

Aus dem Pathologischen Institut der Medizinischen Akademie Düsseldorf
(Direktor: Prof. Dr. H. MEESSEN)

Elektronenmikroskopische Untersuchungen über die Fettaufnahme und die Fettverarbeitung in der regenerierenden Leber der Maus

Von

ERNESTO G. BADE*

Mit 6 Textabbildungen

(Eingegangen am 29. Juli 1964)

Kurz nach der Hepatektomie kommt es zu einer erheblichen Verfettung der restlichen Leber [HARKNESS (1)], mit vorwiegender Erhöhung des Gehaltes an Neutralfetten [HARKNESS (2)]. Zwischen zwei und zehn Stunden nach der Operation erscheinen in den Venen und Sinusoiden Fetttröpfchen verschiedener Größe, die auf ein Überangebot von Fett an die Leberzellen hinweisen. Aus diesem Befund und dem zeitlichen Verlauf der Verfettung wurde geschlossen, daß auch die Verfettung der regenerierenden Leber nach Teilhepatektomie transportativer Natur ist (BADE). Die submikroskopische Untersuchung verschiedener Stadien der Regeneration der Leber nach Teilhepatektomie hat zahlreiche Befunde ergeben, die über den Verlauf dieser Verfettung weiteren Aufschluß geben können.

Material und Methoden

Es wurden insgesamt 12 männliche Cfw-Mäuse, mit einem Körpergewicht zwischen 20 und 25 g verwendet. Den Tieren wurden zwei Drittel ihrer Leber nach der Technik von BRUES, DRURY und BRUES entfernt. 2, 5 und 10 Std und ferner 30 und 42 Std nach der Operation wurden die Mäuse durch Dekapitation getötet. Nach Eröffnung der Bauchhöhle wurden kleine, bis 1 mm³ große Fragmente des dreieckigen rechten Leberlappens in gekühlter (+4° C) Paladelösung 2 Std lang fixiert. Nach Auswaschen in Puffer, Entwässerung in Aceton und Nachkontrastierung in Uranylacetat, wurden die Leberstückchen in Vestopal W eingebettet. Die mit dem Porter-Blum-Mikrotom angefertigten Schnitte wurden in den Elektronenmikroskopen EMU 3 C und EMU 3 G von RCA bei einer Strahlspannung von 50 kV untersucht.

Ergebnisse

In den Disse'schen Räumen der restlichen Lebern, die zwei, fünf und zehn Stunden nach der Teilhepatektomie untersucht wurden, erscheinen zahlreiche osmiophile Partikel unterschiedlicher Größe. Die Zahl dieser Partikel schwankt von Zelle zu Zelle. Zuerst liegen sie frei im Disse'schen Raum (Abb. 1) und können sich dabei inmitten einer mit der verwendeten Einbettung und Nachkontrastierung fibrillären oder strukturlosen, elektronendichten Substanz befinden, welche den Disse'schen Raum an einigen Stellen teilweise ausfüllt (Abb. 1). In anderen Schnitten dagegen liegen die Fettpartikel bereits zwischen den Mikrovilli. Zahl und Gestalt der Mikrovilli ändern sich von Zelle zu Zelle; Leberzellen, die durch Uferzellen abgedeckt sind, besitzen meistens längere und mehr Mikrovilli als Zellen, welche direkt mit dem Blutstrom in Kontakt stehen.

* Jefe de Sección, Instituto de Patología General y Experimental Mendoza, Argentina, zur Zeit Stipendiat der Alexander-von-Humboldt-Stiftung.

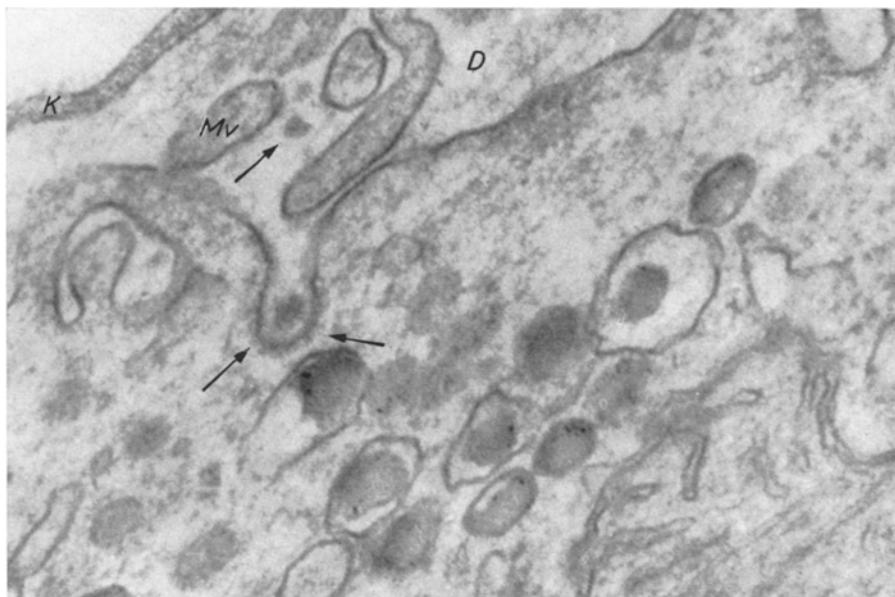


Abb. 1. Leberzelle einer Maus 5 Std nach der Hepatektomie. Im Disse'schen Raum (D) neben Fettpartikeln (Pfeil) Anschnitte von Mikrovilli (MV) und an den Ausläufern Kupfferscher Sternzellen (K) eine elektronendichte, teilweise feinfibrilläre Substanz (Reticulin?). Einbuchtung der Zelloberfläche mit strahlenartiger Verdichtung (Pfeile) des begrenzenden Grundplasmas. In der Einbuchtung ein Fettpartikel, das in einer elektronendichten, teilweise strahlenartig angeordneten Substanz liegt. Unter der Zelloberfläche mehrere Pinocytosebläschen mit Fettpartikeln. 91 000 ×

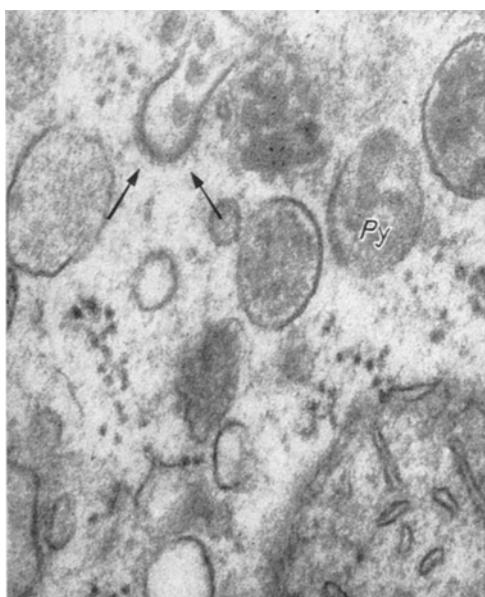


Abb. 2. Leberzelle einer Maus 5 Std nach der Hepatektomie. Mehrere Pinocytosebläschen (Py). Fettpartikel im Ergastoplasma. Die Membran der Bläschen und der Einbuchtungen ist deutlich dargestellt. Die Verdichtung des Grundplasmas an den Einbuchtungen besteht aus mikrotubulären Strukturen (Pfeile). 79 000 ×

Zwischen den Mikrovilli entstehen Einbuchtungen der Zelloberfläche, die einzelne oder mehrere Fettpartikel enthalten können (Abb. 1 und 2). In der Nähe der Einbuchtungen sind zahlreiche, von einer einfachen Membran begrenzte Partikel zu finden (Abb. 1). Ähnliche Bläschen erscheinen schon zwei Stunden nach der Operation auch in allen anderen Abschnitten der Leberzellen, sind aber zu dieser Zeit noch besonders häufig unmittelbar unter der Zelloberfläche. In späteren Stadien sind sie an dieser Stelle nur noch vereinzelt zu finden und dagegen häufiger in allen anderen Abschnitten der Zelle, bis inmitten der Glykogendepots anzutreffen (Abb. 5). Zwei und fünf Stunden nach der Hepatektomie sind auch bereits im Ergastoplasma (Abb. 3) und im glatten endoplasmatischen Reticulum Fettpartikel

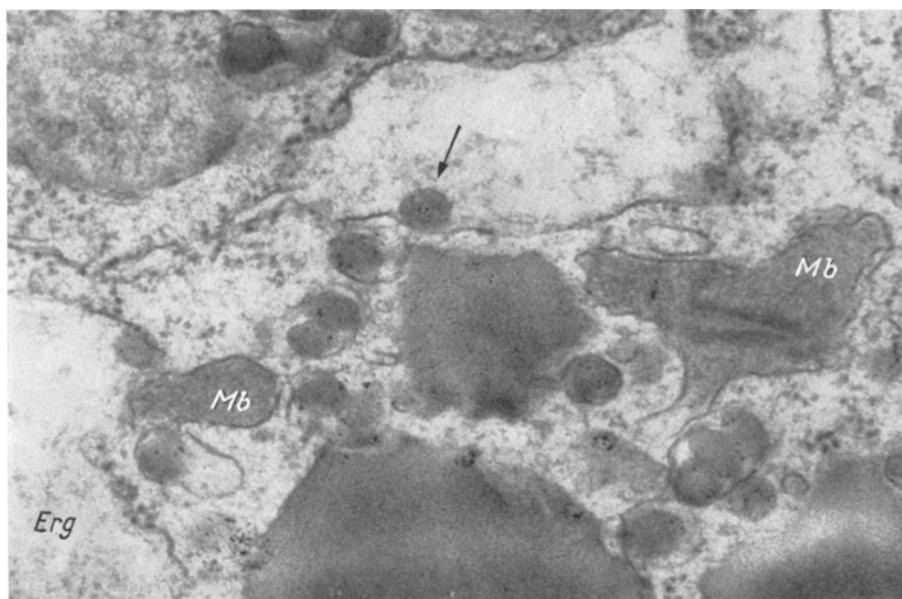


Abb. 3. Leberzelle einer Maus 5 Std nach der Hepatektomie. Fettpartikel in Pinocytosebläschen und in dem örtlichen erweiterten Ergastoplasma (*Erg*, Pfeil), das gleichzeitig eine fibrillär-granuläre Substanz enthält. Frei im Grundplasma liegen Fetttropfen. Daneben unregelmäßig konturierte Mikro-bodies (*Mb*), eins mit Innenstruktur. 59 000 ×



Abb. 4. Leberzelle einer Maus 5 Std nach der Hepatektomie. Von einer einfachen Membran umgebene Pinocytosebläschen mit Fettpartikeln. Ansammlung von Fettpartikeln im Golgi-Apparat (*G*). 79 000 ×

vorhanden (Abb. 3 und 4), die sich von denen in den Pinocytosebläschen enthaltenen nicht unterscheiden. Dagegen sind die Fettpartikel im Golgi-Apparat

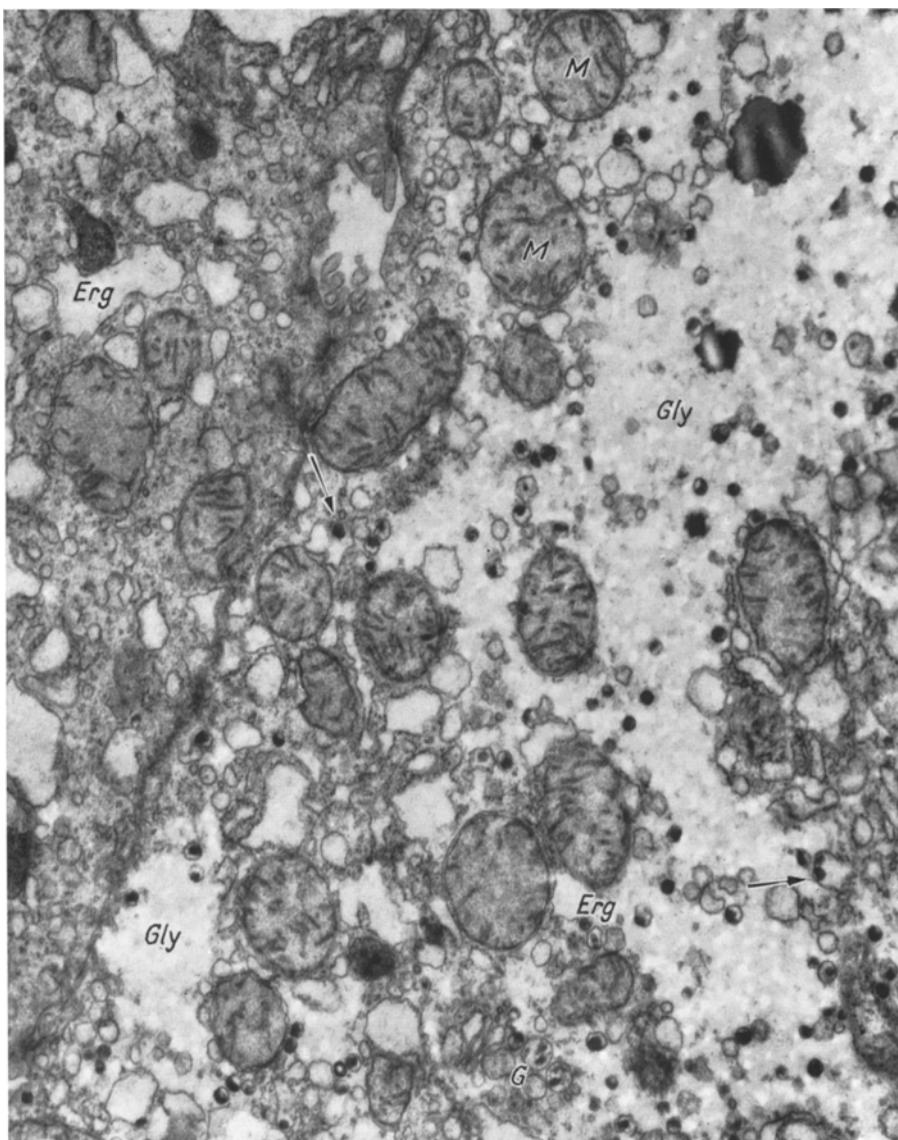


Abb. 5. Leberzelle einer Maus 42 Std nach der Hepatektomie. Zahlreiche Fettpartikel in Pinocytose- und Golgi-Bläschen (G) bis inmitten der Glykogenablagerungen (Gly). Fettpartikel auch im Ergastoplasm (Pfeil). Örtlich erweitertes Ergastoplasma (Erg), einige Fetttröpfchen, Mikrobody mit Innenstruktur und Mitochondrien (M), die teilweise von nur einer Membran umgeben sind. 17 000 ×

meist kleiner, von sehr unterschiedlicher Größe sowie auch sehr zahlreich (Abb. 4), können aber auch gelegentlich einzeln und unverändert sein.

Die Zellmembran und die Membran der Pinocytosebläschen lassen sich als einfache Membranen („unit membranes“: ROBERTSON 1959) (Abb. 2 und 4) darstellen. An einigen Stellen der Einbuchtungen der Zelloberfläche erscheinen die Membranen jedoch verdickt und etwas osmiophiler. Diese Einbuchtungen enthalten eine elektronendichte Substanz und auch öfters Fettpartikel. Zwischen diesem Inhalt und der Membran erscheinen strahlenartig angeordnete, osmiophile

filamentartige Strukturen (Abb. 1). Das Grundplasma dieser Einbuchtungen ist unmittelbar unter der Membran verdichtet (Abb. 1 und 2). Bei höherer Auflösung erweist sich die elektronendichte Schicht des Grundplasmas als eine Reihe neben-einander liegender, radiär angeordneter Mikrotubuli (Abb. 2). Die in derartig veränderten Einbuchtungen enthaltenen Fettpartikel sind häufig kleiner und unregelmäßiger konturiert als die in den unveränderten Einbuchtungen und Pino-cytosebläschen (Abb. 1).

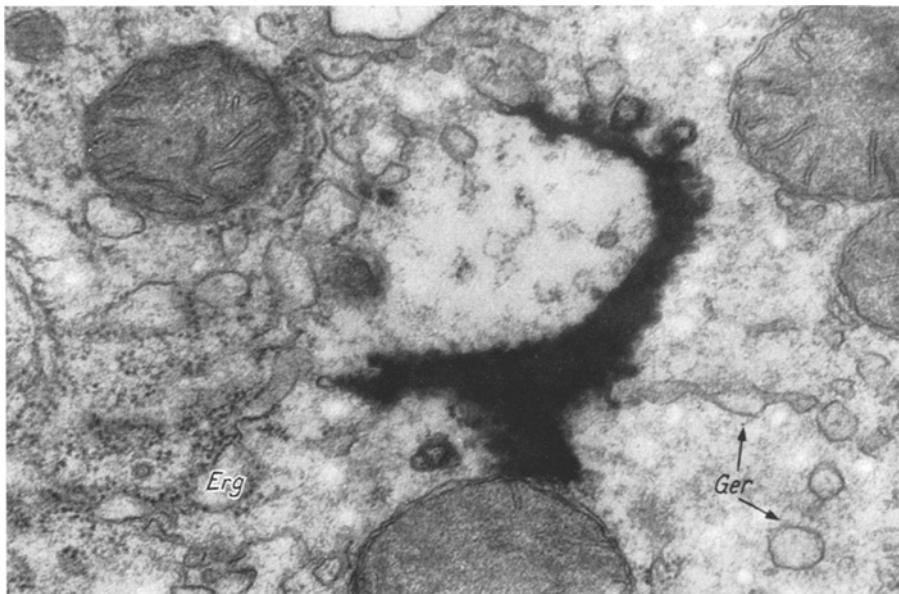


Abb. 6. Leberzellen einer Maus 30 Std nach der Hepatektomie. Verzerrt aussehender Fetttropfen und aufgelockertes Grundplasma. Zwischen den normalen, etwas dichten Mitochondrien und den Anschnitten des Ergastoplasmas (*Erg*) und des glatten endoplasmatischen Reticulums (*Ger*) zahlreiche freie Ribosomen. 42 000 \times

Schon 5 Std nach der Hepatektomie liegen ein Teil der Fettpartikel anscheinend frei im Grundplasma, neben anderen, die noch vollständig oder teilweise von einer deutlich dargestellten Membran umgeben sind. In unmittelbarer Nähe liegen auch frei im Grundplasma unregelmäßig konturierte Fetttropfen. An der Peripherie dieser Fetttropfen sind zum Teil die Konturen von Fettpartikeln deutlich zu erkennen. In späteren Stadien und in normalen Lebern zeigen die Fetttropfen dagegen meist regelmäßige Umrisse.

30 Std. nach der Hepatektomie ist ein Teil der Fetttropfen sehr verändert. Sie erscheinen als verzerrte Gebilde inmitten eines aufgelockerten Grundplasmas (Abb. 6). In diesen Leberzellen ist auch die Zahl der Fetttropfen geringer als 10 Std. nach der Operation. Das Grundplasma zeigt zu dieser Zeit schon wieder etwas Glykogen (Abb. 6).

Diskussion

Die Befunde zeigen, daß den Parenchymzellen der regenerierenden Leber das Fett in Form von Partikeln angeboten wird (vgl. Abb. 1, 2 und 3). Die Herkunft dieser Partikel konnten wir aber nicht einwandfrei feststellen, da die Tiere während der gesamten Versuchszeit Nahrung ad libitum zur Verfügung hatten. Wir können also nicht beantworten, ob diese transportative Verfettung nur durch

die Aufnahme mobilisierter Depotfette oder auch zum Teil durch aus dem Darmtrakt resorbierte Nahrungsfette zustande kam.

Der Verlauf der Fettaufnahme nach peroraler Verabreichung von Fett emulsionen (ASHWORTH u. Mitarb., CAESAR) u. auch bei normalen und Hungertieren (COSSEL; DAVID) ist schon früher untersucht worden. Unter all diesen Situationen wurden Fettpartikel im Disse'schen Raum und in den Leberzellen gefunden. Nach den Befunden von PALAY und KARLIN sowie ASHWORTH u. Mitarb. erreichen diese Fettpartikel die Leber, nachdem sie von den Darmepithelzellen aufgenommen, an deren basalen Pol ausgeschleust wurden und danach in die Lymph- und Blutgefäße gelangten. Auch bei Ratten, die nach 14ständigem Hunger mit Phosphor injiziert wurden (JEZEQUEL), bei Ratten nach Gaben von DMNA (EMMELOT und BENEDETTI), sowie bei Mäusen, die 12 Std. lang gehungert hatten (BADE und SCHUMACHER) sind Fettpartikel in den Leberzellen und im Disse'schen Raum gesehen worden. Bei den Mäusen handelt es sich mit einiger Sicherheit um mobilisierte Depotfette, denn nach WILSON ist der Darmtrakt der Maus bereits 8 Std. nach der letzten Nahrungsaufnahme entleert. In all diesen Fällen wird das Fett den Leberzellen also auch in Form von Partikeln angeboten, so daß wir annehmen möchten, daß die Verfettung der Leber unter den verschiedensten Bedingungen rein transportativer Natur ist.

Auch in der regenerierenden Leber werden die Fettpartikel durch Pinocytose in die Parenchymzellen aufgenommen. Wir konnten dabei dieselben Stadien verfolgen wie sie PALAY und KARLIN an Darmepithelzellen nach Fettgaben beobachteten. So kommt es auch im Cytoplasma der Parenchymzellen der regenerierenden Leber zur Ansammlung von mit Fett beladener Pinocytosebläschen. Diese Pinocytosebläschen oder die Einbuchtungen der Zelloberfläche treten dann mit dem endoplasmatischen Reticulum in Verbindung, so daß die Fettpartikel in sämtlichen Abschnitten desselben erscheinen können. Im Ergastoplasma erscheinen die Fettpartikel aber nur selten. Dies spricht für eine geringere Beteiligung des endoplasmatischen Reticulum bei Fetttransport und -verarbeitung. Es ist aber auch möglich, daß die glattwandigen Cisternen durch den Verlust der Ribosomen entstanden sind (EMMELOT und BENEDETTI). Insbesondere durch diesen Vorgang möchten wir erklären, warum nur selten und dann unter relativ normalen Bedingungen Fettpartikel im Ergastoplasma beobachtet wurden (CAESAR).

Eine Anhäufung osmiophiler Partikel im Golgi-Apparat ist dagegen schon 1958 von JEZEQUEL in Leberzellen von Ratten nach Phosphorvergiftung beschrieben worden. Denselben Befund erhob CAESAR nach Gabe von Fett emulsionen. Die Bedeutung dieser Anhäufung ist nicht klar, denn sie ist auch in normalen Lebern nicht selten und meist bei verschiedenen Zellen unterschiedlich ausgeprägt. Auch in der regenerierenden Leber können einige Zellen mit Fett gefüllte Golgi-Bläschen aufweisen, während die der daneben liegenden Zellen frei von Fettpartikeln sind, oder nur einzelne, größere Partikel enthalten. Wenn also diese Ansammlung der Fettpartikel im Golgi-Apparat als Folge eines verlangsamten Transportes (PALAY und KARLIN) oder Ausdruck einer Weiterverarbeitung (BADE und SCHUMACHER) angesehen werden kann, so muß doch darauf hingewiesen werden, daß die Beteiligung der verschiedenen Leberzellen an dieser Funktion sehr unterschiedlich ist. Die Ursache ist in den topographischen Unterschieden der Aktivität der Parenchymzellen eines Läppchens und dem zeitge-

bundenen Ablauf der Zellaktivität zu sehen. Dem oben erwähnten Befund nach ist der Golgi-Apparat anscheinend der letzte Abschnitt des endoplasmatischen Reticulums, den die Fettpartikel erreichen und verlassen. Mit den vorliegenden, rein morphologischen Befunden kann aber nicht beantwortet werden, welchem Schicksal die Fettpartikel dann unterliegen, d.h. ob das Fett, von der Zelle verändert, wieder in den extracellulären Raum abgegeben, oder auch in Zellstrukturen eingebaut wird.

Schon 5 Std. nach der Hepatektomie erscheinen in den untersuchten Leberzellen größere, frei im Grundplasma liegende Fetttropfen. Sie sind meistens von zahlreichen Fettpartikeln umgeben, die noch vollständig oder teilweise von einer Membran umgeben sind. Dieser räumliche Zusammenhang und die Umrisse der Fetttropfen deuten auf ihre Entstehung durch den Zusammenschluß mehrerer Partikel hin. Die Membran der Pinocytosebläschen ist meistens noch vor dem Zusammenschluß zumindest teilweise darzustellen, wird also anscheinend erst nach Bildung der Fetttropfen vollständig abgebaut. Es entsteht dadurch die Frage, ob die an die Membran gebundenen Enzyme in den Fetttropfen erhalten bleiben und am späteren Abbau der Fetttropfen teilnehmen.

Die Membran der Pinocytosebläschen zeigt dieselbe Struktur wie die Zellmembran und die Membranen des endoplasmatischen Reticulums. Feinere Unterschiede, wie sie von SJÖSTRAND 1963 festgestellt wurden, haben wir mit der erreichten Auflösung nicht nachweisen können. Eine Ausnahme zu dieser Feststellung sind die beschriebenen Einbuchtungen mit Verdichtung des naheliegenden Grundplasmas. Diese Veränderungen an den Membranen, ihre Zusammenhänge mit dem Inhalt der Einbuchtungen und den mikrotubulären Strukturen an der Innenseite der Einbuchtung, möchten wir als Beweis dafür anbringen, daß an diesen Stellen rege Absorptionsphänomene und sehr wahrscheinlich auch eine Neubildung von Strukturen stattfindet. Die beschriebenen Veränderungen wurden auch von PORTER, von NOVIKOFF sowie auch von ROUILLER und JEZEQUEL (s. ROUILLER und JEZEQUEL) beobachtet. Von PORTER wurden diese Strukturen mit der Absorption von injiziertem Ferritin in Zusammenhang gebracht, und kürzlich bei der Absorption von Dotterproteiden eingehend beschrieben (ROTH und PORTER). Da SJÖSTRAND schon 1963 über andere Membranveränderungen an den Darmepithelzellen während der Absorption berichtete, ist der Schluß möglich, daß Absorptionsvorgänge nicht nur durch Pinocytosephänomene, sondern auch durch feinstrukturelle Veränderungen der Zellmembran erfaßt werden können.

Zusammenfassung

In den Diszeschen Räumen der regenerierenden Leber der Maus erscheinen zwischen 2 und 5 Std nach Teilhepatektomie zahlreiche Fettpartikel, die durch Pinocytose in die Parenchymzellen aufgenommen werden. Sämtliche Abschnitte des endoplasmatischen Reticulums nehmen an der Aufnahme und an dem intrazellulären Transport des Fettes teil. Wenn mehrere Fettpartikel zusammenfließen, geht die umgebende Membran verloren; die so entstandenen Fetttropfen liegen im Grundplasma und werden in späteren Stadien verarbeitet. Die Einbuchtungen der Zelloberfläche gehen mit strukturellen Veränderungen der Membran und des Grundplasmas einher, die als Absorptionsphänomene gedeutet werden.

Electron-Microscopic Studies of the Uptake and Elaboration of Fat in the Regenerating Liver of the Mouse

Summary

In the spaces of Disse of the regenerating liver of the mouse between 2—5 hours after partial hepatectomy numerous fat particles appear, which by means of pinocytosis are taken up into the parenchymal cells. All portions of the endoplasmic reticulum take part in the intracellular transport of the fat. When several fat particles coalesce the surrounding membrane becomes lost; the fat droplets thus formed are located in the cytoplasmic ground substance and are elaborated by the cell in later stages. The invaginations of the cell surface are accompanied by structural changes of the membrane and the cytoplasmic ground substance. These changes are interpreted as absorption phenomena.

Literatur

- ASHWORTH, C.T., U.A. STEMMBRIDGE, and E. SANDERS: Lipid absorption, transport and hepatic assimilation studied with electron microscopy. *Amer. J. Physiol.* **198**, 1326—1328 (1960).
- BADE, E.G.: Beitrag über die Frühstadien der Regeneration der Leber nach Teilhepatektomie und die Ursache des kompensatorischen Wachstums. *Virchows Arch. path. Anat.* **337**, 503—514 (1964).
- , u. A. SCHUMACHER: Veränderungen der submikroskopischen Struktur der Leberzellen nach temporärer Ischämie. *Frankfurt. Z. Path.* **74**, 29—45 (1964).
- CAESAR, R.: Elektronenmikroskopischer Nachweis von Fettteilchen im Disse'schen Raum. *Z. Zellforsch.* **54**, 793—802 (1961).
- COSSEL, L.: Über den submikroskopischen Zusammenhang der interzellulären Räume und Sinusoide in der Leber. *Z. Zellforsch.* **58**, 76—93 (1962).
- DAVID, H.: Die Regeneration der Leber nach absolutem Hunger. *Z. ges. inn. Med.* **16**, 393—406 (1961).
- EMMELLOT, P., and E.L. BENEDETTI: Changes in the fine structure of rat liver cells brought about by dimethylnitrosamine. *J. biophys. biochem. Cytol.* **7**, 393—395 (1960).
- HARKNESS, R.D.: (1) Changes in the liver of the rat after partial hepatectomy. *J. Physiol. (Lond.)* **117**, 267—277 (1952).
— (2) Regeneration of liver. *Brit. med. Bull.* **13**, 87—93 (1957).
- JÉZÉQUEL, A.M.: Les effets de l'intoxication aigue au phosphore sur le foie du rat. *Ann. Anat. path.* **3**, 512—537 (1958).
- PALAY, S.L., and S.J. KARLIN: An electron microscopic study of the intestinal villus. II. The pathway of fat absorption. *J. biophys. biochem. Cytol.* **5**, 373—384 (1959).
- PORTER, K.R.: The interpretation of ultrastructure of tumors. *U.I.C.C. Cancer Conference* Amsterdam 1963.
- ROBERTSON, J.D.: The ultrastructure of cell membranes and their derivatives. In: *The structure and function of subcellular components* (E.M. CROOK, ed.). Cambridge: Cambridge University Press 1959.
- ROTH, T.F., and K.P. PORTER: Yolk protein uptake in the oocyte of the mosquito *Aedes Aegypti*. *L. J. Cell Biol.* **20**, 313—332 (1964).
- ROUILLER, C., and A.M. JÉZÉQUEL: Electron microscopy of the liver. In: *The liver* (CH. ROUILLER, ed.). New York: Academic Press 1963.
- SJÖSTRAND, F.S.: The ultrastructure of the plasma membrane of columnar epithelium cells of the mouse intestine. *J. Ultrastruct. Res.* **8**, 517—541 (1963).
- WILSON, J.W.: Hepatic structure in relation to function. In: *Liver function* (R.W. BRAUER, ed.). Washington: Amer. Inst. Biol. Sci. 1958.