

Elektronenmikroskopische Untersuchungen der Leber von Maus und Ratte bei akuter Phalloidin-Vergiftung

F. MILLER und O. WIELAND

Abteilung für Elektronenmikroskopie des Pathologischen Institutes der Universität München
und Institut für Klinische Chemie des Städtischen Krankenhauses München-Schwabing

Eingegangen am 5. Juni 1967

Electron Microscopic Studies of Mouse and Rat Hepatic Cells after Acute Phalloidin Poisoning

Summary. The fine structure of liver cells was investigated (a) in mice at time points between 10 and 90 mins after subcutaneous injection of 10 γ phalloidin/g body weight, and (b) in the isolated perfused livers of rats at time points between 10 and 100 mins after addition of 20 mg phalloidin to the perfusate. The structural alterations were identical in both experiments. The cisternae of the endoplasmic reticulum were dilated in the early stages of intoxication and later turned into large vacuoles which were free of fat but contained fibrin; in the later stages all cells became vacuolated. Autolytic vacuoles sequestering cytoplasmic constituents appeared later than the changes of the reticulum. Foci of cytoplasmic necrosis, partially surrounded by a membrane, were found in the vicinity of autolytic vacuoles. The structure of nuclei and mitochondria remained unaltered. The structural changes were not specific for phalloidin poisoning. Peribiliary lysosomes were not involved in the vacuolization of the endoplasmic reticulum. Foci of cytoplasmic necrosis in the vicinity of autolytic vacuoles could have been caused by leakage of hydrolases through the damaged membrane of the autolytic vacuoles.

Zusammenfassung. Die Struktur der Leberzellen wurde an der Maus nach subcutaner Injektion von 10 γ Phalloidin/g Körperfge wicht und an der isolierten, durchströmten Leber von Ratten nach Zusatz von 20 mg Phalloidin zur Perfusionslösung zu Zeitpunkten zwischen 10 und 100 min nach der Vergiftung elektronenmikroskopisch untersucht.

Die Strukturveränderungen sind in beiden Versuchsanordnungen gleich. Die Vergiftung führt über eine zunehmende Erweiterung der Zisternen des endoplasmatischen Reticulums zum Auftreten großer, fettfreier, fibrinhaltiger Vacuolen, die schließlich alle Leberzellen durchsetzen. Etwas später finden sich autolytische Vacuolen, in denen Cytoplasmabestandteile eingeschlossen werden. In der Umgebung autolytischer Vacuolen treten herdförmige Cytoplasmanekrosen auf, die teilweise durch eine Membran abgegrenzt werden. Die Kern- und Mitochondrienstruktur bleibt intakt.

Die Strukturveränderungen sind nicht spezifisch für die Phalloidinwirkung. Die peribiliären Lysosomen sind an der Vacuolisierung des endoplasmatischen Reticulums nicht beteiligt; umschriebene Cytoplasmanekrosen in der Umgebung autolytischer Vacuolen könnten jedoch durch einen Austritt von Hydrolasen nach Schädigung der Membran der autolytischen Vacuolen verursacht sein.

Trotz umfangreicher Bemühungen ist der primäre Wirkungsmechanismus der hepatotropen Giftstoffe des Knollenblätterschwamms (*Amanita phalloides*) noch immer nicht bekannt. Aus tierexperimentellen Untersuchungen mit dem kristallisierten Cyclopeptid Phalloidin (T. WIELAND und SCHÖN, 1955) ergaben sich Hinweise, daß sich der Angriffspunkt des Toxins nicht so sehr gegen die

Kerne und Mitochondrien, sondern vielmehr auf das Cytoplasma der Leberzelle richtet (MATSCHINSKY et al., 1960). Versuche mit radioaktiv markiertem ^{35}S -Phalloidin zeigten, daß der Giftstoff von den Lebermicrosomen stärker als von den übrigen Zellbestandteilen gebunden wird (REHBINDER et al., 1963). Diese Beobachtung in Verbindung mit dem Nachweis einer Hemmung der Proteinsynthese isolierter Lebermicrosomen phalloidinvergifteter Tiere (v. d. DECKEN et al., 1960) lenkte die Aufmerksamkeit weiter in die Richtung des endoplasmatischen Reticulums. Auf der anderen Seite wurde an die Möglichkeit einer Aktivierung lysosomaler Enzyme als Prinzip der Giftwirkung gedacht, wofür das Auftreten von Autolyseprodukten des Purin- und Eiweißstoffwechsels im Serum phalloidinvergifteter Tiere einen experimentellen Anhaltspunkt zu liefern schien (MATSCHINSKY und WIELAND, 1960). Die vorliegende Arbeit wurde mit dem Ziel unternommen, unter Einsatz der Elektronenmikroskopie weitere Aufschlüsse über den primären Ort der Giftwirkung zu gewinnen. Über einen Teil der im folgenden ausführlich beschriebenen Ergebnisse ist schon kurz in anderem Zusammenhang berichtet worden (O. WIELAND, 1964). Inzwischen liegen auch elektronenmikroskopische Untersuchungen anderer Autoren bei experimenteller Phalloidin- und Amanitinvergiftung vor (FIUME und LASCHI, 1965).

Material und Methoden

Die Versuche wurden an Mäusen und an der isolierten, durchströmten Leber von Ratten vorgenommen.

Fünf weißen Mäusen wurden in Äthernarkose kleine Stücke aus dem rechten Leberlappen 10, 20, 30, 50 und 90 min nach Injektion von 10 μ Phalloidin¹ pro Gramm Körpergewicht entnommen; mehrere unbehandelte Tiere dienten als Kontrolle.

Die isolierte Leber von Ratten wurde im rezirkulierenden System von der Vena portae aus mit einer Aufschwemmung gewaschener Rindererythrocyten in albuminhaltiger Tyrode-Lösung perfundiert. Die Präparation und experimentelle Anordnung ist an anderer Stelle ausführlich beschrieben (MATSCHINSKY und WIELAND, 1960). Gewebsproben aus dem rechten Leberlappen wurden 30 min nach Anlaufen der Durchströmung, sowie 10, 30 und 60 min nach der ersten Excision entnommen.

In einem weiteren Versuch wurden Gewebsproben aus dem rechten Leberlappen 30 min nach Anlaufen der Durchströmung sowie 10, 20, 30, 40, 60 und 100 min nach Zusatz von 20 mg Phalloidin in physiologischer Kochsalz-Lösung entnommen.

Die Gewebsproben wurden in eiskaltem 1% Osmiumtetroxyd in 0,1 M Natriumphosphat-Puffer, pH 7,4, 2 Std fixiert, über Äthanol entwässert und über Propylenoxyd in Epon 812 (LUFT, 1961) eingebettet. 0,5 μ dicke Schnitte für lichtoptische Untersuchungen wurden mit 0,1% alkalischem Toluidinblau (TRUMP et al., 1961) gefärbt. Dünnschnitte wurden auf einem LKB-Ultrotom mit Diamantmessern geschnitten, auf befilmt (Kollodium und Kohle) oder unbefilmte Kupfernetze aufgefangen, 10—30 min mit 2% wäßrigem Uranylacetat und anschließend 5—10 min mit Bleicitrat (REYNOLDS, 1963a) kontrastiert und in einem Siemens Elmiskop I (80 KV, 50 μ Molybdän-Objektiv-Aperturblenden) untersucht.

Von jedem Versuch wurden 3—5 Blöcke, insgesamt 46, geschnitten; über 2000 Aufnahmen wurden ausgewertet.

Ergebnisse

I. Mausleber

In Übereinstimmung mit früheren Beobachtungen (MATSCHINSKY et al., 1960) tritt bei akuter Phalloidinvergiftung eine zunehmende Vacuolisierung des Cyto-

¹ Herrn Prof. Dr. THEODOR WIELAND, Frankfurt, danken wir für die Überlassung von kristallisiertem Phalloidin.

plasmas der Leberzellen auf. Die Vacuolen erscheinen zuerst an der Läppchenperipherie in einzelnen Zellen und erfassen mit zunehmender Dauer der Giftwirkung unter Fortschreiten gegen das Läppchenzentrum alle Zellen des Läppchens; schließlich kommt es zu einer weitgehenden Zerstörung des Zellgefüges mit Auftreten von umfangreichen Blutungen. Der Inhalt der Vacuolen ist fettfrei (MATTSCHINSKY et al., 1960) und nicht oder nur schwach mit Toluidinblau anfärbar.

10 min nach Phalloidingabe ist die Feinstruktur der Leberzellen gegenüber den Kontrollen nicht verändert. Die ersten Abweichungen vom normalen Bau betreffen das endoplasmatische Reticulum und sind 20—30 min nach Phalloidingabe, aber nicht synchron in allen Leberzellen, festzustellen. Die Cisternen des rauhen und glatten endoplasmatischen Reticulum sind unregelmäßig erweitert, so daß stellenweise kleine, bis $0,5 \mu$ große Vacuolen entstehen (Abb. 1). Das Glykogen ist zu diesem Zeitpunkt deutlich verringert. 30 min nach Phalloidingabe treten bereits 3—7 μ große, z. T. nahe aneinander liegende und durch eine schmale, oft nur $30 \text{ m}\mu$ dicke Cytoplasmabrücke getrennte oder gekammerte Vacuolen (Abb. 2) auf. Die begrenzende, im Mittel $\sim 65 \text{ \AA}$ dicke Membran ist nicht von Ribosomen besetzt und zeigt stellenweise einen dreischichtigen Bau mit einer mittleren hellen Schicht und zwei äußeren dunklen Schichten (Abb. 2, Einsatz). Die Membran verläuft wellig und zeigt vielfache, fingerförmige, gegen das umgebende Cytoplasma gerichtete Ausstülpungen, in deren Nachbarschaft bläschenförmige Anschnitte des rauhen oder glatten endoplasmatischen Reticulums liegen (Abb. 2). Daraus entsteht der Eindruck, als ob die Vacuolenmembran durch Einbeziehung von Teilen des endoplasmatischen Reticulums an Umfang zunähme.

Der Inhalt der Vacuolen ist feinflockig, aber von wechselnder Dichte. Wenn eine Vacuole mit dichterem Inhalt durch ein Cytoplasmaseptum von einer solchen mit lockerem Inhalt getrennt wird, so ist die Trennwand immer konvex gegen die Vacuole mit dem lockeren Inhalt vorgebuchtet (Abb. 3). Daraus kann man schließen, daß der Druck in Vacuolen mit dichterem Inhalt höher ist als in Vacuolen mit lockerem Inhalt. Nach Ruptur der Cytoplasmasepten entstehen große, gekammerte Vacuolensysteme, die in den späteren Stadien (50 und 90 min nach Phalloidingabe) die meisten Leberzellen schwammartig durchsetzen.

In den späteren Vergiftungsstadien, ab 30 min, treten im Vacuoleninhalt in steigendem Maße bandartige Züge eines elektronendichten Materials auf, die bei entsprechender Lage zur Schnittebene eine deutliche Hauptperiode von $\sim 210 \text{ \AA}$ zeigen (Abb. 4) und die daher Fibrin darstellen.

Eine bevorzugte Lage der Vacuolen innerhalb der Leberzelle läßt sich in den Frühstadien der Vergiftung nicht feststellen. Es ergab sich kein Anhaltspunkt für eine Bildung der Vacuolenmembran aus der Zellmembran, wie dies bei Hypoxie (HANZON, 1960), Allylalkoholvergiftung (HÜBNER, 1965) und experimenteller Stauungsleber (DAVID et al., 1965) vermutet wurde. In den späteren Vergiftungsstadien liegen die Vacuolen sowohl perinuklear, als auch in der Nähe der Zelloberfläche; häufig sind sie vom Disséschen Raum nur durch eine wenige $\text{m}\mu$ breite Cytoplasmabrücke getrennt. Obwohl eine direkte Verbindung zwischen Vacuolen und Disséschem Raum am untersuchten Material nicht nachgewiesen werden konnte, muß man eine solche annehmen, da das Auftreten

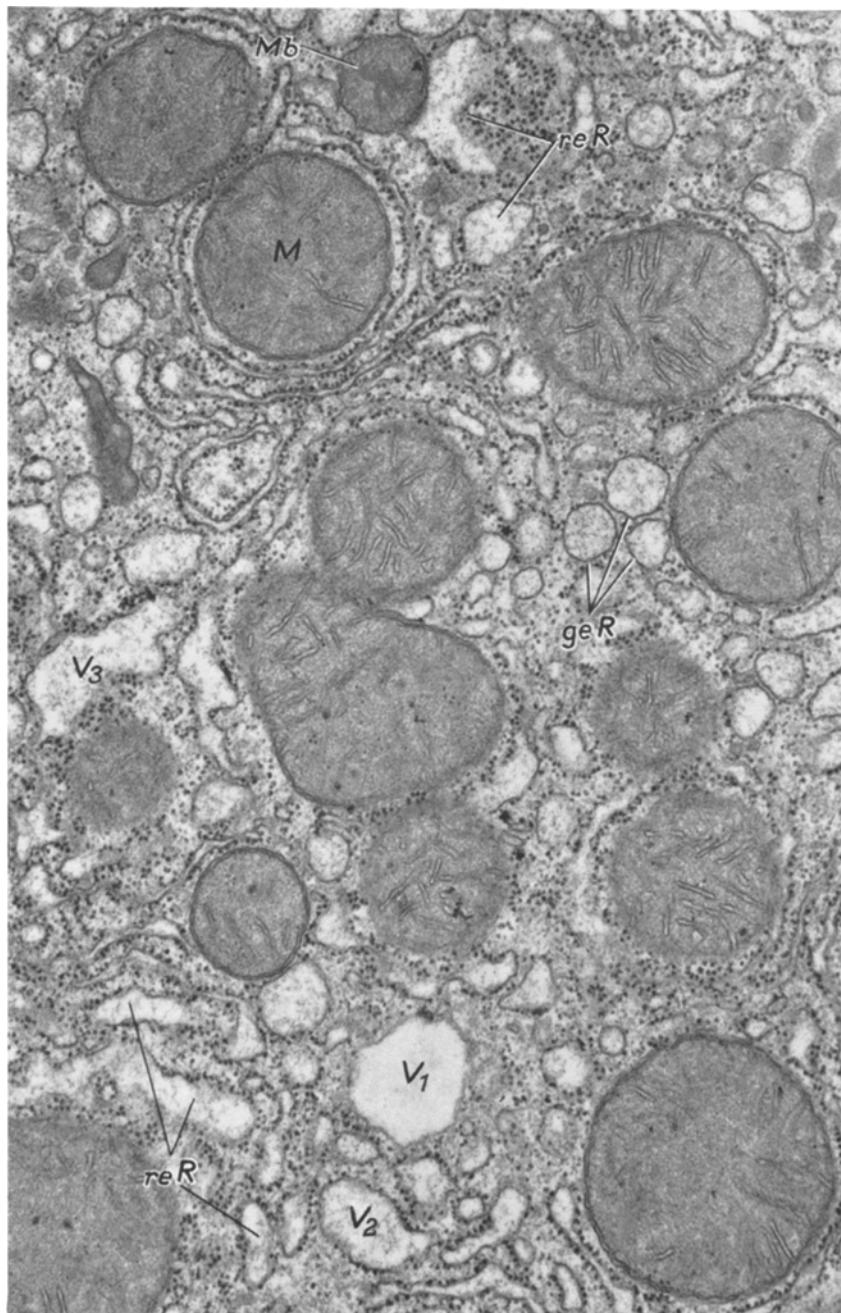


Abb. 1. Leberzelle der Maus 20 min nach Phalloidinjektion. Erweiterung der Zisternen des rauen (*reR*) und glatten (*geR*) endoplasmatischen Reticulums mit Bildung kleiner Vacuolen (V_1 – V_3), deren Wand (V_2 , V_3) zum Teil mit Ribosomen besetzt ist. Mitochondrien (*M*) nicht verändert. Rauhes endoplasmatisches Reticulum in der Umgebung des Mitochondriums (*M*) nicht erweitert. *Mb* Microbody. (242/65). 31000:1

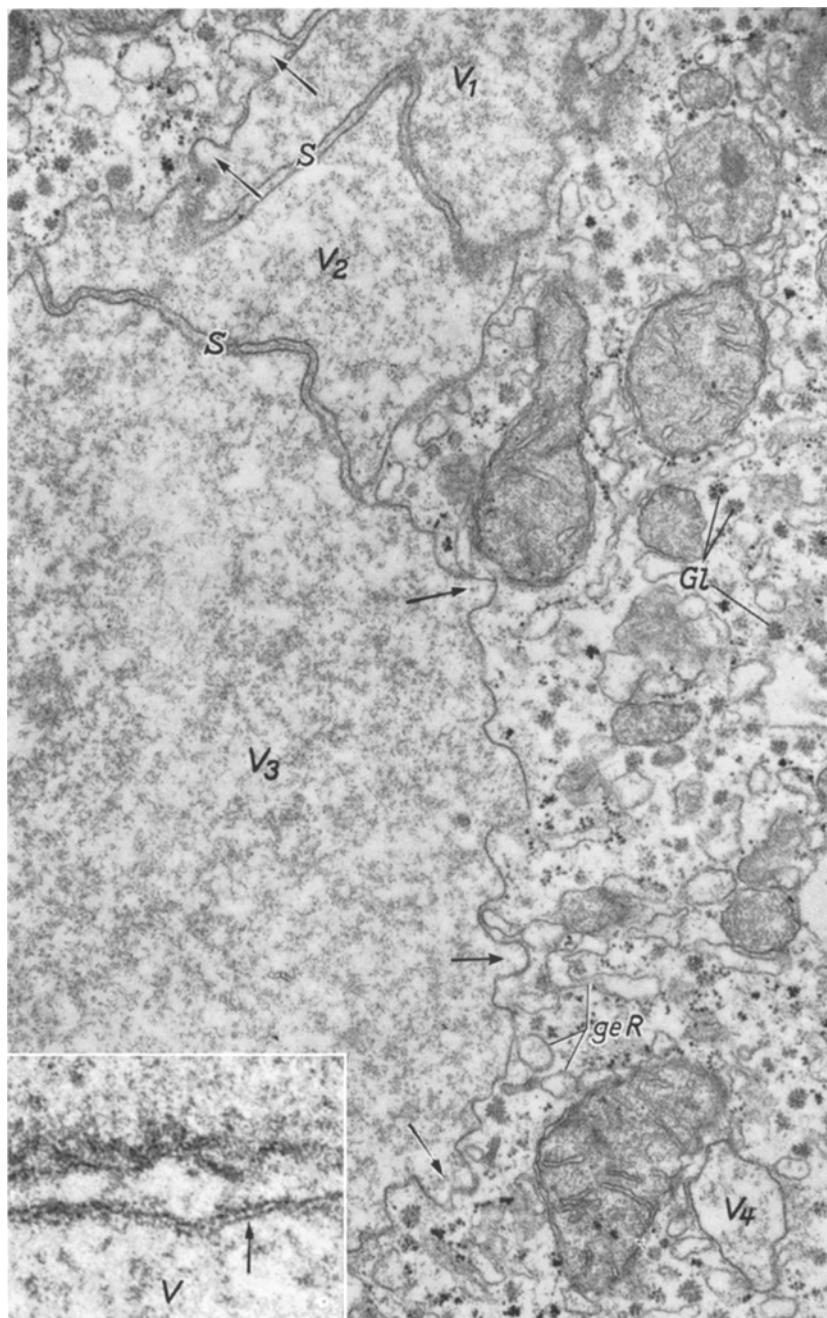


Abb. 2. Leberzelle der Maus 30 min nach Phalloidininjektion. Drei große, durch dünne Septen (*S*) getrennte Vacuolen (*V*₁—*V*₃) mit feinnetzigem Inhalt in einem Glykogenhaltigen (*Gl*) Abschnitt der Zelle. Fingerförmige Ausstülpungen der Vacuolenmembran (↓) zum Teil in enger Nachbarschaft zu Anschnitten des glatten Reticulums (*geR*), das stellenweise erweitert (*V*₄) ist. (220/65). 27000:1. Einsatz: Die ~65 Å dicke Membran (↓) einer Vacuole (*V*) erscheint stellenweise dreischichtig. (198/65). 200000:1

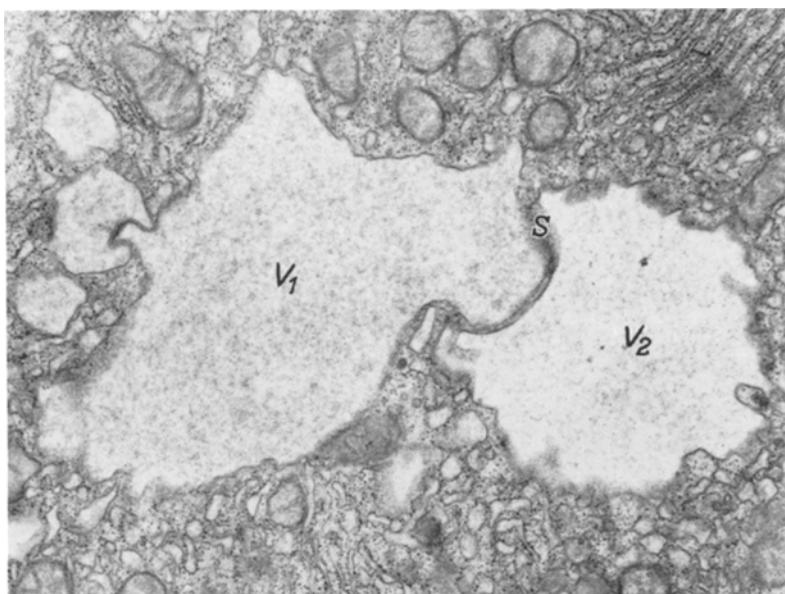


Abb. 3. Leberzelle der Maus 30 min nach Phalloidininjektion. Konvexe Vorbuchtung des Cytoplasmaseptums (S) von der Vacuole mit dichterem Inhalt (V_1) gegen die Vacuole mit lockarem Inhalt (V_2). (1531/64). 13000:1

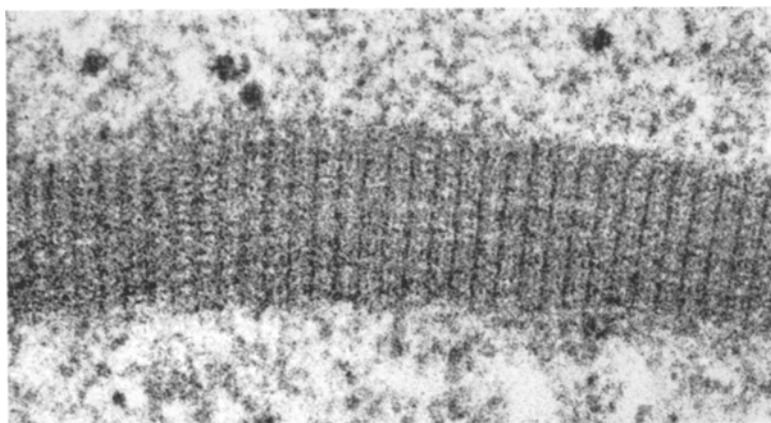


Abb. 4. Leberzelle der Maus 90 min nach Phalloidininjektion. Ausschnitt aus bandartigem Material im Vacuoleninhalt mit der für Fibrin typischen Hauptperiode von ~ 210 Å. (442/65). 150000:1

von Fibrin in den Vacuolen ohne Verbindung zur Blutbahn nicht erklärt werden könnte.

30 min nach Phalloidin-Gabe treten autolytische Vacuolen (Abb. 5) [Cytolyso- men (NOVIKOFF, 1960); fokale Cytoplasmadegradation (HRUBAN et al., 1963)] auf, die in den Leberzellen der Kontrolltiere nicht gefunden wurden. Anfänglich unveränderte oder nur leicht verdichtete Organellen des Cytoplasmas, wie Mitochondrien und endoplasmatisches Reticulum, sind durch eine Membran allseitig vom Rest des Cytoplasmas sequestriert. Die Bildung dieser Membran lässt sich

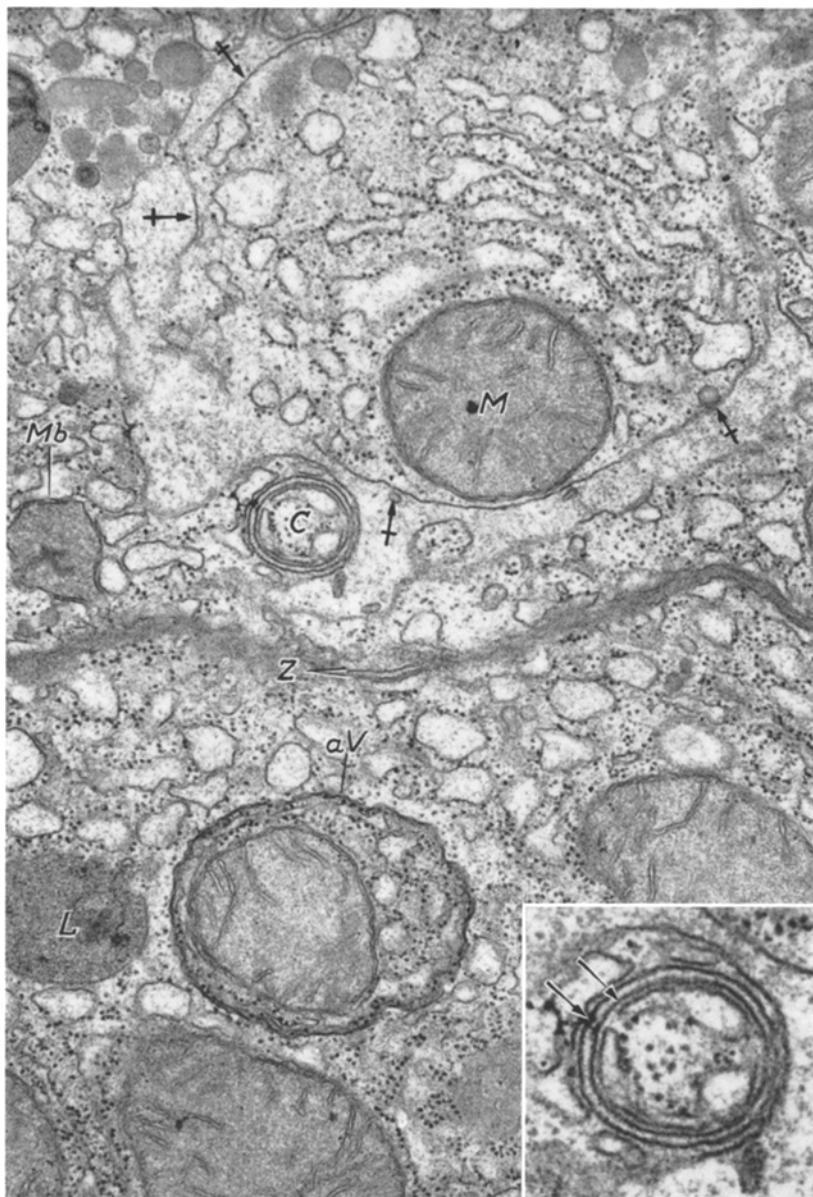


Abb. 5. Ausschnitt aus zwei Leberzellen der Maus 30 min nach Phalloidininjektion. Zellmembran (Z) in Bildmitte zum Teil tangential geschnitten. In der unteren Zelle eine autolytische Vacuole (aV), in der ein Mitochondrium und rauhes endoplasmatisches Reticulum sequestriert sind. Links davon ein Lysosom (L). In der oberen Zelle ist ein kleiner Cytoplasma-
bereich (C) durch eine gepaarte Isolierungsmembran (↓↓) vollständig umfaßt (vgl. Ausschnitt rechts unten). Darüber ein Areal mit Mitochondrium (M) und rauhem endoplasmatischem Reticulum, das durch eine Membran (↑) zum Teil isoliert ist. Mb Microbody. (232/65).
29000:1; Ausschnitt 55000:1

am untersuchten Material nicht eindeutig klären. Nach LOCKE und COLLINS (1965) erfolgt die Sequestrierung durch zwei gepaarte aus den Golgi- (oder Reticulum ?)

Membranen gebildete „Isolierungsmembranen“, von denen die innere später zugrunde geht (Abb. 5, Ausschnitt).

In der Umgebung autolytischer Vacuolen finden sich im Cytoplasma vereinzelt kleine Zerfallsherde, die morphologisch als Colliquationsnekrosen zu bezeichnen wären. Bläschenförmige Fragmente des Reticulums und freie Ribosomen liegen innerhalb eines aufgehellten, feinnetzigen Cytoplasmabereiches, der teils ohne deutliche Grenze in normal strukturiertes Cytoplasma übergeht, teils durch eine Membran begrenzt wird (Abb. 6).

Die in normalen Lebern regelmäßig vorkommenden peribiliären Körper, in denen histochemisch saure Phosphatase (HOLT und HICKS, 1961) und eine saure, gegen E 600 (Diäthyl-p-nitro-phenylphosphat) resistente Esterase (MILLER, 1964) nachgewiesen wurden und die daher als (sekundäre) Lysosomen aufgefaßt werden, sind nach Phalloidinvergiftung morphologisch nicht verändert oder vermehrt und zeigen keine bevorzugte Lage in der Umgebung der Nekrosherde oder der autolytischen Vacuolen. Es ergibt sich kein Hinweis, daß die Cytoplasmanekrosen oder die Bildung autolytischer Vacuolen durch ein Freiwerden von Hydrolasen aus peribiliären Lysosomen eingeleitet werden. Die morphologisch und biochemisch von den Lysosmen zu unterscheidenden Microbodies (DE DUVE und BAUDHUIN, 1966) sind während der Versuchsdauer nicht verändert.

Die Zahl der Glykogenpartikel schwindet mit zunehmender Dauer der Vergiftung in denjenigen Zellen, in denen Vacuolen oder Nekrosen aufgetreten sind; es finden sich aber noch 90 min nach Phalloidingabe Leberzellen mit kaum gestörter Feinstruktur, die reichlich Glykogen enthalten.

Die Mitochondrien bleiben während der ganzen Versuchsdauer morphologisch unverändert; auch in schwer vacuolisierten Leberzellen ist die Matrix von gleichmäßiger Dichte und die Anordnung der Cristae regelrecht.

Die interzellulären Gallenkapillaren sind in den frühen Vergiftungsstadien von normaler Weite und weisen zahlreiche Microvilli auf; in den späteren Stadien sind sie unter Schwund der Microvilli zum Teil beträchtlich erweitert. Einige Vacuolen sind in erweiterte Gallenkapillaren eingebrochen. Die Zellverbindungen (junctional complexes, FARQUHAR und PALADE, 1963) bleiben jedoch stets intakt und der Intercellularspalt jenseits der Zonula occludens eng.

Die Zisternen des Golgi-Apparates bleiben im allgemeinen eng, auch in der Nähe von Vacuolen, und enthalten, wie in den Kontrollen, z.T. dichteres, feinflockiges Material.

Der Dissésche Raum bleibt schmal; die in ihn hineinragenden Microvilli der Leberzellen sind nur verstrichen, wenn eine Vacuole nahe der Zellmembran liegt.

Eine Vermehrung von Fettropfen wurde nicht beobachtet. Die Struktur des Kernes und Nucleolus bleibt unverändert.

2. Rattenleber

a) Durchströmung ohne Phalloidin

Die Feinstruktur der Leberzellen wird während der Blinddurchströmung nur wenig verändert. Die Zisternen des glatten und rauen endoplasmatischen Reticulums und die perinukleäre Zisterne werden mit zunehmender Dauer der Durchströmung weiter (Abb. 7). Die Erweiterung betrifft zuerst das rauhwandige Re-

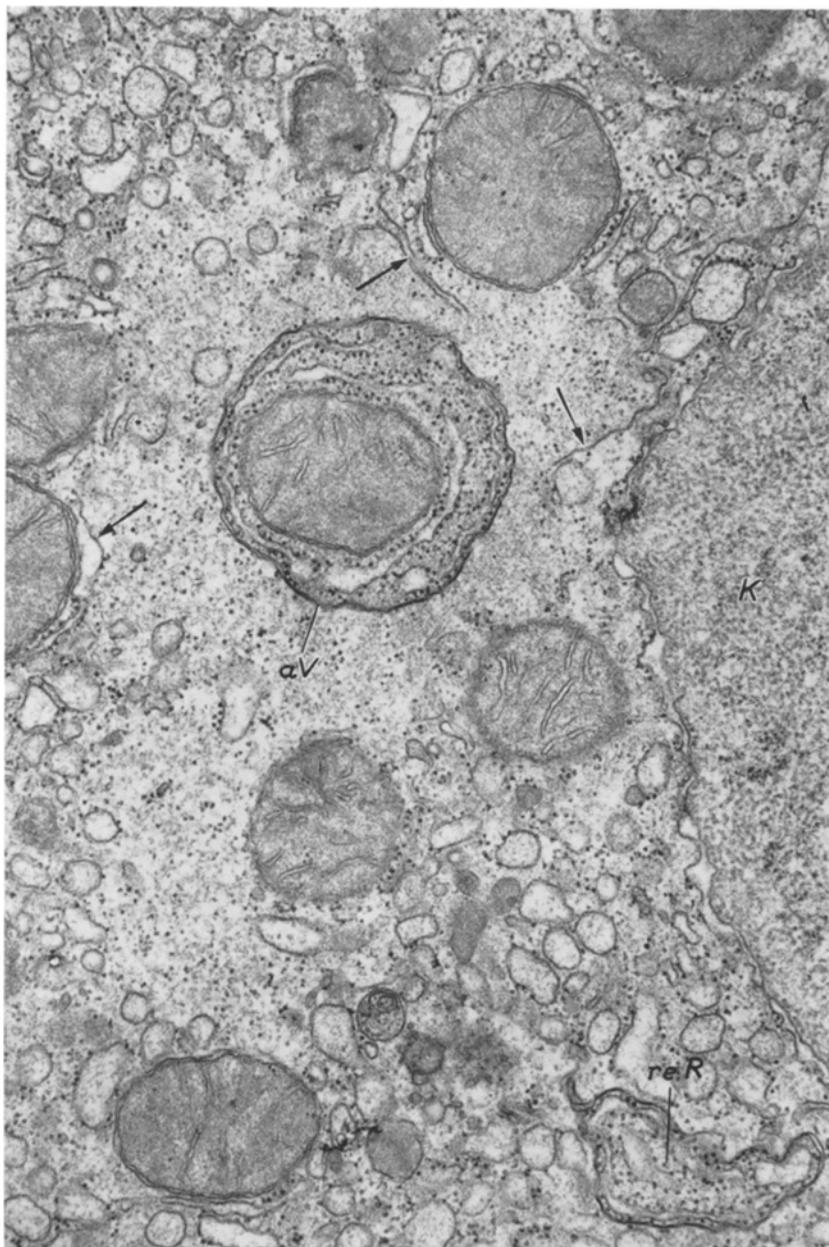


Abb. 6. Leberzelle der Maus 30 min nach Phalloidininjektion. Eine autolytische Vacuole (αV) mit sequestriertem Mitochondrium und rauhem endoplasmatischem Reticulum ist von einem aufgelockerten Cytoplasmahof umgeben, der Ribosomen und Bläschen des Reticulums enthält und der nur stellenweise durch eine Membran (\downarrow) abgegrenzt ist. Rechts unten Sequestrierung von rauhem endoplasmatischem Reticulum (reR). K Kern. (249/65). 31000:1

ticulum, während das glattwandige im Bereich der glykogenhaltigen Bezirke zunächst eng bleibt. Die Veränderung ist anfänglich herdförmig und auf einzelne

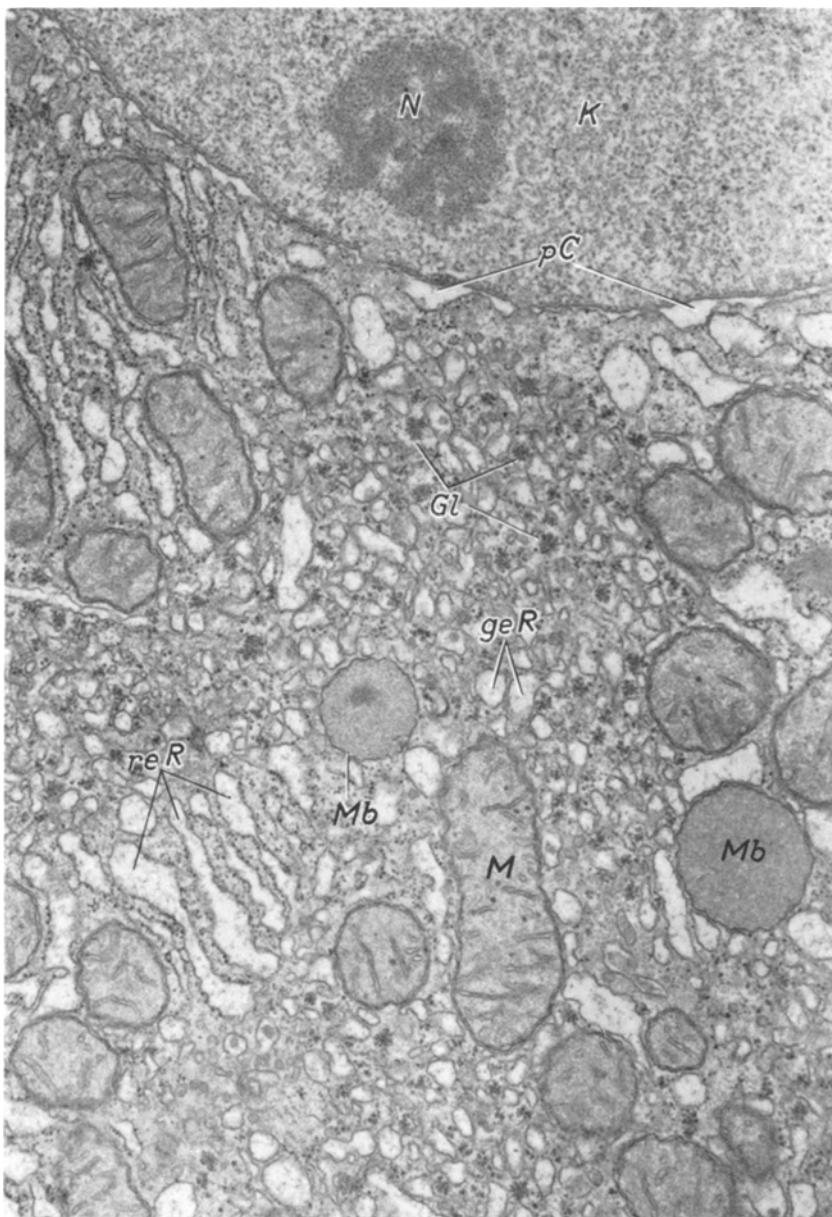


Abb. 7. Zelle der isolierten Rattenleber 30 min nach Beginn der Durchströmung (Blindversuch). Kern (K), Nucleolus (N), Mitochondrien (M) und Microbodies (Mb) nicht verändert. Perinukleäre Zisterne (pC) und Zisternen des rauhen (reR) und teilweise des glatten (geR) Reticulums im Bereich Glykogen-haltiger (Gl) Areale erweitert. (836/65). 22000:1

Zellen beschränkt, hat aber 90 min nach Beginn der Durchströmung alle Leberzellen erfaßt. Die Dissénschen Räume und der Intercellularspalt bleiben eng, die interzellulären Gallenkapillaren sind nicht erweitert und ihre Microvilli erhalten. Die peribiliären Lysosomen sind nicht verändert. 30 min nach Anlaufen der Durch-

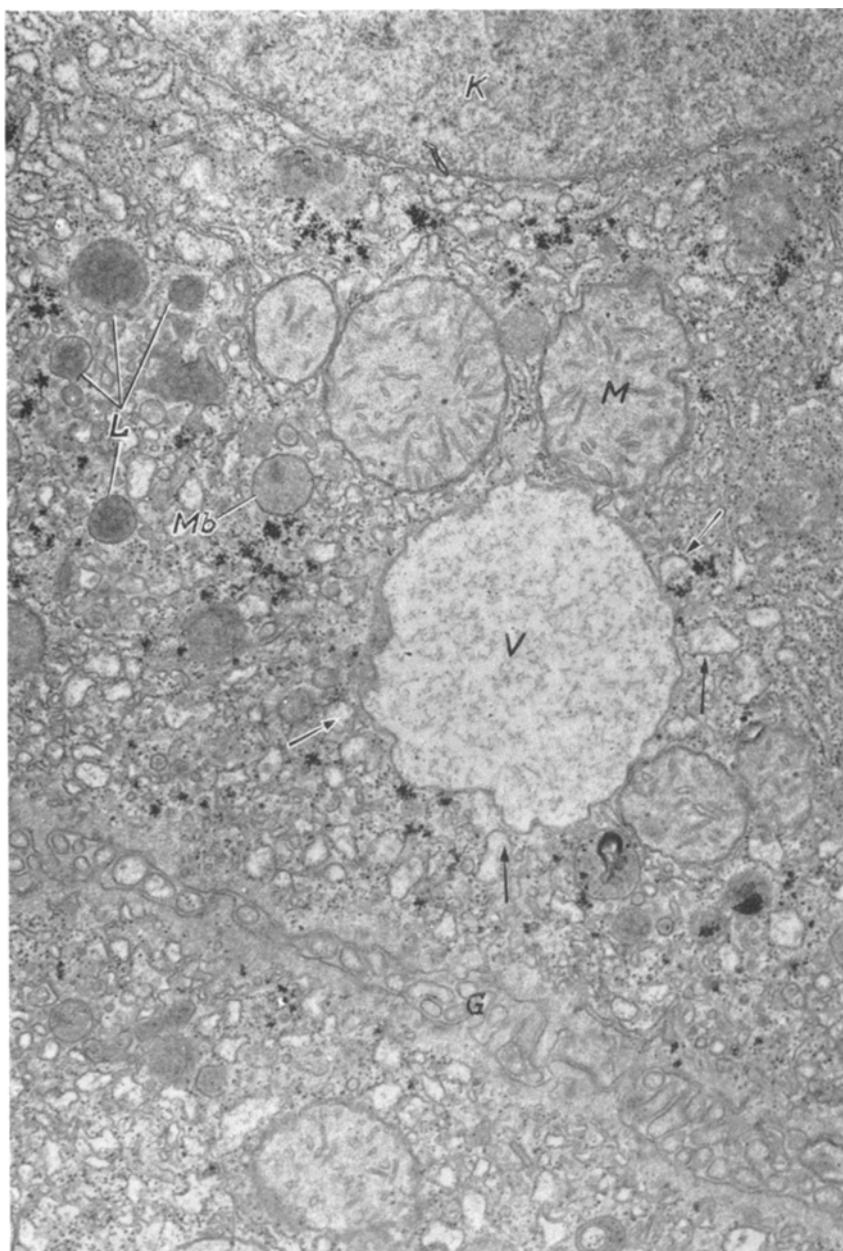


Abb. 8. Ausschnitt aus zwei Zellen der isolierten Rattenleber 30 min nach Beginn der Durchströmung und 10 min nach Phalloidinzusatz. 4μ große Vacuole (V) mit welliger Membran und erweiterten Cisternen des Reticulum (↓) in der Umgebung. Mitochondrien (M), Lysosomen (L), Microbody (Mb) und Kern (K) nicht verändert. Längs getroffene Gallencapillare (G) mit deutlichen Microvilli. (733/65). 20000:1

strömung treten vereinzelt autolytische Vacuolen auf, die Mitochondrien und Teile des endoplasmatischen Reticulum sequestrieren. Das Glykogen bleibt er-

halten, die Lipoidtropfen sind nicht vermehrt. Die Mitochondrien sind kaum verändert (Abb. 7); nach längerer Durchströmung finden sich vereinzelte fleckige Aufhellungen der Matrix und eine geringe Erweiterung des intracristalen Raumes. Die Kernstruktur bleibt unverändert. Es treten keine Vacuolen im Cytoplasma auf.

b) Durchströmung nach Zusatz von 20 mg Phalloidin zum Perfusat

Die Veränderungen entsprechen denen an der Mausleber nach subcutaner Injektion. 10 min nach Phalloidinzusatz treten vereinzelt 0,5—4 μ große, von

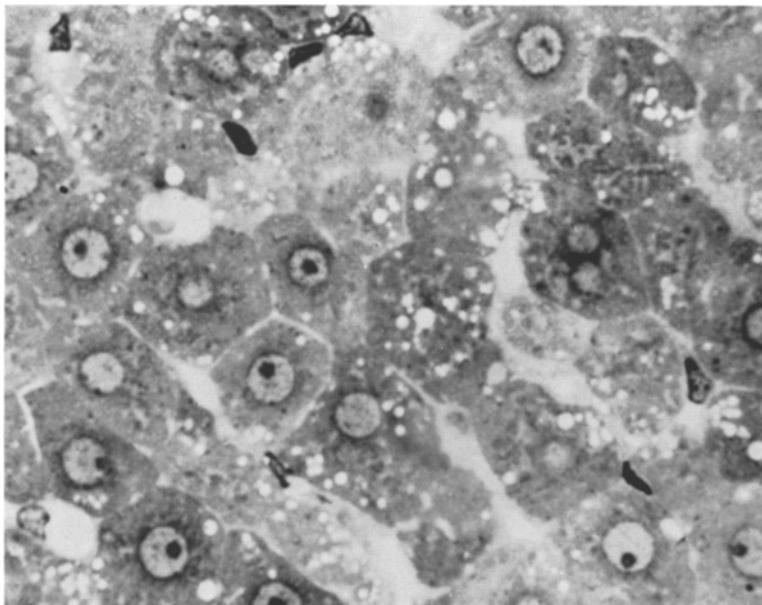


Abb. 9. Isolierte Rattenleber 30 min nach Beginn der Durchströmung und 90 min nach Phalloidinzusatz. Semidünner Eponschnitt. Grobe Vacuolisierung der Leberzellen (25/63—4). 800:1

einer Membran allseits umschlossene Vacuolen auf, deren Entstehung aus konfluierenden Bläschen des endoplasmatischen Reticulums wahrscheinlich ist (Abb. 8). Aus der oft zipfelförmigen Begrenzung und aus der engen Beziehung der Vacuolenmembran zu Bläschen des endoplasmatischen Reticulums kann vermutet werden, daß die Vacuolenmembran durch Einbeziehung von Membranen des endoplasmatischen Reticulum wächst. Der überwiegende Teil der Leberzellen bleibt, bis auf die präparationsbedingte leichte Erweiterung der Zisternen des endoplasmatischen Reticulum (s. o.), unverändert. Anzahl und Größe der Vacuolen nehmen mit der Dauer der Vergiftung zu (Abb. 9); 100 min nach Giftzusatz erreichen sie Durchmesser bis 15 μ , doch bleibt ihre Zahl geringer als in der subcutan vergifteten Mausleber und mehrfach gekammerte Vacuolensysteme treten nicht auf. Als Inhalt findet sich feinflockiges Material und in den Spätdiastadien feine Fasern von Fibrin. Kleinere Nekroseherde sieht man erstmalig 30 min nach Phalloidinzusatz. Autolytische Vacuolen sind ab diesem Zeitpunkt im Vergleich zur blinddurchströmten Leber ebenfalls häufiger und erreichen

Durchmesser bis zu 3μ ; einige enthalten bis zu 3 Mitochondrien neben endoplasmatischem Reticulum und Glykogenpartikeln (Abb. 10). Die Microbodies sind nicht verändert. Das Glykogen schwindet nur geringgradig. An den Mitochondrien (Abb. 10) treten auch 100 min nach Phalloidinzusatz keine anderen morphologischen Veränderungen auf, als sie bei der Blinddurchströmung angetroffen wurden.

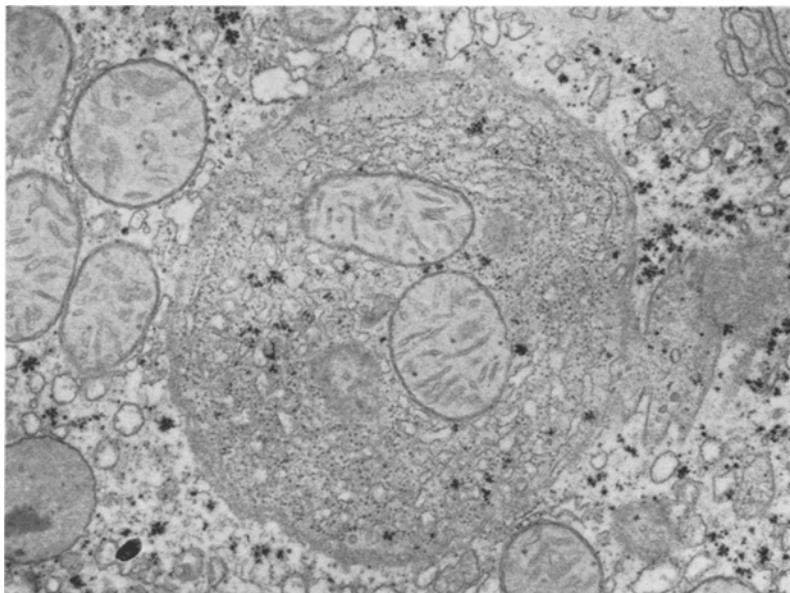


Abb. 10. Zelle der isolierten Rattenleber 30 min nach Beginn der Durchströmung und 100 min nach Phalloidinzusatz. Eine große autolytische Vacuole enthält drei Mitochondrien, rauhes und glattes endoplasmatisches Reticulum und Glykogenpartikel. (794/65). 19000:1

Diskussion

Die experimentelle Phalloidinvergiftung setzt eine Kette von Symptomen in Gang, die schließlich unter dem Zeichen der hämorrhagischen Leberdystrophie zum Tode führt. Bezuglich der Einzelheiten der vielfältigen Vergiftungerscheinungen, die im Laufe der Jahre mit biochemischen Methoden, vor allem bei Ratten und Mäusen, aufgedeckt wurden, sei auf zusammenfassende Darstellungen verwiesen (T. WIELAND und O. WIELAND, 1959; O. WIELAND, 1965). Was den primären Angriffspunkt der Toxine betrifft, so deutet einiges darauf hin, daß sie sich in erster Linie gegen Strukturen des endoplasmatischen Reticulums der Leber richten. So fand man bei Versuchen mit radioaktiv markiertem Phalloidin eine besonders starke Bindung des Giftstoffes an die Lebermicrosomen (REHBINDER et al. (1963). Versuche mit Lebermicrosomen phalloidinvergifteter Ratten hatten eine Hemmung der Proteinsynthese erkennen lassen (v. d. DECKEN et al., 1960). Auch morphologisch waren schon mit dem Lichtmikroskop auffallende vacuoläre Veränderungen des Lebercytoplasmas beobachtet worden (MATSCHINSKY et al., 1960).

Die fettfreien Vacuolen scheinen aus einer Erweiterung des endoplasmatischen Reticulums hervorzugehen. Eine eindeutige Klärung des Ablaufes der Vacuolen-

bildung war auch in den Frühstadien der Vergiftung nicht möglich, weil die Veränderungen nicht in allen Zellen synchron auftreten und weil geringe Erweiterungen des endoplasmatischen Reticulums nicht mit Sicherheit als Vorstufen der Vacuolisierung angesprochen werden dürfen; sie könnten auch durch örtlich unterschiedliche Folgen der Fixierung bedingt sein.

Die Vacuolenmembran zeigt den dreischichtigen Bau einer Elementarmembran und hat die gleiche Dicke (~ 65 Å) wie die Membranen des endoplasmatischen Reticulums (SJÖSTRAND, 1963; YAMAMOTO, 1963); dieser Befund und die geschilderten zipfelförmigen Ausbuchtungen sprechen immerhin für eine Herkunft und ein Wachstum der Vacuolenmembran aus den Membranen des endoplasmatischen Reticulums. Die feinflockige Beschaffenheit des Inhaltes weist auf das Vorhandensein einer eiweißreichen Flüssigkeit in den Vacuolen hin; fixiertes Blutplasma zeigt den gleichen Aspekt. Das Auftreten von Fibrin in den späteren Vergiftungsstadien deutet auf eine sekundäre Verbindung der Vacuolensysteme mit der Blutbahn hin. Fibrin wurde in Vacuolen von Leberzellen auch nach nekrogener Diät (SVOBODA et al., 1963), nach Allylformiat — (HAENNI, 1964) und Allylalkoholvergiftung (HÜBNER, 1965) und bei experimenteller Stauung (DAVID et al., 1965) gefunden.

Eine Erweiterung des endoplasmatischen Reticulums und eine Vacuolisierung des Cytoplasmas wurde nach experimentellen Schädigungen des Leberparenchyms beobachtet, z.B. nach zeitweiliger (HÜBNER und BERNHARD, 1961) oder vollständiger (MERKER et al., 1964) Unterbrechung des Kreislaufes, nach Drosselung der Lebervenen (DAVID et al., 1965), nach Tetrachlorkohlenstoffvergiftung (OBERLING und ROUILLER, 1956; REYNOLDS, 1963b; ASHWORTH et al., 1963), nach Vergiftung mit Diphtherietoxin (CAESAR und RAPAPORT, 1963) oder mit Blausäure, Malonsäure und Dinitrophenol (MÖLBERT, 1957), nach Sauerstoffmangel (MÖLBERT und GUERRITORE, 1957; HANZON, 1960), nach länger dauernder Autolyse *in vivo* (CAESAR, 1961) nach Allylformiat (HAENNI, 1964) und Allylalkoholvergiftung (HÜBNER, 1965). Die Erweiterung des endoplasmatischen Reticulums und das Auftreten von Vacuolen wird von vielen der genannten Autoren als erste morphologisch erfaßbare Veränderung geschildert; das endoplasmatische Reticulum reagiert demnach sehr empfindlich, doch morphologisch monoton auf vielfältige Schädigungen des Stoffwechsels.

Autolytische Vacuolen sind eine Sonderform der unter dem Lysosomenbegriff zusammengefaßten Zellorganellen (MILLER und PALADE, 1964; DE DUVE und WATTIAUX, 1966); ihr Auftreten zeigt an, daß umschriebene Cytoplasmabereiche verdaut werden. Der Abbau der in diesen Vacuolen sequestrierten Cytoplasmabestandteile spiegelt sich morphologisch in einem Verlust ihrer Struktur, meist unter zunehmender Verdichtung, und im Auftreten von Myelinfiguren; er scheint im allgemeinen mit der Bildung vielgestaltiger, dichter Restkörper zu enden (MILLER und PALADE, 1964). Das Auftreten von Cytoplasmanekrosen in der Umgebung autolytischer Vacuolen könnte darauf hindeuten, daß die Vacuolenmembran den Austritt von Hydrolasen aus den autolytischen Vacuolen am Phalloidin-vergifteten Tier nicht immer verhindert. Auch das Auftreten autolytischer Vacuolen ist als eine unspezifische Antwort der Zelle auf eine Vielzahl von Schädigungen zu werten.

Die Struktur des Kernes und der Mitochondrien bleibt während der untersuchten Stadien der akuten Vergiftung morphologisch unverändert. FIUME und LASCHI (1965) beschrieben 15 min nach intraperitonealer Injektion von 500 γ

Phalloidin bei der Ratte neben einer Erweiterung der Zisternen des endoplasmatischen Reticulums auch eine Schwellung der Mitochondrien; letzteres kann weder für die Maus noch für die Ratte bestätigt werden. Hingegen führt α -Amanitin, die langsam wirkende Komponente des Knollenblätterschwamms, zu primären Veränderungen der Leberzellkerne mit Zerfall des Nucleolus (FIUME und LASCHI, 1965).

Durch die vorliegenden Untersuchungen erfährt die Vorstellung über den vorwiegend mikrosomalen Angriffspunkt des Phalloidins eine morphologische Bestätigung. Der kausale Mechanismus der Phalloidinwirkung bleibt jedoch weiterhin ungeklärt; die aufgedeckten Veränderungen sind unspezifisch. Angesichts der tiefgreifenden Zerstörungen im Gefüge des endoplasmatischen Reticulums erscheint es bemerkenswert, daß die Struktur der Mitochondrien bis in das fortgeschrittene Vergiftungsstadium hinein unverändert erhalten bleibt.

Das bisher am frühesten faßbare Symptom der Phalloidin-Wirkung stellt das Versiegen der Galleproduktion schon wenige Minuten nach Giftverabreichung dar (MATSCHINSKY et al., 1960). Zum Verständnis dieses Effektes, der bei Perfusionsversuchen an der isolierten Rattenleber entdeckt wurde, liefern die vorliegenden Studien keine zusätzlichen Gesichtspunkte. In früheren Arbeiten war die Möglichkeit einer Entfesselung hydrolytischer Enzyme durch Phalloidin als Ursache der Zerstörung der Leberstruktur diskutiert worden (MATSCHINSKY et al., 1960). FRIMMER (1966) beobachtete neuerdings einen auffallenden Anstieg des Cathepsins und der sauren Phosphatase, also lysosomaler Enzyme, im Perfusionsmedium bei Durchströmung der isolierten Rattenleber mit Phalloidin. Die Vorstellung einer allgemeinen Aktivierung der Lysosomen erfährt durch die vorliegenden morphologischen Untersuchungen keine Unterstützung. Die Vacuolisierung des Cytoplasmas erfolgt ohne erkennbare Beteiligung der Lysosomen. Das Auftreten von Nekroseherden in der Umgebung autolytischer Vacuolen könnte jedoch auf ein Freiwerden von Hydrolasen aus den autolytischen Vacuolen nach Schädigung der Vacuolenmembran hindeuten. Dieser Frage muß durch histochemische Untersuchungen weiter nachgegangen werden.

Von besonderem Interesse erscheint die Beobachtung FIUME's (1965), daß neugeborene Ratten weniger stark gegen Phalloidin empfindlich sind, als ausgewachsene Tiere. In eigenen Versuchen konnten wir dies bestätigen und zeigen, daß 1—2 Wochen alte Ratten bis zum 80fachen der Phalloidinmenge, die beim erwachsenen Tier zum Tode führt, tolerieren (O. WIELAND und SZABADOS, 1966). Die Phalloidintoleranz neugeborener Tiere wurde von FIUME (1965) dahingehend diskutiert, daß in diesem Entwicklungsstadium noch bestimmte mikrosomale Enzyme fehlen, die das Phalloidin erst in den wirksamen Giftstoff umwandeln. Damit stünden auch Befunde in Einklang, wonach die Vorbehandlung erwachsener Ratten mit Substanzen, die mikrosomale Enzyme schädigen, wie Alloxan (MATSCHINSKY, 1959; VERNE et al., 1950), Thioacetamid (O. WIELAND und SZABADOS, 1966) und Na-Cinchophen (FLOERSHEIM, 1966) zu einer Steigerung der Phalloidinverträglichkeit führt. Umgekehrt haben Versuche, bei neugeborenen Ratten durch Vorbehandlung mit Barbituraten mikrosomale Enzyme zu induzieren und damit die Giftempfindlichkeit zu erhöhen, bisher nicht zum Erfolg geführt (SZABADOS, 1967).

Literatur

- ASHWORTH, C. T., F. J. LUIBEL, E. SANDERS, and N. ARNOLD: Hepatic cell degeneration. Correlation of fine structural with chemical and histochemical changes in hepatic cell injury produced by carbon tetrachloride in rats. *Arch. Path.* **75**, 212 (1963).
- CAESAR, R.: Elektronenmikroskopische Untersuchungen bei der Autolyse in vivo. *Verh. dtsch. Ges. Path.* **45**, 278 (1961).
- , u. M. RAPAPORT: Elektronenmikroskopische Untersuchung des Leberzellenschadens bei der Diphtherietoxinvergiftung. *Frankfurt. Z. Path.* **72**, 517 (1963).
- DAVID, H., A. HECHT u. I. UERLINGS: Elektronenmikroskopische Befunde an der experimentellen Stauungsleber. *Acta biol. med. germ.* **15**, 513 (1965).
- DECKEN, A. v. D., H. LÖW u. T. HULTIN: Über die primären Wirkungen von Phalloidin in Leberzellen. *Biochem. Z.* **332**, 503 (1960).
- DUVE, C. DE, and R. WATTIAUX: Functions of lysosomes. *Ann. Rev. Physiol.* **28**, 435 (1966).
- , and P. BAUDHUIN: Peroxisomes (Microbodies and related particles). *Physiol. Rev.* **46**, 323 (1966).
- FARQUHAR, M. G., and G. E. PALADE: Junctional complexes in various epithelia. *J. Cell Biol.* **17**, 375 (1963).
- FIUME, L.: Mechanism of action of Amanita Phalloides. *Lancet* **1965 I**, 1284.
- , e R. LASCHI: Lesioni ultrastrutturali prodotte nelle cellule parenchimali epatiche dalla falloidina e dalla α -amanitina. *Lo Sperimentale* **115**, 288 (1965).
- FLOERSHEIM: Persönliche Mitteilung 1966.
- FRIMMER: Persönliche Mitteilung 1966.
- HAENNI, B.: Les effets de l'intoxication aiguë au formiate d'allyl sur le foie de rat. Etude au microscope électronique. *Path. et Microbiol. (Basel)* **27**, 974 (1964).
- HANZON, V.: Hypoxic vacuolization of the liver cell. In: European Regional Conference on Electron Microscopy, Delft 1960, (A. L. HOUWINK and B. J. SPIT, eds.). Delft, De Nederlandse Vereniging voor Electronenmicroscopie, vol. 2, p. 903 (1960).
- HOLT, S. J., and R. M. HICKS: The localization of acid phosphatase in rat liver cells as revealed by combined cytochemical staining and electron microscopy. *J. biophys. biochem. Cytol.* **11**, 47 (1961).
- HRUBAN, Z., B. SPARGO, H. SWIFT, R. W. WISSLER, and R. G. KLEINFELD: Focal cytoplasmic degradation. *Amer. J. Path.* **42**, 657 (1963).
- HÜBNER, G.: Zur Genese der großen cytoplasmatischen Einschlußvakuolen. *Naturwissenschaften* **52**, 136 (1965).
- , u. W. BERNHARD: Das submikroskopische Bild der Leberzelle nach temporärer Durchblutungssperre. *Beitr. path. Anat.* **125**, 1 (1961).
- LOCKE, M., and J. V. COLLINS: The structure and formation of protein granules in the fat body of an insect. *J. Cell Biol.* **26**, 857 (1965).
- LUFT, J. H.: Improvements in epoxy resin embedding methods. *J. biophys. biochem. Cytol.* **9**, 409 (1961).
- MATSCHINSKY, F.: Zum Wirkungsmechanismus des Knollenblätterpilzgiftes Phalloidin. *Diss. München* 1959.
- , u. O. WIELAND: Über Serumveränderungen und Störungen der Mitochondrienfunktion bei experimenteller Phalloidinvergiftung. *Biochem. Z.* **333**, 33 (1960).
- , U. MEYER u. O. WIELAND: Die Wirkung des Knollenblätterpilzgiftes Phalloidin auf die isolierte Rattenleber. *Biochem. Z.* **333**, 48 (1960).
- MERKER, H. J., J. WEDELL u. D. NEUBERT: Biochemische und strukturelle Veränderungen an den Zellorganellen der Leber nach vollständiger Kreislaufunterbrechung. *Naunyn-Schmiedebergs Arch. exp. Path. Pharmak.* **249**, 85 (1964).
- MILLER, F.: Elektronenmikroskopisch-histochemischer Nachweis von saurer Esterase in Lysosomen der Leber. *Beitr. path. Anat.* **130**, 253 (1964).
- , and G. E. PALADE: Lytic activities in renal protein absorption droplets. *J. Cell Biol.* **23**, 519 (1964).

- MÖLBERT, E.: Das elektronenmikroskopische Bild der Leberparenchymzelle nach histotoxischer Hypoxydose. *Beitr. path. Anat.* **118**, 203 (1957).
- , u. D. GUERRITORE: Elektronenmikroskopische Untersuchungen am Leberparenchym bei akuter Hypoxie. *Beitr. path. Anat.* **117**, 32 (1957).
- NOVIKOFF, A. B.: Biochemical and staining reactions of cytoplasmic constituents. In: *Developing Cell Systems and Their control* (D. RUDNIK, ed.) p. 167. New York: Ronald Press Co. 1960.
- OBERLING, C., et C. ROUILLER: Les effets de l'intoxication aiguë au tétrachlorure de carbone sur le foie du rat. *Ann. Anat. path.* **1**, 401 (1956).
- REHBINDER, D., G. LÖFFLER u. O. WIELAND: Studien über den Mechanismus der Giftwirkung des Phalloidins mit radioaktiv markierten Giftstoffen. *Hoppe Seylers Z. physiol. Chem.* **331**, 132 (1963).
- REYNOLDS, E. S.: The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy. *J. Cell Biol.* **17**, 208 (1963a).
- Liver parenchymal cell injury. I. Initial alterations of the cell following poisoning with carbon tetrachloride. *J. Cell Biol.* **19**, 139 (1963b).
- SJÖSTRAND, F. S.: A comparison of plasma membrane, cytomembranes, and mitochondrial membrane elements with respect to ultrastructural features. *J. Ultrastruct. Res.* **9**, 561 (1963).
- SOVOBODA, D. J., and J. HIGGINSON: Ultrastructural hepatic changes in rats on a necrogenic diet. *Amer. J. Path.* **43**, 477 (1963).
- SZABADOS, A.: Diss. München 1967 (in Vorbereitung).
- TRUMP, B. F., E. A. SMUCKLER, and E. P. BENDITT: A method for staining epoxy sections for light microscopy. *J. Ultrastruct. Res.* **5**, 343 (1961).
- VERNE, I., P. F. CECCALDI, et S. HÉBERT: Action de l'amanite sur le rat à diabète alloxanique. *C. R. Soc. Biol. (Paris)* **144**, 645 (1950).
- WIELAND, O.: Formen und klinische Bedeutung nicht hereditärer Enzymstörungen im Bereich innerer Erkrankungen. *Verh. dtsch. Ges. inn. Med.* **70**, 548 (1964).
- Changes in liver metabolism induced by the poisons of *Amanita Phalloides*. *Clin. Chem.* **2**, 323 (1965).
- , and A. SZABADOS: Further studies on the mechanism of action of the poisons of *Amanita Phalloides*. VI. *Internat. Kongr. für Klinische Chemie*, München 1966, Abstract 261, G. 3. Basel: S. Karger 1966.
- WIELAND, T., u. W. SCHÖN: Über die Giftstoffe des grünen Knollenblätterpilzes. (X. Mitt.) Die Konstitution des Phalloidins. *Liebigs Ann.* **539**, 157 (1955).
- , and O. WIELAND: Chemistry and toxicology of the toxins of *Amanita Phalloides*. *Pharmacol. Rev.* **11**, 87 (1959).
- YAMAMOTO, T.: On the thickness of the unit membrane. *J. Cell Biol.* **17**, 413 (1963).

Prof. Dr. F. MILLER
Pathologisches Institut der Universität
8 München 15, Thalkirchnerstr. 36

Prof. Dr. O. WIELAND
Institut für Klinische Chemie,
Krankenhaus Schwabing
8 München 23, Kölner Platz 1