

Aus dem Pathologischen Institut der Universität zu Köln (Direktor: Prof. Dr. N. SCHÜMMEL-FEDER) und dem Department of Biology der Brown University in Providence, R. I., USA (Chairman: Prof. H. CHASE, PH. D.)

## Ultrastrukturelle Leberveränderungen bei direkter Einwirkung von Tetrachlorkohlenstoff in vivo und in vitro \*

Von

G. HÜBNER

Mit 7 Textabbildungen

(Eingegangen am 21. November 1964)

Obwohl eine fast unübersehbare Fülle von Arbeiten über die leberschädigende Wirkung des Tetrachlorkohlenstoffs vorliegt (Lit. bei ROUILLER), ist der Wirkungsmechanismus dieser Art von Lebervergiftung nach wie vor nicht geklärt.

Bei der üblichen subcutanen oder enteralen Gabe von Tetrachlorkohlenstoff kommt es zu einer läppchenzentralen oder intermediären Leberschädigung. Die hierbei auftretenden ultrastrukturellen Veränderungen wurden zuerst von OBERLING und ROUILLER beschrieben und später von zahlreichen anderen Untersuchern bestätigt. Frühveränderungen der Feinstruktur bei Tetrachlorkohlenstoffvergiftung der Leber beschrieb kürzlich REYNOLDS. Hier-nach traten die ersten Veränderungen etwa 1 Std nach Gabe von Tetrachlorkohlenstoff auf: Eine Dilatation der Zisternen des endoplasmatischen Reticulum geht mit einer Desorganisation des Ergastoplasma einher. Dabei findet sich eine Vermehrung von glattem endoplasmatischem Reticulum, bei gleichzeitigem Glykogenschwund und einer Leberzellverfettung. Die Mitochondrien schwellen an, bisweilen erscheinen sie echt vergrößert. Später können sie bei fortschreitender Nekrobiose der Zelle unter gelegentlicher Kalkeinlagerung zugrunde gehen. Da die Lokalisation der geschädigten Leberbezirke derjenigen gleicht, die bei einer Hypoxydase der Leber zu beobachten ist, wurden die Leberveränderungen nach Tetrachlorkohlenstoff als hypoxydotisch bedingt angesehen (GLYNN und HIMSWORTH). REYNOLDS postulierte auf Grund seiner elektronenmikroskopischen Befunde eine direkte Einwirkung des Tetrachlorkohlenstoffes auf die Membransysteme der Zelle. Ein derartiger direkter Schädigungsmechanismus war schon auf Grund von lichtmikroskopischen Untersuchungen diskutiert worden, insbesondere von den Autoren, die eine Tetrachlorkohlenstoffvergiftung der Leber durch intralienale oder intraportale Injektion erzeugt hatten (CAMERON u. Mitarb., MYREN, ATERMAN, BENEKE und SIMON, ROSCHLAU). Bei intralienaler (oder intraportaler) Tetrachlorkohlenstoffgabe kommt es nämlich zu einer innerhalb weniger Sekunden eintretenden Leberschädigung (ROSCHLAU); hierbei ist im Gegensatz zur enteralen Tetrachlorkohlenstoffgabe die Läppchenperipherie der Leber zuerst geschädigt. Ferment-histochemische Untersuchungen haben entsprechende funktionelle Unterschiede herausgestellt: Während bei enteraler Applikation von Tetrachlorkohlenstoff beispielsweise mitochondriale Fermente erst nach vielen Stunden beeinflußt werden (LEDUC und WILSON, REYNOLDS), kann eine Verminderung der Aktivität dieser Fermente bei intralienaler Tetrachlorkohlenstoffgabe sehr viel eher beobachtet werden (BENEKE und SIMON).

Da uns die von REYNOLDS erhobenen Befunde an der Ultrastruktur der Leber nach Tetrachlorkohlenstoffvergiftung für eine direkte Tetrachlorkohlenstoffwirkung auf die Membranstrukturen der Leberzellen nicht beweisend

\* Auszugsweise vorgetragen auf der Herbsttagung der Nord- und Westdeutschen Pathologen in Aachen 17.—18. 10. 64.

Mit freundlicher Unterstützung des US Public Health Service (Grant Nr. 5 T1 CA 5007—07) und der American Cancer Society Inc.

erschienen, haben wir den Einfluß von Tetrachlorkohlenstoff auf die Membransysteme der Leberzellen bei intralientaler Injektion untersucht, und außerdem das Verhalten von Leber- und Nierenzellen gegenüber unverdünntem Tetrachlorkohlenstoff *in vitro* geprüft.

### Untersuchungsgut und Methodik

1. Weiße BUB-Mäuse von 30 g Gewicht erhielten in leichter Äthernarkose jeweils 0,02 cm<sup>3</sup> reinen unverdünnten Tetrachlorkohlenstoff in die Milz injiziert. Lebergewebe wurde 20 sec 1, 2 und 5 min nach der Injektion entnommen und entweder in 6,25 % Glutaraldehydlösung nach der Vorschrift von SABATINI u. Mitarb. oder in 2 % gepufferter Osmiumsäurelösung für 2 Std fixiert. Das glutaraldehydfixierte Gewebe wurde anschließend an die Fixierung für 18 Std in gepufferter Rohrzuckerlösung aufbewahrt. Die Einbettung der Gewebsschnitte erfolgte in Epon nach vorhergehender Entwässerung in Aceton und Weglassen eines Propylenzwischenbades. Die Polymerisierung der Blöckchen erfolgte bei 60° C innerhalb von 24 Std. Ultradünne Schnitte wurden mit einem Ultramikrotom nach PORTER-BLUM hergestellt, auf Kupfernetze montiert und nach Kontrastierung mit Blei nach KARNOVSKY direkt in einem Siemens Elmiskop-I-Elektronenmikroskop untersucht.

2. Frisch gewonnenes Leber- und Nierengewebe von etwa 30 g schweren BUB-Mäusen wurde in Stückchen von 1 mm Kantenlänge zerteilt und für 5–10 min in unverdünnten reinen Tetrachlorkohlenstoff eingelegt. Die Gewebstückchen wurden anschließend wie unter 1. angegeben fixiert und elektronenmikroskopisch untersucht.

Für die lichtmikroskopische Untersuchung wurde ein Teil des nach 1. und 2. in Glutaraldehydlösung fixierten Gewebes abgezweigt, und nach zweistündiger Fixierung in Paraffin eingebettet. Hieraus resultierende 5  $\mu$  dicke Gewebsschnitte wurden den üblichen lichtmikroskopischen Färbemethoden unterzogen und untersucht.

*Kontrollen.* Kontrollgewebe wurde bei 1. kurz vor der Injektion aus der Leber der Tiere entnommen. Bei 2. wurde Leber- und Nierengewebe vor dem Einlegen in Tetrachlorkohlenstoff abgezweigt. Diese Gewebsschnitte wurden ebenso wie Leber- und Nierengewebe unbehandelter Tiere in der oben beschriebenen Weise zur licht- und elektronenmikroskopischen Untersuchung herangezogen.

### Befunde

1. **Befunde an der Mäuseleber nach intralientaler Injektion von Tetrachlorkohlenstoff.** Bereits wenige Sekunden nach der Injektion war makroskopisch auf der Leberoberfläche das Auftreten blaß-grauer, stechnadelspitzgroßer Fleckchen zu beobachten, die bald zu stechnadelkopfgroßen Flecken zusammenflossen. Lichtmikroskopisch war außer einer gelegentlich zu findenden Blutleere in der Läppchenperipherie kein wesentlicher pathologischer Befund zu erheben. Die elektronenmikroskopische Untersuchung hingegen zeigte an der Ultrastruktur der Leberzellen hochgradige Veränderungen. Bereits 20 sec nach der Injektion traten im Grundplasma läppchenperipher gelegener Leberparenchymzellen osmiophile Bezirke auf, die bei stärkerer Vergrößerung sich als feine membranöse oder tubuläre Bildungen erwiesen. Sie hatten bisweilen direkte Verbindung mit Membranen des Ergastoplasma oder schienen aus kleinen intracytoplasmatischen Lipidtropfen hervorzuwachsen (Abb. 1). Die Mitochondrien der betroffenen Zellen zeigten zum gleichen Zeitpunkt eine mäßige Schwellung. Ihre Außenmembranen erschienen an umschriebener Stelle aufgesplittert und auch hier fanden sich membranartige Neubildungen, die bei geeigneter Schnittführung als Tubuli in Erscheinung traten (Abb. 2 und 3). Bei Beendigung des Versuches, also 5 min nach der Injektion, waren die Mitochondrien stärker geschwollen; die beschriebenen tubulären Strukturen waren jetzt zu einer osmio-

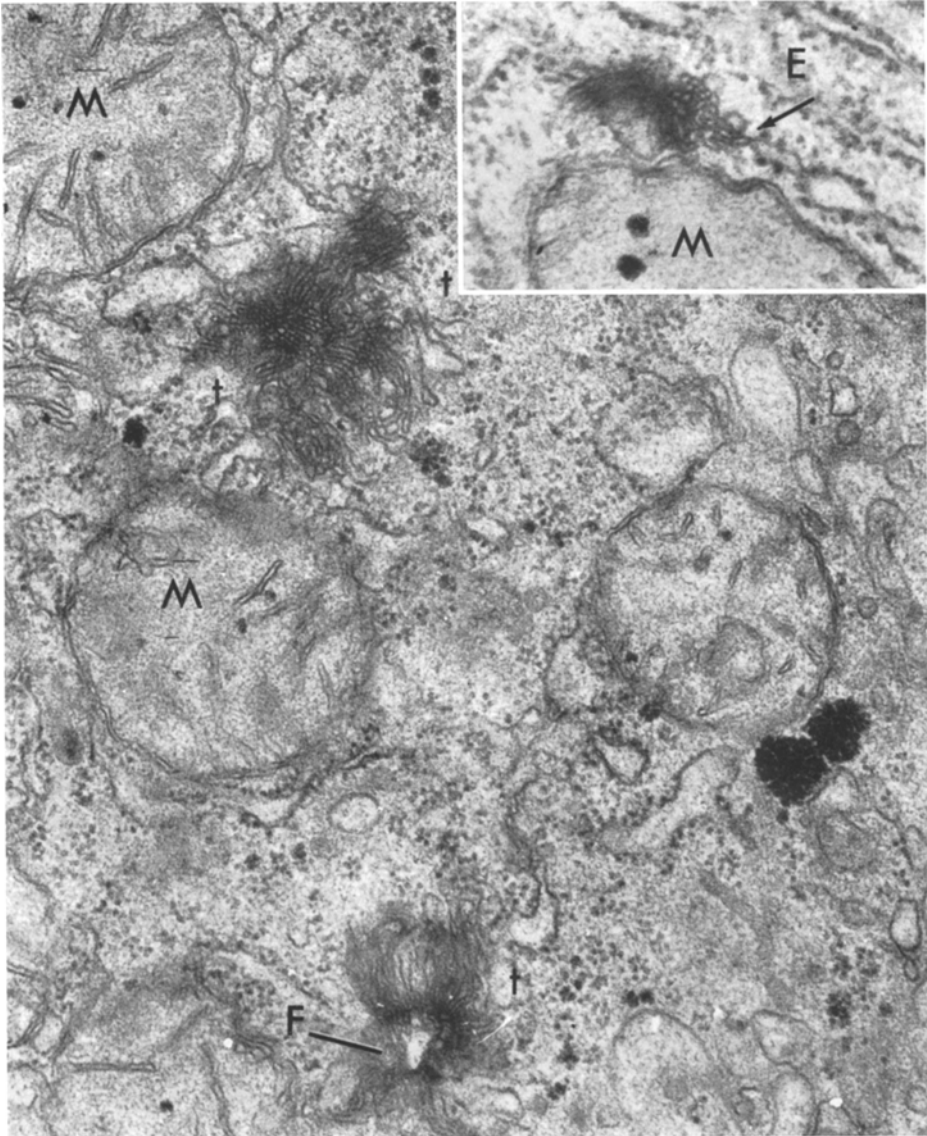


Abb. 1. Leber, Maus. 1 min nach intralialer Injektion von 0,02 cm<sup>3</sup> Tetrachlorkohlenstoff: Der Ausschnitt aus einer Leberzelle zeigt neben Mitochondrien *M* im Cytoplasma mehrere Ansammlungen von zarten Membranen und Tubuli *t*, die an einer Stelle offensichtlich von einem Lipidtropfen *F* ausgehen. Arch.-Nr. 6056/64 (P). Vergr. El.-optisch 10000 $\times$ . Endvergr. 36000 $\times$ . — Ausschnitt rechts oben: Leber, Maus. 20 sec nach intralialer Injektion von 0,02 cm<sup>3</sup> Tetrachlorkohlenstoff. Neben einem Mitochondrium *M* mehrere Ergastoplasmamembranen *E*, die an einer Stelle ( $\rightarrow$ ) im Zusammenhang stehen mit zarten membranös-tubulären Strukturen. Arch.-Nr. 6691/63 (P). Vergr.: El.-optisch 10000 $\times$ . Endvergr. 63000 $\times$

philen, nicht mehr weiter auflösbaren Masse zusammengefließen. Im Cytoplasma lagen unscharf begrenzte, umschriebene osmiophile Verdichtungen, die ebenfalls durch das Zusammenfließen der oben beschriebenen membranösen und tubulären Neubildungen entstanden waren. Das Ergastoplasma hatte sich in rundliche Vacuolen umgewandelt, die noch zum Teil einen Ribosomenbesatz aufweisen.

Die Kernmembran war stellenweise abgehoben. Relativ gut erhalten erschien in den Leberparenchymzellen das Glykogen, das auch am Ende des Versuchs in der bekannten rosettenartigen Häufchenform vorlag (Abb. 4). Die Leberzellen hatten in diesem Stadium ihren Besatz an Mikrovilli sowohl im Bereich der Gallenkapillaren wie auch an der sinusoidalen Begrenzung verloren. Im Dissesehen

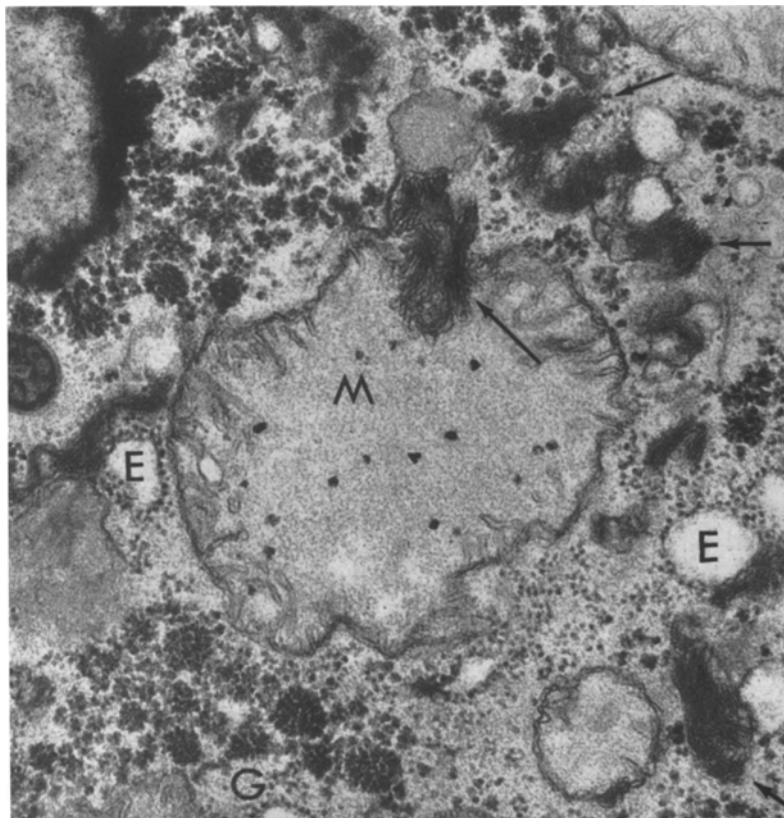


Abb. 2. Leber, Maus. 20 sec nach intraliesaler Injektion von 0,02 cm<sup>3</sup> Tetrachlorkohlenstoff. Der Ausschnitt aus einer Leberzelle zeigt im Cytoplasma ein geschwollenes Mitochondrium *M*, an dessen Außenmembranen an einer Stelle (→) zahlreiche Tubuli entstanden sind. Im Cytoplasma mehrere strahlendichte Ansammlungen analoger Tubuli (→) sowie abgerundete Ergastoplasmazisternen *E* und unverändertes Glykogen *G*.

Arch.-Nr. 5614/63 (P). Vergr.: El.-optisch 10000 ×. Endvergr. 36000 ×

Raum wie im Sinusoid selbst fand sich feingranuläres Material. Die genannten Veränderungen beschränkten sich nicht auf die Leberparenchymzellen. Sie waren in gleicher Weise auch an den Endothel- und Kupfferschen Sternzellen zu erkennen (Abb. 5). Bei stärkerer Vergrößerung konnte man an den neugebildeten Tubuli besonders im Bereich der Mitochondrien eine auffallend deutliche Dreischichtung erkennen. Diese Dreischichtung war bei dem Kontrollgewebe nur selten, und dann auch nur angedeutet zu erkennen (Abb. 7a).

**2. Befunde an Leber- und Nierengewebe bei Behandlung mit Tetrachlorkohlenstoff in vitro.** Nach Einlegen für 5—10 min in unverdünnten Tetrachlorkohlenstoff fanden sich an den oberflächlich im Gewebsblock liegenden Leberzellen Veränderungen, die den eben beschriebenen weitgehend glichen: Auch

hier sah man das Auftreten wirbelartiger tubulärer und membranöser Gebilde sowohl an den Mitochondrien als auch im Cytoplasma (Abb. 6a). Die Mitochondrien waren auch hier geschwollen und zeigten in fortgeschrittenen Stadien im Bereich ihrer Außenmembran herdförmig kappenartig aufsitzendes Material. Analoge Veränderungen konnten auch am untersuchten Nierenrindengewebe

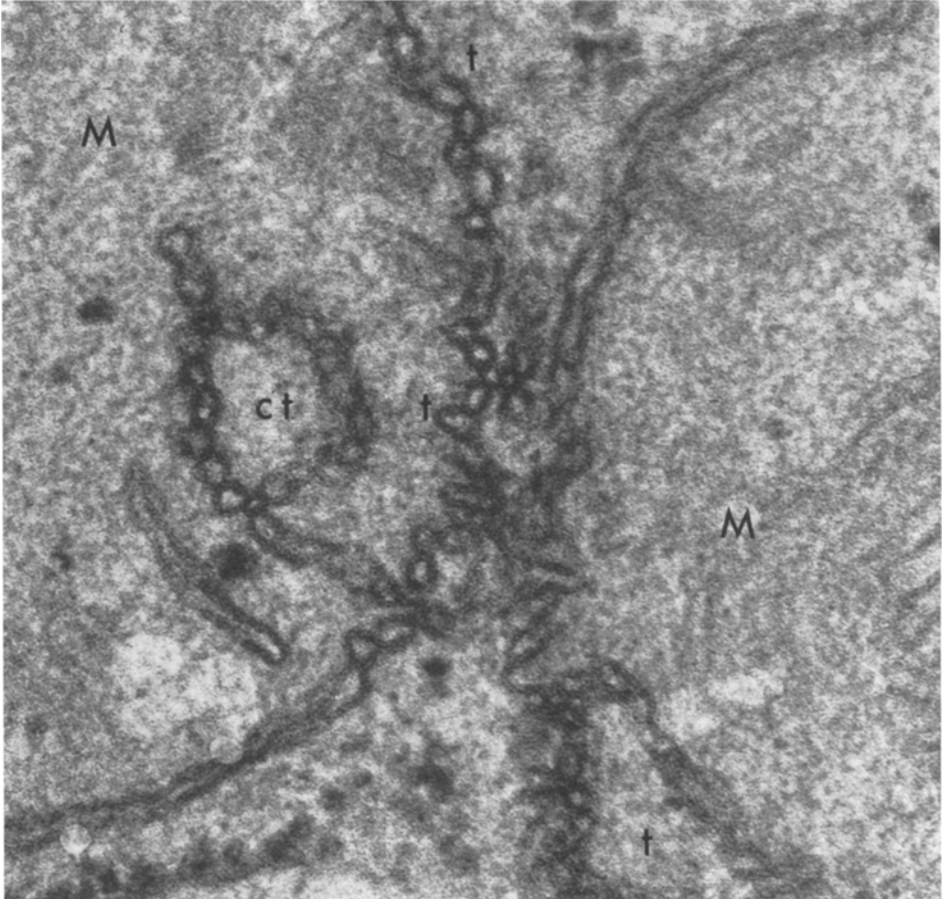


Abb. 3. Leber, Maus. 1 min nach intralienaler Injektion von 0,02 cm<sup>3</sup> Tetrachlorkohlenstoff. In einer Leberzelle zeigen zwei dicht nebeneinanderliegende Mitochondrien *M* im Bereich ihrer Außenmembranen tubuläre Umwandlungen *t*, die im links liegenden Mitochondrium im Bereich der Cristae (*ct*) erkennbar sind.

Arch.-Nr. 4895/63 (P). Vergr.: El.-optisch 40 000 ×. Endvergr. 143 000 ×

festgestellt werden, wie die Abb. 6b zeigt. Wie bereits bei den vorhergehenden Versuchen erwähnt, war auch bei diesen in vitro-Versuchen an den veränderten Membranen und Cristae der Mitochondrien eine auffallende deutliche Dreischichtung zu erkennen (Abb. 7b).

### Diskussion

Unsere Untersuchungen zeigen, daß bei der angewandten Versuchsanordnung, nämlich der intralienalen Injektion, eine direkte Tetrachlorkohlenstoffwirkung auf die Membransysteme der Leberzellen nachweisbar ist. Sie besteht vor allem

im Auftreten von membranösen und tubulären Gebilden, die häufig im Zusammenhang mit vorgebildeten Strukturen entsteht. Da gleichartige Veränderungen auch bei Behandlung von Gewebe mit Tetrachlorkohlenstoff *in vitro* hervorgerufen werden, sind sie als direkte Tetrachlorkohlenstoffwirkung zu

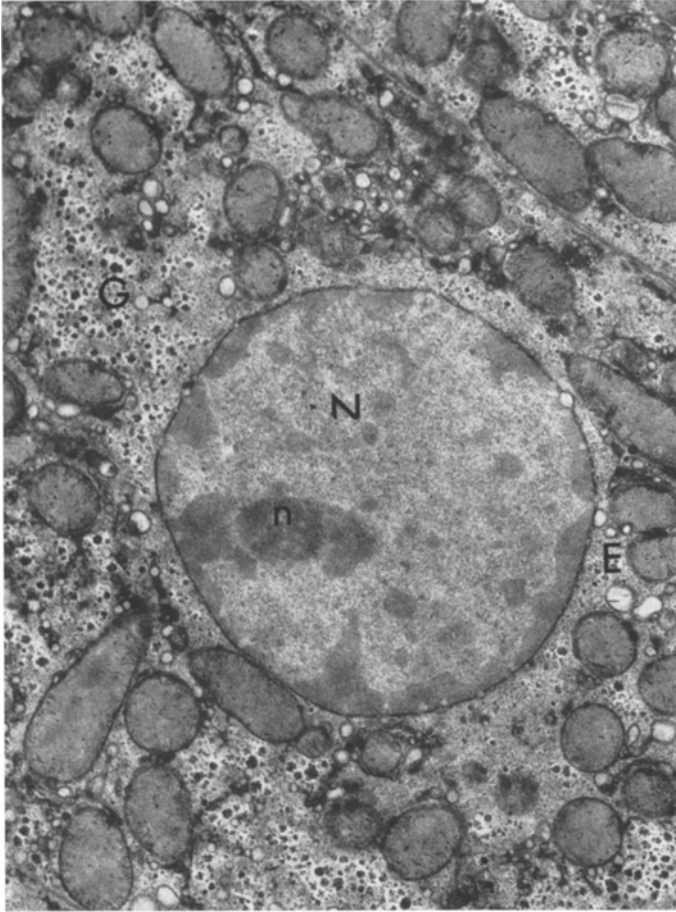


Abb. 4. Leber, Maus. 5 min nach intraperitonealer Injektion von 0,02 cm<sup>3</sup> Tetrachlorkohlenstoff in die Milz: Die Übersichtsaufnahme zeigt Ausschnitte von zwei Leberzellen, im Zellkern *N* deutliche Abgrenzung von Chromatinschollen und des Nucleolus *n* und stellenweise Abheben der Kernmembran. Die Zellen enthalten zahlreiche geschwollene Mitochondrien, an deren Außenmembranen kappenförmig osmiophiles Material aufsitzt. Dazwischen liegt Glykogen *G* sowie abgerundete Ergastoplasmazisternen (z. B. bei *E*). Arch.-Nr. 4742/63 (P).

Vergr.: El.-optisch 1500 $\times$ . Endvergr. 5500 $\times$

betrachten. Der Entstehungsmechanismus der Veränderungen ist nicht völlig klar. Einen wichtigen Hinweis zur Entstehung der beschriebenen membranösen und tubulären Neubildungen sehen wir darin, daß die Membranen der Mitochondrien bei unseren Versuchen *in vivo* wie *in vitro* eine sehr deutliche Dreischichtung erkennen ließen. Eine derartig auffällige Dreischichtung als Ausdruck des submikroskopischen Aufbaus einer „unit-membrane“ (ROBERTSON) haben wir bei den Kontrollen nicht feststellen können. Wenn auch der Aufbau der Mitochondrienmembran durch die neueren Untersuchungen von SJÖSTRAND und FERNÁNDEZ-MORÁN u. Mitarb. noch nicht endgültig geklärt zu sein scheint,

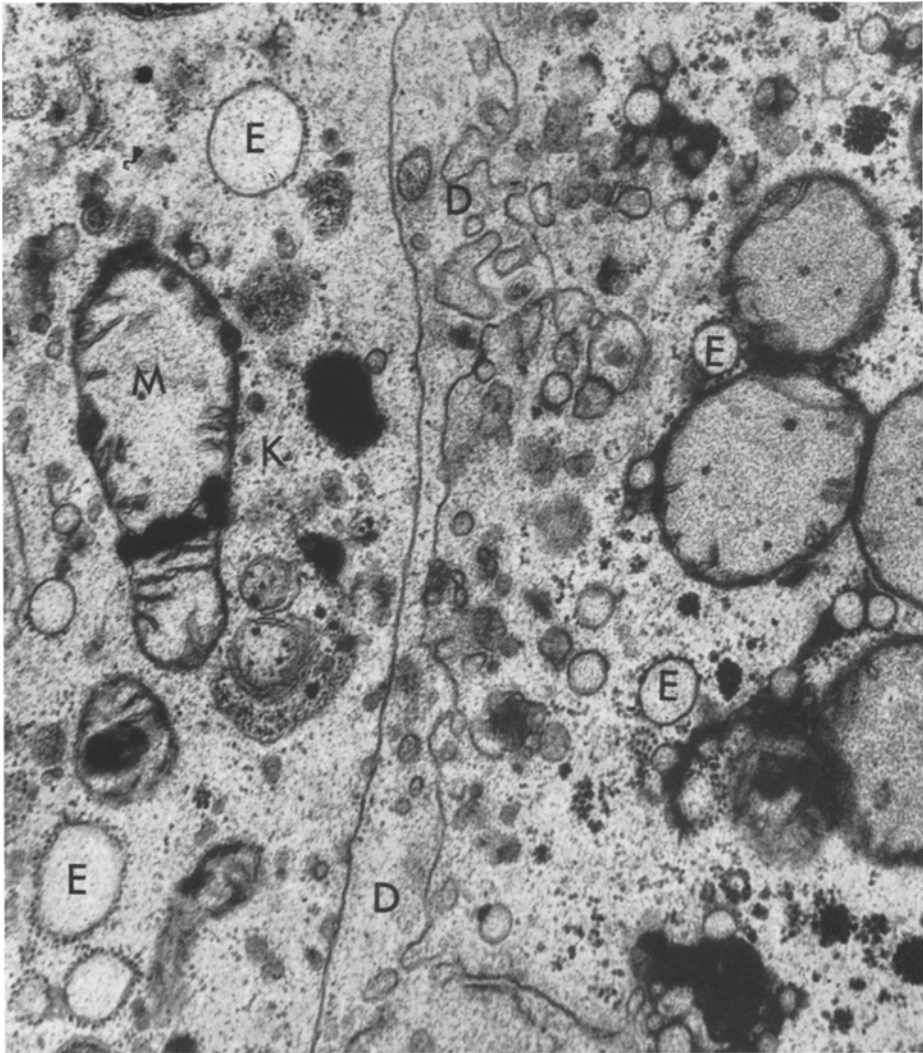


Abb. 5. Leber, Maus. 2 min nach Injektion von 0,02 cm<sup>3</sup> Tetrachlorkohlenstoff in die Milz: Der Ausschnitt zeigt in der rechten Bildhälfte Teile einer Leberparenchymzelle, die durch den Disseschen Raum *D* von einer teilweise getroffenen Kupfferschen Sternzelle *K* getrennt ist. In beiden Zellen erkennt man geschwollene Mitochondrien mit osmiphilen Verdichtungen an den Außenmembranen und Cristae. Ähnliche osmiphile Massen liegen im Cytoplasma der beiden Zellen neben abgerundeten Ergastoplasmazisternen *E* und Glykogen. Die Leberzelle weist im Bereich des Disseschen Raumes *D*, der mit feingranulärem Material erfüllt ist, nur wenige Mikrovilli auf. Arch.-Nr. 6077/64 (P). Vergr.: El.-optisch: 10000 ×. Endvergr. 36000 ×

so ist doch am Vorhandensein einer Substruktur der genannten Membranen nicht zu zweifeln. Die beobachtete deutliche Unterteilung der unit-membrane-Komponenten unter der Einwirkung von Tetrachlorkohlenstoff könnten nach REYNOLDS wie folgt erklärt werden: Das lipidlösende Agens verflüssigt lipidhaltige Komponenten der Membranen. Eine derartige Verflüssigung oder gar Herauslösung von Membranbestandteilen führt zu einer Verringerung der Oberflächenspannung in der Membran, worauf es zur Bildung von Tubuli kommen wird (SCHULMAN).



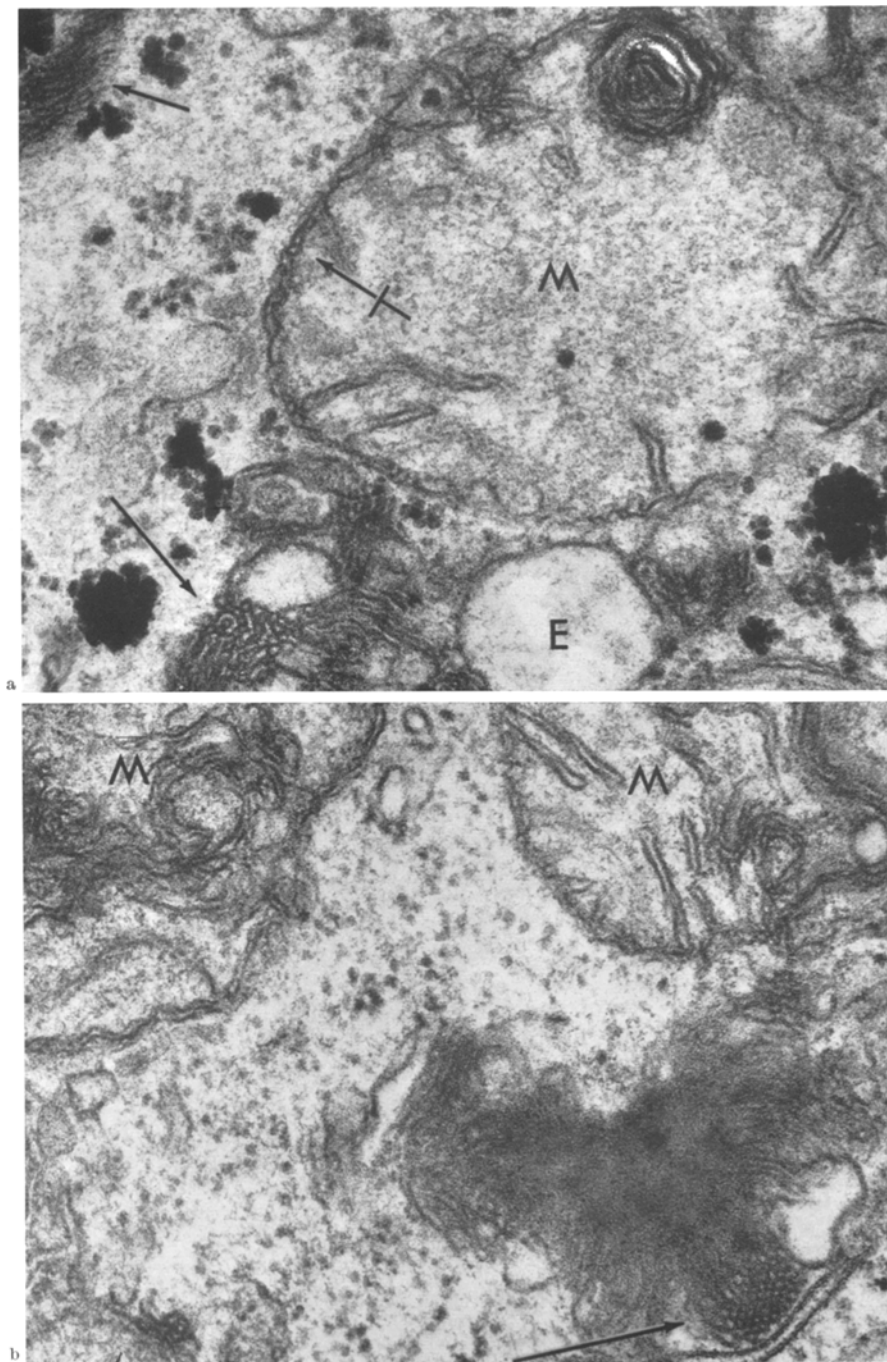


Abb. 6a u. b. Maus, Leber und Niere. 5 min nach Einlegen in unverdünnten Tetrachlorkohlenstoff in vitro: a Im gezeigten Leberzellenausschnitt ein geschwollenes Mitochondrium *M*, in dessen Außenmembranen neben aufgerollten Membranstrukturen herdförmig tubuläre Bildungen ( $\leftrightarrow$ ) erkennbar sind. Ähnliche tubuläre Neubildungen im Cytoplasma ( $\rightarrow$ ) neben abgerundeten Ergastoplasmazisternen *E* und Glykogenhäufchen. Arch.-Nr. 5307/63 (P) Vergr.: El.-optisch 20000  $\times$ . Endvergr. 73000  $\times$ . b Ausschnitt aus einer Kanälchenepithelzelle der Niere zeigt bei stärkerer Vergrößerung Teile geschwollener Mitochondrien *M*, deren Cristae herdförmig zusammengeschoben und aufgerollt sind. In Cytoplasma eine osmiophile Verdichtung, die am Rande feine regelmäßige Tubuli erkennen läßt ( $\rightarrow$ ). Arch.-Nr. 5373/63 (P). Vergr.: El.-optisch 20000  $\times$ . Endvergr. 76000  $\times$



Nach unseren Erfahrungen ist allerdings ein derartiger Mechanismus bei der von REYNOLDS selbst angewandten Versuchsanordnung, nämlich enteraler Verabreichung von Tetrachlorkohlenstoff, nicht wirksam. Die bei enteraler oder subcutaner Vergiftung mit Tetrachlorkohlenstoff beobachteten Membranveränderungen am Chondriom wie am endoplasmatischen Reticulum unterscheiden sich nicht wesentlich von denen bei andersartigen Vergiftungen, z. B. mit Dimethylaminoazobenzol [PORTER und BRUNI, HÜBNER (1)] oder Allylalkohol. Gerade bei der Lebervergiftung mit Allylalkohol, einem wasserlöslichen Stoff, haben wir kürzlich gleichartige Veränderungen an der Ultrastruktur der Leber beobachten können, wie sie auch bei enteraler Gabe von Tetrachlorkohlenstoff vorkommen [HÜBNER (2)]. Bei dieser Sachlage ist man unseres Erachtens nicht berechtigt, die resultierenden Veränderungen bei der enteralen Tetrachlorkohlenstoffvergiftung auf eine direkte Einwirkung des Tetrachlorkohlenstoffes auf die Membransysteme der Zelle zu beziehen.

Die nach wenigen Sekunden eintretende Schädigung der Ultrastruktur der Zellen bei intralienaler Injektion von Tetrachlorkohlenstoff erklärt die Befunde von ROSCHLAU, der nach intralienaler Injektion von Tetrachlorkohlenstoff bereits nach 15 sec eine Leberschädigung fluoreszenzmikroskopisch nachweisen konnte. Ebenso lassen sich nun die Befunde von BENEKE und SIMON, die bereits sehr rasch nach lienaler Injektion von Tetrachlorkohlenstoff eine Verminderung der Fermentaktivität im betroffenen

Lebergewebe feststellen konnten, durch die von uns gezeigten ultrastrukturellen Veränderungen zwanglos erklären. Das morphologische Substrat der direkten Leberschädigung durch Tetrachlorkohlenstoff bei intralienaler (intraportaler) Applikation ist von dem der „klassischen“ Tetrachlorkohlenstoffvergiftung nach enteraler oder subcutaner Gabe grundsätzlich verschieden. Hierdurch werden Unterschiede in den Folgen der Tetrachlorkohlenstoffwirkung je nach Art der Zufuhr des Giftes hinreichend erklärt.

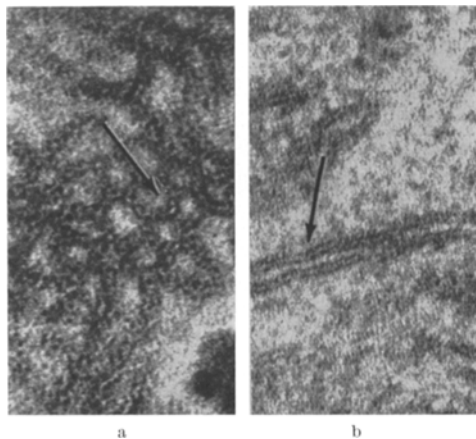


Abb. 7a u. b. Membranveränderungen im Bereich von Mitochondrien nach Tetrachlorkohlenstoffbehandlung: a 2 min nach intralienaler Injektion von 0,02 cm<sup>3</sup> Tetrachlorkohlenstoff ist an den neugebildeten Tubuli im Bereich einer Mitochondrien-Außenmembran eine deutliche Dreischichtung erkennbar (→). Arch.-Nr. 4896/63 (P). Vergr.: EL-optisch 40 000 ×. Endvergr. 244 000 ×. b Cristae mitochondriales 5 min nach Behandlung mit Tetrachlorkohlenstoff in vitro: Deutliche Dreischichtung der Membran (→). Arch.-Nr. 5387/63(P). Vergr.: EL-optisch 28 000 ×. Endvergr. 170 000 ×

### Zusammenfassung

Bei intralienaler Tetrachlorkohlenstoffvergiftung der Maus treten im Zusammenhang mit Membranen der Mitochondrien bzw. des endoplasmatischen Reticulum tubuläre Neubildungen auf, die zu osmiophilen Massen zusammenfließen. Analoge Veränderungen entstehen auch in vitro durch Einlegen von unbehandeltem Leber- und Nierengewebe in unverdünnten Tetrachlorkohlenstoff. Die Leberschädigung bei intralienaler Tetrachlorkohlenstoffgabe ist daher als Ausdruck einer unmittelbaren Einwirkung auf die Membransysteme der Zelle anzusehen, die dabei auftretenden Strukturen stellen die Folge einer Destabilisierung der betroffenen Membranen dar.

Der bisher nicht zu deutende Unterschied im zeitlichen Ablauf der Tetrachlorkohlenstoffvergiftung nach enteraler Gabe einerseits und nach intralientaler Gabe andererseits ist auf die außerordentlich rasch eintretende direkte Tetrachlorkohlenstoffwirkung auf die Zellmembranen zu erklären, die bei enteraler Gabe offenbar fehlt.

### Ultrastructural Changes of the Liver Produced by the Direct Action of $\text{CCl}_4$ (in Vivo and in Vitro)

#### Summary

After intrasplenic poisoning of the mouse with  $\text{CCl}_4$ , newly formed tubular structures appear in association with membranes of the mitochondria and endoplasmic reticulum. These tubular structures coalesce to form osmiophilic masses. Analogous changes develop *in vitro* as shown by immersing untreated liver or kidney tissue in undiluted  $\text{CCl}_4$ . Consequently, the damage of the liver by the intrasplenic administration of  $\text{CCl}_4$ , is to be regarded as an expression of a direct action on the membrane system of the cell. The structures that appear represent a disintegration of the involved membranes.

The prior inexplicable difference in the succession of events of poisoning seen after the enteric administration of  $\text{CCl}_4$ , on the one hand, from that seen after its intrasplenic administration, on the other hand, may now be explained by the extraordinarily rapid appearance of the direct effect of  $\text{CCl}_4$  on the cellular membranes which apparently is absent with the enteric application.

#### Literatur

- ATERMAN, K.: Toxic effect of carbon tetrachloride on the liver cell. *Brit. J. Pharmacol.* **19**, 219—225 (1962).
- BENEKE, G., u. H. SIMON: Neuartige histomorphologische und histochemische Befunde beim akuten Tetrachlorkohlenstoffschaden der Rattenleber. *Verh. dtsch. Ges. Path.* **45**, 284—286 (1961).
- CAMERON, G. R., W. A. E. KARUNARATNE, and J. C. THOMAS: Massive necrosis ("toxic infarction") of the liver following intraportal administration of poisons. *J. Path. Bact.* **44**, 297—303 (1937).
- FERNÁNDEZ-MORÁN, H., T. ODA, P. V. BLAIR, and D. E. GREEN: A macromolecular repeating unit of mitochondrial structure and function. Correlated electron microscopic and biochemical studies of isolated mitochondria and submitochondrial particles of beef heart muscle. *J. Cell Biol.* **22**, 63—100 (1964).
- GLYNN, L. E., and H. P. HIMSWORTH: The intralobular circulation in acute liver injury. *Clin. Sci.* **6**, 235—241 (1948).
- HÜBNER, G.: (1) Die Cancerogenese in der Rattenleber nach Verfütterung von Buttergelb. *Electron Microscopy. Fifth Internat. Congr. for Electron Microscopy, Philadelphia 1962*, vol. II, PP 6, edit. by S. S. BREESE jr. New York and London: Academic Press 1962.
- (2) Ultrastructure of the mouse liver under the influence of allyl alcohol. *Electron Microscopy 1964. Proc. of the third Europ. Reg. Conf. held in Prague*, edit. by M. TITLBACH, vol. B, p. 403—404. Prague: Publishing House of the Czechoslovak Academy of Sciences 1964.
- KARNOVSKY, M. J.: Simple methods for "staining with lead" at high pH in electron microscopy. *J. biophys. biochem. Cytol.* **11**, 729—732 (1961).
- LEDUC, E. H., and J. W. WILSON: Injury to liver cells in carbon tetrachloride poisoning. *Arch. Path.* **65**, 147—157 (1958).
- MYREN, J.: Injury of liver tissue in mice after single injections of carbon tetrachloride. *Acta path. microbiol. scand., Suppl.* **116**, 1—64 (1956).

- OBERLING, CH., et CH. ROUILLER: Les effets de l'intoxication aiguë au tétrachlorure de carbone sur le foie du rat. Étude au microscope électronique. *Ann. Anat. path.* **1**, 401—427 (1956).
- PORTER, K. R., and C. BRUNI: An electron microscope study of the early effects of 3'-Me-DAB on rat liver cells. *Cancer Res.* **19**, 997—1009 (1959).
- REYNOLDS, E. S.: Liver parenchymal cell injury. I. Initial alterations of the cell following poisoning with carbon tetrachloride. *J. Cell Biol.* **19**, 139—158 (1963).
- ROBERTSON, J. D.: The ultrastructure of cell membranes and their derivatives. *Biochim. Soc. Symp. (Cambridge, Engl.)* **16**, 3—43 (1959).
- ROSCHLAU, G.: Fluoreszenzmikroskopische Befunde an der Rattenleber nach akuter Tetrachlorkohlenstoffvergiftung. *Virchows Arch. path. Anat.* **336**, 122—131 (1962).
- ROUILLER, CH.: Experimental toxic injury of the liver. In: *The liver. Morphology, biochemistry, physiology*, vol. II, p. 315—476, edit. by CH. ROUILLER. New York and London: Academic Press 1964.
- SABATINI, D. D., K. BENSCH, and R. J. BARNETT: Cytochemistry and electron microscopy. The preservation of cellular ultrastructure and enzymatic activity by aldehyde fixation. *J. Cell Biol.* **17**, 19—58 (1963).
- SCHULMAN, J. H.: Zit. bei E. S. REYNOLDS.
- SJÖSTRAND, F. S.: A comparison of plasma membrane, cytomembranes and mitochondrial membrane elements with respect to ultrastructural features. *J. Ultrastruct. Res.* **9**, 561—580 (1963).

Dr. G. HÜBNER

Pathologisches Institut der Universität  
5 Köln-Lindenthal, Josef Stelzmann-Straße 9