45, 52</sup> (vgl. auch weiter unten Wirkungsmechanismus).

Auf dem Kulminationspunkt der Vergiftung sind bei allen Tieren der Gruppen IV und V in der zentralen Läppchenzone nur spärliche nekrotische kollabierte Leberzellen nachweisbar und gleichfalls nur einzelne blasig degenerierte Zellen zu erkennen. Schon 6 Tage nach der Tetrachlorkohlenstoffschädigung ist das Gewebsbild durch die Behandlung praktisch normalisiert, was gegenüber dem Zeitraum von etwa 3—4 Wochen, den die unbehandelte Leber zur Regeneration braucht, eine erhebliche Verkürzung bedeutet. Beachtlich ist ebenso das Ausbleiben der stark vermehrten Mitosenzahl in der peripheren Läppchenzone, während andererseits auf dem Höhepunkt der Vergiftung bezüglich der reversiblen Verfettung keine signifikanten Unterschiede gegenüber dem reinen Tetrachlorkohlenstoffschaden beobachtet werden konnten.

Wie erwartet, ist der Effekt in der Gruppe V, in der mit der Mitochondrienzufuhr erst 12 Std nach Vergiftung begonnen wurde, etwas geringer, doch tritt auch hier die Restitution zum Normalbild etwa zum

gleichen Zeitpunkt nach 6—8 Tagen ein. Da nach dem histologischen Bild erwartet werden kann, daß eine Mitochondrienapplikation *gleichzeitig* mit der Vergiftung einen höheren Schutzeffekt ausübt, wurde diese Fragestellung in weiteren, nach verschiedener Richtung ergänzten Versuchsreihen überprüft. Die Ergebnisse sollen an anderer Stelle veröffentlicht werden<sup>20</sup>.

Die besonders bei den Tieren der Gruppe V gefundenen qualitativen Unterschiede in der Manifestation des Schadens sind darauf zurückzuführen, daß alle Tiere stets die gleiche Menge Mitochondrienhomogenat erhielten, somit also das Körpergewicht der Tiere im Gegensatz zur Vergiftungsdosis unberücksichtigt blieb. In einer laufenden, neuen Versuchsreihe wird dieser Faktor in Rechnung gestellt. Aus der Geringfügigkeit der Unterschiede im histologischen Befund darf jedoch geschlossen werden, daß die angewandte Dosierung trotz Vernachlässigung der Gewichtsdifferenzen ausreichend war.

Das Verhalten der histochemischen Fermentreaktionen ist prinzipiell gleichartig wie bei der reinen Vergiftung. Auch hier tritt nach anfänglicher starker Zunahme der Aktivität der alkalischen Phosphatase ein völliger Aktivitätsverlust auf, dem wiederum schon etwa nach 8 Tagen — gegenüber etwa 14 Tagen bei reiner Vergiftung — die Rückkehr zur Norm folgt. Die Aktivitätssteigerung der Bernsteinsäure-Dehydrogenase ist ebenfalls schneller ausgeglichen als bei den vergifteten Tieren der Gruppe III.

#### *B. Elektrophorese*

Es ist bekannt, daß der Ausfall einer Serumelektrophorese auch bei der Ratte keine Rückschlüsse auf die Leberfunktion zuläßt. Erst laufende Kontrollen geben einen gewissen Einblick, jedoch besteht meist keine echte Übereinstimmung mit dem jeweiligen histologischen Befund<sup>49</sup>. Diese Erfahrung konnten auch die vorliegenden Untersuchungen bestätigen.

Im ganzen gesehen waren die Veränderungen in den Gruppen II, IV und V nach 4 Wochen wieder nahezu ausgeglichen, nur in Gruppe III bestanden noch deutliche Eiweißverschiebungen. Damit überdauern — wie auch beim Menschen — die Veränderungen der Serumproteine den histologisch nachweisbaren Leberschaden.

Aus den Verlaufsbeobachtungen geht hervor, daß die elektrophoretischen Veränderungen bei den vor- und nachbehandelten Tieren deutlich weniger ausgeprägt waren als bei der vergifteten Gruppe (vgl. Tabelle 2). Die nur mit Mitochondrien behandelten Tiere zeigten die geringsten Proteinverschiebungen, die wahrscheinlich nur als Ausdruck einer „unspezifischen Reizkörpertherapie“ infolge des Proteingehaltes zu deuten sind.

Vergleicht man aber das Verhalten der Eiweißfraktionen in den einzelnen Gruppen auf dem Höhepunkt der Vergiftung mit dem histologischen Befund, so sind die Unterschiede in der Elektrophorese längst

nicht so eklatant wie im Gewebe. Daraus ergibt sich wieder, daß nur durch mehrere elektrophoretische Kontrollen faßbare Unterschiede zutage kommen.

### C. Wirkungsmechanismus der Mitochondrientherapie

Zur Erklärung des Wirkungsmechanismus parenteral zugeführter Mitochondrien auf den experimentellen Leberschaden kommen zwei Möglichkeiten in Betracht:

1. Die Wirkung kommt durch Inhaltsstoffe der Mitochondrien zustande, die durch Abbau der Mitochondrien im Organismus frei werden, keinen Fermentcharakter mehr haben und nekrobiotrope Eigenschaften besitzen.
2. Die Mitochondrien werden von den Zellen des geschädigten Organes als ganze Strukturelemente aufgenommen und entfalten eine echte Substitutionswirkung durch aktive fermentative Mitarbeit im Stoffwechsel der „Wirtszellen“.

ad 1. Setzt man einen Abbau der zugeführten Mitochondrien voraus, so könnten wirksame Inhaltsstoffe besonders die Purinkörper Adenin, Guanin und Xanthin, ferner B-Vitamine, Ribonucleinsäure, Cholin, Methionin und Aminosäuren sein.

Von den Purinen ist bekannt, daß sie nekrobiotrope Eigenschaften besitzen. Ursprünglich wurde sogar angenommen, daß der unbekannte „Leberparenchymfaktor“ in den purinreichen Leberhydrolysaten (z.B. Prohepar) mit ihnen identisch ist (SCHWIETZER). Diese Ansicht hat sich nicht bestätigt: die Menge der in Leberextrakten vorhandenen Purinkörper ist für deren Schutzwirkung nicht verantwortlich. Gleiches gilt für die anderen oben angeführten Substanzen und zahlreiche weitere geprüfte Stoffe<sup>7,12,13,19,38,45,52</sup>.

In den von uns angewendeten Mitochondriensuspensionen ist der Gehalt an Purinkörpern auf Grund der geringen Ribonucleinsäuremenge äußerst niedrig; er beträgt pro dosi z.B. für Adenin und Guanin durchschnittlich 8  $\mu$ , Xanthin 10  $\mu$ , Cytosin und Uracil 5  $\mu$ ; Vitamin B<sub>12</sub> ist zu 1,0  $\mu$ , Folsäure zu 0,02  $\mu$  enthalten, von Methionin und Cholin lassen sich nur quantitativ nicht faßbare Spuren nachweisen und Cystein fehlt völlig.

Diese Stoffe und eine Reihe weiterer haben allein in den vorliegenden Mengen — einzeln oder kombiniert zugeführt — keinerlei Schutzeffekt auf den Tetrachlorkohlenstoffschaden der Rattenleber. Um z.B. mit Adenin überhaupt einen Effekt zu erzielen, müssen 10—20—50 mg/100 g Ratte und damit das über Tausendfache der in den Mitochondrien vorhandenen Menge gegeben werden. Dann liegt außerdem die wirksame Adenindosis bereits im subtoxischen bis toxischen Bereich, führt also ihrerseits schon häufig zum Tode des Tieres! Ähnlich liegen die Verhältnisse

für die anderen genannten und zahlreiche weitere nekrobiotrope Substanzen: ein antinekrotischer Effekt läßt sich nur mit der hundert- bis tausendfachen in der den Mitochondrien enthaltenen Menge erzielen.

Wenn also die Summe der *bekannten* Inhaltsstoffe für die erzielte präventive und kurative Wirkung nicht verantwortlich ist, so mag diese auf noch *unbekannte* Wirkstoffe oder auf das bestimmte Mengenverhältnis aller Inhaltsstoffe zurückgehen. Diese könnten im Sinne von Katalysatoren oder Stimulatoren zur Fermentregeneration beitragen oder als leicht verwertbare Bausteine direkt zum Aufbau von Struktur- und Fermentprotein verwendet werden. Durch das biologisch abgewogene Verhältnis ihrer Konzentrationen wäre dann der weitaus bessere Wirkungsgrad gegenüber den bisher therapeutisch angewandten Einzelsubstanzen zu erklären und damit ebenfalls eine therapeutische Forderung (EGER<sup>13</sup>) erfüllt.

Setzt man also voraus, daß der günstige Effekt der injizierten Mitochondriensuspensionen auf definierbaren chemischen Abbauprodukten beruht und nicht auf der komplexen Wirkung erhaltengebliebener hochaktiver Fermentsysteme der lebenden Mitochondrien, so müßte mit Mitochondrien-Trockenpulver der gleiche Erfolg zu erzielen sein. Wir haben deshalb in einer weiteren Versuchsreihe gleichartig vergiftete Ratten mit einem Mitochondrien-Trockenpulver behandelt, das alle Inhaltsstoffe der Mitochondrien, aber keine intakten Fermentsysteme mehr enthielt. Nach Abschluß der noch laufenden histologischen Kontrolle werden wir über das Ergebnis dieser Versuchsreihe in einer späteren Veröffentlichung berichten<sup>29</sup>.

*ad 2.* Die Möglichkeit, daß parenteral zugeführte Mitochondrien nach einer gerichteten Wanderung im Organismus von den Zellen des entsprechenden Organes als *ganze Strukturelemente „phagocytiert“* werden, erscheint sehr zweifelhaft. Dennoch haben Untersuchungen von LETTRÉ und Mitarbeitern<sup>32-35</sup> diese Möglichkeit — zumindest für Tumorzellen — wahrscheinlich gemacht. Den Anstoß zu diesen Untersuchungen gab die Tatsache, daß beim Mäuseascitestumor durch intraperitoneale Injektion von Mitochondrien des gleichen Tumors eine Mitosewelle mit Wachstumsförderung beobachtet wurde. Injektion intakter Zellkerne des gleichen Tumors blieb wirkungslos, jedoch hatten Kerntrümmer die gleiche mitoseanregende Wirkung. Daraus wurde geschlossen, daß Tumorzellen extracelluläre Mitochondrien aufnehmen können und der Versuch wurde mit radioaktiv markierten Mitochondrien ( $P^{32}$ ) aus Ascitestumorzellen wiederholt. Erhielten Mäuse mit Ascitestumor die markierten Mitochondrien injiziert, so konnte nach rund 5 Std die Radioaktivität fast vollständig in den Tumorzellen wiedergefunden werden. Die Bindung war so fest, daß sie durch Waschen mit gewebsisotonen Lösungen nicht aus den Zellen entfernt werden

konnte. Wurden jetzt aus diesen Zellen wieder die Mitochondrien isoliert, so waren in dieser Mitochondrienfraktion über 90% der in den Zellen enthaltenen Radioaktivität nachweisbar! Es ist unwahrscheinlich, daß in der relativ kurzen Zeit von 5 Std ein Abbau der markierten extracellulären Mitochondrien erfolgte und das Abbaumaterial selektiv in den Mitochondrien innerhalb der Tumorzellen wieder eingebaut wurde.

LETTRÉ schließt aus diesen Versuchen, daß die Tumorzellen die zugeführten Mitochondrien wahrscheinlich nach Art der Phagocytose als ganze Strukturelemente aufgenommen haben. Durch die Ersparung und Unterstützung eigener synthetischer Leistungen der Tumorzelle kommt es damit zu einer Beschleunigung der Zellteilungen, da im allgemeinen die Mitochondrienvermehrung einen der notwendigen Schritte darstellt, die der Zellteilung vorausgehen müssen.

Diese Schlüsse wurden aus einer Versuchsanordnung gezogen, die sich mit der unsrigen nicht ohne weiteres vergleichen läßt (intraperitoneale Injektion gegenüber subcutaner, Spezialfall eines Tumors gegenüber Spezialfall einer Vergiftung usw.). Überträgt man dennoch einmal das Ergebnis der LETTRÉSchen Versuche auf die vorliegenden eigenen Untersuchungen, so ergibt sich die freilich sehr spekulative Möglichkeit eines analogen Wirkungsmechanismus. Sollten die zugeführten Mitochondrien tatsächlich als ganze Strukturelemente von den gesunden und den noch nicht zu sehr geschädigten Leberzellen aufgenommen worden sein, so erklärt sich die präventive und kurative Wirkung ebenfalls durch die zusätzliche fermentative und energetische Potenz. Es würde sich demnach um eine echte biologische Substitution handeln. Durch die aktive fermentative Mitarbeit der „fremden“ Mitochondrien im Stoffwechsel der Leberzellen ermöglichen sie der Leber, der Intoxikation von Anfang an besser zu begegnen und auch bei eingetretenem Schaden wesentlich schneller zu regenerieren. Mit Übernahme dieser Vorstellung als Arbeitshypothese tauchen naturgemäß weitere Probleme auf: wie verhält es sich mit der Resorption der injizierten Mitochondrien, wie mit der „Wanderung“ und Permeabilität der extracellulären Mitochondrien und ist diese Wanderung unabhängig von der Applikationsart auch gerichtet, d. h. wirken die Mitochondrien tatsächlich zell- und *organspezifisch*? Laufende Untersuchungen scheinen letzteres zu bestätigen, doch müssen zum Beweis dieser interessanten Arbeitshypothese als Grundlage auch der therapeutischen Wirkung von Mitochondriensuspensionen weitere Untersuchungen vorgenommen werden.

Wie die Wirkung im einzelnen auch zu erklären sei, der erzielte prophylaktische und therapeutische Effekt ist außerordentlich und übertrifft die Wirkung der zur Verhinderung des Tetrachlorkohlenstoffschadens bisher angewendeten nekrobiotropen Substanzen erheblich.

### Zusammenfassung

Nach kurzer Erörterung der allgemeinen Aufgaben der Mitochondrien im Zellstoffwechsel wird die besondere Bedeutung einer intakten Mitochondrienfunktion für den Stoffwechsel der Leber hervorgehoben. Infektiöse, toxische, alimentäre oder hypoxämische Prozesse führen leicht zu einer Desintegration der Mitochondrienstruktur und haben durch Störung der an diese Struktur gebundenen lebensnotwendigen Fermentsysteme morphologisch faßbare Zellschäden bis zum Zelltod zur Folge. Die derzeitige Therapie der Leberparenchymenschäden berücksichtigt diese Gegebenheiten nur unvollkommen.

Am Beispiel der akuten Tetrachlorkohlenstoffvergiftung der Rattenleber als Modellversuch einer tiefgreifenden Fermentschädigung wird daher erstmalig die therapeutische Wirksamkeit parenteral zugeführter, isolierter, vitaler Leberzellmitochondrien aus gesunder Rattenleber geprüft.

105 weiße Inzuchtratten beiderlei Geschlechts vom Stamm SPRAGUE-DAWLEY wurden in 5 gleiche Gruppen unterteilt. Drei Gruppen dienten zur Kontrolle (Normaltiere; nur mit Mitochondrien behandelte Tiere; nur vergiftete Tiere). Eine Gruppe wurde zur Prüfung der prophylaktischen Wirkung mit Mitochondrien vorbehandelt, die letzte Gruppe erst 12 Std nach erfolgter Vergiftung nachbehandelt.

Die Beurteilung erfolgte mittels histologischer, enzymatisch-histochemicaler und blutchemischer Methoden.

*Ergebnisse.* 1. Durch mehrmalige Gaben von durchschnittlich 0,5 cm<sup>3</sup> einer nach Fermentaktivität standardisierten Mitochondrien-Frischsuspension gelingt es, den klassischen Leberschaden bei Tetrachlorkohlenstoffvergiftung (einmalig 0,25 cm<sup>3</sup>/100 g subcutan) weitgehend zu verhindern.

2. Die Tiere der prophylaktischen Versuchsreihe zeigten die geringsten geweblichen Veränderungen.

3. Der Wirkungseffekt der homologen Mitochondrien-Frischsuspension übertrifft die Wirksamkeit der bisher am Tetrachlorkohlenstoffschaden geprüften nekrobiotropen Substanzen bei weitem.

4. Die Möglichkeiten des Wirkungsmechanismus werden eingehend besprochen. Die Annahme einer echten biologischen Substitution scheint als Arbeitshypothese berechtigt.

### Literatur

- <sup>1</sup> ALFIN-SLATER, R. B., A. M. LARACK and M. C. PETERMANN: Cancer Res. **9**, 215 (1949). — <sup>2</sup> BEJDL, W., O. KRAUPP u. B. PILLET: Wien. klin. Wschr. **1955**, 321. — <sup>3</sup> BRUNS, F. H., u. J. NEUHAUS: Biochem. Z. **326**, 242 (1955). — <sup>4</sup> CAMERON, J. R., and L. A. E. KARUNARATNE: J. of Path. **42**, 1 (1936). — <sup>5</sup> CAMPBELL, R. M., and H. W. KOSTERLITZ: Brit. J. Exper. Path. **29**, 149 (1948). — <sup>6</sup> CAVALLERO, L.: Biol. Lat. (Milano) **1**, 257 (1948). — <sup>7</sup> DRILL, V. A.: Ann. New York Acad. Sci. **57**, Art. 6, 654

- (1954). — <sup>8</sup> DULANEY, A. D., Y. GOLDSMITH, K. ARNESEN and L. BUXTON: Cancer Res. **9**, 217 (1949). — <sup>9</sup> EGER, W.: Virchows Arch. **325**, 648 (1954). — <sup>10</sup> EGER, W.: Acta hepatol. **3**, H. 3/4 (1955). — <sup>11</sup> EGER, W.: Acta hepatol. **3**, H. 5/6 (1955). — <sup>12</sup> EGER, W.: Münch. med. Wschr. **1956**, 73. — <sup>13</sup> EGER, W.: Dtsch. med. Wschr. **1956**, 598. — <sup>14</sup> EGER, W.: Virchows Arch. **328**, 536 (1956). — <sup>15</sup> FURTH, J., and E. A., KABAT: J. of Exper. med. **74**, 247 (1941). — <sup>16</sup> GLYNN, L.E., and H. P. HIMSWORTH: Clin. Sci. **6**, 235 (1948). — <sup>17</sup> HARTMANN, F., u. F. LEUSCHNER: Klin. Wschr. **1950**, 514. — <sup>18</sup> HENLE, W., A. M. CHAMBERS and V. GROUPÉ: J. of Exper. Med. **74**, 495 (1941). — <sup>19</sup> HOCK, A., G. HUBER u. A. PILAR: Hoppe-Seylers Z. **304**, 11 (1956). — <sup>20</sup> HÖTZL, H. A., u. G. LAUDAHN: Ärztl. Wschr. **1956**, 643. — <sup>21</sup> KETTLER, L. H.: Erg. Path. **37**, 42 (1954). — <sup>22</sup> KRONE, A. H.: Internat. Z. Vitaminforsch. **24**, 12 (1952). — <sup>23</sup> LANG, K.: Angew. Chem. **65**, 409 (1953). — <sup>24</sup> LANG, K., u. G. SIEBERT: In FLASCHENTRÄGER-LEHNARTZ, Physiologische Chemie. Ein Lehr- und Handbuch, Bd. II, S. 1064 ff. Berlin: Springer 1954. — <sup>25</sup> LANG, K., u. G. SIEBERT: In HOPPE-SEYLER/THIERFELDER, Handbuch der physiologisch- und pathologisch-chemischen Analyse, Bd. 2, Teil II, S. 537—594. Berlin: Springer 1955. — <sup>26</sup> LARDY, H. A., and WELLMAN: J. of biol. Chem. **195**, 215 (1952). — <sup>27</sup> LAUDAHN, G.: Vortrag Berl. Med. Ges., 27. Juni 1956. — <sup>28</sup> LAUDAHN, G.: Ärztl. Forsch. **10**, 513—524 (1956). — <sup>29</sup> LAUDAHN, G., u. C. J. LÜDERS: Ärztl. Forsch. (in Vorber.). — <sup>30</sup> LAUDAHN, G., u. C. J. LÜDERS: Klin. Wschr. (in Vorber.). — <sup>31</sup> LEHNINGER, A. L.: Chicago; persönliche Mitteilung. — <sup>32</sup> LETTRÉ, H., F. K. HEMPRICH u. B. SPIRIG: Z. Krebsforsch. **59**, 64 (1953). — <sup>33</sup> LETTRÉ, H.: Naturwiss. **40**, 25 (1953). — <sup>34</sup> LETTRÉ, H., u. K. THOM: Naturwiss. **41**, 144 (1954). — <sup>35</sup> LETTRÉ, H., H. WRBA u. E. SEIDLER: J. Krebsforsch. **60**, 294 (1955). — <sup>36</sup> MACULLA, K.: Yale J. Biol. a. Med. **20**, 299 (1948). — <sup>37</sup> MCCLOSKEY, J. F., and E. H. McGEHEE: Arch. of Path. **46**, 200 (1950). — <sup>38</sup> PATWARDHAN, M. V., V. RAMALINGASWAMY, S. SRIRAMACHARI and V. N. PATWARDHAN: Indian Med. Sci. **8**, 15 (1954). — <sup>39</sup> PATWARDHAN, M. V., V. RAMALINGASWAMY, S. SRIRAMACHARI and V. N. PATWARDHAN: Indian Med. Sci. **7**, 533 (1953). — <sup>40</sup> REMY, R., u. A. TERBRÜGGEN: Z. inn. Med. **1950**, 645. — <sup>41</sup> SCHNEIDER, W. C., and G. H. HOGEBOOM: J. of Biol. Chem. **183**, 123 (1950). — <sup>42</sup> SCHWIETZER, L.: Dtsch. med. J. **5**, 424 (1954). — <sup>43</sup> SCHWIETZER, L.: Therapiewoche **4**, 569 (1954). — <sup>44</sup> SIEKEVITZ, P.: J. of Biol. Chem. **195**, 549 (1952). — <sup>45</sup> STILLE, G., u. H. P. WACHTER: Z. exper. Med. **122**, 199 (1953). — <sup>46</sup> STILLE, G., u. H. P. WACHTER: Acta hepatol. **1**, 1 (1953). — <sup>47</sup> STOWELL, R. E., and C. S. LEE: Arch. of Path. **50**, 519 (1950). — <sup>48</sup> TSUBOI, K. K., and R. E. STOWELL: Cancer Res. **11**, 221 (1951). — <sup>49</sup> WEIHE, L. W.: Arzneimittel-Forsch. **4**, 654 (1954). — <sup>50</sup> WHITE, E. J.: J. of Path. **49**, 95 (1939). — <sup>51</sup> WINTER, C. A.: J. of Biol. Chem. **135**, 123 (1940). — <sup>52</sup> WACHTER, H. P., u. G. SITLLE: Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **218**, 355 (1953).

Dr. GERHARD LAUDAHN, Städtisches Krankenhaus, Innere Abteilung,  
Berlin-Wilmersdorf, Achenbachstr.

Dr. CLAUS JÜRGEN LÜDERS, Städtisches Wenckebach-Krankenhaus,  
Pathologisches Institut, Berlin-Tempelhof