

Aus dem Pathologischen Institut der Humboldt-Universität Berlin
dem Rudolf Virchow-Haus der Charité
(Direktor: Prof. Dr. L. H. KETTLER)

Fluoreszenzmikroskopische Befunde an der Rattenleber nach akuter Tetrachlorkohlenstoffvergiftung*

Von

G. ROSCHLAU

Mit 3 Textabbildungen, davon 2 farbigen

(Eingegangen am 30. April 1962)

Der Tetrachlorkohlenstoff (CCl_4) ist eine der stärksten lebertoxisch wirkenden Substanzen. Die vielfältige technische Verwendung des CCl_4 hat schon frühzeitig das Interesse auf den Mechanismus dieser Vergiftung gelenkt. Heute wird diese Substanz geradezu routinemäßig zur Erzeugung experimenteller Leberschäden bis zur Entstehung einer Cirrhose angewandt. Trotz zahlreicher entsprechender Veröffentlichungen kann aber die Pathogenese der CCl_4 -Vergiftung noch nicht als geklärt gelten. Vor allem ist dies wohl darauf zurückzuführen, daß die bisherigen Untersucher allzu unterschiedliche Versuchsbedingungen wählten — vor allem hinsichtlich der Applikationsart und der Dosis — und auch sehr verschiedene Untersuchungsmethoden anwandten — besonders hinsichtlich des Zeitpunktes der Untersuchung nach der Applikation.

SIMON und BENEKE haben kürzlich an unserem Institut neuartige histomorphologische und histochemische Befunde beim akuten CCl_4 -Schaden der Rattenleber erhoben. Sie benutzten dabei eine bisher kaum angewandte Applikationsart: Eine portale Verabreichung durch Injektion in die Milz. Außerdem untersuchten sie einen Teil der Lebern bereits nach der kurzen Zeit von 1 min und weniger. Die vorliegende Arbeit knüpft an diese Untersuchungen an und soll der Klärung folgender Fragen dienen:

1. Was leistet die Fluoreszenzmikroskopie, insbesondere die Acridinorange-Fluorochromierung bei der Diagnose der ersten Leberveränderungen nach CCl_4 -Schädigung?

2. Können aus der Art der beobachteten Fluoreszenzänderungen Rückschlüsse auf den pathogenetischen Mechanismus der CCl_4 -Schädigung gezogen werden?

Es wurden dabei ebenfalls die bisher kaum untersuchte portale Verabreichung des CCl_4 in Verbindung mit kurzen Einwirkungszeiten gewählt, da diese Methode besonders geeignet erscheint, dem Wirkungsmechanismus des CCl_4 näherzukommen.

Material und Methodik

Die Untersuchungen erfolgten an 30 männlichen Albinoratten von durchschnittlich 250 g Körpergewicht eines mit Standardkost ernährten Inzuchtstammes. Diesen Tieren wurden 0,1 ml CCl_4 nach Laparotomie in Äthernarkose unverdünnt in die Milz injiziert. Die Tiere zeigten in der Regel bereits wenige Sekunden nach der Injektion ein Aussetzen der Atmung,

* Einige Ergebnisse dieser Arbeit wurden bei der 2. Tagung der Arbeitsgemeinschaft für Morphologie in Leipzig am 14. September 1962 vorgetragen.

nach einigen weiteren Sekunden trat eine unregelmäßige Schnappatmung ein, die erst allmählich einer regelmäßigeren Atmung wich. Todesfälle kamen nicht vor. Die Tötung der Tiere erfolgte 15 und 30 sec sowie 1, 2, 3 und 5 min nach der Injektion durch Abschneiden des Herzens an der Basis. 16 weitere Tiere dienten als Kontrollen und blieben unbehandelt oder erhielten 0,1 ml physiologische Kochsalzlösung auf gleiche Weise in die Milz injiziert. In beiden Fällen zeigten sich normale Leberbefunde.

Die sofort nach der Tötung entnommenen Lebern wurden unfixiert mit dem Messertiefkühlmikrotom geschnitten. Dabei wurde mit jeder Versuchsleber eine Kontrolleber in gleicher Dicke (etwa 10μ) mitgeschnitten. Ein Teil jeder Leber wurde in 4%igem Neutralformalin und in Carnoy'scher Lösung fixiert und nach Paraffineinbettung ebenfalls geschnitten und untersucht.

Zur Fluorochromierung wurden verwandt:

Acridinorange (Fa. Chroma, Stuttgart)

Coriphosphin (Fa. Chroma, Stuttgart)

beide in 0,01%iger Pufferlösung. Färbezeit 10 min, danach 10 min Spülung in farbfreier Pufferlösung, danach Eindeckung in Pufferlösung und sofortige Betrachtung im Fluoreszenzmikroskop. Außerdem wurde Astraphosphin (Fa. Bayer, Leverkusen) 0,1%ig, 10 min Färbezeit, danach 10 min Spülung in ungepuffertem Aqua dest. verwandt.

Als Puffer dienten:

1. Walpole-Gemisch (PEARSE 1953) für die pH -Werte 0,5, 1,0, 1,5, 2,0, 3,0 und 4,0.

2. Michaelis-Puffer (PEARSE 1953) für die pH -Werte 3,0, 4,0, 5,0, 6,0, 7,0, 7,5, 7,8 und 8,0.

Zum Nachweis des salzartig gebundenen Farbstoffanteils wurde mit reinem absolutem Äthylalkohol je 30 min, 12 Std und 4 Tage nachbehandelt und in Eukitt eingedickt.

Zur Extraktion der RNS wurde ein Teil der Schnitte mit Ribonuclease (Institut für Mikrobiologie, Jena) 1 mg pro ml, 3 Std bei 37° behandelt, danach Fluorochromierung wie oben. Außerdem wurde zur bevorzugten Entfernung der RNS ein Teil der Schnitte mit Perchlorsäure, 2%ig und 5%ig bei $4^{\circ}C$ 12 Std behandelt und anschließend fluorochromiert.

Lichtoptische Kontrollen erfolgten mit folgenden Färbungen bzw. Reaktionen: HE, HS, Galloxyanin-Chromalaun nach ENARSON, Methylgrün-Pyronin nach BRACHET und LISON, Methylgrün nach PAPPENHEIM, Hämoglobinnachweis nach LEPEHNE.

Als Lichtquelle diente ein HBO-200-Quecksilberhochdruckbrenner. Die Filterkombination setzte sich aus BG-12 und OG-1-Filtern zusammen. Die Mikroaufnahmen erfolgten mit einer Exakta-Varex.

Ergebnisse und Diskussion

der normalen fluoreszenzmikroskopischen Leberbefunde an den Kontrolltieren

An der normalen, mit Acridinorange (AO) fluorochromierten, unfixierten Leber in Blaulichtfluoreszenz zeigt sich, daß im extrem sauren Bereich (pH 0,5) nur wenig Acridinorange vom Gewebe aufgenommen wird, dementsprechend senden die einzelnen Gewebesteile nur kurzwelliges, grünes Licht aus, wobei die Kerne stärker fluoreszieren. Wie zuerst STRUGGER (1940—1949) an Pflanzenzellen und Bakterien und SCHÜMMELFEDER (1948) an tierischen Geweben zeigten, tritt nun mit steigendem pH eine zunehmende Farbstoffadsorption auf, wobei sich die Fluoreszenz des Gewebes zunehmend zum Langwelligen hin verschiebt. Dabei treten im Cytoplasma der Leberepithelzellen bereits ab pH 1,0 anfangs gelbe, später orange und rot gefärbte Granula auf, die nach unseren bisherigen Kenntnissen identisch mit der cytoplasmatischen RNS sind, wie zuerst GÖSSNER (1950), SCHÜMMELFEDER (1950) sowie ZEIGER u. Mitarb. (1951) zeigten. Dafür sprechen auch unsere mit Ribonuclease durchgeführten Kontrollen. Bis pH 4 zeigt sich nach Vorbehandlung mit Ribonuclease nur eine Grünfluoreszenz des Cytoplasma. Ab pH 5 tritt hier eine zunehmende Rotfluoreszenz auf, die auf die Anlagerung von AO an die negativen Gruppen der Proteine zurückzuführen ist, also nicht mehr spezifisch für das Vorliegen von RNS ist. Bei höheren pH -Stufen (bis pH 8) erscheint die Rotfluoreszenz nach Ribonuclease sogar stärker als in den nicht mit Ribonuclease behandelten Schnitten. Offenbar werden durch fermentative Lösung der Nucleinsäuren aus dem Nucleoproteinverband im nucleinsäurefreien Restkörper vermehrt negative Gruppen frei, die jetzt zur Aufnahme von AO zur Verfügung stehen.

Die Fluoreszenz der Kerne beruht auf ihrem Gehalt an DNS, da sie nach Entfernung der DNS verschwindet (SCHÜMMELFEDER u. Mitarb.). Die Kerne zeigen eine Steigerung der

AO-Adsorption nur bis pH 2,0. Ab pH 4,0 nehmen sie offenbar wieder weniger Farbstoff auf, da sich die Fluoreszenzfarbe wieder zur kurzwelligeren Seite des Spektrums verschiebt. Dieses von SCHÜMMELFEDER u. Mitarb. (1958) an Ganglienzellkernen als „Umkehreffekt“ bezeichnete Phänomen ist also auch an Leberzellen zu beobachten und wohl in gleicher Weise als abhängig vom Polymerisationsgrad der DNS zu deuten.

Nach Alkoholbehandlung wird das nicht salzartig gebundene Fluorochrom aus dem Gewebe entfernt, wobei die Nucleinsäuren nur einen geringen Teil ihres Farbstoffes verlieren, während die übrigen Gewebsbestandteile stärker ausgewaschen werden. Wie wir in Übereinstimmung mit SCHÜMMELFEDER u. Mitarb. (1958) feststellten, ist ein Optimum der Alkoholkwirkung bereits nach 30 min erreicht, so daß längere Einwirkungszeiten ohne wesentlichen Einfluß waren. Auch am unfixierten Leberparenchym wird durch Alkohol bis zu einem pH von 2,0 fast das gesamte nicht an Nucleinsäuren gebundene AO entfernt. Die Einwirkung von Perchlorsäure führte ebenfalls in Übereinstimmung mit SCHÜMMELFEDER u. Mitarb. je nach Stärke zu einer verstärkten Anfärbung der Kerne bis zu einer Gelb- oder Orange-Fluoreszenz (bei höheren pH -Werten), also zur Aufhebung des sogenannten „Umkehreffektes“, was wohl auf einer Depolymerisation der DNS durch die Perchlorsäure beruht. Die cytoplasmatische RNS wird durch 5%ige Perchlorsäure weitgehend entfernt. Die AO-Fluorochromierung führt nach einer derartigen Säurebehandlung am Cytoplasma zu gleichen Bildern wie nach Entfernung der RNS durch Ribonuclease.

Die Fluorochromierung mit Coriphosphin (CO) ergab im wesentlichen die gleichen Befunde wie AO, so daß auf eine gesonderte Darstellung verzichtet werden kann. Nur in den unteren pH -Bereichen war eine etwas kurzwelligere — statt gelb-orange z.B. eine gelbe — Fluoreszenz feststellbar. In den höheren pH -Bereichen (7,5—8) nahm die Rot-Fluoreszenz des Cytoplasma stärker ab als das beim AO der Fall war. Mit Astraphosphin zeigte sich in den einzelnen Lebern eine recht unterschiedliche aber in jedem Fall nur sehr geringe Werte erreichende feintropfige Verfettung einzelner Leberzellen.

Befunde an den CCl_4 -geschädigten Lebern

Aus den bereits erwähnten Untersuchungen von SIMON und BENEKE war bekannt, daß es bei der gewählten Methodik zu sektorförmigen Lebernekrosen im peripheren und intermediären Läppchenbereich kommt, die nach 1 Std voll ausgeprägt sind. Makroskopisch fanden wir bereits nach wenigen Sekunden herdförmige Zirkulationsstörungen, die sich rasch über alle Lappen flächenhaft ausbreiteten. Im Fluoreszenzbild zeigen sich bereits nach 15 sec Veränderungen in den gleichen Läppchenanteilen, in denen später die Nekrosen auftreten.

Bereits beim niedrigsten pH -Wert (0,5) zeigen die Kerne in den oben genannten Zonen gegenüber der Umgebung und den Kontrollen eine etwas stärkere hellere Grün-Fluoreszenz. Mit zunehmenden pH bei 1,0 und 1,5 fluoreszieren diese leuchtend gelbgrün gegenüber den übrigen Kernen, die bei pH 1 grüngelb und bei pH 1,5 schwächer gelbgrün fluoreszieren. Die cytoplasmatische RNS zeigt keine Änderung der Fluoreszenzfarbe in den genannten Bezirken, erscheint aber vermindert und stellt sich statt in feinen Schollen etwas verklumpt dar. Diese Unterschiede werden nach Alkoholbehandlung noch deutlicher, da jetzt die Fluoreszenz der nucleinsäurefreien Gewebsbestandteile weitgehend verschwunden ist (vgl. die Normalbefunde). Bei den höheren pH -Werten bis pH 8 treten zu den Unterschieden in der Kernfluoreszenz jetzt noch stärkere Differenzen in der Fluoreszenz des Cytoplasmas auf. Bei pH 4 stellt sich die cytoplasmatische RNS — jetzt allerdings bereits rot fluoreszierend — noch vermindert dar. Ab pH 5 zeigt praktisch das gesamte Cytoplasma sowohl der geschädigten als auch der offenbar ungeschädigten Bezirke eine mehr verwaschene, kaum noch schollige Rotfluoreszenz, wie sie bereits bei den Kontrolltieren auch nach Ribonuclease beschrieben ist (s. oben). Bei höheren pH -Stufen (7,5, 7,8, 8,0) wird diese Rotfluoreszenz in den bereits mehrfach erwähnten Sektoren zunehmend stärker als in den übrigen Läppchenbezirken und Kontrollen. Dabei fluoresziert in den zentralen Läppchenpartien der geschädigten Lebern das Cytoplasma eher in kurzwelligerem Licht als in den Kontrollen — also eher grün —. Nach Fluorochromierung mit Coriphosphin (CO) wird dieser Unterschied besonders deutlich (s. Abb. 1). Sonst zeigen sich nach CO im wesentlichen die gleichen Befunde wie nach AO

(s. oben). In den mit Ribonuclease behandelten Schnitten ist dieser Unterschied zwar noch vorhanden, aber schwächer, da jetzt auch die nicht geschädigten Läppchenteile stark rot fluoreszieren (vgl. die Normalbefunde).

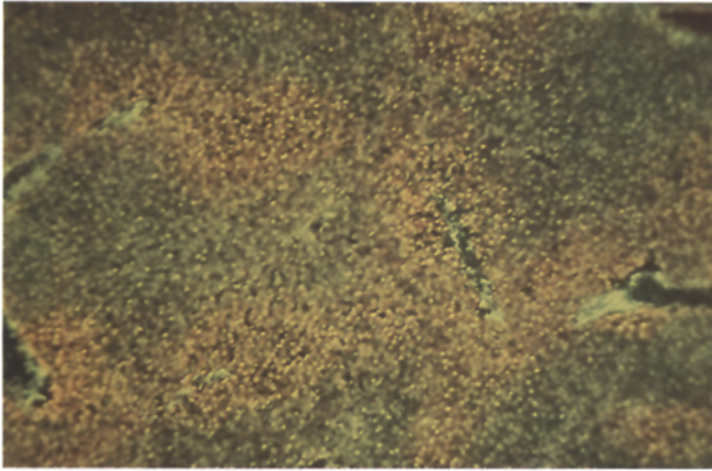


Abb. 1

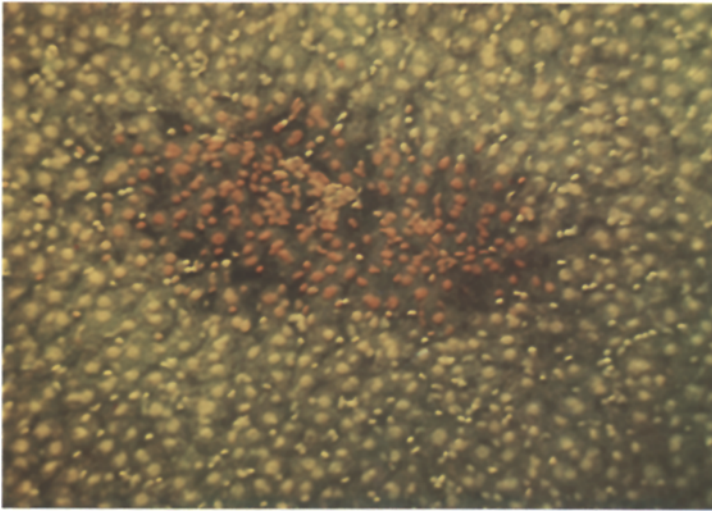


Abb. 2

Abb. 1. Leber 50,4fach, Coriphosphin bei p_H 7,5. In periportalen Läppchensektoren Rotfluoreszenz des Cytoplasma der Leberzellen. Tötung 30 sec nach Injektion des Tetrachlorkohlenstoffes in die Milz
Abb. 2. Leber 200fach, Acridinorange bei p_H 7,5 nach Behandlung mit 5 %iger Perchlorsäure. Orange-fluoreszenz der Kerne im geschädigten Sektor. Tötung 15 sec nach Injektion des Tetrachlorkohlenstoffes in die Milz

Nach Behandlung mit Perchlorsäure sind am Cytoplasma der geschädigten Partien keine neuen Befunde zu erheben. Dagegen werden die Unterschiede in der Kernfluoreszenz hier noch eindrucksvoller. Jetzt zeigen die Kerne der genannten Bezirke bis in die höheren p_H -Stufen (7,5, 7,8, 8,0) eine deutliche vermehrte Farbstoffaufnahme. Die Kerne fluoreszieren leuchtend orange gegenüber einer gelben Kernfluoreszenz der Umgebung (Abb. 2). Verstärkt man die Perchlorsäure auf 10 %, so zeigen auch die normalen Kerne eine Orange-Fluoreszenz. Als Zeichen der stärkeren Säurewirkung sind jetzt auch die Mastzellen der Glissonschen Felder entfärbt, deren Granula vorher noch leuchtend rot fluoreszierten. So kann die Fluoreszenz der Mastzellen als Indikator für die Stärke der Perchlorsäurewirkung benutzt werden.

Alle diese Veränderungen waren bereits nach 15 sec CCl_4 -Einwirkung ausgeprägt. In den nächsten Minuten treten keine neuen Fluoreszenzänderungen mehr auf, dagegen verstärkten sich die genannten Befunde noch. Die Größe der geschädigten Sektoren nahm noch zu; allerdings ist zu berücksichtigen, daß die Größe der geschädigten Sektoren innerhalb der gleichen Leber sehr unterschiedlich ist. Teilweise lagen diese Sektoren isoliert innerhalb von offenbar ungeschädigtem Parenchym, teilweise konfluerten diese Gebiete zu unregelmäßigen, landkartenartigen Bezirken, zwischen denen nur wenig gut erhaltenes Parenchym sichtbar war. Eine deutliche Fettvermehrung in den geschädigten Bezirken war mit Astraphosphin nicht nachweisbar.

Lichtoptische Befunde an den geschädigten Lebern

Im HE-Schnitt zeigt sich nach 15 sec CCl_4 -Einwirkung eine sektorförmige — vorwiegend periphere, zum Teil auch intermediäre — Erweiterung der Sinusoide

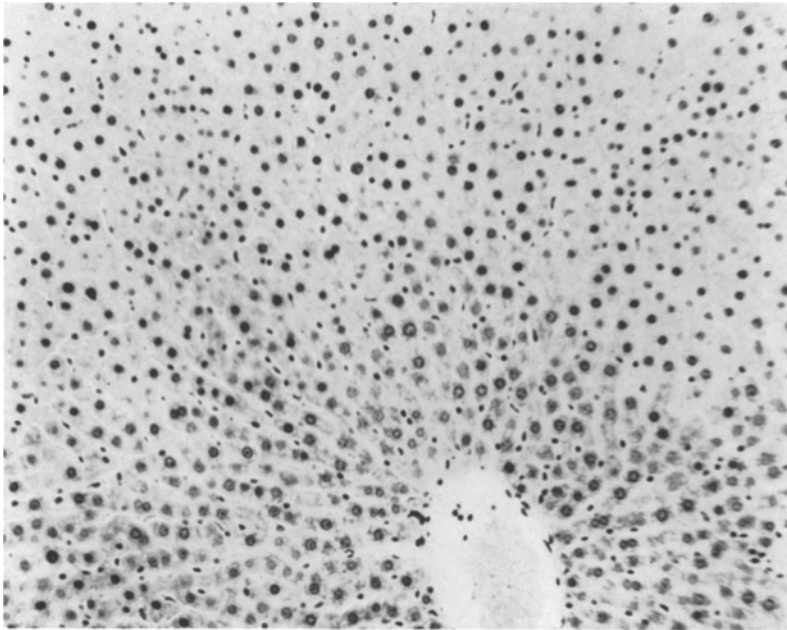


Abb. 3. Leber 180fach. Gallocyanin-Chromalaun. Starke Abnahme bzw. völliges Verschwinden der cytoplasmatischen RNS und beginnende Kernpyknose in einem ausgedehnten, vorwiegend peripheren Läppchenbereich (Zentralvene am unteren Bildrand). Tötung 15 sec nach Injektion des Tetrachlorkohlenstoffes in die Milz

und Dissoziation von Leberzellen. Das Plasma der Zellen erscheint etwas stärker eosinophil, die Kerne färben sich etwas intensiver und erscheinen im Durchschnitt etwas kleiner. In Paraffinschnitten sind diese Befunde etwas geringer ausgeprägt als in Schnitten unfixierten Gewebes. Nach längerer Einwirkungsdauer des CCl_4 werden diese Veränderungen stärker, besonders die Kerne werden zunehmend pyknotisch. Vorwiegend am Rande der genannten Sektoren, teilweise auch innerhalb derselben, zeigen die Zellen teilweise Plasmavacuolen, ohne daß das typische Bild einer blasigen Entartung auftritt. In den ektatischen Sinusoiden

befindet sich verschiedentlich eine homogene bis feinkörnige eosinophile Masse. Stellenweise liegt diese auch in den Pfortaderästen, hier sind nur noch wenig Erythrocyten zu erkennen. Diese Masse reagiert Lepehne-positiv.

Im HS-Schnitt zeigt sich eine geringgradige, recht variable Verfettung einzelner Leberzellen. In den genannten Sektoren ist jedoch kein vermehrter Fettgehalt erkennbar. Nach Färbung mit Methylgrün-Pyronin ist die cytoplasmatische RNS bereits bei den Kontrolltieren in wechselnder Stärke ausgeprägt. Innerhalb der Läppchen scheinen besonders die peripheren Anteile vermehrt RNS zu enthalten. Kontrollen mit Ribonuclease ergaben keinerlei Pyroninophilie des Plasmas. In den oben genannten Sektoren ist nach 15 sec bereits eine Verminderung der Anfärbung mit Pyronin festzustellen. Nach Perchlorsäureeinwirkung heben sich auch die Kerne dieser Bezirke ab, sie nehmen offenbar durch vermehrte Aufnahme von Pyronin einen mehr rötlichen Farbton an (vgl. auch die fluoreszenzmikroskopischen Befunde). Mit Methylgrün allein sind keine besonderen Unterschiede feststellbar. Nach Gallocyanin-Chromalaun wird die Verminderung der basophilen Schollen im Cytoplasma der geschädigten Bezirke noch deutlicher (s. Abb. 3). Auch die beginnende Schrumpfung und vermehrte Anfärbbarkeit der Kerne kommt hier zur Darstellung. Da bei dieser Färbung offenbar die Leberzellen allgemein anschwellen, stellen sich die Sinusoide nur noch als schmale Spalten dar, wobei in den geschädigten Zonen keine Sinusoid-ektasien mehr auffallen.

Diskussion der Ergebnisse

Obwohl fluoreszenzmikroskopische Methoden in der normalen Histologie häufig Anwendung finden und besonders der Anwendungsbereich des AO durch die Färbungsanalysen von SCHÜMMELFEDER u. Mitarb. (1958) auch für histochemische Fragestellungen gesichert erscheint, ist in der experimentellen Pathologie bisher recht wenig Gebrauch davon gemacht worden. Daß die Fluoreszenzmikroskopie — insbesondere die Fluorochromierung mit AO und CO — gegenüber lichtoptischen Methoden bei der Früherfassung von Gewebsschäden Hervorragendes leisten kann, haben erst kürzlich HECHT, KORB und DAVID durch vergleichende Untersuchungen an experimentellen Infarkten des Rattenherzens gezeigt. Ein Vergleich unserer fluoreszenzoptischen und lichtoptischen Ergebnisse spricht erneut für die Leistungsfähigkeit der Fluoreszenzmikroskopie bei der Früherfassung von Gewebsschäden. Während sich lichtoptisch Veränderungen wie verstärkte Plasmaeosinophilie, verminderte Plasmabasophilie und Kernpyknose erst andeutungsweise zeigen, sind bereits massive Fluoreszenzänderungen wahrnehmbar, wie z.B. verstärkte Kernfluoreszenz im stark sauren Milieu, nach Perchlorsäurebehandlung sogar ein qualitativer Fluoreszenzumschlag nach Orange im etwa neutralen Bereich, und im gleichen pH-Bereich veränderte Cytoplasm fluoreszenz, auch nach Ribonucleaseeinwirkung. Darüber hinaus können wir aus der Art der Fluoreszenzänderungen in den geschädigten Gebieten gewisse Rückschlüsse auf die Art der Zellschädigung ziehen. Dies wird dadurch möglich, daß insbesondere SCHÜMMELFEDER u. Mitarb. (1958) durch ihre Färbungsanalysen den histochemischen Wert der AO-Fluorochromierung für tierische Gewebe untermauert haben.

Nach deren Untersuchungen ist die verstärkte Kernfluoreszenz in den CCl_4 -geschädigten Gebieten als Folge einer Strukturänderung der DNS mit Freilegung saurer bzw. Entfernung basischer Gruppen zu deuten. Dafür sprechen besonders die Erscheinungen nach Behandlung mit schwacher Perchlorsäure (2%), die zu einer intensiven Orange-Fluoreszenz der geschädigten Zellkerne gegenüber einer gelben Kernfluoreszenz in der Umgebung und bei den Kontrollen führen. Wie aus zahlreichen Untersuchungen bekannt ist (Lit. bei GÖSSNER 1954 und SANDRITTER) depolymerisiert Perchlorsäure Nucleinsäuren je nach Konzentration, Einwirkungsdauer und Temperatur bis zum völligen Abbau. In unserem Falle wird die schwach depolymerisierende Wirkung bereits an den normalen Zellkernen deutlich (stärkere Fluoreszenz durch verstärkte AO-Aufnahme), noch wesentlich deutlicher aber an den geschädigten, deren AO-Aufnahme jetzt bereits der von RNS gleichkommt. Wenn die übrigen Voraussetzungen richtig sind, lassen diese evidenten Befunde nach Perchlorsäure eigentlich nur zwei Deutungen zu. Entweder ist die DNS der geschädigten Zellkerne geringer polymerisiert, so daß sich der Unterschied nach Säurewirkung nur verstärkt oder der Polymerisationsgrad der DNS aller Kerne ist zwar gleich, aber die geschädigten Zellkerne sind empfindlicher für die Wirkung der Perchlorsäure. Obwohl die Befunde an den nicht mit Säure behandelten Schnitten für die erstere Deutung sprechen, ist die letztere nicht sicher auszuschließen. Sicher bleibt in jedem Falle eine Änderung im Gefüge der DNS. Die lichtoptischen Befunde mit Methylgrün und Methylgrün-Pyronin können zu dieser Frage nichts beisteuern. Dies bestätigt die Beobachtungen von SCHÜMMELFEDER u. Mitarb., daß die Beurteilung des Polymerisationszustandes der DNS mit AO eher möglich ist als mit Methylgrün. Am Cytoplasma der geschädigten Zellen können wir eine Verminderung des RNS feststellen. Diese Verminderung kommt auch lichtoptisch nach Galloeyanin-Chrom-Alaun recht gut zur Darstellung (Abb. 3). Die Befunde mit AO-Fluorochromierung bei höheren pH-Werten sprechen außerdem für eine Veränderung des nucleinsäurefreien Restkörpers.

Es müssen dabei vermehrt negativ geladene — also saure — Gruppen auftreten, die für die gesteigerte Aufnahme von AO und damit für die verstärkte Rotfluoreszenz verantwortlich sind. Nach Behandlung mit Ribonuclease sind diese Unterschiede noch vorhanden, wenn auch schwächer, da jetzt auch die offenbar nichtgeschädigten Läppchenanteile rot fluoreszieren (s. Normalbefunde).

Auf jeden Fall dürften unsere Ergebnisse bestätigen, daß der CCl_4 unabhängig von seiner Wirkung auf den Kreislauf zu einer direkten Zellschädigung führt, was besonders durch die Kürze der Einwirkungszeit und die Lokalisation des Schadens unterstrichen wird. Davon unberührt bleibt die Tatsache, daß man durch Anwendung anderer Applikationsarten, geringerer Dosen und weitaus längerer Einwirkungszeit von mehreren Stunden, zentrale Läppchennekrosen mit Verfettung erzeugen kann (GLYNN und HIMSWORTH 1944; ANDREWS und MAEGRAITH; CAMERON und KARUNARATNE; CHRISTIE und JUDAH; CAVALLERO, GLYNN und HIMSWORTH 1948).

Die zentralen Läppchennekrosen gelten in der bisherigen Literatur als einzige Form des CCl_4 -Schadens der Leber, der auch histochemisch, biochemisch und elektronenoptisch (CHRISTIE und JUDAH; STOWELL und LEE; THOMSON und MOSS; ZÖLLNER und REISIG; PATWARTHAN u. Mitarb.; LEDUC und WILSON,

STOWELL und LEE, WILLIAMS, POPPER u. Mitarb., EGER; OBERLING u. Mitarb.). gut durchuntersucht ist, ohne daß man sich über den pathogenetischen Mechanismus bisher hat einigen können.

Bei der Entstehung dieser zentralen Nekrosen dürften allerdings weniger eine direkte Zellschädigung als mehrere andere Faktoren, wie Zirkulationsstörungen, Hypoxämie und andere eine Rolle spielen. Für eine direkte zellschädigende Wirkung des CCl_4 sprechen einmal die sofortige Wirkung und zum anderen die Lokalisation. Es war zu erwarten, daß die am meisten geschädigten Gewebepartien am Ort der maximalen Gifteinflutung — also in Nähe der Pfortaderaufzweigungen liegen. Daß die geschädigten Sektoren nicht nur in der Peripherie, sondern zum Teil auch offenbar isoliert in der Intermediärzone liegen, ist am besten zu verstehen, wenn man der von RAPPAPORT erarbeiteten Einteilung der Leber in funktionelle Einheiten folgt, die um einen Pfortaderast gruppiert sind. Diese können von hier aus in drei Sektoren unterteilt werden, deren Blut sich hinsichtlich O_2 - und Nährstoffgehalt unterscheidet.

Der Mechanismus der Zellschädigung scheint recht vielfältig zu sein. Nach den Untersuchungen von SIMON und BENEKE kommt es zur Blockierung von SH-Gruppen, was besonders zu einer Inaktivierung der SH-Gruppen tragenden Fermente führt. Unsere Befunde sprechen dafür, daß es sehr rasch auch zu einer Veränderung der Nucleoproteide der Zelle kommt. Davon werden sowohl die DNS der Kerne als auch die RNS des Cytoplasma befallen sowie offenbar auch der nucleinsäurefreie Restkörper des Cytoplasma (s. oben). Exakte Angaben über den Zeitpunkt des Auftretens der von uns beobachteten Veränderungen lassen sich bei der Kürze der Zeit kaum machen. Wir können nur feststellen, daß der CCl_4 in den angegebenen Zeiten (ab 15 sec) bereits in der Leber angelangt sein muß, da sie jeweils sofort nach der Tötung entnommen wurde. Bis zur Anfertigung der unfixierten Schnitte verstrichen jedoch immer noch einige Minuten, so daß der CCl_4 in dieser Zeit noch in den Leberzellen wirksam werden konnte. In der Literatur haben wir vergleichbare Ergebnisse, die auch nur unter annähernd ähnlichen Voraussetzungen gewonnen sein müßten, nicht gefunden. Als einziger hat noch MYREN mit intrasplenischen Injektionen und kurzen Einwirkungszeiten gearbeitet — allerdings mit wesentlich geringeren Dosen (bis 0,02 ml CCl_4 in Olivenöl) und nur mit Untersuchung in HE-Schnitten. Er fand vor allem im intermediären Läppchenbereich Zelldissoziationen mit Plasmavacuolen und einzelnen Kernpyknosen nach 30 sec.

Interessant sind im Zusammenhang mit unseren Ergebnissen Befunde von SCHÜMMELFEDER u. Mitarb. an Kleinhirnen von röntgenbestrahlten Ratten. Fluoreszenzmikroskopisch zeigte sich bei der strahlenbedingten Pyknose der Körnerzellkerne keine Depolymerisation der DNS, sondern ganz im Gegensatz zu unseren Befunden eine erhöhte Resistenz der geschädigten Körnerzellen gegenüber Salz- und Perchlorsäure. Demnach scheint es bei der Pyknose je nach Zellart und Schädigungsmodus zu sehr verschiedenartigen Strukturänderungen der Kern-DNS zu kommen.

Zusammenfassung

Bereits 15 sec nach intrasplenischer Injektion von Tetrachlorkohlenstoff treten in der Leber im peripheren und intermediären Läppchenbereich sektorförmige

Zellveränderungen auf. Mit fluoreszenzmikroskopischen Methoden — insbesondere der Acridinorange-Fluorochromierung — lassen sich diese Frühschäden besser erfassen als mit lichtoptischen Methoden. In den sektorförmigen Bezirken, vorwiegend der Läppchenperipherie, scheint es zu einer Depolymerisation der Kern-DNS und zu einer Verminderung der cytoplasmatischen RNS zu kommen. Gleichzeitig ändert sich auch das elektrochemische Verhalten der Plasmaproteine.

Fluorescence-microscopic findings in the liver of the rat after acute poisoning with carbontetrachloride

Summary

Within 15 sec after intrasplenic injection of carbon tetrachloride, wedge-shaped changes in the peripheral and intermediary zones of the hepatic lobules appear. With the fluorescent microscopic technic, especially with acridine orange fluorochromation, this initial injury may be detected earlier than with the light microscope. In the wedge-shaped regions, chiefly in the periphery of the lobules, it appears that a depolymerization of the nuclear DNA occurs with a decrease in the cytoplasmic RNA. Simultaneously, there is a change in the electrochemical nature of the plasma proteins.

Literatur

- ANDREWS, W. H. H., and B. G. MAEGRAITH: The pathogenesis of the liver lesion due to the administration of carbon tetrachloride. *Ann. trop. Med. Parasit.* **42**, 95 (1948).
- CAMERON, G. R., and W. A. E. KARUNARATNE: Carbon tetrachloride cirrhosis in relation to liver regeneration. *J. Path. Bact.* **42**, 1 (1936).
- CAVALLERO, C.: Etude de la cirrhose experimentale par le tetrachlorure de carbone a l'aide de la reaction stathmocinetique (colchicinique) de Dustin. *Arch. int. Méd. exp.* **14**, 1 (1939).
- CHRISTIE, G. S., and J. D. JUDAH: Mechanism of action of carbon tetrachloride on liver Cells. *Proc. roy. Soc. Lond., Ser. B* **142**, 241—257 (1954).
- EGER, W.: Der Einfluß des Allylkohols und des Tetrachlorkohlenstoffs auf die Phosphoramidase der Leber. *Virchows Arch. path. Anat.* **315**, 135 (1948).
- Beitrag zur experimentellen Lebernekrose, zu ihrer Entstehung und ihrer Verhütung. *Acta hepat. (Hamburg)* **3**, 57—74 (1955).
- GLYNN, L. E., and H. P. HIMSWORTH: Massive acute necrosis of the liver: its significance and experimental production. *J. Path. Bact.* **56**, 297 (1944).
- — The intralobular circulation in acute injury by carbon tetrachloride. *Clin. Sci.* **6**, 235 (1948).
- GÖSSNER, W.: Zur Histochemie des Strugger-Effektes. *Verh. dtsch. Ges. Path.* **33**, 102—109 (1950).
- Die Perchlorsäure und ihre Anwendung zum histochemischen Nucleinsäurenachweis. *Z. wiss. Mikr.* **61**, 377—386 (1954).
- HECHT, A., G. KORB u. H. DAVID: Vergleichende histochemische, fluoreszenzmikroskopische und elektronenoptische Untersuchungen zur Frühdiagnose des Herzinfarktes der Ratte. *Virchows Arch. path. Anat.* **334**, 267—284 (1961).
- LEDUC, E. H., and J. W. WILSON: Injury to liver cells in carbon tetrachloride poisoning. *Arch. Path.* **65**, 147—157 (1958).
- OBERLING, CH., CH. ROUVILLIER et A. DONTCHEFF: Les effets de l'intoxication aigue au tetrachlorure de carbone sur le foie du rat. Etude au microscope électronique. *Ann. Anat. path., N.S.* **1**, 401—427 (1956).
- PATWARDHAN, M. V., V. RAMALINGASWAMI, S. SRIRAMACHARI and V. N. PATWARDHAN: Biochemical and histochemical study of liver injury produced by carbon tetrachloride in normal rats. *Indian. J. med. Sci.* **7**, 533—544 (1953).

- PEARSE, A. G. E.: Histochemistry, 1. Edit. London: J. & A. Churchill 1953.
- POPPER, H., D. K. WESER and P. SZANTO: Protective effect of vitamin B₁₂ upon hepatic injury produced by carbon tetrachloride. *Proc. Soc. exp. Biol. (N.Y.)* **71**, 688—690 (1949).
- RAPPAPORT, A. M.: In L. SCHIFF, Diseases of the liver. Philadelphia: J. B. Lippincott Company 1956.
- SANDRITTER, W.: Die Nachweismethoden der Nucleinsäuren. *Z. wiss. Mikr.* **62**, 283—304 (1954).
- SCHÜMMELFEDER, N.: Die Fluorochromierung tierischer Zellen mit Akridinorange. *Naturwissenschaften* **35**, 346 (1948).
- Strukturveränderungen des Protoplasmas bei dem Absterben der Zelle. *Verh. dtsch. Ges. Path.* **33**, 65—69 (1950).
- E. KROGH u. H. D. BERGEDER: Morphologische und histochemische Untersuchungen zur experimentellen Strahlenschädigung des Hirngewebes. *Tagg. Nord- und Westdtsh. Pathologen*, Bad Pyrmont 5.—7. 10. 1956. *Zbl. allg. Path. path. Anat.* **96**, 409 (1957).
- u. K. J. EBSCHNER: Färbungsanalysen zur Akridinorange-Fluorochromierung. *Histochemie* **1**, 1—28 (1958).
- SIMON, H., u. G. BENEKE: Neuartige histomorphologische und histochemische Befunde beim akuten Tetrachlorkohlenstoffschaden der Rattenleber. *Verh. dtsch. Ges. Path.* **45**, 284—286 (1961).
- STOWELL, R. E., and C. S. LEE: Histochemical studies of mouse liver after single feeding of carbon tetrachloride. *Arch. Path.* **50**, 519—537 (1950).
- STRUGGER, S.: Fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen über die Aufnahme und Speicherung des Akridinorange durch lebende und tote Pflanzenzellen. *Jena. Z. Med. Naturw.* **73**, 97—134 (1940).
- Fluoreszenzmikroskopie und Mikrobiologie. Hannover: M. u. H. Schaper 1949.
- THOMSON, J. F., and E. M. MOSS: The effect of oral administration of carbon tetrachloride on the intercellular distribution of uricase and succinic dehydrogenase activity of rat liver. *Cancer (Philad.)* **8**, 789 (1955).
- ZEIGER, K., H. HARDERS u. W. MÜLLER: Der Strugger-Effekt an der Nervenzelle. *Protoplasma (Wien)* **40**, 76—84 (1951).
- ZÖLLNER, N., u. E. RAISICH: Beobachtungen über den zeitlichen Ablauf der Leberschädigung durch Tetrachlorkohlenstoff bei der Ratte. *Z. ges. exp. Med.* **128**, 140—147 (1956).

Dr. G. ROSCHLAU,
Pathologisches Institut, Berlin N 4, Schumannstr. 20/21