

## Vermehrung von Lipofuscin in der Leber als Folge von Phenacetinabusus

Zentrifugation von menschlicher und tierischer Leber im Dichtegradienten

K. BERNEIS und A. STUDER

Physikalische Forschungsabteilung und Abteilung für Experimentelle Medizin  
der F. Hoffmann-La Roche & Co. AG, Basel

Eingegangen am 19. Juli 1967

### *Increase of Lipofuscin in the Liver as Result of Phenacetin Abuse*

#### *Centrifugation of Human and Animal Liver in Density Gradients*

*Summary.* The pigment formed in the liver after phenacetin abuse and after long-range overdose of phenacetin in dogs was concentrated by ultracentrifugation in a density gradient and its density compared to the pigments formed in brown atrophy, in hemosiderosis of the liver, as well as in melanoma.

The density of the phenacetin pigment was found to be 1.20—1.23 g/ml, equal to that of lipofuscin.

*Zusammenfassung.* Das nach Phenacetinabusus beim Menschen und nach langfristiger Phenacetinüberbelastung des Hundes in der Leber gebildete Pigment wurde durch Ultrazentrifugation in einem Dichtegradienten angereichert. Seine Dichte wurde im Vergleich zu den Pigmenten bei brauner Atrophie bzw. Hämosiderose der Leber sowie bei Melanom bestimmt. Die für das sog. Phenacetinpigment ermittelte Dichte von 1,20—1,23 g/ml entspricht derjenigen von Lipofuscin.

Bei langjährigem Phenacetinabusus fiel zunächst eine eigentümliche Verfärbung der Nieren auf (SPÜHLER und ZOLLINGER, 1953; SCHEIDEGGER, 1958; GLOOR, 1965). Auch die Leber kann einen intensiv dunkelbraunen Farbton aufweisen (SCHEIDEGGER, 1958; GLOOR, 1965). Diese Verfärbung ist auf das Vorkommen eines unregelmäßig im Cytoplasma verteilten, gelbbraunen Eisen-negativen Pigmentes zurückzuführen, das aus feinen rundlichen und eckigen Körnchen besteht. Manchmal ist es mit Hämosiderin vergesellschaftet. Die Natur dieses Eisen-negativen Pigmentes fand bald vermehrtes Interesse. Es läßt sich am Tier (Katze, Hund, Ratte) durch Überbelastung mit Phenacetin erzeugen (ABRAHAMS u. Mitarb., 1963; FORDHAM u. Mitarb., 1964; REBER und STUDER, 1965; SCHNITZER und GOLDEN, 1965; WOODARD u. Mitarb., 1965; SCHNITZER und SMITH, 1966).

Die Zusammensetzung dieses Eisen-negativen Pigmentes ist nach SCHNITZER und SMITH (1966) nicht bekannt. Es wurde an Phenacetinabbauprodukte bzw. an ein Melanin-artiges Pigment gedacht, ohne daß hierfür schlüssige Beweise beigebracht werden konnten (MASSHOFF und HOLLMANN, 1962). Allerdings scheinen Phenacetin bzw. Phenacetinabbauprodukte im Pigment vorkommen zu können, wie an der Katze mit Tritium-markiertem Phenacetin gezeigt wurde (REBER und STUDER, 1965). Vergleichende histochemische Reaktionen lassen das

in Frage stehende Pigment nicht mit genügender Beweiskraft als Lipofuscin identifizieren. Es liegen jedoch Untersuchungen vor, die dafür sprechen, daß das sog. Phenacetinpigment zur Gruppe der Abnutzungspigmente gehört. In Fällen von Phenacetinabusus findet sich in Leber und Niere reichlich Eisen-negatives Pigment (RUBENSTEIN u. Mitarb., 1964), das sich elektronenoptisch nicht von Lipofuscin unterscheidet (ABRAHAMS u. Mitarb., 1963). Ob dabei Verwandtschaft mit dem in der Gefäßmuskulatur und dem in den juxta-glomerulären Zellen der Nieren beschriebenen Lipofuscin-ähnlichen Pigment (BIAVA und WEST, 1965) besteht, bleibt zu untersuchen. Ein weiterer Hinweis auf die Lipofuscinnatur des Phenacetinpigmentes ergibt sich aus der Beobachtung, daß am Hund nach langfristiger Belastung mit großen Phenacetindosen in Leber und Niere ein Pigment auftritt, das sich auf Grund seines histochemischen Verhaltens nicht vom spontan vorkommenden Abnutzungspigment alter Hunde unterscheidet (ABRAHAMS u. Mitarb., 1963). Auch die elektronenmikroskopischen Befunde an mit Phenacetin überbelasteten Ratten lassen sich in dieser Richtung deuten (TORHORST u. Mitarb., 1967). Wir bemühten uns nun, durch direkten analytischen Vergleich der in Frage stehenden Pigmente weiterzukommen. Zu diesem Zweck haben wir in der vorliegenden Arbeit den Versuch unternommen, das bei Phenacetinabusus und bei langdauernder Überbelastung des Hundes mit Phenacetin in der Leber auftretende Pigment durch Zentrifugation in einem Dichtegradienten (BRAKKE, 1951) anzureichern, seine Dichte zu bestimmen und mit Lipofuscin, Hämosiderin und Melanin zu vergleichen.

### Material und Methoden

Für unsere Untersuchungen wurden uns durch das Pathologisch-Anatomische Institut der Universität Basel (Vorsteher Prof. A. WERTHEMANN) in verdankenswerter Weise durch P. D. Dr. F. GLOOR Leberproben der folgenden Fälle zur Verfügung gestellt:

Anamnestisch gesicherter Phenacetinabusus, 45jährige Frau (interstitielle Nephritis mit Nierenschumpfung),

Anamnestisch gesicherter Phenacetinabusus, 52jährige Frau (interstitielle Nephritis mit Nierenschumpfung),

Braune Atrophie der Leber, 54jähriger Mann (Lungencarcinom und Pneumonien),

Hämosiderose und Cirrhose der Leber, 70jähriger Mann (Bronchialcarcinom und Herdpneumonien),

Leichte braune Atrophie der Leber, 46jähriger Mann (Coronarsklerose mit rezidivierendem Infarkt),

Primäres Oesophagus-Melanom, 58jährige Frau,

Leber ohne pathologischen Befund, 3 Tage altes Mädchen (Atelektase beider Lungen),

Leber ohne pathologischen Befund, 8jähriger Knabe (Verkehrsunfall),

Leber ohne pathologischen Befund, 49jähriger Mann (frischer Myokardinfarkt).

Außerdem kam Lebermaterial von Hunden mit Phenacetinüberbelastung aus Versuchsreihen von STUDER und SCHÄRER (STUDER und SCHÄRER, 1965) (diese Proben waren während 3 Jahren bei  $-23^{\circ}\text{C}$  gelagert worden) zur Verwendung sowie von zwei Hunden<sup>1</sup> nach Belastung mit Ro 4-1038 (N'-DL-Seryl-N<sup>2</sup>-isopropyl-hydrazin-monohydrochlorid) ( $2 \times 15\text{ mg/kg per os/die}$ , während 6 Wochen) zur Erzeugung einer Siderose der Leber.

Vom tiefgefrorenen Lebermaterial wurden je 0,70 g entnommen und mit 0,5 ml einer auf pH 7,7 eingestellten wäßrigen Lösung von 2% Natriumpyrophosphat und 5% Zucker im Apparat nach PORTER verrieben, mit derselben Lösung auf 5 g aufgefüllt und während 6 min mit dem Dispergiergerät Polytron PT 10/OD<sup>2</sup> unter Kühlung mit Eiswasser homogenisiert.

<sup>1</sup> Versuche Dr. K. SCHÄRER in unseren Laboratorien.

<sup>2</sup> Hersteller: Kinematica GmbH, Luzern, Schweiz.

1 ml Homogenat wurde auf 4 ml der in einem Zentrifugenröhrchen befindlichen Zuckerlösung mit von unten nach oben abnehmender Dichte überschichtet. Der Dichtegradient kam unter Verwendung des Buchler-Dichtegradientensystems<sup>3</sup> mit Hilfe zweier Zuckerlösungen verschiedener Konzentration zustande, indem die leichtere Lösung langsam zu der in der Mischkammer vorgelegten schwereren Lösung gefügt und das Gemisch kontinuierlich gleichzeitig in drei Zentrifugenröhrchen gepumpt wurde. Zentrifugiert wurde mit der analytischen Spinco-Ultrazentrifuge, Modell E<sup>4</sup>, unter Verwendung des Schwingbecher-Rotors SW 39, bei einer Tourenzahl von 39 460 Umdrehungen pro Minute bei 4° C während 90 min. Während der Zentrifugation sedimentierten die im Homogenat befindlichen Zellbestandteile nur so weit, bis sie die Zuckerlösung ihrer eigenen Dichte erreicht hatten. Auf diese Weise wurden die im Homogenat befindlichen Pigmente angereichert. Gleichzeitig konnte durch Dichtebestimmung der Zone, in welcher diese Anreicherung erfolgte, der Dichtebereich der Pigmente ermittelt werden.

### Ergebnisse

Für die in Abb. 1 dargestellten Versuchsergebnisse wurden zur Herstellung des Dichtegradienten eine 60 % ige Zuckerlösung mit einer Dichte von 1,29 g/ml und eine 30 % ige Zuckerlösung mit einer Dichte von 1,13 g/ml bei 4° C verwendet.

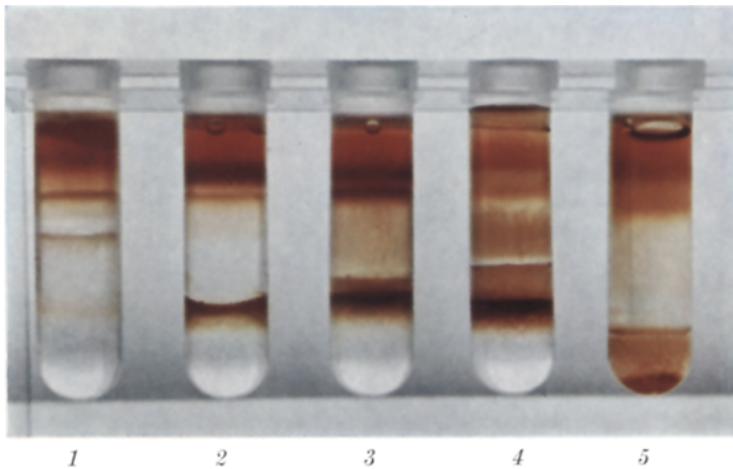


Abb. 1. Verteilung von Leberhomogenat im Dichtegradienten 1,29—1,13 nach 90minütiger Zentrifugation bei 39 460 U/min. 1 Leber ohne pathologischen Befund (3 Tage altes Mädchen); 2 leichte braune Atrophie (46jähriger Mann); 3 braune Atrophie (54jähriger Mann); 4 Phenacetinabusus (45 jährige Frau); 5 Hämosiderose und Cirrhose der Leber (70jähriger Mann)

Auch nach der Zentrifugation blieb die Linearität des Gradienten in den unteren 3 ml erhalten. Die Dichte der Pigmente wurde durch Dichtebestimmung der nach einem Leerversuch — Zentrifugation mit Überschichtung der Pufferlösung ohne Leberhomogenat — am entsprechenden Ort des Zentrifugenröhrchens befindlichen Zuckerlösung bestimmt.

Beim 2., 3. und 4. Zentrifugenröhrchen fällt im unteren Drittel eine braun bis schwarzbraun gefärbte Zone auf. Experimentell wurde ermittelt, daß sich diese Zone in einem Dichtebereich von 1,20—1,23 g/ml befindet. Braunes Pigment, das im selben Dichtebereich liegt, wurde auch in der Leber der 53jährigen Frau mit

<sup>3</sup> Buchler Instruments Inc., Fort Lee, N.J., U.S.A.

<sup>4</sup> Spinco Division of Beckman Instruments Inc., Palo Alto, Kalif., U.S.A.

Phenacetinabusus, ferner bei einem weiteren Abusus-Fall, sowie in den Lebern von Hunden festgestellt, welchen während 95 Wochen 450 mg/kg pro Tag bzw. 225 mg/kg pro Tag Phenacetin oral verabreicht worden war (STUDER und SCHÄRER, 1965).

Bei der Leber des Neugeborenen — Röhrchen 1 — (wie auch des 8jährigen Knaben, des 49jährigen Mannes mit frischem Myokardinfarkt und eines Kontrollhundes) fehlt diese Zone. Im Falle der Hämosiderose — Röhrchen 5 — ist sie nur sehr schwach vorhanden. Hingegen ist in diesem Fall sowie bei zwei Hunden mit experimenteller Siderose der Leber (Ro 4-1038) eine schwere Fraktion fest-

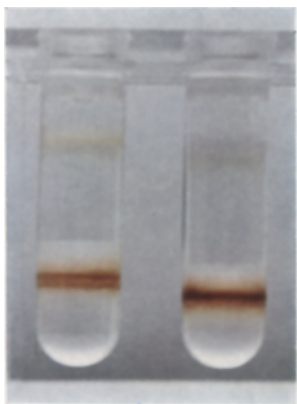


Abb. 2. Verteilung der durch Zentrifugation isolierten und rehomogenisierten „braunen Fraktion“ im Dichtegradienten 1,29—1,13 g/ml nach 90minütiger Zentrifugation bei 39460 U/min. Links: braune Atrophie; rechts: Phenacetinabusus

zustellen, welche sich am Boden des Zentrifugenröhrchens abgesetzt hatte. In diesem Bodensatz dürfte Hämosiderin angereichert sein, dessen hohe Dichte von 1,6—2,6 g/ml bekannt ist. Der Dichtebereich der braunen bis schwarzbraunen Zone im 2., 3. und 4. Röhrchen entspricht derjenigen von Lipofuscin gemäß Angaben von STREHLER und MILDVAN (1962).

Zwecks Isolierung der schwarzbraunen Zone wurde je 1 ml der in der beschriebenen Weise erhaltenen Homogenate der einen Leber mit brauner Atrophie (54jähriger Mann) sowie der Leber nach Phenacetinabusus (45jährige Frau) über 4 ml eines Zuckergradienten mit Dichtebereich von 1,21—1,13 geschichtet und während 2 Std bei einer Tourenzahl von 39460 U/min zentrifugiert.

Dabei sedimentierte die schwarzbraune Zone bis zum Boden des Röhrchens und konnte durch vorsichtiges Absaugen des Überstandes abgetrennt werden. Sie wurde anschließend in 1,5 ml der auf pH 7,7 eingestellten Lösung von 2% Natriumpyrophosphat und 5% Zucker dispergiert und sodann während 6 min in der oben beschriebenen Weise mit dem Homogenisator Polytron behandelt.

Die zwei Homogenate wurden über 4 ml der in den Zentrifugenröhrchen vorgelegten Zuckergradienten mit Dichtebereich 1,29—1,13 geschichtet und wie beim ersten Versuch während 90 min bei einer Tourenzahl von 39460 U/min zentrifugiert. In Abb. 2 sind die Röhrchen nach Beendigung der Zentrifugation wiedergegeben.

Die nach Homogenisation rezentrifugierten braunen Fraktionen befinden sich wiederum im Dichtebereich 1,20—1,22 g/ml (braune Atrophie) bzw. im Bereich 1,20—1,23 g/ml (Phenacetinabusus). Das Melanin (Oesophagus-Melanom) wies eine höhere Dichte als 1,29 g/ml auf.

### Diskussion

Den Ergebnissen ist zu entnehmen, daß die Dichte des bei Phenacetinabusus in der Leber gebildeten braunen Pigmentes in demselben Bereich liegt wie die-

jenige des in der Leber mit brauner Atrophie gefundenen Pigmentes. Erwartungsgemäß fehlt dieses Pigment in der Leber des Neugeborenen. Auch in der Leber mit Hämosiderose und Cirrhose ist kein braunes Pigment dieses Dichtebereiches nachweisbar. Diese Beobachtung entspricht dem Befund von BACHMANN (1953), wonach bei Lebercirrhose eine Verminderung der Lipofuscinablagerung festzustellen ist.

Die Dichte der bei brauner Atrophie oder nach Phenacetinabusus gebildeten braunen Pigmente liegt wesentlich niedriger als diejenige von Proteinen, welche eine Dichte von ungefähr 1,4 g/ml aufweisen. Bei natürlichen Melaninen handelt es sich um Schwermetall-haltige Kondensationsprodukte von Proteinen mit Polymerisaten aromatischer Aminosäuren, deren Dichte höher als 1,4 g/ml liegt. Daher kann ausgeschlossen werden, daß es sich beim vorliegenden Pigment um Melanin-artige Körper handelt. Dies konnte durch Zentrifugation des Homogenates von Melanomgewebe (primäres Oesophagus-Melanom) im Dichtegradienten 1,29—1,13 unter den oben beschriebenen Bedingungen bestätigt werden, wobei sich das in großer Menge vorhandene schwarze Melanin am Boden des Zentrifugenröhrchens ansammelte.

Auf Grund seiner Dichte von 1,20—1,23 g/ml läßt sich das aus Lebern bei Phenacetinabusus und bei Überbelastung des Hundes mit Phenacetin angereicherte Pigment in die Gruppe der Lipoproteine einordnen. Es findet sich nach der Zentrifugation im selben Dichtebereich wie das Pigment bei brauner Atrophie der Leber. Die festgestellten geringen Dichteunterschiede können auf die Uneinheitlichkeit des Lipofuscins zurückgeführt werden (STREHLER und MILDVAN, 1962; BJÖRKERUD, 1964). Es ist bekannt, daß Atrophie von parenchymatösen Organen, insbesondere von Herzmuskelfasern, zu vermehrter Bildung von Lipofuscin führt. STREHLER und MILDVAN (1962) geben den Dichtebereich für Lipofuscin mit 1,17—1,22 an. Bekannt ist ferner die hohe mechanische Widerstandsfähigkeit der Lipofuscin-granula (BJÖRKERUD, 1964), was auch für die durch uns isolierten Pigmentfraktionen zutrifft. Auf Grund dieser Feststellungen scheint der Schluß gerechtfertigt, daß es sich bei dem durch uns angereicherten braunen Pigment aus Lebern nach Phenacetinabusus um das gleiche Pigment handelt, das bei brauner Atrophie vorkommt, um Lipofuscin.

Über Versuche zur weiteren Charakterisierung soll in einer späteren Mitteilung berichtet werden.

### Literatur

- ABRAHAM, C., A. WHEATLEY, A. H. RUBENSTEIN, and D. STABLES: Hepatocellular lipofuscin after excessive ingestion of analgesics. *Lancet* **1963/II**, 621.
- BACHMANN, K. D.: Über das Lipofuscin der Leber. *Virchows Arch. path. Anat.* **323**, 133 (1953).
- BIAVA, C., and M. WEST: Lipofuscin-like granules in vascular smooth muscle and juxta glomerular cells of human kidneys. *Amer. J. Path.* **47**, 287 (1965).
- BJÖRKERUD, S.: Isolated lipofuscin granules — a survey of a new field. *Advanc. Gerontol. Res.* **1**, 257 (1964). — (S. dort weitere Literaturangaben.)
- BRÄKKE, M. K.: Density gradient centrifugation: a new separation technique. *J. Amer. chem. Soc.* **73**, 1847 (1951).
- FORDHAM III, C. C., W. D. HUFFINES, and L. G. WELT: Phenacetin induced renal lesions in the rat. *Clin. Res. Proc.* **12**, 251 (1964).
- GLOOR, F.: Some morphologic features of chronic interstitial nephritis (chronic pyelonephritis). Patients with analgesic abuse. In: *Progress in pyelonephritis*, p. 287, ed. by KASS. Philadelphia: Davis 1965.

- MASSHOFF, W., u. G. HOLLMANN: Die interstitielle Nephritis. Internist (Berl.) **3**, 629 (1962). (S. dort weitere Literaturangaben.)
- REBER, K., u. A. STUDER: Autohistoradiographischer Nachweis von Phenacetin oder Phenacetin-Abbauprodukten im Leber- und Nierenpigment Phenacetin-belasteter Katzen. Med. Pharmacol. exp. **13**, 257 (1965).
- RUBENSTEIN, A.H., C. ABRAHAMS, N.W. LEVIN, and D.P. STABLES: Acetophenetidin nephritis and papillary necrosis. Arch. intern. Med. **113**, 378 (1964).
- SCHEIDEGGER, S.: Pathologisch-anatomischer Diskussionsbeitrag zur Frage der sog. Phenacetinschrumpfniere. In: Symposion über Phenacetinabusus und Nierenschädigung, S.14. Stuttgart: Georg Thieme 1958.
- SCHNITZER, B., and A. GOLDEN: The effects of phenacetin and its contaminant on the kidney of the rat. Amer. J. Path. **46**, 917 (1965).
- , and E.B. SMITH: Localization of hemosiderin. Arch. Path. **81**, 402 (1966).
- SPÜHLER, O., u. H.U. ZOLLINGER: Die chronisch-interstitielle Nephritis. Z. klin. Med. **151**, 1 (1953).
- STREHLER, B.L., and A.S. MILDVAN: Studies on the chemical properties of lipofuscin age pigment. In: Biological aspects of aging (ed. N.W. SHOCK), p. 174. New York: Columbia University Press 1962. — (S. dort weitere Literaturangaben.)
- STUDER, A., u. K. SCHÄRER: Langfristige Phenacetinbelastung am Hund mit Berücksichtigung der Leber- und Nierenpigmentierung. Schweiz. med. Wschr. **95**, 933 (1965).
- TORHORST, J., H.P. ROHR, H.U. ZOLLINGER, A. STUDER u. J.P. TRANZER: Ultrastrukturelle Veränderungen der proximalen Tubuluszelle von Rattennieren nach Phenacetinüberbelastung. Virchows Arch. path. Anat. **342**, 70 (1967).
- WOODARD, G., K.F. POST, K.O. COCKRELL, and M.T.I. CRONIN: Phenacetin: long term studies in rats and dogs (Abstr.). Toxicol. appl. Pharmacol. **7**, 503 (1965).

Prof. Dr. A. STUDER  
CH-4002 Basel/Schweiz  
Grenzacherstraße 124