

Experimenteller Beitrag zur Speicherungsfähigkeit der Leber nach längerer Hypoxydose

HORST RIEDEL, FRIEDER REINHOLD und WERNER GÖPEL

Pathologisches Institut des Bezirkskrankenhauses „Heinrich Braun“, Zwickau/Sachsen
(Direktor: Prof. Dr. med. habil. H.-G. GÜTTNER)

Eingegangen am 18. Juni 1966

Der Sauerstoffmangel und seine morphologischen Auswirkungen, insbesondere in Beziehung auf das RES, beansprucht auch heute noch morphologisches Interesse, da bisher systematische Untersuchungen über die Funktionsfähigkeit des RES oder bestimmter Teilgebiete unter den Bedingungen der Hypoxydose kaum bekanntgeworden sind. Unsere Untersuchungen gelten daher der Frage, ob sich an Hand des Modells der Speicherungsfähigkeit der Mäuseleber für Trypanblau eine objektivierbare Schädigung nachweisen lässt.

Material und Methode

Verwendet wurden 79 Albinomäuse mit einem Durchschnittsgewicht von 18—20 g. Die Fütterung bestand aus einer Standardkost. 44 Tiere (MTr) wurden mit Na-Malonat behandelt, 35 (Tr) dienten zum Vergleich. Die 44 Tiere (MTr) erhielten eine tägliche Na-Malonatdosis von 120 mg/100 g Körpergewicht in zweimaliger Injektion früh und abends subcutan abwechselnd in beide Oberschenkel. Nach 14tägiger Behandlung mit Na-Malonat wurden diesen sowie den 35 Vergleichstieren (Tr) eine einmalige intraperitoneale Injektion von 1 ml 0,1%iger wäßriger Trypanblau-Lösung verabreicht. Die Tötung der Tiere erfolgte 6, 12, 24, 48, 96 Std sowie 7 Tage später durch Nackenschlag und Ausblutung. Die Na-Malonat-Behandlung wurde auch nach der Trypanblau-Injektion bis zur Tötung in o. a. Dosierung fortgesetzt. Aus Tabelle 1 ist die zeitliche Gruppierung der Tiere zu ersehen, wobei der Zeitpunkt der Tötung von der Trypanblau-Injektion ab gerechnet wird.

Tabelle 1

| Gruppe | Zeitpunkt der Tötung | Anzahl der Tiere (MTr) | Anzahl der Tiere (Tr) |
|--------------|-------------------------|---------------------------|--------------------------|
| 1 | 6 Std | 9 | 6 |
| 2 | 12 Std | 9 | 6 |
| 3 | 24 Std | 11 | 8 |
| 4 | 48 Std | 5 | 5 |
| 5 | 96 Std | 5 | 5 |
| 6 | 7 Tage | 5 | 5 |
| Gesamtanzahl | | 44 | 35 |

Unmittelbar nach der Tötung wurde die Leber in Romeisscher Lösung fixiert und nach 48 Std Fixationsdauer aufgearbeitet. Es wurden Gewebsstückchen aus sämtlichen Abschnitten der Leber entnommen, in Paraffin eingebettet und mit Kernechtrot gefärbt. Bei den Tieren, die nach 48 Std, 96 Std und 7 Tagen getötet worden waren, zählten wir pro Leber 8 Kernenichtrotschnitte aus, die sowohl peripherie als auch zentrale Leberanteile umfaßten. Von jedem Schnitt zählten wir insgesamt 300 Kupffersche Sternzellen aus, insgesamt also 2400 pro Tier. 1200 Sternzellen von 4 Schnitten zählten wir pro Tier von denen aus, die nach 6, 12 und 24 Std getötet worden sind. Der Anteil der gespeicherten und ungespeicherten Zellen pro Schnitt

wurde jeweils tabellarisch erfaßt. Zur statistischen Auswertung der Ergebnisse diente der *t*-Test. Um möglichst genaue und objektive Zahlenangaben zu erhalten, wurden alle Präparate von allen 3 Untersuchern bis zum Wert von 24 Std und die späteren Ergebnisse von 2 von uns getrennt in beliebigen Gesichtsfeldern des gleichen Präparates ausgezählt und der Durchschnittswert als endgültiger Wert ermittelt. Die einzelnen Werte der Untersucher wurden miteinander verglichen, bei Schwankungen von ± 15 Zellen erfolgte eine nochmalige Auszählung. Die Berechnung der Streuung für die gesamten Werte der 3 Untersucher bis 24 Std ergab bei einem Mittelwert von 117 ± 3 , die der 2 Untersucher von 48 Std bis 7 Tage bei einem Mittelwert von 127 ± 11 . Zum Vergleich der Speicherungsintensität diente ein Speicherungsindex (S.I.), der die prozentuale Häufigkeit der gespeicherten Zellen zu den überhaupt ausgezählten, also zu 2400 bzw. 1200 für jedes Tier, ausdrückt.

Ergebnisse

Die Tabelle 2 gibt einen Überblick über den S.I. der Mittelwerte der einzelnen Tiergruppen (s. Tabelle 1), die Streuung (Standardabweichung) und die statistische Sicherung.

Die Werte der einzelnen Tiere und die statistische Rechnung sind tabellarisch zusammengestellt und auf Antrag ersichtlich. Die in Tabelle 2 aufgeführten Zahlen

Tabelle 2

| MTr | | S.I. | Tr | | S.I. |
|---|-----------------------|--------|----------------------|-----------------------|--------|
| Mittelwerte | | | Mittelwerte | | |
| gespeicherte Zellen | ungespeicherte Zellen | | gespeicherte Zellen | ungespeicherte Zellen | |
| Gruppe 1 (6 Std) | | | | | |
| 284 | 916 | 23,7 % | 342 | 858 | 28,5 % |
| $\sigma = \pm 56,2$ | | | $\sigma = \pm 44$ | | |
| Ergebnis: Unterschiede sind nicht gesichert | | | | | |
| Gruppe 2 (12 Std) | | | | | |
| 451 | 749 | 39,5 % | 518 | 681 | 43,1 % |
| $\sigma = \pm 70,6$ | | | $\sigma = \pm 30,8$ | | |
| Ergebnis: Unterschiede sind schwach gesichert | | | | | |
| Gruppe 3 (24 Std) | | | | | |
| 486 | 714 | 40,5 % | 726 | 475 | 60,4 % |
| $\sigma = \pm 37,5$ | | | $\sigma = \pm 30,7$ | | |
| Ergebnis: Unterschiede sind stark gesichert | | | | | |
| Gruppe 4 (48 Std) | | | | | |
| 1187 | 1213 | 49,5 % | 1093 | 1307 | 45,4 % |
| $\sigma = \pm 19,0$ | | | $\sigma = \pm 36,7$ | | |
| Ergebnis: Unterschiede sind gesichert | | | | | |
| Gruppe 5 (96 Std) | | | | | |
| 1309 | 1091 | 54,5 % | 1160 | 1240 | 48,3 % |
| $\sigma = \pm 73,9$ | | | $\sigma = \pm 38,1$ | | |
| Ergebnis: Unterschiede sind gesichert | | | | | |
| Gruppe 6 (7 Tage) | | | | | |
| 973 | 1427 | 40,5 % | 383 | 2017 | 15,9 % |
| $\sigma = \pm 202,2$ | | | $\sigma = \pm 157,1$ | | |
| Ergebnis: Unterschiede sind gesichert | | | | | |

σ = Streuung (Standardabweichung).

zeigen bei den Kontrolltieren (Tr) einen relativ gleichförmigen Anstieg der speichernden Zellen bis zum Zeitpunkt 24 Std nach der Injektion mit 60,4% gespeicherten Sternzellen. Einem leichten Abfall nach 48 Std (45,4%) und einem nochmaligen Anstieg nach 96 Std auf 48,3% folgt dann ein langsames Abklingen, wobei nach 7 Tagen nur noch ein Wert von 15,9% ermittelt werden konnte.

Demgegenüber wiesen die mit Malonat behandelten Tiere (MTr) ein stark unterschiedliches Verhalten bezüglich ihrer Trypanblau-Speicherung auf. Der Speicherungsanstieg war nach 6 und 12 Std gegenüber den Kontrolltieren gering verlangsamt, sehr deutlich aber nach 24 Std (40,5 gegenüber 60,4%).

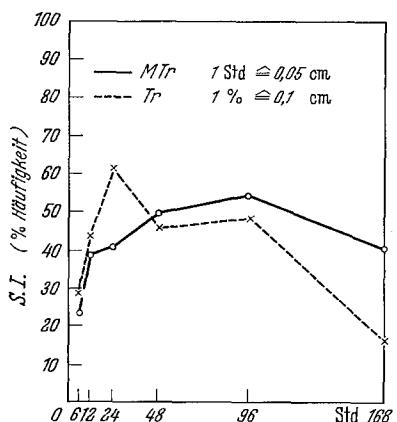


Abb. 1. Intensität und zeitlicher Verlauf der Trypanblauspeicherung malonatgeschädigter und unbehandelter Kontrollmäuse. Senkrecht ist der Speicherungsindex, waagrecht der Zeitpunkt der Auszählung nach der Trypanblauinjektion angegeben

gelagerte Farbstoffpartikel aufwiesen. In beiden Gruppen kamen vereinzelt große, geschwollene Sternzellen vor, die eine homogen-bläuliche Anfärbung erkennen ließen. Hier handelt es sich um eine diffuse Durchtränkung des Plasmas mit Farbstoff. Die teilweise dicht beieinanderliegenden Prozentzahlen zwischen der Malonat- und Kontrollgruppe machen eine Signifikanzberechnung nötig, die nach dem *t*-Test (Student) erfolgte. Aus Tabelle 2 gehen die Ergebnisse der Berechnungen hervor. Die Unterschiede der ersten Gruppe (6 Std) sind nicht gesichert, die der übrigen sind gesichert.

Zusammenfassend reagieren also die Sternzellen der Leber nach längerer Malonatvorschädigung auf ein intraperitoneales Trypanblauangebot verzögert und sind, gemessen an dem Wert der Kontrolltiere, nicht in der Lage, den gespeicherten Farbstoff mit der gleichen Schnelligkeit wieder abzugeben. Die zahlenmäßigen Unterschiede in der Speicherungsfähigkeit zwischen Malonat- und Kontrolltieren sind signifikant.

Diskussion

Wir wählten für unsere Untersuchungen die Form der Hypoxydose durch toxische Fermenthemmung (BÜCHNER, 1957), um einen kontinuierlichen und von zusätzlichen Einflüssen möglichst unabhängigen, über längere Zeit anwendbaren

Schädigungsmodus zu gewährleisten. Wir wissen aus den Untersuchungen von PARDEE und POTTER (1948), daß neben der Blockierung der Succinatdehydrogenase bei höheren Malonatkonzentrationen eine Verminderung der Oxalacetatkonzentration eintritt, so daß zusätzlich die Einführung der C₂-Fragmente, die in der Glykolysekette, beim Fettsäureabbau und im Aminosäurestoffwechsel entstehen, in den Citronensäurecyclus gehemmt wird. Das morphologische Äquivalent der Atmungshemmung durch Malonat ist aus zahlreichen Untersuchungen bekannt (DOERR und BECKER, 1952). Ein besonders eindrucksvolles Bild müßten demnach die Sternzellen der Leber mit ihrer charakteristischen Speicherungsfähigkeit über das Ausmaß einer hypoxidotischen Schädigung vermitteln. Unsere Befunde mit einer deutlich verzögerten Trypanblauaufnahme nach 24 Std unter Malonateinwirkung (40,5 gegenüber 60,4 %) sprechen für eine erhebliche Funktionsschädigung, wenn wir voraussetzen, daß die Farbstoffaufnahme für die Sternzelle mit einem Energieaufwand verbunden ist. Jedenfalls handelt es sich bei der Aufnahme von Trypanblau in die Zelle um eine aktive Permeation, wozu eine besondere Transportenergie benötigt wird (HIRSCH, 1955).

Auch WEISSMANN und GILGEN (1956) fanden bei der Fluorochromierung lebender Ehrlich-Ascites-Tumorzellen mit Acridinorange eine deutliche Abhängigkeit des Färbeergebnisses von energieliefernden Prozessen, insbesondere von der Glykolyse. Aus unseren eigenen Befunden, die eine vereinzelt anzutreffende diffuse Durchtränkung des Plasmas der Sternzellen sowohl bei den Kontrolltieren als auch bei den Malonattieren aufwiesen, lassen sich keine Schlüsse auf eine pathogenetische Bedeutung dieses Vorganges ziehen.

Befunde von SCHMIDT (1962) an den Epithelien der Mäuseniere sprechen dafür, daß das Trypanblau an der Zelloberfläche wieder ausgestoßen wird. Unsere Untersuchungen haben ergeben, daß nach Malonatvorbehandlung das Trypanblau länger in der Sternzelle festgehalten wird, also eine signifikante Ausscheidungsschwäche gegenüber den Kontrolltieren besteht (40,5 gegenüber 15,9 % nach 7 Tagen). Damit werden durch Malonat tiefergreifende Schädigungen am energieliefernden Fermentsystem der Endothelzelle gesetzt, die eine zeitgerechte Wiederabgabe des Farbstoffs verhindern. In diesem Zusammenhange verdiente besonders die Frage Interesse, ob die Phagocytosefähigkeit der Sternzellen gegenüber Bakterien in gleicher Weise gehemmt und der Bakterienabbau verzögert ist. Diese Frage soll Gegenstand weiterer Untersuchungen sein.

Zusammenfassung

Die Funktion des RES der Leber unter den Bedingungen der Hypoxydose wurde tierexperimentell an der Speicherungsfähigkeit der Mäuseleber für Trypanblau nach 14tägiger Malonatvorbehandlung geprüft. Als Vergleichswert diente der Speicherungsindex von 44 malonatvorbehandelten und 35 Kontrolltieren nach 6, 12, 24, 48, 96 Std und 7 Tagen. Dabei ergab sich innerhalb der ersten 24 Std eine signifikante Verzögerung der Trypanblauaufnahme bei den malonatvorbehandelten Tieren; nach 48 Std waren beide Speicherungsindices etwa gleich; die malonatbehandelten Tiere zeigten eine signifikante Verzögerung der Trypanblauabgabe nach 7 Tagen.

Experimental Studies of the Storage Indices of the Liver After Prolonged Hypoxydosis

Summary

The function of the hepatic reticulo-endothelial system during hypoxydosis was studied experimentally by measuring the ability of the mouse liver to store trypan blue after fourteen days of pretreatment with malonate. Forty-four animals pretreated with malonate and 35 control animals gave the indices of storage after 6, 12, 24, 48, 96 hours and seven days. A significantly retarded uptake of trypan blue was observed within the first 24 hours. After 48 hours the storage-indices of both groups were similar. The animals pretreated with malonate showed a significant retardation in the elimination of the trypan blue after 7 days' treatment.

Literatur

BÜCHNER, F.: Die Pathologie der cellulären und geweblichen Oxydationen. Die Hypoxydosen. In: Handbuch der allgemeinen Pathologie, Bd. IV/2. Berlin-Göttingen-Heidelberg: Springer 1957.

CAVALLI-SFORZA, L.: Grundbegriffe der Biometrie. Jena: Gustav Fischer 1965.

DOERR, W., u. V. BECKER: Das morphologische Äquivalentbild der Niere nach experimenteller Vergiftung mit Zyankalium und Malonsäure. Verh. dtsch. Ges. Path. **35**, 222 (1952).

HIRSCH, G. C.: Allgemeine Stoffwechselmorphologie des Cytoplasmas. In: Handbuch der allgemeinen Pathologie, Bd. II/1. Berlin-Göttingen-Heidelberg: Springer 1955.

MASSHOFF, W., u. K. OEHLER: Der Einfluß der Hypothermie auf die Speicherung in der Leber. Beitr. path. Anat. **131**, 184 (1965).

PARDEE, A. B., and V. R. POTTER: Malonate inhibition of oxydations in the Krebs tricarboxylic acid cycle. J. biol. Chem. **178**, 241 (1948).

SCHMIDT, W.: Licht- und elektronenmikroskopische Untersuchungen über die intrazelluläre Verarbeitung von Vitalfarbstoffen. Z. Zellforsch. **58**, 573 (1962).

WEISSMANN, CH., u. A. GILGEN: Die Fluorochromierung lebender Ehrlich-Ascites-Carcinomzellen mit Acridinorange und der Einfluß der Glykolyse auf das Verhalten der Zelle. Z. Zellforsch. **44**, 292 (1956).

Dr. H. RIEDEL
Bezirkskrankenhaus „Heinrich Braun“
x 95 Zwickau/Sachsen, Karl-Keil-Str. 35