

Aus der Medizinischen Klinik der Universität Erlangen-Nürnberg
(Direktor: Prof. Dr. N. HENNING)

Tierexperimentelle Untersuchungen zur Pathogenese der chronischen Hepatitis

I. Mitteilung

Morphologische Studien an der Leber nach Sensibilisierung mit homologen Leberzellfraktionen

Von

F. SCHEIFFARTH, H. WARNATZ und W. NIEDERER

Mit 2 Textabbildungen

(Eingegangen am 1. April 1965)

Die morphologischen Veränderungen an der Leber, die bei Sensibilisierung von Kaninchen mit homologem Leberextrakt zusammen mit Freundschen Adjuvantien beobachtet werden, entsprechen auf Grund von eigenen Untersuchungen in Übereinstimmung mit anderen Autoren (BEHAR und TAL, ISHII und YAMAMOTO, NORKIN et al. sowie STEINER et al.) in gewisser Weise dem Bild der chronischen Hepatitis des Menschen. Sie beschränken sich allerdings auf eine Infiltration der periportalen Felder mit mononukleären Elementen. Leberzellennekrosen und eine stärkere Aktivierung der Kupfferschen Sternzellen lassen sich im allgemeinen erst nach monatelanger, intensiver Sensibilisierung nachweisen. Jedoch konnte bislang tierexperimentell ein Übergang in das Bild der Cirrhose, wie sie die Humanpathologie kennt, nicht beobachtet werden.

Zielsetzung unserer Arbeit war es zu klären, welcher Fraktion der Leberzelle die nachweisbaren morphologischen Veränderungen im Sensibilisierungsversuch zuzuschreiben sind bzw. welche unterschiedlichen histologischen Bilder sich bei Sensibilisierung mit diesen verschiedenen Antigenen ergeben.

Methodik

Als Versuchstiere wurden Kaninchen der Kreuzung Belgische Riesen und Kleinsilber mit einem durchschnittlichen Gewicht von 2500—3000 g verwendet.

Als Antigen benutzten wir Zellfraktionen, die aus homologem Lebergewebe von Kaninchen der gleichen Rasse gewonnen wurden. Die Leber wurde nach Entnahme mit physiologischer Kochsalzlösung durchgespült, bis die aus den Gefäßen herausfließende Flüssigkeit blutfrei war. Nach Zerkleinerung des Organs mit der Schere und Beseitigung größerer Bindegewebsanteile wurde die Leber durch ein Perlonseid gepreßt. Der gewonnene Leberbrei wurde mit 0,88 m Sucroselösung im Verhältnis 1 : 9 verdünnt und mit Hilfe eines Potter-Elvehjem-Glashomogenisators bei +4°C homogenisiert. Die Gewinnung der Zellfraktionen erfolgte nach dem von SCHNEIDER und HOGEBOOM angegebenen Verfahren mittels Zentrifugation in der präparativen Ultrazentrifuge. Zunächst wurden bei 3000 rpm die Zellkerne sowie die unverletzten Zellen abgetrennt. Nach mehrfacher, erneuter Zentrifugation in hypertonerischer Sucroselösung wurde die *Kernfraktion* auf ihren Reinheitsgrad lichtmikroskopisch nach Färbung mit Hämatoxylin-Eosin untersucht. Dabei konnten intakte Zellen nicht mehr gefunden werden; es konnten jedoch neben den Zellkernen und Kerntrümmern Verunreini-

gungen durch verklumpte Mitochondrien nachgewiesen werden. Die überstehende Flüssigkeit und die Waschflüssigkeit wurden anschließend 30 min bei 30000 rpm in einer präparativen Ultrazentrifuge bei +4°C zentrifugiert. Die klare überstehende Flüssigkeit (*Cytoplasmafraktion*) wurde abgehebelt, der braune und der darüberliegende weiße Rückstand, der im wesentlichen der *Mitochondrien-Mikrosomenfraktion* entsprach, zweimal mit Sucroselösung gewaschen und anschließend elektronenmikroskopisch auf Verunreinigungen untersucht¹. Neben Mitochondrien und Mikrosomen konnten dabei Verunreinigungen der Fraktion durch Kerntrümmer nachgewiesen werden.

Die Sensibilisierung mit den so gewonnenen Fraktionen wurde nach folgendem Schema vorgenommen:

1. Drei Tiere der Gruppe A erhielten in wöchentlichem Abstand insgesamt sieben Injektionen zu 0,5 ml *Kernfraktion* intravenös und 2 ml *Kernfraktion* zusammen mit Freundschem Adjuvans (im Verhältnis 1:10) subcutan injiziert; die achte Injektion erfolgte in dreiwöchigem Abstand von der vorangegangenen.

2. Vier Tiere der Gruppe B erhielten in wöchentlichem Abstand insgesamt sieben Injektionen zu 0,5 ml *Cytoplasmafraktion* intravenös und 4 ml *Cytoplasmafraktion* zusammen mit Freundschem Adjuvans (im Verhältnis 1:10) subcutan injiziert.

3. Vier Tieren der Gruppe C wurden ebenfalls im Abstand von einer Woche insgesamt sieben Injektionen zu 0,5 ml *Mitochondrien-Mikrosomenfraktion* intravenös und 2 ml *Mitochondrien-Mikrosomenfraktion* zusammen mit Freundschem Adjuvans (im Verhältnis 1:10) subcutan appliziert.

4. Vier Tieren der Gruppe D wurden im Abstand von einer Woche insgesamt sieben Injektionen zu 0,5 ml *Gesamtextrakt* intravenös und 2 ml *Gesamtextrakt* zusammen mit Freundschem Adjuvans (im Verhältnis 1:10) subcutan verabreicht.

Zehn Tage nach der letzten Injektion wurden die Tiere getötet und die Organe (Leber, Milz und Niere) entnommen. Die Organe wurden zunächst auf makroskopische Veränderungen untersucht. Zur Beurteilung morphologischer Veränderungen wurden histologische Schnitte der Lebern angefertigt und diese nach Hämatoxylin-Eosin-Färbung mikroskopisch beurteilt².

Ergebnisse

Bei histologischer Beurteilung der Leber von Tieren, die mit Gesamtextrakt sensibilisiert wurden (Gruppe D), konnten Parenchymzellnekrosen, Sternzellenknötchen und Gallengangsregenerate beobachtet werden; regelmäßig war auch eine massive Infiltration der periportalen Felder mit mononukleären Zellen nachzuweisen (Abb. 1). Bei den mit *Kernfraktion* sensibilisierten Tieren (Gruppe A) ließen sich keine morphologischen Veränderungen an der Leber nachweisen. Es fiel lediglich eine trübe Schwellung der Parenchymzellen auf. Nekrosen, Vermehrung der Kupfferschen Sternzellen sowie eine zellige Infiltration der periportalen Felder fehlten.

Der histologische Befund bei den mit der *Cytoplasmafraktion* sensibilisierten Tieren (Gruppe B) entsprach im wesentlichen dem der Gruppe D (mit *Gesamtextrakt* behandelte Tiere). Die Veränderungen waren im allgemeinen jedoch etwas geringer ausgeprägt (Abb. 2). Relativ geringe Veränderungen wurden bei den Tieren der Gruppe C (Sensibilisierung mit der *Mitochondrien-Mikrosomen-*

¹ Herrn Prof. Dr. M. KNORE, Direktor des Hygienisch-Bakteriologischen Instituts der Universität Erlangen-Nürnberg, dürfen wir an dieser Stelle für sein liebenswürdiges Entgegenkommen bei der elektronenmikroskopischen Beurteilung der *Mitochondrien-Mikrosomenfraktion* danken.

² Für die liebenswürdige Beurteilung der histologischen Präparate sei Herrn Prof. Dr. E. MÜLLER, Direktor des Pathologischen Instituts der Universität Erlangen-Nürnberg und Herrn Prof. Dr. K. ELSTER vom Pathologischen Institut der Universität Erlangen-Nürnberg gedankt.

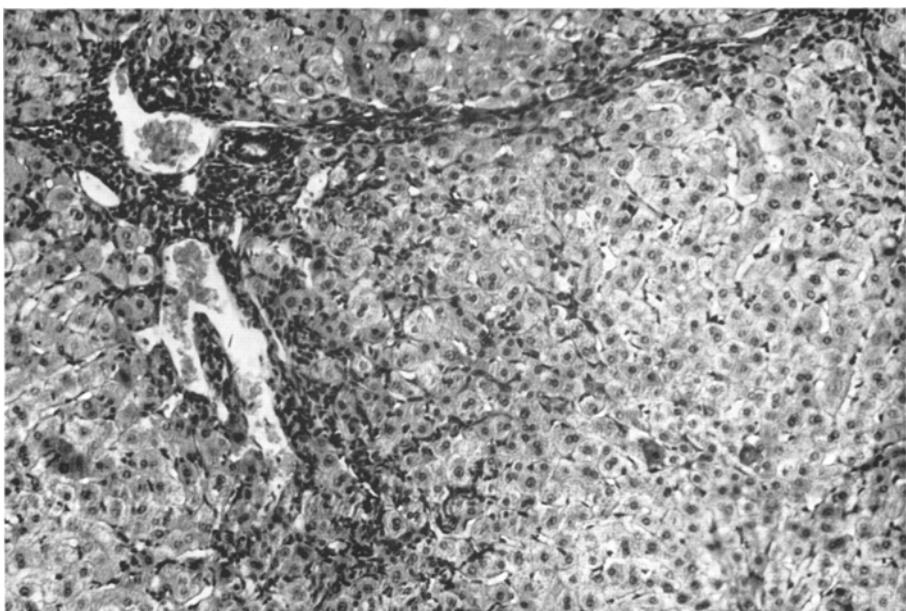


Abb. 1. Leberveränderungen nach Sensibilisierung mit homologem Lebergesamtextrakt

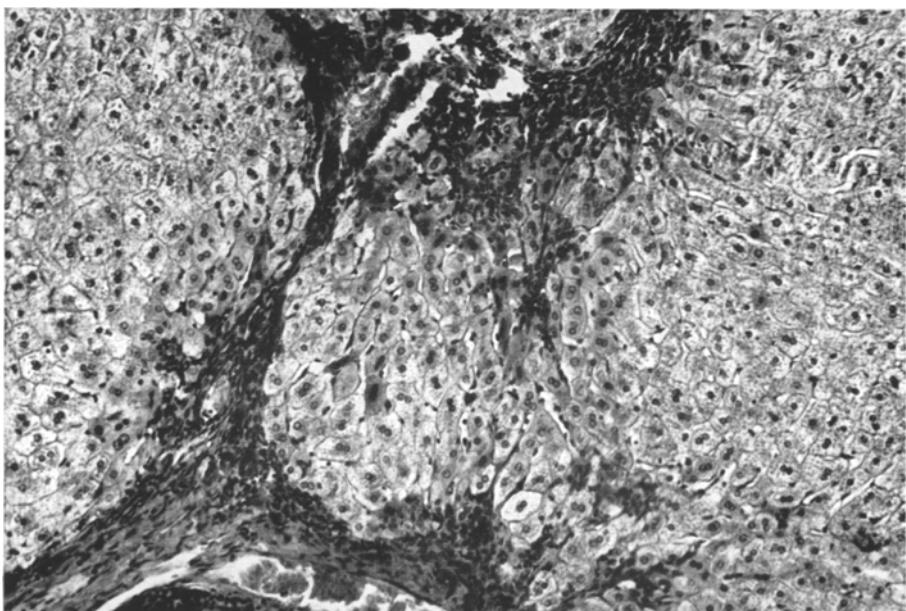


Abb. 2. Leberveränderungen nach Sensibilisierung mit Cytoplasmafraktion

fraktion) beobachtet. Hier fiel lediglich eine mäßige Infiltration der periportalen Felder mit mononukleären Zellen auf. Nekrosen der Leberparenchymzellen, Sternzellknötchen und Gallengangsregenerate fehlten. In keiner der Untersuchungsgruppen fand sich eine nennenswerte Bindegewebsvermehrung.

Diskussion

Aus den mitgeteilten Ergebnissen geht hervor, daß auf dem Wege über eine langfristige Sensibilisierung mit homologem Lebergesamtextrakt das morphologische Bild der chronischen Hepatitis im Tierexperiment erzeugt werden kann. Da bei Sensibilisierung mit homologen Leberzellfraktionen nur die Tiere, die mit der Cytoplasmafraktion behandelt worden waren, ähnliche Veränderungen zeigten, wie sie bei den Tieren der Gruppe D (mit Lebergesamtextrakt sensibilisiert) beobachtet wurden, muß angenommen werden, daß die morphologischen Veränderungen bei Sensibilisierung mit homologem Leberextrakt in erster Linie der antigenen Wirksamkeit der Cytoplasmafraktion zuzuordnen sind. Allerdings ließ sich auch bei den Gruppen B und D nie eine nennenswerte Fibrose als Zeichen eines Überganges in eine Cirrhose nachweisen. Verlaufsbeobachtungen zeigen vielmehr, daß die beschriebenen morphologischen Veränderungen nach Beendigung der Sensibilisierung nicht autonom fortschreiten, sondern im wesentlichen reversibel sind. Dafür sprechen auch die Beobachtungen an vier Tieren (zwei der Gruppe C und je eins der Gruppe B und D), die während der Sensibilisierung unter den Zeichen einer fortschreitenden Kachexie starben; diese zeigten makroskopisch und mikroskopisch die gleichen Veränderungen der Leber, wie sie für die übrigen Tiere der entsprechenden Gruppen beschrieben wurden. Auch bei diesen Tieren fand sich für einen cirrhotischen Umbau der Leber kein Anhaltspunkt. Allerdings ist in Betracht zu ziehen, daß möglicherweise bei genügend langer Fortsetzung der Sensibilisierungsversuche eine bindegewebige Umwandlung der Leber eintreten könnte.

Die Versuchsergebnisse der Gruppe A und C sprechen dafür, daß der leberpathogene Effekt bei Sensibilisierung mit homologem Lebergewebsantigen nicht von der Kernfraktion ausgeht und ebensowenig durch die Mitochondrien-Mikrosomenfraktion das Bild der chronischen Hepatitis erzeugt werden kann. Die Befunde stimmen mit den Beobachtungen von POLLAK et al. sowie VOGT überein, die nach Sensibilisierung mit der Leberzellkernfraktion ebenfalls keine wesentliche Veränderung nachweisen konnten. Für die Beurteilung der Ergebnisse bei diesen beiden Gruppen ist die Prüfung der Reinheit der subzellulären Elemente der Leberzellfraktionen von besonderer Bedeutung. Da die Kernfraktion Verunreinigungen mit verklumpten Mitochondrien zeigte und auch bei der Mitochondrienfraktion Kernbruchstücke nachweisbar waren, mußten bei beiden Gruppen ähnliche histologische Veränderungen erwartet werden, was die Ergebnisse auch bestätigten.

Die mitgeteilten Untersuchungsergebnisse sind schließlich auch für die Frage von Bedeutung, welchen Einfluß das Freundsche Adjuvans auf die Leberveränderungen bei Sensibilisierung mit homologem Leberextrakt besitzen. Ein wesentlicher Einfluß des Freudschen Adjuvans scheidet bei unseren Versuchen aus; es wurde bei sämtlichen Versuchstiergruppen Freudsches Adjuvans in gleicher Menge und in der gleichen zeitlichen Verteilung angewendet. Die Ergebnisse, die deutliche Unterschiede je nach verwendetem Antigen erkennen lassen, stehen im Gegensatz zur Ansicht anderer Autoren (JAHIEL et al., LAUFER et al., NORKIN et al. sowie STEINER et al.), die Leberveränderungen nach Behandlung mit homologem Leberantigen zusammen mit Freudschem Adjuvans nicht als

Folge eines spezifischen Sensibilisierungseffektes ansehen, sondern als Ausdruck einer unspezifischen Reaktion auf das Freundsche Adjuvans werten.

Tierexperimentelle Untersuchungen anderer Autoren über Sensibilisierung mit Leberzellfraktionen sind in der einschlägigen Literatur nur selten zu finden. Auch VOGT konnte bei Behandlung mit heterologer Mitochondrien- und Kernfraktion keine leberspezifischen Veränderungen an der Rattenleber erzeugen. Allerdings beobachtete er auch bei Sensibilisierung mit heterologer Cytoplasmafraktion keine geweblichen Veränderungen an der Leber.

Zusammenfassung

Die bei langzeitiger Sensibilisierung von Kaninchen mit homologem Lebergesamtextrakt beobachteten morphologischen Leberveränderungen (Infiltration der periportalen Felder, Aktivierung der Kupfferschen Sternzellen, Leberzellnekrosen) sind im wesentlichen auf die antigenen Wirksamkeit der Cytoplasmafraktion zurückzuführen. Bei Sensibilisierung mit homologer Mikrosomen-Mitochondrienfraktion sind die Veränderungen wesentlich geringer ausgeprägt. Bei Behandlung mit homologer Leberparenchymzellkernfraktion konnten keine wesentlichen morphologischen Veränderungen nachgewiesen werden.

Experimental Investigations in Animals on the Pathogenesis of Chronic Hepatitis

I. Morphologic Studies of the Liver after Sensitization with Fractions of Homologous Liver Cells

Summary

The morphologic changes in the liver (infiltrates in the periportal regions, hyperactivity of the von Kupffer cells, liver cell necroses) observed after prolonged sensitization of rabbits with extracts of homologous whole liver are due primarily to the antigenic effect of the cytoplasmic fractions. With the sensitization with homologous microsomal-mitochondrial fractions, the changes are essentially less extensive. With the injections of homologous fractions of nuclei of hepatic parenchymal cells no major changes can be demonstrated.

Literatur

- BEHAR, A. J., and C. TAL: Experimental liver necrosis produced by the injection of homologous whole liver with adjuvant. *J. Path. Bact.* **77**, 519 (1959).
- D'AMELIO, V., and P. PERLMANN: The distribution of soluble antigens in cellular structures of rat liver. *Exp. Cell Res.* **19**, 383 (1960).
- ISHII, K., and S. YAMAMOTO: Liver cirrhosis and autoallergy. In: G. A. MARTINI u. S. SHERLOCK, *Aktuelle Probleme der Hepatologie*. Stuttgart: Georg Thieme 1962.
- JAHIEL, R. I., and D. KOFFLER: Hepatic granulomas induced in guinea pigs by Freund adjuvant with and without homologous liver. *Brit. J. exp. Path.* **42**, 338 (1961).
- LAUFER, A., C. TAL, and A. J. BEHAR: Effect of adjuvant and its components on the organs of various animal species; a comparative study. *Brit. J. exp. Path.* **40**, 1 (1959).
- NORKIN, S. A., L. S. GOTTLIEB, and N. ZAMCHEK: Effect of liver homogenate and Freund adjuvant on guinea pig liver and other organs. *Amer. J. dig. Dis.* **7**, 824 (1962).
- POLLAK, V. E., E. MANDEMA, and M. GARSTENSTEIN: Serum antinuclear factor in patients and relatives: observation in systemic lupus erythematosus and liver disease. *J. clin. Invest.* **40**, 1071 (1961).

- SCHEIFFARTH, F., H. WARNATZ, H. GöTZ u. G. KETTNER: Tierexperimentelle Studien über die Bildung humoraler Organautoantikörper gegen homo- und autologes Lebergewebe. Z. Gastroenterologie **2**, 279 (1964).
- SCHNEIDER, W., and G. HOGEBOOM: Intracellular distribution of enzymes. V. Further studies on the distribution of cytochrome in rat liver homogenates. J. biol. Chem. **183**, 123 (1950).
- STEINER, J. W., J. S. CARRUTHERS, R. BAUMAL, and S. R. KALIFAT: Experimental immunologic liver injury and the concept of autodestruction. Part I and II. Canad. med. Ass. J. **85**, 1369, 1425 (1961).
- VOGT, P. K.: The immunology of liver microsomes. I. The properties of the quantitative precipitin system. II. Immunological relations of microsomes to other cell fractions. III. The localization of tissue specific antigens within the structural components of endoplasmic reticulum. Z. Naturforsch. **15 B**, 213, 218, 221 (1960).

Prof. Dr. F. SCHEIFFARTH
Medizinische Klinik u. Poliklinik der Universität
852 Erlangen