

Humorale Beeinflussung der Regeneration der cirrhotischen Leber

I. BARTÓK, ANNA TÓSZEGI und I. TÖRÖK

Pathologisches Institut der Medizinischen Universität Szeged, Ungarn
(Direktor: Prof. Dr. J. ORMOS)

Eingegangen am 18. August 1965

Es gibt wohl kaum ein Organ, dessen Regeneration so häufig und eingehend studiert worden ist, wie die Leber. Bei diesen Untersuchungen konnten zahlreiche Faktoren festgestellt werden, welche die Leberregeneration beeinflussen. Uns interessierte die Frage, welchen Einfluß das Wachstum stimulierende humorale Faktoren auf die Regeneration des cirrhotischen Lebergewebes ausüben.

Material und Methoden

Bei 140 Wistarratten von 200—250 g Körpergewicht wurden über eine Zeitspanne von 5 Monaten zweimal in der Woche 0,12 ml CCl_4 subcutan injiziert. Während dieser Zeit starben 64 Tiere infolge einer Leberschädigung. Bei 66 überlebenden Tieren, bei denen sich eine typische Lebercirrhose entwickelte, wurden danach der mittlere und der linke Leberlappen entfernt. Die operierten Tiere wurden in drei Gruppen eingeteilt und 48, 96 Std sowie 10 Tage nach der Operation durch Entbluten getötet.

In der ersten Gruppe erhielten 23 Tiere unmittelbar nach der Operation, dann an drei aufeinanderfolgenden Tagen und anschließend bis zur Tötung alle 2 Tage 2 ml Serum teilhepatektomierter Ratten (SPHR) intraperitoneal injiziert. In der zweiten Gruppe bekamen 23 Tiere zu den gleichen Zeitpunkten wie oben 2 ml Serum von nichtoperierten Ratten (Normalserum = NS) i.p. verabfolgt, während 20 Ratten der dritten Gruppe nach der Operation unbehandelt blieben. Nach der Operation starben in allen drei Gruppen insgesamt 15 Tiere. Die übrigen zu verschiedenen Zeitpunkten getöteten Tiere verteilten sich wie folgt:

	Operiert	Gestorben	Nach der Operation getötet		
			48 Std	96 Std	10 Tage
Gruppe I	23	5	6	6	6
Gruppe II	23	6	6	6	5
Gruppe III	20	4	5	5	6

Das Serum stammte von unbehandelten Albinoratten beiderlei Geschlechts, gleichen Alters und Gewichts wie die behandelten Tiere. Sie wurden 30 Std nach einer partiellen Hepatektomie bzw. unoperiert durch Entbluten getötet und das nach Zentrifugierung des Blutes erhaltene Serum vor der Injektion höchstens 48 Std im Tiefkühlschrank bei -10°C aufbewahrt.

Die regenerierenden cirrhotischen Lebern wurden histologisch und histochemisch untersucht.

Der Grad der Regeneration wurde nach dem folgenden Schema von CANZANELLI u. Mitarb. (1949) bestimmt:

$$\frac{\text{Gewicht der regenerierenden Leber} - \frac{1}{2} \text{ des Gewichtes der entfernten Leberlappen}}{\text{Gewicht der entfernten Leberlappen}} \times 100.$$

An HE-gefärbten Schnitten wurden in jeder Leber die Mitosen pro 1000 Parenchymzellen gezählt.

Ergebnisse

In dem entfernten Leberlappen stellte sich histologisch das typische Bild der portalen Cirrhose dar.

Durch Serum-Injektionen partiell hepatektomierter Ratten (SPHR) war der Grad der Regeneration der cirrhotischen Leber zu allen drei Zeitpunkten durchschnittlich fast doppelt so hoch als in den Kontrollebern. Das Serum nicht-operierter Tiere (NS) ließ die Regeneration unbeeinflusst (Tabelle 1).

Tabelle 1. *Grad der Regeneration der cirrhotischen Leber bei den mit SPHR bzw. NS behandelten und unbehandelten Tieren*

	SPHR	NS	K
48 Std	24%, 26%, 28%, 53%, 75%, 90% Durchschnitt: 49%	0%, 9%, 19%, 20%, 35%, 70% Durchschnitt: 25%	2%, 12%, 20%, 21%, 27%, 64% Durchschnitt: 24%
96 Std	52%, 66%, 71%, 76%, 79%, 83% Durchschnitt: 70%	2%, 12%, 16%, 25%, 44%, 74% Durchschnitt: 28%	16%, 26%, 33%, 37%, 65% Durchschnitt: 35%
10 Tage	23%, 60%, 61%, 71%, 79%, 88% Durchschnitt: 63%	11%, 23%, 43%, 50%, 69% Durchschnitt: 39%	24%, 25%, 28%, 37%, 40%, 59% Durchschnitt: 37%

Die Mitosenzahl 48 bzw. 96 Std nach der Operation war bei den mit SPHR und NS behandelten Tieren ähnlich. Die Leber der unbehandelten Tiere zeigte eine geringere Mitosenaktivität. Am 10. postoperativen Tage waren in den Lebern der Kontrollgruppen schon keine, oder nur mehr vereinzelte Zellteilungen zu beobachten, während in den Lebern der mit SPHR behandelten Ratten auch weiterhin eine beträchtliche Mitosenstimulation nachgewiesen werden konnte (Tabelle 2).

Tabelle 2. *Die Wirkung von SPHR auf die Mitosenzahl (Durchschnitt)*

	SPHR	NS	K
48 Std	7,33 (6 Tiere)	8,66 (6 Tiere)	2,5 (5 Tiere)
96 Std	3,66 (6 Tiere)	3,66 (6 Tiere)	1,7 (5 Tiere)
10 Tage	13 (6 Tiere)	1, 1, 0, 0, 0 (5 Tiere)	0 (6 Tiere)

Histologisch waren 48 bzw. 96 Std nach der Operation in allen drei Versuchsgruppen die üblichen regenerativen Erscheinungen zu beobachten: Schwellung der Parenchymzellen und Zellkerne, hochgradige Kernpolymorphie, Nucleolenvergrößerung, mehrreihige Leberzellbalken und Vermehrung der neutralen Fette. Letztere läßt nach 96 Std etwas nach. Auffallend war, daß erstens die Lebern der mit NS behandelten bzw. unbehandelten Kontrolltiere häufig Nekrosen aufweisen, während solche im Falle der SPHR-behandelten Tiere fehlen. Bemerkenswert ist zweitens, daß in der Leber der SPHR-behandelten Tiere die Parenchymnoduli außergewöhnlich hochgradige und auf die ganze Leber ausgedehnte Hyperplasien

aufweisen (Abb. 1), während in den mit NS behandelten und in den unbehandelten Tieren lediglich eine wesentlich geringere Hyperplasie eines Teiles der Pseudolobuli sich feststellen läßt (Abb. 2).

Am 10. Tage der Regeneration ist in den Lebern der mit SPHR behandelten Ratten die Hyperplasie der Pseudoläppchen noch immer sehr stark; die Leber-

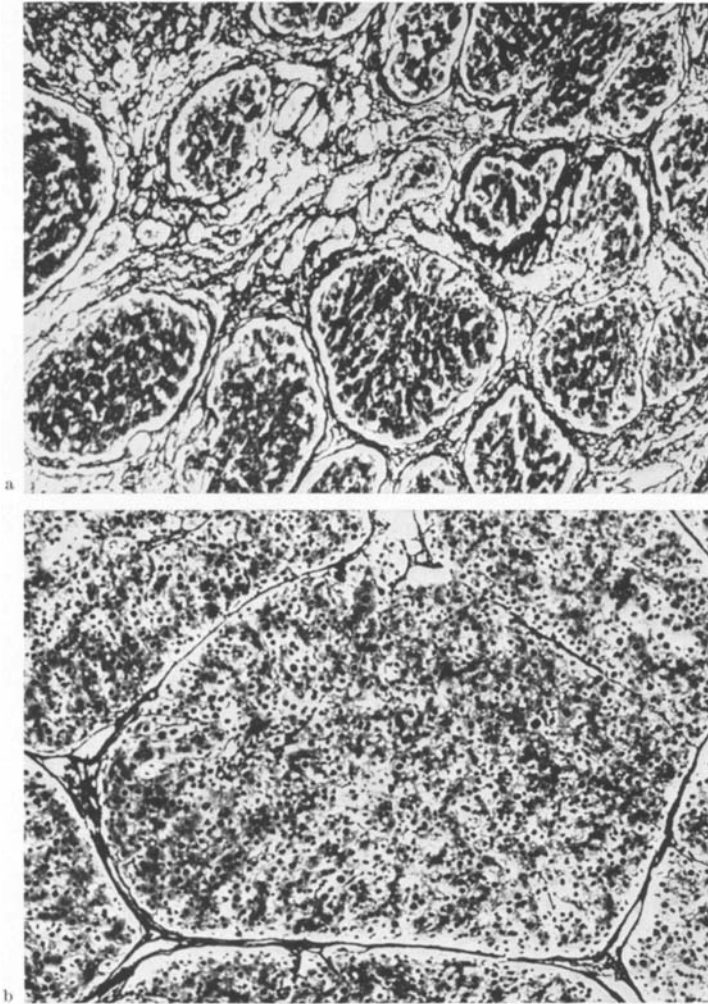


Abb. 1a u. b. Leber eines mit SPHR behandelten Tieres. a Vor der Operation (entfernter Leberlappen); b 96 Std nach der Operation: sehr starke Hyperplasie der Parenchymnoduli, Silberimprägnation nach GÖMÖRI, 88,5 \times

zellen sind geschwollen, es besteht ein hochgradiger Kernpolymorphismus und im Cytoplasma eine starke Basophilie. Die radiäre Anordnung der Leberzellbalken ist deutlich erkennbar, häufig sind mehrreihige Leberzellbalken vorhanden (Abb. 3a). In den Leberzellen erscheinen winzige Fetttröpfchen. Obzwar die Bindegewebssepten komprimiert und schmaler geworden sind, ist eine Modifizierung der cirrhotisch-nodulären Struktur nicht wahrnehmbar.

Ein wesentlich anderes Bild findet sich in den Lebern der beiden Kontrollgruppen. Die Hyperplasie der Pseudoläppchen ist weniger deutlich ausgeprägt.

Ein Teil der Leberzellen ist erheblich geschwollen und vacuolisiert. Die Vacuolen, die kaum Fett enthalten, füllen oft den ganzen Zelleib aus. Das Bild entspricht somit einer typischen vacuolären Degeneration (Abb. 3b). An mehreren Stellen werden herdförmige Nekrosen sichtbar. Die Sinusoide sind stark eingengt, es besteht eine ausgesprochene Kernpolymorphie.

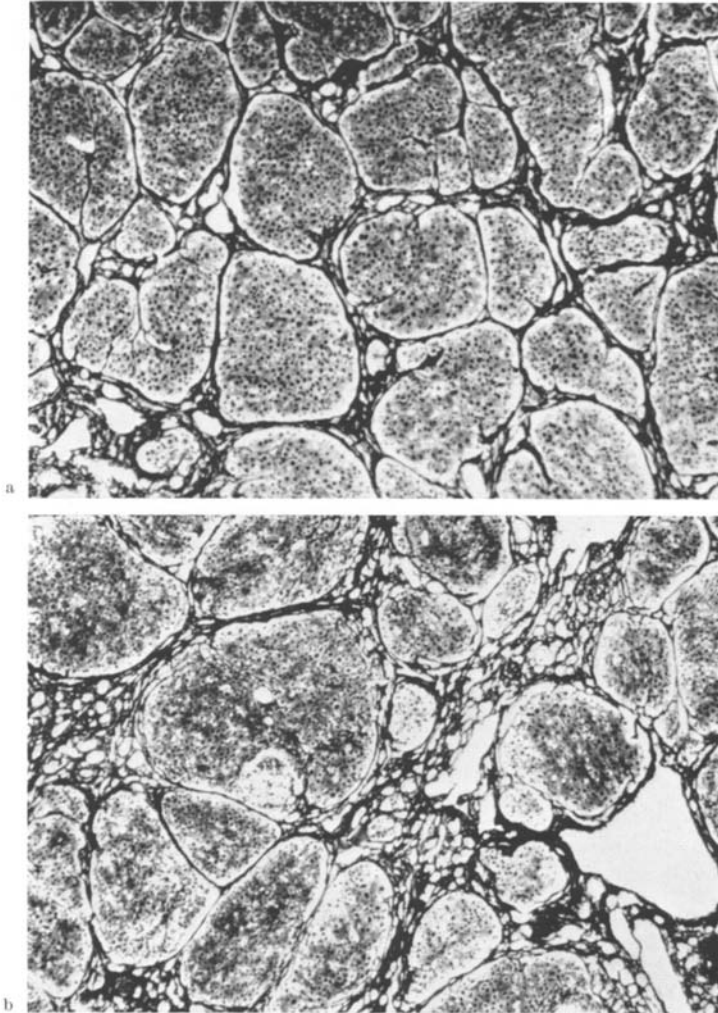


Abb. 2a u. b. Leber eines mit NS behandelten Tieres. a Vor der Operation (entfernter Leberlappen); b 96 Std nach der Operation: mäßige Hyperplasie eines Teiles der Pseudoläppchen. Silberimprägnation nach GÖMÖRI, 88,5 \times

Histochemisch zeigt sich im Methylgrün-Pyronin-Schnitt, daß der RNS-Gehalt der Leberzellen 48 Std nach der Operation in allen drei Gruppen erhöht ist. Nach 96 Std ist in den Lebern der SPHR-behandelten Tiere eine weitere sehr hochgradige Erhöhung zu verzeichnen; die pyroninpositive Substanz bildet meistens große elongierte Schollen, die oft parallel — vielfach um den Kern — angeordnet liegen. Am 10. Tage ist das Bild unverändert. — In den Lebern der mit NS behandelten und der unbehandelten Tiere ist nach 96 Std nur eine mäßige und von

Zelle zu Zelle wechselnde Erhöhung festzustellen. Die Pyroninophilie ist oft diffuser Art, große Granula sind wesentlich seltener anzutreffen. 10 Tage nach der Operation ist die Pyroninophilie im Verhältnis zu den früheren Zeitpunkten geringer; in den stark vacuolisierten Leberzellen ist sie kaum zu beobachten. Zwischen den einzelnen Zellgruppen zeigen sich wesentliche Unterschiede.

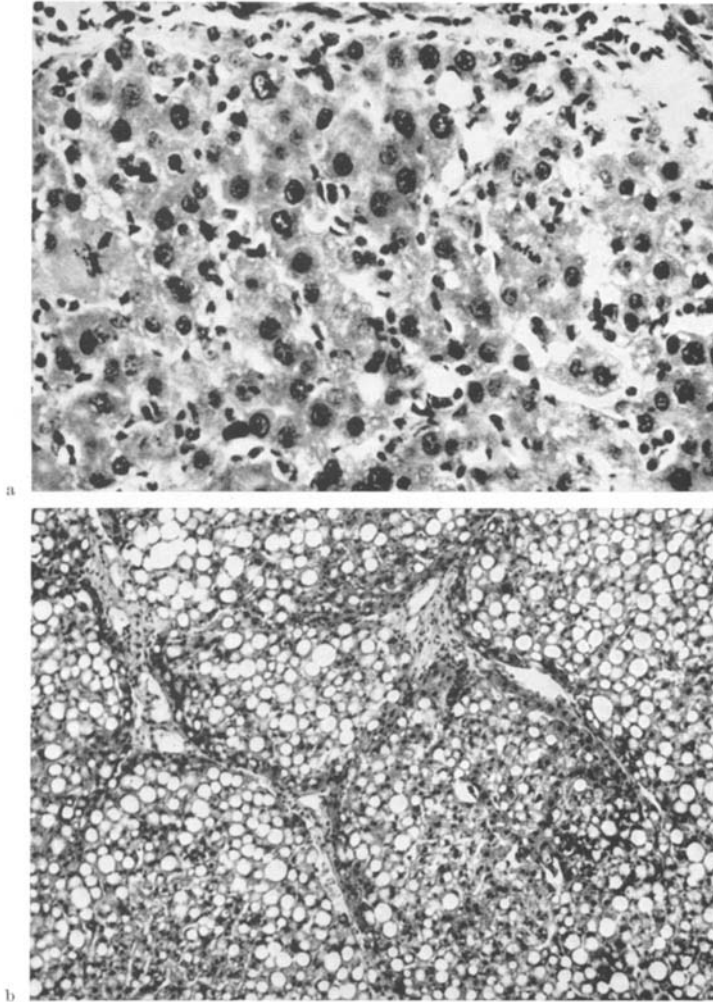


Abb. 3. a Leber eines mit SPHR behandelten Tieres 10 Tage nach der Operation; ausgeprägte Regenerationserscheinungen, Mitosen. H.-E., $287\times$. b Leber eines unbehandelten Kontrolltieres, 10 Tage nach der Operation; vacuoläre Degeneration. H.-E., $88,5\times$

Der Glykogengehalt der Leberzellen ist 48 Std nach der Operation in allen drei Gruppen bedeutend vermindert. Nach 96 Std ist dagegen eine beträchtliche Erhöhung nachweisbar. Am 10. Tage ist der Glykogengehalt der Leber in den Kontrollgruppen im wesentlichen unverändert, bei den SPHR-behandelten Ratten scheint er gegenüber früheren Zeitpunkten herabgesetzt.

Die Succinodehydrogenase (nach CASCARANO und ZWEIFACH, 1955) (SDH)- und Cytochromoxydase (nach BURSTONE, 1959) (Cyt-O)-Aktivität war 48 Std

nach der Operation in den Lebern der SPHR-behandelten Tiere im allgemeinen erheblich vermindert, allerdings war diese Änderung der Aktivität nicht in allen Lebern gleich stark ausgeprägt. Bis zum 10. Tage bleibt die Aktivität beider Enzyme unverändert niedrig. — Zwischen den beiden Kontrollgruppen sind hinsichtlich der Enzymaktivitätsänderungen Unterschiede nicht festzustellen. 48 Std

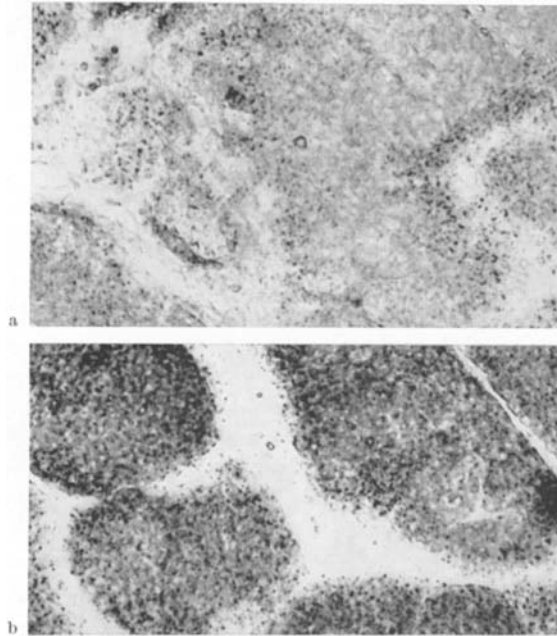


Abb. 4a u. b. SDH-Aktivität 96 Std nach der Operation. a Leber eines mit SPHR behandelten Tieres: niedrige Enzymaktivität. b Leber eines mit NS behandelten Tieres: wesentlich höhere Aktivität. 112 ×

nach der Operation ist eine höhere Aktivität zu beobachten als in der SPHR-behandelten Gruppe; zu späteren Zeitpunkten steigt die Aktivität weiter kontinuierlich an (Abb. 4). Am 10. Tage entspricht die Aktivität beider Enzyme der der intakten normalen Leber. — Im Laufe der Regeneration sind in keiner einzigen Gruppe zonale enzymatische Unterschiede zu beobachten.

Die Veränderung der Aktivität der alkalischen Phosphatase war in allen drei Versuchsgruppen gleich: Bis zum Versuchsende ist in den Sinusoidendothelzellen eine starke Aktivität sichtbar; am zweiten postoperativen Tage ist die Aktivität der Gallenkanälchen stark erhöht, bei einem Teil der Tiere ist sie diffus, bei einem anderen mehr herdförmig ausgebildet. Im zweiten Fall ist sie periportal am ausgeprägtesten. Am 4. Tage läßt die Aktivität im Bereich der Gallenkanälchen vorübergehend etwas nach, um am 10. Tage wieder anzusteigen; sie bleibt vorwiegend auf die Läppchenperipherie beschränkt.

Besprechung

Aus den vorliegenden Versuchen geht hervor, daß das Serum partiell hepatektomierter Ratten ohne Zweifel einen günstigen Einfluß auf die Regeneration der cirrhotischen Leber ausübt.

Vor allem wird der Ersatz des Parenchymverlustes beträchtlich beschleunigt. Hierfür spricht die fast doppelt so schnelle Regeneration gegenüber den Kontrollen, die außergewöhnlich deutliche Hyperplasie der Parenchymnoduli und die dauerhafte, auch am 10. Versuchstag stark ausgeprägte Mitoseaktivität. Von großer Bedeutung ist weiterhin die Tatsache, daß das Serum partiell hepatektomierter Ratten die in der regenerierenden cirrhotischen Leber normalerweise auftretenden und schon früher beschriebenen regressiven Veränderungen (Nekrose, vacuoläre Degeneration; BARTÓK u. Mitarb., 1963) vollkommen verhüten kann und gleichzeitig eine sehr intensive und anhaltende Vermehrung der basophilen Substanz des Cytoplasmas bzw. der Pyroninophilie gegenüber den Kontrollen bewirkt. Die großen, gestreckten und regelmäßig angeordneten pyroninophilen Granula zeigen die Entwicklung des bei der Eiweißsynthese wichtigen Ergastoplasmas an.

Interessant ist schließlich das Verhalten der oxydativen Enzyme (SDH, Cyt.-O.). Nach Injektionen des SPHR nimmt die Aktivität beider Enzyme in der Leber nichtoperierter, gesunder Tiere ab (BILICZKI, HORVÁTH, HÁMORY, 1963). In unseren Versuchen tritt in der Leber der mit NS behandelten bzw. nicht-behandelten Tiere nach einer anfänglichen Aktivitätsverminderung, ähnlich wie anlässlich unserer früheren Beobachtungen (BARTÓK u. Mitarb., 1962, 1963), eine schnelle Steigerung auf, dagegen bleibt in der Leber der mit SPHR behandelten Tiere die Aktivität der Enzyme fast immer herabgesetzt, was auch bei der normalen regenerierenden Leber der Fall ist. Wenn sich also die Regeneration der cirrhotischen Leber intensiver gestaltet und nicht von regressiven Veränderungen gestört wird, so ist die schnelle Gewebsproliferation — ähnlich wie in der normalen Leber — auch in der cirrhotischen Leber von einer langsamen Aktivitätserhöhung der SDH und der Cyt.-O. begleitet. Dies spricht dafür, daß die in der regenerierenden cirrhotischen Leber zu beobachtende schnelle Aktivitätssteigerung nicht als positives Phänomen anzusehen ist und mit den regressiven Veränderungen im Zusammenhang zu stehen scheint.

Durch SPHR blieben — ebenso wie in der intakten Leber (BILICZKI, HORVÁTH, HÁMORY, 1963) und bei chronischer Tetrachlorkohlenstoffintoxikation (BARTÓK u. Mitarb., 1964) — auch in der regenerierenden cirrhotischen Leber die Veränderungen der Aktivität der alkalischen Phosphatase unbeeinflusst. Wir halten es daher für möglich, daß die Aktivitätssteigerung der alkalischen Phosphatase im Bereich der Gallencapillaren mit der Funktion der Leberzellen (Zellmembran) während der Regeneration zusammenhängt. Wenn sie nämlich als Folge der Störung der extrahepatischen Enzymausscheidung entstände, so wäre in den langsamer regenerierenden cirrhotischen Kontrollebern, in denen außerdem regressive Leberzellveränderungen vorhanden sind, eine intensivere Steigerung der Enzymaktivität zu erwarten, als in den auf die Wirkung des Serums stark regenerierenden cirrhotischen Lebern, in denen keine regressiven Veränderungen zu beobachten sind.

In der ersten zehntägigen Periode der Regeneration ist eine Änderung der cirrhotischen Struktur auch nach der Einwirkung von SPHR nicht zu beobachten; soviel scheint aber — in Anbetracht der überaus hochgradigen Hyperplasie der Pseudolappchen — sicher zu sein, daß das Verhältnis von Parenchym und Bindegewebe erheblich zugunsten des Parenchyms verschoben ist. Um hinsicht-

lich der Möglichkeit der späteren Resolution des Bindegewebes Stellung nehmen zu können, ist die Versuchsdauer zu kurz. Da aber SPHR eine intensive und dauernde Proliferation des regenerierenden Leberparenchyms verursacht, ist im Falle einer weiteren Stimulation auch diese Möglichkeit nicht auszuschließen, um so weniger, als im Laufe der Leberregeneration die Regeneration des Kollagens weit hinter der des Parenchyms zurückbleibt (HARKNESS, 1952, 1957).

Zusammenfassung

Bei Wistarratten wurde mit Tetrachlorkohlenstoff eine Cirrhose hervorgerufen und nach einer subtotalen Hepatektomie die Wirkung des Serums gesunder partiell hepatektomierter Ratten auf die Regeneration der cirrhotischen Leber studiert. Dabei zeigte sich, daß das Serum die Regeneration der cirrhotischen Leber überaus günstig beeinflußt; diese Wirkung äußert sich in einer wesentlichen Beschleunigung der Regenerationsgeschwindigkeit gegenüber den Kontrollen; in einer anhaltenden Mitosestimulation und der Verhütung von regressiven Veränderungen. Die Serumbehandlung beeinflußt die Aktivitätsänderung der Succinodehydrogenase und Cytochromoxydase in dem Sinne, daß sie der Aktivitätsänderung der regenerierenden normalen Leber ähnlich wird. Nicht beeinflußt wird dagegen die Aktivität der alkalischen Phosphatase. Das Serum nichtoperierter, gesunder Tiere übt auf die Regeneration der cirrhotischen Leber weder eine Hemmung noch eine Stimulation aus.

Humoral Influence of the Regeneration of the Cirrhotic Liver

Summary

The authors induced CCl_4 cirrhosis of the liver in rats. After subtotal hepatectomy, the effect of the serum of normal as well as partially hepatectomised rats on the regeneration of cirrhotic liver was examined.

The serum of partially hepatectomized rats was found to promote the regeneration of the cirrhotic liver to a considerable degree. The extent of regeneration was about twice as great as in the controls, as the serum produced a prolonged stimulating effect on mitosis (whereas that of the controls had no such effect), and it prevented the development of regressive changes otherwise observable in regenerating cirrhotic liver. It considerably influenced the changes in succinic dehydrogenase and cytochrome oxidase activities, making them similar to those changes observed in the course of the regeneration of intact liver; the changes in alkaline phosphatase activity were not influenced by the serum.

The serum from normal, non-operated animals neither stimulated nor inhibited the regeneration of the cirrhotic liver and did not exert any influence in the activities of the oxidative enzymes.

Literatur

- BARTÓK, I., É. HORVÁTH, GY. DOMJÁN, and B. KÖRPÁSSY: Histochemical studies of regenerating rat liver in experimental cirrhosis after partial hepatectomy. *Path. et Microbiol. (Basel)* **25**, 809—820 (1962).
- — J. POCSAI u. B. KÖRPÁSSY: Enzymhistochemische Untersuchungen an normalen und zirrhotischen Rattenlebern nach partieller Hepatektomie. *Path. et Microbiol. (Basel)* **26**, 415—426 (1963).
- A. TÓSZEGI, J. POCSAI u. L. POKORNY: Die Wirkung von Serum teilhepatektomierter Ratten auf die chronische Leberschädigung durch Tetrachlorkohlenstoff. *Z. ges. exp. Med.* **138**, 135—140 (1964).

- BILICZKI, F., É. HORVÁTH, and É. HÁMORY: Histochemical changes developing in normal rats treated with serum of hepatectomised rats. *Acta biol. Acad. Sci. hung.* **13**, Suppl. **5**, 63 (1963).
- BURSTONE, M. S.: New histochemical techniques for the demonstration of tissue oxidase (cytochrome oxidase). *J. Histochem. Cytochem.* **7**, 112—122 (1959).
- CANZANELLI, A., R. GUILD, and D. RAPPORT: Pituitary and adreno-cortical relationships to liver regeneration and nucleic acids. *Endocrinology* **45**, 91—95 (1949).
- CASCARANO, M. S., and B. W. ZWEIFACH: Comparative histochemical and quantitative study of adrenal and kidney tissue by tetrazolium technique. *J. Histochem. Cytochem.* **3**, 369—381 (1955).
- HARKNESS, R. D.: Collagen in regenerating liver of the rat. *J. Physiol. (Lond.)* **117**, 257—266 (1952).
- Regeneration of liver. *Brit. med. Bull.* **13**, 87—93 (1957).
- MOFFAT, D. B.: Demonstration of alkaline phosphatase and periodic-acid-Schiff positive material in the same section. *Stain Technol.* **33**, 225—228 (1958).

Dr. I. BARTÓK
Pathologisches Institut der Medizinischen Universität
Szeged/Ungarn, Kossuth Lajos Sugárút 40