

Aus dem Pathologischen Institut der Humboldt-Universität Berlin, dem Rudolf Virchow-Haus der Charité (Direktor: Prof. Dr. L. H. KETTLER) und der II. Medizinischen Universitätsklinik der Charité (Direktor: Prof. Dr. H. DUTZ)

Experimentelle Untersuchungen über die hyalintropfige Eiweißspeicherung der Leber

Von

IRMGARD SCHLICHT

Mit 3 Textabbildungen

(Eingegangen am 16. Oktober 1962)

Im Cytoplasma menschlicher Leberepithelien kommt es unter krankhaften Bedingungen gelegentlich zu lichtmikroskopisch erkennbaren Eiweißablagerungen. Im Tierexperiment wurden intraepitheliale Eiweißspeicherungen zum Teil auch in Vacuolen und meist neben anderen degenerativen Veränderungen unter anderem bei gewissen Vergiftungen, nach Sauerstoffmangel, nach partieller Hepatektomie und nach Arterialisation der Leber gesehen. Auf Grund des Ausfalles der Färbereaktionen sind sich alle Untersucher über die Eiweißnatur der Ablagerungen einig.

Nach den histochemischen Untersuchungen von NORKIN et al. bestehen die häufig bei floriden Cirrhosen zu beobachtenden sog. Mallory-Körperchen aus einem basischen unlöslichen Proteinkomplex. LUNZENAUER hält die Eiweißtropfen für abgelagerte Heteroproteine. PAPPENHEIMER und HAWTHORNE diskutieren eine Virusnatur der beim Menschen beobachteten Einschlüsse. TROWELL, ALTMANN und KETTLER halten den Vacuoleninhalt bzw. die hyalinen Tropfen für der Blutbahn entstammendes Serumeiweiß.

Ein massive hyalintropfige Eiweißspeicherung fanden wir regelmäßig in Rattenlebern nach Injektion großer Mengen artgleichen Serums in die Milz. Im Gegensatz zu den meisten bisher bekannten experimentellen Eiweißspeicherungen war die von uns erzeugte Form nicht von weiteren, schwerer wiegenden degenerativen Veränderungen begleitet. Diese Beobachtung im Verein mit der Massivität des Befundes gab uns die Möglichkeit, die formale und kausale Pathogenese der hyalinen Tropfenbildung in der Leber näher zu untersuchen.

Methodik

Wir berichten über 209 Versuche an männlichen und weiblichen Albino-Ratten, deren Gewicht zwischen 100 und 300 g (durchschnittlich um 200 g) lag. Bei dem Grundversuch (100 Tiere) wurde dem nüchternen Versuchstier in Äthernarkose nach Eröffnung der Bauchhöhle je nach Gewicht 10—22 ml (etwa 100 ml pro Kilogramm) homologes Serum in die vorgelagerte Milz injiziert. Nach der Injektion wurde die Milz zwecks Blutstillung mit einem dicken Perlonfaden ligiert. Abschließend wurden die Bauchdecken zweischichtig verschlossen. Die Tiere wurden $\frac{1}{2}$ Std bis 2 Wochen nach dem Eingriff durch Entblutung in Äthernarkose getötet. Bei einzelnen Ratten wurden 5, 10 und 15 min nach dem Eingriff Probeexcisionen entnommen und diese Tiere kurz danach getötet. 33 Tiere dieser Gruppe wurden vor dem Versuch einer 24—48stündigen Nahrungskarenz ausgesetzt. Sie erhielten nur Wasser ad libitum. Weitere 15 Tiere erhielten zusammen mit dem Serum etwa 50 mg *Evans-Blau* (T 1824) injiziert.

In anderen Versuchen sollte der Einfluß der Applikationsform geklärt werden. Es wurde deshalb 5 Tieren das Serum in die *Schwanzvene* gespritzt und 5 weiteren Ratten in Äthernarkose eine gleichgroße Menge *subcutan* injiziert. Die Tötung der Tiere erfolgte nach 24 Std.

Zur Klärung der Frage, ob bei den Versuchen das große Eiweißangebot oder die enorme Flüssigkeitszufuhr zu der Eiweißspeicherung geführt hatte, wurde 13 Tieren eine Menge von 5—7 ml *konzentriertem Serum* mit einem Eiweißgehalt von 16—24% in die Milz injiziert und nach 2 bzw. 24 Std getötet. Das konzentrierte Serum wurde mit Hilfe eines Exsiccators gewonnen und der Eiweißgehalt mit der Biuret-Methode bestimmt. Einer weiteren Gruppe von 21 Tieren wurde statt Serum *physiologische Kochsalzlösung* injiziert. Die Tötung erfolgte nach 2—72 Std. Bei 2 Ratten wurde der Kochsalzlösung Evans-Blau in der oben angegebenen Dosierung zugegeben; 6 Tieren wurde statt Serum *Dextran* appliziert, einer Ratte unter Zusatz von Evans-Blau. Diese Tiere wurden 4—5 Std nach der Operation getötet. Acht Ratten wurde im Verhältnis 1:5 versetztes *Citrat-Vollblut* verabfolgt. Der Eingriff war wegen des Rückstromes von Blut aus der Injektionsstelle schwierig. Drei Tiere kamen deshalb während der Operation infolge Verblutung ad exitum. Die anderen wurden nach einem Tag getötet. Die intralienale Injektion von heterologem Serum (menschliches) wurde von 5 Tieren nur wenige Minuten überlebt.

Eine weitere Versuchsserie von 26 Tieren wurde teils mit *Human-*, teils mit *Ratten-Albumin* unternommen. Das Human-Albumin wurde in Konzentrationen von 3,3—20% bei 20 Tieren getestet und wurde, wie zu erwarten, in Konzentrationen über 5% nicht vertragen, d. h. die Ratten verendeten dann während des Eingriffs oder wenige Minuten danach. Vier Ratten erhielten eine 3,5%ige Lösung von 15—18 ml Ratten-Albumin, 2 Ratten eine 1½%ige Lösung. Das Ratten-Albumin war durch Fällung mit Ammonsulfat mit nachfolgender Dialyse gewonnen worden¹. Von diesen Tieren überstanden nur 3 den Eingriff, sie wurden nach 1½ Std getötet.

In der üblichen Dosierung erhielten ferner 5 Ratten eine 4%ige *Ratten-Globulin-Lösung* intralienal, die ebenfalls wie oben durch Ammonsulfatlösung mit nachfolgender Dialyse gewonnen worden war. In gleicher Weise injizierten wir 2 Tieren eine 4%ige *Human-γ-Globulin-Lösung*.

Nach dem Eingriff wurde allen Tieren Futter und Wasser ad libitum gegeben.

Mit Hilfe eines sonst zur Messung des Liquordruckes gebräuchlichen Steigrohres wurde bei 27 Tieren nach der Injektion der verschiedenen Flüssigkeiten zum Teil unter Zusatz von 1000 E Heparin der Milzdruck in Zentimeter Wasser gemessen.

Weiterhin wurde das Verhalten der hyalinen Tropfen gegenüber Neutralsalzlösungen überprüft. Zu diesem Zweck wurde 5 Tieren die übliche Menge homologes Serum unter Zusatz von Evans-Blau injiziert. 3 Std nach dem Eingriff, dem Höhepunkt der Eiweißspeicherung, wurden diese Tiere entblutet und die Lebern 5 min bei einer Umdrehungszahl von 12000 pro Minute homogenisiert. Als Suspensions- bzw. Lösungsmittel wurden die zu überprüfenden Neutralsalzlösungen verwendet. Getestet wurden: physiologische Kochsalzlösung, 11%ige Natriumsulfatlösung, 25%ige Natriumsulfatlösung, gesättigte Natriumsulfatlösung, gesättigte Magnesiumsulfatlösung, gesättigte Ammoniumsulfatlösung und Aqua bidestillata.

Neben dem Anfangskörpergewicht wurde bei 23 Tieren das Lebergewicht am Versuchsende bestimmt.

Eine Überprüfung des Rest-N wurde bei 5 Tieren durchgeführt und der Hämatokrit bei 28 Tieren bestimmt. Von 23 Tieren wurden ein Elektrophorese-Diagramm angefertigt sowie die Takatasche Reaktion bei 8 Ratten angestellt und die Bilirubinwerte in 3 Fällen ermittelt. Bei 14 Tieren wurden die Urinmenge nach dem Versuch gemessen und eine Eiweißprobe mit Sulfosalicylsäure durchgeführt.

Die histologische Untersuchung erstreckte sich neben der Leber bei 36 Tieren auch auf die Nieren. In Stichproben wurden außerdem Herz, Lungen, Milz, Darm und Muskulatur sowie Haut untersucht.

¹ Für die Trennung des Rattenserums in Albumine und Globuline danken wir Herrn Dr. HERRMANN und Herrn Dr. GILLERT (Robert Koch-Institut, Berlin; Direktor: Prof. Dr. HENNEBERG).

Ergebnisse

Die intralineale Injektion großer homologer Serummengen (etwa 100 ml pro Kilogramm Körpergewicht) wird von Ratten gut vertragen, vorausgesetzt, daß ein größerer Blutverlust aus der Injektionsstelle durch eine zweckmäßige Blutstillung vermieden wird. Noch während der Injektion vergrößert sich die Leber erheblich; man erkennt auf ihrer Oberfläche rasch auftretende, teils punktförmige, teils landkartenartig angeordnete hellere Bezirke. Diese verschwinden jedoch bald unter weiterer Größenzunahme und Cyanose des Organs, die sich aber auch bald

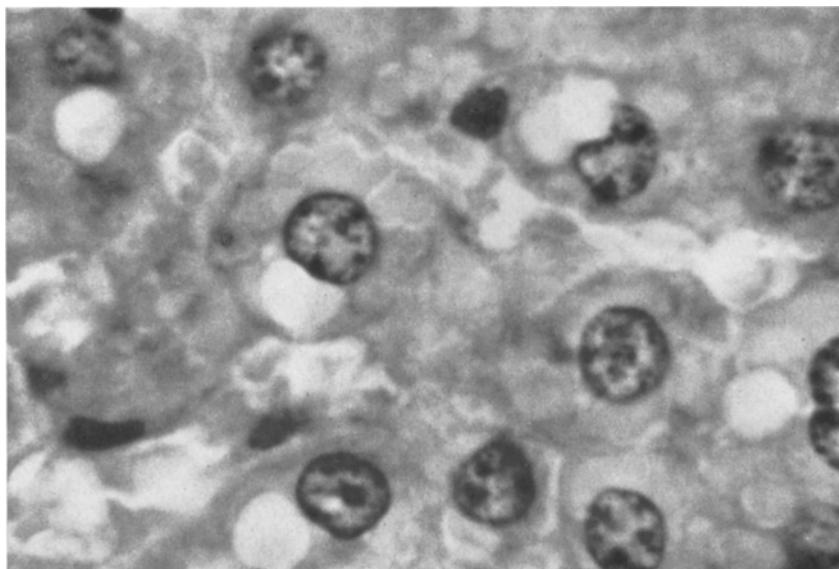


Abb. 1. Rattenleber 5 min nach intralinealer Injektion 18 ml artgleichen Serums. Vacuolige Umwandlung mit starker Eiweißansammlung in den Vacuolen und beginnender hyaliner Tropfenbildung. Hämatoxylin-Eosin

wieder zurückbilden. Die Überprüfung des Lebergewichtes bei 23 Tieren am Ende des Versuches ergab immer etwa im Bereich der Norm liegende Werte, schon sogar 30 min nach dem Eingriff. Auch die Farbe war am Ende des Versuches in allen Fällen wieder normalisiert.

Die histologische Untersuchung der Leber wenige Minuten bis etwa $1\frac{1}{2}$ Std nach der Injektion ergibt neben einer mäßigen Erweiterung der Zentralvenen und der Sinusoide eine hochgradige vacuolige Umwandlung der Leberzellen. Die auftretenden Vacuolen unterscheiden sich in nichts von den aus der Literatur gut bekannten Vacuolusbildungen der Leber, wie sie z. B. unter allgemeinem Sauerstoffmangel (TROWELL, ULRICH, ALTMANN u. a.) nach örtlichen Kreislaufstörungen (KETTLER) und im absoluten Hungerzustand (SCHLICHT) beschrieben wurden. Im Gegensatz zu der zentral gelegenen vacuoligen Umwandlung bei diesen Zuständen ist die jetzt von uns erzeugte Form regelmäßig lappchen-peripher (periportal) lokalisiert. Nur bei besonders hochgradiger Ausbildung kann sie bis zum Lappchenzentrum fortschreiten. Die Vacuolen bilden sich, wie die Befunde einzelner während der Operation verstorbener Tiere und die nach dem

Eingriff durchgeföhrten Probeexcisionen zeigen, bereits unter der Injektion. Sie erscheinen zunächst optisch leer oder beinhalten allenfalls feinste, im Hämatoxylin-Eosinschnitt zartrosa gefärbte amorphe oder der Vacuolenwand sichelförmig anliegende Eiweißniederschläge. Die Vacuolen treten in der Leberzelle einzeln oder in der Mehrzahl auf und können konfluieren. Häufig führen sie zu einer beträchtlichen Zellvergrößerung. Ihre Größe kann die des Kernes übertreffen. Letzterer kann von der Vacuole eingedellt werden und umgekehrt. Im weiteren Verlauf kommt es dann zu einer zunehmenden Eiweißansammlung in den Vacuolen

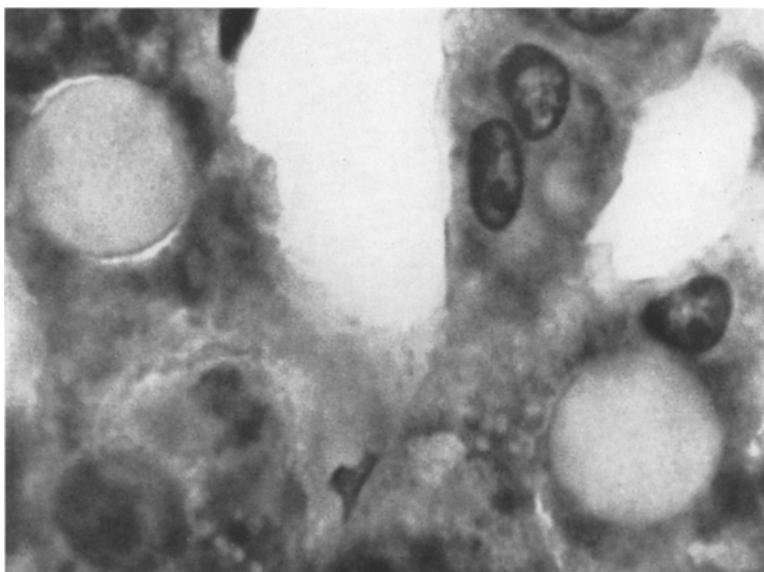


Abb. 2. Hyaline Tropfenbildung in der Rattenleber. 24 Std nach intralienaler Injektion 14 ml artgleichen Serums. Vergr. 1800 \times . Hämatoxylin-Eosin

(s. Abb. 1). Die Eiweißniederschläge sind vielgestaltig und füllen die Vacuole teils als zunächst kleine Kugelchen, Sicheln oder Schalen und zum Teil diffus in amorpher Form aus. Sie nehmen an Dichte zu. Etwa 1—3 Std nach dem Eingriff ist der Höhepunkt der Eiweißspeicherung erreicht. Die Leber zeigt nun eine massive Ablagerung von hyalinen Tropfen, von der fast jede Zelle mit Ausnahme derjenigen des Läppchenzentrums befallen ist. Die Tropfen sind teilweise durch Konfluenz entstanden, nunmehr abgerundet; zwischen ihnen und dem Cytoplasma besteht oft als Rest der Vacuole oder auch als Artefakt ein spaltförmiger Hohlraum (s. Abb. 2). Meistens liegen die Kugeln jedoch unmittelbar im Cytoplasma und dem Kern benachbart. Die Größe schwankt zwischen der einer ganzen Leberzelle bis zu lichtmikroskopisch eben noch erkennbaren Partikeln. Sie kommen in der Ein- und Mehrzahl in der Zelle vor und können, wenn sie sehr groß sind, auch extracellular gefunden werden. Bei schwacher Vergrößerung erscheinen die Tropfen homogen, bei Anwendung stärkerer Vergrößerungen (900mal) erkennt man allerdings innerhalb der Tropfen oft deutliche, teils halbmondförmige, teils schalenförmige Dichteunterschiede sowie feinste vacuoläre Aufhellungen. Die Leberzellkerne zeigen keine degenerativen Veränderungen.

Färberisch verhalten sich die Körperchen wie Eiweiß. Einen negativen Ausfall zeigen die Sudan-Färbung, die Glykogen-Färbung und die Hämoglobin-Färbung, ferner die Färbung mit Kongorot, Methylenblau und Kresylechtviolett; letztere mit vereinzelten Ausnahmen. Im Hämatoxylin-Eosinschnitt sind die Körperchen kräftig rot gefärbt. Die Färbung nach GOLDNER zeigt sie ebenso wie die von MALLORY selbst angegebene Darstellungsmethode auf dem Höhepunkt der Speicherung leuchtend rot, erstere oft mit einem grünen Rand. In Frühstadien sind sie dagegen häufig grün gefärbt, ebenso wie der eiweißhaltige Vacuoleninhalt. Die Azanfärbung nach HEIDENHAIN fällt entsprechend aus: auf dem Höhepunkt der Speiche-

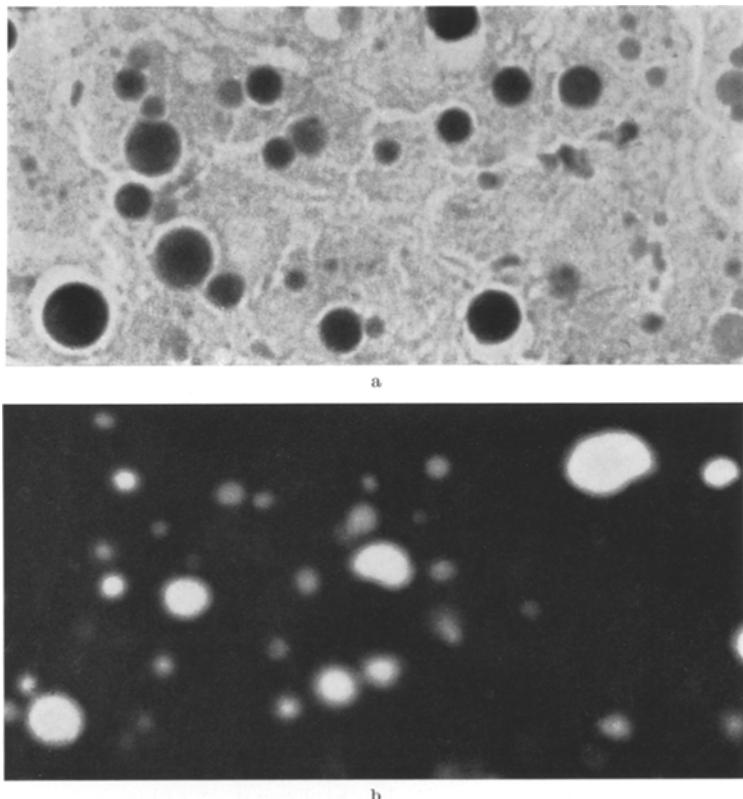


Abb. 3. a Hyaline Tropfenbildung in der Rattenleber. 3 Std nach intralienaler Injektion 20 ml artgleichen Serums. Intravitalfärbung mit Evans-Blau; b hyaline Tropfenbildung in der Rattenleber. 60 min nach intralienaler Injektion 20 ml artgleichen Serums. Fluorochromierung mit Rhodamin B

rung leuchtend rote Kugeln, oft mit blauem Rand. Die von ROQUÉ angegebene Färbung lässt die Tropfen blau oder rot mit blauem Rand erscheinen. Die Fibrinfärbungen nach WEIGERT und KOCKEL fallen kräftig positiv aus ebenso wie die Markscheidenfärbung nach BENDA und SPIELMEYER und die Mitochondriendarstellung nach ALTMANN. Deutlich positiv fällt auch die PAS-Reaktion aus. In den Frühstadien ist dabei der Vacuoleninhalt zunächst nur schwach rot gefärbt, um mit fortschreitender Zeit an Farbintensität zuzunehmen. Eine besonders gute Darstellungsmethode fanden wir in der Intravitalfärbung mit Evans-Blau (Abb. 3a). Dabei ist die Intensität des blauen Farbtones von der zugeführten Farbstoffmenge abhängig. Auch hier zeigen sich die optisch leeren Vacuolen ungefärbt; mit zunehmender Eiweißansammlung kommt es zur Blaufärbung des Vacuoleninhaltes und schließlich zu einer kontrastreichen Blaufärbung der hyalinen Körperchen in der ungefärbten Umgebung. In der von LUNZENAUER angegebenen Fluorochromierung zur Darstellung der Mallory-Körperchen ergibt sich eine ausgezeichnete Methode. Die hyalinen Tropfen zeigen eine starke Sekundärfluorescenz (s. Abb. 3b). Mit Acridinorange leuchten sie bei

fluoreszenzmikroskopischer Betrachtung grün, nach Färbung mit Rhodamin-B orange auf. Die Färbungen mit Methylgrün-Pyronin und nach GIEMSA fallen uncharakteristisch aus. Bei ersterer sind die Körperchen blaßrot bis blaurot dargestellt, bei letzterer blaßrosa.

Abgesehen von dieser grobtropfigen hyalinen Eiweißspeicherung war in der Leber aller Versuchstiere bei Goldner-Färbung eine massive leuchtend rote, lichtmikroskopisch eben noch erkennbare feingranuläre Speicherung zu erkennen, die aber nicht in die Evans-Blau-Färbung einbezogen war und keine PAS- oder Fibrin-Reaktion gab. Bei Normaltieren findet man diesen Befund ebenfalls, jedoch in bedeutend geringerer Intensität.

In allen Leberteilen, d. h. rechts und links, waren die hyaline Tropfenbildung und alle übrigen Veränderungen bei den daraufhin untersuchten Tieren in gleicher Weise ausgeprägt.

An weiteren Veränderungen beobachteten wird lediglich hin und wieder *Einzelzellnekrosen*. Sie wurden vergleichsweise viel zu selten gesehen, als daß man sie in Zusammenhang mit der hyalintropfigen Eiweißspeicherung bringen könnte; auch ließen sie keine hyalinen Tropfen in ihrem Inneren erkennen. Die basophilen Substanzen, beurteilt am Kresylechtviolestschnitt, waren nicht verminderd, eher vermehrt.

Die Entscheidung, ob sich die *Kupfferschen Sternzellen* an der Eiweißspeicherung beteiligen, ist lichtmikroskopisch nicht ganz einfach zu treffen. Wir hatten den Eindruck, daß es auf dem Höhepunkt des Prozesses gelegentlich der Fall war. Bei der Intravitalfärbung mit Evans-Blau waren die Kupfferschen Sternzellen teilweise gefärbt. Da aber nach GIBSON und EVANS dieser Farbstoff der Phagocytose durch das RES anheimfällt, kann es sich um einen derartigen Vorgang gehandelt haben. In den Disse'schen Räumen fanden sich niemals Eiweißabscheidungen.

Bereits 24 Std nach dem Eingriff war der Befund der hyalinen Tropfenbildung deutlich zurückgegangen. Nach 2 und 3 Tagen fanden sich die Tropfen nur noch vereinzelt, nach 6 Tagen konnten wir sie nicht mehr beobachten. Wie die *Rückbildung* erfolgt, ist schwer zu beurteilen. Sie scheint einmal auf dem Wege der Verkleinerung, zum anderen aber auch wieder auf dem Wege über die vacuolige Umwandlung, d. h. durch Verdünnung zu erfolgen. Einzelne kleinere Vacuolen sahen wir immer wieder außer den abgelagerten Eiweißtropfen auch noch nach 2 und 3 Tagen, ferner nach 6 Tagen, zu welchem Zeitpunkt hyaline Tropfen überhaupt nicht mehr gesehen wurden. Celluläre Resorptionserscheinungen wurden jedenfalls gänzlich vermißt. Während der Rückbildungsphase kam es bei einzelnen Tieren 2 und 3 Tage nach dem Eingriff zu einer mäßig starken peripheren fein- bis mitteltropfigen Verfettung der Leber. Zwei Wochen nach der Injektion konnten wir mit unseren Methoden wesentliche Veränderungen nicht mehr feststellen. Es kam zu einer *restitutio ad integrum*.

Von den 33 Tieren, die vor dem Versuch einer 24—48stündigen Nahrungskarenz unterworfen worden waren, bildete sich der Befund der grobtropfigen Eiweißspeicherung auffälligerweise bei 11 Tieren überhaupt nicht aus. Dafür fielen in dieser Gruppe bei 13 Tieren Parenchymuntergänge auf. Es handelte sich dabei teils um subcapsulär gelegene, infarktartige Nekrosen, teils um Massennekrosen und zum Teil um Gruppennekrosen. Sechs von diesen Tieren zeigten keinerlei Eiweißspeicherung und 2 nur einen sehr schwach ausgeprägten Befund. In der Umgebung der Nekrosen war die hyalintropfige Eiweißablagerung nicht stärker als im übrigen Lebergewebe.

Eine der grobtropfigen Eiweißspeicherung der Leber entsprechende Veränderung fanden wir in *keinem anderen der untersuchten Organe* (Nieren, Herz, Muskel, Darm, Haut und Lunge). Nur bei einem Tier war in den Hauptstückepithelien der Niere bei Intravitalfärbung mit Evans-Blau eine geringgradige Tropfenbildung zu erkennen, wobei die Tropfen jedoch an

Größe hinter denen der Leber erheblich zurückblieben. Im übrigen waren in den Kanälchenlumina, wie es auch von Normaltieren bekannt ist, feine Eiweißabscheidungen zu erkennen, die bei der Intravitalfärbung blau tingiert waren. Ebenso wie in der Leber war in den Nieren der Versuchstiere, vorwiegend in den Hauptstückepithelien eine feingranuläre leuchtend rote Speicherung zu erkennen, die sich bei Normaltieren ebenfalls, aber in bedeutend geringerem Umfang fand und sich nicht an der Intravitalfärbung beteiligte. Die von einzelnen gleichzeitig mit Evans-Blau injizierten Tieren untersuchten Organe zeigten spärliche Farbstoffniederschläge nur in den elastischen Fasern einiger Gefäßwände und vereinzelt in der Basalmembran der Harnkanälchen, ferner in phagocytierenden Zellen der Darmschleimhaut, der Milz und der Lunge sowie wahrscheinlich in den Sternzellen der Leber.

Die Versuchsreihe mit *intravenöser* Applikation des homologen Serums führte ebenfalls zur Speicherung hyaliner Tropfen, jedoch in bedeutend geringerem Ausmaß als nach intralienaler Verabfolgung.

Nach *subcutaner* Injektion des Serums bildete sich keine Eiweißspeicherung aus.

Die Versuche mit intralienaler Applikation *konzentrierten* Serums in Dosen von 5—7 ml führte nur in geringem Ausmaß zur Bildung hyaliner Tropfen.

Bei den Tieren, die statt Serum *physiologische Kochsalzlösung* intralienal verabfolgt bekamen, bildeten sich vereinzelt hyaline Tropfen. Im großen und ganzen blieb jedoch der Prozeß auf der Stufe der vacuoligen Umwandlung stehen, die ihrerseits aber auch nicht das Ausmaß erreichte wie nach der Injektion von Serum. Auch kam es bei den Tieren, die zusätzlich Evans-Blau erhalten hatten, nicht zu einer nennenswerten Ausscheidung des Farbstoffes in die Leber. Die Vacuolen blieben ungefärbt.

Mit intralienaler Injektion von *Dextran* konnte ebenfalls keine grobtropfige Eiweißspeicherung erzielt werden; auch keine Farbstoffausscheidung bei gleichzeitiger Ausscheidung von Evans-Blau. Deutlich war aber bei diesen Tieren eine ausgeprägte vacuolige Umwandlung mit feinsten sichelförmigen PAS-positiven Niederschlägen in den Vacuolen. In den Dissesehen Räumen waren keine Ablagerungen PAS-positiven Materials zu erkennen.

Die Injektion von *Citrat-Vollblut* gelang, wie gesagt, nur bei 3 Tieren. Von den drei glücklichen Versuchen zeigte ein Tier eine erhebliche Eiweißspeicherung, eines eine mittelgradige, während bei dem dritten nur vereinzelt hyaline Körperchen nachweisbar waren. Die drei intra operationem verstorbenen Tiere zeigten eine deutliche vacuolige Umwandlung.

Die intralienale Applikation von *Human-Albumin-Lösungen* in Dosen von 15—20 ml wurde von den Ratten in Konzentrationen über 5% nicht vertragen. Auch die Injektion der 5%igen Lösung wurde nur von 2 Tieren überstanden. Hyaline Körperchen bildeten sich jedoch erst bei Konzentrationen von 3,3%, dann allerdings in gleicher Form und Menge wie bei den Versuchen mit homologem Serum. Bei den Tieren, die die Injektion mit 5%iger Lösung überstanden hatten, waren nur vereinzelt Eiweißtropfen nachweisbar. Von 6 Ratten, die eine 4%ige Lösung erhalten hatten, waren nach 24 Std ebenfalls nur bei 2 Tieren vereinzelt Eiweißtropfen zu erkennen. Die übrigen zeigten keine Speicherung. Von den 6 Ratten, die *Ratten-Albumin* injiziert bekamen, kamen 3 während der Operation ad exitum, eine überlebte und wurde nach 3½ Std getötet. Sie zeigte eine massive hyalintropfige Eiweißspeicherung. Zwei Tiere, die eine nur 1½—2%ige Lösung erhalten hatten, ließen eine geringgradige Eiweißspeicherung erkennen. Eine vacuolige Umwandlung war bei den intra operationem gestorbenen Tieren dieser Gruppe auch zu beobachten; bei Anwendungen von Konzentrationen über 3,3% jedoch in deutlich geringerem Ausmaß. Die so mit Albumin erzeugten hyalinen Tropfen waren mit Evans-Blau intravital färbbar und verhielten sich bei der Hämatoxylin-Eosin-, Hämatoxylin-Sudan-, Goldner- und Fibrin-Färbung sowie bei der Anstellung der PAS-Reaktion wie die bei dem Grundversuch erzeugten Tropfen.

Die Durchführung des Versuches bei 2 Ratten mit einer 4%igen *Human-γ-Globulin-Lösung* führte nicht zur Bildung der hyalinen Körperchen. Dagegen war eine leichte hyalintropfige Speicherung bei den 5 Ratten zu beobachten, die Ratten-Globulin (alle Fraktionen) gespritzt bekommen hatten. An Intensität war sie jedoch mit der nach Injektion von Serum oder Albumin nicht entfernt zu vergleichen.

Die Überprüfung des Verhaltens der hyalinen Tropfen gegenüber *Neutral-salzlösungen* ergab eine sehr gute Löslichkeit dieses Eiweißes. Es verhielt sich in dieser Beziehung wie die Serum-Albumine, d. h. die Tropfen waren nur in

gesättigter Natriumsulfat- und in gesättigter Ammoniumsulfatlösung zu erhalten. Sie lösten sich dagegen in Aqua destillata, in physiologischer Kochsalzlösung, in 11%iger Natriumsulfatlösung, in 25%iger Natriumsulfatlösung und in gesättigter Magnesiumsulfatlösung; in letzteren beiden allerdings erst nach mehreren Stunden. In gesättigter Natriumsulfatlösung waren sie dagegen auch nach 24stündiger Einwirkung nicht gelöst. Die vorangegangene Intravitalfärbung erleichterte bei diesen Versuchen die Beobachtung des Lösungsprozesses im Mikroskop.

Die *Milzdruckwerte*, die wir mit unserer Meßmethode bei Normaltieren um Null liegend gefunden hatten, stiegen innerhalb weniger Minuten nach der Injektion von homologem Serum, physiologischer Kochsalzlösung, Dextran und 3,3%iger Human-Albumin-Lösung auf Werte von 12–19 cm Wasser. Nach Injektion kleinerer Mengen stärker konzentrierter Lösungen (6 ml 10- und 20%iger Human-Albumin-Lösung und konzentriertes Serum) erreichten sie die gleiche Höhe, in einem Versuch mit Anwendung 6 ml 10%igem Human-Albumin 21 cm Wasser. Bei einzelnen Tieren konnten wir beobachten, daß der Druck nach $\frac{1}{2}$ Std noch nicht abgesunken war. 3 Std nach dem Eingriff hatten sich die Werte jedoch normalisiert.

Die *Gesamteiweißwerte* im Blut waren bei den 20 diesbezüglich untersuchten Tieren 3 Std bis 6 Tage nach dem Versuch weder vermindert noch erhöht. Sie lagen zwischen 5,7 und 7,9%, bei den meisten Tieren zwischen 6,05 und 6,6%. Bei 5 Tieren wurden sie relativ hoch gefunden, d. h. über 7 g-%. Bei 20 Normaltieren hatten wir dreimal Werte über 7 g-% beobachtet. Die elektrophoretische Trennung ergab keine sicheren Abweichungen der einzelnen Fraktionen von der Norm. 3 Std nach dem Versuch waren sie bei einigen Tieren schwer voneinander abzugrenzen, und es fielen ferner bei 4 Tieren doppelgipflige Albuminzacken auf. Eines dieser 4 Tiere hatte 3,3%iges Human-Albumin injiziert bekommen.

Der *Hämatokrit* war in den ersten Stunden nach dem Eingriff deutlich erniedrigt und lag bei 16 Tieren in diesem Zeitabschnitt im Durchschnitt bei 29%. Nach 24 Std hatten sich die Werte normalisiert und betrugen nun im Durchschnitt von 6 Tieren 49,3% (6 Tage nach dem Versuch fanden wir bei 6 Tieren ebenfalls normale Werte).

Im *Urin* der Versuchstiere war mit der Sulfosalicylsäureprobe niemals Eiweiß nachweisbar. In den ersten Stunden nach dem Versuch wurde gar kein Urin oder nur sehr geringe Mengen, d. h. 1–2 ml gelassen. 1–3 Tage nach dem Versuch war die Urinmenge gegenüber Normaltieren, soweit überprüft, nicht auffällig vermehrt.

Takatasche Reaktion und *Bilirubin* im Serum waren bei den daraufhin untersuchten Tieren normal. Der *Rest-Stickstoff* war 24 Std nach der Injektion homologen Serums in die Milz bei 2 Tieren normal, bei einem mit 56 mg-% etwas erhöht. 3 Tage nach dem Versuch fanden wir bei 2 Tieren normale Werte.

Diskussion

Wie unsere Untersuchungen ergeben haben, läßt sich durch die intralienale Injektion großer Mengen von Serum oder Albuminlösungen eine hochgradige, *nicht degenerative* hyalintropfige Eiweißspeicherung der Leber erzeugen, mit Regelmäßigkeit allerdings nur wenn die Tiere vorher nicht gehungert haben. Die gespeicherten Eiweißtropfen verhalten sich dabei morphologisch und färberisch wie die bisher aus der Literatur bekannten experimentell erzeugten und vielfach beim Menschen beobachteten Einschlußkörperchen der Leber.

Wenn die Applikation großer Mengen homologen Serums zu massiver lichtmikroskopisch erkennbarer Eiweißspeicherung führt, so liegt die Annahme nahe, daß es Serumeiweißkörper sind, die in den Leberzellen abgelagert werden. Es ist weiterhin zu erwarten, daß unter den Serumeiweißkörpern die Albumine mit ihrem geringsten Molekulargewicht die Capillarmembran und die Zellgrenzen am ehesten passieren werden.

Unsere Vermutung, daß die von uns erzeugten hyalinen Eiweißtropfen der Leber im Wesentlichen aus Serumalbuminen bestehen, können wir durch folgende Ergebnisse stützen:

1. Die Tatsache, daß die hyalinen Tropfen intravital mit Evans-Blau färbbar sind, beweist zunächst, daß sie aus der Blutstrombahn ausgetretene Serum-eiweißkörper enthalten, und zwar die niedermolekularen unter diesen. Evans-Blau (T 1824) bindet sich bekanntlich an Albumin (RAWSON, ALLEN und ORAHOVATS). Ein Molekül Albumin bindet nach RAWSON 14 Moleküle Evans-Blau. In höheren Konzentrationen, die wir anwenden mußten, um eine eindrucksvolle Intravital-färbung zu erzielen, bindet es sich auch an die α - und β -Globuline. DONIACH und WEINBRENN kamen auf ähnlichem Wege zur gleichen Annahme der Anwesenheit von Plasmaalbumin in den Eiweißtropfen. Sie markierten nämlich vor der partiellen Hepatektomie das Serum der Ratten mit Evans-Blau und beobachteten danach eine Intravitalfärbung der bei diesem Eingriff auftretenden hyalinen Körperchen.

2. Die Eiweißspeicherung in der *massiven* Form kann nur durch die Injektion albuminhaltiger Flüssigkeiten, also durch Serum-, Human- oder Ratten-Albumin-Lösungen oder durch Vollblut erreicht werden. Hingegen ist mit physiologischer Kochsalzlösung, Dextran- oder Globulinlösungen keine oder eine nur unbedeutende Eiweißspeicherung zu erzielen.

Das Auftreten einer quantitativ sehr geringfügigen Tropfenbildung nach Injektion von 0,9%iger physiologischer Kochsalzlösung sowie Ratten-Globulinlösung erklären wir uns als Folge allein einer Permeabilitätssteigerung, wie sie durch den nachweisbaren starken Druckanstieg im Pfortaderkreislauf entstehen muß. Es ist durchaus zu erwarten, daß unter solchen Bedingungen kleine Mengen von Serumalbumin die Strombahn verlassen.

3. Die hyalinen Tropfen verhalten sich gegenüber Neutralsalzlösungen eindeutig wie Serumalbumine, d. h. sie sind sehr gut löslich und können nur durch gesättigte Lösungen von Ammoniumsulfat oder Natriumsulfat *erhalten* werden. Globuline sind hingegen in den übrigen getesteten unphysiologischen Lösungen nicht löslich.

Diese drei Tatsachen lassen keinen anderen Schluß zu, als daß die von uns erzeugten hyalinen Tropfen im Wesentlichen aus Serumalbuminen bestehen. Daß möglicherweise andere Stoffe in mehr oder weniger kleinen Mengen zusätzlich darin enthalten sein können, insbesondere α - oder β -Globuline mit ihrem relativ geringen Molekulargewicht, halten wir für möglich.

Der Ausfall der Färbereaktionen spricht nicht gegen unsere Ergebnisse. Das kohlenhydrat-haltige Serumalbumin gibt eine positive PAS-Reaktion (Pearse). Ein Stück eingedicktes und mit der üblichen histologischen Methodik gefärbtes Human-Albumin (Fixierung in Formol) färbt sich nach GOLDNEB und mit der Azanfärbung wie die Eiweißkörperchen rot mit grünem bzw. blauem Rand. Auch Acridinorange bindet sich an Albumin (WUHRMANN und WUNDERLY). Fibrinfärbungen stellen bekanntlich kein Spezifum dar.

Während sich die von uns erzeugten hyalinen Tropfen durch eine sehr gute Löslichkeit auszeichnen, sind die sog. Mallory-Körperchen nach den Untersuchungen von NORRIN u. Mitarb. unlöslich. Diese Differenz könnte man sich damit erklären, daß die bei floriden und fortgeschrittenen Lebercirrhosen schwer geschädigten Parenchymzellen nicht imstande sind, einmal durch Permeabilitätsstörungen eingedrungenes Serum-eiweiß abzubauen. Es wird vermutlich vielmehr denaturiert und nimmt dabei gelegentlich auch die von MALLORY als Maschenwerk beschriebene Form an. Die ganze ohnehin degenerierte Zelle wird schließlich leukocytär resorbiert.

Formalpathogenetisch entwickelt sich die hyaline Tropfenbildung in unseren Versuchen eindeutig über den Zustand der vacuoligen Umwandlung. Die Eiweiß-einlagerung erfolgt also nicht in die Mitochondrien, denn die Vakuolenbildung ist, wie ALTMANN ausführlich diskutiert hat, und wie MILLER auf Grund elektronenmikroskopischer Befunde hervorhebt, keine auf eine Mitochondrienveränderung zu beziehende Erscheinung. Daß die Bildung der hyalinen Tropfen *ausschließlich* auf einer Konzentration des Vacuoleninhaltes beruht, halten wir auf Grund der Größen- und Dichteverhältnisse der Tropfen für nicht sicher.

FREY-WYSSLING und ALTMANN halten die vakuolige Umwandlung für eine aktive Leistung der Zelle, eine Meinung, der wir uns auch in bezug auf die Ab-lagerung von Serumalbumin in den Vacuolen anschließen möchten. Fraglich erscheint es uns hingegen, ob es sich bei der Aufnahme und Retention des Albumins in der Leberzelle um einen passiven oder aktiven, im Zusammenhang mit der Leberfunktion stehenden *regulativen* Vorgang handelt. Die Tatsache des Ausbleibens der Speicherung bei einem Teil der Hungertiere spricht dafür. Es handelt sich offensichtlich um eine echte Speicherung.

Kausalpathogenetisch war zur Entstehung der massiven Form der hyalintropfigen Eiweißspeicherung in unseren Versuchen in erster Linie die *Zufuhr von Eiweiß*, d. h. von *Serumalbumin* erforderlich. Die Kontrollversuche mit Dextran und physiologischer Kochsalzlösung sowie mit Globulinlösungen haben zu keiner nennenswerten Speicherung geführt. Das große Angebot von Serumalbumin ist jedoch bei der Entstehung von Tropfen nicht der alleinige pathogenetische Faktor, denn die Versuche mit intralienaler Applikation von konzentriertem Serum bei kleinem Flüssigkeitsvolumen haben gezeigt, daß eine nur geringgradige Tropfenbildung auftrat. Als weitere Vorbedingung möchten wir deshalb den durch die Infusion der großen Flüssigkeitsmenge hervorgerufenen, nachgewiesenen *Druckanstieg im Pfortaderkreislauf* und die damit verbundene *Permeabilitätssteigerung* ansehen. Unsere Milzdruckmessungen nach intralienaler Zufuhr konzentrierten Serums oder 10—20%iger Albuminlösung bei kleinem Volumen (6—7 ml) haben allerdings gezeigt, daß der Druck dabei genau so hohe Werte erreichte. Wir nehmen an, daß in diesen Fällen die Erhöhung des kolloidosmotischen Druckes zum Einströmen von Gewebswasser in die Blutbahn und damit zur Erhöhung des hydrostatischen Druckes geführt hat, ein Vorgang, der seinerseits die zum Zustandekommen der hyalinen Tropfenbildung erforderliche Vakuolenbildung unmöglich machte. Die vacuolige Umwandlung ist ja, gleich unter welchen Bedingungen sie entsteht, die Folge eines *Austrittes* von Flüssigkeit aus der Strombahn. Die Bildung der hyalinen Tropfen erfordert also neben der Eiweißzufuhr und dem durch den im Pfortaderkreislauf hervorgerufenen Druckanstieg mit nachfolgender Permeabilitätssteigerung *normale kolloidosmotische Verhältnisse*, genauer gesagt, es darf keine Erhöhung dieser Werte vorliegen. Das hat sich auch aus den Versuchen ergeben, die mit einem großen Volumen von 4—5%igen Human-Albumin-Lösungen durchgeführt und überstanden wurden. Auch bei diesen trat keine nennenswerte Tropfenbildung auf. Vielmehr konnte sie erst durch Anwendung einer 3,3%igen Lösung erreicht werden.

Zusammenfassend ist für die Entstehung einer hyalintropfigen Eiweißspeicherung der Leber in dem Ausmaß, wie wir sie nach hochdosierter intralienaler Serum- oder Albuminzufluhr beobachtet haben, einmal die Zufuhr des Serum-

albumins und zum zweiten eine Erhöhung der Capillarpermeabilität als Folge der nachgewiesenen Zunahme des Druckes im Pfortaderkreislauf verantwortlich zu machen. Die Vermeidung einer Erhöhung des kolloidosmotischen Druckes ist eine weitere Voraussetzung. Ein optimaler Ernährungszustand der Versuchstiere ist ein begünstigender Faktor bei der Albuminspeicherung. Ob die von uns erzeugten hyalinen Tropfen der Leber den beim Menschen beobachteten Bildungen und den von anderen Untersuchern experimentell erzeugten Bildungen vergleichbar sind, muß dahingestellt bleiben.

Zusammenfassung

Nach Injektion albuminhaltiger Flüssigkeiten wie Serum, Albuminlösung oder Vollblut in die Milz in Mengen von etwa 100 ml pro Kilogramm entsteht bei Ratten eine hochgradige hyalintropfige Eiweißspeicherung in der Leber. Durch Verabfolgung von physiologischer Kochsalzlösung, Dextran oder Globulinlösungen kann sie dagegen nicht bzw. in nur sehr geringem Ausmaß erzeugt werden. Die hyalinen Tropfen sind intravital mit Evans-Blau färbbar und verhalten sich gegenüber Neutralsalzlösungen wie Serumalbumine. Diese Tatsachen lassen keine andere Deutung zu, als daß die Einschlußkörperchen im wesentlichen aus Serumalbuminen bestehen. Die wichtigsten kausal-pathogenetischen Faktoren sind die Zufuhr ausreichender Mengen von Serumalbumin und die durch die Druckerhöhung im Pfortaderkreislauf hervorgerufene Permeabilitätssteigerung; ein normaler bzw. nicht erhöhter kolloidosmotischer Druck ist weitere Vorbedingung. Durch einen dem Versuch vorausgehenden Hungerrzustand von 1—2 Tagen kann die Bildung der hyalinen Tropfen teilweise verhindert werden.

Experimental Studies of the Storage of Hyaline Droplet Protein of the Liver

Summary

After the injection of fluids containing albumin (solutions, serum, whole blood) into the spleen of rats in the amount of 100 ml/kilo., a high-grade storage of hyaline droplet protein develops in the liver. In contrast, only a very slight storage or none at all occurs when physiologic saline, dextran, or globulin solutions are administered. The hyaline droplets are intravitably stainable with Evans Blue and behave as serum albumin in neutral salt solutions. These facts permit no other interpretation than that the inclusion bodies consist essentially of serum albumin. The most important causative-pathogenic factors are the supply of sufficient serum albumin and the permeability disturbances produced by the increased pressure in the portal circulation. A further factor is a normal, that is, not increased colloidal osmotic pressure. With food privation for 1—2 days before the onset of the experiment, the formation of hyaline droplets may be partially prevented.

Literatur

- ALLEN, T. N., and P. D. ORAHOVATS: Kinetics of reaction between t-1824 and liver slice in mixtures of plasma albumin. Amer. J. Physiol. **164**, 123 (1951).
- ALTMANN, H. W.: Über Leberveränderungen bei allgemeinem Sauerstoffmangel nach Unterdruckexperimenten an Katzen. Frankfurt. Z. Path. **60**, 376 (1949).
- Allgemeine morphologische Pathologie des Cytoplasmas. Die Pathobiosen. In Handbuch der allgemeinen Pathologie, Bd. II, S. 419. Berlin-Göttingen-Heidelberg: Springer 1955.

- DONIACH, I., and K. WEINBREN: The development of inclusion bodies in the cells of the rat's liver after partial hepatectomy. *Brit. J. exp. Path.* **33**, 499 (1952).
- FREY-WISSLING, A.: Die submikroskopische Struktur des Cytoplasmas. In: *Protoplasmatalogia, 2A, II.* Wien: Springer 1955.
- GIBSON, J. G., and W. A. EVANS: Clinical studies of the blood volume. Clinical application of a method employing the azo dye „Evans Blue“ and the spectrophotometer. *J. clin. Invest.* **16**, 301 (1937).
- KETTLER, H. L.: Über die vacuolige Degeneration der Leberzellen. *Virchows Arch. path. Anat.* **315**, 587 (1948).
- LUNZENAUER, K.: Zur Frage der prognostischen Bedeutung hyaliner Körperchen in den Leberzellen bei der Lebercirrhose. *Z. ärztl. Fortbild.* **55**, 1106 (1961).
- Untersuchungen zur Genese der Mallory Bodies. *Habil.-Schr. Humboldt-Universität, Berlin*, 1961.
- MALLORY, F. B.: Cirrhosis of the liver. Five different types of lesions from which it may arise. *Bull. Johns Hopk. Hosp.* **22**, 69 (1911).
- The principles of pathologic histology. Philadelphia and London: W. B. Saunders Company 1923.
- Phosphorus and alcoholic cirrhosis. *Amer. J. Path.* **9**, 557 (1933).
- MILLER, F.: Orthologie und Pathologie der Zelle im elektronenmikroskopischen Bild. *Verh. Dtsch. Path. Ges.* 42. Tagg 1959.
- NORKIN, S. A., R. WEITZEL, D. CAMPAGNA-PINTO, R. A. McDONALD and G. K. MALLORY: „Alcoholic“ hyalin in human cirrhosis-histochemical studies. *Amer. J. Path.* **37**, 49 (1960).
- PAPPENHEIMER, A. M., and J. J. HAWTHORNE: Certain cytoplasmic inclusions of liver cells. *Amer. J. Path.* **12**, 625 (1936).
- PEARSE, A. G.: Histochemistry, theoretical and applied, S. 503. Boston: Little, Brown & Co. 1953.
- RAWSON, R. A.: The binding of T-1824 and structurally relates diazo dyes by the plasma proteins. *Amer. J. Physiol.* **138**, 708 (1943).
- ROQUÉ, A. L.: Chromotope aniline blue method of staining Mallory bodies of Laennec's cirrhosis. *Lab. Invest.* **2**, 15 (1953).
- SCHLICHT, I.: Experimentelle Untersuchungen über Lebernekrosen im absoluten Hungerzustand. *Virchows Arch. path. Anat.* **330**, 436 (1957).
- TROWELL, O. A.: The experimental production of watery vacuolation of the liver. *J. Physiol. (Lond.)* **105**, 268 (1946/47).
- ULRICH, H.: Organverfettungen bei Hunger und Sauerstoffmangel. *Frankfurt. Z. Path.* **52**, 80 (1938).
- WUHRMANN, F., u. C. WUNDERLY: Die Bluteiweißkörper des Menschen. Basel: Benno Schwabe & Co. 1952.

Dr. IRMGARD SCHLICHT, Pathologisches Institut der Freien Universität Berlin,
Berlin-Charlottenburg, Spandauer-Damm 130